



中南药 学

ZHONGNAN YAOXUE

月刊 2003 年 4 月创刊 第 23 卷 第 4 期 (总第 231 期) 2025 年 4 月 20 日出版

顾问

周宏灏

主编

李焕德

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) 84895602/82258487

传真: (0731) 82258487

邮发代号: 42-290

投稿网址: <http://znyx.cbpt.cnki.net>

email: znyxzz2003@vip.163.com

中国标准连续出版物号

ISSN 1672-2981

CN43-1408/R

2025 年版权归《中南药 学》

编辑部所有

目 次

研究论文

- (871) 基于 UPLC-QTRAP-MS/MS 技术分析不同释药部位静宁微丸在血、脑、肠的成分分布 张永强, 胡盼祥, 孔佳辉, 等
- (880) 吡柔比星脂质体的制备及体内外评价 姬浩洁, 韩文豪, 姜宇, 等
- (887) 基于网络药理学和体外实验探讨郁金精油抗心脏肥大的作用机制 王虎, 宁静, 李亭亭, 等
- (893) 基于生信分析与实验验证探讨糖肾灌肠方改善糖尿病肾病的作用机制 余辉, 王先敏, 王冲, 等
- (901) 基于 GC-MS 和 UHPLC-TOF-MS 的“秦药”酸枣仁化学成分分析 陈文文, 郑淑娴, 曹宇, 等
- (908) 球形化工艺对吸入粉雾剂流动性及体外雾化性能的影响 周玉童, 杨玉兰, 王晓飞
- (914) 雷公藤红素改善睡眠剥夺小鼠肝损伤的机制研究 赵红梅, 徐红丹, 赵静玉, 等
- (922) 新型 FGF21 类似物 DC2303 对代谢相关脂肪性肝病的初步药效学评价 沈蕾, 邱云良, 赵飞, 等
- (929) 响应面法优化老鹳草水提工艺及其抗炎作用研究 王美玲, 兰卫
- (935) 基于 Ghrelin 水平调控探讨玉液汤改善过氧化氢诱导 SHSY-5Y 细胞氧化应激损伤机制研究 朱宏喆, 张瑞华, 张雨涵, 等
- (941) 地黄九蒸九晒炮制工艺的优选及色度值、pH 值与内在成分的相关性分析 马彦江, 于兰兰, 陈天朝, 等
- (948) 以 PD-L1 为靶点的核酸适配体类 PET 显像药物 ⁶⁸Ga-NOTA-PEG₅-AT45 的设计、合成以及肿瘤显像研究 陈小娟, 欧阳林旗
- (953) 镰形棘豆提取物抗氧化、抑菌活性评估和高活性部位 UPLC-MS/MS 分析研究 叶财发, 沈秋莲, 李娜, 等
- (961) 氧化当归多糖水凝胶的制备与表征 尚上, 王灵敏, 杨帆, 等
- (969) 基于特征图谱、网络药理学和实验验证探究克银丸治疗银屑病的潜在作用机制 王晓凡, 刘苏杰, 阮佳鑫, 等
- (978) 四子定喘汤调控巨噬细胞极化改善幼龄哮喘大鼠气道炎症的实验研究 王保团, 姜德, 陈乙菲, 等

《中南药学》杂志第五届编委会

主编

李焕德

副主编 (排名不分先后)

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 (排名不分先后)

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 姜月芬
宫 建 祝德秋 秦红岩 袁 成
袁 易 贾素洁 夏道宗 原永芳
徐 珽 徐 萍 徐必学 徐华丽
高利臣 郭 韧 郭怀忠 郭建军
唐 芳 曹 玲 常福厚 章超凡
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 睢大箕 肇丽梅
翟 青 黎 敏 颜 苗 潘卫三
魏高文

(983) 滇鸡血藤提取物微丸的制备及其评价

..... 朱倩, 史文娟, 杨玉畅, 等

(990) 基于整合药理学手段探究灯盏生脉胶囊治疗缺血性脑卒中的作用机制

..... 吕丹, 张琪苓, 刘宇灵, 等

(997) 基于系统药理学探究栀子苷改善阿尔茨海默病的作用机制及实验验证

..... 崔珊珊, 姜晶, 薛慧, 等

(1004) 在体单向肠灌注法探讨黄芪桂枝五物汤中主要活性成分的肠吸收特性

..... 姚爱娜, 张慧中, 徐晓涵, 等

(1010) 注射用 HYR-PB21 在带状疱疹后神经痛患者体内的药代动力学研究

..... 易利丹, 王亚平, 邹定全, 李欣, 燕强勇, 等

(1015) 基于网络药理学和实验验证探究复方芪茵颗粒治疗非酒精性脂肪性肝病的影响

..... 杨珍, 刘宏炳, 黄梦, 等

(1021) 基于口腔溃疡药效筛选结合 Box-Behnken 响应面法优化小儿化毒散提取工艺

..... 徐卓, 廖倩, 林龙飞, 等

(1029) 鸡骨草石油醚萃取物对四氯化碳诱导肝纤维化小鼠调节作用的代谢组学研究

..... 赵静玉, 吴芳芳, 朱琳, 等

综述

(1036) 间质性膀胱炎及其膀胱内给药制剂研究进展

..... 李玉卓, 郑依婷, 廖永红

(1044) 转化生长因子- β 在前列腺癌中的研究进展

..... 刘徽, 江沛, 张祥宇

(1052) 糖尿病前期胰岛素抵抗的发病机制及经典复方干预的研究进展

..... 杨星, 郑承红, 张利芳, 等

(1060) I 类组蛋白去乙酰化酶在心脏线粒体功能中调控作用的研究进展

..... 陈鑫婷, 王玉婷, 何新宇, 等

(1066) 黄芪多糖在治疗 2 型糖尿病及其并发症中的研究进展

..... 李小龙, 韩超, 郭万慧, 等

(1073) 微球载药系统在肿瘤治疗中的应用研究进展

..... 舒金丫, 郝贵周, 杜丽平, 等

(1081) 药食同源中药防治尿酸性肾病研究进展

..... 闫思雅, 杜思邈, 杨凤岩, 等

药学监护在临床营养支持治疗中的实践专题

(1089) 新生儿标准化全营养混合液组方的稳定性研究

..... 赵晶晶, 谢锦凤, 杨亮, 等

(1094) 营养支持治疗药学监护系统的临床实践评价

..... 王伟娇, 朱虚阳, 刘文凯, 等

青年编委（排名不分先后）

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 秦 超
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
陆窈窕

本刊声明：

本刊已入编中国知网、万方等数据库，其收录论文作者著作权使用费与本刊稿酬一并支付。凡不同意编入数据库的稿件，请在来稿时声明。

除非特别声明，本刊刊出的所有文章不代表本刊编委会的观点。

药物分析与检验

- (1100) UPLC-MS/MS 法同时测定卷柏中 6 种双黄酮和炔酚的含量
..... 温静，倪帅聪，王婷，等
- (1105) 红花清肝十三味丸中非法染色剂 808 猩红的测定
..... 王秋实，吴琦，赵猛，等
- (1109) 经典名方开心散基准样品 HPLC 指纹图谱及多指标成分含量测定研究
..... 李大伟，单晓晓，汪海宣，等

医院药学

- (1117) 基于 R 语言分析我院药物相关性跌倒管理数据及经验分享
..... 文洋，侯君，李咏冰，等
- (1123) 依沃西单抗联合卡铂和培美曲塞一线治疗晚期非鳞状非小细胞肺癌患者的成本-效用分析
..... 唐玺，胡林，苏远，等
- (1129) 递法明片在某院眼科门诊的超说明书用药分析及循证评价
..... 王静，张颖，张慧芝，等
- (1134) 基于网状 meta 分析的三唑类药物预防血液病患者侵袭性真菌感染的安全性和有效性评价
..... 杨学英，杨亮蕊，任雁飞，等
- (1141) 生殖医药联合门诊管理多囊卵巢综合征患者的药学服务实践
..... 赵路，张梅，姚尧，等
- (1147) 基于真实世界数据的集采注射用醋酸卡泊芬净治疗真菌感染的有效性、安全性和经济性评价
..... 李红桥，夏雯，李兰，等
- (1153) 临床药师主导整合的妇科术后分级镇痛管理模式的建立与评价
..... 雷伟，张梅，马新秀，等
- (1160) 基于加权逼近理想解排序法的肠外营养用药合理性评价
..... 赵晓晓，刘智化，祝子明，等

中药与临床

- (1164) 中药复方疗效预测的算法及应用
..... 陈亚飞，王国玉，于亚南，等

临床药师在临床

- (1170) 1 例牙髓卟啉单胞菌所致化脓性脑膜炎药学实践分析
..... 姚佳，郭玉金，陈玉民，等
- (1173) 罕见突变肺癌患者使用谷美替尼致重度水肿 1 例
..... 雀苏云，罗芬，王可欣，等

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*m*A4*306*zh*P*30.0*700*47*2025-4

本期责任编辑：邬志娟，彭金飞，李科，陆窈窕

英文编辑：周静

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 23, Number 4 April 20 2025

Consultant

ZHOU Hong-hao

Editor-in-Chief

LI Huan-de

Chief of Editorial Department

WU Zhi-juan

Directed by

Hunan Association for Science and
Technology

Edited by

Editorial Board of Central South
Pharmacy (139 Middle Renmin
Road, Changsha, China)

Tel

(0731) 84895602/82258487

Fax

(0731) 82258487

Website of Authors

<http://znyx.cbpt.cnki.net>

Email

znyxzz2003@vip.163.com

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

CONTENTS IN BRIEF

- (871) Blood, brain and intestine components of Jingning pellets from different release sites based on UPLC-QTRAP-MS/MS technology
..... ZHANG Yong-qiang, HU Pan-xiang, KONG Jia-hui, et al
- (880) Preparation and in vitro and vivo evaluation of pirarubicin liposomes
..... JI Hao-jie, HAN Wen-hao, JANG Yu, et al
- (887) Mechanism of *Curcuma aromatica* essential oil against cardiac hypertrophy based on network pharmacology and experimental verification
..... WANG Hu, NING Jing, LI Ting-ting, et al
- (893) Molecular mechanism of Tangshen Guanchang prescription in improving diabetic nephropathy based on bioinformatics and experiment verification
..... YU Hui, WANG Xian-min, WANG Chong, et al
- (901) Phytochemical components of Qin medicine *Ziziphi Spinosae Semen* by GC-MS and UHPLC-TOF-MS
..... CHEN Wen-wen, ZHENG Shu-xian, CAO Yu, et al
- (908) Effect of spheronization process on the flowability and in vitro nebulization of dry powder inhalers
..... ZHOU Yu-tong, YANG Yu-lan, WANG Xiao-fei
- (914) Mechanism of celastrol in ameliorating liver injury in sleep-deprivation mice ZHAO Hong-mei, XU Hong-dan, ZHAO Jing-yu, et al
- (922) Preliminary pharmacological effect of novel FGF21 analogue DC2303 on metabolic dysfunction-associated fatty liver disease
..... SHEN Lei, QIU Yun-liang, ZHAO Fei, et al
- (929) Optimization of the aqueous extraction of *Geranium wilfordii* Maxim. and its anti-inflammation properties WANG Mei-ling, LAN Wei
- (935) Mechanism of Yuye decoction in improving hydrogen peroxide induced oxidative stress injury of SHSY-5Y cells based on Ghrelin levels
..... ZHU Hong-zhe, ZHANG Rui-hua, ZHANG Yu-han, et al
- (941) Optimization of nine steaming and nine sun-drying processing for *Rehmannia glutinosa* and correlation between chromaticity, pH and components
..... MA Yan-jiang, YU Lan-lan, CHEN Tian-chao, et al
- (948) Design, synthesis, and tumor imaging of a new aptamer PET imaging drug ^{68}Ga -NOTA-PEG₅-AT45 for targeting PD-L1
..... CHEN Xiao-juan, OU-YANG Ling-qi
- (953) Antioxidant and antibacterial activity of *Oxytropis falcata* Bunge extract and UPLC-MS/MS characterization of its highly-active fraction
..... YE Cai-fa, SHEN Qiu-lian, LI Na, et al

Price

¥ 30.00 an issue

¥ 360.00 a year

CSSN

ISSN 1672-2981

CN43-1408/R

Copyright 2025 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.

- (961) Preparation and characterization of oxidized *Angelica sinensis* polysaccharide hydrogel
..... SHANG Shang, WANG Ling-min, YANG Fan, et al
- (969) Determination of quality markers of Keyin pills and their therapeutic effect on psoriasis WANG Xiao-fan, LIU Su-jie, RUAN Jia-xin, et al
- (978) Experimental study of Sizi Dingchuan decoction regulating macrophage polarization to improve airway inflammation in young asthmatic rats
..... WANG Bao-tuan, JIANG De, CHEN Yi-fei, et al
- (983) Preparation and evaluation of Kadsurae Caulis extract pellets
..... ZHU Qian, SHI Wen-juan, YANG Yu-chang, et al
- (990) Mechanism and main effective components of Dengzhan Shengmai capsules for ischemic stroke based on integrated pharmacology and pharmacodynamics LYU Dan, ZHANG Qi-ling, LIU Yu-ling, et al
- (997) Mechanism and experiment verification of geniposide in improving Alzheimer's disease based on system pharmacology
..... CUI Shan-shan, JIANG Jing, XUE Hui, et al
- (1004) Intestinal absorption characteristics of Huangqi Guizhi Wuwu decoction by in situ single-pass intestinal perfusion
..... YAO Ai-na, ZHANG Hui-zhong, XU Xiao-han, et al
- (1010) Pharmacokinetics of HYR-PB21 in patients with postherpetic neuralgia
..... YI Li-dan, WANG Ya-ping, ZOU Ding-quan, et al
- (1015) Effect of Fufang Qiyin granules on non-alcoholic fatty liver disease based on network pharmacology and experimental verification
..... YANG Zhen, LIU Hong-bing, HUANG Meng, et al
- (1021) Optimization of the extraction of Xiaer Huadu powder by Box-Behnken response surface method in oral ulcer efficacy screening
..... XU Zhuo, LIAO Qian, LIN Long-fei, et al
- (1029) Metabolomics of the therapeutic effect of *Abrus cantoniensis* Hance on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in mice and related mechanism
..... ZHAO Jing-yu, WU Fang-fang, ZHU Lin, et al
- (1036) Research progress in interstitial cystitis and intravesical drug formulas
..... LI Yu-zhuo, ZHENG Yi-ting, LIAO Yong-hong
- (1044) Research progress of transforming growth factor beta in prostate cancer
..... LIU Hui, JIANG Pei, ZHANG Xiang-yu
- (1052) Research progress in the pathogenesis of insulin resistance in prediabetes and the intervention of classical compound prescriptions
..... YANG Xing, ZHENG Cheng-hong, ZHANG Li-fang, et al
- (1060) Advances in the regulatory role of class I histone deacetylase in cardiac mitochondrial function
..... CHEN Xin-ting, WANG Yu-ting, HE Xin-yu, et al
- (1066) Research progress in *Astragalus* polysaccharide for type 2 diabetes mellitus and its complications
..... LI Xiao-long, HAN Chao, GUO Wan-hui, et al
- (1073) Research progress in the application of microsphere drug delivery system in tumor therapy SHU Jin-ya, HAO Gui-zhou, DU Li-ping, et al

- (1081) Research progress in prevention and treatment of uric acid nephropathy with food homologous traditional Chinese medicine
..... YAN Si-ya, DU Si-miao, YANG Feng-yan, *et al*
- (1090) Stability of standardised total nutrition admixture formulations for neonates
..... ZHAO Jing-jing, XIE Jin-feng, YANG Liang, *et al*
- (1094) Clinical practice evaluation of pharmaceutical monitoring system for nutritional support therapy
..... WANG Wei-jiao, ZHU Xu-yang, LIU Wen-kai, *et al*
- (1100) Simultaneous determination of 6 biflavonoids and selaginellins in *Selaginella tamariscina* by UPLC-MS/MS
..... WEN Jing, NI Shuai-cong, WANG Ting, *et al*
- (1105) Detection of illegally added 808 scarlet in Honghua Qinggan Shisanwei pills
..... WANG Qiu-shi, WU Qi, ZHAO Meng, *et al*
- (1109) HPLC fingerprints and multi-index components content determination of classical prescription Kaixin powder
..... LI Da-wei, SHAN Xiao-xiao, WANG Hai-xuan, *et al*
- (1117) Drug-related fall management data and experience in a hospital based on R language WEN Yang, HOU Jun, LI Yong-bing, *et al*
- (1123) Cost-utility analysis of ivonescimab in combination with carboplatin and pemetrexed for the first-line treatment of patients with advanced nonsquamous non-small cell lung cancer TANG Xi, HU Lin, SU Yuan, *et al*
- (1129) Evidence-based evaluation of the off-label use of difrarel tablets in the ophthalmology clinic of a hospital
..... WANG Jing, ZHANG Ying, ZHANG Hui-zhi, *et al*
- (1134) Safety and efficacy of mesh meta-analysis of triazole for prevention of invasive fungal infections in patients with hematologic diseases
..... YANG Xue-ying, YANG Liang-rui, REN Yan-fei, *et al*
- (1141) Pharmaceutical care for patients with polycystic ovary syndrome via reproductive medicine combined with outpatient pharmaceutical care
..... ZHAO Lu, ZHANG Mei, YAO Yao, *et al*
- (1147) Effectiveness, safety, and cost-effectiveness of centralized procurement of caspofungin acetate injection for fungal infections based on real-world data
..... LI Hong-qiao, XIA Wen, LI Lan, *et al*
- (1153) Establishment and evaluation of a graded pain management model after gynecological surgery led by clinical pharmacists
..... LEI Wei, ZHANG Mei, MA Xin-xiu, *et al*
- (1160) Evaluation of rationality of parenteral nutrition based on TOPSIS
..... ZHAO Xiao-xiao, LIU Zhi-hua, ZHU Zi-ming, *et al*
- (1164) Algorithms and applications of efficacy prediction of traditional Chinese medicine compound formulas
..... CHEN Ya-fei, WANG Guo-yu, YU Ya-nan, *et al*

研究论文

基于 UPLC-QTRAP-MS/MS 技术分析不同释药部位 静宁微丸在血、脑、肠的成分分布

张永强, 胡盼祥, 孔佳辉, 张慧中, 徐晓涵, 李诗曼, 曲昌海, 尹兴斌, 董晓旭*, 倪健* (北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

摘要: **目的** 基于 UPLC-QTRAP-MS/MS 技术对给予自发性高血压大鼠 (SHR) 不同释药部位静宁微丸后的入血、入脑及入肠成分进行定量分析。**方法** 建立 SHR 大鼠的血浆、脑组织和肠组织中药物成分的含量测定方法, 并对不同释药部位静宁微丸 (胃溶、肠溶、结肠溶) 的入血、入脑及入肠成分进行定量检测。**结果** 本研究建立的含量测定方法专属性良好; 各成分在 $0.1 \sim 100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好 ($r > 0.99$); 基质效应与提取回收率的 *RSD* 均小于 14.9%; 24 h 稳定性、反复冻融稳定性、长期稳定性 *RSD* 均小于 12.7%。不同释药部位静宁微丸给药后, 大鼠血浆、脑和结肠中戈米辛 J 含量最高, 回肠中细叶远志皂苷含量最高。太子参环肽 B、细叶远志苷 A 和五味子乙素等 5 种成分在血浆、脑组织和肠组织的分布趋势也存在差异。**结论** 通过综合对比分析不同释药部位静宁微丸在血、脑及肠中的成分异同, 为挖掘治疗注意缺陷多动障碍的活性成分, 揭示其药效物质基础提供依据。

关键词: 静宁微丸; UPLC-QTRAP-MS/MS; 入血成分; 入脑成分; 入肠成分

中图分类号: R914.1, R283 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)04-0871-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.001

Blood, brain and intestine components of Jingning pellets from different release sites based on UPLC-QTRAP-MS/MS technology

ZHANG Yong-qiang, HU Pan-xiang, KONG Jia-hui, ZHANG Hui-zhong, XU Xiao-han, LI Shi-man, QU Chang-hai, YIN Xing-bin, DONG Xiao-xu*, NI Jian* (School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488)

Abstract: **Objective** To analyze the blood, brain, and intestine components of Jingning pellets from different release sites in spontaneously hypertensive rats (SHR) by UPLC-QTRAP-MS/MS. **Methods** A method was developed to quantitatively determine drug components in the plasma, brain tissue, and intestinal tissue of SHR, as well as the entry of Jingning pellets (the stomach, intestine and colon) into the blood, brain, and intestine at different drug release sites. **Results** The method established in this study was specific for the content determination. The linear relationship between each component was good within the range of $0.1 \sim 100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r > 0.99$). The matrix effect and *RSD* of extraction recovery rate were both less than 14.9%. The *RSDs* of 24 h stability, repeated freeze-thaw stability, and long-term stability were all less than 12.7%. After the administration of Jingning pellets at different release sites, the content of gomisins J in the blood, brain, and colon of rats was the highest, while the content of tenuifolin in the ileum was the highest. The distribution of 5 components

基金项目: 国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目 (No.zyyzdxk-2023272); 国家自然科学基金资助项目 (No.81973492)。

作者简介: 张永强, 男, 硕士研究生, 主要从事中药新剂型与新技术研究, email: zyq1572448183@163.com *通信作者: 倪健, 男, 教授, 主要从事中药新剂型与新技术研究, email: njtcm@263.net; 董晓旭, 男, 副教授, 主要从事中药新剂型与新技术研究, email: dxiaoxv@163.com

(heterophyllin B, tenuifoliside A, and schisandrin B, etc.) in the blood, the brain, and the intestine also varied. **Conclusion** Through comprehensive comparison of similarities and differences in the components of Jingning pellets in the blood, the brain, and the intestine at different release sites, this study provides a basis for exploring the active ingredients for attention deficit hyperactivity disorder and revealing the material basis of its efficacy.

Key words: Jingning pellet; UPLC-QTRAP-MS/MS; blood component; brain component; intestinal component

注意缺陷多动障碍 (attention deficit hyperactivity disorder, ADHD) 是一种以注意力缺陷、多动与冲动为特征的神经发育障碍^[1]。中医认为 ADHD 主要病机为阴阳失衡, 阴静不足, 阳动有余, 临床上常见气阴两虚型^[2]。静宁方是北京中医药大学东直门医院王俊宏主任医师的临床经验方, 全方由太子参、熟地黄、枸杞子、五味子、远志、石菖蒲、茯苓等药味组成, 具有益气养阴、安神定志的功效, 对于气阴两虚型 ADHD 有显著的临床疗效^[3], 能明显改善患者多动、注意力不集中等核心症状^[4]。静宁方治疗 ADHD 的作用机制研究多集中于单胺类神经递质及其相关通路方面^[5-8], 也涉及氧化应激^[3]、微生物-脑肠轴^[9]等途径。

课题组前期对静宁方药物成分及口服吸收入血成分进行了鉴定, 并进一步制备了胃溶、肠溶、结肠溶不同释药部位微丸, 从“微生物-脑肠轴”角度探讨了不同释药部位静宁制剂对 ADHD 模型大鼠的治疗作用及机制^[10]。研究发现静宁肠溶微丸和结肠溶微丸对 ADHD 模型大鼠的整体改善作用优于胃溶微丸, 肠溶微丸和结肠溶微丸对不同指标的改善作用各有侧重, 提示胃溶、肠溶、结肠溶制剂药效物质与作用途径可能存在差异^[10]。因此, 本研究基于 UPLC-QTRAP-MS/MS 技术对不同释药部位静宁微丸在血、脑及肠中的成分开展定量分析, 对比不同释药部位的成分差异及其活性成分的体内暴露量, 为揭示其药效物质基础及作用机制提供依据。

1 材料

1.1 仪器

NexeraX2LC-30AD 型超高效液相色谱 (日本岛津公司); SCIEXQTRAP6500 型三重四极杆串联线性离子阱质谱 (美国 SCIEX 公司); ME104/02 型电子天平 [精度: 0.1 mg, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]; MM400 型冷冻混合研磨仪 (德国 Retsch 公司); Centrifuge5810R 型低温冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); CentriVap 型真空离心浓缩仪 (美国 Labconco 公司); MilliQIQ7000 型实验室超纯水机 (德国默克公司)。

1.2 试药

静宁胃溶微丸、肠溶微丸、结肠溶微丸 (批号分别为: 20201129、20201213、2021011, 规格: 1.5 g/袋, 实验室自制)。尼莫地平 (批号: Y17A6C2469)、延胡索甲素 (批号: M25HB179211)、太子参环肽 B (批号: P2007F23170)、五味子乙素 (批号: Y26F11Y17148) (纯度均 $\geq 98\%$, 上海源叶生物科技有限公司); 戈米辛 J (批号: DSTDG003801)、细叶远志苷 A (批号: DST201025) (纯度均 $\geq 98\%$, 成都德思特生物技术有限公司); 细叶远志皂苷 (批号: 20183-47-5, 纯度: 100%, 上海诗丹德标准技术服务有限公司)。

戊巴比妥钠 (批号: Y2015012102, 上海曦耀生物科技有限公司); 甲醇 (质谱级)、乙腈 (色谱级) (赛默飞世尔科技有限公司)。

1.3 动物

雄性 SHR 大鼠, SPF 级, 3 周龄, 体重 50 ~ 60 g, 购自斯贝福 (北京) 有限公司, 许可证号: SCXK (京) 2019-0010。实验均依据北京中医药大学实验动物伦理委员会批准的指南和操作规程进行, 批准编号为 BUCM-2023022204-1192。

2 方法与结果

2.1 大鼠血浆、脑组织和肠组织中药物成分含量测定方法学的建立

2.1.1 色谱和质谱条件 色谱柱: WatersACQUITYU-PLCBEHC₁₈ 色谱柱 (1.7 μm , 2.1 mm $\times$ 50 mm); 流动相: 含有 0.05% 甲酸的乙腈-甲醇 ($V/V = 1:1$) 溶液 (A) 和 0.05% 甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱, 洗脱程序见表 1、2; 流速: 0.3 mL $\cdot$ min⁻¹; 进样量: 5 μL ; 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$; 自动进样器温度: 8 $^{\circ}\text{C}$ 。

表 1 流动相梯度洗脱程序 (正离子模式)		
Tab 1 Gradient elution program of mobile phase (positive ion mode)		
时间 /min	A/%	B/%
0	5	95
2	40	60
4	80	20
6	100	0
7.5	100	0
7.6	5	95
10	5	95

表 2 流动相梯度洗脱程序 (负离子模式)

Tab 2 Gradient elution program of mobile phase (negative ion mode)

时间 /min	A/%	B/%
0	5	95
2	20	80
4	40	60
6	100	0
7.5	100	0
7.6	5	95
10	5	95

质谱条件: 电喷雾离子源, 采用正、负离子模式扫描, 多反应监测, 离子源温度: 350 ℃, 气帘气: 35 psi, 碰撞气: 中等, 离子电压: 5000/—3500 V, 喷雾气和辅助加热气均为 55 psi, 尼莫地平为负离子检测模式的内标物, 延胡索甲素为正离子检测模式的内标物。具体参数见表 3。

表 3 化合物 MRM 及其质谱参数

Tab 3 Compound MRM and its mass spectrometry parameters

化合物	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	去簇电 压 /V	碰撞电 压 /V
尼莫地平	417.0	122.1	— 85	— 25
细叶远志皂苷	679.1	455.2	— 200	— 38
细叶远志苷 A	681.3	443.2	— 160	— 34
戈米辛 J	387.4	372.3	— 110	— 27
五味子乙素	401.0	300.0	160	34
太子参环肽 B	779.0	751.3	205	44
延胡索甲素	370.1	192.3	90	41

2.1.2 对照品溶液和内标溶液的配制 取太子参环肽 B、细叶远志皂苷、细叶远志苷 A、戈米辛 J、五味子乙素 5 种对照品适量, 精密称定, 以甲醇为溶剂配制成质量浓度为 5 mg · mL⁻¹ 的对照品储备液。精密量取各对照品储备液适量, 用甲醇稀释成质量浓度为 50 μg · mL⁻¹ 的中间溶液, 再以 50% 甲醇稀释, 获得系列质量浓度为 1000、500、200、100、50、20、10、5、2、1 ng · mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

取尼莫地平、延胡索甲素对照品适量, 精密称定, 以甲醇为溶剂配制成质量浓度为 5 mg · mL⁻¹ 的内标储备液。精密量取各内标储备液适量, 用甲醇稀释成 50 μg · mL⁻¹ 的中间溶液, 再以 50% 甲醇精密稀释成尼莫地平 and 延胡索甲素质量浓度分别为 10 ng · mL⁻¹ 和 20 ng · mL⁻¹ 的内标溶液。

2.1.3 血浆、脑组织和肠组织的处理 精密吸取大鼠血浆 45 μL, 加入 5 μL 内标溶液、450 μL 含有 0.1% 甲酸的乙腈 - 甲醇 (V/V = 1:1) 溶液, 涡旋 5 min, 4 ℃ 离心 (13 000 r · min⁻¹, 10 min), 取上清液 400 μL, 旋干, 加入 60 μL 50% 甲醇复溶, 涡旋 1 min, 超声 10 min, 4 ℃ 离心 (13 000 r · min⁻¹, 10 min), 离心 2 次, 取上清液进样分析。

精密称取大鼠脑组织和肠组织 0.1 g, 浸入液氮中冷冻, 研磨仪 (频率 25 Hz, 5 min, 研磨两次) 将脑组织匀浆, 加入 1 mL 80% 甲醇 - 乙腈溶液, 涡旋 1 min, 超声 20 min 提取, 再次涡旋 1 min, 4 ℃ 离心 (13 000 r · min⁻¹, 10 min), 取上清液 800 μL 作为空白组织提取液, 加入 10 μL 内标溶液, 旋干, 加入 100 μL 50% 甲醇复溶, 涡旋 1 min, 超声 10 min, 4 ℃ 离心 (13 000 r · min⁻¹, 10 min), 离心 2 次, 取上清液进样分析。

2.1.4 质量控制样品的制备 取空白血浆 / 脑组织 / 肠组织按 “2.1.3” 项下方法操作, 制备低浓度 (0.3 ng · mL⁻¹)、中浓度 (4 ng · mL⁻¹) 和高浓度 (80 ng · mL⁻¹) 的质量控制样品。

2.1.5 专属性考察 取空白血浆 / 脑组织 / 肠组织、含内标和对照品的空白血浆 / 脑组织 / 肠组织、给药后大鼠血浆 / 脑组织 / 肠组织样品, 按照 “2.1.3” 项下方法处理进样。色谱图见图 1 ~ 3。结果表明该方法专属性良好, 空白血浆 / 脑组织 / 肠组织中的内源性成分不干扰待测成分的检测。

2.1.6 标准曲线与定量下限 取空白血浆、空白脑组织提取液和空白肠组织提取液适量, 分别加入内标溶液和混合对照品溶液适量, 按照 “2.1.3” 项下方法处理, 制成质量浓度分别为 0.10、0.20、0.50、1.00、2.00、5.00、10.00、20.00、50.00、100 ng · mL⁻¹ 的样品溶液, 进样测定, 以各对照品浓度为横坐标 (*X*), 各对照品和内标物的峰面积之比为纵坐标 (*Y*), 进行线性回归。定量下限浓度 0.10 ng · mL⁻¹ 的样品平行制备 5 份, 进样测定, 结果见表 4。各成分在 0.1 ~ 100 ng · mL⁻¹ 内线性关系良好 (*r* > 0.99), 定量下限精密度 *RSD* 均小于 14.9%, 准确度 *RE* 在 -14.0% ~ 19.0%, 符合生物样品分析要求。

2.1.7 精密度与准确度 按照 “2.1.4” 项下方法制备低、中、高浓度质控样品, 每个浓度平行 5 份, 同日内连续进样计算日内精密度与准确度, 连续测定 3 d, 计算日间精密度与准确度。

血浆 / 脑组织 / 肠组织中各成分的精密度和准确度结果见表 5。各成分在血浆 / 脑组织 / 肠组织中日内及日间精密度 *RSD* 均小于 10.5%, 日内及日间准确度在 -14.7% ~ 13.4%, 符合生物样本测试要求。

2.1.8 稳定性 按照 “2.1.4” 项下方法制备低、中、高浓度质控样品, 每个浓度平行 5 份, 考察质控样品在不同条件下的稳定性情况。—80 ℃ 下放置 14 d, 作为长期冻融稳定性; 在 -80 ℃ 反复冻融 3 次, 作为反复冻融稳定性; 样品处理后在自动进样器 (4 ℃) 放置 24 h, 作为 24 h 稳定性。结果显示, 3 种考察条件下各成分 *RSD* 均小

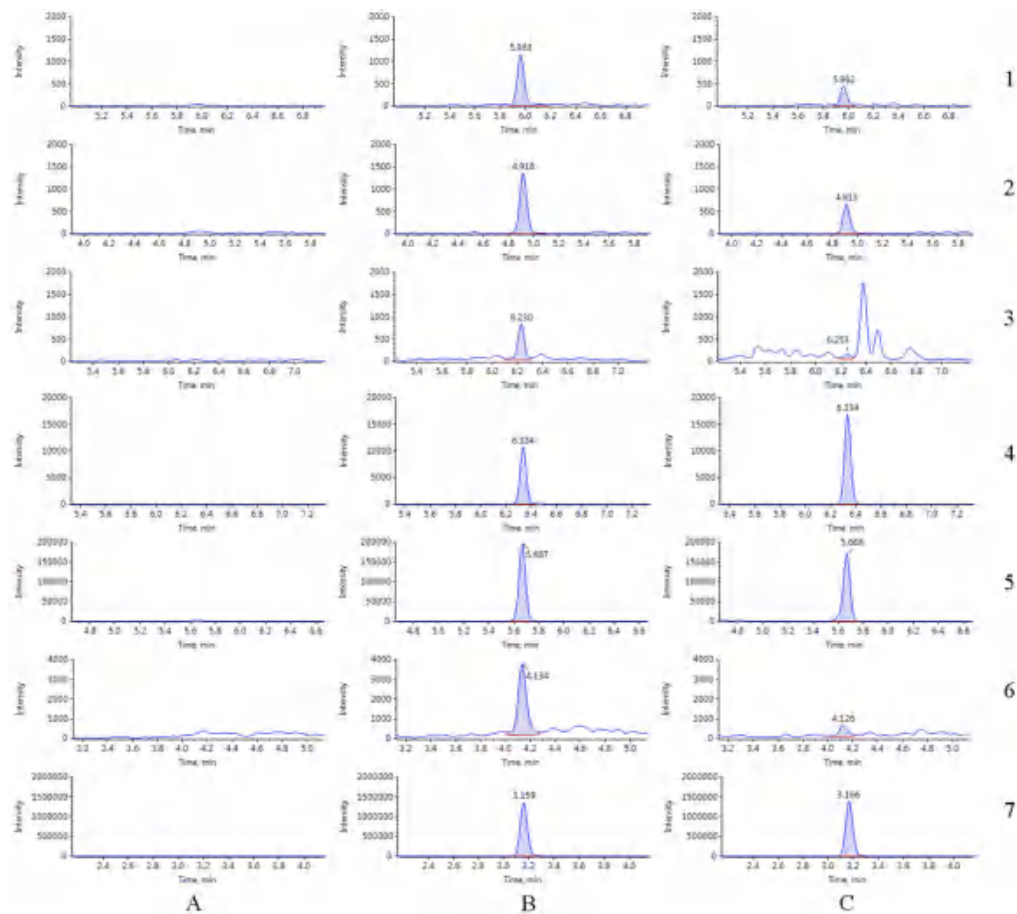


图 1 血浆中 7 种成分及内标的色谱图

Fig 1 Chromatogram of 7 components and internal standards in plasma

A. 空白血浆 (blank plasma) ; B. 含对照品血浆 (plasma contains control) ; C. 给药血浆 (medicated plasma) ; 1. 细叶远志皂苷 (tenuifolin) ; 2. 细叶远志苷 A (tenuifolide A) ; 3. 戈米辛 J (gomisin J) ; 4. 尼莫地平 (nimodipine) ; 5. 五味子乙素 (schisandrin B) ; 6. 太子参环肽 B (heterophyllin B) ; 7. 延胡索甲素 (corydaline)

表 4 各成分在血浆 / 脑组织 / 肠组织中的标准曲线和定量下限

Tab 4 Standard curves and quantification limits of each component in plasma/brain tissue/intestinal tissue						
化合物	基质	标准曲线	<i>r</i>	定量下限 (<i>n</i> = 5)		
				实测值 / (ng · mL ⁻¹)	精密度 <i>RSD</i> /%	准确度 <i>RE</i> /%
细叶远志皂苷	血浆	$Y = 7.426 \times 10^{-2}X + 4.97 \times 10^{-3}$	0.9977	0.102 ± 0.013	12.75	2.00
	脑	$Y = 4.426 \times 10^{-2}X + 3.1 \times 10^{-4}$	0.9992	0.103 ± 0.005	4.85	3.00
	肠	$Y = 3.183 \times 10^{-2}X + 6.66 \times 10^{-3}$	0.9977	0.103 ± 0.009	8.74	3.00
细叶远志苷 A	血浆	$Y = 0.2845X + 7.05 \times 10^{-3}$	0.9971	0.119 ± 0.002	1.68	19.00
	脑	$Y = 0.1176X - 7.9 \times 10^{-4}$	0.9946	0.100 ± 0.013	13.00	0.00
	肠	$Y = 0.3317X + 4.250 \times 10^{-2}$	0.9981	0.094 ± 0.014	14.89	- 6.00
戈米辛 J	血浆	$Y = 1.202 \times 10^{-2}X + 1.21 \times 10^{-3}$	0.9970	0.113 ± 0.007	6.19	13.00
	脑	$Y = 9.24 \times 10^{-3}X + 1.58 \times 10^{-3}$	0.9988	0.096 ± 0.005	5.21	- 4.00
	肠	$Y = 1.765 \times 10^{-2}X + 7.4 \times 10^{-4}$	0.9965	0.095 ± 0.007	7.37	- 5.00
五味子乙素	血浆	$Y = 5.825 \times 10^{-2}X + 1.54 \times 10^{-3}$	0.9964	0.110 ± 0.004	3.64	10.00
	脑	$Y = 7.999 \times 10^{-2}X + 3.10 \times 10^{-3}$	0.9974	0.099 ± 0.010	10.10	- 1.00
	肠	$Y = 0.1355X + 5.1 \times 10^{-4}$	0.9935	0.099 ± 0.007	7.07	- 1.00
太子参环肽 B	血浆	$Y = 1.371 \times 10^{-2}X + 1.2 \times 10^{-4}$	0.9980	0.086 ± 0.004	4.65	- 14.00
	肠	$Y = 3.097 \times 10^{-2}X + 3.421 \times 10^{-2}$	0.9995	0.106 ± 0.007	6.60	6.00

于 12.7%, *RE* 在 - 13.3% ~ 14.0%, 表明各成分在血浆 / 脑组织 / 肠组织中稳定性良好。

2.1.9 基质效应与提取回收率 按照“2.1.4”项下方法制备低、中、高浓度质控样品, 测定峰面

积作为基质样品含量。基质效应为基质样品待测物含量与纯溶剂样品待测物含量之比。制备处理前加标的样品。提取回收率为处理前加标的样品中待测物的含量与基质样品待测物含量之比。

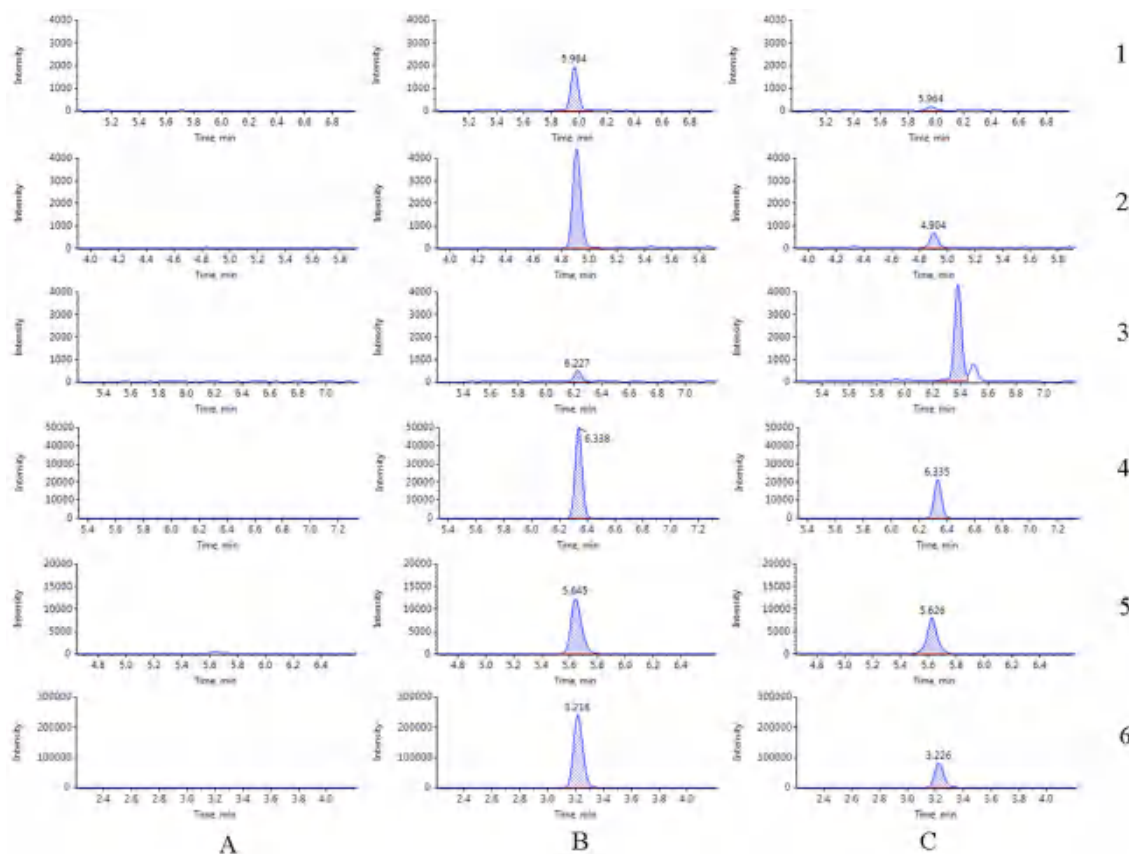


图 2 脑组织中 6 种成分及内标的色谱图

Fig 2 Chromatograms of 6 components and internal standards in brain tissue

A. 空白脑组织 (blank brain tissue); B. 含对照品脑组织 (brain tissue contains control); C. 给药脑组织 (medicated brain tissue); 1. 细叶远志皂苷 (tenuifolin); 2. 细叶远志苷 A (tenuifolisin A); 3. 戈米辛 J (gomisin J); 4. 尼莫地平 (nimodipine); 5. 五味子乙素 (schisandrin B); 6. 延胡索甲素 (corydaline)

结果显示, 细叶远志皂苷、细叶远志苷 A、戈米辛 J、五味子乙素、太子参环肽 B 在血浆、脑组织、肠组织中的基质效应均在 45.8% ~ 176.8%, 提取回收率分别在 34.15% ~ 125.5%, 各成分在血浆 / 脑组织 / 肠组织不同基质中基质效应与提取回收率 *RSD* 均小于 14.9%, 满足生物样品分析要求。

2.2 不同释药部位静宁微丸入血、入脑和入肠成分定量测定

2.2.1 动物分组与给药 3 周龄 SHR 大鼠适应性饲养 7 d 后, 随机分为静宁胃溶微丸组 (JW)、静宁肠溶微丸组 (JC)、静宁结肠溶微丸组 (JJ) 和空白组, 每组 6 只。给药剂量以生药计 10.12 g / (kg · d), 分别相当于本研究中静宁制剂的等效剂量胃溶微丸 5.25 g / (kg · d)、肠溶微丸 6.30 g / (kg · d) 和结肠溶微丸 6.30 g / (kg · d)。药物采用 1.5%CMC-Na 混悬, 每日称量体重后分 2 次灌胃, 连续给药 7 d。空白组给予 1.5%CMC-Na。末次给药 1 h 后腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 (0.04 mL · kg⁻¹) 麻醉, 腹主动脉取血, 4 °C 离心 (3000 r · min⁻¹, 10 min), 取上清液即得血浆。大鼠腹

主动脉取血后立即脱颈处死, 取脑、回肠、结肠组织, 生理盐水清洗干净, 滤纸擦干后称重。

2.2.2 不同释药部位静宁微丸的入血成分定量测定结果 静宁微丸血浆中共测定了 5 种成分, 其中太子参环肽 B 含量低于定量下限, 后续未进行测定分析。血浆中戈米辛 J 含量最高, 其次为五味子乙素, 细叶远志苷 A 和细叶远志皂苷含量较低。统计学分析发现, 胃溶微丸组 4 种成分含量显著高于肠溶微丸组和结肠溶微丸组, 肠溶微丸组和结肠溶微丸组各成分含量差异均无统计学意义, 结果见图 4。

2.2.3 不同释药部位静宁微丸的入脑成分定量测定结果 3 种微丸给药后脑组织中各成分含量排序一致, 为戈米辛 J > 五味子乙素 > 细叶远志苷 A > 细叶远志皂苷。其中 3 组戈米辛 J 含量差异无统计学意义; 统计学分析发现, 五味子乙素在胃溶组含量最高, 约为肠溶组和结肠溶组的 3 倍; 细叶远志苷 A 在肠溶组含量最高, 约为胃溶组和结肠溶组的 2.3 倍和 1.5 倍, 细叶远志皂苷在结肠溶组含量最高, 约为胃溶组和肠溶组的 2 倍和 1.3 倍, 结果见图 5。

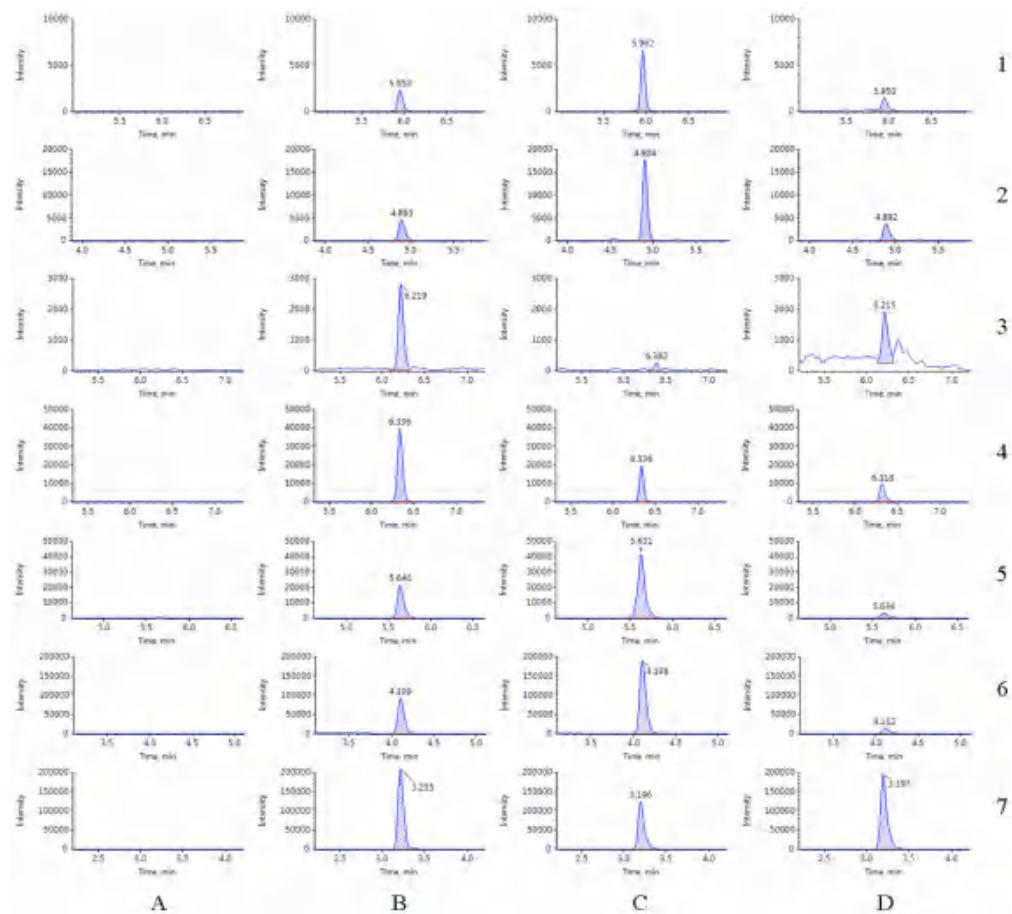


图3 肠组织中7种成分及内标的色谱图

Fig 3 Chromatogram of 7 components and internal standards in the intestinal tissue

A. 空白肠组织 (blank intestinal tissue) ; B. 含对照品肠组织 (intestinal tissues containing control) ; C. 给药回肠组织 (medicated ileum tissue) ; D. 给药结肠组织 (medicated colon tissue) ; 1. 细叶远志皂苷 (tenuifolin) ; 2. 细叶远志苷 A (tenuifolide A) ; 3. 戈米辛 J (gomisin J) ; 4. 尼莫地平 (nimodipine) ; 5. 五味子乙素 (schisandrin B) ; 6. 太子参环肽 B (heterophyllin B) ; 7. 延胡索甲素 (corydaline)

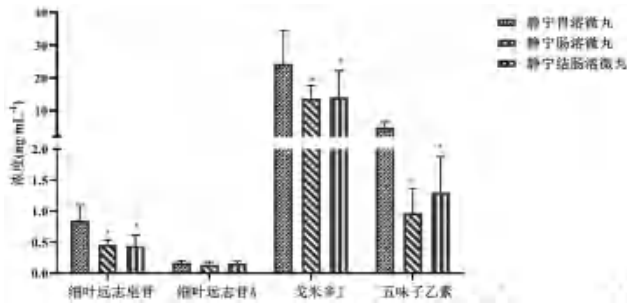


图4 不同释药部位静宁微丸入血成分定量测定结果

Fig 4 Quantitative determination of blood components of Jingning pellets from different release sites

注: 与胃溶微丸组比较, $^*P < 0.05$ 。

Note: Compared with the gastric pellets group, $^*P < 0.05$ 。

2.2.4 不同释药部位静宁微丸的回肠中成分定量测定结果 3种微丸给药后回肠组织中各成分暴露量排序一致, 为细叶远志皂苷>细叶远志苷A>太子参环肽B>戈米辛J>五味子乙素。统计学分析发现, 除戈米辛J外, 其余4种成分在肠溶微丸组含量最高。胃溶微丸组戈米辛J含量

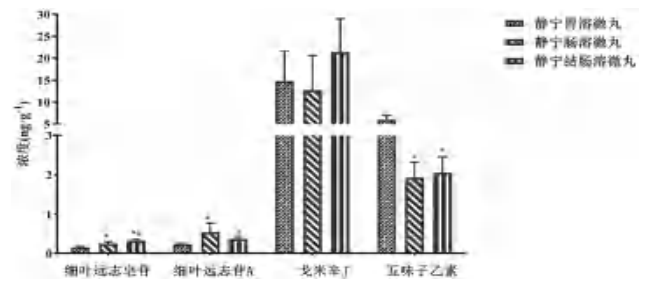


图5 不同释药部位静宁微丸脑内药物成分定量测定结果 ($n = 6$)

Fig 5 Quantitative determination results of drug components in the brain of Jingning pellets from different release sites ($n = 6$)

注: 与胃溶微丸组比较, $^*P < 0.05$; 与肠溶微丸组比较, $^{\#}P < 0.05$ 。

Note: Compared with the gastric pellets group, $^*P < 0.05$; compared with the enteric pellets group, $^{\#}P < 0.05$ 。

约为结肠溶微丸组的1.8倍, 与肠溶微丸组差异无统计学意义, 结果见图6。

2.2.5 不同释药部位静宁微丸的结肠中成分定量测定结果 不同释药部位静宁微丸结肠中成分含量最高的是戈米辛J, 其次是太子参环肽B和细

表 5 各成分在血浆 / 脑组织 / 肠组织中的精密度和准确度 (n = 5)

Tab 5 Precision and accuracy of each component in the plasma/brain tissue/intestinal tissue (n = 5)

化合物	基质	质量浓度 / (ng · mL ⁻¹)	实测值 / (ng · mL ⁻¹)		RSD/%		RE/%	
			日内	日间	日内	日间	日内	日间
细叶远志皂苷	血浆	0.3	0.326±0.015	0.313±0.025	4.54	7.99	8.67	4.33
		4	4.524±0.054	4.520±0.059	1.18	1.31	13.10	13.00
		80	86.973±1.423	87.772±3.324	1.64	3.79	8.72	9.72
	脑	0.3	0.263±0.004	0.275±0.020	1.46	7.31	— 12.33	— 8.33
		4	4.150±0.332	4.257±0.284	7.99	6.68	3.75	6.42
		80	76.675±2.111	77.329±2.569	2.75	3.32	— 4.16	— 3.34
	肠	0.3	0.311±0.026	0.301±0.024	8.47	7.97	3.67	0.33
		4	4.191±0.190	4.055±0.299	4.54	7.37	4.78	1.37
		80	82.240±2.997	79.061±6.763	3.64	8.55	2.80	— 1.17
细叶远志苷 A	血浆	0.3	0.340±0.005	0.334±0.014	1.58	4.19	13.33	11.33
		4	4.524±0.027	4.521±0.069	0.60	1.53	13.10	13.03
		80	89.234±1.367	87.131±3.246	1.53	3.73	11.54	8.91
	脑	0.3	0.256±0.001	0.266±0.014	0.33	0.05	— 14.67	— 11.33
		4	4.127±0.340	4.266±0.258	8.24	6.06	3.17	6.65
		80	76.237±2.004	78.807±3.525	2.63	4.47	— 4.70	— 1.49
	肠	0.3	0.325±0.014	0.310±0.022	4.45	7.10	8.33	3.33
		4	3.809±0.275	4.159±0.310	7.21	7.45	— 4.78	3.98
		80	79.531±4.841	84.375±4.794	6.09	5.68	— 0.59	5.47
戈米辛 J	血浆	0.3	0.320±0.021	0.304±0.022	6.47	7.24	6.67	1.33
		4	4.122±0.288	3.935±0.396	7.00	10.06	3.05	— 1.63
		80	90.315±1.205	84.609±6.314	1.33	7.46	12.89	5.76
	脑	0.3	0.279±0.014	0.299±0.024	4.91	8.09	— 7.00	— 0.33
		4	3.998±0.201	4.001±0.343	5.03	8.57	— 0.05	0.03
		80	76.968±4.880	83.200±5.985	6.34	7.19	— 3.79	4.00
	肠	0.3	0.300±0.018	0.306±0.027	6.09	8.82	0.00	2.00
		4	4.254±0.241	4.276±0.208	5.66	4.86	6.35	6.90
		80	84.696±6.374	85.259±5.128	7.53	6.01	5.87	6.57
五味子乙素	血浆	0.3	0.336±0.007	0.327±0.025	1.94	7.65	12.00	9.00
		4	4.282±0.079	4.313±0.144	1.85	3.34	7.05	7.82
		80	76.510±2.252	75.501±4.476	2.94	5.93	— 4.36	— 5.62
	脑	0.3	0.318±0.003	0.279±0.029	1.08	10.39	6.00	— 7.00
		4	4.041±0.327	3.746±0.290	8.10	7.74	1.03	— 6.35
		80	81.632±3.298	75.057±5.514	4.04	7.35	2.04	— 6.18
	肠	0.3	0.307±0.007	0.327±0.016	2.31	4.89	2.33	9.00
		4	4.172±0.231	4.380±0.206	5.53	4.70	4.30	9.50
		80	70.098±1.537	71.193±2.152	2.19	3.02	— 12.38	— 11.01
太子参环肽 B	血浆	0.3	0.266±0.013	0.286±0.030	4.88	10.49	— 11.33	— 4.67
		4	3.466±0.072	3.726±0.352	2.09	9.45	— 13.35	— 6.85
		80	70.564±1.091	73.067±4.786	1.55	6.55	— 11.80	— 8.67
	肠	0.3	0.273±0.011	0.314±0.031	3.91	9.87	— 9.00	4.67
		4	3.577±0.144	4.106±0.416	4.02	10.13	— 10.58	2.65
		80	71.909±3.076	80.864±7.014	4.28	8.67	— 10.11	1.08

叶远志皂苷, 五味子乙素和细叶远志苷 A 含量较低。统计学分析发现, 除细叶远志苷 A 含量在 3 组差异无统计学意义外, 其余成分在结肠溶微丸组含量最低, 结果见图 7。

2.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 10.1.2 软件作图, SPSS 26.0 软件进行数据统计和整理, 组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 讨论

静宁方治疗 ADHD 的临床疗效显著, 刘应科

等^[11]使用静宁颗粒治疗 ADHD 患儿的临床总有效率可达 85.71%, 丁一芸等^[12]研究发现静宁颗粒对 ADHD 及其伴发的运动协调障碍有一定的改善作用, 于庆洋等^[13]临床应用静宁方治疗 30 例 ADHD 患儿, 其核心症状和胃肠道症状均改善明显。课题组前期研究发现, 静宁微丸中来自远志的细叶远志皂苷和细叶远志苷 A, 来自五味子的五味子乙素和戈米辛 J 是共同入脑成分, 这些成分均具有直接或间接治疗 ADHD 的潜力, 可能是静宁微丸的关键药效物质, 因此选取上述 4 种成

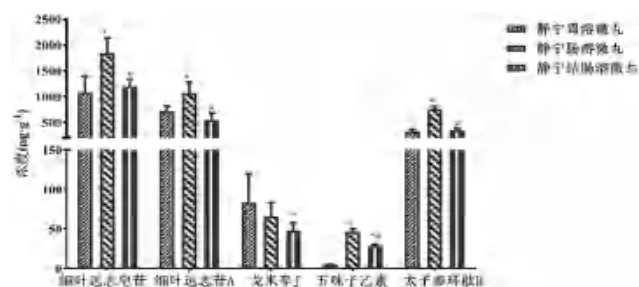


图 6 不同释药部位静宁微丸回肠中药物成分定量测定结果 ($n=6$)
Fig 6 Quantitative determination results of drug components in the ileum of Jingning pellets from different release sites ($n=6$)

注: 与胃溶微丸组比较, $^*P < 0.05$; 与肠溶微丸组比较, $^{\#}P < 0.05$ 。

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

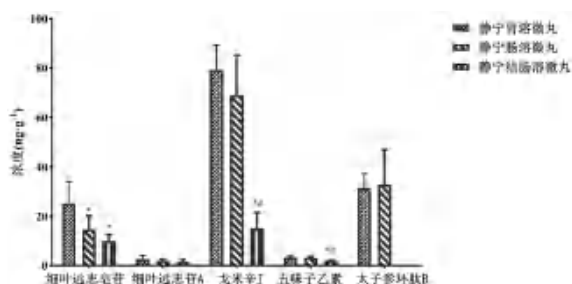


图 7 不同释药部位静宁微丸结肠中药物成分定量测定结果 ($n=6$)
Fig 7 Quantitative determination results of drug components in the colon of Jingning pellets from different release sites ($n=6$)

注: 与胃溶微丸组比较, $^*P < 0.05$; 与肠溶微丸组比较, $^{\#}P < 0.05$ 。

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

分建立在脑组织中的含量测定方法。为了从入血、入脑和入肠多角度探究不同释药部位静宁微丸药效差异的物质基础, 选择了静宁方君药太子参中的太子参环肽 B 共同建立 5 种成分在血浆和肠组织中的含量测定方法。

不同释药部位静宁微丸给药后, 大鼠血和脑中的分布为戈米辛 J 含量最高, 五味子乙素次之, 细叶远志苷 A 和细叶远志皂苷含量较低, 成分分布具有一致性。文献报道五味子乙素具有镇静、改善认知等作用^[14-15]; 戈米辛 J 具有抗炎、抗氧化等作用^[16-18]。提示相比于细叶远志苷 A 和细叶远志皂苷, 戈米辛 J 和五味子乙素更易跨过血脑屏障, 生物利用度更高, 治疗潜力更大, 发挥作用的方式可能是原形吸收入血入脑, 直接作用于神经系统治疗 ADHD^[19], 这可能与 4 种成分的分子灵活性、分子大小、极性差异有关。大鼠回肠中的分布为细叶远志苷 A、细叶远志皂苷和太子参环肽 B 的含量明显高于戈米辛 J 和五味子乙素, 文献报道细叶远志皂苷可以改善认知障碍, 提高学习能力, 多巴

胺、去甲肾上腺素等神经递质水平, 抑制炎症反应^[20-22]; 细叶远志苷 A 具有安神, 神经细胞保护等作用^[23-26]; 太子参环肽 B 可以发挥抗炎和神经保护作用, 改善认知功能障碍和记忆缺陷, 增强学习和记忆能力^[27-29]。同时, 5 种成分在大鼠回肠和结肠中的含量显著高于血和脑中, 以上差异均表明静宁微丸治疗 ADHD 的机制跟“微生物-脑肠轴”途径密切相关, 可以改善 ADHD 大鼠胃肠道功能和菌群环境, 调节脑肠肽水平^[9]。

不同释药部位静宁微丸的成分含量比较, 在血中肠溶和结肠溶微丸相较于胃溶微丸, 4 个成分的含量均相对较低; 在脑中肠溶和结肠溶微丸的细叶远志皂苷、细叶远志苷 A 和戈米辛 J 的含量均高于胃溶微丸, 五味子乙素则相对较低; 在回肠中肠溶和结肠溶微丸相较于胃溶微丸, 戈米辛 J 的含量较低, 其余 4 个成分的含量较高; 在结肠中, 结肠溶微丸的 5 个成分含量明显低于胃溶和肠溶微丸。结合前期研究发现, 静宁肠溶微丸和结肠溶微丸对 ADHD 模型大鼠的整体改善作用优于胃溶微丸, 肠溶微丸和结肠溶微丸对不同指标的改善作用各有侧重, 这可能与上述成分的含量差异有关。

课题组前期研究发现静宁方中太子参环肽 B 可以吸收入血 [达峰时间为 (0.31 ± 0.34) h, 达峰浓度为 (7.44 ± 3.47) ng · mL⁻¹], 而本研究中仅在胃溶组和肠溶组的回肠和结肠中检测到了太子参环肽 B, 结肠溶组仅回肠中检测到了太子参环肽 B, 可能原因有: ① 静宁微丸中太子参环肽 B 的含量很低, 难以达到定量下限; ② 病理状态影响了药物的吸收代谢, 导致太子参环肽 B 难以进入血和脑中, 后续可进一步选择更多时间点对病理状态下太子参环肽 B 的药代动力学特征进行研究。选择尼莫地平 and 延胡索甲素作为内标物的依据有: ① 其稳定性好且与 5 种待测成分的结构类似, 具有相同的关键化学结构和官能团, 如苯环、亚氨基等; ② 不与 5 种待测成分在体内的任何代谢产物相同, 从而避免对检测结果产生影响, 并且在一定程度上消除人员操作等变化引起的误差, 抵消仪器方面的影响, 使定量结果更加准确。本研究控制各成分在血浆/脑组织/肠组织不同基质中基质效应与提取回收率 RSD 均小于 14.9%, 满足 2020 年版《中国药典》生物样品分析要求^[30]; 并且选择合适的内标, 从而排除样品处理过程中可能产生的干扰和内源性物质或代谢物的干扰。

综上所述, 本研究从定量的角度进一步探究了静宁微丸治疗 ADHD 的药效物质基础, 对临床上阐明 ADHD 的发病机制及静宁方的治疗机制奠定了基础。根据实验结果, 可以指导临床更加针对

性、靶向性地用药,如使用肠溶微丸比胃溶微丸的疗效更加显著,对于主诉胃肠道症状的 ADHD 患儿可以针对性地使用静宁肠溶或结肠溶微丸,“因人制宜”以期获得更佳疗效。静宁微丸中太子参、茯苓和枸杞子均含有大量多糖类成分,但本研究未能对这些多糖类成分进行定量分析,后续可针对此类多糖成分建立分析方法,补充本研究的不足之处,进一步阐明静宁微丸的药效物质基础。

参考文献

- [1] Checa-Ros A, Jerez-Calero A, Molina-Carballo A, et al. Current evidence on the role of the gut microbiome in ADHD pathophysiology and therapeutic implications [J]. *Nutrients*, 2021, 13 (1): 249.
- [2] 冯锴,刘玉清,王俊宏.儿童注意缺陷多动障碍的中医研究进展[J]. *天津中医药*, 2023, 40 (1): 131-136.
- [3] 杨春静,时正媛,续茜桥,等.静宁颗粒对 H₂O₂ 诱导的原代皮层神经元氧化应激的保护作用研究[J]. *陕西中医*, 2022, 43 (2): 145-150.
- [4] 方琼杰,丁一芸,任昕昕,等.静宁颗粒治疗气阴两虚型儿童注意力缺陷多动障碍的临床观察[J]. *现代中西医结合杂志*, 2017, 26 (29): 3199-3201, 3299.
- [5] 方琼杰,王俊宏,丁一芸,等.静宁颗粒对注意力缺陷多动障碍模型大鼠认知能力及纹状体单胺类的影响[J]. *世界中西医结合杂志*, 2020, 15 (2): 273-277.
- [6] 杨爱玲,严素玉,张天睿,等.静宁颗粒对治疗小儿注意缺陷多动障碍的作用机制研究[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2019, 21 (10): 2106-2112.
- [7] 丁一芸.静宁颗粒对注意缺陷多动障碍患儿临床疗效及 SHR 多巴胺系统的研究[D].北京:北京中医药大学,2018.
- [8] 邓家琳.基于维生素 D 作用途径探讨静宁颗粒治疗 ADHD 的疗效及机制研究[D].北京:北京中医药大学,2021.
- [9] 于庆洋,王俊宏.静宁颗粒调节 ADHD 大鼠胃肠功能及脑肠肽水平的实验研究[J]. *中医学报*, 2023, 38 (5): 1047-1052.
- [10] Yang CJ, Yin XB, Dong XX, et al. Determination of the phytochemical composition of Jingning fang and the in vivo pharmacokinetics of its metabolites in rat plasma by UP-LC-MS/MS [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2017, 1067: 71-88.
- [11] 刘应科,任昕昕,方琼杰,等.静宁颗粒治疗 56 例小儿多动症气阴两虚证临床观察[J]. *湖南中医药大学学报*, 2016, 36 (4): 49-52.
- [12] 丁一芸,王雅璇,任昕昕,等.静宁颗粒对注意力缺陷多动症患儿运动协调障碍的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36 (4): 869-872.
- [13] 于庆洋,王俊宏,邓家琳,等.静宁方治疗儿童注意缺陷多动障碍的疗效评价及对胃肠功能的影响[J]. *天津中医药*, 2021, 38 (10): 1273-1277.
- [14] Wei BB, Li Q, Fan RH, et al. UFLC-MS/MS method for simultaneous determination of six lignans of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. in normal and insomniac rats brain microdialysates and homogenate samples: towards an in-depth study for its sedative-hypnotic activity [J]. *J Mass Spectrom*, 2013, 48 (4): 448-458.
- [15] Giridharan VV, Thandavarayan RA, Sato S, et al. Prevention of scopolamine-induced memory deficits by schisandrin B, an antioxidant lignan from *Schisandra chinensis* in mice [J]. *Free Radical Res*, 2011, 45 (8): 950-958.
- [16] Min XL, Zhao LP, Shi Y, et al. Gomisins J attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury by inducing anti-apoptotic, anti-inflammatory, and antioxidant effects in rats [J]. *Bioengineered*, 2022, 13 (3): 6908-6918.
- [17] 张庆华.药用植物五味子生物活性物戈米辛 J 对超负荷运动肌肉损伤的影响及分子机制[J]. *分子植物育种*, 2023, 21 (15): 5131-5137.
- [18] 金昔陆,顾峥,胡天喜,等.内南五味子木脂素戈米辛 J 对肝线粒体膜脂质过氧化和超氧阴离子自由基的作用[J]. *中国药理学通报*, 2000, 16 (1): 26-28.
- [19] 吴静静,王俊宏,任献青.静宁方治疗儿童注意缺陷多动障碍的网络药理学研究[J]. *中医儿科杂志*, 2023, 19 (3): 24-31.
- [20] Jiang N, Zhang YW, Yao CH, et al. Tenuifolin ameliorates the sleep deprivation-induced cognitive deficits [J]. *Phytother Res*, 2023, 37 (2): 464-476.
- [21] Wang HX, Huang H, Jiang N, et al. Tenuifolin ameliorates chronic restraint stress-induced cognitive impairment in C57BL/6J mice [J]. *Phytother Res*, 2022, 36 (3): 1402-1412.
- [22] Zhang H, Han T, Zhang L, et al. Effects of tenuifolin extracted from radix polygalae on learning and memory: a behavioral and biochemical study on aged and amnesic mice [J]. *Phytomedicine*, 2008, 15 (8): 587-594.
- [23] Dong XZ, Huang CL, Yu BY, et al. Effect of tenuifoliside A isolated from *Polygala tenuifolia* on the ERK and PI3K pathways in C6 glioma cells [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21 (10): 1178-1188.
- [24] Liu P, Hu Y, Guo DH, et al. Potential antidepressant properties of Radix Polygalae (Yuan Zhi) [J]. *Phytomedicine*, 2010, 17 (10): 794-799.
- [25] 熊晓莉.“建昌帮”炆远志炮制前后成分差异性及安神药效研究[D].南昌:江西中医药大学,2023.
- [26] 高慧.江西“建昌帮”炆远志炮制前后成分及益智药效差异性研究[D].南昌:江西中医药大学,2022.
- [27] 丰心月,王奕霏,邓嘉航,等.太子参改善斑马鱼和 APP/PS1 小鼠学习记忆[J]. *食品与发酵工业*, 2024, 50 (8): 55-61.
- [28] 邓嘉航.太子参环肽 B 通过脾-肠-脑轴改善阿尔茨海默病小鼠认知功能障碍的作用及机制研究[D].湛江:广东海洋大学,2023.
- [29] 倪建成,范永飞,叶祖云.太子参化学成分、药理作用和应用的研究进展[J]. *中草药*, 2023, 54 (6): 1963-1977.
- [30] 中国药典 2020 年版.四部[S]. 2020: 466-472.

(收稿日期: 2024-10-05; 修回日期: 2024-12-05)

吡柔比星脂质体的制备及体内外评价

姬浩洁¹, 韩文豪^{2, 3}, 姜宇^{2, 3*}, 郝贵周^{2, 3}, 张贵民^{1, 2, 3*} (1.中南大学湘雅药学院, 长沙 410000; 2.山东新时代药业有限公司, 山东省复杂注射剂工程技术研究中心, 山东 临沂 276006; 3.鲁南制药集团股份有限公司, 山东 临沂 276005)

摘要: **目的** 采用 3 种不同工艺制备吡柔比星脂质体 (PL), 并考察其药剂学性质及抗肿瘤效果。**方法** 分别采用硫酸铵梯度法、葡糖醛酸铵梯度法和 pH 梯度法, 制备 PL-Sul、PL-Glu、PL-pH, 建立 HPLC 法测定脂质体中吡柔比星的含量和包封率。以包封率为指标, 优化沉淀剂浓度。考察 3 种 PL 的形态、粒径、Zeta 电位、包封率、体外释放曲线、稳定性等药剂学特性。使用 CCK-8 法检测 PL 对小鼠结肠癌细胞 (CT26) 和小鼠 B 细胞淋巴瘤细胞 (A20) 的增殖抑制效果。以吡柔比星注射液为阳性对照, 采用小鼠 CT26 皮下肿瘤模型, 比较 3 种 PL 的抗肿瘤活性。**结果** 3 种 PL 的药物包封率均大于 90%, 平均粒径约为 85 nm, Zeta 电位约为 -26 mV。4℃ 条件下放置 30 d, 各样品的主要质量指标均未发生明显变化。冷冻透射电镜观察形态结果表明, 在脂质体亲水内腔, PL-Glu 中没有观察到药物与沉淀剂的沉淀晶体, 而 PL-Sul 和 PL-pH 中可观察到棒状和片状结晶。体外释放结果表明, 3 种 PL 均缓慢释放药物, 以 PL-pH 释放速度最慢。体外抗肿瘤结果显示 PL-Sul 和 PL-Glu 对细胞增殖的抑制作用更强。药效学研究结果表明, 3 种 PL 都显示出较高的抗肿瘤活性, 但仅 PL-Sul 疗效显著优于吡柔比星注射液。**结论** 使用硫酸铵梯度法制备的 PL 能显著提高药物的抗肿瘤效果, 为 PL 药物的开发奠定了基础。

关键词: 吡柔比星; 脂质体; 硫酸铵梯度法; 葡糖醛酸铵梯度法; pH 梯度法; 结肠癌

中图分类号: R97

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)04-0880-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.002

Preparation and in vitro and vivo evaluation of pirarubicin liposomes

Ji Hao-jie¹, HAN Wen-hao^{2, 3}, JANG Yu^{2, 3*}, HAO Gui-zhou^{2, 3}, ZHANG Gui-min^{1, 2, 3*} (1. Xiangya School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410000; 2. Shandong Complex Injectable Engineering Research Center, Shandong New Times Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi Shandong 276006; 3. Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi Shandong 276005)

Abstract: **Objective** To prepare pirarubicin liposome (PL) with three methods and evaluate their properties and antitumor effects. **Methods** PL was prepared by ammonium sulfate gradient method (PL-Sul), ammonium glucuronate gradient method (PL-Glu) and pH gradient method (PL-pH). HPLC method was used to determine the drug loading and encapsulation efficiency of the PL. The concentration of the precipitant was optimized with the encapsulation efficiency. The morphology, size and Zeta potential of the PL were analyzed by cryo-transmission electron microscope (cryo-TEM) and nanometer particle size analyzer. The in vitro release rate and stability were also evaluated. The cell proliferation inhibitory effect of the PL on CT26 cells and A20 cells was detected with CCK-8. The antitumor effect of the PL was measured in mice bearing CT26 colon tumor and compared with that of pirarubicin injection. **Results** The encapsulation efficiencies of three PLs were all over 90%. The average particle sizes of the PL were about 85 nm, and the Zeta potentials were about -26 mV. The PL was stable, no obvious change was found in each index of the PL after storing at 4℃ for 30 d. Furthermore, the cryo-TEM pictures showed that some rod-like or slice-like crystals were found inside PL-Sul and PL-

基金项目: 山东省重点研发计划 (竞争性创新平台) (No.2022CXPT046)。

作者简介: 姬浩洁, 女, 硕士研究生, 主要从事药物制剂新技术与新型给药系统研究, email: 1589095419@qq.com *通信作者: 张贵民, 男, 研究员, 硕士研究生导师, 主要从事药物制剂新技术与新型给药系统研究, email: Lunanzhangguimin@163.com; 姜宇, 男, 工程师, 主要从事复杂制剂开发, email: jiangyu20181203@163.com

pH, respectively, but no drug crystal was found in PL-Glu. The release rate of PL-pH was the slowest, which indicated that the drug crystal probably influenced the in vitro drug release. In vitro antitumor results showed that PL-Sul and PL-Glu had stronger inhibitory effect on the cell proliferation. The pharmacodynamic test showed that all the three PLs showed high antitumor effect. However, only the antitumor effect of the PL-Sul was much better than pirarubicin injection. **Conclusion** PL prepared by ammonium glucuronate gradient method can effectively improve the antitumor effect of drugs, providing a basis for further research on PL drugs.

Key words: pirarubicin; liposome; ammonium sulfate gradient method; ammonium glucuronate gradient method; pH gradient method; colon tumor

吡柔比星 (pirarubicin, THP) 属于蒽环类抗肿瘤药物, 由 Umezawa 等^[1]于 1979 年发现并开发, 其抗肿瘤作用机制是药物进入细胞核内后迅速嵌入 DNA 核酸碱基对间, 然后干扰转录过程, 阻止 mRNA 合成, 抑制 DNA 聚合酶及 DNA 拓扑异构酶 II 活性, 最终干扰 DNA 的合成^[2-3]。与广泛应用的类似物阿霉素 (doxorubicin, DOX) 相比, THP 在治疗人实体瘤方面表现出相当或稍强的细胞毒性、更低的心脏毒性和更强的长期抗肿瘤疗效^[4]。研究表明, THP 可用于治疗白血病、恶性淋巴瘤、乳腺癌、肺癌等多种疾病^[5-8]。目前 THP 上市的制剂是注射用冻干粉针剂, 临床使用时存在累积性心脏毒性、骨髓抑制及严重的胃肠道反应等毒副作用, 限制了其在抗肿瘤方面的应用^[9-10], 如何高效地将药物递送并释放到肿瘤细胞, 减少在正常组织的富集, 是 THP 临床使用中亟须解决的问题。脂质体是极具前景的药物递送系统, 具有靶向性和缓释性, 生物相容性好, 可降低药物毒性等优点, 为药物递送提供了高效的工具, 将抗肿瘤药物开发为脂质体制剂一直是制药企业的研发热点^[11-12]。

脂质体的制备方法包括被动载药法和主动载药法, THP 属于两亲性弱碱性药物, 更适用于主动载药法, 其能较大地提高脂质体的包封率。主动载药法包括硫酸铵梯度法、pH 梯度法 (柠檬酸梯度法)、蔗糖八硫酸酯梯度法以及葡萄糖醛酸铵梯度法等^[13-14], 药物与形成梯度离子的反离子 (如硫酸铵梯度法的硫酸根、pH 梯度法的柠檬酸根等) 形成沉淀包封于脂质体的内水相中, 不同载药法的沉淀剂不同, 相应药物与沉淀剂结合的紧密程度也不同, 进而影响药物在体内的释放、药效和毒副作用等^[15]。阿霉素脂质体 Doxil 采用硫酸铵梯度法载药, 药物与沉淀剂结合过于紧密, 药物难以有效地释放出来、体内循环时间过长而出现手足综合征等不良反应^[16], 加拿大 INEX 公司的脂质体研究小组采用 pH 梯度法开发米托蒽醌脂质体制剂, 发现其抗肿瘤效果还不如游离的米托蒽醌^[17]。因此, 沉淀剂的种类是影响药物脂质体体内行为的重要因素。

本研究采用硫酸铵梯度法、葡萄糖醛酸铵梯度法和 pH 梯度法 3 种方法制备吡柔比星脂质体 (PL), 并对脂质体的性质进行比较, 考察体外释放及稳定性, 比较不同方法制备的脂质体制剂的体内外抗肿瘤活性, 现报道如下。

1 材料

1.1 仪器

万分之一电子分析天平 XSR204/A (瑞士 Mettler Toledo 公司); Waters e2695 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); AE-100 型脂质体滤膜挤出器 (加拿大 ATS 公司); 0.2、0.08、0.05 μm 的聚碳酸酯膜 (美国 Whatman 公司); ZNCL-G310*150 型智能磁力搅拌器 (郑州予华仪器制造有限公司); SB-800DT 型超声波清洗机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); Zetasizer Nano ZS 型 Zeta 电位与纳米粒径分析仪 (英国 Malvern 公司); Sevencompact 型 pH 计 (瑞士 Mettler Toledo 公司); 冷冻透射显微镜、酶标仪 (赛默飞公司)。

1.2 试药

盐酸吡柔比星注射液 (PI, 山东新时代药业有限公司, 规格: 5 mL/10 mg, 批号: 240408、240426、240430、240507、240516); THP 原料药 (山东道中道制药有限公司, 批号: D62401001, 纯度 $\geq 97.5\%$); 氢化大豆磷脂酰胆碱 (HSPC, 批号: 525600-2200704)、培化磷脂酰乙醇胺 (mPEG-DSPE, 批号: 588200-2200103) (德国 Lipoid 公司, 纯度 $\geq 98\%$); 胆固醇 (Chol, 日本精化株式会社, 批号: B80859, 纯度 $\geq 99\%$); 硫酸铵、L-组氨酸、Sephadex G-50 (德国 Merck 公司); 葡萄糖醛酸 (安徽禾庚生物技术有限公司, 批号: HGBT-SCCP-SGL0-20230808-01); 一水合柠檬酸、柠檬酸钠、盐酸、碳酸氢钠、磷酸 (上海沪试公司); 十二烷基硫酸钠 (北京伊诺凯科技有限公司); 乙二胺四乙酸二水物、氯化钠、氨水、丙酮、三乙胺 (西陇科学公司); 蔗糖 (德国 Merck 公司, 含量: 99%); 无水乙醇 (药用级, 安徽安特食品有限公司); 5% 葡萄糖注射液 (山东齐都药业有限公司); 胎牛血

清 (FBS)、培养基 (DMEM)(美国 Gibco 公司); CCK-8 (上海碧云天生物技术有限公司); 纯化水 (山东新时代药业有限公司); 乙腈及甲醇均为色谱纯; 其他试剂为分析纯。

1.3 细胞株

小鼠结肠癌细胞 (CT26) 和小鼠 B 细胞淋巴瘤细胞 (A20)(中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库)。细胞接种在含 10%FBS 的 DMEM 培养基中, 于 37℃、5%CO₂ 的无菌细胞培养箱培养。待细胞长至培养瓶面积的 80%~90% 时, 用 0.25% 胰酶在培养箱中消化 2 min, 按 1:2~1:4 的比例传代, 取对数生长期细胞制成细胞悬液用于后续实验。

1.4 实验动物

SPF 级雄性 BALB/c 小鼠, 体重 18~20 g, 7~8 周 [许可证号 SCXK (京) 2021-0006], 北京维通利华实验动物技术有限公司。在山东新时代动物房进行饲养 [实验单位使用许可证编号 SYXK (鲁) 20230023], 饲养环境温度为 (22±2)℃, 相对湿度为 (50±5)%。饲料、水及垫料均经过无菌处理, 并定时补充和更换。

2 方法与结果

2.1 PL 的制备

2.1.1 葡萄糖醛酸铵溶液的制备 按照葡萄糖醛酸与氨水摩尔比 1:1.03 的比例称取一定量的葡萄糖醛酸和氨水于烧杯中, 加适量水混合均匀并溶解, 在不断搅拌下缓慢滴加丙酮至不再产生沉淀, 通过过滤分离出葡萄糖醛酸铵的晶体, 再用丙酮洗涤, 在室温下干燥, 得葡萄糖醛酸铵。根据沉淀剂浓度称取葡萄糖醛酸铵, 加入纯化水, 溶解得葡萄糖醛酸铵溶液^[18]。

2.1.2 盐酸 THP 的制备 由于 THP 水溶性差, 使用主动载药法制备 PL 时, 需要先将 THP 制备成盐酸 THP 提高其水溶性^[19]。称取一定量的 THP 原料药, 加入适量纯化水中分散均匀, 缓慢滴入 0.05 mol·L⁻¹ 的盐酸溶液, 直到溶液刚好完全澄清, 继续滴加至 pH 3.7~3.9, 搅拌至完全溶解后立即滴加 0.1 mol·L⁻¹ 碳酸氢钠溶液至药液 pH 5.0~6.0, 并加纯化水至药物最终质量浓度为 10 mg·mL⁻¹。

2.1.3 空白脂质体的制备 按比例精密称取一定量的 HSPC、mPEG-DSPE 和 Chol (质量比 HSPC:mPEG-DSPE:Chol=3:1:1) 于 50 mL 西林瓶中, 加入一定量无水乙醇在 55℃ 下溶解, 得到脂质体的脂相溶液。将脂相溶液分别注入浓度为 0.25 mol·L⁻¹ (或 0.20、0.30、0.35 mol·L⁻¹) 的硫酸铵水溶液、0.25 mol·L⁻¹ (或 0.20、0.30、0.35 mol·L⁻¹) 的葡萄糖醛酸铵水溶液和 0.30 mol·L⁻¹ (或 0.20、0.25、0.35 mol·L⁻¹) 的柠檬

酸缓冲液 (pH 4.0) 中, 在 65℃ 条件下搅拌水化 30 min。分别采用 0.2、0.08、0.05 μm 的聚碳酸酯膜, 通过高压膜挤出机挤出, 得到平均粒径为 80~90 nm 的脂质体混悬液。再通过超滤的方法将脂质体混悬液外水相置换为 9% 蔗糖溶液, pH 梯度法在载药之前需使用 L-组氨酸溶液将外水相 pH 调至 7.0, 建立 H⁺ 浓度梯度, 最终得到 3 种空白脂质体溶液 KB-Sul、KB-Glu、KB-pH。

2.1.4 载药 按照药物与磷脂质量比 1:6 将药物溶液分别与 KB-Sul、KB-Glu、KB-pH 混合, 65℃ 条件下孵育 15 min, 分别得吡柔比星脂质体溶液 PL-Sul、PL-Glu、PL-pH。

2.2 吡柔比星的测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 YMC-Pack ODS-AQ (250 mm×4.6 mm, 3 μm); 流动相: 水相-乙腈 (38:62)(水相: 十二烷基硫酸钠 1.5 g 和乙二胺四乙酸二水物 0.4 g, 加水 900 mL, 加三乙胺 0.2 mL, 用磷酸调节 pH 值至 4.0, 加水稀释至 1000 mL); 检测波长 254 nm; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 30℃; 进样量 20 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取 THP 原料药 25.0 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加少量流动相超声完全溶解后稀释并定容至刻度, 摇匀, 得 THP 储备液。精密量取 2.0 mL 储备液置于 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释并定容至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密量取 1.0 mL PL (PL-Sul、PL-Glu、PL-pH) 样品置于 20 mL 量瓶中, 加少量甲醇破乳后, 再用甲醇稀释并定容至刻度, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 得供试品溶液。

2.2.4 空白脂质体溶液的配制 精密量取 1.0 mL 空白脂质体 (KB-Sul、KB-Glu、KB-pH), 按“2.2.3”项下方法制备空白脂质体溶液。

2.2.5 专属性考察 分别取空白脂质体溶液、对照品溶液及供试品溶液 20 μL, 按“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 记录 HPLC 色谱图, 见图 1。结果在该色谱条件下, 空白脂质体对 THP 的测定无干扰, 专属性较好。

2.2.6 线性关系考察 精密量取“2.2.2”项下 THP 储备液适量并依次稀释, 制成 1.0、5.0、10、20、50、100、200 μg·mL⁻¹ 的系列浓度线性溶液, 进样分析, 测定峰面积, 以质量浓度 (x) 为横坐标、峰面积 (y) 为纵坐标进行线性回归, 得线性回归方程 $y = 4.5 \times 10^4 x + 1.4 \times 10^4$, $r = 1.000$ 。结果表明, THP 质量浓度在 1.0~200 μg·mL⁻¹ 与峰面积的线性关系良好。

2.2.7 精密度试验 取对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录峰面积。结果峰面积 RSD 值为 0.72%, 说明仪器精密度良好。

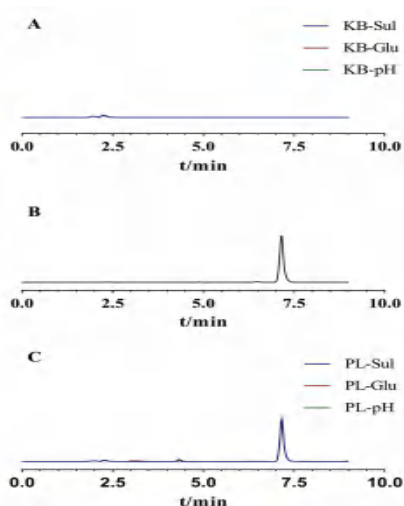


图 1 PL 的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of PL

A. 空白脂质体 (blank liposome); B. THP 对照品 (THP reference substance); C. PL (pirarubicin liposome)

2.2.8 稳定性试验 取同一批 PL (PL-Sul), 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 于室温下放置 0、2、4、6、8、12、24 h 后, 进样分析, 记录峰面积, 峰面积 *RSD* 值为 0.45%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.9 重复性试验 取同一批 PL (PL-Sul), 按“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 进样测定, 记录峰面积并计算样品浓度。结果样品的平均质量浓度为 $97.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, *RSD* 为 0.71%, 说明本方法重复性良好。

2.2.10 加样回收试验 精密量取“2.2.2”项下 THP 储备液 0.2、2、4 mL 各 3 份, 分别置于含 0.5 mL KB-Sul 的 10 mL 量瓶中, 制备成低、中、高 (10 、 100 、 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 3 种浓度的溶液, 进行测定并计算。结果低、中、高浓度的平均回收率分别为 101.7%、101.1%、101.4%, *RSD* 值分别为 0.67%、0.32%、0.53%, 表明该方法准确度较好。

2.3 包封率的测定

本文采用葡聚糖凝胶过滤法测定 PL 的包封率, 该方法能有效将脂质体制剂的包封部分和游离部分分开, 药物用量少且操作简单^[20]。

2.3.1 葡聚糖凝胶的处理 取 Sephadex G-50 适量, 用纯化水浸泡 48 h, 缓缓渗入玻璃柱内 (柱内径约 1.5 cm, 柱高 15 cm), 一次性填装完毕, 以免分层, 用纯化水洗脱排出柱内气泡, 再使用洗脱液 (0.9% 的氯化钠溶液) 平衡柱子。

2.3.2 PL 包封率的测定 精密吸取 PL 溶液 0.2 mL 于 20 mL 量瓶中, 加甲醇破乳并定容至刻度, 摇匀后用 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 取续滤液进样分析, 计算脂质体中 THP 的总浓度 C_b ; 精密吸取 PL 溶液 0.2 mL 上柱, 收集包封药物于 25 mL 量瓶中,

用甲醇破乳并定容至刻度, 摇匀后用 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 取续滤液进样, 计算包封于脂质体中的药物浓度 C_a , 包封率 (*EE*) 根据以下公式计算: $EE(\%) = (C_a \times 1.25) / C_b \times 100\%$ 。

2.4 统计分析

所有统计学分析均使用 GraphPad Prism 9.5.0 软件分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析 (ANOVA) 比较两组或两组以上之间的数据差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2.5 浓度梯度-内水相沉淀剂浓度对包封率的影响

脂质体内外水相的浓度梯度是药物进入脂质体的主要驱动力, 对脂质体的稳定性和包封率有重要影响, 因此本试验以包封率为评价指标对沉淀剂浓度进行筛选。按“2.1.3”和“2.1.4”项下方法制备脂质体样品, 测定样品的包封率, 如图 2 所示, 硫酸铵浓度达到 $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、葡萄糖醛酸铵浓度达到 $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、柠檬酸缓冲液浓度达到 $0.30 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 后, 继续增加浓度, 包封率无明显变化, 最大包封率均大于 90%。因此后续试验中硫酸铵浓度采用 $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、葡萄糖醛酸铵浓度采用 $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、柠檬酸缓冲液浓度采用 $0.30 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

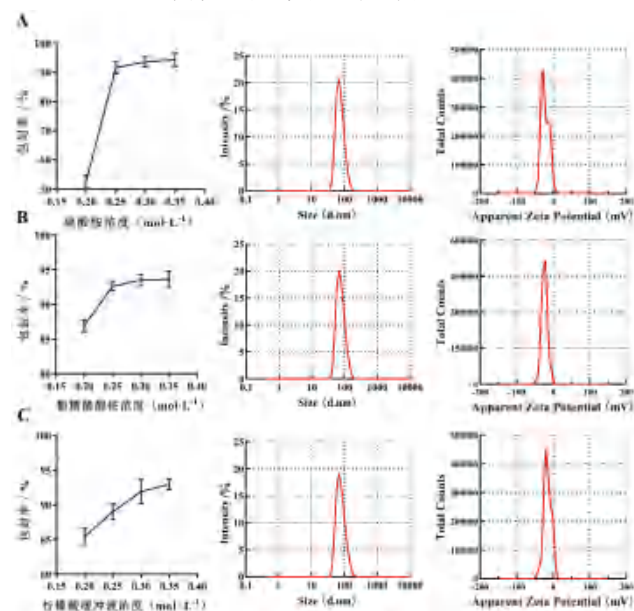


图 2 PL-Sul (A)、PL-Glu (B)、PL-pH (C) 的沉淀剂浓度筛选、粒径分布及 Zeta 电位

Fig 2 Screening of the precipitant concentration, particle size distribution and Zeta potential of PL-Sul (A), PL-Glu (B), PL-pH (C)

2.6 PL 的质量评价

2.6.1 PL 包封率 各取 3 批 PL, 按“2.3”项下方法测定包封率, 结果 PL-Sul 的包封率为 $(94.66 \pm 0.70)\%$, PL-Glu 的包封率为 $(92.40 \pm 0.74)\%$, PL-pH 的包封率为 $(92.69 \pm 0.97)\%$, 3 种 PL 的包封率均大于 90%。

2.6.2 粒径和 Zeta 电位 取 PL 用 0.9% 氯化钠溶

液稀释 200 倍后取适量于样品池中, 用 Nano ZS 型纳米粒径分析仪检测平均粒径; 取 PL 用 9% 蔗糖溶液稀释 40 倍后取适量于样品池中用 Zeta 电位仪检测 Zeta 电位。结果见图 2, 3 种 PL 的粒径约 85 nm、Zeta 电位约 -26 mV, 无明显差异。

2.6.3 冷冻透射电镜形态观察 分别量取 3 种 PL 3 ~ 5 μL 滴在铜网上, 用滤纸轻轻吸去大部分样品溶液, 以便在铜网上形成尽量薄的一层薄膜。迅速将铜网投入液态乙烷进行速冻, 用冷冻透射显微镜观察脂质体形态。如图 3 所示, 3 种 PL 中药物的形态有明显差异, PL-Sul 的亲水内腔能明显观察到药物与沉淀剂形成的纤维棒状结晶, PL-Glu 中几乎观察不到药物与沉淀剂的结晶, PL-pH 中脂质体内部能观察到药物与沉淀剂形成的片状结晶。

2.6.4 体外释放测定 精密量取 PI、PL 适量, 用释放溶液 (含 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化铵和 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ L-组氨酸, pH 6.5) 稀释成每毫升中约含 THP 0.2 mg 的样品溶液^[21]。精密量取 5 mL 样品, 置于处理过的透析袋中 (相对截留分子量 100 000 Da, 沸水煮 10 min 后, 置释放溶液中浸泡过夜), 放置在搅拌浆上, 采用溶出度测定法 (《中国药典》2020 年版四部通则 0931) 第三法的装置, 再向溶出杯中加入释放溶液 100 mL, 在 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 和 $(37 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$ 下进行体外释放试验, 按设定时间于 0.5、1、2、4、6、8、24 h, 分别取样 4 mL (并及时在溶出杯中补充释放溶液 4 mL), 过滤, 按照“2.2.1”项下的色谱条件测定释放介质中 THP 含量, 以下式计算体外累计释放度 (%): 体外累计释放度 (%) = $m_t / m_0 \times 100\%$ 。其中 m_0 为 PL 总药量, m_t 为不同时间药物累计释放量。结果表明, 在含有氯化铵的释放溶液中, PI 释放最快, 4 h 药物即释放 90% 以上。在药物的脂质体制剂中, PL-Glu 体外释放最快, 6 h 药物释放约 50%。PL-Sul、PL-pH 体外释放速度较慢, 24 h 药物体外释放约 50%, PL 相比于吡柔比星注射液具有一定的缓释性, 见图 4。

2.6.5 脂质体稳定性考察 取 PI 及 3 批 PL 分别置于 $4 ^\circ\text{C}$ 避光条件下, 于 0、5、10、30 d 取样检测含量、粒径、Zeta 电位、PDI、药物包封率及 PI 含量的变化情况。结果表明, 3 种 PL 样品外观没有沉淀聚集, 含量均大于 90% 且包封率未明显下降, 粒径、PDI 及 Zeta 电位主要质量指标也无明显变化, 结果见图 5。

2.7 体外抗肿瘤活性评价

本试验采用 CCK-8 法比较 PL-Sul、PL-Glu、PL-pH、PI 对 CT26 细胞及 A20 细胞的抑制率。将 CT26 细胞以每孔 1000 个的密度接种于 96 孔板孵育 24 h 后将 A20 细胞同样以每孔 1000 个的密度接种于 96 孔板, 各加入 100 μL 培养基。另取 3 孔加 100 μL 培

养基作为调零孔, 用含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基溶液将 PL 逐级稀释得 $1 \times 10^{-5} \sim 1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 每孔加入 100 μL 含 5% 葡萄糖注射液、各浓度的 PL-Sul、PL-Glu、PL-pH 及 PI 溶液, 每个浓度 3 个复孔, 加药后继续孵育 72 h, 每孔加入 10 μL CCK-8, 在 $37 ^\circ\text{C}$ 培养箱中继续孵育 4 h, 在酶标仪 450 nm 处检测每孔的吸光度值 (A), 以下式计算细胞生存率: 细胞生存率 (%) = $(A_{\text{给药组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{阴性对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。与 PL-pH 相比, PL-Sul 和 PL-Glu 对肿瘤细胞的抑制作用更强, 对于 CT26 细胞, PL-Sul 和 PL-Glu 对细胞的抑制作用无明显差异, 对于 A20 细胞, PL-Glu 对细胞的抑制作用优于 PL-Sul, 结果见图 6。

2.8 体内抗肿瘤活性评价

2.8.1 结肠癌皮下肿瘤模型建立、分组及给药 收集对数生长期的 CT26 细胞, 将瘤细胞悬液接种于 7 ~ 8 周龄雄性 BALB/c 小鼠右后侧皮下组织, 接种体积为 100 μL , 含瘤细胞约 7.5×10^5 个, 待小鼠平均肿瘤体积增大至 50 mm^3 时随机分为 6 组, 每组 5 只, 分别为空白脂质体组 (BL 组, 其中水相为葡萄糖醛酸铵)、阴性对照组 (NC 组)、PI 组 (整个试验周期内制备 2 批)、PL-Sul 组、PL-Glu 组、PL-pH 组。各治疗组均采用 q6d $\times$ 4 (每 6 日给药一次, 连续给药 4 次), 静脉注射 (iv) 给予 $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的给药方案, 阴性对照组同等方法等体积给予 5% 葡萄糖注射液。

2.8.2 肿瘤体积、瘤重测定 从给药当日 (d_0) 开始每给药一次测一次瘤径, 考察各小鼠肿瘤体积的动态变化, 绘制小鼠肿瘤体积变化曲线, 末次给药 3 d 后将小鼠处死, 剖取皮下结肠癌瘤体组织, 称取肿瘤重量 (TW)。肿瘤体积 (TV) 的计算公式为 $TV = 1/2 \times a \times b^2$, 其中 a 、 b 分别表示肿瘤长径和短径。相对肿瘤体积 (RTV) 的计算公式为: $RTV = V_t / V_0$, 其中 V_0 为给药前测量的肿瘤体积, V_t 为实验结束后测量的剖取的瘤体体积。以相对肿瘤生长抑制率 (RTI) 为主要评价指标, 计算公式为: $RTI (\%) = (1 - P_{\text{RTV}} / C_{\text{RTV}}) \times 100\%$, P_{RTV} 表示治疗组的 RTV; C_{RTV} 表示阴性对照组的 RTV。结果表明, 3 种 PL 的相对肿瘤生长抑制率均高于 PI。但采用不同方法制备得到的 PL 在抑制肿瘤生长方面差异较大, 仅 PL-Sul 相较于 PI 有效提高了抗肿瘤活性, PL-Glu 和 PL-pH 与 PI 相比, 差异并无统计学意义, 结果见图 7。

3 讨论

脂质体具有良好的靶向性, 可以增加药物在肿瘤部位的有效浓度, 降低药物的毒副作用, 从而提高药物的抗肿瘤活性^[22-23]。目前关于蒽环类药物脂质体制剂的研究报道较多^[24], 常用的制备方法包括 pH 梯度法、硫酸铵梯度法、葡萄糖醛酸铵梯度法、蔗糖八硫酸酯梯度法以及葡萄糖酸铜

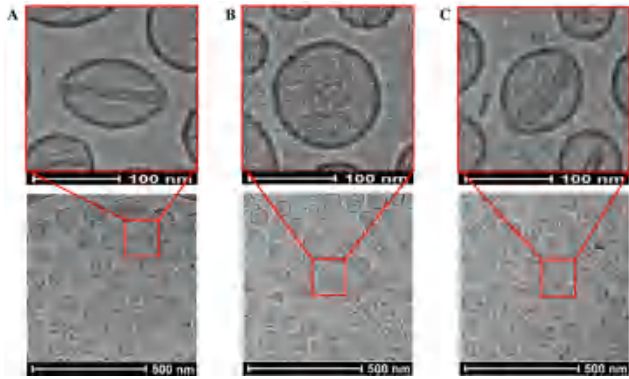


图 3 PL-Sul (A)、PL-Glu (B)、PL-pH (C) 的冷冻透射电镜照片
Fig 3 Cryo-TEM pictures of PL-Sul (A), PL-Glu (B), and PL-pH (C)

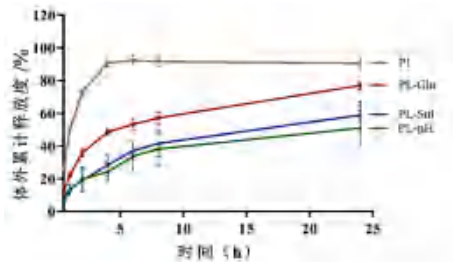


图 4 PI 与 PL 的体外释放曲线
Fig 4 In vitro release curves of PI and PL

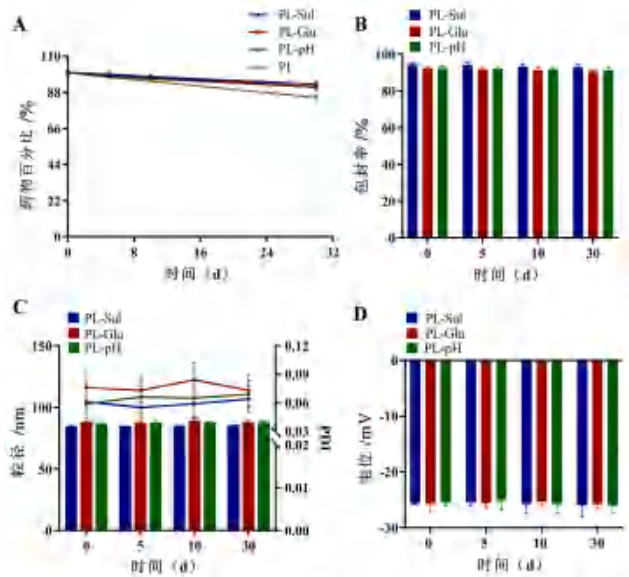


图 5 PL 4 °C 保存 30 d 稳定性考察
Fig 5 Stability of PL stored at 4 °C for 30 d
A. 药物含量稳定性 (stability of drug content); B. 包封率的稳定性 (stability of encapsulation efficiency); C. 粒径及 PDI 的稳定性 (stability of particle size and PDI); D. 电位的稳定性 (stability of potentials)

梯度法, 但对比不同载药方法差异的研究较少。Zhang 等^[25] 对比研究了 pH 梯度法和 Cu^{2+} 梯度法制备的阿糖胞苷 / 柔红霉素双载脂质体, 发现 Cu^{2+} 梯度法制备的脂质体细胞毒性更高且在循环过程中具有较强的控制载体内药物比例的能力。王栋海等^[26] 对比研究了 pH 梯度法、硫酸铵梯度

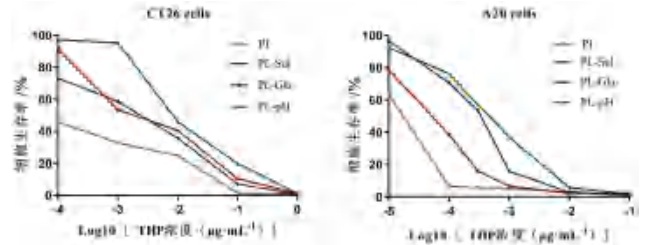


图 6 各组 PL 对 CT26 细胞和 A20 细胞增殖的抑制作用
Fig 6 Inhibitory effect of drugs on the proliferation of CT26 and A20 cells

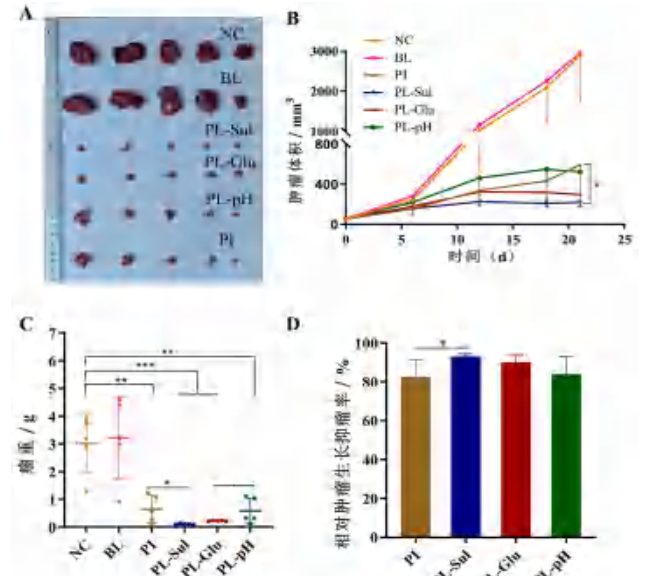


图 7 各组在 CT26 结肠癌皮下肿瘤模型中的抗肿瘤作用 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)
Fig 7 Antitumor effects of each group in the subcutaneous tumor model of CT26 colon cancer (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)
A. 肿瘤照片 (photograph of the tumor); B. 肿瘤体积变化曲线 (curve of tumor volume); C. 肿瘤重量 (tumor weight); D. 相对肿瘤生长抑制率 (relative tumor growth inhibition rate)

法及蔗糖八硫酸酯梯度法制备的酒石酸长春瑞滨脂质体, 发现蔗糖八硫酸酯梯度法制备的脂质体制剂的抗肿瘤疗效优于另外两种方法。

本试验对比研究了硫酸铵梯度法、葡糖醛酸铵梯度法及 pH 梯度法制备的 PL, 3 种 PL 粒径分布均匀, 药物包封率高, 稳定性好。3 种 PL 在粒径、电位、包封率及稳定性方面无明显差异, 但在体外释放、细胞毒性及体内药效方面有较大差异。体外释放研究表明, PL-Glu 体外释放最快, PL-Sul 次之, PL-pH 最慢, 但相比于 PI 都具有一定的缓释作用, 原因很可能是药物与沉淀剂结合的紧密程度不同, 形成了不同结晶形式的沉淀。冷冻透射电镜观察结果支持了这一猜测, PL-Sul 及 PL-pH 中药物以晶体沉淀的形式存在于脂质体亲水内腔, 药物与沉淀剂结合更加紧密。而 PL-Glu 中并未观察到药物和沉淀形成的晶体沉淀, 推测药物是以疏松的凝胶态形式存在, 因此体外释放药物更快。体外抗肿瘤结

果显示 PL-Glu 及 PL-Sul 比 PL-pH 表现出更大的细胞毒性作用, 这和脂质体体外释放药物的速度有很好的相关性, 说明脂质体被胞吞后, 其中药物释放越快, 越完全, 抗肿瘤效果越强。体内抗肿瘤疗效结果显示, 3 种 PL 都表现出优异的抗肿瘤活性, 但仅 PL-Sul 与 PI 相比具有显著优势, 原因可能是脂质体药物体内抗肿瘤效果的发挥与多个方面密切相关, 包括脂质体药物在血液循环中的稳定性、脂质体药物在肿瘤部位的释放以及在肿瘤细胞内的释放, 虽然 PL-Glu 体外释药速度快, 对肿瘤细胞毒性更大, 但可能有部分药物在血液循环过程中就已释放, 未能到达肿瘤部位发挥抗肿瘤作用。在 3 种 PL 中, PL-pH 的抗肿瘤效果最差, 原因可能是药物与沉淀剂结合过于紧密, 虽然有更好的血液循环稳定性, 但在肿瘤组织和肿瘤细胞内药物不能有效释放, 所以抗肿瘤效果差。在后续的研究中, 还需要对 3 种 PL 的药代动力学和组织分布做进一步的考察, 以证实以上分析。综上所述, 与葡萄糖醛酸梯度法、pH 梯度法相比, 硫酸铵梯度法制备的 PL 显示出更好的抗肿瘤效果, 为后续 PL 的开发奠定了基础。

参考文献

- [1] Umezawa H, Takahashi Y, Kinoshita M, et al. Tetrahydropyran derivatives of daunomycin and adriamycin [J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 1979, 32 (10): 1082-1084.
- [2] Mizutani H, Hotta S, Nishimoto A, et al. Pirarubicin, an anthracycline anticancer agent, induces apoptosis through generation of hydrogen peroxide [J]. *Anticancer Res*, 2017, 37 (11): 6063-6069.
- [3] Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, et al. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity [J]. *Pharmacol Rev*, 2004, 56 (2): 185-229.
- [4] Sugiyama T, Sadzuka Y, Nagasawa K, et al. Membrane transport and antitumor activity of pirarubicin, and comparison with those of doxorubicin [J]. *Jpn J Cancer Res*, 1999, 90 (7): 775-780.
- [5] Zhou J, Li LL, Li X, et al. Efficacy analysis of a novel thermochemotherapy scheme with pirarubicin for intermediate-and high-risk nonmuscle-invasive bladder cancer: a single-institution nonrandomized concurrent controlled trial [J]. *Int J Hyperther*, 2019, 36 (1): 867-874.
- [6] Enomoto K, Abe O, Tominaga T, et al. Clinical study of pirarubicin for breast cancer in Japan [J]. *Am J Clin Oncol*, 1990, 13 (Suppl 1): 48-53.
- [7] Daruwalla J, Nikfarjam M, Greish K, et al. In vitro and in vivo evaluation of tumor targeting styrene-maleic acid copolymer-pirarubicin micelles: survival improvement and inhibition of liver metastases [J]. *Cancer Sci*, 2010, 101 (8): 1866-1874.
- [8] Daruwalla J, Greish K, Nikfarjam M, et al. Evaluation of the effect of SMA-pirarubicin micelles on colorectal cancer liver metastases and of hyperbaric oxygen in CBA mice [J]. *J Drug Target*, 2007, 15 (7-8): 487-495.
- [9] 石远凯, 巴一, 冯继锋, 等. 中国蒽环类药物特性专家共识 [J]. *中国肿瘤临床*, 2018, 45 (3): 110-112.
- [10] 李薇, 徐晓红. 蒽环类药物引发心脏毒性的研究进展 [J]. *中南药学*, 2024, 22 (2): 437-444.
- [11] Sercombe L, Veerati T, Moheimani F, et al. Advances and challenges of liposome assisted drug delivery [J]. *Front Pharmacol*, 2015, 6: 286.
- [12] Khafoor AA, Karim AS, Sajadi SM. Recent progress in synthesis of nano based liposomal drug delivery systems: a glance to their medicinal applications [J]. *Results Surf Interfaces*, 2023, 11: 100124.
- [13] 王兴芝, 代英辉, 王东凯. 脂质体的制备方法及应用的研究进展 [J]. *中国药理学杂志 (网络版)*, 2024, 22 (1): 14-24.
- [14] 顾华芳, 徐歌, 朱柯武, 等. 脂质体主动载药技术研究进展 [J]. *中国药理学杂志*, 2021, 19 (6): 173-185.
- [15] Wei XH, Shamrakov D, Nudelman S, et al. Cardinal role of intraliposome doxorubicin-sulfate nanorod crystal in doxil properties and performance [J]. *ACS Omega*, 2018, 3 (3): 2508-2517.
- [16] Barenholz Y. Doxil®-the first FDA-approved nano-drug: lessons learned [J]. *J Control Release*, 2012, 160 (2): 117-134.
- [17] Chang CW, Barber L, Ouyang C, et al. Plasma clearance, biodistribution and therapeutic properties of mitoxantrone encapsulated in conventional and sterically stabilized liposomes after intravenous administration in BDF1 mice [J]. *Brit J Cancer*, 1997, 75 (2): 169-177.
- [18] Immordino ML, Brusa P, Arpicco S, et al. Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing docetaxel [J]. *J Control Release*, 2003, 91 (3): 417-429.
- [19] 杜加秋, 董福霞, 蔡邱华, 等. 处方设计及冻干工艺对注射用盐酸吡柔比星稳定性的影响 [J]. *中国现代应用药学*, 2022, 39 (15): 1979-1983.
- [20] 张朗朗, 戴粤湘, 张涵, 等. 鬼臼毒素脂质体的制备及其质量评价 [J]. *中南药学*, 2024, 22 (1): 65-70.
- [21] 欧婷. 脂质体释放度检查方法的标准化研究 [D]. 北京: 中国食品药品检定研究院, 2017.
- [22] Zununi Vahed S, Salehi R, Davaran S, et al. Liposome-based drug co-delivery systems in cancer cells [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 71: 1327-1341.
- [23] Crommelin DJA, Van Hoogevest P, Storm G. The role of liposomes in clinical nanomedicine development. What now? Now what? [J]. *J Control Release*, 2020, 318: 256-263.
- [24] Liu P, Chen GL, Zhang JC. A review of liposomes as a drug delivery system: current status of approved products, regulatory environments, and future perspectives [J]. *Molecules*, 2022, 27 (4): 1372.
- [25] Zhang JY, Zhou LL, Zhang Y, et al. Contrastive studies of cytarabine/daunorubicin dual-loaded liposomes prepared by pH gradient and Cu^{2+} gradient method [J]. *AAPS PharmSci-Tech*, 2020, 21 (8): 325.
- [26] 王栋海, 解李丽, 张勇, 等. 酒石酸长春瑞滨脂质体注射液的制备及体内外评价 [J]. *中国药理学杂志*, 2014, 49 (15): 1333-1337.

(收稿日期: 2024-07-27; 修回日期: 2024-09-02)

基于网络药理学和体外实验探讨郁金精油 抗心脏肥大的作用机制

王虎, 宁静, 李婷婷, 谢梦蝶, 邱雨美, 丁小云, 张浩, 汤喜兰* (江西科技师范大学药学院, 南昌 330013)

摘要: **目的** 通过网络药理学及体外实验探究郁金精油抗心脏肥大的潜在作用机制。**方法** 通过检索 CNKI、PubMed 等数据库筛选郁金精油有效成分并预测其作用靶点; 利用 OMIM 和 GeneCards 数据库检索心脏肥大疾病靶点, 取交集后获得郁金精油抗心脏肥大的潜在作用靶点。利用 STRING 数据库和 Cytoscape 3.8.0 软件构建交集靶点蛋白互作网络 (PPI) 并分析郁金精油抗心脏肥大的关键靶点。通过 DAVID 数据库对作用靶点进行 GO 功能及 KEGG 富集分析。采用 $10\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 异丙肾上腺素 (isoproterenol, ISO) 诱导的 H9c2 心肌细胞肥大模型, 观察郁金精油抗心肌细胞肥大作用, 进一步采用 RT-qPCR 实验验证关键靶点的 mRNA 表达。**结果** 基于文献筛选获得郁金精油有效成分 71 种, 可作用于 110 个心脏肥大相关靶点, 其中关键靶点包括 AKT1、TNF、MAPK3、EGFR、STAT3 及 SRC 等, 主要涉及癌症通路、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药、催乳素信号通路等信号通路。细胞实验结果表明郁金精油 $0.068\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 可抑制 ISO 诱导的心肌细胞肥大 ($P < 0.05$), 并且抑制 ISO 诱导的关键靶点 AKT1、TNF、MAPK3、EGFR、STAT3、SRC mRNA 表达上调 ($P < 0.05$)。**结论** 郁金精油可能是通过作用于 AKT1、TNF、MAPK3、EGFR、STAT3 及 SRC 等靶点, 从而发挥抗心脏肥大作用。

关键词: 郁金精油; 心脏肥大; 作用机制; 网络药理学

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)04-0887-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.003

Mechanism of *Curcuma aromatica* essential oil against cardiac hypertrophy based on network pharmacology and experimental verification

WANG Hu, NING Jing, LI Ting-ting, XIE Meng-die, QIU Yu-mei, DING Xiao-yun, ZHANG Hao, TANG Xi-lan* (School of Pharmacy, Jiangxi Normal University of Science & Technology, Nanchang 330013)

Abstract: Objective To determine the possible mechanism of *Curcuma aromatica* essential oil against cardiac hypertrophy through network pharmacology and in vitro cell experiments. **Methods** The active ingredients of *Curcuma aromatica* essential oil were screened by searching CNKI, PubMed and other databases to predict the targets. The targets associated with cardiac hypertrophy were searched by OMIM and GeneCards databases, and the potential targets of *Curcuma aromatica* essential oil against cardiac hypertrophy were determined by intersection. Protein-protein interaction (PPI) network was established with STRING database and Cytoscape 3.8.0 software to analyze the key targets. GO function and KEGG enrichment analyses of the potential targets were conducted with DAVID database. An isoproterenol (ISO, $10\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)-induced hypertrophy model of H9c2 cardiomyocytes was used to observe the anti-cardiac hypertrophy effect of *Curcuma aromatica* essential oil. RT-qPCR was used to verify the mRNA expressions of the key targets. **Results** Totally 71 active ingredients of *Curcuma aromatica* essential oil were obtained, which acted on 110 targets

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.82360787, No.82060732); 江西省自然科学基金资助项目 (No.20242BAB25573); 研究生校级创新专项资金立项项目 (No.YC2023-X32)。

作者简介: 王虎, 男, 硕士研究生, 主要从事中药心血管药理研究, email: 1445069409@qq.com *通信作者: 汤喜兰, 女, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药心血管药理研究, email: tangxilan1983@163.com

associated with cardiac hypertrophy. Among them, AKT1, TNF, MAPK3, EGFR, STAT3, and SRC were the key targets, which mainly involved in pathways in cancer, EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance and prolactin signaling pathway and other signal pathways. The cell experiments showed that *Curcuma aromatica* essential oil at $0.068 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ inhibited ISO-induced cardiomyocyte hypertrophy ($P < 0.05$). Moreover, *Curcuma aromatica* essential oil inhibited ISO-induced mRNA upregulations of key targets including AKT1, TNF, MAPK3, EGFR, STAT3, and SRC ($P < 0.05$).

Conclusion *Curcuma aromatica* essential oil may inhibit cardiac hypertrophy by downregulating the key targets of AKT1, TNF, MAPK3, EGFR, STAT3, and SRC.

Key words: *Curcuma aromatica* essential oil; cardiac hypertrophy; mechanism of action; network pharmacology

郁金为姜科植物温郁金、姜黄、广西莪术或蓬莪术的干燥块根，具有活血止痛、行气解郁、清心凉血、利胆退黄的功效^[1]。现代药理研究表明，郁金具有保肝、抗肿瘤、抗炎、镇痛、抗血栓、抗病毒等多种药理作用^[2]。已有研究表明，郁金具有心血管保护作用，其机制可能与抗氧化、调节脂质代谢、减轻炎症反应及抑制细胞凋亡等有关^[3-5]。有研究显示郁金水提物可调节 sGC-cGMP-PKG 通路，改善小鼠心肌肥厚^[6]。

郁金含有挥发油、姜黄素、生物碱等多种化学成分，其中挥发油含量丰富，是其主要的活性成分。郁金挥发油成分以倍半萜类居多，诸多倍半萜类化合物如榄香烯、姜黄烯醇、吉马酮等均被证实具有抗肿瘤活性^[7]。目前，已有研究证实了郁金挥发油成分如 β -榄香烯、莪术二酮、新莪术二酮等具有抗凝血和抗血栓形成、延长凝血酶时间，抑制血小板聚集等作用^[8-9]，提示郁金挥发油成分具有心血管保护作用，但郁金挥发油对心脏肥大的影响尚未见报道。因此，本研究通过网络药理学方法分析郁金精油抗心脏肥大的作用靶点及机制，进一步在异丙肾上腺素 (isoproterenol, ISO) 诱导的大鼠 H9c2 心肌细胞肥大模型上对关键靶点进行验证，以期对心脏肥大的临床防治提供参考。

1 材料

1.1 试药

ISO (中国食品药品检定研究院，批号：Z21N10X103254，纯度：99.9%)；郁金精油 [颇黎芳香医药科技 (上海) 有限公司，批号：RA1827，纯度：100%，原植物：姜科姜黄属植物“郁金”]；DMEM 高糖培养基 (北京索莱宝科技有限公司，批号：20220929)；胎牛血清 (Gemini 公司，批号：A15H74K)；PCR 扩增试剂盒、逆转录试剂盒 (日本 Takara 公司)；MTT (德国 BIOFROXX 公司，批号：EZ7890B104)；二甲基亚砜 (DMSO) (北京索莱宝科技有限公司，批号：710N032)。

1.2 细胞

大鼠 H9c2 心肌细胞 (协和医科大学细胞实验中心)，在含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中，置于 37℃ 含 5% CO₂ 培养箱内培养。

1.3 仪器

Spectra Max Plus384 全波长酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司)；CFX96 Real-Time PCR 仪 (美国 Bio-rad 公司)；梯度 PCR 仪 (杭州米欧仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 网络药理学研究

2.1.1 郁金精油有效成分及作用靶点的筛选 通过 CNKI、PubMed 等数据库检索到郁金精油成分相关文献，选择相关度更高的 5 篇文献^[10-14]，删除重复项，通过 PubChem 数据库 (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 对所检索化学成分进行确认，根据类药五原则 (Lipinski 原则，相对分子质量 < 500、脂水分配系数 < 5、氢键供体 < 5、氢键受体 < 10、可旋转键数 ≤ 10) 进行筛选，删除重复项后共筛选出 71 个化合物 (见表 1)，获取其 SMILE 号。利用小分子药物靶点预测在线平台 (Swiss Target Prediction, <http://www.swisstargetprediction.ch/>) 以 “Probability” > 0 为原则获取化学成分潜在作用靶点，利用 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org>) 查询靶点所对应的基因名，删除重复项后得到郁金精油作用靶点共 376 个。

2.1.2 心脏肥大疾病靶点的筛选 利用 GeneCards 数据库 (<http://www.genecards.org/>)、人类孟德尔遗传数据库 (OMIM, <http://www.omim.org>)，以 “cardiomyocyte hypertrophy” 为检索词进行检索，删去重复项，取并集，以 “Relevance score” > 中位数为筛选标准，获得心脏肥大疾病靶点 1445 个。

2.1.3 郁金精油抗心脏肥大潜在靶点获取 将郁金精油成分靶点与心脏肥大疾病靶点导入 Venny 2.1.0 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)，获得交集靶点 110 个，即为郁金精

表 1 郁金精油有效成分

Tab 1 Active ingredients of *Curcuma aromatica* essential oil

序号	化合物	序号	化合物
1	莪术烯	37	三环烯
2	β -姜黄烯	38	α -侧柏烯, (+/-)-
3	茨烯	39	α -蒎烯
4	樟脑	40	桉烯
5	异龙脑	41	柠檬烯, (+/-)-
6	莪术二酮	42	γ -异松油烯
7	β -蒎烯	43	萜品油烯
8	桉叶油醇	44	1, 7, 7-trimethylbicyclo [2.2.1] heptan-2-ol
9	芳樟醇 (+/-)-	45	4-松油醇, (+/-)-
10	石竹烯	46	α -松油醇
11	萹草烯	47	白乙酯
12	吉马烯 D	48	(-)- α -古巴烯
13	吉马烯 B	49	(Z)-石竹烯
14	β -氧化石竹烯	50	α -柏木烯
15	β -榄香烯	51	α -香柠檬烯, (E)-(-)-
16	吉马酮	52	α -愈创木烯
17	新莪术二酮	53	β -雪松烯
18	4, 5-epoxygermacrone	54	榄香醇
19	郁金烯酮	55	反式-橙花叔醇
20	环己烷	56	桉油烯醇
21	N, N-二甲基乙酰胺	57	莪术酮
22	2-甲基-3-丁烯-2-醇	58	萹草烯环氧化物 II
23	月桂烯	59	β -桉叶油醇
24	龙脑	60	姜黄新酮
25	反式-3-己烯-1-醇	61	莪术烯醇
26	对茴香醛	62	α -姜黄酮
27	2-甲氧基-4-乙基苯酚	63	ar-姜黄酮
28	环戊基乙酸甲酯	64	莪术醇
29	绿花白千层醇	65	氧化萹草烯 II
30	喇叭茶醇	66	4-异丙基甲苯
31	荜澄茄油烯醇	67	香薷酮
32	表蓝桉醇	68	长叶薄荷酮
33	(+)- β -环氧蒎烯	69	广藿香醇
34	环戊基甲醇	70	cycloisolongifolene, 8, 9-dehydro-9-formyl-
35	2, 6-壬二烯-1-醇	71	橙花叔醇
36	trans-Z- α -bisabolene epoxide		

油抗心脏肥大的潜在作用靶点。

2.1.4 郁金精油抗心脏肥大潜在靶点相互作用网络的构建 将上述潜在靶点导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org>) 中, 选定物种为“Homo sapiens”, 参数设置为默认参数, 构建蛋白质相互作用 PPI 网络, 下载后将其导入 Cytoscape 3.8.0 软件中进行可视化分析, 得到靶点蛋白互作 (PPI) 网络图 (见图 1)。图中包含 110 个节点, 1323 条边, 图中节点为靶点, 边为靶点之间的联系, 节点的颜色反映节点的度中心性 Degree 值, 颜色越深则其 Degree 值越大。根据 Degree 值排序, 筛选排名前 6 的关键靶点, 分别为 AKT1、TNF、MAPK3、EGFR、STAT3 及 SRC, 颜色越深则其 Degree 值越大。

2.1.5 GO 功能富集分析与 KEGG 通路富集分析

将郁金精油抗心脏肥大的 110 个潜在靶点导入 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov>) 进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析, 并将结果进行可视化。GO 功能富集共获得 796 个条目, 其中生物过程 (BP) 分类主要包括磷酸化、蛋白质磷酸化、ERK1 和 ERK2 级联的正向调节等 593 个条目; 细胞组分 (CC) 分类主要包括膜筏、细胞质、质膜等 74 个条目; 分子功能 (MF) 分类主要包括酶结合、核受体活性、三磷酸腺苷 (ATP) 结合等 129 个条目。根据 *P* 值由小到大排序, 筛选出三个功能分类结果中前 10 条通过微生信平台绘图 (见图 2)。KEGG 富集分析共获得 163 条信号通路, 其中 159 条信号通路的阈值 *P* < 0.05, 选取前 20 条信号通路, 通过微生信平台绘制可视化气泡图 (见图 3)。郁金精油抗心脏肥大主要与癌症通路、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药、催乳素信号通路等信号通路有关。

2.2 体外实验验证

2.2.1 郁金精油对心肌细胞活力的影响 参考文献^[15]方法培养 H9c2 心肌细胞。采用 MTT 法考察不同质量浓度的郁金精油 (0.017、0.034、0.068、0.090、0.135 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 对 H9c2 心肌细胞活力的影响。结果显示, 与正常对照组比较, 郁金精油 0.090 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 0.135 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 可使 H9c2 心肌细胞活力显著降低 (*P* < 0.05), 而当其在 0.017 ~ 0.068 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对心肌细胞活力无影响 (见表 2), 因此本研究选择郁金精油 0.068 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 进行后续实验。

2.2.2 郁金精油对 ISO 诱导的心肌细胞肥大的影响 参考文献方法^[15], 细胞接种培养 24 h 后随机分为以下组别: 正常对照组 (加入等体积 DMSO)、模型组 (加入 ISO 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、郁金精油干预组 (预先 1 h 加入郁金精油 0.068 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 后加入 ISO 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、郁金精油单独组 (加入郁金精油 0.068 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。药物作用 24 h 后, 拍照, 测量心肌细胞面积, 并提取细胞总 RNA 进行逆转录与扩增反应, 根据双标准曲线法计算各组心脏肥大相关胚胎基因心房钠尿肽 (ANP) 和 α -骨骼肌肌动蛋白 (α -SKA) 的 mRNA 表达。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 引物序列见表 3。结果如表 4 所示, 与正常对照组比较, ISO 诱导心肌细胞面积增加 (*P* < 0.05); 心脏肥大相关胚胎基因 ANP 和 α -SKA mRNA 上调 (*P* < 0.05)。与模型组比较, 0.068 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 郁金精油干预后可使上述指标降低 (*P* < 0.05), 表明郁金精油可抑制 ISO 诱导的心肌细胞肥大。

2.2.3 关键靶点的 mRNA 表达验证 实验接种和加药同“2.2.2”项下方法操作。药物作用 24 h 后, 提

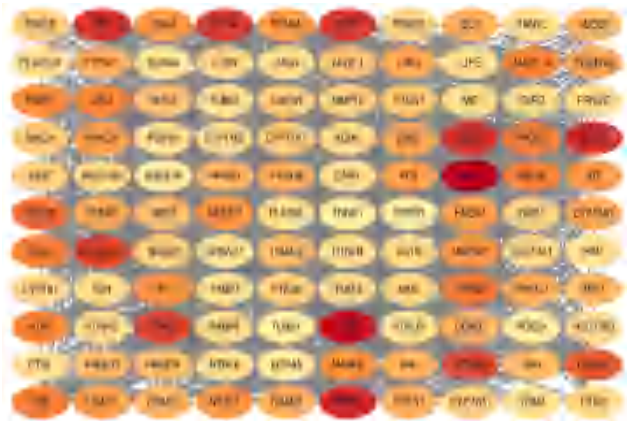


图 1 郁金精油抗心脏肥大潜在靶点的 PPI 网络图
Fig 1 PPI network diagram of potential targets of *Curcuma aromatica* essential oil against cardiac hypertrophy

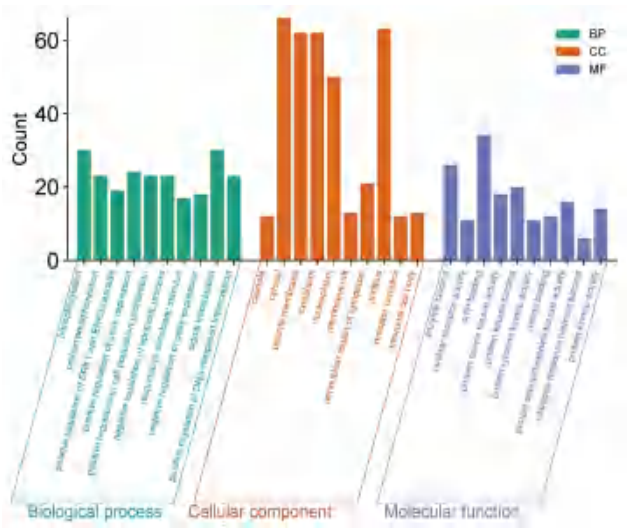


图 2 郁金精油抗心脏肥大 GO 富集分析
Fig 2 GO function enrichment analysis of *Curcuma aromatica* essential oil against cardiac hypertrophy

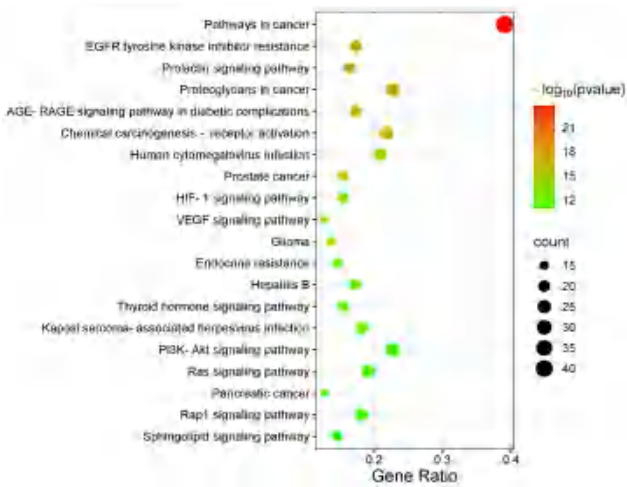


图 3 郁金精油抗心脏肥大 KEGG 富集分析
Fig 3 KEGG pathway enrichment analysis of *Curcuma aromatica* essential oil against cardiac hypertrophy

表 2 郁金精油对心肌细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Tab 2 Effect of *Curcuma aromatica* essential oil on the viability of cardiomyocytes ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	抑制率 / %
正常对照组	—	0.00 $\pm$ 2.64
郁金精油组	0.017	— 4.90 $\pm$ 3.91
	0.034	6.10 $\pm$ 1.44
	0.068	0.14 $\pm$ 1.72
	0.090	11.84 $\pm$ 1.77*
	0.135	48.85 $\pm$ 0.63*

注：与正常对照组比较，* $P < 0.05$ 。
Note: Compared with the normal control group, * $P < 0.05$.

取细胞总 RNA，采用 RT-qPCR 实验验证关键靶点蛋白激酶 B1 (*AKT1*)、肿瘤坏死因子 (*TNF*)、丝裂原活化蛋白激酶 3 (*MAPK3*)、表皮生长因子受体

表 3 qPCR 引物序列
Tab 3 Primer sequence of qPCR

基因	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')	长度 /bp
<i>ANP</i>	TCTCCATCACCAAGGGCTTC	TGACCTCATCTTCTACCGGC	159
α - <i>SKA</i>	GAAGGACCTGTACGCCAACA	TCCACACTGAGTACTTGCGC	152
<i>AKT1</i>	GAGAACCGTGTCTGCAGAA	ACACAATCTCCGCACCGTAG	184
<i>TNF</i>	ACGTCGTAGCAAACCAACAA	GCAGCCTTGTCCTTGAAGA	164
<i>MAPK3</i>	CTGGACCAGCTCAACCACAT	GTGATGCGCTTGTGGGGTT	209
<i>EGFR</i>	TTCTTTCACCCGCACTCCTC	TGTTGCTTTGTTCTGCCACG	162
<i>STAT3</i>	GAGCTGCACCTGATCACCTT	TTGGTGGTGGACGAGAAGT	248
<i>SRC</i>	TGAGGCATGAGAAGCTGGTG	GTCCCGGTGCACATAGTTCA	209
<i>18S rRNA</i>	GGCCGTTCTTAGTTGGTGGA	TGAGCCAGTTCAGTGTAGCG	213

(*EGFR*)、信号传导和转录激活因子 3 (*STAT3*)、非受体酪氨酸激酶 (*SRC*) 的 mRNA 表达，引物序列见表 3。结果见表 5，与正常对照组比较，ISO 诱导心肌细胞 *AKT1*、*TNF*、*MAPK3*、*STAT3*、*SRC* mRNA 表达上调 ($P < 0.05$)，*EGFR* mRNA 表达有上调趋

势；与模型组比较，郁金精油干预组心肌细胞 *AKT1*、*TNF*、*MAPK3*、*EGFR*、*STAT3*、*SRC* mRNA 表达下调 ($P < 0.05$)。

2.3 统计学分析
采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据分析。

表 4 郁金精油对 ISO 诱导的心肌细胞面积及 ANP、 α -SKA mRNA 相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 4 Effect of *Curcuma aromatica* essential oil on ISO-induced cardiomyocyte area and relative expression of ANP, α -SKA mRNA ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞相对面积 ($n = 6$)	ANP/18S ($n = 5$)	α -SKA/18S ($n = 5$)
正常对照组	1.00 $\pm$ 0.03	1.00 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.02
模型组	1.29 $\pm$ 0.03 [*]	1.32 $\pm$ 0.04 [*]	1.32 $\pm$ 0.05 [*]
郁金精油干预组	0.98 $\pm$ 0.03 [#]	1.06 $\pm$ 0.04 [#]	0.91 $\pm$ 0.09 [#]
郁金精油单独组	0.95 $\pm$ 0.02	1.09 $\pm$ 0.04	0.93 $\pm$ 0.05

注：与正常对照组比较，^{*} $P < 0.05$ ；与模型组比较，[#] $P < 0.05$ 。

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

表 5 郁金精油对 ISO 诱导的心肌细胞 AKT1、TNF、MAPK3、EGFR、STAT3、SRC mRNA 相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Tab 5 Effect of *Curcuma aromatica* essential oil on the mRNA relative expression of AKT1, TNF, MAPK3, EGFR, STAT3, and SRC mRNA in ISO-induced cardiomyocyte ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	AKT1/18S	TNF/18S	MAPK3/18S	EGFR/18S	STAT3/18S	SRC/18S
正常对照组	1.00 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.13	1.00 $\pm$ 0.03	1.00 $\pm$ 0.02
模型组	1.26 $\pm$ 0.06 [*]	1.73 $\pm$ 0.25 [*]	1.28 $\pm$ 0.06 [*]	1.43 $\pm$ 0.15	1.28 $\pm$ 0.05 [*]	1.19 $\pm$ 0.05 [*]
郁金精油干预组	0.84 $\pm$ 0.05 [#]	1.08 $\pm$ 0.04 [#]	0.94 $\pm$ 0.05 [#]	0.26 $\pm$ 0.07 [#]	0.92 $\pm$ 0.08 [#]	0.92 $\pm$ 0.03 [#]
郁金精油单独组	0.92 $\pm$ 0.04	1.03 $\pm$ 0.10	0.98 $\pm$ 0.05	0.87 $\pm$ 0.11	0.92 $\pm$ 0.03	1.03 $\pm$ 0.04

注：与正常对照组比较，^{*} $P < 0.05$ ；与模型组比较，[#] $P < 0.05$ 。

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

显著。《本草汇言》谓，“郁金，其性轻扬，能散郁滞，顺逆气，上达高巅，善行下焦，心肺肝胃气，血火痰郁遏不行者最验。”王巧阳等^[17]对某医院心血管科门诊 6000 张中药处方进行了用药规律分析，结果显示郁金的使用频次为 3328 次，使用频率达 55.47%，是使用频率排名前 20 的中药之一。赵健等^[18]运用数据挖掘方法总结了严季澜教授辨治心血管病的临证经验，结果显示在肝郁气滞、心气不足型胸痹心痛的病例中，郁金的用药频数最高。新近研究显示郁金显著改善大鼠心肌梗死、血瘀及血脂异常，进一步相关性分析显示该作用可能归因于莪术烯、异原莪术烯醇、莪术烯醇等郁金精油成分^[4]。本研究结果证实郁金精油抑制 ISO 诱导的心肌细胞肥大，该研究结果与上述文献报道一致。

本研究利用网络药理学方法从相关文献中共筛选得到 71 种郁金精油活性成分，可作用于 110 个心脏肥大疾病靶点，其中前 6 位关键靶点分别为 AKT1、TNF、MAPK3、EGFR、STAT3 及 SRC。另外，本研究对郁金精油抗心脏肥大作用的 110 个靶点进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析。GO 功能富集分析显示，郁金精油抗心脏肥大作用主要涉及磷酸化、蛋白质磷酸化、ERK1 和 ERK2 级联的正向调节等生物过程。

符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间均数比较采用单因素方差分析，组间采用 Tukey 进行多重比较。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 讨论

病理性心脏肥大是由于应激刺激或疾病如冠心病、高血压及心肌梗死等因素所致的心室重塑和心功能不全，主要表现为心室壁增厚，心肌细胞大小和心脏质量增加以及胚胎基因的重新表达等。病理性心脏肥大可持续增加心脏的前、后负荷，使代偿性肥大发展为失代偿，最终导致心功能障碍，如心律失常、心力衰竭或猝死^[16]。郁金是常用的传统活血类中药，治疗心血管疾病疗效

KEGG 通路富集分析显示，郁金精油抗心脏肥大主要与癌症通路、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药、催乳素信号通路等通路有关。

AKT1 是一种丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶，也是 PI3K 的下游靶蛋白，其激活后具有抗凋亡、促进细胞增殖、调节心肌细胞生长和血管生成的作用，AKT1 被认为是防治心脏肥大的重要靶点^[19]。TNF- α 是与心脏疾病相关的促炎细胞因子，其可介导核转录因子 κ B (NF- κ B) 活化并转运至细胞核，激活 NLRP3 炎症小体，促进心脏肥大，而下调 TNF- α /NF- κ B/NLRP3 通路可改善心脏肥大^[20]。MAPK3 又称为细胞外信号调节激酶 1 (ERK1)，主要与细胞的生长发育、增殖等过程有关。研究表明 ERK1/2 和 p38 MAPK 信号通路参与 ISO 诱导的心脏肥大^[21]。EGFR 为表皮生长因子受体，EGFR 信号级联是细胞增殖、分化、存活以及肿瘤发生发展的关键调节因子。研究表明，增加 EGFR 转录活性可激活其下游靶标 AKT，导致心脏肥大^[22]。信号传导和转录激活因子 3 (STAT3) 参与细胞生长、分化、迁移、凋亡等多种生理功能的调控，与炎症、肥大、纤维化及肿瘤等疾病发生发展密切相关^[23]。抑制 STAT3 活性可缓解心脏肥大、心功能障碍^[24]。SRC 是一种非受体酪氨酸激酶，与细胞生长、分化、迁移

和存活密切相关。研究证实 SRC 激酶可介导 ISO 诱导的心脏肥大和心脏成纤维细胞转分化, 已经成为心脏重构的潜在药物治疗靶点^[25]。本研究采用 RT-qPCR 实验考察了上述 6 个靶点基因在 ISO 诱导的心肌细胞肥大模型中的表达, 评价了郁金精油的干预作用。研究结果显示郁金精油抑制 ISO 诱导的心肌细胞 *AKT1*、*TNF*、*MAPK3*、*EGFR*、*STAT3*、*SRC* mRNA 表达上调。

综上所述, 本研究通过网络药理学及体外实验探究了郁金精油对心脏肥大的影响及可能的作用机制。研究结果显示, 郁金精油具有抗心肌细胞肥大作用, 该作用与其下调心肌细胞 *AKT1*、*TNF*、*MAPK3*、*EGFR*、*STAT3*、*SRC* 等基因表达有关。该研究结果为明确郁金精油防治心血管疾病的作用机制提供实验依据。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 217.
- [2] 胥靖域, 吴军, 顾三元. 郁金的炮制历史沿革、药理作用及临床应用研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2025, 27 (2): 84-88.
- [3] 石冰卓, 郝春华, 张蕊, 等. 毛郁金醋酸乙酯提取物对大鼠心肌缺血再灌注损伤的治疗作用 [J]. 中草药, 2018, 49 (3): 633-639.
- [4] Fei CH, Ji D, Tong HJ, et al. Therapeutic mechanism of *Curcuma aromatica* Salisb. rhizome against coronary heart disease based on integrated network pharmacology, pharmacological evaluation and lipidomics [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 950749.
- [5] Li Y, Feng J, Mo YQ, et al. Concordance between cardio-protective effect on isoproterenol-induced acute myocardial ischemia and phenolic content of different extracts of *Curcuma aromatica* [J]. Pharm Biol, 2016, 54 (12): 3226-3231.
- [6] 李星辰, 尹丽燕, 蔡红, 等. 温郁金化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及其质量标志物的预测分析 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48 (20): 5419-5437.
- [7] 刘俊宏, 方慧, 杨文通, 等. 温郁金抗肿瘤有效成分及相关机制进展 [J]. 中华中医药学刊, 2023, 41 (7): 33-37.
- [8] 王秀, 夏泉, 许杜娟, 等. 莪术中莪术二酮抗凝血和抗血栓作用的实验研究 [J]. 中成药, 2012, 34 (3): 550-553.
- [9] Tong HJ, Yu MT, Fei CH, et al. Bioactive constituents and the molecular mechanism of *Curcuma Rhizoma* in the treatment of primary dysmenorrhea based on network pharmacology and molecular docking [J]. Phytomedicine, 2021, 86: 153558.
- [10] Liu QD, Komatsu K, Toyme K, et al. Essential oil composition of *Curcuma* species and drugs from Asia analyzed by headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Nat Med, 2023, 77 (1): 152-172.
- [11] Mohanty S, Ray A, Naik PK, et al. Variation in yield, chemical composition and biological activities of essential oil of three *Curcuma* species: a comparative evaluation of hydrodistillation and solvent-free microwave extraction methods [J]. Molecules, 2023, 28 (11): 4434.
- [12] Dosoky NS, Setzer WN. Chemical composition and biological activities of essential oils of *Curcuma* species [J]. Nutrients, 2018, 10 (9): 1196.
- [13] Al-reza SM, Rahman A, Sattar MA, et al. Essential oil composition and antioxidant activities of *Curcuma aromatica* Salisb [J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48 (6): 1757-1760.
- [14] Dosoky NS, Satyal P, Setzer WN. Variations in the volatile compositions of *Curcuma* species [J]. Foods, 2019, 8 (2): 53.
- [15] 邱雨美, 李冰涛, 欧阳长生, 等. 西洋参抗心脏肥大的网络药理学分析和实验验证研究 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2023, 21 (7): 1224-1232.
- [16] Shi SG, Jiang PD. Therapeutic potentials of modulating autophagy in pathological cardiac hypertrophy [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 156: 113967.
- [17] 王巧阳, 王国军, 何俊明, 等. 心血管科门诊中药处方分析与管理建议 [J]. 中医药管理杂志, 2021, 29 (13): 139-141.
- [18] 赵健, 李柳骥, 严季澜. 严季澜辨治心血管病临证经验数据分析 [J]. 安徽中医学院学报, 2013, 32 (5): 10-14.
- [19] Zhang ZZ, Wang CX. Exploring key genes and pathways of cardiac hypertrophy based on bioinformatics [J]. Dis Markers, 2022, 2022: 2081590.
- [20] Gao Y, Li S, Liu XY, et al. RyR2 stabilizer attenuates cardiac hypertrophy by downregulating TNF- α /NF- κ B/NLRP3 signaling pathway through inhibiting calcineurin [J]. J Cardiovasc Transl Res, 2024, 17 (3): 481-495.
- [21] Song RX, Xiong CM, Bai JC, et al. Artemisinin attenuates isoproterenol-induced cardiac hypertrophy via the ERK1/2 and p38 MAPK signaling pathways [J]. Curr Mol Pharmacol, 2024 (17): e18761429244886.
- [22] Li FF, Du MM, Yang YM, et al. Zinc finger and BTB domain-containing protein 20 aggravates angiotensin II-induced cardiac remodeling via the EGFR-AKT pathway [J]. J Mol Med (Berl), 2022, 100 (3): 427-438.
- [23] Winkle AJ, Nassal DM, Shaheen R, et al. Emerging therapeutic targets for cardiac hypertrophy [J]. Expert Opin Ther Targets, 2022, 26 (1): 29-40.
- [24] Ye SJ, Luo W, Khan ZA, et al. Celastrol attenuates angiotensin II-induced cardiac remodeling by targeting STAT3 [J]. Circ Res, 2020, 126 (8): 1007-1023.
- [25] Li WQ, Zhu YZ, Wang WJ, et al. Src tyrosine kinase promotes cardiac remodeling induced by chronic sympathetic activation [J]. Biosci Rep, 2023, 43 (10): BSR20231097.

(收稿日期: 2024-10-01; 修回日期: 2024-11-08)

基于生信分析与实验验证探讨糖肾灌肠方改善糖尿病肾病的作用机制

余辉¹, 王先敏², 王冲¹, 王尹¹, 藏登², 刘新³, 王晶⁴, 马丽^{2*} (1. 新疆医科大学第四临床医学院, 乌鲁木齐 830000; 2. 新疆医科大学附属中医医院, 乌鲁木齐 830000; 3. 新疆医科大学, 乌鲁木齐 830000; 4. 新疆医科大学附属中医医院呼吸病研究重点实验室, 乌鲁木齐 830000)

摘要: **目的** 采用生物信息分析与实验验证研究糖肾灌肠方对足细胞凋亡的影响, 探讨糖肾灌肠方对糖尿病肾病 (DN) 小鼠肾小球的保护机制。 **方法** 通过分析 GEO 数据库获取 DN 相关数据 (GSE30528, GSE96804) 以及前期网络药理学数据得出糖肾灌肠方治疗 DN 的潜在作用靶点。另进行体内实验, 将小鼠分为正常组、DN 组、DN + 糖肾灌肠方组、DN + 阳性药物组 (卡格列净), 每组 10 只。通过高糖高脂饮食 + 链脲佐菌素 (STZ) 腹腔注射建立 DN 模型, 造模成功后给予相应的药物干预 4 周。干预结束后, 检测小鼠尿微量白蛋白 (MAU) 及血糖; HE 染色检测肾小球病理损伤; 电镜检测肾组织超微结构病理损伤; TUNEL 染色检测肾组织细胞凋亡; Western blot 法和 RT-PCR 法检测小鼠肾组织 Bak1、Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达及 mRNA 表达。 **结果** 根据对 GEO 数据库中糖尿病肾病肾小球样本和正常人样本数据分析及前期网络药理学分析发现凋亡是药物调控的关键机制, 并发现 Bak1, Caspase-3 为药物调控凋亡的潜在作用靶点。与模型组比较, 用药后小鼠肾组织中 Bcl-2 的蛋白和 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$), Bak1、Cytochrome C、Cleaved Caspase-3、Cleaved PARP 和 Bax 蛋白表达水平及 mRNA 表达水平降低 ($P < 0.05$), 肾组织细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$), 小鼠血糖及尿微量白蛋白得到改善 ($P < 0.01$), 肾小球病理损伤有不同程度改善。 **结论** 糖肾灌肠方通过调控 Bak1/Caspase-3 改善肾小球足细胞凋亡, 进而延缓 DN 的进展。

关键词: 糖肾灌肠方; 凋亡; 肾小球; 足细胞; Bak1

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)04-0893-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.004

Molecular mechanism of Tangshen Guanchang prescription in improving diabetic nephropathy based on bioinformatics and experiment verification

YU Hui¹, WANG Xian-min², WANG Chong¹, WANG Yin¹, ZANG Deng², LIU Xin³, WANG Jing⁴, MA Li^{2*} (1. The Fourth School of Clinical Medicine of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000; 2. The Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000; 3. The Xinjiang Medical University, Urumqi 830000; 4. The Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine of Xinjiang Medical University, Laboratory of Respiratory Disease Research, Urumqi 830000)

Abstract: Objective To determine the effect of Tangshen Guanchang prescription on podocyte apoptosis and its protective mechanism on the glomerulus of diabetic nephropathy (DN) mice. **Methods** By analysing the DN-related data (GSE30528, GSE96804) obtained from the GEO database and previous network pharmacology data, the potential target molecules for DN with Tangshen Guanchang prescription were identified. In the in vivo experiments, mice were divided into a normal groups, a DN group, a

基金项目: 新疆维吾尔自治区重点研发项目 (No.2023B03002); 省部共建中亚高发病因与防治国家重点实验室开放课题 (No.SK-LHIDCA-2019-ZY6); 新疆维吾尔自治区重大科技专项项目 (No.2022A03019)。

作者简介: 余辉, 女, 硕士研究生, 主要从事糖尿病肾病方面的研究, email: 729025901@qq.com * **通信作者:** 马丽, 女, 博士生导师, 主要从事糖尿病中西医结合治疗方面的研究, email: malixj322122@163.com

DN + Tangshen Guanchang prescription group, and a DN + positive drug group (canagliflozin), with 10 mice in each group. After the successful establishment of a DN model by giving a high-sugar, high-fat diet combined with intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ), the corresponding drug was used for intervention for 4 weeks. The mice microalbuminuria and blood glucose detected at the end of the intervention. Glomerular pathological damage was detected by HE staining. Ultrastructural pathological damage of the renal tissue was detected by electron microscopy. Renal tissue cell apoptosis was detected by TUNEL staining. The protein and mRNA expression levels of Bak1, Caspase-3, Bcl-2 and Bax in mice renal tissue were detected by Western blot and RT-PCR. **Results** Based on the analysis of glomerular samples of DN and normal samples in the GEO database and previous network pharmacology, apoptosis was found to be a key mechanism regulated by drugs, while *BAK1* and *CASPASE-3* were found to be potential targets for drug-regulated apoptosis. After the drug administration, compared with the model group, the protein and mRNA expressions of Bcl-2 in the renal tissue increased ($P < 0.05$), while the protein and mRNA expression levels of Bak1, Cytochrome C, Cleaved Caspase-3, Cleaved PARP and Bax decreased ($P < 0.05$). The apoptosis rate of renal tissue cells increased ($P < 0.05$). The blood glucose and microalbuminuria of mice were improved ($P < 0.01$), and the glomerular pathological damage also improved to various degrees. **Conclusion** Tangshen Guanchang prescription delays the progression of DN by regulating Bak1/Caspase-3 to improve glomerular podocyte apoptosis.

Key words: Tangshen Guanchang prescription; apoptosis; glomerulus; podocyte; Bak1

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病的主要微血管并发症之一, 也是终末期肾病的主要原因之一。其病理生理是蛋白尿和肾小球肿大甚至肾纤维化^[1]。据统计, 有 30% ~ 40% 的 2 型糖尿病患者会在患病后的 5 ~ 10 年发展成为 DN, 给家庭带来了巨大的经济负担^[2]。目前针对 DN 的治疗仅限于降糖和降压治疗, 只能延缓部分的肾损伤^[3]。因此, 开发新的且安全有效的药物成为研究 DN 的首要任务。

DN 的发病机制复杂, 病理特点包括足细胞凋亡。足细胞连同血管内皮细胞和肾小球基底膜共同构成了肾小球血液滤过屏障, 并对毛细血管有支撑作用^[4]。高糖造成肾细胞凋亡时, 肾小球滤过屏障损伤, 从而加速 DN 的进展^[5]。现代研究表明, 凋亡是足细胞损伤的一种方式, 并且足细胞凋亡直接导致了蛋白尿的产生^[6]。凋亡也称 I 型程序性死亡, 有外源和内源两种途径, 即死亡受体介导的通路和线粒体介导的通路^[7], 研究表明, 足细胞凋亡与 DN 的发生发展密不可分^[8]。

目前中草药被广泛地应用于糖尿病及糖尿病并发症的治疗中^[9]。如黄芪、天麻、丹参等, 它们通过调节细胞凋亡相关的信号通路, 如凋亡相关蛋白 (Bcl-2、Bax 等) 的表达、线粒体通路的激活等, 发挥保护足细胞的作用。如黄芪、三七、山楂等, 被发现具有抗炎、抗氧化等作用, 可以减

轻糖尿病肾脏组织的损伤, 进而减少肾细胞凋亡的发生。糖肾灌肠方是本院协定处方, 前期研究表明, 本方具有改善 DN 患者及小鼠的蛋白尿和炎症指标, 延缓 DN 进展的作用^[10-11], 但其具体作用机制尚未深入探索, 故本研究对 GEO (Gene Expression Omnibus) 数据库中 DN 肾小球病变的基因数据进行分析并结合前期网络药理学分析, 发现药物作用靶点, 进一步通过动物实验发现糖肾灌肠方对肾小球损伤的保护机制, 现报道如下。

1 材料

1.1 实验动物

40 只 6 ~ 8 周龄 C57BL/6J 雄鼠, 体重 17 ~ 20 g [新疆医科大学动物实验房, 小鼠饲养于新疆医科大学动物实验房 (SPF 级)], 本实验经新疆医科大学动物伦理委员会审查批准 [伦理批件号: IACUC-20220127-03, 生产许可证号: SCXK (新) 2018-0001, 使用许可证号: SYXK (新) 2018-0002]]。

1.2 试药

灌肠方组成: 生大黄 30 g、煅牡蛎 50 g、泽泻 30 g、丹参 15 g、槐花 30 g、附子 15 g、黄芩 30 g; 上述中药由新疆医科大学附属中医院药剂科提供, 并统一制备, 糖肾灌肠方总方 2 kg 加入 20 kg 水煎煮浓缩至 1 L 药液, 再加热浓缩至 150 mL 浓缩浸膏, 后经过烘干机烘干研磨制备成粉备用。

高脂饲料(北京博爱港生物技术有限公司),小鼠尿微量白蛋白(MAU)ELISA试剂盒(生工生物工程(上海)有限公司),5%脱脂奶粉(赛国生物科技(上海)有限公司),血糖含量检测试剂盒、肌酐含量检测试剂盒、链脲佐菌素(STZ)、ECL Puls 超敏发光液(北京索莱宝科技有限公司),卡格列净(国药集团汕头金石制药有限公司,批号:220215,规格:25 mg/片),Bak1(美国 CST 公司),BCL2 一抗、Bax 一抗、Caspase-3(英国 ABCAM 公司),Cytochrome C、PARP1、兔抗二抗、鼠抗二抗(武汉三鹰),逆转录试剂、PCR 试剂(日本 Takara 公司),引物由北京擎科生物科技股份有限公司提供,引物序列见表 1。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列信息
Tab 1 PCR primer sequence information

引物名称	序列(5'→3')	产物 大小 /bp
BAK1-F	CTGGGCTTTGGCTACCGTCTG	132
BAK1-R	GCCTCTCTGTGCGATCCATCTG	
BCL2-F	CGAGTGGGATGCTGGAGATGC	86
BCL2-R	GGTTGCTCTCAGGCTGGAAGG	
BAX-F	CGTGAGCGGCTGCTTGTCTG	127
BAX-R	TGGTGAGCGAGGCGGTGAG	
CASPASE-3-F	AGTGGGACTGATGAGGAGATGGC	140
CASPASE-3-R	ATGCTGCAAAGGGACTGGATGAAC	
TP53-F	GAACCGCCGACCTATCCTTACC	102
TP53-R	CTCCCAGGGCAGGCACAAAC	
BIRC5-F	CTACCGCATCGCCACCTTCAAG	82
BIRC5-R	GAAGCCAGCCTCCGCCATTC	
PARP-F	GCCTTGTTGGAGTACGAGATTGAC	111
PARP-R	AGACACTGCCTGCTGGACCTC	
CYTOCHROME C-F	TTGTTCAGAAGTGTGCCAGTGC	83
CYTOCHROME C-R	CCCGAACAGACCGTGGAGATTG	
β -actin-F	GTGACGTTGACATCCGTAAAGA	287
β -actin-R	GCCGGACTCATCGTACTCC	

1.3 仪器

KZ-III-F 型高速低温组织研磨仪、SMB-PC 型金属浴(武汉赛维尔生物科技有限公司),LEGEND MICRO 21 型高速冷冻离心机、MULTISKAN 型酶标仪、7500 型实时荧光定量 PCR 仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司],OI900 型全自动化学发光凝胶成像仪(广州光仪生物科技),PowerPac HC 型 PowerPac 高电流电泳仪(美国 BIO-RAD)。

2 方法与结果

2.1 糖肾灌肠方作用疾病的潜在靶点筛选

2.1.1 正常人与 DN 患者共有差异基因分析 GO 和 KEGG 富集 本研究从 GEO 数据库中导出两个数据集,即 GSE30528 Affymetrix Human Genome U133A 2.0 Array 芯片数据,该数据共使用了 22 个人肾小球

样本,来自 9 个病例和 13 个对照的样本。GSE96804 Affymetrix Human Transcriptome Array 2.0 芯片数据,该数据共使用了 61 个人肾小球样本,来自 41 个病例和 20 个对照的样本。再使用 R 语言 limma 包线性拟合方法、贝叶斯分析和 t 检验的算法识别 DN 和正常人的差异表达基因(DEGs),筛选出 $P < 0.05$ 的基因为差异表达基因,并使用火山图展示 GSE30528 和 GSE96804 差异基因分布情况。结果见图 1,在 GSE30528 的基因芯片集中正常人和 DN 的差异基因,下调的有 2167 个,上调的有 2410 个。在 GSE96804 基因芯片集中下调的有 7222 个,上调的有 7601 个。对 GSE30528 及 GSE96804 共有的差异基因取交集,结果在 GSE30528 基因芯片集中的差异基因有 1943 个,在 GSE96804 基因芯片集中的差异基因有 12 189 个,再取两个差异基因的交集提示有 2634 个差异基因,说明有 2634 个基因在疾病中起到了至关重要的作用。

2.1.2 共有差异基因 GO 和 KEGG 富集 对于共有差异基因的基因集功能富集分析,我们使用 R 软件包 org.Hs.eg.db (Version 3.1.0) 中的基因的 GO 注释,以此作为背景,将基因映射到背景集合中,使用 R 软件包 clusterProfiler (Version 3.14.3) 进行富集分析,以获得基因集富集的结果。结果见图 2,在生物过程(BP)上差异基因大多富集在系统进展,细胞过程的负调控,转录,对有机物的反应,细胞对化学刺激的反应。在细胞组分(CC)中大多富集在胞质溶胶、囊泡、内膜系统、细胞内囊泡、细胞外泌体。在分子功能(MF)中大多富集在阴离子结合、酶结合、碳水化合物衍生物结合。对于基因集功能富集分析,使用 KEGG rest API (<https://www.kegg.jp/kegg/rest/keggapi.html>) 获取了最新的 KEGG Pathway 的基因注释,以此作为背景,将基因映射到背景集合中,使用 R 软件包 clusterProfiler (Version 3.14.3) 进行富集分析,以获得基因集富集的结果。结果见图 3,涉及的通路主要在细胞程序性死亡(PCD)(如凋亡、自噬、铁死亡)、PI3K-AKT 信号通路、MAPK 信号通路等。说明 DN 肾小球损伤主要是程序性死亡造成的。

2.1.3 程序性死亡相关基因筛选 对从 KEGG 数据库中收录的文献的细胞程序性死亡的相关基因构建基因集与正常人与 DN 患者共有差异基因取交集,使用和弦图表示。结果见图 4,与凋亡相关的潜在靶点共有 27 个,前十位为 BAK1、AKT3、GADD45B、CAPN1、CTSV、BCL2、PTPN13、PIK3CD、ACTB、TP53。

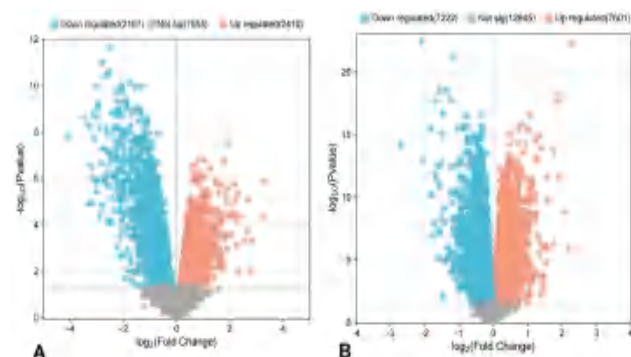


图 1 GSE30582 (A) 及 GSE96804 (B) 集中的差异基因

Fig 1 Volcano plot of differentially expressed genes in GSE30582 (A) and GSE96804 (B)

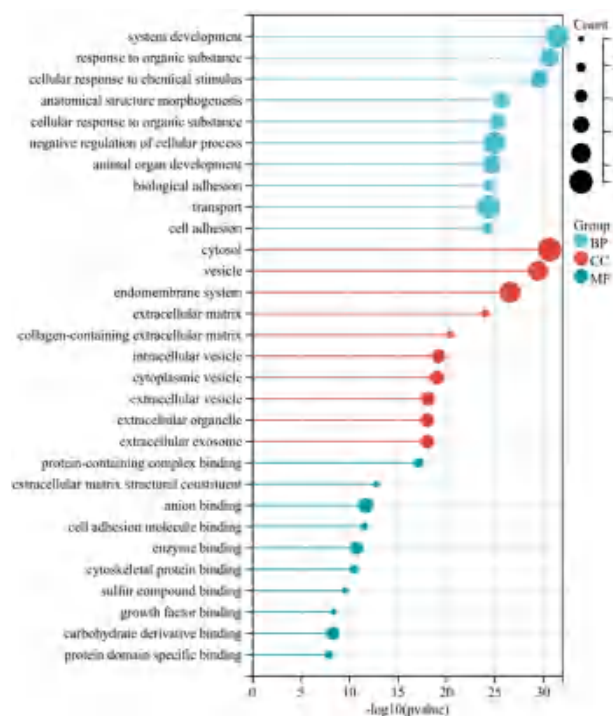


图 2 DGEs 的 GO 富集分析气泡图

Fig 2 Bubble plots of GO enrichment analysis for DGEs

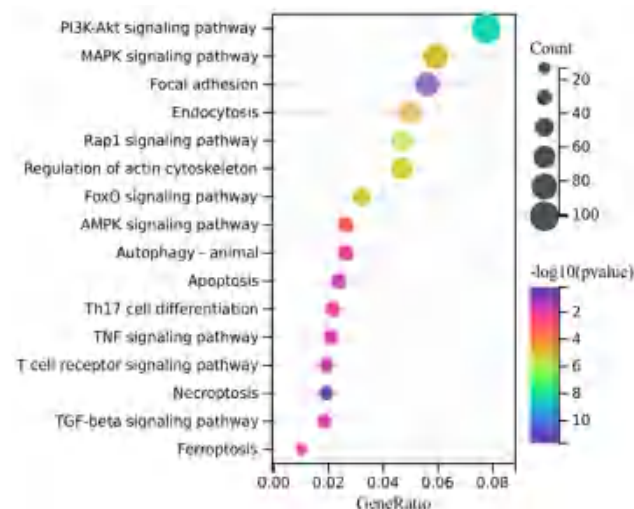


图 3 DGEs 的 KEGG 富集分析气泡图

Fig 3 Bubble plots of KEGG enrichment analysis for DGEs

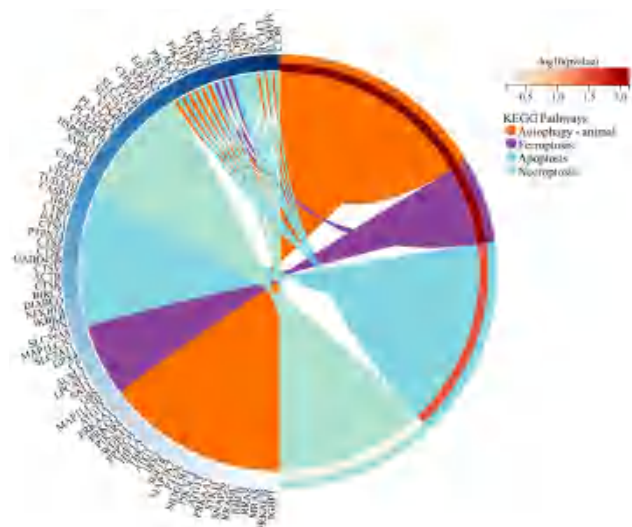


图 4 细胞程序性死亡的 KEGG 富集分析和弦图

Fig 4 Chord diagram for KEGG enrichment analysis of programmed cell death

2.1.4 药物作用疾病的潜在靶点筛选 将“2.1.3”项下调亡相关靶点与药物作用靶点再取交集。将前期网络药理学分析出的药物靶点 193 个^[12], 与“2.12”项下结果中的 27 个基因取交集得出药物作用于调亡的潜在作用靶点, 有 5 个潜在作用靶点: *BAK1*、*BCL2*、*TP53*、*BIRC5*、*CASPASE-3* (图中简称为 *CASP3*)。

2.2 糖肾灌肠方改善肾小球足细胞凋亡实验验证

2.2.1 造模和分组 所有小鼠都在 SPF 级屏障环境中饲养 (温度 22℃, 相对湿度 50%~80%, 昼夜明暗交替时间为 12 h:12 h), 小鼠喂以高糖高脂 (65% 大小鼠维持饲料+10% 猪油+20% 蔗糖+2.5% 胆固醇) 饲料 4 周, 诱导胰岛素抵抗, 连续腹腔注射 STZ (溶于 0.1 mmol·L⁻¹, pH 4.5 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, 配制为 1% 的溶液, 经 0.22 μm 的微孔滤膜过滤除菌, 注射浓度为 50 mg·kg⁻¹, 现配现用) 5 d, 空白对照组腹腔注射等量无菌柠檬酸缓冲液, 72 h 后小鼠尾尖静脉采血, 测定尾静脉血糖值 ≥ 16.7 mmol·L⁻¹ (如有血糖值没有达到 16.7 mmol·L⁻¹ 的小鼠补充注射 STZ), 视为糖尿病小鼠^[13]。继续高糖高脂饲料饲养 8 周, 代谢笼收集每只小鼠 24 h 尿液, 测得尿量大于原尿量 50%、尿蛋白排泄率大于 30 mg/24 h 视为 2 型 DN 模型制备成功^[12]。模型制备成功后将模型动物分组为: 模型组, 糖肾灌肠方组, 卡格列净 (阳性药) 组。动物给药剂量: 糖肾灌肠方给药量为 13 g·kg⁻¹ (相当于生药 52 g·kg⁻¹) 灌肠给药。卡格列净给予 10 mL·kg⁻¹ (即 0.013 g·kg⁻¹) 灌胃给药。持续给药 4 周。

2.2.2 糖肾灌肠方对小鼠肾组织 *BAK1*、*CASPASE-3*、*TP53*、*BIRC5*、*PARP*、*CYTOCHROME C* 及 凋 亡 相 关 基 因 (*BCL2*、*BAX*) 的 mRNA 表达的影响 根据“2.1.4”项下结果可知糖肾灌肠方作用DN的潜在作用靶点,本研究用小鼠肾组织进行PCR验证,取小鼠肾组织适量,粉碎、研磨及匀浆处理后,加入Trizol抽提总RNA,以总RNA为模板反转录得cDNA,再进行PCR扩增反应,反应体系:TB Green premix Ex Tap II 10 μ L,引物各0.8 μ L,ROX Reference Dye II 0.4 μ L,灭菌水6 μ L,模板2 μ L。增加条件

为:预变性95 $^{\circ}$ C 30 s;扩增95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 34 s,40个循环。以 β -actin为内参基因,2 $^{-\Delta\Delta Ct}$ 算法计算各个指标的转录水平。结果见表2,与正常组比较模型组小鼠肾组织的*BAK*、*CASPASE-3*、*BAX*、*PARP*、*CYTOCHROME C* mRNA表达升高($P < 0.01$),而*BCL2* mRNA表达降低($P < 0.01$)。用药后*BAK*、*CASPASE-3*、*BAX*、*PARP*、*CYTOCHROME C* mRNA表达降低($P < 0.01$),*BCL2* mRNA表达升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。*TP53*和*BIRC5*的mRNA表达无明显差异。

表 2 糖肾灌肠方对小鼠肾组织 *BAK1*、*CASPAS-3*、*TP53*、*BIRC5*、*BCL2*、*BAX*、*PARP* 和 *CYTOCHROME C* 的 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Tab 2 Effect of Tangshen Guanchang prescription on <i>BAK1</i> , <i>CASPAS-3</i> , <i>TP53</i> , <i>BIRC5</i> , <i>BCL2</i> , <i>BAX</i> , <i>PARP</i> and <i>CYTOCHROME C</i> mRNA in kidney tissue of mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)								
分组	<i>BAK1</i>	<i>CASPASE-3</i>	<i>TP53</i>	<i>BIRC5</i>	<i>CYTOCHROME C</i>	<i>PARP</i>	<i>BCL2</i>	<i>BAX</i>
正常组	1.40 $\pm$ 1.03	1.01 $\pm$ 0.19	1.05 $\pm$ 0.36	1.02 $\pm$ 0.21	1.00 $\pm$ 0.40	1.07 $\pm$ 0.40	1.01 $\pm$ 0.13	1.03 $\pm$ 0.25
模型组	5.37 $\pm$ 0.66**	1.87 $\pm$ 0.49**	1.14 $\pm$ 0.17	0.80 $\pm$ 0.28	3.18 $\pm$ 0.46**	3.71 $\pm$ 0.82**	0.35 $\pm$ 0.05**	2.44 $\pm$ 0.26**
糖肾灌肠方组	2.91 $\pm$ 0.77###	1.13 $\pm$ 0.19###	1.51 $\pm$ 0.55	1.24 $\pm$ 0.44	1.33 $\pm$ 0.52###	1.86 $\pm$ 0.29###	0.62 $\pm$ 0.24#	1.11 $\pm$ 0.46###
卡格列净组	2.36 $\pm$ 0.73###	1.21 $\pm$ 0.27###	1.54 $\pm$ 0.43	0.92 $\pm$ 0.43	1.30 $\pm$ 0.88###	1.62 $\pm$ 0.48###	0.70 $\pm$ 0.18###	1.37 $\pm$ 0.28###

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 mode group, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$.

2.2.3 糖肾灌肠方对小鼠肾组织 Cytochrome C、Bak1、Caspase-3、PARP 及凋亡相关蛋白表达的影响 取小鼠肾组织适量,研磨后加入RIPA裂解液及PMSF蛋白酶抑制剂提取总蛋白,用BCA分析试剂盒测定蛋白浓度。制备分离胶,取20 μ g蛋白,进行电泳及转膜操作,5%脱脂奶粉封闭,置于合适的一抗抗体及内参抗体孵育过夜,TBST洗涤后,予以合适的兔二抗或鼠二抗室温孵育1 h,化学发光液浸膜显色后,Image J软件分析蛋白条带相对灰度值,以 β -actin为内参蛋白,在EXCEL表格中分析目的蛋白的相对表达水平。结果如图5及表3所示:与正常组比较,模型组小鼠肾组织的Bak1、Cytochrome C、Cleaved Caspase-3、Cleaved PARP和Bax蛋白表达升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),而Bcl2蛋白表达降低($P < 0.01$)。用药后Bak1、Cytochrome C、Cleaved Caspase-3、Cleaved PARP和Bax蛋白表达降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),而Bcl2蛋白表达升高($P < 0.05$)。

2.2.4 小鼠肾组织中细胞凋亡的变化 将肾组织制备成石蜡切块,以冠状位制备4 μ m切片,按TUNEL原位细胞凋亡检测试剂盒说明书操作检测细胞凋亡,DAPI染出来细胞核在紫外光的激发下呈蓝色,用FITC荧光素标记,细胞核固缩、染色体凝集呈绿色为凋亡细胞。结果如图6及表4所示:绿色荧光为凋亡阳性的细胞核。较正常组比较,模型组的绿色荧光较多,而较模型组比

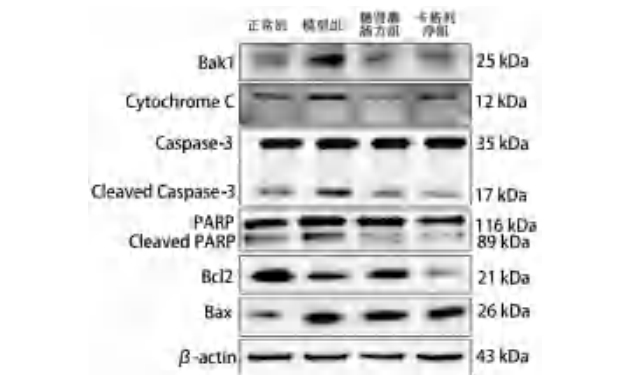


图 5 各组肾脏组织 Bak1、Cytochrome C、Caspase-3、PARP、Bcl2、Bax 的蛋白表达水平

Fig 5 Protein expression levels of Bak1, Cytochrome C, Caspase-3, PARP, Bcl2, and Bax in kidney tissues of each group

较,糖肾灌肠方组及卡格列净组的绿色荧光显然减少,说明模型组的凋亡细胞增多,而用药后凋亡细胞明显减少。

2.2.5 糖肾灌肠方对小鼠血糖、MAU 改变 在处死小鼠24 h前测量小鼠体重,测血糖,收集小鼠尿液,用生化试剂盒检测MAU。结果如表5所示:与正常组比较,模型组小鼠的血糖和MAU升高($P < 0.01$);与模型组比较,糖肾灌肠方组和卡格列净组的血糖和MAU明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2.2.6 糖肾灌肠方对小鼠肾脏组织的病理影响 每组随机选取3只小鼠的肾组织以冰盐水灌洗,分离肾皮质后,以4%多聚甲醛在4 $^{\circ}$ C下固定24 h。

表 3 糖肾灌肠方对小鼠肾组织中 Bak1、Cytochrome C、Caspase-3、PARP、Bcl2 和 Bax 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
Tab 3 Effect of Tangshen Guanchang prescription on the expression of Bak1, Cytochrome C, Caspase-3, PARP, Bcl2, and Bax proteins in kidney tissue of mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

分组	Bak1	Cytochrome C	Caspase-3	Cleaved Caspase-3	PARP	Cleaved PARP	Bcl2	Bax
正常组	1.43±0.07	0.40±0.04	1.52±0.15	0.49±0.03	1.23±0.13	0.59±0.02	1.68±0.12	0.92±0.27
模型组	1.93±0.28*	0.81±0.08**	1.55±0.07	0.97±0.06**	1.39±0.11	1.14±0.02**	0.61±0.19**	1.90±0.21**
糖肾灌肠方组	1.40±0.27 [#]	0.57±0.05 ^{##}	1.55±0.08	0.59±0.03 ^{##}	1.36±0.19	0.52±0.01 ^{##}	1.14±0.31 [#]	1.52±0.12 [#]
卡格列净组	1.40±0.21 [#]	0.55±0.01 ^{##}	1.54±0.09	0.40±0.02 ^{##}	1.14±0.13	0.33±0.01 ^{##}	0.96±0.03 [#]	1.39±0.12 [#]
P 值	0.05	< 0.01	0.97	< 0.01	0.21	< 0.01	< 0.01	< 0.01

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 mode group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$.

表 4 糖肾灌肠方对足细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
Tab 4 Effect of Tangshen Guanchang prescription on podocyte apoptosis ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

分组	凋亡细胞百分比 / %
正常组	0.18±0.07
模型组	4.91±0.08**
糖肾灌肠方组	0.57±0.15 ^{##}
卡格列净组	0.38±0.14 ^{##}

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 mode group, ^{##} $P < 0.01$.

进行脱水，透明，浸蜡，包埋，形成蜡块，用切片机将蜡块切成 4~6 μm 的薄片，置于载玻片上，进行脱蜡染色，接着脱水、透明和封片，镜下观察；将小鼠小块肾组织以 2.5% 戊二醛固定，用环氧树脂包埋，切片机切成 50~70 nm 厚度，染色，进行电镜观察。结果见图 7，与正常组比较，DN 组的肾足细胞减少，外形不规则，足突扁平（黄箭头）；基底膜呈纤维状增厚（橙箭头）；毛细血管袢僵硬、狭窄或闭塞，内皮细胞线粒体肿胀（红箭头）；系膜基质不规则增生，中等电子密度沉积物，系膜细胞增多（绿箭头）。用糖肾灌肠方和卡格列净后改善以上症状。光镜下（HE 染色×200）观察肾组织形态结果提示：正常组的肾小球毛细血管袢开放良好，肾小球毛细血管壁薄而纤细，足细胞、肾小囊壁完整。较正常组比较模型组肾小球体积增大（绿箭头），肾小球细胞增多，毛细血管袢开放尚可，管壁僵硬，肾小囊壁完整。肾小管局部上皮脱落性管型（蓝箭头）。用药后肾小球体积正常，毛细血管袢开放尚可，肾细胞密度基本正常，肾小囊壁完整。但卡格列净组有足细胞密度降低，肾小管上皮细胞局部变性（蓝箭头）。余改变同糖肾灌肠方组。

2.3 统计学分析

以 GraphPad Prism9.0 软件和 SPSS 软件对实验数据进行统计分析及绘图。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，

表 5 各组小鼠的血糖和 MAU 水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
Tab 5 Blood glucose and MAU levels of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

分组	血糖 / (mmol · L ⁻¹)	MAU / (ng · mL ⁻¹)
正常组	5.94±1.27	166.45±83.14
模型组	28.96±2.64**	2107.68±1215.89**
糖肾灌肠方组	24.73±3.54 ^{##}	1159.27±828.78 ^{##}
卡格列净组	22.72±4.57 ^{##}	1325.98±414.79 [#]

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 mode group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$.

数据符合正态分布且方差齐，两组间比较用独立样本 Student's *t* 检验，多组间比较采用 ANOVA 分析并用 LSD 检验进行多重比较，不符合正态分布或方差齐两组间比较用 Mann-Whitney *U* 检验，多组间比较用 Kruskal-Wallis 检验， $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 讨论

糖肾灌肠方是我院协定处方，基于“浊毒内蕴”的病机，以清泄三焦壅塞湿浊之邪，荡涤肠胃湿热秽浊瘀毒为治则，减轻对肾络损伤，方中主药大黄，具有攻积导滞、泻火解毒、泄浊利尿等功效；佐以质重之牡蛎，以敛阴潜阳，收敛固涩，化痰软坚；泽泻，气平，味甘而淡，最善渗泄水道，专能通行小便；黄芩，味苦，具有清热燥湿，泻火解毒之功，全方其性“泻而不猛”，具有“泄浊解毒，扶正祛邪”之功，同时采用保留灌肠的方法给药是糖肾灌肠方的特色优势。药物灌肠治疗是通过刺激肠道蠕动及分泌，增加大便次数，减少食物残渣在肠道的停留时间，减少毒素堆积，同时降低体内毒素水平，达到通腑泄浊、解毒导滞的功能^[14-15]，中药复方作用具有多靶点，多途径的特性，DN 的发病机制复杂，多样化，因此使用生信分析及网络药理学探索中药复方的靶点，为 DN 的治疗提供新的途径。

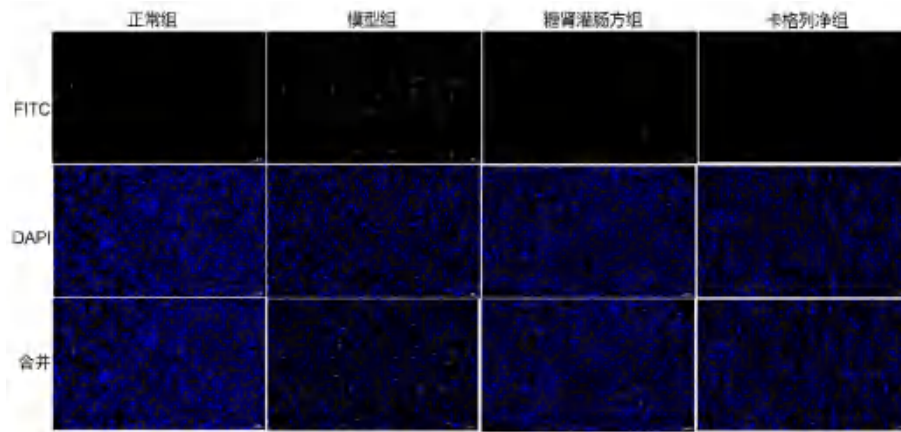


图 6 糖肾灌肠方对肾组织细胞凋亡的影响 ($\times 200$, $n = 3$, 比例尺 = $50 \mu\text{m}$)

Fig 6 Effect of Tangshen Guanchang prescription on apoptosis of renal tissue cells ($\times 200$, $n = 3$, scale = $50 \mu\text{m}$)

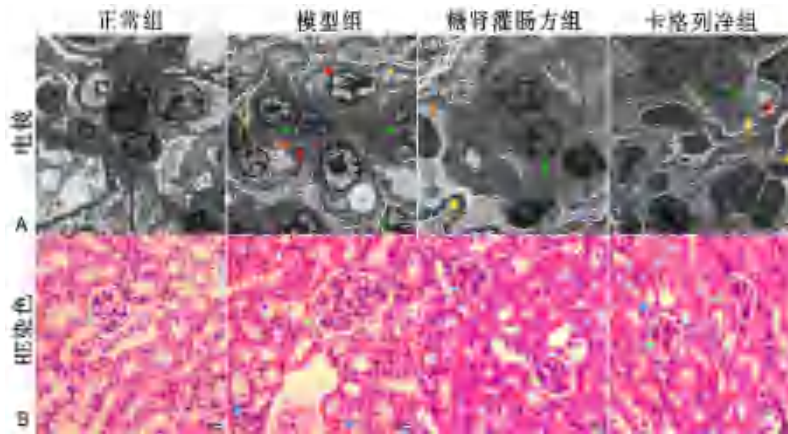


图 7 糖肾灌肠方对小鼠肾脏病理改变的影响 (透射电镜比例尺 = $2 \mu\text{m}$; HE. 染色比例尺 = $50 \mu\text{m}$, $n = 3$)

Fig 7 Effect of Tangshen Guanchang prescription on the pathological changes of kidney in mice (transmission electron microscope, scale = $2 \mu\text{m}$; HE. scale = $50 \mu\text{m}$, $n = 3$)

本研究首先通过分析 GEO 数据库中 GSE30528 和 GSE96804 基因芯片数据, 发现与正常人比较 DN 患者肾小球损伤受到了细胞程序性死亡、免疫、炎症等的调控。越来越多研究表明, 程序性死亡在 DN 的肾小球损伤中有着至关重要的作用, 对足细胞来说尤为重要^[16]。研究发现, 糖脂毒性、血管紧张素和糖基化终产物等多种因素通过不同的促凋亡途径诱导足细胞凋亡, 导致 DN 的发生和发展^[17]。为了进一步找到 DN 肾小球足细胞凋亡关键基因, 本研究将 GSE30528 基因芯片集的 DGEs 和程序性死亡的相关的基因取集, 得到了 DN 肾小球损伤的凋亡相关的基因。再与前期网络药理学中分析出的药物作用靶点取交集, 得出糖肾灌肠方作用 DN 肾小球凋亡的潜在作用靶点。接下来使用动物实验验证, 首先通过对筛选出的药物作用疾病的潜在靶点的验证得出 *BAK1*、*CASPASE-3* 为糖肾灌肠方调控凋亡作用 DN 的潜在靶点。*Bak1* 是 *Bcl2* 同源拮抗剂/杀伤蛋白, 该蛋白是促凋亡因子^[18], 在植物中研究较多, 目前关于该蛋白在 DN 中研究较少, 只在糖

尿病心肌病中有相关研究, 提示 *Bak1* 为凋亡的关键蛋白, 并且 *miR-29a* 是通过靶向 *Bak1* 调控心肌细胞凋亡^[19]。这种蛋白质定位于线粒体, 并具有诱导细胞凋亡的功能^[20]。本研究发现 *Bak1* 蛋白及 mRNA 水平在模型中升高, 用药后降低, 说明模型凋亡增加, 用药后改善。*Bak1* 与线粒体电压依赖性阴离子通道相互作用并加速其打开, 从而导致膜电位损失和细胞色素 C 的释放, 激活 *Caspase* 家族蛋白, *Caspase* 家族蛋白是促凋亡的关键酶, 分为两类, 启动蛋白 *Caspase-8*、*9*、*10*, 执行蛋白 *Caspase-3*、*6*、*7*^[21], 而 *Caspase-3* 被认为是凋亡的执行阶段开始的重要酶^[22], 进一步引起细胞凋亡甚至其他细胞损伤^[23-24]。本研究中 *Caspase-3*、*Cytochrome C*、*PARP* 的蛋白和 mRNA 表达水平相较于正常组在模型组中升高, 用药后较模型组表达降低, 说明药物抑制了 *Cytochrome C* 的释放, 进而抑制了 *Caspase-3* 的剪切。*PARP* 的正常功能是 DNA 损伤的常规修复, 当其被 *Caspase-3* 剪切为片段时通常被认为是细胞凋亡的重要生物标志物^[25]。*Bcl2* 是抑制凋亡蛋白, *Bax*

为促凋亡相关蛋白,因此 Bcl2 蛋白表达降低、Bax 的蛋白升高说明凋亡增加,在本研究中糖肾灌肠方上调了 Bcl2 蛋白的表达并下调了 Bax 蛋白的表达,结合小鼠肾组织的 TUNEL 实验,说明糖肾灌肠方具有改善细胞凋亡的作用;小鼠肾组织的病理结果也提示足细胞损伤改善;并且和接受卡格列净干预的小鼠比较,尽管降血糖效果不甚明显,但在改善肾脏损伤更为明显,证明了糖肾灌肠方抑制了 DN 小鼠肾小球足细胞凋亡。

4 结论

糖肾灌肠方可以改善 DN 小鼠的肾组织损伤,改善小鼠蛋白尿,其作用机制可能是通过调控 Bak1/Caspase-3 改善肾小球细胞凋亡,我们将进一步对糖肾灌肠方改善肾小球损伤的具体机制进行探讨。

参考文献

- [1] Samsu N. Diabetic nephropathy: challenges in pathogenesis, diagnosis, and treatment [J]. Biomed Res Int, 2021, 2021: 1497449.
- [2] Selby NM, Taal MW. An updated overview of diabetic nephropathy: diagnosis, prognosis, treatment goals and latest guidelines [J]. Diabetes Obes Metab, 2020, 22 (Suppl 1): 3-15.
- [3] Gupta S, Dominguez M, Golestaneh L. Diabetic kidney disease: an update [J]. Med Clin North Am, 2023, 107 (4): 689-705.
- [4] Garg P. A review of podocyte biology [J]. Am J Nephrol, 2018, 47 (Suppl 1): 3-13.
- [5] Barutta F, Bellini S, Gruden G. Mechanisms of podocyte injury and implications for diabetic nephropathy [J]. Clin Sci (Lond), 2022, 136 (7): 493-520.
- [6] Li XD, Zhang Y, Xing XD, et al. Podocyte injury of diabetic nephropathy: novel mechanism discovery and therapeutic prospects [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 168: 115670.
- [7] Obeng E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals-a review [J]. Braz J Biol, 2021, 81 (4): 1133-1143.
- [8] Jiang AN, Song AN, Zhang C. Modes of podocyte death in diabetic kidney disease: an update [J]. J Nephrol, 2022, 35 (6): 1571-1584.
- [9] Liu XJ, Hu XK, Yang H, et al. A review of traditional Chinese medicine on treatment of diabetic nephropathy and the involved mechanisms [J]. Am J Chin Med, 2022, 50 (7): 1739-1779.
- [10] 岳薇薇, 马丽. 糖肾灌肠方临床疗效的随机对照试验 [J]. 新疆中医药, 2016, 34 (1): 10-12.
- [11] 叶婷, 徐利娟, 藏登, 等. 糖肾灌肠方对糖尿病肾病的预防作用 [J]. 中成药, 2020, 42 (10): 2760-2763.
- [12] 王尹, 余辉, 徐利娟, 等. 糖肾灌肠方通过 PI3K/AKT/NF- κ B 信号通路调节糖尿病肾病炎症反应的机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2024, 40 (3): 8-16.
- [13] 曾金花, 王凤, 谭焱, 等. 益肾化湿颗粒对糖尿病肾病小鼠足细胞保护机制研究 [J]. 吉林中医药, 2016, 36 (4): 386-390.
- [14] 冯程程, 藏登, 陈茜, 等. 糖肾灌肠方经肠道干预糖尿病肾病小鼠模型的肠道菌群研究 [J]. 实用中医内科杂志, 2022, 36 (4): 75-79, 后插 6-后插 9.
- [15] 刘锐, 钟印芹, 卿艳, 等. 中药灌肠治疗糖尿病肾病的用药规律分析 [J]. 护理研究, 2023, 37 (4): 707-711.
- [16] Yang C, Zhang Z, Liu JT, et al. Research progress on multiple cell death pathways of podocytes in diabetic kidney disease [J]. Mol Med, 2023, 29 (1): 135.
- [17] Liu XQ, Jiang L, Li YY, et al. Wogonin protects glomerular podocytes by targeting Bcl-2-mediated autophagy and apoptosis in diabetic kidney disease [J]. Acta Pharmacol Sin, 2022, 43 (1): 96-110.
- [18] Chittenden T, Harrington EA, O'connor R, et al. Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak [J]. Nature, 1995, 374 (6524): 733-736.
- [19] Wang XY, Zhang ZT, Wang M. MiR-29a regulates cardiomyocyte apoptosis by targeting Bak1 in diabetic cardiomyopathy [J]. J Biochem, 2022, 171 (6): 663-671.
- [20] Czabotar PE, Garcia-saez AJ. Mechanisms of BCL-2 family proteins in mitochondrial apoptosis [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2023, 24 (10): 732-748.
- [21] Fan TJ, Han LH, Cong RS, et al. Caspase family proteases and apoptosis [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2005, 37 (11): 719-727.
- [22] Asaid M, Taghizadeh S, Kaviani E, et al. Caspase-3: structure, function, and biotechnological aspects [J]. Biotechnol Appl Biochem, 2022, 69 (4): 1633-1645.
- [23] Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, et al. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c [J]. Cell Death Differ, 2000, 7 (12): 1166-1173.
- [24] Bock FJ, Tait SWG. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21 (2): 85-100.
- [25] Alshiraihi I, Kato TA. Apoptosis detection assays [J]. Methods Mol Biol, 2023, 2519: 53-63.

(收稿日期: 2024-10-12; 修回日期: 2024-12-11)

基于 GC-MS 和 UHPLC-TOF-MS 的 “秦药”酸枣仁化学成分分析

陈文文^{1, 2}, 郑淑娴³, 曹宇¹, 田韵远⁴, 张从钰¹, 王冰雯¹, 冯海育⁵, 汤海峰^{1*}, 张倩^{1*} (1. 空军军医大学药学院中药与天然药物学教研室, 西安 710032; 2. 联勤保障部队第980医院, 石家庄 050051; 3. 宝鸡职业技术学院, 陕西 宝鸡 721013; 4. 西北大学, 西安 710069; 5. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046)

摘要: **目的** 基于 GC-MS 和 UHPLC-QTOF-MS 分析秦药酸枣仁的化学成分。**方法** 挥发性成分分析采用 Agilent DB-5MS 毛细管色谱柱 (30 m×250 μm×0.25 μm); 程序升温, 进样口温度 280 °C; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 进样量 1 μL; Splitless Mode 分流模式; 通过 LECO-Fiehn Rtx5 数据库检索并结合文献对主要色谱峰进行鉴定。非挥发性成分分析采用 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×150 mm, 1.8 μm); 液相色谱 A 相为 0.1% 甲酸水溶液, 液相色谱 B 相为乙腈; 梯度洗脱; 进样量 1 μL; 电喷雾离子源正负离子模式下对色谱流出物进行质谱检测, 利用对照品、二级质谱数据库及文献对主要色谱峰进行归属。**结果** 酸枣仁提取物中共鉴定出 14 个挥发性成分和 59 个非挥发性成分。**结论** 本研究通过 GC-MS 和 UHPLC-TOF-MS 技术对酸枣仁的化学成分进行了分析, 成功鉴定了 14 个挥发性成分和 59 个非挥发性成分, 为酸枣仁的质量控制和药效成分研究提供了科学依据。

关键词: 酸枣仁; 化学成分; GC-MS; UHPLC-TOF-MS

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)04-0901-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.005

Phytochemical components of Qin medicine *Ziziphi Spinosae Semen* by GC-MS and UHPLC-TOF-MS

CHEN Wen-wen^{1, 2}, ZHENG Shu-xian³, CAO Yu¹, TIAN Yun-yuan⁴, ZHANG Cong-yu¹, WANG Bing-wen¹, FENG Hai-yu⁵, TANG Hai-feng^{1*}, ZHANG Qian^{1*} (1. Department of Chinese Materia Medica and Natural Medicines, School of Pharmacy, Air Force Medical University, Xi'an 710032; 2. The 980 Hospital of the People's Liberation Army, Shijiazhuang 050051; 3. Baoji Vocational & Technical College, Baoji Shaanxi 721013; 4. Northwest University, Xi'an 710069; 5. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712046)

Abstract: Objective To determine the chemical components of Qin medicine *Ziziphi Spinosae Semen* by GC-MS and UHPLC-TOF-MS analysis. **Methods** Volatile components were analyzed with an Agilent DB-5MS capillary chromatography column (30 m×250 μm×0.25 μm). With temperature programming, the sample inlet temperature was set at 280 °C. The column flow rate was maintained at 1.0 mL·min⁻¹, with an injection volume of 1 μL. Splitless Mode was used. The main chromatographic peaks were identified with the database of LECO-Fiehn Rtx5 and relevant literatures. For the detection of soluble components, a ZORBAX SB-C₁₈ column (2.1 mm×150 mm, 1.8 μm) was used. The mobile phase A comprised a 0.1% formic acid solution in water, while mobile phase B was acetonitrile. The elution was performed with a gradient elution. An injection

基金项目: 陕西省重点研发计划 (No. 2023YBSF-514); 陕西省中医药管理局科研项目 (No.SZY-KJCYC-2023-001); 陕西省重点产业链 (No. 2024SF-ZDCYL-03-17)。

作者简介: 陈文文, 男, 硕士, 主要从事天然药物化学研究, email: 199626cww@163.com * **通信作者:** 汤海峰, 男, 教授, 主任药师, 博士研究生导师, 主要从事天然药化研究和中药、海洋药物开发, email: tanghaifeng71@163.com; 张倩, 女, 主管药师, 博士, 主要从事中药药效物质、中药和临床代谢组学研究, email: qianqiangoodok@163.com

volume of 1 μL was used. Mass spectrometry detection was conducted in both positive and negative ion modes with an electrospray ion source. The chromatographic peaks were matched and assigned with reference compounds, secondary mass spectral databases, and literatures. **Results** Totally 14 volatile components and 59 non-volatile components were identified in the extract of Qin medicine *Ziziphi Spinosae Semen*. **Conclusion** The chemical components of the seeds of *Ziziphus jujuba* are successfully identified with GC-MS and UHPLC-TOF-MS, including 14 volatile and 59 non-volatile components, which provides a scientific basis for the quality control and pharmacological component research of *Ziziphi Spinosae Semen*.

Key words: *Ziziphi Spinosae Semen*; chemical component; GC-MS; UHPLC-TOF-MS

酸枣仁为鼠李科植物酸枣 [*Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou] 的干燥成熟种子, 具有养心补肝、宁心安神、敛汗、生津的功效。酸枣仁汤治疗失眠症疗效确切, 应用历史悠久^[1]。2020 年酸枣仁入选“秦药”15 种大宗道地药材。在全国第四次中药资源普查中发现, 陕西省中药材年产量近 40 万吨, 其中酸枣仁市场占有率达 30% 以上^[2]。但是, 关于陕产酸枣仁的现代研究报道较为少见。其作为一种果仁类药材, 脂肪含量高达 32%^[3], 化学成分种类多、极性跨度大, 构成十分复杂, 仅靠单一指标性成分含量鉴定无法全面反映酸枣仁的内在质量差异^[4], 深入探究“秦药”酸枣仁的化学成分对于筛选其药效成分及推动进一步的开发利用具有显著价值。

在中药研究领域, 多角度数据的整合与应用正逐渐成为研究的瓶颈。质谱联用技术具有出色的分辨率、分离效率和灵敏度^[5], 能够精确分析中药中化合物的结构特征, 包括其精确质量、元素构成以及质谱碎片图谱等。目前, 该技术已经在中药成分鉴定中得到了广泛的应用^[6-8]。本研究引入 GC-MS 和 UHPLC-TOF-MS 联合分析手段, 初步对“秦药”酸枣仁的化学成分进行了全面定性研究。这种联合分析策略结合了 GC-MS 在挥发性成分分析和 UHPLC-TOF-MS 在非挥发性成分分析上的优势, 实现了对酸枣仁化学成分的全面覆盖。通过深入挖掘陕产酸枣仁的化学成分, 为筛选其药效成分、评估内在质量和药效特性提供了重要依据, 并为“秦药”酸枣仁的资源开发和药效研究奠定了科学基础。

1 仪器与试药

1.1 仪器

7890A 气相色谱 (Agilent); PEGASUS HT 质谱仪 (LECO); Forma 900 series 超低温冰箱 (Thermo Fisher Scientific); BSA124S-CW 分析天平

(Sartorius); 烘箱 (上海一恒科学仪器有限公司); YM-080S 超声仪 (深圳市方奥微电子有限公司); JXFSTPRP-24 研磨仪 (上海净信科技有限公司); 6545 超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱联用仪 (Agilent); Heraeus Fresco17 离心机、Vanquish 超高效液相 (Thermo); 真空干燥仪 (太仓市华美生化仪器厂)。

1.2 试药

色谱甲醇、氯仿和乙腈 (德国 CNW Technologies 公司); 超纯水 (屈臣氏); 色谱乙酸铵 (Sigma-Aldrich); 色谱乙酸 (Fisher Chemical); 饱和脂肪酸甲酯 (Dr. Ehrenstorfer); 对照品棕榈酸、肉桂酸、芦丁、酸枣仁皂苷 A 和白桦脂酸 [上海源叶生物科技有限公司, 均供含量测定用]; L-2-氯苯丙氨酸 (含量 $\geq 98\%$, 上海恒柏生物科技); 甲氧胺盐酸盐 (AR, TCI); 吡啶 (HPLC, Adamas); 双 (三甲基硅烷基) 三氟乙酰胺 (含 1% 三甲基氯硅烷, REGIS Technologies)。

2 方法

2.1 GC-MS 法测定“秦药”酸枣仁挥发性成分

2.1.1 供试品溶液制备 称取经干燥至恒重的酸枣仁 900 g, 在 70% 的乙醇溶液 (9 L) 中浸泡过夜, 加热冷凝回流提取 4 次, 每次 2 h, 醇提液用旋转蒸发仪浓缩, 得到酸枣仁提取物 30.77 g。准确称取酸枣仁醇提取物 50 mg 于 2 mL EP 管中, 加入 500 μL 预冷提取液 (内含 L-2-氯苯丙氨酸), 涡旋混匀 30 s 后, 加入钢珠 40 Hz 研磨 4 min, 冰水浴超声 5 min, 重复 3 次。样品在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 将 100 μL 上清液转移至 1.5 mL EP 管中, 真空浓缩干燥, 加入 50 μL 的 20 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 甲氧胺盐酸盐的吡啶溶液, 混匀放入 80 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中孵育 30 min。孵育完成后, 向每个样品中加入 70 μL 双 - (三甲基氯硅烷) 三氟乙酰胺, 混合物在 70 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 1.5 h, 按照随机顺序检测。

2.1.2 检测条件 Agilent 7890 气相色谱-飞行时间质谱联用仪配有 Agilent DB-5MS 毛细管柱 (30 m×250 μm×0.25 μm), 采用不分流模式, 柱流速为 1 mL·min⁻¹, 传输线温度为 280℃, 前进样口温度为 280℃, 柱箱升温程序 (初始保持 50℃ 1 min, 以 10℃·min⁻¹ 的速率升温至 310℃, 并保持 8 min), 进样量 1 μL, 隔垫吹扫流速 3 mL·min⁻¹, 载气为氦气, 质量范围 *m/z*: 50~500, 电离电压-70 eV, 离子源温度 250℃, 溶剂延迟 6.4 min, 扫描速率 12.5 spectra/s。

2.1.3 数据处理 质谱数据经 Chroma TOF 软件 (V 4.3x, LECO) 处理。采用 LECO-Fiehn Rtx5 数据库进行物质的定性分析, 包括质谱碎片离子匹配和保留时间匹配。

2.2 UHPLC-QTOF-MS 法测定“秦药”酸枣仁非挥发性化学成分

2.2.1 样品溶液制备 准确称取酸枣仁醇提取物 25 mg, 使用甲醇配制成 10 mg·mL⁻¹ 的溶液, 超声 20 min, 4℃、13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 过 0.22 μm 滤膜, 即得。

2.2.2 检测条件 液相色谱柱为 ZORBAX SB-C₁₈ (2.1 mm×150 mm, 1.8 μm), 6545 超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱联用仪 (Agilent), 一级和二级质谱数据采集。具体参数为进样量 1 μL; 气体温度 320℃; 流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, B 为乙腈, 梯度洗脱程序见表 1, 鞘层气体流量 11 L·min⁻¹, 鞘气温度 350℃, 毛细管电压 0.068 V, 喷嘴电压 1000 V, 电容电压 3500 V, 干燥气体流量 8 L·min⁻¹, 雾化器压力 35 psi。

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedure

时间 /min	0.1 甲酸水 /%	乙腈 /%	流速 / (mL·min ⁻¹)	最大压力 / bar
0.00	95.00	5.00	0.400	1300.00
1.00	95.00	5.00	0.400	1300.00
10.00	70.00	30.00	0.400	1300.00
20.00	30.00	70.00	0.400	1300.00
30.00	15.00	85.00	0.400	1300.00
56.00	1.00	99.00	0.400	1300.00
60.00	1.00	99.00	0.400	1300.00

2.2.3 数据处理 将原始数据转换为 mzXML 格式, 采用 R 程序包 XCMS 中处理数据。对于有对照品的化合物, 将其与对照品色谱保留时间和一级、二级碎片离子信息进行比对。对于没有对照品的化合物, 通过查找 METLIN 与 HMDB 数据库, 通过比较离子碎片信息以及裂解规律对化合物进行推断。

3 结果

3.1 酸枣仁化学成分的测定

采用 GC-MS 分离分析, 得到酸枣仁成分质谱总离子流图, 如图 1 所示。以面积归一化法测定各成分相对百分含量, 经 Chroma TOF 软件和 NIST 库对质谱数据进行检索对比, 并结合对照品质谱图鉴定化学成分, 初步鉴定出酸枣仁提取物中 14 个成分 (见表 2): 壬二酸、没食子酸、木焦油酸、儿茶素、4-羟基苯甲酸、肉毒碱、2, 5-二羟基苯甲醛、表儿茶素、棕榈酸、壬酸、表没食子儿茶素、肉桂酸、21-羟基孕烯醇酮及 4-乙酰丁酸。

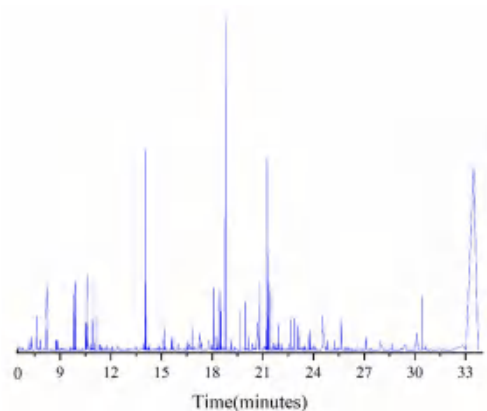


图 1 “秦药”酸枣仁 GC-TOF-MS 总离子流图

Fig 1 Total ion chromatogram of Qin medicine Ziziphi Spinosae Semen based on GC-MS

3.2 “秦药”酸枣仁非挥发性化学成分的测定

图 2 为酸枣仁在正离子和负离子模式下的 UHPLC-QTOF-MS 总离子流图, 结合一级、二级质谱信息、对照品信息与 METLIN 和 HMDB 数据库中的二级碎片信息比对推断^[9-15], 初步鉴定出酸枣仁中 59 个化学成分, 得到负离子模式下 27 个, 正离子模式下 32 个, 具体识别出的酸枣仁化学成分见表 3。

3.3 酸枣仁化学成分质谱解析举例

在本研究中, 选取酸枣仁皂苷 A 作为案例, 用以阐释其裂解路径。酸枣仁皂苷 A, 分子式为 C₅₈H₉₄O₂₆, 如图 3 所示, 在负离子模式下, 酸枣仁皂苷 A 产生了两个主要的离子峰。首先分子失去一个氢原子后, 又加上一个甲酸基团形成质荷比为 1251 的峰, 接着分子失去一个氢原子形成 *m/z* 1205 的准分子离子。酸枣仁皂苷 A 依次失去木糖、葡萄糖、鼠李糖和阿拉伯糖, 分别形成了 *m/z* 1073、911、749、603 的碎片离子。最终, 形成了苷元离子, *m/z* 1205、1073、603 等特征峰为酸枣仁皂苷 A 的特异性裂解产物, 根据这些特征峰鉴定为酸枣仁皂苷 A。其他化合物的鉴定方法与酸枣仁皂苷 A

表 2 “秦药”酸枣仁的挥发性成分及其相对含量

Tab 2 Volatile components in Qin medicine *Ziziphi Spinosae Semen* and their relative contents

No.	t_R /min	化合物	分子式	CAS 号	相对含量 /%
1	21.26	壬二酸 (claidic acid)	$C_9H_{16}O_4$	123-99-9	61.11
2	18.67	没食子酸 (gallic acid)	$C_7H_6O_5$	149-91-7	12.11
3	26.02	木焦油酸 (lignoceric acid)	$C_{24}H_{48}O_2$	557-59-5	0.95
4	26.13	儿茶素 [(+)-catechin]	$C_{15}H_{14}O_6$	154-23-4	0.86
5	15.17	4-羟基苯甲酸 (4-hydroxybenzoic acid)	$C_7H_6O_3$	99-96-7	0.77
6	9.87	肉毒碱 (carnitine)	$C_7H_{15}NO_3$	541-15-1	0.43
7	16.10	2, 5-二羟基苯甲醛 (2, 5-dihydroxybenzaldehyde)	$C_7H_6O_3$	1194-98-5	0.40
8	26.09	表儿茶素 (epicatechin)	$C_{15}H_{14}O_6$	35323-91-2	0.38
9*	19.65	棕榈酸 (palmitic acid)	$C_{16}H_{32}O_2$	57-10-3	0.17
10	11.82	壬酸 (pelargonic acid)	$C_9H_{18}O_2$	112-05-0	0.07
11	26.50	表没食子儿茶素 (epigallocatechin)	$C_{15}H_{14}O_7$	970-74-1	0.05
12*	14.30	肉桂酸 (cinnamic acid)	$C_9H_8O_2$	140-10-3	0.05
13	27.50	21-羟基孕烯醇酮 (21-hydroxypregnenolone)	$C_{21}H_{32}O_3$	1164-98-3	0.03
14	11.43	4-乙酰丁酸 (4-acetylbutyric acid)	$C_6H_{10}O_3$	3128-06-1	0.02

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

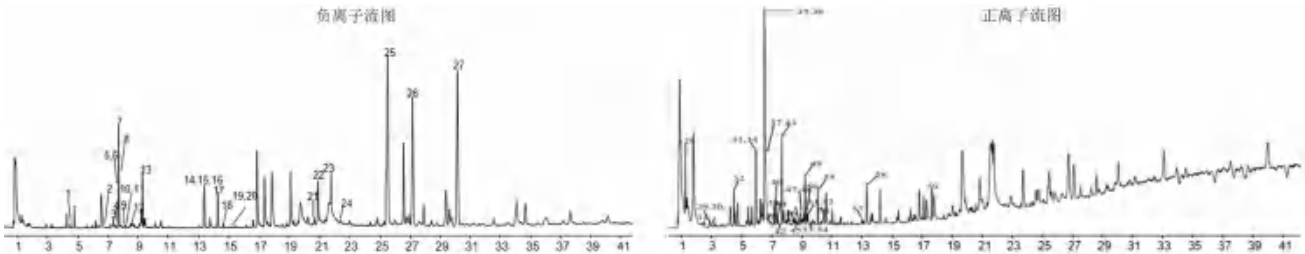


图 2 “秦药”酸枣仁 UHPLC-QTOF-MS 的总离子流图

Fig 2 Total ion chromatogram of Qin medicine *Ziziphi Spinosae Semen* based on UHPLC-QTOF-MS

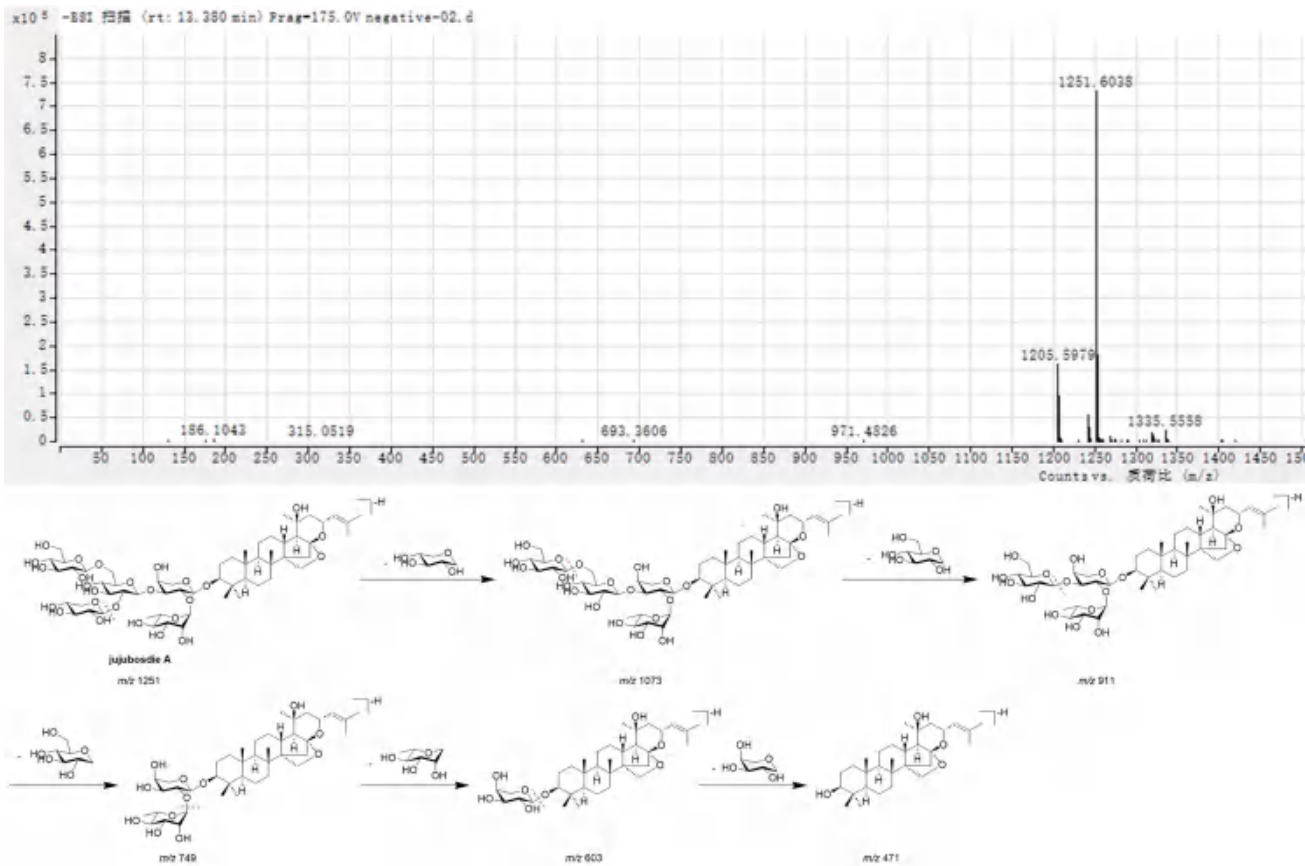


图 3 负离子模式下酸枣仁皂苷 A 二级质谱图及裂解途径

Fig 3 MS^2 spectrum and fragmentation pathways of jujuboside A in negative ion mode

表 3 酸枣仁 UHPLC-MS 检测非挥发性化学成分表征

Tab 3 Identification of chemical compounds in *Ziziphi Spinosae Semen* by UHPLC-QTOF-MS

No	t_R/min	分子式	前体离子	理论质量	误差 / $\times 10^{-6}$	碎片离子 (m/z)	名称
1	4.491	$\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_3$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	284.1292	3.2	154.9117	乌药碱 (coclaurine)
2	6.805	$\text{C}_{32}\text{H}_{38}\text{O}_{20}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	741.1884	0.4	300.0285, 271.0248	quercetin 3- <i>O</i> -xylosyl-rutinoside
3	7.321	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	593.1512	2.7	413.0889, 353.0669, 324.0601	isovitexin 2"- <i>O</i> - β -glucoside
4	7.477	$\text{C}_{32}\text{H}_{38}\text{O}_{19}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	725.1935	1.7	284.0410, 255.0369	kaempferol 3- (2 <i>G</i> -apiosylrobinobioside)
5	7.634	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	609.1461	1.6	301.0427, 271.0300	芦丁 (rutin*)
6	7.634	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	609.1461	1.6	301.0427	quercetin 3- <i>O</i> -neohesperidoside ^[10]
7	7.712	$\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{15}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	607.1668	4.1	427.1048, 367.0856	zizulgarin
8	7.791	$\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{15}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	607.1668	4.1	427.1048, 327.0914	斯皮诺素 (spinosin ^[11])
9	8.026	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	593.1512	2.7	309.1460	kaempferol-3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosyl- (1 $\rightarrow$ 2) - β -D-glucopyranoside ^[12]
10	8.138	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	593.1512	2.7	285.0419	kaempferol-3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosyl- (1 $\rightarrow$ 6) - β -D-glucopyranoside ^[9]
11	8.138	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	445.1140	1.3	325.0744, 297.0399	swertisin
12	8.496	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	593.1512	2.7	285.0419, 257.0451	kaempferol-3-rutinoside
13	9.28	$\text{C}_{38}\text{H}_{40}\text{O}_{18}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	783.2141	2.4	607.1615, 427.1046	6"-feruloylspinosin
14	13.367	$\text{C}_{58}\text{H}_{94}\text{O}_{26}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	1205.5961	1.8	1073.5566, 927.5040	酸枣仁皂苷 A (jujuboside A*)
15	13.367	$\text{C}_{58}\text{H}_{94}\text{O}_{26}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	1205.5961	1.8	1073.5566, 749.4461	酸枣仁皂苷 A ₁ (jujuboside A ₁ ^[13])
16	13.367	$\text{C}_{58}\text{H}_{94}\text{O}_{26}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	1205.5961	1.8	1073.5566, 749.4461	酸枣仁皂苷 D (jujuboside D)
17	14.228	$\text{C}_{52}\text{H}_{84}\text{O}_{21}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	1043.5432	3.2	911.5257, 749.4693	酸枣仁皂苷 B ₁ (jujuboside B ₁ ^[13])
18	14.620	$\text{C}_{52}\text{H}_{84}\text{O}_{21}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	1043.5432	3.2	911.5257, 749.4693	酸枣仁皂苷 B (jujuboside B ^[14])
19	15.169	$\text{C}_{47}\text{H}_{76}\text{O}_{16}$	$[\text{M} + \text{COOH}]^-$	941.5112	1.4	895.5293	jujubasaponin I ^[15]
20	15.169	$\text{C}_{48}\text{H}_{78}\text{O}_{18}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	941.5112	1.4	895.5293	jujubasaponin V ^[14]
21	20.654	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	471.348	1.3	349.1794, 441.1976	oleanolic acid
22	20.889	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	471.348	1.3	242.0201	麦珠子酸 (aliphilic acid ^[10])
23	21.751	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_5$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	485.3272	2.5	423.3274	epiceanothic acid ^[10]
24	22.456	$\text{C}_{29}\text{H}_{42}\text{O}_4$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	453.301	1.8	313.2649	美洲茶酸 (ceanothenic acid ^[10])
25*	25.512	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	455.3531	3.1	313.258	白桦脂酸 (betulinic acid)
26	27.158	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	279.233	1.8	261.2337, 233.1915	亚油酸 (linoleic acid)
27	30.136	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	281.2486	2.5	263.2395, 235.2066	油酸 (oleic acid)
28	1.372	$\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_3$	$[\text{M} + \text{H}]^+$	314.1756	16.9	209.0915	木兰箭毒碱 (magnocurarine)
29	2.874	$\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_9$	$[\text{M} + \text{H}]^+$	370.1133	0	212.0706, 188.0709	3 <i>S</i> -1- <i>N</i> - β -D-glucopyranosyl-3-hydroxy-indole- 3-acetic acid/3 <i>R</i> -1- <i>N</i> - β -D-glucopyranosyl-3- hydroxy-indole-3-acetic acid
30	2.897	$\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_9$	$[\text{M} + \text{H}]^+$	370.1133	0	188.0706	3 <i>R</i> - <i>N</i> -glc-2-hydroxy indoleacetic acid
31	2.930	$\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_9$	$[\text{M} + \text{H}]^+$	370.1133	0.3	212.0709, 188.0705	3 <i>R</i> -1- <i>N</i> - β -D-glucopyranosyl-3-hydroxy-indole- 3-acetic acid/3 <i>S</i> -1- <i>N</i> - β -D-glucopyranosyl-3- hydroxy-indole-3-acetic acid
32	4.476	$\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{NO}_8$	$[\text{M} + \text{H}]^+$	448.1966	- 3.1	286.1443, 237.0906, 107.0494	6-glc-coclaurine
33	6.122	$\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_3$	$[\text{M} + \text{H}]^+$	286.1438	9.1	286.1412, 269.1178, 237.0912, 209.0955, 175.0753, 143.0463, 107.0492	乌头碱 (aconitine)
34	6.133	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	$[\text{M} + \text{H}]^+$	595.1657	0.2	379.0833, 337.0719	meloside A
35	6.530	$\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{NO}_4$	$[\text{M} + \text{H}]^+$	344.1862	25.0	299.1282, 267.0988, 237.0912	tembetarin
36	6.530	$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{NO}_4$	$[\text{M} + \text{H}]^+$	342.1705	- 5.3	297.1132, 282.0894, 265.0869, 237.0912, 219.0807	木兰花碱 (magnoflorine)
37	6.541	$\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_4$	$[\text{M} + \text{H}]^+$	328.1543	4.0	328.1530, 265.0868, 237.0912	norisocorydine
38	6.873	$\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$	$[\text{M} + \text{H}]^+$	625.1763	0.5	463.1264, 445.1134, 367.0810, 343.0822	6"-hydroxyspinosin
39	7.136	$\text{C}_{42}\text{H}_{48}\text{O}_{23}$	$[\text{M} + \text{H}]^+$	921.2659	- 1.3	759.2125, 447.1372, 411.1079, 327.0869, 151.0386	6"- (4"- <i>O</i> -glc) -vanilloylspinosin
40	7.315	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	$[\text{M} + \text{H}]^+$	433.1129	- 1.8	397.0923, 337.0716, 313.0716	牡荆素 (vitexin)
41	7.425	$\text{C}_{44}\text{H}_{50}\text{O}_{23}$	$[\text{M} + \text{H}]^+$	947.2816	- 1.1	327.0877, 177.0547	6"- (4"- (<i>O</i> -glucose) -feruloyl) -spinosin

续表 3

No	<i>t_R</i> /min	分子式	前体离子	理论质量	误差 / × 10 ⁻⁶	碎片离子 (<i>m/z</i>)	名称
42	7.558	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₉	[M + H] ⁺	727.208	2.9	287.0563	山茶苷 B (camelliaside B)
43	7.690	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	[M + H] ⁺	609.1814	- 4.1	447.1298, 429.1195, 411.1087, 393.0978, 351.0873, 327.0877, 297.0764, 285.0762	异斯皮诺素 (isospinosin)
44	8.463	C ₃₆ H ₃₈ O ₁₈	[M + H] ⁺	759.2131	- 0.3	429.1198, 351.0874	6'''-vanilloylspinosin
45	8.607	C ₃₅ H ₃₆ O ₁₇	[M + H] ⁺	729.2025	- 1.5	429.1190, 351.0858, 327.0867	6'''-sinapoylspinosin
46	8.728	C ₃₇ H ₃₈ O ₁₈	[M + H] ⁺	771.2131	- 0.9	433.1125, 415.1020, 337.0705, 313.0726, 177.0552	异牡荆黄素 2''-O- 阿拉伯糖苷 [isovitexin-2''-o-(6-feruloyl) -glucopyranoside]
47	9.027	C ₄₃ H ₅₂ O ₁₉	[M + H] ⁺	873.3176	- 0.9	429.1189, 411.1068, 393.0978, 351.0862, 327.0866, 247.1328, 207.0647, 163.0388	6'''-dihydrophaseoylspinosin
48	9.038	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M + H] ⁺	449.1078	8.9	287.0572	kaempferol glucosides
49	9.237	C ₃₉ H ₄₂ O ₁₉	[M + H] ⁺	815.2393	2.3	447.1298, 411.1079, 393.0972, 327.0871, 163.0392	6'''-sinapoylspinosin
50	9.358	C ₄₄ H ₄₉ O ₂₂ N	[M + H] ⁺	944.2819	- 2.1	782.2291, 764.2187, 393.0965, 327.0870	6'''- (<i>N</i> -β-D-glucopyranosyl) -2''', 3'''-dihydro-2'''-oxo-indol-3'''-yl-acetate spinosin or isomer
51	9.435	C ₄₄ H ₄₉ O ₂₂ N	[M + H] ⁺	944.2819	- 2.6	782.2305, 764.2190, 489.1399, 393.0970, 327.0866	3'''- (<i>M</i> -β-D-glucopyranosyl) -2''', 3'''-dihydro-2'''-oxo-indol-3'''-yl-acetate spinosin or isomer
52	9.435	C ₄₄ H ₄₉ O ₂₂ N	[M + H] ⁺	944.2819	- 2.1	944.2839, 327.0866, 297.1113	6'''-O- (3-glc-indole-acetyl) spinosin or isomer
53	9.656	C ₃₈ H ₄₀ O ₁₈	[M + H] ⁺	785.2287	1.8	447.1242, 429.1182, 411.1107, 327.0871, 177.0544	6'''-feruloylspinosinb
54	9.656	C ₃₈ H ₄₀ O ₁₈	[M + H] ⁺	785.2287	1.8	429.1182, 327.0871, 177.0544	6'''-feruloylspinosin isomer
55	10.087	C ₄₃ H ₅₀ O ₁₉	[M + H] ⁺	871.3019	- 1.7	429.1186, 351.0890, 327.0882, 297.0792	6'''- (-) -phaseoylspinosin
56	10.450	C ₃₇ H ₃₈ O ₁₇	[M + H] ⁺	755.2182	1.3	635.1798, 447.1285, 327.0868, 309.0978, 147.044	6'''-p-coumaloylspinosin
57	12.948	C ₄₈ H ₄₈ O ₂₁	[M + H] ⁺	961.2761	1.7	327.0868, 177.0544	6'', 6'''-di-feruloylspinosin
58	13.125	C ₃₁ H ₄₂ N ₄ O ₄	[M + H] ⁺	535.3279	- 0.7	148.112	sanjoinine A
59	17.730	C ₁₈ H ₁₉ NO ₂	[M + H] ⁺	282.1489	23.4	265.1244	<i>N</i> - 去甲基荷叶碱 (<i>N</i> -nornuciferine)

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

类似,均基于二级质谱碎片特征、对照品及数据库比对进行推断。

4 讨论

酸枣仁质量标准详载于《中国药典》2020 年版第一部,规定了酸枣仁的性状描述、鉴别方法、检查项目以及含量测定。药典中对酸枣仁的质量评价主要依据其特有的化学成分,如酸枣仁皂苷 A 和斯皮诺素等。然而,现行药典标准主要关注于单一化学成分的含量测定,这种方法可能无法全面反映酸枣仁复杂的化学组成和药效特性。酸枣仁的化学成分具有广泛的极性范围,这种复杂多样性无疑增加了对其质量评估的难度。本研究中,采用了 GC-MS 和 UHPLC-QTOF-MS 技术联合分析的方法,对“秦药”酸枣仁的化学成分进行了全面分析。研究结果揭示了酸枣仁中一系列具有代表性的化学成分,包括酸枣仁皂苷 A、斯皮诺素、白桦脂酸、木兰花碱以及多种长链脂肪酸等,这些成分的存在不仅证实了酸枣仁复杂的化学组成,也为进一步的

研究和应用提供了科学依据。

酸枣仁作为一种富含油脂的果仁类中药,其化学成分具有广泛的极性范围,这种复杂多样性要求采用多种技术进行分析^[16]。目前,大多数研究倾向于采用单一分析手段来研究酸枣仁的化学成分,而涉及多种技术联合应用的检测方法在文献中的报道则相对较少。例如,马东来等^[17]利用 GC-MS 技术,分析了不同采收期酸枣仁的脂肪油成分,并鉴定出 29 种成分,包括不饱和脂肪酸类、饱和脂肪酸类、碳氢化合物和醇类化合物。其中,亚油酸甲酯和油酸甲酯在各个时期中为主要脂肪油物质,分别占 33.01% ~ 34.27% 和 43.66% ~ 45.43%;石宇浩等^[18]等通过 UPLC-Q-TOF/MS 技术对酸枣仁种皮和种仁的化学成分进行了定性及半定量分析,共鉴定出 57 个化学成分,并筛选出 17 个差异成分;此外,通过 HPLC-QTOF MS/MS 技术,研究人员在酸枣仁中鉴定了 103 个化合物,包括皂苷、黄酮类化合物、

有机酸和多糖等^[19-20]。而涉及多种技术联合应用的检测方法在文献中的报道则相对较少,其中关于陕产酸枣仁的研究也仅有几篇^[21],因此,采用多种分析手段,深入且全面地探究陕产酸枣仁的化学成分谱对于药效成分的筛选以及“秦药”酸枣仁资源的进一步开发与利用具有显著价值。

综上所述,为了提高“秦药”酸枣仁质量控制的准确性和可靠性,建议增加多成分同时测定的方法,并结合现代分析手段,如 GC-MS 和 LC-MS 联合分析,以全面评估酸枣仁的内在质量,确保其疗效和安全性。建议在未来的陕产酸枣仁质量标准制定中,综合考量含量测定的指标和前处理方法,以增强分析方法的专属性和全面性,从而更准确地评估“秦药”酸枣仁的内在质量和药效特性。这将有助于确保酸枣仁的疗效和安全性,同时也为“秦药”酸枣仁资源的进一步开发与利用提供了科学依据。

参考文献

- [1] 张玲,游秋云,方侃,等.酸枣仁汤治疗失眠的有效性与安全性的系统评价和 Meta 分析[J].中国药事,2021,35(7):1234-1243.
- [2] 胡本祥,彭亮,杨冰月,等.“秦药”的现代研究概况[J].中草药,2018,49(21):4949-4959.
- [3] 曲彤,耿飞飞,李宁,等.酸枣仁的化学成分、药理作用和临床应用研究进展[J].药学前沿,2024,28(9):98-108.
- [4] 曹琴,王凯伟.中药酸枣仁的化学成分研究[J].药学实践杂志,2009,27(3):3-10.
- [5] 马聪玉,生宁,李元元,等.中药成分质谱分析新技术和新策略进展[J].质谱学报,2021,42(5):709-717.
- [6] 高添,杨凌鉴,盛鑫康,等.基于 HPLC-Q-TOF/MS 和 GC/MS 的香丹注射液化学成分分析[J].中成药,2019,41(2):345-352.
- [7] Zhou JL, Qi LW, Li P. Herbal medicine analysis by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2009, 1216(44): 7582-7594.
- [8] Yao PK, Zhong P. Direct analysis of traditional Chinese medicines by mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2016, 1025: 12-22.
- [9] Huang RL, Wang WY, Kuo YH, et al. Cytotoxic triterpenes from the fruit of *Ziziphus jujuba* [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2001, 53: 179-184.
- [10] Guo S, Duan JA, Tang Y, et al. Simultaneous qualitative and quantitative analysis of triterpenic acids, saponins and flavonoids in the leaves of two *Ziziphus* species by HPLC-PDA-MS/ELSD [J]. J Pharm Biomed Anal, 2011, 56: 264-270.
- [11] Wang B, Zhu HT, Wang D, et al. New spinosin derivatives from the seeds of *Ziziphus mauritiana* [J]. Natural Product Bioprospect, 2013, 3: 93-98.
- [12] Perrone A, Plaza A, Hamed A, et al. Solenostemma argel: a rich source of very unusual pregnane and 14-, 15-seco-pregnane glycosides with antiproliferative activity [J]. Current Organic Chemistry, 2008, 12: 1648-1660.
- [13] Zhang FX, Li M, Qiao LR, et al. Rapid characterization of *Ziziphi Spinosae* Semen by UPLC/Qtof MS with novel informatics platform and its application in evaluation of two seeds from *Ziziphus species* [J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 122: 59-80.
- [14] Yoshikawa K, Shimono N, Arihara S. Antisweet substances, jujubasaponins I - III from *Zizyphus jujuba*. Revised structure of ziziphin [J]. Tetrahedron Lett, 1992, 32: 7059-7062.
- [15] Yoshikawa K, Shimono N, Arihara S. Antisweet substances, jujubasaponins I - III from *Zizyphus jujuba*. Revised structure of ziziphin [J]. Tetrahedron Letters, 1991, 32: 7059-7062.
- [16] 孙明哲,张闪闪,闫琳,等.酸枣仁油的研究与开发进展[J].粮油食品科技,2020,28(4):7-14.
- [17] 马东来,李新蕊,司明东,等.GC-MS 测定不同采收期酸枣仁中脂肪油成分[J].食品研究与开发,2021,42(4):161-164.
- [18] 石宇浩,南易,郑伟,等.酸枣仁种皮和种仁化学成分的定性及半定量分析[J].色谱,2024,42(3):234-244.
- [19] Zhao CB, Zhang JX, et al. Botanical and traditional uses and phytochemical pharmacological, pharmacokinetic, and Toxicological characteristics of *Ziziphi Spinosae* Semen: a review [J]. Evid based Complement Altern Med, 2020, 2020(9): 1-21.
- [20] 张巧月.基于液质联用技术的酸枣仁多组分分析与体外代谢研究及连翘心质量标准的建立[D].石家庄:河北医科大学,2024.
- [21] 曲彤,李宁,任慧,等.2000—2022 年酸枣仁研究进展与趋势可视化分析[J].中国药师,2024,27(2):27-35.

(收稿日期:2024-09-10;修回日期:2024-11-20)

球形化工艺对吸入粉雾剂流动性及体外雾化性能的影响

周玉童^{1, 2, 3}, 杨玉兰², 王晓飞^{3*} (1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2. 上海欧米尼医药科技有限公司, 上海 201203; 3. 长三角药物高等研究院, 江苏 南通 226100)

摘要: **目的** 研究球形化工艺对吸入粉雾剂流动性及体外雾化性能的影响。**方法** 通过 Box-Behnken 响应曲面实验设计考察各参数对球形化工艺的影响并预测最佳工艺参数。以布地奈德和富马酸福莫特罗为模型药物, 考察球形化与否的粉体学性质并进行体外评价。**结果** 处方未经球形化时休止角为 43.02° , 堆密度为 $0.21 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$, 递送剂量均一性仅 8 吸在 75% ~ 125%, 布地奈德和富马酸福莫特罗微细粒子百分比 (FPF) 分别为 41.59%、41.93%; 处方经球形化后休止角为 34.56° , 堆密度为 $0.29 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$, 递送剂量均一性 10 吸均在 75% ~ 125% 范围, 布地奈德和富马酸福莫特罗微细粒子百分比分别为 49.52%、51.26%。**结论** 球形化工艺有利于提供流动性好、递送剂量均一、肺部沉积量高的吸入粉雾剂。

关键词: 吸入粉雾剂; 球形化工艺; 流动性; 递送剂量均一性; 微细粒子剂量

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)04-0908-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.006

Effect of spheronization process on the flowability and in vitro nebulization of dry powder inhalers

ZHOU Yu-tong^{1, 2, 3}, YANG Yu-lan², WANG Xiao-fei^{3*} (1. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Shanghai Omni Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai 201203; 3. Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute, Nantong Jiangsu 226100)

Abstract: Objective To determine the effect of spheronization process on the flowability and in vitro nebulization of dry powder inhalers. **Methods** The effect of individual parameters on the spheronization process was determined by Box-Behnken response surface experimental design, and optimal parameters were predicted. We studied the powder properties and evaluated in vitro or with or without spheronization with budesonide and formoterol fumarate as model drugs. **Results** The angle of repose of the formulation without spheronization was 43.02° , and the bulk density was $0.21 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$. Eight inhalations fell within 75% ~ 125% of the mean of the 10 inhaled doses, and the fine particle fraction was 41.59% and 41.93% for budesonide and formoterol fumarate, respectively. The angle of repose of the formulation after the spheronization was 34.56° , and the bulk density was $0.29 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$. All 10 inhaled doses fell within 75% ~ 125% of the mean, and the fine particle fraction was 49.52% and 51.26% for budesonide and formoterol fumarate, respectively. **Conclusion** Spheronization facilitates producing dry powder inhalers with good flowability, uniform dose delivery, and high lung deposition.

Key words: dry powder inhaler; spheronization process; fluidity; uniformity of delivery dose; fine particle dose

中国成人肺部健康研究显示, 我国 20 岁及以上成人的慢性阻塞性肺疾病患病率为 8.6%, 哮喘患病率为 4.2%^[1-2]。吸入给药是治疗上述疾病的首选方法^[3], 具有高效、快速、患者依从性好等优势^[4-5]。吸入粉雾剂 (dry powder inhaler, DPI) 是指固体微粉化原料药物单独或与合适载体混合后,

以胶囊、泡罩或多剂量贮库形式, 采用特制的吸入装置, 由患者吸入雾化的药物至肺部的制剂。

由于呼吸道生理结构的特点, 一般药物粒子的空气动力学粒径为 $0.5 \sim 5 \mu\text{m}$, 才能被递送到肺部, 发挥治疗作用^[6], 因此制备 DPI 时需要将药物进行微粉化处理。微粉化药物由于粒径小, 比表面

作者简介: 周玉童, 女, 硕士研究生, 主要从事吸入制剂研究, email: zhou_yutong0101@163.com * 通信作者: 王晓飞, 男, 博士, 高级工程师, 主要从事吸入制剂等复杂制剂的研究开发, email: fen8129@sina.com

积大，在重力、范德瓦耳斯力、静电作用的影响下，具有一定的聚集倾向，流动性差，易聚结成块^[7-8]，可通过受控的方式团聚并球状化形成较大的颗粒。为了使药物有效递送到肺部，要求所制备的大颗粒在具有较好流动性的前提下具备较低的内聚力，以便在使用吸入装置吸入时大颗粒能够分散成具有治疗作用的小颗粒。目前药物制剂中最常用的制粒技术是干法制粒和湿法制粒^[9]，但干法制粒与湿法制粒所制备的颗粒均无法满足 DPI 的需求。

本研究通过附聚作用使微粉化物料附聚并球形化，改善微粉化物料的流动性。以乳糖为研究对象，颗粒成品率为评价指标，考察球形化工艺参数；以布地奈德（budesonide，BD）和富马酸福莫特罗（formoterol fumarate，FF）为模型药物，递送剂量均一性、微细粒子剂量为主要评价指标，考察球形化工艺对处方关键质量特性的影响，为微粉化物料的工业化生产提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器

XSR 205DU/AC 型十万分之一分析天平、PL601-S 电子天平（梅特勒-托利多仪器有限公司）；BA900 型显微镜（上海新振仪器有限公司）；LC 23AD 高效液相色谱仪[日本岛津国际贸易（上海）有限公司]；Model 170 新一代药用撞击器（上海科铭仪器有限公司）；SCP-6 真空泵、DFM-2000 流量、TPK2000 流量控制器、DUSA 管（Copley China）；IQ7000/ElixEu10uv Millipore 纯水系统（美国默克密理博贸易有限公司）。

1.2 试药

BD（批号：BD190301，湖北葛店人福药业有限责任公司，含量：99.8%）；FF（批号：Y016-150101，宁波天衡药业股份有限公司，含量：99.9%）；乳糖 LH300（批号：743649，DFE pharma）；乙腈（批号：0130240407J）、甲醇（批号：0230240602J）（色谱纯，上海星可高纯溶剂有限公司）；十二烷基磺酸钠（批号：20221020，分析纯，国药集团化学试剂有限公司）。

2 方法与结果

2.1 颗粒制备工艺

2.1.1 Box-Behnken 响应曲面实验设计 压实和滚圆是物料球形化的关键工艺步骤，主要利用物料的黏附力使其附聚形成致密的团聚体，会影响颗粒成品率，因此考察压实重量（A）、压实时间（B）、滚圆转速（C）、滚圆时间（D）等参数对球形化工艺的影响并对适宜工艺参数进行预测。通过 Box-Behnken 响应面设计共进行 29 组实验，取 100 g 乳糖平铺，平铺面积为 200 cm²，依次进行压实、滚圆、筛分，以颗粒成品率作为评价指标。因素水

平见表 1，实验设计与结果见表 2。从表 2 可知所得颗粒堆密度未见明显差异，休止角均小于 40°，说明该法制备颗粒流动性均良好，满足生产需求。

表 1 球形化工艺参数的水平和因素

Tab 1 Levels and factors of sphericalization process parameters

水平	因素			
	A/kg	B/h	C/(r·min ⁻¹)	D/min
−1	3	4	25	5
0	5	9.5	30	15
1	7	15	35	25

表 2 球形化工艺实验设计与结果 (n = 3)

Tab 2 Experimental design and results of sphericalization process (n = 3)

组别	A	B	C	D	颗粒成品率/%	休止角/°	堆密度/(g·cm ⁻³)
1	0	−1	1	0	83.5	34.30±2.22	0.27±0.01
2	0	−1	−1	0	84.2	34.33±1.14	0.26±0.01
3	0	1	0	−1	77.4	35.59±2.22	0.28±0.01
4	1	0	0	1	89.1	34.27±3.02	0.27±0.01
5	0	0	1	1	88.6	34.33±1.14	0.27±0.01
6	1	0	−1	0	88.2	36.24±1.09	0.28±0.01
7	−1	1	0	0	85.2	33.68±1.14	0.28±0.01
8	1	1	0	0	88.5	33.62±3.00	0.28±0.01
9	0	0	−1	1	89.4	34.15±4.98	0.27±0.01
10	0	0	1	−1	67.2	34.96±1.93	0.28±0.01
11	0	1	−1	0	88.8	34.87±3.85	0.29±0.01
12	0	0	0	0	84.9	32.33±1.19	0.28±0.01
13	0	1	1	0	89.5	34.33±1.14	0.28±0.01
14	−1	0	1	0	87.2	34.96±1.93	0.27±0.01
15	0	0	−1	−1	66.0	33.68±1.14	0.27±0.02
16	0	0	0	0	87.1	32.33±1.19	0.29±0.01
17	0	−1	0	1	84.2	34.33±1.14	0.26±0.02
18	−1	0	−1	0	86.5	34.78±5.25	0.28±0.01
19	1	0	1	0	86.7	33.68±1.14	0.27±0.01
20	0	0	0	0	88.8	32.30±2.33	0.28±0.01
21	−1	−1	0	0	82.5	34.27±3.02	0.28±0.02
22	0	0	0	0	90.6	32.99±2.02	0.27±0.01
23	0	1	0	1	92.5	34.33±1.14	0.28±0.02
24	−1	0	0	1	87.2	34.96±1.93	0.28±0.02
25	0	0	0	0	86.5	31.66±1.19	0.27±0.01
26	0	−1	0	−1	65.2	34.96±1.93	0.27±0.01
27	1	0	0	−1	72.5	34.21±3.99	0.27±0.02
28	−1	0	0	−1	67.8	33.68±1.14	0.28±0.02
29	1	−1	0	0	85.2	34.33±1.14	0.26±0.01

2.1.2 模型拟合与数据分析 使用 Design-Expert 软件对表 2 中的颗粒成品率与 A、B、C、D 的关系进行二次多元拟合，得回归方程：颗粒成品率 = 87.58 + 1.15A + 3.09B − 0.033C + 9.58D + 0.15AB − 0.55AC − 0.70AD + 0.35BC + 0.98BD − 0.50CD − 0.59A² − 0.58B² − 0.69C² − 8.03D²，R² = 0.9529，R²_{adj} = 0.9058。模型的 R² 与 R²_{adj} 均接近 1，说明通过二次回归得到的模型与实验拟合度较好，该回归方程的预测结果可靠。

方差分析显示，模型整体拟合度 P < 0.0001，

表明该二次方程达到极显著水平;失拟项 $P > 0.05$, 其影响不显著, 表明模型选择较为合适, 可用该响应面模型预测球形化的工艺参数。各参数对颗粒的综合影响为 $D > B > A > C$, 即滚圆时间 $>$ 压实时间 $>$ 压实重量 $>$ 滚圆转速。实验结果方差分析如表 3 所示, 三维响应面图如图 1 所示。

2.1.3 球形化工艺预测 使用 Design-Expert 软件进行统计分析, 预测球形化工艺的最优参数为: 压实重量 5.363 kg, 压实时间 14.920 h, 滚圆转速 $30.232 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 滚圆时间 20.215 min, 此时颗粒成品率为 92.516%。考虑到实际操作可行性, 球形化工艺初步确定为: 压实重量 5 kg, 压实时间 15 h, 滚圆转速 $30 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 滚圆时间 20 min。

2.2 布地奈德福莫特罗吸入粉雾剂制备

将 BD、FF 与乳糖 (质量比为 160 : 4.5 : 3835.5) 混合均匀即为处方 I, 将处方 I 进行球形化即得处方 II, 手动灌装至贮库型吸入装置储药仓内, 标示量为 $160 \mu\text{g}/4.5 \mu\text{g}/\text{吸}$, 60 吸 / 支。

表 3 方差分析

Tab 3 Analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1670.0892	14	119.2921	20.2209	< 0.0001
A	15.8700	1	15.8700	2.6901	0.1232
B	114.7008	1	114.7008	19.4427	0.0006
C	0.0133	1	0.0133	0.0023	0.9628
D	1100.1675	1	1100.1675	186.4868	< 0.0001
AB	0.0900	1	0.0900	0.0153	0.9035
AC	1.2100	1	1.2100	0.2051	0.6576
AD	1.9600	1	1.9600	0.3322	0.5735
BC	0.4900	1	0.4900	0.0831	0.7774
BD	3.8025	1	3.8025	0.6446	0.4355
CD	1.0000	1	1.0000	0.1695	0.6868
A ²	2.2900	1	2.2900	0.3882	0.5433
B ²	2.1946	1	2.1946	0.3720	0.5517
C ²	3.1256	1	3.1256	0.5298	0.4787
D ²	418.4281	1	418.4281	70.9267	< 0.0001
残差	82.5922	14	5.8994		
失拟项	63.4042	10	6.3404	1.3217	0.4237
净误差	19.1880	4	4.7970		
总误差	1752.6814	28			

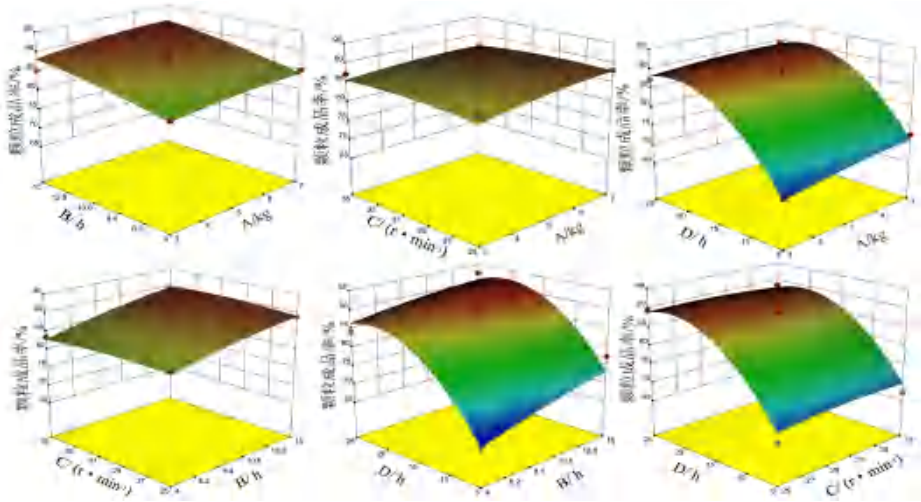


图 1 各因素对颗粒成品率的三维响应面图

Fig 1 Three-dimensional response surface diagram of each factor to particle yield

2.3 表面形态

利用光学显微镜观察样品的表面状态, 如图 2 所示。目测未经球形化时为白色粉末状; 经球形化后为白色球形颗粒, 直径约为 $500 \mu\text{m}$, 个体大小较为均一, 圆整度好。

2.4 流动性与堆密度

采用固定漏斗法以及固定体积法检测样品的休止角和堆密度, 结果如表 4 所示。微粉化处方经球形化后休止角显著减小 ($P < 0.05$), 堆密度显著增加 ($P < 0.05$)。球形化后处方的流动性明显改善, 药物颗粒间孔隙较小, 药物与载体结合力较强, 有利于灌装过程中装量均匀性。

2.5 引湿性

将待测样品 (质量记为 M_1) 置于不同饱和盐

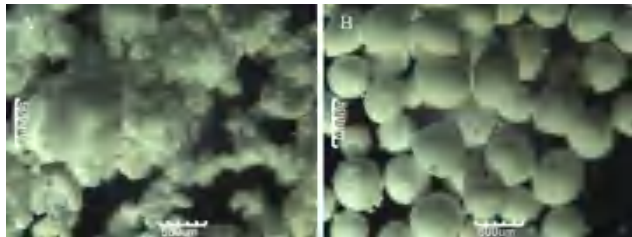


图 2 不同制备工艺下处方颗粒的光学显微镜图 ($\times 40$)

Fig 2 Optical microscope diagram of formulation particles under different preparation processes ($\times 40$)

A. 未球形化粉末 (unsphericalized powder); B. 球形化颗粒 (sphericalized particles)

溶液的干燥器内处理 24 h (质量记为 M_2), 环境温度为 25°C , 按式 1 计算质量增长率, 结果见图 3。

质量增长率 (%) = $(M_2 - M_1) / M_1 \times 100\%$ (式 1)

表 4 不同制备工艺下处方颗粒的休止角与堆密度 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Tab 4 Angle of repose and bulk density of formulation particles under different preparation processes ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

工艺	休止角 /°	堆密度 / ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)
未球形化	43.02 ± 0.68	0.21 ± 0.01
球形化	34.56 ± 0.87*	0.29 ± 0.01*

注：与未球形化比较，* $P < 0.05$ 。

Note: Compare with unsphericalization, * $P < 0.05$.

未球形化、球形化处方在 83.2% 相对湿度 (RH) 下质量增长率分别为 0.26%、0.08%，未球形化处方略有引湿性，经球形化几乎无引湿性^[10]。此外由图 3 可知，在 65.9%RH 下 (药用固体制剂 GMP 车间的温湿度控制范围：温度 18 ~ 26 °C，湿度 45% ~ 65%) 处方球形化前后质量增长率均小于 0.2%，即球形化工艺过程可直接在 GMP 车间内进行，无需特殊控制环境温湿度。处方经球形化后，水分吸收速率减慢，在各湿度条件下吸湿情况均有所改善。

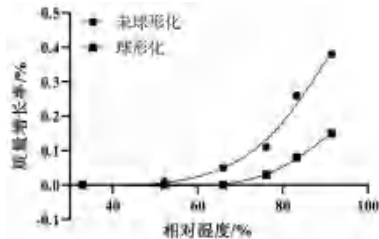


图 3 不同制备工艺下处方颗粒的吸湿曲线

Fig 3 Moisture absorption curves of formulation particles under different preparation processes

2.6 每吸重量

为了考察在固定流速下药物从装置的释放药物量，可记录从装置内释放的药物重量，按照式 2 计算每吸体积，如表 5 所示。经球形化后每吸重量及

每吸体积的波动小，处方经球形化后每吸释放的药物重量重复性好，有利于递送剂量的均匀性，经球形化后每吸重量增加，每吸体积减小，颗粒间排列紧密孔隙率减小。

$$\text{每吸体积 (mL)} = \text{每吸重量} / \text{堆密度} \quad (\text{式 2})$$

表 5 不同制备工艺下处方的每吸重量和每吸体积 ($\bar{x} \pm s$, $n = 30$)

Tab 5 Weight and volumn per inhalation of formulation under different preparation processes ($\bar{x} \pm s$, $n = 30$)

工艺	每吸重量 /mg	每吸体积 /mL
未球形化	3.59 ± 1.17	17.10 ± 5.57
球形化	3.99 ± 0.10	13.77 ± 0.35

2.7 体外评价

2.7.1 色谱分析 色谱柱：Agilent Eclipse C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)；检测波长：214 nm；流动相：乙腈 - 0.1% 十二烷基磺酸钠水溶液 (38 : 62, V/V)；柱温：35 °C；流速：1.0 mL · min⁻¹；进样体积：50 μL；检测时间：30 min；稀释液：甲醇 - 乙腈 - 水 = 20 : 20 : 60 (V/V/V)。

空白辅料溶液无色谱峰与 BD、FF 峰重叠，且对照品溶液和供试品溶液中主峰保留时间一致，专属性良好，如图 4 所示。BD 线性回归方程为 $Y = 33.133X + 2.250$ ($R^2 = 0.9999$)，在 0.10 ~ 20.30 μg · mL⁻¹ 与峰面积线性关系良好。FF 线性回归方程为 $Y = 221.190X - 0.498$ ($R^2 = 0.9998$)，在 0.01 ~ 1.01 μg · mL⁻¹ 与峰面积线性关系良好。6 份供试品溶液中 BD 与 FF 峰面积 RSD 值分别为 0.84%、0.91%，重复性良好。不同浓度样品中 BD、FF 的回收率均在 98% ~ 101%，且 RSD 值均小于 2.0%，回收实验符合要求。

2.7.2 递送剂量均一性 将 DUSA 管与真空泵相

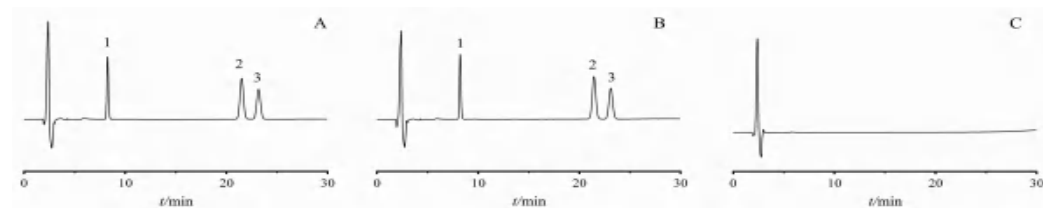


图 4 方法专属性考察的高效液相色谱图

Fig 4 HPLC chromatogram of method specificity

A. 供试品溶液 (test solution) ; B. 对照品溶液 (reference solution) ; C. 空白辅料溶液 (blank excipient solution) ; 1. 富马酸福莫特罗 (formoterol fumarate) ; 2. 布地奈德异构体 B (budesonide isomer B) ; 3. 布地奈德异构体 A (budesonide isomer A)

连，调节气体流量进口处的气体流速为 70 L · min⁻¹ (±2%)。并通过适配器与吸入装置相连，开启真空泵进行递送剂量均一性检测。由于本品作为多剂量贮库型吸入粉雾剂，因此参见吸入气雾剂用 HPLC 依次测定第 1、2、3、29、30、31、32、58、59、60 吸的递送剂量，共检测 10 吸。以每吸递送剂量和每吸递送剂量相对平均值百分比作为评价指标。

由图 5 可知，未经球形化工艺两种活性成分每

吸递送剂量整体偏高，球形化后每吸递送剂量显著降低 ($P < 0.05$)，在不改变处方的前提下，球形化后两种活性成分每吸递送剂量更接近目标值。如图 6 所示 BD 与 FF 两种活性成分未经球形化的 10 吸递送剂量测定值仅有 8 吸在平均值的 75% ~ 125%，且数据波动较大，RSD 均为 21%。经球形化工艺后 10 吸递送剂量的测定值均在平均值的 75% ~ 125%，符合《中国药典》要求。且 RSD 分别为 2.4%、2.6%。

处方经球形化后体现了良好的递送剂量均一性，其每吸药物含量的准确度和均匀性均良好。

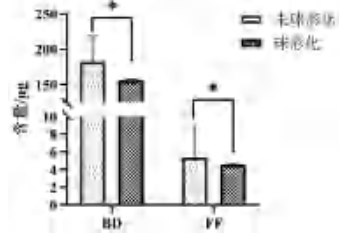


图 5 不同制备工艺下处方的每吸药物递送剂量 ($n = 10$)
Fig 5 Dose delivered per inhalation of formulation under different preparation processes ($n = 10$)

注：与未球形化比较， $^*P < 0.05$ 。
Note: Compare with unsphericalization, $^*P < 0.05$.

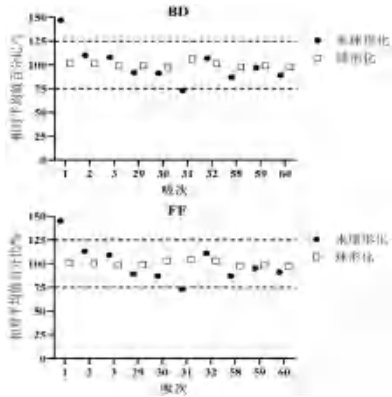


图 6 不同制备工艺下处方的每吸递送剂量相对平均值百分比
Fig 6 Relative average percentage of dose delivered per inhalation of formulation under different preparation processes

表 6 不同制备工艺下处方的体外沉积性能变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Tab 6 Changes in vitro deposition performance of formulation under different preparation processes ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)						
活性成分	工艺	递送总量/ μg	FPD/ μg	FPF/%	MMAD/ μm	GSD
BD	未球形化	105.67 ± 25.43	44.54 ± 14.52	41.59 ± 4.96	3.21 ± 0.07	2.08 ± 0.13
	球形化	148.94 ± 7.61	73.61 ± 0.62	$49.52 \pm 2.92^*$	$2.91 \pm 0.02^*$	$1.81 \pm 0.01^*$
FF	未球形化	4.04 ± 1.36	1.71 ± 0.63	41.93 ± 3.63	3.47 ± 0.17	1.86 ± 0.03
	球形化	4.20 ± 0.12	2.15 ± 0.09	$51.26 \pm 3.53^*$	$3.01 \pm 0.11^*$	$1.75 \pm 0.01^*$

注：与未球形化比较， $^*P < 0.05$ 。
Note: Compare with unsphericalization, $^*P < 0.05$.

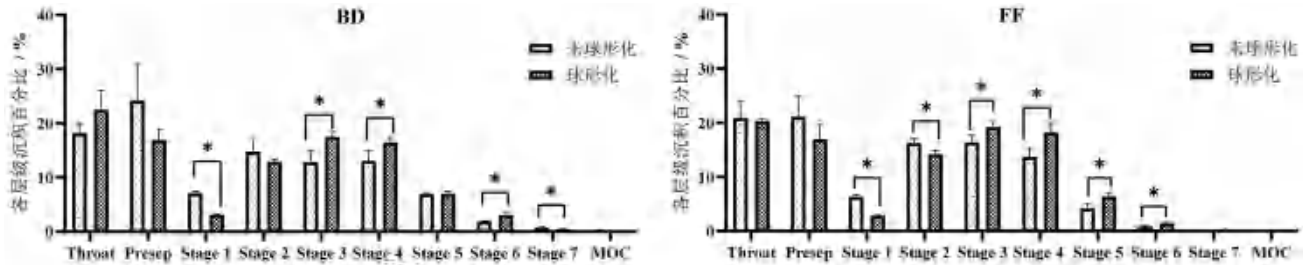


图 7 不同制备工艺下处方的体外层级分布 ($n = 3$)
Fig 7 In vitro hierarchical distribution of formulation under different preparation processes ($n = 3$)

注：与未球形化比较， $^*P < 0.05$ 。
Note: Compare with unsphericalization, $^*P < 0.05$.

3 讨论

本实验所制备的 DPI 为复方制剂，使用液相分析应考虑 BD、FF 的溶解情况。BD 不溶于水，

2.7.3 微细粒子剂量 将新一代级联撞击器 (NGI) 的出口与真空泵相连，调节气体流量使 L 型连接管进口处的气体流速为 $70 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1} (\pm 2\%)$ ，并通过适配器与 NGI 相连，开启真空泵进行体外雾化性能实验。以微细粒子剂量 (FPD)、微细粒子百分比 (FPF)、质量中值空气动力学直径 (MMAD) 及几何标准偏差 (GSD) 等为评价指标。FPD 与 FPF 分别表示粒径小于 $5 \mu\text{m}$ 的药物质量与百分比。FPD 或 FPF 越高，表示递送到气道内的药物沉积量越高。MMAD 是累计药物量为 50% 时的空气动力学直径，代表可吸入药物粒径的平均水平。GSD 是累计药物量百分比为 84.13% 和 15.87% 时的空气动力学直径之比的平方根，表示 NGI 层级分布的离散程度，GSD 越小，颗粒大小越均一^[11]。

由表 6 可知，经球形化工艺后，BD 与 FF 的递送总量、FPD、FPF 均有一定程度的增加。BD 与 FF 球形化前后的 FPF、MMAD 以及 GSD 的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，球形化工艺可以提高处方的递送总量、FPD、FPF，有利于提高肺部递送效率。如图 7 所示，经球形化处理后 BD 与 FF 在第 1、2 级沉积量有所减少，在第 3、4 级沉积量显著增加 ($P < 0.05$)，BD 与 FF 两种活性成分层级分布整体向后移动。

2.8 统计分析

本实验数据采用 Design Expert (10.0.1) 软件进行响应面分析；采用 Excel 软件进行 t 检验分析。

溶于乙腈^[12-13]，而 FF 不溶于乙腈溶于甲醇^[14]，因此使用甲醇-乙腈混合溶液作为稀释液。同时为避免溶剂效应对色谱峰的影响，稀释液中有有机相比

例与流动相接近。

本研究通过附聚作用使微粉化物料附聚并球形化,获得递送剂量均一、肺部沉积量高的吸入粉雾剂。理论上任何物料均可以通过加入液体或固体黏合剂在范德瓦耳斯力、毛细管力、黏附力的相互作用下使其附聚^[15]。小粒度的物料由于自身强大的黏附力可以在无黏合剂的前提下,通过有序的搅拌或滚动使得物料聚集形成母核,母核在滚动时进一步压实并长大形成较大颗粒,同时该过程不改变物料的理化性质^[15-17]。通过 Box-Behnken 响应曲面实验设计初步确定球形化工艺为:压实重量为 5 kg,压实时间为 15 h,滚圆转速为 $30 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,滚圆时间为 20 min。其中压实时间和滚圆时间是球形化工艺的显著影响因素。实验过程中滚圆前的压实操作有助于将小颗粒物料黏合在一起,降低颗粒间的孔隙率,形成致密团聚体^[18-19],但过度压实会使得颗粒硬度增大,影响药物的分散。由于滚圆后所制成颗粒的粒度范围较广,可以通过筛分来控制颗粒大小的均一性。

通过该技术制备的球形颗粒,其直径约为 500 μm ,休止角降低,流动性改善。球形化后颗粒之间排列紧密,孔隙率减小,比表面积减小,堆密度增加,药物与载体间结合力增强,颗粒吸湿能力减小,有利于药物的贮存。球形化后所得颗粒大小均一,递送剂量接近目标递送值,有利于药物递送剂量的准确性,改善递送剂量均一性。从层级分布来看球形化后药物的递送总量提高,原因是球形化后颗粒的流动性改善,小颗粒之间的结合力增强^[20],包材以及装置内的药物残留量减少;同时球形化后药物粒子的 FPF 显著增加,预分离器以及各层级的药物沉积是药物与载体相互作用的结果,处方未经球形化时药物与载体的结合力较弱,部分药物容易在给药早期与载体分离,进而影响下呼吸道的给药剂量^[21]。经球形化后处方的 MMAD 较未球形化显著降低,说明球形颗粒中原辅料具有较好的分散性能,为这类 DPI 提供了一个可行的工艺开发路线。

参考文献

- [1] Wang C, Xu JY, Yang L, et al. Prevalence and risk factors of chronic obstructive pulmonary disease in China (the China Pulmonary Health [CPH] study): a national cross-sectional study [J]. *Lancet*, 2018, 391 (10131): 1706-1717.
- [2] Huang KW, Yang T, Xu JY, et al. Prevalence, risk factors, and management of asthma in China: a national cross-sectional study [J]. *Lancet*, 2019, 394 (10196): 407-418.
- [3] Chandel A, Goyal AK, Ghosh G, et al. Recent advances in aerosolised drug delivery [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112: 108601.
- [4] Kumar M, Jha A, Dr M, et al. Targeted drug nanocrystals for pulmonary delivery: a potential strategy for lung cancer therapy [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2020, 17 (10): 1459-1472.
- [5] 万妮, 陈斌, 李合, 等. 肺部吸入给药系统的研究进展 [J]. *中国新药杂志*, 2021, 30 (15): 1386-1395.
- [6] Hadiwinoto GD, Lip Kwok PC, Lakerveld R. A review on recent technologies for the manufacture of pulmonary drugs [J]. *Ther Deliv*, 2018, 9 (1): 47-70.
- [7] 韩婷, 张金龙, 邵洪梅. 吸入粉雾剂制备过程中相关问题探析 [J]. *化工管理*, 2023 (27): 149-152.
- [8] 薛涛, 黄乐冉, 杨建龙, 等. 扎那米韦粉雾剂的研制 [J]. *伊犁师范大学学报 (自然科学版)*, 2023, 17 (2): 45-54, 76.
- [9] Leane M, Pitt K, Reynolds GK, et al. Manufacturing classification system in the real world: factors influencing manufacturing process choices for filed commercial oral solid dosage formulations, case studies from industry and considerations for continuous processing [J]. *Pharm Dev Technol*, 2018, 23 (10): 964-977.
- [10] 中国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 485.
- [11] 贾茵茵, 张财树, 周颖, 等. 吸入制剂微细粒子空气动力学粒径分布评价方法研究 [J]. *中国药物警戒*, 2024, 21 (2): 141-146.
- [12] European Pharmacopoeia 11.0, Budesonide [S]. 2024, 1876-1878.
- [13] United States Pharmacopeia 2024, USP Monographs, Budesonide [S]. 2024.
- [14] European Pharmacopoeia 11.0, Formoterol fumarate Dihydrate [S]. 2024: 2842-2844.
- [15] E·特罗罗斯特, J·法尔克. 工艺技术 I: CN1132476 [P]. 1996-10-02.
- [16] 宓静英, 杨安金. 简述微丸的制备方法 [J]. *江西中医学院学报*, 2006 (6): 28.
- [17] Claussen ND, Petzow G. Kugelherstellung durch pulveragglomeration [J]. *Materialwiss Werkstofftech*, 1973, 4: 148-156.
- [18] Fries L, Dupas J, Bellamy-Descamps M, et al. Bonding regime map for roller compaction of amorphous particles [J]. *Powder Technol*, 2019, 341: 51-58.
- [19] Szulc A, Skotnicka E, Gupta MK, et al. Powder agglomeration processes of bulk materials—a state of the art review on different granulation methods and applications [J]. *Powder Technol*, 2024, 431: 119092.
- [20] Gresse E, Rousseau J, Akdim M, et al. Enhancement of inhaled micronized powder flow properties for accurate capsules filling [J]. *Powder Technol*, 2024, 437: 119576.
- [21] Sun Y, Cui ZX, Sun YJ, et al. Exploring the potential influence of drug charge on downstream deposition behaviour of DPI powders [J]. *Int J Pharm*, 2020, 588: 119798.

(收稿日期: 2024-09-28; 修回日期: 2024-11-28)

雷公藤红素改善睡眠剥夺小鼠肝损伤的机制研究

赵红梅¹, 徐红丹², 赵静玉¹, 李雪¹, 杨萌¹, 张宁^{1*}, 孙慧峰^{1*} (1.黑龙江中医药大学 药学院, 哈尔滨 150040; 2.无锡卫生高等职业技术学校, 江苏 无锡 214028)

摘要: **目的** 探讨雷公藤红素对睡眠剥夺小鼠肝损伤的保护作用及可能机制。**方法** 雄性 C57 小鼠随机分为空白组、模型组、塞来昔布组和雷公藤红素组, 每组 12 只。除空白组外, 其余各组小鼠给予 72 h 睡眠剥夺, 造模期间各组小鼠给予相应药物治疗。HE 染色和 Masson 染色观察小鼠肝组织及肝脏胶原纤维变化情况; 生化试剂盒检测小鼠血清中谷丙转氨酶 (ALT) 和谷草转氨酶 (AST) 的变化情况; ELISA 试剂盒检测各组小鼠肝脏白细胞介素-1 β (IL-1 β) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 含量变化; 网络药理学预测雷公藤红素改善睡眠障碍肝损伤的靶点及机制; 分子对接预测雷公藤红素与核心靶点的结合能力; 免疫组织化学 (IHC) 法检测小鼠肝脏磷酸酶和张力蛋白同系物 (PTEN) 蛋白的表达情况; Western blot 法检测小鼠肝脏 PPARG、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达情况。**结果** HE 染色试剂盒检测结果表明连续 72 h 睡眠剥夺明显造成了小鼠肝脏炎症及损伤, 与空白组相比, 模型组小鼠肝脏组织发生炎性细胞浸润, 伴随着 IL-1 β 、TNF- α 的升高 ($P < 0.01$), 同时小鼠血清内的 ALT 及 AST 含量增加 ($P < 0.01$), 给予塞来昔布及雷公藤红素后, 这些现象被逆转; Masson 染色结果表明雷公藤红素改善了 72 h 睡眠剥夺引起的轻度肝纤维化; 网络药理学预测到雷公藤红素通过多个靶点改善肝损伤, 其作用可能主要是通过 PI3K/Akt 信号通路介导的抗炎机制来发挥的; 分子对接结果表明雷公藤红素与该机制相关的多个靶点有良好的结合能力; IHC 和 Western blot 结果表明, 与空白组相比, 模型组小鼠肝脏的 PPARG 和 PTEN 的表达降低, PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 的表达增加 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 塞来昔布组和雷公藤红素组小鼠肝脏的 PPARG 和 PTEN 表达增加, PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 表达降低 ($P < 0.01$)。**结论** 雷公藤红素可通过 PPARG/PTEN/PI3K/Akt 信号通路改善睡眠剥夺小鼠的肝损伤情况。

关键词: 雷公藤红素; 睡眠剥夺; 肝损伤

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)04-0914-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.007

Mechanism of celastrol in ameliorating liver injury in sleep-deprivation mice

ZHAO Hong-mei¹, XU Hong-dan², ZHAO Jing-yu¹, LI Xue¹, YANG Meng¹, ZHANG Ning^{1*}, SUN Hui-feng^{1*} (1. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040; 2. Wuxi Health Vocational and Technical School, Wuxi Jiangsu 214028)

Abstract: **Objective** To determine the protective effect and possible mechanism of celastrol against liver injury in sleep-deprivation mice. **Methods** Male C57 mice were randomly divided into a blank group, a model group, a celecoxib group, and a celastrol group, 12 mice in each group. All the mice except the blank group were subjected to continuous 72 h sleep-deprivation, and mice in all groups were given corresponding drug treatments during modeling. HE staining and Masson staining were used to observe the changes in the liver tissue and liver collagen fibers in the mice. Biochemical kits were used to detect the changes in alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in mouse serum. ELISA kits were used to detect the changes in interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels in the liver. Network pharmacology predicted the targets and

基金项目: 国家自然科学基金区域创新发展联合基金重点支持项目 (No.U23A20521)。

作者简介: 赵红梅, 女, 硕士研究生, 主要从事中药鉴定学研究, email: 15877811262@qq.com *通信作者: 张宁, 男, 研究员, 主要从事药物分析研究, email: zhangning0454@163.com; 孙慧峰, 男, 教授, 主要从事中药材质量标准及新药研究, email: huihengsun@hotmail.com

mechanism of celastrol in ameliorating liver injury induced by sleep disorder. Molecular docking predicted the binding ability of celastrol with the core target. Immunohistochemistry (IHC) detected the expression of phosphatase and tensin homolog on chromosome ten (PTEN) in the liver. Western blot detected the expression of PPARG, PI3K, p-PI3K, Akt, and p-Akt proteins in the liver. **Results** The HE staining kit showed that continuous 72 h sleep-deprivation obviously caused the liver inflammation and injury in the mice. Compared with the blank group, the model groups had inflammatory cell infiltration in the liver tissue, accompanied by the elevation of IL-1 β and TNF- α ($P < 0.01$), all the increase of ALT and AST levels in the serum of the mice ($P < 0.01$). All these phenomena were reversed after the administration of celecoxib and celastrol. Masson staining suggested that celastrol ameliorated mild liver fibrosis induced by 72 h sleep-deprivation. Network pharmacology predicted that celastrol ameliorated liver injury through multiple targets, whose function might mainly be through the anti-inflammatory mechanism mediated by PI3K/Akt signalling pathway. Molecular docking showed that celastrol had a good binding capacity for multiple targets related to this mechanism. IHC and Western blot showed that the expression of PPARG and PTEN in the livers of mice in the model group was decreased, while the expression of PI3K, p-PI3K, Akt, and p-Akt was increased compared with the blank group ($P < 0.01$); compared with the model group, the expression of PPARG and PTEN in the livers of mice in the celecoxib group and the celastrol group was increased, while the expression of PI3K, p-PI3K, Akt and p-Akt was decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** Celastrol can ameliorate the liver injury in sleep-deprivation mice through PPARG/PTEN/PI3K/Akt signalling pathway.

Key words: celastrol; sleep-deprivation; liver injury

睡眠是机体维持生命活动的正常生理现象，体内生物钟调控相关基因的表达以适应外周环境^[1]，随着现代社会生活环境改变以及不良生活方式增加，人们睡眠时间减少或睡眠不足，一般认为 24 h 内的睡眠时间少于 6 ~ 8 h 则发生了睡眠剥夺^[2]。睡眠剥夺通过损害机体学习、记忆、免疫及心血管功能^[3-4]等方面严重影响着人们的健康和生活质量。肝脏在睡眠期间表达大量抗氧化基因以清除清醒状态下积累的代谢废物^[5]，以维持机体内环境稳态，睡眠障碍使肝磷脂酰胆碱降低，破坏了肝细胞结构功能及信号传递，损害了肝脏的正常生理功能^[6]，加速肝损伤、肝炎、脂肪肝、肝硬化、肝癌等疾病的发展^[7]。急性肝损伤是一种严重的临床疾病，可由药物滥用、感染和营养不良等因素引发，大量研究表明氧化应激和炎症是急性肝损伤发病的主要机制^[6, 8]。

睡眠不足已被证明可引起体内炎症风暴^[9]，在失眠患者的肝脏和血液中观察到促炎细胞因子白细胞介素 (IL) -6、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等促炎细胞因子显著升高^[10-11]，这些促炎分子进一步招募大量单核细胞从血液进入肝脏，产生大量炎性巨噬细胞，导致肝细胞损伤^[12]，引发肝脏疾病，因此抑制炎症发展是改善肝损伤的重要举措。日益增长的生活压力及电子产品过度使用使得睡眠问题发生率急剧上升^[5]，增加了肝损伤风险，因此关注和寻找改善肝损伤的药物尤为重要。

雷公藤红素是从天然植物雷公藤 (*Tripterygium wilfordii* Hook. f.) 根茎中提取的一种三萜类化合物，有良好的抗炎作用，在各疾病领域均有其药效研究。已有研究表明雷公藤红素可通过多个靶点和通路来改善各型肝炎和肝癌的发展，如雷公藤红素在小鼠体内实验中已被证明可抑制 PI3K/Akt 通路磷酸化改善自身免疫性肝炎^[13]；与 HSP90 β 的 Ala47 残基结合发挥抗炎作用及通过 JNK/Nrf2/HO-1 轴来抑制丙型肝炎病毒复制，阻碍其发展为肝细胞癌^[14-15]；C-20 修饰的雷公藤红素衍生物也能显著抑制乙肝病毒复制^[16]；此外雷公藤红素还能调控亚油酸代谢、脂肪酸生物合成、氨基酸代谢等代谢途径来治疗蛋氨酸-胆碱缺乏饮食所诱导的非酒精性脂肪性肝炎^[17]；体外实验发现雷公藤红素可抑制 PTEN/PI3K/Akt 通路^[18]、NF- κ B 通路^[19]、HSP90-HIF1 α 及 VEGF 通路^[20]等显著抑制肝癌细胞的迁移。但未见其在改善睡眠障碍引发肝损伤方向的报道，因此本研究旨在探究雷公藤红素改善睡眠障碍所致肝损伤的药效及作用机制，为雷公藤红素治疗肝损伤及其新药研发提供理论依据。

1 材料

1.1 试药

雷公藤红素、塞来昔布 (批号: C15600263、C15777968, 纯度均为 98%, 上海麦克林生化科技股份有限公司); 苏木精-伊红 (HE) 试剂盒、

Masson 三色染色试剂盒 (批号: G1120, G1346, 北京索莱宝科技有限公司); 谷丙转氨酶 (ALT) 和谷草转氨酶 (AST) 试剂盒 (美国 IDEXXG 公司); TNF- α 和 IL-1 β 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 试剂盒 (江苏酶标生物科技有限公司); BCA 试剂盒 (Abbkine); DAB 显色试剂盒 (Servicebio); 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ /PPARG) 抗体 (批号: 10025850, Proteinch); 同源性磷酸酶-张力蛋白 (PTEN) 抗体 (批号: 21)、磷酸化蛋白激酶 (p-Akt) 抗体 (批号: 27)、磷酸化磷酸肌醇 3-激酶 (p-PI3K) 抗体 (批号: 7)(CST); 磷酸肌醇 3-激酶 (PI3K) 抗体 (批号: 1088922-6, Abcam); 蛋白激酶 (Akt) 抗体 (批号: 10026612, Proteinch); 山羊抗兔 IgG (H+L)、山羊抗小鼠 IgG (H+L) (批号分别为 A0208、A0216, 上海碧云天生物科技有限公司)。

1.2 仪器

Gemini AS 型号的 HE 全自动染色机、STP120 型号的全自动脱水机、HISTOSTAR 型号的全自动包埋机、HM-355S 型号的全自动切片机、EI0001 型号的电泳仪、A44116 型号的成像系统 (Thermo 公司); BX41TF 型号的光学显微镜 (OLYMPUS); 全自动生化分析仪 (美国 IDEXXG, 型号: VetTest8008 型); 高速冷冻离心机 (德国 SIGMA 公司)。

1.3 实验动物

实验动物为 6~8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠, 体重 (22 $\pm$ 2) g, SPF 级 [斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 动物许可证号: SYXK (滇) 2019-0002]。饲养于西双版纳植物研究所清洁级动物实验室, 温度 (23 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 (55 $\pm$ 5) %, 12 h/12 h 循环照明, 自由饮食饮水。动物实验在中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物福利伦理委员会的批准下开展 (批准文号 2024005)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

48 只小鼠适应性饲养 7 d 后被随机均分为空白组、模型组、塞来昔布组 (50 mg $\cdot$ kg $^{-1}$, ig) 及雷公藤红素组 (2 mg $\cdot$ kg $^{-1}$, ig), 药物均用 0.5% 的羧甲基纤维素钠配制。除空白组外, 其余各组小鼠连续 6 d 给予相应药物治疗, 最后 3 d 对小鼠进行 72 h 睡眠剥夺, 于每日 00: 00、06: 00、12: 00 及 18: 00 分别给予小鼠 1 h 的自由时间进行饮水饮食, 其余时间利用潮湿垫料、噪声 (广播、敲打物体等)、陌生环境 (换笼)、睡眠时摇晃笼子或触碰小鼠致醒、强光照射等刺激条件无规律对小鼠进行睡眠剥夺, 单次刺激时间约为 2 h。结束后对各组小鼠进行取材及指标检测。

2.2 肝脏组织病理观察

2.2.1 HE 染色评价小鼠肝损伤程度 小鼠肝脏用 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋后切成 5 μm 的薄片, 进行 HE 染色, 观察各组小鼠肝细胞形态、炎性细胞浸润、肝小叶脉络扩张等现象来判断肝脏损伤情况。

2.2.2 Masson 染色评价小鼠肝组织纤维化情况 将肝脏石蜡切片, 按照改良 Masson 三色染色试剂盒说明书对切片进行染色, 根据肝脏门静脉、中央静脉周围胶原纤维的数量、形态、是否形成纤维间隔及周围炎性浸润程度等现象来判断肝纤维化及损伤情况。

2.3 血清及肝组织生化指标测定

2.3.1 血清 ALT、AST 含量测定 小鼠麻醉后眼球取血, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 2 h 后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3500 r $\cdot$ min $^{-1}$ 离心 10 min, 分离血清, 全自动生化仪检测血清中 AST 和 ALT 水平。

2.3.2 ELISA 检测肝组织 IL-1 β 及 TNF- α 表达 根据试剂盒说明书检测各组小鼠肝脏的 IL-1 β 及 TNF- α 水平。

2.4 网络药理学预测雷公藤红素改善睡眠障碍所致肝损伤的靶点及通路

通过 TCMSP 平台 (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)、PharmMapper (<https://lilab-ecust.cn/pharmmapper/>) 及 Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 搜寻雷公藤红素的靶点; 以 “sleep disorder” 和 “liver injury” 为检索词在 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、DrugBank (<https://go.drugbank.com/>) 检索疾病靶点。通过 Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) 数据库对靶点进行标准化规范注释。Venny (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) 平台获取药物与疾病的交集靶点, 导入 STRING (<https://string-db.org/>) 平台, 设置对象为 (homosapiens) 取置信度 ≥ 0.900 , 隐藏游离基因节点, 得到蛋白互作关系。将网络导入 Cytoscape 3.8.2 软件, 通过软件中的插件 CytoNCA 筛选大于平均值的潜在关键靶点。将交集基因导入欧易云平台 (<https://cloud.oebiotech.com/>) 平台进行 GO 富集和 KEGG 通路富集分析。

2.5 分子对接预测雷公藤红素与核心靶点的结合能力

PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载雷公藤红素的 3D 结构, 在 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载 IL-6、PPARG、MMP9、BCL2 及 MYC 蛋白 3D 结构, 经 Open Babel GUI 软件格式转换, 用 Autodock Tools (1.5.7) 软件进行处理和对接, 用 pymol (2.2.0) 软件处理对接结果。

2.6 免疫组织化学 (IHC) 检测肝组织 PTEN 蛋白表达情况

肝组织切片脱蜡和脱水后,放入 EDTA 缓冲溶液中微波修复,3% 过氧化氢 (H_2O_2) 溶液室温孵育,山羊血清室温封闭。滴加 PTEN (1:400 稀释) 抗体,4℃ 过夜,二抗溶液室温孵育,DAB 溶液显色,苏木素染色液复染,脱水,透明后封片,干燥后显微镜下观察肝组织 PTEN 蛋白的阳性细胞表达情况。

2.7 蛋白免疫印迹 (Western blot) 检测肝组织 PPARG、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 表达情况

BCA 试剂盒检测各组小鼠肝脏蛋白质浓度。用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE, 10% 凝胶) 分离蛋白,转膜后,室温下封闭 2 h,加入一抗 (PPARG、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 和 GAPDH 抗体) 4℃ 过夜,1×TBST 溶液清洗 4 次,每次 5 min,加入二抗室温孵育 1 h,清洗 4 次,每张膜加入 200 μL 发光液在凝胶系统成像装置中曝光显影成像并拍照。采用 Image J 软件进行蛋白定量分析。

2.8 统计分析

数据结果使用 GraphPad Prism8 软件分析处理并作图。用平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示数据结果,符合正态分布并且总体符合方差齐性的数据,采用单因素方差分析 (oneway-ANOVA),组间均数两两比较应用 LSD 检验,应用 SNK 进行统计后校正。方差不齐的数据采用 Tamhane' S T2 法进行组间比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 雷公藤红素可明显改善 72 h 睡眠剥夺小鼠的急性肝损伤

3.1.1 雷公藤红素对睡眠剥夺所引起的小鼠肝脏炎症的影响 各组小鼠肝组织染色结果如图 1A ~ 1C 所示,空白组小鼠肝脏细胞及肝小叶大小、形态完整,无明显病理改变;与空白组小鼠相比,模型组小鼠肝组织门静脉周围出现大量炎症细胞浸润、炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 表达增加 ($P < 0.01$),肝小叶静脉管腔扩张,肝脏受损;与模型组小鼠相比,塞来昔布组和雷公藤红素组小鼠肝组织炎症浸润得到改善、IL-1 β 和 TNF- α 表达降低 ($P < 0.01$),这表明雷公藤红素可有效抑制睡眠剥夺所诱导的小鼠肝脏炎症。

3.1.2 雷公藤红素对睡眠剥夺所引起的小鼠肝脏纤维化的影响 各组小鼠肝组织 Masson 染色结果如图 1A 所示,空白组小鼠肝脏门静脉周围纤维形态结构正常,分布均匀,未见纤维间隔。与空白组小鼠相比,模型组小鼠门静脉周围出现少量蓝色胶原纤维病理性沉积;这些现象在给予塞来昔布和雷公藤红

素后被明显逆转。与以往研究结果一致,雷公藤红素有效改善了 72 h 睡眠剥夺引起的肝纤维化症状^[17]。

3.1.3 雷公藤红素对睡眠剥夺所引起的小鼠血清 ALT 和 AST 的影响 各组小鼠血清的 ALT 和 AST 结果如图 1D ~ 1E 所示,空白组小鼠血清 ALT 和 AST 含量较低;与空白组小鼠相比,模型组小鼠血清 ALT 和 AST 含量明显升高 ($P < 0.01$),表明小鼠存在肝损伤情况;与模型组小鼠相比,塞来昔布组和雷公藤红素组小鼠血清 ALT 和 AST 含量明显降低 ($P < 0.01$),表明雷公藤红素可有效减轻睡眠剥夺诱导小鼠的肝损伤情况。

3.2 网络药理学预测雷公藤红改善睡眠障碍小鼠肝损伤的可能机制

利用数据库获得雷公藤红素靶点 173 个,肝损伤相关疾病靶点 1555 个,睡眠障碍相关疾病靶点 2787 个,三者交集靶点 63 个。将 63 个交集靶点导入 STRING 在线平台,得到交集靶点的蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络数据,将数据导入 Cytoscape 3.8.2 软件修饰得到 PPI 网络图,见图 2A;随后利用 CytoNCA 插件计算每个基因的 eigenvector、betweenness 和 closeness 值,以 3 个参数均值再次进行筛选得到 9 个核心靶点,最后根据 Degree 值从大到小排列核心靶点,颜色越深则表示 Degree 越大,结果如图 2B 所示。经网络药理学初步预测,雷公藤红素改善睡眠障碍所致肝损伤的潜在核心靶点依次为 IL-6、MYC、PPARG、BCL-2、MMP9、PTGS2、TGFB1、CCND1、FN1。

GO 富集的生物过程 (BP)、细胞组分 (CC) 和分子功能 (MF) 前 10 项可视化结果见图 2C,雷公藤红素可参与调控肝脏细胞增殖、转录过程的正调控、细胞对血管内皮生长因子刺激的反应及细胞外凋亡途径等生物过程;涉及细胞外空间、基底膜、病灶黏附、细胞外基质、核孔复合体等细胞部位;参与类固醇激素受体活性、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性、类固醇结合、序列特异性 DNA 结合生长因子活性、核受体活性等分子功能。KEGG 结果见图 2D,与雷公藤红素相关的人类疾病有癌症发病途径、表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂的抗药性、癌症中的蛋白多糖、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、乙型肝炎、癌症中的微 RNA、人类巨噬细胞病毒感染等;与雷公藤红素相关的细胞过程主要有病灶黏附等;与雷公藤红素相关的环境信息处理有 PI3K-Akt 信号通路、JAK-STAT 信号通路等。

3.3 分子对接预测雷公藤红素与核心靶点的结合活性

将网络药理学预测的前 5 个核心靶点与雷公藤红素进行分子对接,结果见图 3,雷公藤红素与 IL-6 (PDB ID: 1ALU)、MYC (PDB ID: 1NKP)、

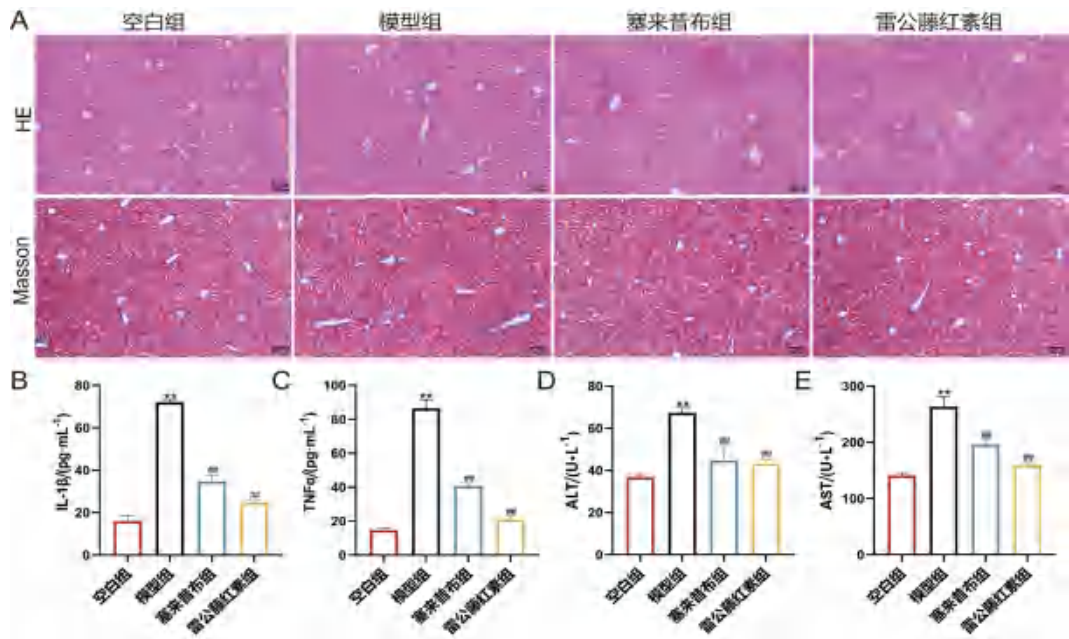


图 1 雷公藤红素对 72 h 睡眠剥夺小鼠的急性肝损伤的影响 (×100)

Fig 1 Effect of celastrol on acute liver injury induced by 72 h sleep-deprivation in mice (×100)

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

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

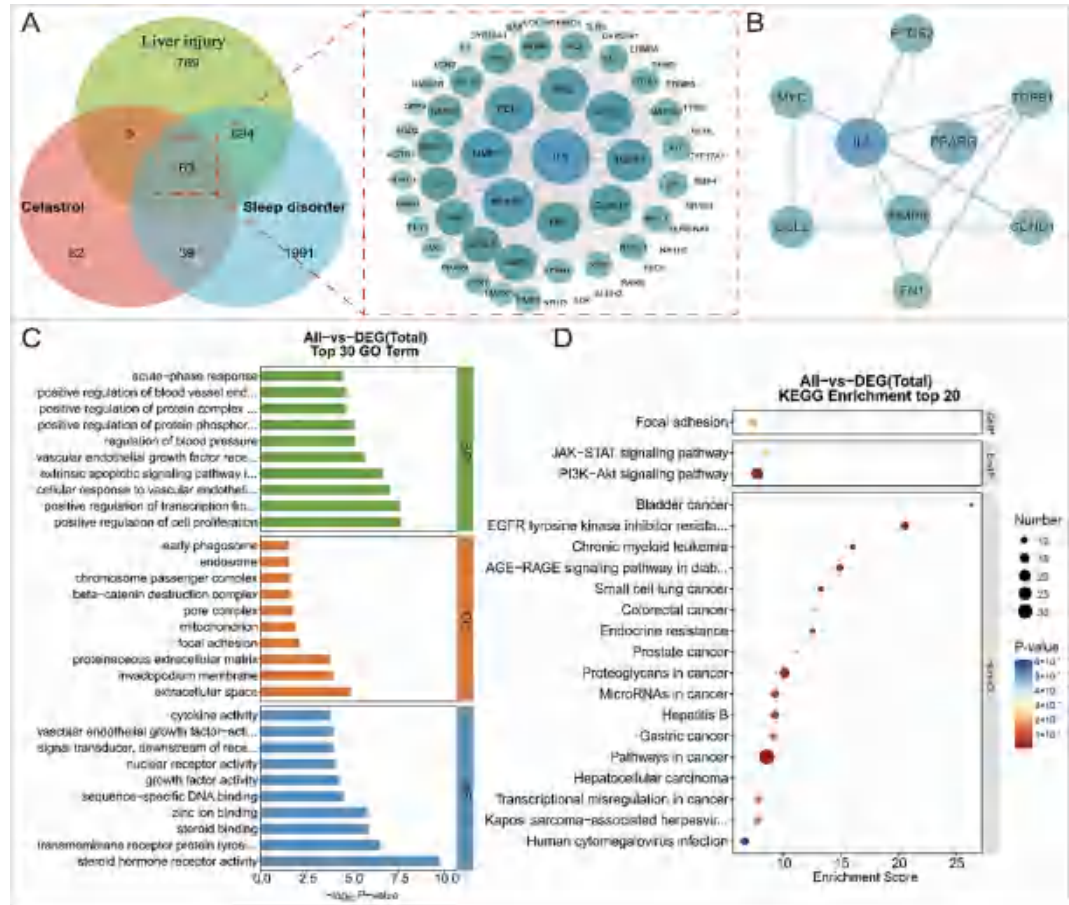


图 2 网络药理学预测雷公藤红素改善睡眠障碍小鼠肝损伤的靶点和机制

Fig 2 Network pharmacology predicted the targets and mechanism of celastrol in ameliorating the liver injury in sleep disorder mice

A. 雷公藤红素 - 睡眠障碍 - 肝损伤靶点韦恩图和交集靶点 PPI 网络图 (celastrol-sleep disorder-liver injury targets and PPI network of intersecting targets); B. 核心靶点 PPI 网络图 (PPI network of core targets); C. GO 分析图 (analysis diagram of GO); D. KEGG 富集分析图 (analysis of KEGG enrichment)

PPARG (PDB ID: 3EOO)、BCL-2 (PDB ID: 2W3L)、MMP9 (PDB ID: 4JIJ) 的结合能分别为 -32.38 、 -27.74 、 -35.56 、 -27.87 及 -31.55

$\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 结果显示雷公藤红素与 PPARG 有较好的结合活性, 因此 PPARG 可能作为雷公藤红素改善睡眠剥夺肝损伤的主要作用靶点。

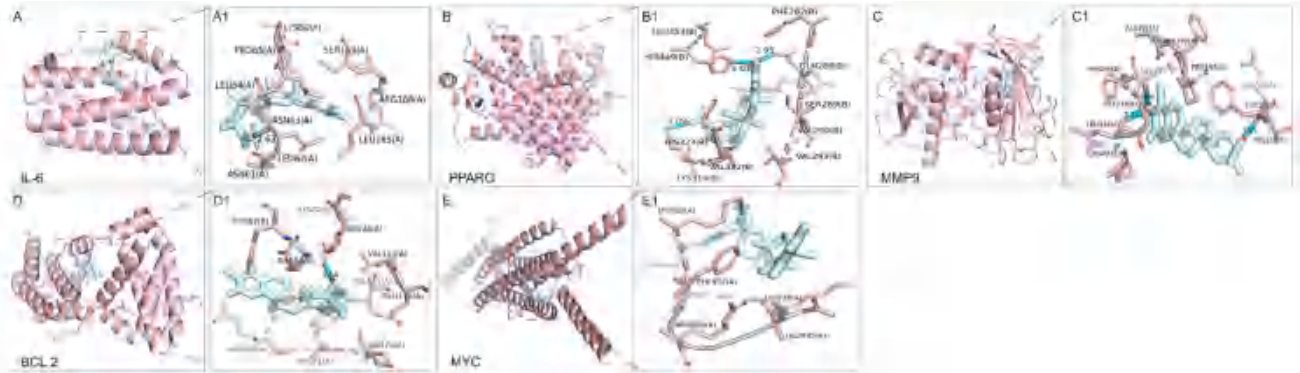


图 3 雷公藤红素与核心蛋白的分子对接模拟结果

Fig 3 Molecular docking simulations of celastrol with core proteins

3.4 雷公藤红素通过 PPARG/PTEN/PI3K/Akt 通路改善睡眠剥夺所致肝损伤

结果如图 4 所示, 与空白组小鼠相比, 模型组小鼠肝组织的 PPARG 和 PTEN 蛋白含量明显降低 ($P < 0.01$), PI3K、p-PI3K、Akt 和 p-Akt 蛋白含量明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组小鼠相比, 塞来昔

布组和雷公藤红素组小鼠肝组织的 PPARG 和 PTEN 蛋白含量明显升高 ($P < 0.01$), PI3K、p-PI3K、Akt 和 p-Akt 蛋白含量明显降低 ($P < 0.01$)。这表明雷公藤红素可能通过 PPARG/PTEN/PI3K/Akt 信号通路改善小鼠睡眠剥夺所致的肝损伤情况。

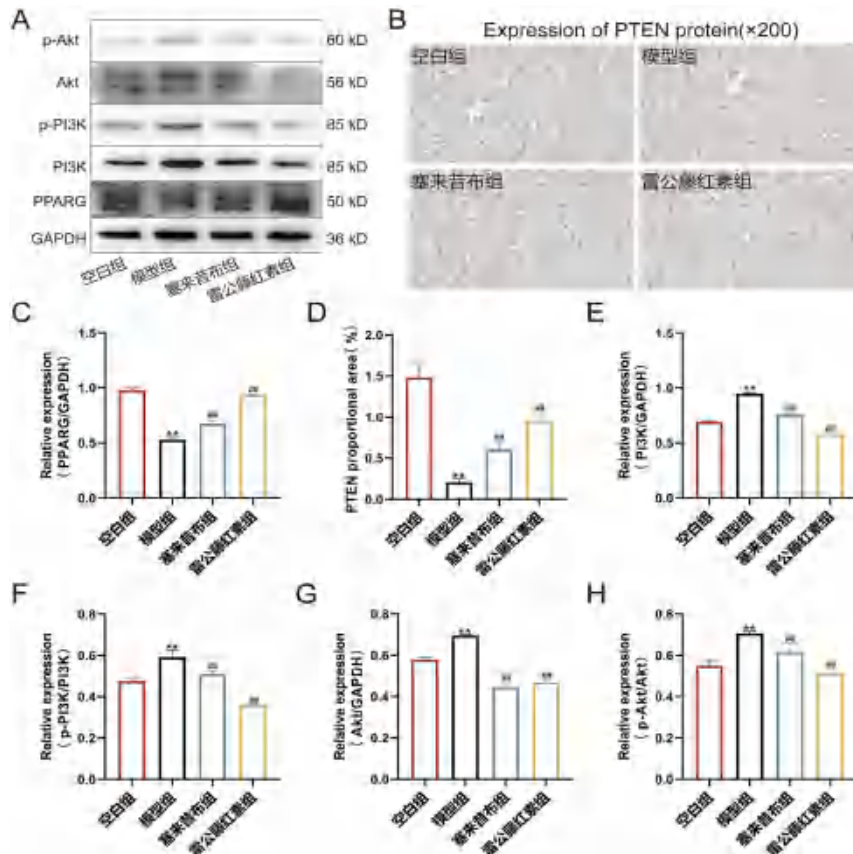


图 4 雷公藤红素改善睡眠剥夺小鼠肝损伤的机制研究

Fig 4 Mechanism of celastrol in ameliorating the liver injury in sleep-deprivation mice

注: 与空白组相比, $**P < 0.01$; 与模型组相比, $##P < 0.01$ 。

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

4 讨论

PPARG 属于核内激素受体超家族,是结构保守的转录因子,以配体调节方式被激活,PPARG 与视黄醛 X 受体 α (RXR α) 结合形成异二聚体从而调控靶基因表达,参与糖脂代谢和炎症等多种生物学过程^[21]。研究表明 PPARG 通过脂肪生成、胰岛素抵抗、炎症、氧化应激、内质网应激和纤维化等生理过程参与肝脏疾病的发生与发展^[22],PPARG 可通过终止 NF- κ B p65 因子转录、JAK2 信号传导和转录激活因子 3 (STAT3) 信号通路等,来调控 IL-6、TNF- α 、IL-4、IL-10、IL-2、干扰素 (IFN) 等炎症因子的表达以改善肝脏炎症和肝纤维化等疾病^[22-23]。有研究表明 PPARG 激动剂、中药及其提取物已被证明可通过 PPARG 的表达或活性来改善各类型的肝脏疾病^[24],如 PPARG 激动剂 15d-PGJ2 激活 PPARG 抑制巨噬细胞迁移抑制因子在损伤肝细胞中的表达,以减少骨髓来源巨噬细胞 (BMM) 的浸润和促炎激活,从而缓解急性肝损伤^[25];红花中的羟基红花黄色素 A 可激活 PPARG 减轻氧化应激诱导的肝纤维化^[26],也能显著降低乙醇诱导脂肪肝模型动物肝脏的 PPARG、PI3K、Akt 和 mTOR 的表达来改善脂肪肝病理情况^[27-28];兰花甲醇提取物可能通过 PPARG 改善对乙酰氨基酚引起的肝损伤^[29];雷公藤红素可与 PPAR γ 结合并调节其转录活性来改善非酒精性脂肪肝^[30]。这暗示 PPARG 可能是多种药物改善肝脏疾病的重要靶点。

PTEN 具有蛋白质和脂质磷酸酶活性,主要作用是使磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸 (PIP3) 去磷酸化将其转化为磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 (PIP2),负调控 PI3K/Akt 信号通路^[31]。磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 通路是细胞内最重要的信号通路之一,参与调节细胞存活、迁移、增殖以及协调对各种代谢和炎症信号的反应^[32]。PI3K/Akt 信号激活可通过 Akt/TSC-2/TSC-1/Rheb/ mTORC1 通路、PI3K/Akt/mTORC1 通路来阻断 NF- κ B 激活或增强 STAT3 活性抑制炎症反应;能磷酸化 GSK-3 β 促进 BCL-3/NF- κ B1 (p50)/NF- κ B2 (p52) 三聚体结合从而表达促炎细胞因子或使 GSK-3 β 磷酸化失活来抑制 NF- κ B 表达;而依赖 Ca²⁺ 的 PI3K/Akt 通路激活则调控内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 诱导一氧化氮 (NO) 产生发挥扩血管和抗炎效应;此外,PI3K/Akt 信号激活还能使 FOXO1 快速磷酸化和核转位来促进炎症因子表达^[33]。研究表明许多药物可通过调控 PTEN/PI3K/Akt 信号通路改善各类型肝病,如羌活醇提取物、单宁、白藜芦醇和清肝活血方等药物均可调节 PTEN/PI3K/Akt 通路来

有效抑制肝细胞凋亡、肝纤维化或肝癌细胞增殖等^[34-37]。PPARG 直接与 PTEN 基因启动子区域结合诱导 PTEN 表达^[38],在各类肝脏疾病中均发现 PPARG、PTEN 表达降低和 PI3K/Akt 信号过度激活的现象^[24, 39-40],因此,促进 PPARG 和 PTEN 表达从而抑制肝脏疾病中的 PI3K/Akt 信号过度激活仍是改善各因素所致肝损伤的重要手段。

实验显示 72 h 睡眠剥夺激活小鼠肝脏 PI3K/Akt 通路,致炎性细胞浸润及 IL-1 β 、TNF- α 升高。塞来昔布与雷公藤红素通过下调 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白抑制该通路。网络药理学及分子对接提示 PPARG 是雷公藤红素改善肝损伤的潜在靶点,且 PTEN 为 PPARG 调控 PI3K/Akt 的关键蛋白。睡眠剥夺导致肝内 PPARG、PTEN 表达降低,塞来昔布与雷公藤红素则上调其表达以负调控 PI3K/Akt 通路,缓解炎症。后续将用 PPARG 激动剂 (罗格列酮) 及拮抗剂 (GW9662) 验证该靶点在雷公藤红素抗炎机制中的核心作用。

参考文献

- [1] 顾晔,邢陈,宋伦,等.连续睡眠剥夺对大鼠肝生物钟基因及肝损伤标志物表达水平的影响[J].军事医学,2017,41(3):174-177.
- [2] Onaolapo JO, Onaolapo YA, Akanmu AM, et al. Caffeine and sleep-deprivation mediated changes in open-field behaviours, stress response and antioxidant status in mice [J]. Sleep Sci, 2016, 9(3): 236-243.
- [3] Van AB, Semenza ER, Yap M, et al. A deep sleep stage in *Drosophila* with a functional role in waste clearance [J]. Sci Adv, 2021, 7(4): EABC2999.
- [4] 方慧,郭宗君.慢性失眠患者过度觉醒与血清炎症细胞因子的相关性研究[J].临床医学进展,2024,14(4):204-210.
- [5] 易冲.鲑鱼 (*Katsuwonus pelamis*) 寡肽 SEP-3 对睡眠剥夺小鼠肝脏损伤的修复作用及机制探究[D].舟山:浙江海洋大学,2022.
- [6] 吴晚虹.疏泄一号方改善睡眠剥夺所致小鼠肝损伤的作用机制研究[D].厦门:厦门大学,2021.
- [7] Filipinski E, Subramanian P, Carrière J, et al. Circadian disruption accelerates liver carcinogenesis in mice [J]. Mutat Res, 2009, 680(1-2): 95-105.
- [8] 刘璐.睡眠剥夺加重 LPS/D-Gal 诱导的急性肝损伤[D].重庆:重庆医科大学,2021.
- [9] You YW, Li JW, Zhang Y, et al. Exploring the potential relationship between short sleep risks and cognitive function from the perspective of inflammatory biomarkers and cellular pathways: insights from population-based and mice studies [J]. CNS Neurosci Ther, 2024, 30(5): e14783.
- [10] 方慧,郭宗君.慢性失眠患者过度觉醒与血清炎症细胞因子的相关性研究[J].临床医学进展,2024,14(4):204-210.
- [11] Veler H. Sleep and inflammation: bidirectional relationship [J]. Sleep Med Clin, 2023, 18(2): 213-218.

- [12] 李婷, 刘华宝, 胡文艳, 等. 炎症在肝纤维化中的作用[J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 38 (10): 2368-2372.
- [13] Wang SH, Huang Z, Lei Y, et al. Celastrol alleviates autoimmune hepatitis through the PI3K/Akt signaling pathway based on network pharmacology and experiments [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 816350.
- [14] Chen SR, Li ZQ, Xu J, et al. Celastrol attenuates hepatitis C virus translation and inflammatory response in mice by suppressing heat shock protein 90 β [J]. Acta Pharmacol Sin, 2023, 44 (8): 1637-1648.
- [15] Tseng CK, Hsu SP, Lin CK, et al. Celastrol inhibits hepatitis C virus replication by upregulating heme oxygenase-1 via the JNK MAPK/Nrf2 pathway in human hepatoma cells [J]. Antiviral Res, 2017, 146: 191-200.
- [16] Zhang H, LU GX. Synthesis of celastrol derivatives as potential non-nucleoside hepatitis B virus inhibitors [J]. Chem Biol Drug Des, 2020, 96 (6): 1380-1386.
- [17] 朱子家, 王文斌, 沈志博, 等. 基于代谢组学研究雷公藤红素对非酒精性脂肪性肝炎小鼠的治疗作用及其机制[J]. 中国医药, 2020, 15 (9): 1410-1414.
- [18] Zhu BQ, Wei YW. Antitumor activity of celastrol by inhibition of proliferation, invasion, and migration in cholangiocarcinoma via PTEN/PI3K/Akt pathway [J]. Cancer Med, 2020, 9 (2): 783-796.
- [19] Waang ZY, Zhai ZY, Du XL. Celastrol inhibits migration and invasion through blocking the NF- κ B pathway in ovarian cancer cells [J]. Exp Ther Med, 2017, 14 (1): 819-824.
- [20] Huang LL, Zhang ZF, Zhhang S, et al. Inhibitory action of celastrol on hypoxia-mediated angiogenesis and metastasis via the HIF-1 α pathway [J]. Int J Mol Med, 2011, 27 (3): 407-415.
- [21] 杨艳, 周禹, 隗雅姿, 等. PPAR γ 在自身免疫性疾病中的研究进展[J]. 药科学报, 2022, 57 (10): 3124-3132.
- [22] 冯帅霞, 徐莹, 韩涵. 过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR) 在肝脏疾病中的作用及潜在意义[J]. 临床肝胆病杂志, 2023, 39 (7): 1747-1753.
- [23] 赵晓璐, 高晓阳, 张春艳, 等. PPAR γ 在肝纤维化进程中的影响及其配体药物研发进展[J]. 中国药物警戒, 2024, 21 (6): 716-720.
- [24] Wu LW, Guo CY, Wu JY. Therapeutic potential of PPAR γ natural agonists in liver diseases [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24 (5): 2736-2748.
- [25] Li WY, Xie JS, Yang L, et al. 15-deoxy- Δ (12, 14)-prostaglandin J (2) relieved acute liver injury by inhibiting macrophage migration inhibitory factor expression via PPAR γ in hepatocyte [J]. Int Immunopharmacol, 2023, 121: 110491.
- [26] Wang CY, Liu Q, Huang QX, et al. Activation of PPAR γ is required for hydroxysafflor yellow A of Carthamus tinctorius to attenuate hepatic fibrosis induced by oxidative stress [J]. Phytomedicine, 2013, 20 (7): 592-599.
- [27] Wang WX, Liu M, Fu XL, et al. Hydroxysafflor yellow A ameliorates alcohol-induced liver injury through PI3K/Akt and STAT3/NF- κ B signaling pathways [J]. Phytomedicine, 2024, 132: 155814.
- [28] Yu HC, Bai QR, Guo JJ, et al. Elucidating hydroxysafflor yellow A's multi-target mechanisms against alcoholic liver disease through integrative pharmacology [J]. Phytomedicine, 2024, 134: 155956.
- [29] Ahmed AMA, Rahman MA, Hossen MA, et al. Epiphytic Acampe ochracea orchid relieves paracetamol-induced hepatotoxicity by inhibiting oxidative stress and upregulating antioxidant genes in in vivo and virtual screening [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 143: 112215.
- [30] Luo MY, Wang YT, Ma YY, et al. Celastrol stabilizes glycolipid metabolism in hepatic steatosis by binding and regulating the peroxisome proliferator-activated receptor γ signaling pathway [J]. Metabolites, 2024, 14 (1): 64.
- [31] Kotelevets L, Trifault B, Chastre E, et al. Posttranslational regulation and conformational plasticity of PTEN [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2020, 10 (7): a036095.
- [32] Jafari M, Ghadami E, Dadkhah T, et al. Astaxanthin targets PI3K/Akt signaling pathway toward potential therapeutic applications [J]. J Cell Physiol, 2019, 234 (3): 2373-2385.
- [33] 韩婷婷, 史家欣, 李小民. Akt 下游蛋白调控炎症介质表达机制的研究进展[J]. 南京医科大学学报 (自然科学版), 2018, 38 (6): 853-857.
- [34] Zhang LL, Chen L, Tao DY, et al. Tannin alleviates glyphosate exposure-induced apoptosis, necrosis and immune dysfunction in hepatic L8824 cell line by inhibiting ROS/PTEN/PI3K/Akt pathway [J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2023, 266: 109551.
- [35] Feng YQ, Hao FJ. Hansenia weberbaueriana (Fedde ex H. Wolff) pimenov & kljuykov extract suppresses proliferation of HepG2 cells via the PTEN-PI3K-Akt pathway uncovered by integrating network pharmacology and in vitro experiments [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 620897.
- [36] Zhu LL, Mou QJ, Wang YH, et al. Resveratrol contributes to the inhibition of liver fibrosis by inducing autophagy via the microRNA-20a-mediated activation of the PTEN/PI3K/Akt signaling pathway [J]. Int J Mol Med, 2020, 46 (6): 2035-2046.
- [37] Wang JM, Lu YF, Zhang CY, et al. Qinggan Huoxue recipe attenuates alcoholic liver disease by suppressing PI3K/Akt signaling pathway based on network pharmacology [J]. Int J Med Sci, 2023, 20 (3): 346-358.
- [38] Kong FY, Han BX, Chen JM, et al. Role of PPARG in chemosensitivity-regulating network for hypopharyngeal squamous cell carcinoma [J]. PPAR Res, 2023, 2023: 6019318.
- [39] Nguyen HT, Park J, Zhang Y, et al. The role of oxidative inactivation of phosphatase PTEN and TCPTP in fatty liver disease [J]. Antioxidants (Basel), 2023, 12 (1): 120.
- [40] 张晓岚, 郝礼森. PTEN 与肝脏疾病研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16 (17): 1904-1911.

(收稿日期: 2024-12-19; 修回日期: 2025-01-22)

新型 FGF21 类似物 DC2303 对代谢相关脂肪性肝病的初步药效学评价

沈蕾^{1, 2, 3}, 邱云良^{2, 4, 5*}, 赵飞², 李淋雨² (1.安徽中医药大学药学院, 合肥 230013; 2.益诺思生物技术南通有限公司, 江苏 南通 226133; 3.长三角药物高等研究院, 江苏 南通 226133; 4.上海益诺思生物技术股份有限公司, 上海 201203; 5.中国医药工业研究总院, 上海 201203)

摘要: **目的** 探究 DC2303 对代谢相关脂肪性肝病 (MAFLD) 的治疗作用。**方法** ① 采用 $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 棕榈酸 (PA) 诱导 HepG2 细胞构建 MAFLD 模型对 DC2303 药效进行初步考察, Cell Titer-Glo 发光法检测细胞活力; 油红 O 染色分析细胞内脂滴蓄积程度; GPO-PAP 酶法检测细胞内三酰甘油 (TG) 水平。② 采用 60% 高脂饲料 (HFD) 诱导 8 周龄雄性 db/db 小鼠构建 MAFLD 模型对 DC2303 进行药效学评价, 依据空腹血糖和体重, 随机将动物分为 Model 组 (PBS, $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)、阳性对照组 (Fc-FGF21, $5, 20 \text{ nmol} \cdot \text{kg}^{-1}$)、DC2303 组 (DC2303, $5, 20 \text{ nmol} \cdot \text{kg}^{-1}$), 定期监测小鼠体重、血糖和摄食量; GPO-PAP 酶法检测小鼠血清 TG、谷丙转氨酶 (ALT) 和谷草转氨酶 (AST) 水平; ELISA 法检测小鼠血清胰岛素水平并计算胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR); HE 染色和油红 O 染色对小鼠肝脏进行组织病理学分析。**结果**

① 体外药效评价: 与 Model 组相比, DC2303 显著降低细胞内 TG 水平, 并且减少细胞内脂滴蓄积。② 体内药效评价: 与 Model 组相比, DC2303 显著降低 MAFLD 小鼠的体重、摄食量、附睾脂肪重量、血糖和 HOMA-IR; 同时, 显著降低肝重、肝体比、NAS 评分、血清 TG 和 ALT/AST 水平, 减少肝脏脂滴面积, 并对 MAFLD 小鼠肝脏具有保护作用。此外, DC2303 $20 \text{ nmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 Fc-FGF21 $20 \text{ nmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 相比, DC2303 在附睾脂肪重量、肝重、肝体比、NAS 评分和逆转肝脂肪变性方面呈现优异的治疗作用。**结论** 新型 FGF21 类似物 DC2303 可通过改善胰岛素抵抗、减轻肝脏损伤和逆转肝脂肪变性等多方面显著改善 MAFLD 模型。

关键词: 代谢相关脂肪性肝病; 成纤维细胞生长因子 21; 胰岛素抵抗; 脂质蓄积

中图分类号: R575.5, R96 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)04-0922-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.008

Preliminary pharmacological effect of novel FGF21 analogue DC2303 on metabolic dysfunction-associated fatty liver disease

SHEN Lei^{1, 2, 3}, QIU Yun-liang^{2, 4, 5*}, ZHAO Fei², LI Lin-yu² (1. School of Pharmacy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230013; 2. InnoStar Biotechnology Nantong Co., Ltd., Nantong Jiangsu 226133; 3. Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute, Nantong Jiangsu 226133; 4. Shanghai Innostar Bio-tech Co., Ltd., Shanghai 201203; 5. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203)

Abstract: Objective To determine the therapeutic effect of DC2303 on metabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD). **Methods** ① HepG2 cells were treated with $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ palmitic acid (PA) to induce a MAFLD model, and the efficacy of DC2303 was preliminarily determine. Cell Titer-Glo luminescence assay was used to measure the cell viability, oil red O staining was performed to analyze lipid droplet accumulation in the cells, and GPO-PAP enzyme method to detect triglyceride (TG) levels in the cells. ② A MAFLD model was established with 8-week-old male db/db mice fed with a 60% high-fat diet (HFD) for pharmacological evaluation of DC2303. Based on fasting blood glucose and body weight, the mice were randomly assigned to a model group (PBS, $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), a positive control

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

作者简介: 沈蕾, 女, 硕士, 主要从事药理学研究, email: lldsl75@163.com **通信作者:** 邱云良, 男, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事药物毒理学与药物临床前安全性评价研究, email: ylqiu@innostar.cn

group (Fc-FGF21, 5 and 20 nmol · kg⁻¹), and a DC2303 group (DC2303, 5 and 20 nmol · kg⁻¹). The body weight, blood glucose, and food intake were regularly monitored, while the serum TG, alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels were detected by GPO-PAP enzyme method. The serum insulin levels were measured with ELISA and homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) conducted. HE staining and oil red O staining were performed for the histopathological analysis of mouse livers. **Results** ① In the in vitro efficacy evaluation, DC2303 obviously reduced the intracellular TG levels and decreased the area of intracellular lipid droplet accumulation compared with those of the model group. ② In the in vivo efficacy evaluation, DC2303 greatly reduced the body weight, food intake, epididymal fat weight, blood glucose, and HOMA-IR in the MAFLD mice compared with those of the model group. It also reduced the liver weight, liver-to-body ratio, NAS score, serum TG levels, serum ALT/AST levels, and liver lipid droplet area, and exhibited a protective effect on the liver of MAFLD mice. Additionally, DC2303 at 20 nmol · kg⁻¹ demonstrated impressive therapeutic effects compared with Fc-FGF21 at 20 nmol · kg⁻¹ in terms of epididymal fat weight, liver weight, liver-to-body ratio, NAS score, and reversal of hepatic steatosis. **Conclusion** The novel fibroblast growth factor 21 (FGF21) analogue DC2303 greatly improves the MAFLD model by enhancing the insulin resistance, reducing the liver injury, and reversing the hepatic steatosis.

Key words: metabolic dysfunction-associated fatty liver disease; fibroblast growth factor 21 (FGF21); insulin resistance; lipid accumulation

代谢相关脂肪性肝病 (MAFLD) 是指不存在酗酒、药物滥用或病毒感染人群肝细胞内脂肪过度蓄积所导致的一系列肝脏疾病^[1]。代谢功能障碍相关脂肪性肝炎 (MASH) 是 MAFLD 中最严重的类别, 具有进展为肝硬化和肝癌的高风险因素, 20% ~ 25% 的 MAFLD 患者患有 MASH^[2]。尽管全球首个治疗 MASH 药物 Resmetirom 获美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准上市, 但沉重的医疗负担势头未减^[3]。MAFLD 的病理生理学是复杂的, 其主要病理特征在于肝细胞中的脂肪过度沉积、脂肪因子的异常分泌、炎症细胞因子的产生和氧化应激^[4-5], 脂毒性和氧化应激被认为是疾病进展的驱动因素或疾病的根本原因。因此, 迫切需要研发能够靶向上述多种病理因素的 MAFLD 治疗药物。

成纤维细胞生长因子 21 (FGF21) 是一种调节能量稳态和糖脂代谢的内源性激素^[6]。研究发现, FGF21 具有多效性药理学作用, 例如逆转肝

脂肪变性、改善胰岛素抵抗、降低炎症细胞因子浸润、增强脂肪组织中产热因子的表达和诱导脂联素产生^[7-9]。基于这些研究发现, FGF21 被认为是 MAFLD 的重要潜在治疗靶点, 有望全面改善与 MAFLD 相关的整体病理生理学。然而, 天然 FGF21 蛋白在体内易被蛋白酶降解, 导致其血浆半衰期较短。在应用长效化及结构修饰技术如 PASylation、聚乙二醇化 (PEGylation)、白蛋白融合和类弹性蛋白样多肽融合 (ELP) 修饰天然 FGF21 蛋白时, 仍显示出低稳定性^[8, 10]。基于其较差的药代动力学特性以及在临床应用上的限制, 本课题组通过 PASylation 技术将 FGF21 与脂肪酸修饰的多个功能侧链共轭而二聚化, 合成出长效 FGF21 类似物 DC2303 (结构见图 1)。目前, DC2303 对 MAFLD 治疗作用仍然未知, 本研究拟通过细胞水平和动物水平实验初步揭示 DC2303 对 MAFLD 的治疗作用, 为临床治疗奠定基础。

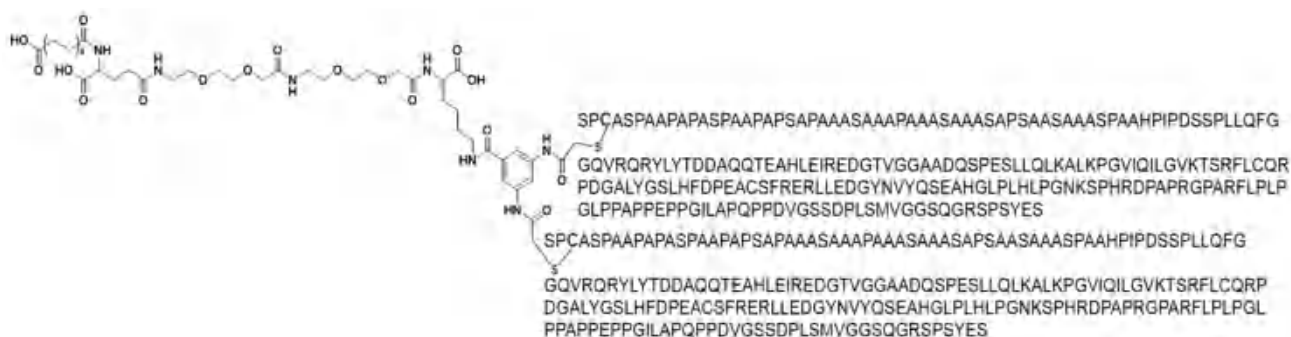


图 1 DC2303 结构式

Fig 1 Structure of DC2303

1 材料

1.1 细胞株

人肝癌细胞株 HepG2 (南京科佰生物科技有限公司)。

1.2 实验动物

本实验所有涉及动物管理和使用申请均获得益诺思生物技术南通有限公司动物管理和使用委员会批准(批件号: IACUC-2023-m-438)。雄性 8 周龄 db/db 小鼠 20 只和 db/m 小鼠 4 只(体重 40 ~ 50 g), 均符合 SPF 级标准(常州卡文斯实验动物有限公司), 实验动物使用许可证: SYXK (苏) 2023-0053。所有动物均在光暗循环的 SPF 级动物房中分笼饲养, 自由摄食饮水, 环境温度: 20 ~ 25 °C, 相对湿度: 40% ~ 70%。

1.3 试剂

Fc-FGF21 (纯度 > 90%)、DC2303 (纯度 > 80%)(上海多米瑞生物科技有限公司); 棕榈酸高脂细胞添加剂 (PA, 批号: PWL221-2, 大连美仑生物技术有限公司); 胎牛血清 (批号: 2059458CP)、DMEM 高糖培养基 (批号: 20230928)(美国 Gibco 公司); 三酰甘油 (TG) 试剂盒 (批号: A110-1-1)、BCA 蛋白定量试剂盒 (批号: W041-1-1)、小鼠胰岛素 (INS) 酶联免疫检测试剂盒 (批号: H203-1-1)(南京建成生物工程研究所); 胰酶细胞消化液 (批号: C0203)、改良油红 O 染色试剂盒 (批号: C0158S)、Triton X-100 溶液 (批号: ST797)(上海碧云天生物技术有限公司); Cell Titer-Glo (CTG) 发光法试剂盒 (批号: G7572, 普洛麦格生物技术有限公司)。

1.4 仪器

371 型二氧化碳培养箱、Multifuge X1R Pro 型离心机 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 细胞计数仪 (上海睿钰生物科技有限公司); HH-6 型数显恒温水浴锅 (常州国华仪器制造有限公司); CKX53 型生物倒置显微镜 (日本奥林巴斯公司); Spectra Max Plus 型酶标仪 (英国 Molecular Devices 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

HepG2 细胞培养于 DMEM 高糖培养基中 (含 10% 胎牛血清, 1% 双抗), 并置于 37 °C、5%CO₂ 培养箱。待培养皿中细胞融合率达到 80% ~ 90% 时, 进行传代。

2.2 MAFLD 细胞模型条件的筛选及分组

取对数生长期 HepG2 细胞, 以 4×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞密度接种至 12 孔板, 待细胞贴壁后分别加入不同浓度的 PA (0、0.1、0.2、0.4、0.8

和 $1.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 诱导 HepG2 细胞, 每组 4 个复孔, 37 °C、5%CO₂ 培养箱中孵育 24 h。通过细胞存活率及细胞内 TG 水平确定合适的建模浓度。

MAFLD 细胞模型构建成功后, 将 HepG2 细胞分成三组给予不同处理, Normal 组: HepG2 细胞; Model 组: HepG2 细胞 + $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PA; DC2303 组: HepG2 细胞 + $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PA + DC2303 (0.5、1、2 和 $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。各组干预 24 h 后, 收集细胞, 用于后续实验。

2.3 MAFLD 模型的构建及给药方案

8 周龄雄性 db/m 小鼠 (作为 Normal 组) 通过检疫期并采用标准饮食适应性喂养, 实验第 4 周开始, 每周 3 次皮下注射磷酸盐缓冲液 (PBS) ($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), 持续 6 周。8 周龄雄性 db/db 小鼠, 标准饮食适应性喂养 2 ~ 3 d 后, 将 db/db 小鼠饲料全部换成 60% 高脂饲料 (HFD), 饲喂 3 周, 根据空腹血糖及体重, 随机将动物分为 Model 组 (PBS, $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)、阳性对照组 (Fc-FGF21, 5、20 $\text{nmol} \cdot \text{kg}^{-1}$)、DC2303 组 (DC2303, 5、20 $\text{nmol} \cdot \text{kg}^{-1}$)、Model 组及药物干预组每周 3 次皮下给药 (DC2303 皮下注射剂量参考阳性对照药 Fc-FGF21^[11]), 持续 6 周。每 48 h 监测摄食量, 每周监测体重及空腹血糖, 药物干预结束后收集生物样本。

2.4 生物样本取材和储存

给药结束后, 小鼠眼眶采集血液样本 (禁食 12 h), 二氧化碳麻醉法实施安乐死。解剖小鼠, 灌注, 取肝。观察肝脏形态, 称量肝脏湿重, 计算肝体比 (肝脏重量占体重的百分比)。将肝组织浸泡在二甲基亚砜 (DMSO) 中于 -80 °C 保存, 部分肝组织用于油红 O 染色的冷冻切片, 用 10% 甲醛固定, 制备用于 HE 染色的石蜡切片。

2.5 CTG 法检测细胞活力

取对数生长期 HepG2 细胞, 以 4×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞密度接种至 96 孔板, 每孔加入 100 μL 细胞悬液。待细胞贴壁后分别加入不同浓度的 PA (0、0.1、0.2、0.4、0.8 和 $1.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 同时设置空白组, 每组 4 个复孔, 37 °C、5%CO₂ 培养箱中孵育 24 h。孵育结束后, 室温平衡 96 孔板 30 min 并加入 100 μL CTG 试剂, 室温孵育 10 min。酶标仪检测各孔光密度值 (OD) 值, 计算细胞存活率。

2.6 GPO-PAP 酶法检测 TG 水平

收集处理好的细胞悬液和血清, 离心弃上清液; PBS 清洗 1 ~ 2 次, 离心弃上清液, 并加入 1% Triton X-100 对样本进行裂解, 裂解完成的样本按照 TG 试剂盒说明书步骤操作, 酶标仪 (500 nm) 测定各组 OD 值并计算 TG 水平。

2.7 ELISA 法检测胰岛素水平

取末次给药后采血分离的血清样本,按 ELISA 说明书检测胰岛素水平,并使用空腹血糖和血清胰岛素浓度计算胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR)。

2.8 油红 O 染色

按“2.2”项下方法对 HepG2 细胞给予不同的处理,弃去细胞培养液, PBS 清洗 1~2 次,加入 4% 多聚甲醛固定 15 min,进行油红 O 染色,镜检观察并随机选取 5 个视野进行拍照。肝脏组织经 30% 蔗糖溶液脱水后用 OCT 包埋,液氮速冻,使用旋转式切片机将其切成 8 μm 厚的切片,进行油红 O 染色,镜检观察切片染色情况并使用 Image J 软件进行图像采集分析。

2.9 苏木精-伊红 (HE) 染色

肝脏组织经 4% 多聚甲醛充分固定后,使用梯度乙醇脱水、石蜡包埋,旋转式切片机将石蜡固定的肝脏组织切成 4 μm 厚的切片,进行 HE 染色,镜检观察切片染色情况,进行图像采集分析,并依据 2010 年《非酒精性脂肪性肝病诊疗指南》^[12] 对肝组织进行 MAFLD 活动度评分 (NAS 评分)。

2.10 统计学分析

数据以均值 $\pm$ 标准差表示,所有统计分析均采用 GraphPad Prism 9.0 进行。数据比较采用单因素方差分析 (ANOVA),多重比较检验采用邓尼特法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 DC2303 对 MAFLD 的体外药效学评价

3.1.1 PA 诱导 HepG2 细胞 MAFLD 模型的建立

如图 2A 所示,PA 在 0~0.8 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 均对细胞存活率无显著影响;PA 浓度为 1.6 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细胞存活率显著降低 ($P < 0.001$)。此外,PA 作为机体内源性脂肪酸,能够诱导脂质产生从而造成脂代谢紊乱。如图 2B 结果所示,与 0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组相比, HepG2 细胞经 0.1~0.8 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PA 诱导后细胞内 TG 水平呈剂量依赖性升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。因此,选用 0.8 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PA 作为造模浓度构建 MAFLD 细胞模型。

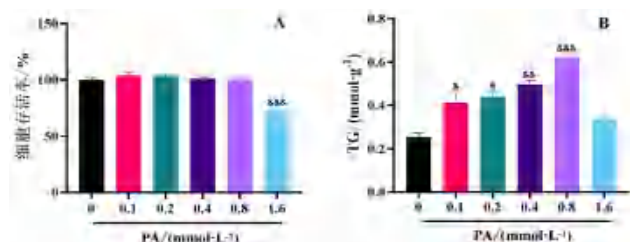


图 2 MAFLD 细胞模型条件的筛选 ($n = 4$, $\bar{x} \pm s$)

Fig 2 Screening of MAFLD cell model conditions ($n = 4$, $\bar{x} \pm s$)

注 (Note): 与 0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PA 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (Compared with the 0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PA group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)。

3.1.2 DC2303 对 PA 诱导 HepG2 细胞脂质积聚的影响 如图 3A 结果所示,与 Model 组相比, DC2303 在 2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下, HepG2 细胞内 TG 水平显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。同时,油红 O 染色结果显示 (见图 3B), Normal 组细胞内呈现少量红色脂滴蓄积, Model 组细胞内呈现大量红色脂滴面积;与 Model 组相比, DC2303 减少了细胞内红色脂滴蓄积程度。上述结果表明, DC2303 可以改善由 PA 诱导 HepG2 细胞内的脂质积聚。

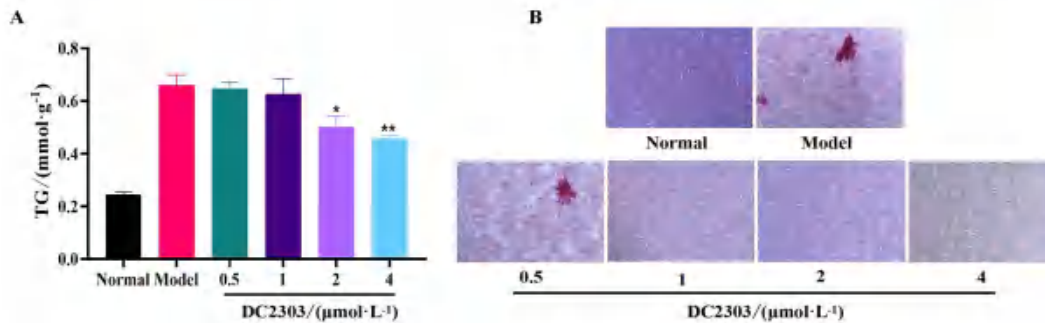
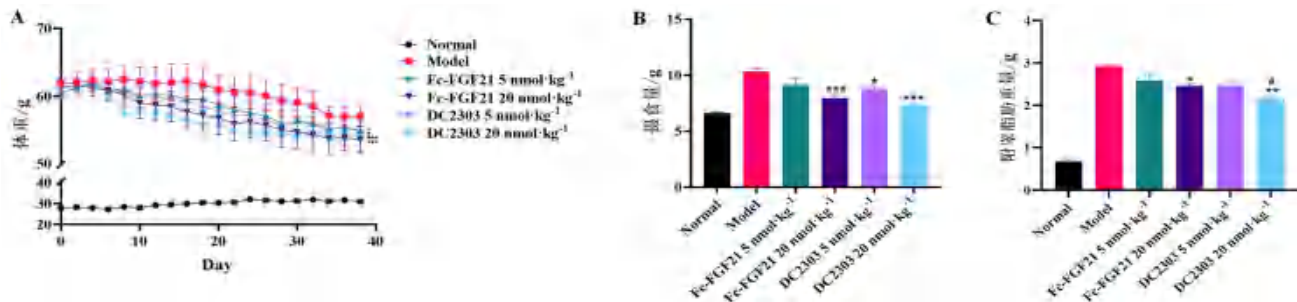
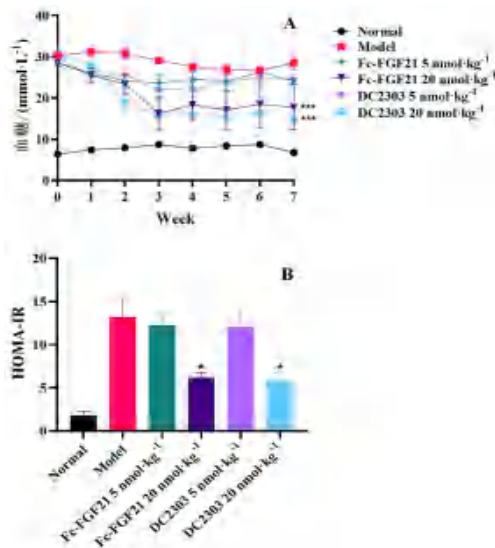
3.2 DC2303 对 MAFLD 的体内药效学评价

3.2.1 对 MAFLD 小鼠的体重、摄食量和附睾脂肪重量的影响 如图 4A 所示,与 Model 组相比, DC2303 组和 Fc-FGF21 组在 Day38 时均显著降低 MAFLD 小鼠的体重 ($P < 0.05$, $P < 0.001$)。如图 4B 所示,与 Model 组相比, DC2303 组和 Fc-FGF21 (20 $\text{nmol} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组均显著降低 MAFLD 小鼠的摄食量 ($P < 0.05$, $P < 0.001$)。如图 4C 结果所示,饲喂 60% HFD 能够显著增加附睾脂肪重量。同时,与 Model 组相比, DC2303 (20 $\text{nmol} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组显著降低 MAFLD 小鼠的附睾脂肪重量 ($P < 0.01$),且效果优于同浓度 Fc-FGF21 组 ($P < 0.05$)。

3.2.2 对 MAFLD 小鼠的血糖和 HOMA-IR 的影响 给药期间定期监测 MAFLD 小鼠空腹血糖水平。如图 5A 所示,与 Model 组相比, DC2303 (20 $\text{nmol} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组和 Fc-FGF21 (20 $\text{nmol} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组在第 7 周均显著降低血糖水平 ($P < 0.001$)。如图 5B 所示,通过评估 MAFLD 小鼠的发现,与 Model 组相比, DC2303 (20 $\text{nmol} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组与 Fc-FGF21 (20 $\text{nmol} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组均显著改善 MAFLD 小鼠胰岛素抵抗 ($P < 0.05$)。

3.2.3 对 MAFLD 小鼠肝脏形态的影响 如图 6A 结果所示, Normal 组肝脏质地柔软、叶边光滑平整,呈红褐色; Model 组肝脏表面呈现乳白色颗粒,色泽暗黄出现白化且外观粗糙; Fc-FGF21 组和 DC2303 组肝脏外观、颜色均得到不同程度的改善。与 Model 组相比, DC2303 (20 $\text{nmol} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组和 Fc-FGF21 (20 $\text{nmol} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组均可显著降低肝重和肝体比 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),且同浓度下, DC2303 组在降低肝重方面疗效优于 Fc-FGF21 组 ($P < 0.05$),见图 6B~6C。

3.2.4 DC2303 对 MAFLD 小鼠肝损伤及肝脂肪变性的影响 如图 7A 肝组织 HE 染色结果所示, Normal 组肝细胞形态结构完整,以中央静脉为中心呈放射状向周围排列; Model 组可见肝细胞核固缩,胞质与胞核之间空隙增大,炎症细胞浸润肝小叶,肝细胞出现脂肪变性及气球样变。肝组织油红 O 染色结果所示 (见图 7A), Normal 组肝脏组织中未见脂肪

图3 DC2303对MAFLD细胞模型脂质积聚的影响($n=4$, $\bar{x}\pm s$)Fig 3 Effect of DC2303 on the lipid accumulation in MAFLD cell model ($n=4$, $\bar{x}\pm s$)A. 细胞内TG水平 (intracellular TG levels); B. 细胞油红O染色 ($\times 100$) (cell oil red O staining, $\times 100$)注 (Note): 与 Model 组相比, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ (Compared with the Model group, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$).图4 DC2303对MAFLD小鼠6周治疗期间体重(A)、摄食量(B)和附睾脂肪重量(C)的影响($n=4$, $\bar{x}\pm s$)Fig 4 Effect of DC2303 on body weight (A), food intake (B), and epididymal fat weight (C) during 6-week treatment in MAFLD mice ($n=4$, $\bar{x}\pm s$)注 (Note): 与 Model 组相比, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$; 与同浓度 Fc-FGF21 组相比, $^{\#}P < 0.05$ (Compared with the Model group, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$; compared with the Fc-FGF21 group at the same concentration, $^{\#}P < 0.05$).图5 DC2303对MAFLD小鼠6周治疗期间血糖(A)和HOMA-IR(B)的影响($n=4$, $\bar{x}\pm s$)Fig 5 Effect of DC2303 on blood glucose (A) and HOMA-IR (B) during 6-week treatment in MAFLD mice ($n=4$, $\bar{x}\pm s$)注 (Note): 与 Model 组相比, $^*P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$ (Compared with the Model group, $^*P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$).

沉积; Model 组肝细胞内有大量脂肪和脂滴渗入, 胞质间存在大小不一的脂肪空泡。如图 7B 结果所示, 与 Model 组相比, DC2303 ($20 \text{ nmol} \cdot \text{kg}^{-1}$)

组和 Fc-FGF21 ($20 \text{ nmol} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组均能够显著降低 NAS 评分 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且同浓度下, DC2303 组疗效优于 Fc-FGF21 组 ($P < 0.05$)。如图 7C 结果所示, 与 Model 组相比, DC2303 组和 Fc-FGF21 组均显著降低脂滴面积 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$); 且同浓度下, DC2303 组疗效优于 Fc-FGF21 组 ($P < 0.01$)。如图 7D ~ E 结果所示, Model 组血清中 TG 和 ALT/AST 水平显著增加; 与 Model 组相比, DC2303 组和 Fc-FGF21 组均能够显著降低血清 TG 水平 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$); 各组血清 ALT/AST 水平呈下降趋势。

4 讨论

随着 MAFLD 合并肥胖和胰岛素抵抗患者人数的不断增加^[13], FGF21 已被认为是治疗 MAFLD 的一个有吸引力的靶点。大量研究表明, FGF21 具有降低血糖^[14]、改善胰岛素抵抗^[15]、减轻肝脏炎症及脂肪变性^[9]等多效性药理作用。天然 FGF21 蛋白半衰期短, 稳定性差, 在体内容易被蛋白酶降解。因此, 为了克服这些局限性并优化 FGF21 药效, 课题组前期通过 PASylation 技术将 FGF21 与脂肪酸修饰的多个功能侧链共轭而二聚化, 合成出新型长效 FGF21 类似物 DC2303, 并评估了 DC2303 对 MAFLD 的治疗作用。

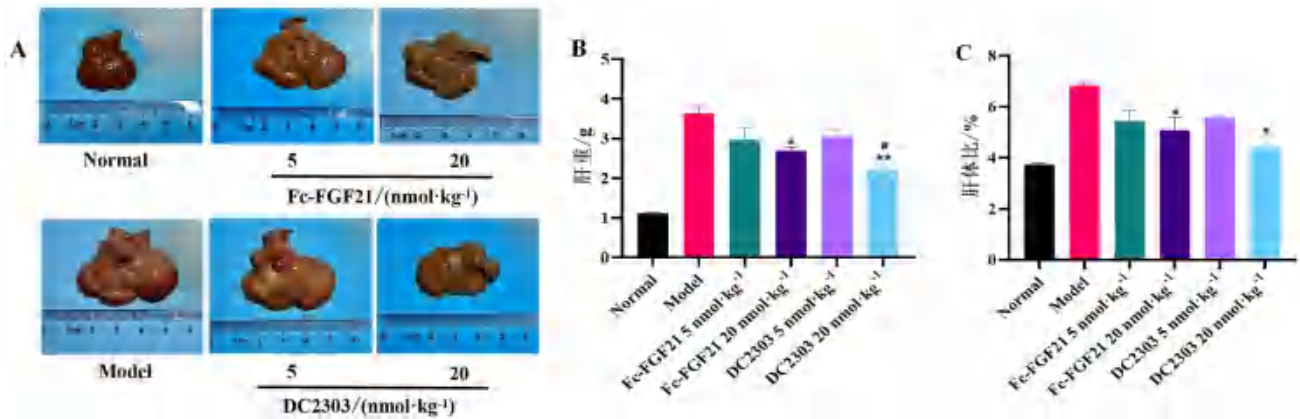


图 6 DC2303 对 MAFLD 小鼠肝脏形态的影响 ($n = 4$, $\bar{x} \pm s$)

Fig 6 Effect of DC2303 on liver morphology in MAFLD mice ($n = 4$, $\bar{x} \pm s$)

注 (Note): 与 Model 组相比, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; 与同浓度 Fc-FGF21 组相比, $^{\#}P < 0.05$ (Compared with the Model group, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; compared with the Fc-FGF21 group at the same concentration, $^{\#}P < 0.05$).

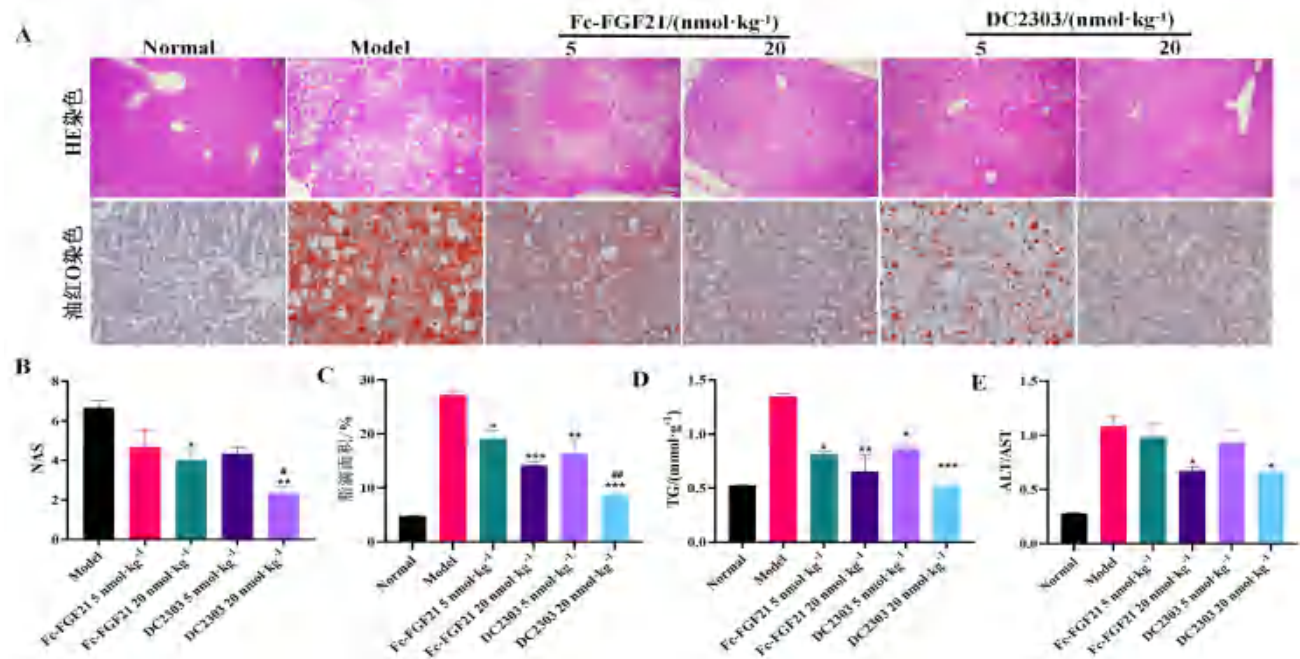


图 7 DC2303 对 MAFLD 小鼠肝损伤及肝脂肪变性的影响 ($n = 4$, $\bar{x} \pm s$)

Fig 7 Effect of DC2303 on liver injury and hepatic steatosis in MAFLD mice ($n = 4$, $\bar{x} \pm s$)

注 (Note): 与 Model 组相比, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$; 与同浓度 Fc-FGF21 组相比, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$ (Compared with the Model group, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$; compared with the Fc-FGF21 group at the same concentration, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$).

研究表明,理想的 MAFLD 治疗药物应该靶向脂质沉积,通过增加脂肪酸氧化、减少肝脏中新脂肪的形成和降低全身 TG 水平来减少肝脏内脂肪^[16-17]。因此,考察药物对于游离脂肪酸诱导的肝脂肪变性的影响,是评价药物是否具有潜在药理活性的首要指标。本研究利用 PA 诱导 HepG2 细胞构建 MAFLD 模型,评价 DC2303 对 MAFLD 的潜在药理活性。研究发现,PA 作为游离脂肪酸中含量最高的饱和脂肪酸,低剂量可促进 HepG2、HuH7 和 WRL68 细胞内 TG 合成,诱导脂肪变性,而高剂量则会产生细胞脂毒性并诱导细胞凋亡^[18]。本研究结果表明,利用 $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PA 刺激 HepG2 细胞

后,细胞内出现大量脂滴, TG 水平显著升高。给予 $0.5 \sim 4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DC2303 干预处理后,与 Model 组相比,DC2303 ($2, 4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 显著降低 TG 水平并减少细胞内脂滴蓄积程度,表明 DC2303 可以改善由 PA 诱导 HepG2 细胞内的脂质积聚。

MAFLD 的致病机制复杂,体外细胞水平实验对药物的药理活性评价往往过于单一,因此还需在体内动物模型中进一步考察 DC2303 的药理活性。研究表明,肥胖和胰岛素抵抗之间错综复杂的关系,能够加速 MAFLD 的病理进展^[2, 19], MAFLD 模型小鼠对肥胖和胰岛素抵抗的改善是决定治疗候选药物疗效的关键因素^[20-21]。本研究采

用 60% HFD 诱导 db/db 小鼠, 构建肥胖且糖脂代谢异常的 MAFLD 模型, 给予 MAFLD 小鼠皮下注射 DC2303 能够显著降低小鼠摄食量、体重和附睾脂肪重量, 这种体重和附睾脂肪重量的降低可能是通过抑制摄食量实现的, 具体的作用机制有待进一步深入研究。胰岛素抵抗是胰岛素信号通路传导缺陷的主要表现, 是 MAFLD 发生的重要机制之一, 既可以导致肝脏从头脂肪生成, 也可以间接增加游离脂肪酸进入肝脏^[15]。研究发现, DC2303 能够显著降低 MAFLD 小鼠的空腹血糖, 改善胰岛素抵抗。肝损伤和肝脂肪变性被认为是 MAFLD 疾病进展过程中的驱动因素, 随着脂质代谢功能的紊乱, 肝脏内游离脂肪酸摄取增多, 进而导致肝脏 TG 合成增加, 血清中 AST、ALT 水平升高^[22]。DC2303 能够显著降低 MAFLD 小鼠的肝重、肝体比、NAS 评分和血清中 ALT/AST 水平, 缓解高脂饮食对肝脏造成的损伤。同时, 能够减少肝细胞内大量脂肪和脂滴的渗入, 显著降低脂滴面积和血清中 TG 水平, 逆转肝脏脂肪变性。此外, 在附睾脂肪重量、肝重、肝体比、NAS 评分和逆转肝脂肪变性方面, DC2303 的疗效优于同等剂量下对照药物 Fc-FGF21。

综上所述, 本研究初步揭示了新型 FGF21 类似物 DC2303 对 MAFLD 的治疗作用, 基于 MAFLD 复杂的致病机制, 构建 PA 诱导 HepG2 细胞 MAFLD 模型, 证实 DC2303 可以改善由 PA 诱导 HepG2 细胞内的脂质积聚。通过构建 60% HFD 诱导 db/db 小鼠的 MAFLD 模型进一步研究发现, 皮下注射 DC2303 能够改善胰岛素抵抗、减轻肝脏损伤和逆转肝脂肪变性。由于本研究中所构建的 MAFLD 小鼠并未发生纤维化, 无法评估 DC2303 对 MAFLD 的抗纤维化作用。未来, 还须构建多种动物模型, 进一步深入探究 DC2303 对 MAFLD 的安全性和作用机制, 为其临床合理应用提供强有力的支持。

参考文献

- [1] Brunt EM, Wong VW, Nobili V, et al. Nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2015, 1: 15080.
- [2] Younossi Z, Tacke F, Arrese M, et al. Global perspectives on nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Hepatology*, 2019, 69 (6): 2672-2682.
- [3] Petta S, Targher G, Romeo S, et al. The first MASH drug therapy on the horizon: current perspectives of resmetirom [J]. *Liver Int*, 2024, 44 (7): 1526-1536.
- [4] Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis [J]. *Hepatology*, 2010, 52 (5): 1836-1846.
- [5] Michelotti GA, Machado MV, Diehl AM. NAFLD, NASH and liver cancer [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013, 10 (11): 656-665.
- [6] Watanabe H, Miyahisa M, Chikamatsu M, et al. Development of a long acting FGF21 analogue-albumin fusion protein and its anti-diabetic effects [J]. *J Control Release*, 2020, 324: 522-531.
- [7] Chikamatsu M, Watanabe H, Shintani Y, et al. Albumin-fused long-acting FGF21 analogue for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease [J]. *J Control Release*, 2023, 355: 42-53.
- [8] 邵美, 尹骏, 高文, 等. 长效化纤维细胞生长因子 21 及其类似物研究进展 [J]. *药学进展*, 2017, 41 (12): 919-925.
- [9] Tucker B, Li H, Long X, et al. Fibroblast growth factor 21 in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Metabolism*, 2019, 101: 153994.
- [10] Schilz J, Clement C, Greiner F, et al. Direct affinity purification of long-acting PASylated proteins with therapeutic potential using L-prolinamide for mild elution [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2022, 61 (25): e202200079.
- [11] Stanislaus S, Hecht R, Yie J, et al. A novel Fc-FGF21 with improved resistance to proteolysis, increased affinity toward β -klotho, and enhanced efficacy in mice and cynomolgus monkeys [J]. *Endocrinology*, 2017, 158 (5): 1314-1327.
- [12] 范建高. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南 (2010 年修订版) [J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2010, 19 (6): 483-487.
- [13] 李海洋, 熊媛琴, 王景淑, 等. 降糖西药治疗非酒精性脂肪性肝病并发 2 型糖尿病的研究进展 [J]. *中南药学*, 2024, 22 (6): 1609-1614.
- [14] Bao LC, Yin J, Gao W, et al. A long-acting FGF21 alleviates hepatic steatosis and inflammation in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis partly through an FGF21-adiponectin-IL17A pathway [J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175 (16): 3379-3393.
- [15] Pan Q, Lin SS, Li Y, et al. A novel GLP-1 and FGF21 dual agonist has therapeutic potential for diabetes and non-alcoholic steatohepatitis [J]. *EBioMedicine*, 2021, 63: 103202.
- [16] 范建高, 徐小元, 南月敏, 等. 代谢相关 (非酒精性) 脂肪性肝病防治指南 (2024 年版) [J]. *实用肝脏病杂志*, 2024, 27 (4): 494-510.
- [17] 何红, 龙荣. 秦皮甲素对高脂饮食诱导非酒精性脂肪肝的保护作用研究 [J]. *中南药学*, 2019, 17 (10): 1651-1654.
- [18] Ricchi M, Odoardi MR, Carulli L, et al. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 24 (5): 830-840.
- [19] Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes [J]. *Hepatology*, 2016, 64 (1): 73-84.
- [20] Hunter H, Degraiah D, Duret A, et al. Weight loss, insulin resistance, and study design confound results in a meta-analysis of animal models of fatty liver [J]. *Elife*, 2020, 9: e56573.
- [21] 赵驿歌, 赵一颖, 丰晨然, 等. 高脂饮食诱导的非酒精性脂肪肝大鼠模型的代谢组学研究 [J]. *中南药学*, 2023, 21 (11): 2920-2925.
- [22] 赵维良, 王治霞, 喇登海, 等. 血管生成抑制剂 ZM 306416 对高脂饮食诱导的非酒精性脂肪性肝病小鼠的保护作用 [J]. *中国肝脏病杂志 (电子版)*, 2023, 15 (2): 36-46.

(收稿日期: 2024-10-16; 修回日期: 2024-12-16)

响应面法优化老鹳草水提工艺及其抗炎作用研究

王美玲, 兰卫* (新疆医科大学中医学院, 乌鲁木齐 830017)

摘要: **目的** 采用响应面法优化老鹳草水提工艺, 探讨其对脂多糖 (LPS) 诱导的 RAW264.7 细胞炎症的抑制作用。**方法** 以没食子酸、槲皮素含量为评价指标, 采用 AHP-熵权法计算权重系数, 综合评价分析并结合 Box-Behnken 响应面考察提取温度、料液比、提取时间对老鹳草水提工艺的影响; CCK-8 比色法检测老鹳草水提物对 RAW264.7 细胞增殖的抑制作用; 不同浓度的水提物 (250 、 500 、 $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 干预体外培养 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 24、48 h 后, Griess 法检测一氧化氮 (NO) 变化。**结果** 最佳提取工艺条件: 提取时间 55 min、料液比 1 : 21 (g/mL)、提取温度 100°C 。与模型组比较, 250 、 500 、 $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的老鹳草水提物作用 RAW264.7 细胞 24 和 48 h 后, NO 生成量均显著降低 ($P < 0.0001$)。**结论** 通过响应面法优化得出的老鹳草水提工艺, 经验证稳定合理、操作可控、重现性好, 并发现老鹳草水提物能够显著抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 炎症细胞的 NO 生成量。

关键词: 老鹳草; 总鞣质; 总黄酮; 响应面法; RAW264.7

中图分类号: R931.6, R283 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)04-0929-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.009

Optimization of the aqueous extraction of *Geranium wilfordii* Maxim. and its anti-inflammation properties

WANG Mei-ling, LAN Wei* (College of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830017)

Abstract: **Objective** To optimize the aqueous extraction of *Geranium wilfordii* Maxim. and determine its inhibition effect on lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW264.7 cells with response surface methodology. **Methods** The content of gallic acid and quercetin was used as the evaluation indexes. The weight coefficient was calculated by AHP-entropy weight method, and the effects of extraction temperature, solid-liquid ratio and extraction time on the water extraction of *Geranium wilfordii* Maxim. were determined by comprehensive evaluation and analysis combined with Box-Behnken response surface method. The inhibition of aqueous extract of *Geranium wilfordii* Maxim. on the proliferation of RAW264.7 cells was detected by CCK-8 colorimetric method, and the nitric oxide change was detected by Griess method after different concentrations of aqueous extracts (250 , 500 and $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) were intervened in vitro to culture lipopolysaccharide-induced RAW264.7 cells for 24 and 48 h. **Results** The optimal extraction conditions were as follows: extraction for 55 min, solid-liquid ratio at 1 : 21 (g/mL), and extraction temperature 100°C . Compared with the model group, the amount of nitric oxide was significantly reduced after 24 and 48 h treatment of aqueous extracts at 250 , 500 and $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ in RAW264.7 cells ($P < 0.0001$). **Conclusion** The aqueous extraction of *Geranium wilfordii* Maxim. by response surface optimization is stable, reasonable, controllable, and reproducible, and can inhibit the nitric oxide production of lipopolysaccharide-induced RAW264.7 inflammatory cells. **Key words:** *Geranium wilfordii* Maxim.; total tannin; total flavonoid; response surface method; RAW264.7

基金项目: 新疆乌鲁木齐自治区重大专项子课题 (No.2022A03017-5-3)。

作者简介: 王美玲, 女, 硕士研究生, 主要从事中药基础研究, email: 1547281280@qq.com *通信作者: 兰卫, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事中药基础研究, email: 641059126@qq.com

老鹳草 (*Geranium wilfordii* Maxim.), 是牻牛儿苗科牻牛儿苗、老鹳草或野老鹳草的干燥地上部分, 具有祛风通络、活血、清热利湿功效。现有研究表明, 老鹳草提取物具有抗炎镇痛的作用^[1], 还可以防治类风湿关节炎^[2-3]。杨小双等^[4]通过老鹳草巴布剂治疗弗氏完全佐剂诱导的类风湿关节炎大鼠, 发现老鹳草巴布剂可显著改善膝关节滑膜细胞增生及炎性细胞浸润, 说明老鹳草可通过抑制细胞的炎症反应减轻机体的损伤。一氧化氮 (NO) 作为细胞间信息传递的重要载体之一, 参与诸多生理功能的调节及病理发展的过程^[5-6]。炎症是生物组织受到某种刺激如外伤、感染等损伤因子的刺激所产生的生理或者病理的反应, 当炎症反应加剧时, 会破坏机体内环境平衡、损伤组织等, 导致病情恶化。巨噬细胞在机体遭受感染或损伤时, 能够调控机体免疫反应^[7], 从而影响炎症的发生和发展。脂多糖 (LPS) 可以刺激巨噬细胞表面受体产生大量诱导型一氧化氮合酶 (iNOS), 进一步诱导 NO 的生成, 激发炎症反应^[8], 加重炎症对机体一系列的损伤。本文通过探讨老鹳草对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症的抑制作用, 进一步从细胞水平上阐明老鹳草对炎症抑制的作用机制。现已有的老鹳草提取工艺的研究, 多是以有机溶剂作为提取溶剂^[9], 或是以单一成分作为考察^[10], 老鹳草作为我国传统中药, 多以水煎液应用于临床, 现缺乏对老鹳草水提工艺的研究以及其在细胞水平上抗炎的药效学研究。基于此, 本研究以总鞣质以及总黄酮含量为指标^[11]进行综合评价, 优化老鹳草的水提工艺, 最大限度地提取老鹳草中的有效成分; 以 LPS 诱导的 RAW264.7 炎症细胞考察优化后水煎液对细胞炎症的影响, 以期老鹳草后续的剂型开发以及临床应用提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器

UV-2007 紫外可见分光光度计 (日本岛津仪器有限公司); HH-S4 型恒温水浴锅 (常州国宇仪器制造有限公司); AB135-S 电子天平 (梅特勒托利多国际有限公司)。

1.2 试药

老鹳草药材饮片均购于新疆医科大学第四附属医院, 由新疆医科大学胡君萍教授鉴定为牻牛儿苗科老鹳草的干燥地上部分; RAW264.7 小鼠巨噬细胞 (武汉赛维尔公司); 没食子酸对照品、槲皮素对照品 (批号: C17D10C105977、O29HB199514, 纯度均 > 98.0%, 上海源叶生物科技有限公司); NO 试剂盒 (批号: S0021S, 碧

云天生物技术有限公司); CCK-8 试剂盒 (批号: BA00208, 北京博奥森生物技术有限公司); 无水碳酸钠 (批号: 20220208, 纯度 > 99.8%, 天津市鑫铂特化工有限公司); 无水钼酸钠、硫酸锂 (批号: C150309911、C15336434, 纯度均 > 99.0%, 上海麦克林生化科技有限公司); 氢氧化钠 (批号: 20211110, 纯度 > 96.0%, 天津市北联精细化学品开发有限公司); 实验用水均为纯水。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 老鹳草水提液的制备 利用粉碎机将老鹳草饮片粉碎后过三号筛, 称取粉碎后的药材粉末 2.0 g, 加入 40 mL 蒸馏水^[12], 称定重量, 水浴加热回流, 再称定重量, 补足损失的溶剂, 静置冷却, 过滤, 精密量取滤液 1 mL, 以水定容至 25 mL 量瓶中, 得供试品溶液。

2.1.2 磷钼钨酸试剂的配制^[13] 称取一定量的钨酸钠、钼酸钠、硫酸锂等试剂, 制备显色剂磷钼钨酸试剂, 待用。

2.1.3 对照品溶液的制备 精密称取没食子酸对照品 1.00 mg, 以水定容, 制备成 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 备用。精密称取槲皮素对照品 1.00 mg, 以甲醇定容, 制备成 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 备用。

2.2 标准曲线的绘制

精密量取没食子酸对照品溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL 置于 25 mL 棕色量瓶中, 加入磷钼钨酸试液 1 mL, 用水补足至 12 mL, 用 29% 碳酸钠溶液定容, 混匀, 静置 30 min, 以相应试剂为空白对照, 在 400 ~ 800 nm 波长内进行全波长扫描, 确定最大吸收波长为 760 nm, 在该波长下测定吸光度, 得回归方程式为: $y = 111.2x + 0.0815$, $R^2 = 0.9913$, 结果表明, 对照品没食子酸在 0.00 ~ 0.15 mg 与吸光度线性关系良好。

精密量取槲皮素对照品溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL 置于 10 mL 量瓶中, 各加入 1 mL 亚硝酸钠溶液, 混匀, 静置 6 min, 加入 1 mL 硝酸铝溶液, 静置 6 min, 加入 4 mL 氢氧化钠溶液, 以甲醇定容, 放置 15 min。以相应试剂为空白对照, 在 300 ~ 600 nm 波长内进行全波长扫描, 确定最大吸收波长为 356 nm, 在该波长下测定吸光度, 得回归方程: $y = 44.129x + 0.1776$, $R^2 = 0.9949$, 结果表明, 对照品槲皮素在 0.1 ~ 0.6 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与吸光度线性关系良好。

以没食子酸含量作为总鞣质含量评价指标, 以槲皮素含量作为总黄酮含量评价指标。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度实验 精密吸取同一对照品溶液各 2.0 mL, 按“2.2”项下操作进行, 重复测定 6 次, 结果没食子酸精密度 RSD 值为 0.08% ($n = 6$); 槲皮素精密度 RSD 值为 0.19% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性实验 精密吸取老鹳草水提液 1.0 mL, 平行制备 6 份, 按“2.2”项下操作进行, 结果在 760 nm 处测得没食子酸吸光度平均值为 0.452, RSD 值为 1.5% ($n = 6$); 在 356 nm 处测得槲皮素吸光度平均值为 0.232, RSD 值为 0.84% ($n = 6$), 表明该方法重复性良好。

2.3.3 稳定性实验 精密吸取老鹳草水提液 1.0 mL, 按“2.2”项下操作进行, 分别在 1、2、4、6、8、10、24 h 测定吸光度, 结果在 760 nm 处测得没食子酸吸光度平均值为 0.237, RSD 值为 0.93% ($n = 7$); 在 356 nm 处测得槲皮素吸光度平均值为 0.200, RSD 值为 0.92% ($n = 7$), 表明该方法稳定性良好。

2.3.4 加样回收实验 精密吸取已知含量的老鹳草提取液 1.0 mL, 共 9 份, 每份分别加入低、中、高没食子酸对照品 (质量浓度分别为 0.2、0.4、0.6 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 适量, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 于 760 nm 处测定吸光度, 按“2.2”项下的没食子酸线性方程计算总鞣质含量, 根据生药量计算总鞣质提取率, 进一步计算加样回收率, 加样回收率平均值分别为 99.64%、99.90%、99.81%, RSD 值分别为 0.23%、0.29%、0.14% ($n = 3$); 槲皮素的加样回收率测定方法同上, 每份分别加入低、中、高槲皮素对照品 (质量浓度分别为 0.8、1.6、2.4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 适量, 得出加样回收率平均

值分别为 99.22%、99.69%、99.51%, RSD 值分别为 0.58%、0.01%、0.58% ($n = 3$), 结果表明加样回收率符合实验要求。

2.4 AHP-熵权法确定指标权重

采用主、客观评价方法 (AHP-熵权法) 对评价指标进行综合打分, 参考文献^[14], 根据 AHP 层次分析得到的主观熵权 W_A , 将预实验所得数据导入 SPSSPRO 进行 CRITIC 权重分析, 得到的权重系数 W_C 并代入综合权重计算公式, 得到综合权重 W_{A-C} 。总黄酮, 总鞣质权重系数 W_{A-C} 分别为 0.425, 0.575。

综合权重计算公式: $W_{A-C} = (W_{Ai} \times W_{Ci}) / \sum_{i=1}^n (W_{Ai} \times W_{Ci})$ (1)

综合评分计算公式: $Y = \sum_{i=1}^n (W_{A-C} \times X_i / \max X_i) \times 100$ (2)

2.5 单因素实验

选择料液比、提取温度、提取时间、提取次数作为考察因素, 总鞣质及总黄酮含量为评价指标, 进行单因素实验。固定提取温度 90 $^{\circ}\text{C}$ 、料液比 1:25、提取时间 1 h, 考察提取次数 1、2、3 次对总鞣质和总黄酮含量的影响; 固定料液比 1:20、提取时间 2 h、提取 1 次, 考察提取温度 50、60、70、80、90、100 $^{\circ}\text{C}$ 对总鞣质和总黄酮含量的影响; 固定提取温度 90 $^{\circ}\text{C}$ 、提取时间 2 h、提取次数 1 次, 考察料液比 1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40 对总鞣质和总黄酮含量的影响; 固定提取温度 90 $^{\circ}\text{C}$ 、料液比 1:25、提取次数 1 次, 考察提取时间 30、60、90、120、150、180 min 对总鞣质和总黄酮含量的影响, 结果如图 1 所示。

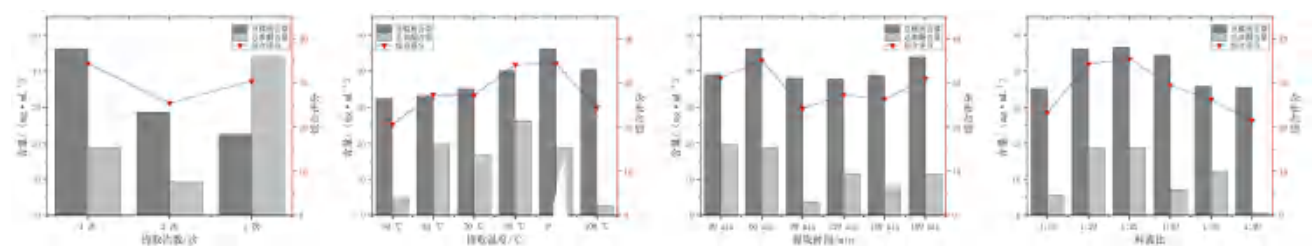


图 1 各因素对老鹳草总鞣质及总黄酮含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig 1 Effects of various factors on the total tannin and total flavonoid contents of *Geranium wilfordii* Maxim. ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

由图 1 可知, 在提取次数为 1 次时, 便可对有效成分进行最大限度地提取。根据综合得分, 选取提取次数为 1 次。提取温度在 50 ~ 100 $^{\circ}\text{C}$ 区间, 随着不断地升温, 总鞣质及总黄酮含量呈现出先升高后降低的趋势, 当温度 ≥ 90 $^{\circ}\text{C}$ 时, 有效成分得率降低, 推测是由于温度较高破坏有效成分所致, 根据综合评分结果, 选择 90 $^{\circ}\text{C}$ 作为提取温度。提取时间在 30 ~ 60 min 内, 综合评分持续增大; 提

取温度 > 60 min, 随着时间的增加, 有效成分含量反而开始下降, 且过长时间的提取可能会增加无效成分的含量以及破坏有效成分。根据综合评分, 选取 60 min 作为提取时间。总鞣质及总黄酮含量呈升高趋势, 料液比 $> 1:25$ 后, 增加料液比, 含量降低, 说明继续增加料液比, 含量可能并不会大幅增长, 反而因浓缩过程耗时延长, 损失增多。根据综合评分, 选择 1:25 作为料液比。

2.6 Box-Behnken 响应面法优化实验设计

基于前期预实验及单因素实验考察结果，选取提取温度（A）、提取时间（B）、料液比（C）作为自变量，因素水平设置见表 1。

表 1 响应面法的因素水平表

Tab 1 Response surface factors and levels			
水平	因素		
	A 提取温度	B 提取时间	C 料液比
− 1	80	30	1 : 20
0	90	60	1 : 25
1	100	90	1 : 30

根据单因素实验考察结果，选取提取温度（A）、提取时间（B）、料液比（C）作为自变量进行考察，实验设计见表 2，方差分析结果见表 3。

表 2 老鹳草水提工艺响应面法因素设计与结果

Tab 2 Response surface methodology factor design and results of <i>Geranium wilfordii</i> Maxim. water extraction process						
实验组	提取温度 A/℃	提取时间 B/min	料液比 C	总鞣质 / (mg·g ^{−1})	总黄酮 / (mg·g ^{−1})	综合评分 (R)
1	90	90	1 : 30	12.50	16.92	29.42
2	90	60	1 : 25	14.17	19.18	33.35
3	100	90	1 : 25	12.04	16.29	28.33
4	100	60	1 : 20	14.15	19.15	33.30
5	90	60	1 : 25	14.22	19.25	33.48
6	90	30	1 : 30	11.50	15.56	27.06
7	90	60	1 : 25	14.16	19.15	33.31
8	90	90	1 : 20	11.34	15.35	26.69
9	100	30	1 : 25	12.44	16.84	29.28
10	90	60	1 : 25	14.21	19.23	33.44
11	80	90	1 : 25	9.94	13.45	23.39
12	90	30	1 : 20	12.88	17.43	30.31
13	100	60	1 : 30	13.55	18.33	31.88
14	80	60	1 : 20	11.28	15.23	26.55
15	80	30	1 : 25	9.84	13.32	23.16
16	90	60	1 : 25	14.16	19.15	33.31
17	80	60	1 : 30	11.91	16.11	28.02

对所得数据进行回归模拟，得方程 $R = -278.48 + 5.88A + 0.42B + 1.80C - 0.00098AB - 0.0144C + 0.010BC - 0.029A^2 - 0.0049B^2 - 0.022C^2$ ， $R^2 = 0.9994$ ，由表 3 方差分析结果及图 2 可知，模型 $P < 0.0001$ ，表明数据具有高度显著性；失拟项 $P > 0.05$ ，不显著，表明模型符合实际，具有良好的拟合度和可信度，模型矫正决定系数 $\text{Adj } R^2 = 0.9985$ 与预测决定系数 $\text{Pred } R^2 = 0.9916$ 差值小于 0.02，说明该模型可用于老鹳草水提液提取工艺的分析预测。

因素的二次项均存在显著性差异（ $P < 0.0001$ ），表明因素对综合评分的影响并非一般的线性关系。单因素中一次项 A、B 为显著项，A 对提取工艺综合评分影响最大，其影响大小顺序为：A > B > C。

表 3 方差分析结果

Tab 3 ANOVA results					
来源	离均差平方和	自由度	均值	F 值	P 值
模型	199.09	9	22.12	1222.61	< 0.0001
A	58.70	1	58.70	3244.17	< 0.0001
B	0.49	1	0.49	27.08	0.0012
C	0.028	1	0.028	1.53	0.2565
AB	0.35	1	0.35	19.24	0.0032
AC	2.09	1	2.09	115.40	< 0.0001
BC	8.94	1	8.94	494.10	< 0.0001
A ²	35.05	1	35.05	1937.22	< 0.0001
B ²	83.48	1	83.48	4613.91	< 0.0001
C ²	1.30	1	1.30	71.74	< 0.0001
残差	0.13	7	0.012		
失拟项	0.10	3	0.034	5.62	0.0643
误差	0.024	4	0.006		
总离差	199.22	16			

AB、BC、AC 均为显著项，提取时间与料液比、提取温度与提取时间的交互作用以及料液比与提取温度的交互作用结果均有显著性影响。因此可以确定最佳提取工艺为：提取时间 55 min，料液比 1 : 21，提取温度 100 ℃。

2.7 提取工艺验证实验

分别称取老鹳草药材 60 g，分为 3 批次，按“2.6”项下最佳提取工艺条件进行验证实验，按标准曲线项下操作方法测定，3 批次水提物综合评分分别为 33.44、33.84、33.82（ $RSD = 0.23\%$ ， $n = 3$ ），实际值与预测值的偏差 ≤ 1%，证明该提取工艺稳定可行。

2.8 老鹳草对 RAW264.7 炎性细胞的影响

2.8.1 细胞培养 使用含 10% 胎牛血清、1% 双抗 DMEM 培养基，在温度 37 ℃、5%CO₂、湿度 100% 的培养箱内培养细胞，选择对数生长期的细胞进行各项研究。

2.8.2 CCK-8 法测定细胞增殖活性 取对数生长期的 RAW264.7 细胞，离心后弃去旧培养基，加入新鲜培养基，以 1.2×10^4 个 / 孔的细胞量接种于 96 孔板，每孔 100 μL，培养 24 h。分别加入老鹳草水提物，终质量浓度为 0、25、50、100、250、500、1000、1500 μg · mL^{−1}，设置 6 个复孔，同时设置空白组（空白培养基）以及对照组（仅接种细胞）。孵育 12、24、48 h 后加 10 μL CCK-8 溶液，最终每孔加入 90 μL 培养基，振荡 3 min，继续培养 1、2 h，充分溶解后使用酶标仪检测各孔 450 nm 处光密度值（OD）值，计算细胞活力，实验重复 3 次。

细胞活力（%）= $\frac{[OD_{\text{对照}} - OD_{\text{空白}}]}{[OD_{\text{给药}} - OD_{\text{空白}}]} \times 100\%$

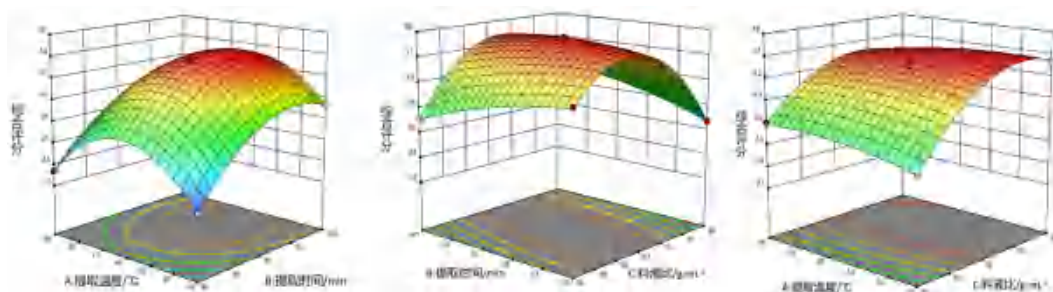


图 2 各因素交互作用对综合评分影响的响应面谱图

Fig 2 Response map of the effect of the interaction of various factors on the composite score

抑制率 (%) = $\frac{[OD_{\text{对照}} - OD_{\text{给药}}]}{[OD_{\text{对照}} - OD_{\text{空白}}]} \times 100\%$

如图 3 所示, 当老鹳草水提物质量浓度为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 不同作用时间皆表现出对细胞的抑制作用, 抑制率为 70% ~ 80%, 当老鹳草水提物质量浓度为 $1500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 细胞增殖的抑制作用显著, 抑制率接近 50%, 故选择 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为药物作用最大浓度。根据不同浓度对细胞增殖的抑制作用得出老鹳草作用于 RAW264.7 细胞 24 h 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 $1582.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 48 h 的 IC_{50} 为 $1235.9 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

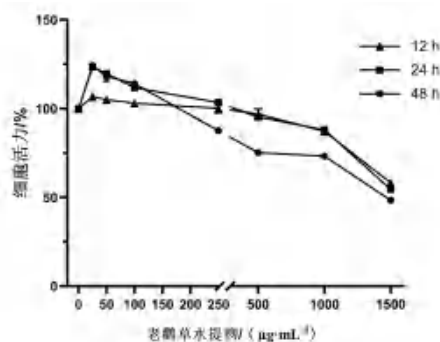

 图 3 老鹳草提取液作用不同时间对 RAW264.7 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

 Fig 3 Effect of aqueous extract of *Geranium wilfordii* Maxim. on the viability of RAW264.7 cells at different treatment time ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

2.8.3 老鹳草水提物对 RAW264.7 细胞 NO 产生的影响 RAW264.7 细胞接种于 96 孔板, 培养 24 h 后, 各孔加入终质量浓度为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 LPS 刺激 24 h, 分别加入终质量浓度为 250、500、1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的老鹳草提取液作用 24、48 h, 显微镜下观察各组细胞形态的变化, RAW264.7 细胞空白组形态多呈圆形, 少数呈椭圆形。经 LPS 干预刺激 24 h 后, 模型组细胞体积增大, 梭形形态的细胞增多, 相较于模型组, 给药组细胞形态更趋于正常, 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 给药组中细胞体积改善较为显著, 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 给药组中细胞体积有所改善, 但仍存在部分体积较大的细胞, 250 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 给药组中细胞体积略微有所改变, 存在部分梭形细胞, 如图 4 所示。

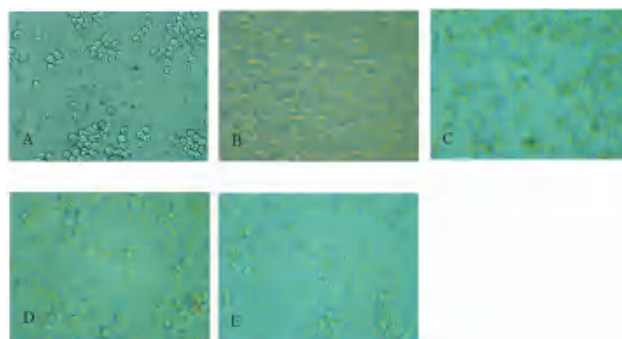

 图 4 各组细胞形态 ($\times 200$)

 Fig 4 Cell morphology of each group ($\times 200$)

A. 空白组 (blank group); B. 模型组 (model group); C. 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 给药组 (1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ group); D. 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 给药组 (500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ group); E. 250 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 给药组 (250 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ group)

不同给药浓度及不同给药时间对 RAW264.7 炎性细胞 NO 产生量的影响如图 5 所示, 与空白组比较, 模型组 NO 生成量显著升高 ($P < 0.0001$), 250、500、1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 老鹳草水提物作用于 RAW264.7 细胞 24 和 48 h 后, 与模型组相比较, NO 生成量均显著降低 ($P < 0.001$), 抑制效果与药液浓度成正相关。

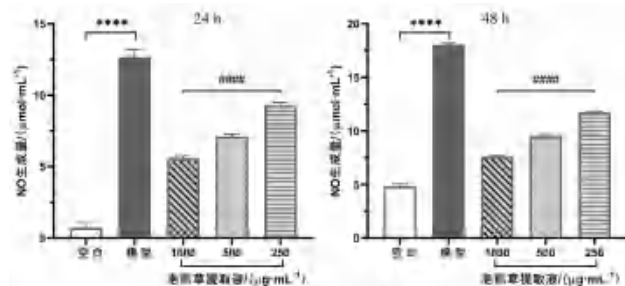

 图 5 不同浓度老鹳草对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞产生的 NO 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$, **** $P < 0.0001$, ##### $P < 0.0001$)

 Fig 5 Effect of different concentrations of *Geranium wilfordii* Maxim. on the NO content induced by LPS in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$, **** $P < 0.0001$, ##### $P < 0.0001$)

2.9 数据的归一化处理

采用 GraphPad Prism8 软件绘图, 并采用 SPSS 27 软件进行统计学分析, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析 (ANOVA) 进行多组间比较,

以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 讨论

3.1 老鹳草水提工艺考察

经前期研究发现,传统的制备老鹳草水提物的方法,存在因煎煮时间不足、温度过高以及溶剂比例设置不当等因素,致使其中的有效成分未被充分提取利用。为进一步优化老鹳草水提工艺,提高老鹳草的利用率,本文采用 AHP-熵权法计算总鞣质及总黄酮两项评价指标的权重系数,并以此得出综合评分来评价分析。此类方法能够在一定程度上降低因主观因素和数据误差所带来的影响,客观真实、合理地反映各指标的重要程度^[15]。在单因素实验的基础上,结合响应面法优化老鹳草水提工艺,通过对提取时间、提取温度、料液比的进一步考察,得出最佳提取工艺条件:提取时间 55 min、料液比 1:21、提取温度 100℃。实验结果表明优化后的提取工艺与传统的水煎煮法相比,总鞣质及总黄酮等有效成分的保留量增加,成分损耗减少,更有利于老鹳草的开发利用,提取工艺经验证稳定可行,具有制备简单、提取率高、稳定性佳、易操作等优点。

3.2 药效学验证

老鹳草为常用的祛风湿、止痹痛类药物,现有研究证实其具有良好的抗炎镇痛效果^[16-17],能够治疗类风湿关节炎,老鹳草中含有的老鹳草素、槲皮素以及木犀草素^[18]等成分被证实能够调节巨噬细胞。本研究以 RAW264.7 细胞作为实验载体,以 LPS 诱导建立体外细胞炎症模型。LPS 刺激细胞后会释放出大量 NO,从而进一步加剧炎症反应,故以 NO 产生量作为炎症的检测指标来探讨老鹳草水提物对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症的抑制作用。

实验选用 RAW264.7 细胞 IC_{50} 浓度以下的药液浓度进行抗炎活性研究,排除可能是细胞活力被影响从而造成的抑制 NO 产生的干扰。实验结果表明,不同浓度的老鹳草水提物均能够抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 炎症细胞的 NO 产生量,抑制作用与药液浓度呈现出浓度相关性,证实了老鹳草具有抗炎活性,能够减轻机体的炎症损伤,说明老鹳草的抗炎作用可能是通过影响细胞炎症来产生。

参考文献

[1] 胡迎庆,刘岱琳,周运筹,等.老鹳草的抗炎、镇痛活性研究[J].西北药学杂志,2003,18(3):113-115.

[2] 陶伟莉.老鹳草多糖提取工艺的优化及治疗类风湿性关节炎的药效学研究[D].汕头:汕头大学,2022.

[3] 宋泽冲.老鹳草除痹汤联合枸橼酸托法替布片治疗类风湿关节炎(湿邪痹阻证)的随机对照临床试验[D].乌鲁木齐:新疆医科大学,2022.

[4] 杨小双,宋信莉,甘莹莹,等.老鹳草巴布剂对类风湿性关节炎大鼠的药效作用[J].药物评价研究,2022,45(9):1816-1821.

[5] Torok NJ, Higuchi H, Bronk S, et al. Nitric oxide inhibits apoptosis downstream of cytochrome C release by nitrosylating caspase 9[J]. Cancer Res, 2002, 62(6): 1648-1653.

[6] 李舒芳,郭广恩,杨月琴,等.血清 14-3-3 β 蛋白联合呼出气一氧化氮及常规通气肺功能参数对儿童支气管哮喘的诊断效能[J].中国当代儿科杂志,2024,26(7):723-729.

[7] 朱彦彬,徐鑫婷,黎燕冰,等.桦褐孔菌醇抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症反应[J].食品工业科技,2023,44(19):401-409.

[8] 冯晓昇,赵微,何朋伦,等.三七总皂苷调节 iNOS-NO-NF- κ B 信号通路抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症研究[J].药物评价研究,2020,43(4):670-675.

[9] 李宇,刘海华,刘翠君,等.老鹳草乙醇提取物中黄酮类化合物和挥发性组分及其抗菌活性[J].福建农业学报,2020,35(12):1397-1404.

[10] 敖芬,沈文,王兰,等.老鹳草中槲皮素提取工艺优化及不同干燥方法对其转移率的影响[J].中成药,2022,44(12):3964-3968.

[11] 杨祎辰,常晖,王二欢,等.老鹳草属药用植物化学成分及药理作用研究进展[J].中国现代中药,2021,23(5):918-927.

[12] 李祎,张志杨,李超,等.老鹳草总鞣质的提取工艺优化[J].中医学报,2017,32(2):269-272.

[13] 沈洁,徐金钟,胡济宏,等.磷钼钨酸-干酪素法测定丹参药材中鞣质的含量[J].分析化学,2008,36(4):553-555.

[14] Frattani FS, Assafim M, Casanova LM, et al. Oral treatment with a chemically characterized parsley (*Petroselinum crispum* var. *neapolitanum* Danert) aqueous extract reduces thrombi formation in rats[J]. J Tradit Complement Med, 2020, 11(3): 287-291.

[15] 钱怡洁,皮文霞,朱广飞,等.基于熵权法结合层次分析法和反向传播神经网络优选酒黄肉蒸制工艺[J].中草药,2021,52(22):6816-6824.

[16] Wasik BR, De Wit E, Munster V, et al. Onward transmission of viruses: how do viruses emerge to cause epidemics after spillover? [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2019, 374(1782): 20190017.

[17] 李宇,刘海华,刘翠君,等.老鹳草乙醇提取物中黄酮类化合物和挥发性组分及其抗菌活性[J].福建农业学报,2020,35(12):1397-1404.

[18] 付冲,吴超,张焰平.老鹳草治疗溃疡性结肠炎的网络药理学研究与体外实验验证[J].山西医科大学学报,2022,53(10):1276-1280.

(收稿日期:2024-10-11;修回日期:2025-01-05)

基于 Ghrelin 水平调控探讨玉液汤改善过氧化氢诱导 SHSY-5Y 细胞氧化应激损伤机制研究

朱宏喆¹, 张瑞华¹, 张雨涵¹, 王欣¹, 史磊磊¹, 安宇宇¹, 肖杨¹, 孙怡萱¹, 刘继平^{1, 2, 3, 4*} (1. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西省中医药管理局中药药效机制与物质基础重点实验室, 陕西 咸阳 712046; 3. 中医药健康陕西工程研究中心, 陕西 咸阳 712046; 4. 陕西省食品药品安全监测重点实验室, 陕西 咸阳 712046)

摘要: **目的** 基于 Ghrelin 水平调控探讨玉液汤改善过氧化氢诱导人神经母细胞瘤细胞 SHSY-5Y 氧化应激损伤机制研究。**方法** 采用分化型 SHSY-5Y 细胞, 用过氧化氢诱导构建氧化应激损伤细胞模型。实验分 6 组: 空白组、模型组、玉液汤低剂量组 (YYT-L, 4.575 g · kg⁻¹)、玉液汤中剂量组 (YYT-M, 9.15 g · kg⁻¹)、玉液汤高剂量组 (YYT-H, 18.3 g · kg⁻¹) 和 [D-Lys3]-GHRP-6 (DLS) 抑制剂组。通过 CCK-8 法检测细胞活力; 免疫荧光法检测细胞线粒体膜电位 (MMP); 流式细胞技术检测细胞活性氧 (ROS) 含量; Western blot 法检测细胞中相关蛋白表达, 进行线粒体功能综合评价。**结果** CCK-8 结果显示玉液汤各剂量组能显著增加细胞活力 ($P < 0.01$), DLS 抑制剂组明显降低细胞活力 ($P < 0.01$); 免疫荧光和流式细胞检测结果显示模型组细胞 MMP 显著降低 ($P < 0.01$), ROS 显著增加 ($P < 0.01$), 玉液汤含药血清处理恢复了 MMP ($P < 0.01$), 降低了 ROS ($P < 0.01$); Western blot 结果表明玉液汤各剂量组能不同程度上调细胞 GHS-R1 α /p-AMPK/PGC-1 α /UCP2 的蛋白表达, 而 DLS 抑制剂显著抑制这些蛋白表达 ($P < 0.01$); **结论** 玉液汤能提高 SHSY-5Y 细胞活力, 减轻过氧化氢诱导的氧化应激损伤, 可能与 Ghrelin 和 GHS-R1 α 相互作用, 激活了 UCP2 蛋白表达, 减少细胞中 ROS 含量、增加 MMP 进而改善线粒体功能有关。

关键词: 玉液汤; Ghrelin; 氧化应激; 线粒体功能

中图分类号: R286

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)04-0935-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.010

Mechanism of Yuye decoction in improving hydrogen peroxide induced oxidative stress injury of SHSY-5Y cells based on Ghrelin levels

ZHU Hong-zhe¹, ZHANG Rui-hua¹, ZHANG Yu-han¹, WANG Xin¹, SHI Lei-lei¹, AN Yu-yu¹, XIAO Yang¹, SUN Yi-xuan¹, LIU Ji-ping^{1, 2, 3, 4*} (1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712046; 2. Key Laboratory of Pharmacodynamics and Material Basis of Chinese Medicine, Shaanxi Administration of Traditional Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712046; 3. Engineering Research Center of Brain Health Industry of Chinese Medicine, Universities of Shaanxi Province, Xianyang Shaanxi 712046; 4. Shaanxi Key Laboratory for Safety Monitoring of Food and Drug, Xianyang Shaanxi 712046)

Abstract: Objective To determine the mechanism of Yuye decoction in improving the oxidative stress injury of human neuroblastoma cells SHSY-5Y induced by hydrogen peroxide based on Ghrelin levels. **Methods** Differentiated SHSY-5Y cells were used to establish a cell model of oxidative stress injury induced by hydrogen peroxide. The experiment was divided into 6 groups: a blank group, a model group, a Yuye decoction low dose group (4.575 g · kg⁻¹), a Yuye decoction medium dose group (9.15 g · kg⁻¹), a Yuye decoction high dose group (18.3 g · kg⁻¹), and a [D-Lys3]-GHRP-6 (DLS)

基金项目: 陕西省教育厅 2022 年度服务地方专项 (No. 22JC029)。

作者简介: 朱宏喆, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药药理学研究, email: 164780484@qq.com * **通信作者:** 刘继平, 男, 教授, 主要从事中药神经药理学研究, email: liwenjie780711@163.com

inhibitor group. The cell viability was detected by CCK-8 method. Mitochondrial membrane potential was detected by immunofluorescence. The content of reactive oxygen species (ROS) was detected by flow cytometry. Western blot was used to detect the expression of related proteins in the cells and to evaluate the mitochondrial function comprehensively. **Results** CCK-8 showed that Yuye decoction significantly increased the cell viability ($P < 0.01$), while the cell viability was significantly decreased in the DLS inhibitor group ($P < 0.01$). Immunofluorescence and flow cytometry showed that MMP was significantly decreased ($P < 0.01$) and ROS increased ($P < 0.01$) in the model group. Yuye decoction drug-containing serum restored MMP ($P < 0.01$) and decreased ROS ($P < 0.01$). Western blot showed that Yuye decoction up-regulated GHS-R1 α /p-AMPK/PGC-1 α /UCP2 protein expression at different degrees, while DLS inhibitor significantly inhibited the protein expression ($P < 0.01$). **Conclusion** Yuye decoction can improve the viability of SHSY-5Y cells and alleviate the oxidative stress injury induced by hydrogen peroxide, which may be related to the interaction of Ghrelin and GHS-R1 α , activation of UCP2 protein expression, reduction of ROS content in the cells, increase in cell membrane potential and improvement of mitochondrial function.

Key words: Yuye decoction; Ghrelin; oxidative stress; mitochondrial function

氧化应激已被视为糖尿病 (DM) 和认知功能障碍之间潜在的病理机制, 它可诱发线粒体功能下降, 在阿尔茨海默病 (AD) 的产生中发挥重要作用, 并进一步阻碍机体葡萄糖代谢过程, 破坏血脑屏障 (BBB) [1-2]。有研究认为, 激素可调节内分泌, 破坏 BBB, 是导致脑区功能异常的一个重要因素, 与认知功能的下降存在紧密联系 [3]。Ghrelin 是 1999 年由日本科学家 Kojima [4] 发现的一种由 28 个氨基酸组成的新的内源性脑肠肽, 有抑制胰岛素分泌、调节血糖值等作用, 能作用于大脑, 参与葡萄糖代谢, 保护大脑受损时脑细胞线粒体功能。Ghrelin 抑制胰岛素分泌是通过与生长激素促泌受体 (GHS-R) 相互作用实现的, GHS-R 通过 Akt-Pdx1-GLUT2 通路调节葡萄糖的摄取及葡萄糖诱导的胰岛素释放 [5]。GHS-R 是酰化 Ghrelin 的特异性受体, [D-Lys3]-GHRP-6 (DLS) 注射使肥胖大鼠血清 Ghrelin 恢复。相反, Ghrelin 信号调节障碍可能会诱发 AD 病理过程。对此, 研究人员认为抑制受体可成为治疗 DM 的途径。本研究使用 DLS 抑制 GHS-R1 α 观察 Ghrelin 的抗氧化效应。

中医药在 DM 和认知障碍的治疗上历史悠久、疗效独特。玉液汤出自清代张锡纯的《医学衷中参西录》, 具有补脾固肾、益气养阴、生津止渴之效, 临床上对其应用于 DM 的防治已有深入研究 [6]。本课题组基于组方药味分析及相关文献研究, 发现该方对 SHSY-5Y 氧化应激损伤有一定改善作用, 但具体机制不清。故本研究基于 Ghrelin 的生物学作用和中医“脾脑”相关理论, 探讨玉液汤通过调控线粒体功能对过氧化氢 (H₂O₂) 诱导 SHSY-5Y 细胞氧化应激损伤的作用机制, 以期为临床应用提供实验基础和理论依据。

1 材料

1.1 细胞与动物

分化型人神经母细胞瘤细胞 SHSY-5Y (上海生科院细胞库, 货号: C6823); 40 只健康 SPF 级雄性 SD 大鼠 [成都达硕有限公司, 动物许可证编号为 SCXK (川) 2020-030], 8 周龄, 体重 200 ~ 220 g。所有动物实验经陕西中医药大学科技处动物伦理审批通过, 并严格按照动物实验管理法规和相关准则进行, 动物伦理批件号: SUCMDL-20240205001。

1.2 试药

药材饮片均购于陕西中医药大学附属医院, 经药学院中药鉴定教研室颜永刚教授鉴定为正品, 符合 2020 年版《中国药典》质量规定。DME/F12 培养基 (美国 Hyclone 公司, 批号: SH30022.05); 青霉素-链霉素-胰蛋白酶 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号分别为: C0222、C0203); 细胞冻存液 (苏州新赛美生物科技有限公司, 批号: CB95532192); 30% H₂O₂ (山西同杰化学试剂有限公司, 批号: 20211201); CCK-8 试剂盒 (Trans Gen Biotech 公司, 批号: FC101-04); 磷酸盐缓冲液 (PBS) (武汉博士德生物工程有限公司, 批号: PYG0021); BCA 蛋白定量试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司, 批号: AR0146); RIPA 裂解液 (北京兰杰柯科技有限公司, 批号: 20101ES60); Ghrelin 多克隆抗体 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 批号: GB11548); GHS-R1 α 多克隆抗体 (Affinity 公司, 批号: DF2794); AMPK 多克隆抗体 (ABclonal 公司, 批号: A1229); 过氧化物酶体增殖受体 γ 辅激活因子 α (PGC-1 α)、解偶联蛋白 2 (UCP2)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) (武汉三鹰生物技术有限公司, 批号分别为: 66369-1-Ig、11081-

1-AP、60004-1-Ig); [D-Lys3]-GHRP-6 (DLS, 上海源叶生物科技有限公司, 批号: S29631); 线粒体膜电位 (MMP) 试剂盒 (上海纪宁生物科技有限公司, 批号: JN21998); 活性氧 (ROS) 试剂盒 (上海科爱博生物科技有限公司, 批号: CB10719)。

1.3 仪器

CO₂ 细胞培养箱 (上海力申科学仪器有限公司, 型号: HF240); 全波长酶标仪 (美国 Thermo Fisher 公司, 型号: Mutiskan GO); 高速台式离心机 (上海安亭科学仪器厂, 型号: TGL-16B); -80℃ 超低温冰箱 (日本 Sanyo 公司, 型号: HYC-301); 流式细胞仪 [安捷伦科技 (中国) 有限公司, 型号: Agilent NovoCyte]; 小型垂直电泳槽 (美国 Bio-Rad 公司, 型号: 165-8001); 转膜仪 (美国 Bio-Tek 公司, 型号: DYCZ-40F); 电泳仪 (北京六一生物科技有限公司, 型号: DYCZ-24DN); 恒温水浴箱 (江苏新春兰科学仪器有限公司, 型号: HH-US)。

2 方法

2.1 玉液汤的制备

玉液汤依据《医学衷中参西录》原方所载药量: 生山药 30 g、生黄芪 15 g、知母 18 g、生鸡内金 (捣细) 6 g、葛根 4.5 g、五味子 9 g、天花粉 9 g。称取药材后加 10 倍量纯净水浸泡 30 min, 武火煮沸后转文火慢煎 1 h, 过滤, 再加 8 倍量水同法煎煮 40 min, 合并两次滤液, 制成含生药量 1 g·mL⁻¹ 的浓缩液, 4℃ 保存备用。

2.2 含药血清制备

40 只 SPF 级健康雄性 SD 大鼠按体质量随机分为: 空白组 (Control)、玉液汤低剂量组 (YYT-L)、玉液汤中剂量组 (YYT-M)、玉液汤高剂量组 (YYT-H) (剂量分别为 4.575、9.15、18.3 g·kg⁻¹, 以临床人用剂量折算), 每组 10 只。空白组灌胃生理盐水, 其余 3 组灌胃相应剂量玉液汤水煎液, 连续灌胃 7 d。末次灌胃 2 h 后腹主动脉取血, 并在室温下, 以 3500 r·min⁻¹ 离心 15 min, 收集同组血清于同一管内, 分离上清用 0.22 μm 水相微孔滤膜灭菌后 4℃ 保存备用。

2.3 细胞培养与分组

将 SHSY-5Y 细胞用完全培养基置于含 5%CO₂ 的 37℃ 细胞培养箱中培养。参考文献方法^[7] 采用 H₂O₂ 诱导 SHSY-5Y 细胞构建氧化应激损伤模型。将培养至对数生长期的 SHSY-5Y 细胞, 待生长密度为 80% 左右, 接种于 96 孔板中, 分为 6 组: 空白组 (Control)、模型组 (Model, 400 μmol·L⁻¹ H₂O₂)、YYT-L 组、YYT-M 组、YYT-H 组和 DLS (10 μmol·L⁻¹) 抑制剂组。每组设 6 个复孔。待细胞贴壁 24 h, 空白组不处理, 模型组更换 10% 空白鼠血清, DLS 抑制剂组更换空白血清前用

DLS 预处理 1 h, 其余 3 组更换不同浓度 10% 含药血清, 24 h 后弃去培养基, 除空白组外其余组加入 2 mL H₂O₂ 处理 2 h。

2.4 CCK-8 法检测 SHSY-5Y 细胞活力

将细胞密度为 1×10⁵ 个·mL⁻¹ 的 SHSY-5Y 细胞铺板, 待细胞贴壁完全后不同剂量给药组给予 10% 含药血清, DLS 抑制剂组先用 10 μmol·L⁻¹ DLS 预处理 1 h 再加入空白血清, 每组设 6 个复孔, 处理 24 h 后。空白组更换为 10% 空白鼠血清, 其余 5 组加入 2 mL H₂O₂ 处理 2 h, 加入 10 μL CCK-8 溶液, 检测细胞活力。

2.5 免疫荧光法检测 SHSY-5Y 细胞 MMP

MMP 以 JC-1 染色法进行: 收集 SHSY-5Y 细胞, 用 PBS 洗涤两次, 离心后收集适量密度细胞, 按照 MMP 试剂盒操作进行。最终结果以荧光密度表示。

2.6 流式细胞仪检测 SHSY-5Y 细胞 ROS 含量

依据试剂盒操作步骤, 按照 1:1000 用无血清培养基稀释 2', 7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA), 使终浓度为 10 μmol·L⁻¹, 去细胞培养液后加入适当体积稀释好的 DCFH-DA。37℃ 培养箱孵育 20 min, 离心后用无血清培养基洗涤细胞 3 次, 去除未进入细胞的 DCFH-DA。用 200 μL 的 PBS 重悬细胞, 根据激发波长, 选择合适的通路, 进行检测。

2.7 Western blot 检测 GHS-R1α/p-AMPK/PGC-1α/UCP2 蛋白水平

将 SHSY-5Y 细胞置于含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液中裂解 30 min 后进行 BCA 蛋白定量测定。配制 10% 分离胶 10 mL 和 5% 浓缩胶 5 mL, 上样后进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 先用 70 V 恒压电泳, 约 30 min 后当指示剂溴酚蓝进入分离胶后改用 90 V 恒压电泳。电泳结束后, 将电泳仪置于冰水条件下 200 mA 恒流转膜 70 min, 将蛋白转至 PVDF 膜上, 放入 5% 牛血清白蛋白 (BSA) 室温封闭 2 h, 分别加入 GHS-R1α、p-AMPK、PGC-1α、UCP2 一抗在 4℃ 孵育过夜, 洗膜, 加入二抗室温孵育 2 h, 洗膜后用增强型 ECL 化学发光法显色, 扫描灰度值, 利用 AlphaEase FC 软件分析目标带分子量和净光密度。每个样品的灰度值与 GAPDH 灰度值的比值作为各蛋白的相对表达量。

2.8 统计学分析

采用 SPSS 24.0 软件包进行统计学处理, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 图表应用 GraphPad Prism7 软件进行数据图形分析, 采用单因素方差分析进行组间比较检验, LSD 法进行检验后多重比较, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 玉液汤含药血清对 H_2O_2 诱导的 SHSY-5Y 细胞损伤模型细胞活力的影响

与空白组相比, $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 刺激显著降低 SHSY-5Y 细胞活力, 玉液汤可以减轻 SHSY-5Y 细胞氧化应激损伤, 显著提高细胞活力, 见图 1A。当用 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DLS 抑制细胞上的 GHS-R1 α 时, 与模型组相比, 细胞活力进一步明显降低, 见图 1B。

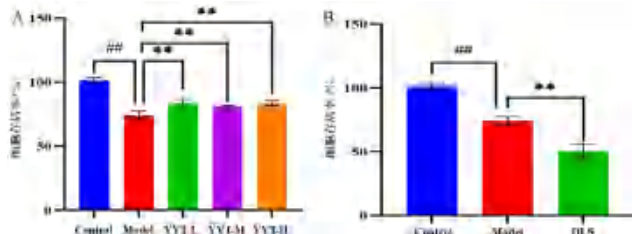


图 1 玉液汤含药血清对氧化应激损伤 SHSY-5Y 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig 1 Effect of Yuye decoction drug-containing serum on the viability of SHSY-5Y cells with oxidative stress injury ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

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

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

3.2 玉液汤含药血清对 H_2O_2 诱导的 SHSY-5Y 细胞损伤模型细胞膜电位的影响

MMP 是评价线粒体功能的指标之一^[8]。正常细胞膜具有极性, 此时 JC-1 指示剂会透过正常的细胞膜在线粒体内形成多聚体而发射红色荧光, 而细胞凋亡时, 线粒体膜电位去极化, JC-1 从线粒体被释放而呈单体形式并发射绿色荧光。与空白组相比, 模型组几乎无红色荧光信号, 而绿色荧光较强, MMP 显著降低。玉液汤各剂量组及 DLS 干预降低了绿色荧光信号, 使红色荧光增强, 较模型组比, 显著增加了 MMP, 见图 2。

3.3 玉液汤含药血清对 H_2O_2 诱导的 SHSY-5Y 细胞损伤模型线粒体 ROS 的影响

正常状态下, SHSY-5Y 细胞 ROS 含量处于较低水平, 而氧化应激损伤加重时, ROS 含量增加。与空白组相比, 模型组 ROS 含量显著升高, 玉液汤各剂量组均显著降低 ROS 含量, 以中剂量组和高剂量组效果最明显。DLS 干预也降低 ROS 含量, 但变化不明显 (见图 3)。

3.4 玉液汤对 H_2O_2 诱导的 SHSY-5Y 细胞损伤模型 GHS-R1 α /p-AMPK/PGC-1 α /UCP2 蛋白表达的影响

与空白组相比, 模型组 GHS-R1 α 、p-AMPK、PGC-1 α 和 UCP2 表达显著下降。玉液汤各剂量组均可不同程度升高 GHS-R1 α /p-AMPK/PGC-1 α /UCP2 的蛋白表达, 而使用 DLS 显著抑制了 GHS-R1 α 蛋白表达, 且 p-AMPK/PGC-1 α /UCP2 表达较模型组显著

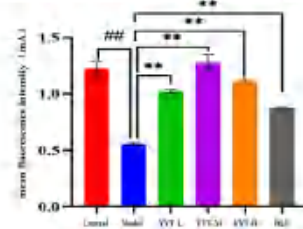
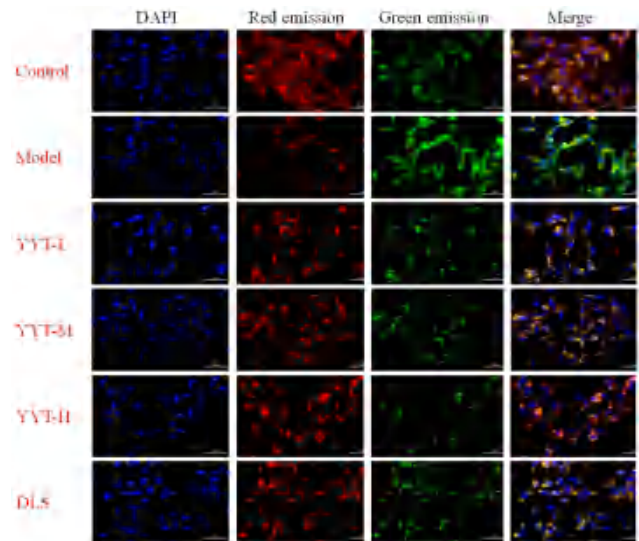


图 2 玉液汤含药血清对氧化应激损伤 SHSY-5Y 细胞 MMP 的影响 ($\times 400$)

Fig 2 Effect of Yuye decoction drug-containing serum on MMP of SHSY-5Y cells with oxidative stress injury ($\times 400$)

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

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

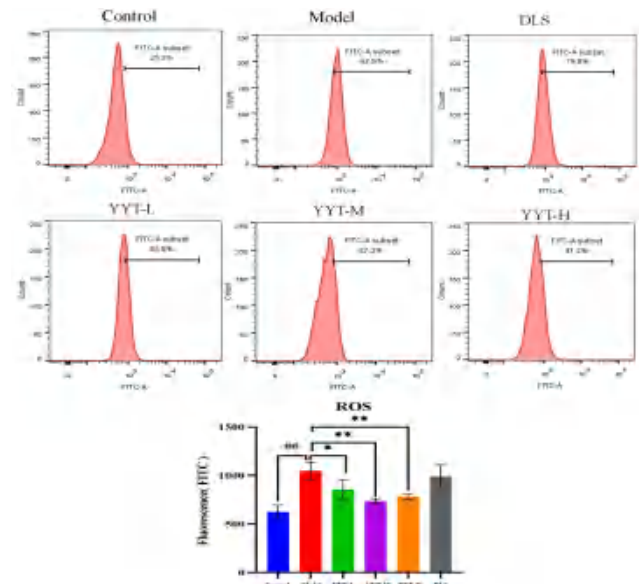


图 3 玉液汤含药血清对氧化应激损伤 SHSY-5Y 细胞线粒体 ROS 的影响
Fig 3 Effect of Yuye decoction drug-containing serum on mitochondrial ROS of SHSY-5Y cells with oxidative stress injury

注: 与空白组比较, $^{###}P < 0.01$; 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, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$.

降低(见图4)。

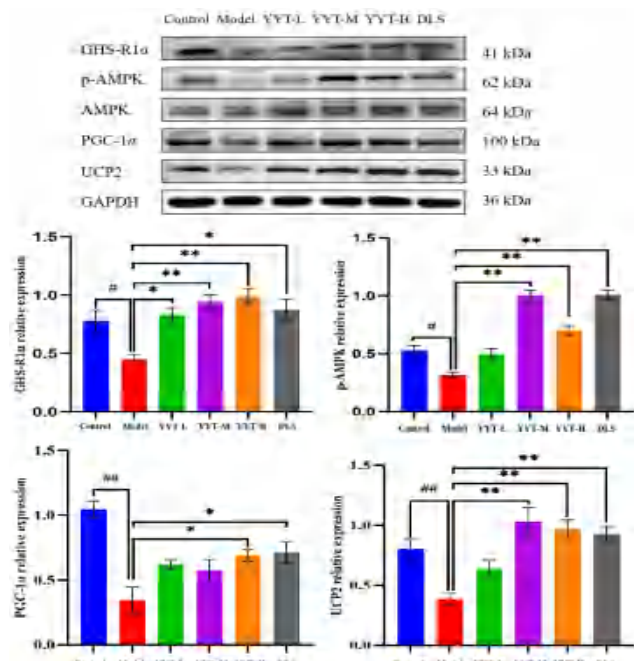


图4 玉液汤含药血清对氧化应激损伤 SHSY-5Y 细胞 GHS-R1 α /p-AMPK/PGC-1 α /UCP2 蛋白的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig 4 Effect of Yuye decoction drug-containing serum on GHS-R1 α /p-AMPK/PGC-1 α /UCP2 protein of SHSY-5Y cells with oxidative stress injury ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

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: Compared with the Control group, $^{\#}P < 0.01$, $^{##}P < 0.01$; compared with the Model group, $^*P < 0.01$, $^{**}P < 0.01$ 。

4 讨论

氧化应激是机体抗氧化能力弱于氧化的失衡状态,常表现为氧化因子释放增加、抗氧化酶活力下降^[9-10]。ROS 含量异常是氧化应激发生的主要指标,且常伴随线粒体功能障碍。胰高血糖素样肽-1 (GLP-1)是由肠道释放的激素,其活性状态可保护神经,改善糖尿病认知障碍(DCI)^[11-12]。氧化应激损伤不仅是 DCI 的致病因素,也是引发早期 AD 的关键因素^[13]。氧化应激损伤产生的大量 ROS 和活性氮(RNS)会阻碍细胞蛋白质、脂类及核酸的合成,诱导细胞死亡。氧化蛋白和脂质类增加,在脑部即可形成 A β 堆积,促进 Tau 磷酸化,最终形成 AD^[14-15]。故而在氧化应激损伤早期阶段的干预对延缓 DCI 发展成 AD 具有重要意义。

线粒体功能障碍可直接引起氧化应激, MMP 是评价线粒体功能的重要指征^[16]。在 Ghrelin 刺激下,线粒体数量与 UCP2 呈依赖性增加,但在 UCP2 基因敲除时,线粒体数量无变化^[17],说明 UCP2 可以介导 Ghrelin 增加线粒体的数量^[18]。UCP2 是介导质子渗漏的蛋白,其过度激活可以引起 MMP 下降^[19-20],还可控制细胞 ROS 的生成减少氧化应

激^[21]。AMPK 是能量代谢蛋白,其激活后既可以改善脑能量代谢也能保护线粒体的健康状态^[22-23]。PGC-1 α 是 AMPK 的直接下游靶蛋白,被 AMPK 磷酸化水平激活可以调节生物酶而增强中枢神经系统的抗氧化能力^[24-25]。GHS-R1 α 作为 Ghrelin 的内源性受体,与酰化的 Ghrelin 结合可以发挥抗氧化作用^[26-27]。已有研究证明, Ghrelin 可以通过 GHS-R1 α /Sirt1/AMPK/PGC-1 α /UCP2 通路减轻缺氧缺血大鼠脑氧化应激和神经元凋亡^[28-29]。本实验结果显示模型组 MMP 降低,而 DLS 抑制剂组较模型组 MMP 升高。可能与抑制 GHS-R1 α 蛋白间接导致 UCP2 蛋白水平降低导致质子渗漏减少相关。同时,在受体未抑制情况下,玉液汤也可增加 MMP,可能是因为血清中的 Ghrelin 与受体结合表现出 MMP 增加。另外,模型组虽也未抑制受体, MMP 却降低,提示这可能与空白鼠血清的基础 Ghrelin 水平较低相关。实验结果揭示玉液汤可能提高血清中的 Ghrelin 水平,从而激活 UCP2 并介导了 Ghrelin 的线粒体稳态功能。

课题组前期对玉液汤进行复方成分分析和入血成分分析,从玉液汤水煎液中共筛选出 307 个(正离子模式)和 174 个(负离子模式)化合物,分别有 13 个(正离子模式)和 16 个(负离子模式)成分入血,其中以黄酮类成分最多,可能是发挥作用的主要物质成分。H₂O₂ 作为一种强氧化剂,具有细胞毒性作用^[30-31]。本课题前期使用梯度浓度筛选出 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂O₂ 诱导氧化应激细胞最佳,以低、中、高剂量玉液汤含药血清处理 24 h, 10% 血清浓度干预下细胞存活率最高,且组间差异最小,确定干预浓度为 10%。由于前期体内实验结果显示玉液汤通过增加 Ghrelin 水平促进了抗氧化途径,但其调节 Ghrelin 的类型尚不明确^[32]。因此本实验使用 DLS 抑制 GHS-R1 α 观察 Ghrelin 的抗氧化效应,结果显示 DLS 降低了细胞活力,较模型组显著,且预处理细胞 1 h 抑制了 GHS-R1 α 表达,其下游 AMPK/PGC-1 α /UCP2 表达较模型组均显著下降,说明抑制 GHS-R1 α 阻断了酰化型 Ghrelin 的抗氧化作用,ROS 检测结果同样证明,玉液汤含药血清降低了 ROS,改善了线粒体功能。

综上,本研究检测 MMP 和 ROS 含量验证了玉液汤调节 Ghrelin 而激活 GHS-R1 α /AMPK/PGC-1 α /UCP2 途径实现抗氧化效应,玉液汤能提高 SHSY-5Y 细胞活力,减轻 H₂O₂ 诱导的氧化应激损伤,可能与 Ghrelin 和 GHS-R1 α 相互作用,激活了 UCP2 蛋白表达,减少细胞中 ROS 含量、增加细胞膜电位进而改善线粒体功能有关。

参考文献

- [1] Potenza MA, Sgarra L, Desantis V, et al. Diabetes and Alzheimer's disease: might mitochondrial dysfunction help deci-

- phering the common path? [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10 (8): 1257.
- [2] 高星, 吕英雷, 魏依兰, 等. 糖尿病认知功能障碍机制研究进展 [J]. *承德医学院学报*, 2022, 39 (2): 155-159.
 - [3] 王成朋, 黄生维, 王淑美, 等. 玉液汤治疗糖尿病及其并发症临床应用概述 [J]. *实用中医药杂志*, 2022, 38 (5): 886-888.
 - [4] Kojima M, Hosoda H, Date Y, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach [J]. *Nature*, 1999, 402 (6762): 656-660.
 - [5] Dewanjee S, Chakraborty P, Bhattacharya H, et al. Altered glucose metabolism in Alzheimer's disease: role of mitochondrial dysfunction and oxidative stress [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 193 (Pt 1): 134-157.
 - [6] Banks WA. The blood-brain barrier interface in diabetes mellitus: dysfunctions, mechanisms and approaches to treatment [J]. *Curr Pharm Des*, 2020, 26 (13): 1438-1447.
 - [7] Karvani M, Simos P, Stavrakaki S, et al. Neurocognitive impairment in type 2 diabetes mellitus [J]. *Hormones (Athens)*, 2019, 18 (4): 523-534.
 - [8] Srikanth V. Type 2 diabetes, glycemia, and brain health: the complexity of causality [J]. *Diabetes*, 2021, 70 (10): 2187-2189.
 - [9] Lee SH, Park SY, Choi CS. Insulin resistance: from mechanisms to therapeutic strategies [J]. *Diabetes Metab J*, 2022, 46 (1): 15-37.
 - [10] Lee TH, Yau SY. From obesity to hippocampal neurodegeneration: pathogenesis and non-pharmacological interventions [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 22 (1): 201.
 - [11] Watt C, Sanchez-Rangel E, Hwang JJ. Glycemic variability and CNS inflammation: reviewing the connection [J]. *Nutrients*, 2020, 12 (12): 3906.
 - [12] Lebovitz HE. Thiazolidinediones: the forgotten diabetes medications [J]. *Curr Diab Rep*, 2019, 19 (12): 151.
 - [13] 陈璐, 聂永伟, 张燕欣, 等. 注射用丹参多酚酸对缺氧所致 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用及机制研究 [J]. *中南药学*, 2023, 21 (6): 1502-1508.
 - [14] Comeras LB, Herzog H, Tasan RO. Neuropeptides at the crossroad of fear and hunger: a special focus on neuropeptide Y [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2019, 1455 (1): 59-80.
 - [15] Pradhan G, Lee JH, Wu CS, et al. Mechanistic investigation of GHS-R mediated glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic islets [J]. *Biomolecules*, 2022, 12 (3): 407.
 - [16] Huang CC, Chou D, Yeh CM, et al. Acute food deprivation enhances fear extinction but inhibits long-term depression in the lateral amygdala via Ghrelin signaling [J]. *Neuropharmacology*, 2016, 101: 36-45.
 - [17] Ezquerro S, Becerril S, Tuero C, et al. Role of Ghrelin isoforms in the mitigation of hepatic inflammation, mitochondrial dysfunction, and endoplasmic reticulum stress after bariatric surgery in rats [J]. *Int J Obes (Lond)*, 2020, 44 (2): 475-487.
 - [18] Anbari DM, Al-Harithy RN. Ghrelin intronic lncRNAs, lnc-GHRL-3: 2 and lnc-GHRL-3: 3, as novel biomarkers in type 2 diabetes mellitus [J]. *Arch Physiol Biochem*, 2023, 129 (1): 241-245.
 - [19] Eslami M, Sadeghi B, Goshadrou F. Chronic Ghrelin administration restores hippocampal long-term potentiation and ameliorates memory impairment in rat model of Alzheimer's disease [J]. *Hippocampus*, 2018, 28 (10): 724-734.
 - [20] Hameed M, Khan K, Salman S, et al. Dose comparison and side effect profile of metformin extended release versus metformin immediate release [J]. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 2017, 29 (2): 225-229.
 - [21] Yanagi S, Sato T, Kangawa K, et al. The homeostatic force of Ghrelin [J]. *Cell metabolism*, 2018, 27 (4): 786-804.
 - [22] Zhao YX, Shen ZX, Zhang DL, et al. Ghrelin ameliorates nerve growth factor dysmetabolism and inflammation in STZ-induced diabetic rats [J]. *Metab Brain Dis*, 2017, 32 (3): 903-912.
 - [23] Kodali M, Attaluri S, Madhu LN, et al. Metformin treatment in late middle age improves cognitive function with alleviation of microglial activation and enhancement of autophagy in the hippocampus [J]. *Aging Cell*, 2021, 20 (2): e13277.
 - [24] 李娟, 吴良燕, 屈敏莉, 等. 非瑟素抑制 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞 tau 蛋白过度磷酸化 [J]. *中南药学*, 2018, 16 (11): 1505-1510.
 - [25] Satin LS, Soleimanpour SA, Walker EM. New aspects of diabetes research and therapeutic development [J]. *Pharmacol Rev*, 2021, 73 (3): 1001-1015.
 - [26] Ciarmiello A, Giovannini E, Riondato M, et al. Longitudinal cognitive decline in mild cognitive impairment subjects with early amyloid-beta neocortical deposition [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2019, 46 (10): 2090-2098.
 - [27] Peng XB, Xu ZH, Mo XX, et al. Association of plasma beta-amyloid 40 and 42 concentration with type 2 diabetes among Chinese adults [J]. *Diabetologia*, 2020, 63 (5): 954-963.
 - [28] Madhavadas S, Kutty BM, Subramanian S. Amyloid beta lowering and cognition enhancing effects of Ghrelin receptor analog [D-Lys (3)] GHRP-6 in rat model of obesity [J]. *Indian J Biochem Biophys*, 2014, 51 (4): 257-262.
 - [29] Zhou J, Li XY, Liu YJ, et al. Full-coverage regulations of autophagy by ROS: from induction to maturation [J]. *Autophagy*, 2022, 18 (6): 1240-1255.
 - [30] Steinberg GR, Carling D. AMP-activated protein kinase: the current landscape for drug development [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18 (7): 527-551.
 - [31] Besseiche A, Riveline JP, Delavallee L, et al. Oxidative and energetic stresses mediate beta-cell dysfunction induced by PGC-1alpha [J]. *Diabetes Metab*, 2018, 44 (1): 45-54.
 - [32] Stevenson RF, Zheng J, Mnatsakanyan L, et al. Hippocampal CA1 gamma power predicts the precision of spatial memory judgments [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115 (40): 10148-10153.

(收稿日期: 2024-09-07; 修回日期: 2024-11-07)

地黄九蒸九晒炮制工艺的优选及色度值、pH 值与 内在成分的相关性分析

马彦江^{1, 5}, 于兰兰^{2, 3*}, 陈天朝^{1, 4, 5}, 李蒙恩^{2, 3}, 史可⁴, 王梦珂⁴, 王春燕⁴ (1. 河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450000; 2. 河南省直第三人民医院, 郑州 450006; 3. 河南省中药高活性药物开发与临床应用研究工程技术研究中心, 郑州 4500062; 4. 河南中医药大学, 郑州 450008; 5. 陈天朝全国老药工传承工作室, 郑州 450000)

摘要: **目的** 采用 AHP-熵值混合加权法结合均匀设计法优选地黄九蒸九晒炮制工艺, 并分析色度、pH 值与内在成分的相关性。**方法** 以蒸制次数、蒸制时间、闷润时间、黄酒用量为考察因素, 选取多糖、地黄苷 D、益母草苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、5-羟甲基糠醛含量为内在成分评价指标, 采用 AHP-熵值混合加权法结合均匀设计法进行试验, 优选出地黄九蒸九晒炮制工艺, 测定地黄炮制品色度和 pH 值, 分析色度值、pH 值、化学成分间的相关性并建立相应的回归模型。**结果** 三种权重分析法综合评分得出地黄六蒸六晒, 蒸制时间 7 h、闷润时间 1 h、黄酒用量 60 mL 工艺下, 综合评分最高。数据分析结果说明 pH 值与地黄各化学成分的相关性极为显著, 所建立逐步回归模型 R^2 均 > 0.9 。部分色度指标参数对成分含量有显著影响。**结论** 所优化的工艺稳定、可行, 与预测值误差较小, 可为地黄九蒸九晒炮制古法的传承及其后续加工炮制的深入研究提供参考依据, 并且依据相关性及回归分析, pH 值、色度值也可纳入九蒸九晒地黄炮制工艺研究的考量指标。

关键词: 地黄; 九蒸九晒; AHP 法; 熵值法; 色度; pH 值

中图分类号: R284.1, R283 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)04-0941-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.011

Optimization of nine steaming and nine sun-drying processing for *Rehmannia glutinosa* and correlation between chromaticity, pH and components

MA Yan-jiang^{1, 5}, YU Lan-lan^{2, 3*}, CHEN Tian-chao^{1, 4, 5}, LI Meng-en^{2, 3}, SHI Ke⁴, WANG Meng-ke⁴, WANG Chun-yan⁴ (1. The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000; 2. The Third People's Hospital of Henan, Zhengzhou 450006; 3. Engineering Technology Research Center for Development and Clinical Application of Highly Active Chinese Medicine in Henan, Zhengzhou 450006; 4. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008; 5. Chen Tianchao National Inheritance Studio of Traditional Chinese Medicine Old Pharmacists, Zhengzhou 450000)

Abstract: Objective To optimize the processing of rehmannia glutinosa by combining AHP-entropy hybrid weighting combined with uniform design, and analyze the correlation between chromaticity, pH value and intrinsic components. **Methods** The steaming times, duration, moistening time, and amount of yellow wine were used as the evaluation factors. The contents of polysaccharides, rehmannioside D, leonuride, verbascoside, isoverbascoside, and 5-hydroxymethylfurfural were selected as the component evaluation indicators. The AHP-entropy hybrid weighting combined with uniform design and uniform design method were used in the experiments to optimize the nine

基金项目: 河南省中医药科学研究专项课题 (No.2023ZY2058, 2019ZY2137); 国家中医临床研究基地科研专项课题 (No.2019JDZX078); 国家中医药管理局中医药部门公共卫生服务补助资金项目 (No. 国中医规财发〔2015〕21号)。

作者简介: 马彦江, 男, 副主任药师, 主要从事中药炮制与制剂研究, email: 15237118286@163.com * **通信作者:** 于兰兰, 女, 主管药师, 主要从事中药炮制及中药新剂型研究, email: 18638392832@163.com

steaming and nine sun-drying processing for rehmannia glutinosa. The chromaticity and pH values of rehmannia glutinosa processed products were measured, and the correlation between chromaticity, pH values, and chemical components was determined and a corresponding regression model was established. **Results** The comprehensive score was obtained after three weight analysis methods, and the highest comprehensive score was obtained after six steamings and six sun-dryings of rehmannia glutinosa, with steaming time 7 hours, soaking time 1 hour, and yellow wine dosage at 60 mL. The data analysis indicated that the correlation between pH value and various chemical components of rehmannia glutinosa was highly significant, and the established stepwise regression models had R^2 values greater than 0.9. Some chromaticity index parameters had an obvious impact on the content of component. **Conclusion** The optimized process is stable, feasible, and had a small error as compared to the predicted values. It can provide a reference for the inheritance of the traditional method of nine steaming and nine sun-drying of rehmannia glutinosa and further research on its processing. Based on correlation and regression analysis, pH and chromaticity can also be considered as indicators in the study of nine steaming and nine-sun drying process for rehmannia glutinosa.

Key words: rehmannia glutinosa; nine steaming and nine sun-drying; AHP method; entropy method; chromaticity; pH value

地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的新鲜或干燥块根^[1], 首载于《神农本草经》, 列为上品, 以河南所产的质量为佳, 是著名的“四大怀药”之一, 地黄生品清热养阴, 经炮制后味甘性温, 能“滋肾水, 补真阴, 填骨髓, 生精血”^[2], 为治阴虚、血虚证之要药, 临床应用广泛。九蒸九晒法最早出现在南北朝时期, 系指利用反复蒸和晒的方法加工处理药材的一种古代炮制技术, 又称九蒸九曝^[3]。随着中医药事业的发展和对中药炮制品研究的深入, 现代研究者越来越重视传统的炮制技术, 因此九蒸九晒炮制古法受到广泛关注, 相较于单纯蒸制, 药材遵循九蒸九晒原则炮制后, 可以减毒增效、改变或缓和其性味及扩大其用药范围, 炮制作用十分明显。本实验以多糖、地黄苷 D、益母草苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、5-羟甲基糠醛 (5-HMF) 含量为评价指标, 采用 AHP-熵值混合加权法和均匀设计法, 优选地黄九蒸九晒的炮制工艺, 同时测定地黄的色度和 pH 值, 探究其与地黄内在成分的相关性, 以期地黄后续加工炮制的深入研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1260Agilent 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 科技有限公司); Thermo Evolution 201 紫外分光光度计 (美国赛默飞公司); BSA224S-CW 分析天平 (德国赛多利斯公司, 精度: 0.0001 g); Hk250 科导台式超声波清洗器 (上海科导超声仪

器有限公司); HH-S4A 电热恒温水浴锅 (北京科伟永兴仪器有限公司); FW-500 高速万能粉碎机 (北京科伟永兴仪器有限公司); GZX-9146MBE 电热鼓风干燥箱 (上海博讯实业有限公司); pH 计 pHSJ-3F (上海精密科学仪器有限公司); TLC VISUALIZER2 型薄层成像仪 (瑞士卡玛公司)。

1.2 试药

生地黄 (批号: 2201091, 产于河南, 购自安徽普仁中药饮片有限公司, 经河南中医药大学第一附属医院陈天朝主任药师鉴定为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的新鲜或干燥块根); 黄酒 (批号: SC1313211120009, 江苏恒顺醋业股份有限公司); 蒽酮 (上海蓝季生物有限公司, 批号: 220311); 对照品无水葡萄糖、地黄苷 D、益母草苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、5-HMF (纯度均 $\geq 98\%$, 上海源叶生物科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 均匀设计法设计炮制工艺

2.1.1 实验方案 在预实验的基础上, 选择蒸制次数、蒸制时间、闷润时间、黄酒用量为考察因素, 以多糖、地黄苷 D、益母草苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、5-HMF 含量为评价指标, 每个因素设 10 个水平, 选用均匀设计表 $U_{10}^*(10^8)$ 设计实验方案。

2.1.2 炮制方法 称取生地黄饮片 10 份, 每份 150 g, 按实验设计加入一定量的黄酒, 搅拌均匀, 将药材进行闷润, 闷润结束后进行反复隔水蒸制, 每次蒸制后置于 60℃ 下干燥 6 h, 最后一次蒸制干燥后, 取

出, 粉碎, 过五号筛, 备用。均匀试验的因素水平表见表 1。其中, X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 分别表示为蒸制次数、蒸制时间、闷润时间、黄酒用量。地黄饮片炮制品图片见图 1, 用首字母缩写代表其完整名称, 如地黄一蒸一制炮制品, 标记为 DH-1, 以此类推。

表 1 $U_{10}^*(10^8)$ 4 因素 10 水平均匀设计表

Tab 1 $U_{10}^*(10^8)$ 4 factors 10 levels evenly designed table

水平	因素			
	X_1 /次	X_2 /h	X_3 /h	X_4 /mL
1	1	3	3	90
2	2	6	7	90
3	3	9	0	75
4	4	1	4	75
5	5	4	8	60
6	6	7	1	60
7	7	10	5	45
8	8	2	9	45
9	9	5	2	30
10	10	8	6	30

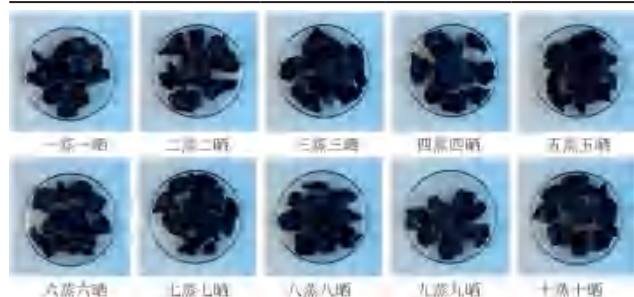


图 1 九蒸九晒地黄炮制品

Fig 1 Nine steaming and nine sun-drying processed products of rehmannia glutinosa

2.2 多糖的含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称无水葡萄糖对照品 30.42 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加纯水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得 $0.6084 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取地黄蒸制样品粗粉 0.2 g, 置具塞锥形瓶中, 加入 80% 乙醇 40 mL, 60°C 超声提取 2 h, 滤去乙醇提取液, 残渣挥干后, 加入 40 mL 纯水, 超声提取 1 h, 滤过, 滤液移至 100 mL 量瓶中, 加纯水定容, 即得。

2.2.3 多糖含量测定 取地黄各蒸制样品供试品溶液, 参照 2020 年版《中国药典》四部 (通则 0401) 中的紫外-可见分光光度法在 582 nm 处测定吸光度, 计算样品中多糖的含量。

2.3 地黄苷 D 和益母草苷的含量测定

2.3.1 色谱条件 Agilent 反相色谱柱 SB-C₁₈ (5 μm , 4.6 mm $\times$ 250 mm), 流动相: 乙腈 (A) -0.1% 磷酸水 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 1.5%A; 10 ~ 20 min, 1.5% ~ 3%A; 20 ~ 30 min, 3% ~ 15%A;

30 ~ 32 min, 15% ~ 1%A; 32 ~ 40 min, 1%A), 检测波长 203 nm, 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 25°C , 进样量 5 μL 。HPLC 图谱见图 2。

2.3.2 混合对照品溶液的制备 精密称取地黄苷 D 对照品 4.93 mg, 益母草苷对照品 20 mg, 分别置于 5、10 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇溶解并定容至刻度, 配制成质量浓度分别为 0.986 、 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液; 取地黄苷 D 和益母草苷对照品溶液各 1 mL, 置于同一个 10 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇混匀并定容至刻度, 即得混合对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液①的制备 精密称取地黄样品粉末约 1.0 g, 分别置于具塞锥形瓶中, 加入 50% 甲醇 25 mL, 称定重量, 超声处理 60 min, 冷却至室温, 再次称量, 用 50% 甲醇补足失重, 取上清液 2 mL, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得供试品溶液。

2.4 毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷的含量测定

2.4.1 色谱条件 Agilent 反相色谱柱 SB-C₁₈ (5 μm , 4.6 mm $\times$ 250 mm), 流动相: 乙腈 -0.1% 磷酸水 (16 : 84), 检测波长 330 nm, 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 25°C , 进样量 5 μL 。HPLC 图谱见图 2。

2.4.2 混合对照品溶液的制备 精密称取毛蕊花糖苷对照品 11.61 mg, 异毛蕊花糖苷对照品 10.38 mg, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇溶解并定容至刻度, 配制成质量浓度分别为 1.161 、 $1.038 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 取两种对照品溶液各 1 mL, 置于同一个 10 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇溶解并定容至刻度, 即得混合对照品溶液。

2.4.3 供试品溶液②的制备 精密称取地黄生品及蒸制样品粉末约 1.0 g, 同“2.3.3”项下方法制备供试品溶液。

2.5 5-HMF 的含量测定

2.5.1 色谱条件 Agilent 反相色谱柱 SB-C₁₈ (5 μm , 4.6 mm $\times$ 250 mm), 流动相: 甲醇 - 水 (8 : 92), 检测波长 284 nm, 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 25°C , 进样量 5 μL 。HPLC 图谱见图 2。

2.5.2 对照品溶液的制备 精密称取 5-HMF 对照品 20 mg 置于 50 mL 量瓶内, 加 80% 甲醇溶解并定容至刻度, 配制成质量浓度为 $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.5.3 供试品溶液③的制备 精密称定地黄样品粉末 1.0 g, 置于具塞锥形瓶中, 加入 50% 甲醇 25 mL, 称重, 超声处理 60 min, 冷却至室温, 再次称重, 50% 甲醇补足失重, 摇匀滤过, 取上清液, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 即得。

2.6 各指标成分标准曲线的绘制

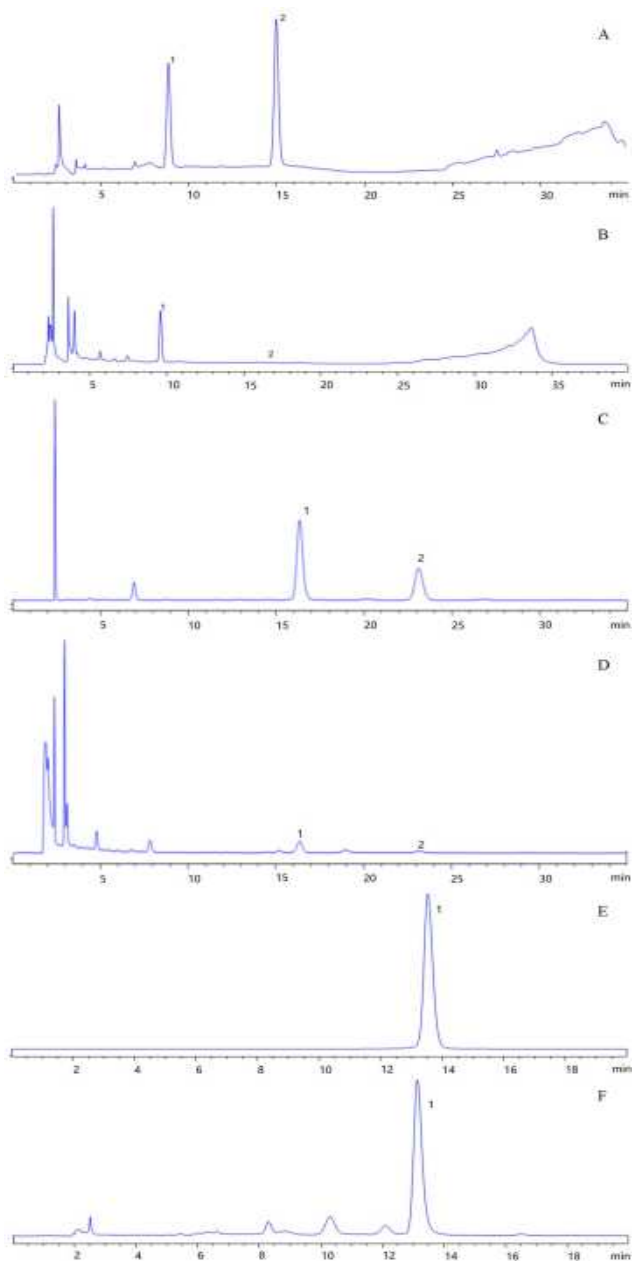


图 2 地黄中各指标成分对照品与供试品 HPLC 图
Fig 2 HPLC chromatogram of reference and test samples for each indicator component in rehmannia glutinosa

注 (Note): A. 对照品 (reference substance); B. 供试品① (1. 地黄苷 D, 2. 益母草苷) [test substance (1. rehmamioside D, 2. leonuride)]; C. 对照品 (reference substance); D. 供试品② (1. 毛蕊花糖苷, 2. 异毛蕊花糖苷) [test samples (1. verbascoside, 2. isoverbacoside)]; E. 对照品 (reference substance); F. 供试品③ (1. 5-HMF) [test sample (1. 5-HMF)]。

取各指标成分对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 逐级稀释, 以对照品浓度梯度为横坐标, 以峰面积为纵坐标建立标准曲线, 进行线性回归, 结果见表 2。

2.7 方法学考察及含量测定

根据 2020 年版《中国药典》, 分别从精密度、

表 2 九蒸九晒地黄炮制品中 6 种指标成分线性关系考察结果
Tab 2 Linear relationship of 6 index components in nine steamed and nine sun-drying rehmannia glutinosa processed products

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围 / (mg · mL ⁻¹)
多糖	$Y = 31.589X - 0.0099$	0.9999	0.0031 ~ 0.0183
地黄苷 D	$Y = 2.5518X - 142.273$	0.9983	0.1000 ~ 0.6000
益母草苷	$Y = 2.1787X - 7.4364$	0.9997	0.0160 ~ 0.1200
毛蕊花糖苷	$Y = 4.5426X - 0.4204$	0.9994	3.1250 ~ 100
异毛蕊花糖苷	$Y = 4.0175X - 1.1744$	0.9997	1.2000 ~ 300
5-HMF	$Y = 49.591X - 17.081$	0.9999	6.2500 ~ 200

重现性、稳定性以及加样回收率对方法学进行考察。其中各成分精密度的 *RSD* < 1.5%, 重现性的 *RSD* < 3.1%, 稳定性的 *RSD* < 5.0%, 加样回收率 > 100%, 说明精密度、重现性及稳定性良好, 加样回收率符合要求。对各样品进行含量测定, 结果见表 3。

2.8 pH 值的测定

分别精密称取地黄炮制品饮片约 5.0 g、细粉约 1.0 g, 置于 150 mL 锥形瓶内, 浸入 50 mL 纯化水中, 浸泡 8 h, 过滤, 用 pH 计进行测定, 平行测定 3 次, 取平均值, 结果见表 4。

2.9 色度的测定

取地黄各样品及细粉, 分别放置于干净透明的培养皿中, 均匀平铺, 把培养皿置于薄层扫描仪中, 调至透色光模式, 采集图像, 将采集好的图像用 Adobe Photoshop CC2019 软件打开, 选取拾色器, 随机多次取点, 并记录 *L*^{*}、*a*^{*}、*b*^{*} 的平均值, 计算总色差 (ΔE^*) 值, 色差值计算公式为 $\Delta E^* = [(L^*)^2 + (a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2}$ 。结果见表 4。

2.10 数据分析

2.10.1 三种权重分析法各指标权重系数确定

① AHP 法是一种定性、定量相结合的主观赋权分析方法。本研究依据地黄各成分炮制前后含量的增减变化, 确定各指标优先顺序为: 地黄苷 D > 毛蕊花糖苷 = 异毛蕊花糖苷 > 益母草苷 > 多糖 > 5-HMF, 据此构建各指标成对比较的判断优先矩阵, 利用 SPSSAU 在线软件 (<https://spssau.com>) 中的 AHP 层次分析, 计算得出地黄苷 D、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、益母草苷、多糖、5-HMF 的权重系数分别为 0.2632、0.2105、0.2105、0.1579、0.1053、0.0526。

② 熵值法是一种客观赋权方法, 可减少主观赋权所产生的偏差。利用 SPSSAU 在线软件 (<https://spssau.com>) 对数据进行“正向化”处理, 再进行“熵值法”权重分析计算得出地黄苷 D、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、益母草苷、多糖、5-HMF 的权重系数分别为 0.2244、0.1699、0.1095、0.2025、0.0840、0.2097。

表 3 均匀设计实验方案及含量测定结果 (mg · g⁻¹)
Tab 3 Uniform design test and content determination (mg · g⁻¹)

名称	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	多糖	地黄苷 D	益母草苷	毛蕊花糖苷	异毛蕊花糖苷	5-HMF
DH-1	1	3	3	90	7.6195	3.5932	1.1674	0.3103	0.0936	0.3350
DH-2	2	6	7	90	8.0043	3.8669	0.8396	0.2915	0.1146	0.7474
DH-3	3	9	0	75	6.7516	11.9514	0.6646	0.2489	0.1136	4.7708
DH-4	4	1	4	75	8.0139	3.5932	1.2683	0.4630	0.1330	0.3172
DH-5	5	4	8	60	7.7769	10.3442	0.7736	0.2265	0.1085	3.9766
DH-6	6	7	1	60	9.4907	18.7863	0.6964	0.1304	0.0738	7.9092
DH-7	7	10	5	45	8.7255	21.1259	0.6908	0.0762	0.0418	8.9676
DH-8	8	2	9	45	7.8370	11.6095	0.6850	0.2441	0.1021	4.4634
DH-9	9	5	2	30	8.8773	18.9685	0.5925	0.1333	0.0667	7.9498
DH-10	10	8	6	30	6.2491	19.8827	0.7450	0.0998	0.0682	8.4818

表 4 地黄炮制品饮片与粉末 Lab 值、pH 值含量测定结果
Tab 4 Lab value and pH content determination of Rehmannia processed pieces and powder

名称	饮片 L [*]	饮片 a [*]	饮片 b [*]	饮片 ΔE [*]	粉末 L [*]	粉末 a [*]	粉末 b [*]	粉末 ΔE [*]	饮片 pH	粉末 pH
DH-1	21.67	8.33	— 32.00	39.53	25.00	13.00	18.67	33.80	3.50	5.44
DH-2	50.00	— 13.00	— 8.00	52.28	6.67	28.00	15.67	32.77	3.26	5.14
DH-3	23.00	8.00	— 31.33	39.68	36.00	42.00	27.00	61.55	2.99	4.84
DH-4	40.67	— 11.00	— 24.67	48.82	43.00	— 7.33	26.67	51.13	3.52	5.43
DH-5	43.67	4.00	— 30.00	53.13	36.67	42.00	47.00	72.92	3.01	4.88
DH-6	15.00	38.00	— 55.00	68.51	7.00	34.00	— 22.00	41.10	2.87	4.56
DH-7	29.33	26.00	5.00	39.52	19.33	22.33	10.67	31.41	2.87	4.33
DH-8	44.00	4.33	— 6.33	44.66	6.00	14.67	— 34.00	37.51	3.01	4.91
DH-9	42.33	— 7.33	— 32.00	53.57	20.33	— 5.00	26.67	33.91	2.79	4.49
DH-10	21.33	10.67	— 28.67	37.29	7.00	24.33	11.33	27.74	2.77	4.35

③ AHP-熵值法是从主观和客观两方面综合考虑,可更加合理地计算权重系数,计算公式见式 1。经计算得出地黄苷 D、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、益母草苷、多糖、5-HMF 的权重系数分别为 0.3480、0.2107、0.1358、0.1884、0.0521、0.0650。

$$\omega_{\text{综合}ij} = \omega_{\text{AHP}ij} \times \omega_{\text{熵值}ij} / \sum \omega_{\text{AHP}ij} \times \omega_{\text{熵值}ij} \quad (\text{式 1})$$

2.10.2 三种权重分析方法综合评分的比较 用上述三种权重系数,根据式 2 计算综合评分 (Y),式 3 计算各工艺下平均综合评分 (Y_{平均}),结果见表 5。地黄六蒸六晒、蒸制时间 7 h、闷润时间 1 h、黄酒用量 60 mL 工艺下 (DH-6) 的综合评分最高。

$$Y = (Y_{1i}/Y_{1\max}) \times 100\% + (Y_{2i}/Y_{2\max}) \times 100\% + \dots + (Y_{6i}/Y_{6\max}) \times 100\% \quad (\text{式 2})$$

$$Y_{\text{平均}} = (Y_1 + Y_2 + Y_3) \quad (\text{式 3})$$

2.10.3 工艺验证

① 重复验证:称取生地黄饮片 3 份,每份 150 g,按优化工艺进行验证实验,对地黄九蒸九晒炮制品的指标成分进行含量测定,结果见表 6。3 份样品所测得的成分含量相近,平均综合评分为 92.7193 分, RSD 值为 2.1%,与预测值 (95.12 分) 的相对误差为 -2.52%,表明优选的地黄九蒸九制工艺稳定、可行。

表 5 三种赋权方法的综合评分
Tab 5 Comprehensive scores of the three ways of empowerment methods

样本名称	AHP 法	熵权 TOPSIS 法	AHP-熵权 TOPSIS 法	平均评分
DH-1	56.5826	49.0757	51.3638	52.3407
DH-2	55.9803	46.4767	48.7442	50.4004
DH-3	62.7488	58.9241	59.6498	60.4409
DH-4	71.4442	59.8414	64.0382	65.1079
DH-5	60.9497	56.7657	57.0686	58.2613
DH-6	64.8533	68.8299	65.7031	66.4621
DH-7	59.9414	68.3999	64.0871	64.1428
DH-8	61.5625	58.0055	58.3700	59.3126
DH-9	62.1381	66.4384	63.5596	64.0453
DH-10	61.2861	67.6564	64.9023	64.6149

② 本实验因素水平验证:利用 DPS 软件对均匀设计试验的综合评分进行二次多项式回归分析处理,得回归方程,将本研究中四个因素水平代入拟合方程 (Y = 47.4878 + 2.7672X₃ - 0.2862X₃² - 0.0167X₁X₂ + 0.0517X₁X₄ - 0.0209X₃X₄, R = 0.9921, P = 0.0011) 中,对本实验方案进行综合评分,结果见表 7。采用 Origin 软件对拟合的回归方程评分与权重分析法平均评分结果进行比较,结果见图 3。可知拟合的回归方程评分与权重评分趋势相近,

表 6 工艺验证结果 (mg · g⁻¹)
Tab 6 Craft verification results (mg · g⁻¹)

编号	多糖	地黄苷 D	益母草苷	毛蕊花糖苷	异毛蕊花糖苷	5-HMF
1	8.0112	10.2888	0.9022	0.3012	0.0834	6.0424
2	7.9004	10.4902	0.8978	0.3187	0.0797	6.0002
3	8.0063	10.7884	0.8848	0.3003	0.0803	5.9862

再次验证表明回归方程的有效性，其预测的最佳工艺具有较高的可信度。

表 7 实验方案回归方程综合评分
Tab 7 Comprehensive score of experimental plan regression equation

X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	评分
1	3	3	90	52.1735
2	6	7	90	48.7730
3	9	0	75	58.6694
4	1	4	75	63.1506
5	4	8	60	56.4526
6	7	1	60	66.6254
7	10	5	45	64.5828
8	2	9	45	59.0907
9	5	2	30	63.8309
10	8	6	30	64.1998

2.10.4 相关性分析

① pH 值、色度与内在成分的相关性分析：采用 IBM SPSS25.0 软件对地黄各样品的 pH 值、色度、化学成分进行 Pearson 相关性分析，相关性结果见表 8，结果显示饮片与粉末的 pH 值均与地黄苷 D、5-HMF 含量呈显著负相关，与益母草苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷含量呈显著正相关，

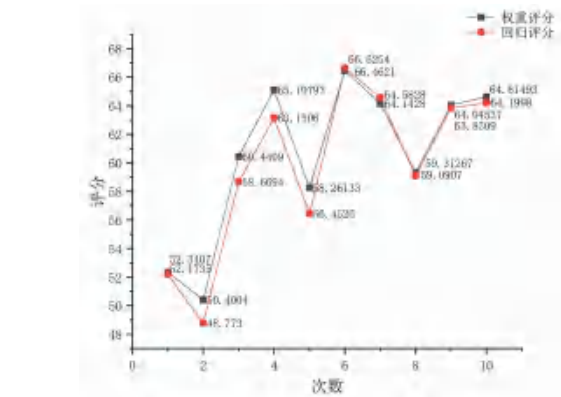


图 3 权重评分与回归评分比较图
Fig 3 Comparison between weight score and regression score

可见在炮制过程中，随着指标成分的变化，药材 pH 会相应发生改变。因此，利用指标成分表征炮制品质量的综合评分时，可建立与 pH 值的回归关系，从而利用简单可测的 pH 值来预测炮制品的质量。粉末 L* 与益母草苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷含量呈显著正相关。L* 表示的是药材色度值中的亮度，炮制过程中即随着指标含量的增加，饮片越光亮，这与传统工艺评价中“黑如漆”的客观描述是一致的。

表 8 相关性分析
Tab 8 Correlation analysis

名称	多糖	地黄苷 D	益母草苷	毛蕊花糖苷	异毛蕊花糖苷	5-HMF
饮片 pH 值	- 0.130	- 0.930 ^{###}	0.938 ^{###}	0.909 ^{###}	0.774 ^{###}	- 0.940 ^{###}
粉末 pH 值	- 0.174	- 0.899 ^{###}	0.897 ^{###}	0.973 ^{###}	0.915 ^{###}	- 0.904 ^{###}
饮片 ΔE [#]	0.660 [#]	0.260	- 0.451	- 0.433	- 0.403	0.265
粉末 L [#]	- 0.193	- 0.496	0.621 [#]	0.686 [#]	0.649 [#]	- 0.499

注：[#]P < 0.05；^{###}P < 0.01。

Note: [#]P < 0.05；^{###}P < 0.01.

② 饮片和粉末 pH 值与内在成分的逐步回归分析：pH 是药材的物理性质，用以表征药材中游离的 H⁺浓度的大小，指标成分中多以含 H 有机物为主，在炮制过程中，经过一系列转化会使药材中游离 H⁺浓度发生变化，因此，可建立 pH 与指标成分的回归模型，寻找其量值关系。以饮片 pH 值为因变量，以地黄苷 D、益母草苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、5-HMF 为自变量，进行逐步回归分析（选择逐步 stepwise 法），经过模型识别，保留益母草苷、5-HMF 两项显著自变量，其 R² 为 0.976，表征益母草苷、5-HMF 可以解释饮片 pH 值的 97.6%

变化原因，且模型通过 F 检验 (F = 205.766, P < 0.05)，说明模型有效。模型公式为：Y_{饮片 pH 值} = 2.806 + 0.579X_{益母草苷} - 0.045X_{5-HMF}。以粉末 pH 值为因变量，以地黄苷 D、益母草苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、5-HMF 为自变量，进行逐步回归分析，模型 F 检验 (F = 160.335, P < 0.05)，R² = 0.945，说明模型有效。模型公式为：Y_{粉末 pH 值} = 4.098 + 3.331X_{毛蕊花糖苷}。由方程可知，随着毛蕊花糖苷和益母草苷含量的增加，pH 值增大，药材中游离 H⁺浓度减少，随着 5-HMF 含量增加，pH 减小，药材中游离 H⁺浓度增大。另外，回归模型的建立也可通

过简单 pH 值的测定预测指标成分的含量变化范围。

③ 成分含量与 pH、色度的 PLS 分析：将测得的成分含量数据与 pH 值、色度值数据导入 SIMCA 14.1 软件，以 pH 值、色度值为自变量，成分含量为因变量，建立 PLS 模型，建立的 PLS 模型 $R^2X = 0.998$, $R^2Y = 0.983$, $Q^2 = 0.609$ ，说明建立的模型稳定。根据 VIP 值 > 1 原则，可发现粉末 b^* 、粉末 L^* 、饮片 a^* 、粉末 ΔE^* 对地黄各成分含量有显著影响。VIP 值结果见图 4。

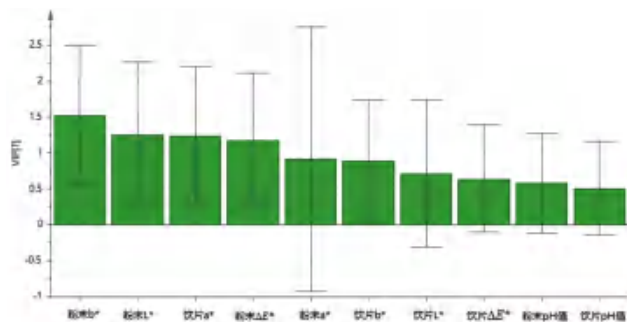


图 4 九蒸九晒地黄的 VIP 值结果

Fig 4 VIP value results of nine steaming and nine-drying rehmannia glutinosa

3 讨论

目前，评价中药饮片的质量标准主要由外观颜色和化学成分等因素确定^[4]。中药饮片的外观性状作为中药质量评价的外在表达，能够凭经验去鉴定药材的真伪优劣^[5]，此方法虽然简单方便，但容易受到主观因素和环境因素等影响，客观性难以保证^[6]。近年来，随着我国在检测技术方面的进步，将中药指纹图谱技术作为评价中药质量的重要指标，但由于中药饮片的化学成分较为复杂^[7]，中药的药效由多种成分相互作用而产生，仅检测中药中某一种指标成分无法代表中药的整体疗效，而中药指纹图谱适用于定性分析，较难实现定量分析^[8]。本实验基于“中医整体观念”为重要指导思想，以“有限个代表性成分”为指标的综合评价体系，采用 AHP-熵值法将主客观多指标相结合综合评价控制中药饮片的质量，将中药的质量评价标准多元化、注重整体性^[9]。

研究指出地黄的主要化学成分有环烯醚萜类、苯乙醇类、蔗糖、甘露三糖、氨基酸等^[10]，其中地黄苷 D 为 2020 年版《中国药典》地黄项下规定的含量测定指标，具有滋阴、补血及降血糖活性^[11]，地黄苷 D 和益母草苷均为环烯醚萜类成分，具有保护神经、抗菌、抗肿瘤、抗病毒、清热的药理作用，并且对心血管也有一定的保护作用^[12]；毛蕊花糖苷对免疫和神经系统均具有很好

的调节作用，特别是在治疗阿尔茨海默病以及慢性肾炎方面，发挥出显著的疗效^[13]；异毛蕊花糖苷能够保护神经，具有抗菌抗炎、酶抑制以及免疫调节的作用^[14]；地黄多糖能够改善血虚型模型小鼠的造血功能^[15]，并且具有抗衰老、抗肿瘤、调节免疫系统、增强机体免疫功能的作用^[16]。因此，选择以上指标符合“中医整体观念”的思想，具有一定的研究意义。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 129.
- [2] [清]汪昂. 本草备要[M]. 王德群, 张珂, 张玲校注. 北京: 中国中医药出版社, 2009: 10.
- [3] 吴思俊, 王龙, 赵铭威, 等. 中药九蒸九晒炮制技术研究进展[J]. 中南药学, 2022, 20(9): 2015-2022.
- [4] 王梦珂, 王梦伟, 李蒙恩, 等. 基于 AHP-熵权法的白附子有效成分与颜色值的相关性研究[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(12): 125-131, 296.
- [5] 李蒙恩, 马彦江, 姚超, 等. 基于九蒸九制黄精中 5-HMF 和多糖含量分析的黄精炮制品质量评价模型的建立[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(8): 1897-1900.
- [6] 叶洵, 梁琪, 王丹, 等. 中药饮片质量标准化性状数字化研究的进展[J]. 世界中医药, 2022, 17(9): 1240-1245.
- [7] 王梦珂, 王梦伟, 陈天朝. 酒醋盐炙丹参物性指标与脂溶性成分关联性分析[J]. 中国中医药信息杂志, 2023, 30(1): 135-141.
- [8] 邹纯才, 鄢海燕. 我国中药色谱指纹图谱相似度评价方法 30 年(1988—2017 年)研究进展与展望[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(10): 1969-1977.
- [9] 欧则民, 王锦玉, 张冰冰, 等. 基于 AHP-CRITIC 优选茯苓舒痉颗粒的提取工艺[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(13): 3481-3487.
- [10] 周丽. 基于整体观的地黄“九蒸九制”质/效评价研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2017.
- [11] 徐雄飞, 王海燕, 何清. 熟地黄配方颗粒和标准汤剂中地黄苷 D 的含量测定[J]. 江西中医药大学学报, 2022, 34(4): 86-88, 94.
- [12] 杜亚朋, 王美, 李璐遥, 等. 基于化合物稳定性探讨炮制对含环烯醚萜类成分中药药性及功效影响的研究进展[J]. 中草药, 2021, 52(16): 5039-5051.
- [13] 尚伟庆, 贺清辉, 张建军. 地黄炮制过程中毛蕊花糖苷变化的研究[J]. 新中医, 2014, 46(5): 209-211.
- [14] 王敏, 刘欢欢, 张婷, 等. 基于化学特征和核心功效的经典名方清胃散中地黄炮制品研究[J]. 中草药, 2022, 53(13): 3940-3952.
- [15] 崔瑛, 颜正华, 侯士良, 等. 论熟地黄的益智作用与研究思路[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(6): 7-9, 59.
- [16] 林好. 不同炮制工艺熟地黄主要成分分析及对大鼠卵巢颗粒细胞的活性影响[D]. 广州: 广州中医药大学, 2019.

(收稿日期: 2024-06-20; 修回日期: 2024-07-20)

以 PD-L1 为靶点的核酸适配体类 PET 显像药物 ^{68}Ga -NOTA-PEG₅-AT45 的设计、合成以及肿瘤显像研究

陈小娟, 欧阳林旗* (湖南中医药大学第一附属医院药学部, 长沙 410208)

摘要: **目的** 设计并合成 PET 显像药物 ^{68}Ga -NOTA-PEG₅-AT45, 研究其特异性显像肿瘤组织中 PD-L1 表达水平的能力。**方法** 设计并合成 NOTA-PEG₅-AT45 后用 ^{68}Ga 对 NOTA-PEG₅-AT45 进行放射性标记得 ^{68}Ga -NOTA-PEG₅-AT45, 并用高效液相色谱仪检测其放化纯度, 同时在细胞、组织和动物水平评估其对 PD-L1 的特异性靶向能力。**结果** 合成的 ^{68}Ga -NOTA-PEG₅-AT45 具有较高的放化产率 (86.7%) 和放化纯度 (> 95%), 在肿瘤细胞中有较高的细胞摄取, 并能高特异性地对 PD-L1 阳性的皮下移植瘤进行清晰的 PET/CT 成像。**结论** ^{68}Ga -NOTA-PEG₅-AT45 对 PD-L1 有较高的靶向特异性, 可实现对 PD-L1 阳性肿瘤的 PET/CT 靶向成像。

关键词: 核酸适配体; PET 显像; PD-L1

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)04-0948-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.012

Design, synthesis, and tumor imaging of a new aptamer PET imaging drug ^{68}Ga -NOTA-PEG₅-AT45 for targeting PD-L1

CHEN Xiao-juan, OU-YANG Lin-qi* (Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208)

Abstract: Objective To design and synthesis PET imaging drug ^{68}Ga -NOTA-PEG₅-AT45, and study its ability to specifically visualize PD-L1 expression levels in tumor tissues. **Methods** The aptamer NOTA-PEG₅-AT45 for targeting PD-L1 was labeled with ^{68}Ga , and the radiochemical purity was detected by high performance liquid chromatography. The targeting ability for PD-L1 was evaluated at the cellular and in vivo levels. **Results** The synthesized ^{68}Ga -NOTA-PEG₅-AT45 had high yield (86.7%) and radiochemical purity (more than 95%), and had good targeting specificity for PD-L1 on the cell membrane. It could also target PD-L1-positive subcutaneous xenografts with clear and specific PET/CT imaging. **Conclusion** ^{68}Ga -NOTA-PEG₅-AT45 has good targeting specificity for PD-L1, which can be used for PET/CT targeted imaging on PD-L1 positive tumors.

Key words: nucleic acid aptamer; PET imaging; PD-L1

癌症是我国居民过早死亡的首要原因, 也是目前全球多个国家居民过早死亡的主要原因之一^[1]。2020 年全球新增癌症病例 1930 多万例, 癌症死亡病例将近 1000 万例, 预计到 2040 年, 全球癌症患者将达到 2840 万例, 比 2020 年增长高达 50%^[2]。包括免疫检查点抑制剂、细胞过继治疗和肿瘤疫苗在内的免疫治疗是近十年来肿瘤治疗的热门选择, 尤其是以程序性死亡受体 1 (PD-1) / 程序性死亡配体 1 (PD-L1) 为主的免疫检查

点抑制剂 (immune checkpoint inhibitors, ICIs) 疗法, 改变了 15% ~ 30% 晚期癌症患者的治疗格局, 带来了更多的生存获益, 但大多数癌症患者对 PD-1/PD-L1 阻断治疗没有反应^[3-5]。而这些靶向 PD-1/PD-L1 的 ICIs 抗体成本均不低。因此, 寻找一种能预测免疫治疗疗效的方法是非常迫切的, 以选择最有可能治疗获益的患者, 使无反应者免于不必要的经济负担和可能出现的不良反应。目前临床主要通过穿刺肿瘤组织的 PD-L1 免疫组

作者简介: 陈小娟, 女, 硕士研究生, 主要从事放射性药物研究, email: 510783010@qq.com * 通信作者: 欧阳林旗, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事药物分析方向的研究, email: oylq03@163.com

化结果来筛选患者。但由于抗肿瘤免疫反应具有动态性、空间异质性以及时间异质性等特性,仅通过某一部位一个时间点的免疫组化结果选择患者是不够准确的。能提供全身显像的正电子发射断层显像/X线计算机断层成像(position emission tomography/computed tomography, PET/CT)无创分子成像方法,目前被认为是最有可能预测疗效的检查手段, PET/CT 靶向显像可以一次成像,显示肿瘤的原发灶和转移灶的靶分子表达情况,解决了肿瘤空间异质性的问题。它又是无创检查,可以在患者治疗过程中多次显像,动态观察靶分子变化状况,解决了肿瘤动态变化和时间异质性的问题,为肿瘤患者的诊疗决策提供关键信息。因此,如果能够研发可以特异性靶向 PD-L1 的显像药物实现对患者体内肿瘤的 PD-L1 表达水平的无创显像并精准定量,实现对患者免疫治疗疗效的预测,具有重要的临床意义。

适配体是由 DNA、RNA 或修饰 RNA 的单链人工寡核苷酸序列构成,能够与靶分子相互作用并特异性结合折叠形成三维结构,亲和力在皮摩尔到纳摩尔范围内,类似于单克隆抗体(MoAb)^[6]。而且适配体可以区分密切相关的蛋白质或其他分子,对靶点的诊断具有高度特异性^[7]。近年来已有多个研究用放射性核素标记适配体用以单光子发射计算机断层成像(single-photon emission computed tomography, SPECT)或 PET/CT,取得了良好的显像效果^[8-11]。文献调研发现核酸适配体序列 5'-ACG GGC CAC ATC AAC TCA TTG ATA GAC AAT GCG TCC ACT GCC CGT-3' (AT45) 对 PD-L1 具有较好的靶向性^[12],可以作为 PET 显像药物的模板化合物。为了对该化合物进行放射性标记以实现 PET 显像,且确保稳定、高效及便捷的标记工艺,本团队对原结构进行了 NOTA (1, 4, 7-triazacyclononane-*N*, *N'*, *N''*-triacetic acid) 修饰以用于螯合金属放射性核素,并选用 PEG 链作为连接臂将 NOTA 与核酸适配体进行偶联。放射性核素选用半衰期为 67.7 min 的 ⁶⁸Ga,拟采用经典的螯合标记方法进行标记。因此,本研究拟以 AT45 为基础,为了不影响原核酸适配体结构活性,在 5' 端引入 PEG₅ 作为连接基团并修饰上螯合基团 NOTA,实现设计并合成了放射性标记前体 NOTA-PEG₅-AT45,并通过放射性核素 ⁶⁸Ga 进行标记,得到 PET 显像药物 ⁶⁸Ga-NOTA-PEG₅-AT45,并在细胞和动物水平评估它对肿瘤中 PD-L1 的靶向性。

1 材料

1.1 仪器

高效液相色谱仪(HPLC)(安捷伦科技有限公司, 1260), 干热灭菌箱(上海一恒科学仪器有限公司), 冰箱(青岛海尔生物股份有限公司), 倒置生物显微镜及生物显微镜(蔡司科技有限公司), 二氧化碳培养箱(上海力申科学仪器有限公司), 生物安全柜(新加坡艺思高公司), γ 自动计数仪(美国 PerkinElmer 股份有限公司), 电子天平(奥豪斯仪器有限公司), nanoScan PET/CT (Mediso Medical Imaging Systems), 气体麻醉机(湖南杨桥射线防护器材有限公司), 活度计(北京恒益德科技有限公司), 超纯水机(湖南启沁环保科技有限公司)。

1.2 试药、细胞及实验动物

鼠源黑色素瘤细胞株 B16、结肠癌细胞株 CT26、人胚成纤维细胞 KMST-6 以及胰腺癌细胞株 PANC02 (中国科学院细胞库), 磷酸盐缓冲液(PBS)溶液、0.5% 胰蛋白酶、RPMI 1640 培养基、DMEM 高糖培养基(武汉普诺赛生物科技有限公司), 抗 PD-L1 抗体及二抗(美国 CST 生命科学公司), 靶向 PD-L1 适配体(上海生工生物工程股份有限公司), 胎牛血清(以色列生物科技公司), C57 小鼠(6~8 周)[中南大学动物学部, 合格证号为 SYXK(湘)2023-0006, 所有动物实验均按照指南进行, 并经中南大学动物护理和使用委员会批准(CSU-2022-0290)]。

2 方法与结果

2.1 放射性显像药物 ⁶⁸Ga-NOTA-PEG₅-AT45 标记前体的合成

放射性标记前体 NOTA-PEG₅-AT45 (5'-NOTA-PEG₅-ACG GGC CAC ATC AAC TCA TTG ATA GAC AAT GCG TCC ACT GCC CGT-3') 由上海生工生物工程股份有限公司合成, 并进行了氢谱、碳谱和质谱验证, 见图 1。

2.2 ⁶⁸Ga-NOTA-PEG₅-AT45 的制备

取 25~30 μ g 标记前体化合物 NOTA-PEG₅-AT45, 加入 1 mL 0.25 mol·L⁻¹ NaOAc 水溶液, 混匀, 获得 NOTA-PEG₅-AT45 溶液, 将 4 mL 0.05 mol·L⁻¹ HCl 淋洗的 30 mCi ⁶⁸Ga 加入到 NOTA-PEG₅-AT45 溶液中, 90℃ 反应 10 min。再向其中加入 10 mL 去离子水以发生猝灭反应; 随后反应体系过 C₁₈ Plus 柱进行富集, 用 10 mL 去离子水, 再依次用 1 mL 乙醇和 10 mL 生理盐水将产物淋洗至装有滤膜的产品瓶中, 获得 26 mCi 靶向 PD-L1 的 PET 分子探针 ⁶⁸Ga-NOTA-PEG₅-AT45, 放化产率为 86.7%。取 0.1 mL 浓度 0.2 mCi·mL⁻¹ 的探针溶液

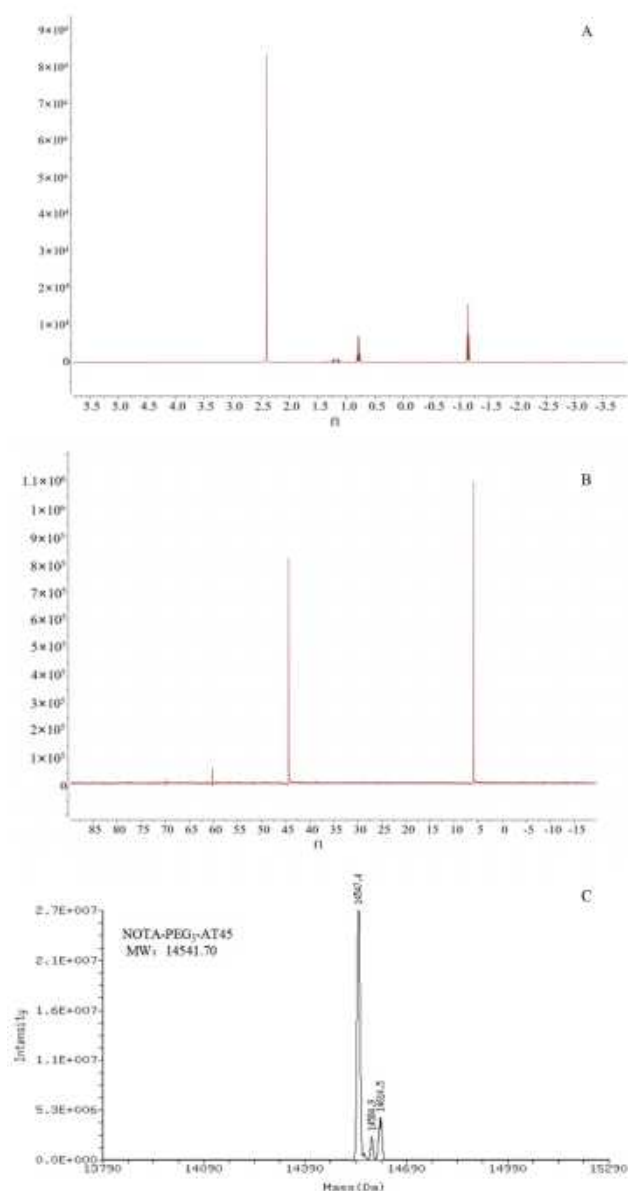
图1 NOTA-PEG₅-AT45 的氢谱 (A)、碳谱 (B) 和质谱图 (C)

Fig 1 ¹H-NMR (A), ¹³C-NMR (B) and mass spectrum (C) of NOTA-PEG₅-AT45

在高效液相色谱仪上进行放化纯度检测, 其中色谱柱为 ZORBAX SB-C18 (5 μm, 4.6 mm×150 mm), 流动相为 10% 乙腈溶液, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测器为放射检测器。结果显示 ⁶⁸Ga-NOTA-PEG₅-AT45 探针的放化纯度 > 95%, 见图 2。

2.3 细胞摄取

B16、CT26 和 KMST-6 细胞用添加了 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素双抗的 RPMI 1640 培养基在含 5%CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养; PANC02 细胞用添加了 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素双抗的 DMEM 高糖培养基在含 5%CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养。将 3 种生长状态良好的适量肿瘤细胞 B16、CT26、PANC02 分别在 24 孔板中培养, 形成单层贴壁细胞后取出,

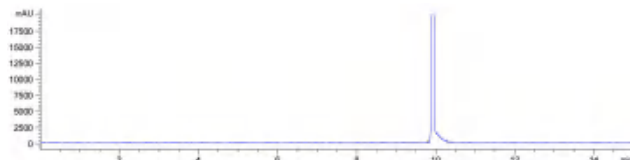
图2 ⁶⁸Ga-NOTA-PEG₅-AT45 探针的放化纯度图

Fig 2 Radiochemical purity map of the ⁶⁸Ga-NOTA-PEG₅-AT45

去掉培养基加入 0.5 mL 无血清培养基以洗去表面死去或脱落的细胞。阻断组每孔加入含 1 μg NOTA-PEG₅-AT45 的无血清培养基 0.5 mL, 实验组只加 0.5 mL 无血清培养基, 培养箱反应 1 h 后, 吸弃培养液, 每孔加入含有 1 μCi ⁶⁸Ga-NOTA-PEG₅-AT45 的无血清培养基 0.5 mL 继续培养 1 h 后将孔板中所有的培养基完全吸出, 向孔板中加入 0.5 mL 冷 PBS 清洗 3 次。再向所有孔板中加入 1 mL 1 mol·L⁻¹ NaOH, 室温下放置 5~10 min 后吸取孔板内所有溶液和细胞放入做好记号的小试管中。最后取 3 份含 1 μCi ⁶⁸Ga-NOTA-PEG₅-AT45 的无血清培养基 0.5 mL 放入 3 个小试管中作为总放射活度, 分别在自动 γ 计数仪上计数。结果显示, 3 种肿瘤细胞中 B16 对探针的摄取高于 CT26 和 PANC02, 所有肿瘤细胞对探针 ⁶⁸Ga-NOTA-PEG₅-AT45 的摄取均可被其未核素标记的前体 NOTA-PEG₅-AT45 明显阻断, 正常非肿瘤细胞 KMST-6 无明显细胞摄取。3 种肿瘤细胞对 ⁶⁸Ga-NOTA-PEG₅-AT45 的摄取结果见图 3。

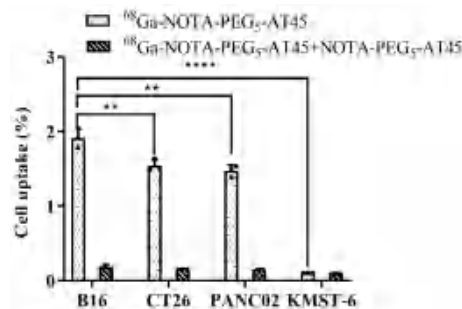


图3 4 种细胞对 ⁶⁸Ga-NOTA-PEG₅-AT45 的摄取率 (**P < 0.01, ****P < 0.0001)

Fig 3 Uptake rate of ⁶⁸Ga-NOTA-PEG₅-AT45 by cells (**P < 0.01, ****P < 0.0001)

2.4 micro PET/CT 成像

参考细胞摄取实验中细胞培养的方法对 CT26、B16、PANC02 这 3 种肿瘤细胞进行培养^[12], 将处于对数生长的 3 种肿瘤细胞用 0.5% 的胰酶消化, 重悬到无血清培养基中。每只 6~8 周的 C57 小鼠先进行脱毛处理, 随后在腋下皮下注射 1×10⁷ 个/0.1 mL 肿瘤细胞, 每种肿瘤种 5 只小鼠。待 CT26、B16、PANC02 皮下瘤长径达 5~8 mm 后开始进行 ⁶⁸Ga-NOTA-PEG₅-AT45 的 PET/CT 成像。成像小鼠先尾静

脉注射 200 $\mu\text{Ci}/0.15\text{ mL}$ ^{68}Ga -NOTA-PEG₅-AT45 探针, 1 h 后在氧流量为 $1\text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 2% 异氟醚麻醉下在 nanoScan PET/CT 仪器上静态采集 10 min。显像效果较好的 B16 皮下移植瘤小鼠加采了 1 h 动态 PET/CT 图像, 即小鼠气体麻醉下尾静脉注射显像药物后立刻开始图像采集共 1 h。结果显示: CT26、B16、

PANC02 这 3 种皮下移植瘤中 B16 的显像效果最佳, 肿瘤/肌肉比值最高, CT26 和 PANC02 皮下移植瘤显像效果相当。B16 动态采集图像显示, 显像药物注射后 10 min 即可见肿瘤部位有明显的显像药物摄取, 且 60 min 之后肿瘤依然可见明显摄取, 见图 4。

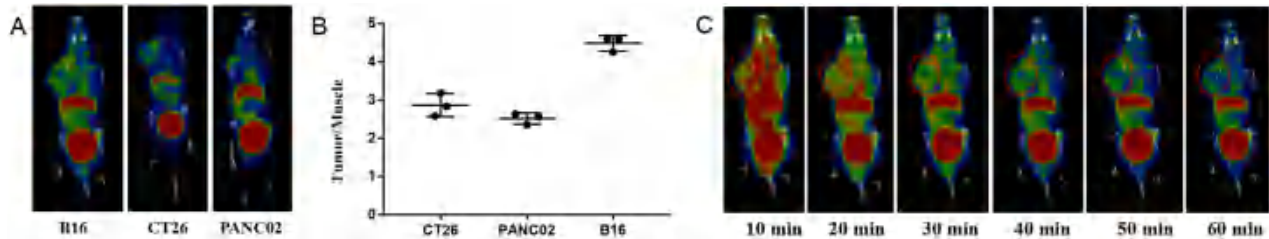


图 4 ^{68}Ga -NOTA-PEG₅-AT45 在各种肿瘤模型中的 PET/CT 的静态扫描 (A)、肿瘤/肌肉比值 (B) 及 B16 模型中动态扫描 (C)

Fig 4 PET/CT static imaging of ^{68}Ga -NOTA-PEG₅-AT45 in multiple tumor models (A), tumor/muscle ratios (B), and PET/CT dynamic acquisition images of B16 model (C)

2.5 ^{68}Ga -NOTA-PEG₅-AT45 在 B16 荷瘤鼠中的生物分布

B16 皮下移植瘤长径到 8 ~ 10 mm 后, 将荷瘤鼠随机分为 3 组, 每组 5 只, 分别在尾静脉注射 100 $\mu\text{Ci}/0.1\text{ mL}$ ^{68}Ga -NOTA-PEG₅-AT45 显像药物 10、30、60 min 后迅速脱颈处死小鼠, 取出小鼠体内的血液、心脏、肝、脾、肺、肾、脑、左侧股骨、左侧大腿肌肉、小肠、胃及肿瘤组织, 放入小试管中在自动 γ 计数仪上计数, 计算各脏器组织对显像药物的摄取 %ID/g 值。结果显示显像药物很快代谢富集在肾脏中, 表明此药物主要是通过泌尿系统排泄, 其在肝脏的摄取值较高, 其次是肿瘤组织和心脏, 如图 5 所示。

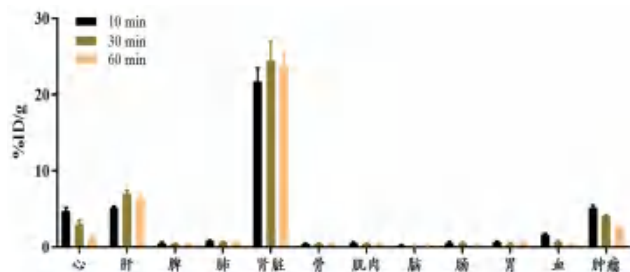


图 5 显像药物 ^{68}Ga -NOTA-PEG₅-AT45 在 B16 荷瘤鼠中的生物分布
Fig 5 Biodistribution of imaging agents ^{68}Ga -NOTA-PEG₅-AT45 in B16 tumor-bearing mice

2.6 3 种肿瘤组织的 PD-L1 免疫组化

3 种荷瘤鼠在生物分布实验结束后将肿瘤组织固定在 4% 的多聚甲醛中, 用梯度乙醇脱水及石蜡包埋切片, 病理切片脱蜡后梯度乙醇水化, 然后抗原修复、10% 山羊封闭血清封闭、抗 PD-L1 的一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保湿孵育过夜, 清洗一抗后常温孵育二抗 30 min 后 DAB 显色及苏木素染

核。封片后显微镜下观察各肿瘤组织中 PD-L1 的表达情况。结果显示 B16 肿瘤组织切片的 PD-L1 表达量最高, PANC02 与 CT26 表达比较接近, 见图 6。细胞摄取结果显示 B16 细胞摄取值最高, CT26 和 PANC02 肿瘤细胞摄取比较接近。此外, 在对 3 种肿瘤模型进行 micro PET/CT 成像时, 显像药物 ^{68}Ga -NOTA-PEG₅-AT45 在 B16 肿瘤组织中摄取值最高, CT26 和 PANC02D 肿瘤组织中摄取比较接近, 细胞摄取和动物显像结果与免疫组化的结果基本一致。实验结果提示显像药物 ^{68}Ga -NOTA-PEG₅-AT45 在肿瘤中的富集程度与肿瘤组织 PD-L1 表达水平成正相关。



图 6 3 种肿瘤组织的 PD-L1 免疫组化

Fig 6 Immunohistochemistry of PD-L1 on 3 tumor tissues

3 讨论

本研究首次将放射性核素 ^{68}Ga 标记靶向 PD-L1 的适配体 NOTA-PEG₅-AT45, 且具有较高的放化产率和放化纯度, 同时在细胞和动物水平验证了该探针对 PD-L1 的良好靶向性和对 PD-L1 阳性肿瘤的成像能力。

与其他团队的研究类似^[8, 11, 13-14], ^{68}Ga -NOTA-PEG₅-AT45 在小鼠的肝脏体内也有较高的聚集, 可能是核酸适配体普遍分子量较大容易在肝脏富集, 需要后续研究进一步对其结构进行优化, 加速其从肝脏的清除。但是与其他研究不同的是本显像

药物在小肠中的摄取并不高^[14-15],这或许是因为本研究中生物分布的时间在 60 min 内,而其他研究的生物分布延续到了 90 ~ 120 min,肝内的显像药物还未从胆道系统排入小肠,也可能是因为⁶⁸Ga-NOTA-PEG₅-AT45 对 PD-L1 的靶向性较高,使得肠道等部位的非特异性滞留减少。

与放射性核素标记靶向 PD-L1 的单抗显像研究相比^[16-18],适配体具有独特的优势,化学和热稳定性良好,可大量快速批量生产且成本低。最重要的是,适配体可通过加入不同的功能配件来修饰改善其在体内的循环,并且基于适配体的分析试剂盒可以很容易地生成、存储及利用^[19]。因为它的分子量较小,可快速在肿瘤部位聚集,显像药物注射后 40 ~ 60 min 即可进行显像,不需要等几天以后,这为后续的临床转换提供了便利。

相对于用¹⁸F核素来标记该适配体,⁶⁸Ga具有其独特的优势:第一,它的半衰期(68 min)合适,可以减少患者的辐射时间;第二,⁶⁸Ga可通过⁶⁸Ge/⁶⁸Ga发电器的淋洗现场使用,不受加速器有无的限制,这对小规模医院非常便利;第三,⁶⁸Ga的放射性标记对后续治疗具有显著的意义,因为它可以很容易地被¹⁷⁷Lu或⁹⁰Y等其他治疗性放射性核素所取代^[20-21],为该适配体后续的诊疗一体化研究提供了前期基础。

本研究合成的⁶⁸Ga-NOTA-PEG₅-AT45对PD-L1有较高的靶向特异性,可对PD-L1阳性肿瘤进行PET/CT靶向成像。

参考文献

- Bray F, Laversanne M, Weiderpass E, et al. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide [J]. *Cancer*, 2021, 127 (16): 3029-3030.
- 赵东升, 程钺, 廖伟科. 基于片段生长技术的 PD-1/PD-L1 小分子抑制剂的设计 [J]. *中南药学*, 2024, 22 (1): 111-115.
- Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, et al. Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy [J]. *Cell*, 2017, 168 (4): 707-723.
- 周转利, 姚霜霜, 甄琴, 等. 1 例 PD-L1 抑制剂致突眼不良反应分析 [J]. *中南药学*, 2023, 21 (7): 1976-1978.
- 周玉玲, 张永昌, 廖德华, 等. PD-1/PD-L1 抑制剂在 EGFR-TKIs 治疗失败的非小细胞肺癌中的研究进展 [J]. *中南药学*, 2021, 19 (10): 2104-2110.
- Hermann T, Patel DJ. Adaptive recognition by nucleic acid aptamers [J]. *Science*, 2000, 287 (5454): 820-825.
- Xiong XL, Lv YF, Chen T, et al. Nucleic acid aptamers for living cell analysis [J]. *Annu Rev Anal Chem*, 2014, 7 (1): 405-426.
- Varmira K, Hosseinimehr SJ, Noaparast Z, et al. A HER2-targeted RNA aptamer molecule labeled with ^{99m}Tc for single-photon imaging in malignant tumors [J]. *Nucl Med Biol*, 2013, 40 (8): 980-986.
- Wu XD, Liang HY, Tan Y, et al. Cell-SELEX aptamer for highly specific radionuclide molecular imaging of glioblastoma in vivo [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (6): e90752.
- Jacobson O, Yan XF, Niu G, et al. PET imaging of tenascin-C with a radiolabeled single-stranded DNA aptamer [J]. *J Nucl Med*, 2015, 56 (4): 616-621.
- Pieve CD, Perkins AC, Missailidis S. Anti-MUC1 aptamers: radiolabelling with ^{99m}Tc and biodistribution in MCF-7 tumour-bearing mice [J]. *Nucl Med Biol*, 2009, 36 (6): 703-710.
- 章晓联, 刘传刚. 一种靶向肿瘤细胞的 Aptamer-CD3⁺T 细胞及其构建方法与应用: 202010209383.9 [P]. 2020-06-05.
- Zhao ZL, Fan HH, Zhou GF, et al. Activatable fluorescence/MRI bimodal platform for tumor cell imaging via MnO₂ nanosheet-aptamer nanoprobe [J]. *J Am Chem Soc*, 2014, 136 (32): 11220-11223.
- Cheng S, Jacobson O, Zhu G, et al. PET imaging of EGFR expression using an ¹⁸F-labeled RNA aptamer [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2019, 46 (4): 948-956.
- Gijs M, Becker G, Plenevaux A. Biodistribution of novel ⁶⁸Ga-radiolabelled HER2 aptamers in mice [J]. *J Nucl Med Radiat Ther*, 2016, 7 (5): 1-8.
- Hettich M, Braun F, Bartholomä MD, et al. High-resolution PET imaging with therapeutic antibody-based PD-1/PD-L1 checkpoint tracers [J]. *Theranostics*, 2016, 6 (10): 1629-1640.
- Lesniak WG, Chatterjee S, Gabrielson M, et al. PD-L1 detection in tumors using [⁶⁴Cu] atezolizumab with PET [J]. *Bioconjug Chem*, 2016, 27 (9): 2103-2110.
- England CG, Ehlerding EB, Hernandez R, et al. Preclinical pharmacokinetics and biodistribution studies of ⁸⁹Zr-labeled pembrolizumab [J]. *J Nucl Med*, 2017, 58 (1): 162-168.
- Potyrailo RA, Murray AJ, Nagraj N, et al. Towards maintenance-free biosensors for hundreds of bind/release cycles [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, 54 (7): 2174-2188.
- Chan H, Moseley C, Zhang L, et al. Correlation of DOTATOC uptake and pathologic grade in neuroendocrine tumors [J]. *Pancreas*, 2019, 48 (7): 948-952.
- Filippi L, Schillaci O, Cianni R, et al. Yttrium-90 resin microspheres and their use in the treatment of intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *Future Oncol*, 2018, 14 (9): 809-818.

(收稿日期: 2024-11-02; 修回日期: 2024-12-20)

镰形棘豆提取物抗氧化、抑菌活性评估和高活性部位 UPLC-MS/MS 分析研究

叶财发¹, 沈秋莲¹, 李娜², 陈锦珊^{1*} (1.第九〇九医院/厦门大学附属东南医院药剂科, 福建 漳州 363000; 2.福建中医药大学药学院, 福州 350122)

摘要: **目的** 探究镰形棘豆的体外抗氧化和抑菌活性部位, 并采用超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 法对高活性部位中的化学成分进行鉴定。**方法** 采用定性鉴别反应初步分析镰形棘豆的水提取物 (WTE)、乙酸乙酯提取物 (EAE) 和无水乙醇提取物 (ETE) 的组成; 测定 DPPH、ABTS 自由基清除能力以评估各提取物的抗氧化能力; 利用倍比稀释法测定提取物对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌的抑菌效果, 筛选出最佳抗氧化和抑菌活性部位。应用 UPLC-MS/MS 技术, 鉴定高活性部位的化学成分。**结果** WTE、EAE 和 ETE 对 DPPH 和 ABTS 自由基的清除能力均呈剂量依赖性增加, 其中 ETE 具有最强的抗氧化活性, 其半抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 $0.41 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.08 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。EAE 和 ETE 均对金黄色葡萄球菌具有较好的抑菌效果, 其最小抑菌浓度 (MIC) 均为 $6.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 最小杀菌浓度 (MBC) 均为 $25.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 对铜绿假单胞菌无抑菌活性; 而 WTE 对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌均无抑菌效果。从 ETE 的质谱数据分析出 92 个化学成分, 包含黄酮类 58 个, 生物碱类 16 个, 三萜类 7 个和其他类化合物 11 个。其中 11 个黄酮类、5 个生物碱类、2 个三萜类和 10 个其他类化合物在镰形棘豆中为首次报道。**结论** 富含黄酮类物质的 ETE 表现出最佳的抗氧化和抑菌活性; 建立的 UPLC-MS/MS 法可对镰形棘豆中化学成分进行准确、快速、全面的分析。**关键词:** 镰形棘豆提取物; 化学组成; 抗氧化能力; 抑菌活性; UPLC-MS/MS

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)04-0953-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.013

Antioxidant and antibacterial activity of *Oxytropis falcata* Bunge extract and UPLC-MS/MS characterization of its highly-active fraction

YE Cai-fa¹, SHEN Qiu-lian¹, LI Na², CHEN Jin-shan^{1*} (1. Department of Pharmacy, the 909th Hospital/Dongnan Hospital of Xiamen University, Zhangzhou Fujian 363000; 2. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122)

Abstract: Objective To determine the antioxidant and antibacterial activity of *Oxytropis falcata* Bunge (OFB) and to identify the chemical constituents of the most active fraction by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** The compositions of the water extract (WTE), ethyl acetate extract (EAE), and anhydrous ethanol extract (ETE) of OFB were analyzed by qualitative identification reactions. Antioxidant capacity was assessed by the scavenging ability of DPPH and ABTS radicals. The antibacterial effect of the extract against *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) was determined with broth dilution method. UPLC-MS/MS was used to identify the chemical components of the highly-active parts. **Results** The scavenging abilities of WTE, EAE, and ETE against DPPH and ABTS radicals increased in a dose-dependent manner, and ETE demonstrated the highest antioxidant activity with the inhibitory concentration 50 (IC_{50}) at $0.41 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ and 0.08

基金项目: 漳州市自然科学基金 (No.ZZ2018J15); 医院自主科研项目 (No.22QN006)。

作者简介: 叶财发, 男, 主管药师, 主要从事中药药理及药物分析研究, email: 273796753@qq.com * 通信作者: 陈锦珊, 男, 主任药师, 主要从事医药药理学和临床药学工作, email: cjs18659341758@163.com

mg · mL⁻¹, respectively. Antibacterial experiment indicated that both EAE and ETE had certain bacteriostatic effects on *S. aureus*, the minimum inhibitory concentration (MIC) was 6.25 mg · mL⁻¹ for all, and the minimum bactericidal concentration (MBC) was 25.00 mg · mL⁻¹ for all. However, neither showed antibacterial activity against *P. Aeruginosa*, and WTE lacked antibacterial effect on *S. aureus* and *P. Aeruginosa*. From the ETE mass spectrometry data, 92 chemical components were identified, including 58 flavonoids, 16 alkaloids, 7 triterpenoids, and 11 other compounds. Notably, 11 flavonoids, 5 alkaloids, 2 triterpenoids, and 10 other compounds were reported for the first time in the *Oxytropis falcata* Bunge. **Conclusion** ETE rich in flavanoids shows strongest antioxidant and antibacterial activities, and the UPLC-MS/MS method is accurate and rapid for the comprehensive analysis of the chemical components in *Oxytropis falcata* Bunge.

Key words: extract from *Oxytropis falcata* Bunge; chemical composition; antioxidant capacity; antibacterial activity; UPLC-MS/MS

镰形棘豆 (*Oxytropis falcata* Bunge) 属于豆科植物棘豆属类, 收录于《中华人民共和国卫生部药品标准 (藏药)》第一册^[1]。该植物主要分布在甘肃、青海和新疆等地区, 近年来已鉴定出黄酮、生物碱、皂苷和多糖等成分, 具有抗肺纤维化、抗炎、抗肿瘤、防晒伤等功效^[2], 可用于生肌止痛、治疗疮疖肿痛、治流感、治刀伤和促进烧伤创面愈合等^[3]。其中, 烧伤创面愈合与抑菌^[4]、抗炎、抗氧化、免疫调节等多重生物过程息息相关^[5], 而金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) 和铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa*) 是临床烧伤感染中较常见的两种病原体^[6], 烧伤还会引发氧化应激反应, 导致组织损伤的进一步加剧^[5]。因此, 筛选具有抗氧化和抑菌活性的镰形棘豆部位可以为研发制剂提供帮助。

本研究旨在探讨镰形棘豆不同溶剂提取物的药理活性及其化学成分。研究表明, 镰形棘豆水提取物 (WTE) 中富含多糖^[7], 乙酸乙酯提取物 (EAE) 和无水乙醇提取物 (ETE) 中含有较高浓度的总黄酮和总生物碱^[8]。课题组前期试验证实, 镰形棘豆总黄酮、总生物碱和总多糖均能促进二度烧伤创面愈合^[9]。此外, 已有研究指出, 镰形棘豆中的黄酮苷元和生物碱具有抑菌、抗氧化和抗炎的多重药理作用^[3]。然而, 关于不同提取物间药理活性的比较研究尚不多见。超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 技术因其高灵敏度和高分辨率, 已被广泛应用于中药及其复方制剂的化学成分分析^[10-11]。因此, 本试验利用成分定性鉴别反应对镰形棘豆不同极性部位的成分进行定性鉴别, 初步评估各提取物的体外抗氧化和抑菌活性, 并利用 UPLC-MS/MS 技术系统分析高活性提取物中的化学成分, 以期对镰形棘豆的质量控制和药效物质基础研究提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

RE-2000A 型旋转蒸发仪、SHZ-III 型循环水真空泵 (上海亚荣生化仪器厂); 101A-1E 电热鼓风干燥箱 (上海试验仪器厂有限公司); KQ-300DE 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); DZF-1 型真空干燥箱 (上海医用恒温设备厂); LD5-2A 低速离心机 (北京医用离心机厂); JY1002B 电子天平 (上海浦春计量仪器有限公司); AUX220 电子天平、UV-2550 紫外可见分光光度计 (日本岛津); Agilent 1290 infinity II 超高效液相色谱仪、Agilent 6546 Q-TOF 质谱仪 (美国安捷伦); LDZH-150KBS 型立式自动电热压力蒸汽灭菌器 (上海申安医疗器械厂); 101-2A 型数显式电热恒温干燥箱 (上海阳光试验仪器有限公司); DG-2B 多功能恒温箱 (上海医疗器械厂); HWS-400 型恒温恒湿箱 (上海精宏试验设备有限公司)。

1.2 试药

镰形棘豆 (产地: 青海西宁), 经陈锦珊主任药师鉴定为豆科棘豆属植物镰形棘豆。无水乙醇、乙酸乙酯、乙醚、浓硫酸、三氯化铁、三氯化铝、盐酸、碘苯酚、硫酸铜、氢氧化钾、碳酸钠、二甲基亚砜 (DMSO)、三氯甲烷 (西陇化工有限公司); 碘化钾 (国药集团化学试剂有限公司); 乙酸镁 (萨恩化学技术有限公司); 氯化汞 (姜堰区环球试剂有限公司); 碘化铊钾 (上海润捷化学试剂有限公司); 2, 2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸 (ABTS) 和抗坏血酸 (阿拉丁有限公司); 1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH, 菲金生物有限公司); 胰酪大豆胨液体培养基、胰酪大豆胨琼脂培养基和 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液 (广东环凯微生物科技有限公司); 金黄色葡萄球菌 [CMCC (B) 26033] 和铜绿假单胞菌 [CMCC (B) 10104] (中国

食品药品检定研究院)。

2 方法

2.1 镰形棘豆提取物的制备及成分鉴别

2.1.1 制备镰形棘豆提取物 根据李磊等^[12]的方法优化,称取镰形棘豆粗粉 150 g 分别置于不同的圆底烧瓶中,分别加入 10 倍量的水、乙酸乙酯和无水乙醇于 60℃ 水浴 24 h,收集提取液并过滤,合并滤液,滤液以 4000 r·min⁻¹ 离心 5 min,上清液以 45~60℃ 减压浓缩真空干燥,得到 WTE、EAE 和 ETE,并计算提取率(%)。

2.1.2 镰形棘豆提取物成分鉴别 分别称取“2.1.1”项下制备的镰形棘豆提取物,采用三氯化铝反应^[13]和乙酸镁反应^[14]鉴别黄酮类成分;采用碘化汞钾试剂、碘化铋钾试剂、碘-碘化钾试剂对生物碱成分进行鉴别^[13];利用苯酚硫酸法、三氯化铁反应、三氯甲烷-浓硫酸反应和双缩脲反应分别鉴别多糖、鞣质、皂苷和蛋白质类成分^[13]。观察上述反应,并记录。

2.2 镰形棘豆提取物抗氧化能力评估

制备 2.0 mg·mL⁻¹ 的镰形棘豆提取物溶液后,稀释至不同浓度进行 DPPH 和 ABTS 自由基清除试验^[15]。在 DPPH 自由基清除试验中,取 1 mL 溶液加 3 mL DPPH 醇溶液,室温避光 30 min 后,于 517 nm 处测吸光度(A_1);在 ABTS 试验中,配制 ABTS 工作液,取 0.5 mL 供试品溶液加 3 mL ABTS 工作液,30℃ 反应 10 min 后,于 734 nm 处测吸光度(A_1),均以维生素 C 为阳性对照,空白溶剂吸光度为 A_0 ,测定去离子水取代提取物溶液组的吸光度(A)。计算清除率,清除率(%) = $[1 - (A_1 - A_0) / A] \times 100\%$ 。

2.3 镰形棘豆提取物抑菌活性测定

使用 50% DMSO 溶解 WTE、EAE 和 ETE,制备成 200.00 mg·mL⁻¹ 的无菌溶液。试验通过倍比稀释结合平板划线法测定镰形棘豆提取物的最小抑菌浓度(MIC)及最小杀菌浓度(MBC)^[16]。无菌操作下,将溶液二倍稀释制备供试品组,同时制备阴性对照组和空白组。除空白组外,向各试管中加入 0.1 mL 的金黄色葡萄球菌或铜绿假单胞菌菌液(浓度为 1×10^6 cfu·mL⁻¹),在 30~35℃ 下培养 24 h,观察细菌生长。选取 3 管(肉眼观察第一支澄清管及其前 2 支)划线接种至胰酪大豆胨琼脂平板,再培养 24 h 后观察菌落。以菌落生长的最高浓度为 MIC,无菌落的最低浓度为 MBC。每组试验重复 3 次。

2.4 UPLC-MS/MS 法鉴定镰形棘豆高活性部位化学成分

2.4.1 色谱条件

采用 Agilent Eclipse Plus C₁₈ (1.8 μm, 2.1 mm×50 mm) 色谱柱,以含 0.1% (V/V) 甲酸的水(A)和含 0.1% (V/V) 甲酸的乙腈(B)为流动相,梯度洗脱(0~20 min, 5%~42%B; 20~30 min, 42%~80%B; 30~30.2 min, 80%~5%B; 30.2~35 min, 5%B),流速 0.3 mL·min⁻¹,柱温 30℃,进样量 1 μL。

2.4.2 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI),正离子模式下扫描,扫描范围 m/z 100~1000,扫描频率为每秒扫描 2 个光谱。质谱参数:气体温度 300℃,干气流速 8 L·min⁻¹,雾化器压力 35 psi,鞘气温度 400℃,流速 12 L·min⁻¹,毛细管电压 4000 V,喷嘴电压 1000 V,碎片器电压 100 V。质谱数据采集及处理软件为 Agilent Masshunter 工作站。以 Auto MS/MS 模式采集二级质谱。

2.5 数据处理

采用 Excel 2007、SPSS 17.0、Origin 8.5 软件处理分析相关数据,并进行差异显著性检验分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。利用 Masshunter 的 Qualitative Navigator B.08.00 处理质谱数据。

3 结果

3.1 成分鉴别

根据“2.1.1”项下工艺提取镰形棘豆,得到 WTE (10.69 g)、EAE (2.09 g) 和 ETE (3.89 g),提取率分别为 7.12%、1.39%、2.59%。按照“2.1.2”项下方法操作,三种提取物的成分种类鉴别结果见表 1。由此可见,WTE、EAE 和 ETE 中均含有黄酮类、生物碱类及皂苷类成分,糖类成分主要存在于 WTE 和 ETE 中,多糖不溶于高浓度乙醇中,故仅见于 WTE 中,蛋白质类及鞣质类则均未在三种提取物中检出。

3.2 不同溶剂镰形棘豆提取物抗氧化作用比较

如图 1 所示,在 0.125~2.00 mg·mL⁻¹ 内,WTE、EAE 和 ETE 对 DPPH 和 ABTS 两种自由基均表现出剂量依赖的清除能力。如图 1A 所示,对于 DPPH 自由基,WTE、EAE 和 ETE 的 IC_{50} 值分别为 0.53、0.52、0.41 mg·mL⁻¹,最大清除能力分别为 81.08%、97.02% 和 93.58%。经统计学分析,三种提取物对 DPPH 自由基的清除能力差异均有统计学意义($P < 0.05$)。如图 1B 所示,对于 ABTS 自由基,WTE、EAE 和 ETE 的 IC_{50} 值分别为 0.17、0.10、0.08 mg·mL⁻¹,最大清除能力分别为 95.27%、99.94%、98.85%。经统计学分析,在 0.125 mg·mL⁻¹ 时,ETE 对 ABTS 自由基清除能力低于 EAE ($P < 0.05$),但质量浓度提升至 0.50~2.00 mg·mL⁻¹ 时,ETE 和 EAE 均高于维生素 C ($P < 0.01$)。综合 IC_{50} 和清除率结果,ETE 表现出最佳的抗氧化能力。

3.3 MIC 和 MBC 测定

表 1 镰形棘豆提取物成分鉴别结果

Tab 1 Identification of extract from <i>Oxytropis falcata</i> Bunge				
成分类别	鉴别反应	WTE	EAE	ETE
黄酮类	三氯化铝反应	+	+	++
	乙酸镁反应	+	+	+
生物碱类	碘化铋钾试剂	+	—	—
	碘化汞钾试剂	—	+	—
	碘 - 碘化钾试剂	++	++	++
多糖或单糖类	苯酚硫酸反应	++	—	+
鞣质类	三氯化铁反应	—	—	—
三萜皂苷类	三氯甲烷 - 浓硫酸反应	++	++	++
甾体皂苷类		++	++	++
蛋白质类	硫酸铜溶液	—	—	—

注：“++”代表现象明显，“+”代表现象略明显，“—”代表无现象。

Note: “++” indicates a pronounced phenomenon, “+” indicates a slightly noticeable phenomenon, and “—” indicates no phenomenon.

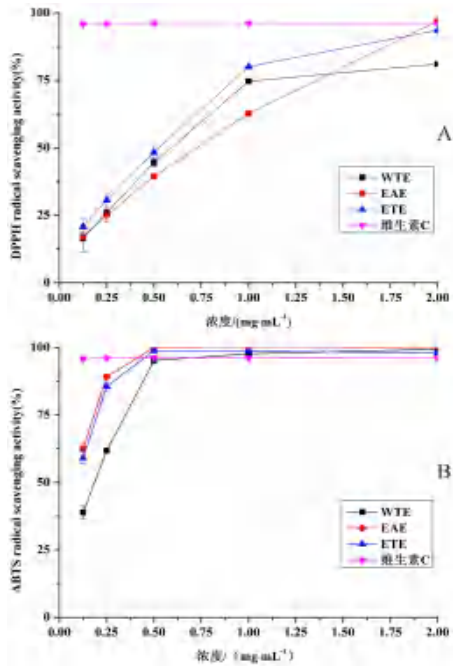


图 1 镰形棘豆提取物对 DPPH (A) 和 ABTS (B) 自由基的清除能力
Fig 1 Free radical scavenging abilities of extracts of *Oxytropis falcata* Bunge against DPPH (A) and ABTS (B)

通过“2.3”项下方法测定了镰形棘豆提取物对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的 *MIC* 和 *MBC*。对于金黄色葡萄球菌的抑菌效果,当样品质量浓度达到 $6.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, EAE 和 ETE 处理的试管溶液澄清,在相应的培养基平板观察到菌落生长,这表明 EAE 和 ETE 对金黄色葡萄球菌的 *MIC* 均为 $6.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,将澄清试管中的溶液转移至胰酪大豆胨琼脂平板上,发现 EAE 和 ETE 在质量浓度为 $25.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的相应平板内未见菌落生长,说明对金黄色葡萄球菌的 *MBC* 值为 $25.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,而 WTE 组在最大检测浓度条件下与空白溶剂组溶液均澄清,故无法判断 *MIC* 值。对于铜绿假单胞菌的抑菌效果,三种提取物均未见

对铜绿假单胞菌有抑菌或杀菌作用。

3.4 UPLC-MS/MS 分析 ETE 成分

综合体外抗氧化和抑菌活性结果,对活性最佳的 ETE 部位进行系统成分分析。ETE 的正离子模式总离子流图见图 2,利用 MassHunter 软件对获得的质谱数据进行处理,与现有文献和数据库中的信息进行匹配,本研究共推断出 92 个化学成分,包括黄酮类 58 个(峰 13 ~ 17, 20 ~ 51, 53 ~ 54, 56 ~ 59, 61 ~ 66, 69, 72 ~ 73, 75 ~ 76, 80 ~ 83, 85),生物碱类 16 个(峰 1 ~ 6, 11, 18 ~ 19, 55, 67, 77 ~ 79, 81, 90),三萜类 7 个(峰 52, 60, 71, 74, 84, 91 ~ 92)和其他类化合物 11 个(峰 7 ~ 10, 12, 68, 70, 86 ~ 89),详见表 2。其中 11 个黄酮类(峰 14 ~ 17, 21, 26 ~ 28, 30, 34 ~ 35)、5 个生物碱类(4, 6, 11, 18 ~ 19)、2 个三萜类(峰 71, 74)和 10 个其他类成分(峰 1, 7 ~ 8, 14, 70, 86 ~ 90)在镰形棘豆中为首次报道。

4 讨论

镰形棘豆在中国青海、甘肃等地区资源丰富,但其化学成分及有效部位的系统性研究尚不深入。从本研究结果可知,ETE 对 DPPH 和 ABTS 自由基的 *IC*₅₀ 值分别为 $0.41 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.08 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,低于 WTE 和 EAE,且各提取部位抗氧化活性趋势基本一致,说明 ETE 表现出最佳的抗氧化活性。另外,ETE 对金黄色葡萄球菌的 *MIC* 和 *MBC* 值分别为 $6.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $25.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,与 EAE 表现出相同的抑菌能力,但 WTE、EAE 和 ETE 对铜绿假单胞菌均未表现出抗菌作用。综合分析可知,ETE 是镰形棘豆发挥抗菌和抗氧化的高活性部位。

目前,镰形棘豆的化学成分分析集中在高效液相色谱研究^[13, 55],但镰形棘豆成分种类复杂,含量不一,采用灵敏度较低的紫外检测器、荧光检测器和示差折光检测器等检测器,难以有效识别同分异构体、低含量物质或物理性质高度相似组分。因此,本研究通过体外抗氧化和抑菌试验筛选得到 ETE 为活性最高部位,采用 UPLC-MS/MS 进行系统分析。本研究从 ETE 中推断出 92 个成分,包含黄酮类、生物碱类、皂苷类、氨基酸类和其他类化合物,其中槲皮素-3-*O*-鼠李糖-7-*O*-葡萄糖苷、异鼠李素-3-*O*-槐糖-7-*O*-鼠李糖苷、6-*C*-葡萄糖-8-*C*-木糖洋芹素、scutellarein-*O*-rutinoside、apigenin-7-glucoside、luteolin 7-rutinoside、橙皮素 7-*O*-葡萄糖苷或同分异构体等 28 个物质首次在镰形棘豆提取物中报道,进一步掌握了其物质基础,但仍存在部分物质无法解析,后续可结合核磁共振等技术进行更全面的分析。

通过成分定性结果可知,ETE 的三氯化铝反

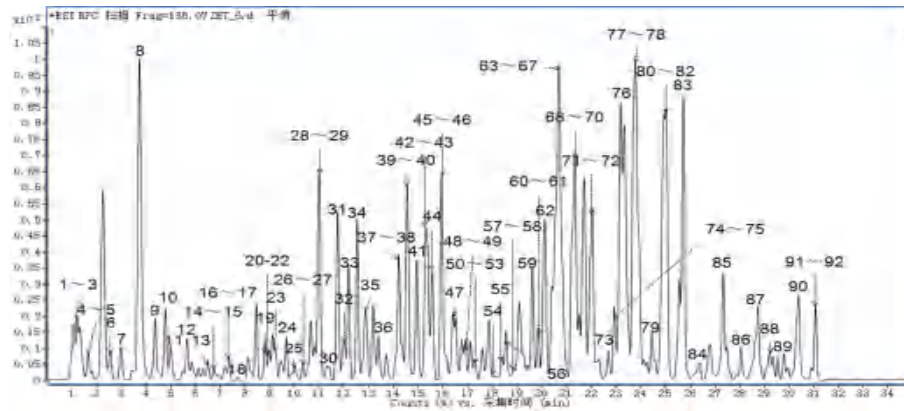


图 2 镰形棘豆 ETE 的总离子流图
Fig 2 Total ion flow diagram of ETE

表 2 镰形棘豆 ETE 中化学成分信息

Tab 2 Identification of compounds in ETE of extract from *Oxytropis falcata* Bunge

No.	推测化合物	正离子	t_R /min	分子式	分子量	检测分子量	$MS^2 (m/z)$	文献
1	胆碱 [*]	$[M+H]^+$	1.088	$C_5H_{13}NO$	104.1070	104.1072	874779、60.0805	[17]
2	苦马豆素	$[M+H]^+$	1.142	$C_8H_{15}NO_3$	174.1125	174.1123	156.1020、138.1230、70.0643	[18]
3	古豆碱	$[M+H]^+$	1.250	$C_8H_{15}NO$	142.1226	142.1226	124.1309、96.0806、55.0542	[19]
4	水苏碱 [*]	$[M]^+$	1.658	$C_7H_{13}NO_2$	144.1019	144.1020	84.0808、70.5962	[20]
5	臭豆碱	$[M+H]^+$	1.814	$C_{15}H_{20}N_2O$	245.1648	245.1622	199.0589、150.1270、98.0959、62.3604	[21]
6	烟碱 [*]	$[M+H]^+$	2.689	$C_{10}H_{14}N_2$	163.1230	163.1233	135.0908、122.7760、61.0278	[17]
7	dianthoside [*]	$[M+H]^+$	3.021	$C_6H_6O_3$	127.0390	127.0383	67.0174	[22]
8	1-甲基-3-哌啶甲酸乙酯 [*]	$[M+H]^+$	3.754	$C_9H_{17}NO_2$	172.1332	172.1376	159.6088、130.4495、98.0963	[23]
9	5-羟甲基糠醛	$[M+H]^+$	4.369	$C_6H_6O_3$	127.0390	127.0389	107.4270、53.0383	[24]
10	邻苯二甲酸二异丁酯	$[M+H]^+$	4.772	$C_{16}H_{22}O_4$	279.1591	279.1461	220.0963、174.0911、105.0336、70.0650	[25]
11	四氢哈尔明 [*]	$[M+H]^+$	5.010	$C_{13}H_{16}N_2O$	217.1335	217.1337	204.1151、187.2334	[22]
12	苯乙胺	$[M+H]^+$	5.851	$C_8H_{11}N$	122.0964	122.0600	105.0449、77.0385、51.0222	[26]
13	甘草苷	$[M+H]^+$	6.524	$C_{18}H_{24}O_{12}$	433.1341	433.1341	395.0812、354.5962、127.0934、85.0269	[27]
14	vanillic acid hexoside [*]	$[M+H]^+$	6.749	$C_{14}H_{18}O_9$	331.1024	331.1028	242.6632、187.0598、127.0391、85.0285	[28]
15	槲皮素-3-O-鼠李糖-7-O-葡萄糖苷 [*]	$[M+H]^+$	6.962	$C_{33}H_{40}O_{20}$	757.2186	757.2145	595.6330、449.0190、287.0561、129.0548	[29]
16	根皮苷 [*]	$[M+H]^+$	7.125	$C_{21}H_{24}O_{10}$	437.1442	437.1444	401.1224、317.1017、216.1595、107.0494	[25]
17	异鼠李素-3-O-槐糖-7-O-鼠李糖苷 [*]	$[M+H]^+$	7.285	$C_{34}H_{42}O_{21}$	787.2291	787.2348	641.1709、479.1180、317.0683、229.0491	[27]
18	N-甲基金雀花碱 [*]	$[M+H]^+$	7.751	$C_{12}H_{16}N_2O$	205.1335	205.1350	163.0865、105.0329	[30]
19	东莨菪碱 [*]	$[M+H]^+$	8.740	$C_{17}H_{22}NO_4$	305.1622	305.1614	246.1122、201.1370、158.0936、31.0492	[26]
20	槲皮素-3-新橙皮苷-7-鼠李糖	$[M+H]^+$	8.780	$C_{33}H_{40}O_{19}$	741.2237	741.2223	595.1641、433.1128、287.0543、195.1233	[31]
21	6-C-葡萄糖-8-C-木糖洋芹素 [*]	$[M+H]^+$	8.826	$C_{27}H_{30}O_{15}$	595.1657	595.1650	433.1136、287.0552	[32]
22	木犀草素	$[M+H]^+$	8.956	$C_{15}H_{10}O_6$	287.055	287.0546	241.0505、153.0181、68.9968	[26]
23	山柰酚-3-葡萄糖-7-鼠李糖苷	$[M+H]^+$	9.242	$C_{27}H_{30}O_{15}$	595.1657	595.1650	433.1177、287.0553、85.0282	[33]
24	三叶豆紫檀苷	$[M+H]^+$	9.683	$C_{22}H_{22}O_{10}$	447.1286	447.1294	285.0761、225.6009	[34]
25	山柰酚-3-O-洋槐糖苷	$[M+H]^+$	9.919	$C_{27}H_{30}O_{15}$	595.1657	595.1662	549.2647、477.1070、349.7614、287.0563	[34]
26	scutellarein-O-rutinoside [*]	$[M+H]^+$	10.294	$C_{27}H_{30}O_{15}$	595.1657	595.1662	449.1086、287.0559、167.0719、129.0544	[26]
27	apigenin-7-glucoside [*]	$[M+H]^+$	10.315	$C_{21}H_{20}O_{10}$	433.1129	433.1131	365.1475、271.0590、242.1075、205.0756	[35]
28	luteolin 7-rutinoside [*]	$[M+H]^+$	10.778	$C_{27}H_{30}O_{15}$	595.1657	595.1653	574.2717、449.1079、287.0550、168.0409	[36]
29	鼠李素-3-芸香糖苷	$[M+H]^+$	11.115	$C_{28}H_{32}O_{16}$	625.1763	625.1748	584.0565、479.1164、317.0651、274.7584	[37]
30	山柰酚-3-O-β-D-葡萄糖苷 [*]	$[M+H]^+$	11.248	$C_{21}H_{20}O_{11}$	449.1078	449.1078	287.0546、145.0490、85.0282	[26]
31	山柰酚-7-O-α-L-鼠李糖苷	$[M+H]^+$	11.659	$C_{21}H_{20}O_{10}$	433.1129	433.1129	271.0602	[37]
32	chrysoeriol-6、8-C-glucoside	$[M+H]^+$	12.004	$C_{28}H_{32}O_{16}$	625.1763	625.1768	568.2488、463.1238、301.0699、163.0600	[38]
33	樱桃苷	$[M+H]^+$	12.229	$C_{21}H_{22}O_{10}$	435.1286	435.1284	309.0967、231.0626、147.0441、127.0390	[39]
34	橙皮素-3-O-葡萄糖苷或同分异构体 [*]	$[M+H]^+$	12.687	$C_{22}H_{24}O_{11}$	465.1391	465.1386	339.1075、271.1892、177.0544、127.0385	[25]
35	异鼠李素-3-O-阿拉伯糖-7-O-鼠李糖苷 [*]	$[M+H]^+$	12.864	$C_{27}H_{30}O_{15}$	595.1657	595.1632	528.1331、435.1267、257.0794、225.1167	[40]
36	芒柄花苷	$[M+H]^+$	13.404	$C_{22}H_{22}O_9$	431.1337	431.1335	269.0810、213.3233	[36]

续表 1

No.	推测化合物	正离子	t_R/min	分子式	分子量	检测分子量	$\text{MS}^2 (m/z)$	文献
37	7-羟基二氢黄酮	$[\text{M}+\text{H}]^+$	14.031	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_3$	241.0859	241.0850	223.4977、195.0796、163.0378、131.1096	[26]
38	oxytroflavoside F	$[\text{M}+\text{H}]^+$	14.214	$\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{15}$	609.1814	609.1811	463.1234、301.0713、129.0549、85.0286	[39]
39	异甘草素	$[\text{M}+\text{H}]^+$	14.482	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$	257.0808	257.0807	189.0718、147.0439、107.7218	[26]
40	oxytroflavoside A	$[\text{M}+\text{H}]^+$	14.541	$\text{C}_{34}\text{H}_{40}\text{O}_{19}$	753.2237	753.2339	447.1484、301.0947、271.1051、187.0837	[39]
41	oxytroflavoside B	$[\text{M}+\text{H}]^+$	14.957	$\text{C}_{34}\text{H}_{40}\text{O}_{19}$	753.2237	753.2339	607.1658、447.0945、301.0706、187.0598	[39]
42	maackiain	$[\text{M}+\text{H}]^+$	15.306	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$	285.0757	285.0744	270.0521、253.2255、196.4416、137.0234	[40]
43	oxytroflavoside C	$[\text{M}+\text{H}]^+$	15.321	$\text{C}_{34}\text{H}_{40}\text{O}_{19}$	753.2237	753.2339	607.1657、437.1319、301.0711、187.0604	[39]
44	柯伊利素-7-O-葡萄糖苷	$[\text{M}+\text{H}]^+$	15.541	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	463.1235	463.1234	349.0674、301.0717、2313.0652、167.0320	[41]
45	oxytroflavoside D	$[\text{M}+\text{H}]^+$	15.925	$\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	607.1657	607.1672	342.0821、301.0715、187.0602	[39]
46	乔松素	$[\text{M}+\text{H}]^+$	16.047	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$	257.0808	257.0804	153.0190、131.1481、67.0181	[26]
47	5-羟基-7-甲氧基二氢黄酮	$[\text{M}+\text{H}]^+$	16.355	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$	271.0965	271.0959	165.0510、107.0491、79.0538	[26]
48	甘草苷	$[\text{M}+\text{H}]^+$	16.728	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_9$	419.1337	419.1339	389.1586、299.6815、131.0493、103.0544	[27]
49	vesticarpin	$[\text{M}+\text{H}]^+$	16.988	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_5$	287.0914	287.0916	227.0722、177.0536、153.0545、138.1230	[26]
50	glycitein	$[\text{M}+\text{H}]^+$	17.126	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$	285.0757	285.0763	270.1072、229.0862、211.7886、151.0388	[40]
51	柚皮素	$[\text{M}+\text{H}]^+$	17.208	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$	273.0757	273.0749	201.2220、153.0183、91.0554	[26]
52	3-oxo-azukisapogenol	$[\text{M}+\text{H}]^+$	17.285	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_4$	471.3469	471.3449	453.3323、299.1965、233.1318、175.108	[42]
53	芹菜素	$[\text{M}+\text{H}]^+$	17.318	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	271.0601	271.0600	215.1081、131.0499、67.0539	[26]
54	熊竹素	$[\text{M}+\text{H}]^+$	18.080	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$	315.0863	315.0867	255.0661、177.0158	[43]
55	oxytrofalcatin D	$[\text{M}+\text{H}]^+$	18.369	$\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO}_4$	284.0917	284.0921	269.0679、150.0314、121.2413、65.0381	[40]
56	7-羟基黄酮	$[\text{M}+\text{H}]^+$	18.546	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_3$	239.0703	239.0705	211.0750、137.0234、68.9969	[26]
57	2, 4, 4'-trihydroxydihydrochalcone	$[\text{M}+\text{H}]^+$	18.873	$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_4$	259.0965	259.0967	203.0019、153.0545、107.0491	[40]
58	ϕ 醌素	$[\text{M}+\text{H}]^+$	19.629	$\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{O}_5$	283.0601	283.0604	253.2255、225.0553	[40]
59	芒柄花素	$[\text{M}+\text{H}]^+$	19.808	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$	269.0808	269.0813	213.0928、197.9763	[40]
60	melilotigenin B	$[\text{M}+\text{H}]^+$	19.885	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3$	455.3520	455.3520	437.3895、425.1119、409.3464、189.1639	[42]
61	4'-羟基-7-甲氧基异黄酮	$[\text{M}+\text{H}]^+$	20.124	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$	269.0808	269.0815	213.0914、118.0417	[26]
62	5-hydroxy-6, 7-dimethoxyflavone*	$[\text{M}+\text{H}]^+$	20.394	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_5$	299.0914	299.0922	283.9195、239.0705、151.0390	[44]
63	4'-hydroxy-7-methoxyflavanone	$[\text{M}+\text{H}]^+$	20.518	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$	271.0965	271.0973	210.0682、151.0393、119.0495、95.1514	[34]
64	7-羟基二氢黄酮	$[\text{M}+\text{H}]^+$	20.627	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_3$	241.0859	241.0869	195.0806、137.0236、81.0332	[34]
65	7, 4'-dimethoxy-3-hydroxyflavanone	$[\text{M}+\text{H}]^+$	20.860	$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_5$	301.1078	301.1078	285.9955、271.0503、167.0704	[26]
66	甘草素	$[\text{M}+\text{H}]^+$	20.953	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$	255.0652	255.0653	181.0650、137.0230、68.9967	[26]
67	N-苯甲酰基-2-苯基乙胺	$[\text{M}+\text{H}]^+$	21.189	$\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}$	226.1226	226.1229	105.0701、77.0386	[45]
68	isomucronulatol	$[\text{M}+\text{H}]^+$	21.362	$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_5$	303.1227	303.1225	167.0700、133.0189、123.0440、67.0541	[26]
69	香豆素	$[\text{M}+\text{H}]^+$	21.533	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_3$	285.0757	285.0760	175.0393、151.0389、122.7760、95.0491	[26]
70	D-ribo-phytosphingosine*	$[\text{M}+\text{H}]^+$	21.931	$\text{C}_{18}\text{H}_{39}\text{NO}_3$	318.3003	318.3009	256.2633、212.2375、132.1030、88.0757	[36]
71	soyasaponin I*	$[\text{M}+\text{H}]^+$	21.964	$\text{C}_{48}\text{H}_{78}\text{O}_{18}$	943.5261	943.5261	441.3729、423.5772	[36]
72	2'-羟基-4'-甲氧基查耳酮	$[\text{M}+\text{H}]^+$	22.728	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_3$	255.1016	255.0643	209.0559、153.0181、103.0541	[26]
73	2', 4'-二羟基-4-甲氧基查耳酮	$[\text{M}+\text{H}]^+$	22.808	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$	271.0965	271.0959	253.2255、225.0913、197.9763、151.0385	[26]
74	soyasaponin III*	$[\text{M}+\text{H}]^+$	22.675	$\text{C}_{42}\text{H}_{68}\text{O}_{14}$	797.4682	797.4682	599.3934、423.3617、383.3299、217.1962	[36]
75	sakuranetin	$[\text{M}+\text{H}]^+$	22.954	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_5$	287.0914	287.0915	245.0800、189.0556、167.0339、147.3312	[40]
76	异甘草素	$[\text{M}+\text{H}]^+$	23.148	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$	257.0808	257.0814	215.0699、173.0593、153.0185、103.0542	[26]
77	苯乙基-肉桂酰胺	$[\text{M}+\text{H}]^+$	23.820	$\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}$	252.1383	252.1389	131.0496、105.0701	[26]
78	oxytrofalcatin C	$[\text{M}+\text{H}]^+$	23.945	$\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO}_3$	268.0968	268.0963	253.0974、210.0910、121.0510、65.0571	[46]
79	2-(2-amino-3-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one	$[\text{M}+\text{H}]^+$	24.399	$\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO}_3$	268.0968	268.0967	253.2255、150.0320、104.0486	[47]
80	2', 4'-二羟基-4'-甲氧基查耳酮	$[\text{M}+\text{H}]^+$	24.766	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$	271.0965	271.0933	253.2255、225.0909、151.0389	[26]
81	oxytrofalcatin A	$[\text{M}+\text{H}]^+$	24.825	$\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NO}_2$	268.0863	238.0870	未检测到	[46]
82	2', 4'-二羟基查耳酮	$[\text{M}+\text{H}]^+$	25.042	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_3$	241.0859	241.0876	195.0806、37.0235	[26]
83	2'-甲氧基-4'-羟基查耳酮	$[\text{M}+\text{H}]^+$	25.747	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_3$	255.1016	255.1018	209.0964、151.0394、131.9842、103.0543	[26]
84	3-羧基齐墩果酸	$[\text{M}+\text{H}]^+$	26.405	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3$	455.3520	455.3520	437.3895、409.3460、289.2162、203.1792	[48]
85	球松素	$[\text{M}+\text{H}]^+$	27.302	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$	271.0965	271.0967	193.0499、167.0339、130.4495、103.0542	[26]
86	2, 5-二苯基噁唑*	$[\text{M}+\text{H}]^+$	28.036	$\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ON}$	222.0913	222.0918	178.0776、105.0334、77.0382	[49]

续表 1

No.	推测化合物	正离子	t_R/min	分子式	分子量	检测分子量	$\text{MS}^2 (m/z)$	文献
87	6-姜酚 [*]	$[\text{M}+\text{H}]^+$	28.736	$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_3$	277.1798	277.1799	173.6337、131.0486、102.8251	[30]
88	10-hydroxy-2, 4, 6-octadecatrienoic acid [*]	$[\text{M}+\text{H}]^+$	29.214	$\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_3$	295.2268	295.2271	277.2160、235.1711、179.1432、135.1173	[50]
89	9-氧代-10(E), 12(E)-十八碳二烯酸 [*]	$[\text{M}+\text{H}]^+$	29.764	$\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_3$	295.2268	295.2271	277.2163、231.2092、151.1120、95.0844	[51]
90	棕榈酰胺 [*]	$[\text{M}+\text{H}]^+$	30.287	$\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{NO}$	256.2635	256.2638	102.8249、88.0755、56.7839	[52]
91	melilotigenin C	$[\text{M}+\text{H}]^+$	30.892	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$	457.3676	457.3679	421.3476、38.3145、313.2495、247.2055	[53]
92	ganoderol B	$[\text{M}+\text{H}]^+$	31.059	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_2$	441.3727	441.3738	423.5772、377.3220、285.1619、217.1962	[54]

注：“*”代表该成分镰形棘豆中首次报道。

Note: “*” represents the component was reported first time in *Oxytropis Falcata Bunge*.

应现象最明显，WTE 的苯酚硫酸反应最明显，说明 ETE 中含有的 3-羟基、4-羰基和邻二酚羟基结构的黄酮类化合物高于 WTE 和 EAE^[56]，WTE 中糖类含量最多。结合 UPLC-MS/MS 分析结果，ETE 中槲皮素、芹菜素、山柰酚、鼠李素及其衍生物等具有 3-羟基、4-羰基和邻二酚羟基结构的黄酮类化合物的含量高于 WTE 和 EAE，故 ETE 具有最佳的抗氧化和抑菌活性可能与此类结构黄酮含量较高有关，而较高的糖类物质降低了 WTE 的抑菌活性。综上，镰形棘豆以黄酮类物质为主要成分的 ETE 活性最佳，建立的 UPLC-MS/MS 法可对镰形棘豆中化学成分进行快速分析，同时为后续的药效基础和作用机制研究奠定基础。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国卫生部药品标准: 藏药 (第一册) [S]. 1995: 340.
- [2] 陈锦珊, 杨钦磊, 刘晓玲, 等. 藏药镰形棘豆的化学成分、药理作用及毒理学研究进展 [J]. 中国药房, 2016, 27 (28): 3945-3948.
- [3] 王彦君, 明海霞. 镰形棘豆主要成分及生物学活性研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39 (10): 108-111.
- [4] Khan A, Xu M, Wang TJ, et al. Catechol cross-linked antimicrobial peptide hydrogels prevent multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in burn wounds [J]. Biosci Rep, 2019, 39 (6): 1-15.
- [5] 凌书建, 杨丽萍, 陶剑光, 等. 大蒜素对大鼠深 II 度烧伤创面氧化应激和炎症反应的影响 [J]. 中国现代中药, 2021, 23 (1): 77-82.
- [6] Pangli H, Vatanpour S, Hortamani S, et al. Incorporation of silver nanoparticles in hydrogel matrices for controlling wound infection [J]. J Burn Care Res, 2021, 42 (4): 785-793.
- [7] 叶财发, 蔡跃辉, 倪晓霞, 等. 正交设计法优化镰形棘豆多糖含量测定方法及单糖组成分析 [J]. 中南药学, 2020, 18 (12): 2037-2040.
- [8] 顾青, 蔡银娜, 杨光明, 等. 藏药镰形棘豆的化学成分及其抗肿瘤活性研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19 (11): 72-75.
- [9] 王艺红, 蔡小辉, 曾棋平, 等. 藏药镰形棘豆抗深 II 度烧伤活性部位筛选 [J]. 解放军药理学学报, 2018, 34 (1): 11-14.
- [10] 卢洋, 邓小惠, 吴梦瑶, 等. 基于 UPLC-Q-Orbitrap-HRMS 技术的葛根-丹参药对化学成分分析 [J]. 中南药学, 2024, 22 (9): 2380-2386.
- [11] 霍思奇, 王帅, 杨欣欣, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的复方木鸡合剂化学成分析研究 [J]. 中南药学, 2024, 22 (5): 1150-1156.
- [12] 李磊, 崔鹤蓉, 王鹏龙, 等. 藏药普尔那不同部位体外抑菌及抗肿瘤活性研究 [J]. 中国医药导报, 2020, 17 (20): 17-20.
- [13] 杨欢. 藏药镰形棘豆的抗炎活性及化学成分研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2008.
- [14] 宋巧英, 孔令琦, 刘子晴. 低共熔溶剂协同超声波提取马泡瓜黄酮工艺优化及其体内外抗氧化活性 [J]. 食品科技, 2023, 48 (10): 180-187.
- [15] Stach M, Kolniak-Ostek J. The Influence of the use of different polysaccharide coatings on the stability of phenolic compounds and antioxidant capacity of chokeberry hydrogel microcapsules obtained by indirect extrusion [J]. Foods, 2023, 12: 1230515.
- [16] 沈秋莲, 叶财发, 倪晓霞, 等. 10% 水杨酸软膏微生物限度检查方法的适用性实验 [J]. 东南国防医药, 2021, 23 (2): 159-163.
- [17] 王志雁. 四种新疆特色植物生物碱 AChE 抑制活性及化学成分分析 [D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2018.
- [18] 李欣, 刘志荣, 李冬华, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定不同产地和不同品种棘豆中苦马豆素的含量 [J]. 药物分析杂志, 2021, 41 (4): 586-593.
- [19] 刘宏栋, 潘玲玲, 周翔, 等. 兰科植物生物碱类化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50 (3): 731-744.
- [20] 肖艳, 张婷, 张英杰, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 技术及网络药理学探讨化浊散结除痹方治疗痛风性关节炎的药效物质及潜在机制 [J]. 中国中药杂志, 2025, 50 (2): 444-464.
- [21] 元王涛, 张本印, 张育浩, 等. 藏药裁达夏提取物水部位化学成分及其大鼠血浆移行成分的质谱分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36 (5): 1783-1792.
- [22] 孙钰婧, 霍志鹏, 王玉, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MSE 分析不同炮制时间炒车前子的化学成分变化规律 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28 (4): 146-153.
- [23] 陈艳君, 杨伟群, 董海仟. 一锅法制备 1-吡啶基-3-哌啶-4-甲酸的合成研究 [J]. 化工设计通讯, 2024, 50 (1): 117-119.
- [24] 孙钰婧, 霍志鹏, 王玉, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MSE 分析不同炮制时间炒车前子的化学成分变化规律 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28 (4): 146-153.

- [25] 韩小芳. 金花茶关键组分的 LC-MS 分析 [D]. 南宁: 广西大学, 2023.
- [26] 元王涛. 藏药莪达夏改善大鼠心肌缺血再灌注损伤入血活性成分分析研究 [D]. 西宁: 青海大学, 2017.
- [27] Kozachok S, Kolodziejczyk CJ. Comparison of phenolic metabolites in purified extracts of three *Wild-growing* L. species and their antioxidant and anti-inflammatory activities in vitro [J]. *Molecules*, 2022, 27 (2): 1-23.
- [28] Prakash Om, Baskaran R, Kudachikar VB. Characterization, quantification of free, esterified and bound phenolics in Kainth (*Pyrus pashia* Buch.-Ham. Ex D. Don) fruit pulp by UPLC-ESI-HRMS/MS and evaluation of their antioxidant activity [J]. *Food Chem*, 201, 299: 125114.
- [29] 秦振纲, 张瑜, 齐梦蝶, 等. 中国沙棘和西藏沙棘叶中化学成分的 UPLC/Q-TOF-MS 快速分析 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41 (8): 1461-1468.
- [30] 霍星华. 镰形棘豆生物碱成分研究及毒性评价 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008.
- [31] 李军茂, 何明珍, 欧阳辉, 等. 超高效液相色谱与飞行时间质谱联用快速鉴别木芙蓉叶的化学成分 [J]. *中国药理学杂志*, 2016, 51 (14): 1162-1168.
- [32] 刘泽, 张硕, 徐欣雨, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的枳实炮制前后化学成分的比较研究 [J]. *中药材*, 2024, 47 (9): 2208-2214.
- [33] 叶嘉, 杨明建, 杨香瑜, 等. 太行山区酸枣叶化学成分的 UPLC-QTOF-MS 分析 [J]. *天然产物研究与开发*, 2019, 31 (7): 1183-1191.
- [34] Zhang MR, Jiang K, Yang JL, et al. Flavonoids as key bioactive components of *Oxytropis falcata* Bunge, a traditional anti-inflammatory and analgesic Xizang medicine [J]. *Nat Prod Res*, 2019, 34 (23): 1-19.
- [35] 刘艳, 荣晓惠, 谭金燕, 等. 洋金花叶中黄酮类和生物碱类化学成分研究 [J]. *中草药*, 2021, 52 (14): 4141-4152.
- [36] Wu JY, Cai BR, Zhang A. Chemical identification and antioxidant screening of Bufei Yishen formula using an offline DPPH ultrahigh-performance liquid chromatography Q-extractive orbitrap MS/MS [J]. *Int J Anal Chem*, 2022, 2022: 1-29.
- [37] Xu XJ, Guo YL, Chen ML. Hypoglycemic activities of flowers of *Xanthoceras sorbifolia* and identification of anti-oxidant components by off-line UPLC-QTOF-MS/MS-free radical scavenging detection [J]. *Chin Herb Med*, 2024, 16 (1): 151-161.
- [38] Wang Y, Cui WL, Pang GW, et al. Analyses of physical and chemical compositions of different medicinal specifications of CRPV by use of multiple instrumental techniques combined with multivariate statistical analysis [J]. *Molecules*, 2022, 27 (10): 1-25.
- [39] Wang SS, Zhang XJ, Que S, et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl flavonol glycosides from *oxytropis falcata* [J]. *J Nat Prod*, 2012, 5 (7): 1359-1364.
- [40] Guo Y, Zhang BY, Peng YF, et al. Mechanism of action of flavonoids of *oxytropis falcata* on the alleviation of myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Molecules*, 2022, 27 (5): 1706.
- [41] Hongrui L, Shang G. Comparative analysis of flavonoid metabolites from different parts of *hemerocallis citrine* [J]. *BMC Plant Biology*, 2023, 23 (1): 491-491.
- [42] Chen WH, Qi HY, Shi YO. 24-Hydroxyoleanane-type triterpenes from the aerial parts and roots of *Oxytropis falcata* [J]. *J Nat Prod*, 2009, 72 (8): 1410-1413.
- [43] 吴健, 关永霞, 范建伟, 等. 基于超高效液相色谱串联四级杆静电场轨道阱质谱法的天麻眩晕宁颗粒化学成分鉴定及归属 [J]. *中国现代中药*, 2021, 16 (17): 1-16.
- [44] 王丽桂, 吕佳杰, 都述虎, 等. 基于 UPLC-ESI-Q-TOF-MS 分析中药鸡冠花子的化学成分 [J]. *中国现代应用药学*, 2024, 41 (17): 2359-2371.
- [45] 魏学红, 金莉. 藏药镰形棘豆的研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2010, 26 (11): 1535-1538.
- [46] Chen WH, Wu QX, Wang R, et al. Oxytrofalcitins A-F, *N*-benzoylindole analogues from the roots of *Oxytropis falcata* (Leguminosae) [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71 (8-9): 1002-1006.
- [47] 刘洋. 棘豆属药用植物亲缘学初步研究 [D]. 乌鲁木齐: 内蒙古医科大学, 2022.
- [48] 薛俊娟, 叶国华, 魏国栋, 等. 芫花枝叶三萜类化学成分及其 α -葡萄糖苷酶抑制活性研究 [J]. *中草药*, 2024, 55 (8): 2524-2532.
- [49] 郑尚珍, 确生, 许先芳, 等. GC-MS 联用法测定镰形棘豆石油醚浸提物的化学成分 [J]. *西北师范大学学报 (自然科学版)*, 2003, 39 (2): 51-53.
- [50] 马文杰. 不同采收期首乌藤、首乌叶差异性成分分析及抗炎、抗氧化活性初探 [D]. 广州: 广东药科大学, 2019.
- [51] 吴孟娇, 李涵艺, 聂宇迪, 等. 人肠道菌群对党参水提物的体外转化作用 [J]. *中国现代中药*, 2024, 26 (11): 1919-1929.
- [52] 刘明阳, 金莹, 赵启韬, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 分析酒煎瓜蒌薤白半夏汤物质成分 [J]. *辽宁中医杂志*, 2024, 51 (9): 141-148.
- [53] 李秋萍, 缪剑华, 宋志军, 等. 山豆根非生物碱化学成分研究进展 [J]. *中国现代中药*, 2018, 20 (9): 1169-1178.
- [54] Wu SJ, Zhang SY, Peng B, et al. *Ganoderma lucidum*: a comprehensive review of phytochemistry, efficacy, safety and clinical study [J]. *Food Sci Hum Wellness*, 2024, 13 (2): 568-596.
- [55] 格桑罗布, 确生, 格桑帕卓, 等. 藏药镰形棘豆和轮叶棘豆的高效液相色谱指纹图谱分析 (英文) [J]. *中国药理学杂志*, 2014, 23 (11): 783-789.
- [56] 张琳琳. 桑黄毒理及黄酮提取分离和抗氧化活性研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2017.

(收稿日期: 2024-10-15; 修回日期: 2024-12-15)

氧化当归多糖水凝胶的制备与表征

尚上, 王灵敏, 杨帆, 齐梦飞, 向亚津晶, 张颜, 童瑛, 沈家燕, 刘葭, 吴清* (北京中医药大学中药学院, 北京 100029)

摘要: **目的** 利用当归多糖 (ASP) 与羧甲基壳聚糖 (CMCS) 交联, 制备可用于经皮给药系统或伤口敷料的水凝胶基质, 并进行表征。 **方法** 采用柱前衍生化 HPLC 分析 ASP 的单糖组成, 高碘酸钠法制备氧化当归多糖 (OASP)。以 L929 细胞存活率、划痕愈合率为指标评价 ASP 氧化前后的促愈合活性。Schiff 碱反应制备 OASP/CMCS 水凝胶, 以能否成功胶凝、溶胀和保水性能、流变学性质为指标, 单因素试验考察交联的影响因素, 筛选最优处方, 并对水凝胶的宏观性质、内部结构、溶胀性能、生物相容性以及体外生物活性等进行表征与评价。 **结果** ASP 主要由半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖组成。相较于 ASP, OASP 保留了促进 L929 细胞迁移的作用, 并能促进 L929 细胞的增殖。最优 OASP/CMCS 水凝胶处方为: OASP 质量分数 2%、氧化度 54%, CMCS 质量分数 5%, OASP 与 CMCS 比例 3:7, 交联 pH 6.5。OASP/CMCS 水凝胶呈多孔结构, 具有良好的载药空间、组织黏附性、自愈合性、力学性能, 在中性及碱性条件下溶胀效果更佳, 且具有良好的生物可降解性和生物相容性。该水凝胶能显著促进 L929 细胞的增殖和迁移, 具有良好的体外促愈合活性。 **结论** 本研究制备了一种具备优异性能与良好生物活性的 OASP/CMCS 水凝胶, 为经皮给药系统及伤口敷料等医疗领域提供了一种新型安全的材料选择。

关键词: 当归多糖; 水凝胶; Schiff 碱; 羧甲基壳聚糖; 经皮给药系统; 敷料

中图分类号: R943, R283 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)04-0961-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.014

Preparation and characterization of oxidized *Angelica sinensis* polysaccharide hydrogel

SHANG Shang, WANG Ling-min, YANG Fan, QI Meng-fei, XIANG Ya-jin-jing, ZHANG Yan, TONG Ying, SHEN Jia-yan, LIU Jia, WU Qing* (School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029)

Abstract: **Objective** To prepare and characterize hydrogel matrices for percutaneous drug delivery systems or wound dressings, by cross-linking *Angelica sinensis* polysaccharide (ASP) with carboxymethyl chitosan (CMCS). **Methods** The monosaccharide composition of ASP was analyzed by PMP-HPLC. Oxidized *Angelica sinensis* polysaccharide (OASP) was prepared by sodium periodate method. Additionally, the survival rate and scratch healing rate of L929 cells were used as indicators to determine the changes in the healing activity of ASP before and after the oxidation. OASP/CMCS hydrogels were prepared by Schiff base reaction. Single-factor experiments were conducted to determine the optimal formulation successful gel formation, swelling properties, water retention properties, and rheological properties. The macroscopical properties, internal structure, rheological properties, dressing properties, biocompatibility and in vitro bioactivity of hydrogels were characterized and evaluated. **Results** ASP was composed of galacturonic acid, glucose, galactose, and arabinose. Compared with the ASP, OASP retained the ability to promote L929 cell migration and promoted the proliferation of L929 cells. The optimal OASP/CMCS hydrogel prescription was as follows: OASP mass fraction

作者简介: 尚上, 女, 硕士研究生, 主要从事中药新剂型与新技术研究, email: shang01720@163.com *通信作者: 吴清, 女, 博士研究生导师, 主要从事中药新剂型与新技术研究, email: qwu@vip.sina.com

2%, oxidation degree 54%, CMCS mass fraction 5%, OASP and CMCS ratio 3 : 7, and crosslinking pH 6.5. The hydrogel exhibited a porous structure, featuring excellent drug-loading capacity, tissue adhesiveness, self-healing ability, and mechanical properties. It swelled more effectively under neutral and alkaline conditions with good biodegradability and biocompatibility. Furthermore, the hydrogel obviously promoted the proliferation and migration of L929 cells, indicating good in vitro healing activity. **Conclusion** OASP/CMCS hydrogel with excellent properties and biological activity is prepared, which provides a new safe choice for transdermal drug delivery system and wound dressing.

Key words: *Angelica sinensis* polysaccharide; hydrogel; Schiff base; carboxymethyl chitosan; transdermal drug delivery system; dressing

当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根, 被誉为“补血活血”的要药, 常用于治疗风湿痹痛、跌扑损伤、痈疽疮疡等症^[1]。当归多糖 (*Angelica sinensis* polysaccharide, ASP) 作为当归主要的化学成分之一, 在促进创面愈合方面展现出显著的活性, 包括促进细胞增殖、调节免疫应答、促进血管生成及抗氧化等^[2-4]。同时, ASP 具有丰富的侧链基团如羟基、羧基等, 使其能够通过多种化学修饰进一步扩展生物活性和应用范围^[5]。目前, 天然多糖基水凝胶因兼备高含水量、良好的生物相容性和可调的药物释放性能等优势, 在组织工程、药物输送及伤口敷料等领域的应用日益广泛^[6-7]。然而, 传统水凝胶的力学性能较差, 在外力作用下容易碎裂, 现常通过构建动态化学结构^[8], 使水凝胶的网络结构在断裂后能够再生, 以优化其自愈合性能和机械强度。其中, Schiff 碱反应利用氨基和醛基之间的反应形成动态共价亚胺键, 在制备自愈合水凝胶中被广泛应用^[9]。羧甲基壳聚糖 (carboxymethyl chitosan, CMCS) 为一种水溶性壳聚糖衍生物, 具有优异的生物相容性和生物可降解性, 其侧链含有大量氨基, 可与含有醛基或酮基的大分子反应, 从而成为构建水凝胶的优选基质材料^[10]。因此, 本文拟以 ASP 为材料, 将其侧链上的羟基氧化为醛基得到氧化当归多糖 (oxidized *Angelica Sinensis* polysaccharide, OASP), 与 CMCS 侧链上的氨基反应形成 Schiff 碱键, 构建 OASP/CMCS 水凝胶基质, 探索 ASP 作为外用高分子材料在生物医药领域新的应用与可行性。

1 材料

1.1 试药

ASP (糖含量: 90%, 重均分子量: 33 786 Da, 纯度: 66.90%, 批号: 230603, 上海融禾医药科技发展有限公司), CMCS (批号: 2230807001, 北京索莱宝科技有限公司), 高碘酸钠 (纯度: 99.5%, 批号: S817518, 上海麦克林生化科技有限公司),

乙二醇 (分析纯, 批号: 20210401, 天津大茂化学试剂厂), 1-苯基-3-甲基-5-吡啶酮 (PMP, 纯度 $\geq 99\%$, 上海源叶生物科技有限公司), 三氟乙酸 (纯度: 99%, 批号: C30153, 上海迈瑞尔生化科技有限公司), 0.25% 胰蛋白酶消化液、PBS 缓冲液、青链霉素混合液 (双抗) (武汉赛维尔生物科技有限公司), 无血清细胞冻存液 (批号: C0210B, 碧云天生物技术有限公司), 细胞增殖及毒性检测试剂盒 (CCK-8, 大连博格林生物科技有限公司)。

1.2 细胞

小鼠成纤维细胞 L929 (批号: STCC20025, 武汉梓杉生物技术有限公司), 兔红细胞 (批号: O23IM229801, 上海源叶生物科技有限公司)。

1.3 仪器

BSA224S 型电子天平、PB-10 酸度计 (北京赛多利斯科学仪器有限公司), Sorvall ST 8R 台式离心机、HAAKE Viscotester iQ Air 流变仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), 真空冷冻干燥机 (北京博医康实验仪器有限公司), Thermo Ultimate 3000 高效液相色谱仪、Ultimate 可变波长检测器 (美国赛默飞科技有限公司), DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器 (北京科伟永兴仪器有限公司), NEXUS 傅里叶变换红外光谱仪 (美国 Thermo Nicolet 公司), AVANCE NEO 600 核磁共振仪 (瑞士 Brugg 公司), EPOCH 多功能酶标仪 (美国 Bio Tek 仪器有限公司), TS2-S-SM 光学显微镜 (日本尼康公司), HWS-80B 型恒温恒湿箱 (北京市恒诺利兴科技有限公司), JSM-IT200 (LV) 扫描电子显微镜 (日本电子株式会社)。

2 方法与结果

2.1 ASP 单糖组成分析

利用 PMP 柱前衍生 HPLC 法分析 ASP 的单糖组成。精密称取 20 mg ASP 进行酸水解处理^[11]。精密量取 0.4 mL ASP 酸水解溶液, 加入等量 0.5 mol·L⁻¹ PMP 溶液和 0.3 mol·L⁻¹ NaOH 溶液混合,

70 °C 反应 40 min 后, 加入等量 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液中和。然后以三氯甲烷萃取, 取水相经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 备用。不同单糖标准品混合溶液采用同样方法进行衍生和处理。HPLC 检测条件^[11]: 色谱柱为 Kromasil 100-5-C18 ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$), 流动相为 PBS ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7) - 乙腈 (82 : 18), 流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长为 245 nm, 柱温为 25 °C, 进样量为 $10 \mu\text{L}$ 。结果见图 1, 通过对照 10 种标准单糖衍生化产物, 发现 ASP 主要由半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖组成。

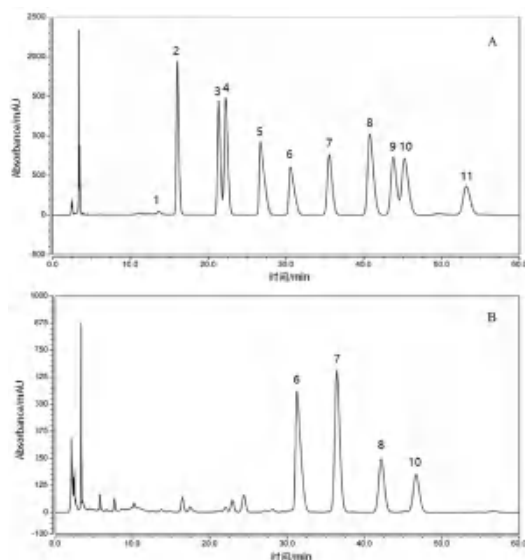


图 1 混合标准单糖 (A) 和 ASP 酸水解产物 (B) 的 PMP-HPLC 图谱
Fig 1 PMP-HPLC diagram of mixed standard monosaccharides (A) and ASP acid hydrolysate (B)

1. PMP; 2. 甘露糖 (mannose); 3. 核糖 (ribose); 4. 鼠李糖 (rhamnose); 5. 葡萄糖醛酸 (glucuronic acid); 6. 半乳糖醛酸 (galacturonic acid); 7. 葡萄糖 (glucose); 8. 半乳糖 (galactose); 9. 木糖 (xylose); 10. 阿拉伯糖 (arabinose); 11. 岩藻糖 (fucose)

2.2 OASP 的制备

根据课题组前期研究及实验结果^[11], 确定制备 OASP 的基本工艺为: 调节 1.5% ASP 水溶液 pH 至 6.5, 加入一定量的高碘酸钠, 35 °C 下避光搅拌 6 h 后, 加入 3 mL 乙二醇搅拌 30 min 终止反应, 然后加入 95% 乙醇使溶液含醇量达到 80%, 冷藏静置过夜。离心获得沉淀, 再次用水复溶后醇沉, 静置离心, 重复两次, 将沉淀冷冻干燥, 得到氧化产物。同时, 为了探究 OASP 氧化度对生物活性及水凝胶性质的影响, 本研究通过调节高碘酸钠与 ASP 比例 (0.4 : 1、0.6 : 1 和 0.8 : 1), 制备得到了氧化度分别为 35%、54%、71% 的 OASP。产物 OASP 的氧化度定义为氧化后糖醛基单体占 ASP 整体的摩尔百分比^[12]。

2.3 OASP 的结构表征

2.3.1 傅里叶红外光谱 (FT-IR) 分析 分别对 ASP 和 OASP 样品 (以氧化度 54% 的为代表) 进行 FT-IR 分析, 设置波数范围为 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$, 分辨率为 4 cm^{-1} 。结果见图 2, 与 ASP 相比, OASP 在 1748 cm^{-1} 的吸收峰显著增强, 代表醛基 $\text{C}=\text{O}$ 有关的伸缩振动, 说明 ASP 被成功氧化。

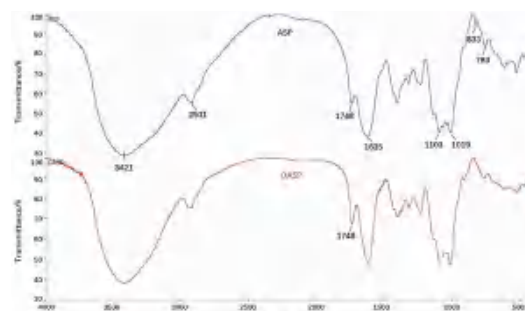


图 2 ASP 与 OASP 的红外光谱图
Fig 2 Infrared spectra of ASP and OASP

2.3.2 核磁共振波谱 (^1H NMR) 分析 以重水为溶剂, 分别对 ASP 和 OASP (以氧化度 54% 的为代表) 进行 ^1H NMR 分析。结果见图 3, OASP 在 9.20 ppm 出现了新峰, 归属于醛基的活泼氢, 说明 ASP 氧化后其侧链上的部分羟基转化为醛基, 与 FT-IR 结果一致。

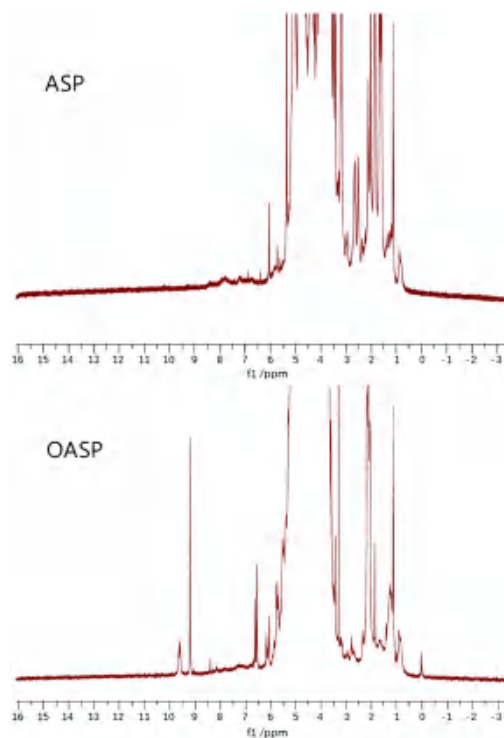


图 3 ASP 和 OASP 的 ^1H -NMR 谱图
Fig 3 ^1H -NMR spectra of ASP and OASP

2.4 ASP 与 OASP 的促愈合活性评价

2.4.1 对 L929 细胞增殖作用的影响 取对数生长期的 L929 细胞, 按 5×10^3 个 / 孔的密度铺于 96

孔板中,待贴壁后弃去原培养基,在每个孔中加入不同浓度的 ASP、OASP 溶液,给药 24 h 后,每孔加入 100 μL 含有 10% CCK-8 的 MEM 培养基溶液,孵育 1.5 h。测定 450 nm 下的吸光度,计算细胞存活率,并选择细胞存活率大于 80% 的浓度范围进行后续划痕实验。结果见图 4,ASP 对 L929 细胞增殖无明显影响。相比之下,OASP 在 20 ~ 320 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 下对 L929 细胞呈现促增殖效应,且其作用随浓度与氧化度的增加而增强;但在高浓度下,其增殖作用随浓度和氧化度增加而减弱,高氧化度时甚至表现出抑制效应,此抑制作用可能与醛基含量增加导致细胞毒性增强有关。上述结果表明,OASP 具有一定的促 L929 细胞增殖作用,但随着氧化度提高,其安全浓度范围也随之缩小。

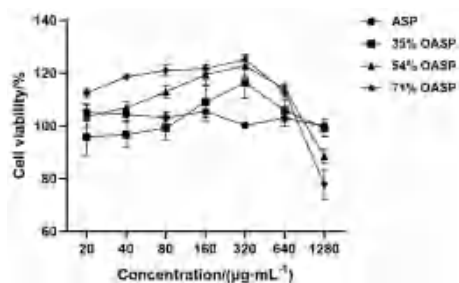


图 4 ASP 与不同氧化度的 OASP 对 L929 细胞活力的影响 ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

Fig 4 Effect of ASP and OASP with different oxidation degrees on the viability of L929 cells ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

2.4.2 对 L929 细胞迁移作用的影响 在 6 孔板中接种 L929 细胞,镜下观察细胞长满视野,用无菌枪头分别在每孔左、中、右垂直划 3 条划痕,用 PBS 冲洗掉漂浮的细胞,每孔加入不同浓度的 ASP、OASP,分别在 0、24、48、72 h 拍照,使用 Image J 软件分析细胞划痕面积,并计算划痕愈合率。结果见图 5,在 48 h 和 72 h 时 ASP 能够显著促进 L929 细胞迁移,且呈剂量依赖性。在 72 h 时,OASP 也表现出良好的促迁移效果(以氧化度 54%OASP 为代表)。

进一步比较了 72 h 时不同氧化度 OASP 的划痕愈合率,结果见图 6,其中 54%OASP 促 L929 细胞迁移效果较好。54% 和 71% 氧化度的 OASP 在 640 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度下划痕愈合率有所下降,原因可能是溶液中过量的醛基对细胞迁移产生了逆向影响,与增殖实验结果一致。综上,ASP 具有显著促 L929 细胞迁移作用,且 OASP 仍保留了该作用。同时 OASP 的氧化度会影响促 L929 细胞迁移作用。

2.5 OASP/CMCS 水凝胶处方筛选

通过试管倒置法优选胶凝的条件,初步确定了 OASP/CMCS 水凝胶在 pH 6.5, OASP 氧化度

为 35%、54%、71%, OASP 质量分数为 2%、3%、4%, CMCS 质量分数为 2%、3%、4%、5%、6%、7%, OASP 与 CMCS 比例为 1 : 9、2 : 8、3 : 7、4 : 6 时可成功实现胶凝。

水凝胶作为重要的伤口敷料及药物载体材料,其吸收和保存液体的能力直接影响其应用效果^[13]。同时,水凝胶在实际应用中应保持稳定的力学性能^[14]。因此,本研究以溶胀率、保水率及流变学性能为指标,优选水凝胶处方。

振荡频率扫描:采用 C35 2°/Ti 型转子,设置间隙为 0.1 mm,温度 37 $^{\circ}\text{C}$,应变振幅 0.1%,对水凝胶进行振荡频率扫描,在线性黏弹范围内施加不同角频率 (1 ~ 100 $\text{rad} \cdot \text{s}^{-1}$),比较其储存模量 (G') 和损耗模量 (G'') 的变化。

实验结果表明,在 OASP 氧化度为 54%, CMCS 质量分数为 5%, OASP 与 CMCS 比例为 3 : 7 的条件下,水凝胶的溶胀率、保水率、储存模量 (G') 和损耗模量 (G'') 均较高,且 G' 始终大于 G'' ,即水凝胶吸收和保存液体的能力良好,且更易于保持固体状态,力学性能较好。综上,确定水凝胶的最优处方为:质量分数为 2%、氧化度为 54% 的 OASP 溶液及质量分数为 5% 的 CMCS 溶液,按 3 : 7 比例混合,调节交联 pH 至 6.5。

2.6 OASP/CMCS 水凝胶最优处方验证结果

按“2.5”项下最优处方平行制备 3 份 OASP/CMCS 水凝胶,测定溶胀率和保水率。制得的 OASP/CMCS 水凝胶溶胀率为 3669%, 24 h 保水率为 (90.98 $\pm$ 0.59) %, 48 h 保水率为 (83.42 $\pm$ 0.57) %, 72 h 后保水率仍能保留 (77.03 $\pm$ 0.74) %,具有良好的溶胀率与保水率。

2.7 OASP/CMCS 水凝胶的表征

2.7.1 OASP/CMCS 水凝胶的宏观表征 制备原水凝胶和含显色剂的水凝胶,结果水凝胶呈现了良好的组织黏附性,将两者交互摆放充分接触,静置 1 h 后,显色剂逐渐向原水凝胶中迁移,使用镊子对水凝胶进行悬挂和拉伸,两种水凝胶已经合为一体(见图 7),显示水凝胶具有自愈合性。

2.7.2 OASP/CMCS 水凝胶的微观结构表征 为了比较载药前后的水凝胶的微观形态变化,选取阿魏酸作为模型药物制备载药水凝胶。将冻干的空白水凝胶、载药水凝胶于液氮中脆断,得到水凝胶横截面。样品喷金后在扫描电子显微镜 (SEM) 下观察内部形貌。结果见图 8,空白水凝胶呈现多孔结构,载药后内部孔洞变得更加致密,验证了阿魏酸成功载入水凝胶中,对水凝胶的基本交联结构不会造成破坏,

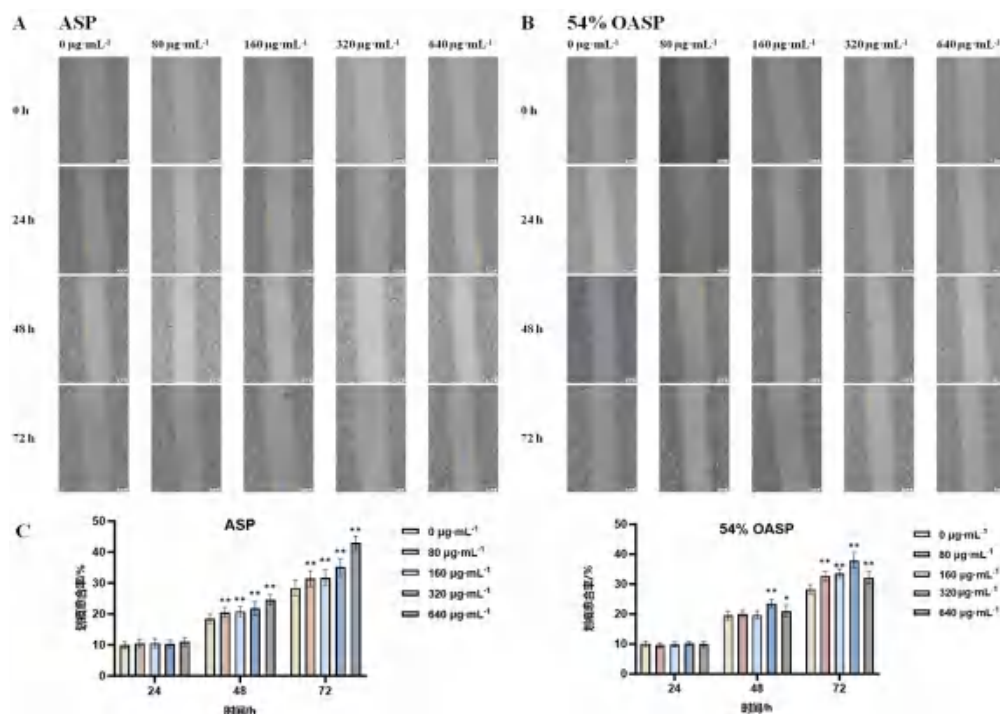

 图 5 ASP 和 OASP 对 L929 细胞划痕愈合的影响 ($\times 40$, $\bar{x} \pm s$)

 Fig 5 Effect of ASP and OASP on the scratch healing of L929 cells ($\times 40$, $\bar{x} \pm s$)

注 (Note): 与 $0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ (Compared with the $0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ group, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$).

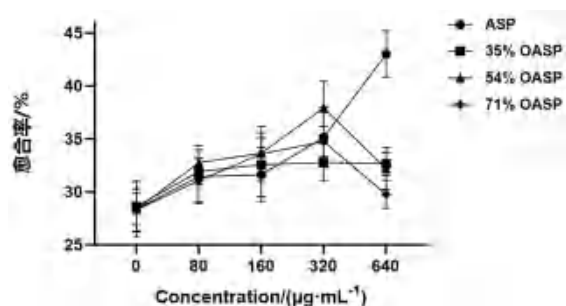

 图 6 ASP 与不同氧化度的 OASP 给药 72 h 的划痕愈合结果 ($\bar{x} \pm s$)

 Fig 6 Scratch healing rate of ASP and OASP with different oxidation degree for 72 h ($\bar{x} \pm s$)

药物分子与水凝胶的网状结构之间存在着良好的相容性, 水凝胶的丰富孔隙提供了良好的载药空间。

2.7.3 OASP/CMCS 水凝胶 FT-IR 分析 采用 FT-IR 法分别对 OASP、CMCS、OASP 与 CMCS 混合物、OASP/CMCS 水凝胶进行分析, 设定波数范围为 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ 。结果见图 9, 与 OASP 相比, OASP/CMCS 水凝胶 1746 cm^{-1} 处的醛基 $\text{C}=\text{O}$ 有关的伸缩振动消失, 在 1600 cm^{-1} 出现新的 $\text{C}=\text{N}$ 伸缩振动峰, 说明 OASP 的醛基与 CMCS 的氨基成功反应形成 Schiff 碱键, 交联成功。



图 7 水凝胶的自愈合性宏观表征结果图

Fig 7 Self-healing macroscopical characterization of hydrogel

2.8 OASP/CMCS 水凝胶流变学分析

振荡振幅扫描: 设定温度 37°C , 设置角频率 $10 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$, 改变应变范围 $\gamma = 1\% \sim 500\%$; **振荡频率扫描:** 设定温度 37°C , 应变振幅 0.1% , 施加不同角频率 ($1 \sim 100 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$); 分别考察水凝胶 G' 和 G'' 的变化。由图 10A 可知, 水凝胶的线性黏弹区间 (LVR) 为 $1\% \sim 25\%$, 当应力为 122.3% 时,

G' 和 G'' 相交, 表明在此范围内, 水凝胶可以保持其结构不发生塌落, 具有良好的力学性质。如图 10B 所示, 整个扫描过程中水凝胶的 G' 的值始终大于 G'' , 并且无交点出现, 说明水凝胶具有类固体性质和稳定的交联结构, 凝胶强度较好。

2.9 OASP/CMCS 水凝胶性能分析

2.9.1 体外 pH 响应性溶胀测试^[15] 为模拟不同

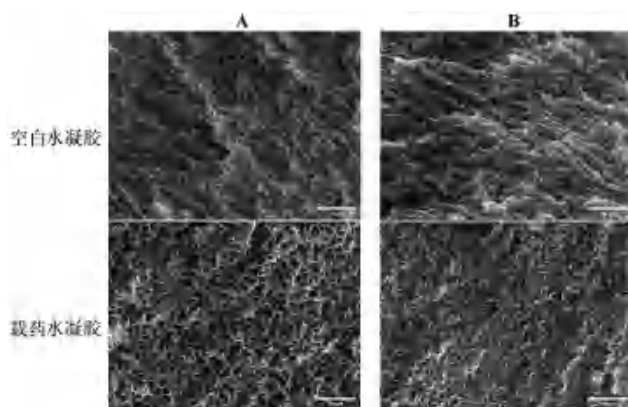
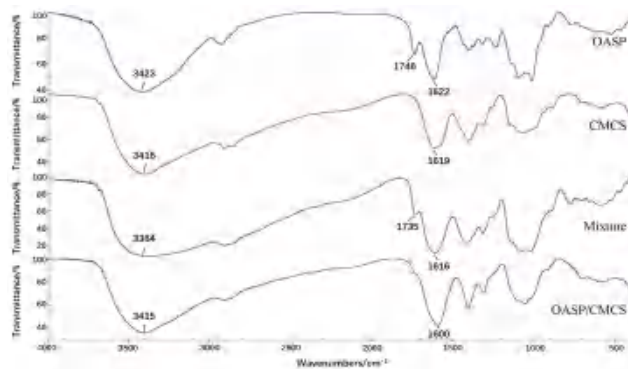
图 8 OASP/CMCS 水凝胶扫描电镜图 (A. $\times 200$; B. $\times 400$)Fig 8 TEM image of OASP/CMCS hydrogel (A. $\times 200$; B. $\times 400$)

图 9 OASP、CMCS、两者混合物以及 OASP/CMCS 水凝胶的红外光谱图

Fig 9 IR spectra of OASP, CMCS, mixtures of OASP and CMCS, and OASP/CMCS hydrogel

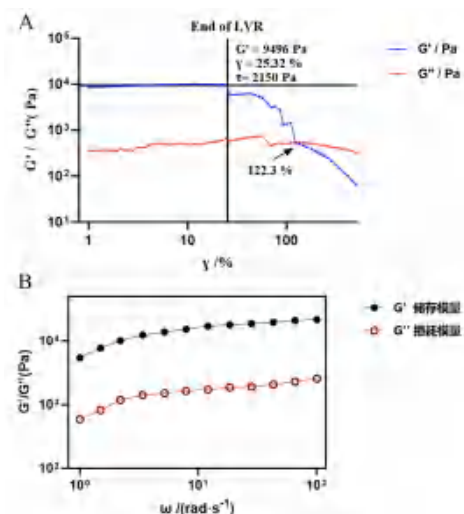


图 10 OASP/CMCS 水凝胶流变学性能

Fig 10 Rheological properties of OASP/CMCS hydrogels

A. 固定频率下的应变扫描图 (strain scan chart at fixed frequency); B. 不同角频率下频率扫描图 (frequency scans at different angular frequencies)

类型的创面环境, 将冻干水凝胶浸泡于温度为 37°C , 不同 pH 的 PBS (pH 5.5、6.5、7.4、8.5) 中, 实验方法同“2.5”项下, 绘制水凝胶 pH 响应

性溶胀曲线。结果见图 11, 水凝胶的溶胀率呈现碱性 $>$ 中性 $>$ 酸性的趋势。且水凝胶在酸性条件下 (pH 5.5、6.5) 于 12 h 达到溶胀平衡后溶胀率开始迅速下降。在 pH 7.4 条件下, 水凝胶在 96 h 达到溶胀平衡后溶胀率开始小幅度缓慢下降。在 pH 8.5 条件下, 水凝胶于 120 h 达到溶胀平衡。

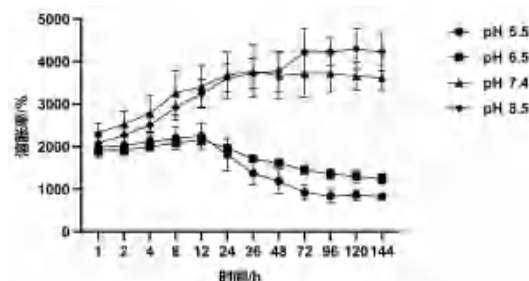


图 11 OASP/CMCS 水凝胶在不同 pH 下的溶胀性能

Fig 11 Swelling properties of OASP/CMCS hydrogels at different pH

2.9.2 体外降解测试 为了保持水凝胶内部结构和吸水状态的稳定, 胶凝后的水凝胶达到溶胀平衡后, 称定水凝胶的重量, 放于 37°C 恒温培养箱中, 间隔固定时间取出, 称重, 计算降解残留率直至水凝胶完全降解。结果显示, 水凝胶在达到平衡溶胀后即开始缓慢降解, 在 36 h 降解率可达 $(57.87 \pm 2.82)\%$, 在 84 h 时完成降解, 具有良好的生物可降解性。

2.10 OASP/CMCS 水凝胶生物相容性评价

采用紫外分光光度法, 以溶血率为指标, 初步评价水凝胶的血液相容性^[16]; 采用小鼠成纤维细胞 L929 细胞系, 以细胞活力为指标, 评价水凝胶的细胞相容性。

2.10.1 血液相容性 将 OASP/CMCS 水凝胶与生理盐水按 1:3 比例在 37°C 恒温条件下浸提 12 h, 按比例进行稀释得到一系列水凝胶浸提液。阴性对照为生理盐水, 阳性对照为 5% Triton-X 溶液。取 500 μL 各组溶液于 1.5 mL 试管中, 加入 500 μL 2% 兔红细胞, 于 37°C 中孵育 15、30、45、60、120、180 min。孵育完成后离心, 吸取上层清液于 96 孔板中, 测定 545 nm 下的吸光度, 计算溶血率 (%)。结果见图 12, 不同比例水凝胶浸提液的溶血率均在 2% 以下, 低于溶血标准的 5%, 表明水凝胶具有良好的血液相容性。

2.10.2 细胞相容性 CCK-8 法测定水凝胶浸提液的细胞毒性, 实验方法同“2.4.1”项下。结果见图 13, 水凝胶浸提液在 $18.75 \sim 1200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内对 L929 细胞的活性均无抑制作用, 这说明水凝胶具有良好的细胞相容性, 且在中高浓度 $300 \sim 1200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 下能显著促进 L929 细胞增殖, 表明水凝胶保留了 OASP 的促 L929 细胞增殖作用。

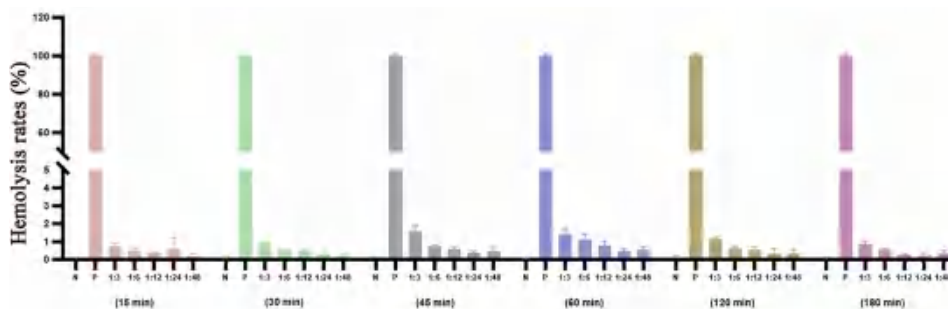

 图 12 不同比例 OASP/CMCS 水凝胶浸提液的溶血率结果 ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

 Fig 12 Hemolysis rate of different proportions of OASP/CMCS hydrogel extracts ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

注 (Note): N. 阴性对照 (negative control); P. 阳性对照 (positive control)。

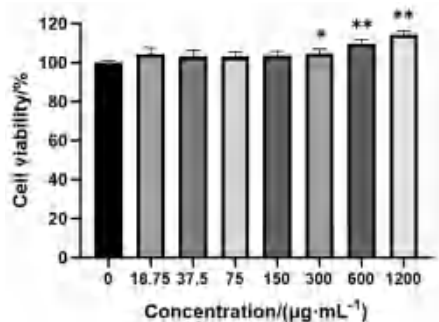

 图 13 OASP/CMCS 水凝胶对 L929 细胞活力的影响 ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

 Fig 13 Effect of OASP/CMCS hydrogel on the viability of L929 cells ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

 注 (Note): 与 $0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组比较, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ (Compared with the $0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ group, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$)。

2.11 OASP/CMCS 水凝胶体外细胞迁移评价

以 L929 细胞划痕愈合率为指标, 评价 OASP/CMCS 水凝胶的体外促细胞迁移能力。实验方法同“2.4.2”项下。结果见图 14, 不同浓度的 OASP/CMCS 水凝胶均能显著促进 L929 细胞的迁移, 表明 OASP/CMCS 水凝胶仍然保留了 OASP 的促 L929 细胞迁移作用。

2.12 统计分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 Prism 8 进行绘图, 采用 One-way ANOVA 进行统计分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 讨论

当归作为常用的补血活血中药, 其中 ASP 可通过促进血液循环、抗炎、促进细胞增殖与组织修复以及抗氧化等多种机制在创面愈合过程中发挥重要作用^[17-18]。基于 ASP 的生物活性与化学活性, 本研究对 ASP 进行氧化改性后, 与 CMCS 通过 Schiff 碱键交联, 制备了一种新型外用多糖基水凝胶。为了更好地贴合应用, 该研究基于敷料性质对水凝胶处方进行筛选, 最终得到的水凝胶展现了良好的组织黏附性、自愈合性和力学稳定性, 能够自动修复因皮肤活动而产生的细小裂

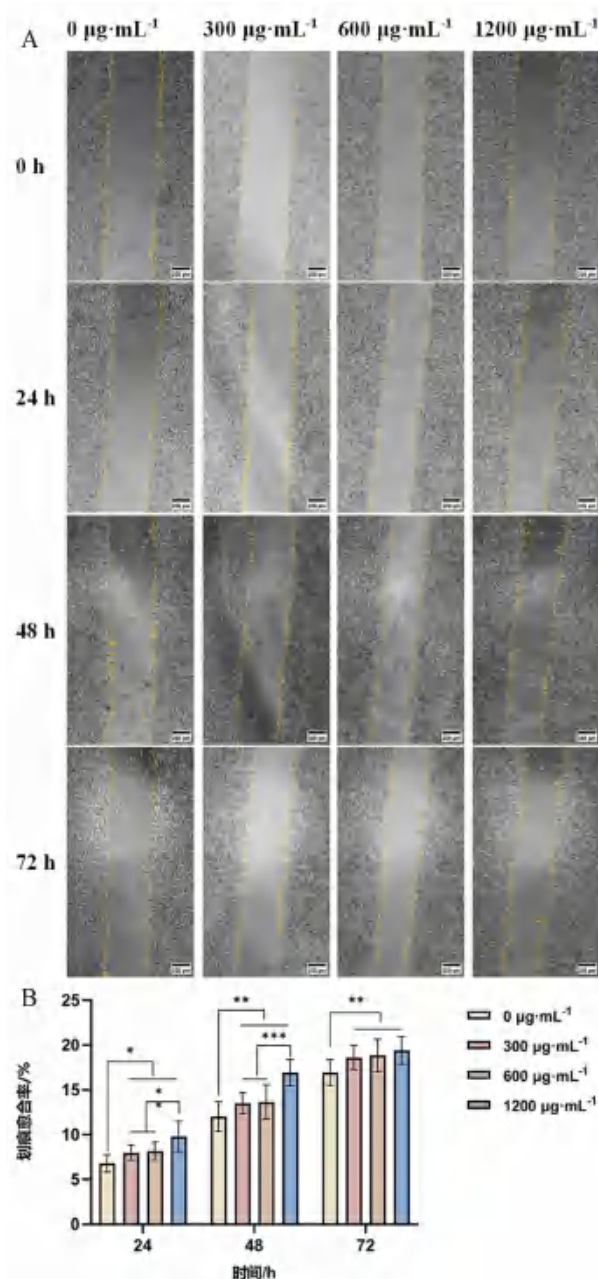

 图 14 OASP/CMCS 水凝胶对 L929 细胞迁移的影响 ($\times 40$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$)

 Fig 14 Effect of OASP/CMCS hydrogel on the migration of L929 cell ($\times 40$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$)

缝,且在日常动态环境中保持稳定的结构。同时该水凝胶具有良好的生物安全性和体外促愈合活性,是一种具有潜力的生物医用材料。

依据水凝胶的交联机制,OASP的氧化度越高,意味着其醛基含量越高,这有利于与CMCS的氨基发生反应,进而快速形成交联水凝胶。然而,过量的醛基容易引发细胞毒性以及相关活性降低等问题^[19]。本研究发现,OASP的氧化度对其促愈合活性有显著影响,在一定浓度范围内,提高OASP氧化度能促进L929细胞增殖与迁移;然而,高浓度和高氧化度下的过量醛基会对细胞产生毒性,导致作用减弱。此外,OASP的氧化度对水凝胶的溶胀率及流变学性质都有不同程度的影响,提示在天然多糖的氧化改性研究中需考虑多糖氧化度的多重影响。

OASP/CMCS水凝胶呈现聚阴离子型pH敏感水凝胶溶胀性能,在碱性及中性条件下溶胀效果更佳,这可能是由于大量的 $-\text{COO}^-$ 在不同pH条件下的质子化或离子化转化,使得水凝胶网络结构发生变化,其在碱性条件下易于发生离子化产生负电荷 $-\text{COO}^-$,导致水凝胶分子链间静电斥力作用增强,分子链间距离增大,使得水凝胶更容易吸水膨胀,而水凝胶在酸性条件下(pH 5.5、6.5)于12 h达到溶胀平衡后溶胀率开始迅速下降,可能是冻干水凝胶在吸水后充分接触酸性环境, $-\text{COO}^-$ 质子化变成 $-\text{COOH}$,基团之间相互作用使水凝胶网络结构更加紧凑,进而溶胀率呈下降趋势。根据文献研究^[15],正常皮肤pH值为4~7,而创面的pH值比正常皮肤pH更偏碱性,且深度创面比浅表创面的pH值更高,急性创面出现感染时呈现出碱性化,慢性难愈性创面的pH值为7.50~8.70,之后随着创面愈合,创面pH值趋于中性。根据水凝胶pH响应性溶胀的结果,提示该水凝胶在中性和碱性环境下更有利于药物的释放,在实际应用中更适宜于感染性创面及慢性难愈性创面。

本研究构建了一种新型的OASP/CMCS外用水凝胶,探索了ASP作为高分子材料在生物医药领域应用的可能性,同时为经皮给药及伤口敷料等领域提供了新的材料选择。

参考文献

[1] 徐志伟,李季文,马新换,等.当归不同药用部位的化学成分及药理作用研究进展[J].中华中医药学刊,2024,

42(4): 74-77.

- [2] 张玉,王凯平.当归多糖的研究进展[J].中国药学杂志,2023,58(12): 1065-1073.
- [3] 王刚,杜士明,杨光义,等.当归多糖对表皮细胞促创面愈合的调控作用[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(16): 150-154.
- [4] 刘永升,魏梅,宋春梅,等.当归多糖通过上调VEGF抑制细胞凋亡[J].基因组学与应用生物学,2020,39(3): 1307-1313.
- [5] 訾娅鑫,雷金凤,徐志朗,等.多糖的氧化改性及在生物医药领域的应用[J].生物加工过程,2018,16(1): 31-37.
- [6] 曹芳语,黄可欣,石凤娜,等.天然多糖聚合物在载药水凝胶中的应用研究进展[J].高分子通报,2023,36(2): 158-171.
- [7] 罗艳荣,卢春兰,杨东旭,等.天然多糖基载药水凝胶研究进展[J].功能材料,2022,53(8): 8054-8058, 8077.
- [8] 叶凡,李思宇,张运,等.基于动态共价键的多糖水凝胶在药物递送及组织修复中的应用研究进展[J].中国现代应用药学,2023,40(21): 3047-3052.
- [9] Xu J, Liu Y, Hsu SH. Hydrogels based on Schiff base linkages for biomedical applications[J]. Molecules, 2019, 24(16): 3005.
- [10] Guo FB, Liu Y, Chen SQ, et al. A Schiff base hydrogel dressing loading extracts from *Periplaneta Americana* for diabetic wound healing[J]. Int J Biol Macromol, 2023, 230: 123256.
- [11] 陈佳佳,王灵敏,王昕怡,等.白及多糖的氧化改性及交联化水凝胶的制备[J].中华中医药杂志,2023,38(5): 2091-2097.
- [12] 王琴梅,廖燕红,滕伟,等.盐酸羟胺-电位滴定法测定氧化海藻酸钠上的醛基浓度[J].分析试验室,2008,27(S1): 83-86.
- [13] 谭维群.透明质酸/羧甲基壳聚糖水凝胶载三七总皂苷在糖尿病皮肤损伤修复中应用[D].重庆:重庆理工大学,2022.
- [14] 杨亮亮.多功能水凝胶基敷料的制备及其在组织损伤修复中的应用研究[D].长春:吉林大学,2023.
- [15] 牟天易.急、慢性创面pH值变化与创面愈合[D].重庆:重庆医科大学,2016.
- [16] 国家食品药品监督管理总局.中药、天然药物局部刺激性和溶血性研究技术指导原则[S]. 2005.
- [17] 郇晓宇,孙波,孙庆.当归在创面修复中的作用机制研究进展[J].中国中西医结合外科杂志,2022,28(1): 119-121.
- [18] 刘琳,柴志勇,刁云辉,等.当归多糖对氧化型低密度脂蛋白诱导的血管内皮细胞损伤的保护作用研究[J].中国临床药理学杂志,2020,36(7): 818-821.
- [19] 王坤堂.白及多糖基水凝胶的制备、性能研究及在创面修复中的应用[D].天津:天津中医药大学,2022.

(收稿日期:2024-11-16;修回日期:2024-12-20)

基于特征图谱、网络药理学和实验验证探究克银丸 治疗银屑病的潜在作用机制

王晓凡¹, 刘苏杰¹, 阮佳鑫¹, 王晨¹, 闫嘉鹤¹, 刘树民^{2*} (1. 黑龙江中医药大学研究生院, 哈尔滨 150000;
2. 黑龙江中医药大学中医药研究院, 哈尔滨 150000)

摘要: **目的** 通过指纹图谱、网络药理学、体内外实验预测并验证克银丸治疗银屑病的作用机制。**方法** 采用 HPLC 法建立克银丸特征图谱的检测方法, 匹配共有峰并进行色谱峰归属; 基于文献及特征图谱研究筛选克银丸活性成分, 进行含量测定并分析饮片-基准样品的量值传递规律; 通过网络药理学建立“成分-靶点-通路”网络预测核心靶点和通路, 通过体内外实验对得到的预测结果进行验证。**结果** 克银丸指纹图谱共标示了 13 个共有峰, 并指出没食子酸、绿原酸、落新妇苷、白鲜碱、黄柏酮、鞣酮, 其含量测定结果分别为 $(0.0216 \pm 0.0050)\%$ 、 $(0.0184 \pm 0.0053)\%$ 、 $(0.0400 \pm 0.0120)\%$ 、 $(0.0013 \pm 0.0003)\%$ 、 $(0.012 \pm 0.0031)\%$ 、 $(0.003 \pm 0.0007)\%$ 。构建了“成分-靶点-通路”网络, 筛选出 25 个核心靶点, 15 条通路。实验结果显示, 与模型组相比, 给药组大鼠皮肤中信号传导和转录激活因子 3 (STAT3) 的表达量明显降低 ($P < 0.01$), 程序性细胞死亡蛋白 1 (PD-1) 及其配体 (PD-L1) 的表达量明显升高 ($P < 0.05$); 细胞实验证明白鲜碱、黄柏酮、落新妇苷对银屑病有治疗作用。**结论** 采用指纹图谱、含量测定的方法探索克银丸标准样品量值传递关系, 网络药理学结合体内外实验验证了克银丸的治疗作用, 其作用机制可能是调节 STAT3 进而通过 PD-1/PD-L1 通路发挥作用, 为克银丸质量标准的建立及作用机制的研究提供参考。

关键词: 克银丸; 指纹图谱; 网络药理学; 银屑病; STAT3; PD-1/PD-L1 通路

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)04-0969-09

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.015

Determination of quality markers of Keyin pills and their therapeutic effect on psoriasis

WANG Xiao-fan¹, LIU Su-jie¹, RUAN Jia-xin¹, WANG Chen¹, YAN Jia-he¹, LIU Shu-min^{2*} (1. Graduate School, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150000; 2. Institute of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150000)

Abstract: **Objective** To screen and verify the quality markers of Keyin pills by fingerprint, network pharmacology, in vitro and in vivo experiments. **Methods** HPLC was used to establish a detection method for the characteristic map of Keyin pills. The common peaks were matched and chromatographic peaks assigned. Based on the literature and feature map, the active ingredients of Keyin pills were screened, the content was determined, and the quantity and value transfer rule between decoction pieces and reference samples were analyzed. A component-target-pathway network was established by network pharmacology to predict the core targets and pathways, and the prediction was verified by in vitro and in vivo experiments. **Results** Totally 13 common peaks were identified in the fingerprint of Keyin pills, and 6 compounds peaks identified. The contents of gallic acid, chlorogenic acid, astilbin, dictamnine, obacunone, and fraxinellone were $(0.0216 \pm 0.0050)\%$, $(0.0184 \pm 0.0053)\%$, $(0.0400 \pm 0.0120)\%$, $(0.0013 \pm 0.0003)\%$, $(0.012 \pm 0.0031)\%$ and $(0.003 \pm 0.0007)\%$. The component-target-pathway network

基金项目: 国家重点研发计划“中医药现代化”重点专项资助项目 (No. 2022YFC3502103-04)。

作者简介: 王晓凡, 女, 硕士研究生, 主要从事中药药性理论及药效物质基础方面的研究, email: 984105940@qq.com *通信作者:

刘树民, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药药性理论及药效物质基础方面的研究, email: keji_liu@163.com

was established for network pharmacology analysis, and 25 core targets and 15 pathways were screened. Compared with the model group, the expression of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) in the skin of the drug group was significantly decreased ($P < 0.01$), while the expression of programmed cell death protein 1 (PD-1) and its ligand (PD-L1) was significantly increased ($P < 0.05$). The cell experiments showed therapeutic effects of leucine, xanthone and astilbin on psoriasis. Gallic acid, chlorogenic acid, astilmidine, leucocyne, corkone, and ash were predicted to be potential quality-markers for Keyin pills. **Conclusion** HPLC fingerprint and content determination are used to determine the relationship between the quasi-sample quantity and value of Keyin pills. Network pharmacology combined with in vitro and in vivo experiments verify the therapeutic effect of Keyin pills, whose mechanism may be the regulation of STAT3 to play a role via PD-1/PD-L1 pathway.

Key words: Keyin pill; fingerprint; network pharmacology; psoriasis; STAT3; PD-1/PD-L1 pathway

克银丸由拳参、土茯苓、白鲜皮、北豆根 4 味中药组成, 是治疗银屑病的常用药, 对皮损基底红、伴便秘和尿黄的血热风燥银屑病具有显著疗效, 具有清热解毒、祛风止痒的功效, 是治疗血热证银屑病的常用中成药, 但其作用机制尚不明确^[1-2]。尽管克银丸被《卫生部药品标准·中药成方制剂(第六册)》收录, 但因收录时间较早, 针对其质量标准的研究相对匮乏。现有的研究主要集中在通过薄层色谱鉴别没食子酸和高效液相色谱(HPLC)分别测定鞣酮、蝙蝠葛碱、没食子酸的含量^[3-6]。这些方法虽然为克银丸中特定成分的定量分析提供了依据, 但尚无法全面控制克银丸的整体质量。

银屑病作为一种由免疫系统介导的非传染性慢性炎症性皮肤病, 其典型临床表现为鳞屑性红斑或斑块, 全球有 2%~3% 的人群受其影响^[7]。患者常表现出角质形成细胞的异常增殖、真皮毛细血管的扩张以及炎性细胞的浸润, 严重者还会伴有代谢综合征、心血管疾病、关节炎和免疫功能紊乱等并发症^[8-9]。当前研究普遍认为, 银屑病的发病机制涉及适应性免疫和固有免疫系统之间相互作用的失衡, 多种免疫细胞及其产生的细胞因子在银屑病的病理过程中扮演着关键角色^[10-11]。

Q-Marker 是由刘昌孝院士于 2016 年提出的概念, 其内容主要包括“质量传递与溯源”“成分特有性”“成分有效性”“复方配伍环境”“成分可测性”等五大元素^[12-13]。为建立能全面反映克银丸质量状况的分析方法, 完善其质量标准, 同时探究其活性成分治疗银屑病的机制, 本研究建立了克银丸 HPLC 特征图谱, 结合活性成分的含量测定、转移率等指标建立克银丸的质量评价方法, 利用网络药理学分析活性成分治疗银屑病的潜在靶点及作用机制, 并进一步通过体内外实验对相关成分与靶点的有效性进行验证, 以期克银丸

的质量控制提供科学依据, 并为其在临床治疗银屑病中的应用提供理论支持。

1 材料

1.1 仪器

Waters2695 型高效液相色谱仪、2996DAD 检测器、Empower 色谱工作站(美国 Waters 公司); KQ-700DE 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); CHT210R 型大容量高速台式冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); CPA225D 型电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司); 电泳仪及附件、电转仪及附件(BIO-RAD 公司); 2020 Attune NxT 流式细胞仪(赛默飞世尔科技); M200pro 型酶标仪(瑞士 TECAN 集团公司); ChemicScope 5300 化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器)。

1.2 试药

盐酸普萘洛尔、十八醇、甘油、单硬脂酸甘油酯(上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 批号分别为: B23111145、L2121390、J2325319、J22111119), 十二烷基硫酸钠(毕得医药, 批号: DMU756), 凡士林(天津市致远化学试剂有限公司, 批号: 20230401); 白细胞介素(IL)-23、肿瘤坏死因子(TNF- α)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号分别为: 20230916、20230911); PAGE 凝胶快速制备试剂盒、Omni-ECL 基础型化学发光检测试剂盒(上海雅酶生物医药科技有限公司); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、信号传导和转录激活因子 3(STAT3)、程序性细胞死亡蛋白 1(PD-1)及其配体(PD-L1)(武汉赛维尔生物科技有限公司, 批号分别为: AC24041400、10026539、10031805); CCK8 检测试剂(Biosharp, 批号: BS350A); M5 混合溶液(IL-1 α 、IL-17A、IL-22、TNF- α 、Oncostatin M)(美国 Pepro Tech 公司); 细胞周期检测试剂盒(碧云天生物公司); 鞣酮(批号: 111923-202105, HPLC $\geq 99.7\%$)、鞣酮(批号:

111700-202004, HPLC $\geq 99.6\%$)、没食子酸(批号: 110831-201906, HPLC $\geq 91.5\%$)、落新妇苷(批号: 111798-201805, HPLC $\geq 93.6\%$)、绿原酸(批号: 110753-202119, HPLC $\geq 96.3\%$)(中国食品药品检定研究院); 白鲜碱(上海源叶生物科技有限公司, 批号: A24IB223596, HPLC $\geq 98\%$); 克银丸(北京同仁堂股份有限公司同仁堂制药厂, 批号: 21030049, 规格: 10 g/100 粒); 白鲜皮(批号: 2201001、2204001)、土茯苓(批号: 2205001)(河北全泰药业有限公司); 土茯苓(批号: 221201)、拳参(批号: 210401、210901)、北豆根(批号: 220601、221101)(黑龙江祥泰中药饮片有限公司), 所有药材均经黑龙江中医药大学中医药研究院刘树民教授鉴定为正品。

1.3 动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠 30 只, 体重(220 $\pm$ 20) g [辽宁长生生物技术股份有限公司(生产许可证号: SCXK(辽) 2020-0001, 质量合格证号: No.210726231102568276, 实验动物使用许可证号: SYXK(黑) 2018-0007)], 饲养于温度(25 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 50% $\sim$ 60%、12 h 昼夜交替光照的环境中, 自由进食饮水, 适应性饲养 1 周。本实验获得黑龙江中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理审查批件号: DXLL2023122702)。

1.4 细胞

人永生角质形成细胞 HaCat 细胞(尚恩生物, 批号: SNL-163), 经 STR 鉴定为 HaCat 细胞, 使用稳定后的第 3 $\sim$ 4 代细胞进行实验。

2 方法与结果

2.1 克银丸指纹图谱的建立

2.1.1 克银丸基准样品的制备 按处方比例称取土茯苓 30 g、白鲜皮 30 g、北豆根 10 g、拳参 30 g, 加蒸馏水浸泡 30 min 后煎煮 3 次, 将合并后的滤液浓缩, 使用冷冻干燥机干燥, 即得克银丸基准样品冻干粉。利用随机函数对土茯苓、拳参、北豆根、白鲜皮 4 味饮片不同批次药材进行组合, 共得到 16 批样品(K1 $\sim$ K16)。

2.1.2 对照品及供试品溶液的制备 精密称取黄柏酮、枳酮、白鲜碱、落新妇苷、绿原酸、没食子酸对照品适量, 加甲醇溶解, 配制得质量浓度分别为 98、87、102、94、88、93 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。称取克银丸基准样品粉末 0.5 g, 加入 10 mL 甲醇, 密封后称定重量, 超声 30 min, 放冷后补足失重, 摇匀后滤过, 取续滤液, 即得克银丸基准样品供试品溶液。

2.1.3 色谱条件 Dikma C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 以甲醇(A)-0.1%磷酸水溶液(B)

为流动相; 洗脱梯度(0 $\sim$ 4 min, 5% $\sim$ 14.5%A; 4 $\sim$ 20 min, 14.5% $\sim$ 20%A; 20 $\sim$ 38 min, 20% $\sim$ 24%A; 38 $\sim$ 54 min, 24% $\sim$ 31.5%A; 54 $\sim$ 59 min, 31.5% $\sim$ 33.5%A; 59 $\sim$ 85 min, 33.5% $\sim$ 43%A; 85 $\sim$ 95 min, 43% $\sim$ 62%A; 95 $\sim$ 105 min, 62% $\sim$ 95%A); 柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$; 进样量为 10 μL ; 流速为 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长为 236 nm。

2.1.4 方法学考察

①精密试验: 取克银丸基准样品(K1) 0.5 g, 按照“2.1.2”项下方法制备样品, 重复进样 6 次, 以 8 号色谱峰(落新妇苷)为参照峰, 计算得各共有峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD 均低于 1.7%, 表明仪器精密性良好。

②重复性试验: 取克银丸基准样品(K1) 0.5 g, 按照“2.1.2”项下方法制备样品, 共平行制备 6 份样品溶液, 进样测定, 以 8 号色谱峰(落新妇苷)为参照峰, 计算得共有峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD 均低于 2.3%, 表明本法重复性良好。

③稳定性试验: 取克银丸基准样品(K1) 0.5 g, 按照“2.1.2”项下方法制备样品, 分别于 0、4、8、12、18、24 h 进样测定, 以 8 号色谱峰(落新妇苷)为参照峰, 计算得共有峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD 均低于 2.1%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

④线性关系考察: 取“2.1.2”项下对照品溶液, 按一定比例稀释, 进样测定, 记录色谱图。以峰面积为纵坐标(Y)和对照品浓度为横坐标(X)绘制标准曲线, 并计算回归方程, 结果没食子酸 $y = 7.4496 \times 10^3 x + 2.3434 \times 10^3$ ($R^2 = 0.9998$), 绿原酸 $y = 1.5709 \times 10^4 x - 1.3421 \times 10^4$ ($R^2 = 0.9998$), 落新妇苷 $y = 1.4030 \times 10^4 x - 9.5467 \times 10^4$ ($R^2 = 0.9998$), 白鲜碱 $y = 1.4478 \times 10^5 x - 8.7463 \times 10^4$ ($R^2 = 0.9997$), 黄柏酮 $y = 3.9821 \times 10^3 x - 4.1953 \times 10^4$ ($R^2 = 0.9973$), 枳酮 $y = 1.8909 \times 10^4 x - 1.4684 \times 10^5$ ($R^2 = 0.9984$), 表明没食子酸在 52 $\sim$ 312 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 绿原酸在 10.2 $\sim$ 183.6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 落新妇苷在 75.6 $\sim$ 252 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 白鲜碱在 4.54 $\sim$ 27.24 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 黄柏酮在 45.4 $\sim$ 181.6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 枳酮在 4.2 $\sim$ 59.1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

⑤加样回收试验: 精密称定 K1 样品 0.5 g, 按照供试品中各成分含量约 1:1 加入对照品溶液, 再按“2.1.2”项下方法制备 6 份平行样品, 进样测定, 记录峰面积并计算加样回收率, 结果没食子酸、绿原酸、落新妇苷、白鲜碱、黄柏酮、枳酮的

平均加样回收率分别为 101.4%、103.3%、98.2%、104.7%、99.6%、102.9%，*RSD* 分别为 1.7%、2.1%、2.3%、1.9%、3.1%、2.7%，表明所建立的含量测定方法可靠。

⑥ 含量测定及传递率研究：按“2.1.2”项下方法制备基准样品供试品溶液，进样分析，记录峰面积，测定 16 批基准样品中各成分的含量及饮片-基准样品传递率。结果没食子酸、绿原酸、落新妇苷、白鲜碱、黄柏酮、枳酮的平均含量分别为 $(0.0216 \pm 0.0050)\%$ 、 $(0.0184 \pm 0.0053)\%$ 、 $(0.0400 \pm 0.0120)\%$ 、 $(0.0013 \pm 0.0003)\%$ 、 $(0.012 \pm 0.0031)\%$ 、 $(0.003 \pm 0.0007)\%$ ，平均转移率分别为 $(28.383 \pm 6.5)\%$ 、 $(36.097 \pm 10.4)\%$ 、 $(36.678 \pm 10.9)\%$ 、 $(57.592 \pm 13.3)\%$ 、 $(46.247 \pm 12.0)\%$ 、 $(49.326 \pm 12.2)\%$ 。

2.1.5 指纹图谱及相似度分析及共有峰的归属和指认 按照“2.1.2”项下方法制备 16 批克银丸供试品溶液 (K1 ~ K16)，进样检测并记录结果。使用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012A) 软件，根据各峰的积分面积对 K1 ~ K16 色谱图进行分析，得到 16 组基准样品共有模式图 (R)，以 K1 作为参照图谱，采用平均数法，进行全峰匹配，计算相似度。结果见图 1，共确定了 13 个共有峰，样品相似度分别为 0.990、0.979、0.985、0.987、0.980、0.988、0.976、0.988、0.954、0.980、0.970、0.972、0.983、0.986、0.946、0.973，均大于 0.95，基准样品特征图谱相似度良好，表明基准样品的稳定性较好，主要物质群差异性小，形成的基准样品对照图谱能够作为衡量克银丸的标准参照物。

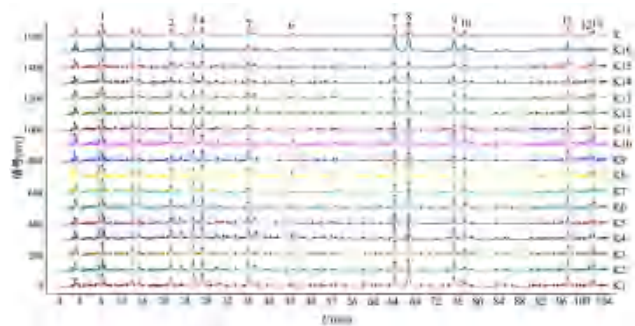


图 1 16 批克银丸 HPLC 特征图谱叠加图

Fig 1 Overlay of HPLC characteristic profiles of 16 batches of Keyin pills

按照“2.1.2”项下方法分别制备单味饮片供试品溶液和各阴性样品溶液，将对照品溶液、单味饮片供试品溶液、阴性样品溶液和基准样品供试品溶液色谱图叠加，对共有峰进行归属。其中峰 11、峰 12、峰 13 属于白鲜皮，峰 4 属于北豆根，峰 6、峰 7、峰 8、峰 9、峰 10 属于土茯苓，峰 1、峰 2、峰 3 属于拳参。共有峰指认结果显示，峰

1 为没食子酸、峰 3 为绿原酸，峰 8 为落新妇苷，峰 11 为白鲜碱，峰 12 为黄柏酮，峰 13 为枳酮。结果见图 2。

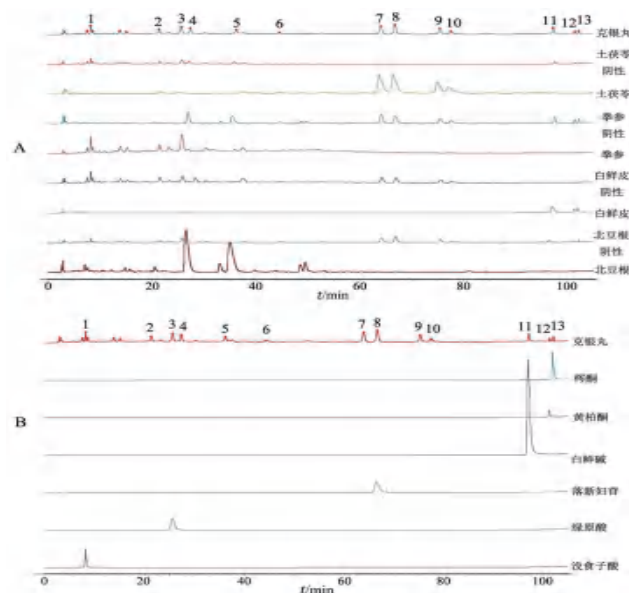


图 2 克银丸基准样品共有峰归属 (A) 与指认 (B) 结果

Fig 2 Common peak attribution (A) and identification (B) of the reference sample of Keyin pills

1. 没食子酸 (gallic acid); 3. 绿原酸 (chlorogenic acid); 8. 落新妇苷 (astilbin); 11. 白鲜碱 (dictamnine); 12. 黄柏酮 (obacunone); 13. 枳酮 (fraxinellone)

2.2 克银丸的网络药理学预测分析

2.2.1 克银丸测定成分与银屑病交集靶点筛选 将特征图谱所指认的 6 个化学成分，通过 PubChem 化合物数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取典范 SMILES 格式文件，并将 SMILES 文件导入 Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 和 Super-PRED 数据库 (https://prediction.charite.de/subpages/target_prediction.php) 预测药物相关靶点。以银屑病“psoriasis”为关键词，在 OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>)^[14]、DrugBank 数据库 (<https://go.drugbank.com/>)^[15]、Gene Card 数据库 (<https://www.genecards.org/>)^[16]、Disgenet 数据库 (<https://www.disgenet.org/>)^[17] 中筛选疾病靶点，将 223 个药物靶点与疾病靶点对比，得到 70 个交集靶点。

2.2.2 蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 网络构建 将筛选出的靶点导入 STRING 12.0 数据库 (<https://string-db.org/>)^[18]，选择物种为“Homo sapiens”，选取最高置信度蛋白交互参数评分值 > 0.4 的蛋白互作数据，将分析结果导入 Cytoscape 3.9.0 软件中，将生物分子相互作用网络与高通量表达数据和其他分子状态集成分析，使用“Network Analyzer”功能对 PPI 网络进行拓扑属性分析，选取介数中心性、接近中心性

和度值 3 个重要拓扑参数均大于中位值的靶点作为核心靶点, 并将筛选得到的关键靶点导入 Cytoscape 3.9.0 软件构建 PPI 网络图, 结果见图 3。

2.2.3 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析 利用 Metascape 平台 (<http://metascape.org/>)^[19] 对筛选所得的 25 个关键靶点进行基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 使用微生信在线作图工具 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 根据富集分析结果制图, 结果见图 4。

KEGG 结果表明, 克银丸可能通过癌症 PD-L1 表达及 PD-1 核查点通路、癌症通路、PI3K-Akt 信号通路、Th17 细胞分化、HIF-1 信号通路等发挥作用。GO 富集结果显示, 候选成分主要参与的生物过程 (BP) 包括对肽的反应、对激素的反应、细胞迁移的正向调节等过程; 细胞组分 (CC) 主要涉及转录调节复合体、内体腔、细胞质的核周区域等; 分子功能 (MF) 主要涉及蛋白激酶活性、RNA 聚合酶 II 特异性 DNA 结合转录因子结合、纤连蛋白结合等。

2.2.4 构建“成分-靶点-通路”网络 利用 Cytoscape 3.10.0 软件, 构建克银丸“成分-靶点-通路”网络图, 结果见图 5。克银丸可通过 STAT3、NFKB1、HIF1A、MAPK14、mTOR 等 25 个核心靶点, 参与癌症 PD-L1 表达及 PD-1 核查点通路、HIF-1 信号通路、Th17 细胞分化、PI3K-Akt 信号通路等 15 条生物学途径, 对银屑病发挥治疗作用。

2.3 对克银丸质量标志物的实验验证

2.3.1 盐酸普萘洛尔乳膏剂的配制 根据前期基础^[20], 将凡士林、十八醇和单硬脂酸甘油酯 (6:4:1) 混合作为油相, 在 95℃ 水浴中加热融化; 另将十二烷基硫酸钠、甘油和蒸馏水 (1:7:70) 混合作为水相, 同样在 95℃ 水浴中溶解。两相溶解后, 将水相加入油相并不断搅拌直至冷却乳化, 冷却至室温后混入占总重量 5% 的普萘洛尔粉末, 即得 5% 盐酸普萘洛尔乳膏。

2.3.2 动物分组及造模^[21] 将大鼠随机分 3 组 ($n = 10$), 分别为空白组、模型组和给药组。大鼠背部剃去部分毛发, 空白组涂抹甘油, 模型组、给药组涂抹 5% 盐酸普萘洛尔乳膏剂, 每日 1 次, 连续 2 周。造模成功标志为大鼠背部皮肤出现红色斑痕及鳞屑症, HE 染色见角质层增厚与细胞炎性浸润^[21-22]。造模结束后开始灌胃给药, 给药量 1 mL/100 g, 给予给药组大鼠克银丸水溶液 ($2.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 相当于成人日均用量), 空白组与模型组大鼠等量生理盐水, 每日 1 次。给药结束后麻醉并处死大鼠, 收集腹主动脉血液, 4℃ 下 $13\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后收集上清液, -80℃ 冰箱

保存; 取造模处皮肤组织, 一部分 -80℃ 冰箱保存, 一部分 4% 多聚甲醛溶液中固定。

2.3.3 大鼠背部皮肤状况与 HE 染色病理学变化 大鼠背部皮肤状况对比结果见图 6A, 与空白组相比, 模型组大鼠背部皮肤出现明显红色斑痕及鳞屑症状, 给药组大鼠皮损症状有明显改善。取出固定在多聚甲醛中的皮肤组织, 脱水、透明后进行石蜡包埋, 切片后进行常规 HE 染色, 显微镜下观察染色情况, 结果见图 6B, 空白组大鼠皮肤结构完整、细胞形态正常; 模型组大鼠细胞出现炎性浸润, 细胞排列疏散, 角质层增厚; 给药组大鼠细胞形态有所恢复, 炎性细胞浸润减轻。

2.3.4 生化试剂盒检测大鼠血清中 IL-23、TNF- α 水平 取“2.3.2”项下血清样本, 参照试剂盒步骤, 检测大鼠血清中 IL-23 及 TNF- α 水平。结果见表 1, 与空白组相比, 模型组大鼠血清中的 IL-23、TNF- α 水平显著升高 ($P < 0.005$), 克银丸给药后大鼠血清中 IL-23、TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.05$), 说明克银丸对大鼠血清中 IL-23、TNF- α 水平具有调控作用。

表 1 克银丸对大鼠血清中 IL-23、TNF- α 水平的影响

Tab 1 Effect of Keyin pills on the serum levels of IL-23 and TNF- α in rats

组别	IL-23/ ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	TNF- α / ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
空白组	6.00 ± 0.40	1.91 ± 0.14
模型组	7.07 ± 0.35^a	2.47 ± 0.26^a
给药组	6.41 ± 0.28^b	2.11 ± 0.12^b

注: 与空白组比较, ^a $P < 0.005$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the blank group, ^a $P < 0.005$; compared with the model group, ^b $P < 0.05$.

2.3.5 蛋白质印迹法检测皮肤组织中 STAT3、PD-1、PD-L1 蛋白的表达 提取大鼠皮肤组织蛋白, 使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 加入蛋白上样缓冲液, 沸水浴 5 min 进行变性, 配制 SDS-PAGE 上样凝胶, 上样、电泳、转膜、封闭、一抗孵育 (STAT3、PD-1、PD-L1, 1:5000 稀释)、洗涤、二抗孵育后显影。结果见图 7, 与空白组比较, 模型组大鼠皮肤组织中 STAT3 表达明显增加 ($P < 0.01$), PD-1、PD-L1 表达明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 给药组大鼠皮肤组织 STAT3 明显降低 ($P < 0.01$), PD-1、PD-L1 表达明显增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.3.6 细胞培养与分组 选择 HaCaT 细胞作为实验对象, 共分为 5 组: 空白组, M5 组 (在含有 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ M5 混合溶液的培养基中培养 48 h), 白鲜碱组 (BXJ 组)、黄柏酮组 (HBT 组)、落新妇苷组 (LXFG 组), 每组设低、中、高 3 个不同浓度, 分别为 50、100、200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 在 M5 诱导条件下分别添加 0.1、1、10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BXJ、HBT、LXFG。



图3 克银丸治疗银屑病的核心靶蛋白的PPI网络图

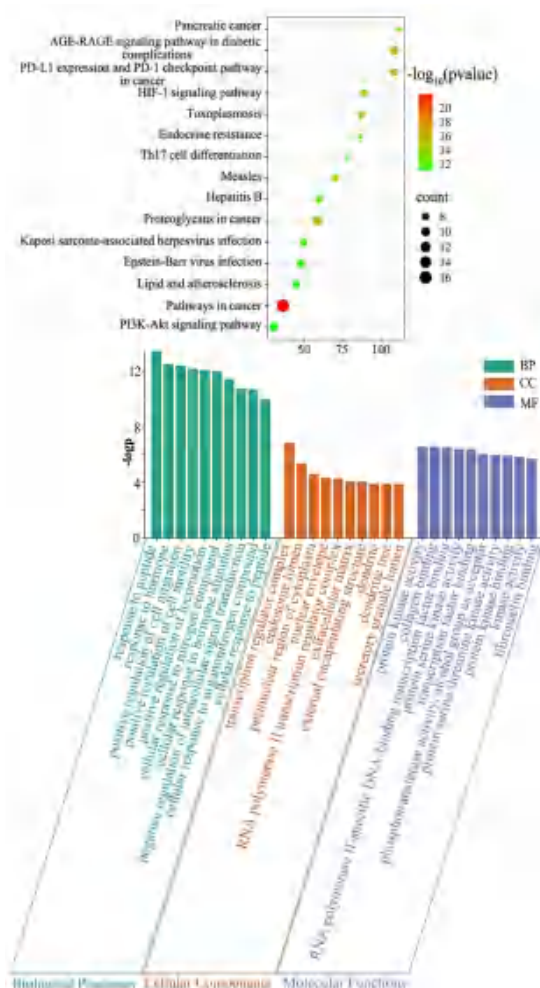


图4 克银丸治疗银屑病的 KEGG 富集与 GO 富集分析结果
Fig 4 KEGG enrichment and GO enrichment analysis of Keyin pills treating psoriasis

2.3.7 细胞增殖实验 采用 CCK-8 实验, 收集细胞 (1×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$), 将 100 μL /孔的 HaCaT 细胞接种至 96 孔板中, 给药后 24 h 向各孔加入 10 μL 的 CCK-8 试剂, 放置在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 30 min, 使用酶标仪在 450 nm 处检测各孔细胞的光密度值 (OD), 并计算其存活率。M5 组细胞

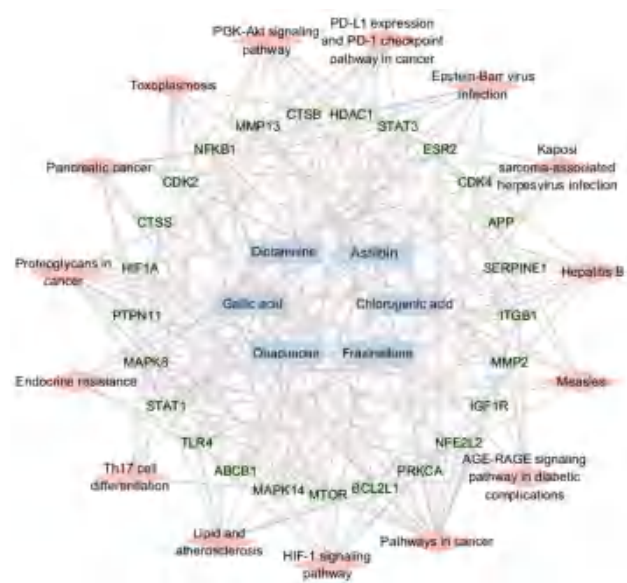


图5 克银丸治疗银屑病的“成分-靶点-通路”网络图
Fig 5 Component-target-pathway network diagram of the Keyin pill treating psoriasis

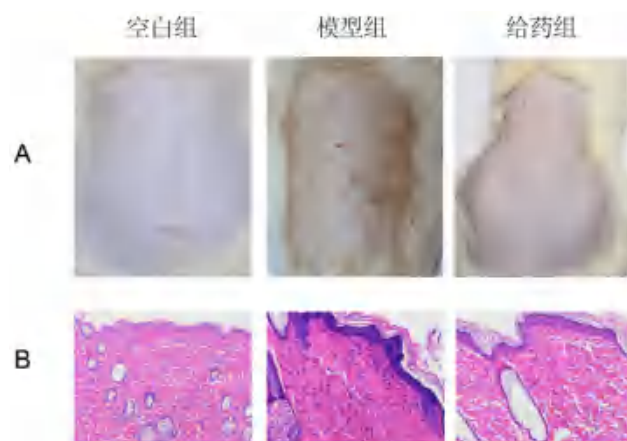


图6 克银丸对大鼠皮肤的外观(A)及组织形态(B)的影响(HE染色, $\times 20$)

Fig 6 Appearance (A) and morphology (B) of rat skin (HE stain, $\times 20$)

的存活率为 $(33.83\% \pm 1.97)\%$ ，与空白组（存活率 100%）相比显著降低（ $P < 0.001$ ）；BXJ 组细胞在不同浓度下的存活率分别为 $(49.11 \pm 3.18)\%$ 、 $(63.91 \pm 2.31)\%$ 、 $(71.81 \pm 3.11)\%$ ，HBT 组细胞存活率分别为 $(39.05 \pm 3.65)\%$ 、 $(46.87 \pm 1.86)\%$ 、 $(57.06 \pm 1.35)\%$ ，LXFG 组细胞存活率分别为 $(46.74 \pm 1.53)\%$ 、 $(54.45 \pm 1.79)\%$ 、 $(65.00 \pm 1.21)\%$ ，与 M5 组相比均显著升高（ $P < 0.001$ ）。结果见图 8，其中 BXJ 组存活率 $>$ LXFG 组存活率 $>$ HBT 组存活率，且随着浓度升高，存活率逐渐升高。

2.3.8 细胞周期检测 各组细胞加药处理 24 h 后, 1000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 收集细胞, 弃上清液, 用 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷 PBS 重悬细胞, 1000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 收集细胞。将收集到的细胞加入 1 mL 冰浴预

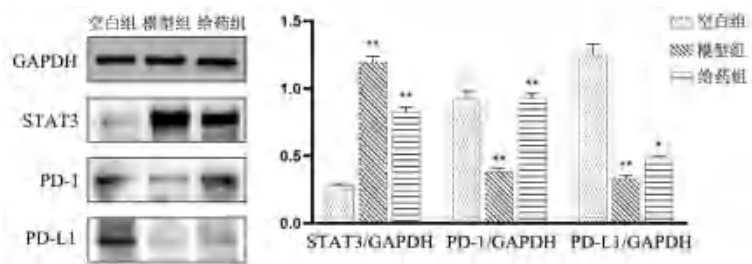


图 7 克银丸对大鼠皮肤中 STAT3、PD-1、PD-L1 蛋白表达的影响 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig 7 Effect of Keyin pills on the protein expression of STAT3, PD-1 and PD-L1 in the skin of rats (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

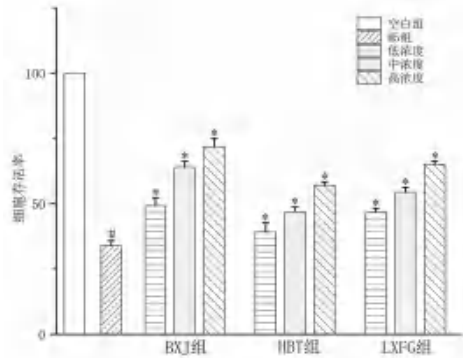


图 8 克银丸中 3 种成分对各组细胞存活率的影响

Fig 8 Effect of 3 compounds in Keyin pills cell survival rate in each group

注: 与空白组相比, $^{\#}P < 0.001$; 与 M5 组相比, $^{*}P < 0.001$ 。

Note: Compared with the blank group, $^{\#}P < 0.001$; compared with the M5 group, $^{*}P < 0.001$.

冷的 70% 乙醇中, 轻轻吹打混匀, 4℃ 固定 24 h, 1000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 5 min 收集细胞。向每个空管内加入 0.5 mL 配制好的碘化丙啶染色液, 缓慢并充分重悬细胞沉淀, 37℃ 温浴 30 min。选取每个成分的高剂量组进行流式分析, 将待测样本避光置于冰上存放, 通过流式细胞仪依次检测各组待测样品, 使用 FlowJo 软件对细胞周期进行数据分析。与空白组相比, M5 组细胞周期 S 期显著增加, G_0/G_1 占比明显降低; 与 M5 组相比, BXJ-G 组、LXFG-G 组、HBT-G 组细胞的 S 期占比显著降低, 表明落新妇苷、白鲜碱、黄柏酮对银屑病均发挥治疗作用, 结果见图 9。

3 讨论

克银丸作为治疗银屑病的常用药, 其临床疗

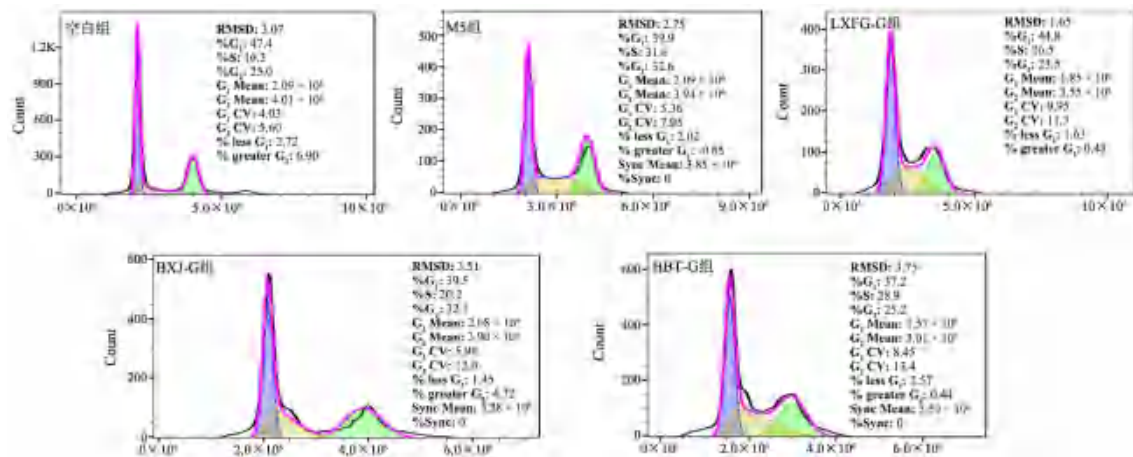


图 9 落新妇苷、白鲜碱、黄柏酮对 HaCaT 细胞细胞周期的影响

Fig 9 Effect of astilbin, dictamnine and obacunone on cell cycle of HaCaT cells

效已被广泛认可。然而, 关于其质量标准和作用机制的研究相对较少。本研究首先建立了克银丸指纹图谱, 标定了 13 个共有峰, 并指出其中 6 个成分, 分别为没食子酸、绿原酸、落新妇苷、白鲜碱、黄柏酮、栲酮。根据现有研究, 白鲜碱、黄柏酮、栲酮为白鲜皮入血成分, 落新妇苷为土茯苓入血成分^[23-24]。TCMSP 数据库提供的数据显示, 没食子酸的口服利用度 (OB 值) 大于 30%, 且根据 2020 年版《中国药典》规定, 没食子酸是拳参含量测定的关键指标。此外, 绿原酸和没食子酸也是其

他含拳参中药制剂如痢泻灵片、茵陈清筋颗粒、速效止泻胶囊质量标准的重要检测成分。因此, 认为这 6 个成分是克银丸的关键靶点成分。转移率研究显示, 没食子酸、绿原酸、落新妇苷、白鲜碱、黄柏酮、栲酮的平均转移率分别为 (28.383±6.5) %、(36.0972±10.4) %、(36.6777±10.9) %、(57.5922±13.3) %、(46.2475±12.0) %、(49.3264±12.2) %, 根据《古代经典名方目录管理的中药复方制剂药学研究技术指导原则》的建议, 这些指标成分的含量及其转移率应保持在平均

值 $\pm 30\%$ 范围内。在本实验中, 16 批克银丸基准样品的转移率均符合该标准, 表明克银丸基准样品在制备过程中能够确保从饮片到物质基准的一致性和稳定性。没食子酸、绿原酸、落新妇苷、白鲜碱、黄柏酮、枳酮在克银丸基准样品中的平均含量分别为 $(0.0216 \pm 0.0050)\%$ 、 $(0.0184 \pm 0.0053)\%$ 、 $(0.0400 \pm 0.0120)\%$ 、 $(0.0013 \pm 0.0003)\%$ 、 $(0.012 \pm 0.0031)\%$ 、 $(0.003 \pm 0.0007)\%$, 可为克银丸含量测定标准的制订提供参考。

网络药理学分析揭示了克银丸中 6 种活性成分对银屑病治疗的潜在作用机制, 这些成分主要靶向 STAT3、NFKB1、HIF1A、MAPK14、mTOR 等关键靶点, 并通过调控 PD-L1/PD-1 信号通路、HIF-1 信号通路、Th17 细胞分化等途径发挥作用。银屑病的发病机制与免疫异常紧密相关, 其中 T 细胞、中性粒细胞和角质形成细胞等免疫细胞均参与其中^[25]。STAT3 在调节细胞生长、分化及响应病原信号中扮演着关键角色, 其基因多态性已被确定为银屑病的易感性因素^[26]。STAT3 的激活不仅可促进 Th17 细胞的分化、激活和增殖, 还影响角质形成细胞的分化、增殖和分泌抗菌肽。有研究表明, STAT3 过表达会影响 Th17 分化, 诱导角质形成细胞增殖和表皮增生, 增加促炎介质和银屑病自身抗原角蛋白 17 的表达, 从而促进银屑病的发生发展^[27-28]。此外, PD-1 和 PD-L1 的表达受到 IL-6/STAT3 信号通路的调控, STAT3 能够上调 PD-L1 的表达^[29-30]。PD-1/PD-L1 作为协同刺激分子, 能够介导自身免疫功能, 对 T 淋巴细胞的活化和增殖具有抑制作用, 其功能失调可加剧炎症反应^[31-33]。研究亦表明, 银屑病患者体内 PD-1 与 PD-L1 的表达降低, 而增加它们的表达有助于改善银屑病症状^[34-36]。这与网络药理学预测和动物实验结果相符, 银屑病大鼠皮肤组织中 STAT3 表达增加而 PD-1 与 PD-L1 的表达降低, 克银丸治疗后 STAT3 表达降低而 PD-1 与 PD-L1 的表达增加, 银屑病症状有所改善。细胞增殖和周期实验进一步证实, 白鲜碱、黄柏酮和落新妇苷 3 个成分对 HaCaT 细胞均有不同程度的改善作用, 其中白鲜碱的效果最为显著, 表明这些成分在克银丸中具有明确的治疗作用。

综上所述, 本研究通过建立克银丸的指纹图谱, 初步推断没食子酸、绿原酸、落新妇苷、白鲜碱、黄柏酮和枳酮为克银丸的潜在 Q-Marker, 并对各成分进行含量测定与转移率研究。通过网络药理学分析, 探讨了克银丸治疗银屑病多成分、多靶点、多通路的作用机制。动物实验和细胞实验的验证结果进一步证实了白鲜皮、黄柏酮

和落新妇苷 3 种成分具有确切的治疗效果, 揭示了克银丸通过调节癌症 PD-L1 表达及 PD-1 检查点通路来治疗银屑病的相关机制。这些发现为克银丸的质量标准制订和作用机制研究提供了重要参考。但本研究仍存在不足, 仅对部分成分进行了分析, 未来的研究需进一步探究克银丸中其他成分的作用, 以全面理解其治疗银屑病的机制。

参考文献

- [1] 申倩, 张婷, 熊万涛, 等. 基于网络药理学克银丸治疗银屑病作用机制的研究 [J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志, 2020, 19 (1): 14-19, 24.
- [2] 蔺莉, 闫小宁, 李文彬, 等. 中成药复方制剂联合常规治疗用于寻常型银屑病疗效与安全性的贝叶斯网状 Meta 分析 [J]. 中国药房, 2021, 32 (6): 750-757.
- [3] 李海燕, 康建, 王健. HPLC 法测定克银丸中没食子酸的含量 [J]. 中国药事, 2007, 21 (11): 908-909.
- [4] 贾俊, 范国强, 王小焕, 等. HPLC 法测定克银丸中蝙蝠葛碱含量 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30 (7): 1222-1224.
- [5] 张丽娟, 贾俊, 王小焕, 等. 克银丸质量控制方法研究 [J]. 现代仪器, 2012, 18 (2): 39-41.
- [6] 王会平, 胡顺波, 郭洪丽, 等. 克银丸质量标准制定 [A]/ 增强自主创新能力促进吉林经济发展——启明杯·吉林省第四届科学技术学术年会论文集 (下册) [C]. 2006: 428-429.
- [7] Tampa M, Mitran MI, Mitran CI, et al. Psoriasis: what is new in markers of disease severity? [J]. Medicina (Kaunas), 2024, 60 (2): 337.
- [8] Zhang CY, Cao XR, Zhao LX, et al. Traditional Chinese medicine Shi-Bi-Man ameliorates psoriasis via inhibiting IL-23/Th17 axis and CXCL16-mediated endothelial activation [J]. Chin Med, 2024, 19 (1): 38.
- [9] 朱雨雨, 宋承霖, 孙洋. 银屑病发病机制及药物调控研究进展 [J]. 药学报, 2020, 55 (7): 1393-1400.
- [10] Kuczyńska M, Moskot M, Gabig-Ciminska M. Insights into autophagic machinery and lysosomal function in cells involved in the psoriatic immune-mediated inflammatory cascade [J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2024, 72 (1): doi: 10.2478/aite-2024-0005.
- [11] 刘婧雯, 朱蕾. 银屑病发病机制及药物研究新进展 [J]. 药学报, 2023, 58 (10): 2942-2951.
- [12] 刘昌孝. 中药质量标志物 (Q-Marker) 研究发展的 5 年回顾 [J]. 中草药, 2021, 52 (9): 2511-2518.
- [13] 梁由单, 曹怡, 代小琳, 等. 基于特征图谱-网络药理学-实验验证探讨小儿咳喘灵颗粒治疗咳嗽的潜在作用机制 [J]. 中药药理与临床, 2023, 39 (12): 31-38.
- [14] McKusick VA. Mendelian inheritance in man: a catalog of human genes and genetic disorders [M]. Baltimore: JHU Press, 1998.
- [15] Knox C, Wilson M, Klinger CM, et al. DrugBank 6.0: the DrugBank knowledgebase for 2024 [J]. Nucleic Acids Res, 2024, 52 (D1): D1265-D1275.

- [16] Stwlzer G, Rosen N, Plaschkes I, et al. The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses [J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2016, 54: 1.30.1-1.30.33.
- [17] Piñero J, Saüch J, Sanz F, et al. The DisGeNET cytoscape app: exploring and visualizing disease genomics data [J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2021, 19: 2960-2967.
- [18] Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, et al. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest [J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51 (D1): D638-D646.
- [19] Zhou YY, Zhou B, Pache L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets [J]. *Nat Commun*, 2019, 10 (1): 1523.
- [20] 张萌萌, 刘树民, 孙慧娟, 等. 盐酸普萘洛尔致银屑病样大鼠模型的剂量、时间及性别探讨 [J]. *海南医学院学报*, 2025, 31 (5): 351-359, 372.
- [21] 陈婧弘, 吴朋娟, 刘莎, 等. 紫檀芪调节 JAK2/STAT3 信号通路改善银屑病样皮损大鼠 Th17/Treg 细胞平衡的机制 [J/OL]. *中国免疫学杂志*. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/22.1126.R.20241016.1613.002.html>.
- [22] 牛凡琪, 李炳男, 何世烨, 等. 桃红四物汤调控 MAPK/NF- κ B 信号通路治疗大鼠银屑病的作用机理 [J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2025, 39 (1): 17-29.
- [23] 刘金莲, 南海鹏, 陶然, 等. 基于超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱技术的清利湿热颗粒入血成分分析 [J]. *世界中医药*, 2023, 18 (6): 756-760.
- [24] 王培. 中药白鲜皮二氯甲烷部位的化学成分与药代动力学研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2015.
- [25] Kim DS, Je JH, Kim SH, et al. Programmed death-ligand 1, 2 expressions are decreased in the psoriatic epidermis [J]. *Arch Dermatol Res*, 2015, 307 (6): 531-538.
- [26] Belge K, Brück J, Ghoreschi K. Advances in treating psoriasis [J]. *F1000Prime Rep*, 2014, 6: 4.
- [27] Zhou X, Chen YD, Cui L, et al. Advances in the pathogenesis of psoriasis: from keratinocyte perspective [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13 (1): 81.
- [28] Calautti E, Avalle L, Poli V. Psoriasis: a STAT3-centric view [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19 (1): 171.
- [29] 洪静, 王超, 孙姗姗, 等. 基于 UHPLC-MS/MS、分子对接及细胞实验探讨健脾益气方对肝癌 PD-L1 和 PD-1 表达的影响 [J]. *中成药*, 2024, 46 (6): 2011-2017.
- [30] 胡唯伟, 杨大松. 肿瘤中 PD-L1 表达调控的分子机制研究进展 [J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37 (21): 2634-2639.
- [31] Deepak HB, Prince SE, Deshpande P. Effect of baricitinib in regulating programmed death 1 and ligand programmed cell death ligand 1 through JAK/STAT pathway in psoriasis [J]. *Indian J Pharmacol*, 2022, 54 (3): 183-193.
- [32] Adamczyk M, Bartosińska J, Racziewicz D, et al. The impact of biologic treatment on PD-1/PD-L1 pathway disturbances in psoriasis [J]. *J Clin Med*, 2023, 12 (13): 4179.
- [33] 刘明伟, 彭慧, 冷晓杰. 莫夫利西单抗治疗重度斑块状银屑病的临床疗效及其对 PD-1 和 PD-L1 表达水平的影响 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2022, 21 (24): 2660-2664.
- [34] 郑毅, 杨素清, 张琼, 等. 基于滤泡辅助性 T 细胞通路研究蜈蚣败毒饮治疗银屑病的机制 [J]. *中医学报*, 2023, 38 (4): 787-793.
- [35] 安月鹏, 杨素清, 刘畅. 蜈蚣败毒饮对银屑病小鼠滤泡辅助性 T 细胞相关因子 STAT3 及 PD-1 表达的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2022, 29 (6): 55-61.
- [36] 刘文静. 清热凉血方调节外周辅助性 T 细胞免疫治疗血热型银屑病的机理研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.

(收稿日期: 2024-11-01; 修回日期: 2024-12-20)

四子定喘汤调控巨噬细胞极化改善幼龄哮喘大鼠气道炎症的实验研究

王保团, 姜德*, 陈乙菲*, 何金秀, 刘亚锋, 魏毅 (新疆医科大学中医学院, 乌鲁木齐 830017)

摘要: **目的** 探讨四子定喘汤对幼龄哮喘大鼠气道炎症及巨噬细胞极化的影响。**方法** 将幼龄 SD 大鼠随机分为正常组, 模型组, 地塞米松组, 低、中、高剂量四子定喘汤组, 每组 6 只; 除正常组外, 其余各组采用卵清蛋白 (OVA) 激发制备幼龄大鼠哮喘模型, 各组分别给予相应药物治疗。采用小动物呼吸系统检测各组大鼠呼吸频率、气道反应性 (Penh 值); HE 染色观察大鼠肺组织病理结构变化; ELISA 法检测血清白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-10 (IL-10) 含量; 免疫荧光检测肺巨噬细胞标志物 CD86、CD163 的表达; qRT-PCR、Western blot 法检测大鼠肺组织巨噬细胞标志物肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 的水平。**结果** 与正常组相比, 模型组大鼠可见肺间质大面积充血, 肺泡间隔增厚, 炎性细胞浸润等病理改变, OVA 激发后大鼠呼吸频率、Penh 值、血清中 IL-1 β 含量、肺组织 TNF- α 和 TGF- β 1 mRNA 表达水平及 CD86 和 CD163 的表达水平明显升高 ($P < 0.001$), 血清 IL-10 含量明显降低 ($P < 0.001$)。与模型组相比, 各剂量四子定喘汤处理组和地塞米松组大鼠肺组织病理变化均有不同程度减轻, OVA 激发后大鼠呼吸频率、Penh 值、血清 IL-1 β 含量、肺组织 TNF- α 和 TGF- β 1 mRNA 表达水平及 CD86 和 CD163 表达水平显著下降, 血清 IL-10 含量明显上升。**结论** 四子定喘汤可减轻幼龄哮喘大鼠肺组织炎性细胞浸润和气道炎症, 其机制可能与调控巨噬细胞极化有关。

关键词: 四子定喘汤; 幼龄哮喘大鼠; 炎症; 巨噬细胞

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)04-0978-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.016

Experimental study of Sizi Dingchuan decoction regulating macrophage polarization to improve airway inflammation in young asthmatic rats

WANG Bao-tuan, JIANG De*, CHEN Yi-fei*, HE Jin-xiu, LIU Ya-feng, WEI Yi (School of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830017)

Abstract: Objective To determine the effect of Sizi Dingchuan decoction on the airway inflammation and macrophage polarization in young asthmatic rats. **Methods** Young SD rats were randomly divided into a normal group, a model group, a dexamethasone group, and low-dose, medium-dose and high-dose Sizi Dingchuan decoction groups, with 6 rats in each group. Except for the normal group, the other groups were activated by ovalbumin (OVA) to prepare young rat asthma models, and each group was given corresponding treatment respectively. The respiratory frequency and airway responsiveness (Penh value) of rats in each group were detected by small-animal respiratory system; the pathological structure changes of rat lung tissues were observed by HE staining; the contents of serum IL-1 β and IL-10 detected by ELISA; the expressions of lung macrophage markers CD86 and CD163 detected by immunofluorescence; and the levels of macrophage marker TNF- α and TGF- β 1 in the rat lung tissues detected by qRT-PCR and Western blot. **Results** Compared with the normal group, rats in the model group showed large-area hyperemia in the lung interstitium, thickening of alveolar septa, infiltration of

基金项目: 新疆维吾尔自治区重大科技专项项目 (No.2022A03019); 新疆医科大学西北燥证创新团队 (No.XYD2024C02); 新疆维吾尔自治区研究生创新项目 (No.XJ2024G181); 国家中医药管理局全国名中医周铭心传承工作室建设项目 [No. 国中医药办人教函 (2018) 119 号]; 新疆地区高发疾病研究教育部重点实验室开放课题 (No.2023B05)。

作者简介: 王保团, 男, 在读硕士研究生, 主要从事西北燥证与相关性疾病预防研究, email: 19339567842@qq.com *通信作者: 姜德, 男, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 主要从事西北燥证与相关性疾病预防研究, email: jiangde-ws@163.com; 陈乙菲, 女, 副教授, 主治医师, 主要从事中医药防治呼吸系统疾病的临床和基础研究, email: cfyEileen@163.com

inflammatory cells and other pathological changes. After the OVA activation, the respiratory frequency, Penh value, the content of IL-1 β in the serum, the expression levels of TNF- α and TGF- β 1 mRNA in lung tissues, and the expressions of CD86 and CD163 in the rats were all significantly increased ($P < 0.001$), while the content of serum IL-10 was significantly decreased ($P < 0.001$). Compared with the model group, the pathological changes in the lung tissues in rats in each Sizi Dingchuan decoction treatment group and dexamethasone group showed degrees of alleviation. After the OVA activation, the respiratory frequency, Penh value, the content of IL-1 β in the serum, the expressions of TNF- α and TGF- β 1 mRNA in the lung tissues, and the expressions of CD86 and CD163 were greatly decreased, while the content of IL-10 in the serum was significantly increased. **Conclusion** Sizi Dingchuan decoction can reduce the infiltration of inflammatory cells in the lung tissues and airway inflammation in young asthmatic rats, whose mechanism may be related to the regulation of macrophage polarization.

Key words: Sizi Dingchuan decoction; young asthmatic rat; inflammation; macrophage

支气管哮喘以咳嗽、痰鸣以及反复发作的喘息为基本症状的慢性肺部炎症性疾病，是儿童时期最常见的呼吸系统疾病之一，现已成为影响人类健康及生活质量的重要问题^[1-3]。气道炎症是哮喘发病的关键^[4]，而作为哮喘中独立且重要病理学改变的气道重塑，则是气道反复炎症损伤与修复发展到一定阶段的必然结果。因此临床治疗哮喘以抗炎为主，多使用支气管舒张剂、糖皮质激素、茶碱类药物^[5-6]，临床疗效肯定，但哮喘发病率及死亡率仍较高，且长期使用对儿童正常发育有不良影响^[7-8]。

研究表明，哮喘是由淋巴细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、巨噬细胞等多种细胞和细胞组分参与的炎症性疾病。其中巨噬细胞根据外部环境刺激的不同，可以分为经典活化型 M1 和交替活化型 M2。M1 型巨噬细胞在炎症反应时占支配地位，对呈递抗原十分重要，而 M2 型巨噬细胞则与抗炎反应相关^[9]。因此，通过靶向调节巨噬细胞极化，可能是治疗哮喘的潜在手段。

中医药治疗哮喘具有悠久的历史，积累了丰富的经验，理论体系较为完善。全国名中医周铭心教授从肺体之疾的本病病机出发，以“治当取肃肺体之法”为出发点，结合多年临床经验与中医理论基础自拟四子定喘汤用以治“肺体之疾”，在临床实践中取得较好的效果，但缺乏微观角度阐述其发挥作用的机制。因此，本研究基于巨噬细胞极化探讨了四子定喘汤治疗支气管哮喘的作用机制，并观察其对哮喘大鼠炎症因子的影响，以期四子定喘汤的临床应用提供依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠 36 只，体重（100 $\pm$ 20）g [新疆医科大学动物实验中心，动物许可证号：SYXK（新）2021-0003]。在新疆医科大学 SPF 级动物实验室内饲养，室内温度 23 $\sim$ 25 $^{\circ}\text{C}$ ，相对

湿度 55% $\sim$ 65%，自由饮食，适应性饮食 3 d 后进行实验。实验经新疆医科大学实验动物伦理委员会批准，伦理审查批件号：IACUC-JT-20231121-45。

1.2 试剂与仪器

卵清白蛋白（OVA，SigmaA5503），氢氧化铝佐剂（赛默飞世尔科技有限公司，批号：77161），地塞米松（江西正和生物科技有限公司，批号：20230902），大鼠白细胞介素（IL）-10、IL-1 β 酶联免疫吸附测定试剂盒（批号分别为 WO08VZX24478、WO07R00P2288，伊莱瑞特生物科技有限公司），TNF- α 抗体（批号：60291-1-Ig）、 β -actin 抗体（批号：66009-1-Ig）、CD163 多克隆抗体、CD86 多克隆抗体（武汉三鹰生物技术有限公司），TGF- β 1 抗体（abcam，批号：ab215715）；超声雾化器（江苏鱼跃医疗设备股份有限公司），RT-qPCR 仪（美国 Applied Biosystems 公司，型号：ABI7500），通用电泳仪（美国 BIO-RAD）。

2 方法与结果

2.1 药物的制备

四子定喘汤由麻黄、紫苏子等 7 味中药组成。所有药材均购自新疆医科大学附属中医医院，经新疆医科大学中医学院姜德教授鉴定。所有饮片加饮用水浸泡 30 min，大火迅速煮沸，转小火再煎 20 $\sim$ 30 min，滤出药液，残渣复煎，合并两次煎液，真空密封包装后冷藏保存。

2.2 分组及模型制备

36 只大鼠适应性饲养 3 d 后随机均分为 6 组，分别为正常组，模型组，地塞米松组，低、中、高剂量四子定喘汤组，每组 6 只。参照李潘营等^[10]实验方法构建哮喘幼鼠模型，除正常组外，所有大鼠于造模第 1 日及第 8 日腹腔注射 1 mL 致敏液（OVA 10 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ + 氢氧化铝 10 mg）致敏；第 15 $\sim$ 21 日将大鼠放于密封性良好的器具内应用超声波雾化器予 30 mL 2% 的 OVA

连续雾化激发，每日 1 次，观察大鼠状况。

2.3 给药方法

第 22 ~ 35 日，地塞米松组予地塞米松 $1\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃，低、中、高剂量四子定喘汤组分别按 3.2 、 6.4 、 $12.8\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃，均每日 1 次（根据成人与大鼠用药剂量换算实验动物的等效剂量，并以此作为四子定喘汤的中剂量）。

2.4 大鼠一般情况比较

观察大鼠一般活动、情绪、毛色、体重、进食饮水等情况，并采用 DSI BUXCO-WBP 小动物肺功能 - 全身体积描记检测系统，检测大鼠呼吸频率 (f) 和气道反应性 (Penh 值)。

结果显示，正常组大鼠未见异常反应；模型组大鼠可见点头样呼吸、腹式呼吸、烦躁、易激惹、搔鼻、抓耳等表现。激发期间，体重增长缓慢，毛发缺乏光泽，精神状态差，腹式呼吸明显。经四子定喘汤和地塞米松干预治疗后，大鼠症状均有不同程度改善。

与正常组比较，模型组大鼠 f 和 Penh 值明显增高 ($P < 0.001$)，说明哮喘模型制备成功。与模型组相比，中高剂量四子定喘汤组、地塞米松组大鼠 f 和 Penh 值均有不同程度降低 ($P < 0.001$)，低剂量四子定喘汤组 Penh 值差异无统计学意义，见图 1。

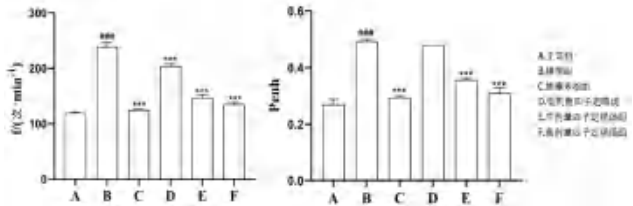


图 1 各组大鼠肺功能比较

Fig 1 Pulmonary function among the groups of rats

注：与正常组比较，### $P < 0.001$ ；与模型组比较，*** $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the normal group, ### $P < 0.001$; compared with the model group, *** $P < 0.001$.

2.5 ELISA 试剂盒检测各组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-10 的表达

按照 ELISA 试剂盒说明书检测大鼠血清中 IL-1 β 、IL-10 的水平。结果显示，与正常组相比，模型组大鼠血清中 IL-1 β 水平显著增高 ($P < 0.001$)，而 IL-10 水平明显降低 ($P < 0.001$)；与模型组相比，低、中、高剂量四子定喘汤组大鼠血清中 IL-1 β 水平显著下降 ($P < 0.001$)，中、高剂量四子定喘汤组大鼠血清中 IL-10 水平明显升高 ($P < 0.001$) (见表 1)，表明四子定喘汤能通过调节 OVA 诱导哮喘大鼠体内 IL-1 β 、IL-10 的表达来治疗哮喘。

2.6 四子定喘汤对大鼠组织病理学的影响

各组大鼠麻醉处死后，取肺组织标本，在通用多聚甲醛固定液中固定 48 h，脱水、浸蜡，包埋，切片，脱蜡后进行 HE 染色，光镜下观察各

表 1 各组大鼠炎症因子水平

Tab 1 Levels of inflammatory factors in rats in each group

组别	IL-1 β / (pg $\cdot$ mL $^{-1}$)	IL-10/ (pg $\cdot$ mL $^{-1}$)
正常组	27.26 $\pm$ 0.23	39.86 $\pm$ 5.45
模型组	41.19 $\pm$ 1.32 ^{###}	12.62 $\pm$ 0.90 ^{###}
地塞米松组	30.33 $\pm$ 0.58 ^{***}	33.90 $\pm$ 2.71 ^{***}
低剂量四子定喘汤组	37.67 $\pm$ 0.95 ^{***}	16.59 $\pm$ 1.48
中剂量四子定喘汤组	35.39 $\pm$ 0.40 ^{***}	24.81 $\pm$ 1.20 ^{***}
高剂量四子定喘汤组	31.49 $\pm$ 0.52 ^{***}	29.81 $\pm$ 0.94 ^{***}

注：与正常组比较，### $P < 0.001$ ；与模型组比较，*** $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the normal group, ### $P < 0.001$; compared with the model group, *** $P < 0.001$.

组大鼠肺组织病理结构变化。

如图 2 所示正常组大鼠肺泡及细支气管结构基本正常，管腔尚规则，未见明显炎症细胞浸润。模型组大鼠肺组织结构紊乱，肺泡壁增厚，管腔狭窄，腔内及血管周围有大量炎症细胞浸润。四子定喘汤各剂量组和地塞米松组大鼠肺组织结构较为清晰，肺泡间隔缩小，管腔内炎性分泌物减少，管壁厚度趋于正常，且四子定喘汤组呈现梯度趋势。

2.7 四子定喘汤对大鼠肺组织中 CD86、CD163 荧光表达的影响

取各组大鼠肺组织样本包埋切片，抗原修复，PBS 清洗，封闭，加入一抗，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜，次日加入对应荧光二抗，DAPI 复染，封片，使用 PANNORAMIC SCAN 全景切片扫描仪扫描成像，然后用 CaseViewer 2.4 软件打开，可以 1 ~ 400 倍任意倍数放大后进行观察，其中 CD163 呈绿色，CD86 呈红色，采用 Image J 软件分析 CD86、CD163 阳性信号的平均光密度值。

结果显示，与正常组比较，模型组大鼠肺组织 CD163、CD86 荧光强度显著增高 ($P < 0.001$)，见图 3。与模型组相比，低、中、高剂量四子定喘汤组 CD163、CD86 荧光强度均有不同程度的减弱 ($P < 0.01$, $P < 0.001$)。提示哮喘大鼠肺巨噬细胞极化增多，而四子定喘汤干预后可以减弱哮喘大鼠肺部巨噬细胞的极化过程。

2.8 四子定喘汤对大鼠肺组织中 TNF- α 、TGF- β 1 mRNA 的表达的影响

取冻存肺组织 100 mg，按照试剂盒操作步骤提取肺组织总 RNA，将 RNA 进行逆转录，在荧光定量 PCR 仪上进行扩增反应，以 β -actin 为内参，扩增条件为：95 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s，预变性为：95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 、34 s，完成 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算出目的 mRNA 的相对表达量。各 mRNA 引物序列见表 2。结果显示，与正常组比较，模型组大鼠肺组织 TNF- α 、TGF- β 1 mRNA 的相对表达增加 ($P < 0.001$)；与模型组相比，低、中、高剂量四子定喘汤组 TNF- α 、TGF- β 1 mRNA 相对表达减弱

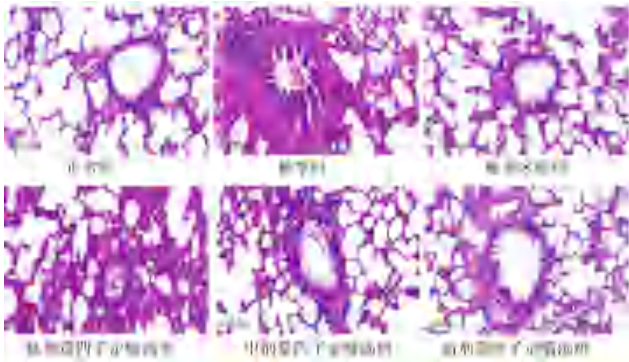


图 2 各组大鼠病理结果图 (HE, ×100)

Fig 2 Pathological results of rats in each group (HE, ×100)

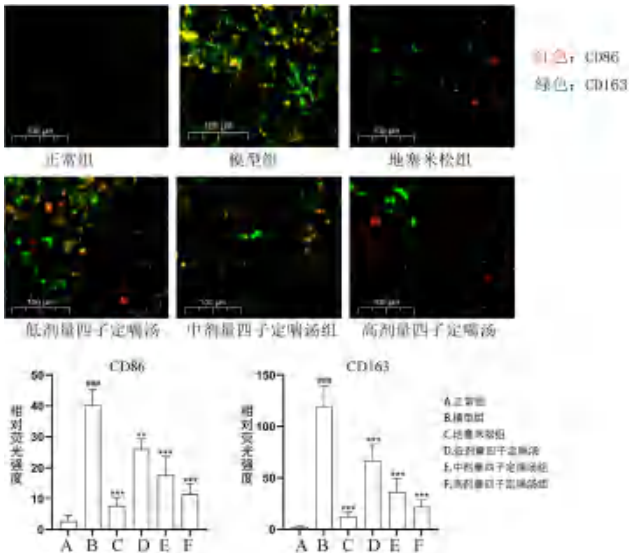


图 3 各组大鼠肺组织 CD86、CD163 表达比较

Fig 3 CD86 and CD163 expressions in lung tissues of rats in each group

($P < 0.001$), 且呈梯度下降趋势, 见图 4。说明四子定喘汤可以降低哮喘大鼠肺组织 $TNF-\alpha$ 、 $TGF-\beta 1$ mRNA 的表达, 减轻肺部的炎症反应。

2.8 四子定喘汤对大鼠肺组织中 $TNF-\alpha$ 、 $TGF-\beta 1$ 蛋白表达的影响

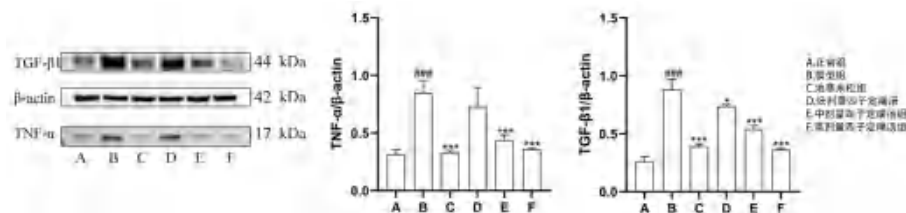


图 5 各组大鼠肺组织中 $TNF-\alpha$ 、 $TGF-\beta 1$ 蛋白电泳结果

Fig 5 Electrophoresis of $TNF-\alpha$ and $TGF-\beta 1$ protein in lung tissues of rats in each group

注: 与正常组比较, **** $P < 0.001$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the normal group, **** $P < 0.001$; compared with the model group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

2.9 统计学方法

采用 GraphPad Prism10.1 软件进行数据分析, 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。符合正态性和方差齐性时, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 以

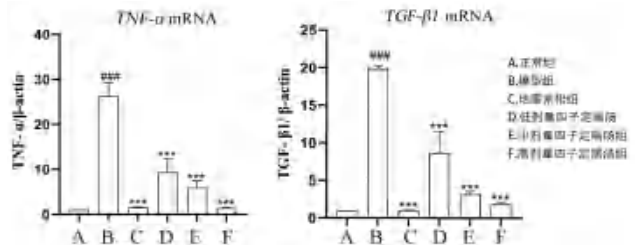


图 4 各组大鼠蛋白基因相对表达

Fig 4 Relative expression of protein gene in each group

注: 与正常组比较, **** $P < 0.001$; 与模型组比较, *** $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the normal group, **** $P < 0.001$; compared with the model group, *** $P < 0.001$.

表 2 qRT-PCR 检测各基因引物信息

Tab 2 Primer information for each gene detected by qRT-PCR

基因		引物序列 (5'-3')	片段长度 /bp
β -actin	F	GTACCACTGGCATTGTGATG	102
	R	ATCTTCATGGTGCTAGGAGC	
$TNF-\alpha$	F	GTTCTATGGCCAGACCCTCAC	175
	R	GGACCACTAGTTGGTTGTCTTTG	
$TGF-\beta 1$	F	GTGGAATCAACGGGATCAG	188
	R	CGCACACAGCAGTTCTTCTC	

取适量冻存肺组织剪碎后液氮充分研磨, 加 RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂, 离心, 取上清液。BCA 法检测蛋白浓度, 进行 SDS-PAGE 电泳后分离, 转移至活化 PVDF 膜上, 封闭后滴加一抗 $TNF-\alpha$ 、 $TGF-\beta 1$ 和 β -actin, 4℃摇床孵育过夜后加入 HRP 标记的鼠源或兔源 (山羊抗鼠或抗兔 IgG 型) 二抗孵育, TBST 洗涤。ECL 显影液曝光显色, Image J 软件分析条带灰度值, 计算目的蛋白相对表达量。

结果显示, 与正常组比较, 模型组大鼠肺组织 $TNF-\alpha$ 、 $TGF-\beta 1$ 蛋白表达水平明显升高; 与模型组比较, 中、高剂量四子定喘汤组及地塞米松组大鼠 $TNF-\alpha$ 、 $TGF-\beta 1$ 蛋白表达水平均有不同程度降低, 提示四子定喘汤可以降低哮喘大鼠肺组织 $TNF-\alpha$ 、 $TGF-\beta 1$ 蛋白的表达 (见图 5)。

$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 讨论

哮喘是一种小儿时期常见的呼吸系统疾病, 其特征是慢性气道炎症、高反应性和气道重塑。其

中, 气道炎症在哮喘气道高反应性和气道重塑中扮演着关键作用。全球哮喘防治倡议提出哮喘的治疗目标是控制哮喘相关症状, 减少复发次数。糖皮质激素和白三烯可有效控制气道炎症, 减轻哮喘症状, 提高生活质量, 改善肺功能并减少哮喘发作频率。但激素的长期使用会对儿童的正常生长发育产生不良影响。研究表明中药复方能通过调控巨噬细胞极化、调节免疫平衡, 改善气道炎症, 缓解气道重塑^[11-12]。因此, 积极探讨中医药治疗哮喘的药物作用机制具有重要意义。四子定喘汤是全国名中医周铭心教授的经验方, 该方由麻黄、紫苏子等中药组成, 具有清宣肺气、涤痰定喘之功。本研究结果表明四子定喘汤可以调控哮喘大鼠血清中 IL-1 β 、IL-10 含量, 改善哮喘大鼠肺功能, 缓解哮喘大鼠气道炎症反应与气道重塑。

巨噬细胞是宿主肺防御中的重要防线, 在维持免疫调节、病原体清除和体内平衡方面起着至关重要的作用^[13]。其中 M1 型主要促进促炎细胞因子的大量生成, 具有促炎作用; M2 型主要促进抗炎细胞因子的产生, 具有抗炎和免疫调节作用, 当 M1/M2 型巨噬细胞占比失衡时, 会导致机体炎症反应的失衡, 因此维持巨噬细胞 M1/M2 的动态平衡对保持机体内环境稳态具有重要作用, 而调节巨噬细胞极化状态或许就是治疗哮喘的有效途径^[14-15]。因此研究巨噬细胞极化及其标志物在哮喘气道重塑中的作用具有重要意义。本实验中哮喘大鼠肺组织中 CD86、CD163 蛋白阳性表达相对光密度均明显升高, 提示巨噬细胞发生了极化, 其分别代表的 M1 型、M2 型巨噬细胞增多。而 M1 型巨噬细胞增多会导致 TNF- α 的高表达, 会加重气道炎症, 从而加重哮喘症状^[16]; M2 型巨噬细胞增多会造成 TGF- β 1 相对增多, 诱导气道平滑肌细胞增殖, 构成气道重塑, 并对免疫反应产生抑制作用^[17]。经四子定喘汤治疗后哮喘大鼠肺组织炎症细胞浸润明显缓解, 血清中 IL-1 β 水平明显降低, IL-10 水平升高, 提示哮喘大鼠气道炎症得到改善。另外, 四子定喘汤干预后, 免疫荧光检测结果显示, 肺组织 CD86、CD163 的表达与共定位荧光强度明显降低, Western blot、RT-qPCR 结果显示大鼠肺组织中 TNF- α 和 TGF- β 1 的表达水平明显降低, 均提示哮喘大鼠 M1/M2 型巨噬细胞减少, 四子定喘汤抑制了巨噬细胞的极化。本实验结果说明, 四子定喘汤可以改善哮喘大鼠气道炎症, 其机制可能是通过调控 M1/M2 型巨噬细胞极化的相关因子表达实现的。

参考文献

[1] GBD Chronic Respiratory Disease Collaborators. Prevalence

and attributable health burden of chronic respiratory diseases, 1990—2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. *Lancet Respir Med*, 2020, 8 (6): 585-596.

- [2] 中华儿科杂志编辑委员会, 中华医学会儿科学分会呼吸学组, 中国医师协会儿科医师分会儿童呼吸专业委员会. 儿童支气管哮喘规范化诊治建议 (2020 年版) [J]. *中华儿科杂志*, 2020, 58 (9): 708-717.
- [3] 王林, 许光兰, 王光耀, 等. 口服中成药治疗成人咳嗽变异性哮喘有效性和安全性的系统评价 [J]. *中国医院用药评价与分析*, 2023, 23 (1): 80-87, 95.
- [4] 曹玲, 徐湘. 肺炎支原体肺炎患儿血清单核细胞趋化蛋白-4、可溶性细胞间黏附因子-1、白细胞介素-33 水平变化及与气道重塑和肺功能的相关性 [J]. *中国医药导报*, 2024, 21 (14): 80-82.
- [5] 赵娟丽, 张会侠, 刘建军. 匹多莫德联合孟鲁司特钠/布地奈德/福莫特罗对儿童咳嗽变异性哮喘肺功能及气道炎症的影响 [J]. *海南医学*, 2021, 32 (5): 603-606.
- [6] 卢鹏程, 曾镇钟, 张佳妮, 等. 雾化吸入布地奈德联合特布他林对哮喘患儿肺功能的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38 (5): 387-390.
- [7] Buters TP, Hameeteman PW, Jansen IME, et al. Clinical, cellular, and molecular effects of corticosteroids on the response to intradermal lipopolysaccharide administration in healthy volunteers [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2022, 111 (4): 964-971.
- [8] 张静. 吸入性糖皮质激素对咳嗽变异性哮喘气道炎症和高反应性的影响 [J]. *当代医学*, 2021, 27 (4): 138-139.
- [9] 潘雅朦, 康雨彤, 蔡晓翠, 等. 基于 Notch/STAT 信号通路研究神香草对哮喘免疫失衡的调节作用 [J]. *中南药学*, 2023, 21 (5): 1138-1144.
- [10] 李潘营, 袁培培, 侯颖等. 葶苈子活性组分通过调控气道炎症和上皮损伤改善过敏性哮喘大鼠肺通透性 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47 (4): 1009-1016.
- [11] 张凤凯, 张宏丽, 杨卫立. 射干麻黄汤对支气管哮喘大鼠巨噬细胞活化及 IL-21/STAT3 通路调节作用研究 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2024, 33 (5): 639-645.
- [12] 范晓琳, 陈蒙恩, 贺亚楠, 等. 搜风愈喘方对哮喘大鼠气道炎症及 Th17/Treg 平衡的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2024, 35 (5): 1040-1044.
- [13] Aegerter H, Lambrecht BN, Jakubzick CV. Biology of lung macrophages in health and disease [J]. *Immunity*, 2022, 55 (9): 1564-1580.
- [14] 杨霞, 宁宗. 巨噬细胞极化调控信号通路及 M1/M2 失衡在肺部炎症性疾病中作用的研究进展 [J]. *山东医药*, 2023, 63 (26): 88-91.
- [15] 邓珊, 孔晓丹. M2a 巨噬细胞在过敏性哮喘发病机制中的研究进展 [J]. *中国免疫学杂志*, 2022, 38 (6): 758-761.
- [16] Yao XL, Kaler M, Qu X, et al. Asthmatic patients with high serum amyloid A have proinflammatory HDL: implications for augmented systemic and airway inflammation [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2024, 153 (4): 1010-1024.
- [17] Lv XH, Li Y, Gong Q, et al. TGF- β 1 induces airway smooth muscle cell proliferation and remodeling in asthmatic mice by up-regulating miR-181a and suppressing PTEN [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12 (1): 173-181.

(收稿日期: 2024-09-21; 修回日期: 2024-10-24)

滇鸡血藤提取物微丸的制备及其评价

朱倩, 史文娟, 杨玉畅, 刘娟, 王子恒, 易丽莎, 尹兴斌, 董晓旭, 倪健*, 曲昌海* (北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

摘要: **目的** 优选滇鸡血藤的提取工艺, 获取木脂素类成分含量较高的提取物, 并将其制备成具有良好溶出性能的微丸。**方法** 以戈米辛 D、内南五味子素、异南五味子丁素、南五味子素 4 种成分含量为指标, 优选提取工艺; 采用醇洗和 β -环糊精包合技术改善提取物物料特性, 通过正交试验优化包合工艺; 采用挤出滚圆法制备微丸, 结合单因素考察优化处方。**结果** 本研究建立的 4 种木脂素成分的含量测定方法经方法学考察均符合要求; CO_2 超临界提取法所得指标成分含量最高, 但物料黏稠, 经 β -环糊精包合后成功实现粉末化; 正交试验优化包合工艺为滇鸡血藤提取物和 β -环糊精质量比 1 : 3.75、80 °C、2 h; 辅以微晶纤维素等辅料制得的微丸外观均匀, 溶出度达标。**结论** 4 种成分测定方法准确可靠; 优选工艺 (CO_2 超临界提取联合包合技术) 可高效富集木脂素并改善溶出性能, 提取与制剂工艺稳定可行。

关键词: 滇鸡血藤; 木脂素; 超临界提取; 包合; 微丸

中图分类号: R283 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)04-0983-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.017

Preparation and evaluation of Kadsurae Caulis extract pellets

ZHU Qian, SHI Wen-juan, YANG Yu-chang, LIU Juan, WANG Zi-heng, YI Li-sha, YIN Xing-bin, DONG Xiao-xu, NI Jian*, QU Chang-hai* (School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488)

Abstract: **Objective** To optimize the extraction process of Kadsurae Caulis for obtaining lignan-rich extracts and develop pellets with enhanced dissolution performance. **Methods** Extraction parameters were screened based on the contents of gomisin D, interiorin, heteroclitin D, and kadsurin. The extract was treated with ethanol washing and β -cyclodextrin inclusion to enhance material properties, and the inclusion process was optimized via orthogonal experiments. The pellets were prepared by extrusion-spheronization, and the formulation was studied with single-factor experiments. **Results** The established method for simultaneously determining four lignans demonstrated satisfactory validation parameters (specificity, linearity, precision, and recovery). CO_2 supercritical extraction yielded the highest content of target components, but the material was viscosity, which was converted into a free-flowing powder after β -cyclodextrin inclusion. Optimal inclusion conditions (mass ratio of Kadsurae Caulis extract and β -cyclodextrin 1 : 3.75, 80 °C, 2 h) were determined by orthogonal experiments. Pellets prepared with microcrystalline cellulose and other excipients exhibited uniform morphology and met the predetermined dissolution requirements. **Conclusion** The analytical method is accurate and reliable for quality control. The optimized process (CO_2 supercritical extraction combined with β -cyclodextrin inclusion technology) efficiently enriches lignans and enhances dissolution performance, demonstrating robust and practical extraction and formulation processes.

Key words: Kadsurae Caulis; lignan; CO_2 supercritical extraction method; inclusion compound; pellet

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.81973492)。

作者简介: 朱倩, 女, 硕士研究生, 主要从事中药制剂新技术与新剂型研究, email: b18801045062@163.com *通信作者: 曲昌海, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事药物制剂新技术及递药系统研究, email: quchanghai@bucm.edu.cn; 倪健, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药新剂型与新技术研究, email: nijian@bucm.edu.cn

滇鸡血藤 (*Kadsurae Caulis*) 为木兰科植物内南五味子 *Kadsura interior* A. C. Smith 的干燥藤茎, 其功效为活血补血、调经止痛, 临床上用于治疗血虚血瘀所致的月经不调、痛经、气血两虚等症^[1-2]。滇鸡血藤含有多类成分, 如木脂素、三萜、黄酮、单萜、倍半萜和精油等^[3-4]。其中, 木脂素类成分是滇鸡血藤活血化瘀的主要有效成分^[5-7], *Kadsutherin* F、异南五味子丁素、戈米辛 J 等木脂素类成分均被报道有缓解微循环障碍等作用^[8], 《中国药典》中也以异南五味子丁素作为其含量测定的指标成分^[1]。木脂素为脂溶性成分, 但在临床传统应用中, 滇鸡血藤常采用水煎法进行提取^[2], 对木脂素成分的提取率较低, 不利于药材的充分利用和药效的发挥。因此, 本研究将采用多种不同的提取方式对滇鸡血藤进行提取, 以戈米辛 D、内南五味子素、异南五味子丁素、南五味子素 4 个成分的含量为指标, 优选具有较高提取率的工艺; 并在此基础上, 克服木脂素类成分黏稠度高、溶解性差的问题^[9], 将滇鸡血藤提取物制备成环糊精包合物达到增溶的目的, 再制成微丸, 提高药物的生物利用度, 为进一步的新药研究和开发提供试验依据。

1 材料

1.1 仪器

1200 型高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); KQ-500DE 型超声波清洗机 (昆山市超声仪器有限公司); JY6002 型电子分析天平 (精度: 0.01 g, 上海衡平仪器仪表厂); BCE55I-10CN 型电子分析天平 (精度: 0.01 mg, 赛多利斯科学仪器有限公司); HA220-50-06-C 型超临界 CO₂ 萃取装置 (南通市华安超临界萃取有限公司); RE52CS 型旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); CML 湿法制粒挤出滚圆一体机 (Caleva); ZRS-8G 智能溶出试验仪 (天津精拓仪器科技有限公司)。

1.2 试药

滇鸡血藤饮片 (批号: 20210325, 云南广福药业有限公司, 经北京中医药大学倪健教授鉴定为正品); 南五味子素 (纯度: 98.11%, 批号: 23030106)、内南五味子素 (纯度: 99.69%, 批号: 23030105) (成都格利普生物科技有限公司); 戈米辛 D (纯度: 98%, 批号: J26HB1860531)、异南五味子丁素 (纯度: 98%, 批号: M06GB140638) (上海源叶生物科技有限公司); 乙腈、甲醇为色谱级 (Fisher 公司); 聚维酮 K30 (PVP K30, 批号: 190803)、微晶纤维素 102 (MCC 102, 批号: B230931)、低取代羟丙纤维素 (L-HPC, 批号: B231118) (安徽山河药用辅料股份有限公司); 乳糖 (批号: 0005130382, 北京凤礼精求医药股份有限公司); 羧甲基淀粉钠 (CMS-Na,

批号: EH00820230903)、β-环糊精 (β-CD, 批号: 20240112)、微粉硅胶 (批号: EH01720240321) (西安天正药用辅料有限公司); 交联聚维酮 (PVP-P, 批号: 02405189, 北京迈瑞达科技有限公司)。

2 滇鸡血藤提取方法比较

2.1 色谱条件

CAPCELL PAK MG C18 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 柱温: 35℃; 流动相: 甲醇-乙腈-水, 连续梯度洗脱 [10:40:50 (0 min) → 10:47:43 (23 min) → 10:50:40 (35 min) → 10:80:10 (50 min)], 共 55 min; 流速 1 mL·min⁻¹; 检测波长 230 nm。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 分别精密称定戈米辛 D、内南五味子素、异南五味子丁素、南五味子素对照品适量, 加甲醇溶解定容, 作为对照品储备液; 取各储备液适量, 加适量甲醇定容于同一量瓶中, 得 4 种成分的质量浓度分别约为 0.03、0.08、0.11、0.10 mg·mL⁻¹ 的混合对照品母液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称定滇鸡血藤浸膏 60 mg, 置具塞锥形瓶中, 以 9 mL 的 75% 甲醇作提取溶剂, 超声提取 30 min, 放冷并补足失重; 置离心管中, 3000 r·min⁻¹ 离心 5 min; 精密移取上清液 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 用 75% 甲醇稀释并定容至刻度, 摇匀, 滤过, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性考察 取混合对照品溶液、供试品溶液及空白溶剂 (甲醇) 进样检测。在样品及对照品出峰处溶剂无干扰, 表明方法专属性良好, 见图 1。

2.3.2 线性关系考察 取混合对照品母液加甲醇分别稀释 0、2、4、8、16 倍, 得系列浓度对照品溶液, 进样测定。以对照品质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 并求得线性回归方程, 结果见表 1。各成分在线性范围内与峰面积线性关系良好。

表 1 滇鸡血藤中 4 种木脂素成分的线性关系考察结果

Tab 1 Linearity of 4 lignans in *Kadsurae Caulis*

成分	线性方程	R ²	线性范围 / (mg·mL ⁻¹)
戈米辛 D	$y = 2.8211 \times 10^4 x - 0.2458$	0.999	0.0020 ~ 0.0315
内南五味子素	$y = 3.6244 \times 10^4 x - 0.1792$	0.999	0.0051 ~ 0.0810
异南五味子丁素	$y = 3.3573 \times 10^4 x + 3.1333$	0.999	0.0063 ~ 0.1066
南五味子素	$y = 3.9290 \times 10^4 x - 4.5917$	0.999	0.0064 ~ 0.1030

2.3.3 其他方法学考察 参考《中国药典》2020 年版考察方法稳定性、重复性、精密度、加样回收试验, 结果显示供试品溶液在 24 h 内稳定性良好, RSD 均小于 1.3%; 方法重复性、精密度良好, RSD 均小于 2.6%; 所测 4 种木脂素加样回收率在 92.68% ~ 103.50%, RSD 在 0.16% ~ 2.7%, 符合方法学要求。

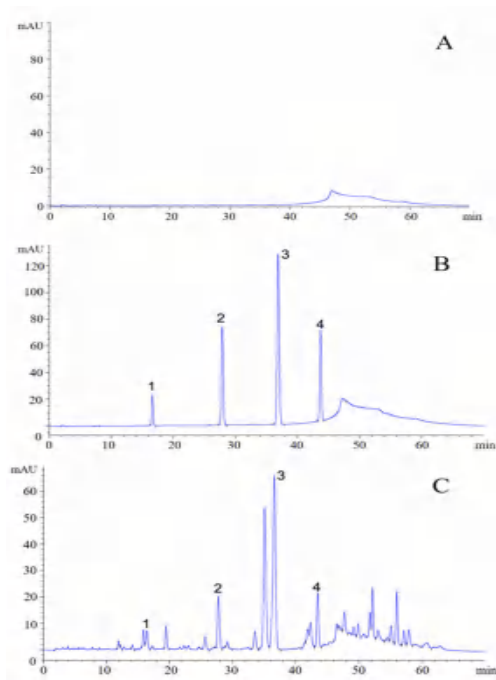


图 1 空白溶剂 (A)、混合对照品 (B) 和滇鸡血藤供试品 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of blank solvent (A), mixed reference substance (B), and Kadsurae Caulis sample (C)

1. 戈米辛 D (gomisin D); 2. 内南五味子素 (interiorin); 3. 异南五味子丁素 (heteroclitin D); 4. 南五味子素 (kadsurin)

表 2 滇鸡血藤不同提取方法指标成分含量 ($n = 3$, %)

Tab 2 Content of lignans with different extraction methods ($n = 3$, %)

提取方法	指标成分含量				4 种木脂素总含量
	戈米辛 D	内南五味子素	异南五味子丁素	南五味子素	
水提法	0.0036±0.0002	0.0065±0.0003	0.0085±0.0006	0.0071±0.0005	0.0257±0.0016
乙醇渗漉提取法	0.0611±0.0003	0.2087±0.0025	0.2008±0.0011	0.2737±0.0022	0.7444±0.0060
乙醇回流提取法	0.0360±0.0004	0.1303±0.0060	0.1183±0.0006	0.2374±0.0017	0.5221±0.0033
CO ₂ 超临界提取法	1.3170±0.0113	3.6634±0.0622	3.5306±0.0336	3.5918±0.0467	12.1028±0.1524

表 3 结果显示, 采用 95% 乙醇处理后, 可以去除部分絮状沉淀, 并且指标成分损失最少。所得到的提取物黏稠度有明显改善, 但仍然不易粉碎成细粉。

表 3 乙醇浓度对滇鸡血藤提取效果的影响 ($n = 3$)

Tab 3 Effect of ethanol concentration on the extraction efficiency of Kadsurae Caulis ($n = 3$)

乙醇浓度	浸膏保留率 / %	浸膏中木脂素含量 / %
30%	21.46±4.58	10.39±2.00
50%	43.72±11.25	11.42±1.89
70%	75.97±4.82	6.44±0.43
80%	81.26±1.44	7.87±2.63
95%	87.63±0.11	13.06±0.26

3 滇鸡血藤提取物 β -环糊精包合物的制备^[10]

3.1 包合物制备方法

采用水饱和溶液法^[11]进行制备: 称取 β -环糊精 1.5 g, 加入蒸馏水, 加热至 80℃ 形成饱和溶液。称取滇鸡血藤提取物 0.4 g, 溶于 3 mL 无水乙醇制

2.4 滇鸡血藤提取方法的选择

为提高滇鸡血藤木脂素类成分的提取率, 以提取物中戈米辛 D、内南五味子素、异南五味子丁素、南五味子素的含量为指标, 对水提法、乙醇渗漉提取法、乙醇回流提取法和 CO₂ 超临界提取法展开比较研究, 以筛选出最佳提取方法。水提法按既定水提工艺进行提取; 乙醇渗漉提取法使用 10 倍量的 80% 乙醇冷浸 48 h, 收集 30 倍体积的渗漉液, 经旋蒸得提取物浸膏; 乙醇回流提取法加 5 倍量 80% 乙醇, 90℃ 水浴回流提取 3 次, 旋蒸得到浸膏; CO₂ 超临界提取法取滇鸡血藤粗粉过 2 号筛, 置于 5 L 萃取釜中, 萃取压力 30 MPa, 萃取温度 45℃, 分离釜 I、II 压力 5.8 MPa, 分离釜温度 35℃, CO₂ 流速 29 L·h⁻¹, CO₂ 频率 15 Hz, 萃取时间 2 h, 得到萃取物。

表 2 结果显示, CO₂ 超临界提取法所得浸膏中 4 种木脂素类成分含量最高, 约为水提法的 500 倍, 大大提高了此类成分的提取效率, 在一定程度上实现了木脂素类成分的富集。

2.5 滇鸡血藤提取物的处理

取滇鸡血藤超临界提取物, 加入 160 倍量不同浓度乙醇, 超声 30 min 使充分沉淀; 将混合液 3000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上清液, 60℃ 旋蒸至无醇味, 浓缩至适当的稠膏后 60℃ 减压干燥即得。

备乙醇溶液。在 80℃ 恒温磁力搅拌下, 饱和溶液中缓慢加入滇鸡血藤乙醇溶液, 继续搅拌 2 h。混合物冷却至室温, 在 4℃ 冷藏 12 h, 使包合物完全析出, 抽滤, 使用无水乙醇和蒸馏水交替冲洗滤饼 3 次, 60℃ 减压干燥 2 h, 即得滇鸡血藤提取物包合物。

3.2 包合物评价方法

3.2.1 4 种木脂素含量测定 称取适量滇鸡血藤提取物包合物, 加入 10 mL 无水乙醇, 混匀, 于 60℃ 下超声处理 30 min, 3000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 收集上清液, 过 0.22 μ m 滤膜后用 HPLC 进行含量测定。

3.2.2 综合评分 采用主观加权综合评分法^[12], 对包合率、包合物收率及滇鸡血藤 4 种木脂素含量进行加权处理, 权重系数分别为 0.5、0.3 和 0.2。

3.3 正交设计优化包合物制备工艺

根据前期单因素试验的结果确定包合时间、包合温度、投料比对包合物制备的影响较大, 设计 L₉ (3⁴) 正交试验优化滇鸡血藤木脂素包合物制备工艺

表 4 滇鸡血藤木脂素包合工艺因素水平表
Tab 4 Factor and level for total lignan inclusion technology of Kadsurac Caulis

水平	因素		
	A 包合时间 /h	B 包合温度 /℃	C 投料比 /(g/g)
1	1	60	1 : 7.5
2	2	70	1 : 5
3	3	80	1 : 3.75

表 5 滇鸡血藤木脂素包合工艺正交试验结果
Tab 5 Orthogonal test of total lignan inclusion technology of Kadsurac Caulis

No.	包合时间	包合温度	投料比	空列	包合率 /%	载药率 /%	收率 /%	综合评分
1	1	1	1	1	56.44	13.30	43.28	40.51
2	1	2	2	2	89.88	19.13	63.33	61.81
3	1	3	3	3	81.29	23.95	54.35	56.96
4	2	1	2	3	81.38	19.91	54.56	54.08
5	2	2	3	1	82.63	23.07	58.03	60.16
6	2	3	1	2	74.33	12.03	63.95	58.16
7	3	1	3	2	83.57	21.68	63.59	64.88
8	3	2	1	3	65.75	15.15	43.34	41.13
9	3	3	2	1	82.01	18.86	58.79	57.56
K_1	159.28	159.47	139.80	158.23				
K_2	172.40	163.10	173.45	184.85				
K_3	163.57	172.68	182.00	152.17				
k_1	53.09	53.16	46.60	52.74				
k_2	57.47	54.37	57.82	61.62				
k_3	54.52	57.56	60.67	50.72				
R	4.37	4.40	14.07	10.89				

条件。各因素水平见表 4，正交试验结果见表 5。

根据 K 值进行分析，水饱和法制备滇鸡血藤包合物的最佳工艺条件为 $A_2B_3C_3$ ，即滇鸡血藤浸膏和 β 环糊精的质量比为 1 : 3.75，包合时间为 2 h，包合温度为 80℃。

取滇鸡血藤浸膏 0.4 g，按最佳的包合工艺条件进行 3 次验证试验，测得滇鸡血藤木脂素包合率为 $(86.86 \pm 0.87)\%$ ， RSD 为 1.0%；收率为 $(65.43 \pm 1.39)\%$ ， RSD 为 2.1%；载药率为 $(21.85 \pm 0.48)\%$ ， RSD 为 2.2%；综合评分为 $(66.69 \pm 1.20)\%$ ， RSD 为 1.8%，该包合工艺稳定可行。

3.4 包合物的表征

3.4.1 扫描电镜 (SEM) 观察 称取 β -环糊精、 β -环糊精与滇鸡血藤浸膏的物理混合物、最佳工艺下制备的包合物各 1.0 mg，在电镜下观察。结果如图 2 所示，在 1000 倍放大倍数下， β -环糊精表面粗糙且形态不规则，物理混合物与 β -环糊精形貌相似，滇鸡血藤浸膏如油膜般吸附在 β -环糊精的表面，未进入其内部。相较之下，滇鸡血藤环糊精包合物在 10 000 倍放大倍数下，表面光滑、呈菱形的颗粒状，表观形态发生了显著的改变，可以说明滇鸡血藤浸膏被成功包裹，形成了包合物^[13]。

3.4.2 红外光谱 (IR) 扫描 取滇鸡血藤浸膏、 β -环糊精、物理混合物和包合物适量，采用溴化钾

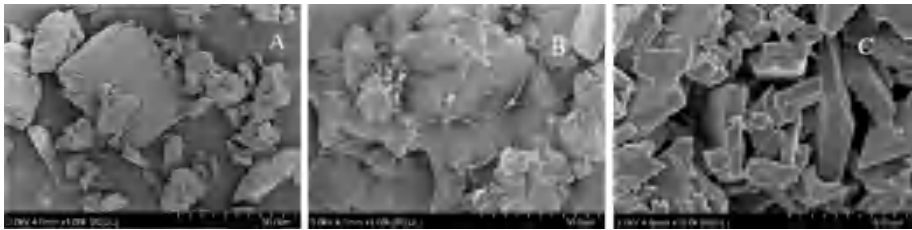


图 2 β -环糊精 (A)、物理混合物 (B) 及包合物 (C) 在不同放大倍数下的扫描电镜图

Fig 2 SEM images of β -cyclodextrin (A), simple mixture (B) and inclusion compound (C) at different magnifications

A. β -环糊精 (β -cyclodextrin) ($\times 1000$); B. 物理混合物 (simple mixture) ($\times 1000$); C. 包合物 (inclusion compound) ($\times 10\ 000$)

压片法制备样品，于 $400 \sim 4000\text{ cm}^{-1}$ 波数范围进行 IR 扫描。

从图 3 中可以看出，滇鸡血藤浸膏在 2924、1707、1371、1061 cm^{-1} 处有伸缩振动吸收峰。 β -环糊精在 3277、2923、1639、1019 cm^{-1} 处有振动吸收峰^[14]。物理混合物和包合物从整体上来看显示的是 β -环糊精红外光谱图特征，吸收峰的强度和位置基本与 β -环糊精的一致。同时，与 β -环糊精相比，物理混合物和包合物在 2920、1366 cm^{-1} 处的吸收峰强度增强。且物理混合物和包合物 2924、1707、1371、1061 cm^{-1} 处的滇鸡血藤浸膏的特征峰减弱或消失，包合物的滇鸡血藤特征峰减弱更多，说明滇鸡血藤中的木脂素已进入 β -环糊精空腔内，形成包合物，与 SEM 观察结果一致。

3.4.3 差示扫描热 (DSC) 分析 称取滇鸡血藤浸膏、 β -环糊精、物理混合物和包合物适量，置于铝制坩埚中，用差式扫描量热仪进行分析。测定参数设置如下：氮气体积流量 $40\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ，升温速度 $10\text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ ，升温范围 $25 \sim 400\text{ }^\circ\text{C}$ 。

如图 4 所示， β -环糊精在 110℃ 有吸热峰，主要是由于样品表面的吸附水、内部结晶水和小分子物质的分解，在 310、330℃ 也有熔融峰。滇鸡血藤浸膏没有明显特征峰。物理混合物的 DSC 曲线与 β -环糊精的 DSC 曲线相似，而包合物在 110℃ 出现的吸热峰并不明显，330℃ 处的吸热峰基本消失，说明滇鸡血藤木脂素已经将 β -环糊精空腔内的结晶水置换出来，推测包合物形成，与 IR 结果分析一致。

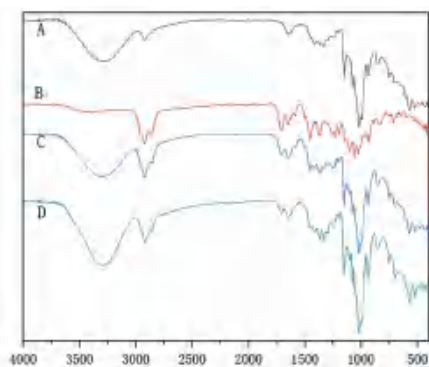


图 3 红外光谱图

Fig 3 Infrared spectrum

A. β - 环糊精 (β -cyclodextrin); B. 滇鸡血藤浸膏 (Kadsurae Caulis extract); C. β - 环糊精与浸膏物理混合物 (physical mixture of β -cyclodextrin and extractum); D. 滇鸡血藤浸膏环糊精包合物 (Kadsurae Caulis β -cyclodextrin inciusion complex)

3.4.4 滇鸡血藤包合物的溶解度测定 分别称取滇鸡血藤总木脂素浸膏、滇鸡血藤包合物于室温下分别溶解在 10 mL 水中, 在恒温搅拌器中以 37℃, 100 r·min⁻¹ 振荡 12 h, 然后以 3000 r·min⁻¹, 离

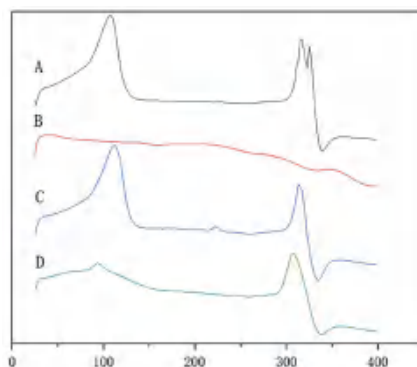


图 4 差示扫描热图

Fig 4 Differential scanning heat map

A. β - 环糊精 (β -cyclodextrin); B. 滇鸡血藤浸膏 (Kadsurae Caulis extract); C. β - 环糊精与浸膏物理混合物 (physical mixture of β -cyclodextrin and extractum); D. 滇鸡血藤浸膏环糊精包合物 (Kadsurae Caulis β -cyclodextrin inciusion complex)

心 5 min 去除不溶性物质。结果如表 6 所示, 将滇鸡血藤浸膏制成环糊精包合物后, 各木脂素的溶解度均有所提升。

表 6 滇鸡血藤包合物的溶解度 ($n = 3$)

Tab 6 Solubility of the inclusion compound of Kadsurae Caulis

样品	在水中的溶解度 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)				4 种木脂素之和 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	4 种木脂素 增溶倍数
	戈米辛 D	内南五味子素	异南五味子丁素	南五味子素		
滇鸡血藤浸膏	3.32±0.70	1.46±0.32	12.72±3.91	0.53±0.13	18.03±5.06	/
滇鸡血藤包合物	10.48±0.03	4.73±0.17	39.69±0.80	0.98±0.02	55.88±0.96	3.10

4 滇鸡血藤微丸的制备研究

4.1 滇鸡血藤微丸的制备方法

取适量滇鸡血藤环糊精包合物与微粉硅胶共研, 将混合物与辅料混合均匀, 加润湿剂制成软材, 经挤出滚圆机制备微丸, 60℃干燥 2 h, 筛分, 称定, 即得滇鸡血藤微丸。

4.2 微丸的评价方法

4.2.1 收率 以滇鸡血藤微丸的收率为指标进行考察, 采用筛分法计算微丸的收率。

4.2.2 溶出度的测定 参照《中国药典》2020 年版第四部溶出度测定第二法 (桨法) 进行体外溶出试验。以 0.5% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 水溶液 (900 mL) 作为溶出介质, 转速 50 r·min⁻¹, 温度为 (37±0.5)℃, 分别于 5、10、20、30、45、60、90、120、180、240、360 min 取样 10 mL (立刻补充 10 mL 等温的溶出介质), 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 注入高效液相色谱仪, 测定各指标成分, 计算累计溶出百分率, 并以时间为横坐标, 各成分的累计溶出百分率为纵坐标, 绘制溶出曲线。

4.3 微丸处方考察及优化

采用 1.0 mm×1.0 mm 孔径筛板, 选择挤出

速度 30 r·min⁻¹, 滚圆速度 3000 r·min⁻¹, 滚圆时间 10 min, 制备微丸。采用单因素考察的方式, 以微丸收率和外观为评价指标, 优化最佳药占比 (%)、润湿剂种类、填充剂种类及比例、微粉硅胶用量和崩解剂种类等。

4.3.1 药占比的选择 试验采用黏合剂为 0.5%PVP K30 水溶液, 填充剂为 MCC-乳糖 = 4:1 保持不变, 考察不同比例的药占比 (以滇鸡血藤包合物计) 对微丸成型的影响。结果见表 7, 随着药占比增加, 微丸收率增加, 投药量为 50% 左右时收率最高, 且细粉较少, 但微丸圆整度欠佳, 多为短圆柱状。后续可通过调整辅料的比例等改善微丸的圆整度。

表 7 药占比对微丸外观的影响

Tab 7 Effect of drug loading on the appearance of pellets

药占比 /%	收率 /%	微丸性状
35	90.28	微丸呈短圆柱状, 粒径差异较大, 细粉多
40	90.07	微丸呈短圆柱状, 粒径差异较大, 细粉多
45	91.76	微丸呈短圆柱状, 粒径较均一, 少量细粉
50	94.03	微丸呈短圆柱状, 粒径较均一, 无细粉
55	92.39	微丸呈短圆柱状, 较黏, 损耗大

4.3.2 润湿剂黏合剂种类的选择 试验采用 50% 药占比, MCC-乳糖 = 4 : 1 保持不变, 考察不同润湿剂黏合剂对微丸外观的影响。结果见表 8, 以 2.5%PVP K30 为黏合剂时, 微丸的性状较好, 收率较高, 因此选择 2.5%PVP K30 作为黏合剂。

表 8 润湿剂种类对微丸外观的影响

Tab 8 Effect of wetting agent type on the appearance of pellets

润湿剂	收率 / %	微丸性状
0.5%PVP K30	93.58	微丸呈短圆柱状, 粒径较均一, 无细粉
2.5%PVP K30	96.98	微丸呈短圆柱状, 粒径均匀, 无细粉
2%HPMC	92.10	微丸呈短圆柱状, 粒径较均一, 无细粉
50% 乙醇	/	挤出物无黏性, 无法挤出
70% 乙醇	/	挤出物无黏性, 无法挤出

4.3.3 填充剂种类及比例的选择 试验采用 50% 药占比, 0.5%PVP K30 水溶液黏合剂保持不变, 考察不同填充剂的种类和比例对微丸成型的影响。结果见表 9, MCC-乳糖 = 1 : 1.5 或 1 : 2 时微丸的圆整度较好, 因此选择 MCC 与乳糖的比例在 1 : 1.5 ~ 1 : 2。

表 9 填充剂种类及比例对微丸外观的影响

Tab 9 Effect of filler type and proportion on the appearance of pellets

填充剂	收率 / %	微丸性状
MCC	93.05	微丸呈短圆柱状, 粒径均一, 少量细粉
乳糖	/	过黏, 无法挤出
MCC-乳糖 = 4 : 1	96.98	微丸呈短圆柱状, 粒径较均一, 无细粉
MCC-乳糖 = 2 : 1	95.64	微丸呈长哑铃状, 粒径较均一, 无细粉
MCC-乳糖 = 1 : 1	90.19	微丸呈短哑铃状, 粒径均一, 无细粉
MCC-乳糖 = 1 : 1.5	95.08	微丸呈类球形, 粒径均一, 无细粉
MCC-乳糖 = 1 : 2	94.27	微丸呈类球形, 粒径有差异, 无细粉
MCC-乳糖 = 1 : 4	/	过黏, 丸条合并, 形成大球

4.3.4 微粉硅胶用量的选择 试验采用 50% 药占比, MCC-乳糖 = 1 : 1.5, 0.5%PVP K30 水溶液黏合剂条件不变, 将微粉硅胶与滇鸡血藤包合物共研, 再与辅料混合, 考察微粉硅胶用量对微丸外观的影响。结果见表 10, 使用 2% 的微粉硅胶时, 微丸外观良好, 收率较高, 因此选择 2% 的微粉硅胶作为助流剂。

表 10 微粉硅胶用量对微丸外观的影响

Tab 10 Effect of silica gel dosage on the appearance of pellets

微粉硅胶用量 / %	收率 / %	微丸性状
1	97.02	微丸呈类球形, 粒径均一, 无细粉
2	98.62	微丸呈类球形, 粒径均一, 无细粉
3	98.33	微丸呈类球形, 粒径均一, 无细粉
4	98.29	微丸呈葫芦状, 粒径均一, 无细粉

4.3.5 崩解剂种类的选择 采用 50% 药占比, MCC-乳糖 = 1 : 1.5, 0.5%PVP K30 水溶液黏合剂, 2% 微粉硅胶条件不变, 考察 4% 的 CMS-Na、L-HPC、交联聚维酮 (PVP-P) 对微丸赋型的影响。由表 11 可

知, 加入 PVP-P 后, 微丸圆整度良好, 收率较高, 因此选择 PVP-P 作为微丸的崩解剂。具体崩解和溶出效果待后续溶出试验进行考察。

表 11 崩解剂种类对微丸外观的影响

Tab 11 Effect of disintegrant type on the appearance of pellets

4% 崩解剂	收率 / %	微丸性状
CMS-Na	95.31	微丸呈类球形, 粒径较大, 较均一, 无细粉
PVP-P	97.03	微丸呈类球形, 粒径均一, 无细粉
L-HPC	93.22	微丸呈类球形, 粒径均一, 少量细粉

4.4 微丸的溶出
按“4.2.2”项下条件, 考察微丸和滇鸡血藤浸膏 (微丸中浸膏等效剂量) 的溶出效果^[14-15], 结果见图 5。结果显示, 投药后微丸中药物迅速释放, 20 min 时戈米辛 D、内南五味子素、异南五味子丁素、南五味子素的累计溶出度均已超过了 50%; 随后溶出速度略有减缓, 45 min 时溶出度基本达到了溶出的限度要求; 60 min 时基本达到释放的平台期, 至 90 min 时各成分均溶出完全。滇鸡血藤浸膏木脂素成分释放较为缓慢, 360 min 时 4 种成分溶出度分别为 32.17%、25.31%、24.86%、28.62%, 尚未进入平台期。溶出结果显示, 将滇鸡血藤浸膏制备成微丸后, 其溶出效果显著提高。滇鸡血藤微丸在水中可以迅速释放, 并且各成分的溶出行为较为一致, 有利于口服后药物的吸收及体内药效的发挥。

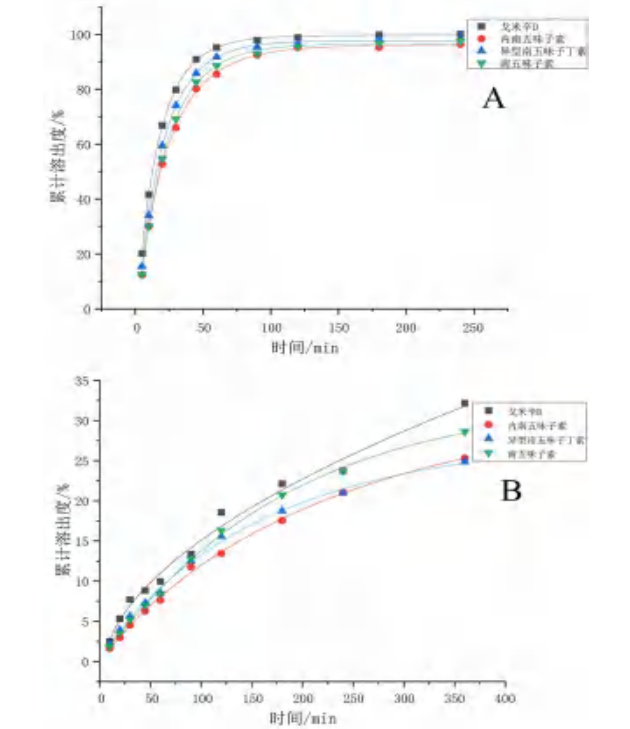


图 5 滇鸡血藤提取物微丸 (A) 和滇鸡血藤浸膏 (B) 中 4 种指标成分的累计溶出度曲线
Fig 5 Cumulative dissolution curves of the 4 index components in Kadsurae Caulis extract pellets (A) and Kadsurae Caulis extract (B)

5 讨论

木脂素类化合物为天然植物雌激素,具有多种生理活性^[16-17],朱泓宇等^[18]采用体外凝血酶抑制试验证明内南五味子素 D 和阿里山五味子灵 C 可能为凝血酶抑制活性的核心成分。Xu 等^[19]证明滇鸡血藤乙醇提取物能显著提高血虚小鼠的血细胞比容、血红蛋白和红细胞水平,且异型南五味子丁素、异型南五味子庚素和内南五味子丙素为潜在补血活性标志物。但滇鸡血藤的含量测定成分仅限于异型南五味子丁素^[1],对滇鸡血藤木脂素成分的临床应用有较大的局限性。本研究建立的 4 种木脂素类成分的同时测定方法,可为滇鸡血藤的质量控制及标准提升提供参考。

戈米辛 D 具有抗氧化^[20]、保肝^[21]等作用;内南五味子素具有潜在补血活性^[19];异南五味子丁素抗血小板凝集、抗氧化^[7];南五味子素具有强抑制 CYP3A 酶活性的作用^[22];这 4 种成分与滇鸡血藤活血化淤的功效有强关联性,因此,本文以这 4 种成分代表滇鸡血藤的总木脂素^[23],并以此确定采用 CO₂ 超临界萃取法提取滇鸡血藤的木脂素成分,将其制备成包合物微丸,为木脂素萃取物的应用和剂型选择提供科学依据。

滇鸡血藤主要活性成分木脂素均为脂溶性化合物,因此选择超临界萃取可以有效富集这些亲脂性较大的成分,然而这种方法并不利于提取极性相对较大的成分。超临界萃取溶剂的极性会影响其对不同极性成分的萃取能力,通过加入适量的极性夹带剂,可以改变体系的极性,从而使超临界流体能够有效地萃取极性成分。在后续研究中,可考察夹带剂对萃取物性质的影响。在本研究中,所得提取物呈现黄棕色稠膏,具有一定的流动性,在常温下会出现分层现象。同时,某些木脂素本身表现为液态^[24],推测萃取物不同分层中的木脂素成分可能存在差异。基于此,对超临界提取进行更为细致的研究,分别获取不同提取时间、部位的提取物,有望制备出功效侧重不同的药物,以满足不同的治疗需求。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 版.一部[S]. 2020: 378.
- [2] 向雅洁,刘洋洋,冯剑,等.经典名方中鸡血藤的本草考证[J].中国实验方剂学杂志,2025,31(6): 238-248.
- [3] 陈道峰.南五味子属药用植物的化学成分及其生物活性[J].中国天然药物,2007,5(1): 15-19.
- [4] Liu JS, Qi YD, Lai H, et al. Genus Kadsura, a good source with considerable characteristic chemical constituents and potential bioactivities[J]. Phytomedicine, 2014, 21(8-9): 1092-1097.
- [5] 朱泓宇,任广喜,徐裕彬,等.豆科与木兰科鸡血藤类药

- 材活性成分及药理作用研究进展[J].中国现代中药,2022,24(11): 2278-2294.
- [6] 徐菁.滇鸡血藤基原植物内南五味子及其近缘物种化学成分和活性的比较研究[D].北京:北京协和医学院,2022.
- [7] Wang ZH, Liu QY, He YX, et al. Lignans in genus Kadsura Kaempf.: sources, biological activities, mechanisms, and applications[J]. J Funct Foods, 2024, 121: 106425.
- [8] Liu JS, Zhang J, Qi YD, et al. Four new lignans from Kadsura interior and their bioactivity[J]. Molecules, 2018, 23(6): 1279.
- [9] 韩军军,李红斌,刘俊霞.木脂素制剂新剂型研究进展[J].黑龙江科学,2021,12(16): 42-43.
- [10] 沈海民,纪红兵,武宏科,等.β-环糊精的固载及其应用最新研究进展[J].有机化学,2014,34(8): 1549-1572.
- [11] 王炳琪,李国文,周振华,等.莪术颗粒挥发油β-环糊精包合物的制备及表征[J].中国新药杂志,2023,32(16): 1690-1696.
- [12] 张雨萌,徐芳,姚雨含,等.小茴香挥发油β-G 环糊精包合物的制备、表征及稳定性研究[J].食品与机械,2024,40(3): 203-209.
- [13] 徐玉仙,姚勇波,生俊露,等.香榧精油/β-环糊精包合物的制备、表征及特性[J].包装工程,2023,44(7): 76-84.
- [14] Liu H, Cai XY, Wang Y, et al. Adsorption mechanism-based screening of cyclodextrin polymers for adsorption and separation of pesticides from water[J]. Water Res, 2011, 45(11): 3499-3511.
- [15] 罗慧玉,闫伟伟,谢颖,等.血塞通片体外溶出行为研究[J].食品与药品,2024,26(4): 323-327.
- [16] Osmakov DI, Kalinovskii AP, Belozero OA, et al. Lignans as pharmacological agents in disorders related to oxidative stress and inflammation: chemical synthesis approaches and biological activities[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(11): 6031.
- [17] Shi YN, Shi YM, Yang L, et al. Lignans and aromatic glycosides from Piper wallichii and their antithrombotic activities[J]. Ethnopharmacol, 2015, 162: 87-96.
- [18] 朱泓宇,乔子璇,徐裕彬,等.基于生物活性和分子对接的滇鸡血藤水煎液质量控制研究[J].中国药事,2023,37(11): 1319-1325.
- [19] Xu J, Liu JS, Li B, et al. Comparison of blood tonic efficacy and chemical constituents of Kadsura interior A. C. Smith and its closely related species[J]. Chin Med, 2022, 17(1): 14.
- [20] Chen ZH, Liu YX, Chen ZW, et al. Effect and mechanism of gomisins D on the isoproterenol induced myocardial injury in H9C2 cells and mice[J]. Asian Nat Prod Res, 2024, 26(5): 604-615.
- [21] Wang R, Liu FB, Chen PP, et al. Gomisins D alleviates liver fibrosis through targeting PDGFRβ in hepatic stellate cells[J]. Int J Biol Macromol, 2023, 235: 123639.
- [22] 陈倩,吴育晶,程能能,等.五味子提取物对大鼠肝 CYP3A 酶的双重作用[J].药学学报,2010,45(9): 1194-1198.
- [23] 刘曼婷,倪健,杨玉畅,等.复方滇鸡血藤颗粒的指纹图谱建立及 4 个木脂素类成分含量测定[J].中国医院药学杂志,2023,43(14): 1581-1587.
- [24] 张进,黄嫚,李建光,等.内南五味子中木脂素类化学成分研究[J].中国现代中药,2018,20(6): 669-674.

(收稿日期: 2024-10-25; 修回日期: 2025-01-15)

基于整合药理学手段探究灯盏生脉胶囊治疗 缺血性脑卒中的作用机制

吕丹¹, 张琪苓¹, 刘宇灵¹, 汤如莹¹, 李慧^{1, 2*}, 林龙飞^{1*} (1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;
2. 中国中医科学院中医药健康产业研究所, 南昌 330006)

摘要: **目的** 应用整合药理学方法, 探讨灯盏生脉胶囊 (DZSM) 治疗缺血性脑卒中 (IS) 的作用机制和主要疗效。**方法** 采用网络药理学及分子对接手段, 以及分化的 SH-SY5Y 细胞损伤模型, 对 DZSM 主要活性成分进行药效学研究, 并验证相关作用靶点。**结果** 本研究针对 DZSM 中 290 种化学成分进行筛选, 获得对抗 IS 的 67 种主要活性成分和 128 个潜在靶标。DZSM 可能通过调节 AKT1、VEGFA、CASP3 等核心靶点以及流体剪切应力与动脉粥样硬化、缺氧诱导因子-1 (HIF-1) 和磷脂酰肌醇 3 激酶-蛋白激酶 B (PI3K-Akt) 等信号通路, 预防和治疗 IS。分子对接结果表明, DZSM 中野黄芩苷、人参皂苷 Rb₁ 和五味子醇甲等活性成分与 AKT1、VEGFA、CASP3 等靶点具有良好的结合活性。同时对上述活性成分进行药效验证, 结果表明 3 个成分均可以提高超氧化物歧化酶 (SOD) 活性, 减少丙二醛 (MDA) 的释放, 并显著下调分化的 SH-SY5Y 损伤细胞中 *Caspase-3*、*MMP9*、*VEGFA* 和 *SRC* 的水平。**结论** DZSM 治疗 IS 可能与抑制炎症、促进血管生成、保护神经元和增强血管通透性有关, 野黄芩苷、人参皂苷 Rb₁ 和五味子醇甲可能是其中的主要活性成分。

关键词: 灯盏生脉胶囊; 整合药理学; 缺血性脑卒; 作用机制

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)04-0990-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.018

Mechanism and main effective components of Dengzhan Shengmai capsules for ischemic stroke based on integrated pharmacology and pharmacodynamics

LYU Dan¹, ZHANG Qi-ling¹, LIU Yu-ling¹, TANG Ru-ying¹, LI Hui^{1, 2*}, LIN Long-fei^{1*} (1. *Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700*; 2. *Institute of Traditional Chinese Medicine Health Industry, China Academy of Chinese Medical Sciences, Nanchang 330006*)

Abstract: Objective To determine the mechanism of action and main therapeutic effects of Dengzhan Shengmai capsules (DZSM) for ischemic stroke (IS) by integrated pharmacology methods. **Methods** Utilizing network pharmacology and molecular docking techniques, along with a differentiated SH-SY5Y cell injury model, the pharmacological effects of its main active components were studied, and the relevant targets were validated. **Results** Totally 290 chemical components, 67 potential active components and 128 potential targets of DZSM against IS were obtained. DZSM prevented and treated IS by regulating the core targets including AKT1, VEGFA and CASP3, as well as signaling pathways including fluid shear stress and atherosclerosis, hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and phosphoinositide 3-kinase-protein kinase B (PI3K-Akt). The molecular docking showed that active ingredients of DZSM such as scutellarin, ginsenoside Rb₁ and schisandrol A had good binding activity with targets like AKT1, VEGFA and CASP3. At the same time, we pharmacologically verified the above active ingredients. All

基金项目: 中国中医科学院科技创新工程项目资助 (No.CI 2021A04309)。

作者简介: 吕丹, 女, 硕士研究生, 主要从事中药制剂新技术新方法研究与中药新药研发方面的研究, email: 2602517025@qq.com

***通信作者:** 林龙飞, 男, 副研究员, 硕士研究生导师, 主要从事中药制剂新技术新方法研究与中药新药研发方面的研究, email: lflin@icmm.ac.cn; 李慧, 女, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事中药新剂型研究与新药开发方面的研究, email: lihuizys@126.com

three components increased superoxide dismutase (SOD) activity, reduced malondialdehyde (MDA) release and greatly down-regulated levels of *Caspase-3*, *MMP9*, *VEGFA* and *SRC* in differentiated SH-SY5Y damaged cells. **Conclusion** Mechanism of DZSM for IS may be via inhibiting inflammation, promoting angiogenesis, protecting neurons and enhancing vascular permeability. Scutellarin, ginsenoside Rb₁ and schisandrol A are the main active ingredients in DZSM.

Key words: Dengzhan Shengmai capsule; integrated pharmacology; ischemic stroke; mechanism

脑卒中 (cerebral stroke) 是危害人类健康的重大疾病之一^[1], 是由于脑血管的阻塞或爆裂而导致的脑血流中断发生的破坏性脑血管事件, 从而引发身体残疾和多重功能损伤。流行病学研究显示, 缺血性脑卒中 (ischemic stroke, IS) 患病率占全部脑卒中的 85%, 具有高发病率、高致残率、高死亡率和高发率等特点^[2-4]。

灯盏生脉胶囊 (DZSM) 由灯盏细辛、人参、麦冬和五味子组成, 具有益气养阴、活血通络等功效, 是临床上治疗 IS 的上市中成药^[5-7]。在 2002 年, 中国食品药品监督管理局 (NMPA) 将其作为治疗脑卒中后遗症的中成药批准上市, 主要用于缺血性心脑血管疾病的恢复期治疗。DZSM 是目前唯一具有 A 级循证医学依据的卒中二级预防用中成药, 并且在用于神经系统治疗的中药品种中排名第一。有研究表明, DZSM 作为 IS 的辅助治疗, 可通过抗凝、抗血小板、抗炎等途径, 显著改善患者的神经功能与凝血功能^[8]。DZSM 能够与常规二级预防药物联用, 在有效降低 IS 复发的同时不会增加严重不良事件^[6]。DZSM 也可通过改善患者神经功能受损程度, 控制 IS 的复发率^[9]。值得一提的是, 有报道标准二级预防方案与 DZSM 联用后, 更具经济性^[10]。但目前关于 DZSM 治疗 IS 的药效机制、靶点研究尚未系统阐明。本研究拟运用网络药理学及分子对接方法探讨 DZSM 治疗 IS 的靶点与相关通路, 使用分化的 SH-SY5Y 细胞损伤模型来研究主要成分的药效学, 并验证所涉及的关键靶点, 以期阐明其药理学机制提供参考。

1 材料

1.1 细胞

人神经母细胞瘤细胞株 SH-SY5Y 细胞, 由中国科学院上海细胞库提供。

1.2 试剂

DMEM 培养基 (Gibco); CCK-8 试剂溶液 (赛百科); 微量丙二醛 (MDA) 测定试剂盒 (TBA 法) (批号: A003-2-2)、总超氧化物歧化酶 (SOD) 测定试剂盒 (WST-1 法) (批号: A001-3-2) (南京建成生物工程研究所); UltraPure Agarose (货号: 16500100)、SuperScript III RT 逆转录试剂盒 (货号:

11752050)、Sybr qpcr mix (货号: 4472920) (ABI-invitrogen); 维甲酸 (RA) (北京贝丽莱斯生物化学有限公司); 野黄芩苷 (纯度 ≥ 98%, CAS: 27740-01-8)、人参皂苷 Rb₁ (纯度 ≥ 98%, CAS: 41753-43-9)、五味子醇甲对照品 (纯度 ≥ 98%, CAS: 7432-28-2) (宝鸡翊瑞生物科技有限公司)。

1.3 仪器

显微镜 (Canon 公司), CO₂ 培养箱 (长沙华曦电子科技有限公司), 台式高速冷冻离心机、分光光度计 (THERMO 公司), 荧光 PCR 仪 [Applied biosystems (USA) 公司], 电泳仪、凝胶成像仪器 (Bio-Rad)。

2 方法与结果

2.1 网络药理学研究

应用 PubChem 数据库与相关文献^[11-12], 收集整理灯盏生脉胶囊相关化学成分, 共 290 个, 并利用 SwissADME (<http://swissadme.ch/>) 进行成药性筛选, 得到灯盏生脉胶囊潜在活性成分 67 个, 包括灯盏细辛成分 8 个, 人参成分 13 个, 五味子成分 41 个, 麦冬成分 5 个。分别在 Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 与 GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 检索上述成分作用靶点及脑缺血疾病相关基因, 两者取交集, 获取 128 个灯盏生脉胶囊抗脑缺血潜在靶点。上传至 STRING (<https://cn.string-db.org/>) 数据库, 筛选 Interaction score > 0.9 的靶点导入 Cytoscape 3.8.0 构建蛋白-蛋白互作网络图 (见图 1)。参数 “Betweenness Centrality” “Closeness Centrality” “Degree” 的 z-score 值相加得到靶点的总 z-score 值, 排名前 10 的视为关键靶点, 分别为 ALB、AKT1、VEGFA、CASP3、TNF、MAPK1、MAPK8、PTGS2、SRC、MMP9。通过 STRING 数据库对潜在靶点进行 KEGG 通路富集分析, 结果涉及流体剪应力与动脉粥样硬化、HIF-1、PI3K-Akt、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、肿瘤坏死因子 (TNF) 等 185 条信号通路, 通路富集气泡图见图 2 和 GO 功能富集条形图见图 3。运用 Cytoscape 软件绘制相关成分-关键靶点-关键通路网络图 (见图 4), 其中 Degree 为 0 的节点已被剔除。

利用 iGEMDOCK 2.1 软件对关键靶点 AKT1、

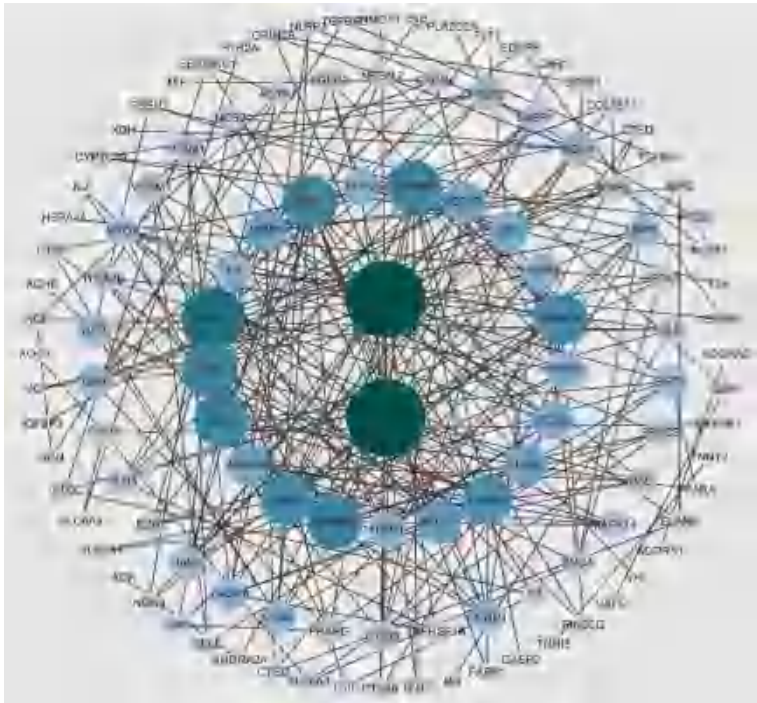


图 1 DZSM 抗脑缺血潜在靶点交互网络图

Fig 1 Network diagram of potential target interactions of DZSM against cerebral ischemia

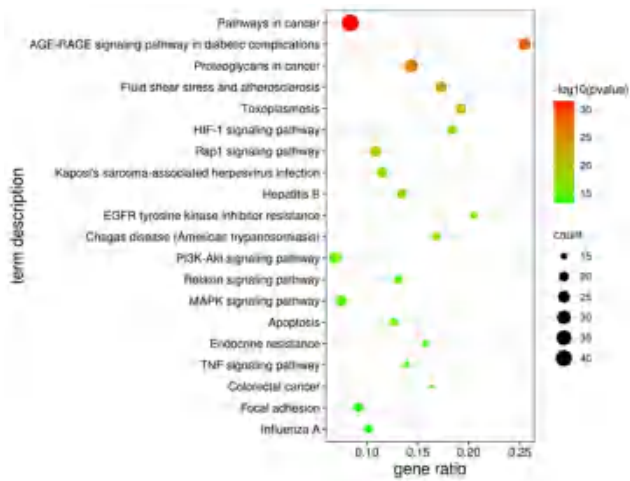


图 2 KEGG 通路富集分析

Fig 2 KEGG pathway enrichment analysis

VEGFA、CASP3、TNF、MAPK1、MAPK8、PTGS2、SRC、MMP9 与相应成分进行分子对接,验证其结合活性。首先,从 RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/search>) 数据库获取所需的靶标蛋白,并从 DrugBank (<https://go.drugbank.com/>) 数据库查找蛋白对应的已批准上市的药物,若该蛋白没有批准药物,则通过 RCSB PDB 数据库获取该蛋白的原始配体进行后续对接。从 PubChem 数据库下载所有配体(小分子化合物)的 3D 结构,通过 Open Babel 3.1.1 软件对化合物进行格式转换,保存为 mol2 格式文件,对接结果见图 5。分数(total energy)越低,表明结合稳定性越高,即大分子蛋白与小分子化合物之间的结合活性越好。从图中信

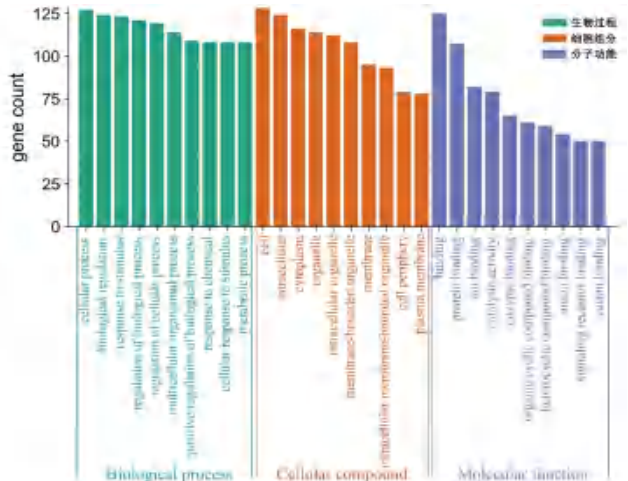


图 3 GO 功能富集分析

Fig 3 GO function enrichment analysis

息可以看出,人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re、野黄芩苷、五味子醇甲等成分与关键靶点具有良好结合活性。由于野黄芩苷在 DZSM 中的含量接近 10%,为其含量最高的有效成分,故本研究选择模拟野黄芩苷与关键靶点的对接结合模式。野黄芩苷与靶点 TNF2、CASP3、PTGS2、MMP9 之间的对接结合模式(见图 6)。

2.2 体外实验验证

2.2.1 实验分组与模型建立 首先用 RA 诱导 SH-SY5Y 细胞分化。以 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ RA 的 DMEM 培养基培养 SH-SY5Y 细胞,并置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂ 培养箱内,每 2 日更换培养基。第 7 日,在显微镜下观察细胞形态变化,证实细胞分化。将分化后的

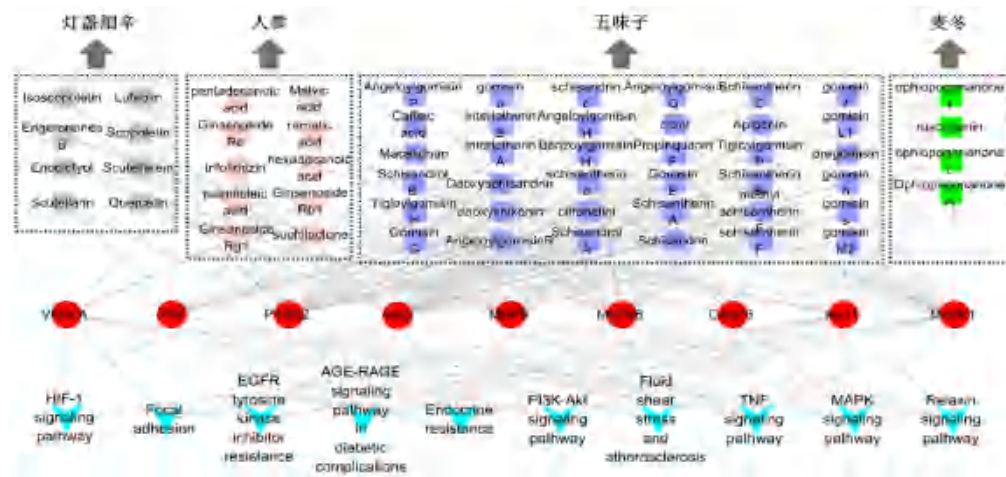


图 4 DZSM 抗脑缺血成分-关键靶点-通路网络

Fig 4 DZSM anti-cerebral ischemia components-key targets-pathway network

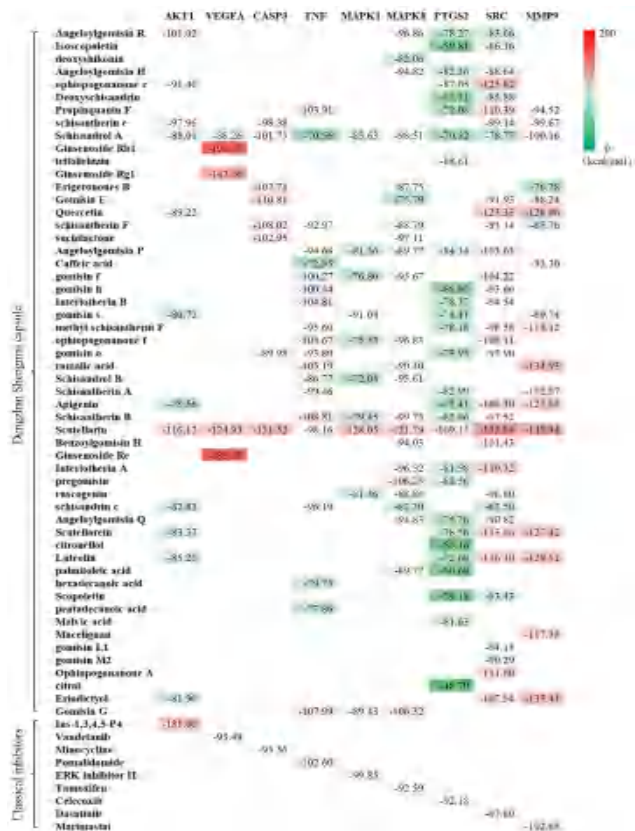


图 5 关键蛋白与对应小分子对接结果

Fig 5 Docking results between key proteins and corresponding small molecules

SH-SY5Y 细胞随机分为 5 组：对照组、模型组、高剂量成分组、中剂量成分组、低剂量成分组。对照组在含 DMEM (10% 胎牛血清) 的 CO₂ 培养箱中培养，其余各组均建立缺氧葡萄糖剥夺/复氧 (OGD/R) 模型。高、中、低剂量成分组在 OGD/R 条件下分别加入高 (40 μmol · L⁻¹)、中 (20 μmol · L⁻¹)、低 (10 μmol · L⁻¹) 剂量成分 (野黄芩苷、人参皂苷 Rb₁、五味子醇甲) 处理，模型组则更换 DMEM 培养基，培养 24 h。

2.2.2 CCK-8 测定细胞增殖率 将各组以每孔 1 × 10⁴ 个细胞的密度接种于 96 孔板中。OGD/R 建模并处理后，每孔加入 10 μL CCK-8 溶液，并在 CO₂ 培养箱中孵育 1 h。用微孔板测量每孔在 450 nm 波长处的光密度 (OD)。计算细胞存活率 (%) = (实验组 OD 值 - 模型组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 模型组 OD 值) × 100%。与对照组相比，模型组细胞活性显著降低 (P < 0.05)。与模型组相比，各剂量组 (40、20、10 μmol · L⁻¹) 野黄芩苷、人参皂苷 Rb₁ 和五味子醇甲均显著提高了 OGD/R 诱导的 SH-SY5Y 分化细胞的活性 (P < 0.05)，结果见图 7。

2.2.3 ELISA 法测定 MDA 与 SOD 活性 将分化后的 SH-SY5Y 细胞以每孔 5 × 10⁵ 个的密度接种于 24 孔板中，培养 24 h，进行建模和给药处理。对每组细胞消化、离心及 PBS 洗涤后进行收集。在 4℃ 下机械均质细胞，离心，收集上清液。采用 BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度，调整其质量浓度为 1 mg · mL⁻¹。按 ELISA 法测定试剂盒说明书测定 MDA 含量及 SOD 活性。结果与正常组比较，模型组 MDA 含量升高，SOD 活性降低 (P < 0.05)，提示存在明显的氧化应激相关损伤。与模型组比较，野黄芩苷、人参皂苷 Rb₁、五味子醇甲组 MDA 含量显著降低，SOD 活性显著升高 (P < 0.05)，且其趋势均呈剂量依赖性 (见图 8)。这一结果提示野黄芩苷、人参皂苷 Rb₁ 和五味子醇甲可能通过增加细胞抗氧化酶活性来减缓细胞凋亡过程，从而减少 MDA 的释放并提高 SOD 活性。

2.2.4 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 按照“2.2.3”项下方法处理并收集细胞，随之提取总 RNA，逆转录为 cDNA，以肌动蛋白 (Actin) 为内参，进行 PCR 扩增。PCR 条件为 95℃ 变性 10 s，58℃ 退火 20 s，72℃ 延伸 20 s，共 40 个循环。引物序列如表 1 所示。采用 RT-qPCR 检测野黄芩苷、人参皂苷 Rb₁、五味子

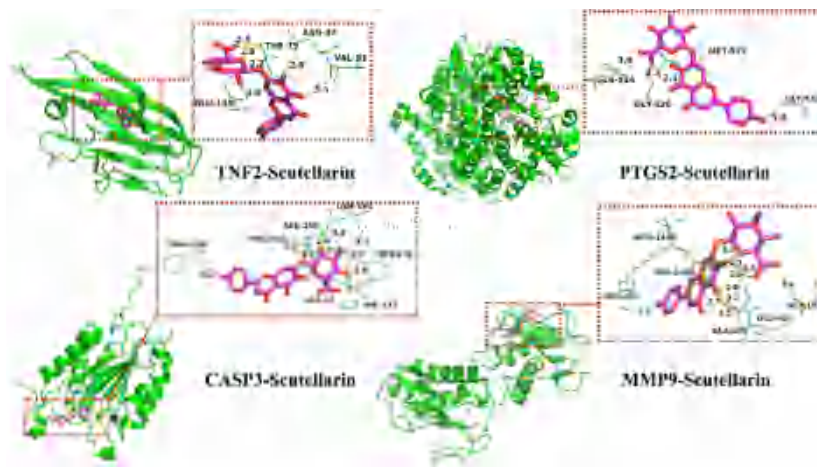
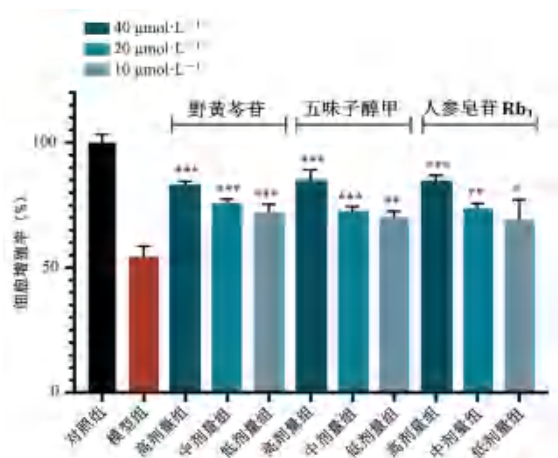


图6 野黄芩苷与靶点 TNF2、PTGS2、CASP3 及 MMP9 的对接模式图

Fig 6 Docking pattern diagram of scutellarin with TNF2, PTGS2, CASP3 and MMP9

图7 野黄芩苷、人参皂苷 Rb₁ 和五味子醇甲处理后的细胞增殖率Fig 7 Cell proliferation rate after the treatment with scutellarin, ginsenoside Rb₁ and schisandrol A

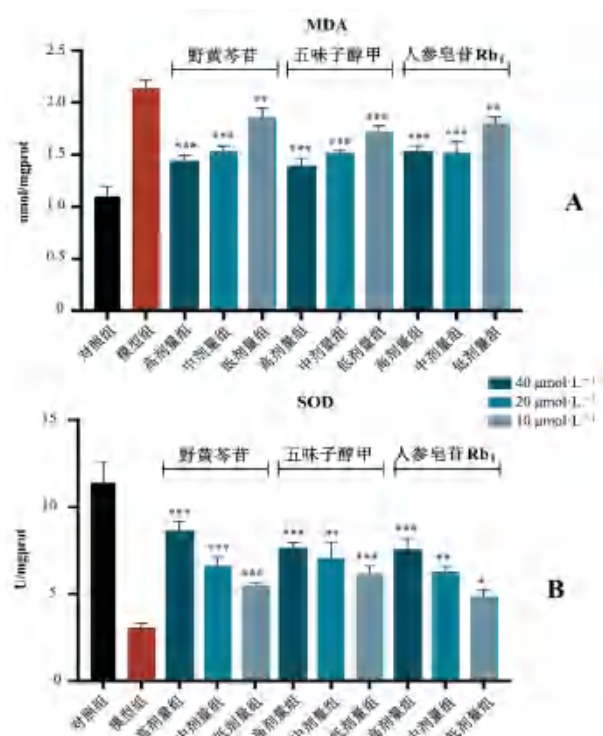
注: 与对照组比较, $^{\#}P < 0.05$; 与模型组比较, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ 。

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

醇甲处理后 *Caspase-3*、*MMP9*、*SRC*、*VEGFA* 的相对表达量。与对照组比较, 模型组 *Caspase-3*、*MMP9*、*SRC*、*VEGFA*、*PTGS2* 基因相对表达量显著上调 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 野黄芩苷处理后, 各组 SH-SY5Y 细胞中 *Caspase-3*、*MMP9* 和 *SRC* 的 mRNA 相对表达量均显著下调 (见图 9A) ($P < 0.001$)。此外, 人参皂苷 Rb₁ 处理后的 *VEGFA* (见图 9B) 以及五味子醇甲处理后的 *Caspase-3* 和 *MMP9* (见图 9C) 的 mRNA 相对表达量均显著下调 ($P < 0.001$)。综合分析, 各高剂量组结果水平接近对照组, 提示高剂量的野黄芩苷、五味子醇甲及人参皂苷 Rb₁ 可能对 SH-SY5Y 细胞损伤分化模型有较强的修复潜力。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 22 软件进行数据分析, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析,

图8 野黄芩苷、人参皂苷 Rb₁ 和五味子醇甲对 SH-SY5Y 细胞内 MDA 含量 (A) 及 SOD 活性 (B) 的影响Fig 8 Effect of scutellarin, ginsenoside Rb₁ and schisandrol A on MDA content (A) and SOD activity (B) in SH-SY5Y cells

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

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

组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 讨论

基于现有报道对 DZSM 中化学成分的分析鉴定, 本研究整理得到 290 个相关化学成分, 筛选后得到 67 个潜在活性成分, 并获取 128 个 DZSM 抗脑缺血潜在靶点。GO 分析结果显示, 生物过程主

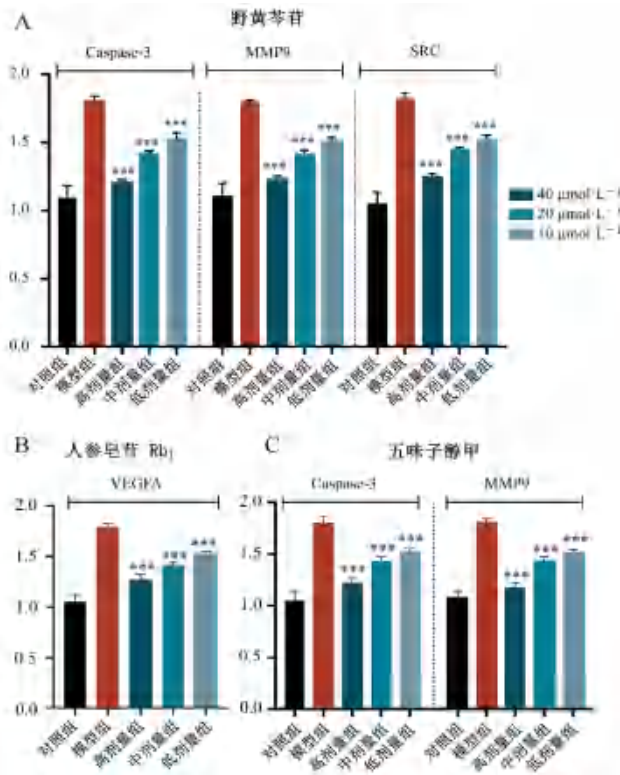


图9 野黄芩苷(A)、人参皂苷Rb₁(B)、五味子醇甲(C)对SH-SY5Y细胞中Caspase-3、MMP9、VEGFA和SRC的mRNA相对表达量的影响

Fig 9 Effect of scutellarin, ginsenoside Rb₁ and schisandrol A on the relative expression levels of mRNA of Caspase-3, MMP9, VEGFA and SRC in SH-SY5Y cells

注: 与对照组比较, [#]*P* < 0.05; 与模型组比较, ^{***}*P* < 0.001。

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

表1 荧光定量PCR的引物

Tab 1 Primers for fluorescent quantitative PCR

基因名称	引物(5'-3')
Actin	F CTGAACGTGAAATTGTCCGAGA
	R TTGCCAATGGTGATGACCTG
TNF-α	F GTTCCATGGCCCAGACCCCT
	R AGCTGCTCCTCCGCTTGGTG
Caspase-3	F CATGCCAGAAGATACCACTG
	R ATTTCTCCAGGAATAGTAACCG
MMP9	F CACCACCGCCAATATGACCAG
	R CTGCTTGCCCAGGAAGACGAA
PTGS2	F CGAGCGACTGTTCCAAACCA
	R AAAAGCAGCTCTGGGTCGAA

要有细胞过程、生物调节及对刺激的反应等;细胞组分主要包括细胞质、细胞器及包内细胞器等;分子功能则主要涉及蛋白结合、离子结合和催化活性等。KEGG 通路分析发现,靶标主要参与流体剪切应力与动脉粥样硬化、HIF-1、PI3K-Akt、MAPK、TNF 等信号通路。IS 中的诱因多为脑供血动脉狭窄或闭塞、脑供血不足而导致脑组织坏死。而颈部动脉和椎动脉狭窄的主要原因为动脉硬化斑块所造成

血管狭窄甚至阻塞,即流体剪切应力与动脉粥样硬化是 IS 发病的主要信号通路。与此同时,PI3K-Akt 活化可减少缺血性病变体积、降低细胞损伤和凋亡,对缺氧/缺血再灌注损伤起保护作用^[13-14];MAPK 信号通路可进一步活化 NF-κB,促进相关因子以及多种动脉粥样硬化相关基因的表达^[15-16];HIF-1 信号通路中的低氧诱导因子-1α(HIF-1α)参与调节血管的生成、细胞凋亡与自噬等信号通路^[17-18];TNF 信号通路与中风后炎症反应及血脑屏障破坏有关,发生脑缺血后 IL-6 及 TNF-α 等可诱发更多细胞毒素物质及炎性细胞因子的产生,进一步破坏血脑屏障和细胞外基质,加速继发性脑损伤的发生^[19-21]。

DZSM 抗脑缺血的关键靶点包括 AKT1 和 VEGFA 等 10 个细胞因子。研究表明早期激活 AKT 可以减少缺血再灌注后大鼠脑部神经损伤,改善缺氧情况,具有神经保护作用;抑制 MAPK 可以有效改善缺血再灌注损伤引起的炎症反应^[22-23];VEGFA 可增加大脑中动脉阻塞大鼠模型缺血半暗带中生物微血管密度,促进血管生成^[24-25];TNF-α 可以激活胶质细胞并介导血管内皮细胞上黏附分子的表达,促进中性粒细胞的浸润,影响血脑屏障通透性;CASP3 可催化多种细胞关键蛋白的特异性断裂,在启动缺血脑区受损神经元凋亡的关键环节中发挥着十分重要的作用^[26];MMP9 可降解脑血管基膜成分,增加血脑屏障的通透性,加重脑水肿的发生,检测脑缺血患者的外周血发现其 MMP9 水平相对于健康人较高^[27-29]。上述报道进一步佐证了本网络药理学研究结果。

本研究对 DZSM 有效成分与抗 IS 的关键靶点进行分子对接,发现灯盏细辛、人参以及五味子等的有效成分与关键靶点的结合活性较高。进一步研究 DZSM 中含量最高的野黄芩苷对细胞抗缺氧损伤的作用,结果显示,野黄芩苷能提高抗氧化酶活性,减少 MDA 释放并减缓细胞凋亡过程。同时,RT-qPCR 结果表明,野黄芩苷可显著下调损伤分化 SH-SY5Y 细胞中 Caspase-3、MMP9、SRC 基因水平,人参皂苷 Rb₁ 可调节 VEGFA 基因水平,五味子醇甲可调节损伤分化 SH-SY5Y 细胞中 Caspase-3、MMP9 基因水平,说明野黄芩苷、人参皂苷 Rb₁、五味子醇甲具有治疗 IS 的潜力。

综上所述,本研究综合运用网络药理学方法、分子对接技术及 SH-SY5Y 细胞损伤分化模型分析并验证了 DZSM 治疗 IS 的活性成分、关键靶点及信号通路。结果显示 DZSM 可能通过野黄芩苷、人参皂苷 Rb₁ 及五味子醇甲等作用于 AKT1、VEGFA 及 CASP3 等核心靶点,并通过调控流体剪切应力与动脉粥样硬化、HIF-1 及 PI3K-Akt 等信号通路治疗 IS。本研究利用整合药理学指导实验,为 DZSM 治疗 IS 的深入机制研究提供了理论依据。

参考文献

- [1] Feigin VL, Forouzanfar MH, Krishnamurthi R, et al. Global and regional burden of stroke during 1990–2010: findings from the global burden of disease study 2010 [J]. *Lancet*, 2014, 383 (9913): 245-254.
- [2] Wang Y, Zhou LH, Guo J, et al. Secular trends of Stroke incidence and mortality in China, 1990 to 2016: the global burden of disease study 2016 [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2020, 29 (8): 104959.
- [3] Krishnamurthi RV, Ikeda T, Feigin VL. Global, regional and country-specific burden of ischaemic stroke, intracerebral haemorrhage and subarachnoid haemorrhage: a systematic analysis of the global burden of disease study 2017 [J]. *Neuroepidemiology*, 2020, 54 (2): 171-179.
- [4] Kim J, Thayabaranathan T, Donnan GA, et al. Global stroke statistics 2019 [J]. *Int J Stroke*, 2020, 15 (8): 819-838.
- [5] Ma Y, Sun WP. Effects of Dengzhan Shengmai capsule combined with butylphthalide soft capsule on oxidative stress indexes and serum Hcy and CRP levels in patients with vascular dementia [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2020, 66 (6): 8-14.
- [6] Cai YF, Zhang XY, Huang Y, et al. The add-on effect of Dengzhan Shengmai capsules on secondary prevention of ischemic stroke: a multicentre, randomised, placebo-controlled clinical trial [J]. *Complement Ther Med*, 2019, 46: 189-194.
- [7] 魏戌, 叶晓勤, 谢雁鸣, 等. 灯盏细辛注射液与灯盏生脉胶囊治疗缺血性中风上市后临床再评价 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36 (20): 2789-2792.
- [8] 李勃, 孟宏涛, 刘凯. 灯盏生脉胶囊预防性治疗缺血性脑卒中效果评价 [J]. *中国药业*, 2018, 27 (7): 60-63.
- [9] Yang XY, Wang LQ, Li JG, et al. Chinese herbal medicine Dengzhan Shengmai capsule as adjunctive treatment for ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials [J]. *Complement Ther Med*, 2018, 36: 82-89.
- [10] 李薇, 朱晓晨, 朱贺, 等. 灯盏生脉胶囊用于缺血性脑卒中二级预防的成本效用分析 [J]. *中国新药杂志*, 2021, 30 (5): 474-480.
- [11] Sheng N, Zheng H, Xiao Y, et al. Chiral separation and chemical profile of Dengzhan Shengmai by integrating comprehensive with multiple heart-cutting two-dimensional liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1517: 97-107.
- [12] Mu XM, Xu XK, Guo X, et al. Identification and characterization of chemical constituents in Dengzhan Shengmai capsule and their metabolites in rat plasma by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2019, 1108: 54-64.
- [13] Yao RQ, Qi DS, Yu HL, et al. Quercetin attenuates cell apoptosis in focal cerebral ischemia rat brain via activation of BDNF-TrkB-PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Neurochem Res*, 2012, 37 (12): 2777-2786.
- [14] Wang MM, Zhang M, Feng YS, et al. Electroacupuncture inhibits neuronal autophagy and apoptosis via the PI3K/AKT pathway following ischemic stroke [J]. *Front Cell Neurosci*, 2020, 14: 134.
- [15] Yeung YT, Aziz F, Guerrero-Castilla A, et al. Signaling pathways in inflammation and anti-inflammatory therapies [J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24 (14): 1449-1484.
- [16] Sun SC. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17 (9): 545-558.
- [17] Ashayeri AR, Khaleghi GM, Gorji A. The role of Toll-like receptor signaling pathways in cerebrovascular disorders: the impact of spreading depolarization [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17 (1): 108.
- [18] Hong M, Shi HL, Wang N, et al. Dual effects of Chinese herbal medicines on angiogenesis in cancer and ischemic stroke treatments: role of HIF-1 network [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 696.
- [19] Pasarica D, Gheorghiu M, Topârceanu F, et al. Neurotrophin-3, TNF-alpha and IL-6 relations in serum and cerebrospinal fluid of ischemic stroke patients [J]. *Roum Arch Microbiol Immunol*, 2005, 64 (1-4): 27-33.
- [20] Clausen BH, Wrenfeldt M, Høgedal SS, et al. Characterization of the TNF and IL-1 systems in human brain and blood after ischemic stroke [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2020, 8 (1): 81.
- [21] Bokhari FA, Shakoori TA, Butt A, et al. TNF-alpha: a risk factor for ischemic stroke [J]. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 2014, 26 (2): 111-114.
- [22] Vikman P, Ansar S, Henriksson M, et al. Cerebral ischemia induces transcription of inflammatory and extracellular-matrix-related genes in rat cerebral arteries [J]. *Exp Brain Res*, 2007, 183 (4): 499-510.
- [23] Xie WJ, Zhu T, Dong X, et al. HMGB1-triggered inflammation inhibition of notoginseng leaf triterpenes against cerebral ischemia and reperfusion injury via MAPK and NF- κ B signaling pathways [J]. *Biomolecules*, 2019, 9 (10): 512.
- [24] Plate KH, Beck H, Danner S, et al. Cell type specific upregulation of vascular endothelial growth factor in an MCA-occlusion model of cerebral infarct [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1999, 58 (6): 654-666.
- [25] Freitas-Andrade M, Raman-Nair J, Lacoste B. Structural and functional remodeling of the brain vasculature following stroke [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 948.
- [26] Lee BY, Chon J, Kim HS, et al. Association between a polymorphism in CASP3 and CASP9 genes and ischemic stroke [J]. *Ann Rehabil Med*, 2017, 41 (2): 197-203.
- [27] Zhao BQ, Wang S, Kim HY, et al. Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke [J]. *Nat Med*, 2006, 12 (4): 441-445.
- [28] Yi XY, Zhou Q, Sui G, et al. Matrix metalloproteinase-9 gene polymorphisms are associated with ischemic stroke severity and early neurologic deterioration in patients with atrial fibrillation [J]. *Brain Behav*, 2019, 9 (6): e01291.
- [29] Wang YK, Zhang L, Huang HT, et al. Relationship between the matrix metalloproteinase-9 gene polymorphisms and ischemic stroke [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12 (3): 949-956.

(收稿日期: 2024-10-02; 修回日期: 2024-11-28)

基于系统药理学探究栀子苷改善阿尔茨海默病的作用机制及实验验证

崔珊珊¹, 姜晶¹, 薛慧¹, 邱琦¹, 刘宇欣¹, 朴成玉¹, 雷霞², 张亚峰^{2*}, 张宁^{1*} (1.黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040; 2.南京中医药大学无锡附属医院, 江苏省中医退行性骨关节病临床医学创新中心, 江苏 无锡 214071)

摘要: **目的** 基于 GEO 芯片、网络药理学和分子对接技术探索栀子苷改善阿尔茨海默病 (AD) 的潜在作用机制, 并应用体外实验进行初步验证。**方法** 通过公开数据库 GEO 挖掘栀子苷治疗 AD 的关键基因, 借助 PharmMapper 检索药物靶点信息, 利用 GEO、OMIM、DrugBank、GeneCards 和 TTD 筛选 AD 靶点。通过 Cytoscape 构建“活性成分-靶点”可视化网络图, 通过 DAVID 数据库进行 GO、KEGG 和分子对接分析, 预测其作用机制。通过栀子苷干预 $A\beta_{25-35}$ 诱导大鼠嗜铬瘤细胞 (PC12 细胞) 所构建的 AD 细胞模型, 利用 MTT 法检测栀子苷的有效浓度, ELISA 法检测栀子苷对炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素- 1β (IL- 1β) 和白细胞介素-6 (IL-6) 的影响, 并通过 Western blot 验证核心靶点和通路。**结果** 网络药理学结果显示, 栀子苷与 AD 共有 119 个交集靶点, 涉及信号传导、细胞迁移的正向调节等生物过程和蛋白激酶活性、酶结合和 ATP 结合等分析功能, 富集在 AD、MAPK 信号通路、雌激素信号通路和 PI3K-Akt 等信号通路。JNK1 等关键靶点参与调控 MAPK 信号通路。分子对接结果表明, 栀子苷与 JNK1 具有良好的结合亲和力。体外实验表明, 栀子苷能够提高 PC12 细胞增殖率, 抑制炎症因子 TNF- α 、IL- 1β 和 IL-6 的释放, 改善 $A\beta_{25-35}$ 对 PC12 细胞的损伤, 提高 ER β 的水平, 降低 p-JNK/JNK 的水平。**结论** 栀子苷可能通过增加 ER β 的表达, 抑制 p-JNK/JNK 的活性, 进而发挥对 $A\beta$ 损伤 PC12 细胞的保护作用。

关键词: 栀子苷; 阿尔茨海默病; PC12 细胞; $A\beta$; p-JNK1/JNK1

中图分类号: R286 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)04-0997-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.019

Mechanism and experiment verification of geniposide in improving Alzheimer's disease based on system pharmacology

CUI Shan-shan¹, JIANG Jing¹, XUE Hui¹, QIU Qi¹, LIU Yu-xin¹, PIAO Cheng-yu¹, LEI Xia², ZHANG Ya-feng^{2*}, ZHANG Ning^{1*} (1. School of Pharmacy, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040; 2. Wuxi Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Clinical Medical Innovation Center of Jiangsu Traditional Chinese Medicine Degenerative Osteoarthritis, Wuxi Jiangsu 214071)

Abstract: Objective To preliminarily verify the potential mechanism of geniposide in improving Alzheimer's disease (AD) by in vitro experiments, based on chip mining, network pharmacology, and molecular docking. **Methods** Key genes modulated by geniposide in AD were initially mined from the Gene Expression Omnibus (GEO) database, followed by prediction of direct drug targets with PharmMapper. AD-related targets were concurrently curated from GEO, OMIM, DrugBank,

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No.82174007); 江苏省中医退行性骨关节病临床医学创新中心资助项目 (No.20210405); 黑龙江中医药大学科研基金项目 (No.201819)。

作者简介: 崔珊珊, 女, 硕士研究生, 主要从事中药药效物质基础及体内代谢研究, email: 1540143057@qq.com * **通信作者:** 张亚峰, 男, 主任医师, 博士研究生导师, 主要从事脊柱退行性骨关节疾病及骨质疏松症研究, email: wxzy007@njucm.edu.cn; 张宁, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药药效物质基础及体内代谢研究, email: zhangning0454@163.com

GeneCards, and TTD databases, with overlapping candidates selected for subsequent analysis. A “compound-target” interaction network was constructed via Cytoscape to visualize relationships and prioritize hub targets based on topological parameters (degree centrality, betweenness centrality). Functional annotation via DAVID revealed significant enrichment in Gene Ontology (GO) biological processes and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways, while molecular docking simulations validated binding affinities between geniposide and core targets. Experimental validation involved treating $A\beta_{25-35}$ -induced PC12 cell models of AD with geniposide, followed by MTT assay to determine optimal concentrations, ELISA to quantify inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , and IL-6), and Western blot analysis to confirm expression changes in key signaling pathways. **Results** Network pharmacology showed that geniposide mainly acted on key targets such as JNK1, and participated in the regulation of MAPK signaling pathway. Molecular docking showed that geniposide had good binding affinity to JNK1. In vitro experiments showed that geniposide increased the proliferation rate of PC12 cells, inhibited the release of inflammatory factors TNF- α , IL-1 β and IL-6, improved the damage of $A\beta_{25-35}$ to PC12 cells, increased the expression of ER β , and decreased the expression of p-JNK/JNK. **Conclusion** Geniposide may inhibit the activity of p-JNK/JNK by increasing the expression of ER β , thereby protecting PC12 cells damaged by $A\beta$.

Key words: geniposide; Alzheimer’s disease; PC12 cell; $A\beta$; p-JNK1/JNK1

阿尔茨海默病 (AD) 是一种神经退行性疾病, 其发病机制为大脑皮质等区域中淀粉样蛋白 β ($A\beta$) 的大量聚集和细胞内由 tau 蛋白过度磷酸化引起的神经原纤维缠结^[1]。乙酰胆碱酯酶抑制剂 (AChEI) 是目前临床上使用最为广泛的 AD 治疗药物, 其疗法仅能暂时缓解 AD 患者的症状^[2]。

栀子苷 (geniposide) 为环烯醚萜苷类化合物, 具有抗炎、抗肿瘤、保胆利肝、抗氧化等作用。课题组前期研究结果表明, 杜仲提取物可提高 APP/PS1 小鼠下丘脑 ER β 的表达, 提高下丘脑中促性腺激素释放激素 (GnRH)、 β -内啡肽 (β -EP)、P 物质 (SP) 的含量, 提示杜仲提取物能够启动下丘脑-垂体-性腺轴, 发挥抗衰老作用^[3]。栀子苷为中药杜仲的主要药效成分之一, 但栀子苷治疗 AD 的详细机制尚不清楚。故本实验采用 GEO 芯片挖掘联合网络药理学和分子对接手段预测栀子苷治疗 AD 的关键靶点及信号通路。通过 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞, 复制 AD 细胞模型, 并探讨 p-JNK/JNK 信号通路对 $A\beta_{25-35}$ 损伤 PC12 细胞的影响, 以阐述栀子苷对 $A\beta_{25-35}$ 损伤 PC12 细胞的保护作用及机制, 为临床 AD 的治疗提供理论依据。

1 材料

1.1 软件与数据库

AutoDock Vina 1.5.7 软件、AutoDock-Tools

1.5.6 软件、Pymol 2.2.0 软件、R 4.3.3 软件 (<https://www.r-project.org/>)、GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)、PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、PharmMapper 数据库 (<http://l-lilab-ecust.cn/pharmmapper/index.html>)、GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)、TTD 数据库 (<https://db.idrblab.net/ttd/>)、Drug-Bank 数据库 (<https://go.drugbank.com/>)、OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>)、STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>)、DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>)、PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>)、微信在线生物信息学分析可视化云平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>)。

1.2 细胞与试剂

PC12 细胞 (高分化, 中国科学院细胞库); 栀子苷 (纯度: 98%, 批号: SML0153)、 β -雌二醇 (纯度: 98%, 批号: E2758) (SIGMA-ALDRICH); $A\beta_{25-35}$ (纯度: 95%, 批号: Y0044)、DMEM (批号: SH300022.01)、胎牛血清 (批号: SV30087.01)、0.25% 胰蛋白酶 (批号: SH30042.01)、青霉素-链霉素 (批号: SV30010) (美国 Hyclone 公司); 二甲基亚砜 (DMSO) (批号: 20130716)、MTT (批号: 021005) (美国 Sigma 公司); 磷酸盐缓冲液 (PBS) (批号: P1010-2L, 北京中杉金桥); 小鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 测试盒、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 测试盒和白细胞介素-6 (IL-6) 测试盒 (南京建成生物工

程研究所); 兔抗 β -actin 抗体(批号: bs-0061R) 和 HRP 标记羊抗兔 IgG (批号: bs-0295G-HRP)(北京博奥森生物技术有限公司); 兔抗 JNK1 抗体(批号: ab124956, 英国 Abcam 公司); 彩色预染蛋白分子量标准(批号: P0069, 碧云天生物技术)。

1.3 仪器

HF240 型 CO₂ 培养箱(上海力申科学仪器有限公司); IX-71-21PH 型 Olympus 倒置显微镜(日本奥林巴斯株式会社); YXQ-LS-50S11 型立式压力蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); MK3 型酶标仪(上海热电仪器有限公司); mini PROTEAN Tetra Cell 电泳仪和 Trans-Blot SD Cell 半干转膜仪(BIO-RAD 公司)。

2 方法与结果

2.1 构建栀子苷抗 AD 作用靶点的蛋白-蛋白互作网络(PPI)

通过 VENNY 2.1.0 在线绘图工具绘制韦恩图, 筛选出栀子苷和 AD 共同靶点 119 个。将这些靶点上传到 STRING 数据库中生成 PPI 网络, 将条件设置为“Human”, 置信度设置为 > 0.9, 并隐藏网络中断开连接的节点, 保存 TSV 文件并导入 Cytoscape 3.7.2 软件构建可视化靶网, 筛选出核心靶点。结果显示, 119 个交集靶点共形成了 116 个节点和 1279 条边。根据度值对其排列, 节点颜色越深、形状越大, 代表度值越大。结果见图 1 和表 1。

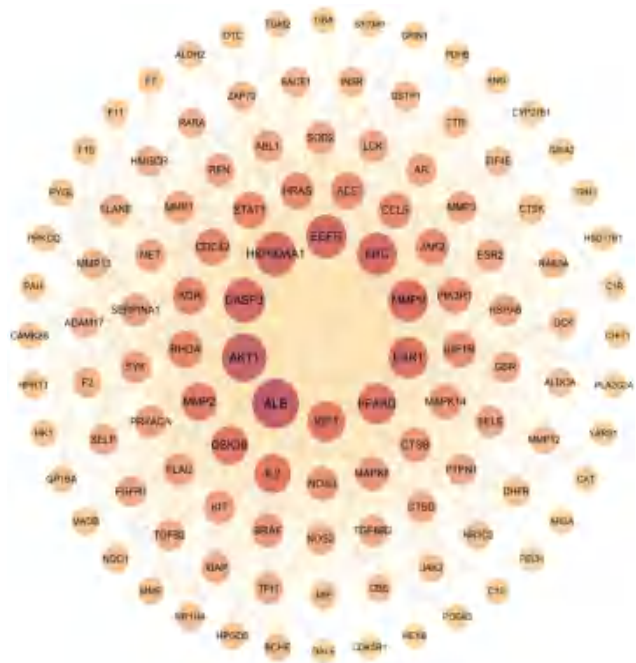


图 1 栀子苷-AD 的 PPI 网络图

Fig 1 PPI network diagram of geniposide-AD

表 1 栀子苷抗 AD 蛋白-蛋白互作拓扑学分析

Tab 1 Topology of anti-Alzheimer's disease protein-protein interaction of geniposide

基因	蛋白名称	度值	紧密中心性
ALB	白蛋白	77	0.764
AKT1	丝氨酸 / 苏氨酸激酶 1	71	0.724
EGFR	表皮生长因子受体	56	0.663
PPARG	过氧化物酶体增殖物活化受体 γ	48	0.625
GSK3B	半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3	43	0.608
STAT1	信号传导和转录激活因子 3	37	0.576
JNK1	C-Jun 氨基末端激酶 1	29	0.561
SOD2	超氧化物歧化酶 2	25	0.561
AR	雄激素受体	24	0.539
RARA	核维甲酸受体	17	0.502

2.2 基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析

将栀子苷治疗 AD 交集靶点上传至 DAVID 数据库, 物种设定为“Homo sapiens”即可进行 GO 及 KEGG 分析, 并通过使用微生信在线绘图工具对上述所得的结果进行展示。去除不相关的广谱通路, 依据代谢(metabolism)、遗传信息处理(genetic information processing)、环境信息处理(environmental information processing)、细胞过程(cellular processes)、有机系统(organismal systems)、人类疾病(human diseases)和药物开发(drug development)对 KEGG 结果进行分类。结果显示, 栀子苷抗 AD 的交集靶点主要富集在 AD、MAPK 信号通路、雌激素信号通路和 PI3K-Akt 信号通路等。GO 分析共富集出 470 条生物功能(BP)条目, 72 条细胞组成(CC)条目, 105 条分子功能(MF)条目。列举前 10 个 BP、MF、CC 条目($P < 0.01$), GO 富集结果表明栀子苷与 AD 的交集靶点主要富集在信号传导、细胞迁移的正向调节等生物过程及蛋白激酶活性、酶结合和 ATP 结合等分析功能, 结果见图 2。

2.3 栀子苷-AD 靶点-通路网络构建

将栀子苷抗 AD 的核心靶点和前 20 条 KEGG 富集的通路导入 Cytoscape 3.7.2 软件, 构建“栀子苷-AD 靶点-通路”网络。该网络共有 109 个靶点节点, 20 个通路节点, 454 条边, 平均节点数为 22.052, 特征路径长度为 1.852。体现栀子苷多靶点多通路的药理特征。在栀子苷抗 AD 的靶点中, JNK1 度值较高, 且 KEGG 结果提示栀子苷可能通过 MAPK 等一系列信号通路发挥药物调节作用, 结果见图 3。

2.4 分子对接模拟验证

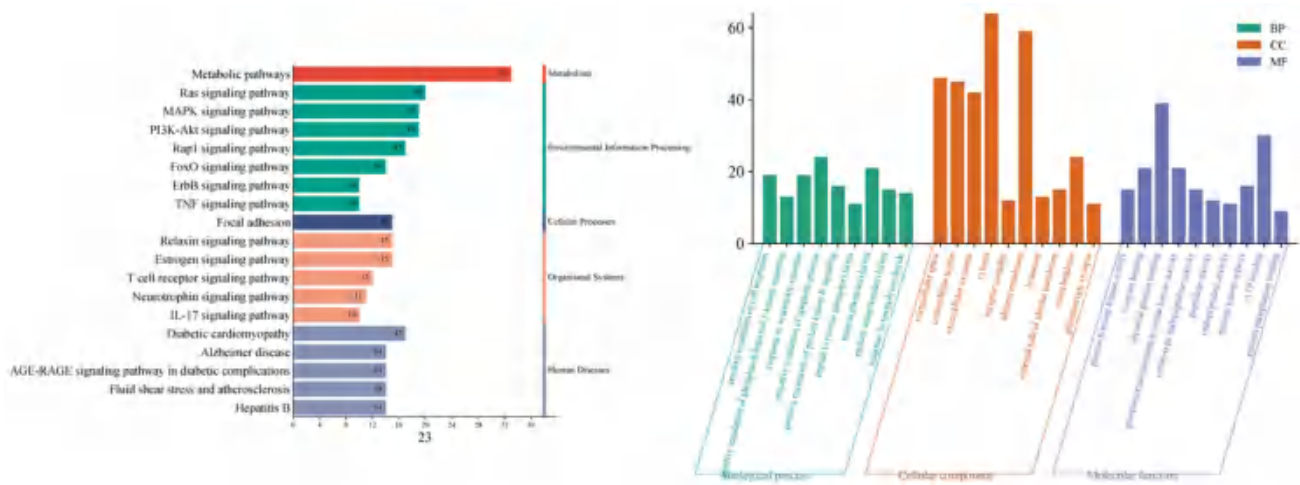


图2 栀子苷抗AD作用靶点的KEGG富集分析和GO富集分析
Fig 2 KEGG enrichment analysis and GO enrichment analysis of anti-AD targets of geniposide

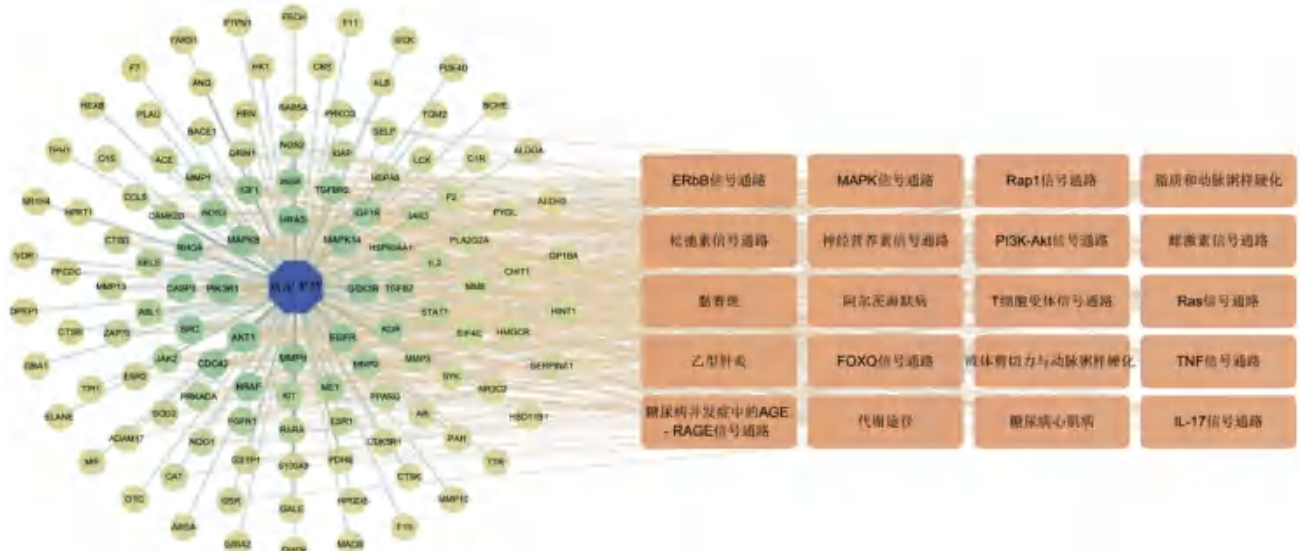


图3 “栀子苷-AD靶点-通路”网络
Fig 3 Network of geniposide-AD target-pathway

利用 AutoDock Vina 1.5.7 软件对栀子苷以及 MAPK 8 (JNK 1) 进行分子对接, 并以结合能作为评价标准。在 PubChem 数据库及 PDB 数据库分别获取配体的 mol2 格式文件、受体的 pdb 格式文件。在 AutoDock-Tools-1.5.6 软件中对受体和配体进行去水、加氢、分配电荷、设置可旋转键等处理, 其次通过 AutoDock Vina 1.5.7 进行分子对接, 最后选取部分对接结果在 Pymol 2.2.0 软件中进行可视化分析。通常认为, 化合物与靶蛋白结合能低于 $0 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 证明化合物与各靶蛋白具有自发结合能力, 化合物与靶蛋白结合能 $< -5.0 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 证明化合物与靶蛋白有较好的结合能力。栀子苷与 JNK1 的结合能为 $-6.5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 在该靶蛋白的 THR-255 及 GLY-199 残基处形成 2 个氢键, 见图 4。

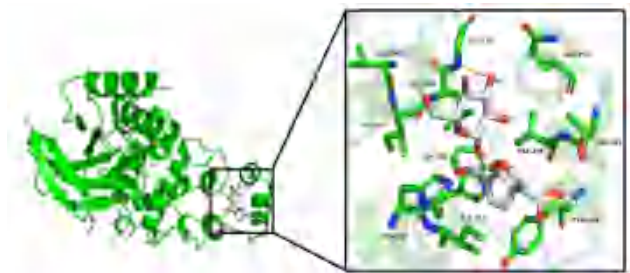


图4 栀子苷与 JNK1 分子对接模式
Fig 4 Docking mode of geniposide and related targets JNK1

2.5 细胞培养

将 PC12 细胞置于 DMEM 完全培养液 (含 10% 胎牛血清和 1% 双抗) 中, 于 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中培养。待细胞长至铺满瓶底 70% ~ 80%, 进行传代。选取对数生长期的细胞进行后续实验。

2.6 MTT 法筛选栀子苷的有效浓度

将 PC12 细胞以 2000 个 / 每孔接种于 96 孔板中, 空白组替换新鲜培养液, 继续培养 24 h。模型组替换培养液 2 h 后加 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $A\beta_{25-35}$ ^[4], 继续培养 22 h。栀子苷组分别加入 1.0、0.1、0.01、 1.0×10^{-3} 、 1.0×10^{-4} 、 1.0×10^{-5} 、 1.0×10^{-6} 、 $1.0 \times 10^{-7} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的栀子苷, 并于 2 h 后加 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $A\beta_{25-35}$, 继续培养 22 h。各孔加 $20 \mu\text{L}$ MTT ($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 溶液, 在 37°C 孵育 4 h, 弃上清液, 加 $150 \mu\text{L}$ 的 DMSO, 于 37°C 摇床上孵

育 30 min 并在 570 nm 处测定各组细胞的吸光度。细胞存活率以空白组为 100% 计算。

栀子苷改善 $A\beta$ 诱导 PC12 细胞损伤有效浓度的筛选结果如表 2 所示, 各个浓度相对于模型组均有较好的改善作用, 在栀子苷浓度为 $1.0 \sim 1000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 栀子苷对 PC12 细胞的保护作用呈剂量依赖性, 在 $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度时, 细胞增殖率最高, 随后增加浓度增殖率下降。因此, 选择 $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的栀子苷进行后续的研究。

表 2 栀子苷对 $A\beta_{25-35}$ 损伤 PC12 细胞增殖率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Tab 2 Effect of geniposide on the proliferation rate of PC12 cells injured by $A\beta_{25-35}$ ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	浓度 / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	各组吸光度值 (OD)	细胞增殖率 / %
空白组 (Con)	—	0.6578 ± 0.0754	100.00
模型组 ($A\beta_{25-35}$)	20.0	$0.4367 \pm 0.0544^{**}$	$66.40 \pm 0.0082^{**}$
栀子苷组	1.0×10^{-4}	$0.4397 \pm 0.0714^{**}$	$66.86 \pm 0.0108^{**}$
	1.0×10^{-3}	$0.4837 \pm 0.0880^{***}$	$73.54 \pm 0.0134^{***}$
	1.0×10^{-2}	$0.5540 \pm 0.0852^{***}$	$84.22 \pm 0.1296^{***}$
	1.0×10^{-1}	$0.6290 \pm 0.0469^{***}$	$95.62 \pm 0.071^{***}$
	1.0	$0.6507 \pm 0.0485^{***}$	$98.94 \pm 0.074^{***}$
	10.0	$0.5672 \pm 0.0713^{***}$	$86.24 \pm 0.0108^{***}$
	100.0	$0.5415 \pm 0.0045^{***}$	$82.32 \pm 0.0686^{***}$
	1000.0	$0.5040 \pm 0.0040^{***}$	$76.62 \pm 0.0620^{***}$

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

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

2.7 实验分组

将处于对数生长期的细胞随机分为空白组 (Con)、模型组 (Model)、雌二醇组 (Est)、栀子苷组 (Gen)。空白组、模型组加入 DMEM 培养液; 栀子苷组加入 $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的栀子苷溶液; 雌二醇组加入 $1.0 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的雌二醇溶液, 培养 2 h 后, 给予 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $A\beta_{25-35}$, 继续培养 22 h, 收集各组细胞上清液进行后续实验。

2.8 ELISA 法测定栀子苷对 $A\beta$ 诱导 PC12 细胞损伤炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的影响

采用酶联免疫法测定栀子苷对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 PC12 细胞的炎症因子的影响。收集 PC12 细胞上清液, 严格按照试剂盒说明书操作, 分别测定 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的含量。结果显示, $A\beta_{25-35}$ 可显著增加 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的释放, 栀子苷可显著抑制 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的释放, 结果见图 5。

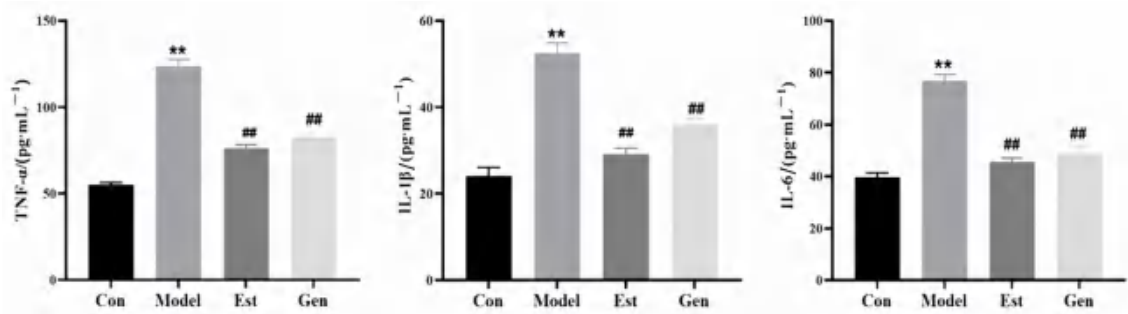


图 5 栀子苷对 $A\beta_{25-35}$ 损伤 PC12 细胞 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig 5 Effect of geniposide on TNF- α , IL-1 β and IL-6 in PC12 cells injured by $A\beta_{25-35}$ ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

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

Note: Compared with the Con group, $^{**}P < 0.01$; compared with the Model group, $^{***}P < 0.01$.

2.9 Western blot 法检测栀子苷对 $A\beta_{25-35}$ 损伤 PC12 细胞 ER β 和 p-JNK1/JNK1 的影响

参照 BCA 试剂盒说明书, 提取各组细胞的总蛋白并测定其浓度。通过 SDS-PAGE 凝胶电泳法分

离各组蛋白,并将其转置 PVDF 膜上,脱脂奶粉封闭 2 h,一抗 4℃ 孵育过夜,二抗 (1:5000) 孵育 2 h 后 ECL 成像。Image J 1.8.0 图像处理软件对条带进行灰度分析。结果显示,与空白组相比,模型组 ER β 表达明显降低 ($P < 0.01$), p-JNK1/JNK1 表达明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 栀子苷组 ER β 表达明显升高 ($P < 0.01$), p-JNK1/JNK1 表达明显降低 ($P < 0.01$)。结果见图 6。

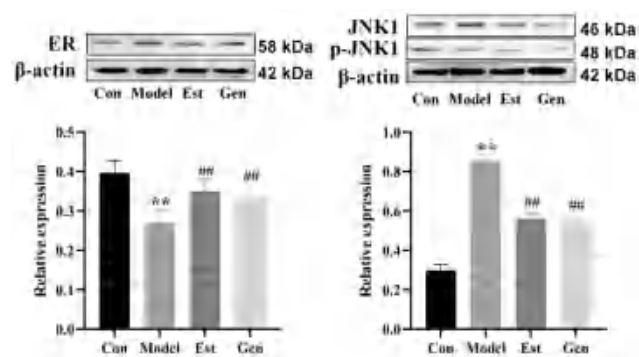


图 6 栀子苷对 A β_{25-35} 损伤 PC12 细胞 ER β 、p-JNK1/JNK1 表达的影响

Fig 6 Effect of geniposide on the expression of ER β and p-JNK1/JNK1 in PC12 cells injured by A β_{25-35}

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

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

3 讨论

AD 是一种中枢神经系统疾病,其特征是大脑颞叶皮层和海马区神经元丢失,并伴有老年斑和神经原纤维缠结等神经病理损伤^[5]。雌激素(即作为一般群体,包括雌酮、雌二醇和雌三醇)属于神经活性类固醇激素,与记忆和认知有关^[6]。雌激素通过降低 A β 毒性^[7]、减少 tau 蛋白过度磷酸化,发挥神经保护作用。植物来源的雌激素化合物和人体内 17 β -雌二醇具有显著的结构相似性^[8]。ER α 、ER β 和雌激素存在于大脑中的海马、下丘脑、杏仁核、丘脑、小脑和皮质的丘脑连接系统区域。故植物雌激素可与雌激素受体(ER)相互作用并介导雌激素反应^[9]。植物雌激素可与神经元细胞内的 ER 结合为转录调节因子,进而调控神经元内的神经递质、酶、结构蛋白等的基因转录,并通过 MAPK/JNK 等多条信号途径快速发挥非基因调节效应,进而调节神经元的结构和功能^[10-11]。

栀子苷作为中药杜仲、栀子中的重要药效成分之一,具有广泛的临床应用价值,在脑部疾病特别是神经退行性疾病中具有较好的神经保护作用^[12]。研究证明,栀子苷可以通过抑制 mTOR 信号通路,提高 APP/PS1 小鼠的学习记忆能力,减

少 APP/PS1 小鼠皮质和海马中 A β 沉积。栀子苷通过调节 IDE 表达,进而拮抗 A β 诱导的神经毒性^[13]。但栀子苷抗 AD 的机制尚未被完全揭示。

本研究通过 GEO 等公开数据库筛选栀子苷抗 AD 的靶点,并构建 PPI 网络以获得 MAPK 等核心靶点。通过 GO 功能和 KEGG 通路富集分析探讨栀子苷抗 AD 的作用机制。KEGG 结果涉及 MAPK、雌激素等相关信号通路,推测 JNK1 等多个靶点共同参与 AD 相关信号通路。分子对接结果也表明 JNK1 与栀子苷具有较高的亲和力。此外,GO 功能分析结果表明,栀子苷抗 AD 涉及炎症反应等生物学调控过程。提示栀子苷可能在炎症等病理环节中发挥重要作用。本研究通过体外实验证明,栀子苷可显著提高 A β 损伤的 PC12 细胞 ER β 的表达,阻碍 JNK 的激活,抑制 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达。提示栀子苷改善 A β 诱导的 PC12 细胞炎症性损伤与调控 MAPK/JNK 信号通路相关。

MAPK 信号传导途径是真核细胞中最重要的调节机制之一^[14]。c-Jun 末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)属于丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族,在 JNK 介导的磷酸化后易位到细胞核,参与多种生理功能的调节,并充当大脑凋亡,肥胖和记忆存储的介质,包括神经元受损和再生的过程^[15-16]。研究表明,JNK 抑制剂肽(D-JNKI-1)可显著降低 tau 蛋白在 S202/T205 位点的过度磷酸化,进而证实其在治疗 AD 中的关键作用^[17]。MAPK/JNK 通路细胞增殖、炎症、凋亡等信号通路相关^[18]。MAPK 是炎症反应中促炎症因子的关键调节因子,在启动和维持炎症反应中发挥重要作用。持续的神经炎症反应被认为是 AD 的第三大病理特征,并与 tau 蛋白的病理改变存在紧密联系^[19]。神经炎症过程中促炎细胞因子大量产生,如白细胞介素(IL-1 β 、IL-6、IL-18)、肿瘤坏死因子(TNF)等。A β 激活的细胞可产生神经毒性细胞因子和趋化因子,包括 TNF、IL-6 和 IL-1,随后导致神经功能障碍和死亡^[20-21]。本研究中,通过 ELISA 实验证明栀子苷可改善 A β_{25-35} 对 PC12 细胞的炎症性损伤,显著抑制 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的释放。进而推测,栀子苷可能通过抑制 JNK 信号通路的激活,发挥对 A β_{25-35} 损伤 PC12 细胞的保护作用。

综上所述,栀子苷可能通过抑制 MAPK/JNK 信号通路的激活,进而改善 A β_{25-35} 诱导的 PC12 细胞的炎症性损伤,以发挥对 A β_{25-35} 损伤 PC12 细胞的保护作用,为临床 AD 的治疗提供理论依据。

参考文献

- [1] Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, et al. Alzheimer's disease [J]. *Lancet*, 2021, 397 (10284): 1577-1590.
- [2] Weller J, Budson A. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment [J]. *F1000Res*, 2018, doi: 10.12688/f1000research.14506.1.
- [3] 刘彦宏, 武凤, 于修芳, 等. 杜仲提取物通过 HPG 轴对 APP/PS1 小鼠学习认知功能的影响 [J]. *中药材*, 2022, 45 (8): 1964-1968.
- [4] Qu LC, Huang JJ, Fan MD, et al. Effects of stachyine on apoptosis in an A β 25-35-induced PC12 cell model of Alzheimer's disease [J]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2020, 40 (7): 1023-1028.
- [5] Hardy J. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis: an update and reappraisal [J]. *J Alzheimers Dis*, 2006, 9 (3 Suppl): 151-153.
- [6] Kiyama R, Wada-Kiyama Y. Estrogenic endocrine disruptors: molecular mechanisms of action [J]. *Environ Int*, 2015, 83: 11-40.
- [7] Yagyu K, Kitagawa K, Wu B, et al. Protective effects of estradiol against amyloid beta protein-induced inhibition of neuronal Cl⁻-ATPase activity [J]. *Neuropharmacology*, 2002, 43 (8): 1297-1304.
- [8] Zaw JJT, Howe PRC, Wong RHX. Does phytoestrogen supplementation improve cognition in humans? A systematic review [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2017, 1403 (1): 150-153.
- [9] Canivenc-Lavier MC, Bennetau-Pelissero C. Phytoestrogens and health effects [J]. *Nutrients*, 2023, 15 (2): 317.
- [10] Anita Domańska, Orzechowski A, Litwiniuk A, et al. The beneficial role of natural endocrine disruptors: phytoestrogens in Alzheimer's disease [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 3961445.
- [11] Hussain A, Tabrez ES, Muhammad A, et al. The mechanisms of dietary phytoestrogen as a potential treatment and prevention agent against Alzheimer's disease [J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2018, 28 (4): 321-327.
- [12] He PK, Wang H, Cheng SB, et al. Geniposide ameliorates atherosclerosis by regulating macrophage polarization via perivascular adipocyte-derived CXCL14 [J]. *Ethnopharmacol*, 2023, 314: 116532.
- [13] Ma ZG, Dai J, Zhang WB, et al. Protection against cardiac hypertrophy by geniposide involves the GLP-1 receptor/AMPK α signalling pathway [J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173 (9): 1502-1516.
- [14] Yeung YT, Aziz F, Guerrero-Castilla A, et al. Signaling pathways in inflammation and anti-inflammatory therapies [J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24 (14): 1449-1484.
- [15] de Los Reyes Corrales T, Losada-Pérez M, Casas-Tintó S. JNK pathway in CNS pathologies [J]. *Int J Mol*, 2021, 22 (8): 3883.
- [16] Yarla R, Vela S, Solas M, et al. c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling as a therapeutic target for Alzheimer's disease [J]. *Front Pharmacol*, 2016, 6: 321.
- [17] Ploia C, Antoniou X, Scip A, et al. JNK plays a key role in tau hyperphosphorylation in Alzheimer's disease models [J]. *J Alzheimers Dis*, 2011, 26 (2): 315-329.
- [18] Yang S, Li FY, Lu SY, et al. Ginseng root extract attenuates inflammation by inhibiting the MAPK/NF- κ B signaling pathway and activating autophagy and p62-Nrf2-Keap1 signaling in vitro and in vivo [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 283: 114739.
- [19] Chen YJ, Yu Y. Tau and neuroinflammation in Alzheimer's disease: interplay mechanisms and clinical translation [J]. *J Neuroinflammation*, 2023, 20 (1): 165.
- [20] Chiu YJ, Hsieh YH, Lin TH, et al. Novel compound VB-037 inhibits A β aggregation and promotes neurite outgrowth through enhancement of HSP27 and reduction of P38 and JNK-mediated inflammation in cell models for Alzheimer's disease [J]. *Neurochem Int*, 2019, 125: 175-186.
- [21] Bairamian D, Sha S, Rolhion N, et al. Microbiota in neuroinflammation and synaptic dysfunction: a focus on Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurodegener*, 2022, 17 (1): 1-23.

(收稿日期: 2024-09-14; 修回日期: 2024-12-23)

在体单向肠灌注法探讨黄芪桂枝五物汤中主要活性成分的肠吸收特性

姚爱娜, 张慧中, 徐晓涵, 王雯琪, 张可, 王欣竹, 杨静雯, 李文静, 董晓旭*, 倪健* (北京中医药大学 中药学院, 北京 102488)

摘要: **目的** 研究黄芪桂枝五物汤中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、肉桂酸和芍药苷在不同灌注浓度和不同肠段的吸收特性。**方法** 采用在体单向肠灌注法结合 HPLC 进行含量测定, 考察不同灌注浓度和不同肠段对黄芪桂枝五物汤中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、肉桂酸、芍药苷的吸收速率常数 (K_a) 及表观渗透系数 (P_{app}) 的影响。**结果** 毛蕊异黄酮葡萄糖苷在十二指肠、空肠、低中浓度灌注时的回肠段和低浓度灌注时的结肠段易于吸收, 其他肠段吸收良好; 肉桂酸在四个肠段均易于吸收; 芍药苷在低中浓度灌注时的十二指肠段易于吸收, 在高浓度灌注时的十二指肠段和低浓度灌注时的空肠段吸收良好, 在其他肠段均难以吸收。三种成分的吸收参数受灌注浓度的影响。**结论** 黄芪桂枝五物汤中毛蕊异黄酮葡萄糖苷在四个肠段均有吸收, 肉桂酸在四个肠段均易于吸收, 芍药苷仅在十二指肠段和低浓度灌注时的空肠段有吸收。三种成分的吸收存在自身浓度限制, 吸收机制可能以主动吸收或促进扩散为主。本研究可为进一步探讨黄芪桂枝五物汤的主要药效基础提供科学依据。

关键词: 在体单向肠灌注; 黄芪桂枝五物汤; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 肉桂酸; 芍药苷

中图分类号: R943, R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)04-1004-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.020

Intestinal absorption characteristics of Huangqi Guizhi Wuwu decoction by in situ single-pass intestinal perfusion

YAO Ai-na, ZHANG Hui-zhong, XU Xiao-han, WANG Wen-qi, ZHANG Ke, WANG Xin-zhu, YANG Jing-wen, LI Wen-jing, DONG Xiao-xu*, NI Jian* (School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488)

Abstract: Objective To determine the absorption characteristics of calycosin-7-glucoside, cinnamic acid and paeoniflorin in Huangqi Guizhi Wuwu decoction under different perfusion concentrations and different intestinal segments. **Methods** The contents of calycosin-7-glucoside, cinnamic acid and paeoniflorin in Huangqi Guizhi Wuwu decoction were determined by in situ single-pass intestinal perfusion combined with high performance liquid chromatography. The effects of different perfusion concentrations and intestinal segments on the absorption rate constant (K_a) and apparent permeability coefficient (P_{app}) of calycosin-7-glucoside, cinnamic acid and paeoniflorin were determined. **Results** Calycosin-7-glucoside was easily absorbed in the duodenum, jejunum, ileum during perfusion at low and medium concentrations, and in the colon during perfusion at low concentration, and was absorbed in the other intestinal segments. Cinnamic acid was easily absorbed in all four intestinal segments. Paeoniflorin was easily absorbed in the duodenum during perfusion at low and medium concentrations, and was absorbed in the duodenum during perfusion at high concentration, and in the jejunum at low concentration, but was difficult to be absorbed in other intestinal segments. The

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项 (No.2022-JYB-XJSJJ-015)。

作者简介: 姚爱娜, 女, 硕士研究生, 主要从事中药新剂型与新技术研究, email: yaoainaaa@163.com *通信作者: 倪健, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药新剂型与新技术研究, email: njtcm@263.net; 董晓旭, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药新剂型与新技术研究, email: dxiaoxv@163.com

absorption parameters of the three components is influenced by perfusion concentration. **Conclusion** In Huangqi Guizhi Wuwu decoction, calycosin-7-glucoside is absorbed in all four intestinal segments, cinnamic acid is easily absorbed in all four intestinal segments, while paeoniflorin is only absorbed in the duodenum and jejunum with low concentration perfusion. The absorption of the three components has its own concentration limitation, whose mechanism may be mainly active absorption or promoting diffusion. This study provides a scientific for further exploring the main pharmacodynamic basis of Huangqi Guizhi Wuwu decoction.

Key words: in situ single-pass intestinal perfusion; Huangqi Guizhi Wuwu decoction; calycosin-7-glucoside; cinnamic acid; paeoniflorin

黄芪桂枝五物汤最早记载于《金匮要略》，由黄芪、桂枝、白芍、生姜和大枣组成，是治疗血痹的要药。现代临床中多认为血痹与血管神经病变、大动脉炎、血管炎、多发性神经炎、末梢神经炎等疾病有关^[1]。方中黄芪为君药，桂枝、芍药为臣药，黄芪固表补中，桂枝温经通痹，白芍是血痹四药之一，可养阴益血除血痹^[2]，黄芪和桂枝合用可益气温阳、和血通痹，芍药和桂枝合用可增强养血通痹之效^[3]。有效成分被肠道吸收入血是其产生药效的关键，现代研究表明，黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芍药中芍药苷具有神经保护和促进血管新生等作用^[4-6]，桂枝中肉桂酸具有抗炎性反应、抗凝血、扩张血管的作用^[7]，且三种成分均可在大鼠的含药血清中检测到^[8]，推测三者可能是其治疗血痹的物质基础。因此，考察药物口服后的吸收部位及吸收特性具有十分重要的意义，但目前关于黄芪桂枝五物汤的肠道吸收特性尚未见报道。

肠吸收的主要研究方法有离体法、在体法和体内法，其中在体单向肠灌流法更能真实反映药物在肠道中的吸收情况^[9]。本实验借助大鼠在体单向肠灌流法对黄芪桂枝五物汤中活性成分毛蕊异黄酮葡萄糖苷、肉桂酸和芍药苷在大鼠肠道的吸收情况进行考察，有助于我们了解黄芪桂枝五物汤在肠道的吸收特性，为其进一步开发和临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 试药

黄芪桂枝五物汤冻干粉(自制，批号：1320240618)；对照品毛蕊异黄酮葡萄糖苷(纯度 $\geq 98\%$ ，批号：JB238425)、芍药苷(纯度 $\geq 98\%$ ，批号：O20IB229347)、肉桂酸(纯度 $\geq 98\%$ ，批号：Y11M10C88100)及 Krebs-Ringer 粉剂(无碳酸氢钠)(批号：JR239394，上海源叶生物科技有限

公司)；碳酸氢钠(纯度 $\geq 99.5\%$ ，天津光复科技发展有限公司，批号：20231220)；磷酸(分析纯，天津市大茂化学试剂厂，批号：20210105)；乙腈(色谱级，美国 Thermo Fisher Scientific 公司)；娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

1.2 仪器

岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津)；BT100-1F 蠕动泵(保定兰格恒流泵有限公司)；TGL16M 台式高速冷冻离心机(湖南迈达仪器有限公司)；超声波清洁剂(昆山市超声仪器有限公司)；电热恒温水浴锅(北京长安科学仪器厂)；BT125D 电子天平(精度：0.01 mg，赛多利斯科学仪器有限公司)；JY500 电子天平(精度：0.01 g，上海衡平仪器仪表厂)。

1.3 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠，体重(200 $\pm$ 20) g(北京斯贝福生物技术有限公司，伦理批准编号：BUCM-2023091402-3243)。大鼠饲养于室温(25 $\pm$ 2)℃，相对湿度(55 $\pm$ 5)%环境中，整个研究在北京中医药大学伦理委员会的许可和监督下进行。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

2.1.1 Krebs-Ringer 溶液(简称 K-R 试液)的制备 精密称量碳酸氢钠 1.37 g，与 Krebs-Ringer 粉剂(无碳酸氢钠)混合，加水定容至 1 L，混匀即得。

2.1.2 黄芪桂枝五物汤肠灌流液的制备 分别精密取黄芪桂枝五物汤冻干粉 1.8、3.6、7.2 g，用 K-R 试液超声溶解，定容至 250 mL，即得低、中、高浓度黄芪桂枝五物汤灌流液。

2.1.3 空白肠灌流液的配制 用 37℃ 生理盐水将肠内容物冲洗干净后，用不含药物的 K-R 试液迅速充盈肠段，以 0.25 mL $\cdot$ min⁻¹ 的速度连续泵入肠段，在出口处收集流出液，作为空白肠灌流液。

2.1.4 对照品溶液的配制 精密称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷 10 mg、肉桂酸 5 mg、芍药苷 20 mg，分别置于 10 mL 量瓶中，用甲醇超声溶解，定容至 10 mL，分别得毛蕊异黄酮葡萄糖苷质量浓度 $1\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、肉桂酸质量浓度 $0.5\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、芍药苷质量浓度 $2\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.2 色谱条件

2.2.1 测定毛蕊异黄酮葡萄糖苷的色谱条件 色谱柱为 Agilent Eclipse Plus C_{18} (4.6 mm×250 mm, 5 μm)；流动相：乙腈 (A) -0.1% 磷酸 (B)，梯度洗脱 (0 ~ 30 min, 12%→15%A；30 ~ 35 min, 15%→40%A)；检测波长 260 nm；柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ ；流速 $1.0\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ；进样量 10 μL 。

2.2.2 测定肉桂酸和芍药苷的色谱条件 色谱柱为 Agilent Zorbax SB- C_{18} (4.6 mm×250 mm, 5 μm)；流动相：乙腈 (A) -0.1% 磷酸 (B)，梯度洗脱 (0 ~ 7 min, 10%→30%A；7 ~ 9 min, 30%A；9 ~ 16 min, 30%→15%A；16 ~ 30 min, 15%→43%A)；检测波长 232 nm、290 nm；柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ ；流速 $1.0\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ；进样量 10 μL 。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性考察 分别取空白肠灌流液、对照品+空白肠灌流液和样品肠灌流液进样检测。考察空白肠灌流液对毛蕊异黄酮葡萄糖苷、肉桂酸和芍药苷的测定是否有干扰。色谱图见图 1，结果表明各溶液色谱峰之间无干扰，专属性良好，满足测定要求。

2.3.2 线性关系考察 精密吸取毛蕊异黄酮葡萄糖苷、肉桂酸和芍药苷对照品母液，分别将其稀释为系列浓度混合对照品溶液，于 0.22 μm 滤膜过滤后，连续进样，以对照品的质量浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标 (x)，峰面积为纵坐标 (y) 进行线性回归，得到毛蕊异黄酮葡萄糖苷、肉桂酸和芍药苷的线性回归方程及相关系数，结果见表 1。由表 1 可知，毛蕊异黄酮葡萄糖苷在 $1.25 \sim 20\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，肉桂酸在 $0.5 \sim 15\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，芍药苷在 $125 \sim 1000\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与峰面积线性关系良好。

2.3.3 精密度试验 向空白肠灌流液中分别加入一定浓度的对照品溶液，分别配制成毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (2.5、5、10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)，肉桂酸 (2、5、10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和芍药苷 (250、500、750 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 低、中、高质量浓度的质控溶液。于一日内重复测定 6 次，并且每个质量浓度每日测定一次，连续测定 5 d，计算日内、日间精密度，结果见表 2。

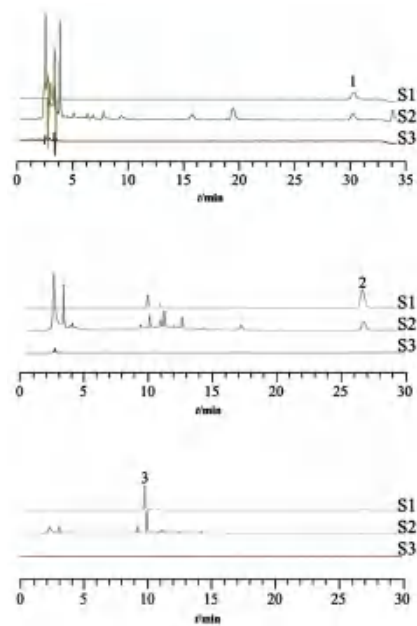


图 1 黄芪桂枝五物汤中三种活性成分的专属性图谱

Fig 1 Specificity chromatogram of 3 active ingredients in Huangqi Guizhi Wuwu decoction

S1. 对照品+空白肠灌流液 (control product + blank intestinal perfusion solution)；S2. 样品肠灌流液 (sample intestinal perfusion solution)；S3. 空白肠灌流液 (blank intestinal perfusion solution)；1. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (calycosin-7-glucoside)；2. 肉桂酸 (cinnamic acid)；3. 芍药苷 (paeoniflorin)

表 1 线性关系考察结果

Tab 1 Linearity

化合物	回归方程	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	R^2
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	$y = 7.141 \times 10^3 x + 253.83$	1.25 ~ 20	0.9993
肉桂酸	$y = 5.801 \times 10^4 x + 3.320 \times 10^3$	0.5 ~ 15	0.9998
芍药苷	$y = 1.160 \times 10^4 x + 2.630 \times 10^5$	125 ~ 1000	1.0000

2.3.4 稳定性试验 用空白肠灌流液配制低、中、高浓度黄芪桂枝五物汤冻干粉灌流液，分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 取样，0.22 μm 滤膜过滤后进样测定，以成分峰面积计算 RSD，结果见表 2。

2.3.5 重复性试验 平行配制低、中、高浓度供试品肠灌流液各 6 份，0.22 μm 滤膜过滤后进样检测，以成分含量计算 RSD，结果见表 2。

2.3.6 回收试验 配制低、中、高浓度供试品肠灌流液各 3 份，精密加入毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芍药苷和肉桂酸对照品质量，0.22 μm 滤膜过滤后进样检测，计算加样回收率及 RSD，结果见表 2。

方法学考察结果表明，该方法仪器精密度、样品 24 h 稳定性、重复性、回收率考察等均符合要求。

表 2 方法学考察结果

Tab 2 Methodology

灌流液浓度	成分	日内精密度 RSD/%	日间精密度 RSD/%	24 h 稳定性 RSD/%	重复性 RSD/%	平均加样回收率 /%	准确度 RSD/%
低浓度	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	2.7	1.5	2.2	1.2	100.29	2.3
	肉桂酸	1.1	0.5	2.1	0.84	99.98	2.5
	芍药苷	0.16	0.040	1.2	0.36	99.39	0.58
中浓度	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	2.8	1.2	2.7	2.0	99.82	0.30
	肉桂酸	0.32	0.46	2.8	0.22	99.63	0.78
	芍药苷	0.14	0.30	1.6	0.18	98.58	1.2
高浓度	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	1.4	1.1	2.8	2.0	100.88	0.25
	肉桂酸	0.14	0.41	0.74	1.8	100.20	0.62
	芍药苷	1.6	0.42	0.85	1.5	99.90	0.71

2.3.7 药物在蠕动泵管路中的物理吸附情况 取黄芪桂枝五物汤灌流液, 分别于 0、1 和 2 h 后取样, 样品处理后进样测定分析, 以成分峰面积计算 RSD。结果显示, 各成分峰面积 RSD 值均小于 3%, 表明管路对药物无明显吸附情况。

2.4 肠吸附实验

大鼠禁食不禁水 12 h, 麻醉后固定在手术台并维持体温, 沿腹中线打开腹腔, 分别在所需肠段(肠段区间: 幽门向下 1 cm 开始取 10 cm 为十二指肠肠段, 幽门向下 15 cm 开始取 10 cm 为空肠肠段, 盲肠上端向上开始取 10 cm 为回肠肠段, 距盲肠后端开始为盲肠段)两端切口。先用预热至 37℃ 的生理盐水将肠道内容物冲洗干净, 泵入空气冲出生理盐水后插管, 结扎固定。伤口处用浸有生理盐水的纱布覆盖保湿, 用预热至 37℃ 的供试品肠灌流液以大流速充满肠道后, 将流速降为 0.25 mL · min⁻¹, 灌流平衡 30 min 后开始计时, 每隔 15 min 迅速更换西林瓶。计算泵入供试液的重量和每 15 min 内收集到的灌流液的重量。4℃、12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 进样测定。

实验结束后处死大鼠, 剪下所研究的肠段, 分别测量其长度和周长, 由 3 次周长测量值求得平均半径。

2.5 数据分析

本实验采用重量法对供试液流入和流出的体积进行校正, 并计算药物吸收速率常数 (K_a) 和有效渗透系数 (P_{app})。根据公式 (1)、(2) 计算肠吸收参数, 即吸收速率常数 K_a (min⁻¹) 和有效渗透系数 P_{app} (cm · min⁻¹):

$$K_a = (1 - C_{out}/C_{in} \cdot V_{out}/V_{in}) \cdot Q/\pi r^2 L \quad (1)$$

$$P_{app} = -Q/2\pi r L \cdot \ln(C_{out}/C_{in} \cdot V_{out}/V_{in}) \quad (2)$$

式中 C_{in} 和 C_{out} 分别为进出口灌流液的浓度 (μg · mL⁻¹); V_{in} 和 V_{out} 分别为灌入和收集的供试液的体积 (使用重量法进行校正, 假设进出口的溶

液的密度相同); Q 为灌流速度 (0.25 mL · min⁻¹); r 和 L 分别为灌流肠段的半径 (cm) 和长度 (cm)。

毛蕊异黄酮葡萄糖苷、肉桂酸和芍药苷在各个灌流浓度下大鼠各个肠段的 K_a 和 P_{app} 见表 3。采用 SPSS 软件进行数据分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用多因素方差分析 (One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

K_a 代表成分从吸收部位进入体循环的速度; P_{app} 代表成分透过生物膜的渗透能力。 $P_{app} < 1.8 \times 10^{-4}$ cm · min⁻¹ 和 $P_{app} > 1.20 \times 10^{-3}$ cm · min⁻¹ 时分别表示药物难以吸收和易于吸收, 介于两者之间则为吸收能力中等^[10]。由表 3 可知, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷十二指肠段、空肠段和低中浓度灌流时的回肠段、低浓度灌流时的结肠段 $P_{app} > 1.20 \times 10^{-3}$ cm · min⁻¹, 易于吸收; 其他肠段在 1.2×10^{-3} cm · min⁻¹ 和 1.8×10^{-4} cm · min⁻¹ 之间, 吸收良好; 根据毛蕊异黄酮葡萄糖苷的吸收参数判断吸收能力由强到弱依次为: 十二指肠、空肠、回肠、结肠。肉桂酸在四个肠段的 $P_{app} > 1.2 \times 10^{-3}$ cm · min⁻¹, 均易于吸收, 比较肉桂酸在四个肠段的吸收参数, 可知吸收能力由强到弱依次为: 十二指肠、空肠、回肠、结肠。芍药苷在低浓度和中浓度灌流时的十二指肠段 $P_{app} > 1.2 \times 10^{-3}$ cm · min⁻¹, 在高浓度灌流时的十二指肠段和低浓度灌流时的空肠段 P_{app} 介于 1.2×10^{-3} cm · min⁻¹ 和 1.8×10^{-4} cm · min⁻¹; 在中、高浓度灌流时的空肠段及其他肠段 $P_{app} < 1.8 \times 10^{-4}$ cm · min⁻¹, 说明芍药苷在低、中浓度灌流时的十二指肠段易于吸收, 在高浓度灌流时的十二指肠段和低浓度灌流时的空肠段吸收良好, 芍药苷在中、高浓度灌流时的空肠和其他肠段均难以吸收, 由芍药苷的吸收参数可知其吸收能力由强到弱依次为: 十二指肠、空肠、回肠和结肠。

由图 2 可知, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷和肉桂酸在四个肠段的吸收参数随着灌流浓度的增加而降低, 说明两种成分在四个肠段的吸收有自身浓度限制,

表 3 不同浓度黄芪桂枝五物汤在大鼠不同肠段中的吸收参数 (n = 6, $\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Absorption parameters of different concentrations of Huangqi Guizhi Wuwu decoction in different intestinal segments of rats (n = 6, $\bar{x} \pm s$)

成分	灌流液浓度 / (mg·mL ⁻¹)	参数	十二指肠	空肠	回肠	结肠
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	0.0072	$K_a/\times 10^{-3}(\text{min}^{-1})$	46.89±9.47	26.21±8.85	26.71±10.36	17.98±7.13
		$P_{app}/\times 10^{-4}(\text{cm} \cdot \text{min}^{-1})$	58.31±9.38	32.09±12.22	33.52±14.69	30.06±13.76
	0.0144	$K_a/\times 10^{-3}(\text{min}^{-1})$	33.72±5.58	11.48±4.15	15.99±4.55	5.01±4.54
		$P_{app}/\times 10^{-4}(\text{cm} \cdot \text{min}^{-1})$	41.17±6.14	13.94±5.23	18.85±5.36	7.58±6.98
	0.0288	$K_a/\times 10^{-3}(\text{min}^{-1})$	19.58±3.39	11.29±4.54	4.65±2.14	3.41±1.38
		$P_{app}/\times 10^{-4}(\text{cm} \cdot \text{min}^{-1})$	23.13±4.07	13.43±5.48	5.37±2.18	5.57±2.35
肉桂酸	0.0072	$K_a/\times 10^{-3}(\text{min}^{-1})$	102.61±26.72	83.76±16.30	80.50±18.35	25.95±5.46
		$P_{app}/\times 10^{-4}(\text{cm} \cdot \text{min}^{-1})$	164.71±45.49	130.74±27.28	133.67±42.08	43.41±7.20
	0.0144	$K_a/\times 10^{-3}(\text{min}^{-1})$	83.7±9.33	48.85±7.10	52.34±12.95	20.71±1.81
		$P_{app}/\times 10^{-4}(\text{cm} \cdot \text{min}^{-1})$	125.2±10.89	69.64±13.63	71.52±19.32	33.44±5.17
	0.0288	$K_a/\times 10^{-3}(\text{min}^{-1})$	81.38±5.47	51.09±9.22	40.91±3.38	20.44±4.21
		$P_{app}/\times 10^{-4}(\text{cm} \cdot \text{min}^{-1})$	129.08±18.62	73.69±15.59	56.04±4.22	37.83±8.48
芍药苷	0.0072	$K_a/\times 10^{-3}(\text{min}^{-1})$	21.88±4.42	9.1±0.91	0.58±0.07	0.43±0.05
		$P_{app}/\times 10^{-4}(\text{cm} \cdot \text{min}^{-1})$	24.67±6.28	10.23±1.28	0.64±0.08	0.62±0.03
	0.0144	$K_a/\times 10^{-3}(\text{min}^{-1})$	16.24±1.76	0.38±0.06	0.58±0.05	0.45±0.07
		$P_{app}/\times 10^{-4}(\text{cm} \cdot \text{min}^{-1})$	18.48±1.94	0.46±0.07	0.64±0.06	0.65±0.11
	0.0288	$K_a/\times 10^{-3}(\text{min}^{-1})$	6.41±2.07	0.58±0.07	0.58±0.05	0.4±0.06
		$P_{app}/\times 10^{-4}(\text{cm} \cdot \text{min}^{-1})$	7.26±2.42	0.66±0.08	0.66±0.04	0.63±0.10

药物有吸收饱和现象,可能存在主动转运或促进扩散;芍药苷在十二指肠段的吸收参数随着灌流浓度的升高而降低,在回肠段和结肠段吸收参数不随灌流浓度发生改变,说明芍药苷在十二指肠和空肠段的吸收有自身浓度限值,可能存在主动转运或促进扩散,而在回肠和结肠段难以吸收。

3 讨论

肠道是口服药物吸收的主要部位,在体肠灌流模型拥有完整的血液供应和神经支配,能更加真实地反映黄芪桂枝五物汤在肠道的吸收情况^[11]。在体肠灌流主要分为在体单向肠灌流和在体循环肠灌流。在体循环肠灌流时间长和流速高,会损伤大鼠肠黏膜,导致药物的吸收增加,影响结果的准确性^[12]。在体单向肠灌流操控性好^[13]、流速度更符合人体肠道的蠕动速度,对大鼠肠黏膜的损伤也更小,结果更接近实际人体肠道吸收情况^[14]。在体单向肠灌流过程中,灌流液体积的损失会直接影响药物的浓度,因此需要对灌流液体积进行校正^[15]。本研究选择重量法进行校正,与酚红法相比,重量法可以真实地反映肠道水分吸收情况,具有操作简单、工作量小、时间短、费用低等显著优势^[16],结果更加准确。

在体单向肠灌流实验结果表明,毛蕊异黄酮葡萄糖苷和芍药苷的最佳吸收肠段为十二指肠,与赵晓莉等^[17]和屈清慧等^[18]的研究结果一致,推测与十二指肠段小肠绒毛最为发达,增大了吸收面积有关^[19]。杨本坤等^[20]通过在体单向肠灌流

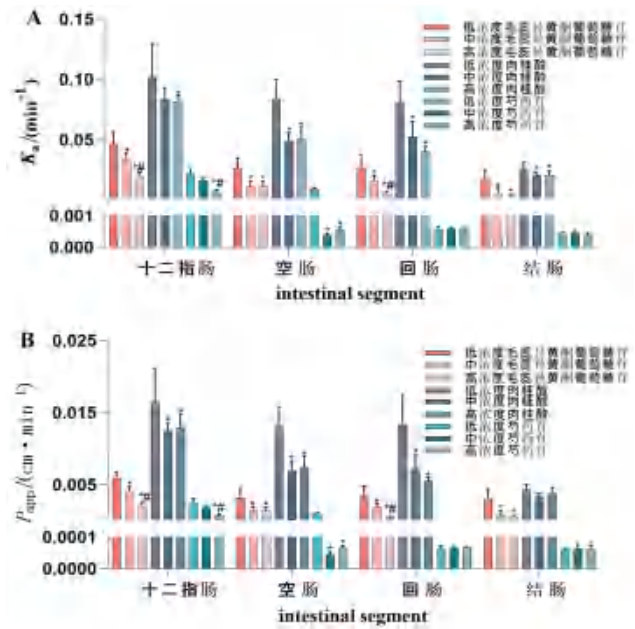


图 2 不同灌流浓度的黄芪桂枝五物汤对大鼠不同肠道吸收的影响
Fig 2 Effect of different perfusion concentrations of Huangqi Guizhi Wuwu decoction on different intestinal absorption in rats

注:与低浓度比较,*P<0.05;与中浓度比较,#P<0.05;与高浓度比较,+P<0.05。

Note: Compared with the low concentration, *P<0.05; compared with the medium concentration, #P<0.05.

实验证明肉桂酸单体属于易于吸收化合物,在复方中肉桂酸在各个肠段也均易于吸收,可能因为肉桂酸的亲水基团羧基,同时处方中化学成分的药代动力学相互作用,使得肉桂酸依旧易于吸收。

除了十二指肠和空肠低浓度灌流时可吸收芍药苷,其他肠段均难以吸收,可能是芍药苷有较好的水溶性,难以透过肠道表皮细胞,吸收过程有所限制,从而吸收少^[21]。由于不同肠段在酶活性、肠黏膜的厚度、转运在体的数量等方面存在差异^[22],导致三种成分在四个肠段的吸收情况有所不同。分子量大小也是影响肠道对成分吸收的重要因素^[23],毛蕊异黄酮葡萄糖苷分子量为 446.41,肉桂酸分子量为 148.16,芍药苷分子量为 480.46,肠道对三种成分的吸收能力与分子量成反比。同时三种成分在易于吸收或吸收良好的肠段, P_{app} 和 K_a 均受灌流浓度的影响,且存在自身浓度限值,不符合 Ficks 扩散原理,提示三种成分在吸收肠道的转运过程中存在自身吸收抑制,因此推测其可能吸收机制为主动吸收或促进扩散为主^[10]。

本研究通过在体单向肠灌流法研究了低、中、高浓度的黄芪桂枝五物汤中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、肉桂酸和芍药苷在大鼠不同肠段的在体肠吸收特性。许多因素都会影响到药物的吸收,用单一的方法很难预测药物体内的吸收过程,笔者后续将采用体外法进一步研究黄芪桂枝五物汤的吸收特性,以期对黄芪桂枝五物汤的进一步开发和临床应用提供科学依据。

参考文献

- [1] 封婷.《金匱要略》血痹病脉证并治研究[D].北京:北京中医药大学,2023.
- [2] 陈文康,邹和德,赵家有.《神农本草经》“血痹四药”及其在《伤寒杂病论》中的应用[J].世界中医药,2024,19(16):2455-2458,2463.
- [3] 左婕,徐瑞荣.徐瑞荣运用黄芪桂枝五物汤加减治疗多发性骨髓瘤周围神经病变经验[J].中医药导报,2023,29(8):180-182,197.
- [4] 吴丘玲,成彦琼,刘爱军,等.4个黄芪异黄酮类化合物对PC12细胞分化的影响[J].药学实践杂志,2020,38(3):232-236.
- [5] 杨竣然,徐子文,陈道,等.补阳还五汤有效组分抗缺血性脑卒中研究进展[J].陕西中医,2024,45(7):995-998.
- [6] 雷超芳,陈志刚,刘玥芸,等.芍药苷治疗神经系统疾病药理作用研究进展[J].中华中医药杂志,2023,38(4):1697-1701.
- [7] 郑小雪.基于营卫理论应用黄芪桂枝五物汤治疗气虚血瘀型下肢ASO临床疗效观察[D].济南:山东中医药大学,2023.
- [8] Guan J, Wang LM, Jin J, et al. Simultaneous determination of calycosin-7-O- β -D-glucoside, cinnamic acid, paeoniflorin and albiflorin in rat plasma by UHPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study of Huangqi Guizhi Wuwu decoction[J]. J Pharm Biomed Anal, 2019, 170: 1-7.
- [9] 张燕,朱华旭,郭立玮.在体单向肠灌流模型研究小檗碱及其在复方配伍环境中的大鼠肠吸收特性[J].药学报,2012,47(2):233-238.
- [10] 高惠静,王鑫,李玉玲,等.基于在体单向肠灌流模型探究去氢骆驼蓬碱衍生物HM-Y-A的肠吸收特性[J].中南药学,2023,21(3):607-611.
- [11] 张燕娜,王焱,刘梅.在体肠灌流模型在中药研究中的应用[J].现代中药研究与实践,2012,26(5):76-79.
- [12] 何帅,蔺明煊,姜亦南,等.中药成分肠吸收模型研究进展与思考[J].中医药学报,2018,46(3):121-124.
- [13] 朱容慧,赵军宁,毕岳琦,等.中药肠吸收动力学的研究进展[J].药物评价研究,2010,33(1):25-29.
- [14] Liu JY, Lee KF, Sze CW, et al. Intestinal absorption and bioavailability of traditional Chinese medicines: a review of recent experimental progress and implication for quality control[J]. J Pharm Pharmacol, 2013, 65(5): 621-33.
- [15] 汪凯康,贾文,丁文华,等.在体单向肠灌流模型测定甘草素的药物渗透性及生物药剂学分类预测[J].中南药学,2024,22(2):302-306.
- [16] 聂淑芳,潘卫三,杨星钢,等.对大鼠在体肠单向灌流技术中重量法的评价[J].中国新药杂志,2005,14(10):56-59.
- [17] 赵晓莉,潘鹏,周乐,等.毛蕊异黄酮葡萄糖苷大鼠在体肠吸收动力学的研究[J].南京中医药大学学报,2012,28(6):552-554.
- [18] 屈清慧,周莉,张继业.单向肠灌流法研究芍药苷和刺芒柄花苷的肠吸收特性[J].药物分析杂志,2021,41(1):64-71.
- [19] Pang KS. Modeling of intestinal drug absorption: roles of transporters and metabolic enzymes (for the Gillette Review Series)[J]. Drug Metab Dispos, 2003, 31(12): 1507-1519.
- [20] 杨本坤,王素军,曾洁,等.大鼠在体单向肠灌流模型研究肉桂酸肠道吸收特性[J].广东药学院学报,2013,29(1):69-72.
- [21] 蔡郁,梁文革,刘新颜.白芍提取物活性成分芍药苷大鼠在体肠吸收动力学的研究[J].中国医药导报,2011,8(16):39-42.
- [22] He X, Song ZJ, Jiang CP, et al. Absorption properties of luteolin and apigenin in genkwa flos using in situ single-pass intestinal perfusion system in the rat[J]. Am J Chin Med, 2017, 45(8): 1745-1759.
- [23] 彭紫薇,黄嘉怡,李花花,等.基于在体单向肠灌流法探究滑膜炎颗粒的肠吸收特性[J].药物评价研究,2024,47(10):2343-2350.

(收稿日期:2025-01-02;修回日期:2025-01-25)

注射用 HYR-PB21 在带状疱疹后神经痛患者体内的药代动力学研究

易利丹^{1,2}, 王亚平^{3,4}, 邹定全^{3,4}, 李欣^{3,4}, 燕强勇^{1,2}, 欧鹏^{3*} (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; 3. 中南大学湘雅二医院麻醉科, 长沙 410011; 4. 中南大学湘雅二医院疼痛科, 长沙 410011)

摘要: **目的** 研究注射用 HYR-PB21 (布比卡因缓释新剂型) 在带状疱疹后神经痛 (PHN) 患者体内的药代动力学。**方法** 12 例 PHN 患者采用注射用 HYR-PB21 200 mg 进行单侧椎旁神经阻滞麻醉给药, 在单侧椎旁单次注射后不同时间采集血液标本, 采用高效液相色谱-串联质谱法 (HPLC-MS/MS) 测定血浆中布比卡因的血药浓度, PK 参数计算由 Phoenix WinNonlin 8.3.4 完成, 其他方法学验证参数使用 SAS 9.4 软件分析。**结果** 注射用 HYR-PB21 的血浆药物峰浓度 $C_{\max}$ 均值为 $(271.92 \pm 121.19) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; 血药浓度-时间曲线下面积 $AUC_{0 \sim t}$ 均值为 $(10\,229.25 \pm 3379.93) \text{ h} \cdot \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $AUC_{0 \sim \infty}$ 均值为 $(11\,069.80 \pm 3387.02) \text{ h} \cdot \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; 消除半衰期 $t_{1/2}$ 均值为 $(25.41 \pm 7.02) \text{ h}$, 表观清除率 CL_z/F 均值为 $(19.62 \pm 5.87) \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ 。**结论** 注射用 HYR-PB21 在 PHN 患者体内呈现出缓释药代动力学特征, 且安全性良好。

关键词: 注射用 HYR-PB21; 带状疱疹后神经痛; 药代动力学

中图分类号: R969.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)04-1010-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.021

Pharmacokinetics of HYR-PB21 in patients with postherpetic neuralgia

YI Li-dan^{1,2}, WANG Ya-ping^{3,4}, ZOU Ding-quan^{3,4}, LI Xin^{3,4}, YAN Qiang-yong^{1,2}, OU Peng^{3*} (1. Department of Pharmacy, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011; 2. Institute of Clinical Pharmacy, Central South University, Changsha 410011; 3. Department of Anesthesiology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011; 4. Department of Pain Treatment, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011)

Abstract: Objective To determine the pharmacokinetics of HYR-PB21 (bupivacaine sustained-release new formulation) for injection in patients with postherpetic neuralgia (PHN). **Methods** Twelve patients with PHN were given 200 mg of HYR-PB21 for injection under unilateral paravertebral nerve block anesthesia. Blood samples were collected at different time sports after unilateral paravertebral injection. The plasma concentration of bupivacaine was determined by LC-MS/MS. Pharmacokinetic parameters were calculated by Phoenix WinNonlin 8.3.4, and others were analyzed with SAS 9.4 software. **Results** The mean plasma peak concentration $C_{\max}$ of HYR-PB21 for injection was $(271.92 \pm 121.19) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. The mean area of $AUC_{0 \sim t}$ under the blood concentration-time curve was $(10\,229.25 \pm 3379.93) \text{ h} \cdot \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, and the mean of $AUC_{0 \sim \infty}$ was $(11\,069.80 \pm 3387.02) \text{ h} \cdot \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. The mean elimination half-life $t_{1/2}$ was $(25.41 \pm 7.02) \text{ h}$, and the mean apparent clearance CL_z/F was $(19.62 \pm 5.87) \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$. The pharmacokinetic parameters varied among individual patients. **Conclusion** The pharmacokinetics of HYR-PB21 for injection in patients with PHN show similar sustained release pharmacokinetic characteristics and are safe.

Key words: HYR-PB21 for injection; postherpetic neuralgia; pharmacokinetics

基金项目: 湖南省自然科学基金 (No. 2019JJ80060)。

作者简介: 易利丹, 女, 主管药师, 主要从事药物经济学、药事管理、药剂学等方面的研究, email: 505237@csu.edu.cn *通信作者:

欧鹏, 男, 主治医师, 主要从事慢性疼痛管理、癌性疼痛管理、医学模拟教育方面的研究, email: oupeng@csu.edu.cn

带状疱疹(HZ)由水痘-带状疱疹病毒(VZV)引起。水痘-带状疱疹病毒属于人类单纯疱疹病毒 3(HSV-3),是八种可感染人类的疱疹病毒之一。带状疱疹后神经痛(PHN)为带状疱疹皮疹愈合后持续 1 个月及以上的神经理理性疼痛,可表现为持续性疼痛,也可缓解一段时间后再次出现^[1-2],是带状疱疹最常见的并发症。PHN 最常累及胸腰脊神经背根神经节。研究表明,适当浓度的局部麻醉药作用于神经干,能够可逆性地阻断神经冲动的产生和传导,使局部痛觉暂时消失,而运动功能不受阻滞。椎旁神经阻滞麻醉能够有效地阻滞脊神经,起到减轻疼痛的作用,因而在临床 PHN 治疗上得到广泛的应用。

布比卡因是临床上广泛使用的长效局部麻醉药(简称局麻药),但是,对于需要数天镇痛的患者,其 6~8 h 的作用时效尚不能满足临床需求^[3]。设计药物剂型来延长局麻药的作用时效或减少其毒性是目前局麻药的研究内容之一。

注射用 HYR-PB21 是长效局部麻醉用混悬型注射剂,为布比卡因与双羟萘酸形成 2:1 的超分子复合物(HYR-PB21),其溶解度显著下降,可在注射局部缓慢释放布比卡因,达到长效局部麻醉的作用。本试验选择 PHN 患者,采用随机双盲试验设计,评估注射用 HYR-PB21 椎旁神经阻滞麻醉用于 PHN 患者镇痛治疗的药代动力学特征。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-30AD 液相系统(日本岛津公司);美国 AB Sciex API 4000/ESI 质谱系统;UMX2、XP205 型天平(METTLER TOLEDO);5810R 离心机、移液枪(Eppendorf);37600 型涡旋仪(Thermolyne);4625 型摇板机(Lab-Line Instruments, Inc.);自动移液仪(Cybi-SELMA)。

1.2 试药

注射用 HYR-PB21[合肥合源药业有限公司,批号:1909176,规格:100 mg(以布比卡因计)];盐酸布比卡因对照品(批号:1272-071A1,含量:94.8%)、内标布比卡因-d₉(批号:1805-092A4,含量:99.9%)(TLC PHARMACEUTICAL STANDARDS);甲醇(HPLC 级,云南新蓝景化学工业有限公司);甲酸(质谱级, Fisher)。

2 方法与结果

2.1 血浆中注射用 HYR-PB21 测定方法的建立

2.1.1 HPLC-MS/MS 测定条件

① 色谱条件:采用 ACE Excel 3 C18-AR 色谱柱(50 mm×2.1 mm, 3 μm),流动相:含 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~1.5 min:

0→25%B, 1.5~3.01 min:25%→40%B, 3.01~5.21 min:40%→90%B, 5.21~7.41 min:90%→90%B, 7.41~10.41 min:90%→25%B);柱温 40℃,流速 0.450 mL·min⁻¹,进样体积 5.0 μL。

② 质谱条件:电喷雾离子源(ESI);正离子模式,多反应监测。喷雾电压:5500 V;离子源温度:500℃;去簇电压:60 V;碰撞能:30 eV;气帘气:20 psi;离子源气体 1:50 psi;离子源气体 2:60 psi;质谱采集时间:3.0 min;用于定量分析的离子对分别为 *m/z* 289.200→140.200(布比卡因)和 *m/z* 298.300→149.300(布比卡因-d₉)。

2.1.2 溶液的配制 精密称取布比卡因对照品适量,用 100% 二甲基亚砜(DMSO)溶解稀释,制得质量浓度为 1.00 mg·mL⁻¹ 的储备液。取布比卡因储备液适量,用 50% 乙腈稀释,得质量浓度为 20.0、40.0、120、500、2000、6000、9000、10 000 ng·mL⁻¹ 的系列浓度标准曲线溶液,每个浓度水平 2 个重复。精密称取布比卡因-d₉ 对照品适量,用 DMSO 溶解稀释,制得质量浓度为 1.00 mg·mL⁻¹ 的内标储备液,精密称取内标储备液适量,用 50% 乙腈稀释,制成质量浓度为 40.0 ng·mL⁻¹ 的内标工作液。

2.1.3 标准曲线样品和质控样品的配制 取 20.0 μL “2.1.2” 项下标准曲线溶液加入 380 μL 空白基质中,混合均匀,新鲜配制成 1.00(定量下限, LLOQ)、2.00、6.00、25.0、100、300、450、500(定量上限, ULOQ) ng·mL⁻¹ 系列浓度水平的标准曲线样品。再按上述方法制备定量下限(LLOQQC, 1.00 ng·mL⁻¹)、低浓度(LQC, 3.00 ng·mL⁻¹)、中浓度(GMQC, 20.0 ng·mL⁻¹; MQC, 200 ng·mL⁻¹)、高浓度(HQC, 400 ng·mL⁻¹) 水平的样品溶液作为质控样品。

2.1.4 血浆样品的预处理 移取 50.0 μL 血浆样品,加入 50.0 μL 内标工作液,置于 96 孔聚丙烯板中,振摇混匀至少 30 s 后,加入 300 μL 乙腈,振摇混匀约 5 min。再在 4℃、4000 r·min⁻¹ 离心 10 min,室温下转移 100 μL 上清液至另一干净的 96 孔聚丙烯板中,添加 300 μL 水,振摇混匀约 5 min 后进行 HPLC-MS/MS 分析。

2.1.5 空白基质的制备 ① 空白人血浆中加入抗凝剂 K₂EDTA 制得空白基质;② 将全血于-80℃ 条件下冷冻至少 30 min,解冻后涡旋至少 1 min 后离心(离心力 1700 g, 4℃, 10 min),取上清液与上述常规空白基质混合(1:49, V/V) 制得溶血空白基质;③ 采用 Intralipid-20% 脂肪乳与志愿者高脂饮食后采集的空白基质以体积比 1:39 混合制得脂类质量浓度约为 5 mg·mL⁻¹ 的高脂空白基质。

2.2 方法学考察

2.2.1 专属性考察^[4-5]

① 空白基质中内源性物质对待测物与内标的干扰：通过测试“2.1.5”项下的 3 种基质制备的不添加待测物和内标的空白基质样品（各 1 个重复）与相应基质制备的 LLOQ 样品（ $1.00\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，各 1 个重复）进行评估，结果待测物通道的检出物峰面积未超过 LLOQ 样品中待测物峰面积的 20.0%，且内标通道的检出物峰面积未超过 LLOQ 样品中内标峰面积的 5.0%，说明空白基质中内源性物质不干扰待测物与内标的测定。

② 待测物与内标之间的干扰：通过测试空白基质中只添加待测物（不添加内标）或者只添加内标（不添加待测物）的 ULOQ 浓度（ $500\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ）水平的样品（各 6 个重复）进行评估，内标通道检出物峰面积均值未超过有效标准曲线 LLOQ 样品内标峰面积均值的 5.0%，待测物通道检出物峰面积均值未超过有效标准曲线 ULOQ 样

品待测物峰面积均值的 20.0%，表明该方法选择性良好。

2.2.2 标准曲线和 LLOQ 取“2.1.3”项下标准曲线样品，按“2.1.1”项下色谱条件进样，测定布比卡因及其内标峰面积，并计算其比值，每个浓度重复 2 次。使用权重因子 $1/x^2$ ，得标准曲线的回归方程 $y = 0.0265x + 0.002\ 23$ （ $R^2 = 0.9977$ ），线性范围为 $1.00 \sim 500\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，计算得 LLOQ 为 $1.00\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，连续测定 7 个 LLOQ 样本，准确度为 98.5%，*RSD* 为 2.9%。

2.2.3 精密度和准确度 按照表 2 配制不同质控浓度的样品溶液，各平行 6 份，按“2.1”项下条件测定精密度和准确度，结果显示每个浓度水平质控样品的测定浓度的总体变异系数（*CV*）未超过 15.0%，且每个浓度水平质控样品的测定浓度总体均值与其理论浓度的偏差未超过 $\pm 15.0\%$ 。说明该法精密度和准确度良好，符合生物样品分析要求，见表 1。

表 1 布比卡因在人血浆中批间和批内精密度和准确度

Tab 1 Precision and accuracy of bupivacaine in human plasma in inter and intra assay

质量浓度 / ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	批内 ($n = 6$)			批间 ($n = 18$)		
	实测浓度 / ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	精密度 <i>CV</i> /%	准确度 <i>RE</i> /%	实测浓度 / ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	精密度 <i>CV</i> /%	准确度 <i>RE</i> /%
1	0.973	3.1	- 2.7	0.972	4.6	- 2.8
3	3.16	2.0	5.4	3.16	2.2	5.3
20	21.4	1.1	6.8	21.3	1.9	6.5
200	201	1.9	0.3	201	2.3	0.5
400	395	1.5	- 1.4	394	1.5	- 1.5

2.2.4 稳定性 分析基质样品在室温、 $- 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下 5 次冻融循环、自动进样器中（约 $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ）、 $- 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下的稳定性，对其进行测试分析。考察 LQC 和

HQC，每个浓度重复 6 次。结果各浓度水平的稳定性测试样品的测定浓度的 *CV* 均未超过 15.0%，结果见表 2。

表 2 布比卡因基质样品稳定性 ($n = 6$)

Tab 2 Stability of bupivacaine matrix samples ($n = 6$)

质量浓度 / ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	室温存放 24 h		冻融循环 5 次		自动进样器 $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下放置 120 h 再进样		$- 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 存放 95 d	
	准确度 /%	<i>CV</i> /%	准确度 /%	<i>CV</i> /%	准确度 /%	<i>CV</i> /%	准确度 /%	<i>CV</i> /%
3.00	108.0	1.9	111.3	3.5	105.0	1.6	112.3	1.2
400	103.5	0.7	101.3	1.4	98.8	1.0	103.5	2.7

2.2.5 基质效应 将“2.1.5”项下的 3 种基质作为空白样品，提取后，向各空白样品提取物中添加待测物和内标制得 LQC、MQC 和 HQC，作为测试样品。制备与上述测试样品相同理论浓度纯溶液（待测物及内标）作为参比溶液（每个浓度重复 3 次）。考察内标归一化基质效应因子，即每个浓度基质的测试样品中待测物（或者内标）峰面积除以同浓度参比溶液中待测物（或者内标）峰面积均值算出待测物（或者内标）的基质效应因子，再由待测物基质效应因子除以其内标基质效应因子得内标归一化基质效应因子。最后计算得出低、中、高浓度下，内标归一化基质效应因子分别为 0.992、1.01

和 1.00，*CV* 分别为 0.9%、1.1% 和 1.6%，均小于 15%，符合 9012 法规生物样本检测的规定。

2.2.6 提取回收率 向空白样品提取物中添加待测物和内标制得 LQC、MQC 和 HQC（每个浓度重复 6 次），作为参比样品。测试样品为常规质控样品或者同其制备过程的样品，包含 LQC、MQC 和 HQC（每个浓度各 6 个重复）。待测物提取回收率计算：每个浓度常规质控样品（测试样品）中待测物峰面积均值除以同浓度参比样品中待测物峰面积均值。内标提取回收率计算：所有浓度常规质控样品（测试样品）中内标峰面积均值除以参比样品中内标峰面积均值。布比卡因的提取回收率

为 90% ~ 94.2%, $CV \leq 15\%$; 内标的平均提取回收率为 95.3%, $CV \leq 15\%$ 。

2.2.7 残留效应 批量样品检测过程的残留通过每个分析批有效标准曲线定量上限样品后进样的空白基质样品进行评估。结果显示空白基质样品中待测物通道检出物峰面积均值未超过有效标准曲线定量下限样品中待测物峰面积均值的 20.0%; 内标通道检出物峰面积均值也未超过有效标准曲线定量下限样品中内标峰面积均值的 5.0%。

2.2.8 稀释效应 以空白血浆稀释 $1250\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质控样品, 制得质量浓度为 $250\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的测试样品 (重复稀释 6 次)。结果显示稀释质控样品测定浓度的 CV 未超过 15.0%; 稀释质控样品的测定浓度与理论浓度的偏差未超过 $\pm 15.0\%$; 稀释质控样品测定浓度均值与其理论浓度的偏差也未超过 $\pm 15.0\%$, 稀释样品浓度结果可接受。

2.3 药代动力学研究

该项试验方案经中南大学伦理委员会批准 [批件号为 (2021) 伦审第 (K102) 号], 研究严格遵守《赫尔辛基宣言》的有关伦理准则。本试验入组 PHN 患者 12 例, 所有受试者均充分了解试验方案和过程, 并签署知情同意书。受试者年龄 (64.30 ± 7.30) 岁, 身高 (163.13 ± 6.15) cm, 体重 (64.01 ± 9.67) kg, 体质量指数为 (24.01 ± 2.97) $\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$; 其中男性 10 例 (83.30%), 女性 2 例 (16.70%); 汉族 12 例 (100%); 体力劳动者 4 例 (33.33%), 非体力劳动者 8 例 (66.67%)。

2.3.1 给药与血样采集 12 例受试者椎旁注射 200 mg 注射用 HYR-PB21。分别于给药前 1 h 内 (0 h), 给药结束后 0.083、0.25、0.5、1、2、4、8、12、24、36、48、72、96 h 采取血样 3 mL, 置于 K_2EDTA 抗凝的 PK 采血管中。采集后采血管应立即被缓慢、轻柔地 180° 上下颠倒至少 8 次混匀, 以确保与管内抗凝剂等充分接触。混匀后立即将采血管直立置于室温条件下。避免样本与橡皮塞长时间接触。血样采集后 1 h 内进行离心。将采血完成后的采血管置于离心机, 在 1700 g ($\pm 2\%$) 条件下 4°C 离心 10 min 分离血浆。待离心操作结束后, 将样本从离心机中取出, 并于 1 h 内将血浆转移至贴好对应标签的冻存管中, 一式 2 管。其中, 保证 1 管血浆量至少 0.5 mL, 用于分析测试 (测试管); 剩余的血浆分装于另 1 管中, 作为备份管。血浆样本量不应超过冻存管体积的 2/3, 当血浆量不足时, 优先保证测试管容量。分装后的血浆可于 -20°C 冰箱暂时储存, 并于 48 h 内转移至 -60°C 及以下的冰箱中冻存或者直接于 -60°C 及以下的冰箱中冻存, 直至冷链运送至样本分析检测单位 (上海熙华检测技术服务股份有限公司)。给药后血样从采集、预处理到存入冰箱的时

间不得超过 2 h, 除离心操作外, 其余操作均在室温白光条件下进行。

2.3.2 注射用 HYR-PB21 体内药代动力学参数 12 名 PHN 患者给药后, 按照“2.3.1”项下方法采集血样, 按“2.1”项下方法测定, 主要药代动力学参数见表 3。

表 3 PHN 患者单次椎旁注射 200 mg 注射用 HYR-PB21 后的血浆中布比卡因平均药代动力学参数比较 ($n = 12$)

Tab 3 Mean pharmacokinetic parameters of prednisone in plasma after PHN patients by single vertebral HYR-PB21 for injection ($n = 12$)

参数	注射用 HYR-PB21	$CV/\%$
$t_{\max}/\text{h}$	8.08 (中位数)	58.6
$C_{\max}/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	271.92 ± 121.19	44.60
$AUC_{0 \sim t}/(\text{h} \cdot \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	$10\,229.25 \pm 3379.93$	33.00
$AUC_{0 \sim \infty}/(\text{h} \cdot \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	$11\,069.80 \pm 3387.02$	30.60
$t_{1/2}/\text{h}$	25.41 ± 7.02	27.60
$CLZ/F/(\text{L} \cdot \text{h}^{-1})$	19.62 ± 5.87	29.90

2.3.3 注射用 HYR-PB21 在 PHN 患者体内药代动力学曲线 12 名 PHN 患者给药后的血药浓度 - 时间曲线经 DAS 3.0 拟合后符合非房室模型, 见图 1。

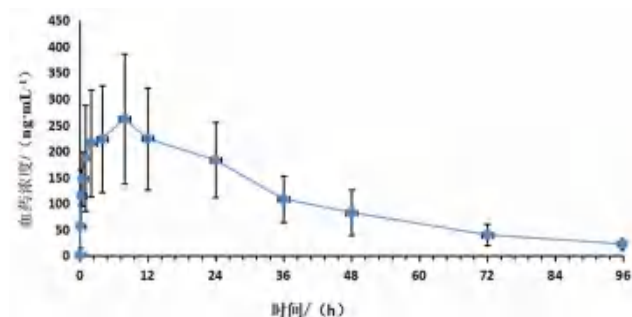


图 1 注射用 HYR-PB21 受试者平均血液浓度 - 时间曲线

Fig 1 Average blood concentration-time curve of HYR-PB21 subjects for injection

3 讨论

3.1 血浆中布比卡因测定方法的建立

布比卡因在人体内以原形药物发挥药效, 本方法用于支持布比卡因浓度检验的人体临床试验, 故目标待测物确定为布比卡因。

目前, 国内外测定血浆中盐酸布比卡因浓度的方法主要有高效液相色谱法、反相高效液相色谱法以及液相质谱联用法等^[6-9]。王权光等^[7]生物样品前处理采用碱化萃取后再酸化的反提方法, 以乙腈 $-0.02\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4 = 18:82$ (V/V), pH 4.0 为流动相, 最低检测浓度为 $0.05\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。本研究采用 HPLC-MS/MS 法测定注射用 HYR-PB21 在 PHN 患者体内的药代动力学数据, 样品前处理采用蛋白沉淀法, 在 100% 的水含 0.1% 甲酸和 100% 的乙腈作为流动相条件下, 梯度洗脱确保待测样品完全分离, 灵敏度高, 可满足高通量测定布比卡因

的要求,适用于 K_2EDTA 人血浆中布比卡因浓度测定,样品用量为 $50.0\ \mu\text{L}$,浓度范围为 $1.00\sim 500\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,操作简单,精密可靠,检测时间短,最低检测浓度为 $1.00\ \text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 。本方法提取回收率为 $90\%\sim 94.2\%$, $CV\leq 15\%$;日内、日间精密度 RSD 均 $< 15\%$,为其药代动力学研究及血药浓度检测提供了准确、快速的检测依据。

3.2 注射用 HYR-PB21 药代动力学参数分析

HYR-PB21 是一种新型的缓释局部麻醉剂,基于新型布比卡因晶体的低溶解度,可提供长达 72 h 的疼痛缓解。有体内动物研究表明,HYR-PB21 的局部浸润产生了强大的剂量依赖性、长效的局部镇痛作用。这提示 HYR-PB21 可能是一种潜在的长效局部麻醉剂来缓解术后疼痛^[10]。有研究表明注射用 HYR-PB21 血浆中布比卡因峰浓度与布比卡因制剂的系统安全性直接相关,据 FDA 批准的布比卡因制剂的上市说明书披露,布比卡因引起的严重毒副作用通常与其过高的血浆布比卡因浓度有关,已报道血浆布比卡因浓度达到 $2500\sim 4000\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 会引起中枢神经系统毒性^[11]。

本研究首次对注射用 HYR-PB21 在 PHN 患者中的药代动力学进行临床研究,采用的是非房室模型拟合计算药代动力学参数。非房室模型法不依赖任何模型假设,能够较客观地描述药物的体内暴露和药代动力学状况^[12-13]。

本研究结果表明注射用 HYR-PB21 单次椎管注射给予 200 mg,试验药达峰时间延迟至 8.08 h,半衰期均数延长至 25 h,以上结果显示注射用 HYR-PB21 半衰期 ($25.41\pm 7.02\ \text{h}$) 与文献报道的长效制剂(微球 25.6 h 左右、脂质体 $23.80\sim 34.10\ \text{h}$ 、凝胶 $26.80\ \text{h}$ 左右、微囊 $26.00\sim 49.00\ \text{h}$) 的结果相似^[14]; $C_{\max}$ 为 ($271.92\pm 121.19\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$),但远低于文献报道的布比卡因脂质体引起的神经毒性和心脏毒性阈值(分别为 2000 和 $4000\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)^[15]。

本文通过对注射用 HYR-PB21 用于 PHN 患者的药代动力学进行研究,了解其在 PHN 患者体内的吸收、分布、代谢和排泄过程,可以更精准地确定给药剂量和时间间隔,以达到理想的治疗效果,同时减少药物过量导致的不良反应,提高治疗的有效性和

可预测性。后期课题组还将进一步加大样本量探索不同剂量、不同给药部位对药代动力学参数的影响,以更深入地了解注射用 HYR-PB21 椎旁神经阻滞用于 PHN 患者镇痛治疗的开发路径和开发前景。

参考文献

- [1] 带状疱疹后神经痛诊疗共识编写专家组. 带状疱疹后神经痛诊疗中国专家共识[J]. 中国疼痛医学杂志, 2016, 22(3): 161-167.
- [2] 中国医师协会皮肤科医师分会带状疱疹专家共识工作组. 带状疱疹中国专家共识[J]. 中华皮肤科杂志, 2018, 51(6): 403-408.
- [3] 徐鑫,汪小海,汤春艳,等. 布比卡因脂质体注射液研究进展[J]. 医药导报, 2024, 43(1): 91-96.
- [4] 李庚喜,刘丽芳,李良,等. 醋酸泼尼松片在中国人体内的药动学研究[J]. 中南药学, 2021, 19(4): 657-662.
- [5] 中国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020: 466-472.
- [6] 全新勇,李立民. 盐酸左布比卡因原位凝胶注射剂的制备及其在动物体内的药代动力学和药效学[J]. 中国药科大学学报, 2015, 46(2): 209-213.
- [7] 王权光,陈丽梅,刘乐,等. 反相高效液相色谱法检测富含脂肪乳剂血浆中盐酸布比卡因浓度[J]. 温州医学院学报, 2010, 40(5): 480-483.
- [8] Macorigh C, Guibbert V, Casanova M, et al. Stability study of hydromorphone and bupivacaine mixture by HPLC-UV[J]. Eur J Hosp Pharm, 2020, 27(2): 95-99.
- [9] 石浩强,王曦晗,翟晓慧,等. 人血浆中布比卡因与罗哌卡因的 HPLC 法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2020, 51(5): 620-625.
- [10] Peng JS, Liu C, Liu JJ, et al. HYR-PB21-LA, a potential extended-release bupivacaine formulation, produces long-lasting local anesthesia in rats and guinea pigs[J]. Reg Anesth Pain Med, 2020, 45(5): 367-372.
- [11] 布比卡因脂质体注射液说明书[Z]. 江苏恒瑞医药股份有限公司, 2023.
- [12] 王承海,唐晓莉,尚书军,等. 肾上腺素对左旋布比卡因臂丛神经阻滞时药代动力学的影响[J]. 中华麻醉学, 2010, 30(6): 767-768.
- [13] 杨宝峰. 药理学[M]. 9 版. 北京: 人民卫生出版社, 2018.
- [14] 曾慧琳,邓艾平,王奕,等. 布比卡因长效制剂的研究进展[J]. 中南药学, 2016, 14(12): 1342-1346.
- [15] Rice D, Heil JW, Biernat L. Pharmacokinetic profile and tolerability of liposomal bupivacaine following a repeated dose via local subcutaneous infiltration in healthy volunteers[J]. Clin Drug Investig, 2017, 37(3): 249-257.

(收稿日期: 2024-07-13; 修回日期: 2024-10-10)

基于网络药理学和实验验证探究复方芪茵颗粒治疗非酒精性脂肪性肝病的影响

杨珍^{1, 2}, 刘宏炳^{1, 2}, 黄梦^{1, 2}, 王彦顺^{1, 2}, 燕雪花^{1, 2*} (1.新疆医科大学中医学院, 乌鲁木齐 830017; 2.新疆维吾尔自治区新疆名医名方与特色方剂学重点实验室, 乌鲁木齐 830017)

摘要: **目的** 通过网络药理学和细胞实验探究复方芪茵颗粒对非酒精性脂肪性肝病的保护作用及机制。**方法** 通过 TCMSP、BATMAN-TCM、PubChem、SwissADME 数据库检索复方芪茵颗粒的化学成分及靶点预测, 通过 DisGeNET、GeneCards 等疾病数据库汇总有关非酒精性脂肪性肝病的疾病靶点, 利用 STRING 数据库和 Cytoscape 3.7.2 软件构建有效成分-靶点图和蛋白质-蛋白质相互作用网络, 用 David 数据库对交集靶点进行 GO 功能及 KEGG 通路富集分析; 基于关键化合物和靶点进行分子对接验证; 建立 RAW264.7 细胞炎症模型, 通过 MTT 实验检测细胞存活率, 一氧化氮 (NO) 试剂盒检测细胞上清中 NO 的含量, ELISA 法检测白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的表达水平。**结果** 获得非酒精性脂肪性肝病与复方芪茵颗粒的交集靶点 258 个, 核心靶点有 AKT1、JUN、STAT3 等; 主要涉及细胞内受体信号通路、信号传导、凋亡等生物学过程; 与非酒精性脂肪性肝病治疗相关的信号通道主要为 TNF 信号通路、HIF-1 信号通路、JAK-STAT 信号通路等; 分子对接表明活性成分与关键靶点结合紧密; 实验结果显示各给药组对 RAW264.7 细胞无毒性, 且可抑制 RAW264.7 细胞上清液 NO 分泌, 抑制炎症因子 IL-6、TNF- α 的表达水平。**结论** 复方芪茵颗粒对非酒精性脂肪性肝病具有保护作用, 其机制与调控 TNF 信号通路、JAK/STAT 信号通路, 抑制细胞炎症有关。

关键词: 复方芪茵颗粒; 网络药理学; 非酒精性脂肪性肝病

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)04-1015-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.022

Effect of Fufang Qiyin granules on non-alcoholic fatty liver disease based on network pharmacology and experimental verification

YANG Zhen^{1, 2}, LIU Hong-bing^{1, 2}, HUANG Meng^{1, 2}, WANG Yan-shun^{1, 2}, YAN Xue-hua^{1, 2*} (1. College of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830017; 2. Xinjiang Key Laboratory of Famous Medicine and Characteristic Formulations, Urumqi 830017)

Abstract: Objective To determine the protective effect and mechanism of Fufang Qiyin granules on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) by network pharmacology and cell experiments. **Methods** The chemical compositions and targets prediction of Fufang Qiyin granules were retrieved through TCMSP, BATMAN-TCM, PubChem and SwissADME databases. The targets related to NAFLD were summarized via DisGeNET, GeneCards and other databases. The active component target map and protein-protein interaction network were established with STRING database and Cytoscape 3.7.2 software. The GO function and KEGG pathway enrichment analysis of intersection targets were performed with David database. Molecular docking was verified based on the key compounds and targets. The RAW264.7 cell inflammation model was established, the cell survival rate was detected by MTT assay, the nitric oxide (NO) content in the cell supernatant by NO kit, and the expression levels of interleukin (IL-6) and tumor necrosis factor α (TNF- α) were detected by ELISA. **Results** Totally 258 intersection targets of NAFLD and Fufang Qiyin granules were obtained, the core targets being AKT1,

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金 (No.2023D01C43)。

作者简介: 杨珍, 女, 硕士, 主要从事中药复方制剂方面的研究, email: yangzhen@stu.xjmu.edu.cn * **通信作者:** 燕雪花, 女, 教授, 主要从事中药复方制剂方面的研究, email: yxh_zy@xjmu.edu.cn

JUN, STAT3, etc. Mainly intracellular receptor signaling pathway, signal transduction, apoptosis and other biological processes were involved. The signaling pathways associated with NAFLD treatment mainly included TNF signaling pathway, HIF-1 signaling pathway, and JAK-STAT signaling pathway. The molecular docking showed that the active ingredients had good binding activity to the key targets. The experiment showed no toxicity of each drug group to RAW264.7 cells. All the treatment groups inhibited the secretion of NO in the supernatant of RAW264.7 cells, and the expression levels of inflammatory factors IL-6 and TNF- α . **Conclusion** Fufang Qiyin granules have a protective effect on NAFLD, whose mechanism is related to the regulation of TNF signaling pathway, JAK/STAT signaling pathway, and inhibition of cell inflammation.

Key words: Fufang Qiyin granule; network pharmacology; non-alcoholic fatty liver disease

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是近年来全球最常见的慢性肝脏疾病, 若不及时治疗, 可能会发展为非酒精性脂肪性肝炎及相关的肝组织纤维化、肝组织硬化甚至转变为肝癌^[1-2]。中医从整体观念辨证论治出发, 提出多成分、多靶点、多环节的特色治疗方案, 在治疗 NAFLD 方面显示出巨大的优势, 成为近年来研究的热点。复方芪茵颗粒 (Fufang Qiyin granules, QY) 是新疆医科大学附属中医医院治疗 NAFLD 的经验方, 由黄芪、茵陈、三七、决明子、大黄、泽泻、山楂、补骨脂、苦丁茶 9 味药组成。研究表明, 复方芪茵颗粒可以有效改善肝脏脂肪变性, 减轻肝脏炎症及纤维化^[3]。本研究通过构建“药材-成分-靶点”网络和体外实验验证, 为复方芪茵颗粒治疗 NAFLD 的配伍机制提供生物信息学支持。

1 仪器与试剂

Multiskan GO 酶标仪 (赛默飞仪器有限公司); ME204E 型电子天平 (梅特勒公司); YM-080S 型超声仪 (深圳市方奥微电子有限公司)。

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 (武汉普诺赛公司), 高糖 DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司), 胎牛血清 (美国 Sigma 公司), 脂多糖 (LPS)、噻唑蓝 (MTT) (美国 AbMole Bioscience), 小鼠白细胞介素-6 (IL-6)、小鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司), 一氧化氮 (NO) 检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司), 复方芪茵颗粒 (阴天江药业有限公司, 黄芪批号: 2403064301、茵陈批号: 2401142301、三七批号: 230801、决明子批号: 2310005301、大黄批号: 2305291301、泽泻批号: 2304480301、山楂批号: 2309037301、补骨脂批号: 2404090301)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 复方芪茵颗粒活性化学成分筛选及靶点预测
使用中药系统药理学数据与分析平台 (TCMSP, <http://tcmsp.com/tcmsp.php>) 结合课题组前期的液质

分析结果, 设置人体口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 且药物相似性 (DL) ≥ 0.18 , 筛选复方芪茵颗粒中 9 味中药包含的活性成分。以分数临界值 ≥ 20 , $P \leq 0.05$ 作为筛选条件在中药分子力学生物信息学分析工具数据库 (<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>) 中筛选。在 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库中补充化合物的名称和结构信息, 通过 SwissADME 在线平台 (<http://www.swissadme.ch/index.php>) 对复方芪茵颗粒化学成分的靶点进行预测。合并上述数据库靶点后, 删除重复值。选择物种为 Homo sapiens, 删除可能性小于“0”的靶点。通过 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 中的 UniProt KB 功能, 选择物种为 Human, 将活性成分靶点转化为靶基因名。

2.1.2 NAFLD 靶点预测 通过 DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>)、GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 等疾病数据库, 以“non-alcoholic fatty liver disease”为关键词, 对疾病关键词进行检索、合并与去冗余, 获得疾病靶点。通过 UniProt 数据库中的 UniProt KB 功能, 选择物种为 Human, 将疾病靶点转化为靶基因名。

2.1.3 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络构建
通过 Venny2.1.0 在线平台 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/>) 获得 NAFLD 与复方芪茵颗粒中组成药物相关的交集靶点, 选择置信度大于 0.9, 其交集靶点即为复方芪茵颗粒调控 NAFLD 的相关靶点基因。将从 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>) 中获取的交集靶点的相互作用信息导入到 Cytoscape 3.7.2 软件中, 绘制 PPI 网络图并进行可视化分析, 根据度值大小筛选出复方芪茵颗粒调控 NAFLD 的关键靶点。

2.1.4 KEGG 和 GO 通路富集分析 通过 David 数据库 (<https://david.ncicrf.gov/>) 将交集靶点进行 KEGG 和 GO 通路富集分析, 根据 P 值从大到小排列, 筛选前 20 条与 NAFLD 相关的信号通路进行可视化分析。利用微生信在线平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 绘制 KEGG 和 GO 富集气泡图, 并对结果进行可视化处理。

2.1.5 “成分-靶点-通路”网络的构建 利用 Cytoscape 3.7.2 软件将“药材-成分-靶点”图可视化。

2.1.6 中药重复靶点分析 课题组前期代谢组学和蛋白质组学研究发现复方芪茵颗粒可能是通过 JAK/STAT 信号通路发挥对 NAFLD 的治疗作用^[3]。基于复方芪茵颗粒通过 JAK/STAT 信号通路治疗 NAFLD 的作用靶点,计算复方中各味中药成分与 JAK/STAT 信号通路的重叠靶点占比,重叠靶点占比(%)=各味中药成分涉及靶点/复方中涉及 JAK/STAT 信号通路靶点×100%。

2.1.7 分子对接 基于交集靶点的 PPI 分析结果中的前 10 个核心靶点中涉及 JAK/STAT 信号通路和对应的活性成分进行分子对接模拟,在 PubChem 数据库中下载活性小分子的 SDF 文件,在 RSCB PDB (<https://www.rcsb.org/pdb/>) 数据库下载已筛选靶点“pdb”格式的文件,使用 PyMol 软件去除结构中的配体和水分子,获得相应的蛋白受体并通过 AutoDock Tool 软件对蛋白受体进行加氢,保存为“pdbqt”格式文件。用 AutoDock Vina 软件进行分子对接并计算结合能,用 PyMol 软件对结合能较小的 4 个活性成分及其亲和性最高的 NAFLD 核心靶点进行可视化分析。

2.2 细胞实验

2.2.1 细胞培养 RAW264.7 细胞培养于含 10% 胎牛血清(FBS)的高糖 DMEM 培养液中,37℃、5%CO₂ 条件下培养。

2.2.2 药物及制备 复方芪茵颗粒(QY)组、苦丁茶阴性(QY-KDC)组、三七阴性(QY-SQ)组、补骨脂阴性(QY-BGZ)组按照处方配比组成。将颗粒剂溶于无菌水中,并在 70℃ 的水浴中加热 20 min,以充分释放药物的活性成分。然后,使用功率为 300 W 的超声处理混合物 20 min,并在 70℃ 的水浴中加热 30 min。以 2000 r·min⁻¹ 离心 5 min 后,收集上清液并使用 0.22 μm 注射器过滤^[4-5]。

2.2.3 MTT 法检测细胞存活率 RAW264.7 细胞以 1×10⁴ 个/孔接种于 96 孔板,每孔 100 μL 培养基,用不同质量浓度(0、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 mg·mL⁻¹)的 QY、QY-KDC、QY-SQ、QY-BGZ 培养 24 h。加入含 10% MTT 的培养液 100 μL,继续培养 3 h 后,于 490 nm 波长处检测 OD 值,计算细胞存活率。细胞存活率(%)=[(OD_{实验}-OD_{空白})/(OD_{对照}-OD_{空白})]×100%。

2.2.4 细胞分组及处理 根据 MTT 实验结果,取对数生长期 RAW264.7 细胞以 5×10⁴ 个/孔接种于 24 孔板,每孔 500 μL 培养基,将细胞分为空白组(Control)、模型组(Model)和给药组,空白组细胞不做任何处理;根据课题组前期研究,模型组使用终质量浓度为 1 μg·mL⁻¹ 的 LPS 刺激 24 h;给药组中加入 0.2、0.4、0.8 mg·mL⁻¹ 的 QY、QY-KDC、QY-SQ,0.4、0.8、1.6 mg·mL⁻¹ 的 QY-BGZ 和 1

μg·mL⁻¹ 的 LPS 培养 24 h。

2.2.5 检测细胞上清液中 NO、IL-6、TNF-α 水平 细胞按照“2.2.4”项下方法进行分组,收集细胞培养上清液,离心后按照 NO 试剂盒说明书检测细胞上清中 NO 的含量。基于 NO 含量检测结果,以各给药组最佳剂量干预 RAW264.7 细胞,设置空白组、LPS 组以及 4 个给药组,其中 QY、QY-KDC、QY-SQ 为 0.8 mg·mL⁻¹,QY-BGZ 为 1.6 mg·mL⁻¹,干预方法“2.2.4”项下,收集细胞培养上清液,离心后按照 ELISA 试剂盒说明书检测细胞上清中 IL-6、TNF-α 的含量。

2.3 统计学分析

采用 SPSS 27.0 软件,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 网络药理学

3.1.1 复方芪茵颗粒及 NAFLD 靶点预测 通过 TCMSP、SwissADME、BATMAN-TCM 数据库检索得到 30 个活性成分(见表 1),641 个相关靶点。通过 DisGeNET、GeneCards 等疾病数据库,获得 1982 个疾病靶点。将 NAFLD 靶点与复方芪茵颗粒药物靶点整合,得到交集靶点 258 个。

3.1.2 复方芪茵颗粒治疗 NAFLD 的潜在靶点 将筛选出的 258 个靶点导入 STRING 数据库构建 PPI 网络(见图 1)进行拓扑分析,根据 Degree 值从大到小的顺序进行排序,筛选前 20 个为核心靶点,分别为 TP53、AKT1、JUN、STAT3、TNF、ESR1、HSP90AA1、AKT2、IL-6、CASP3、NFKB1、MAPK1、BCL2、HSP90AB1、MAPK3、PIK3CA、PIK3R1、RELA、PIK3CB、EGFR。

3.1.3 KEGG 和 GO 通路富集分析 KEGG 通路富集分析得到 186 条信号通路,其中分析排名越靠前,表明存在该通路上潜在靶点数越多。排名前 20 条通路涉及脂质代谢、胰岛素抵抗、TNF 信号通路、HIF-1 信号通路、JAK/STAT 信号通路等。GO 通路富集分析共得到 1207 条,其中生物过程(BP)203 条、细胞组成(CC)100 条、分子功能(MF)904 条,包括 BP 涉及转录的调节、细胞凋亡的负调节、细胞对脂多糖的反应等;CC 涉及细胞质、细胞膜、膜筏等;MF 涉及相同蛋白质结合、酶结合等(见图 2)。

3.1.4 构建“成分-靶点”网络 将得到的 30 个活性成分和 258 个交集靶点导入 Cytoscape 3.7.2 软件,得到成分-靶点网络见图 3。复方芪茵颗粒中黄芪、茵陈为君药,其靶点与 JAK/STAT 信号通路相同的靶点占比为 16.9%、10.2%;决明子的重叠靶点为 10.2%;大黄、泽泻、山楂的重叠靶点为 15.3%、16.9%、16.9%;补骨脂、苦丁茶的重叠靶点为 23.7%、8.5%,其中补骨脂的重叠靶点占比最多,苦丁茶和三七的靶点占比最少(见图 3)。

表 1 复方芪茵颗粒活性成分

Tab 1 Active ingredient in Fufang Qiyin granules			
化合物名称	CAS 号	化合物名称	CAS 号
精氨酸	157-07-3	异补骨脂素	66-97-7
没食子酸	149-91-7	大黄酚	523-50-2
7-羟基香豆素	93-35-6	芒柄花素	481-74-3
protocatechuic aldehyde	139-85-5	16-氧化泽泻醇 A	485-72-3
儿茶素	154-23-4	补骨脂二氢黄酮	124515-98-6
4-香豆酸	501-98-4	新补骨脂异黄酮	19879-32-4
没食子酸异戊酯	2486-02-4	补骨脂色烯查耳酮	41060-15-5
咖啡酸	331-39-5	异补骨脂查耳酮	41743-38-8
对羟基苯乙酮	99-93-4	补骨脂异黄酮	20784-50-3
环四(异)亮氨酸	104068-43-1	泽泻醇 C23-乙酸酯	20784-50-3
去甲汉黄芩素	4443-09-8	补骨脂查耳酮	26575-93-9
黄芩素	491-67-8	corylifols A	28448-85-3
毛蕊异黄酮	20575-57-9	环五(异)亮氨酸	775351-88-7
千层纸素 A	480-11-5	表儿茶素	52-52-8
大黄酸	478-43-3	补骨脂素	490-46-0

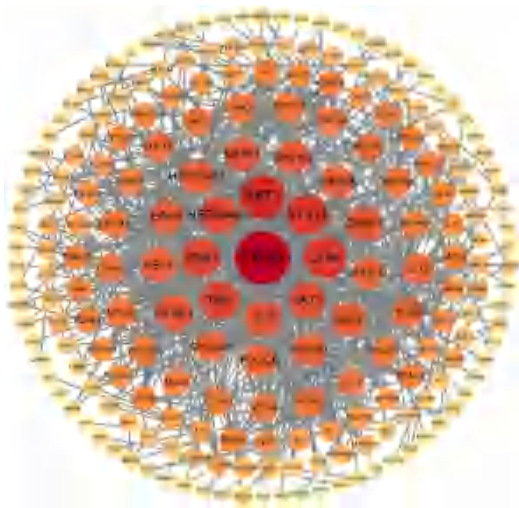


图 1 QY 治疗 NAFLD 的 PPI 网络
Fig 1 PPI network of QY for NAFLD

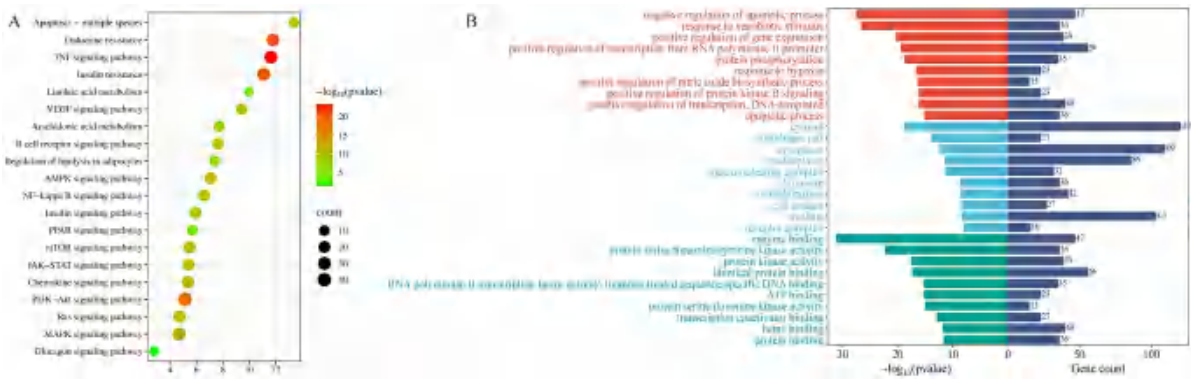


图 2 复方芪茵颗粒治疗 NAFLD 的 KEGG 通路分析 (A) 和 GO 通路分析 (B)
Fig 2 KEGG pathway analysis (A) and GO pathway analysis (B) of Fufang Qiyin granules in the treatment of NAFLD



图 3 复方芪茵颗粒“药材-成分-JAK/STAT 信号通路靶点”网络图
Fig 3 Network diagram of “medicine-composition-JAK /STAT signaling pathway target” for Fufang Qiyin granules

3.1.5 核心靶点和活性成分分子对接 基于网络药理学预测结果, 结合相关领域文献, 选择 PPI 网络中核心靶点 AKT1、EGFR、IL-6、STAT3 为研究对象和对应的活性成分异补骨脂素、黄芩素、补骨

脂查耳酮、表儿茶素、异补骨脂查耳酮、7-羟基香豆素、毛蕊异黄酮、咖啡酸、大黄酚、芒柄花素、新补骨脂异黄酮、去甲汉黄芩素进行分析, 一般认为结合能 $< -20.93 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 具有良好的对接活性(见表 2)。分子对接结果显示复方芪茵颗粒活性成分和核心靶点具有良好的对接活性, 其中结合能力较强的活性成分和核心靶点的对接结果见图 4。

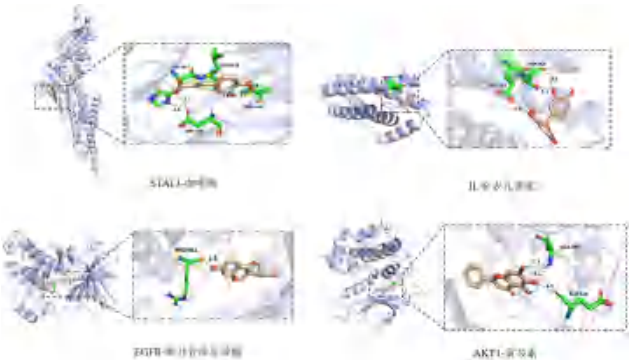


图 4 复方芪茵颗粒活性成分和核心靶点分子对接图
Fig 4 Molecular docking diagram of Fufang Qiyin granules active ingredient and core target

3.2 细胞实验

表 2 复方芪茵颗粒活性成分和核心靶点的结合能情况 (kJ · mol⁻¹)
Tab 2 Binding energy of Fufang Qiyin granules active ingredients and core targets (kJ · mol⁻¹)

核心靶点	PDB ID	活性成分	结合能
AKT1	4GV1	异补骨脂素	- 30.98
		黄芩素	- 35.59
		补骨脂查耳酮	- 35.17
		表儿茶素	- 30.98
		异补骨脂查耳酮	- 34.75
		7-羟基香豆素	- 29.31
		毛蕊异黄酮	- 33.49
EGFR	2RGP	黄芩素	- 36.84
		补骨脂查耳酮	- 38.94
		咖啡酸	- 28.05
		大黄酚	- 35.17
		芒柄花素	- 36.84
		异补骨脂查耳酮	- 39.36
		新补骨脂异黄酮	- 40.61
		去甲汉黄芩素	- 37.68
		7-羟基香豆素	- 30.98
		表儿茶素	- 26.80
		咖啡酸	- 25.54
IL-6	1ahu		
STAT3	6NJS		

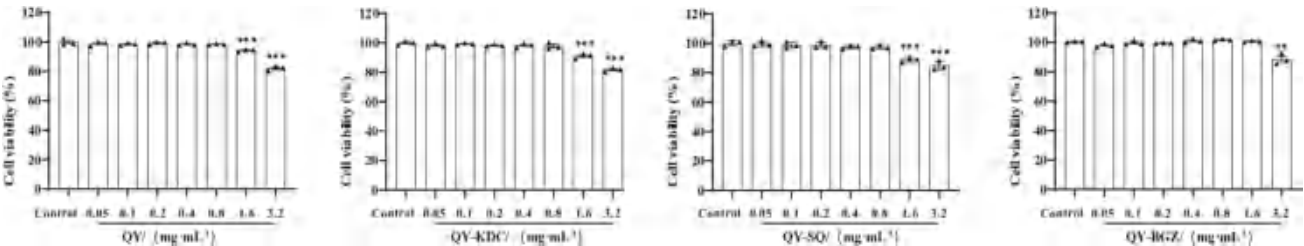


图 5 QY、QY-KDC、QY-SQ、QY-BGZ 对细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig 5 Effect of QY, QY-KDC, QY-SQ, and QY-BGZ on cell viability ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

注：与 Control 组相比，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ 。
Note: Compared with the Control group, ** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ 。

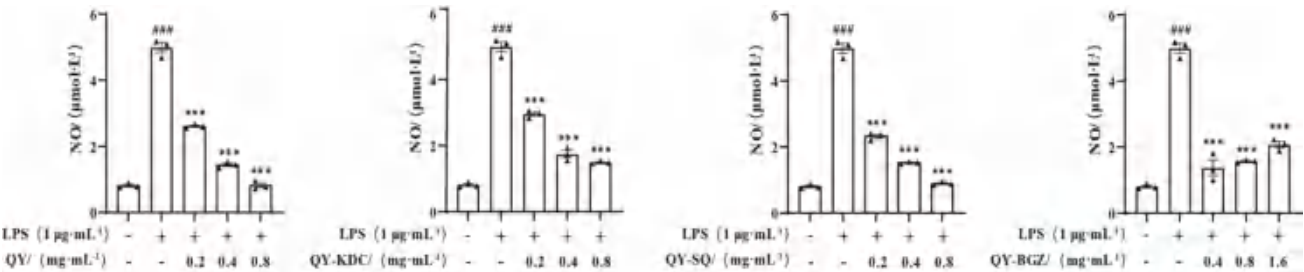


图 6 QY、QY-KDC、QY-SQ、QY-BGZ 对细胞产生 NO 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig 6 Effect of QY, QY-KDC, QY-SQ and QY-BGZ on NO production in cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

注：与 Control 组相比，### $P < 0.001$ ；与 LPS 组相比，*** $P < 0.001$ 。
Note: Compared with the Control group, ### $P < 0.001$ ；compared with the LPS group, *** $P < 0.001$ 。

4 讨论

本研究通过网络药理学方法研究复方芪茵颗粒治疗 NAFLD 的潜在作用机制，发现其核心靶点可能为 TP53、AKT1、JUN、STAT3、TNF、EP300、IL-6、ESR1、IL-1 β 、EGFR，主要涉及脂质代谢、胰岛素抵抗和 TNF、JAK/STAT 等炎症信号通路，表明复方芪茵颗粒可能通过多靶点、多途径来改善 NAFLD。分子对接结果显示 QY 中 4 种活性成分和

3.2.1 各组细胞存活率比较 由图 5 可知，在小于 1.6 mg · mL⁻¹ 时，QY、QY-KDC、QY-SQ 对 RAW264.7 细胞均未显示出明显的毒性作用；在小于 3.2 mg · mL⁻¹ 时，QY-BGZ 对 RAW264.7 细胞均未显示出明显的毒性作用。故选用安全浓度为 0.2、0.4、0.8 mg · mL⁻¹ 的 QY、QY-KDC、QY-SQ，0.4、0.8、1.6 mg · mL⁻¹ 的 QY-BGZ 开展后续实验。

3.2.2 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞上清液 NO、IL-6、TNF- α 的影响 如图 6 所示，与空白组相比，LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 释放量明显升高 ($P < 0.001$)，炎症模型诱导成功，QY、QY-KDC、QY-SQ、QY-BGZ 各浓度组均可抑制 NO 释放，0.2、0.4、0.8 mg · mL⁻¹ 的 QY、QY-KDC、QY-SQ 随着浓度升高，NO 释放量降低；0.4、0.8、1.6 mg · mL⁻¹ 的 QY-BGZ 随着浓度升高，NO 释放量升高。如图 7 所示，与 LPS 组相比，QY、QY-KDC、QY-SQ、QY-BGZ 组 IL-6 水平均显著降低 ($P < 0.001$)，除 QY-SQ、QY-BGZ 组外，QY、QY-KDC 组较 LPS 组 TNF- α 水平显著降低。

4 个核心靶点 (AKT1、EGFR、IL-6、STAT3) 均具有较好的结合能。

NAFLD 的发病过程常见脂肪肝和炎症的发生，持续的炎症反应可导致肝脏慢性炎症加重，NAFLD 进一步恶化。JAK/STAT 信号通路与炎症反应、氧化应激、细胞损伤、凋亡等密切相关，是许多促炎性细胞因子发挥作用的主要途径之一^[6-7]。巨噬细胞是炎症细胞的重要组成部分，当巨噬细胞受到 LPS 刺

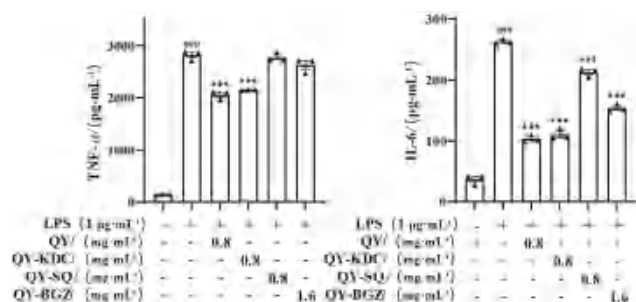


图 7 QY、QY-KDC、QY-SQ、QY-BGZ 对细胞产生 IL-6 和 TNF- α 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig 7 Effect of QY, QY-KDC, QY-SQ and QY-BGZ on the production of IL-6 and TNF- α by cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

注: 与 Control 组相比, $^{###}P < 0.001$; 与 LPS 组相比, $^{***}P < 0.001$ 。

Note: Compared with the Control group, $^{###}P < 0.001$; compared with the LPS group, $^{***}P < 0.001$.

激后, 引发大量炎症因子的产生, 包括 NO、IL-6、TNF- α 等, NO 可以参与整个炎症过程, 细胞 NO 的释放量反映炎症反应的严重程度, 与此同时, IL-6 在炎症反应的调控中扮演着关键的调节角色, IL-6 的减少能减轻炎症反应。IL-6 可以诱导 JAK/STAT 信号通路的激活, 从而产生炎症细胞因子。研究表明, IL-6 可以促进肝脏 STAT3 和 AMPK 的活化, 增加脂肪生成酶, 促进脂肪生成, 导致脂肪肝的加重^[8-9]。TNF- α 信号通路导致的胰岛素抵抗可进一步加重 NAFLD 疾病的发生与发展。TNF- α 是一种促炎细胞因子, 主要由单核细胞和巨噬细胞产生, TNF- α 能够诱导星状细胞的活化促进胰岛素抵抗, TNF- α 水平升高抑制肝细胞线粒体自噬, 导致 NAFLD 炎症加重^[10-12]。

根据网络药理学结果, 补骨脂与 JAK/STAT 信号通路的重叠靶点占比最多, 苦丁茶和三七的重叠靶点占比最少, 故设立苦丁茶阴性组、三七阴性组、补骨脂阴性组, 进一步明确补骨脂、苦丁茶和三七在复方芪茵颗粒中的作用, 为复方芪茵颗粒进一步开发利用提供科学依据。本实验根据 LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞炎症反应, 经复方芪茵颗粒干预后, 细胞上清液中 NO、IL-6 及 TNF- α 均显著下降, 其治疗 NAFLD 的作用机制可能与复方芪茵颗粒调控 JAK/STAT 信号通路炎症因子的表达有关。

同时, 复方芪茵颗粒组和苦丁茶阴性组对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞表现出较强的保护作用, 而补骨脂阴性组和三七阴性组可显著降低 IL-6 水平, 而对 TNF- α 无明显降低作用, 且复方芪茵颗粒组对两种炎症因子水平的抑制作用均优于其余各组, 三七和补骨脂为方中臣药和使药, 可能通过降低 TNF- α 水平发挥抗炎作用, 苦丁茶为方中使药, 去除

苦丁茶稍弱于原方药效但无明显影响, 与中药复方配伍理论“君臣佐使”相符合, 组间差异表明君臣佐使相互配伍具有协同增效作用, 方中药味各有所长, 相辅相成, 相互制约。本研究对核心靶点进行了初步验证, 此后仍需要对活性成分和关键通路深入探究。

参考文献

- [1] Lee HW, Wong VW. Changing NAFLD epidemiology in China [J]. Hepatology, 2019, 70 (4): 1095-1098.
- [2] Powell EE, Wong VW, Rinella M. Non-alcoholic fatty liver disease [J]. Lancet, 2021, 397 (10290): 2212-2224.
- [3] Yan XH, Liu H, Huang M, et al. Integrative proteomics and metabolomics explore the effect and mechanism of Qi-yin granules on improving non-alcoholic fatty liver disease [J]. Heliyon, 2024, 10 (5): e27075.
- [4] Liao YL, Li SR, An J, et al. Ethyl acetate extract of Antenorion Filiforme inhibits the proliferation of triple negative breast cancer cells via suppressing Skp2/p21 signaling axis [J]. Phytomedicine, 2023, 116: 154856.
- [5] Liu ZW, Xi XL, Wu TR, et al. Aikeqing, a kidney-and spleen-tonifying compound Chinese medicine granule, prevented ovariectomy-induced bone loss in rats via the suppression of osteoclastogenesis [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 166: 115339.
- [6] Bharadwaj U, Kasembel MM, Robinson P, et al. Targeting Janus kinases and signal transducer and activator of transcription 3 to treat inflammation, fibrosis, and cancer: rationale, progress, and caution [J]. Pharmacol Rev, 2020, 72 (2): 486-526.
- [7] 王婷, 葛尧, 张小瑞. 基于 IL-6/JAK2/STAT3 通路探讨斑蝥酸钠对人胃癌细胞增殖、凋亡及炎症免疫的影响 [J]. 中南药学, 2024, 22 (9): 2314-2319.
- [8] Vida M, Gavito AL, Pavón FJ, et al. Chronic administration of recombinant IL-6 upregulates lipogenic enzyme expression and aggravates high-fat-diet-induced steatosis in IL-6-deficient mice [J]. Dis Model Mech, 2015, 8 (7): 721-731.
- [9] Park J, Zhao Y, Zhang F, et al. IL-6/STAT3 axis dictates the PNPLA3-mediated susceptibility to non-alcoholic fatty liver disease [J]. J Hepatol, 2023, 78 (1): 45-56.
- [10] Jin KP, Shi YZ, Zhang HT, et al. A TNF α /Miz1-positive feedback loop inhibits mitophagy in hepatocytes and propagates non-alcoholic steatohepatitis [J]. J Hepatol, 2023, 79 (2): 403-416.
- [11] Lopetuso LR, Mocci G, Marzo M, et al. Harmful effects and potential benefits of anti-tumor necrosis factor (TNF- α) on the liver [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19 (8): 2199.
- [12] 孙泽萱, 张雨涵, 石勇, 等. 黄芪-知母对大鼠糖尿病认知功能障碍及海马组织 JAK2/STAT3 信号通路的影响 [J]. 中南药学, 2024, 22 (10): 2643-2649.

(收稿日期: 2024-10-26; 修回日期: 2024-12-05)

基于口腔溃疡药效筛选结合 Box-Behnken 响应面法 优化小儿化毒散提取工艺

徐卓¹, 廖倩¹, 林龙飞¹, 汤如莹¹, 李慧^{1, 2*}, 刘宇灵^{1*} (1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 中国中医科学院中医药健康产业研究所, 南昌 330006)

摘要: **目的** 通过药效实验筛选小儿化毒散的提取工艺路线, 并利用 Box-Behnken 响应面法进行优化, 确定小儿化毒散的最佳提取工艺。**方法** 采用组织切除法建立大鼠口腔溃疡模型, 以溃疡面积比、组织病理评分为药效指标, 筛选小儿化毒散的提取工艺路线; 再以芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和小檗碱 5 种指标成分含量及出膏率为评价指标, 通过 Box-Behnken 响应面法优化该提取工艺路线的各参数水平。**结果** 提取工艺路线 I 被证明促进大鼠口腔溃疡愈合效果最佳, 优化后的工艺路线 I 为: 12 倍水浸泡 15 min, 提取 3 次, 每次 2 h, 浓缩干燥得到冻干粉后加入人工牛黄、雄黄、珍珠、冰片 4 味药混合均匀。**结论** 优选的小儿化毒散提取工艺合理可行, 可为小儿化毒散的二次开发提供参考。

关键词: 小儿化毒散; Box-Behnken 响应面法; 药效筛选; 提取工艺

中图分类号: R283.6

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)04-1021-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.023

Optimization of the extraction of Xiaoer Huadu powder by Box-Behnken response surface method in oral ulcer efficacy screening

XU Zhuo¹, LIAO Qian¹, LIN Long-fei¹, TANG Ru-ying¹, LI Hui^{1, 2*}, LIU Yu-ling^{1*} (1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700; 2. Institute of Traditional Chinese Medicine Health Industry, China Academy of Chinese Medical Sciences, Nanchang 330006)

Abstract: **Objective** To determine the optimal extraction of Xiaoer Huadu powder, to screen the extraction route of Xiaoer Huadu powder by pharmacodynamic experiments and optimize with Box-Behnken response surface method. **Methods** Firstly, a rat model with traumatic oral ulcer was established, and the extraction route of Xiaoer Huadu powder was determined with ulcer area ratio and histopathological score as the evaluation indexes. Subsequently, the response method was used to further optimize the parameter levels of the extraction route. Meanwhile, dry yield of aqueous extract and the content of 5 indexes (aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol and berberine) were used as the evaluation index of the method. **Results** The extraction route I proved to have the best effect on the healing of oral ulcers in rats. The optimal route I was as follows: 12-fold water immersion for 15 min, extraction for 2 h, and three extractions. After concentration and drying lyophilised powder was obtained before adding artificial bezoar, realgar, margarita and borneol, 4 flavours of the drug well mixed. **Conclusion** The optimized extraction of Xiaoer Huadu powder is reasonable and feasible, which provides reference for the secondary development of Xiaoer Huadu powder.

Key words: Xiaoer Huadu powder; Box-Behnken response surface method; pharmacodynamic screening; extraction technology

基金项目: 国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项 (No.2022YFC3501900); 中国中医科学院科技创新工程项目资助 (No. CI202104301, No.CI202104305, No.CI2021B014)。

作者简介: 徐卓, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药新剂型及中药新药开发方面的研究, email: xuzhuo0222@163.com *通信作者: 刘宇灵, 女, 硕士研究生导师, 副研究员, 主要从事中药新剂型及中药新药开发方面的研究, email: liuyulinglyl@163.com; 李慧, 女, 博士研究生导师, 研究员, 主要从事中药新剂型及中药新药开发方面的研究, email: lihuizys@126.com

小儿化毒散是中医儿科经典方剂,源于明代《痘疹金镜录》赛金化毒散,现收录于 2020 年版《中国药典》。该方由人工牛黄、珍珠、雄黄、大黄、黄连、天花粉、川贝母、赤芍、乳香、没药、冰片、甘草 12 味药组成,具有清热解毒、活血消肿的功效,用于热毒内蕴、毒邪未尽所致的口疮肿痛、疮疡溃烂、烦躁口渴、大便秘结^[1]。本方牛黄清热解毒,大黄解毒活血消肿、泄热通便,合用清热解毒之力更著,为君药。黄连清热泻火、燥湿解毒,珍珠清热解毒、生肌敛疮,雄黄解毒消肿,川贝母、天花粉清热化痰、散结解毒、消肿排脓,共为臣药。赤芍、乳香、没药凉血活血祛瘀、消肿生肌止痛,冰片清热止痛,具有内清外透之力,共为佐药。甘草清热解毒,又能调和诸药,而为佐使药。诸药合用,共奏清热解毒,活血消肿之功^[2]。小儿化毒散在现代临床多单独或联合用于治疗小儿口腔溃疡^[3-4]、口角炎^[5]、急性扁桃体炎^[5-7]、手足口病^[8]等。当其用于小儿口腔溃疡时,用法为“外用,敷于患处”,而在临床使用过程中,受唾液影响,一部分的散剂会随唾液流散,导致药物滞留在病灶部位时间过短,影响给药剂量的准确性进而降低生物利用度,直接影响疗效^[9]。因此,推动小儿化毒散剂型的升级成为小儿化毒散二次开发的重点。

小儿化毒散处方量大,药味组成复杂,为减少载药量,保证制剂的质量和疗效,本研究采用药效学指标结合化学指标的筛选方式优选小儿化毒散提取工艺。课题组拟设计 3 种针对小儿化毒散的提取工艺路线,对各提取物进行药效实验确定最佳提取路线,再基于 G1-熵权法结合 Box-Behnken 响应面法对最佳提取工艺参数进行优化,并进行提取工艺和药理实验的验证,获得疗效确切、工艺稳定的小儿化毒散提取物,为后期二次开发提供稳定可行的药物。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters e2695-2998 型高效液相色谱仪(美国沃特世公司);XP105 型 1/10 万电子分析天平、ML3002/02 型电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);DK-98-II A 型电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司);DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱(杭州艾普仪器设备有限公司);BRANSON 3510 型超声仪(美国 Branson 公司);DFT-50A 50 克手提式高速万能粉碎机(温岭市林大机械有限公司);LGJ-10E 冷冻干燥机(北京四环福瑞科仪科技发展有限公司);EYELA-N1100 旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司);98-I-BN 电子调温电热套(天津市泰斯特仪器有限公司);HC-2066

高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司)。

1.2 试药

对照品芦荟大黄素(批号:110795-202011,质量分数 97.5%)、大黄酚(批号:110796-201922,质量分数 99.4%)、大黄酸(批号:110757-201607,质量分数 99.3%)、大黄素(批号:110756-201913,质量分数 96%)、盐酸小檗碱(批号:110713-201613,质量分数 86.8%)(中国食品药品检定研究院)。

三氯甲烷(批号:20240116,北京市通广精细化工公司);磷酸二氢钾(批号:20161102)、十二烷基硫酸钠(批号:20200923)[福晨(天津)化学试剂有限公司];水为娃哈哈纯净水,甲醇、乙腈(色谱纯,赛默飞世尔科技公司);磷酸(色谱纯,天津市大茂化学试剂厂),其余试剂均为分析纯。

人工牛黄(批号:Z10950107,四川菲德力制药有限公司);雄黄(批号:2212001)、珍珠(批号:2301001)(安国市瑞峰背冷中药材有限公司);冰片(批号:20240308,四川青神康华制药有限公司);药材大黄(批号:221129006)、黄连(批号:220625003)、甘草(批号:220722003)、天花粉(批号:220622003)、醋乳香(批号:220920007)、醋没药(批号:220920008)、赤芍(批号:220107004)(北京仟草中药饮片有限公司);药材川贝母(批号:2308001,安国市昌达中药材饮片有限公司)。所有药材均由中国中医科学院中药资源中心詹志来研究员鉴定,均符合 2020 年版《中国药典》标准。小儿化毒散(批号:230803,规格:0.6 g×10 袋,健民药业集团股份有限公司)。

1.3 实验动物

幼龄雄性 SD 大鼠,3~4 周龄,SPF 级,体重约 70 g[斯贝福(北京,中国)实验动物科技有限公司,许可证号:SCXK(京)2019-0010]。大鼠在标准动物实验室中适应性饲养 1 周。所有实验和程序均符合中国科学技术部颁布的《实验动物管理条例》和中国中医科学院动物实验伦理委员会批准的方案(伦理号 2023B345)。

2 方法与结果

2.1 基于口腔溃疡愈合作用筛选小儿化毒散提取工艺

2.1.1 样品的制备

① 工艺路线一:按照处方称取药材饮片大黄、黄连、甘草、天花粉、川贝母、赤芍、乳香和没药 8 味药,加 10 倍水回流提取 3 次,每次提取 1 h,将提取液浓缩成相对密度约为 1.05 的清膏,冷冻干燥后得到冻干粉,将人工牛黄、雄黄、冰片、珍珠加入冻干粉中用高速万能粉碎机粉碎混合^[10],过 7 号筛,备用。

② 工艺路线二: 按照处方称取药材饮片大黄、黄连、甘草、天花粉、川贝母、赤芍、乳香和没药 8 味药, 加 10 倍 70% 乙醇回流提取 3 次, 每次提取 1 h, 提取液浓缩至无醇味, 将稠膏冷冻干燥后得到冻干粉, 将人工牛黄、雄黄、冰片、珍珠加入冻干粉中用高速万能粉碎机粉碎混合, 过 7 号筛, 备用。

③ 工艺路线三: 将大黄、黄连、乳香、没药 4 味药加入 10 倍 70% 乙醇回流提取 3 次, 每次提取 1 h, 保留滤液; 将甘草、天花粉、川贝母、赤芍 4 味药加水回流提取 3 次, 加 8 倍水, 每次提取 1 h, 过滤, 合并滤液, 浓缩成相对密度约为 1.05 的清膏, 冷冻干燥后得到冻干粉, 将人工牛黄、雄黄、冰片、珍珠加入冻干粉中用高速万能粉碎机粉碎混合, 过 7 号筛, 备用。

2.1.2 大鼠口腔溃疡模型建立 采用组织切除方法制备创伤性口腔溃疡模型^[11-13]。选择幼龄雄性 SD 大鼠, 用 2% 戊巴比妥钠将大鼠麻醉, 使用圆形皮肤打孔器在大鼠唇内侧黏膜形成直径为 2 mm、深度为 1 mm 的圆形创面。24 h 后, 观察大鼠口腔溃疡形成情况, 实验区出现明显溃疡, 表面呈黄白色, 部分有溃烂、渗出等现象, 表明造模成功。

2.1.3 分组及给药 将大鼠随机分成模型组、工艺路线一组、工艺路线二组、工艺路线三组, 每组 6 只。为增加药物与溃疡接触时间, 将药物与 1% 壳聚糖溶液混合后冻干制成直径为 3 mm 的冻干膜^[14-16] (含生药量约为 $0.7 \text{ mg} \cdot \text{mm}^{-2}$) 进行给药, 给药后禁食禁水 30 min, 每日 1 次。

2.1.4 溃疡创面形态观察 拍摄第 0 日和第 8 日溃疡面情况。Image J 1.46 软件计算第 0 日 (W_0) 和第 8 日 (W_8) 的溃疡面积, 计算溃疡面积比, 溃疡面积比 (%) = $W_8/W_0 \times 100\%$ 。统计各组大鼠给药 8 d 后口腔溃疡情况, 从图 1 可看出, 模型组的溃疡面积比为 $(36.26 \pm 7.38)\%$, 而经过 8 d 的治疗后, 工艺路线一组、工艺路线二组、工艺路线三组溃疡面积比分别为 $(4.84 \pm 3.14)\%$ 、 $(4.98 \pm 4.72)\%$ 及 $(8.84 \pm 8.71)\%$ 。与模型组相比, 3 种提取物组的溃疡面积显著减小, 表明 3 种提取工艺均表现出良好的治疗效果, 其中工艺路线一的提取物治疗效果最佳。

2.1.5 组织病理学变化 给药第 8 日时取各大鼠溃疡部位的黏膜组织, 用 4% 多聚甲醛固定, 用 HE 染色。观察大鼠溃疡黏膜组织病理变化, 并对其进行量化评分^[16]。评分标准如下: ① 口腔黏膜上皮受损、糜烂, 黏膜组织水肿, 上皮细胞排列紊乱; ② 炎症细胞浸润; ③ 新生肉芽组织和血管充血。对上述表观指标进行量化积分, 分为无、

轻度、中度、重度 4 级, 分别计 0、1、2、3 分。

如图 2 所示, 正常大鼠口腔黏膜的 HE 染色结果可以看到完整的黏膜结构, 未见炎症细胞浸润; 模型组大鼠溃疡局部上皮层破损严重, 细胞排列杂乱, 有较多炎症细胞浸润和肉芽组织生成。3 种提取物组与模型组相比均减少了炎症细胞浸润, 黏膜结构也较为完整, 在结缔组织中有新生血管和肉芽组织。进一步进行组织病理学评分, 评分越高代表溃疡越严重。结果如图 2 所示, 评分结果从高到低依次为模型组 > 工艺路线三组 > 工艺路线二组 > 工艺路线一组, 表明工艺路线一组的愈合效果最好, 与上述溃疡面积比统计结果一致。综合溃疡面积比和组织病理评分可知, 工艺路线一促进口腔溃疡愈合效果最佳, 故选择工艺路线一继续进行提取工艺优化考察。

2.2 工艺优化

2.2.1 芦荟大黄素、大黄酚、大黄酸、大黄素含量测定

① 色谱条件: 色谱柱为 GL Sciences Inertsil ODS-HL C18 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇 (A) - 0.1% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 25 min, 80% ~ 85%A; 25 ~ 40 min, 85%A; 40 ~ 45 min, 85% ~ 80%A); 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长 254 nm; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL。

② 对照品溶液制备: 精密称取对照品芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚适量, 加甲醇配制成质量浓度为 31.44、18.27、17.32、18.17 μg · mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

③ 供试品及阴性样品溶液制备: 精密吸取水提液 25 mL, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定重量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过。精密量取续滤液 10 mL, 置烧瓶中, 挥去溶剂, 加 8% 盐酸溶液 10 mL, 超声处理 2 min, 再加入三氯甲烷 10 mL, 加热回流 1 h, 放冷, 置分液漏斗中, 取三氯甲烷层, 酸液再用三氯甲烷提取 3 次, 合并三氯甲烷层, 减压回收溶剂至干, 残渣加甲醇溶解, 转移至 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

同工艺路线一制备缺大黄药材饮片和缺黄连药材饮片的阴性样品, 并按上述方法制备相应的阴性样品溶液。

④ 方法学考察: 根据《中国药典》2020 年版, 分别从精密度、重复性、稳定性、加样回收率以及线性关系对芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚的方法学进行了考察。其中精密度实验中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚峰面积的

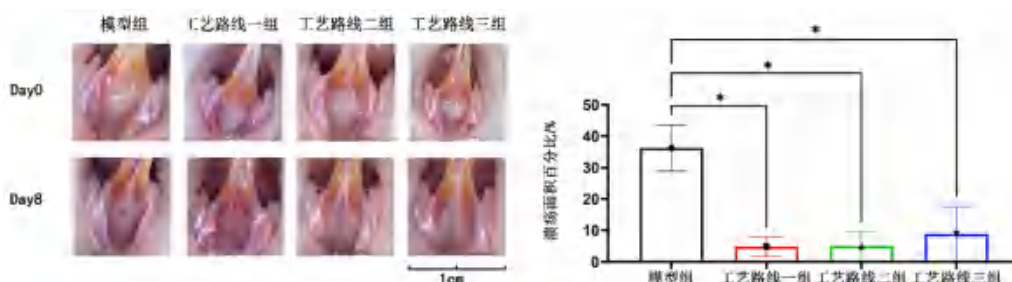


图 1 小儿化毒散不同工艺提取物组治疗 8 d 后的溃疡面积代表性图片和溃疡面积比 (* $P < 0.05$)

Fig 1 Representative pictures of ulcer areas and ulcer area ratios after 8 days of treatment with different extract groups of Xiaoer Huadu powder (* $P < 0.05$)

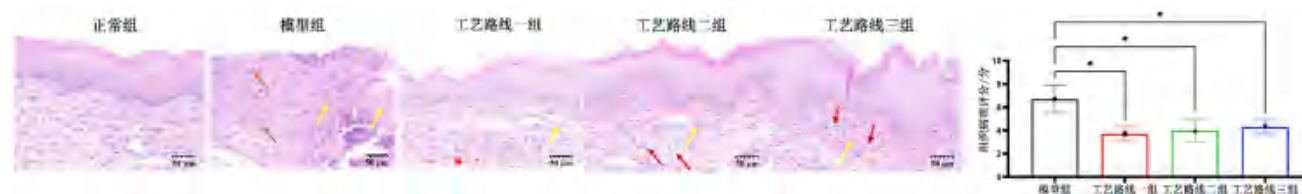


图 2 小儿化毒散不同工艺提取物组治疗 8 d 后的 HE 染色图和组织病理评分 (* $P < 0.05$)

Fig 2 HE staining and histopathological scores after 8 days of treatment with different extracts groups of Xiao Huadu powder (* $P < 0.05$)

注: 黄色箭头代表肉芽组织; 红色箭头代表血管; 橙色箭头代表炎症浸润。

Note: Yellow arrows represent granulation tissue; red arrows represent blood vessels; orange arrows represent inflammatory infiltration.

RSD 值 分 别 为 0.28%、1.7%、0.58% 及 0.60%，表明仪器系统精密度良好；重复性实验结果芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚峰面积的 RSD 值分别为 1.9%、2.5%、2.6% 及 2.4%，表明所建立的方法重复性良好；稳定性实验结果芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚峰面积的 RSD 值分别为 2.1%、1.2%、2.1% 及 2.5%，表明供试品溶液在室温密闭条件下放置 24 h 稳定性良好；4 种成分的平均加样回收率均大于 96%，表明所建立的含量测定方法准确度良好；线性相关系数 R^2 均大于 0.999。混合对照品、缺大黄阴性供试品及工艺路线一组样品的专属性色谱图见图 3，工艺路线一组样品与对照品在相同时间点出现同一色谱峰，阴性样品无干扰，专属性符合要求。

2.2.2 小檗碱含量测定

① 色谱条件：参考 2020 年版《中国药典》^[1] 一部“黄连”项下含量测定方法，色谱柱为 GL Sciences Inertsil ODS-HL C18 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m)；以乙腈-0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液 (50 : 50) (每 100 mL 中加十二烷基硫酸钠 0.40 g，再以磷酸调节 pH 值为 4.0) 为流动相；流速 1.0 mL·min⁻¹；检测波长 345 nm；柱温 30 $^{\circ}$ C；进样量 10 μ L。

② 对照品溶液制备：精密称取对照品盐酸小檗碱，加甲醇配制成质量浓度为 77.43 μ g·mL⁻¹ 的对照品溶液。

③ 供试品溶液制备：精密吸取水提液 25 mL 于 50 mL 量瓶中，精密加入甲醇-盐酸 (100 : 1, V/V) 的混合溶液，超声处理 (功率 250 W，频

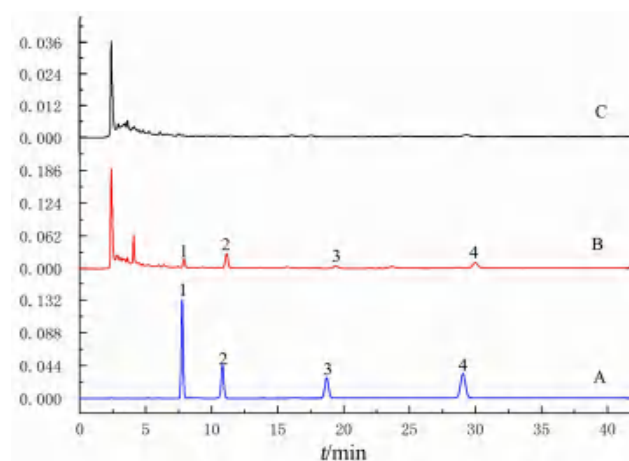


图 3 大黄专属性考察 HPLC 色谱图

Fig 3 HPLC chromatogram of Rheum palmatum examined for its exclusivity

A. 混合对照品溶液 (mixed reference solution) ; B. 供试品溶液 (sample solution) ; C. 缺大黄阴性供试品溶液 (negative solution without Rheum palmatum) ; 1. 芦荟大黄素 (aloe-emodin) ; 2. 大黄酸 (rhein) ; 3. 大黄素 (emodin) ; 4. 大黄酚 (chrysophanol)

率 40 kHz) 30 min，放冷，定容至刻度线，摇匀，滤过，取续滤液，即得供试品溶液。

④ 方法学考察：根据《中国药典》2020 年版，分别从精密度、重复性、稳定性、加样回收率和线性关系对小檗碱的方法学进行考察。其中精密度、重复性和稳定性的 $RSD < 1\%$ ，平均加样回收率 $> 97\%$ ，线性相关系数 $R^2 = 0.9999$ 。小檗碱对照品及工艺路线一组样品的专属性色谱图见图 4，工艺路线一组样品与对照品在相同时间点出现同一色谱峰，阴性样品无干扰，专属性符合要求。

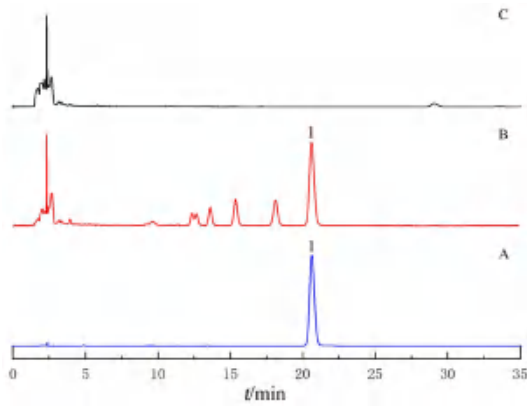


图 4 黄连专属性考察 HPLC 色谱图

Fig 4 HPLC chromatogram of Coptidis rhizoma examined for its exclusivity

A. 对照品溶液 (reference solution); B. 供试品溶液 (sample solution); C. 缺黄连阴性供试品溶液 (negative solution without Coptidis rhizoma); 1. 小檗碱 (berberine)

2.2.3 出膏率测定 精密量取 50 mL 药液放入已恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干, 再在 105 °C 烘箱中干燥 3 h, 取出, 置干燥器中冷却, 精密称定质量, 计算出膏率^[18]。

2.2.4 评价指标综合赋权

① G1 主观赋权: 根据君臣佐使原则, 确定本方中 6 个评价指标的序关系为芦荟大黄素 (y_1) = 大黄酸 (y_2) = 大黄素 (y_3) = 大黄酚 (y_4) > 小檗碱 (y_5) > 出膏率 (y_6)。随后确定相邻指标间的相对重要评价标度为 r_2 (y_1/y_2) = 1, r_3 (y_2/y_3) = 1, r_4 (y_3/y_4) = 1, r_5 (y_4/y_5) = 1.3, r_6 (y_5/y_6) = 1.3^[19-20], 最后根据公式 (1)、(2) 计算各指标的主观权重系数 (ω_k)。

$$\omega_k = 1 / (1 + \sum_{i=2}^n \prod_{i=k}^n r_i) \quad (1)$$

$$\omega_{k-1} = r_i \omega_k \quad (2)$$

$k = n, n-1, \dots, 2$ (n 代表评价指标个数), 为相邻指标的相对重要评价标度, 代表相邻指标中重要程度较低的指标顺序 (2, 3, $\dots$, n)。

② 熵权法计算客观权重系数: 采用 Matlab 软件实现熵权法的权重计算^[21], 首先对各指标进行归一化处理, 再计算各指标的熵值, 最后确定各指标的权重系数 (ω_e)。

③ 组合权重确定: 将 G1 法得到的权重 (ω_k) 和熵权法得到的权重 (ω_e) 通过公式 (3) 计算组合权重 (ω_j), 得到各指标的 ω_j 结果如表 1 所示。

$$\omega_j = \omega_k \omega_e / \sum_{i=1}^6 \omega_k \omega_e \quad (3)$$

④ 综合评分: 采用 6 个评分指标的组合权重, 根据公式 (4) 计算综合评分 (H):

$$H = \sum_{j=1}^6 (100\omega_j y_j) / y_{jmax} \quad (4)$$

表 1 6 个评价指标的权重计算结果

Tab 1 Calculation of the weights of the six evaluation indicators

评分指标	ω_k	ω_e	ω_j
芦荟大黄素	0.19	0.20	0.22
大黄酸	0.19	0.14	0.15
大黄素	0.19	0.21	0.23
大黄酚	0.19	0.18	0.20
小檗碱	0.14	0.12	0.10
出膏率	0.11	0.15	0.10

2.2.5 响应面法优化小儿化毒散工艺参数

① Box-Behnken 响应面设计方法与结果: 以加水倍数 (A)、浸泡时间 (B)、提取时间 (C) 及提取次数 (D) 为自变量, 综合评分为因变量, 共设计 29 组响应面实验。按照 “2.2.1” “2.2.2” 和 “2.2.3” 项下条件测定, 分别计算 5 种指标成分及出膏率, 结合 “2.2.4” 项下组合权重进行综合评分, 结果见表 2。

② 模型建立与方差分析: 应用 Design-Expert 12 软件对表 2 数据进行多元回归拟合, 因素 A、B、C、D 与综合评分 (H) 之间的二次多项回归方程 $H = 104.91 - 1.49A - 0.22B - 84.71C - 15.78D + 0.064AB + 5.41AC + 4.10AD - 0.32BC - 0.02BD + 8.04CD - 0.67A^2 + 0.004B^2 + 11.35C^2 - 4.30D^2$ ($R^2 = 0.8908$)。进一步对模型进行方差分析, 结果见表 3。该模型 $P < 0.001$, 说明模型具有显著性意义。失拟项 $P = 0.1279 > 0.05$, 失拟项不显著, 表明可以用该模型进行分析和预测。其中, 因素 A、C、D 的 P 值均小于 0.001, 表明加水倍数、提取时间和提取次数对综合评分具有显著性影响, 而浸泡时间对综合评分无显著性影响, 其影响顺序为提取次数 > 加水倍数 > 提取时间 > 浸泡时间。各因素之间的交互作用均无显著性, 表明因素之间的交互作用对提取工艺影响不显著。

③ 响应面分析与预测: 使用 Design-Expert 12 软件绘制各因素交互作用的响应面图, 如图 5 所示, 响应面图曲线越陡, 表示影响越显著, 倾斜度越高, 证明两者相互作用越明显, 因素 D 与其他因素的交互影响作用较强, 而其他因素之间交互作用不明显。根据所建模型回归方程选择小儿化毒散的最佳提取工艺为加水倍数 11.939 倍, 浸泡 17.49 min, 提取时间 1.986 h, 提取次数 2.998 次。结合实际情况选择提取工艺加入 12 倍水, 浸泡 15 min, 提取时间 2 h, 提取次数 3 次, 预测的综合评分为 103.52。

2.2.6 提取工艺验证 取 3 批小儿化毒散按照最佳提取工艺进行 3 次实验验证。按 “2.2.1” 和 “2.2.2” 项下方法制备供试品溶液, 测定各成分含量, 结果芦荟大黄素平均含量为 217.04 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 大黄酸

表 2 响应面法设计方案及结果

Tab 2 Response surface method design options

编号	因素				含量 / ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)					出膏率 / %	综合评分
	A 加水 倍数	B 浸泡 时间 / min	C 提取 时间 / h	D 提取 次数 / 次	芦荟 大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	小檗碱		
1	10	45	1.5	3	115.08	504.70	103.25	187.73	2713.14	37.89	69.44
2	10	45	2	2	122.90	562.21	122.14	161.42	2080.76	33.80	69.26
3	10	15	2	2	110.43	474.95	156.69	210.37	2205.35	36.28	75.26
4	10	30	1.5	2	89.99	418.24	64.36	143.87	2025.59	33.31	52.82
5	10	30	1	3	119.88	585.68	128.32	197.96	2536.64	34.28	74.33
6	8	30	1	2	110.96	365.24	83.26	167.36	1760.77	31.85	56.90
7	10	30	2	1	57.01	224.13	40.94	79.65	1278.47	25.08	32.98
8	8	30	1.5	1	47.11	151.27	40.00	73.18	1168.50	23.20	28.97
9	8	30	2	2	98.21	366.80	90.18	149.90	2012.67	32.02	56.44
10	8	15	1.5	2	89.38	356.04	65.08	148.62	1853.29	30.93	50.62
11	10	45	1	2	104.20	448.57	94.62	168.45	2009.57	33.46	60.92
12	10	30	1.5	2	92.88	482.43	85.41	147.36	2130.75	32.46	57.91
13	12	30	1	2	54.08	316.34	69.03	170.95	2232.08	32.26	49.60
14	8	30	1.5	3	91.00	363.32	58.74	151.97	2231.55	35.04	52.69
15	12	15	1.5	2	89.24	412.10	67.54	143.52	2414.19	33.69	54.57
16	12	30	2	2	132.09	382.43	108.37	229.64	2521.19	35.39	70.77
17	10	15	1	2	101.08	391.71	95.43	160.59	1862.85	29.03	57.36
18	8	45	1.5	2	100.41	371.89	83.72	156.52	2091.35	32.15	56.57
19	12	30	1.5	3	196.99	693.45	151.45	320.03	2739.13	37.52	97.47
20	10	15	1.5	1	58.36	307.10	62.76	101.77	1339.34	25.38	39.67
21	12	30	1.5	1	64.08	276.18	60.82	104.79	1670.03	25.95	40.93
22	10	15	1.5	3	116.90	597.62	100.78	177.70	2564.59	36.55	69.67
23	10	45	1.5	1	74.74	271.66	60.72	95.31	1512.39	25.01	40.59
24	10	30	1	1	57.18	222.38	56.54	91.58	993.00	23.84	34.61
25	10	30	2	3	159.80	757.35	150.26	223.96	2837.07	36.75	88.79
26	10	30	1.5	2	120.13	521.74	92.17	161.99	2144.65	32.45	63.65
27	12	45	1.5	2	124.16	500.64	112.47	176.97	2103.83	33.39	67.65
28	10	30	1.5	2	102.94	450.09	104.94	159.81	2451.38	32.38	63.13
29	10	30	1.5	2	104.80	395.64	92.58	165.77	2536.09	33.79	61.45

表 3 回归模型方差分析结果

Tab 3 ANOVA of regression model

方差来源	均方和	自由度	离差平方和	F 值	P 值
Model	6180.85	14	441.49	8.16	0.0002
A	517.47	1	517.47	9.56	0.0079
B	24.84	1	24.84	0.4592	0.509
C	297.71	1	297.71	5.5	0.0342
D	4588.41	1	4588.41	84.81	< 0.0001
AB	12.72	1	12.72	0.2352	0.6352
AC	117.05	1	117.05	2.16	0.1634
AD	269.44	1	269.44	4.98	0.0425
BC	22.91	1	22.91	0.4234	0.5258
BD	0.3336	1	0.3336	0.0062	0.9385
CD	64.71	1	64.71	1.2	0.2926
A ²	46.13	1	46.13	0.8526	0.3715
B ²	5.07	1	5.07	0.0937	0.764
C ²	52.25	1	52.25	0.9657	0.3424
D ²	119.85	1	119.85	2.22	0.1588
残差	757.47	14	54.11		
失拟项	676.57	10	67.66	3.35	0.1279
绝对误差	80.9	4	20.23		
总差	6938.33	28			

平均含量为 $557.02 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ，大黄素平均含量为 $170.56 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ，大黄酚平均含量为 $339.84 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ，小檗碱平均含量为 $3288.25 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ，3 次实验的实际评分平均值为 102.32，RSD 值为 2.1%，表明提取工艺稳定。

2.2.7 药理实验验证 同“2.1.2”项下方法建立大鼠口腔溃疡模型，将大鼠随机分成模型组、原药组、验证组，每组 6 只，原药组给予小儿化毒散，验证组给予优化后工艺路线一组药物，给药方式同“2.1.3”。给药 8 d 后观察溃疡创面形态并拍照，计算溃疡面积比。各组代表性图片如图 6 所示，各组大鼠口腔溃疡均有不同程度的愈合。模型组的溃疡面积比由第 0 日的 $(55.98 \pm 10.25) \%$ 降为第 8 日的 $(50.97 \pm 6.55) \%$ ，而原药组和验证组第 8 日的溃疡面积比分别为 $(38.75 \pm 7.94) \%$ 、 $(14.46 \pm 4.82) \%$ ，表明小儿化毒散具有促进大鼠口腔溃疡愈合作用。同时与原药组相比，经过提取优化后的验证组表现出更佳的溃疡愈合效果。给药第 8 日时取各大鼠溃疡部位的黏膜组织，用于 HE 染色。结果如图 7 所

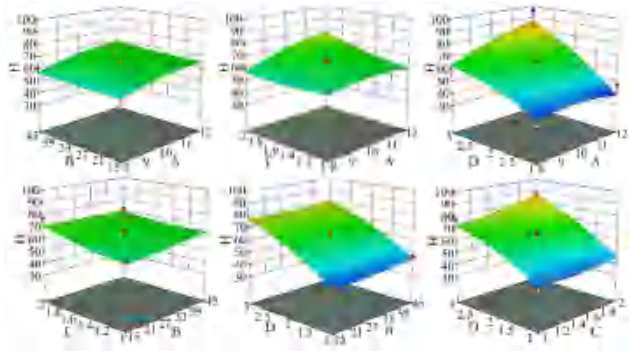


图 5 各因素交互作用对小儿化毒散工艺综合评分影响的响应面图
Fig 5 Response surface plot of the effect of interaction of factors on composite score of Xiaer Huadu powder

示,模型组溃疡局部组织上皮层破损严重,细胞排列杂乱,有较多肉芽组织生成。原药组和验证组均有完整上皮结构,但是原药组上皮层较厚,角质层

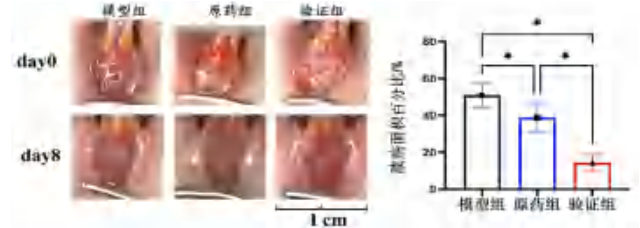


图 6 各组治疗 8 d 后的溃疡面积代表性和溃疡面积比 (* $P < 0.05$)
Fig 6 Representative pictures of ulcer area and ulcer area ratio after 8 days of treatment in each group (* $P < 0.05$)

增生较为明显,进一步进行组织病理学评分,从高低依次为模型组>原药组>验证组,表明验证组的愈合效果最好,与上述溃疡面积比统计结果一致。综合溃疡面积比和组织病理评分表明,与原药组相比,经过提取优化工艺得到的小儿化毒散提取物具有更好的促溃疡愈合疗效。

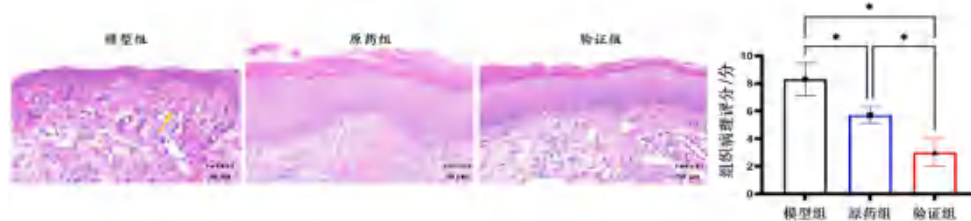


图 7 各组治疗 8 d 后的 HE 染色图和组织病理评分 (* $P < 0.05$)
Fig 7 HE staining and histopathological scores after 8 days of treatment in each group (* $P < 0.05$)
注 (Note): 黄色箭头代表肉芽组织 (Yellow arrow represents granulation tissue)。

2.3 统计学方法

通过 GraphPad Prism 软件 (版本 9.5.0) 进行单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和多重比较评估组间差异。通过 Brown-Forsythe 检验验证各组数据的正态性,并采用 Bartlett 检验确认组间方差齐性 ($P < 0.05$)。

3 讨论

儿童及青少年是创伤性口腔溃疡的多发人群^[22-23],小儿化毒散具有较好的解毒生肌作用,其外用于口腔溃疡的临床有效率达 95% 以上^[3],因此作为儿童创伤性口腔溃疡药物极具研究价值。本研究前期根据各药味性质设计了 3 种提取工艺方案,并参考其临床适应证构建了创伤性口腔溃疡模型,对比不同提取物对创伤性口腔溃疡的治疗作用,通过药效学指标筛选出工艺路线一作为小儿化毒散的提取工艺进行后续工艺优化。参照 2020 年版《中国药典》和相关文献,选择君药大黄中的芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚与臣药黄连中的小檗碱 5 种成分作为指标成分,研究表明大黄可能通过调节免疫炎症以及促进创伤愈合等反应达到治疗口腔溃疡的目的^[24];研究表明黄连可改善口腔溃疡大鼠微循环,维持 Th1/Th2 细胞在体内平衡状态,其作用机制可能与抑

制 MAPK/ERK 通路相关^[25]。本实验应用 G1 法结合熵权法计算以上 5 种指标成分和出膏率作为评价指标的权重系数,进而确定综合评分值,兼顾主观性和指标的内在联系,使小儿化毒散提取工艺的多指标综合评价更加科学合理^[26-27]。响应面可有效减少实验次数,已被广泛应用于中药提取及制剂制备中^[28],通过上述方法优选小儿化毒散最佳提取工艺参数,所得综合评分高,模型拟合度高,具有良好的预测能力,为小儿化毒散研究获得更加全面客观的分析结果。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版.一部[M]. 2020: 554-554.
- [2] 肖飞,赵厚睿,向希雄,等.小儿化毒散临床应用探讨[J].世界中医药,2015,10(11):1806-1807.
- [3] 王娟.观察小儿化毒散治疗小儿口腔溃疡的临床疗效[J].中外女性健康研究,2018(20):102,191.
- [4] 赵浩堂,张璇,陈庆梅,等.小儿化毒散治疗小儿口腔溃疡 78 例的疗效观察[J].世界中医药,2016,11(4):653-655.
- [5] 李华浚.小儿化毒散联合甘草锌治疗疱疹性咽峡炎的疗效分析目的探讨小儿化毒散联合甘草锌治疗疱疹性咽峡炎的临床效果[A]/2018 年浙江省医学会儿科学分会学术年会论文汇编[C].绍兴市人民医院,2018.
- [6] 丁冬胜,邹敏书,聂国明.小儿化毒散治疗小儿急性化脓

- 性扁桃体炎临床疗效观察[J]. 华南国防医学杂志, 2015, 29(1): 66-67.
- [7] 王利平, 廖琴. 小儿化毒散与抗生素联合治疗小儿急性化脓性扁桃体炎的效果分析[J]. 家庭医药就医选药, 2018(8): 183-184.
- [8] 王旭琴, 王华萍, 赵青青. 小儿化毒散辅助治疗手足口病 48 例临床疗效观察与护理体会[J]. 新中医, 2015, 47(12): 263-265.
- [9] 刘梓琛, 郭宁, 吴飞, 等. 中药散剂在口腔黏膜部位临床使用与制备的关键问题探讨[J]. 南京中医药大学学报, 2023, 39(1): 84-92.
- [10] 杨艳君. 粒子设计技术提升珠黄吹喉散质量的应用研究[D]. 咸阳: 陕西中医药大学, 2021.
- [11] Silva PGB, de Codes ÉBB, Freitas MO, et al. Experimental model of oral ulcer in mice: comparing wound healing in three immunologically distinct animal lines[J]. J Oral Maxillofac Pathol, 2018, 22(3): 444.
- [12] 郑利光, 翟所迪. 甘草锌膜对实验性口腔溃疡的治疗作用及黏膜刺激性研究[J]. 中国新药杂志, 2006, 15(8): 601-603.
- [13] Wicaksono S, Nugraha AP, Rahmahani J, et al. Adipose mesenchymal stem cell metabolites oral gel enhance pro-angiogenic factors expression, angiogenesis, and clinical outcome of oral ulcer rat model[J]. Eur J Dent, 2024, 18(1): 117-123.
- [14] 杜梓萱. 复方珍珠膏制备工艺及质量标准研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [15] 邱玥. 实脾消水凝胶贴膏的制备工艺及质量标准研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [16] 郑蕾, 李国芳, 杨盼盼, 等. 益气养阴生肌方对大鼠口腔溃疡创面愈合的作用及 PTEN/AKT/GSK3 β 通路的机制研究[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(3): 157-162.
- [17] 林晓钰, 魏吉昌, 赵一航, 等. 基于中药超分子化学探究大黄-黄连配伍不同煎煮方式的物质基础差异[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(18): 4948-4956.
- [18] 熊丹, 蒋翠平, 牛江进, 等. G1-熵权法结合 Box-Behnken 响应面法优化银星养脑方醇提工艺[J]. 中南药学, 2024, 22(7): 1742-1747.
- [19] 程炳铎, 罗丽琴, 李元增, 等. 基于 G1-熵权法的正交实验设计对比 BP 神经网络优化香薷解热颗粒水提工艺[J]. 中国药房, 2024, 35(1): 27-32.
- [20] 艾尼玩尔·买提库尔班, 马桂芝, 滕亮. 基于 Box-Behnken 响应面法与 BP 神经网络优化雪莲药渣化学成分提取工艺[J]. 中南药学, 2024, 22(4): 923-929.
- [21] 吉部肖情, 李丽, 阮婧华, 等. 正交设计和 BP 神经网络结合 G1-熵权法对比优化羌活附片颗粒水提工艺[J]. 中草药, 2022, 53(4): 1051-1058.
- [22] Zeng YY, Gao YJ, He LM, et al. Multifunctional polysaccharide composited microneedle for oral ulcers healing[J]. Mater Today Bio, 2023, 22: 100782.
- [23] 林婷, 江新香, 唐国瑶. 儿童及青少年自伤性口腔溃疡研究进展[J]. 临床口腔医学杂志, 2024, 40(8): 507-510.
- [24] 张嘉宁, 任越, 王梓安, 等. 桂林西瓜霜治疗口腔溃疡的潜在作用机制与药效物质基础研究[J]. 中南药学, 2023, 21(6): 1429-1435.
- [25] 刘苗苗, 崔月曦, 郑勇, 等. 川黄连调控 MAPK/ERK 通路对口腔溃疡大鼠微循环及 Th1/Th2 细胞因子的作用[J]. 药物评价研究, 2024, 47(2): 323-330.
- [26] 赵雪莲, 兰建龙, 杨正明, 等. 基于响应面和 G1-熵权法优选彝药痛风颗粒提取工艺及其药效评价[J]. 中草药, 2022, 53(12): 3653-3661.
- [27] 王继龙, 魏舒畅, 刘永琦, 等. 基于 G1-熵权法和正交设计优选黄芪百合颗粒的提取纯化工艺[J]. 中草药, 2018, 49(3): 596-603.
- [28] 王星星, 张艳军, 朱秀辉, 等. 基于质量源于设计理念优化参蒲盆炎颗粒喷雾干燥工艺[J]. 中草药, 2019, 50(6): 1334-1340.

(收稿日期: 2024-11-05; 修回日期: 2025-02-11)

鸡骨草石油醚萃取物对四氯化碳诱导肝纤维化小鼠调节作用的代谢组学研究

赵静玉¹, 吴芳芳², 朱琳¹, 彭应珍¹, 姜珊¹, 孙慧峰^{1*}, 张宁^{1*} (1. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040; 2. 广西中医药大学, 中药壮瑶药创新药物教育部工程研究中心, 南宁 530200)

摘要: **目的** 基于药效学及代谢组学探讨鸡骨草对四氯化碳 (CCl₄) 诱导 C57BL/6J 小鼠肝纤维化的保护作用及机制。**方法** 将 40 只 C57BL/6J 小鼠随机分为空白组、模型组、水飞蓟宾组、鸡骨草组, 采用腹腔注射 20% CCl₄ 诱导小鼠肝纤维化模型, 通过肝脏指数、血清生化指标、组织病理学检查、ELISA 法检测肝纤维化相关指标、免疫组化检测肝纤维化相关蛋白表达来评价鸡骨草对肝纤维化的防治作用。采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术结合多元统计方法筛选差异代谢物, 并进行代谢通路分析。**结果** 鸡骨草给药干预可显著降低小鼠肝脏指数, 有效改善血脂及肝功能异常情况; 显著降低肝脏透明质酸 (HA)、Ⅲ型前胶原表达及肝脏 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、I 型胶原蛋白表达水平。代谢组学共筛选出 γ -谷氨酰亮氨酸、L-色氨酸等 7 种差异代谢产物, 共涉及色氨酸代谢、嘌呤代谢、甘油磷脂代谢、初级胆汁酸生物合成、牛磺酸和次牛磺酸代谢 5 条代谢途径。**结论** 鸡骨草可有效改善 CCl₄ 诱导的肝纤维化模型相关病理改变, 可能通过色氨酸代谢、嘌呤代谢等代谢途径发挥作用。

关键词: 鸡骨草; 肝纤维化; 药效学研究; UPLC-Q-TOF-MS/MS

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)04-1029-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.024

Metabolomics of the therapeutic effect of *Abrus cantoniensis* Hance on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in mice and related mechanism

ZHAO Jing-yu¹, WU Fang-fang², ZHU Lin¹, PENG Ying-zhen¹, JIANG Shan¹, SUN Hui-feng^{1*}, ZHANG Ning^{1*} (1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040; 2. Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Engineering Research Center for Innovative Drugs of Traditional Zhuang and Yao Medicine, Ministry of Education, Nanning 530200)

Abstract: Objective To determine the effect of *Abrus cantoniensis* Hance on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in C57BL/6J mice with pharmacodynamics and metabolomics. **Methods** Forty C57BL/6J mice were randomly divided into a blank group, a model group, a silymarin group, and an *Abrus cantoniensis* Hance group. The mouse liver fibrosis model was induced by intraperitoneal injection of 20% carbon tetrachloride, and then evaluated by hepatic index, serum biochemical index, and histopathological examination. ELISA was used to assess the liver fibrosis-related indexes, and immunohistochemistry assay for the liver fibrosis-related protein expression. The preventive and curative effect of *Abrus cantoniensis* Hance on hepatic fibrosis was evaluated. UPLC-Q-TOF-MS/MS combined with multivariate statistical methods screened the differential metabolites and analyzed metabolic pathways. **Results** *Abrus cantoniensis* Hance reduced the hepatic index of the mice, improved the abnormalities of blood lipids and liver function, and reduced the expression of hepatic hyaluronic acid (HA), procollagen type Ⅲ, and the level of hepatic α -smooth muscle actin

基金项目: 国家自然科学基金区域创新发展联合基金重点支持项目 (No.U23A20521); 国家自然科学基金地区基金项目 (No.82360767)。

作者简介: 赵静玉, 女, 硕士研究生, 主要从事基于地产资源的中药创新药物研究, email: zjy99422@163.com ***通信作者:** 孙慧峰, 男, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事基于地产资源的中药创新药物研究, email: hui Fengsun@hotmail.com; 张宁, 男, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事中药药效物质基础及体内代谢研究, email: zhangning0454@163.com

(α -SMA) and collagen type I. Totally seven differential metabolites, including γ -glutamyl leucine and L-tryptophan, were screened by metabolomics, involving five metabolic pathways (tryptophan metabolism, purine metabolism, glycerophospholipid metabolism, primary bile acid biosynthesis, taurine and hypotaurine metabolism). **Conclusion** *Abrus cantoniensis* Hance can effectively alleviate the pathological changes in carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis model through metabolic pathways such as tryptophan metabolism and purine metabolism.

Key words: *Abrus cantoniensis* Hance; liver fibrosis; pharmacology; UPLC-Q-TOF-MS/MS

肝纤维化通常是由病毒性肝炎、非酒精性脂肪性肝炎、酒精中毒等引起的慢性肝脏疾病^[1]。其特征是在病理状态下,肝星状细胞(HSC)被激活,增殖形成肌成纤维细胞分泌细胞外基质,细胞外基质逐渐积累成纤维瘢痕,最终导致肝纤维化^[2]。肝纤维化发展过程中可引起肝脏结构紊乱,肝细胞再生形成假小叶样结构,导致肝硬化,最终恶化为肝癌^[3-4]。目前肝纤维化被认为是一个动态可逆的病理过程,治疗得当可防止恶化^[5]。然而虽然许多抗肝纤维化候选药物在动物模型中效果优异,但在临床试验中效果有限,因此仍需继续探索有效防治肝纤维化的药物^[6]。

鸡骨草为豆科相思子属植物广州相思子(*Abrus cantoniensis* Hance)的干燥全株,为临床常用中药材^[7]。据2020年版《中国药典》记载,其具有利湿退黄,清热解毒,疏肝止痛的功效^[8]。现代研究表明,鸡骨草具有抗氧化、抗炎、免疫调节和保肝等药理作用^[9]。但是目前对于鸡骨草防治肝纤维化的研究相对较少,因此本研究采用四氯化碳(CCl_4)肝损伤模型结合液质联用技术,分析了鸡骨草发挥功效的关键差异代谢物和代谢通路,为阐明鸡骨草对于肝纤维化的防治作用及作用机制提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

4周龄雄性C57BL/6J小鼠40只,体重(20±2)g[北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证号SCXK(滇)2019-0002]。饲养于中国医学科学院药用植物研究所云南分所SPF级实验动物中心,动物实验经中国医学科学院药用植物研究所云南分所实验动物福利伦理委员会批准(批准文号2024005)。

1.2 试药

水飞蓟宾(批号:H20040299,天津天士力圣特制药有限公司);鸡骨草购自钦州浦北县,经广西中医药大学黄荣韶教授鉴定,符合2020年版《中国药典》标准; CCl_4 (批号:G65805A, Greagent);橄

榄油(批号:O108686,阿拉丁);生化仪24项检测试剂盘(批号:AW01859, Seamaty);HE、Masson染色试剂盒(Solarbio);Ⅲ型前胶原蛋白(PCⅢ)试剂盒、透明质酸(HA)试剂盒(上海源桔生物科技有限公司); α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)单克隆抗体、I型胶原蛋白(Collagen-I)多克隆抗体(批号:67735-1-IG、14695-1-AP, proteintech);山羊抗兔IgG(H+L)、山羊抗小鼠IgG(H+L)(批号:A0208、A0216,上海碧云天生物科技有限公司);甲醇、乙腈(Honeywell)。

1.3 仪器

全自动生化分析仪(Seamaty);自动染色机、转盘式组织脱水处理仪、组织包埋机、电子旋转切片机(Thermo Fisher 科技有限公司);数码显微照相机(日本奥林巴斯);自动平衡离心机(Dynamica);Nexera XS Inert 高效液相色谱仪(上海岛津);X500B QTOF 质谱仪(AB Sciex)。

2 方法

2.1 鸡骨草提取物的制备

取一定量的鸡骨草粉末,以10倍体积的75%乙醇回流提取2次,每次2h。将提取液合并,抽滤,旋转蒸发,减压浓缩成浸膏。将水与浸膏等比例配制成混悬液后,用石油醚进行萃取,萃取液放置于60℃烘箱烘干后,用羧甲基纤维素钠配制得到含鸡骨草提取物 $11.6\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,4℃保存备用。

2.2 分组、造模与给药

小鼠适应性饲养1周,随机分为空白组、模型组、水飞蓟宾组(阳性对照)和鸡骨草组,每组10只。除空白组,其余各组均腹腔注射20% CCl_4 诱导肝纤维化模型,剂量为 $5\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,每周2次,连续给药11周,于造模第一周开始灌胃给药。按人每日最大给药剂量420 mg进行人与小鼠等效剂量换算,水飞蓟宾组给药量为 $55\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 。鸡骨草组给药量为 $116\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$,空白组和模型组灌胃给予等量蒸馏水。每日观察记录各组小

鼠精神状况,每周称一次体重,于第 11 周禁食不禁水 12 h,眼眶取血后将小鼠进行脱颈处死。

2.3 肝脏外观观察及肝脏指数的测定

取材时收集小鼠肝脏进行拍照观察并按下列公式进行肝脏指数的测定。肝脏指数 (%) = 脏器重量 (g) / 体重 (g) × 100%。

2.4 血清生化指标测定

将眼眶取血收集的血液静置 2 h, 3000 r · min⁻¹ 离心 15 min, 收集上层血清, 取 100 μL 血清于生化试剂盘中进行谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT)、碱性磷酸酶 (ALP) 及总胆汁酸 (TBA) 含量测定。

2.5 肝脏组织病理观察

取材时将肝脏放置于 4% 多聚甲醛溶液固定, 24 h 后脱水并进行常规石蜡包埋和切片之后采用 HE 和 Masson 染色以评估小鼠肝脏形态和肝纤维化程度。

2.6 ELISA 检测肝脏组织中 HA、PC-Ⅲ 表达

称取于 -80℃ 冰箱冷冻的小鼠肝脏组织 0.1 g, 加入 0.9 mL 冷藏生理盐水, 制备组织匀浆, 离心, 取上清液。按照 ELISA 试剂盒说明书检测组织匀浆中的 HA、PC-Ⅲ 含量。

2.7 免疫组化法检测肝脏组织 α-SMA、Collagen-Ⅰ 表达

肝脏组织石蜡包埋切片后, 脱蜡至水, 进行抗原修复, 加一抗 (α-SMA 抗体 1:5000 稀释; Collagen-Ⅰ 抗体 1:1000 稀释) 后于 4℃ 条件下孵育过夜、次日于室温下将二抗孵育 2 h (二抗 1:50 稀释), DAB 显色, 苏木素复染细胞核, 于显微镜下观察结果, 最后采用 Image J 软件进行结果分析。

2.8 肝脏组织样品制备

称取冻存于 -80℃ 的肝脏组织样品 100 mg, 加入预冷的甲醇-乙腈-水 (2:2:1) 溶液 0.9 mL, 低温研磨 2 min, -20℃ 静置 10 min, 涡旋混匀, 低温超声 10 min, 于 -20℃ 静置 1 h 后 4℃、13 000 r · min⁻¹ 离心 15 min, 取上清氮气吹干, 放置于 -80℃ 保存备用。采用 500 μL 预冷的乙腈-水 (1:1) 复溶, 再次离心后经 0.22 μm 滤膜滤过即得待测样品溶液。另取各样品 10 μL 混匀即得 QC 样本。

2.9 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析条件

色谱条件: ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: 0.1% 甲酸乙腈 (A) - 0.1% 甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 2 min, 5%B; 2 ~ 6 min, 5% ~ 30%B; 6 ~ 7 min, 30%B; 7 ~ 10 min, 30% ~ 60%B; 10 ~ 11.5 min, 60%B;

11.5 ~ 13 min, 60% ~ 80%B; 13 ~ 13.5 min, 80%B; 13.5 ~ 16 min, 80% ~ 90%B; 16 ~ 17 min, 90%B; 17 ~ 17.5 min, 90% ~ 100%B; 17.5 ~ 20 min, 100%B; 20 ~ 20.5 min, 100% ~ 5%B; 20.5 ~ 30 min, 5%B); 柱温: 40℃; 流速: 0.3 mL · min⁻¹; 进样体积: 1 μL。

质谱条件: ESI 离子源; 正、负离子扫描模式; 一级质谱和二级质谱扫描范围分别为 100 ~ 1200 *m/z*、50 ~ 1200 *m/z*; 气帘气压力: 35 psi; 雾化气压力: 60 psi; 辅助气压力: 60 psi; 离子源温度: 550℃。

2.10 差异代谢物及相关代谢通路分析

将采集得到的代谢组质谱数据使用 MSDIAL 软件进行处理, 得到标准数据矩阵; 将上述数据导入 MetaboAnalyst 网络平台进行主成分分析 (PCA)、正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 等多元统计分析。以 OPLS-DA 得分图分析组间代谢轮廓谱的总体差异, 以 “*P* < 0.05、FoldChange (FC) > 2 及 VIP > 1” 为条件筛选差异代谢物。将筛选出的差异代谢物的质谱信息整合到 HMDB 在线数据库进行检索鉴定, 之后将已鉴定的潜在差异化合物导入 MetaboAnalyst 平台进行代谢通路分析。

2.11 统计学分析

应用 Graph Pad Prism 8 软件进行数据统计, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 21.0 软件, 进行单因素方差分析, 之后采用 LSD 检验进行组间两两比较。以 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 鸡骨草对肝纤维化小鼠肝脏外观及肝脏指数的影响

如图 1A 所示, 与空白组相比, 模型组肝脏颜色变浅, 包膜表面呈磨砂状不光滑, 可见大量白色脂肪颗粒散状沉积, 水飞蓟宾与鸡骨草干预后, 肝组织表面磨砂状不平及白色脂肪颗粒沉积明显减少, 且肝组织颜色更加红润。

如图 1B 所示, 相比于空白组, 模型组小鼠肝脏指数显著增加 (*P* < 0.01); 水飞蓟宾与鸡骨草干预给药可明显降低小鼠肝脏指数 (*P* < 0.05, *P* < 0.01)。

3.2 鸡骨草对肝纤维化小鼠血清生化指标的影响

与空白组相比, 模型组小鼠血清中 AST、ALT、ALP 及 TBA 活性明显升高 (*P* < 0.01), 鸡骨草干预处理显著降低 AST、ALT、ALP 及 TBA 活性 (*P* < 0.05), 改善血脂异常及肝功能损伤, 且效果基本与阳性药水飞蓟宾相当 (见图 2)。

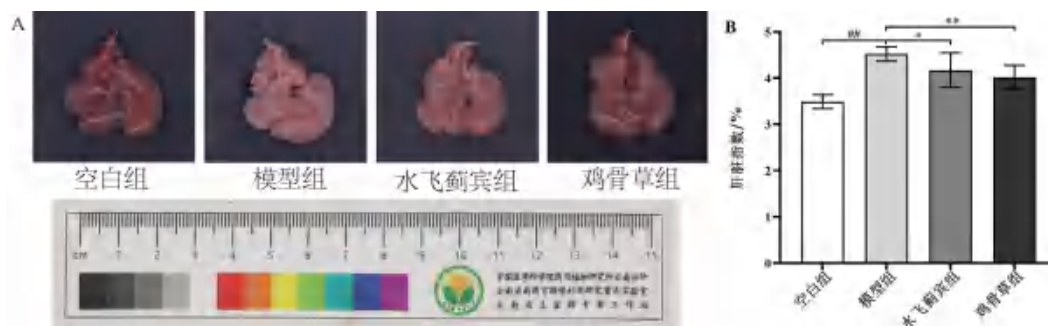


图1 鸡骨草对肝纤维化小鼠肝脏外观 (A) 及肝脏指数 (B) 的影响 ($n = 7$)

Fig 1 Effect of *Abrus cantoniensis* Hance on liver appearance (A) and hepatic index (B) in mice with liver fibrosis ($n = 7$)

注: 与空白组比较, ^{###} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

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

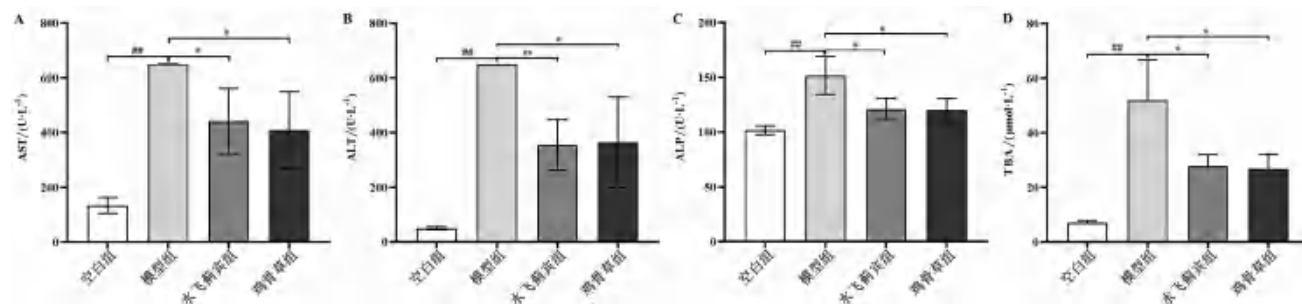


图2 鸡骨草对小鼠血清中 AST (A)、ALT (B)、ALP (C) 及 TBA (D) 含量的影响 ($n = 6$)

Fig 2 Effect of *Abrus cantoniensis* Hance on the content of AST (A), ALT (B), ALP (C) and TBA (D) in the serum of mice ($n = 6$)

注: 与空白组比较, ^{###} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

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

3.3 鸡骨草对肝纤维化小鼠肝组织结构的影响

3.3.1 HE 染色结果 HE 染色结果显示, 空白组肝小叶结构正常, 肝索排列整齐, 无肝细胞损伤坏死现象。与空白组相比, 模型组小鼠肝细胞水肿, 肝小叶结构紊乱, 肝小叶、门管区周围炎性细胞浸润情况严重, 纤维结缔组织弥漫性增生。与模型组相比, 水飞蓟宾组与鸡骨草组肝组织炎性浸润及纤维结缔组织异常增生均有所减少 (见图 3)。

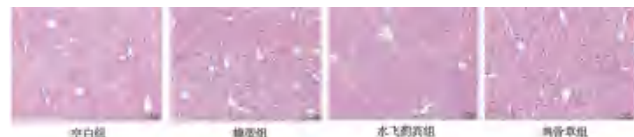


图3 鸡骨草对肝纤维化小鼠肝组织病理形态的影响 (HE, $\times 100$)

Fig 3 Effect of *Abrus cantoniensis* Hance on the pathological morphology of liver tissues in mice with liver fibrosis (HE, $\times 100$)

3.3.2 Masson 染色结果 Masson 染色结果显示, 与空白组比较, 模型组小鼠肝小叶、门静脉区以及窦周均存在大量蓝色胶原纤维病理性沉积, 且纤维间隔明显不规则增宽, 并延伸入肝小叶形成假小叶; 与模型组相比, 水飞蓟宾组和鸡骨草组纤维结缔组织增生显著减少, 假小叶形成得到明显改善 (见图 4)。

3.4 鸡骨草对肝纤维化小鼠肝组织 HA、PC-III 水平的影响



图4 鸡骨草对肝纤维化小鼠肝组织病理形态的影响 (Masson, $\times 100$)

Fig 4 Effect of *Abrus cantoniensis* Hance on the pathological morphology of liver tissues in mice with liver fibrosis (Masson, $\times 100$)

与空白组相比, 模型组小鼠 HA、PC-III 水平均显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组比较, 水飞蓟宾组和鸡骨草组小鼠肝组织中 HA、PC-III ($P < 0.05$) 水平均有所降低, 且鸡骨草组效果更优 (见图 5)。

3.5 鸡骨草对肝纤维化小鼠肝组织纤维化胶原沉积的影响

免疫组化结果显示, α -SMA、Collagen-I 蛋白表达主要定位于肝细胞质中。与空白组相比, 模型组肝组织中 α -SMA、Collagen-I 表达均显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 水飞蓟宾组与鸡骨草组上述蛋白表达均显著减少 ($P < 0.01$) (见图 6)。

3.6 鸡骨草对肝纤维化小鼠肝脏代谢物谱的影响

3.6.1 代谢轮廓分析 将采集到的质谱数据采用 PCA 分析, 得到 Scatter3D 模式识别图, 见图 7。结果显示, QC 样品聚集良好, 表明仪器运行状态稳定, 所得数据可靠。进一步采用 OPLS-DA 分析

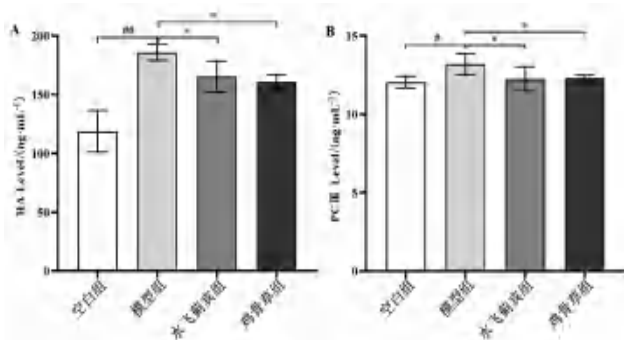


图 5 鸡骨草对肝纤维化小鼠肝组织 HA (A)、PC-III (B) 水平的影响 ($n = 4$)

Fig 5 Effect of *Abrus cantoniensis* Hance on the levels of HA (A) and PC-III (B) in liver tissue of mice with liver fibrosis ($n = 4$)

注：与空白组比较， $^{\#}P < 0.05$ ， $^{##}P < 0.01$ ；与模型组比较， $^*P < 0.05$ 。

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

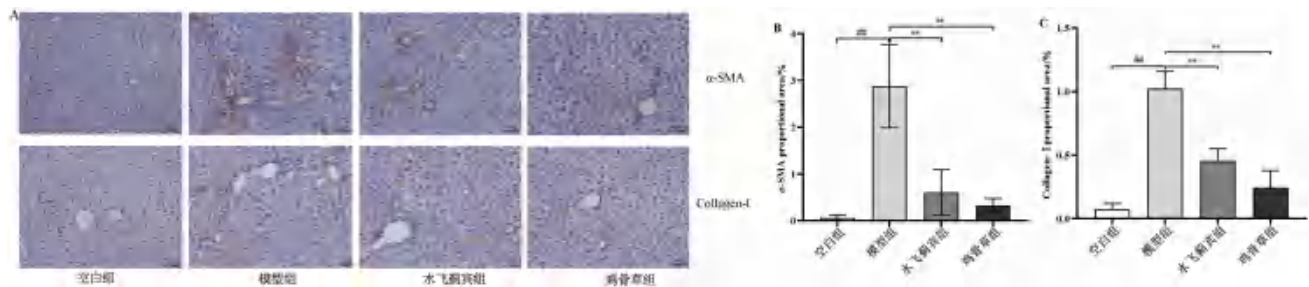


图 6 肝脏免疫组化染色 (A) (×200)、α-SMA (B)、Collagen-I (C) 蛋白阳性面积 ($n = 3$)

Fig 6 Immunohistochemical staining of liver (A) (×200), α-SMA (B), and Collagen-I (C) protein positive area ($n = 3$)

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

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

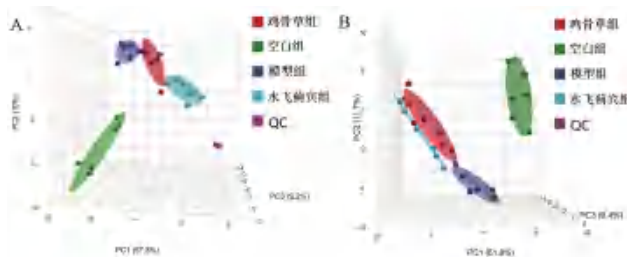


图 7 正离子 (A)、负离子 (B) 模式下各组小鼠肝脏代谢物分布 PCA 得分图

Fig 7 PCA score plot of liver metabolite distribution in each group of mice in both positive ion (A) and negative ion (B) modes

3.6.3 通路富集分析 将上述筛选出的差异代谢物导入 MetaboAnalyst 在线平台进行 KEGG 代谢通路分析，见图 9。图中纵坐标代表通路的显著性水平，值越大节点颜色越深；横坐标为通路影响值代表代谢通路影响的重要程度^[10]。结果显示，差异代谢物共影响了以下 5 条代谢通路：色氨酸代谢、嘌呤代谢、甘油磷脂代谢、初级胆汁酸生物合成、牛磺酸和次牛磺酸代谢。

4 讨论

筛选差异代谢物，见图 8，结果显示空白组与模型组之间明显分离，表明 CCl_4 造模破坏了小鼠肝脏代谢模式；模型组与鸡骨草组明显分离，提示鸡骨草给药可改变 CCl_4 造模引起的代谢产物的变化。经过 100 次置换检验，正离子模式下，空白组与模型组相比， $R^2Y = 0.987$ ， $Q^2 = 0.951$ ，模型组与鸡骨草组相比， $R^2Y = 0.934$ ， $Q^2 = 0.787$ ；负离子模式下，空白组与模型组相比， $R^2Y = 0.997$ ， $Q^2 = 0.965$ ，模型组与鸡骨草组相比， $R^2Y = 0.997$ ， $Q^2 = 0.965$ ，表明模型具有良好的拟合度和预测能力，不存在过拟合现象。

3.6.2 差异代谢物的筛选 基于上述 OPLS-DA 分析，根据二级质谱、文献信息，HMDB 数据库进行筛选和鉴定，最终得到 7 种差异代谢物，详见表 1。

本研究采用 CCl_4 腹腔注射的方法复制了肝纤维化模型。 CCl_4 诱导肝纤维化属于氧化应激反应，其具有很强的诱导肝脏脂质过氧化的作用，可导致体内自由基代谢紊乱^[11]，破坏生物膜结构和功能^[12]，引起肝小叶结构紊乱，肝细胞出现肿胀坏死，长期接触导致肝纤维化甚至肝硬化。有文献表明水飞蓟宾可抑制肝脏中肝星状细胞活化，降低 HA 等表征肝纤维化程度的因子表达量，减少肝细胞损伤进而抑制肝纤维化，故本研究选用水飞蓟宾为阳性药进行动物实验研究^[13]。有研究发现，鸡骨草可通过促进脂质代谢、抗氧化应激，减少肝细胞过度氧化来抑制肝损伤^[14]。

从本研究的药效学结果可表明，鸡骨草入药可显著降低模型小鼠肝损伤相关生化指标，减少肝纤维化相关标志性蛋白 α-SMA、Collagen-I 表达。HA 可较准确、灵敏地反映肝内已生成的纤维量及肝细胞受损状况、PC-III 反映肝内 III 型胶原合成情况，与肝纤维化形成的活动程度密切相关。试剂盒检测结果表明，鸡骨草可显著减少肝

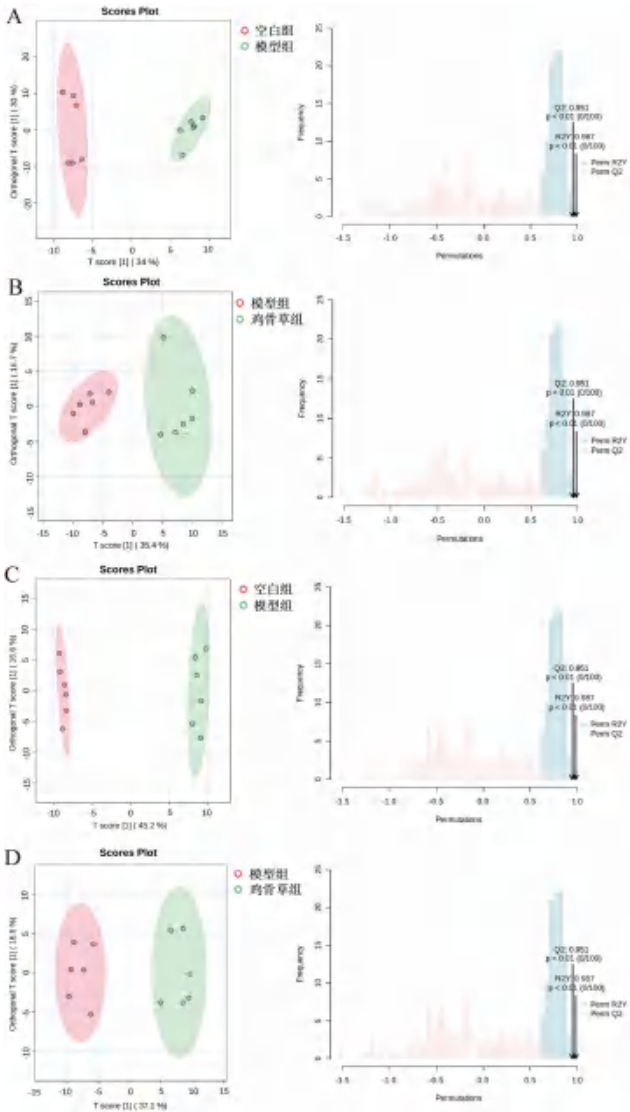


图 8 正 (A、B)、负 (C、D) 离子模式下各组小鼠肝脏代谢物分布 PCA 得分图及相应置换检验图

Fig 8 PCA scores of liver metabolites distribution in each group of mice under positive (A and B) and negative (C and D) ion modes and corresponding replacement charts

表 1 鸡骨草对肝纤维化小鼠肝脏差异代谢物的影响

Tab 1 Effect of *Abrus cantoniensis* Hance on differential metabolites in the liver of mice with liver fibrosis

编号	代谢物	HMDB 号	保留时间 /min	质荷比 /Da	离子模式	分子式	变化趋势
1	γ -谷氨酰亮氨酸	HMDB0011171	4.723	259.12946	[M-H] ⁻	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₅	A↑; B↓
2	L-色氨酸	HMDB0000929	4.190	203.08267	[M-H] ⁻	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	A↑; B↓
3	单磷酸腺苷	HMDB0000045	0.887	693.11243	[2M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₇ P	A↑; B↓
4	磷脂酰甘油	HMDB0302468	21.581	773.53510	[M-H] ⁻	C ₄₂ H ₇₉ O ₁₀ P	A↓; B↑
5	苯甲酸	HMDB0001870	5.672	121.02953	[M-H] ⁻	C ₇ H ₆ O ₂	A↑; B↓
6	邻苯二甲酸	HMDB0002107	5.672	165.01755	[M-H] ⁻	C ₈ H ₆ O ₄	A↑; B↓
7	牛磺胆酸	HMDB0000036	8.911	514.28381	[M-H] ⁻	C ₂₆ H ₄₅ NO ₇ S	A↓; B↑

注: A. 与空白组比, 模型组的变化趋势; B. 与模型组比, 给药组的变化趋势。

Note: A. The trend of the model group compared with the blank group; B. The trend of the drug group compared with the model group.

提示模型组小鼠体内代谢紊乱与嘌呤代谢有关。
磷脂酰甘油与甘油磷脂代谢密切相关, 是细胞内脂质合成和降解的重要产物。研究发现补充

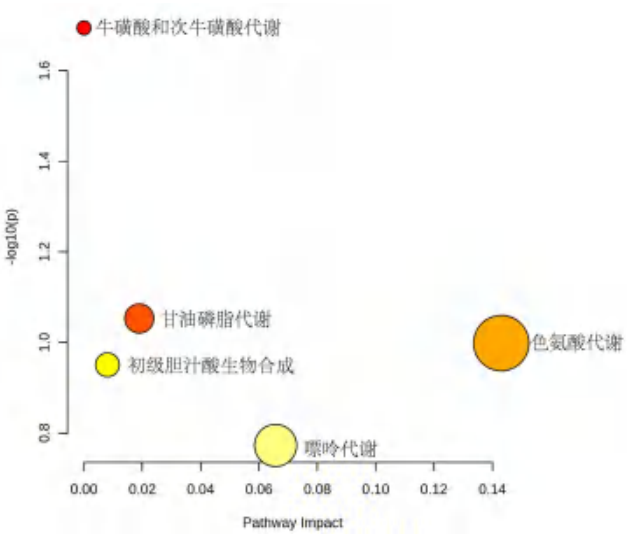


图 9 小鼠肝脏代谢物 KEGG 通路富集分析
Fig 9 Enrichment analysis of KEGG pathway of liver metabolites in mice

脏 HA、Collagen- I 表达量, 有效改善肝纤维化。
代谢组学结果表明, 鸡骨草可从多条代谢途径发挥改善肝纤维化的作用。色氨酸可通过一系列反应生成 5-羟色胺 (5-HT), 当肝脏受到损伤时, 5-HT 可介导肝星状细胞的增殖和活化^[15], 形成肝纤维化, 而肝纤维化也会诱导色氨酸代谢异常进而加剧疾病的发展^[16]。本研究中鸡骨草可降低模型组肝脏中 L-色氨酸水平的异常上调, 说明鸡骨草的功效作用机制可能与色氨酸代谢有关。
嘌呤类物质是细胞的必要组成部分^[17], 在病理状态下, 三磷酸腺苷和二磷酸腺苷被水解为单磷酸腺苷。同时 2 型嘌呤受体可被激活, 导致活性氧产生, 进而产生脂质过氧化反应, 造成肝脏的损伤^[18]。本研究中模型组肝脏中单磷酸腺苷含量增加可能与三磷酸腺苷、二磷酸腺苷的异常水解有关,

磷脂酰甘油可显著降低肝脏三酰甘油 (TG) 和胆固醇含量, 减少脂肪生成相关基因 mRNA 表达, 减少脂质积累, 有效缓解脂质过氧化^[19]。本研究

鸡骨草组磷脂酰甘油含量较模型组上涨,表明鸡骨草可改善肝纤维化模型小鼠甘油磷脂代谢异常。

在肝细胞中游离型初级胆汁酸可与牛磺酸结合形成牛磺胆酸,牛磺胆酸可以增加脂质和胆固醇的溶解性,有效改善胆汁阻塞情况,与初级胆汁酸生物合成、牛磺酸和次牛磺酸代谢途径密切相关。胆汁酸是胆固醇代谢的关键终产物,可通过肝肠循环促进脂类消化吸收^[20]。已有研究表明,牛磺酸能够通过其自身的抗氧化作用和抗凋亡活性降低药物导致的急慢性肝损伤^[21]。本研究中,相较于空白组,模型组牛磺胆酸含量下降,鸡骨草给药可逆转这种现象,说明鸡骨草可通过初级胆汁酸生物合成、牛磺酸和次牛磺酸代谢途径调节脂代谢起到防治肝纤维化的作用。

综上,本研究通过药效学实验证实鸡骨草可有效改善肝纤维化相关病理改变,并利用液质联用技术初步探索了鸡骨草给药对于 CCl₄ 诱导肝纤维化模型小鼠肝脏代谢的影响,推测鸡骨草可能通过色氨酸代谢、嘌呤代谢等多种途径达到防治肝纤维化的作用。

参考文献

- [1] 黄迪,彭辉,李子义,等.基于网络药理学和细胞实验探究健脾活血方干预 AMPK 和 Hippo 糖脂代谢信号通路治疗肝纤维化研究[J].海南医学院报,2024,11(3):1-17.
- [2] Xu SX, Chen YE, Miao JD, et al. Esculin inhibits hepatic stellate cell activation and CCl₄-induced liver fibrosis by activating the Nrf2/GPX4 signaling pathway[J]. *Phytomedicine*, 2024, 128: 155465.
- [3] 杨逸鑫,彭芳.基于代谢组学的中医药防治肝纤维化的研究进展[J].中南药学,2023,21(1):155-160.
- [4] Zhang LJ, Liu CH, Yin LF, et al. Mangiferin relieves CCl₄-induced liver fibrosis in mice[J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 4172.
- [5] 刘旭文.基于肝脏代谢组学和网络药理学的岩黄莲抗肝纤维化作用机制研究[D].南宁:广西医科大学,2019.
- [6] Roehlen N, Crouchet E, Baumert TF. Liver fibrosis: mechanistic concepts and therapeutic perspectives[J]. *Cells*, 2020, 9(4): 875.
- [7] 何嘉丽.基于网络药理学和实验探讨鸡骨草总皂苷缓解对乙酰氨基酚致肝损伤的作用机制[D].广州:南方医科大学,2024.
- [8] 中国药典 2020 年版.一部[S].2020:203.
- [9] 杨燕玲.鸡骨草对 APAP 诱导的小鼠肝损伤的保护作用及机制研究[D].赣州:赣南医学院,2023.
- [10] 韩丽颖,王帅,包永睿,等.基于 UPLC-Q-TOF-MS 研究加味八珍益母胶囊对卵巢早衰大鼠血清代谢组学的影响[J].世界科学技术-中医药现代化,2023,25(9):3125-3131.
- [11] 李伟,孙静,郭英.葡萄籽提取物对化学性肝损伤的抗氧化保护作用[J].热带医学杂志,2007,7(2):148-150.
- [12] 姚香草,薛兢兢,肖晓,等.鸡骨草总皂苷对化学性及免疫性肝损伤的保护作用[J].中国临床药理学杂志,2019,35(18):2071-2074.
- [13] 郭思瑞,邝咏梅,何笑荣,等.水飞蓟宾胶囊保肝作用的药理学研究进展[J].中国医院用药评价与分析,2024,24(1):116-118,123.
- [14] 吕超,毛德文,石清兰,等.广西地区少数民族常用护肝药物研究进展[J].中华中医药杂志,2020,35(7):3545-3549.
- [15] 刘菲.吡啶丙酸(IPA)对四氯化碳(CCl₄)诱导的小鼠肝纤维化的作用及机制研究[D].泸州:西南医科大学,2021.
- [16] 赵心怡.基于蛋白质组学与网络药理学探讨壮药依山红改善大鼠肝纤维化的作用机制[D].南宁:广西中医药大学,2024.
- [17] 赵杰.雷公藤甲素肝损伤作用机制研究[D].石家庄:河北医科大学,2018.
- [18] 雷鹏.23-乙酰泽泻醇 B 治疗肝损伤的药效作用研究[D].天津:天津中医药大学,2022.
- [19] Kim YJ, Choi JY, Ryu R, et al. Platycodon grandiflorus root extract attenuates body fat mass, hepatic steatosis and insulin resistance through the interplay between the liver and adipose tissue[J]. *Nutrients*, 2016, 8(9): 532.
- [20] 郭梓琪.葶苈提取物对 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化的作用机制及差异代谢物分析的研究[D].呼和浩特:内蒙古医科大学,2023.
- [21] Heidari R, Jamshidzadeh A, Niknahad H, et al. Effect of taurine on chronic and acute liver injury: focus on blood and brain ammonia[J]. *Toxicol Rep*, 2016, 3: 870-879.

(收稿日期:2024-11-05;修回日期:2024-11-29)

综述

间质性膀胱炎及其膀胱内给药制剂研究进展

李玉卓, 郑依婷, 廖永红* (中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193)

摘要: 间质性膀胱炎 (IC) 是一种具有明显症状的慢性顽固性泌尿系统疾病, 目前临床上通常对症状改善不明显的患者进行膀胱内给药治疗。然而, 尿路上皮屏障、药物随尿液排出、患者顺应性不佳等因素严重影响药物在膀胱内的治疗效果。本文从 IC 的发病机制、现有疗法及新型膀胱内给药制剂进展三方面进行综述, 以期在膀胱内给药疗法在治疗 IC 方面的应用提供参考和理论依据。

关键词: 间质性膀胱炎; 治疗方法; 药物治疗; 膀胱内给药

中图分类号: R694.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)04-1036-08

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.025

Research progress in interstitial cystitis and intravesical drug formulas

LI Yu-zhuo, ZHENG Yi-ting, LIAO Yong-hong* (*Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193*)

Abstract: Interstitial cystitis is a chronic and refractory urological disease characterized by obvious symptoms. In clinical practice, intravesical drug administration is frequently used for patients who have limited symptomatic improvement. However, several factors, including the urothelial barrier, drug excretion through urine, and poor patient compliance, substantially impeded the effectiveness of intravesical therapy. This review summarized the underlying pathophysiology of interstitial cystitis, current therapeutic strategies, and advances in novel intravesical drug preparations to provide reference and theoretical framework for intravesical drugs for interstitial cystitis.

Key words: interstitial cystitis; treatment method; pharmacotherapy; intravesical drug administration

膀胱疼痛综合征 (bladder pain syndrome, BPS) / 间质性膀胱炎 (interstitial cystitis, IC) 是一种病因不明的慢性疾病, 其特征是膀胱充盈感增加、尿急和尿频等其他可以统称为膀胱超敏 (hypersensitive bladder, HSB) 的泌尿症状。IC 与 BPS 在症状上难以区分, 然而最新研究发现有无 Hunner 病变及明显膀胱炎症是两者在生物学及组织病理学上的主要区别^[1-3]。因此, IC 的最新定义是伴有 HSB 症状和膀胱炎症, 且发生 Hunner 病变的膀胱疾病^[4], 临床可通过膀胱镜检查有无 Hunner 病变对 IC 和 BPS 进行鉴别诊断。IC 的患病率及发病率受年龄、种族及性别等因素影响, 且因各国采纳的诊断标准不一而存在显著差异^[5]。数据显示美国女性患病率为 2.7% ~ 6.5%, 日本女性发病率为 (3 ~ 4) / 10 万,

欧洲发病率为 18/10 万, 且患者多集中于 30 ~ 50 岁的女性群体, 其中白种人占比超 90%^[6-7]。值得注意的是, 女性 IC 的发病率是男性的 5 倍以上^[8]。当前, 国内关于 IC 的流行病学资料还相对匮乏。在临床实践中, IC 通常被初步诊断为尿路感染, 采用消炎药物进行治疗, 疗效不佳且易复发。IC 严重影响了患者的生活质量, 不仅会引发腹部慢性疼痛和不适, 还影响患者的排尿习惯、睡眠质量, 甚至精神状态和性功能。本文就 IC 的发病机制、现有疗法以及新型膀胱内给药制剂研究的进展进行综述, 以期在 IC 的临床治疗和药物开发提供方向。

1 病因及发病机制

IC 的病因及发病机制迄今尚不明确, 存在多种假说, 主要包括感染、糖胺聚糖 (glycosaminogly-

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.82173983)。

作者简介: 李玉卓, 女, 硕士, 主要从事中药调控间质性膀胱炎研究, email: lyz09042000@163.com *通信作者: 廖永红, 男, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事生物药剂学研究, email: yhliao@imiplad.ac.cn

can, GAG) 层损伤、自身免疫因素、神经源性炎症、尿液中的有害因子和氧化应激等, 但均缺乏确凿的临床证据支持。

1.1 感染

IC 患者在发病初期多表现为与尿路感染相似的膀胱刺激症状, 如尿频、尿急等, 这些症状可以通过使用抗菌药物对症治疗。虽然目前尚未有确凿证据直接关联感染为 IC 的致病原因, 但两者之间的关系不容忽视^[9]。Akiyama 等^[10]研究发现伴有 Hunner 病变的 IC 患者表现出与免疫反应及感染通路相关的独特基因组和组织学特征, 表现为大范围的黏膜下炎症、浆细胞及淋巴细胞浸润。不过, IC 是否与感染所引发的炎症反应有关需要进一步探讨。

1.2 GAG 层损伤

目前主流观点认为, IC 可能由原发性尿路上皮内膜缺陷或 GAG 层受损引起。正常的膀胱黏膜表面存在一层具有保护作用的 GAG 层, 它由包括透明质酸 (hyaluronic acid, HA)、肝素、硫酸软骨素 (chondroitin sulfate, CS)、硫酸皮肤素、硫酸角质素等在内的 GAG 家族组成^[11], 能够阻止尿液中的有毒物质对膀胱黏膜及膀胱肌层的破坏。而 IC 患者的 GAG 层均有不同程度的损伤, 导致膀胱黏膜表面的通透性增加, 尿液中钾离子和有毒物质得以直接刺激膀胱黏膜表面, 从而引发疼痛等不适症状^[12]。相关研究表明, 尿路上皮屏障缺陷可能是 IC、复发性尿路感染、化学和放射性膀胱炎等几种慢性膀胱疾病发病机制的基础^[13]。因此, 及时恢复 GAG 层是治疗 IC 的重要手段之一。

1.3 自身免疫因素

越来越多的证据表明 IC 可能是一种自身免疫性疾病。在 IC 患者群体中, 如系统性红斑狼疮、干燥综合征及类风湿关节炎等自身免疫性疾病的患病率显著增加^[14]。相关文献指出, IC 患者膀胱黏膜上抗核抗体增多, 并可在黏膜上检测到 CD8⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、调节 T 细胞、浆细胞及免疫球蛋白等免疫组分^[15-16]。Su 等^[17]通过单细胞 RNA 测序和影像质谱分析对 IC 患者的膀胱微环境进行了探究, 结果显示患者膀胱微环境内存在显著的免疫失衡。此外, 尿路上皮肥大细胞的活化与浸润亦是 IC 的典型病理特征。活化的肥大细胞会释放多种细胞因子及促炎、伤害性分子, 其中包括与神经纤维增殖密切相关的 P 物质和神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 等^[18]。

1.4 神经源性炎症

痛觉过敏是 IC 的主要特征之一。研究表明, IC 患者的膀胱神经纤维相较健康人群更加密集, 尿路上皮功能障碍可能导致三磷酸腺苷 (ATP) 和一氧化氮 (NO) 等物质增加, 而 ATP 与高敏感性

感觉神经传导疼痛有所关联。然而, 二甲基亚砜 (DMSO) 或肝素能够有效抑制 ATP 的分泌, 可能是它们用于治疗 IC 的原因之一。Ca²⁺非依赖性诱导型 NO 合成酶可以产生 NO, 从而增加尿路上皮对亲水性大分子的通透性, 导致尿路上皮屏障功能在许多疾病状态下的丧失。研究发现, IC 患者尿液和膀胱壁中的 NGF 水平显著升高, 能够通过增加神经元超敏反应发挥作用, 这与 IC 患者疼痛评分和炎症严重程度成正相关^[19]。

1.5 尿液中的有害因子

尿液中的有害因子主要包括毒性阳离子代谢物、异常成分及致病菌等, 若接触到膀胱黏膜或渗入膀胱黏膜间隙, 可能引起盆腔疼痛以及局部炎症反应。研究表明, IC 患者尿液中一些阳离子代谢物 (如 1-甲基腺苷、1-甲基鸟嘌呤等) 含量显著高于对照组, 这些成分对尿路上皮细胞和平滑肌细胞均有细胞毒性^[20]。抗增殖因子 (antiproliferative factor, APF) 是一种分子量低且热稳定性低的蛋白质, 能够与细胞膜上的 CKAP4 受体结合, 上调抑制细胞增殖的基因, 同时下调刺激细胞增殖的基因, 双重抑制膀胱黏膜增殖, 导致膀胱壁通透性增加。研究表明, IC 患者经过治疗后, 不仅症状发生了明显变化, 尿液中 APF 的水平也有所改变^[21]。以上证据均表明, 尿液中有害因子的增加与 IC 患者息息相关, 且目前针对尿液环境改变的研究也已成为热点。

1.6 氧化应激

活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 是一类化学性质活泼, 具有较高氧化活性的分子或离子的总称, 包括羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$)、超氧自由基阴离子 ($\cdot\text{O}_2^-$)、过氧化氢 (H_2O_2) 和 NO, 存在于代谢和生理活动中^[22]。ROS 的增加导致尿路上皮和逼尿肌中的过氧亚硝酸盐浓度增加, 这可导致脂质过氧化、蛋白质氧化、氧化损伤、细胞凋亡和细胞坏死等^[23]。Ni 等^[24]对野生型和 Nrf2 基因敲除型小鼠的氧化应激标志物及抗氧化剂因子进行检测, 验证了 Nrf2 通路能够通过抑制氧化应激改善 IC。Li 等^[25]使用尿液来源的干细胞治疗大鼠 IC 模型, 结果显示干细胞可以通过抑制氧化应激、炎症反应和细胞凋亡过程恢复膀胱的组织结构和功能。基于此, ROS 信号通路也是未来治疗膀胱系统疾病药物开发的潜在靶标^[26]。

1.7 其他

IC 的发生机制复杂, 除以上因素外, 还与多种其他因素密切相关。社会心理因素如长期的精神压力、焦虑及抑郁情绪, 在 IC 中起着重要作用^[27]。此外, 雌激素水平的波动也与 IC 发病有关, Liu 等^[28]研究发现雌激素可以通过下调膀胱上皮细胞中 P2X3 受体的表达来缓解环磷酸腺苷诱导的膀胱炎大鼠的膀胱

过度活动症状。同时，其他慢性疾病如慢性泌尿系统感染等，也可能在 IC 的发病过程中扮演重要角色。

2 现有疗法

由于 IC 的发病机制并不完全清晰，目前尚无明确的治疗方法。2014 年美国泌尿外科协会（AUA）间质性膀胱炎 / 膀胱疼痛综合征诊断和治疗指南（简称为 2014 版 AUA 诊疗指南）为此提出了六种诊疗层次（见表 1）^[29]。而在最新发布的 2022 版 AUA 诊疗指南中，治疗被分为行为 / 非药物治疗、口服药物治疗、膀胱灌注药物、手术和大手术五大类（见表 2）^[30]。

表 1 2014 版 AUA 诊疗指南提出的六种诊疗层次

Tab 1 Six levels of diagnosis and treatment proposed by the 2014 AUA diagnosis and treatment guidelines

诊疗层次	具体用药及疗法
一线治疗	全身放松、压力控制、疼痛管理、患者教育行为矫正
二线治疗	物理治疗、药物治疗（包括口服药物及膀胱内灌注治疗）
三线治疗	麻醉下膀胱镜水扩张试验、Hunner 溃疡电灼术
四线治疗	神经调节术、疼痛管理
五线治疗	环孢素 A（CyA）、疼痛管理
六线治疗	尿流改道术、代膀胱术

表 2 2022 版 AUA 诊疗指南提出的五类治疗方案

Tab 2 Five categories of diagnosis and treatment proposed by the 2022 AUA diagnosis and treatment guidelines

治疗方案	具体用药及疗法
行为 / 非药物治疗	患者教育、行为矫正、压力管理、物理治疗、疼痛管理
口服药物治疗	阿米替林、西咪替丁、羟嗪、戊聚糖多硫酸盐（PPS）、CyA
膀胱灌注药物	DMSO、肝素、利多卡因
手术	膀胱镜下水扩张（Hunner 病变部位电灼或注射曲安奈德）、膀胱注射肉毒杆菌毒素 A（BTX-A）、骶神经调控
大手术	膀胱扩大成形术、尿流改道术（或联合膀胱切除）、三角区以上膀胱切除

2.1 行为 / 非药物治疗

IC 患者的早期症状或许并不明显，不影响正常的工作和生活，此时可以先尝试一系列非药物治疗措施，如健康教育、行为矫正和饮食调整等；同时，密切观察患者症状，并建议患者定期复查；此外，还可以通过限制液体摄入、调整心态等途径进一步改善症状。

2.2 口服药物治疗

针对行为 / 非药物治疗未能取得满意效果的患者，口服药物治疗成为后续的选择。2022 版 AUA 诊疗指南推荐了五种可以用于 IC 治疗的口服药物，分别是阿米替林、西咪替丁、羟嗪、PPS 和 CyA。在执行药物治疗方案的同时，行为 / 非药物治疗亦需持续进行，不可忽视。此外，在使用这些药物改善病情的同时，还需加强疼痛管理，力求最大程度减轻患者的不适感，从而提升其日常生活能力。

2.2.1 阿米替林 阿米替林是一种三环类抗抑郁药，

具有中枢和外周抗胆碱能、抗组胺以及镇静作用，还能抑制多巴胺和去甲肾上腺素的再摄取。阿米替林被证明可有效治疗多种神经性疼痛疾病，在 2022 版 AUA 诊疗指南中的证据等级被归类为 B 级。Van Ophoven 等^[31]对 50 名 IC 患者进行了随机对照试验，患者用自我滴定方案前瞻性地治疗了 4 个月，结果显示阿米替林组中有 15 名（63%）对治疗结果的满意程度为良好或优秀，而安慰剂组仅有 1 名（4%）。Hertle 等^[32]对 94 名 IC 患者进行了一项长期研究，结果显示有 43 例患者（46%）对治疗结果表示非常满意或总体满意，然而，有 79 名（84%）患者发生了口干、恶心、眩晕和体重增加等不良反应。因此，笔者认为长期给予阿米替林是一种可行、安全、有效的 IC 治疗方法，但在使用时需谨慎以减少不良反应。

2.2.2 西咪替丁和羟嗪 西咪替丁和羟嗪都属于抗组胺药，分别是 H₂ 受体拮抗剂和 H₁ 受体激动剂，在 2022 版 AUA 诊疗指南中的证据等级分别被归类为 B 级和 C 级。Thilagarajah 等^[33]对 36 名 IC 患者进行了一项随机对照试验报告，结果显示口服西咪替丁（400 mg bid）的患者接受治疗 3 个月 after 在总症状、疼痛和夜尿方面的疗效与安慰剂组相比差异有统计学意义。

2.2.3 PPS PPS 是美国食品药品监督管理局（FDA）唯一批准的用于治疗 IC 的口服药物，也是迄今为止研究最多的 IC 口服药物。PPS 的治疗原理是在膀胱表面形成一层保护膜，修复 GAG 层，以防止尿液中有害成分进入膀胱肌层，在 2022 版 AUA 诊疗指南中的证据等级被归类为 B 级。PPS 的不良事件发生率相对较低（10% ~ 20%），通常不严重。但 Pearce 等^[34]研究结果显示视网膜色素性黄斑病变与 PPS 的使用有关，因此在临床使用时医师应详细询问患者的眼科病史并告知其潜在的风险。

2.2.4 CyA 2022 版 AUA 诊疗指南给出的证据等级为 C 级，主要用于治疗难治性 IC。Sairanen 等^[35]研究发现与口服 PPS 患者（19%）相比，口服 CyA 的 IC 患者的临床改善率（75%）更高，差异有统计学意义。Forrest 等^[36]研究发现，CyA 对具有 Hunner 病变患者疗效显著，成功率为 85%，远高于无病变患者的 30%，提示 CyA 对于 Hunner 病变患者的成功率更高；其不良事件的发生率在 30% ~ 55%，主要包括高血压、牙龈增生和面部毛发增长。此外，在临床过程中还应密切监测患者的肾功能和血压。

2.3 膀胱灌注药物

口服进入体内的药物不能有效地靶向受影响的组织，并且通常需要更高的药物剂量才能原位达到治疗浓度。这可能会使负责排泄的器官（例如肝脏）过度工作，并增加更有可能接受多种药物治疗的老年人出现并发症和不良反应的风险^[37]。

与口服途径相比,膀胱内给药(intravesical drug delivery, IDD)可以避免药物由于首过效应而导致的部分消除,以更低剂量的药物达到更好的疗效。IDD是指将含有一种或多种药物的液体制剂通过导管直接插入患者尿道从而滴注到膀胱中的局部给药方式,药物在排出体外之前可以在膀胱内保留一段时间从而发挥治疗作用。

2.3.1 DMSO 2022 版 AUA 诊疗指南对 DMSO 给出的证据等级为 C 级, DMSO 可以减轻 IC 患者的膀胱疼痛症状,机制可能为膜穿透性、抗炎止痛、肌肉松弛及抑制肥大细胞的组胺释放等。Perez-Marrero 等^[38]对 33 名 IC 患者进行了 DMSO 有效性试验,结果显示试验组有 53% 的患者症状明显改善,而安慰剂组只有 18%。DMSO 也可能会增强对其他物质的吸收,因此可以和其他药物如肝素、利多卡因等联合使用以提高疗效。虽然 DMSO 停用后复发率高,但绝大部分复发的患者继续使用 DMSO 治疗依然有效。

2.3.2 肝素 肝素和 GAG 层的化学结构相似,可以通过补充 GAG 层发挥一定的治疗作用,同时肝素还具有抗炎、抑制平滑肌细胞增生、保护黏膜等作用,它在 2022 版 AUA 诊疗指南中的证据等级被归类为 C 级。Parsons 等^[39]对 48 例 IC 患者使用肝素(10 000 IU/次, tiw)进行膀胱内治疗,3 个月结果显示有 27 例(56%)患者的尿急尿频症状得到显著改善。此外,肝素也可以和其他物质联用,比如作为“高效抗反转录病毒治疗”治疗方案的组成部分。

2.3.3 利多卡因 2022 版 AUA 诊疗指南对利多卡因给出的证据等级为 B 级,利多卡因是一种常见的局部麻醉剂,被广泛应用于包括 IC 在内的多种疼痛综合征。利多卡因有多种不同的制剂,在使用时可将其稀释为不同浓度,并且可以与碱化剂组合使用。然而,利多卡因的疼痛缓解通常仅能维持不到两周。有研究者通过可连续释放的利多卡因膀胱内装置(LiRIS)来解决该问题,研究结果显示 LiRIS 在健康志愿者和患者中均耐受性良好,能显著减轻患者膀胱疼痛和尿急等症状,且疗效可维持数月之久^[40]。

2.3.4 HA 和 CS HA 和 CS 作为 GAG 衍生物,可以通过补充 GAG 层而达到治疗效果,目前虽已在临床应用,却未被纳入 2022 版 AUA 诊疗指南中。两者均为线性多糖,可以结合水在顶端细胞膜上形成凝胶状层从而保护黏膜不受尿液中有害物质的侵害。Kocatürk 等^[41]对 62 名在 2014—2018 年间接受过膀胱内 CS 治疗的女性 IC 患者进行调查,第一年结束时的评估显示 21% 患者轻度改善,79% 患者中度改善。HA 和 CS 也可以联合使用,Giberti 等^[42]对 20 名女性 IC 患者进行试验,结果显示在接受 1.6% HA 和 2% CS 膀胱内灌注治疗后,患者症状指数、问题

指数、症状量表均出现了统计学意义上的下降。

2.3.5 其他 临床上在使用但 2022 版 AUA 诊疗指南中未提及的其他药物还有树脂毒素、卡介苗(BCG)、奥昔布宁等^[43]。此外,硝酸银因具有强黏膜收敛和抗菌作用也可用于 IC 的治疗,临床上常采用 0.2% 浓度进行膀胱灌注。

2.4 手术和大手术

当口服药物及膀胱灌注疗效不佳时可以使用神经调节,主要包括骶神经刺激(sacral nerve stimulation, SNS)、阴部神经刺激以及经皮胫神经刺激,目前最常用的为 SNS^[44]。如果神经刺激试验成功,则可以植入永久性神经刺激装置改善 IC 症状。对于已经用尽了其他方法但治疗效果仍不理想的患者,可以考虑大手术。最常见的包括膀胱三角区以上膀胱切除,尿道及膀胱全切。

此外,干细胞治疗^[45]、富血小板血浆^[46]、体外冲击波治疗、单克隆抗体治疗、高压氧治疗等疗法也被应用于治疗 IC。

3 新型膀胱内给药制剂研究进展

膀胱作为人体前部的中空器官,主要负责收集和短期储存来自体循环和肾脏的废物并将其以尿液的形式排出体外。正常情况下人体每小时可产生 20 ~ 60 mL 尿量,因此被灌注到膀胱内的药物会因尿量增加而被稀释并迅速排出体外,从而影响药物疗效。膀胱上皮是存在于固有层顶部的上皮层,覆盖了整个膀胱的内表区域,充当血液和尿液之间不可穿透的屏障,亦称为膀胱通透屏障。膀胱上皮的通透性非常低,即使在患病状态下也不允许药物渗透到膀胱壁中,从而阻止药物进入膀胱壁发挥药效。同时,IDD 往往需要通过尿道反复插管,易引起患者不适、炎症和细菌感染,患者依从性较低。综上所述,IDD 面临诸多挑战。

为解决上述问题,诸多新型膀胱内给药制剂应运而生。纳米技术可以与 IDD 相结合设计出包埋药物的纳米粒,显著提升与尿路上皮的化学相互作用,进一步增强药物对膀胱壁的渗透性。相关研究指出,脂质体、纳米颗粒、固体脂质纳米粒等纳米载体能够提高膀胱中的局部药物浓度并靶向病变细胞。此外,树枝状大分子、水凝胶和纳米机器人也已经被应用于膀胱疾病治疗。

3.1 脂质体

脂质体由磷脂双分子层组成,尺寸从 30 nm 到几微米不等,被广泛用于医疗和美容行业,也是研究最深入的药物递送载体。脂质体的膜结构类似于人体细胞膜,有助于药物穿透细胞膜。此外,它们可以整合到膀胱屏障中,减弱刺激物对膀胱壁的影响。因此,脂质体不仅可用作治疗剂,也可作为药物递送载体,其特殊结构可以将水溶性药物包埋在

内核,将水不溶性药物包埋在双层,极大地提高了固有疏水性药物的生物利用度。

Majima 等^[47]在大鼠膀胱炎症模型中使用脂质体包裹的神经生长因子反义寡核苷酸(OND)进行膀胱内注射,研究结果显示其能够显著改善由过氧化氢诱导的膀胱炎症。膀胱内灌注 BTX-A 是 FDA 批准的治疗方法之一,临床试验结果表明,膀胱内滴注 BTX-A 脂质体可显著减少 IC 患者症状,是一种有前途且无不良反应的治疗手段^[48]。但脂质体在膀胱中的稳定性和停留时间尚需提高,这限制了其在 IDD 的进一步应用。为了克服这一挑战,Ma 等^[49]将细胞穿透肽修饰的奥沙利铂前药脂质体和低剂量卡介苗通过壳聚糖溶液共同递送,研究结果显示这一策略可以显著提高化疗药物在膀胱壁上的滞留时间和通透性,为 IDD 提供了新的可能。

另外,还可以利用不同的物理化学因素(如温度、pH、离子浓度、酶、辐射等)进一步优化脂质体,以触发特定部位的药物释放。若这些系统能够对尿液中的特定 pH 值或离子变化作出响应,那么它们有望应用在 IDD 中。有研究者设计了一种离子触发的脂质体凝胶系统(LP-Gel),结果显示载有紫杉醇的 LP-Gel 可在膀胱内滞留 7 d,游离药物滞留量在给药 7 d 后仅为前者的 1.17%^[50]。

3.2 固体脂质纳米粒

固体脂质纳米粒(solid lipid nanoparticles, SLN)是以固态油相为核心,被一层连续的表面活性剂覆盖且粒径小于 500 nm 的纳米颗粒。目前,已有多种抗肿瘤药品被证实可以通过 SLN 提升其在脂质中的溶解度,如阿霉素、依托泊苷及多西他赛。然而,关于 SLN 在 IDD 的研究仍相对匮乏。Shawky 等^[51]设计了一种负载槲皮素的 SLN,结果表明其具有优秀的包封率和长达 142 h 的持续释放效果。鉴于 SLN 与脂质体类似的特性,且稳定性更优,因此我们有理由相信,SLN 在 IC 等膀胱疾病治疗领域具有广阔的发展前景和巨大的应用潜力。

3.3 纳米粒子

纳米粒子在增强药物靶向性方面展现出显著优势,相较于微粒,更适合用于膀胱内的药物递送。大致可以分为聚合物纳米粒子(例如 PLGA)、磁性纳米粒子(例如氧化铁)和黏膜黏附纳米粒子(例如壳聚糖)。磁性纳米粒子具有独特的物理和化学性质,可以通过磁场来进行定位,甚至靶向身体的特定区域。磁性纳米粒子在受到外部施加的交变磁场时会变热,这一特性使其能够通过局部热疗治疗肿瘤,Qi 等^[52]采用温和磁热疗方法将 HA 修饰的磁性纳米颗粒用于治疗膀胱癌,研究结果显示这一方法能够有效靶向肿瘤细胞并显著抑制肿瘤生长。Cai 等^[53]研究了超顺磁性氧化铁纳米粒子在膀胱癌

细胞中的铁死亡诱导作用,发现其能显著提高化疗效果。黏膜黏附纳米粒子因其能紧密黏附在膀胱壁黏膜上并延长药物在膀胱中的停留时间而广泛用于 IDD^[54]。其中,壳聚糖的使用比较广泛。黏膜黏附载体必须满足三个标准:通过氢键牢固地黏附在尿路上皮上;不干扰泌尿过程或其他自然过程;不会因频繁排尿而导致药物损失。Kong 等^[55]利用黏附性纳米粒子技术,实现了膀胱内局部递送 KDM6A-mRNA,有效抑制了膀胱癌细胞的侵袭和迁移。Du 等^[56]使用壳聚糖低聚糖开发了一种具有高 Zeta 电位的亚细胞纳米仿生脂质体,可以通过电荷相互作用提高与膀胱黏膜的黏附性,有效抵抗尿液冲刷,用于增强膀胱内药物递送。

3.4 水凝胶

凝胶能够附着在膀胱壁上,有效避免药物随尿液排出,从而减少重复给药的需求。热敏水凝胶在室温下呈现溶胶状态以便于注射,注射后在体温下可转化为凝胶状态。然而,热敏水凝胶凝胶化后会提升尿路梗死的风险。为了解决这一问题,Lin 等^[57]设计了一种微泡自发型漂浮水凝胶,能够漂浮在尿液中从而避免普通水凝胶可能引起的尿路梗阻和膀胱刺激。Jensen 等^[58]开发了一种基于丝弹性蛋白聚合物的系统来增强半合成糖胺聚糖醚的递送,结果显示丝弹性蛋白聚合物能够提供至少 24 h 的持续治疗效果。Jing 等^[59]开发了一种纳米转运蛋白包裹的水凝胶系统,可调节膀胱癌细胞内氨代谢实现抗肿瘤效果,为膀胱癌的治疗提供了新的思路。Guo 等^[60]开发了一种 HA 热敏水凝胶,研究结果显示药物释放时间可以达到 5 d 以上,并且具有良好的生物相容性和抗菌性能,有望成为 IC 膀胱内滴注的理想剂型。尽管水凝胶具有诸多优势,但其降解产物可能会引发刺激和炎症。因此,在开发新的水凝胶系统时,需要全面评估其降解速率,以减少膀胱内的潜在不良反应。

3.5 树枝状大分子(dendrimers)

树枝状大分子是具有树枝状结构、由低聚物通过枝化单元的重复线性连接而成的大分子,通常由内核、聚合物主链及树枝单元的侧链组成。高度有序的结构、狭窄的尺寸分布和众多官能团使其在药物分子连接、靶向配体连接以及对药物释放特性的高度控制方面展现出巨大潜力,为相关药物应用于 IDD 领域奠定了基础。

Qiu 等^[61]开发了一种基于聚酰胺-胺型树枝状大分子(PAMAM)和聚乙二醇(PEG)的新型给药系统,成功提高了药物渗透性和靶向释放能力。Ambrosio 等^[62]对负载靶向 Nrf2 的 siRNA 的碳硅烷树状大分子进行研究,发现其能有效降低膀胱癌细胞对顺铂的耐药性,并且显示出良好的安全性。然而,其在 IC 等膀胱疾病中的治疗用途尚待

进一步探讨和研究。

3.6 纳米机器人 / 纳米马达

纳米机器人是一类能够在微米至纳米级别空间活动，并拥有自主运动能力的微型机器人。凭借其细胞 / 亚细胞尺寸及卓越的运转特性，纳米机器人能够深入传统医疗器械无法触及的病灶微区，实现精确操控。这一特性使其在疾病诊治、靶向药物运输、微创手术以及生物感知等多个领域展现出广阔的发展前景。在膀胱癌治疗方面，纳米机器人已展现出显著成效。Simó 等^[63]借助放射性标记的介孔二氧化硅基尿素酶驱动的纳米机器人来改善膀胱癌治疗，研究结果显示使用单次高剂量纳米机器人即可将肿瘤体积减小 90%。Cong 等^[64]开发了一种装载溶瘤腺病毒（oncolytic viruses，OVs）的新型磁性驱动 Janus 细胞

机器人，能够在磁场控制下精确地将 OV 输送到肿瘤部位，在体外和体内实验中均显示出了显著的抗肿瘤效果和良好的生物安全性。Tang 等^[65]开发了一种基于细菌外膜囊泡（OMV）和尿素酶的自驱动纳米机器人，通过尿素分解实现自主运动和药物递送，为膀胱癌的精准治疗提供了新的解决方案。Choi 等^[66]设计了一种尿素酶驱动的多巴胺纳米马达，能够在膀胱中将尿素转化为二氧化碳和氨，可以穿透膀胱壁的黏膜层，即使在反复排尿后也有助于延长在膀胱中的保留时间，大幅提升了药物的递送效率。纳米机器人和纳米马达在药物递送方面的优势，不仅能用于膀胱癌治疗，同样有望被应用于解决 IC 的给药难题。

以上这些创新制剂在 IDD 领域的最新动态及其发展趋势，其特性与应用总结见表 3。

表 3 膀胱内药物递送创新制剂特性与应用

Tab 3 Characteristics and applications of innovative drug delivery formulations for intravesical administration					
制剂类型		材料	药物	治疗疾病	特性
脂质体	—	磷脂	OND/BTX-A/ 奥沙利铂前药 -BCG/ 紫杉醇	IC、膀胱癌	既可作为治疗剂，又可作为药物递送载体；可提高水不溶性药物的生物利用度 ^[47-50]
固体脂质纳米粒	—	固态油相、表面活性剂	槲皮素	膀胱癌	提高药物溶解度、稳定性及持续释放效果 ^[51]
纳米颗粒	磁性纳米颗粒	氧化铁等	阿霉素	膀胱癌	磁靶向性、生物相容性、可与热疗相结合 ^[52-53]
	黏膜黏附纳米颗粒	壳聚糖、油酸	甲氧苄啶、KDM6A-mRNA	膀胱癌、糖尿病性膀胱功能障碍	可以黏附在膀胱壁黏膜上并延长药物在膀胱中的停留时间，减少因排尿产生的药物损失 ^[54-56]
水凝胶	漂浮水凝胶	泊洛沙姆 407	肝素	IC	能够漂浮在尿液中从而避免了普通水凝胶可能引起的尿路梗阻和膀胱刺激 ^[57]
	热敏水凝胶	PEG-PLGA-PEG、TC-3-丝弹性蛋白聚合物、壳聚糖	米索前列醇、BTX-A、半合成糖胺聚糖醚	IC、膀胱癌	制备简单、生物相容性好；药物释放更持久和可控 ^[58-60]
树枝状大分子	—	PAMAM、PEG	阿霉素	膀胱癌	提高药物渗透性、靶向释放能力、生物安全性高 ^[61]
	—	碳硅烷树状大分子	靶向 Nrf2 的 siRNA	对顺铂耐药的膀胱癌	生物相容性、增强细胞穿透能力 ^[62]
纳米机器人	—	介孔二氧化硅、尿素酶等	碘 -131	膀胱癌	自主驱动、精确操控、深入病灶微区、生物相容性 ^[63]
	—	四氧化三铁	OVs	膀胱癌	磁响应性、肿瘤特异性、延长药物滞留时间、组织渗透性 ^[64]
纳米马达	—	OMV、尿素酶、细胞穿透肽	siRNA	膀胱癌	自主驱动、生物相容性、肿瘤特异性、免疫原性 ^[65]
	—	聚多巴胺、脲酶	—	IC	促进了对膀胱壁黏膜层的渗透，延长滞留时间 ^[66]

4 结论和展望

IC 的发病机制难以捉摸，目前虽已有多种治疗方式，但治疗效果仍不尽如人意。在药物治疗方面，传统的口服药物如阿米替林、西咪替丁、羟嗪、PPS 和 CyA 等，虽然在一定程度上能够缓解 IC 症状，但疗效有限且常伴有不良反应。而膀胱灌注药物如 DMSO、肝素、利多卡因等能够更直接地作用于膀胱，提高药物在膀胱内的局部浓度，减少全身不良反应。然而，IDD 方式由于尿路上皮障碍及随尿液排出、依从性不佳等问题有待进一步改进。为了克服这些挑战，研究者们开始探索新型膀胱内制剂，如脂质体、固体脂质纳米粒、纳米粒子、水凝胶、树枝状大

分子和纳米机器人等。这些新型制剂通过提高药物的稳定性、延长药物在膀胱内的滞留时间、增强药物的靶向性等途径，显著提高了 IDD 的疗效。特别是纳米机器人技术，凭借其精确操控和自主运动的能力，在 IDD 领域展现出巨大的潜力。

展望未来，随着纳米技术和材料科学的不断进步，我们有理由相信，会有更多创新性的膀胱内制剂将被开发出来，为 IC 的治疗提供新的选择。同时，随着对 IC 发病机制的深入研究，我们也有望找到更加精准、有效的治疗方法，为患者带来更好的治疗效果和生活质量。

参考文献

- [1] Akiyama Y, Sonehara K, Maeda D, et al. Genome-wide association study identifies risk loci within the major histocompatibility complex region for Hunner-type interstitial cystitis [J]. *Cell Rep Med*, 2023, 4 (7): 101114.
- [2] Fall M, Nordling J, Cervigni M, et al. Hunner lesion disease differs in diagnosis, treatment and outcome from bladder pain syndrome: an ESSIC working group report [J]. *Scand J Urol*, 2020, 54 (2): 91-98.
- [3] Wein AJ. Re: update on the pathophysiology of interstitial cystitis/bladder pain syndrome [J]. *J Urol*, 2020, 204 (3): 625.
- [4] Homma Y, Akiyama Y, Kim JH, et al. Definition change and update of clinical guidelines for interstitial cystitis and bladder pain syndrome [J]. *Low Urin Tract Symptoms*, 2024, 16 (5): e12532.
- [5] Homma Y, Akiyama Y, Tomoe H, et al. Clinical guidelines for interstitial cystitis/bladder pain syndrome [J]. *Int J Urol*, 2020, 27 (7): 578-589.
- [6] Li J, Yi XY, Ai JZ. Broaden horizons: the advancement of interstitial cystitis/bladder pain syndrome [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (23): 14594.
- [7] Offiah I, McMahon SB, O'Reilly BA. Interstitial cystitis/bladder pain syndrome: diagnosis and management [J]. *Int Urogynecol J*, 2013, 24 (8): 1243-1256.
- [8] Clemens JQ, Meenan RT, Rosetti MCO, et al. Prevalence and incidence of interstitial cystitis in a managed care population [J]. *J Urol*, 2005, 173 (1): 98-102.
- [9] Dinis S, De Oliveira JT, Pinto R, et al. From bladder to systemic syndrome: concept and treatment evolution of interstitial cystitis [J]. *Int J Womens Health*, 2015, 7: 735-744.
- [10] Akiyama Y, Maeda D, Katoh H, et al. Molecular taxonomy of interstitial cystitis/bladder pain syndrome based on whole transcriptome profiling by next-generation RNA sequencing of bladder mucosal biopsies [J]. *J Urol*, 2019, 202 (2): 290-300.
- [11] Wyndaele JJJ, Riedl C, Taneja R, et al. GAG replenishment therapy for bladder pain syndrome/interstitial cystitis [J]. *Neurourol Urodyn*, 2019, 38 (2): 535-544.
- [12] Patnaik SS, Laganà AS, Vitale SG, et al. Etiology, pathophysiology and biomarkers of interstitial cystitis/painful bladder syndrome [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2017, 295 (6): 1341-1359.
- [13] Lazzeri M, Hurle R, Casale P, et al. Managing chronic bladder diseases with the administration of exogenous glycosaminoglycans: an update on the evidence [J]. *Ther Adv Urol*, 2016, 8 (2): 91-99.
- [14] Keller JJ, Chen YK, Lin HC. Comorbidities of bladder pain syndrome/interstitial cystitis: a population-based study [J]. *BJU Int*, 2012, 110 (11C): E903-E909.
- [15] Jin XW, Liu BK, Zhang X, et al. Establishment of a novel autoimmune experimental model of bladder pain syndrome/interstitial cystitis in C57BL/6 mice [J]. *Inflammation*, 2017, 40 (3): 861-870.
- [16] Peng L, Jin X, Li BY, et al. Integrating single-cell RNA sequencing with spatial transcriptomics reveals immune landscape for interstitial cystitis [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7 (1): 161.
- [17] Su F, Zhang W, Meng LF, et al. Multimodal single-cell analyses outline the immune microenvironment and therapeutic effectors of interstitial cystitis/bladder pain syndrome [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2022, 9 (18): 2106063.
- [18] Liu HT, Kuo HC. Biomarkers for patients with interstitial cystitis/bladder pain syndrome [J]. *Urol Sci*, 2015, 26 (4): 225-229.
- [19] Jacobs BL, Smaldone MC, Tyagi V, et al. Increased nerve growth factor in neurogenic overactive bladder and interstitial cystitis patients [J]. *Can J Urol*, 2010, 17 (1): 4989-4994.
- [20] Parsons CL, Argade S, Evans RJ, et al. Role of urinary cations in the etiology of interstitial cystitis: a multisite study [J]. *Int J Urol*, 2020, 27 (9): 731-735.
- [21] Keay SK, Zhang CO. Abnormal Akt signalling in bladder epithelial cell explants from patients with interstitial cystitis/bladder pain syndrome can be induced by antiproliferative factor treatment of normal bladder cells [J]. *BJU Int*, 2016, 118 (1): 161-172.
- [22] Mormone E, Cisternino A, Capone L, et al. The model of interstitial cystitis for evaluating new molecular strategies of interstitial regeneration in humans [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25 (4): 2326.
- [23] Wróbel A, Serefko A, Bańczerowska-Górska M, et al. Intravesical administration of blebbistatin prevents cyclophosphamide-induced toxicity of the urinary bladder in female Wistar rats [J]. *Neurourol Urodyn*, 2019, 38 (4): 1044-1052.
- [24] Ni B, Chen ZS, Shu L, et al. Nrf2 pathway ameliorates bladder dysfunction in cyclophosphamide-induced cystitis via suppression of oxidative stress [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021: 4009308.
- [25] Li J, Luo H, Dong XY, et al. Therapeutic effect of urine-derived stem cells for protamine/lipopolysaccharide-induced interstitial cystitis in a rat model [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8 (1): 107.
- [26] Mohammad A, Laboulaye MA, Shenhar C, et al. Mechanisms of oxidative stress in interstitial cystitis/bladder pain syndrome [J]. *Nat Rev Urol*, 2024, 21 (7): 433-449.
- [27] Windgassen S, McKernan L. Cognition, emotion, and the bladder: psychosocial factors in bladder pain syndrome and interstitial cystitis (BPS/IC) [J]. *Curr Bladder Dysfunct Rep*, 2020, 15 (1): 9-14.
- [28] Liu X, Yang Y, Gao Y, et al. Estrogen inhibits bladder overactivity in rats with cyclophosphamide-induced cystitis via downregulating the expression of P2X3 receptors in bladder epithelium cells [J]. *Neurourol Urodyn*, 2022, 41 (1): 174-187.
- [29] Hanno PM, Erickson D, Moldwin R, et al. Diagnosis and treatment of interstitial cystitis/bladder pain syndrome: AUA guideline amendment [J]. *J Urol*, 2015, 193 (5): 1545-1553.
- [30] Clemens JQ, Erickson DR, Varela NP, et al. Diagnosis and treatment of interstitial cystitis/bladder pain syndrome [J]. *J Urol*, 2022, 208 (1): 34-42.
- [31] Van Ophoven A, Pokupic S, Heinecke A, et al. A prospective, randomized, placebo controlled, double-blind study of amitriptyline for the treatment of interstitial cystitis [J]. *J Urol*, 2004, 172 (2): 533-536.
- [32] Hertle L, Van Ophoven A. Long-term results of amitriptyline treatment for interstitial cystitis [J]. *Aktuelle Urol*, 2010, 41 (S1): S61-S65.
- [33] Thilagarajah R, Witherow RO, Walker MM. Oral cimetidine gives effective symptom relief in painful bladder disease: a prospective, randomized, double-blind placebo-controlled trial [J]. *BJU Int*, 2001, 87 (3): 207-212.
- [34] Pearce WA, Chen R, Jain N. Pigmentary maculopathy associated

- with chronic exposure to pentosan polysulfate sodium [J]. *Ophthalmology*, 2018, 125 (11): 1793-1802.
- [35] Sairanen J, Tammela TL, Leppilahti M, et al. Cyclosporine A and pentosan polysulfate sodium for the treatment of interstitial cystitis: a randomized comparative study [J]. *J Urol*, 2005, 174 (6): 2235-2238.
- [36] Forrest JB, Payne CK, Erickson DR. Cyclosporine A for refractory interstitial cystitis/bladder pain syndrome: experience of 3 tertiary centers [J]. *J Urol*, 2012, 188 (4): 1186-1191.
- [37] Palugan L, Cerea M, Cirilli M, et al. Intravesical drug delivery approaches for improved therapy of urinary bladder diseases [J]. *Int J Pharm X*, 2021, 3: 100100.
- [38] Perez-Marrero R, Emerson LE, Feltis JT. A controlled study of dimethyl sulfoxide in interstitial cystitis [J]. *J Urol*, 1988, 140 (1): 36-39.
- [39] Parsons CL, Housley T, Schmidt JD, et al. Treatment of interstitial cystitis with intravesical heparin [J]. *Br J Urol*, 1994, 73 (5): 504-507.
- [40] Nickel JC, Jain P, Shore N, et al. Continuous intravesical lidocaine treatment for interstitial cystitis/bladder pain syndrome: safety and efficacy of a new drug delivery device [J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4 (143): 143ra100.
- [41] Kocatürk H, Atasoy N, Bedir F, et al. Questionnaire-guided evaluation of the effectiveness of long-term intravesical 0.2% chondroitin sulfate therapy in interstitial cystitis [J]. *Int Urogynecol J*, 2021, 32 (5): 1293-1298.
- [42] Giberti C, Gallo F, Cortese P, et al. Combined intravesical sodium hyaluronate/chondroitin sulfate therapy for interstitial cystitis/bladder pain syndrome: a prospective study [J]. *Ther Adv Urol*, 2013, 5 (4): 175-179.
- [43] Matsuoka PK, Haddad JM, Pacetta AM, et al. Intravesical treatment of painful bladder syndrome: a systematic review and meta-analysis [J]. *Int Urogynecol J*, 2012, 23 (9): 1147-1153.
- [44] Kendall HJ, Schrijvers J, Heesakkers JPFA. Current position of neuromodulation for bladder pain syndrome/interstitial cystitis [J]. *Curr Opin Urol*, 2024, 34 (2): 64-68.
- [45] Shin JH, Park JH, Ryu CM, et al. Stem cell therapy for interstitial cystitis/bladder pain syndrome [J]. *Low Urin Tract Symptoms*, 2024, 16 (4): e12527.
- [46] Kuo HC. Intravesical injections of autologous platelet-rich plasma for the treatment of refractory interstitial cystitis [J]. *Low Urin Tract Symptoms*, 2023, 15 (6): 210-215.
- [47] Majima T, Tyagi P, Dogishi K, et al. Effect of intravesical liposome-based nerve growth factor antisense therapy on bladder overactivity and nociception in a rat model of cystitis induced by hydrogen peroxide [J]. *Hum Gene Ther*, 2017, 28 (7): 598.
- [48] Hung FC, Kuo HC. Liposome-encapsulated botulinum toxin A in treatment of functional bladder disorders [J]. *Toxins*, 2022, 14 (12): 838.
- [49] Ma C, Zhong XF, Liu R, et al. Co-delivery of oxaliplatin pro-drug liposomes with bacillus calmette-guérin for chemo-immunotherapy of orthotopic bladder cancer [J]. *J Control Release*, 2024, 365: 640-653.
- [50] GuhaSarkar S, More P, Banerjee R. Urothelium-adherent, ion-triggered liposome-in-gel system as a platform for intravesical drug delivery [J]. *J Control Release*, 2017, 245: 147-156.
- [51] Shawky S, Makled S, Awaad A, et al. Quercetin loaded cationic solid lipid nanoparticles in a mucoadhesive in situ gel-a novel intravesical therapy tackling bladder cancer [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14 (11): 2527.
- [52] Qi FG, Bao QQ, Hu P, et al. Mild magnetic hyperthermia-activated immuno-responses for primary bladder cancer therapy [J]. *Biomaterials*, 2024, 307: 122514.
- [53] Cai XM, Ruan LF, Wang DQ, et al. Boosting chemotherapy of bladder cancer cells by ferroptosis using intelligent magnetic targeting nanoparticles [J]. *Colloid Surface B*, 2024, 234: 113664.
- [54] Ways TMM, Lau WM, Khutoryanskiy VV. Chitosan and its derivatives for application in mucoadhesive drug delivery systems [J]. *Polymers*, 2018, 10 (3): 267.
- [55] Kong N, Zhang RN, Wu GW, et al. Intravesical delivery of *KDM6A*-mRNA via mucoadhesive nanoparticles inhibits the metastasis of bladder cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119 (7): e2112696119.
- [56] Du HF, Yin HY, Qin YH, et al. Subcellular nanobionic liposome with high zeta potential enhances intravesical adhesion and drug delivery [J]. *ACS Nano*, 2024, 18 (4): 3583-3596.
- [57] Lin TS, Zhao XZ, Zhang YF, et al. Floating hydrogel with self-generating micro-bubbles for intravesical instillation [J]. *Materials*, 2016, 9 (12): 1005.
- [58] Jensen MM, Jia W, Schults AJ, et al. Temperature-responsive silk-elastinlike protein polymer enhancement of intravesical drug delivery of a therapeutic glycosaminoglycan for treatment of interstitial cystitis/painful bladder syndrome [J]. *Biomaterials*, 2019, 217: 119293.
- [59] Jing WQ, Chen C, Wang GY, et al. Metabolic modulation of intracellular ammonia via intravesical instillation of nanopore-encased hydrogel eradicates bladder carcinoma [J]. *Adv Sci*, 2023, 10 (12): e2206893.
- [60] Guo W, Liu HC, Zhang JX, et al. Preparation and characterization of a novel composite acellular matrix/hyaluronic acid thermosensitive hydrogel for interstitial cystitis/bladder pain syndrome [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2024, 112 (3): 449-462.
- [61] Qiu XF, Cao K, Lin TS, et al. Drug delivery system based on dendritic nanoparticles for enhancement of intravesical instillation [J]. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12: 7365-7374.
- [62] Ambrosio L, Argenziano M, Cucci MA, et al. Carbosilane dendrimers loaded with siRNA targeting Nrf2 as a tool to overcome cisplatin chemoresistance in bladder cancer cells [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9 (10): 993.
- [63] Simó C, Serra-Casablancas M, Hortelao AC, et al. Urease-powered nanobots for radionuclide bladder cancer therapy [J]. *Nat Nanotechnol*, 2024, 19 (4): 554-564.
- [64] Cong ZQ, Tang SS, Xie LM, et al. Magnetic-powered Janus cell robots loaded with oncolytic adenovirus for active and targeted virotherapy of bladder cancer [J]. *Adv Mater*, 2022, 34 (26): e2201042.
- [65] Tang SS, Tang DT, Zhou HH, et al. Bacterial outer membrane vesicle nanorobot [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2024, 121 (30): e2403460121.
- [66] Choi H, Cho SH, Hahn SK. Urease-powered polydopamine nanomotors for intravesical therapy of bladder diseases [J]. *ACS Nano*, 2020, 14 (6): 6683-6692.

(收稿日期: 2024-10-12; 修回日期: 2024-12-27)

转化生长因子- β 在前列腺癌中的研究进展

刘徽¹, 江沛², 张祥宇^{3*} (1. 山东第一医科大学(山东省医学科学院), 济南 250117; 2. 济宁市第一人民医院临床药学科, 山东 济宁 272000; 3. 济宁市第一人民医院病理科, 山东 济宁 272000)

摘要: 前列腺癌是男性中一种常见的肿瘤, 近年来发病率呈逐年上升趋势, 去势治疗及手术治疗是前列腺癌的主要治疗方式, 但是去势治疗抵抗和远处转移仍然是前列腺癌治疗过程中面临的棘手问题, 且严重影响患者的生存质量。此外, 前列腺癌微环境中的免疫耐受使得多种免疫治疗效果有限。转化生长因子- β (TGF- β) 信号通路参与前列腺癌去势治疗抵抗、远处转移和免疫抑制微环境的形成, 促进前列腺癌的进展。本文主要对 TGF- β 在前列腺癌发生发展中的作用, 其介导的免疫抑制效应以及后续相关的治疗方案进行综述。

关键词: 转化生长因子- β ; 前列腺癌; 去势抵抗; 转移; 抑制剂

中图分类号: R737.25 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)04-1044-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.026

Research progress of transforming growth factor beta in prostate cancer

LIU Hui¹, JIANG Pei², ZHANG Xiang-yu^{3*} (1. Shandong First Medical University (Shandong Academy of Medical Sciences), Jinan 250117; 2. Institute of Clinical Pharmacy & Pharmacology, Jining First People's Hospital, Jining Shandong 272000; 3. Department of Pathology, Jining First People's Hospital, Jining Shandong 272000)

Abstract: Prostate cancer is a frequent malignancy, and in recent years, the incidence rate has been rising. The two primary treatment modalities for prostate cancer are castration and surgery; nevertheless, difficult issues during these procedures include castration resistance and distant metastases, which have a negative impact on patient prognosis. Additionally, the effectiveness of several immunotherapies has been constrained by immunological tolerance in the prostate cancer microenvironment. However, prostate cancer growth is much influenced by the transforming growth factor beta signaling system, which also has a role in distant metastasis, development of castration resistance, and the immune-suppressive milieu of prostate cancer. This paper primarily reviewed the role of transforming growth factor beta in prostate cancer, including its role in immune invasion and the following therapeutic choices.

Key words: TGF- β ; prostate cancer; castration-resistant; metastasis; inhibitor

前列腺癌是男性中一种常见的恶性肿瘤, 在全球男性新发癌症中占 14.2%, 位居第二; 在全球男性死亡病例中占 7.3%, 位居第五^[1]。在中国, 随着人口老龄化的进展以及前列腺癌早筛技术的进步, 前列腺癌发病率呈现明显上升趋势^[2]。由于前列腺癌属于一种相对惰性的肿瘤, 早期局限性前列腺癌经过手术治疗之后患者的五年生存期可达到 100%, 但是前列腺癌患者一旦出现远处脏器的转

移, 其五年生存期就会明显地降低^[3]。目前, 随着人们对前列腺癌发病机制的探讨, 发现转化生长因子- β (transforming growth factor beta, TGF- β) 在前列腺组织增生过程中发挥重大作用^[4]。

哺乳动物的 TGF- β 包括三种类型即 TGF- β_1 、TGF- β_2 和 TGF- β_3 。TGF- β 是以同源二聚体形式发挥生物学作用, 当潜伏期相关肽 (latency-associated peptide, LAP) 与细胞膜表面的 αv 整合素结合之

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.81803097); 山东省自然科学基金 (No.ZR2023MH260)。

作者简介: 刘徽, 女, 在读硕士研究生, 主要从事前列腺癌及其药物治疗相关研究, email: liu15610271915@163.com * 通信作者: 张祥宇, 男, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事前列腺癌及其药物治疗相关研究, email: zhangxiangyu666@126.com

后, 具有生物学活性的 TGF- β 被释放出来, 之后能够与两对跨膜的丝氨酸蛋白激酶受体 TGF- β I 型受体 (T β R I) 和 II 型受体 (T β R II) 结合, 首先 TGF- β 激活 T β R II, 之后 T β R II 磷酸化并激活 T β R I 的近膜区域 (GS 区), TGF β R I GS 区域一旦被 T β R II 磷酸化, 该区域就成为 Smad 蛋白的结合位点, 继而磷酸化并激活 Smad2/3 因子, Smad2/3 与 Smad4 形成三聚体, 进入细胞核转录激活靶基因, 一旦 Smad 去磷酸化, 则失去与脱氧核糖核酸 (DNA) 结合的能力, 进入下一轮的信号传递^[5]。TGF- β 信号通路是一个进化保守的信号通路, 代表了信号从细胞膜到细胞核传递的一种方式, 通过膜受体介导的转录因子活化^[6]。

1 TGF- β 与前列腺癌关系

TGF- β 对前列腺上皮细胞具有双重调节作用^[7]。在抑制细胞生长方面, TGF- β 主要与细胞周期和抑癌基因作用从而发挥抑制增殖作用。细胞的生长受到细胞周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白 P27 和 P21 的调控, TGF- β /Smad 信号通路调控 P27 和 P21 从而影响前列腺上皮细胞增殖^[8]。TGF- β 可以通过 P27 和 P21 使细胞周期停滞在 G₁ 期^[9]。P53 与 Smad 复合物在 TGF- β 抑制生长方面不可缺少, p53 的缺失会减弱 TGF- β 的抑制增殖作用^[10]。

在 TGF- β 抑制生长到促进增殖的过程中, 一些抑制生长的途径会转变成促进细胞增殖的途径, 这些改变是复杂且多样的, 例如上皮细胞中 TGF- β 通过 P27 抑制细胞生长停滞, Ral 介导的 RalA 结合蛋白 1 (RalBP1) 通路能够减弱这一效应^[11]。在促进增殖方面, TGF- β 与雄激素之间存在相互依存关系, 有利于前列腺基质细胞和上皮细胞的增殖^[12]。TGF- β 能够诱导成纤维细胞向肌成纤维细胞分化, 从而促进前列腺上皮细胞增殖^[13]。TGF- β 促进微小 RNA-223-3p (miR-223-3p) 的表达增加, 间接促进前列腺上皮细胞的增殖^[14]。此外, 有研究表明 TGF- β 调控 miR663AHG/miR-765/FOXK1 轴导致前列腺上皮细胞过度增殖^[15]。TGF- β_1 通过 Smad 复合物促进长非编码 RNA DIO3OS (lncRNA DIO3OS) 转录, 继而通过 miR-656-3p 和 miR-485-5p 上调结缔组织生长因子 (CTGF) 和锌指 E- 盒结合同源盒蛋白 1 (ZEB1), 促进前列腺上皮细胞的增殖^[16]。研究表明, 生存素/TGF- β /哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物 1 (survivin/TGF- β /mTORC1) 轴在胰岛素样生长因子 -1 (IGF-1) 介导下促进前列腺上皮细胞增殖^[17]。

TGF- β 含量的改变与前列腺癌的发生关系密切。在进展较快的前列腺癌患者的肿瘤组织中检测

到明显高水平的 TGF- β_1 , 肿瘤细胞分泌的高水平 TGF- β_1 能够抑制抗肿瘤免疫反应, 促进肿瘤进展。TGF- β_1 是将炎症与肿瘤相互联系在一起的关键因子, 参与调控肿瘤进展、浸润和转移。有研究表明, TGF- β_1 表达水平与前列腺癌 Gleason 评分和临床分期成正相关, 细胞和动物实验均表明, 抑制 TGF- β_1 能够明显减缓前列腺癌细胞浸润性^[18-19]。

1.1 TGF- β 与前列腺癌去势治疗抵抗

前列腺癌经去势治疗后, 前列腺癌细胞表达的 TGF- β 水平升高。越来越多的证据表明肿瘤微环境参与了前列腺癌去势抵抗, 前列腺癌去势治疗能够诱发肿瘤相关成纤维细胞 (cancer associated fibroblasts, CAFs) 发生表型转换, 前列腺癌微环境中的 TGF- β 诱导炎症型肿瘤相关成纤维细胞 (iCAFs) 转变为肌成纤维型肿瘤相关成纤维细胞 (myCAFs), myCAFs 通过旁分泌分泌型磷蛋白 1- 细胞外调节蛋白激酶 (SPP1-ERK) 信号来诱导前列腺癌细胞去势治疗抵抗^[20] (见图 1)。有研究表明, SPP1 能够诱导前列腺癌细胞对恩杂鲁胺 (enzalutamide) 耐受, 而敲低 SPP1 表达能够增敏恩杂鲁胺杀伤 22Rv1 细胞, 可能与 SPP1 激活 ERK 信号通路有关^[21] (见图 1)。前列腺癌肿瘤微环境中 myCAFs 的产生受到 TGF- β 信号通路动态调控。在缺乏雄激素的条件下, TGF- β 能够通过白细胞介素 (IL) -6 和骨形态发生蛋白 (BMP-6) 等途径激活 LNCaP 细胞上的雄激素受体 (AR), 上调 AR 调控靶基因如前列腺特异性抗原基因 (prostate-specific antigen, PSA)、跨膜丝氨酸蛋白酶基因 (transmembrane serine protease 2, TMPRSS2) 和激肽释放酶 4 基因 (kallikrein-related peptidase-4, KLK4)^[22] (见图 1)。AR 与 TGF- β_1 可以发生交互作用影响前列腺癌细胞浸润、生长和转移, AR 过表达能够拮抗 TGF- β_1 的生长抑制作用, AR 的丢失能够通过 TGF- β_1 / 上皮-间质转化 (TGF- β_1 /EMT) 信号通路增加去势抵抗性干细胞样前列腺癌细胞^[23]。AR 受体的核转位对于 AR 转录活性具有重要意义, TGF- β_1 可以增加 AR 的核转位, TGF- β 能够通过扭曲蛋白家族 bHLH 转录因子 1 (Twist1) 转录因子上调 AR 表达^[24]。TGF- β_1 信号通路通过与 AR、B 淋巴细胞瘤 -2 基因 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 和 β - 连环蛋白 (β -catenin) 发生相互作用促进前列腺癌去势抵抗的发生。激素敏感性前列腺癌进展至转移性去势抵抗性前列腺癌的过程中, TGF- β 信号通路出现明显活化, 提示 TGF- β 信号通路的活化可能促进前列腺癌去势

抵抗过程^[25]。采用 T β R I 抑制剂处理去势抵抗前列腺癌细胞，能够增强恩杂鲁胺杀伤作用^[26]。此外，在前列腺癌骨转移灶，破骨细胞溶解骨基质释放多种细胞因子，如 TGF- β 、IL-8、趋化因子 CXCL12 (CXCL12)、粒细胞集落刺激因子，这些细胞因子能够诱导恩杂鲁胺的耐受，诱导去势抵抗，而抑制 TGF- β 信号通路能抵抗前列腺癌去势抵抗，表明 TGF- β 信号通路在前列腺癌骨转移灶的去势抵抗中也发挥了重要作用^[27]。

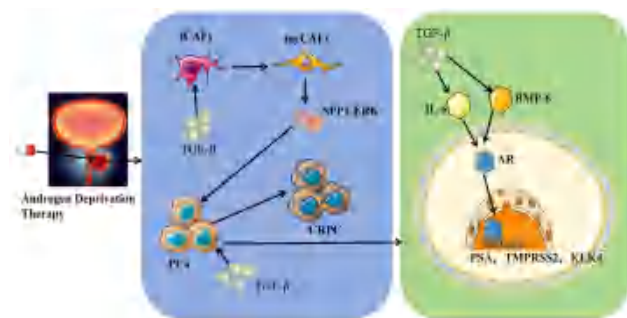


图 1 TGF- β 在前列腺癌去势治疗抵抗中的作用^[20-22]

Fig 1 Effect of TGF- β in castration-resistant prostate cancer^[20-22]

1.2 TGF- β 与前列腺癌免疫抑制微环境

前列腺癌的肿瘤微环境常呈免疫抑制状态，所以前列腺癌的免疫治疗效果非常有限。前列腺癌微环境中 TGF- β 通过激活巨噬细胞中信号传导及转录激活蛋白 3 (STAT3) 促进 M2 型巨噬细胞极化，且能够通过调节 *c-Myc* 基因上调 *C-X-C* 受体 4 (CXCR4) 基因。TGF- β 能够促进 CAFs 分泌 CXCL12 因子，与巨噬细胞表面的 CXCR4 受体结合^[28]。肿瘤微环境间质纤维化与抗肿瘤免疫细胞浸润减少密切相关，而 TGF- β 能够促进胶原的合成而形成硬度较高的肿瘤间质纤维，继而阻断 CD8⁺ T 细胞在物理上与肿瘤细胞的接触，并且产生一些代谢产物对肿瘤相关巨噬细胞进行重编程，抑制巨噬细胞的抗肿瘤效果^[29]。

在前列腺癌移植瘤动物模型中，以敲除 T 细胞的 T β R II 或者是注射 TGF- β 拮抗抗体的方式抑制 T 细胞的 TGF- β 信号通路，能够增强 T 细胞免疫反应并减少肿瘤的体积。肿瘤细胞分泌的 TGF- β 能够抑制 T 细胞免疫反应，引起免疫逃逸。阻断 T 细胞的 TGF- β 信号通路能够增强肿瘤抗原特异性 T 细胞增殖、促进效应 T 细胞分化、抑制肿瘤进展。TGF- β_1 含量与前列腺癌内调节性 T 细胞数量成正比^[30]。T 细胞特异性敲除 T β R I 基因能够抑制前列腺癌进展和转移。转基因前列腺癌小鼠 (TRAMP) 常用来研究前列腺癌进展，在出生之后小鼠的前列腺就会出现病变，最终在

8 ~ 10 月龄出现死亡，发现 TGF- β 介导的免疫抑制能够促进 TRAMP 小鼠前列腺癌进展，且 T 细胞产生的 TGF- β_1 能够促进转移性肿瘤的生长，也有的研究表明 T β R II 功能缺陷能够促进 TRAMP 小鼠前列腺癌进展^[31-32]。

1.3 TGF- β 与前列腺癌转移

有研究表明，前列腺癌转移至骨骼时，一开始最倾向于定植在成骨细胞富集的部位。骨骼转移灶处的破骨细胞溶解骨基质，由于骨基质富含多种细胞因子，因此包括 TGF- β 在内的多种细胞因子释放至转移灶微环境中，促进转移灶肿瘤细胞的生长。TGF- β 通过活化 mTOR 信号通路和上调 microRNA-96 来促进前列腺癌骨转移^[33]。肿瘤微环境中的内皮细胞分泌 IL-6，能够降低前列腺癌细胞 AR 信号通路，并活化 TGF- β /基质金属蛋白酶 9 (TGF- β /MMP9) 信号通路来促进前列腺癌细胞侵袭，阻断 IL-6 $\rightarrow$ AR $\rightarrow$ TGF- β $\rightarrow$ MMP-9 这一信号通路能够降低前列腺癌细胞侵袭^[34]。前列腺癌骨转移灶中的 TGF- β 能够通过 T β R II 调节骨髓内皮细胞功能，继而影响前列腺癌转移进展。PCAT7 是与前列腺癌骨转移有关的 lncRNA，在前列腺癌组织中发现 PCAT7 增高，体外实验证明，PCAT7 通过 miRNA-324-5p 上调 T β R I，增强 TGF- β /Smad 信号通路，Smad3/转录因子特化蛋白 1 (Smad3/SP1) 又可以上调 PCAT7，最终形成 PCAT7/TGF- β /Smad/SP1 信号回路，导致前列腺癌骨转移^[35] (见图 2)。TGF- β 能够促进转录因子 Krüppel 样因子 5 (KLF5) 乙酰化，乙酰化 KLF5 能活化 CXCR4，促进 IL-11 的分泌，促进破骨细胞增生和前列腺癌骨转移^[36]。TGF- β 能够调节破骨细胞的功能，促进破骨细胞的增生，破骨细胞分泌的组织蛋白酶能进一步激活 TGF- β 。在骨转移灶处，条件性敲除成骨细胞中 T β R II，能够促进转移瘤增生，但是条件性敲除破骨细胞中的 T β R II 却抑制肿瘤生长^[37]。

TGF- β 能够诱导前列腺癌细胞发生 EMT，促进肿瘤细胞迁移。去势抵抗性前列腺癌出现骨转移和内脏转移，在骨转移灶处 EMT 现象较为明显，且在骨转移灶部位高表达 TGF- β_1 ，特别是 Twist 蛋白表达水平明显升高，表明 TGF- β_1 促进转移灶处的肿瘤细胞进一步发生 EMT 从而增强肿瘤细胞的侵袭性^[38]。在表达 TGF- β 激素不敏感的前列腺癌细胞中，通过给予 TGF- β 抑制剂或者直接敲除 T β R I 可使神经钙黏蛋白 (N-cadherin) 表达下降，可以抑制骨髓来源的间充质干细胞 (BM-MSCs) 向前列腺癌的条件培养基迁移。有研究表明，miR-20b-

5p 在一些肿瘤中发挥着促进细胞增殖和迁移作用,在前列腺癌中, $\text{TGF-}\beta_1$ 会抑制 miR-20b-5p 的表达, miR-20b-5p 通过直接与 $\text{T}\beta\text{R II}$ 结合影响 $\text{TGF-}\beta$ 的下游转录因子 E2F1 (E2F1), 形成 miR-20b-5p/ $\text{T}\beta\text{R II}$ /E2F1 轴, 从而影响前列腺癌细胞的 EMT^[39] (见图 2)。但也有研究表明, $\text{TGF-}\beta$ 诱导前列腺癌细胞 EMT 依赖于 RAS-丝裂原活化蛋白激酶 (RAS-MAPK) 信号通路活化^[40]。前列腺周围的脂肪组织能够释放 $\text{TGF-}\beta$ 以旁分泌作用模式促进前列腺癌细胞迁移, 使用 SB431542 抑制 $\text{TGF-}\beta$ 受体能够降低前列腺癌细胞迁移^[41]。

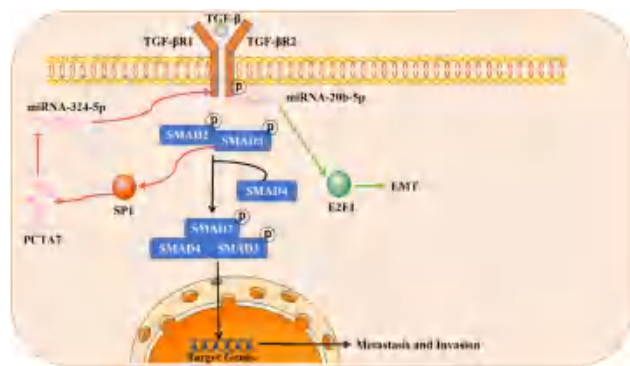


图 2 MiRNA 作用于 $\text{TGF-}\beta$ /Smad 信号通路调节前列腺癌细胞转移^[35, 39]

Fig 2 MiRNA act on $\text{TGF-}\beta$ signaling pathway to regulate cell metastasis of prostate cancer^[35, 39]

2 $\text{TGF-}\beta$ 信号通路抑制剂的应用

$\text{TGF-}\beta$ 通路抑制剂有很多类型。本文将其分为 5 类 (见表 1): $\text{TGF-}\beta$ 抑制剂 (吡非尼酮); $\text{TGF-}\beta$ 受体抑制剂 (有 galunisertib、LY320082、SB431542、itacnosertib、GFH018、GW788388、LY2109761、SD208、EW-7195 等); 抗体和配体陷阱 (罗特西普、索特西普、LY3022859、M7824、metelimumab、fresolimumb、AVID200 等); 寡核苷酸药物 (AP12009、AP11014、ISTH0036 等); 肿瘤疫苗 (belagenpumatucel-L、gemogenovatumucel-T 等)。

目前, 不同的 $\text{TGF-}\beta$ 抑制剂尚处在不同研发的阶段。大多数 $\text{TGF-}\beta$ 信号通路抑制剂仍处在临床试验和临床前研究阶段, 只有小部分抑制剂如吡非尼酮、罗特西普和索特西普目前已经上市。其中一些抑制剂, 其适应证目前虽然尚未包含前列腺癌, 但其治疗思路也为未来前列腺癌的治疗提供了新的方向。

2.1 $\text{TGF-}\beta$ 抑制剂

吡非尼酮目前已经上市, 主要作用为抗纤维化, 不良反应主要是恶心、呕吐等胃肠道反应, 其作为 $\text{TGF-}\beta$ 配体抑制剂在抗肿瘤方面报道较少, 但是有体外实验表明, 吡非尼酮可以诱导前

列腺癌细胞 G_1 期停止, 不受雄激素敏感的影响, 从而治疗前列腺癌^[42-43]。

2.2 $\text{TGF-}\beta$ 受体抑制剂

Galunisertib (LY2152299) 是一种 $\text{T}\beta\text{R I}$ 激酶抑制剂, 在体外实验中通过诱导 EMT 表型的重塑和肿瘤细胞的再分化能够增敏恩杂鲁胺抗肿瘤的效果, 在临床试验中 galunisertib 联合恩杂鲁胺治疗转移性去势抵抗性前列腺癌 (mCRPC) 患者的 2 期临床试验 (NCT02452008) 正在进行中^[44]。

LY3200882 作为 $\text{T}\beta\text{R I}$ 抑制剂, 在晚期肿瘤患者的 I 期研究 (NCT02937272) 中首次表明其联合其他药物在治疗晚期实体肿瘤中的安全性和效应。患者最常见的不良反应包括头痛、恶心、贫血和疲劳等治疗相关不良事件。研究中的 13 例晚期癌症患者接受了 LY3200882 和细胞程序性死亡 - 配体 1 (PD-L1) 抑制剂 LY3300054 的联合治疗, 其中 4 例患者出现了病情缓解, 1 例患者出现了部分缓解^[45]。

GFH018 是一种 $\text{T}\beta\text{R I}$ 抑制剂, 主要靶点是 $\text{T}\beta\text{R I}$ 。在其 I 期临床试验 (NCT05051241) 中, 50 名入组患者中有 9 名患者 (18.0%) 病情稳定, 3 名患者发生了 ≥ 3 级治疗相关不良事件。最常见的不良反应 (任何等级 / 等级 ≥ 3) 为谷草转氨酶升高、蛋白尿、贫血等^[46]。Itacnosertib (TP-0184) 是一种 $\text{T}\beta\text{R I}$ 抑制剂, 在晚期实体瘤患者的 I 期临床试验 (NCT03429218) 中表明其单药耐受剂量高达 125 mg qw ^[47]。

LY2109761 是 $\text{T}\beta\text{R I/II}$ 双重抑制剂^[48]。GW788388、SD208、EW-7195 和 SB431542 都是选择性 $\text{T}\beta\text{R I}$ 抑制剂, 其中 GW788388 还能同时抑制 $\text{TGF-}\beta$ II 型受体和激活素 II 型受体活性^[49-51]。

2.3 抗体和配体陷阱

罗特西普是由人免疫球蛋白 G1 (IgG1) 的 Fc 结构域与激活素受体 II B (ActR II B) 的细胞外结构域融合而成, 结合生长分化因子 11 (GDF11), 阻断 Smad 2/3 信号通路, 主要用于骨髓增生异常综合征和 β -地中海贫血的治疗, 其最常见的不良反应是头痛、肌肉骨骼疼痛等^[52-53]。索特西普是一种激活素受体 II A-Fc 型 (ActR II A-Fc) 融合蛋白, 已于 2024 年获批上市^[54], 目前主要用来治疗肺动脉高压, 最常见的不良反应有头痛、鼻出血、皮疹、毛细血管扩张、腹泻、眩晕、红斑等^[55]。罗特西普和索特西普这两种药物, 虽尚未应用于前列腺癌治疗, 但其治疗思路为前列腺癌的治疗提供了新的方向。

LY3022859 是一种单克隆抗体, 主要拮

表 1 TGF-β 通路抑制剂
Tab 1 TGF-β pathway inhibitors

药物名称	靶点	研发阶段	适应证	不良反应
TGF-β 抑制剂				
吡非尼酮 (pirfenidone)	TGF-β	获批上市	特发性肺纤维化	恶心、呕吐 ^[42-43]
TGF-β 受体抑制剂				
galunisertib (LY2152299)	TβR I	I 期临床 (NCT02452008)	mCRPC ^[44]	N/A
LY3200882	TβR I	I 期临床 (NCT02937272)	晚期实体瘤	头痛、恶心、贫血和疲劳 ^[45]
GFH018	TβR I	I 期临床 (NCT05051241)	晚期实体瘤	谷草转氨酶升高、蛋白尿、贫血 ^[46]
itacenosertib	TβR ALK2	I 期临床 (NCT03429218)	晚期实体瘤 ^[47]	N/A
LY2109761	TβR I / II	临床前研究	N/A	N/A
GW788388	TβR I / II	临床前研究	N/A	N/A
SD208	TβR I	临床前研究	N/A	N/A
EW-7195	TβR I	临床前研究	N/A	N/A
SB431542	TβR I	临床前研究	N/A	N/A
抗体和配体陷阱				
罗特西普 (luspatercept)	GDF11	获批上市	骨髓增生异常综合征	头痛、肌肉骨骼疼痛 ^[52-53]
索特西普 (sotatercept)	ACVR2A	获批上市	肺动脉高压	头痛、鼻出血 ^[54-55]
LY3022859	TβR II	I 期临床 (NCT01646203)	晚期实体瘤	细胞因子释放综合征 ^[56]
M7824 (MSB0011359C)	TGF-β	I 期临床 (NCT02517398)	晚期实体瘤	局部大疱性类天疱疮的皮肤感染 ^[57]
metelimumab	TGF-β ₁	临床前研究	N/A	N/A
fresolimumb (GC1008)	TGF-β ₁ 、β ₂	I 期临床 (NCT03064074)	成骨不全 ^[59]	N/A
AVID200	TGF-β ₁ 、β ₃	临床前研究	N/A	N/A
寡核苷酸药物				
AP12009 (trabedersen)	TGF-β ₂ mRNA	I 期临床 (NCT00844064)	晚期胰腺癌、恶性黑色素瘤	一过性血小板减少症 ^[61-62]
AP11014	TGF-β ₁ mRNA	临床前研究	N/A	N/A
ISTH0036	TGF-β ₂ mRNA	I 期临床 (NCT02406833)	青光眼	脉络膜渗血和结膜出血 ^[64]
肿瘤疫苗				
belagenpumatucel-L	TGF-β ₂	III 期临床 (NCT00676507)	非小细胞肺癌	皮疹 ^[65]
gemogenovatumucel-T	TGF-β ₁ 、β ₂	III 期临床 (NCT03495921)	卵巢癌	关节痛、骨痛 ^[66]

注：“N/A (Not Applicable)”代表无可适用数据或无法找到所需要信息。

抗 TGF-β₂。在晚期实体瘤患者 I 期临床试验 (NCT01646203) 中,在皮质类固醇和抗组胺药两种预防措施下,细胞因子释放综合征仍无法控制,导致其最大耐受剂量尚未确定^[56]。

M7824 (MSB0011359C) 属于配体陷阱,是一种靶向 PD-L1 和 TGF-β 的双功能融合蛋白。一项 I 期临床试验 (NCT02517398) 评估了 M7824 (MSB0011359C) 在晚期实体瘤患者中的安全性。在 14 例晚期实体瘤患者中,1 例确认完全缓解,1 例持续部分缓解,1 例接近部分缓解。4 例患者发生 ≥ 3 级治疗相关不良事件,包括继发于局部大疱性类天疱疮的皮肤感染、无症状脂肪酶升高和结肠炎伴贫血等^[57]。

Metelimumab 主要靶向 TGF-β₁, 起初用来治疗硬皮病,但因缺乏疗效而终止^[58]。Fresolimumb (GC1008) 是一个靶向 TGF-β₁ 和 TGF-β₂ 的单克隆抗体,在 I 期临床试验 (NCT03064074) 中主要用

来治疗成骨不全症,且耐受性良好^[59]。AVID200 属于配体陷阱,由 TGF-β 受体的胞外段与 IgG 片段融合而成,能够特异性地捕获 TGF-β₁ 和 TGF-β₃^[60]。

2.4 寡核苷酸药物

AP12009 (trabedersen) 是一种反义寡脱氧核苷酸,可通过结合 TGF-β₂ 的 mRNA 的互补序列,特异性抑制 TGF-β₂。在 I 期临床试验 (NCT00844064) 中,AP12009 主要用来针对晚期胰腺癌、恶性黑色素瘤和结肠直肠癌进行治疗,延长了患者存活率。仅出现过非严重的一过性血小板减少症^[61-62]。AP11014 主要针对 TGF-β₁ mRNA,目前尚未进入临床试验,其在细胞水平抑制细胞增殖和迁移^[63]。ISTH0036 主要靶向 TGF-β₂ mRNA,在 I 期试验 (NCT02406833) 中主要治疗青光眼,使眼压值在术后三个月的观察期内持续维持在较低水平。在试验期间并未出现 4 级不良反应,仅出现了脉络膜渗血和结膜出血等 3 级及以下不良治疗事件^[64]。

2.5 肿瘤疫苗

Belagenpumatucel-L 是一种治疗性疫苗,靶点是 TGF- β_2 ,其Ⅲ期临床试验(NCT00676507)主要的适应证是非小细胞肺癌,可以提高非小细胞肺癌患者的生存率。1 例患者注射后在上身和手臂出现了皮疹^[65]。Gemogenovatumucel-T 是一种自体肿瘤细胞疫苗,可以减少 TGF- β_1 和 TGF- β_2 蛋白的表达。在Ⅲ期临床试验(NCT03495921)中,Gemogenovatumucel-T 可以减缓卵巢癌恶化,增加患者的无复发生存时间和总生存期,其治疗相关不良事件主要为关节痛和骨痛^[66]。

3 结论与展望

TGF- β 对前列腺癌的发生发展具有重要作用,在前列腺癌去势抵抗、免疫微环境耐受和前列腺癌转移过程中均发挥重要作用。尽管 TGF- β 能够抑制正常前列腺上皮细胞增殖且促进其凋亡,但是其常常促进前列腺癌的进展。在前列腺癌肿瘤微环境中,肿瘤细胞和多种免疫细胞均可分泌 TGF- β ,激活 TGF- β /Smad 信号通路,调控肿瘤细胞或免疫细胞或其他间质细胞的功能,在复杂的肿瘤微环境中,TGF- β 信号通路受到多种细胞和多种细胞因子的调节,目前针对该方面的研究已经取得了较大的进展。近年来科学家探索了多种抑制 TGF- β 信号通路的策略,包括 TGF- β 抑制剂、TGF- β 受体抑制剂、抗体和配体陷阱、寡核苷酸药物、肿瘤疫苗等,有的已经进入临床试验阶段,但是其对肿瘤的治疗效果仍有待于进一步的确定。针对 TGF- β 信号通路进行靶向干预,将会是一个非常具有前景的治疗方向。

参考文献

- [1] 王培宇,黄祺,王少东,等.《全球癌症统计数据 2022》要点解读[J].中国胸心血管外科临床杂志,2024,31(7):933-954.
- [2] 滕熠,张晓丹,夏昌发,等.中国与全球癌症发病、死亡和患病对比及其预测分析:GLOBOCAN 2022 数据解读[J].中华肿瘤防治杂志,2024,31(23):1413-1420.
- [3] Hamdy FC, Donovan JL, Lane JA, et al. Fifteen-year outcomes after monitoring, surgery, or radiotherapy for prostate cancer[J]. N Engl J Med, 2023, 388(17):1547-1558.
- [4] 骆华,魏强. FGF2 及 TGF- β_1 与良性前列腺增生的研究进展[J].中华男科学杂志,2022,28(9):843-847.
- [5] Liu Q, Chen GW, Moore J, et al. Exploiting canonical TGF β signaling in cancer treatment[J]. Mol Cancer Ther, 2022, 21(1):16-24.
- [6] Lodyga M, Hinz B. TGF- β_1 -a truly transforming growth factor in fibrosis and immunity[J]. Semin Cell Dev Biol, 2020, 101:123-139.
- [7] Massagué J, Sheppard D. TGF- β signaling in health and disease[J]. Cell, 2023, 186(19):4007-4037.
- [8] Muñoz-Espín D, Cañamero M, Maraver A, et al. Programmed cell senescence during mammalian embryonic development[J]. Cell, 2013, 155(5):1104-1118.
- [9] Datto MB, Li Y, Panus JF, et al. Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(12):5545-5549.
- [10] Cordenonsi M, Dupont S, Maretto S, et al. Links between tumor suppressors: p53 is required for TGF-beta gene responses by cooperating with Smads[J]. Cell, 2003, 113(3):301-314.
- [11] Tazat K, Harsat M, Goldshmid-Shagal A, et al. Dual effects of Ral-activated pathways on p27 localization and TGF- β signaling[J]. Mol Biol Cell, 2013, 24(11):1812-1824.
- [12] La Vignera S, Condorelli RA, Russo GI, et al. Endocrine control of benign prostatic hyperplasia[J]. Andrology, 2016, 4(3):404-411.
- [13] Gong GY, Xi SY, Li CC, et al. Bushen Tongluo formula ameliorated testosterone propionate-induced benign prostatic hyperplasia in rats[J]. Phytomedicine, 2023, 120:155048.
- [14] Wang ZY, Zhang YY, Zhao CC, et al. Bushen Tongluo formula ameliorated testosterone propionate-induced benign prostatic hyperplasia in rats[J]. Cell Signal, 2021, 84:110004.
- [15] Tong SY, Mo M, Hu XH, et al. MIR663AHG as a competitive endogenous RNA regulating TGF- β -induced epithelial proliferation and epithelial-mesenchymal transition in benign prostate hyperplasia[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2023, 37(9):e23391.
- [16] Chen YB, Xu H, Liu C, et al. LncRNA DIO3OS regulated by TGF- β_1 and resveratrol enhances epithelial mesenchymal transition of benign prostatic hyperplasia epithelial cells and proliferation of prostate stromal cells[J]. Transl Androl Urol, 2021, 10(2):643-653.
- [17] Song K, Shankar E, Yang J, et al. Critical role of a survivin/TGF- β /mTORC1 axis in IGF-I-mediated growth of prostate epithelial cells[J]. PLoS One, 2013, 8(5):e61896.
- [18] Shree B, Das K, Sharma V. Emerging role of transforming growth factor- β -regulated long non-coding RNAs in prostate cancer pathogenesis[J]. Cancer Pathog Ther, 2022, 1(3):195-204.
- [19] Lang C, Dai Y, Wu Z, et al. Smad3/SP1 complex-mediated constitutive active loop between lncRNA PCAT7 and TGF- β signaling promotes prostate cancer bone metastasis[J]. Mol Oncol, 2020, 14(4):808-828.
- [20] Wang HL, Li N, Liu QL, et al. Antiandrogen treatment induces stromal cell reprogramming to promote castration resistance in prostate cancer[J]. Cancer Cell, 2023, 41(7):1345-1362. e9.

- [21] Pang XC, Zhang JL, He X, et al. SPP1 promotes enzalutamide resistance and epithelial-mesenchymal-transition activation in castration-resistant prostate cancer via PI3K/AKT and ERK1/2 pathways [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 1: 5806602.
- [22] Yang F, Chen YZ, Shen T, et al. Stromal TGF- β signaling induces AR activation in prostate cancer [J]. *Oncotarget*, 2014, 5 (21): 10854-10869.
- [23] Cai QL, Chen YG, Zhang DR, et al. Loss of epithelial AR increase castration resistant stem-like prostate cancer cells and promotes cancer metastasis via TGF- β_1 /EMT pathway [J]. *Transl Androl Urol*, 2020, 9 (3): 1013-1027.
- [24] Danielpour D. Functions and regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) in the prostate [J]. *Eur J Cancer*, 2005, 41 (6): 846-857.
- [25] Shiota M, Fujimoto N, Matsumoto T, et al. Differential Impact of TGF- β_1 variation by metastatic status in androgen-deprivation therapy for prostate cancer [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 697955.
- [26] Paller C, Pu H, Begemann DE, et al. TGF- β receptor I inhibitor enhances response to enzalutamide in a pre-clinical model of advanced prostate cancer [J]. *Prostate*, 2019, 79 (1): 31-43.
- [27] Huang J, Freyhult E, Buckland R, et al. Osteoclasts directly influence castration-resistant prostate cancer cells [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2022, 39 (5): 801-814.
- [28] Comito G, Giannoni E, Segura CP, et al. Cancer-associated fibroblasts and M2-polarized macrophages synergize during prostate carcinoma progression [J]. *Oncogene*, 2014, 33 (19): 2423-31.
- [29] Gao Z, Zhang N, An BZ, et al. Comprehensive analyses of the cancer-associated fibroblast subtypes and their score system for prediction of outcomes and immunosuppressive microenvironment in prostate cancer [J]. *Cancer Cell Int*, 2024, 24 (1): 127.
- [30] Tang L, Shao HM, Wu Y, et al. Dominant negative TGF β receptor II and truncated TIM3 enhance the antitumor efficacy of CAR-T-cell therapy in prostate cancer [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 124: 110807.
- [31] Pu H, Collazo J, Jones E, et al. Dysfunctional transforming growth factor-beta receptor II accelerates prostate tumorigenesis in the TRAMP mouse model [J]. *Cancer Res*, 2009, 69 (18): 7366-7374.
- [32] Verma P, Shukla N, Kumari S, et al. Cancer stem cell in prostate cancer progression, metastasis and therapy resistance [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2023, 1878 (3): 188887.
- [33] Lian ZP, Chang TH, Ma SF, et al. MiR-96-5p induced NDRG1 deficiency promotes prostate cancer migration and invasion through regulating the NF- κ B signaling pathway [J]. *Cancer Biomark*, 2022, 35 (1): 83-98.
- [34] Wang XH, Lee SO, Xia SJ, et al. Endothelial cells enhance prostate cancer metastasis via IL-6 $\rightarrow$ androgen receptor $\rightarrow$ TGF- β $\rightarrow$ MMP-9 signals [J]. *Mol Cancer Ther*, 2013, 12 (6): 1026-1037.
- [35] Wang Q, Xiong F, Wu GH, et al. Smad proteins in TGF- β signalling pathway in cancer: regulatory mechanisms and clinical applications [J]. *Diagnostics (Basel)*, 2023, 13 (17): 2769.
- [36] Zhang BT, Li YX, Wu Q, et al. Acetylation of KLF5 maintains EMT and tumorigenicity to cause chemoresistant bone metastasis in prostate cancer [J]. *Nat Commun*, 2021, 12 (1): 1714.
- [37] Meng X, Vander Ark A, Daft P, et al. Loss of TGF- β signaling in osteoblasts increases basic-FGF and promotes prostate cancer bone metastasis [J]. *Cancer Lett*, 2018, 418: 109-118.
- [38] Goncharov AP, Vashakidze N, Kharashvili G. Epithelial-mesenchymal transition: a fundamental cellular and microenvironmental process in benign and malignant prostate pathologies [J]. *Biomedicines*, 2024, 12 (2): 418.
- [39] Doghish AS, Ismail A, El-Mahdy HA, et al. A review of the biological role of miRNAs in prostate cancer suppression and progression [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 197: 141-156.
- [40] Amatangelo MD, Goodyear S, Varma D, et al. c-Myc expression and MEK1-induced Erk2 nuclear localization are required for TGF-beta induced epithelial-mesenchymal transition and invasion in prostate cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33 (10): 1965-1975.
- [41] La Civita E, Liotti A, Cennamo M, et al. Peri-prostatic adipocyte-released TGF β enhances prostate cancer cell motility by upregulation of connective tissue growth factor [J]. *Biomedicines*, 2021, 9 (11): 1692.
- [42] 杨阳, 周秋云, 宋映容, 等. 基于 openFDA 对吡非尼酮和尼达尼布药品不良反应的比较分析 [J]. *药学与临床研究*, 2022, 30 (3): 263-266, 280.
- [43] Ishii K, Sasaki T, Iguchi K, et al. Pirfenidone, an anti-fibrotic drug, suppresses the growth of human prostate cancer cells by inducing G₁ cell cycle arrest [J]. *J Clin Med*, 2019, 8 (1): 44.
- [44] Rodríguez Y, Unno K, Truica MI, et al. A genome-wide CRISPR activation screen identifies PRRX2 as a regulator of enzalutamide resistance in prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2022, 82 (11): 2110-2123.
- [45] Yap TA, Vieito M, Baldini C, et al. First-in-human phase I study of a next-generation, oral, TGF β receptor 1 inhibitor, LY3200882, in patients with advanced cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27 (24): 6666-6676.
- [46] Guo Y, Wang ZS, Zhou H, et al. First-in-human study of GFH018, a small molecule inhibitor of transforming growth factor- β receptor I inhibitor, in patients with advanced solid tumors [J]. *BMC Cancer*, 2024, 24 (1): 444.
- [47] Baranda J, Gordon MS, Parikh AR, et al. Abstract CT134: phase 1, first-in-human, dose-escalation, safety, pharmacokinetic (PK), and pharmacodynamic

- study of oral TP-0184, an activin receptor-like kinase-2 (ALK2) inhibitor, in patients (pts) with advanced solid tumors (ASTs) [J]. *Cancer Res*, 2022, 82 (12) : CT134.
- [48] Huang XX, Han LF, Wang RY, et al. Dual-responsive nanosystem based on TGF- β blockade and immunogenic chemotherapy for effective chemoimmunotherapy [J]. *Drug Deliv*, 2022, 29 (1) : 1358-1369.
- [49] Teixeira GS, Andrade AA, Torres LR, et al. Suppression of TGF- β /Smad2 signaling by GW788388 enhances DENV-2 clearance in macrophages [J]. *J Med Virol*, 2022, 94 (9) : 4359-4368.
- [50] 李倩倩, 薛晓文. ALK5 小分子抑制剂生物活性研究进展 [J]. *中南药学*, 2023, 21 (10) : 2698-2703.
- [51] Jiao CC, Meng T, Zhou CY, et al. TGF- β signaling regulates SPOP expression and promotes prostate cancer cell stemness [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12 (9) : 7747-7760.
- [52] Fenaux P, Platzbecker U, Mufti GJ, et al. Luspatercept in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382 (2) : 140-151.
- [53] 张闪闪, 徐文峰, 王晶, 等. 首个 β -地中海贫血治疗药物罗特西普 [J]. *中国新药杂志*, 2024, 33 (11) : 1098-1101.
- [54] Kang C. Sotatercept: first approval [J]. *Drugs*, 2024, 84 (7) : 857-862.
- [55] Hoeper MM, Badesch DB, Ghofrani HA, et al. Phase 3 trial of sotatercept for treatment of pulmonary arterial hypertension [J]. *N Engl J Med*, 2023, 388 (16) : 1478-1490.
- [56] Tolcher AW, Berlin JD, Cosaert J, et al. A phase I study of anti-TGF β receptor type- II monoclonal antibody LY3022859 in patients with advanced solid tumors [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2017, 79 (4) : 673-680.
- [57] Strauss J, Heery CR, Schlom J, et al. Phase I trial of M7824 (MSB0011359C), a bifunctional fusion protein targeting PD-L1 and TGF β , in advanced solid tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24 (6) : 1287-1295.
- [58] Lord DM, Bird JJ, Honey DM, et al. Structure-based engineering to restore high affinity binding of an isoform-selective anti-TGF β 1 antibody [J]. *MAbs*, 2018, 10 (3) : 444-452.
- [59] Song IW, Nagamani SC, Nguyen D, et al. Targeting TGF- β for treatment of osteogenesis imperfecta [J]. *J Clin Invest*, 2022, 32 (7) : e152571.
- [60] Kim BG, Malek E, Choi SH, et al. Novel therapies emerging in oncology to target the TGF- β pathway [J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14 (1) : 55.
- [61] Jaschinski F, Rothhammer T, Jachimczak P, et al. The antisense oligonucleotide trabedersen (AP 12009) for the targeted inhibition of TGF- β 2 [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2011, 12 (12) : 2203-2213.
- [62] Vallières L. Trabedersen, a TGF β 2-specific antisense oligonucleotide for the treatment of malignant gliomas and other tumors overexpressing TGF β 2 [J]. *IDrugs*, 2009, 12 (7) : 445-453.
- [63] Schlingensiepen KH. The TGF- β 1 antisense oligonucleotide AP 11014 for the treatment of non-small cell lung, colorectal and prostate cancer: preclinical studies [J]. *J Clin Oncol*, 2004, 22 (14) : 3132-3132.
- [64] Pfeiffer N, Voykov B, Renieri G, et al. First-in-human phase I study of ISTH0036, an antisense oligonucleotide selectively targeting transforming growth factor beta 2 (TGF- β 2), in subjects with open-angle glaucoma undergoing glaucoma filtration surgery [J]. *PLoS One*, 2017, 12 (11) : e0188899.
- [65] Giaccone G, Bazhenova LA, Nemunaitis J, et al. A phase III study of belagenpumatucel-L, an allogeneic tumour cell vaccine, as maintenance therapy for non-small cell lung cancer [J]. *Eur J Cancer*, 2015, 51 (16) : 2321-2329.
- [66] Rocconi RP, Grosen EA, Ghamande SA, et al. Gemogenovatumel-T (Vigil) immunotherapy as maintenance in frontline stage III/IV ovarian cancer (VITAL) : a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial [J]. *Lancet Oncol*, 2020, 21 (12) : 1661-1672.

(收稿日期: 2024-10-29; 修回日期: 2024-12-09)

糖尿病前期胰岛素抵抗的发病机制及经典复方干预的研究进展

杨星^{1, 2}, 郑承红^{2, 3*}, 张利芳², 丁念², 邹秀淇¹ (1.湖北中医药大学, 武汉 430065; 2.武汉市中医医院, 武汉 430050; 3.湖北中医药大学附属国医医院, 武汉 430014)

摘要: 胰岛素抵抗 (IR) 是糖尿病前期主要的病理生理机制, 对 IR 的管理是防治糖尿病的关键。IR 的发生机制主要包括胰岛素信号通路传导异常、炎症反应、氧化应激、肠道菌群、线粒体功能障碍、内质网应激、外泌体、异位脂质沉积、铁死亡等方面, 相关药物涉及噻唑烷二酮类、胰高血糖素样肽-1 受体 (GLP-1R) 激动剂、钠-葡萄糖协同转运蛋白 2 (SGLT-2) 抑制剂、阿卡波糖、二甲双胍、奥利司他、替西帕肽等。近年来, 中医药在糖尿病的治疗中日益受到重视, 从脾论治是传统医学干预糖尿病前期的重要路径, 经典中药复方能够通过健脾祛痰、培脾化痰、运脾化湿、助脾燥湿, 参与调整糖脂代谢紊乱、降低炎症反应、抗氧化应激、调节肠道菌群、缓解内质网应激、减少异位脂质沉积、调控外泌体、优化线粒体功能等途径, 从而改善 IR。因此, 梳理总结近年经典复方干预 IR 的作用途径, 对治疗糖尿病前期及糖尿病的临床工作具有重要参考价值。

关键词: 糖尿病前期; 胰岛素抵抗; 发病机制; 经典复方; 从脾论治

中图分类号: R285, R286 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)04-1052-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.027

Research progress in the pathogenesis of insulin resistance in prediabetes and the intervention of classical compound prescriptions

YANG Xing^{1, 2}, ZHENG Cheng-hong^{2, 3*}, ZHANG Li-fang², DING Nian², ZOU Xiu-qi¹ (1. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065; 2. Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430050; 3. Traditional Chinese Medicine Hospital Affiliated to Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430014)

Abstract: Insulin resistance (IR) is the main pathophysiological mechanism in prediabetes, and the management of IR is the key to the prevention and treatment. The occurrence of IR mainly include abnormal conduction of the insulin signaling pathway, inflammatory response, oxidative stress, gut microbiota, mitochondrial dysfunction, endoplasmic reticulum stress, exosomes, ectopic lipid deposition, ferroptosis and others. The related drugs involve thiazolidinediones, GLP-1R agonists, SGLT-2 inhibitors, acarbose, metformin, orlistat, tirzepatide and so on. In recent years, traditional Chinese medicine has received increasing attention in the treatment of diabetes. Treating from the spleen is an important approach in traditional Chinese medicine for prediabetes. Classic Chinese medicine compound prescriptions can improve IR by invigorating the spleen to resolve the phlegm, cultivating the spleen to transform the phlegm, activating the spleen to resolve dampness, and assisting the spleen to reduce dampness. They also adjust disorders of glucose and lipid metabolism, reduce inflammatory response, resist oxidative stress, regulate gut microbiota, alleviate endoplasmic reticulum stress, reduce ectopic lipid deposition, regulate exosomes, and optimize mitochondrial function and other pathways to relieve IR. It is important to sort out and summarize the action pathways of classic compound prescriptions in

基金项目: 湖北省中医药管理局中医药指导性项目 (No.ZY2023F053); 武汉市中医药科研面上项目 (No.WZ24A18); 武汉市科技局知识创新专项项目 (No.2022020801010582)。

作者简介: 杨星, 女, 博士, 主要从事中西医结合治疗内分泌代谢及免疫性疾病研究, email: 276184278@qq.com *通信作者: 郑承红, 女, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中西医结合治疗内分泌代谢及免疫性疾病研究, email: chzheng@qq.com

intervening IR in recent years in the treatment of the prediabetes and diabetes.

Key words: prediabetes; insulin resistance; pathogenesis; classical compound prescription; treatment from the spleen

糖尿病前期 (prediabetes mellitus, PDM) 是正常血糖与糖尿病的中间时期, 属于糖尿病的高危人群, 其发展为糖尿病的风险高达 74%^[1]。循证医学证据表明, PDM 的治疗方式以生活干预为主, 国内外相关指南尚未广泛或强烈推荐药物治疗, 且生活方式干预无效后药物干预是否敏感也无相关临床证据^[2]。中医药治疗 PDM 有明显益处, 从脾论治符合 PDM “脾失健运” 的病机特点, 健脾化痰类经典中药复方具有多靶点、多通路的特点, 能够通过调整糖脂代谢紊乱、减少炎症、抗氧化应激 (OS)、调节肠道菌群紊乱、改善线粒体功能障碍、缓解内质网应激 (ERS)、减轻脂质异位沉积、抑制铁死亡等发挥作用^[3]。

1 糖尿病前期胰岛素抵抗 (IR) 的发生机制

现代医学认为, IR 和胰腺 β 细胞功能下降是 PDM 的主要特点^[4], PDM 的发展以 IR 为核心驱动因素。IR 是指胰岛素的靶组织在胰岛素的作用下, 对葡萄糖的反应减弱或不敏感, 使细胞难以有效地从血液中吸收葡萄糖, 进而导致高血糖。IR 发病机制复杂, 主要包括胰岛素信号传导异常、慢性炎症、OS、肠道菌群失调等, 骨骼肌、脂肪、肝脏等靶器官参与其中。此外, IR 发病机制还与线粒体功能障碍、ERS、外泌体 miRNA、脂质异位沉积、铁死亡等相关。

1.1 胰岛素信号传导异常与 IR

胰岛素信号传导对 IR 起关键作用, 胰岛素信号传导异常可发生在胰岛素受体前、受体及受体后异常。其中, 胰岛素受体后异常在 IR 中地位重要, 是胰岛素与受体结合后在细胞内引发的异常代谢过程。正常情况下, 胰岛素受体底物 (IRS) 被激活, 使磷脂酰肌醇-3-OH 激酶 (PI3K) 将磷脂酰肌醇-4, 5-二磷酸 (PIP2) 转化为磷脂酰肌醇-3, 4, 5-三磷酸 (PIP3), PIP3 招募并激活蛋白激酶 B (AKT), 并在 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1 (PDK1) 和雷帕霉素靶蛋白复合物 2 (mTORC2) 的作用下磷酸化骨骼肌、肝脏和脂肪组织中的下游底物^[5], 进而引发信号级联反应, 调控生命活动。

噻唑烷二酮类 (thiazolidinediones, TZDs) 药物是经典的胰岛素增敏剂, 包括吡格列酮、罗格列酮, 能增加 IRS-1 酪氨酸磷酸化, 促进胰岛素信号

传导。临床研究表明, 吡格列酮能提高胰岛素敏感性, 显著降低空腹血糖、糖化血红蛋白 (HbA1c) 水平^[6], 使 PDM 转化为糖尿病的风险降低 72%^[7]。

1.2 炎症反应与 IR

大量证据表明, 慢性低度炎症是 IR 发展的关键介质, 许多细胞因子及炎症因子在 IR 中上调, 如单核细胞趋化蛋白-1、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、C 反应蛋白、白细胞介素 (IL) 等^[8]。临床研究显示, PDM 患者血清 TNF- α 高于常人, 且与血糖、IR 加重趋势一致, 表明 PDM 阶段已伴有炎症反应^[8]。细胞因子阻断 PI3K/AKT, 或激活 JNK/NF- κ B 炎症信号通路, 致 IRS-1 酪氨酸磷酸化减少, 阻碍胰岛素信号传递, IR 恶化常与炎症加剧形成负面循环^[9]。研究表明, 敲除促炎细胞因子基因, 高脂高糖饮食诱导的 IR 缓解^[10]。此外, 过多炎症因子诱导脂质分解, 释放大量游离脂肪酸, 加重炎症和 IR^[11]。综上, 炎症与 IR 往往伴随出现。

目前临床上以胰高血糖素样肽-1 受体 (GLP-1R) 为靶点的广泛降糖药, 主要是 GLP-1R 激动剂 (如利拉鲁肽、司美格鲁肽) 和二肽基肽酶 4 (DPP-4) 抑制剂 (如西格列汀)。临床应用发现, GLP-1R 激动剂可通过抗炎改善 IR^[12], 减少肥胖和 PDM 患者发生糖尿病的风险^[7]。DPP-4 抑制剂显著减轻 2 型糖尿病 (T2DM) 患者的微炎症状态^[13], 降低糖调节受损 (IGR) 人群糖尿病发病率^[14]。

1.3 OS 与 IR

Houstis 等^[15]早在形成任何可检测的 IR 水平之前就观察到了 OS, 表明 OS 的发生先于 IR。高龄、超重或肥胖及不健康饮食习惯等, 均可改变机体的氧化平衡, 干扰胰岛素分泌, 加剧 IR 或降低糖耐量, 进而加速糖尿病进程^[16]。核因子 (NF)- κ B 作为 OS 触发炎症通路的核心调控因子, 可激活 JNK 和 κ B 激酶抑制剂- β (IKK- β), 干扰胰岛素信号级联反应, 诱发脂肪因子失调, 导致 IR。同时, 过量自由基削弱葡萄糖转运蛋白-4 (GLUT-4) 的功能, 阻碍葡萄糖有效进入细胞^[17]。氧化损伤和炎症相互纠缠, 糖尿病患者炎症反应、OS 程度愈严重, IR 愈明显^[18]。此外, OS 相关标志物, 如丙二醛 (MDA)、蛋白羰基、氢过氧化物、晚期糖基化

终末产物 (AGEs)、NADPH 氧化酶等, 均可降低胰岛素敏感性, 加剧外周组织 IR^[8]。综上, OS 激活炎症信号通路, 炎症因子诱导 OS, 共同加剧 IR 状态。

一些抗氧化剂 (如维生素 C、维生素 E 和 β -胡萝卜素) 能限制自由基的破坏, 改善 IR, 减少患 T2DM 的风险^[19]。钠-葡萄糖协同转运蛋白 2 (SGLT-2) 抑制剂 (如达格列净、恩格列净) 能降低肾小管对葡萄糖的重吸收, 促进葡萄糖经尿排出, 临床研究证实其能升高超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、降低 MDA, 减轻 OS, 改善 IR^[20], 合并 PDM 的慢性肾脏病和心力衰竭患者接受达格列净治疗后发展成糖尿病的风险比安慰剂组低 31.7%^[7]。

1.4 肠道菌群失调与 IR

近年来, 肠道菌群被证实与 IR、T2DM 等显著相关, PDM 与肠道菌群相关机制涵盖炎症、肠屏障功能、糖脂代谢、胰岛素敏感性和能量平衡等。菌群失衡可能会减少短链脂肪酸生成, 促进炎症因子释放, 影响胰岛素分泌和胰岛 β 细胞敏感性, 产生 IR^[21]。高脂饮食破坏菌群稳态, 使肠屏障受损, 肠道通透性增加。革兰氏阴性菌的主要外膜成分脂多糖 (LPS) 更易进入机体循环, 加重由内毒素诱导的炎性反应所致的 IR^[22]。此外, 菌群其他代谢产物, 如胆汁酸 (BA) 通过对 G 蛋白偶联胆汁酸受体 1 (TGR5) 和法尼醇 X 受体 (FXR) 的调控作用调节胰高血糖素样肽 -1 (GLP-1), 从而持续减重、提高糖耐量; 三甲胺 (TMA) 通过转化为三甲胺 N-氧化物 (TMAO) 后, 抑制肝脏胰岛素信号传导, 诱发脂肪炎症, 加重糖耐量异常 (IGT)^[22]。总之, 菌群失调及其代谢产物变化, 破坏肠屏障, 激活免疫细胞, 引发一系列的代谢紊乱诱导 IR。

益生菌制剂能降糖、改善 IR, 抑制炎症, 增加双歧杆菌和乳酸杆菌数量, 降低大肠埃希菌数量^[23], 对于 IGT 患者安全性良好, 但无法降低转化为 T2DM 的风险^[24]。临床研究显示, 阿卡波糖使 IGT 人群 3.3 年内进展为糖尿病的风险降低 25%^[7], 有效降低 T2DM 患者的 HbA1c, 影响肠道菌群分布^[25]。二甲双胍干预 IGT 人群可使糖尿病发生风险降低 17%, 能减重、降低 HbA1c、改善 β 细胞功能^[26], 调节肠道菌群以平衡糖代谢^[27]。

1.5 线粒体功能障碍与 IR

线粒体为细胞能量工厂合成三磷酸腺苷 (ATP), 其活性降低与胰岛素敏感性降低相关。无肥胖时线粒体功能障碍可致脂质在肌肉和肝脏

异位积累^[28], 诱导 IR。胰岛素通过抑制 FOXO1/HMOX1 和维持线粒体 NAD⁺/NADH 比例以保障线粒体电子传递链 (METC) 的完整性, 然而高水平自由基干扰胰岛素信号传导, 引发 IR^[29]。此外, 线粒体自噬受损和由此导致的线粒体裂变-融合动力学失调是细胞内 OS 的主要原因^[30], 线粒体功能障碍增加活性氧 (ROS) 生成, 加剧 OS, 进一步促进 IR。综上, 胰岛素是线粒体融合所必需的, 而线粒体是胰岛素信号传递所必需的。

α -硫辛酸、维生素 E、维生素 C 等抗氧化剂有助于清除自由基, 保护线粒体免受氧化损伤。类维生素物质左卡尼汀可促进脂肪酸 β 氧化, 改善线粒体能量代谢。临床研究证实, 左卡尼汀可改善 T2DM 患者的血糖、血脂, 对 IR 治疗有效^[31]。此外, 米托蒽醌甲磺酸盐 (MitoQ) 是线粒体靶向抗氧化剂, 可减轻线粒体 OS 损伤、抗凋亡, 降低 T2DM 患者 ROS 水平, 发挥抗炎与抗氧化作用^[32], 但尚无大规模队列研究证实 MitoQ 在糖尿病治疗方面的稳定性与安全性。

1.6 ERS 与 IR

内质网 (ER) 是细胞内负责蛋白质合成与折叠的关键区域, 对肝脏、脂肪、肌肉等代谢控制至关重要。细胞的 ERS 与未折叠蛋白反应 (UPR)、ER 相关蛋白降解 (ERAD)、自噬等程序有关^[33], 其中 UPR 是主要 ERS 反应系统, 对胰岛 β 细胞健康维护意义重大。高糖与 OS 环境扰乱胰岛 β 细胞 ER 稳态, 蛋白质折叠受阻且错误折叠蛋白堆积, UPR 被激活, 诱导炎症反应和脂质沉积, 干扰胰岛素信号传导、减少胰岛素生物合成并损害 β 细胞功能^[34]。过度 ERS 阻碍 ER 正常折叠蛋白质, 干扰肝脏葡萄糖摄取、糖原合成及糖异生等, 加剧肝脏 IR, 破坏血糖平衡, 加重糖尿病^[35]。综上, ERS 负调节胰岛素敏感性诱导 IR。

4-苯基丁酸 (4-PBA) 是一种化学伴侣, 能减轻 ERS, 促进蛋白质的正确折叠。研究显示, 4-PBA 缓解高糖环境下胰岛 β 细胞的 ERS, 减少炎症与脂质沉积, 改善胰岛素信号传导和 β 细胞功能^[36], 但目前人体临床应用证据尚缺。另有研究表明, 抑制 β 细胞促 ERS 基因 (如 CHOP), 可改善胰岛素分泌失调, 减轻 T2DM 患者的疾病负担^[37]。

1.7 外泌体 miRNA 与 IR

外泌体是细胞间传递信息的纳米级囊泡, 含蛋白质、脂质、细胞因子、核酸等多种生物活性分子。核酸中的 miRNA 因其广泛应用而备受瞩目。研究表明, miRNA 与 IR 联系紧密, 外泌体作

为载体将 miRNA 输送至胰岛素靶器官, 如脂肪组织、肝脏和肌肉组织, 在 IR 的发生发展中起重要作用^[38]。miR-155 是葡萄糖稳态的有益调节因子, 过表达可致外周组织低血糖、糖耐量改善及胰岛素敏感性增强, 缺乏则引发高血糖、IGT 和 IR^[39]。肥胖小鼠脂肪组织巨噬细胞释放的外泌体 miR-155 表达差异化可能下调过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR- γ), 阻碍胰岛素信号传递^[40]。肝脏外泌体 miR-130a-3p 能够激活脂肪细胞的 AKT-AS160-GLUT4 信号级联, 改善 IGT, 抑制脂肪生成^[41]。miR-27a 在 PDM 和 T2DM 肥胖个体血清中高表达, 脂肪细胞来源的 miR-27a 抑制 PPAR- γ 的表达, 诱导骨骼肌细胞 IR^[42]。综上, 外泌体 miRNA 通过靶向作用于脂肪组织、肝脏、骨骼肌组织等, 缓解 IR。

目前, 针对外泌体 miRNA 的药物开发大多处于研究阶段。一些研究尝试通过基因编辑技术或外泌体工程来调节 miRNA 的表达以改善 IR, 但尚未有成熟的临床药物应用。

1.8 异位脂质沉积与 IR

国内外研究表明, 脂肪异位沉积与 IR 紧密相关。肝脏脂肪异常积累影响肥胖 T2DM 前期的发生发展, 肝细胞脂肪过度积累致胰岛素分泌增多, 诱发 IR, 加剧机体炎症反应与 OS, 使脂肪沉积愈严重, 终成恶性循环^[43]。异位脂质代谢产生的二酰基甘油 (DAG)、神经酰胺 (Cer) 等中间产物扰乱胰岛素信号传导, 阻碍 IRS-1 和 AKT 活化, 或抑制 GLUT4 向细胞膜迁移, 损害线粒体功能, 造成糖脂代谢利用障碍^[44]。总之, 异位脂质沉积是肥胖、PDM 及 T2DM 发生发展的重要因素, 与 IR 相互作用复杂, 可加剧机体代谢失衡, 促进炎症和 OS, 形成负面循环。

具有改善异位脂质沉积作用的降糖减重药物渐受临床青睐, 主要包括 TZDs、SGLT-2 抑制剂、奥利司他、GLP-1R 激动剂、葡萄糖依赖性促胰岛素多肽 (GIP)/GLP-1 双受体激动剂, 皆可通过影响脂肪分布发挥疗效, 改善 IR^[45]。替西帕肽 (tirzepatide) 是目前首个 GIP/GLP-1 双受体激动剂, 干预 PDM 一年半可使其缓解率比安慰剂组高 33.4%^[7]。

1.9 铁死亡与 IR

铁死亡是铁依赖性脂质过氧化物介导的非凋亡性细胞死亡, 其特征是铁过载和过量脂质氧化^[46]。铁死亡介导了糖尿病的发病机制和进展过程。胰腺 β 细胞铁死亡使胰岛素分泌减少, 肝脏、脂肪、肌肉铁死亡可诱发 IR^[47], 抑制铁死亡能减

弱胰腺 β 细胞的丢失与功能障碍^[48]。研究显示, 铁过载致小鼠血清铁蛋白升高、胰岛素敏感性降低, 通过抑制 JAK2/STAT3/SLC7A11 信号通路诱导铁死亡和 IR, 而铁螯合剂改善铁过载所致的肝脏 IR^[49]。总之, 铁死亡作为一种新型细胞死亡方式, 在糖尿病的发病与进展中至关重要, 既影响胰腺 β 细胞功能, 致胰岛素分泌减少, 又影响肝脏等代谢器官, 诱发或加剧 IR。

去铁胺、地拉罗司等铁螯合剂可螯合体内多余的铁离子, 减少铁过载。铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 (Fer-1) 能抑制糖尿病肾小管细胞谷胱甘肽 (GSH) 与脂质过氧化, 进而抑制铁死亡^[50], 然而其在临床患者中应用的有效性与安全性仍有待更多研究证实。

总体而言, IR 发病机制间相互影响、相互作用、互为因果, 形成了一个复杂的网络, 共同推动 PDM 的发展。相关药物的使用需遵医嘱, 综合考量患者个体差异与病情轻重, 结合合理饮食、适量运动等生活方式调整, 优化治疗成效。

2 经典中药复方从脾论治改善 IR

IR 在中医学里并无与之对应的病名, 但 PDM 可归属“脾瘕”“肥胖”等范畴。祖国传统医学多认为脾胃运化功能失调导致脾瘕, 禀赋不足、饮食不节、久坐少动、情志失调、年老体衰等皆可致脾的运化失常, 脾胃功能受损, 水谷精微 (包括血中之“糖”) 运化失调, 无法输布全身, 精微物质堆积, 痰湿蕴酿, 后期郁久化热、灼伤阴液, 久则变生他疾, 逐渐演变为脾瘕、消瘕。因此, 脾失健运是 PDM 的关键病机, 从脾论治被视为改善 PDM 的重要途径。研究表明, 从脾论治能有效帮助患者分泌胰岛素, 改善 IR, 保护胰岛功能, 实现降糖目的^[51]。与脾胃、痰湿有关的中药经典复方, 主要通过健脾祛痰、培脾化痰、运脾化湿、助脾燥湿等治法改善 IR, 其作用途径与促进胰岛素信号传递、减少炎症反应、抗 OS、纠正菌群紊乱、改善线粒体功能障碍、减少脂质异位沉积、缓解 ERS、抑制铁死亡、调控外泌体等有关, 见图 1。

2.1 健脾祛痰

《医方集解》言“治痰通用二陈”。临床研究显示, 健脾祛痰经方二陈汤干预 PDM 痰湿质患者, 能有效降低血糖, 减少炎症因子, 改善 IR, 并纠正偏颇体质, 延缓糖尿病进程^[52]。体内研究证实, 二陈汤能够调节 Zucker 糖尿病肥胖大鼠 (ZDF 大鼠) 白色脂肪组织 IRS1/AKT/PKA/HS 通路活性, 减少脂肪过度分解, 降低菌群代谢物

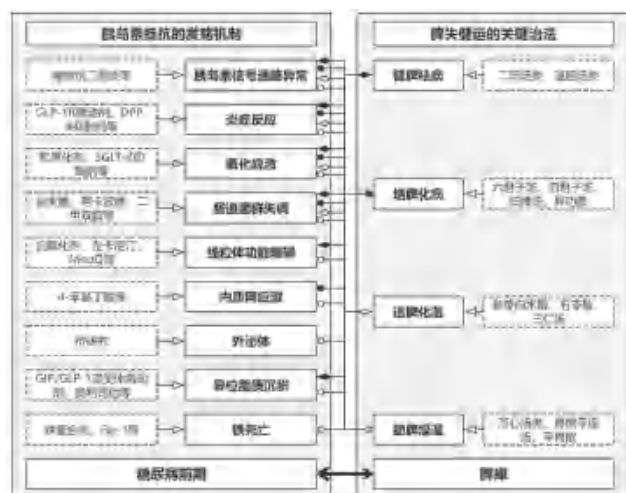


图1 糖尿病前期IR的发病机制及经典复方干预的作用途径

Fig 1 Pathogenesis of insulin resistance in prediabetes and the action pathways of classic compound prescriptions for intervention

丙酸含量,调节脂代谢紊乱^[53]。在ZDF大鼠中,二陈汤增加白色脂肪组织PI3K、p-AKT/AKT比例,减少p-JNK/JNK表达,从而参与调控脂质代谢与转运,减轻炎症并改善IR^[54]。二陈汤亦可通过调节mTORC1/SREBP1/CAV1通路优化线粒体功能^[55]。温胆汤化痰与理气并用,气顺则痰消,临床研究显示其治疗PDM人群能降糖减脂、改善肥胖指数^[56]。基础研究发现,温胆汤加减能改善IGT大鼠的OS,增加肠道菌群多样性^[57];或调节PI3K/Akt、NF- κ B、NLRP3信号通路,抑制促炎因子的释放,改善IR^[58]。综上,健脾祛痰法主要通过减少炎症与OS、促进胰岛素传导、调整肠道菌群、改善脂质沉积、优化线粒体功能等途径发挥作用。

2.2 培脾化痰

《证治汇补》述:“脾虚有痰者,宜培脾以化其痰涎”,狭义上可理解为“培脾”即健脾益气。临床研究证实,六君子汤能缓解PDM的临床症状,调节糖脂代谢紊乱,提升血糖复常率^[59]。赵加等^[60]认为该方干预PDM的作用机制可能与肠道菌群及炎症反应有关。基础研究证实,四君子汤显著改善T2DM小鼠肠道屏障功能,增加胰岛素敏感性^[61]。四君子颗粒可能通过抑制ERS诱导的胰岛细胞凋亡,改善大鼠PDM状态,从而缓解IR^[62]。归脾汤被证明可通过调节NF- κ B/PI3K或PKB/GSK-3 β 信号通路缓解糖尿病脑病大鼠IR^[63-64]。异功散被发现显著降低T2DM患者的炎症指数,调节铁代谢,减轻OS,改善IR^[65]。综上,培脾化痰法主要在调节肠道微生态、缓解炎症、减少OS、抑制ERS、改善胰岛素信号通路等方面发挥重要作用。

2.3 运脾化湿

参苓白术散出自《太平惠民和剂局方》,具有渗湿益气健脾之功。系统评价显示,参苓白术散具有较好的降糖效果^[66],体内研究证实,参苓白术散能优化代谢综合征大鼠的糖脂代谢,缓解IR,减轻肝脏脂肪变性及炎性细胞的浸润程度,其机制可能与炎症相关基因及炎症因子有关^[67]。此外,参苓白术散已被证实可通过调控自发性肥胖T2DM大鼠的肠道菌群及其代谢产物,减轻慢性炎症,改善IR,有效预防和治疗肥胖及糖尿病^[68]。五苓散助阳化气以利水湿,助脾运化,出自《金匮要略》:“消渴者,宜利小便,发汗,五苓散主之”。临床研究显示,五苓散降低肥胖T2DM患者的血糖、血脂,改善IR^[69],可通过纠正糖脂代谢紊乱、水液平衡失调、抑制炎症反应与OS,主要与细胞凋亡、NF- κ B、AGE-RAGE、PI3K-AKT等信号通路有关^[70]。三仁汤加减能显著改善肥胖T2DM的血糖、血脂,减少内脏脂肪^[71],通过调节血清胰岛素样生长因子(IGF-1)、TNF- α 水平,改善IR,提高神经传导速度^[72]。综上,运脾化湿法主要通过抑制炎症反应、调节肠道菌群、减轻OS、促进胰岛素信号传导等治疗IR。

2.4 助脾燥湿

泻心汤类方是从脾论治脾瘕的具体运用,具有清热燥湿、助脾运化的功效。杨旭^[73]揭示半夏泻心汤能够抑制糖尿病大鼠的脂肪酸氧化,促进肝组织PPAR- α 表达,缓解肝细胞OS与脂质积累。半夏泻心汤亦能调节T2DM大鼠肠道菌群多样性与有益菌丰度,改善胰岛功能,降低血糖^[74]。而大黄黄连泻心汤能调节TLR4/NF- κ B信号通路,抑制M1型巨噬细胞极化,减轻肥胖T2DM小鼠脂肪炎症,并抑制脂肪组织M1型巨噬细胞外泌体miR-155的分泌,改善肝脏IR^[75];亦可调控HIF-1 α /BNIP3/LC3B通路,抑制肥胖T2DM大鼠内脏脂肪的线粒体自噬,促进脂肪棕色化,改善糖脂代谢^[76]。此外,葛根芩连汤通过上调p-PI3K、p-AKT,下调ERS标志蛋白葡萄糖调节蛋白78(GRP78),提高肝组织钙离子含量,缓解肝过度ERS,减轻IR^[77];亦可调节OS相关因子SOD、铁死亡相关因子长链酰基辅酶A合成酶4(ACSL4)与谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4),有效抑制铁死亡,降低血糖^[78]。平胃散具有燥湿健脾行气之功,可经AKT1、ESR1、NF- κ B、PIK3CA等靶点和IR、cAMP、TNF等通路治疗肥胖T2DM^[79]。临床研究证实,平胃散

加减肥能改善 PDM 的 IR、降糖、减重、调脂^[80]。综上,助脾燥湿法通过改善 OS、减少脂质积累、调整肠道菌群、降低炎症、缓解 ERS、调节自噬与外泌体等途径发挥作用。

3 小结

本文从胰岛素信号传导异常、炎症反应、OS、肠道菌群、线粒体功能障碍、ERS、外泌体、异位脂质沉积及铁死亡等多个角度,探讨 PDM 的 IR 发生机制,这些机制相互交织,形成复杂网络,并同时总结了相关病理机制已有的药物临床研究。基于 PDM“脾失健运”的核心病机,梳理“从脾论治”脾瘕的经典中药复方在治疗 IR 方面的作用途径,并归纳为健脾祛痰、培脾化痰、运脾化湿、助脾燥湿四个方面,系统阐述相关治法与发病机制的联系。虽然中药复方能根据患者具体病情进行个体化调整,具有多靶点、多途径治疗优势,但其通常由多种中药材组成,成分复杂,难以确定具体成分或成分组合的关键作用,中药复方质量亦受药材产地、采集时间、炮制方法等诸多因素影响。此外,中药复方改善 IR 的临床研究样本量较小,导致研究结果的代表性和可靠性受到质疑。因此,需结合现代先进手段,如蛋白质组学、代谢组学、单细胞测序等技术研究中中药复方的作用机制,并建立完善的中药材质量标准体系,实现药材从种植到生产全过程溯源与质量监控。同时,优化临床研究设计、提高证据等级,加大临床研究样本量、丰富观察指标、开展长期随访。本课题组长期致力于研究中医药防治糖尿病,目前正在开展中药复方治疗超重/肥胖型糖代谢异常的临床研究及相关中药复方干预 PDM 的作用机制研究,这些研究将为防治糖尿病提供更多的治疗选择与科学依据。

参考文献

- [1] Shi J, Zhang WW, Niu YX, et al. Association of circulating proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 levels and the risk of incident type 2 diabetes in subjects with prediabetes: a population-based cohort study [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2020, 19 (1): 209.
- [2] 尤良震,于东东,方朝晖,等.基于循证中医药学的糖尿病前期临床研究探析[J].*中华中医药杂志*, 2020, 35 (3): 1343-1346.
- [3] Song YN, Wang HY, Qin LL, et al. Efficiency and safety of Chinese herbal medicine in the treatment of prediabetes: a systemic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 3628036.
- [4] Kanat M, DeFronzo RA, Abdul-Ghani MA. Treatment of prediabetes [J]. *World J Diabetes*, 2015, 6 (12): 1207-1222.
- [5] Khalid M, Alkaabi J, Khan MAB, et al. Insulin signal transduction perturbations in insulin resistance [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (16): 8590.
- [6] Lian JX, Fu JF. Pioglitazone for NAFLD patients with prediabetes or type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12: 615409.
- [7] 中华医学会内分泌学分会,中华医学会糖尿病学分会,中国医师协会内分泌代谢科医师分会.中国成人糖尿病前期干预的专家共识(2023版)[J].*中华糖尿病杂志*, 2023, 15 (6): 484-494.
- [8] Yarbeygi H, Farrokhi FR, Butler AE, et al. Insulin resistance: review of the underlying molecular mechanisms [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234 (6): 8152-8161.
- [9] 魏颖,张嘉诚,李晓娟,等.基于经典胰岛素传导及炎症信号通路的相互作用中药改善胰岛素抵抗作用研究进展[J].*世界科学技术-中医药现代化*, 2022, 24 (5): 2026-2034.
- [10] Bouter B, Geary N, Langhans W, et al. Diet-genotype interactions in the early development of obesity and insulin resistance in mice with a genetic deficiency in tumor necrosis factor- α [J]. *Metabolism*, 2010, 59 (7): 1065-1073.
- [11] Himanshu D, Ali W, Wamique M. Type 2 diabetes mellitus: pathogenesis and genetic diagnosis [J]. *J Diabetes Metab Disord*, 2020, 19 (2): 1959-1966.
- [12] Marso SP, Bain SC, Consoli A, et al. Semaglutide and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes [J]. *N Engl J Med*, 2016, 375 (19): 1834-1844.
- [13] Xie DP, Wang QQ, Huang W, et al. Dipeptidyl-peptidase-4 inhibitors have anti-inflammatory effects in patients with type 2 diabetes [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2023, 79 (10): 1291-1301.
- [14] 吕霄,赵猛,凌宏威,等.西格列汀对糖尿病前期人群的干预效果[J].*中国老年学杂志*, 2014, 34 (1): 26-29.
- [15] Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance [J]. *Nature*, 2006, 440 (7086): 944-948.
- [16] Singh A, Kukreti R, Saso L, et al. Mechanistic insight into oxidative stress-triggered signaling pathways and type 2 diabetes [J]. *Molecules*, 2022, 27 (3): 950.
- [17] Newsholme P, Keane KN, Carlessi R, et al. Oxidative stress pathways in pancreatic β -cells and insulin-sensitive cells and tissues: importance to cell metabolism, function, and dysfunction [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019, 317 (3): C420-C433.
- [18] 张钢,王海芳.糖尿病患者外周血炎症-氧化应激水平与胰岛素抵抗的相关性研究[J].*河北医药*, 2023, 45 (7): 1050-1053.
- [19] Lampousi AM, Lundberg T, Löfvenborg JE, et al. Vitamins C, E, and β -carotene and risk of type 2 diabetes: a

- systematic review and meta-analysis [J]. *Adv Nutr*, 2024, 15 (5): 100211.
- [20] 谢周妮, 李卓峻, 王会娟, 等. 2 型糖尿病患者达格列净治疗效果与氧化应激反应指标关系研究 [J]. *临床军医杂志*, 2024, 52 (10): 1081-1084.
- [21] Aw W, Fukuda S. Understanding the role of the gut ecosystem in diabetes mellitus [J]. *J Diabetes Investig*, 2018, 9 (1): 5-12.
- [22] Wang X, Yang J, Qiu XL, et al. Probiotics, pre-biotics and synbiotics in the treatment of pre-diabetes: a systematic review of randomized controlled trials [J]. *Front Public Health*, 2021, 9: 645035.
- [23] 吕洁, 苏萌, 王岩松, 等. 益生菌制剂治疗对 2 型糖尿病患者肠道菌群和血清炎症水平影响的荟萃分析 [J]. *微生物学杂志*, 2024, 44 (5): 71-79.
- [24] 晏群, 李栩, 李沛城, 等. 益生菌干预糖耐量异常向 2 型糖尿病转化的随机、双盲、安慰剂对照临床研究 [J]. *上海医学*, 2021, 44 (10): 726-732.
- [25] Wang ZC, Wang J, Hu JX, et al. A comparative study of acarbose, vildagliptin and saxagliptin intended for better efficacy and safety on type 2 diabetes mellitus treatment [J]. *Life Sci*, 2021, 274: 119069.
- [26] Zhang LH, Zhang YL, Shen SA, et al. Safety and effectiveness of metformin plus lifestyle intervention compared with lifestyle intervention alone in preventing progression to diabetes in a chinese population with impaired glucose regulation: a multicentre, open-label, randomised controlled trial [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2023, 11 (8): 567-577.
- [27] 唐程, 朴春丽, 王丽, 等. 糖尿病前期中西医结合治疗进展 [J]. *吉林中医药*, 2021, 41 (3): 416-420.
- [28] Sangwung P, Petersen KF, Shulman GI, et al. Mitochondrial dysfunction, insulin resistance, and potential genetic implications [J]. *Endocrinology*, 2020, 161 (4): bqaa017.
- [29] Cheng ZY, Tseng Y, White MF. Insulin signaling meets mitochondria in metabolism [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2010, 21 (10): 589-598.
- [30] Sun DN, Wang J, Toan S, et al. Molecular mechanisms of coronary microvascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus: focus on mitochondrial quality surveillance [J]. *Angiogenesis*, 2022, 25 (3): 307-329.
- [31] 方丽涌, 赵紫楠, 张亚同, 等. 左卡尼汀口服溶液的药品综合评价 [J]. *中国医院用药评价与分析*, 2023, 23 (6): 709-713, 718.
- [32] 谭宁, 李巴仑, 艾力·艾尔肯, 等. 线粒体靶向抗氧化剂 MitoQ 研究进展 [J]. *农业生物技术学报*, 2024, 32 (6): 1432-1439.
- [33] Lemmer IL, Willemsen N, Hilal N, et al. A guide to understanding endoplasmic reticulum stress in metabolic disorders [J]. *Mol Metab*, 2021, 47: 101169.
- [34] Hetz C, Zhang KZ, Kaufman RJ. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21 (8): 421-438.
- [35] Zhang XY, Shen DQ, Fang ZW, et al. Human gut microbiota changes reveal the progression of glucose intolerance [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (8): e71108.
- [36] Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, et al. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes [J]. *Science*, 2006, 313 (5790): 1137-1140.
- [37] Yong J, Johnson JD, Arvan P, et al. Therapeutic opportunities for pancreatic β -cell ER stress in diabetes mellitus [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2021, 17 (8): 455-467.
- [38] 田亚丽, 古丽海夏·哈勒玛合拜, 张燕, 等. 外泌体微小 RNA 与胰岛素抵抗的研究现状 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36 (8): 1016-1019.
- [39] Zhang BH, Shen CA, Zhu BW, et al. Insight into mirnas related with glucometabolic disorder [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 111: 657-665.
- [40] Ying W, Riopel M, Bandyopadhyay G, et al. Adipose tissue macrophage-derived exosomal mirnas can modulate in vivo and in vitro insulin sensitivity [J]. *Cell*, 2017, 171 (2): 372-384. e12.
- [41] Wu JH, Dong T, Chen T, et al. Hepatic exosome-derived mir-130a-3p attenuates glucose intolerance via suppressing phlpp2 gene in adipocyte [J]. *Metabolism*, 2020, 103: 154006.
- [42] Yu Y, Du HW, Wei SN, et al. Adipocyte-derived exosomal mir-27a induces insulin resistance in skeletal muscle through repression of PPAR γ [J]. *Theranostics*, 2018, 8 (8): 2171-2188.
- [43] 高金青, 许清松, 方永青, 等. 肥胖 2 型糖尿病前期肝脏脂肪异位沉积的脂质代谢研究 [J]. *中药药理与临床*, 2023, 39 (7): 74-81.
- [44] 张亚欣, 苏文凌. 二酰基甘油和神经酰胺与胰岛素抵抗关系的研究进展 [J]. *中国慢性病预防与控制*, 2019, 27 (10): 795-798.
- [45] 罗樱樱, 纪立农. 代谢性疾病的管理: 关注机体异位脂肪沉积 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2024, 40 (4): 345-349.
- [46] Lei PX, Bai T, Sun YL. Mechanisms of ferroptosis and relations with regulated cell death: a review [J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 139.
- [47] Miao RY, Fang XY, Zhang YJ, et al. Iron metabolism and ferroptosis in type 2 diabetes mellitus and complications: mechanisms and therapeutic opportunities [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14 (3): 186.
- [48] Li D, Jiang CJ, Mei GB, et al. Quercetin alleviates ferroptosis of pancreatic β cells in type 2 diabetes [J]. *Nutrients*, 2020, 12 (10): 2954.
- [49] Mo MQ, Pan L, Deng L, et al. Iron overload induces hepatic ferroptosis and insulin resistance by inhibiting the Jak2/stat3/slc7a11 signaling pathway [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2024, 82 (3): 2079-2094.
- [50] Deng Q, Zhu Y, Zhang MM, et al. Ferroptosis as a po-

- tential new therapeutic target for diabetes and its complications [J]. Endocr Connect, 2023, 12 (3): e220419.
- [51] 晁俊, 刘桢, 钟文, 等. 基于“脾胰同源”理论从脾论治糖尿病 [J]. 中医杂志, 2017, 58 (17): 1458-1461.
- [52] 郭珊. 二陈汤干预痰湿质糖尿病前期的临床研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2021.
- [53] Zhao T, Zhan LB, Zhou W, et al. The effects of erchen decoction on gut microbiota and lipid metabolism disorders in Zucker diabetic fatty rats [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 647529.
- [54] 赵春燕, 战丽彬, 赵田, 等. 基于网络药理学探讨二陈汤治疗肥胖的作用机制及实验验证 [J]. 中药药理与临床, 2022, 38 (1): 24-31.
- [55] 丁珊珊, 庄妍, 廖颖, 等. 二陈汤通过抑制 mTORC1/SREBP1/CAV1 通路改善高脂饮食小鼠肝脏线粒体功能的作用研究 [J]. 中国中药杂志, 2024, 49 (3): 763-769.
- [56] 杨清. 基于“三焦气化”理论探讨温胆汤加减对糖尿病前期人群的干预研究 [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2022.
- [57] 田苗. 化痰温胆汤调控 IGT 大鼠肝脏 Nrf2、HO-1 表达的作用机制及对肠道菌群的影响 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2018.
- [58] 侯一鸣, 郭峥, 卞国本, 等. 温胆汤研究进展 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2024, 30 (1): 176-181.
- [59] 郝志婧. 健脾化湿法干预糖尿病前期 (脾虚痰湿证) 的理论与临床研究 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2020.
- [60] 赵加, 王倩, 苑浩彬, 等. 六君子汤加味穴位贴敷治疗脾虚痰湿型糖尿病前期肥胖患者的疗效及对患者炎症因子和肠道菌群的影响 [J]. 河北中医, 2023, 45 (7): 1150-1155.
- [61] 李辉, 谢金洙, 樊若溪, 等. 四君子汤对 2 型糖尿病小鼠肠屏障的影响 [J]. 中国中药杂志, 2024, 49 (16): 4510-4520.
- [62] 唐保露, 张旭, 袁萍, 等. 四君子颗粒对大鼠糖尿病前期的改善作用 [J]. 中成药, 2020, 42 (3): 610-615.
- [63] 冯晓帆, 王艳杰, 刘羽茜, 等. 在补脾益气法调节 PKB/GSK-3 β 信号通路缓解糖尿病脑中沉默 LncRNA MALAT1 的研究 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33 (7): 1597-1601.
- [64] 冯晓帆, 王艳杰, 刘羽茜, 等. 沉默 LncRNA MALAT1 对补脾益气法调节 DE 大鼠海马中 I- κ B、IL-6 和 PI3K 表达的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40 (10): 151-155.
- [65] 王华, 陈月, 李园园, 等. 基于铁代谢探讨异功散对 2 型糖尿病患者胰岛素抵抗的疗效及机制 [J]. 世界临床药物, 2021, 42 (12): 1093-1097.
- [66] 金小琴, 刘晓敏, 陈辉, 等. 参苓白术散对 2 型糖尿病患者血糖及其相关指标影响的系统评价 [J]. 世界中医药, 2023, 18 (8): 1106-1114.
- [67] 李怡, 蔡惠铃, 招敏虹, 等. 参苓白术散对代谢综合征大鼠胰岛素抵抗、炎症状态的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2023, 40 (8): 2026-2032.
- [68] 张栋婧, 战丽彬, 杭天怡, 等. 基于肠道菌群探讨参苓白术散改善慢性炎症防治 ZDF 大鼠肥胖 2 型糖尿病 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47 (4): 988-1000.
- [69] 郭祺, 卢伟焯, 朱章志. 五苓散近 10 年来应用研究的可视化分析 [J]. 广州中医药大学学报, 2024, 41 (8): 2195-2202.
- [70] 韦婷婷, 黄雪霞, 孟立锋, 等. 五苓散加减治疗糖尿病肾病研究概况 [J]. 中医学报, 2022, 37 (2): 311-315.
- [71] 郑文静, 高慧峰, 马君, 等. 三仁汤联合抗阻运动在 2 型肥胖糖尿病中的应用分析 [J]. 辽宁中医杂志, 2023, 50 (5): 164-167.
- [72] 邹冬吟, 张喜民, 范英, 等. 三仁汤联合常规疗法对糖尿病周围神经病变的临床疗效及血清胰岛素样生长因子 -1、肿瘤坏死因子 - α 水平的影响 [J]. 安徽医药, 2022, 26 (12): 2529-2533.
- [73] 杨旭. 半夏泻心汤对 2 型糖尿病代谢性损伤的临床及实验研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2020.
- [74] 顾祎雯, 宋秀道, 周梁, 等. 半夏泻心汤剂对 3-脱氧葡萄糖醛酮诱导的糖尿病前期大鼠的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38 (19): 2320-2323.
- [75] 任渊. 基于脂肪组织 M1 型巨噬细胞外泌体介导的细胞间通讯探讨大黄黄连泻心汤改善肥胖型 T2DM 小鼠肝脏胰岛素抵抗的分子机制 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2023.
- [76] 安冬, 梁永林, 高艳奎, 等. 大黄黄连泻心汤加味对肥胖 2 型糖尿病大鼠内脏脂肪线粒体自噬及棕色化影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30 (24): 131-140.
- [77] 姜月, 延李科, 王颖, 等. 葛根芩连汤缓解肝内质网应激改善体内外糖代谢的效应机制 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48 (20): 5565-5575.
- [78] 黄璟夷, 林俊, 钟玉娇, 等. 葛根芩连汤对 2 型糖尿病合并非酒精性脂肪肝大鼠模型铁死亡干预作用研究 [J]. 环球中医药, 2024, 17 (7): 1291-1298.
- [79] 王伟, 蒋媛媛, 宋宝宏, 等. 基于网络药理学和分子对接研究平胃散治疗肥胖 2 型糖尿病的活性成分及作用机制 [J]. 成都中医药大学学报, 2023, 46 (3): 31-39.
- [80] 黄文忠. 加味平胃散治疗脾虚痰湿证肥胖型糖尿病前期的临床疗效观察 [D]. 福州: 福建中医药大学, 2022.

(收稿日期: 2024-11-20; 修回日期: 2024-12-05)

I 类组蛋白去乙酰化酶在心脏线粒体功能中 调控作用的研究进展

陈鑫婷^{1, 2}, 王玉婷^{1, 2}, 何新宇^{1, 2}, 马传瑞^{1*}, 倪晶宇^{1*} (1. 天津中医药大学第一附属医院, 国家中医针灸临床医学研究中心, 天津 300380; 2. 天津中医药大学, 天津 301600)

摘要: 随着人口老龄化的加剧, 心血管疾病已成为一个不容忽视的健康问题。保持线粒体的结构完整和功能正常是维持心脏生理活动的关键。研究表明, I 类组蛋白去乙酰化酶 (HDAC) 可通过调节能量代谢、氧化应激和线粒体自噬来恢复线粒体正常功能。因此, 本文综述了 I 类 HDAC 的定位和功能, 以及它们如何通过影响线粒体功能参与心脏疾病的发生和发展, 并总结了已有的 I 类 HDAC 抑制剂在心脏治疗方面的研究与应用, 揭示出 HDAC 抑制剂在心脏保护方面的潜力和潜在作用机制, 期望为靶向 HDAC 治疗心血管疾病的药物研发及临床应用提供参考。
关键词: 组蛋白去乙酰化酶; 组蛋白去乙酰化酶抑制剂; 能量代谢; 氧化应激; 自噬; 心血管疾病
中图分类号: R541, R96 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)04-1060-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.028

Advances in the regulatory role of class I histone deacetylase in cardiac mitochondrial function

CHEN Xin-ting^{1, 2}, WANG Yu-ting^{1, 2}, HE Xin-yu^{1, 2}, MA Chuan-rui^{1*}, NI Jing-yu^{1*} (1. First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, National Clinical Research Center for Chinese Medicine Acupuncture and Moxibustion, Tianjin 300380; 2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301600)

Abstract: With the aging of population, cardiovascular diseases have become a major health concern. The structural integrity and normal function of mitochondria are crucial for maintaining cardiac physiological activities. Research has indicated that class I histone deacetylases (HDAC) can restore normal mitochondrial function by regulating energy metabolism, oxidative stress, and mitochondrial autophagy. This paper reviewed the localization and function of class I HDAC and how they were involved in the occurrence and development of cardiac diseases by affecting the mitochondrial function, and summarized the existing research and application of class I HDAC inhibitors in cardiac therapy. By revealing the potential mechanism of action of HDAC inhibitors in cardioprotection, we expect to provide a reference for drug development and clinical application of targeted HDAC for cardiovascular diseases.

Key words: histone deacetylase; histone deacetylase inhibitor; energy metabolism; oxidative stress; autophagy; cardiovascular disease

近十年来, 全球心血管疾病 (cardiovascular diseases, CVD) 的死亡率上升了 12.5%, 约占全球死亡人数的三分之一^[1]。根据全球心血管疾病负担报告, 心血管疾病是导致死亡和寿命减少的首要原因^[2]。随着人口老龄化和不健康生活方式的加剧, 心血管疾病的发病率和死亡率将持续上升^[2]。

尽管目前市场上已有多种心血管疾病药物, 但在临床治疗中, 心血管疾病药物的研究进展仍显缓慢, 且缺乏新的治疗靶点^[3]。因此, 寻找有效的治疗策略和靶点, 逆转心血管疾病的进展, 是当前亟待解决的重要课题。

组蛋白乙酰转移酶 (HAT) 和组蛋白去乙酰化

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 82204661); 天津中医药大学第一附属医院拓新工程 (No. ZD2020047)。

作者简介: 陈鑫婷, 女, 在读硕士研究生, 主要从事心血管疾病研究, email: chenxinting1221@163.com *通信作者: 马传瑞, 男, 副研究员, 硕士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化疾病研究, email: chuanruima2013@mail.nankai.edu.cn; 倪晶宇, 女, 助理研究员, 硕士研究生导师, 主要从事心血管疾病研究, email: njy920502@163.com

酶 (HDAC) 介导的可逆酰基化修饰是细胞功能调控的关键表观遗传机制之一^[4]。HDAC 是乙酰化修饰过程中的一类关键酶, 它不仅调节染色质中组蛋白的乙酰化水平, 还影响细胞周期控制、细胞凋亡和血管生成等过程, 在心血管疾病的发生和发展中发挥重要作用。目前已知的 HDAC 共有 18 种, 分为四类: I 类、II 类、III 类和 IV 类^[5]。其中 I 类 HDAC 的表达和活性异常已被发现与心脏线粒体功能障碍有关^[6]。线粒体功能障碍表现为代谢异常、氧化应激、钙离子 (Ca^{2+}) 紊乱和线粒体生物合成减少等^[7], 这些障碍可能导致糖尿病心肌病^[8]、心力衰竭 (HF)^[9]、动脉粥样硬化^[10] 和心律失常^[11] 等心血管疾病。随着研究的深入, HDAC 抑制剂在心血管领域的应用逐渐受到关注。例如, 伏立诺他 (vorinostat) 是一种可以靶向 I 类、II 类 HDAC 和 HDAC11 的泛抑制剂, 研究发现在心肌缺血/再灌注 (I/R) 前后给予伏立诺他可以预防线粒体功能障碍, 并减少心肌活性氧 (ROS) 的产生^[12]。这表明伏立诺他在心血管疾病治疗中具有潜在的作用, 并且靶向 I 类 HDAC 的抑制剂有望用于心血管疾病的治疗。因此, 本综述将重点介绍和讨论 I 类 HDAC 及其抑制剂对心脏线粒体功能影响的最新研究进展。

1 I 类 HDAC 简介

1.1 I 类 HDAC 的亚细胞定位

I 类 HDAC 是锌依赖性酶, 通过去除组蛋白尾部特定赖氨酸残基上的乙酰基来调节染色质的结构和基因的表达。I 类 HDAC 包括 HDAC1、2、3 和 8, 与酵母 Rpd3 蛋白具有序列相似性^[13], 通常位于细胞核内, 但 HDAC3 和 HDAC8 也可以在细胞质中被发现^[14]。HDAC3 能够在细胞核和细胞质之间穿梭, 其在细胞核中与核因子 κB 抑制蛋白 α ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$) 结合, 随后在 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 降解时转移到细胞质^[15]。AMP 活化蛋白激酶 (AMPK) 可以通过磷酸化 HDAC8, 调节其在细胞核和细胞质之间的定位^[16] (见图 1)。

1.2 I 类 HDAC 的结构

I 类 HDAC 包含一个约 400 个氨基酸残基的催化结构域, 均位于蛋白质 N 端。HDAC1 和 HDAC2 共享一个高度保守的 N 端结合结构域, 这对于同源和异源二聚化至关重要。HDAC1 和 HDAC2 在 C 末端的结构不同, HDAC1 的 C 末端具有两个残基 Chfr (调节蛋白质降解的泛素连接酶) 相互作用结构域和一个核定位信号 (NLS), 而 HDAC2 的 C 末端包含一个卷曲螺旋结构域 (CCD), HDAC3 包含一个 NLS 区域和核输出信号 (NES) 区域^[17-18]。与 HDAC1/2/3 不同, HDAC8 除了催化核心结构域外, 缺少 C 端延伸区, 从而影响其功能和定位^[19] (见图 1)。

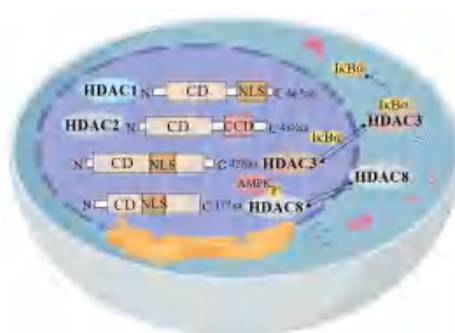


图 1 I 类 HDAC 的细胞定位和结构 (该图由 Figdraw 绘制)

Fig 1 Cellular localization and structure of class I HDAC (by Figdraw)
CD. 催化域 (catalytic domain)

1.3 I 类 HDAC 的酶活性

在 I 类 HDAC 中, HDAC1/2/3 的酶活性依赖于与大型多亚基协同抑制因子复合体的结合。HDAC1 和 HDAC2 通常存在于复合体中, 如核小体重塑和去乙酰化酶复合体 (NuRD)、Sin3 组蛋白去乙酰化酶复合体相关因子 (Sin3) 和神经元限制性沉默因子共抑制因子 (CoREST) 等。而 HDAC3 主要作为核受体共抑制子 (NCoR) / 维 A 酸和甲状腺激素受体沉默介导因子 (SMRT) 复合物的一部分, 与其中的去乙酰化酶激活结构域 (DAD) 结合, 有利于激活 HDAC3 的酶活性。肌醇磷酸盐能够结合在 HDAC 与辅阻遏蛋白之间的特定口袋中, 从而调节 HDAC1/2/3 在复合物中的酶活性。与 HDAC1/2/3 不同, HDAC8 是一个功能独立且完全分离的酶, 其形成同型二聚体并独立发挥作用, 不作为多蛋白复合体的一部分^[20-22]。

2 I 类 HDAC 在心脏线粒体功能中的作用

心脏作为人体的重要器官, 需消耗大量的三磷酸腺苷 (ATP) 以维持正常的泵血和收缩功能, 为了满足这种高能量需求, 心脏拥有高容量的线粒体系统^[23]。线粒体在氧化应激、炎症、新陈代谢、线粒体吞噬功能缺陷和细胞凋亡的调节中起着关键作用^[24], 其功能紊乱与心血管疾病的发生发展密切相关。因此, 保持线粒体的健康对于维护心脏的正常功能和防治心血管疾病至关重要。研究显示 I 类 HDAC 可通过调节能量代谢、减轻氧化应激和促进线粒体自噬等机制来恢复线粒体正常功能, 有望用于心血管疾病的治疗。目前的研究尚缺少 HDAC8 对心脏线粒体功能的影响, 因此, 本文对 HDAC1/2/3 在心脏线粒体功能中的作用进行分析总结。

2.1 I 类 HDAC 影响心脏能量代谢

在正常情况下, 心脏代谢主要依赖于脂肪酸 (FA) 氧化和线粒体氧化磷酸化产生能量。而在病理状态下, 心脏会发生代谢重编程, 减少 FA 的利用和增加葡萄糖酵解过程, 从而适应不同环境变化^[25]。Milstone 等^[26] 通过对敲除 HDAC1 和 HDAC2

基因的小鼠心脏进行转录组学分析,发现 *HDAC1* 和 *HDAC2* 的缺失会导致代谢关键基因的转录位点被激活,进而使这些基因表达降低,例如柠檬酸合酶 (CS) 和泛醌氧化还原酶亚基 B9 (NDUFB9) 表达降低,从而影响心脏的能量代谢。Montgomery 等^[27]通过 PCR 实验发现,在 *HDAC3* 心脏特异性敲除的小鼠心肌组织中,脂肪酸摄取和氧化基因 [如 CD36 和酰基辅酶 A 氧化酶 (*ACOX*)] 上调,而葡萄糖代谢基因 [如葡萄糖转运蛋白 4 (*Glut4*)、丙酮酸脱氢酶激酶 4 (*PKD4*)] 表达下调,提示 *HDAC3* 的缺失影响心肌细胞的代谢途径,导致心肌细胞对 FA 的依赖增加和对葡萄糖的利用减少。此外, Sun 等^[28]发现特异性敲除 *HDAC3* 的小鼠在高脂饮食喂养后会出现肥厚型心肌病 (HCM) 和 HF,并对小鼠心肌中的基因表达进行了微阵列分析,发现编码脂肪酸氧化 (FAO) 和脂质代谢关键酶的基因表达水平下降,包括肉碱棕榈酰转移酶 1b (CPT-1b)、1-酰基甘油-3-磷酸 *O*-酰基转移酶 9 (AGPAT9) 和烯酰辅酶 A 水合酶 (ECH) 等,由此可见 *HDAC3* 缺失导致心肌线粒体氧化能力下降,从而引发心肌能量失衡。Na 等^[29]研究发现 *HDAC3* 通过抑制特定 miR-18a,进而促进肾上腺素能受体 β_3 (ADRB3) 的表达。ADRB3 在脂质代谢中扮演关键角色,它能够促进三酰甘油分解成游离脂肪酸和甘油,加速脂肪酸的分解代谢,从而对心脏的能量供应产生影响。Wu 等^[30]通过免疫共沉淀实验表明,当 I/R 发生时, *HDAC1* 通过去乙酰化神经内分泌因子 77 (Nurf77),影响异柠檬酸脱氢酶 1 (IDH1) 的转录和表达,进而调控代谢重编程,改善心脏能量代谢。Zhou 等^[31]研究通过阿霉素 (DOX) 处理 H9c2 心肌细胞,发现 *HDAC1* 可以抑制 H3K27 乙酰化诱导的磷酸果糖激酶 (PFKM) 转录,进而调节糖酵解过程 (见图 2)。以上这些发现揭示了 *HDAC1/2/3* 在心脏能量代谢中的关键作用, *HDAC1/2/3* 的缺失或表达异常会显著影响心肌细胞的正常代谢和功能,包括脂肪酸的摄取、氧化、三羧酸循环以及糖酵解的调节等。这些代谢变化可能导致心脏功能下降和 HF 的发生。

2.2 I 类 HDAC 对心脏线粒体氧化应激的调控作用

ROS 主要包括超氧阴离子 ($\cdot\text{O}_2^-$)、羟基自由基 ($\text{OH}\cdot$) 和过氧化氢 (H_2O_2),是参与心肌收缩和钙转移的信号分子。细胞内 ROS 的产生和清除是平衡的。细胞通过多种抗氧化酶 [如超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 等] 相互作用来清除 ROS,维持氧化还原平衡^[32]。线粒体作为细胞内 ROS 的主要生成场所,当 ROS 的产生超过细胞的清除能力时,过量的 ROS 将攻击心肌细胞内的脂质、蛋白质和核酸等关键大分子,造成氧化损伤,进而引发氧化应激反

应,最终导致心肌细胞功能障碍^[7]。I 类 HDAC 在心脏线粒体氧化应激中发挥着重要的调控作用,主要通过直接影响 ROS 的生成及调控核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 信号通路发挥作用。Nrf2 通过激活一系列抗氧化酶和蛋白,帮助清除细胞内有害的氧化物质,降低氧化应激对细胞的损伤^[33]。Huynh 等^[34]发现抑制 *HDAC1* 通过减少线粒体 ROS 生成和钙过载来减弱血管紧张素 II (ANG II) 诱导的心肌纤维化。Herr 等^[35]的研究发现, *HDAC1* 定位于心肌细胞的线粒体,能通过修饰琥珀酸脱氢酶 (SDHA) 的活性,从而控制 ROS 产生,可修复线粒体损伤。Zhang 等^[36]在感染性休克小鼠中,发现醛脱氢酶 (ALDH2) 通过抑制 *HDAC3* 从细胞核到线粒体的易位,进而抑制了由羟酰基辅酶 A 脱氢酶三功能多酶复合物 α 亚基 (HADHA) 的去乙酰化过程,当这一过程受到干扰时,会导致有毒脂质的积累,并诱导 ROS 的产生,从而加剧了感染性休克中的代谢紊乱和氧化应激。此外, *HDAC3* 可以间接调控 Nrf2 信号通路。Zhao 等^[37]发现 *HDAC3* 通过减少 Nrf2 与 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1 (Keap1) 的结合来上调 Nrf2 表达,这一过程激活了血管内皮细胞中的抗氧化还原信号通路。Guo 等^[38]通过免疫共沉淀实验发现 *HDAC3* 可以通过与核因子 κB (NF- κB) p65 的协同作用,通过去乙酰化直接抑制 Nrf2 活性,进而抑制心肌细胞的抗氧化能力。另外,有研究发现抑制 *HDAC1* 和 *HDAC3* 的表达可以通过促进抗氧化酶的表达和活性,对抗心肌细胞的氧化应激和凋亡,从而保护心脏免受损伤和重塑^[39-40] (见图 2)。

综上所述, *HDAC1* 和 *HDAC3* 通过影响 ROS 的产生、调控抗氧化信号通路,参与线粒体功能和心肌纤维化等过程,在心肌细胞的氧化应激反应中发挥作用。

2.3 I 类 HDAC 对心脏线粒体自噬的调控作用

线粒体自噬是一种细胞内部的清理机制,它通过选择性地清除多余和损伤的线粒体来维持细胞内的线粒体稳态。当线粒体自噬过程受到抑制时,会导致线粒体功能障碍的加剧,从而加速心血管疾病的发展。在病理生理条件下,心肌细胞通过增强线粒体自噬来启动自我保护机制,以应对和减轻心肌损伤^[41-42]。Li 等^[43]研究发现,在心肌肥大模型中,抑制 *HDAC1* 的表达可以加强 PGC-1 α 与核呼吸因子 1 (NRF-1) 的相互作用,进而增加 FUN14 结构域蛋白 1 (FUND1) 和微管相关蛋白 1 轻链 3-II (LC3-II) 的表达,这有助于促进线粒体自噬。Qiu 等^[44]通过蛋白质免疫印迹法研究发现, *HDAC3* 的抑制可以通过上调核转位蛋白样 1 基因 (Bmal1) 和 LC3 II 的表达,从而增加线粒体自噬进程,维持线粒体结构和功能的稳

定,减轻糖尿病心肌损伤。此外,Shi 等^[45]的研究发现,通过抑制 HDAC1 和 HDAC3 与磷酸酶及张力蛋白同源物 (PTEN) 基因启动子的结合,可以促进 PTEN 的表达,PTEN 是一种磷酸酶,能够去磷酸化磷酸磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸 [PI (3,4,5) P₃],进而抑制 Akt 的活性,导致 mTORC1 的活性降低。这种机制加速了心肌细胞的自噬过程,有助于减少线粒体损伤。王月涵等^[46]研究发

现,HDAC3 可以直接抑制 mTOR 蛋白的表达,促进了低氧诱导的 H9c2 心肌细胞自噬进程。这一发现揭示了 HDAC3 通过调节线粒体自噬来改善线粒体功能保护心肌细胞 (见图 2)。上述研究提示,HDAC1 和 HDAC3 可通过调节线粒体自噬来维持线粒体稳态和正常功能,并且可改善心肌细胞的损伤和应激,控制心血管疾病的发生和发展。

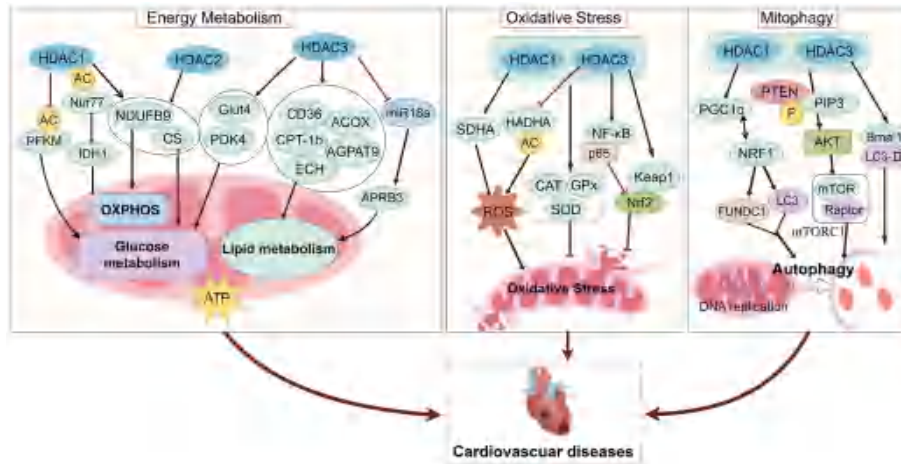


图 2 I 类 HDAC 对心脏线粒体功能的调控 (该图由 Figdraw 绘制)

Fig 2 Regulation of cardiac mitochondrial function by class I HDAC (by Figdraw)

综上,HDAC1/2/3 对心脏线粒体功能的影响是一个复杂的过程,涉及多种机制和途径。未来需要进一步探索 HDAC1/2/3 在心脏线粒体功能中的具体作用,并增加 HDAC8 是否影响心脏线粒体功能相关研究,以为心血管疾病的治疗提供新的思路。

3 I 类 HDAC 抑制剂在心血管疾病中的作用

HDAC 抑制剂是一类具有广阔临床应用前景的药物,通过抑制 HDAC 的活性,从而影响基因表达和细胞功能。目前,一些 HDAC 抑制剂,如伏立诺他、罗米地辛、贝利司他和帕比司他,已经获得美国食品药品监督管理局 (FDA) 的批准用于治疗某些癌症^[47]。已有研究发现 HDAC 抑制剂在心脏保护方面的多重机制,包括抑制心脏纤维化、促进血管新生、增强线粒体生物合成、维持心脏电生理稳定性以及调控细胞凋亡、自噬和细胞周期停滞等^[48]。随着对 HDAC 在心血管疾病中作用机制的深入了解,I 类 HDAC 抑制剂逐渐成为研究的焦点。目前已报道的 I 类 HDAC 抑制剂主要包括以下几类^[13, 49-51]: ① 苯甲酰胺类包括恩替诺特 (entinostat, MS-275)、莫西司他 (mocetinostat, MGCD0103)、tacedinaline (CI-994)、domatinostat、RG2833、BG45、RGFP966 等,这些化合物通过与 HDAC 的活性位点结合,有效抑制其去乙酰化活性;② 异羟肟酸类包括奎西诺司他、德罗西诺司他、scriptaid、PCI-34051、NCC149、AR-42、MMH371、CHR-3996,它们通过羟胺基团

与 HDAC 活性位点中的锌离子形成螯合物,有效抑制 HDAC 的去乙酰化活性;③ 环肽类包括拉加唑、罗米地辛、阿匹西丁、spiruchostatin、thailandepsins 和 burkholdacs,这些天然产物来源的化合物具有独特的大环结构,对 HDAC 表现出较高的选择性和亲和力;④ 脂肪酸类以丙戊酸 (VPA) 为代表^[52]。

MS-275、MGCD0103、RGFP966 和 quisinostat 等药物已被证实与改善心脏线粒体功能障碍密切相关。Lkhagva 等^[6]研究表明,MS-275 通过抑制 I 类 HDAC 活性,增强心肌细胞线粒体的 ATP 合成能力,有效恢复线粒体的能量代谢功能,并显著降低线粒体超氧化物和 ROS 的产生,有助于逆转 TNF-α 引起的心肌细胞线粒体功能障碍。Wang 等^[53]发现,MGCD0103 通过抑制 I 类 HDAC 活性并激活 PGC-1α 信号通路,促进 ATP 产生并减少 ROS 生成,从而缓解 HCM 引起的线粒体功能障碍。Xu 等^[54]的研究显示,RGFP966 作为 HDAC3 的选择性抑制剂,在糖尿病心肌病模型小鼠中能够降低 HDAC3 表达并减少 ROS 产生,有效改善心脏的氧化应激和糖尿病诱导的心功能障碍。Zhang 等^[55]的研究进一步发现,在 CaMK II 过表达的小鼠心脏中,自噬相关基因表达下调,而 quisinostat 治疗能够使这些基因表达水平恢复正常,表明 quisinostat 通过抑制 HDAC1 改善线粒体自噬及心功能障碍。

这些研究揭示了 HDAC 抑制剂在心脏线粒体功

能治疗中的潜力,包括改善能量代谢、抗氧化应激和调节自噬等作用机制。尽管如此,这些药物的安全性和有效性仍需通过更多的实验研究来进一步验证。

4 总结与展望

综上所述,Ⅰ类 HDAC 作为关键调节因子,在心脏线粒体功能中具有多种调控作用,① 能量代谢调节:Ⅰ类 HDAC 可以通过改善心肌能量代谢重编程来调控心脏功能;② 抗氧化应激:能够直接减少 ROS 的生成或激活 Nrf2 信号通路,增强抗氧化酶的表达和活性,以及促进与氧化应激相关的基因表达,减轻心脏因氧化应激而受到的损害;③ 维持线粒体稳态:通过促进 mtDNA 转录和复制,以及线粒体生物合成和自噬过程,维持线粒体稳态和功能,减轻心肌损伤。Ⅰ类 HDAC 虽被证实对心脏功能障碍具有调节作用,但为了更全面地了解其在心脏线粒体功能中的作用,仍需进一步深入探究Ⅰ类 HDAC 的分子调控机制。

HDAC 抑制剂的治疗潜力在于其作用的表现遗传途径具有可逆性,这使得它们成为治疗多种疾病的有希望的靶点。在临床前研究中,HDAC 抑制剂已经显示出改善线粒体功能障碍和增强心脏功能的显著效果。目前,一些 HDAC 抑制剂正在临床Ⅱ期和Ⅲ期试验阶段^[54]。尽管这些抑制剂存在潜在的毒性问题,但随着研究的深入,它们正逐渐被开发为更安全的治疗药物。有研究发现将 HDAC 抑制剂与传统药物如紫杉醇、硼替佐米或顺铂等联合使用,可以实现协同治疗效应。这种联合疗法有助于减少长期治疗引起的不良反应,并已经在临床上取得了一定的成功^[55-56]。因此,为了全面评估 HDAC 调节剂的临床应用潜力,需要通过更多的临床试验来验证其安全性和有效性。这些研究将为 HDAC 抑制剂的临床应用提供关键的科学依据,并有助于优化治疗方案,以实现最佳的治疗效果和最小的副作用。

参考文献

- [1] Joseph P, Leong D, McKee M, et al. Reducing the global burden of cardiovascular disease, part 1: the epidemiology and risk factors [J]. *Circ Res*, 2017, 121 (6): 677-694.
- [2] Timmis A, Vardas P, Townsend N, et al. European society of cardiology: cardiovascular disease statistics 2021 [J]. *Eur Heart J*, 2022, 43 (8): 716-799.
- [3] Di Raimondo D, Musiari G, Rizzo G, et al. New insights in prevention and treatment of cardiovascular disease [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, 19 (4): 2475-2486.
- [4] Shi YC, Zhang HJ, Huang SL, et al. Epigenetic regulation in cardiovascular disease: mechanisms and advances in clinical trials [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7 (1): 200-210.
- [5] Bagchi RA, Weeks KL. Histone deacetylases in cardiovascular and metabolic diseases [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 130: 151-159.
- [6] Lkhagva B, Kao YH, Lee TI, et al. Activation of class I histone deacetylases contributes to mitochondrial dysfunction in cardiomyocytes with altered complex activities [J]. *Epigenetics*, 2018, 13 (4): 376-385.
- [7] 熊燕, 张梅, 陈菲, 等. 线粒体功能障碍与心血管疾病 [J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29 (2): 364-370.
- [8] 石彦波, 杜书琴, 潘琪宏, 等. 线粒体功能障碍: 糖尿病心脏病防治新方向 [J]. *浙江工业大学学报*, 2024, 52 (4): 416-422.
- [9] 何梦铎, 曹玉, 于雅馨, 等. 线粒体相关功能障碍在射血分数保留的心力衰竭中的重要作用 [J]. *中国医药导报*, 2024, 21 (1): 56-59, 91.
- [10] 张嘉祺, 王茜婷, 陈夏欢, 等. 线粒体融合分裂与自噬在动脉粥样硬化中的作用及研究进展 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2024, 26 (8): 974-977.
- [11] 尚帅, 张玲, 汤宝鹏. 心房颤动与线粒体功能障碍 [J]. *中国心脏起搏与心电生理杂志*, 2021, 35 (1): 70-73.
- [12] Yang J, He J, Ismail M, et al. HDAC inhibition induces autophagy and mitochondrial biogenesis to maintain mitochondrial homeostasis during cardiac ischemia/reperfusion injury [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 130: 36-48.
- [13] Seto E, Yoshida M. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014, 6 (4): a018713.
- [14] Wang ZA, Cole PA. The chemical biology of reversible lysine post-translational modifications [J]. *Cell Chem Biol*, 2020, 27 (8): 953-969.
- [15] 夏子涵, 张和, 张紫琼, 等. HDAC3: 动脉粥样硬化治疗的新靶点 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2024, 32 (7): 621-626, 640.
- [16] Kim JY, Cho H, Yoo J, et al. Pathological role of HDAC8: cancer and beyond [J]. *Cells*, 2022, 11 (19): 3161-3167.
- [17] 曹端方, 杨娜. 组蛋白去乙酰化酶的结构及应用 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2015, 42 (11): 978-993.
- [18] Ma P, Schultz RM. HDAC1 and HDAC2 in mouse oocytes and preimplantation embryos: specificity versus compensation [J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23 (7): 1119-1127.
- [19] 胡婷婷, 朴光宇, 金艳花. 组蛋白去乙酰化酶 8 在肿瘤发展中作用的研究进展 [J]. *吉林大学学报 (医学版)*, 2021, 47 (2): 528-536.
- [20] Hess L, Moos V, Lauber AA, et al. A toolbox for class I HDACs reveals isoform specific roles in gene regulation and protein acetylation [J]. *PLoS Genet*, 2022, 18 (8): e1010376.
- [21] Watson PJ, Fairall L, Santos GM, et al. Structure of HDAC3 bound to co-repressor and inositol tetrakisphosphate [J]. *Nature*, 2012, 481 (7381): 335-340.
- [22] Jiang LP, Yu XH, Chen JZ, et al. Histone deacetylase 3: a potential therapeutic target for atherosclerosis [J]. *Aging Dis*, 2022, 13 (3): 773-782.
- [23] 孙侠, 赵倩茹, 袁伟. 心肌线粒体能量代谢在心血管疾病中的研究进展 [J]. *中国心血管杂志*, 2022, 27 (1): 90-93.
- [24] Dorn GW 2nd, Vega RB, Kelly DP. Mitochondrial biogenesis and dynamics in the developing and diseased heart [J]. *Genes Dev*, 2015, 29 (19): 1981-1991.
- [25] Wang HC, Shen M, Shu XF, et al. Cardiac metabolism, reprogramming, and diseases [J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2024, 17 (1): 71-84.
- [26] Milstone ZJ, Saheera S, Bourke LM, et al. Histone deacetylases 1 and 2 silence cryptic transcription to promote mitochondrial function during cardiogenesis [J]. *Sci Adv*, 2020, 6

- (15): e5150.
- [27] Montgomery RL, Potthoff MJ, Haberland M, et al. Maintenance of cardiac energy metabolism by histone deacetylase 3 in mice [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118 (11): 3588-3597.
 - [28] Sun Z, Singh N, Mullican SE, et al. Diet-induced lethality due to deletion of the Hdac3 gene in heart and skeletal muscle [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286 (38): 33301-33309.
 - [29] Na JT, Jin HF, Wang X, et al. The crosstalk of HDAC3, microRNA-18a and ADRB3 in the progression of heart failure [J]. *Cell Biosci*, 2021, 11: 1-15.
 - [30] Wu ZH, Bai YP, Qi YJ, et al. HDAC1 disrupts the tricarboxylic acid (TCA) cycle through the deacetylation of Nur77 and promotes inflammation in ischemia-reperfusion mice [J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9 (1): 10-16.
 - [31] Zhou M, Sun X, Wang CL, et al. PFKM inhibits doxorubicin-induced cardiotoxicity by enhancing oxidative phosphorylation and glycolysis [J]. *Sci Rep*, 2022, 12 (1): 11684-11688.
 - [32] Vallabh NA, Romano V, Willoughby CE. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in corneal disease [J]. *Mitochondrion*, 2017, 36: 103-113.
 - [33] He F, Ru XL, Wen T. NRF2, a transcription factor for stress response and beyond [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (13): 4777-4789.
 - [34] Huynh TV, Rethi L, Chung CC, et al. Class I HDAC modulates angiotensin II-induced fibroblast migration and mitochondrial overactivity [J]. *Eur J Clin Invest*, 2022, 52 (4): e13712.
 - [35] Herr DJ, Baarine M, Aune SE, et al. HDAC1 localizes to the mitochondria of cardiac myocytes and contributes to early cardiac reperfusion injury [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 114: 309-319.
 - [36] Zhang Y, Lv Y, Zhang QJ, et al. ALDH2 attenuates myocardial pyroptosis through breaking down mitochondrion-NLRP3 inflammasome pathway in septic shock [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1125866.
 - [37] Zhao QC, Zhang F, Yu ZY, et al. HDAC3 inhibition prevents blood-brain barrier permeability through Nrf2 activation in type 2 diabetes male mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16 (1): 103-112.
 - [38] Guo XY, Hong SQ, He H, et al. NF κ B promotes oxidative stress-induced necrosis and ischemia/reperfusion injury by inhibiting Nrf2-ARE pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 159: 125-135.
 - [39] Zheng XH, Wang LL, Zheng MZ, et al. RGFP966 inactivation of the YAP pathway attenuates cardiac dysfunction induced by prolonged hypothermic preservation [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2020, 21 (9): 703-707.
 - [40] Li Y, Zhang ZY, Zhou XN, et al. Histone deacetylase 1 inhibition protects against hypoxia-induced swelling in H9c2 cardiomyocytes through regulating cell stiffness [J]. *Circ J*, 2017, 82 (1): 192-202.
 - [41] Killackey SA, Philpott DJ, Girardin SE. Mitophagy pathways in health and disease [J]. *J Cell Biol*, 2020, 219 (11): e202004029.
 - [42] Li AQ, Gao M, Liu BL, et al. Mitochondrial autophagy: molecular mechanisms and implications for cardiovascular disease [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13 (5): 444-450.
 - [43] Li G, Pan B, Liu LF, et al. Epigallocatechin-3-gallate restores mitochondrial homeostasis impairment by inhibiting HDAC1-mediated NRF1 histone deacetylation in cardiac hypertrophy [J]. *Mol Cell Biochem*, 2024, 479 (4): 963-973.
 - [44] Qiu Z, Ming H, Lei SQ, et al. Roles of HDAC3-orchestrated circadian clock gene oscillations in diabetic rats following myocardial ischaemia/reperfusion injury [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12 (1): 43-52.
 - [45] Shi XH, Liu Y, Zhang DQ, et al. Valproic acid attenuates sepsis-induced myocardial dysfunction in rats by accelerating autophagy through the PTEN/AKT/mTOR pathway [J]. *Life Sci*, 2019, 232: 116613.
 - [46] 王月涵, 黄颖. HDAC3 负性调控 mTOR 促进低氧诱导 H9C2 心肌细胞自噬 [J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56 (10): 1575-1579.
 - [47] 高文聪, 马昕, 陈鹏, 等. I 类及 II 类组蛋白去乙酰化酶在心力衰竭中的作用及机制的研究进展 [J]. *中南药学*, 2022, 20 (10): 2329-2335.
 - [48] Chun P. Therapeutic effects of histone deacetylase inhibitors on heart disease [J]. *Arch Pharm Res*, 2020, 43 (12): 1276-1296.
 - [49] Eckschlagner T, Plch J, Stiborova M, et al. Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18 (7): 1414-1420.
 - [50] 姚开云, 丁虹琬, 曹琳玉, 等. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂的抗抑郁前景 [J]. *药学报*, 2021, 56 (1): 29-36.
 - [51] 石安喆, 武善超, 盛春泉. 基于组蛋白去乙酰化酶的双靶点抑制剂研究进展 [J]. *第二军医大学学报*, 2021, 42 (5): 543-552.
 - [52] Pedro FJ, Pitt B, Zannad F. Histone deacetylase inhibitors for cardiovascular conditions and healthy longevity [J]. *Lancet Healthy Longev*, 2021, 2 (6): e371-e379.
 - [53] Wang KH, Tang RJ, Wang SY, et al. Isoform-selective HDAC inhibitor mocetinostat (MGCD0103) alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury via mitochondrial protection through the HDACs/CREB/PGC-1 α signaling pathway [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2022, 79 (2): 217-228.
 - [54] Xu Z, Tong Q, Zhang ZG, et al. Inhibition of HDAC3 prevents diabetic cardiomyopathy in OVE26 mice via epigenetic regulation of DUSP5-ERK1/2 pathway [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2017, 131 (15): 1841-1857.
 - [55] Zhang ML, Yang X, Zimmerman RJ, et al. CaMK II exacerbates heart failure progression by activating class I HDACs [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2020, 149: 73-81.
 - [56] Bondarev AD, Attwood MM, Jonsson J, et al. Recent developments of HDAC inhibitors: emerging indications and novel molecules [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2021, 87 (12): 4577-4597.

(收稿日期: 2024-07-31; 修回日期: 2024-11-13)

黄芪多糖在治疗 2 型糖尿病及其并发症中的研究进展

李小龙¹, 韩超^{1, 2}, 郭万慧^{1, 2}, 孙力康², 张玥^{3*} (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. 天津中医药大学药物安全评价中心, 天津 301600)

摘要: 2 型糖尿病是一种以胰岛 β 细胞功能障碍和外周胰岛素抵抗为特征的慢性疾病, 患病率在全球范围内逐步上升。长期的糖尿病还会导致一系列并发症, 例如大血管并发症 (心血管疾病) 和微血管并发症 (糖尿病肾病、糖尿病视网膜病变和神经病变)。黄芪是众多抗糖尿病中药复方的关键组成之一, 对糖尿病及其并发症具有良好的治疗作用。黄芪多糖是黄芪中的重要活性成分, 具有改善消化系统、改善糖脂代谢、抗氧化、调节免疫等功能。本文将基于国内外实验研究, 综述了黄芪多糖治疗 2 型糖尿病及其并发症的主要机制及相关信号通路。

关键词: 黄芪多糖; 2 型糖尿病; 胰岛素抵抗; 信号通路

中图分类号: R587.1, R285 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)04-1066-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.029

Research progress in *Astragalus* polysaccharide for type 2 diabetes mellitus and its complications

LI Xiao-long¹, HAN Chao^{1, 2}, GUO Wan-hui^{1, 2}, SUN Li-kang², ZHANG Yue^{3*} (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. *Center for Drug Safety Evaluation, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301600*)

Abstract: Type 2 diabetes mellitus with increasing prevalence worldwide is a chronic disease characterized by pancreatic β -cell dysfunction and peripheral insulin resistance. Long-term diabetes also leads to many complications, such as macrovascular complications (cardiovascular diseases) and microvascular complications (diabetic nephropathy, diabetic retinopathy and neuropathy). *Astragalus* is a key component of many antidiabetic herbal compounds with favorable therapeutic effect on diabetes and its complications. *Astragalus* polysaccharides is an important active ingredient in *Astragalus*, which can improve digestion and glycolipid metabolism, and regulate antioxidation and immunity. In this paper, we reviewed the main mechanism and related signaling pathways of astragalus polysaccharide in the treatment of type 2 diabetes and its complications based on experimental studies home and abroad.

Key words: *Astragalus* polysaccharide; type 2 diabetes; insulin resistance; signaling pathway

糖尿病是一种常见且严重的慢性代谢疾病, 据国际糖尿病联合会估计, 2021 年全球 20 ~ 79 岁人群的糖尿病患病率为 10.5% (5.366 亿人), 到 2045 年将上升到 12.2% (7.832 亿人)^[1]。美国糖尿病协会于 2021 年将糖尿病分为 1 型糖尿病 (T1DM)、2 型糖尿病 (type 2 diabetes,

T2DM)、妊娠糖尿病及其他类型糖尿病, 其中大多数糖尿病患者为 T2DM。T2DM 是以高血脂、高血糖、胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 为特点的代谢疾病, 通常还伴有血管功能异常、动脉硬化、血脂异常、高血压, 肥胖人群以及老年人群是 T2DM 的易感群体^[2]。研究显示, 许多单

基金项目: 校企合作项目 (No.TM01)。

作者简介: 李小龙, 男, 在读硕士研究生, 主要从事药理学方向研究, email: 643347535@qq.com * 通信作者: 张玥, 女, 高级实验师, 博士, 主要从事中药毒理、药代动力学研究, email: zhangyue@tjutc.edu.cn

味中药及其活性成分、中药复方对 T2DM 的预防和治疗有显著效果^[3]。中药黄芪治疗糖尿病有着悠久的历史,《名医别录》最早记载了黄芪有“止渴”作用^[4]。黄芪多糖(Astragalus polysaccharide, APS)是从植物黄芪根中提取出来的水溶性活性成分,其主要成分包括杂多糖、葡聚糖、中性多糖和酸性多糖。杂多糖是一种酸性水溶性多糖,而葡聚糖分为水溶性和非水溶性。研究表明,从 APS 中分离出的六种单糖(即淀粉、半糖、阿拉伯糖、木糖、葡萄糖醛酸和鼠李糖^[5]),对糖尿病具有良好的治疗作用,涉及的机制及相关信号通路众多,本文将从保护胰岛 β 细胞等机制以及磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT)等信号通路进行综述。

1 APS 治疗 T2DM 及其并发症的机制

1.1 保护胰岛 β 细胞

胰岛素的分泌涉及胰岛内多种内分泌细胞之间的复杂串扰,包括分泌胰高血糖素的 α 细胞,分泌胰岛素的 β 细胞和分泌生长抑素的 δ 细胞^[6]。到目前为止,研究最广泛的胰岛细胞类型是 β 细胞,尽管其他类型细胞在 T2DM 的发病机制中也发挥了作用,但最终是胰岛 β 细胞分泌胰岛素^[7]。胰岛 β 细胞作为胰岛素的主要来源,在维持葡萄糖稳态方面发挥着关键作用,其负责胰岛素的合成、储存和释放,胰岛素受到严格调节,以应对身体代谢状态的变化^[8]。胰岛 β 细胞对营养环境非常敏感,可以对极小的血糖水平波动产生响应,在短时间内通过刺激-分泌偶联过程,引起胰岛素分泌水平的显著变化^[9]。胰岛 β 细胞功能异常(即胰岛 β 细胞数目减少及功能下降甚至丧失)是糖尿病形成的关键因素^[10]。Deng 等^[11]报道,APS 能够促进高糖加棕榈酸处理的小鼠胰岛 β 细胞株 MIN6 细胞中 miR-136-5p 和 miR-149-5p 的表达,从而导致胰岛 β 细胞凋亡和胰岛素分泌异常。唐思梦等^[12]通过对大鼠胰腺组织进行免疫组化染色分析发现,与模型组相比,APS 干预后大鼠胰岛 β 细胞显著增多,胰岛形状规则,边缘整齐。这表明 APS 改善 T2DM 大鼠的糖脂代谢异常的机制可能是通过保护大鼠的胰岛 β 细胞进而促进空腹胰岛素的分泌来实现的。

1.2 加强葡萄糖转运,增加糖原合成

葡萄糖是所有生物体的主要能量来源之一。葡萄糖可以从体内合成和饮食中获取,被运送到靶细胞进行吸收和储存。在这方面,葡萄糖转运蛋白在细胞葡萄糖转运中起着关键作用^[13]。葡萄糖

转运蛋白 2 (GLUT2) 主要在肝脏和胰岛 β 细胞中表达。在肝细胞中, GLUT2 是葡萄糖转运所必需的,它确保肝脏在能量需求时输出葡萄糖,并调节全身血糖; GLUT2 还可以平衡细胞内外葡萄糖浓度,以确保适当控制肝脏中葡萄糖敏感基因的表达。在胰岛 β 细胞中,葡萄糖刺激的胰岛素分泌需要 GLUT2^[14]。葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT4) 是一种从循环中去除葡萄糖的转运蛋白,在脂肪组织和骨骼肌中高度表达^[15]。GLUT4 从细胞质转位到细胞膜表面,并介导细胞外葡萄糖的跨膜转运,这是胰岛素代谢信号传导途径中中级反应的主要限速步骤,任何部分受损都会导致葡萄糖表达和转运受限,最终导致血糖升高。在 T2DM 的疾病进程中,葡萄糖转运蛋白表达受到抑制会影响外周组织(如骨骼肌、脂肪组织)中葡萄糖的利用^[16]。Luo 等^[17]对 T2DM 模型大鼠肝脏研究表明,与模型组相比,APS 以 700 mg/(kg·d) 的剂量干预 8 周之后, GLUT2、GLUT4 表达水平显著升高。Zhang 等^[18]对小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞的 qRT-PCR 分析数据表明,与对照细胞相比,APS 处理使得脂肪细胞分化过程中 GLUT4 mRNA 含量增加了 7.5 倍, GLUT4 水平增加了 5.8 倍;免疫细胞化学染色结果进一步证实了 APS 对脂肪细胞 GLUT4 含量的影响。Ren 等^[19]以脂多糖诱导大鼠 INS-1 胰岛素瘤细胞导致胰岛素分泌受损, qRT-PCR 结果显示,脂多糖刺激细胞后 GLUT2 显著下调, APS 处理后,显著增加了 GLUT2 的表达,这表明恢复胰岛素分泌机制可能与提高 GLUT2 表达有关。

1.3 改善氧化应激

氧化应激是由活性氧(ROS)产生增加的生化过程与机体抗氧化防御系统之间的不平衡所引起的代谢功能障碍。氧化应激存在于心血管疾病、癌症、神经退行性疾病和衰老等多种非传染性疾病的发病过程之中^[20]。与代谢功能障碍相关的疾病可能受到氧化还原平衡变化的影响。越来越多的证据表明 T2DM 在很大程度上受到氧化应激的影响^[21]。T2DM 患者体内长期保持着高糖的环境, ROS 在体内过度生成以及清除相对不足,导致 ROS 的蓄积,从而导致氧化应激,过度的氧化应激反应是导致 T2DM 发生发展的重要因素^[22]。还有研究表明,在患有 T2DM 的 Zucker 大鼠肝脏中发现了线粒体功能障碍、ROS 过度产生和脂质过氧化^[23]。氧化应激的增加是 T2DM 出现 IR 和葡萄糖耐量受损的有害因素^[24]。超氧化物歧化酶 2 (SOD2) 在胞质溶胶中合成并输入到线粒体基质中,然后被激活并作

为细胞呼吸的主要抗氧化剂发挥作用^[25]。Ju 等^[26]对糖尿病心肌病的研究发现,高血糖使得糖尿病模型小鼠心肌细胞 SOD2 生成减少且活性降低。APS 处理之后,糖尿病模型小鼠和杂合 SOD2 敲除小鼠心肌细胞中 SOD2 活性和蛋白水平显著升高。此外,与 C57BJ/6J 对照小鼠相比,APS 治疗显著逆转糖尿病杂合 SOD2 敲除小鼠心肌细胞中 SOD2 活性和蛋白水平的降低。Chen 等^[27]的实验也证明,APS 增强了由链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠和非糖尿病杂合 SOD2 敲除小鼠 SOD2 酶活性和蛋白的水平,并抑制了以上两种小鼠心肌干祖细胞中 ROS 形成和氧化损伤。

1.4 抑制内质网应激 (ERS)

内质网 (ER) 是分泌蛋白和跨膜蛋白合成、折叠和修饰的中心细胞器。蛋白质折叠能力在多种外界因素和细胞内在因素的影响下可能会遭到破坏,并且引发 ERS 状态,其特征是错误折叠或未折叠蛋白质积累^[28]。胰岛素的天然结构是在 ER 内形成的,ERS 会导致胰岛 β 细胞功能障碍以及胰岛 β 细胞凋亡,从而引起糖尿病^[29]。当机体处于过度持续的 ERS 情况时,蛋白激酶 R 样内质网激酶 (PERK) 和肌醇需要酶 1 (IRE1) 从感应 ERS 转变为诱导细胞凋亡,分别激活转录活化因子 4 (ATF4) 和凋亡信号调节激酶 1 (ASK1),并上调凋亡相关转录因子 C/EBP 同源蛋白 (CHOP) 和 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 表达,启动 PERK/ATF4/CHOP 和 IRE1/ASK1/JNK 途径,诱导细胞凋亡^[30]。周海燕^[31]对 T2DM 大鼠的研究结果表明,与模型组相比,APS 处理后降低了凋亡蛋白 CHOP、Bax 表达水平,增加抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,改善胰岛功能形态和 ERS,从而抑制或延缓胰岛内细胞的凋亡以保护胰岛的功能。胡琛琛等^[32]用 APS 干预 T2DM 大鼠 8 周后,大鼠的 CHOP 表达水平显著降低,提示 APS 可能通过降低 CHOP 的表达来改善大鼠 ERS,从而增加胰岛素敏感性。

1.5 改善 IR, 增加胰岛素敏感性

IR 是指周围靶组织 (肌肉、肝脏、脂肪等) 对胰岛素作用的敏感性降低,致使机体出现摄取和利用葡萄糖效率降低的现象。IR 的发生先于非生理性血糖水平的升高,这是 T2DM 的主要临床症状^[33]。靶组织对胰岛素敏感性降低、胰岛素的产量下降和胰岛 β 细胞衰竭是 T2DM 的主要特征^[34]。葡萄糖的摄取依赖于葡萄糖转运蛋白, GLUT4 是脂肪细胞中主要的葡萄糖转运蛋白,脂肪细胞的 IR 主要是因为 GLUT4 的耗竭,而 APS 增加了脂

肪细胞中 GLUT4 的含量,从而对改善 3T3-L1 脂肪细胞中的胰岛素敏感性有一定的帮助作用。Liu 等^[35]研究表明, KKAY 小鼠出现持续性高血糖、葡萄糖耐量受损和 IR。与年龄匹配的 C57BL/6J 小鼠相比, KKAY 小鼠中胰岛素刺激的 AKT 磷酸化和 GLUT4 易位显著降低, APS 治疗后改善了 KKAY 小鼠高血糖、IR 和葡萄糖稳态并增加胰岛素敏感性,其机制可能与上调 GLUT4 有关。microRNA 属于长度为 20 ~ 24 个核苷酸的非编码 RNA 家族。单个 microRNA 可以协同调控涉及多种途径的多个基因的表达,因此可以通过发现疾病中 microRNA 表达的改变来解开基因调控^[36]。近年来研究发现, microRNA 在调节 IR、糖尿病及其心血管并发症中发挥重要作用^[37]。有研究表明, APS 可能通过上调或维持 microRNA-203a-3p 水平,降低葡萄糖调节蛋白 78 mRNA 和蛋白表达,降低 ERS 信号通路中 CHOP、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 12 的表达和 JNK1 蛋白磷酸化水平来减轻 IR^[38]。

1.6 减轻炎症反应

T2DM 是一种非特异性慢性低度炎症引起的疾病,通常表现为趋化因子、黏附分子、白细胞介素和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 等非特异性炎症因子水平升高。炎症反应是 T2DM 及其并发症发生发展的重要因素^[39]。这种慢性低度炎症状态起源于代谢细胞对过量营养的反应,通过增加外周组织 (主要是肝脏、肌肉和脂肪组织) 的 IR,并以胰岛为靶点,从而损害胰岛素分泌,促进 T2DM 的发展^[40]。Guo 等^[41]对糖尿病肾病大鼠血清中的炎症因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6) 和单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 的研究发现,与模型组相比较, APS 干预后这些炎症因子表达水平显著降低,这与他们体外研究的结果是一致的,说明 APS 能够减轻炎症反应,提高肾脏的功能,从而改善糖尿病肾病的情况。裴文丽^[42]用 APS 干预 T2DM 大鼠 4 周,结果显示,与模型组相比, APS 治疗后 IL-1 β 、IL-6 等炎症因子表达水平均显著下降。吴东等^[43]研究发现,用 APS 干预 T2DM 模型大鼠,然后用 ELISA 法检测血清中的 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 水平,结果表明与对照组相比,模型组大鼠血清中上述炎症因子显著升高, APS 干预组血清炎症因子显著降低。

2 APS 治疗 T2DM 及其并发症相关信号通路

2.1 PI3K/AKT 信号通路

T2DM 的特征是胰岛素分泌不足、IR 或这两种因素结合导致高血糖水平。胰岛素是一种在调

节血糖水平方面发挥着重要作用的激素,它可以降低胆固醇和血糖水平^[44]。在葡萄糖代谢过程中,胰岛素首先刺激胰岛素受体,然后激活 PI3K/AKT 信号通路,此通路是胰岛素信号传导的重要节点,能够调节血糖摄取,细胞代谢,细胞增殖、迁移和糖原合成,在调节 IR 和高血糖中起着重要作用^[45]。Ke 等^[46]用 TNF- α 、高糖和胰岛素处理 3T3-L1 脂肪细胞,建立了 IR 的细胞培养模型,用 APS 处理后,减轻了 TNF- α 诱导的 IR,其机制可能与 APS 激活 PI3K/AKT 信号通路,增加了胰岛素敏感性有关。内皮祖细胞是一种能够分化为血管内皮细胞的前体细胞,其数量以及功能紊乱在糖尿病血管并发症的发生发展中起到非常重要的作用^[47]。内皮型一氧化氮合酶(eNOS)作为促进内皮源性一氧化氮(NO)产生的关键酶,eNOS 表达上调能够促进 NO 的分泌,从而增加外周内皮祖细胞的数量,改善血管生成^[48]。徐寒松等^[49]用 APS 干预内皮祖细胞,结果显示 APS 能够显著增强内皮祖细胞 AKT 和 eNOS 磷酸化,而给予 PI3K 抑制剂 LY294002 后能够阻断 APS 增强的 AKT 和 eNOS 的磷酸化,这表明 APS 能够通过 PI3K/AKT/eNOS 信号通路促进内皮祖细胞增殖,改善糖尿病血管并发症。

2.2 转化生长因子 β (TGF- β) / 苏氨酸激酶受体 (Smads) 信号通路

人类 TGF- β 家族包括 TGF- β 、骨形态发生蛋白、生长分化因子、激活素、抑制素等。TGF- β 家族与 TGF β R II 结合后,TGF β R I 在特定的丝氨酸和苏氨酸残基上磷酸化,最终形成杂合物。受体复合物与下游效应物 Smads 蛋白反应,最终调节靶基因的转录^[50]。糖尿病肾病是 T2DM 微血管并发症,且超过 30% 的 T2DM 患者最终会患上终末期肾病^[51]。TGF- β /Smads 信号通路是诱导纤维化的经典信号通路之一,研究表明终末期肾病患者的 Smad2/3 含量明显高于健康人^[52]。当破坏肾小管上皮细胞的 Smad3 基因时,血管紧张素 II 诱导的基质形成会明显减少,这表明 TGF- β /Smads 信号通路参与了肾脏纤维化^[53]。Meng 等^[54]用链脲佐菌素建立了 T2DM 大鼠模型,结果显示,与模型组相比,APS 处理组大鼠 24 h 尿微量白蛋白水平、肌酐、血尿素氮等糖尿病患者肾功能指标显著降低。在蛋白免疫印迹实验结果中,与模型组相比,APS 处理后 TGF- β 1 和 Smad3 的表达显著降低。李承德等^[55]同样用链脲佐菌素构建 T2DM 大鼠模型,结果显示,与模

型组相比,APS 处理后糖尿病患者肾功能指标也显著降低,TGF- β 1、Smad2/3 蛋白表达水平显著降低。综上,APS 对糖尿病肾病大鼠的改善作用可能与抑制 TGF- β /Smads 信号通路有关。

2.3 神经调节蛋白 1 (NRG1) / 表皮生长因子受体 (ErbB) 信号通路

糖尿病心肌病是 T2DM 常见的并发症,是导致糖尿病患者死亡的主要原因之一^[56]。NRG1 是表皮生长因子家族的成员,NRG1 的受体是 ErbB 家族(包括 ErbB2、ErbB3 和 ErbB4),成人心脏中 NRG1 信号传导的主要受体是 ErbB2 和 ErbB4^[57]。NRG1 能够促进心肌细胞的存活,减少氧化应激,诱导心肌细胞增殖,并修复心脏损伤,NRG1/ErbB 信号通路在心血管系统的发育和心脏功能的维持中起着至关重要的作用^[58]。Chang 等^[59]用糖基化终产物修饰的牛血清白蛋白和葡萄糖处理 H9C2 细胞建立糖尿病心肌病模型,然后给予不同浓度的 APS 进行处理,结果表明 APS 改善了糖尿病心肌病模型 H9C2 细胞的增殖并降低了细胞凋亡,增加了细胞内超氧化物歧化酶(SOD)的活性,降低了 ROS、丙二醛(MDA)和 NO 水平,提示 APS 对糖尿病心肌病细胞有保护作用。然而在使用 ErbB 的抑制剂卡奈替尼后,部分消除了 APS 对糖尿病心肌病模型 H9C2 细胞的保护作用,这表示其机制可能与 NRG1/ErbB 通路有关。常晓等^[60]用链脲佐菌素构建 T2DM 大鼠模型,体内实验数据也表明 APS 对糖尿病心肌病大鼠心肌细胞具有保护作用,作用机制可能与激活 NRG1/ErbB 信号通路有关。

2.4 核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) / 血红素氧合酶 1 (HO-1) 信号通路

Nrf2 是 Cap'n'collar (CNC) -BZIP 转录因子家族的成员。Nrf2 包含六个高度保守的结构域,是调节细胞氧化应激反应的关键因素。在正常生理条件下,Nrf2 与 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 结合形成复合物。这些复合物由细胞质中的肌动蛋白锚定,处于低活性状态^[61]。在氧化应激或其他病理刺激下,Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 的半胱氨酸残基被修饰以诱导 Nrf2 的磷酸化,Nrf2 从复合物中释放并易位到核中,与核中的 Maf 蛋白和 Jun-bZip 转录因子形成异二聚体(Nrf2-Maf)。核中抗氧化反应元件的序列可以准确地识别此异二聚体,并与 Nrf2 的 Neh4 和 Neh5 结构域结合^[62]。然后,在 cAMP 反应元件结合蛋白、转录激活剂等帮助下,Nrf2 介导的转录过

程被启动,以调节下游基因的表达,激活一系列抗氧化酶和Ⅱ期抗氧化酶,如 HO-1、SOD、谷胱甘肽过氧化物酶,去除 ROS 和其他有害物质,促进抗氧化应激、抗炎、抗凋亡和其他细胞保护机制。HO-1 是一种由 Nrf2 调节的Ⅱ期抗氧化酶,是一种重要的诱导性应激反应蛋白,它将血红蛋白转化为一氧化碳(CO)、 Fe^{2+} 和胆绿素,并将以上产物还原为胆红素,从而发挥抗氧化、抗炎、抗凋亡和抗血栓作用^[63]。Nrf2/HO-1 信号通路在糖尿病诱导的血管内皮功能障碍中得到了广泛的研究,主要是在内皮细胞和巨噬细胞中。有研究显示,APS 的处理促进抗炎巨噬细胞表型 M2 巨噬细胞极化,来显著缓解内皮功能障碍,其机制可能与激活 Nrf2/HO-1 信号通路有关^[64]。另一项 APS 对糖尿病大鼠肝损伤的研究显示,与模型组相比,APS 处理后大鼠肝脏 MDA 水平显著降低,SOD 水平显著升高,表明 APS 抑制了由糖尿病引发的肝脏氧化应激反应,其机制可能与激活 Nrf2/HO-1 信号通路有关^[65]。

3 讨论

T2DM 发病率逐年上升,导致医疗成本增加、生活质量下降、死亡率上升,其发病机制复杂,主要与 IR、氧化应激、ERS、炎症等因素有关。目前临床常用来降糖的药物主要有磺酰脲类、双胍类、噻唑烷二酮类、非磺酰脲类胰岛素促泌剂等。因糖尿病患者需要长期服药,可能产生一定的不良反应,因此需要寻求一种毒副作用比较小的天然有效成分。APS 是黄芪重要的天然活性成分,对糖尿病的治疗具有良好的作用,根据国内外的报道,其作用机制主要涉及胰岛 β 细胞、糖原合成、氧化应激、ERS、IR、炎症等,涉及的通路有 PI3K/AKT、TGF- β /Smads、NRG1/ErbB、Nrf2/HO-1 等。寻找其他研究靶点可尝试与网络药理学分析和蛋白组学相结合,筛选相关性较强基因和信号通路。

但目前黄芪在糖尿病的临床应用仍然处于初始阶段,研究不够深入,多集中在机制方面,临床使用仍存在诸多问题,比如有效降低血糖时多大剂量的 APS 才能达到最佳的有效浓度,APS 制剂的安全性、稳定性等问题还不是十分清楚,还需要大量的临床试验进一步证实。

参考文献

[1] Sun H, Saeedi P, Karuranga S, et al. IDF diabetes atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence es-

timates for 2021 and projections for 2045 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2022, 183: 109119.

[2] Laakso M. Biomarkers for type 2 diabetes [J]. *Mol Metab*, 2019, 27 (Suppl): S139-S146.

[3] 谢鑫,段学清,朱晨,等. 中药基于肠道菌群干预 2 型糖尿病的研究进展 [J]. *贵州中医药大学学报*, 2022, 44 (5): 56-60.

[4] 江远玲,冯楠,邵欣宇,等. 黄芪的现代药理作用研究进展 [J]. *西南医科大学学报*, 2023, 46 (5): 456-460, 463.

[5] Zheng YJ, Ren WY, Zhang LN, et al. A review of the pharmacological action of astragalus polysaccharide [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 349.

[6] Almaca J, Molina J, Menegaz D, et al. Human beta cells produce and release serotonin to inhibit glucagon secretion from alpha cells [J]. *Cell Rep*, 2016, 17 (12): 3281-3291.

[7] Krenta NAJ, Gloyn AL. Insights into pancreatic islet cell dysfunction from type 2 diabetes mellitus genetics [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2020, 16 (4): 202-212.

[8] Bartolome A. The pancreatic beta cell: editorial [J]. *Bio-molecules*, 2023, 13 (3): 495.

[9] Hudish LI, Reusch JE, Sussel L. β cell dysfunction during progression of metabolic syndrome to type 2 diabetes [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129 (10): 4001-4008.

[10] 申娇,赵伟,李光美,等. 基于浊毒理论探讨化浊解毒法改善 2 型糖尿病胰岛 β 细胞的作用 [J]. *湖南中医杂志*, 2023, 39 (11): 104-107.

[11] Deng SF, Yang L, Ma K, et al. Astragalus polysaccharide improve the proliferation and insulin secretion of mouse pancreatic β cells induced by high glucose and palmitic acid partially through promoting miR-136-5p and miR-149-5p expression [J]. *Bioengineered*, 2021, 12 (2): 9872-9884.

[12] 唐思梦,杨泽民,陈伟强,等. 黄芪多糖保护胰岛 β 细胞改善大鼠 2 型糖尿病 [J]. *第二军医大学学报*, 2017, 38 (4): 482-487.

[13] Saha S. Association between the membrane transporter proteins and type 2 diabetes mellitus [J]. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2020, 13 (3): 287-297.

[14] Chen Y, Li Q, Zhao SW, et al. Berberine protects mice against type 2 diabetes by promoting PPAR γ -FGF21-GLUT2-regulated insulin sensitivity and glucose/lipid homeostasis [J]. *Biochem Pharmacol*, 2023, 218: 115928.

[15] Kou YB, Yan XQ, Jing QY, et al. Light (TNFSF14) inhibits glucose uptake of adipocytes by downregulating GLUT4 expression via AKT signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 583: 106-113.

[16] 孙汇,李娜,詹巾卓,等. 葡萄糖转运体 4 与 2 型糖尿病相互关系的研究进展 [J]. *北华大学学报 (自然科学版)*, 2012, 13 (2): 190-193.

[17] Luo MJ, Wang Y, Chen SY, et al. Astragalus polysaccharides alleviate type 2 diabetic rats by reversing the

- expressions of sweet taste receptors and genes related to glycolipid metabolism in liver [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 916603.
- [18] Zhang RX, Qin XZ, Zhang T, et al. Astragalus polysaccharide improves insulin sensitivity via AMPK activation in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Molecules*, 2018, 23 (10): 2711.
- [19] Ren XD, Dai Y, Shan MY, et al. Astragalus polysaccharide restores insulin secretion impaired by lipopolysaccharides through the protein kinase B/mammalian target of rapamycin/glucose transporter 2 pathway [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2023, 23 (1): 358.
- [20] Singh A, Kukreti R, Saso L, et al. Mechanistic insight into oxidative stress-triggered signaling pathways and type 2 diabetes [J]. *Molecules*, 2022, 27 (3): 950.
- [21] Masenga SK, Kabwel LS, Chakulya M, et al. Mechanisms of oxidative stress in metabolic syndrome [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (9): 7898.
- [22] Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications [J]. *Circ Res*, 2010, 107 (9): 1058-1070.
- [23] Ding XQ, Jian TY, Wu YX, et al. Ellagic acid ameliorates oxidative stress and insulin resistance in high glucose-treated HepG2 cells via miR-223/keap1-Nrf2 pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110: 85-94.
- [24] Tangvarasittichai S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus [J]. *World J Diabetes*, 2015, 6 (3): 456-480.
- [25] Afolayan AJ, Teng RJ, Eis A, et al. Inducible HSP70 regulates superoxide dismutase-2 and mitochondrial oxidative stress in the endothelial cells from developing lungs [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014, 306 (4): 351-360.
- [26] Ju J, Chen W, Lai Y, et al. Astragalus polysaccharides improve cardiomyopathy in STZ-induced diabetic mice and heterozygous (SOD2^{+/−}) knockout mice [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2017, 50 (8): e6204.
- [27] Chen W, Ju J, Yang YH, et al. Astragalus polysaccharides protect cardiac stem and progenitor cells by the inhibition of oxidative stress-mediated apoptosis in diabetic hearts [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 943-954.
- [28] Chen X, Cubillos RJR. Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment [J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21 (2): 71-88.
- [29] Lee JH, Lee J. Endoplasmic reticulum (ER) stress and its role in pancreatic β -cell dysfunction and senescence in type 2 diabetes [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (9): 4843.
- [30] Sun SQ, Yang S, An NN, et al. Astragalus polysaccharides inhibits cardiomyocyte apoptosis during diabetic cardiomyopathy via the endoplasmic reticulum stress pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 238: 111857.
- [31] 周海燕. 黄芪多糖对 2 型糖尿病大鼠胰岛内质网应激及 Bcl-2 和 Bax 表达影响的研究 [D]. 安徽: 安徽中医药大学, 2015.
- [32] 胡琛琛, 毕会民, 张叶敏, 等. 黄芪多糖对 2 型糖尿病大鼠肝脏 CHOP 表达的影响 [J]. *微循环学杂志*, 2010, 20 (1): 1-3, 12.
- [33] Lee SH, Park SY, Choi CS. Insulin resistance: from mechanisms to therapeutic strategies [J]. *Diabetes Metab J*, 2022, 46 (1): 15-37.
- [34] Marusic M, Paic M, Knobloch M, et al. NAFLD, Insulin resistance, and diabetes mellitus type 2 [J]. *Can J Gastroenterol Hepatol*, 2021, 2021: 6613827.
- [35] Liu M, Wu K, Mao XQ, et al. Astragalus polysaccharide improves insulin sensitivity in KKAY mice: regulation of PKB/GLUT4 signaling in skeletal muscle [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 127 (1): 32-37.
- [36] Chen L, Heikkinen L, Wang CL, et al. Trends in the development of miRNA bioinformatics tools [J]. *Brief Bioinform*, 2019, 20 (5): 1836-1852.
- [37] Perez CD, Chen J, Assa C, et al. MicroRNA-mediated control of myocardial infarction in diabetes [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2023, 33 (4): 195-201.
- [38] Wei ZT, Weng SY, Wang L, et al. Mechanism of astragalus polysaccharides in attenuating insulin resistance in Rats with type 2 diabetes mellitus via the regulation of liver microRNA-203a-3p [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17 (1): 1617-1624.
- [39] Yeung YT, Aziz F, Guerrero CA, et al. Signaling pathways in inflammation and anti-inflammatory therapies [J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24 (14): 1449-1484.
- [40] Kurylowicz A, Kozniowski K. Anti-inflammatory strategies targeting metaflammation in type 2 diabetes [J]. *Molecules*, 2020, 25 (9): 2224.
- [41] Guo MF, Gao JR, Jiang L, et al. Astragalus polysaccharide ameliorates renal inflammatory responses in a diabetic nephropathy by suppressing the TLR4/NF- κ B pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2023, 17: 2107-2118.
- [42] 裴文丽. 黄芪多糖对 2 型糖尿病大鼠血清 IL-1 β 、IL-6、IL-18 的影响作用 [J]. *中医临床研究*, 2016, 8 (2): 10-13.
- [43] 吴东, 张庆红, 何立群, 等. 黄芪多糖调控 PI3K/AKT 通路改善糖尿病大鼠肾损伤 [J]. *生物技术*, 2024, 7 (1): 1-7.
- [44] Aierken A, Li BL, Liu P, et al. Melatonin treatment improves human umbilical cord mesenchymal stem cell therapy in a mouse model of type II diabetes mellitus via the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13 (1): 164.
- [45] Chen SH, Liu XN, Peng Y. MicroRNA-351 eases insulin resistance and liver gluconeogenesis via the PI3K/AKT pathway by inhibiting FLOT2 in mice of gestational diabetes mellitus [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23 (9): 5895-5906.
- [46] Ke B, Ke X, Wan XS, et al. Astragalus polysaccharides attenuates TNF- α -induced insulin resistance via suppression of miR-721 and activation of PPAR- γ and PI3K/AKT in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9 (5): 2195-2206.

- [47] Benitez CJ, Ballesteros A, Beltran CL, et al. Endothelial progenitor cells as biomarkers of diabetes-related cardiovascular complications [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2023, 14 (1): 324.
- [48] Yao L, Liang XH, Liu YM, et al. Non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonist finerenone ameliorates mitochondrial dysfunction via PI3K/Akt/eNOS signaling pathway in diabetic tubulopathy [J]. *Redox Biol*, 2023, 68: 102946.
- [49] 徐寒松, 吴青, 谢晓云, 等. 黄芪多糖对 2 型糖尿病患者外周血内皮祖细胞 PI3K/Akt/eNOS 信号通路的影响 [A]/ 贵州省中西医结合内分泌代谢学会论文汇编 [C]. 贵州省中西医结合学会, 2012.
- [50] Zhang Q, Wang L, Wang SQ, et al. Signaling pathways and targeted therapy for myocardial infarction [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7 (1): 78.
- [51] Gao JJ, Gu ZY, Xu YX, et al. Peritoneal dialysis treatment of metformin-associated lactic acidosis in a diabetic nephropathy patient [J]. *Clin Nephrol*, 2016, 86 (11): 279-282.
- [52] Raina P, Sikka R, Kaur R, et al. Association of transforming growth factor beta-1 (TGF- β 1) genetic variation with type 2 diabetes and end stage renal disease in two large population samples from north india [J]. *Omics*, 2015, 19 (5): 306-317.
- [53] Geng XQ, Ma A, He JZ, et al. Ganoderic acid hinders renal fibrosis via suppressing the TGF- β /Smad and MAPK signaling pathways [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41 (5): 670-677.
- [54] Meng X, Wei MM, Wang D, et al. Astragalus polysaccharides protect renal function and affect the TGF- β /Smad signaling pathway in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *J Int Med Res*, 2020, 48 (5): 300060520903612.
- [55] 李承德, 王煜, 曲敬蓉, 等. 黄芪多糖对糖尿病大鼠肾脏 TGF- β 1/Smads 信号通路的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2018, 34 (4): 512-516.
- [56] Dillmann WH. Diabetic cardiomyopathy [J]. *Circ Res*, 2019, 124 (8): 1160-1162.
- [57] Li SC, Wang MD, Ma JC, et al. MOTS-c and exercise restore cardiac function by activating of NRG1-ErbB signaling in diabetic rats [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 812032.
- [58] Wang Y, Wei JL, Zhang P, et al. Neuregulin-1, a potential therapeutic target for cardiac repair [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 945206.
- [59] Chang X, Lu K, Wang L, et al. Astragalus polysaccharide protects diabetic cardiomyopathy by activating NRG1/ErbB pathway [J]. *Biosci Trends*, 2018, 12 (2): 149-156.
- [60] 常晓, 李惠林, 楚淑芳, 等. 黄芪多糖介导 NRG-1/ErbB 信号通路对糖尿病心肌细胞凋亡的作用 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2016, 22 (9): 1192-1195, 1218.
- [61] Zhang Q, Liu J, Duan HXY, et al. Activation of Nrf2/HO-1 signaling: an important molecular mechanism of herbal medicine in the treatment of atherosclerosis via the protection of vascular endothelial cells from oxidative stress [J]. *J Adv Res*, 2021, 34: 43-63.
- [62] Cui W, Leng B, Wang GP. Klotho protein inhibits H₂O₂-induced oxidative injury in endothelial cells via regulation of PI3K/AKT/Nrf2/HO-1 pathways [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2019, 97 (5): 370-376.
- [63] Zhao CH, Zhang Y, Liu HY, et al. Fortunellin protects against high fructose-induced diabetic heart injury in mice by suppressing inflammation and oxidative stress via AMPK/Nrf-2 pathway regulation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 490 (2): 552-559.
- [64] Sha WJ, Zhao B, Wei HZ, et al. Astragalus polysaccharide ameliorates vascular endothelial dysfunction by stimulating macrophage M2 polarization via potentiating Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2023, 112: 154667.
- [65] 曲敬蓉, 张艳艳, 宿宏佳, 等. 黄芪多糖激活 Nrf2/HO-1 信号通路改善模型大鼠糖尿病性肝损伤 [J]. *中国药理学通报*, 2020, 36 (10): 1422-1427.

(收稿日期: 2024-07-20; 修回日期: 2024-09-04)

微球载药系统在肿瘤治疗中的应用研究进展

舒金丫¹, 郝贵周², 杜丽平², 张丽², 张贵民^{2*} (1. 青岛大学, 山东 青岛 266071; 2. 山东新时代药业有限公司, 山东 临沂 273400)

摘要: 肿瘤是机体在致癌因素的作用下, 使局部组织细胞的生长无法正常调控、异常增生而形成的新生物, 是人类健康面临的重大威胁。在众多治疗方法中, 传统化疗药物治疗疗效高、应用广泛, 但存在毒副作用大、耐药性差等缺点。微球载药系统因更好的安全性和有效性而被广泛用于肿瘤的治疗。本文介绍了微球载药系统载体材料的分类情况及其在抗肿瘤领域的应用研究, 最后讨论了微球载药系统在未来肿瘤治疗领域面临的主要挑战, 并对其应用前景进行展望。

关键词: 肿瘤; 治疗手段; 微球载药系统; 载体材料

中图分类号: R730.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)04-1073-08
doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.030

Research progress in the application of microsphere drug delivery system in tumor therapy

SHU Jin-ya¹, HAO Gui-zhou², DU Li-ping², ZHANG Li², ZHANG Gui-min^{2*} (1. Qingdao University, Qingdao Shandong 266071; 2. Shandong New Times Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi Shandong 273400)

Abstract: Tumor is a new organism formed by abnormal proliferation of local tissue cells that cannot be regulated normally by carcinogenic factors. It is a serious threat to global people's health. Among the many therapeutic methods, traditional medicine has high curative effect and wide application, but with disadvantages such as obvious side effects and poor drug resistance. Microsphere drug delivery systems have been widely used in the treatment of tumors owing to their better safety and efficacy. This paper classified the carrier materials of microsphere drug delivery systems and their application in anti-tumor research. Finally, the main challenges faced by microsphere drug delivery systems in tumor treatment in the future were discussed, and their application prospected.

Key words: tumor; treatment method; microsphere drug delivery systems; carrier materials

据世界卫生组织国际癌症研究机构统计分析, 2012 年全球新发肿瘤病例达 1410 万例, 肿瘤相关死亡病例为 820 万例, 预计到 2025 年, 新发肿瘤病例将增至 1930 万例^[1]。因此, 研发各种肿瘤药物的新剂型及探索新的临床治疗策略是当前重要且迫切的任务。目前肿瘤的治疗主要包括传统的手术治疗、放射治疗、化学治疗和近年来发展迅速的新型治疗方式, 如基因疗法、靶向疗法、放射栓塞疗法、光动力疗法、新型给药系统等^[2]。传统化疗药物是肿瘤化疗的基石, 具有疗效高、应用广泛等特点, 在肿瘤的综合治疗以

及新辅助治疗中具有举足轻重的地位, 但因其影响正常细胞的生长增殖, 存在毒副作用大、耐药性差等缺点, 因此对传统抗肿瘤药物进行优化以增加靶向性, 降低毒性, 取得更好的疗效成为新的研究方向^[1]。

微球是一种微粒分散体系, 由药物与聚合物基质组成, 微球载药系统可以在体内达到一个月或几个月的缓释作用, 其释放速率主要由载体材料在体内的降解速率控制^[3], 可以实现药物的靶向递送, 并降低药物的毒副作用以减少不良反应^[4]。目前, 上市销售的微球类注射用缓释制剂,

基金项目: 山东省泰山产业领军人才项目 (No.TSCX202312103); 山东省重点研发计划 (重大科技创新工程) 项目 (No.2024CXGC010618)。

作者简介: 舒金丫, 女, 在读硕士研究生, 主要从事微球药物的研究与开发, email: 1685018036@qq.com *通信作者: 张贵民, 男, 研究员, 主要从事新药的研究与开发, email: lunanzhangguimin@163.com

如醋酸亮丙瑞林微球,可治疗乳腺癌、前列腺癌等;醋酸曲普瑞林微球,可治疗转移性前列腺癌;醋酸奥曲肽微球和注射用兰瑞肽微球,可治疗神经内分泌肿瘤、肢端肥大等;戈舍瑞林微球,可治疗前列腺癌;钇 90 (^{90}Y) 微球,可治疗肝癌等。

本文综述了微球载药系统载体材料的分类情况及其在抗肿瘤领域的应用研究,讨论了微球载药系统在未来肿瘤治疗领域面临的主要挑战,并对其应用前景进行展望,旨在推动该领域的发展与完善。

1 微球载药系统的载体材料

微球的载体材料分为三大类:天然高分子材料,如壳聚糖(CS)、海藻酸钠(SA)等;合成高分子材料,如聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)、聚乳酸(PLA)等;无机材料,如二氧化硅、磷酸钙、多孔材料等。

1.1 天然高分子材料

近年来,天然生物聚合物的药物递送技术因其在治疗肿瘤方面的潜在用途而备受关注,天然聚合物可以将高浓度的药物输送到所需位置,并提供可用于治疗肿瘤的药物延长释放,CS和海藻酸盐是最常用的延迟和靶向释放药物载体。

1.1.1 CS CS及其衍生物是一种生物活性分子,

具有无毒、生物可降解性、生物相容性等众多优点。CS是由葡萄糖分子组成的生物聚合物,如图1所示,其分子中的大量氢键可形成相互交错、相互衔接的链状结构,进而形成不规则的纤维素样片段,片段之间继续形成的可调节性多孔结构,使其具有较高的比表面积,有利于药物负载而实现较高的载药量,同时多孔结构可使药物得以缓慢释放,故CS是制备微球的一种理想载体^[5-6]。Zhang等^[7]利用CS包覆的介孔二氧化硅纳米粒子为核壳结构,制备了负载5-氟尿嘧啶(5-FU)的微球,其具有良好的球形度、高比表面积及pH响应性,体内研究表明,其药动学符合一级动力学模型,有望增强5-FU抗肿瘤的疗效。Lee等^[8]使用抗肿瘤药物阿霉素制备三苯基磷-乙二醇壳聚糖衍生物聚合物微球,能很好地导入细胞中,靶向线粒体,且对正常的细胞系无聚合物毒性,具有很大的应用潜力。Chandy等^[9]用CS包被溶解在丙酮-二氯甲烷混合物中的5-FU和PLA的乳液,制备成微球,扫描电子显微镜结果显示其具有更少的表面微孔,认为可能具有靶向递送5-FU以治疗脑肿瘤的潜力。上述研究为肿瘤治疗提供了一定的思路,但应用于临床治疗还需要深入研究。

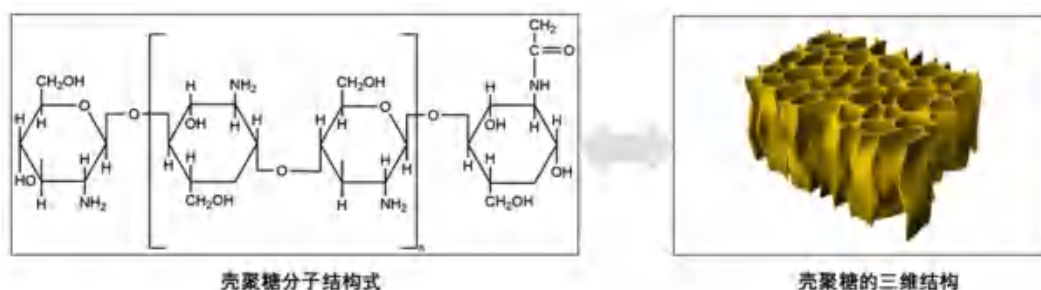


图1 壳聚糖的分子结构式和三维结构示意图^[5-6]

Fig 1 Molecular structure formula and three-dimensional structure diagram of chitosan^[5-6]

1.1.2 SA SA是一种从海带中提取的天然高分子材料,具有优良的生物相容性、无毒性、可生物降解能力和丰富的储存能力,并且其形成条件温和,能够有效避免活性物质失活,因此被广泛应用于生物材料和组织工程领域。Rashdan等^[10]合成了具有抗乳腺癌活性的1,3,4-噻二唑衍生物,封装于SA后其亲水性提高,在药物应用中更有效;Olukman等^[11]分别制备了负载5-FU的SA包被和未包被的甲基纤维素/CS微球,结果表明,用SA涂覆的微球提供了更可控的药物释放,适合于抗肿瘤药物的递送;Chen等^[12]成功制备了一种新型SA修饰丝素蛋白(SF)微球栓塞剂,研究表明SA修饰的SF微球可在3周内栓塞动脉,

可用作肝癌治疗的潜在可生物降解动脉栓塞剂。

1.2 合成高分子材料

1.2.1 PLGA/PLA PLGA/PLA是一种可以生物降解的合成高分子材料,具有良好的生物相容性,在体内PLGA会经过酯键水解反应,分解成乳酸和乙醇酸,乳酸经过三羧酸循环代谢生成 CO_2 和 H_2O ,乙醇酸则会通过尿液被直接排出体外,或者转化为丙酮酸,然后由线粒体处理进入三羧酸循环,最终以 CO_2 的形式从肺中排出;相比之下PLA经过酯键水解后的乳酸,可以被人体的新陈代谢转化为 H_2O 和 CO_2 ,从而排出体外(见图2)^[13-14]。PLGA/PLA还具有优异的成囊、成膜性,作为药物的控释载体材料,可以延长药物在体内

的作用时间、提高药物的生物利用度、显著改善治疗效果^[15]，因此被广泛应用于医疗领域。

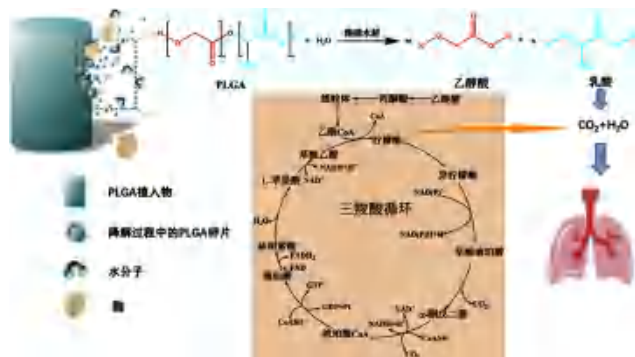


图 2 PLGA 体内降解示意图^[14]

Fig 2 Hydrolysis degradation process of PLGA implant in vivo^[14]

目前，PLGA/PLA 的可生物降解微球在抗癌药物递送领域已经取得了一些进展，Wang 等^[16]制备了负载青蒿素 B 的 PLGA 微球，研究表明该微球可以低爆发释放和稳定释放，具有优异的体内外抗肿瘤活性，显示出巨大的临床应用潜力。Li 等^[17]制备了负载瑞戈非尼的 PLGA 微球，研究表明该微球可为经动脉化疗栓塞术提高治疗效果，且与米铂单药治疗相比，可显著提高米铂的抗肿瘤疗效。Gautam 等^[18]将抗肿瘤药物吉非替尼偶联的聚乙二醇（PEG）钝化石墨烯量子点掺入 PLA 微球，可以清楚地观察到微球表面光滑且近乎球形，实验证实其具有抗肿瘤活性，可以实现抗肿瘤药物的靶向递送。

1.2.2 两亲性共聚物 两亲性共聚物是指将其亲水性区域和疏水性区域通过共价键连接而形成的胶束。共聚物的形态受外界环境如温度、pH 及溶剂组成等因素影响。温度越高，主链的溶解度越低，导致分子内构象转变、主链塌缩；溶剂 pH 的改变可能会影响共聚物间的络合方式及活性，进而影响共聚物的构象；溶剂组成引发的体积效应直接影响共聚物分子内和分子间相互作用力^[19]。共聚物可以包裹疏水性药物、保持药物稳定性及延长药物的保留时间，在抗肿瘤药物递送领域具有很大的应用潜力^[20]。Zhang 等^[21]使用两亲性大分子材料，将亲水性材料聚乙二醇单甲醚（mPEG）与疏水性 PLA 接枝，制备两嵌段两亲性共聚物 mPEG-PLA，然后以 mPEG-PLA 为载体，制备了三七皂苷微球，实验表明该聚合物微球具有良好的生物相容性和抗炎、抗肿瘤活性，因此该聚合物微球作为新型的药物递送载体具有潜在的应用价值，未来可作为抗肿瘤药物的稳定给药系统。如图 3 所示，Sabatelle 等^[22]使用亲水

性氨基聚酰胺糖与 PLA 自组装形成一种带正电荷的具有黏膜黏附性的聚集体结构，负载抗肿瘤药物紫杉醇（PTX），其能在体外迅速进入肿瘤细胞，且这种药物载体的黏膜黏附性能够精确应用于疾病部位，从而限制脱靶发病率，提高治疗效果，该研究对开发靶向药物系统以治疗食管等疑难疾病具有重大意义，也为新的治疗方式打开了大门。因此，两亲性共聚物在抗肿瘤药物的研发中具有一定的应用价值。

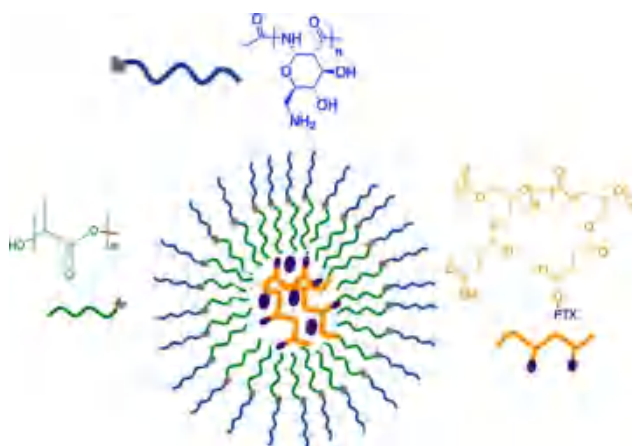


图 3 两亲性氨基聚酰胺糖和 PLA 嵌段共聚物负载 PTX^[22]

Fig 3 Amphiphilic aminopolyamide sugars and PLA block copolymers loaded with PTX^[22]

1.3 无机材料

在过去的几十年里，有学者研究了不同的方案来制备抗肿瘤缓释微球载药系统，其中就包括无机材料，例如碳纳米管、介孔二氧化硅^[23]、无机纳米粒子、含硒植骨材料^[24]等。Belbekhouche 等^[25]使用简单无机盐作为孔模板，胶体二氧化硅纳米颗粒作为构建块，制备了大孔介孔二氧化硅（LPMS）微球，又成功负载促凋亡的细胞表面核仁素（NCL）拮抗剂，制备的微球显示出孔径依赖性的抗肿瘤活性，其孔洞特性允许包封抗肿瘤药物并释放到肿瘤组织中，证实了 LPMS 微球作为药物载体在胰腺癌治疗中的多功能性，有望成为肿瘤治疗中药物递送载体的理想候选者。张弛等^[24]制备了缓释硒纳米微球，与磷酸钙骨水泥复合后制备成了自固化载硒纳米微球/磷酸钙骨修复系统，研究表明其可显著抑制人乳腺癌细胞及人骨肉瘤细胞的增生，为骨肿瘤的术后恢复和治疗提供了新思路。

目前，大多数抗肿瘤微球的体内和临床前研究都是用小鼠进行的，为了在未来进行更准确的疗效评价，有必要进行致癌物诱导的肿瘤临床研究。

2 基于微球载药系统的肿瘤治疗手段

微球是由药物和载体组成的一种优良的新型

给药系统。药物溶解、吸附或包裹于载体材料中,通过载体材料在体内的降解速率差异实现药物的缓慢释放,在较长时间内维持药物的有效浓度,从而达到药物长效缓释的效果^[26-27]。微球载药系统广泛应用于肿瘤治疗领域,调控抗肿瘤药物的释放,具有可持续作用于肿瘤部位和减轻化疗毒副作用等优势,且可以通过调整微球制剂参数,为肿瘤患者提供更多个性化的药物治疗方案^[28]。因此,已有众多肿瘤治疗方法涉及微球载药系统,例如化学治疗、放射栓塞治疗、免疫治疗、光热和光动力疗法等。

2.1 化学治疗

化学治疗是通过口服或注射化学抗肿瘤药物治疗肿瘤,然而传统的化学抗肿瘤药物在杀死肿瘤细胞的同时,对正常细胞也会有损伤,存在药物毒副作用大、耐药性及靶向性差等缺点。微球载药系统具有良好的生物相容性,可以根据聚合物、药物和环境条件实现药物可控且持续地释放、保证平稳的血药浓度、减少患者的给药频率、改善患者用药的依从性和便利性、增强药物效果以及降低药物的副作用和毒性。此外,微球载药系统可以通过提供物理屏障保护药物免受降解、氧化和酶的水解,提高药物的稳定性和生物利用度,延长制剂的保质期。目前已经上市的抗肿瘤微球药物包括促性腺激素释放激素受体激动剂(GnRHa)和生长抑素(SST)两大类,GnRHa类微球药品主要为注射用醋酸亮丙瑞林微球(Takeda Pharmaceutical Co Ltd)、注射用醋酸曲普瑞林微球(Ipsen Pharma Biotech)、注射用戈舍瑞林微球(山东绿叶制药有限公司),用于治疗子宫内膜异位症、子宫肌瘤、乳腺癌和前列腺癌等。SST类微球药品主要为注射用醋酸奥曲肽微球(Novartis Pharma AG)和注射用兰瑞肽微球(Ipsen Pharma Biotech),可用于治疗神经内分泌肿瘤等^[29-30]。上述微球产品通过聚合物载体的缓慢降解实现了药物的不同释放周期,其中注射用醋酸亮丙瑞林微球是基于PLGA/PLA为载体构建的可生物降解粒子,根据不同的药物剂量以及载体含量实现了1个月、3个月的长效释放^[31],可有效用于治疗前列腺癌、子宫内膜异位、性早熟等疾病。临床使用前将微球分散到特定的分散介质中,通过注射器注射至人体皮下或肌肉组织,药物在扩散和聚合物降解两种机制的共同作用下缓慢持续释放,可维持有效血药浓度、减少给药次数,而微球的骨架材料在体内可自动降解,最后被机体吸收,克服了常规亮丙瑞林制剂生物半衰期较短、体液中稳定性差、口服给药难以吸收、

服药后毒副作用大等缺点。

此外,Zhao等^[32]分别制备了包载5-FU、PTX、顺铂(CDDP)的洗脱壳聚糖微球,实验结果表明抗肿瘤药物洗脱壳聚糖微球在骨肉瘤的治疗中可以显著抑制骨肉瘤细胞的生长和迁移;谢川^[33]制备的厄洛替尼聚己二酸/对苯二甲酸丁二醇酯微球有效提高了肺癌治疗的靶向性及治疗效果。Lessmann等^[34]将抗肿瘤药物瑞喹莫特和阿西替尼通过连接体共价连接到水凝胶微球载体上,用于肿瘤治疗的局部缓释药物递送,可改善并提高疗效,减少全身不良反应。上述微球还处于研究阶段,尚未应用于临床,仍然需要进一步研究。

2.2 放射栓塞治疗

放射栓塞治疗是一种新型栓塞治疗方式,选择性地将载有放射性药物微球通过动脉或静脉插入的导管靶向递送至肿瘤细胞,精确断裂肿瘤细胞DNA,最小化对非靶向细胞的辐射暴露,同时阻断靶器官的供血和营养,使局部肿瘤细胞坏死而达到治疗效果^[35]。目前,已经开发出多种放射性核素标记的惰性微球,用于肝肿瘤的动脉内治疗。这些放射性核素标记的惰性微球可被精准栓塞至肝毛细血管中,通过肝动脉向原发性肝肿瘤(如肝细胞癌)或继发性肝肿瘤提供高剂量的局部辐射。研究表明,与全身药物治疗相比,这种治疗方法的效果显著提高(见图4),其肿瘤靶向性更高,副作用更少^[36-37]。

钬-166(¹⁶⁶Ho)是一种用于治疗恶性肿瘤的放射性核素。上市产品主要为Terumo公司研发的¹⁶⁶Ho放射性微球[聚左旋乳酸(PLLA)包载¹⁶⁶Ho],用于不可切除肝癌的放射栓塞治疗,作为第三种用于不可切除肝恶性肿瘤放射栓塞的微球,提供了精确的剂量及成像可能性,同时具有体内代谢残留量低、毒副作用小等优点^[38]。Zielhuis等^[39]研究了负载¹⁶⁶Ho的PLLA微球(¹⁶⁶Ho-PLLA-MS)的短期和长期化学毒性,研究显示¹⁶⁶Ho-PLLA-MS在大鼠肝脏中并未表现出任何毒性反应;植入14个月后,微球体经历了解体过程,几乎未检测到释放出的钬元素,且体内成像未观察到明显的伪影大小变化,这进一步证实了钬未被释放。另外体外研究表明在降解过程中,钬形成了乳酸钬,而在体内的研究中未观察到该降解产物引发的不良反应。即¹⁶⁶Ho-PLLA-MS不会引起任何毒性反应,可以安全地在体内应用。此外,Arranja等^[40]研究的放射性磷酸盐¹⁶⁶Ho微球(¹⁶⁶HoPO₄-MS)具有较高的¹⁶⁶Ho含量(52%),且在人血清中非常稳定(钬释放量小于0.1%),对于肝脏恶性肿瘤的肝癌选择性内放射治疗(SIRT)技术和实体瘤的瘤内治疗具有很好的应用前景。

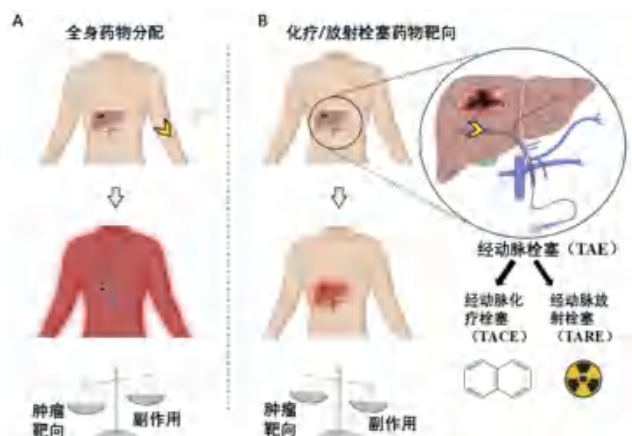


图 4 肝细胞癌的治疗显示出化疗/放射栓塞药物靶向 (B) 优于全身药物治疗 (A) 的优势^[37]

Fig 4 The treatment of hepatocellular carcinoma showing advantages of chemotherapeutic/radioembolic drug targeting (B) over systemic drug therapy (A)^[37]

放射性 ^{90}Y 微球通过微创介入栓塞手术将治疗剂量的 ^{90}Y 聚集在肿瘤部位, 发出高能量的 β 射线, 选择性地杀死肿瘤细胞, 成为抗肿瘤的新利器。我国自主研发的 ^{90}Y 微球注射液 (远大医药), 是一种新型的治疗肝癌用药品, 通过将放射性同位素 ^{90}Y 与树脂微球结合, 精准地定位到肿瘤组织, 并释放高能量的 β 射线, 有效杀灭肿瘤细胞的同时最大限度地减少对正常组织的损伤。目前国内用于治疗经过标准治疗后仍然失败, 不可以用手术直接切除的结直肠癌肝转移患者。其有望成为中晚期肝癌的一线治疗方法。总体而言, ^{90}Y 微球放射栓塞治疗对于中晚期肝癌患者来说是一种经济有效的治疗方式, 是国内肝脏肿瘤学方向的重要发现, 但其他载体基质的 ^{90}Y 微球如 ^{90}Y 玻璃微球、 ^{90}Y 碘化油微球、 ^{90}Y 炭微球、 Y_2O_3 和 YPO_4 陶瓷微球等仍处于基础研究阶段, 尚未发现更详细的临床研究和应用评价^[41]。

2.3 免疫治疗

免疫治疗通过激活人体的免疫系统, 抑制各种肿瘤的转移和复发, 包括溶瘤病毒疗法、癌症疫苗、细胞因子疗法、过继性免疫细胞疗法和免疫检查点抑制剂 (如图 5 所示), 克服了传统药物治疗方法较难治疗晚期或复发肿瘤的缺点, 成为治疗肿瘤的热点^[1]。目前市场上已有较多肿瘤特异性免疫治疗的药物获得批准, 如伊匹单抗 (Bristol-Myers Squibb Company)、帕姆单抗 (Merck Sharp & Dohme)、阿特珠单抗 (Roche Pharmaceutical Ltd)、地尼白介素 (Akiyama Jozai Co., Ltd.) 等, 在肿瘤治疗领域具有较好的疗效, 但如何保持药物的活性以及将药物递送到肿瘤组织中发挥其药效仍是当前需要解决的问题^[42]。基于微球载药系

统的免疫治疗是通过将免疫治疗药物与聚合物采用特殊技术制成可生物降解的微球, 该载药系统用于肿瘤疾病的免疫治疗, 可增强抗肿瘤药物在特定位置的分布、提高生物利用度及疗效, 减少不良反应。He 等^[43]开发了一种可注射水凝胶微球, 能够激发肿瘤浸润 T 淋巴细胞的活性以实现实体瘤的免疫治疗; 何家辰^[44]将浓度极高的维生素 E 封装于磷脂纳米颗粒中, 制备得到还原型冻干多西他赛脂质微球, 可以选择性地释放药物、抑制正常细胞的氧化应激、降低毒性及提高治疗效果, 为临床应用提供了参考。

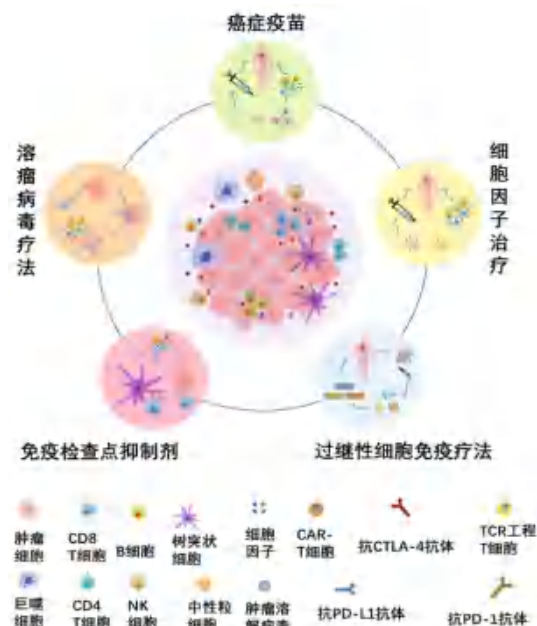


图 5 免疫疗法的主要类别^[45]

Fig 5 Main class of immunotherapy^[45]

目前在众多免疫疗法中, 疫苗具有安全性高、特异性强等优势, 可能是肿瘤免疫疗法的下一个突破口。Liu 等^[46]制备了水凝胶微球疫苗, 增强了免疫细胞-肿瘤驻留 I 型常规树突状细胞的应答反应、抑制了雄性小鼠体内胰腺癌细胞的转移生长, 提高了小鼠生存率。上述实验成果仍处于研究阶段, 尚未有产品上市, 但该研究方向可能是未来肿瘤免疫治疗的一个新兴趋势。

2.4 光热和光动力治疗

光热治疗是利用光热剂激光诱导的热能来达到肿瘤细胞的热消融, 在高温环境下可以杀死肿瘤细胞; 而光动力疗法是通过肿瘤细胞具有更高的代谢能力, 使无毒的光敏剂在病变部位积累, 光敏剂会因肿瘤组织被无害的可见光照射而激活, 从而将其能量转移到周围的基态氧分子, 形成活性氧 (ROS), 特异性损伤肿瘤细胞, 如图 6 所示^[47]。光动力疗法和光热疗法在肿瘤的治疗中

发挥了重要作用,近年来逐渐成为肿瘤治疗的主要手段之一,但目前尚未有基于微球载药系统的产品上市。

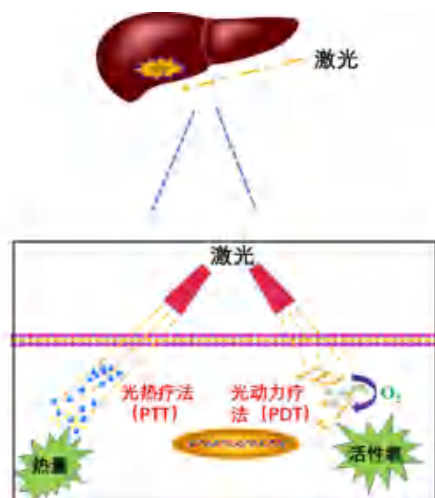


图 6 用于肝癌的光热疗法和光动力疗法^[47]

Fig 6 Photothermal and photodynamic therapy for hepatocellular carcinoma^[47]

光动力疗法的关键组成部分是通过光敏剂给药,但光热疗法不需要外源性光热造影剂就可提高治疗效率和疗效,目前光疗药物和相关设备的开发取得了很大的进步,但关键的问题(如光热材料缺少靶向性)尚未解决,限制了它们的临床应用^[48]。通过靶向或局部激活来改善光敏剂肿瘤特异性,可以提供更好的疗效和更少的不良反应。因此,科学家们设计微球载药系统来克服与光疗相关的问题,如 Ma 等^[49]在仿生金纳米棒-介孔二氧化硅核-壳纳米颗粒(Au-MSN NPs)中加入光敏剂卟啉(THPP),制备了 Au@MSN/THPP@CM NPs,将 NPs 与过氧化氢酶(CAT)一起载入到明胶甲基丙烯酰胺微凝胶基质中,形成微球,结果显示该微球具有显著的抗肿瘤作用,为增强光动力疗法提供了新方法,并为卵巢癌的治疗提供了新策略;张一弛等^[50]使用钆离子制备得到钆基水凝胶微球,可应用于光热抗肿瘤和骨修复中,但目前这些微球都没有应用于临床,只是初步研究。将光敏剂与光化学内化疗法结合已经成为一种很有前景的新策略,沈鑫^[51]使用 PLGA 微球负载光敏剂四苯氯二磺酸盐,可用于控制抗原递送的免疫学效应,表明抗原呈递细胞,主动转运疫苗微球到引流淋巴结的重要性,是一种治疗肿瘤的新策略,但该研究可能仅限于小鼠实验模型,对于在较大哺乳动物或人类中的效应,需要进一步研究。

2.5 微球在肿瘤治疗中的新方法和新思路

微球载药系统作为一种新剂型,其在肿瘤治疗中的应用研究进展层出不穷。近几年, Deng 等^[52]通过加载大麻素受体 1 (CB1) 激动剂花生

四烯酰 2'-氯乙酰胺(ACEA),并以光响应方式产生 ROS,制备了靶向 CB1 和 ROS 的电喷雾微球,以实现微球释放的 ACEA 和 ROS 的协同抗肿瘤作用,能在乳酸钠和紫外线照射的条件下瞬间解体,并伴随大量 ROS 的产生,直接损伤肿瘤细胞,小鼠实验证实了 ACEA 和微球的活性共同促进免疫原性肿瘤细胞死亡,展示了通过分子设计改善药物递送平台的抗肿瘤效果的良好前景。Yang 等^[53]提出了一种使用磁热疗(MHT)增强肿瘤免疫疗法的有效策略,其结合经导管动脉栓塞术可治疗肝细胞癌,利用微流控技术获得的均匀液态金属微球具有强大的涡热效应,诱导 MHT 增强免疫系统,促进免疫细胞浸润,并进一步刺激强大的免疫反应以抑制肿瘤的转移生长;且在原位兔肝癌实验中表明液态金属微球可以通过 MHT 来增强免疫治疗效果,展示了将 MHT 与经导管动脉栓塞术联合治疗大型原位肝癌的巨大前景。Luo 等^[54]使用两亲性嵌段共聚物 PEG-聚己内酯、光敏剂和干扰素活化蛋白(STING)激动剂构建了光免疫纳米颗粒,制备了具有免疫放大能力的可注射水凝胶微球,体内实验表明该微球可提高 STING 激动剂的肿瘤滞留及逆转肿瘤内免疫,同时抑制微环境,最终实现骨肉瘤的免疫放大和光免疫治疗。Xiong 等^[55]利用可吸入的纳米颗粒-微球系统,开发了一种创新的干粉吸入剂治疗肺癌方式,其具有尺寸可调节性、电荷可逆性、黏液渗透性、结构稳定性、优异的环境响应性和高生物相容性,体外和体内研究表明,该系统改善了肺部递送效率,增强了药物在肿瘤组织内的保留和有效渗透,是肺癌治疗方案中一种有前途的策略。目前这些载药微球都处于研究阶段,国内对这部分理论、实践研究仍然有限,相信在不久的将来,随着技术的进一步发展和研究的深入,抗肿瘤微球的应用前景会扩大,有望成为治疗肿瘤的新型药物。

3 总结与展望

肿瘤治疗由于化疗效果较差以及传统化疗药物存在耐药现象,在提高疗效方面存在诸多困难。微球载药系统不仅可以提高抗肿瘤药物治疗的靶向作用、控制药物释放、延长药物作用时间,从而提高药物在肿瘤部位的治疗效果,还可以减少患者的给药次数、减少不良反应、克服与传统化疗药物间存在的交叉耐药现象,在抗肿瘤制剂领域展现出潜在的应用前景。并且还可与肿瘤治疗方法联合使用,如化学治疗、免疫治疗、放射栓塞治疗、光热和光动力治疗等。虽然很多研究成果显示微球载药系统在肿瘤治疗中具有良好的应用前景,但也存在不足之处。

第一, 临床试验和实际应用中仍有很多未知因素, 目前大多数微球只是临床前研究, 未进行更深入的人体试验, 且临床应用较少。现有研究表明, 国内对这方面的研究相对不足, 对于其理论和实践部分还需要完善、加强, 因此如何将研究成果转化为实际产品并满足临床需求, 是一个重要挑战。

第二, 工艺生产问题, 尽管微球的制备方法不断优化, 但大规模生产仍然面临巨大挑战, 制备过程中药物的均匀分布、微球的形态、粒径及药物的稳定性等因素, 对生产工艺提出了更高的要求, 例如大批量生产中可能会出现粒径分布不均匀、形态不圆整、释放度不好、载药量有限等问题。

第三, 突释问题, 微球进入人体后, 会由于其形状、体内降解等问题造成药物的突释的现象, 如 PLGA 作为载体时会因 PLGA 的结构、吸水、水解以及扩散等因素影响而发生突释现象, 引发严重的不良反应。

第四, 蛋白或多肽类微球稳定性差导致生物利用度低的问题, 蛋白多肽类药物由于相对分子质量大、脂溶性差以及易受到体内外环境(如光照、氧浓度、释放介质的 pH 与温度、体内 pH 与蛋白水解酶等)的影响而发生氧化、水解等反应, 进而影响药物的生物利用度。

最后, 其安全性和有效性仍需进一步研究和验证, 如长期缓慢释放药物可能导致的毒性、免疫反应、体内的分布、代谢和排泄等问题。

虽然面临诸多挑战, 但是微球载药系统在肿瘤治疗中的应用前景还是非常广阔。未来, 我们需要进一步优化制备工艺, 提高药物的负载能力, 加强安全性和有效性的研究, 推动在肿瘤治疗中的广泛应用。

参考文献

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65 (2): 87-108.
- [2] Kaur R, Bhardwaj A, Gupta S. Cancer treatment therapies: traditional to modern approaches to combat cancers [J]. Mol Biol Rep, 2023, 50 (11): 9663-9676.
- [3] 邢树礼, 徐燕平, 高培民, 等. 硝酸咪康唑壳聚糖缓释凝胶的制备及释放度研究 [J]. 重庆医学, 2019, 48 (1): 117-119.
- [4] 阎观琼. 缓释微球的研究现状 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19 (93): 39.
- [5] Xia YD, Wang DX, Liu D, et al. Applications of chitosan and its derivatives in skin and soft tissue diseases [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2022, 10: 894667.
- [6] 刘敬肖, 曾森, 史非, 等. SiO₂ 气凝胶/壳聚糖复合药物载体材料的制备和表征 [J]. 功能材料, 2007, 38 (9): 1527-1530.
- [7] Zhang QQ, Wan T, Jin GC, et al. pH-responsive chi-

- tosan-mediated spherical mesoporous silica microspheres for high loading and controlled delivery of 5-fluorouracil [J]. Carbohydr Res, 2024, 543 (9): 109206.
- [8] Lee YH, Park HI, Chang WS, et al. Triphenylphosphonium-conjugated glycol chitosan microspheres for mitochondria-targeted drug delivery [J]. Int J Biol Macromol, 2021, 167 (2): 35-45.
- [9] Chandy T, Das GS, Rao GH. 5-fluorouracil-loaded chitosan coated polylactic acid microspheres as biodegradable drug carriers for cerebral tumours [J]. J Microencapsul, 2000, 17 (5): 625-638.
- [10] Rashdan HRM, Farag MM, El-Gendey MS, et al. Toward rational design of novel anti-cancer drugs based on targeting, solubility, and bioavailability exemplified by 1, 3, 4-thiadiazole derivatives synthesized under solvent-free conditions [J]. Molecules, 2019, 24 (13): 2371.
- [11] Olukman Şahin M, Şanlı O. In vitro 5-fluorouracil release properties investigation from pH sensitive sodium alginate coated and uncoated methyl cellulose/chitosan microspheres [J]. Int J Biol Macromol, 2024, 258 (Pt 1): 128895.
- [12] Chen GB, Wei RN, Huang X, et al. Synthesis and assessment of sodium alginate-modified silk fibroin microspheres as potential hepatic arterial embolization agent [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 155 (14): 1450-1459.
- [13] 韦宝伟, 刘布鸣. 聚乳酸乙醇酸的生物降解和安全性研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27 (4): 422-428.
- [14] Hu FF, Qi JP, Lu Y, et al. PLGA-based implants for sustained delivery of peptides/proteins: current status, challenge and perspectives [J]. Chin Chem Lett, 2023, 34 (11): 108250.
- [15] 吴俊. 壳聚糖包衣中空 PLGA 载药微球制备及抗癌研究 [D]. 武汉: 武汉理工大学, 2022.
- [16] Wang YQ, Huang WJ, Wang NN, et al. Development of artemisinin B sustained-release microspheres for anti-tumor therapy by integrated experimental and molecular modeling approaches [J]. J Pharm, 2021, 13 (8): 1236.
- [17] Li X, He GW, Su F, et al. Regorafenib-loaded poly (lactide-co-glycolide) microspheres designed to improve transarterial chemo-embolization therapy for hepatocellular carcinoma [J]. Asian J Pharm Sci, 2020, 15 (6): 739-751.
- [18] Gautam A, Pal K. Gefitinib conjugated PEG passivated graphene quantum dots incorporated PLA microspheres for targeted anticancer drug delivery [J]. Heliyon, 2022, 8 (12): e12512.
- [19] 贾舒涵. 两亲性接枝共聚物香精微胶囊的制备表征与应用 [D]. 上海: 上海应用技术大学, 2021.
- [20] 王锐, 王晓桐, 白皓天, 等. 高分子材料载体在天然抗肿瘤药物中的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52 (10): 3133-3141.
- [21] Zhang PH, Tang RM, Yang SL, et al. Preparation and in vitro release of mPEG-PLA microspheres of Panax notoginseng saponins [J]. Int J Biol Macromol, 2022, 217 (24): 922-930.
- [22] Sabatelle RC, Geller A, Li SY, et al. Synthesis of amphiphilic amino poly-amido-saccharide and poly (lactic) acid block copolymers and fabrication of paclitaxel-loaded mucoadhesive nanoparticles [J]. Bioconjugate Chem, 2024, 35 (9): 1429-1440.

- [23] 高颖. 介孔二氧化硅抗肿瘤微球的光热效应研究[D]. 上海: 上海应用技术大学, 2022.
- [24] 张驰, 吴海燕, 冉青, 等. 自固化载硒纳米微球/磷酸钙复合骨修复材料的制备及性能[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2019, 56(1): 125-134.
- [25] Belbekhouche S, Poostforooshan J, Shaban M, et al. Fabrication of large pore mesoporous silica microspheres by salt-assisted spray-drying method for enhanced antibacterial activity and pancreatic cancer treatment[J]. *Int J Pharm*, 2020, 590(18): 119930.
- [26] 刘冯晨, 赵佳雪, 张磊, 等. 缓释微球制备的研究进展[J]. 武警医学, 2024, 35(7): 639-642.
- [27] 吴迪, 郑琳. 载药微球栓塞治疗在肝癌全程管理中的临床应用进展[J]. 介入放射学杂志, 2024, 33(8): 921-927.
- [28] Floyd JA, Galperin A, Ratner BD. Drug encapsulated polymeric microspheres for intra-cranial tumor therapy: a review of the literature[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 91(11): 23-37.
- [29] 田亚, 曹洪庆, 赵德贞. 钇⁹⁰Y微球放射栓塞治疗在中晚期肝细胞癌中的临床应用[J]. 中国现代医药杂志, 2024, 26(1): 101-106.
- [30] 王毅州. 肝癌患者的新希望-钇 90 微球治疗[J]. 人人健康, 2024, 43(6): 78-79.
- [31] Okada H. One-and three-month release injectable microspheres of the LH-RH superagonist leuporelin acetate[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1997, 28(1): 43-70.
- [32] Zhao JB, Tian H, Shang FS, et al. Injectable, anti-cancer drug-eluted chitosan microspheres against osteosarcoma[J]. *J Funct Biomater*, 2022, 13(3): 91.
- [33] 谢川. PBAT 微球的制备及其载药应用研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2023.
- [34] Lessmann T, Jones SA, Voigt T, et al. Degradable hydrogel for sustained localized delivery of anti-tumor drugs[J]. *J Pharm Sci*, 2023, 112(11): 2843-2852.
- [35] St James S, Bednarz B, Benedict S, et al. Current status of radiopharmaceutical therapy[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2021, 109(4): 891-901.
- [36] d' Abadie P, Hesse M, Louppe A, et al. Microspheres used in liver radioembolization: from conception to clinical effects[J]. *Molecules*, 2021, 26(13): 3966.
- [37] Welling MM, Duszenko N, van Meerbeek MP, et al. Microspheres as a carrier system for therapeutic embolization procedures: achievements and advances[J]. *J Clin Med*, 2023, 12(3): 918.
- [38] Reinders MTM, Smits MLJ, van Roekel C, et al. Holmium-166 microsphere radioembolization of hepatic malignancies[J]. *Semin Nucl Med*, 2019, 49(3): 237-243.
- [39] Zielhuis SW, Nijssen JFW, Seppenwoolde JH, et al. Long-term toxicity of holmium-loaded poly(L-lactic acid) microspheres in rats[J]. *Biomaterials*, 2007, 28(31): 4591-4599.
- [40] Arranja AG, Hennink WE, Denkova AG, et al. Radioactive holmium phosphate microspheres for cancer treatment[J]. *In J Pharm*, 2018, 548(14): 73-81.
- [41] Hao YY, Liu JJ, Jia QW, et al. SN-38-Loaded PLGA microspheres injected intratumorally for cancer: preparation, characterization and evaluation[J]. *J Drug Delivery Sci Technol*, 2019, 53(5): 101178.
- [42] 邢续扬, 王孝春, 何伟. 肿瘤免疫治疗及其药物研发进展[J]. 中国药科大学学报, 2021, 52(1): 10-19.
- [43] He JC, Niu JJ, Wang L, et al. An injectable hydrogel microsphere-integrated training court to inspire tumor-infiltrating T lymphocyte potential[J]. *Biomaterials*, 2024, 306(3): 122475.
- [44] 何家辰. 激活肿瘤浸润性 T 细胞的可注射功能化微球用于肿瘤免疫治疗的研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2023.
- [45] Igarashi Y, Sasada T. Cancer vaccines: toward the next breakthrough in cancer immunotherapy[J]. *J Immunol Res*, 2020, 2020: 5825401.
- [46] Liu XY, Zhuang YP, Huang W, et al. Interventional hydrogel microsphere vaccine as an immune amplifier for activated antitumor immunity after ablation therapy[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 4106.
- [47] Fan Z, Zhuang CJ, Wang S, et al. Photodynamic and photothermal therapy of hepato-cellular carcinoma[J]. *Front Oncol*, 2021, 11(1): 787780.
- [48] Zhang YY, Zhang ZM. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications[J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17(8): 807-821.
- [49] Ma XD, Zhou WH, Zhang R, et al. Minimally invasive injection of biomimetic Nano @Microgel for in situ ovarian cancer treatment through enhanced photodynamic reactions and photothermal combined therapy[J]. *Mater Today Bio*, 2023, 20(3): 100663.
- [50] 张一弛, 祁成创, 黄泳糠, 等. 钆基水凝胶微球在光热抗肿瘤和骨修复中的应用研究[J]. 中国稀土学报, 2023, 41(1): 159-167.
- [51] 沈鑫. 新型自组装微球在癌症免疫疗法中的应用[D]. 重庆: 重庆大学, 2022.
- [52] Deng YM, Li JY, Tao R, et al. Molecular engineering of electrosprayed hydrogel microspheres to achieve synergistic anti-tumor chemo-immuno-therapy with ACEA cargo[J]. *Adv Sci*, 2024, 11(17): e2308051.
- [53] Yang NL, Sun XW, Zhou YK, et al. Liquid metal microspheres with an eddy-thermal effect for magnetic hyperthermia-enhanced cancer embolization-immunotherapy[J]. *Sci Bull*, 2023, 68(16): 1772-1783.
- [54] Luo HH, Chen JY, Gao T, et al. Immune amplifying hydrogel microspheres with STING activation improve tumor retention for photoimmunotherapy[J]. *Chem Eng J*, 2024, 496(14): 153346.
- [55] Xiong LS, Li XY, Lu XJ, et al. Inhaled multilevel size-tunable, charge-reversible and mucus-traversing composite microspheres as trojan horse: enhancing lung deposition and tumor penetration[J]. *Chin Chem Lett*, 2024, 35(9): 109384.

(收稿日期: 2024-07-18; 修回日期: 2024-09-26)

药食同源中药防治尿酸性肾病研究进展

闫思雅¹, 杜思邈², 杨凤岩¹, 王洋¹, 刘梦扬^{1*}, 王丹^{1*} (1.天津中医药大学 中医药研究院, 天津 301617; 2.天津达仁堂京万红药业有限公司, 天津 300112)

摘要: 尿酸性肾病是高尿酸血症导致尿酸盐结晶沉积于肾脏引发的肾脏病变, 也称为痛风性肾病。尿酸性肾病起病隐匿, 常被大家忽视, 出现延误治疗或治疗不当的情况。目前, 临床治疗药物主要通过降尿酸来改善尿酸性肾病, 但降尿酸药物肝肾毒副作用大, 不宜长期服用, 并且不能有效改善高尿酸引起的肾脏损伤。相比之下, 药食同源中药因其安全性、有效性以及良好的患者依从性, 更适宜作为长期用药来防治尿酸性肾病。本文查阅已报道的药食同源中药降尿酸相关文献, 筛选出可以降尿酸的 55 味中药; 同时, 以降尿酸和保护肾脏机制为基础, 对 12 味药食同源中药防治尿酸性肾病的机制进行论述, 旨在为药食同源中药改善尿酸性肾病提供新的理论依据和研发思路。

关键词: 药食同源中药; 尿酸性肾病; 活性成分; 作用机制

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)04-1081-08

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.031

Research progress in prevention and treatment of uric acid nephropathy with food homologous traditional Chinese medicine

YAN Si-ya¹, DU Si-miao², YANG Feng-yan¹, WANG Yang¹, LIU Meng-yang^{1*}, WANG Dan^{1*} (1. Chinese Medicine Research Institute, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617; 2. Tianjin Darrentang Jingwanhong Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300112)

Abstract: Uric acid nephropathy (UAN) is a renal disease caused by hyperuricemia, which results in the deposition of urate crystals in the kidneys and is also known as gouty nephropathy. UAN has an insidious onset, which is often overlooked and treatment delayed or inappropriate. At present, clinical treatment drugs mainly lower uric acid to improve UAN, but uric acid-lowering drugs have strong toxic effects on the liver and kidneys, should not be taken for a long period, and cannot effectively improve the kidney damage caused by high uric acid. In contrast, food homologous traditional Chinese medicine is more suitable for long-term use against UAN owing to their safety, efficacy, and good patient compliance. By reviewing the literature related to uric acid lowering, 55 food homologous traditional Chinese medicines were screen out; at the same time, the mechanism of UAN prevention and treatment by 12 food homologous traditional Chinese medicines was discussed, to provide a new theoretical basis for food homologous traditional Chinese medicine to improve the UAN.

Key words: food homologous traditional Chinese medicine; urinary acid nephropathy; active ingredient; action mechanism

随着生活质量逐步提升, 人们的日常饮食也逐渐向高糖分、高嘌呤的方向发展, 这一变化导致高尿酸血症 (hyperuricemia, HUA) 的患病率不断增加^[1-3], 尤其在发达国家与发展中国家的沿海地区,

目前, 我国大陆普通人群 HUA 患病率高达 17.4%^[4]。我国 HUA 患病人数已达 1.9 亿^[5], 其中痛风患者从 586.4 万人增至 1616.1 万人, 增长了 175.6%^[6]。由于 HUA 是慢性肾脏病 (CKD) 的独立危险因素, 因此

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 82304870); 天津市大学生创新创业训练项目 (No. 202410063027)。

作者简介: 闫思雅, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药治疗代谢性疾病作用及机制研究, email: yansiya2021@163.com *通信作者: 王丹, 女, 助理研究员, 主要从事中药治疗代谢性疾病作用及机制研究, email: wangdan0048@tjutc.edu.cn; 刘梦扬, 男, 副研究员, 主要从事中药治疗代谢性疾病作用及机制研究, email: liumengyang0212@tjutc.edu.cn

罹患尿酸性肾病 (uric acid nephropathy, UAN) 的风险显著增加^[7]。UAN 起病隐匿且早期症状不明显, 多数患者发现时已发展至中晚期。若病情久治不愈, 最终会导致肾衰竭等终末期肾病^[8]。目前, UAN 的临床治疗药物主要通过降低尿酸水平来改善疾病, 但降尿酸药物肝肾毒副作用强, 不宜长期服用, 并且不能有效改善高尿酸引起的肾脏损伤。如高剂量别嘌呤醇会引起超敏综合征^[9]以及部分人群对别嘌呤醇不耐受^[10], 非布司他具有较高的诱发心血管疾病风险^[11-12], 苯溴马隆会引起严重的肝损伤、低血压和肾功能损害等。因此, 迫切需要寻找适合患者长期服用且安全性高的抗 UAN 药物。

近年来, 中医药在治疗 UAN 方面取得了较大进展, 特别是在降低尿酸水平、减少尿蛋白、保护肾功能等方面具有独特的优势。药食同源中药以其低毒性、低刺激性以及良好的患者依从性, 成为调节机体尿酸水平的理想长期用药选择, 具有较大的开发潜力。药食同源中药富含多酚、皂苷、黄酮等多种生物活性成分, 可通过多靶点、多层次发挥调节机体的尿酸代谢、抗氧化应激、抗炎及保护肾小管等作用。更重要的是, 药食同源中药的应用, 体现了中医“治未病”的预防保健思想, 强调个体差异, 注重整体调理。相较于西医药物的标准化治疗, 中医药可根据患者体质、病情发展阶段的不同, 量身定制个性化的诊疗方案, 避免了一刀切的弊端, 有助于提高治疗效果的同时减少不良反应的发生。菊苣、茯苓、姜黄、葛根、甘草、木瓜、菊花、山药、槐米、枸杞子等是目前研究较多的具有降尿酸作用的药食两用中药^[13-15]。针对药食同源中药治疗 UAN 的研究还缺少系统的归纳和总结, 故基于降尿酸与保护肾脏机制, 本文将具有降尿酸作用的药食同源中药以及其中的活性成分进行总结, 同时对研究较多的抗 UAN 药食同源中药进行综述, 为今后开发保健食品和药食同源类药物治疗 UAN 提供理论基础。

1 UAN 概述

UAN 是由于血尿酸 (SUA) 产生过多或排泄减少形成 HUA 所致的肾损伤。中医理论认为“湿浊淤滞”是 UAN 的主要病因, 西医所说 HUA 也与这种病因有相似之处。尿酸盐沉积于肾脏引发肾脏病变, 同时引起炎症反应, 最终导致肾纤维化。UAN 患者 SUA 升高的原因主要有两个, 分别是嘌呤合成增加和肾脏、肠道的尿酸排泄不足。不良的饮食习惯和嘌呤代谢酶的紊乱也会加剧 UAN 的发生。

1.1 影响肝脏中嘌呤合成的因素

嘌呤代谢主要包括两条路径: 合成代谢与分解代谢。前者涉及嘌呤核苷酸的从头合成与补救途径, 后者则侧重于嘌呤碱基的降解。从头合成途径是嘌呤核苷酸通过复杂的步骤从简单的前

体合成而来, 涉及多种酶的协同作用, 其中包括磷酸核糖焦磷酸合成酶 (PRPP)、腺苷酸脱氨酶 (ADA) 等。补救途径是已有的嘌呤碱基可通过两种主要的酶——次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HGPRT) 和 ADA, 实现嘌呤核苷酸的回收利用。分解代谢是嘌呤核苷酸降解为嘌呤碱基后, 通过一系列酶促反应最终转化为尿酸, 此过程中最关键的是次黄嘌呤氧化酶 (XOD) 的活性, 它是尿酸生成的主要限速酶。尿酸是嘌呤代谢的终产物, 嘌呤代谢的调控机制中, XOD 和 ADA 协同催化尿酸生成, XOD 广泛存在于哺乳动物肝脏和肠道组织中, 催化次黄嘌呤至黄嘌呤的氧化过程, 进而促进尿酸的形成。ADA 则特异性催化腺苷脱氨生成肌苷, 参与嘌呤代谢的另一环节。ADA 和次黄嘌呤核苷磷酸转移酶 (HPRT) 这两个酶参与补救途径, 它们维持核酸代谢平衡。HPRT 缺乏会导致 Lesch-Nyhan 综合征, 这是一种罕见遗传病, 表现为严重的 HUA。磷酸核糖焦磷酸合成酶 1 (PRPS1) 调节嘌呤和嘧啶的合成, 其过度活跃可导致过量的嘌呤合成和尿酸积聚。当上述酶活性异常时, 无论是过高还是过低, 都会打破嘌呤代谢的平衡, 导致体内尿酸水平升高, 超出肾脏排泄负荷, 进而引起 HUA。嘌呤代谢酶的紊乱严重影响着尿酸代谢, 导致 HUA 及相关并发症。了解这些酶的作用机制和调控方式, 对于开发更有效的治疗策略至关重要。鉴于此, 抑制 XOD 与 ADA 活性, 已成为调控尿酸水平、预防 UAN 的有效策略^[16]。

1.2 影响肾脏、肠道的尿酸排泄不足因素

肝脏是尿酸盐的主要产生器官, 小肠分泌较少。其排泄机制涉及肠道与肾脏, 约 30% 通过肠道分泌物并经由肠道微生物群的代谢降解, 而剩余 70% 的尿酸则通过肾脏排泄, 经尿液排出体外^[17]。尿酸的排泄是维持体内尿酸平衡的关键过程, 主要依赖于肾脏的功能。肾脏通过过滤、重吸收和分泌三个连续的过程, 调节尿酸的排泄量, 从而保持血液中尿酸水平的相对稳定。① 肾小球滤过: 血液中的尿酸首先通过肾小球滤过屏障, 进入原尿, 这个过程几乎不受血液中尿酸浓度的影响, 而是取决于肾小球滤过的总量。② 近曲小管重吸收: 经过肾小球滤过的尿酸, 60% ~ 70% 会被近曲小管细胞重吸收回血液, 这个过程主要是被动扩散和主动运输的组合, 主要的重吸收载体是位于近端肾小管上的尿酸盐转运蛋白 1 (URAT1), 它通过与有机阴离子交换的方式摄取尿酸。③ 再分泌: 尽管大多数尿酸在近曲小管被重吸收, 但仍有一部分尿酸在通过近端肾小管时被再次分泌出来, 这部分占原尿中尿酸的 40% ~ 50%, 是通过另一个不同的载体蛋白质——ATP 结合盒蛋白 G 超家族成员 2 (ABCG2) 完成的。

④ 远端小管和集合管的排泄：到达远端肾小管和集合管的尿酸继续受到调控。在这个阶段，尿酸的排泄增加，主要是通过有机阴离子转运体（OATs）家

族的蛋白质的帮助,特别是 OAT1 和 OAT4^[18]。

综上所述,嘌呤的代谢及UAN的发病机制总结见图1。

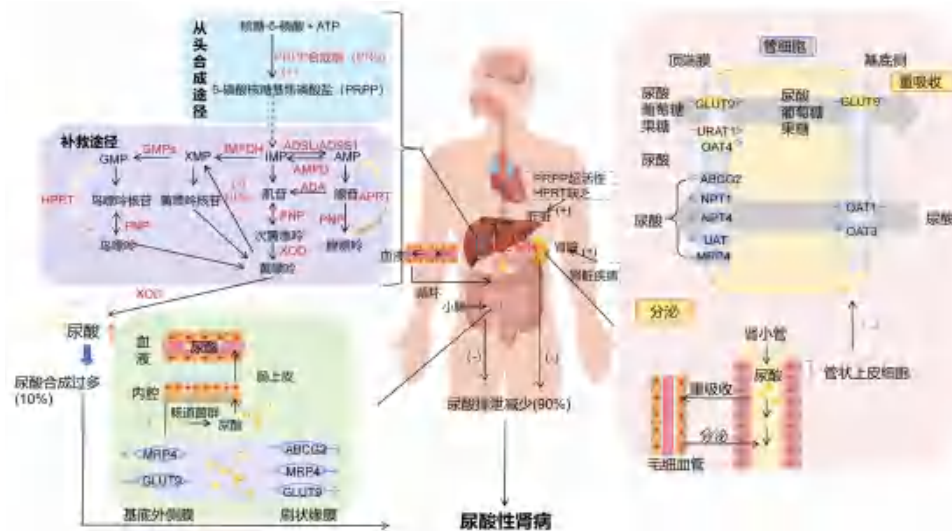


图1 嘌呤的产生和代谢以及尿酸性肾病的发病机制

Fig 1 Purine production and metabolism, and pathogenesis of UAN

注: GMP (鸟苷酸, guanosine monophosphate); GMPs (鸟苷酸合成酶, guanylate synthase); XMP (黄嘌呤核苷酸, xanthine nucleotide); IMPDH (次黄嘌呤核苷酸脱氢酶, hypoxanthine nucleotide dehydrogenase); IMP (次黄嘌呤核苷酸, hypoxanthine nucleotide); ADSL (腺苷琥珀酸裂解酶, adenosine succinate lyase); ADSS1 (腺苷琥珀酸合成酶, adenosine succinate synthase); AMP (腺嘌呤核苷酸, adenosine nucleotides); AMPD (腺苷单磷酸脱氨酶, adenosine monophosphate deaminase); APRT (腺苷磷酸核糖转移酶, adenosine phosphoribosyltransferase); PNP (嘌呤核苷磷酸化酶, purine nucleoside phosphorylase); MRP4 (多药耐药蛋白 4, multidrug resistance protein 4); GLUT9 (葡萄糖转运蛋白 9, Glucose transporter 9); NPT1 (钠依赖性磷酸转运蛋白 1, Sodium dependent phosphate transporter 1); UAT (尿酸转运蛋白, uric acid transporter protein); MRP4 (多药耐药蛋白 4, multidrug resistance protein 4)。

2 药食同源中药降尿酸的研究现状

通过不断地修订和完善，国家卫健委目前已将 106 种药品列入“按照传统既是食品又是药品的物品名单”。其中不乏补脾益肾，清热利湿的药物，如菊苣、茯苓、木瓜、栀子、紫苏、槐米等。这些药物的应用，为药食同源治疗 UAN 等疾病提供了更多的选择和可能性。

2.1 药食同源中药降尿酸相关研究文献筛选

本文选取了“中国知网”“万方数据”和“维普资讯”等中文权威数据库以及“Web of Science”“Science Direct”“Springer Link”和“Wiley Online Library”等外文数据库为数据统计源,对 106 种药食同源中药进行文献检索。在中文数据库中以“药物名称-尿酸”为关键词,例如“菊苣-尿酸”,逐一进行筛选,结果表明,有 55 种药食同源中药具有降尿酸的作用,如表 1 所示。此外,在外文数据库中使用“药物拉丁学名-uric acid”为关键词,如“*Cichorirum intybus* L.-uric acid”,进行精确查找,发现仅有少数外文文献与药食同源中药降尿酸研究直接相关。

3 防治UAN的药食同源中药研究

目前,对药食同源中药治疗UAN的研究仍缺乏系统性的研究,故本文以影响嘌呤合成增加和

影响肾脏、肠道的尿酸排泄不足因素为基础,选取表 1 中文献报道 ≥ 15 篇的 13 味药食同源中药探讨其抗 UAN 的作用及相关药理机制。

3.1 影响嘌呤合成增加的抗UAN的药食同源中药

3.1.1 菊苣 菊苣为菊科植物,具有清肝利胆、利尿消肿功效,广泛用于炎性疾病,特别是对于湿热型黄疸和尿液减少引起的水肿有显著疗效^[19]。毛菊苣中含有大量有效组分,如黄酮类、多糖类、萜类和酚酸类等^[20]。UAN在中医理论体系被视为“湿邪”和“浊滞”范畴,一般通过健脾化湿泄浊来治疗,而菊苣是一种常见的健脾祛湿药,能够被用于治疗UAN^[21]。首先,菊苣可通过调节肠道中ABCG2的表达,维持肠黏膜屏障完整性^[22],从而促进肠道尿酸的分泌;其次,通过提升肾脏OAT1、OAT3水平,抑制GLUT9和URAT1的表达,促进肾脏尿酸的排泄。研究发现菊苣酸具有促进尿酸排泄、降低尿酸在体内储存的功能^[23]。菊苣可通过抑制XOD、嘌呤核苷磷酸化酶,从而抑制尿酸的合成。菊苣具备减缓肾脏中脂多糖(LPS)和TLR4/NF-κB炎症通路的活性,进而减轻LPS/TLR4轴所引发的炎症应答,改善UAN的炎症反应^[23]。除此之外,还有研究发现菊苣提取物能阻碍肠道对嘌呤的摄取,进而下调嘌呤

表 1 药食同源中药降尿酸相关研究文献数量
Tab 1 Number of literature reports on food homologs traditional Chinese medicine and medicine in reducing uric acid levels

中药名	文献数		中药名	文献数		中药名	文献数	
	中文	英文		中文	英文		中文	英文
菊苣	100	10	肉桂	5	4	夏枯草	1	2
茯苓	68	4	薏苡仁	8	1	山柰	2	0
姜黄	39	19	天麻	8	0	赤小豆	1	1
葛根	54	0	灵芝	5	3	桃仁	1	1
甘草	44	8	金银花	5	3	肉豆蔻	1	1
木瓜	33	3	荷叶	7	1	橘皮	1	1
菊花	30	5	山楂	7	0	杏仁	1	1
山药	16	15	党参	6	1	玫瑰花	1	1
桑叶	13	7	黄精	4	2	砂仁	0	2
枸杞子	10	7	蒲公英	5	1	杜仲叶	1	0
紫苏	15	0	蜂蜜	4	2	槐花	1	0
槐米	14	1	西红花	2	4	沙棘	1	0
黄芪	11	4	铁皮石斛	2	3	胖大海	1	0
栀子	9	4	马齿苋	3	2	桑葚	0	1
当归	10	2	决明子	4	0	桔梗	1	0
百合	12	0	白芷	4	0	松花粉	1	0
人参	5	7	枳椇子	4	0	鲜芦根	1	0
姜	4	6	余甘子	3	0			
高良姜	9	0	牡蛎	2	1			

代谢酶，最终实现降低尿酸水平的效果^[24]。

3.1.2 姜黄 姜黄能破血行气宽中、活血化瘀止痛，临床上常用于治疗中风、胸痹、心痛、风湿肩臂疼痛及跌打损伤等症^[25]。姜黄的有效成分主要有姜黄素和挥发油类等，具有抗氧化、抗炎和调控细胞凋亡等药理作用。炎性细胞浸润和炎症因子的累积会破坏肾小球滤过膜，影响肾小管重吸收和排泄功能，而姜黄素具有显著抗炎活性^[26-28]，能够减轻肾脏炎症反应和纤维化，起到保护肾脏的作用^[29]。并且有研究表明，每日服用姜黄水提取物能降低肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和 C-反应蛋白 (CRP) 等促炎细胞因子的表达^[30-31]，以此来减轻炎症反应。Ao 等^[32]建立 HUA 小鼠模型，给予姜黄醇提取物，结果表明相比于 HUA 组，给予姜黄醇提取物的小鼠 SUA 和 XOD 活性均显著降低，尿液尿酸 (UUA) 明显升高；并且从姜黄中分离能够得到 3 种抑制 XOD 活性的成分，即姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素，其中姜黄素可通过下调 URAT1 和抑制 XOD 的活性，来促进尿酸分泌和抑制尿酸合成，发挥抗 UAN 的作用。

3.1.3 葛根 葛根具有生津止渴和固阳止泻的功效^[33]，主要含有黄酮、三萜、香豆素、皂苷等类成分。葛根主要通过调控核因子 (NF) - κ B 展现出特有的抗炎特性^[34]。葛根叶提取物及其主要成分刺槐苷通过调节 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK)、TANK 结

合激酶 1 (TBK1) 的激活，抑制 LPS 诱导的环氧合酶-2 (COX-2)、肿瘤坏死因子 (TNF) - α 和白细胞介素 (IL-6) 的产生^[35]。实验显示，葛根能有效地减轻大鼠痛风关节肿胀，同时具有降低尿酸和保护肾脏的功能^[36]。研究发现，给予 HUA 大鼠葛根提取物，其 SUA 水平和血清 XOD 活性明显降低^[37]。有研究指出，HUA 大鼠常伴有血脂异常，葛根醇提取物有助于改善血脂的相关指标^[38]。

3.1.4 甘草 甘草具有缓急止痛、补气养中之功^[39]。HUA 的病机之一是脾胃亏虚引起的运化失调，水湿内蕴致使湿邪痹证，而甘草因其补益脾胃的特性而被广泛应用于诸如甘草泻心汤、甘草附子汤等方剂中，可作为抗 UAN 的药物。芍药甘草汤可显著降低 HUA 患者的 SUA，同时有助于恢复自主神经系统的平衡，特别适合于治疗 HUA 的虚证患者。甘草中的黄酮化合物具备降低急性 HUA 小鼠 SUA 的效果，这一效果得益于甘草素对肾脏中的 URAT1 表达的下调作用，减少了尿酸在肾脏的重吸收^[40]。甘草多糖可通过抑制 XOD 在 HUA 模型肝脏中的表达，从而减轻 HUA 所致的肝、肾损伤，对于预防和治疗 UAN 具有积极作用。甘草水或茶可单独或与菊花、薄荷等草本植物组合，既美味又有益健康。

3.1.5 桑叶 桑叶具有疏散风热、清肺润燥、清肝明目之功效，用于肺热燥咳^[20]，其有效成分主要有黄酮类、生物碱类、酚类、甾醇类、多糖类和挥发油等。桑叶中的黄酮类成分具有抑制尿酸代谢中 XOD 的作用，还能够调节糖脂代谢异常和减轻炎症^[41-42]。王珂等^[43]建立 HUA 和肾损伤模型，发现给予桑叶总黄酮的各剂量组大鼠 SUA、肝脏 XOD 均显著下降。而且值得注意的是，与 HUA 组相比，桑叶总黄酮处理的组别显示出肾脏指数的明显降低，同时血清尿酸氮 (SUN)、肌酐 (Cr) 和丙二醛 (MDA) 水平均显著下降^[44]，这证实了桑叶在控制尿酸与缓解肾损伤方面的潜在益处。

3.1.6 紫苏 紫苏具有解表散寒、行气和胃的功效^[45]，主要含有挥发油类、黄酮类、酚酸类等成分^[46]。紫苏中的黄酮类化合物具有抗氧化能力，能够抑制氧化应激反应，减少尿酸代谢过程中产生的自由基，保护肾脏组织不受损伤。紫苏油中含有的 α -亚麻酸等不饱和脂肪酸，有助于降低血脂，间接减轻肾脏负担，改善肾功能。紫苏挥发油的成分具有消炎止痛效果，对于因尿酸过高引发的关节疼痛有一定的缓解作用。王亚楠等^[47]研究揭示，紫苏提取物在体外对 XO 具有浓度依赖性的抑制效果。而张蕾等^[48]的实验则表明，紫苏在 HUA 小鼠模型中，有降低尿酸、Cr 和尿素的效果，尤其是高剂量组，对肾小管的保护作用接近正常对照组。

3.1.7 槐米 槐米含有皂苷类、黄酮类、甾醇类等成分。药理研究表明槐米能显著增强毛细血管稳定性和弹性,降低血管通透性,有助于降低血脂和防止动脉硬化^[49]。有研究表明,通过碱溶解酸沉淀法提取的槐米提取物具有体外 XO 抑制作用,该槐米提取物的主要成分槲皮素为其中活性最高的成分^[50]。以上结果表明槐米具有抗 UAN 的潜力。

3.2 影响肾脏、肠道尿酸排泄不足的抗 UAN 的药食同源中药

3.2.1 茯苓 茯苓主要活性成分有多糖类、萜类、甾体类、脂肪酸等,能够抗炎和利尿^[51]。中医临床上茯苓属于利尿类中药,多应用于肾气不足、水湿内停者,如茯苓散^[52]、五苓散^[53]等,可作为治疗 UAN 的药物。经肾脏排泄的尿酸约占总量的 70%,而茯苓归肾经,又有渗湿利水之效,能助尿酸等湿邪外排。前期研究发现,茯苓提取物能显著提高肾组织中 ABCG2 的水平,阻止 UAN 的发生^[54]。茯苓多糖作为茯苓的主要活性成分之一,它可通过增加大鼠肾组织中 OAT1 的表达以及降低 URAT1 的表达,抑制尿酸的重吸收,加快尿酸的排泄,使得尿酸在体内的含量减少,从而发挥治疗 UAN 的作用^[55]。除此之外,茯苓还能够通过抑制 XOD 的活性,提高机体的抗氧化水平以及降低尿酸和保护肾脏,证明茯苓不仅能抑制尿酸的再吸收,还可抑制尿酸的合成,对于发挥抗 UAN 有着至关重要的作用。此外,茯苓还具有抗炎作用,可通过抑制 TLR4/MyD88 信号传导和炎性小体(NLRP3)的激活来减少白细胞介素-1 β (IL-1 β)的产生^[53],降低机体炎症水平。

3.2.2 木瓜 木瓜具有和胃化湿、舒筋活络的效用^[56]。《本草纲目》^[57]中记载“主治湿痹邪气,霍乱大吐下……”。木瓜含有多酚类、有机酸、三萜类、黄酮类等化学成分,具有抗氧化、抗炎、保护肝脏和修复肠损伤等多种药理作用^[58]。木瓜属于祛风湿强筋骨药,能助机体运化湿邪浊痹,降低小鼠肾脏中 URAT1 和 OAT4 的表达,升高肾脏和肠道中 ABCG2 的表达来减少尿酸重吸收,从而降低 SUA。同时,此方还能够降低如 TNF- α 、IL-1 β 等炎症标志物的表达,有助于缓解肝肾损伤^[58]。从木瓜果肉中分离出的黄酮类化合物对于 HUA 有治疗效果,同时抑制 XOD 活性,增加肾脏中 OAT1 表达和减少 URAT1 表达,促进尿酸排泄;另外,对于高尿酸引起的谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性改变异常,木瓜黄酮能帮助机体恢复其活性来改善 UAN^[59]。木瓜酵素不仅有助于蛋白质分解,促进消化,还有助于减少体内炎症,对抗尿酸结晶形成的炎症反应,从而缓解痛风症状,新鲜木瓜是获取木瓜所有营养成分的最佳方式。

3.2.3 菊花 菊花中富含包括多糖、黄酮、挥发油等多种活性成分,此外,菊属植物还含有丰富的萜类化合物、苯丙酮类化合物等^[60]。其功效为疏散风热,平抑肝阳,清肝明目,清热解毒,具有抗氧化、抗炎、抗菌和抗衰老等多种作用^[61-62]。菊花具有抑制 XOD 的活性以及缓解 HUA 的潜力。其中毫菊提取物可通过提高肾脏中 ABCG2 水平、降低 GLUT9 和 URAT1 水平来促进尿酸排泄,同时降低 XOD 活性来减少尿酸的生成,从而降低 SUA 含量^[63];此外,毫菊提取物还能调控由 HUA 引起的氨基酸代谢和脂质代谢紊乱,通过降低血清中花生四烯酸、吲哚硫酸盐和溶血磷脂酰胆碱的含量来有效改善^[63]。同时有研究表明菊花中的许多活性成分对肝脏具有益处^[64]。汉防己甲素,一种从北黄菊花中提取的成分,能够抑制 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞中炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 的产生;其次,汉防己甲素还可以抑制 NF- κ B 与核蛋白的结合活性,降低 NF- κ B 的转录活性,从而抑制肾脏炎症反应^[65],综上所述,菊花具有抗 UAN 的潜力。菊花中的谷氨酸、天冬氨酸等氨基酸,以及钾、锌、硒等微量元素,共同促进人体代谢平衡,间接辅助尿酸的正常代谢。

3.2.4 山药 山药中含有甾体皂苷类、多糖类、黄酮类和酚苷类等成分^[66],具有补脾养胃、补肾涩精的功效。“脾肾亏虚、湿浊内盛”常被视为 UAN 的病机之一,而山药可以逆转此症,所以方剂常加入山药配伍,如加味金匱肾气丸、六味地黄丸^[67]等。一方面,山药中的薯蓣皂苷能够调控机体的尿酸水平,通过下调 URAT1 和 GLUT9 的表达,上调 OAT1 和 OAT3 的表达,以促进尿酸排泄,改善 UAN 的症状^[68];另一方面,山药甲醇提取物能抑制小鼠肝脏的 XOD 酶活性,从而阻碍尿酸合成,有助于降低小鼠 SUA 水平。山药还可通过抑制炎症降低尿酸引起的炎症反应,尤其在急性痛风性关节炎情况下,它能通过调节肝脏代谢,发挥抗感染治疗作用^[69]。

在肾脏疾病的临床治疗过程中,采用“凉血化瘀”理论来治疗肾脏疾病,山药与其他药物配伍制成复方蛇龙胶囊,该方有助于减轻肾脏炎症、保护肾小球滤过功能、减少蛋白尿、并防止足细胞损伤等。这得益于它能提升肾病大鼠肾小球足细胞上 Podocin 蛋白、Nephrin 蛋白的表达,有效降低蛋白尿的含量^[70]。山药中的薯蓣皂苷成分会明显降低血尿素氮(BUN)含量,这一效果是通过干预 Wnt 信号途径,降低转化生长因子- β (TGF- β)的表达实现的^[71]。薯蓣皂苷元还可通过下调 TLR4/NF- κ B 途径缓解炎症,同时降低 ROS 的生成,缓解氧化应激反应,改善肾脏的损伤状况^[72]。山药总皂苷可通过调节 TGF- β 1/Smad 通路改善高果糖诱导的肾损伤,减少肾纤维化以及调控氧化应激^[73]。山药特有的黏液

蛋白成分具有良好的润滑和保护作用,能够修复受损的肾小管,增强肾脏的过滤功能,促进尿酸排出。山药中含有钾、镁等元素,有助于维持水电解质平衡,减少尿酸盐沉积,预防肾结石形成。

3.2.5 枸杞子 枸杞子具有滋养肝肾、养血益精的功效,可以直接食用,也可用作枸杞茶或入菜等。枸杞子含有黄酮类、多糖类、氨基酸等多种成分^[74],具有清除氧自由基、抗氧化、保肝护肾等多种药理作用。随着年龄的增长,中老年人常出现肾精损耗,气血不足,体内平衡失调,此时肝肾虚弱,容易引发 HUA,枸杞子对这类肝肾亏虚的情况有益,有助于抵抗尿酸过高的影响。其提取物能降低小鼠肝脏中 XOD 活性,减少炎症因子 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 的释放,因此有助于降低小鼠 SUA 水平,缓解由尿酸引起的炎症,为治疗 UAN 提供帮助^[75]。枸杞子中的枸杞多糖能够抑制 XOD 活性,升高肾脏中的 OAT1、OAT3 的表达和降低 GLUT9 的表达^[76],从而有效降低小鼠 SUA 浓度并保护肾脏,对 UAN 的治疗显示出积极作用。

3.2.6 黄芪 黄芪长久以来被誉为补气固表、利水消肿的佳品,富含皂苷、黄酮、多糖等多元活性成分,具有滋补肝肾、抗氧化和抗炎的特性^[77]。研究表明黄芪对 HUA 小鼠有较好的改善作用,显著降低 SUA 水平,具有良好的肝肾保护作用;还能够显著逆转肝肾损伤,与临床药物相比优势更明显^[78]。防己黄芪汤可以显著降低 HUA 小鼠 SUA、升高 UUA 和 Cr 水平,同时可以显著降低炎症因子 $\text{IL-1}\beta$,升高肾脏 OAT1、OAT3 和 ABCG2 的蛋白表达水平^[79],从而增强肾脏对尿酸的清除能力,直接促进尿酸的排泄,展现了其在 UAN 治疗上的积极疗效。

4 总结与展望

药食同源中药通过多靶点协同作用,不仅能够调节体内的尿酸代谢,还能够保护肾脏功能,减轻炎症,甚至修复损伤的肾脏组织,显示出一定的治疗潜力。许多药食同源的中药可通过调节尿酸合成酶的活性,减少尿酸生成,或者促进尿酸排泄,实现对尿酸代谢的双重调控。例如,菊苣、姜黄、葛根、甘草、桑叶、紫苏、槐花中的活性成分能够抑制黄嘌呤氧化酶活性,减少尿酸生成;而茯苓、木瓜、菊花、山药等中药主要通过肾脏和肠道促进尿酸排泄治疗 UAN。除此之外,大多数药食同源中药富含黄酮类、多酚类、皂苷类等天然抗氧化剂,能有效清除自由基,减轻氧化应激,降低炎症因子水平。例如,槐米、枸杞子中的黄酮类化合物,能够抑制炎症介质如 $\text{TNF-}\alpha$ 、 IL-6 的释放,减少炎症对肾脏的损伤。药食同源中药通过多靶点作用发挥药效,如图 2 所示,其中 XOD 和 ADA 作为嘌呤代谢途径中的核心酶,其活

性调控对尿酸生成水平具有决定性影响。GLUT9、URAT1 和 OAT4 等尿酸转运体在人体近端肾小管中扮演着尿酸重吸收的关键角色,而 ABCG2 则主要负责肾外尿酸排泄。



图 2 药食同源中药及其成分在降低体内尿酸水平中的潜在靶点

Fig 2 Potential targets of traditional Chinese medicine and its compounds in lowering uric acid levels

总之,中药及其有效成分在治疗 UAN 方面展现出一定的优势,尤其是在提供综合性治疗和减少并发症方面,但其作用机制研究、质量控制、有效成分提取及证据级别待提升等方面仍需进一步探索。为此,加强中药现代化建设,推进药食同源中药的规范化种植、加工及质量控制,利用现代科技手段解析其活性成分及作用机制,构建科学合理的评价体系,将是推动其在 UAN 治疗领域广泛应用的关键所在。综上所述,药食同源中药在防治 UAN 方面具有很大的潜力,未来希望有更多的研究来探索其在治疗 UAN 方面的机制和功能,其产品开发提供更多的选择和可能性。

参考文献

- [1] Roughley MJ, Belcher J, Mallen CD, et al. Gout and risk of chronic kidney disease and nephrolithiasis: meta-analysis of observational studies [J]. *Arthritis Res Ther*, 2015, 17 (1): 90.
- [2] 赵敏, 陈婷, 黄承龙, 等. 不同饮品与中国成人高尿酸血症的关系研究 [J]. *现代预防医学*, 2022, 49 (9): 1577-1581.
- [3] 江鹏程, 齐新阳, 田园梦, 等. 不同诊断标准下农村老年人高尿酸血症患病率及影响因素分析 [J]. *中国实用内科杂志*, 2022, 42 (5): 409-413.
- [4] Zhang M, Zhu XX, Wu J, et al. Prevalence of hyperuricemia among Chinese adults: findings from two nationally representative cross-sectional surveys in 2015-16 and 2018-19 [J]. *Front Immunol*, 2022, 12: 791983.
- [5] 方宁远, 吕力为, 吕晓希, 等. 中国高尿酸血症相关疾病诊疗多学科专家共识 (2023 年版) [J]. *中国实用内科杂志*, 2023, 43 (6): 461-480.
- [6] 赵敏, 陈婷, 黄振光, 等. 1990—2019 年中国痛风疾病负担研究 [J]. *现代预防医学*, 2021, 48 (21): 3974-3978.
- [7] Petreski T, Bevc S, Ekart R, et al. Hyperuricemia and long-term survival in patients with chronic kidney disease undergoing hemodialysis [J]. *Clin Nephrol*, 2017, 88 (13): 69-72.

- [8] Thomas B, Matsushita K, Abate KH, et al. Global cardiovascular and renal outcomes of reduced GFR [J]. J Am Soc Nephrol, 2017, 28 (7): 2167-2179.
- [9] Mohammad CM, Shahidah CA, Wan Fatimah SWM, et al. Delayed hypersensitivity reaction to allopurinol: a case report [J]. Malays Fam Physician, 2023, 18: 11.
- [10] Chaby G, Valeyrie-Allanore L, Duong TA, et al. Severe cutaneous adverse reactions due to inappropriate medication use [J]. Br J Dermatol, 2018, 179 (2): 329-336.
- [11] 张静雯, 汪宁, 邱红霞, 等. 非布司他治疗早期糖尿病肾病合并高尿酸血症疗效及对患者肾功能影响研究 [J]. 陕西医学杂志, 2020, 49 (2): 209-211.
- [12] 李金康, 苏琳, 王连亮. 非布司他联合别嘌醇治疗痛风性关节炎的临床效果 [J]. 中国实用医刊, 2023, 50 (4): 108-111.
- [13] 张瑛毓, 付励, 范海茹, 等. 具有降尿酸功效的食品研究进展 [J]. 中国食物与营养, 2020, 26 (1): 50-53.
- [14] 王红娟, 刘娜, 李彦科, 等. 甘肃产 5 种中药治疗痛风作用的比较研究 [J]. 中国中医药科技, 2021, 28 (5): 720-722.
- [15] 郭花斌, 辛宝. 药食两用中草药在防治高尿酸血症上的研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18 (86): 50-51, 53.
- [16] Liu G, Chen XF, Lu X, et al. Sunflower head enzymatic hydrolysate relieves hyperuricemia by inhibiting crucial proteins (xanthine oxidase, adenosine deaminase, uric acid transporter1) and restoring gut microbiota in mice [J]. J Functional Foods, 2020, 72: 104055.
- [17] Maiuolo J, Oppedisano F, Gratteri S, et al. Regulation of uric acid metabolism and excretion [J]. Int Cardiol, 2016, 213: 8-14.
- [18] Ristic B, Sikder MOF, Bhutia YD, et al. Pharmacologic inducers of the uric acid exporter ABCG2 as potential drugs for treatment of gouty arthritis Asian [J]. Pharm Sci, 2020, 15 (2): 173-180.
- [19] Ei-Sayed YS, Lebda MA, Hassinin M, et al. Chicory (*Cichorium intybus* L.) root extract regulates the oxidative status and antioxidant gene transcripts in CCl₄-induced hepatotoxicity [J]. PLoS One, 2015, 10 (3): 1-12.
- [20] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 28-338.
- [21] 王雨, 褚梦真, 李文静, 等. 基于“肠-肾”途径的健脾祛湿中药抗痛风病研究 [J]. 世界中医药, 2021, 16 (1): 13-19.
- [22] Bian M, Wang J, Wang Y, et al. Chicory ameliorates hyperuricemia via modulating gut microbiota and alleviating LPS / TLR4 axis in quail [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 131: 110719.
- [23] 邹丽娜, 王雨, 姜卓希, 等. 基于肾脏尿酸转运的中药降尿酸活性成分筛选及评价——以菊苣酸为例 [J]. 世界中医药, 2021, 16 (1): 28-34.
- [24] 白云飞. 基于肠道嘌呤转运蛋白 CNT2 探讨菊苣提取物降尿酸作用机制 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [25] 秦宇雯, 费程浩, 张伟, 等. 姜黄属中药活血化癥功效关联物质研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47 (1): 24-35.
- [26] Ran YY, Su W, Gao FH, et al. Curcumin ameliorates whitmatter injury after ischemic stroke by inhibiting microglia/macrophage pyroptosis through NF- κ B suppression and NLRP3 inflammasome inhibition [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 1-25.
- [27] 樊丽娟, 钱林枫, 黄楠, 等. 姜黄素预处理对脑缺血再灌注损伤沙土鼠炎症反应的影响 [J]. 脑与神经疾病杂志, 2021, 29 (12): 759-763.
- [28] Zhang YY, Yan Y, Cao Y, et al. Potential therapeutic and protective effect of curcumin against stroke in the male albinos-stroke-induced model rats [J]. Life Sci, 2017, 183: 45-49.
- [29] 胥雪玲. 姜黄素调节尿酸性肾病大鼠的肠道菌群并改善肾功能 [D]. 青岛: 青岛大学, 2022.
- [30] Uchio R, Muroyama K, Okuda-Hanafusa C, et al. Hot water extract of *Curcuma longa* L. improves serum inflammatory markers and general health in subjects with overweight or prehypertension/mild hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. Nutrients, 2019, 11 (8): 1822.
- [31] Uchio R, Kawasaki K, Okuda-Hanafusa C, et al. Curcuma longa extract improves serum inflammatory markers and mental health in healthy participants who are overweight: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. Nutr J, 2021, 20 (1): 91.
- [32] Ao GZ, Zhou MZ, Li YY, et al. Discovery of novel curcumin derivatives targeting xanthine oxidase and urate transporter 1 as antihyperuricemic agents [J]. Bioorg Med Chem, 2017, 25 (1): 166-174.
- [33] 程浩, 陈冲, 黄静, 等. 葛根药理作用、微生物转化及发酵食品应用 [J]. 现代食品, 2022, 28 (14): 63-68.
- [34] 陈燕启, 刘德红, 杨光田. 鼠脑缺血再灌注时葛根素对核因子 κ B 表达的影响 [J]. 中国临床康复, 2005 (37): 187-189.
- [35] Eom SH, Jin SJ, Jeong HY, et al. Kudzu leaf extract suppresses the production of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, tumor necrosis factor- α , and interleukin-6 via inhibition of JNK, TBK1 and STAT1 in inflammatory macrophages [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19 (5): 1536.
- [36] 马越, 吕圭源, 陈素红. 葛根提取物抗痛风性关节炎作用及机制初探 [J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22 (3): 241-244.
- [37] 史坤, 张荣涛, 尚小玉, 等. 葛根提取物对高尿酸血症大鼠血尿酸的影响 [J]. 食品科技, 2014, 39 (2): 216-220.
- [38] 于瑞丽, 陈素红, 吕圭源, 等. 葛根提取物对高尿酸血症模型大鼠尿酸及血脂的影响 [J]. 浙江中医药大学学报, 2011, 35 (3): 455-458.
- [39] 陈玉娥, 冯冲, 杨诗慧, 等. 不同产地甘草药材质量评价 [J]. 安徽农业科学, 2023, 51 (1): 183-187.
- [40] 邓桃妹, 彭灿, 彭代银, 等. 甘草化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的探讨 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46 (11): 2660-2676.
- [41] 钱锦秀, 孟武威, 刘晖晖, 等. 经典名方中紫苏类药材的本草考证 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28 (10): 55-67.
- [42] Meng QH, Qi X, Chao Y, et al. IRS1/PI3K/AKT pathway signal involved in the regulation of glycolipid metabolic abnormalities by *Mulberry* (L.) leaf extracts in 3T3-L1 adipocytes [J]. Chinese Medicine, 2020, 15 (2): 1.
- [43] 王珂, 王瑞坡, 李姣, 等. 桑叶黄酮对腺嘌呤诱导大鼠高尿酸血症肾损伤的防治作用 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24 (2): 172-175, 202.
- [44] Tian SM, Wang M, Liu CY, et al. Mulberry leaf reduces inflammation and insulin resistance in type 2 diabetic mice by TLRs and insulin Signalling pathway [J]. BMC Complement Altern M, 2019, 19 (1): 326.
- [45] 李雪梅, 尹丹, 曹泽平, 等. 紫苏的性味归经、功效及用药禁忌考证 [J]. 环球中医药, 2021, 14 (12): 2174-2178.

- [46] 李紫薇, 车萍, 张颖颖, 等. 紫苏化学成分及药理作用研究进展[J]. 山东化工, 2024, 53 (3): 111-114.
- [47] 王亚楠, 张志军, 李会珍. 紫苏叶提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制作用[J]. 中成药, 2020, 42 (2): 462-465.
- [48] 张蕾, 郝婧玮, 景云荣, 等. 紫苏叶对高尿酸血症模型小鼠的影响[J]. 江苏农业科学, 2020, 48 (12): 156-159.
- [49] 李秋红, 栾仲秋, 王继坤. 中药槐米的化学成分、炮制研究及药理作用研究进展[J]. 中医药学报, 2017, 45 (3): 112-116.
- [50] 安茹. 槐米中槲皮素的提取及其对高尿酸血症的影响[D]. 天津: 天津科技大学, 2010.
- [51] 刘琦, 耿晓桐, 花娇娇, 等. 茯苓化学成分及药理作用研究进展[J]. 品牌与标准化, 2023 (2): 106-109.
- [52] 于立红. 2 型糖尿病高尿酸血症采用人参茯苓散加减治疗的效果分析[J]. 中国现代药物应用, 2020, 14 (18): 222-224.
- [53] Yang Y, Zhang DM, Liu JH, et al. Wuling San protects kidney dysfunction by inhibiting renal TLR4/MyD88 signaling and NLRP3 inflammasome activation in high fructose-induced hyperuricemic mice[J]. J Ethnopharmacol, 2015, 169: 49-59.
- [54] Liang DL, Yang TQ, Diao X, et al. Hypouricaemic and nephroprotective effects of *Poria cocos* in hyperuricemic mice by up-regulating ATP-binding cassette super-family G member 2[J]. Pharm Biol, 2021, 59 (1): 275-286.
- [55] 邓未娇, 闫洁熙, 王沛, 等. 茯苓多糖对高尿酸血症大鼠肾小管转运体 rURAT1、rOAT1 和 rOCT2 表达的影响[J]. 西部中医药, 2019, 32 (6): 10-14.
- [56] 陆锦锐, 杨建宇, 李杨, 等. 道地药材宣木瓜的研究近况[J]. 光明中医, 2020, 35 (18): 2952-2955.
- [57] 杨益萍. 和胃化湿舒筋骨药食两用话木瓜[J]. 养生月刊, 2019, 40 (10): 902-904.
- [58] 刘涛. 薏仁木瓜化浊汤对高尿酸血症小鼠的降尿酸作用及其机制研究[D]. 广州: 广东药科大学, 2020.
- [59] Zhang R, Zhan SY, Li SY, et al. Anti-hyperuricemic and nephroprotective effects of extracts from *Chaenomeles sinensis* (Thouin) Koehne in hyperuricemic mice[J]. Food Funct, 2018, 9 (11): 5778-5790.
- [60] Han JM, Song HY, Seo HS, et al. Immunoregulatory properties of a crude extraction fraction rich in polysaccharide from *Chrysanthemum zawadskii* Herbich var. *latilobum* and its potential role as avaccine adjuvant[J]. Int Immunopharmacol, 2021, 95: 107513.
- [61] 陈庆蕾, 陈庆国, 赵玉荣. 菊花的功效及其产品开发[J]. 中国果菜, 2023, 43 (2): 61-65.
- [62] Jeong YH, Kim TI, Oh YC, et al. Chrysanthemum indicum prevents hydrogen peroxide-induced neurotoxicity by activating the TrkB/Akt signaling pathway in hippocampal neuronal cells[J]. Nutrients, 2021, 13 (11): 3690.
- [63] 彭岸. 毫菊提取物改善大鼠高尿酸血症作用机制及其 XO1 活性谱效关系研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2021.
- [64] Ming K, Chen Y, Shi JT, et al. Effects of *Chrysanthemum indicum* polysaccharide and its phosphate on anti-duck hepatitis a virus and alleviating hepatic injury[J]. Int J Biol Macromol, 2017, 102: 813-821.
- [65] Pyee Y, Chung HJ, Choi TJ, et al. Suppression of inflammatory responses by handelin, a guaianolide dimer from *chrysanthemum boreale*, via downregulation of NF- κ B signaling and proinflammatory cytokine production[J]. J Nat Prod, 2014, 77 (4): 917-924.
- [66] 杨雁, 孙羽灵, 孙建梅, 等. 山药活性成分药理作用研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2022, 41 (12): 55-60.
- [67] 张婉怡, 王陈芳, 周文倩, 等. 高祥福用六味地黄丸合四妙丸加减治疗痛风一则[J]. 中国乡村医药, 2022, 29 (7): 31.
- [68] Zhu LR, Dong YF, Na S, et al. Saponins extracted from *Dioscorea collettii* rhizomes regulate the expression of urate transporters in chronic hyperuricemia rats[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 93: 88-94.
- [69] Fang C, Chen LY, He MZ, et al. Molecular mechanistic insight into the anti-hyperuricemic effect of *Eucommia ulmoides* in mice and rats[J]. Pharm Biol, 2019, 57 (1): 112-119.
- [70] 贾世艳, 仲启明, 司瑞花, 等. 复方蛇龙胶囊对膜性肾病大鼠 PI3K/Akt 信号通路及足细胞凋亡的影响[J]. 环球中医药, 2022, 15 (10): 1788-1795.
- [71] 高维松, 王隆辉, 顾运涛, 等. 薯蓣皂苷通过调节人髓核细胞 TLR4/NF- κ B 信号通路抑制 IL-1 β 诱导的分解代谢和凋亡[J]. 局解手术学杂志, 2021, 30 (10): 857-862.
- [72] Saad HM, Elekhawy E, Shaldam MA, et al. Rosuvastatin and diosmetin inhibited the HSP70/TLR4/NF- κ B p65/NLRP3 signaling pathways and switched macrophage to M2 phenotype in a rat model of acute kidney injury induced by cisplatin[J]. Biomed Pharmacother, 2024, 171: 116151.
- [73] Qiao YJ, Xu LN, Tao XF, et al. Protective effects of dioscin against fructose-induced renal damage via adjusting Sirt3-mediated oxidative stress, fibrosis, lipid metabolism and inflammation[J]. Toxicol Lett, 2018, 284 (3): 37-45.
- [74] 张敏, 岳坤, 姜交华, 等. 枸杞子及其有效成分的药理作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2023, 46 (7): 1611-1619.
- [75] 孙铭, 刘春雨, 傅文绮, 等. 枸杞提取物对慢性高尿酸血症的治疗作用及机制研究[J]. 中国民族民间医药, 2017, 26 (24): 35-37.
- [76] Yu X, Zhang L, Zhang P, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides protect mice from hyperuricaemia through promoting kidney excretion of uric acid and inhibiting liver xanthine oxidase[J]. Pharm Biol, 2020, 58 (1): 944-949.
- [77] 王丹阳, 冯毅晖, 潘加豪, 等. 黄芪的主要化学成分及药理作用[J]. 新农民, 2024 (24): 126-128.
- [78] 金兴聪, 卢建秋, 崔议方, 等. 黄芪-茯苓双向固体发酵菌质对高尿酸血症小鼠的改善作用研究[J]. 中国现代中药, 2023, 25 (6): 1245-1251.
- [79] 王星, 薛宁, 李洪雷, 等. 防己黄芪汤对高尿酸血症小鼠降尿酸及肾保护作用机制的研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45 (21): 5248-5255.

(收稿日期: 2024-10-12; 修回日期: 2024-12-12)

药学监护在临床营养支持治疗中的实践专题

【编者按】

营养药学一方面用药学理论研究营养素在体内的效应和代谢过程,另一方面研究营养素和药物相互作用及营养素的药理作用机制等。临床实践中营养药学可以研究营养状态对药物代谢动力学和药效学的影响,不同疾病(状态)肠内营养制剂和肠外营养组方的选择和优化,治疗药物与营养药物相互作用,肠外与肠内营养制剂和其他药物混合后的稳定性,肠外肠内营养疗法中的用药安全监护及药物经济学评价等。药学监护是营养药学在临床营养支持治疗发挥药师作用的具体体现形式,也是保证合理使用营养制剂的重要手段,同时也为临床用药的安全性保驾护航,本期专题从营养支持治疗药学监护系统的临床应用、全营养混合液(TNA)组方稳定性等药学层面的实践研究出发,旨在为营养支持药师提供临床药学研究的思路,开展更多、更好、更深的营养药学实践研究。

【主持人简介】



秦侃,安徽医科大学第三附属医院(合肥市第一人民医院)主任药师,硕士研究生导师。安徽省医疗卫生重点专科——临床药学科带头人,中华医学会肠外肠内营养学分会药学协作组副组长、NUSOC协作组委员;中国抗癌协会肿瘤营养专业委员会委员;安徽省药学会临床营养药专业委员会主任委员;安徽省医学会肠外肠内营养学分会副主任委员兼药理学组组长。主要从事药事管理及外科系统的临床药学工作,研究肠外肠内营养支持治疗、抗感染药物合理应用及药物警戒等。发表论文 100 多篇,主编专著 3 部,参编 6 部;近年来主持安徽省科技厅年度重点科研项目 2 项,合肥市科技局科研项目 5 项;负责国家科技部科技支撑项目子课题 4 项;参与国家自然科学基金项目 1 项;获合肥市政府科技进步奖 4 项,省级科研成果证书 5 项。

新生儿标准化全营养混合液组方的稳定性研究

赵晶晶, 谢锦凤, 杨亮, 张琳, 方瑞* (广东省妇幼保健院药学部, 广州 511400)

摘要: **目的** 观察某院设计的新生儿标准化全营养混合液在室温(25℃)条件下不同时间点的指标,为该组方全营养混合液提供有价值的稳定性数据。**方法** 基于国内外肠外营养支持治疗指南,设计适合日龄>3 d,体重<1500 g 新生儿使用的标准化全营养混合液。在静配中心按照标准操作规程将全营养混合液调配完成后,室温下避光保存,考察其在 0、4、12、24、48 h 的外观性状、pH 值、乳粒平均粒径(MDS)大小及分布(PDI)、渗透压、不溶性微粒数、细菌生长等情况。**结果** 在 48 h 内,该标准化全营养混合液外观无明显变化;pH: 6.25~6.36, MDS: 249.57~304.6 nm, PDI<0.2, 渗透压: 991.7~999 mOsm·L⁻¹, 且无细菌生长。**结论** 在室温避光条件下 48 h 内,该新生儿标准化全营养混合液各项关键指标均符合《中国药典》的规定,稳定性良好,可进一步推广和应用。

关键词: 全营养混合液; 标准化配方; 稳定性

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)04-1089-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.032

基金项目: 广东省医院药学研究基金(No.2023A10); 广东省医院协会药学科专项基金(No.2022YXKY17)。

作者简介: 赵晶晶,女,副主任药师,主要从事肠外肠内营养方面研究, email: zjjafuji@163.com *通信作者: 方瑞,女,主任药师,主要从事肿瘤药学、医院药学等方面研究, email: fangrui_sf@163.com

Stability of standardised total nutrition admixture formulations for neonates

ZHAO Jing-jing, XIE Jin-feng, YANG Liang, ZHANG Lin, FANG Rui* (Department of Pharmacy, Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou 511400)

Abstract: Objective To determine the stability of standardised total nutrition admixture (TNA) formulations by observing the key indicators of the standardised TNA at different time points at room temperature (25 °C). **Methods** In accordance with national and international guidelines, a hospital-designed standardized TNA suitable for neonates aged > 3 days and weighing < 1500 g. After mixing and blending the TNA with standard operation procedures, the static dispensing center place it under room temperature to avoid light, and examined its appearance, pH, mean diameter size (MDS), polymer dispersity index (PDI), osmolality, number of insoluble particles, and bacterial growth at 0, 4, 12, 24, and 48 h. **Results** There was no significant change in the appearance of the standardized TNA at 48 h; pH: 6.25 ~ 6.36, MDS: 249.57 ~ 304.6 nm, PDI < 0.2, osmolality: 991.7 ~ 999 mOsm · L⁻¹. No bacterial growth was detected. **Conclusion** Under room temperature and light avoiding for 48 h, all the stability indexes of the hospital-designed standardized neonatal TNA conform to the provisions of the *Chinese Pharmacopoeia*, with good stability for further promotion and application.

Key words: total nutrition admixture; standardized TNA; stability

全营养混合液 (total nutrition admixture, TNA) 是指将葡萄糖、氨基酸、脂肪乳、碳水化合物、维生素、电解质、微量元素等营养要素, 在无菌条件下按比例混合后, 用于肠外营养治疗的静脉输液。TNA 的组分复杂, 属于弱稳定体系, 各组分之间会相互影响, 其稳定性不仅影响治疗效果, 还关系到用药安全。因此针对 TNA 的稳定性研究, 对于肠外营养治疗意义重大。

新生儿标准化 TNA 是某院新生儿科联合药学部参照中外新生儿肠外营养治疗指南对各类营养素的要求^[1-5], 制订的专门给不同日龄新生儿患者使用的全营养混合液。新生儿标准化 TNA 组成配比相对固定, 一般医师通过改变液体量, 来调节患者的营养给予量, 从而达到治疗目的。该 TNA 具有使用方便, 适用于多数患儿的特点, 并且被国内外的新生儿肠外营养治疗指南所推荐^[6]。本研究重点考察适用于日龄 > 3 d, 体重 < 1500 g 的新生儿的标准化 TNA 的稳定性, 以期为临床新生儿肠外营养治疗的安全性提供参考, 为新生儿标准化 TNA 进一步推广应用奠定基础。

1 仪器与试药

1.1 仪器

pH 计 (上海仪电科学仪器股份有限公司); 净化工作台 (苏州安泰空气技术有限公司); 激光纳米粒度仪 (英国马尔文仪器有限公司); 全自动冰点渗透压仪 (德国罗泽公司); 微粒分析

仪 (天津天河分析仪器有限公司)。

1.2 试药

10% 葡萄糖注射液 (规格: 500 mL, 批号: B23K0103)、50% 葡萄糖注射液 (规格: 20 mL, 批号: 23G97J4)(中国大冢制药有限公司); 6.74% 小儿复方氨基酸 (广东利泰制药股份有限公司, 规格: 100 mL, 批号: 1123080416); 10% 葡萄糖酸钙注射液 (四川美大康华康药业有限公司, 规格: 10 mL, 批号: 23092726); 甘油磷酸钠注射液 (无锡凯夫制药有限公司, 规格: 10 mL, 批号: 2303216); 25% 硫酸镁注射液 (河北天成药业股份有限公司, 规格: 10 mL, 批号: 32312012); 10% 氯化钠注射液 (湖北兴华制药有限公司, 规格: 10 mL, 批号: 20230102); 10% 氯化钾注射液 (湖北科伦药业有限公司, 规格: 10 mL, 批号: C240125F1); 多种微量元素 I (百正药业股份有限公司, 规格: 10 mL, 批号: 2308001); 20% 中/长链脂肪乳 (贝朗医疗有限公司, 规格: 100 mL, 批号: 2402287101); 脂溶性维生素 I (成都天山制药有限公司, 规格: 复方 3.345 ~ 4.041 mg, 批号: 11230401); 水溶性维生素 (重庆药友制药有限公司, 规格: 复方 0.5 g, 批号: 22223281); 苏丹红 I 号 (大连美仑生物技术有限公司, 规格: 25 g, 批号: D1109A); 注射器 (山东威高集团医用高分子制品股份有限公司, 规格: 20 mL、50 mL, 批号: 20230611、20230701)。

2 方法

2.1 新生儿标准化 TNA 的组方

某院新生儿科联合药学部, 参照国内外新生儿肠外营养治疗指南对各类营养素的要求^[1-5] (见表 1), 设计出适合日龄 > 3 d, 体重 < 1500 g 的新生

儿使用的标准化 TNA (每日用量: 150 mL · kg⁻¹, 能量: 275.43 kJ · 100 mL⁻¹), 具体组成见表 2。该研究经广东省妇幼保健院医院伦理委员会批准 (批件号: 广东省妇幼保健院医伦理 [202201139] 号)。

表 1 国内外指南对新生儿肠外能量及营养素推荐

Tab 1 National and international guidelines on parenteral energy and nutrient recommendations for neonates										
指南	氨基酸 /[g/ (kg · d)]	脂肪乳 /[g/ (kg · d)]	葡萄糖 /[mg/ (kg · min)]	钠 /[mmol/ (kg · d)]	钾 /[mmol/ (kg · d)]	钙 /[mmol/ (kg · d)]	镁 /[mmol/ (kg · d)]	磷 /[mmol/ (kg · d)]	能量 /[kJ/ (kg · d)]	
中国 2013 ^[2]	3.5 ~ 4	1.0 ~ 3.0	4 ~ 8	2 ~ 3	1 ~ 2	0.6 ~ 0.8	0.3 ~ 0.5	1.0 ~ 1.2	334.87 ~ 418.59	
欧洲 2018 ^[1]	2.5 ~ 3.5	1.0 ~ 4.0	4 ~ 10	2 ~ 5	2 ~ 3	0.8 ~ 3.5	0.1 ~ 0.3	1.0 ~ 3.5	376.73 ~ 502.30	
美国 2023 ^[4]	3.0 ~ 3.5	0.5 ~ 3.0	6 ~ 14	2 ~ 5	2 ~ 4	1.0 ~ 2.0	0.15 ~ 0.25	1.0 ~ 2.0	376.73 ~ 502.30	
英国 2020 ^[3]	3.0 ~ 4.0	1.0 ~ 4.0	4 ~ 11	4 ~ 5	—	0.8 ~ 2.0	—	1.0 ~ 2.0	313.94 ~ 503.30	
澳大利亚 2020 ^[5]	2.0 ~ 4.0	1.0 ~ 3.0	9.4 ~ 11.8	1 ~ 4.6	1 ~ 3	< 2.3	0.2 ~ 0.3	< 1.8	376.73 ~ 481.37	

表 2 新生儿标准化 TNA 的组成

Tab 2 Composition of the standardised TNA formulations of the neonate	
药品组成	用量
10% 葡萄糖注射液	267 mL
50% 葡萄糖注射液	147 mL
6.74% 小儿复方氨基酸	395 mL
10% 葡萄糖酸钙注射液	38 mL
甘油磷酸钠注射液	8.5 mL
25% 硫酸镁注射液	1.3 mL
10% 氯化钠注射液	3.7 mL
10% 氯化钾注射液	15.3 mL
多种微量元素 I	7 mL
20% 中长链脂肪乳	117 mL
脂溶性维生素 I	1.4 支
水溶性维生素	0.7 支
能量	275.43 kJ/100 mL
糖脂比	61.8% : 38.2%
热氮比	151.04 : 1
一价阳离子	43.84 mmol · L ⁻¹
二价阳离子	9.78 mmol · L ⁻¹

2.2 观察的相关重点指标项目

根据组方, 混合调配新生儿标准化 TNA 后, 将其置于室温避光保存, 分别于 0、4、12、24、48 h 取样, 每个检测时间点平行测定 3 次, 考察其稳定性。试验内容如下:

① 外观考察: 分别在 5 个时间点取样 5 mL 置于烧杯, 观察是否有分层、絮凝、沉淀现象, 杯壁是否出现油痕与析出物。

② 苏丹红染色: 分别在 5 个时间点取样 20 mL 置于烧杯, 加入 5 mg 油性染料苏丹红, 轻摇并用玻璃棒搅拌, 如果脂肪乳发生破乳, 苏丹红会在营养液中溶解扩散^[7]。

③ pH 值检测: 分别在 5 个时间点取样 5 mL 置于烧杯, 用 pH 计测 pH。

④ 乳粒粒径及其分布的测定: 分别在 5 个时间点取样 0.1 mL 置于 EP 管, 以去离子水稀释 100 倍, 用马尔文激光纳米粒度仪检测其乳粒粒径大小及其粒度分布情况, 结果以平均粒径值 (MDS, nm) 和分散系数 (PDI) 值表示; PDI 值能反映乳滴外观尺寸的均匀性, 一般 PDI 值 < 0.2, 乳滴的单分散性较好^[8]。

⑤ 渗透压的测定: 分别在 5 个时间点取样 0.1 mL, 使用冰点渗透压仪依次测定渗透压。

⑥ 不溶性微粒的检查: 采用《中国药典》2020 年版通则 0903 中不溶性微粒的测定方法^[9], 测定各时间点不溶性微粒数 (直径 ≥ 10 μm、≥ 25 μm)。

⑦ 无菌检查: 无菌环境操作下, 分别在 5 个时间点取样 0.2 mL, 将其均匀涂于整个血琼脂平板培养基, 于 37℃ 培养箱倒置培育 72 h, 观察各时间点是否有无菌落生长。

2.3 统计学处理方法

采用 SPSS 27 对实验数据进行统计分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 Graphpad Prism9.0 进行作图。组间差异比较使用单因素方差分析方法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 外观考察

在 5 个时间点 (0、4、12、24、48 h) 取样, 对新生儿标准化 TNA 外观进行观察, 结果显示, TNA 颜色未发生变化, 未出现絮凝、分层以及沉淀等情况。

3.2 苏丹红染色

苏丹红染色后, 5 个时间点取样的 TNA 均未出现溶解扩散现象 (见图 1)。

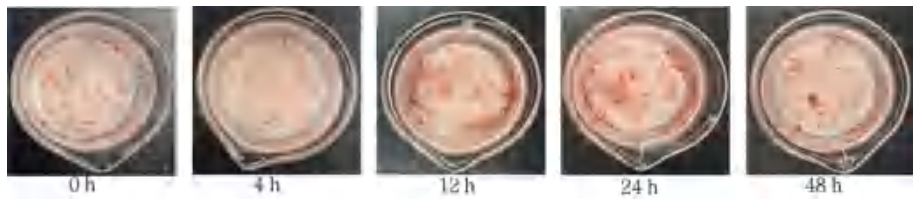


图 1 苏丹红在新生儿标准化 TNA 中的溶解情况
Fig 1 Solubility of Sudan red in standardized TNA formulations

3.3 pH 的测定

在 5 个时间点取样, 测定 pH, 结果显示, 在 48 h 内, 随着时间的增长, 新生儿标准化 TNA 的 pH 略微下降。与 0 h 相比, 24 h 以内各时间点的 pH 值变化差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 48 h 的 pH 值变化差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 结果见表 3。

3.4 乳粒粒径及其分布的测定

在 5 个时间点取样, 测定新生儿标准化 TNA 中乳粒 MDS 和 PDI。结果显示, 与 0 h 相比, MDS 和 PDI 在 24 h 内的各时间点变化差异无统计学意义

($P > 0.05$), 在 48 h 的变化差异存在统计学意义 (P 均 < 0.05)。激光纳米粒度仪测定出溶液中不同粒径大小的乳粒数目^[10], 结果显示, 48 h 内新生儿标准化 TNA 没有大于 $5\ \mu\text{m}$ 的乳粒, 且随着放置时间的延长, 乳粒分布向右偏移, 具体结果见表 3、图 2。

3.5 渗透压的测定

在 5 个时间点取样, 测定新生儿标准化 TNA 的渗透压, 结果显示, 48 h 内该 TNA 的渗透压无明显变化, 且各个时间点与 0 h 相比, 变化差异无统计学意义, 结果见表 3。

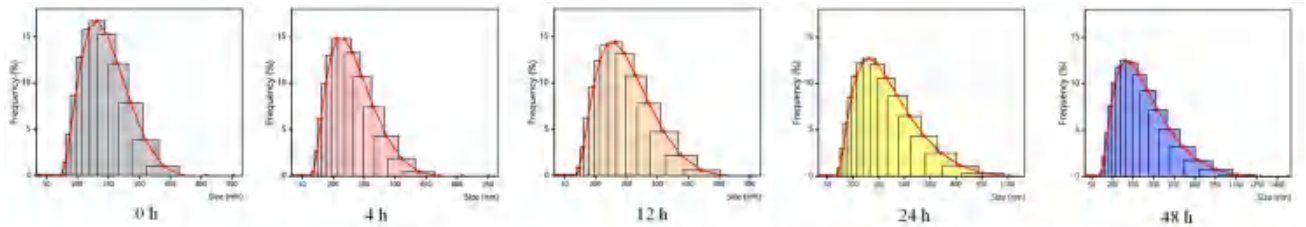


图 2 新生儿标准化 TNA 的粒径分布
Fig 2 Particle size distribution of the standardised TNA formulations

3.6 不溶性微粒的检查

根据《中国药典》2020 年版通则 0903 中不溶性微粒检测的方法分别测定 5 个时间点每毫升新生儿标准化 TNA 中直径 $\geq 10\ \mu\text{m}$, $\geq 25\ \mu\text{m}$ 的

不溶性微粒数, 结果显示, 48 h 内新生儿标准化 TNA 的不溶性微粒数均符合《中国药典》的要求, 且差异无统计学意义, 结果见表 3。

表 3 新生儿标准化 TNA 的 pH、MDS、PDI、渗透压、不溶性微粒数测定结果 ($n = 3$, $\bar{x} \pm s$)
Tab 3 pH, MDS, PDI, osmolality, number of insoluble particles of the standardised TNA formulations ($n = 3$, $\bar{x} \pm s$)

时间 /h	pH	MDS/nm	PDI	渗透压 / (mOsm · L ⁻¹)	不溶性微粒 / (个 · mL ⁻¹)	
					$\geq 10\ \mu\text{m}$	$\geq 25\ \mu\text{m}$
0	6.36 ± 0.051	251.13 ± 17.707	0.120 ± 0.015	999 ± 8.888	0.078 ± 0.042	0.028 ± 0.010
4	6.34 ± 0.030	249.57 ± 13.306	0.129 ± 0.008	994 ± 3.606	0.089 ± 0.042	0.017 ± 0.029
12	6.33 ± 0.044	257.13 ± 12.745	0.141 ± 0.025	992 ± 5.774	0.077 ± 0.000	0.013 ± 0.011
24	6.27 ± 0.046	288.63 ± 7.703	0.153 ± 0.021	995 ± 3.000	0.056 ± 0.010	0.011 ± 0.010
48	6.25 ± 0.042*	304.60 ± 35.400*	0.177 ± 0.010**	996 ± 6.083	0.05 ± 0.017	0.033 ± 0.033

注 (Note): 与 0 h 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Compared with the 0 h, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

3.7 无菌度检查

5 个时间点取样的新生儿标准化 TNA, 经培养均未发现菌落生长, 符合《中国药典》2020 年版对于静脉输液的要求。

4 讨论

新生儿标准化 TNA 是某院根据国内外新生儿肠外营养治疗指南推荐设计的, 它的组成配比固

定, 具有开具方便、适合多数患儿、能有效降低处方差错和提高药师调配效率等特点。目前国内已有上市使用的针对成人的标准化 TNA。但是, 对于儿童尤其是新生儿还未有统一的标准。本研究旨在考察该新生儿标准化 TNA 的稳定性, 以期临床新生儿标准化 TNA 的安全使用提供依据。

研究结果显示, 在 48 h 内新生儿标准化 TNA

外观无絮凝、分层等现象,加入油性染料苏丹红染色后,也未发生扩散现象,说明该 TNA 在 48 h 内室温避光条件下,外观稳定性良好,脂肪乳未发生破乳的情况。

TNA 的 pH 除了应该在人体血液的缓冲能力范围之内,还不能破坏营养液中各组分的结构。pH 值在 5~6.5 脂肪乳结构是稳定的^[11];当 pH<5 时,脂肪颗粒表面磷脂分子会发生电离,负电位降低,导致脂肪乳结构受到破坏^[12];当 pH>6.5 时,发生钙磷沉淀的可能性会增加,同时 pH 的升高还会破坏维生素 C 的结构^[13]。本研究中的新生儿标准化 TNA 的 pH 48 h 内在 6.25~6.36 波动,TNA 各组分的结构是稳定的。

新生儿的毛细血管的内径为 3~5 μm,如果在静脉输液中含有大于 5 μm 的微粒,将会导致新生儿血管堵塞^[14]。《中国药典》2020 年版规定静脉用乳状液型注射液中 90% 乳滴的粒度应小于 1 μm,并不得有大于 5 μm 的乳滴。因此,为保证营养治疗的安全性,必须确保输入的 TNA 中乳粒粒径不得大于 5 μm^[9]。本研究中的新生儿标准化 TNA 在 48 h 内的 MDS 在 251.1~304.6 nm,符合《中国药典》对乳粒粒径的要求。从 PDI 的结果来看,48 h 内的数值均小于 0.2,说明该 TNA 的乳粒在 48 h 内分散性均较好^[8, 11]。随着时间的增加,在 48 h 时,新生儿标准化 TNA 的 MDS 和 PDI 的数值与 0 h 相比,差异有统计学意义,并且乳粒分布也随着放置时间的增加向右偏移,说明时间越长,新生儿标准化 TNA 中的乳粒 MDS、PDI 增大越显著,提示体系脂肪乳稳定性降低。

渗透压与静脉炎发生率有明显的相关性,渗透压越高,静脉刺激越明显^[15],本研究中的新生儿标准化 TNA 48 h 内渗透压在 992~999 mOsm·L⁻¹波动,这一数值与理论计算值保持一致。通常情况下,当静脉输液的渗透压超过 900 mOsm·L⁻¹,临床上会建议使用中心静脉输入^[14]。因此新生儿科使用新生儿标准化 TNA 进行营养支持治疗时,通常使用中心静脉输入(新生儿通常以脐静脉为主)。

《中国药典》2020 年版还规定静脉输入的液体,每毫升中含≥10 μm 的不溶性微粒数应≤12 粒,含≥25 μm 的不溶性微粒数应≤2 粒,本研究中的新生儿标准化 TNA 48 h 内不溶性微粒数符合药典

要求,且经过观察,在 48 h 内溶液中无菌落生长。

综上,某院设计的适合日龄>3 d,体重<1500 g 的新生儿患者使用的新生儿标准化 TNA,在临床使用条件下稳定性良好,可进一步推广应用。

参考文献

- [1] Mihatsch W, Shamir R, Goudoever JB, et al. ESPGHAN/ESPEN/ESPR/CSPEN guidelines on pediatric parenteral nutrition: Guideline development process for the updated guidelines [J]. Clin Nutr, 2018, 37 (6PtB): 2306-2336.
- [2] 蔡威,汤庆娅,王莹,等.中国新生儿营养支持临床应用指南[J].临床儿科杂志,2013,31(12):1177-1182.
- [3] National institute for health and care excellence. Neonatal parenteral nutrition. NICE guideline [EB/OL] (2020-02-26) [2024-09-14]. <https://www.nice.org.uk/guidance/ng154>.
- [4] Robinson DT, Calkins KL, Chen Y, et al. Guidelines for parenteral nutrition in preterm infants: the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition [J]. Parenter Enteral Nutr, 2023, 47 (7): 830-858.
- [5] 邵天伟,唐仕芳,陈龙,等.2020 年澳洲新生儿肠外营养标准化配方指南更新要点解读[J].重庆医学,2021,50(13):2161-2164.
- [6] Simmer K, Rakshasbhuvarkar A, Deshpande G. Standardised parenteral nutrition [J]. Nutrients, 2013, 5 (4): 1058-1070.
- [7] 安龙,王汝涛,赵雯,等.不同浓度脂肪乳注射液在全合一营养液中的稳定性研究[J].中国药业,2011,20(21):16-18.
- [8] 周欣,王秀荣,翟所迪.“全合一”静脉营养液与胶体溶液配伍的稳定性研究[J].中南药学,2008,16(6):711-714.
- [9] 中国药典 2020 年版.四部[S].2020:114.
- [10] Lobo BW, da Veiga VF, Cabral LM, et al. Influence of the relative composition of trace elements and vitamins in physicochemical stability of total parenteral nutrition formulations for neonatal use [J]. Nutrition Journal, 2012, 11 (1): 26.
- [11] 邓树荣,金伟军.新生儿全营养混合液的稳定性研究和处方分析[D].广州:暨南大学,2015.
- [12] 刘海雄,邓树荣.多种脂肪乳注射液在全营养混合液中稳定性比较[J].中国药业,2022,31(22):50-53.
- [13] 王晶,赵瑞玲.不同水溶性维生素对新生儿肠外营养液稳定性和临床疗效的影响研究[D].太原:山西医科大学,2019.
- [14] Timmer JG, Schipper HG. Peripheral venous nutrition: the equal relevance of volume load and osmolarity in relation to phlebitis [J]. Clin Nutr, 1991, 10 (2): 71-75.
- [15] 赵彬,老东辉,商永光.规范全营养混合液配制[J].协和医学杂志,2018,9(4):320-331.

(收稿日期:2024-09-15;修回日期:2024-11-15)

营养支持治疗药学监护系统的临床实践评价

王伟娇^{1, 2}, 朱虚阳^{1, 2}, 刘文凯^{1, 2}, 秦侃^{1, 2*} (1. 安徽医科大学药学院, 合肥 230061; 2. 安徽医科大学第三附属医院药学部, 合肥 230061)

摘要: **目的** 评价营养支持治疗药学监护系统, 探究信息化管理在营养治疗及药学监护中的意义。**方法** 选取 2022 年 9 月至 2024 年 4 月接受营养支持治疗的住院患者 109 例, 根据实际情况分为软件系统管理的药学监护组 (A 组, 55 例) 及人工管理的药学监护组 (B 组, 54 例), 分析软件系统在营养支持治疗和药学监护中的作用。**结果** A 组肠外营养 (PN) 个体化处方平均制订时间为 (3.3 ± 1.1) min, 明显少于 B 组 $[(25.0 \pm 4.7)$ min, $P < 0.05$]; A 组个体化 PN 处方不合理率为 0%, 显著低于 B 组 (16.7%, $P < 0.05$); 药学监护期间, A 组患者出现肝功能指标、电解质、血糖波动的发现率为 100.0%, 显著高于 B 组 (57.1%, $P < 0.05$)。**结论** 营养支持治疗药学监护系统可缩短营养支持药师 (NSP) 制订个体化 PN 处方时长, 减少不合理处方, 协助 NSP 监护和干预, 提高患者异常指标的发现率, 改善营养支持疗效。

关键词: 营养支持; 药学监护; 信息系统; 评价研究

中图分类号: R96, R969.3 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)04-1094-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.033

Clinical practice evaluation of pharmaceutical monitoring system for nutritional support therapy

WANG Wei-jiao^{1, 2}, ZHU Xu-yang^{1, 2}, LIU Wen-kai^{1, 2}, QIN Kan^{1, 2*} (1. School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230061; 2. Department of Pharmacy, the Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230061)

Abstract: Objective To evaluate the pharmaceutical monitoring system for nutritional support therapy and information management in nutritional therapy and pharmaceutical care. **Methods** Totally 109 hospitalized patients receiving nutritional support therapy from September 2022 to April 2024 were selected. Based on actual conditions, they were divided into a software system-managed pharmaceutical care group (group A, 55 patients) and a manually managed pharmaceutical care group (group B, 54 patients). The role of software system in nutritional support therapy and pharmaceutical care was determined. **Results** The average time for parenteral nutrition (PN) prescription in group A was (3.3 ± 1.1) min, which was shorter than that in group B $[(25.0 \pm 4.7)$ min, $P < 0.05$]. The rate of unreasonable individualized PN prescriptions in group A was 0%, while a much higher rate of 16.7% in group B ($P < 0.05$). During the pharmaceutical care period, the detection rate of liver function indicators, electrolytes, and dysglycemia in group A was 100.0%, while that in group B was 57.1% ($P < 0.05$). **Conclusion** The pharmaceutical monitoring system for nutritional support therapy can reduce the time needed of individualized PN prescription, reduce unreasonable prescriptions, facilitate monitoring and intervention, and improve the detection rate of abnormal indicators of the patients.

Key words: nutrition support; pharmaceutical monitoring; information system; evaluation

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

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

营养风险与住院期延长、术后并发症、总生存期和无病生存期紧密相连,营养支持治疗对营养不良的住院患者具有重要意义^[1]。我国住院患者的营养风险发生率为 17.8%,营养不良率为 11.6%^[2]。在临床实践中,个体化营养支持治疗需求大、营养药品种类繁多、营养支持药师(nutrition support pharmacists, NSP)不足,医师凭经验开具处方的现象常见,营养支持治疗往往达不到效果,甚至存在用药安全问题。相关文献证实,信息技术在营养风险筛查^[3-5]、营养评估^[6]、个体化营养方案制订^[7]中可发挥积极作用。我院自主开发了营养支持治疗药学监护系统,可覆盖营养支持中营养风险筛查至营养药学监护的全过程。NSP 可以根据软件系统里显示的患者基本信息、生理生化检查结果等为患者进行营养风险筛查、评估;软件系统基于相关指南如中华医学会肠外肠内营养学分会《中国成人患者肠外肠内营养临床应用指南(2023 版)》、中国抗癌协会肿瘤营养与支持治疗专业委员会《中国肿瘤营养治疗指南(2020 版)》等设定营养计算公式和营养处方审核要点,自动审核肠外营养(PN)处方中氨基酸、葡萄糖、脂肪乳、维生素、微量元素、电解质配比是否合理,协助 NSP 为患者制订更准确的个体化 PN 治疗方案;在营养药学监护期间,患者检查检验报告更新、生命体征变化或使用的某药物与营养药品发生可能的不良相互作用时,软件系统以弹窗的形式提醒 NSP,NSP 查看后决定是否需要调整营养治疗方案或用药方案。该系统应用于临床后,尚未与传统药学监护模式对比,信息化手段的药学监护模式的作用和优势亟待证实。本文以我院自主开发的营养药学监护系统应用为例,从个体化 PN 治疗及药学监护方面进行评价,以期为营养治疗信息化管理提供理论依据和思路。

1 研究对象

选取 2022 年 9 月至 2024 年 4 月在本院接受 PN 治疗的 109 例患者为研究对象。纳入标准:① 年龄 18~85 岁;② NRS2002 评分 ≥ 3 分;③ 无严重肝肾功能损伤或感染性疾病;④ NSP 参与制订个体化 PN 治疗方案且全程参与营养药学监护;⑤ 患者无法使用肠内营养(EN)支持或 EN 供给能量 $<$ 目标能量的 60%[目标能量以 104.65~125.58 kJ/(kg·d)]进行估算,肥胖患者采用矫正体重,矫正体重=理想体重+(实际体重-理想体重) $\times 0.33$ [理想体重是指体质量指数(BMI)为 25 kg·m⁻²的体重^[8]];⑥ PN 治疗 ≥ 7 d 且治疗前、中、后的生化指标记录完整。排除标准:① 年龄 < 18

岁或 > 85 岁;② NRS2002 评分 < 3 分;③ 有严重肝肾功能损伤或感染性疾病患者;④ NSP 未参与营养方案制订或 NSP 未能全程监护;⑤ 患者可以使用 EN 且 EN 供给能量 $>$ 目标能量 60%;⑥ PN 治疗 < 7 d 或治疗前、中、后的生化指标缺失。本研究已通过医院伦理委员会批准(伦研批 2024-295-01 号),并申请通过免除知情同意书。

2 研究方法

2.1 住院患者营养支持治疗

患者入院后使用营养风险筛查表 NRS2002 进行营养风险筛查,使用主观整体评估(SGA)、患者主观整体评估(PG-SGA)等工具进行营养评估,营养不良且不能使用 EN 的患者,根据其个人营养、疾病情况制订个体化 PN 治疗方案。输注时规范选择静脉导管途径,治疗期间标准化维护患者静脉导管,尽量避免相关感染并发症的风险。监护期间,若患者出现电解质、血糖代谢紊乱或肝功能损伤,NSP 及时干预,必要时调整 PN 处方,给予患者相应治疗。软件系统管理的药学监护组为 A 组,人工管理的药学监护组为 B 组,具体流程见图 1。

2.2 资料收集

① 一般资料:患者的性别、年龄、诊断、慢性病史、入院 NRS2002 评分;② A、B 组的 PN 组方耗时、不合理处方;③ 生化指标:PN 治疗前、中、后患者的营养指标白蛋白(ALB)、总蛋白(TP),非特异性炎症指标 C 反应蛋白(CRP),肝功能指标谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、总胆红素(TBIL),肾功能指标尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、尿酸(UA),电解质、血糖水平;④ 监护期间 NSP 的营养干预(调整 PN 处方、改变输液速度);⑤ 患者住院天数、营养支持天数、营养相关并发症(胃肠道不耐受、感染性疾病、肝功能损伤情况如胆汁淤积)。

2.3 处方点评

根据《中国成人患者肠外肠内营养临床应用指南(2023 版)》和 PN 治疗相关文献指导^[9-10],从能量供给、稳定性、配比合理性这几个角度点评 PN 处方。能量供给不合理指无特殊原因总能量 > 125.58 kJ/(kg·d);脂肪供给不在 1.0~1.5 g/(kg·d)内;葡萄糖供给不在 3.0~5.0 g/(kg·d)内;蛋白质供给不在 1.2~1.5 g/(kg·d)内,肿瘤患者蛋白供给不在 1.0~2.0 g/(kg·d)内,肥胖患者以矫正体重进行计算。稳定性不合理指处方指总氨基酸包括丙氨酰谷氨酰胺浓度 $\leq 2.5\%$;一



图1 两组住院患者营养支持治疗药学监护流程

Fig 1 Pharmaceutical care process of nutritional support therapy for inpatients in the two groups

注 (Note): 医院信息系统 (hospital information system, HIS)。

价阳离子浓度 $\geq 150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 二价阳离子浓度 $\geq 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; Ca^{2+} 与维生素 C 在同一处方。配比不合理指热氮比不在 $(80 \sim 300):1$ 内; 糖脂比不在 $4:6 \sim 7:3$ 内; 脂肪供能 $> 60\%$; 丙氨酰谷氨酰胺占 PN 中氨基酸比例 $> 30\%$ 。

2.4 数据处理

使用 SPSS 27.01 统计软件对数据进行分析, 计量资料符合或近似正态分布用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 不符合则用中位数及四分位数 [$M(P_{25}, P_{75})$] 表示, 统计方法选择独立样本 t 检验或者 Wilcoxon Mann Whitney 非参数检验; 计数资料用 [$n(\%)$] 表示, 统计方法选择卡方检验或 Fisher 确切概率法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般资料比较

共收集病例 109 例, 其中 A 组 55 例, B 组 54 例。按照纳排标准筛选的患者 90% 为消化系统疾病包括消化系统肿瘤、胆管损伤、胆结石、胰腺炎等, 因此在患者诊断划分以消化系统疾病和其他疾病进行划分。在入组患者合并疾病中高血压、糖尿病占前两位, 且制订 PN 处方需考虑电解质对高血压患者的影响, 葡萄糖和胰岛素对糖尿病患者的影响, 营养支持期间需监测患者尤其糖尿病患者血糖波动情况, 因此在患者合并疾病中比较了高血压、糖尿病。A 组和 B 组的基线资料各项内容比较, 差异均无统计学意义 (见表 1)。

表 1 两组患者基线资料

Tab 1 Baseline data of the two groups

组别	性别 (男/女)	年龄 / 岁 ($\bar{x} \pm s$)	诊断 (消化系统疾病 / 其他疾病)	NRS2002 评分 [$M(P_{25}, P_{75})$]	糖尿病 / [$n(\%)$]	高血压 / [$n(\%)$]
A 组 ($n = 55$)	38/17	71.9 $\pm$ 10.0	52/3	4.0 (3, 5)	11 (20)	21 (38.2)
B 组 ($n = 54$)	40/14	68.1 $\pm$ 11.6	46/8	4.0 (3, 5)	9 (16.7)	23 (42.6)
$\chi^2/F/Z$	0.332	1.919	2.631	— 0.064	0.202	0.220
P 值	0.564	0.075	0.105	0.949	0.653	0.639

3.2 PN 组方耗时及不合理处方比较

A 组个体化 PN 的组方耗时 (3.3 ± 1.1) min, 显著少于 B 组的耗时 (25.0 ± 4.7) min; 两组不合

理处方比较, A 组未出现不合理处方, B 组共出现 9 张不合理处方, 不合理处方率为 16.7%, A 组不合理处方率小于 B 组 ($P < 0.05$, 见表 2)。

表 2 两组个体化 PN 组方耗时与不合理处方分析

Tab 2 Individualized PN prescriptions and irrational prescriptions of the two groups

组别	组方耗时 / min	总不合理处方 / [$n(\%)$]	能量供给不足 / [$n(\%)$]	稳定性不合理 / [$n(\%)$]	配比不合理 / [$n(\%)$]
A 组 ($n = 55$)	3.3 $\pm$ 1.1	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
B 组 ($n = 54$)	25.0 $\pm$ 4.7	9 (16.7)	2 (3.7)	7 (13.0)	3 (5.6)
F	8.085				
P	< 0.001	$< 0.001^*$			

注: * 表示采用 Fisher 确切概率法。

Note: * Indicates Fisher's exact probability method.

3.3 营养药学监护效果比较

3.3.1 两组生化指标对比 A、B 组患者接受 PN 治疗前各项指标差异无统计学意义。经个体化 PN

治疗后, A 组患者 ALT 水平较治疗前升高, CRP、CR、UA 水平较治疗前降低 ($P < 0.05$), 其他指标 TBIL、TP、BUN 较治疗前有所改善; B 组患者

CR、UA 水平较治疗前降低 ($P < 0.05$), 其他各项指标 TBIL、ALB、TP、CRP 较治疗前有所改善。治疗后 A、B 两组组间对比, 各指标差异无统计学意义 (见表 3)。

表 3 两组患者生化指标 [$M(P_{25}, P_{75})$]
Tab 3 Physiological indexes of the two groups [$M(P_{25}, P_{75})$]

组别	时间	ALT/ ($U \cdot L^{-1}$)	AST/ ($U \cdot L^{-1}$)	TBIL/ ($\mu mol \cdot L^{-1}$)	ALB/ ($g \cdot L^{-1}$)	TP/ ($g \cdot L^{-1}$)	CRP/ ($\mu mol \cdot L^{-1}$)	BUN/ ($mmol \cdot L^{-1}$)	CR/ ($\mu mol \cdot L^{-1}$)	UA/ ($\mu mol \cdot L^{-1}$)
A 组	治疗前	15 (11.2, 22)	22 (15.7, 29.9)	11.5 (8.7, 19.1)	34.6 (32.0, 39.6)	60.9 (56.2, 66.5)	26.6 (6.5, 51.7)	6.14 (5.1, 8.3)	73.8 (61.7, 88.0)	259.9 (203.5, 337.0)
	治疗后	23.80 (17, 32.1)	23.0 (18, 36.2)	10.4 (6.6, 15.5)	34.4 (31.6, 37.9)	62.6 (58.6, 66.4)	12.4 (6.8, 23.5)	5.9 (5.0, 7.4)	63.0 (51.0, 73.0)	184.0 (130.0, 252.0)
B 组	治疗前	17.0 (11.2, 30.7)	20.2 (14.5, 40.8)	11.9 (7.4, 20.6)	37.5 (29.9, 42.0)	61.3 (55.5, 67.1)	18.8 (4.2, 56.2)	6.0 (4.6, 9.2)	74.2 (59.6, 93.6)	261.5 (212.3, 358.8)
	治疗后	23.4 (12.8, 37.3)	21.8 (15.9, 32.1)	10.0 (7.6, 14.0)	34.7 (32.1, 37.5)	60.8 (55.9, 65.6)	14.0 (5.7, 25.3)	6.6 (5.5, 7.8)	63.2 (48.8, 75.0)	222.4 (166.8, 271.8)
A 组	Z_1 (治疗前后)	-3.067	-1.118	-1.557	-0.613	-0.702	-2.071	-0.816	-2.987	-3.515
	P_1 (治疗前后)	0.002	0.264	0.119	0.540	0.482	0.038	0.414	0.003	< 0.001
B 组	Z_1 (治疗前后)	-1.505	-0.172	-1.124	-1.078	-0.307	-0.636	-0.651	-2.633	-2.747
	P_1 (治疗前后)	0.132	0.863	0.261	0.281	0.759	0.525	0.515	0.008	0.006
A、B 组	Z_2 (治疗前)	-0.664	-0.218	-536	-0.906	-0.064	-0.861	-0.058	-0.136	-0.776
	P_2 (治疗前)	0.507	0.827	0.592	0.365	0.949	0.389	0.954	0.892	0.438
A、B 组	Z_3 (治疗后)	-0.045	-1.133	-0.021	-0.255	-1.061	-0.021	-1.594	-0.094	-1.452
	P_3 (治疗后)	0.964	0.257	0.983	0.799	0.289	0.983	0.111	0.925	0.147

3.3.2 营养药学监护中干预行为比较 PN 常见并发症中肝功能损伤、电解质紊乱、血糖波动可通过患者生化检查结果显示, 软件系统可及时将患者最新的生化检查结果提醒给 NSP, 因此本研究从患者的肝功能指标、电解质、血糖水平这三方面比较两组 NSP 在监护中的干预行为。发现率是指监护期间 NSP 发现患者出现异常指标例数与患者实际出现异常的例数之比, 干预率是监护期间 NSP 实际进行的营养干预与应行营养干预之比。在临床实践中, 不是每一次患者的异常指标都需营养干预, 因此两

组患者异常指标实际出现数不等于 NSP 应行营养干预数。A 组患者中出现异常肝功能指标 6 例, 电解质紊乱 3 例, 血糖波动 2 例, 实际出现共 11 例异常指标, NSP 发现 11 例, 发现率为 100%; 应行干预 8 例, NSP 实际干预 8 例, 干预率达 100%。B 组患者共出现 14 例异常值指标, 其中肝功能指标异常 8 例, 电解质紊乱 3 例, 血糖波动 3 例, NSP 共发现 8 次, 发现率 57.1%; NSP 应行干预 10 次, 实际干预了 6 例, 干预率 60.0%。A 组患者异常情况发现率显著高于 B 组 ($P < 0.05$, 见表 4)。

表 4 两组患者营养药学监护中干预行为

Tab 4 Intervention behaviors in nutritional pharmaceutical care of the two groups

生化检查结果	组别	实际出现数 / (n)	监护中 NSP 发现数 / [n (%)]	NSP 应行营养干预数 / (n)	NSP 实际营养干预数 / [n (%)]
肝功能指标异常	A 组	6	6 (100.0)	4	4 (100.0)
	B 组	8	4 (50.0)	5	2 (40.0)
电解质紊乱	A 组	3	3 (100.0)	2	2 (100.0)
	B 组	3	2 (66.7)	2	2 (100.0)
血糖波动	A 组	2	2 (100.0)	2	2 (100.0)
	B 组	3	2 (66.7)	3	2 (66.7)
汇总	A 组	11	11 (100.0)	8	8 (100.0)
	B 组	14	8 (57.1)	10	6 (60.0)
P			0.020*		0.092*

注: *表示采用 Fisher 确切概率法。

Note: *Indicates Fisher's exact probability method.

3.3.3 两组患者临床结局比较 个体化 PN 治疗期间, A、B 两组患者营养支持相关并发症的差异无统计学意义, 在经过 PN 治疗及营养药学监

护后, A、B 两组患者的住院时长、PN 使用时长差异无统计学意义 (见表 5)。

表 5 两组患者临床结局
Tab 5 Clinical outcomes of the two groups

组别	住院时长 /d [<i>M</i> (<i>P</i> ₂₅ , <i>P</i> ₇₅)]	PN 使用时长 /d [<i>M</i> (<i>P</i> ₂₅ , <i>P</i> ₇₅)]	营养支持相关并发症 /[<i>n</i> (%)]	胃肠道不耐受 / [<i>n</i> (%)]	肝功能损害 / [<i>n</i> (%)]	感染性疾病 / [<i>n</i> (%)]
A 组 (<i>n</i> = 55)	24 (18, 32)	11 (7, 14)	5 (9.1)	3 (5.5)	1 (1.8)	1 (1.8)
B 组 (<i>n</i> = 54)	24 (16.8, 31)	12.5 (9, 16)	7 (13.0)	3 (5.6)	3 (5.6)	1 (1.9)
<i>Z/c</i> ²	− 0.628	− 1.874	0.417			
<i>P</i>	0.530	0.061	0.518			

4 讨论

4.1 有效缩短 PN 处方的制订时间

接受营养支持治疗的患者病情、营养状态、生理情况不同，对营养素的选择、能量需求也不相同，应为患者制订个体化的营养支持方案。Schuetz 等^[11]在营养风险的内科患者中开展的研究指出，与使用标准医院食品组相比，个体化营养支持组患者的临床结局如生存率可得到有效改善。而临床开展个体化 PN 组方工作往往耗时长，覆盖面较窄，如何优化一直是临床的关注点。本研究比较了两组个体化 PN 组方耗时，结果显示 NSP 个体化 PN 组方耗时 (25.0±4.7) min，利用软件系统个体化 PN 组方耗时 (3.3±1.1) min，软件系统的应用大幅缩短了个体化 PN 处方制订时长 (*P* < 0.05)。张静等^[12]的研究也得出一致结论，临床药师应用肠外肠内营养处方系统后，开立处方时间明显缩短，平均处方开立时间由 (27.3±6.1) min 缩短至 (2.6±0.3) min。软件系统缩短 NSP 制订个体化 PN 处方时间，从而可为更多的患者制订个体化 PN 治疗。

4.2 有效增强 PN 处方合理性

在 PN 处方制订中，NSP 要根据患者情况合理选择营养药品，如癌症术后患者选择多种脂肪乳有更好的临床意义^[13]；要计算患者每日能量需求和 PN 处方中葡萄糖、氨基酸、脂肪乳、维生素、电解质等各营养药品添加量；要考虑到营养液中电解质浓度是否会影响脂肪乳的稳定性，处方的热氮比、糖脂比、糖胰比、丙氨酰谷氨酰胺占总氨基酸质量比等各营养的配比情况^[14]。整个过程计算复杂，多种因素要考虑，人工组方难免出现问题。软件系统根据录入的指南、设定的算法协助 NSP 组方，若 NSP 制订的 PN 处方不合理，系统可提醒 NSP 修改，对处方中营养药品添加提供意见。B 组共出现 9 张不合理 PN 处方，不合理率为 16.7%，计算处方中的一价阳离子、二价阳离子浓度复杂，人工计算易出错，因此稳定性不合理的处方最多，出现 7 次。A 组 NSP 使用软件系统制订的 PN 处方不合理率为 0.0%，表

明软件系统可改善 PN 处方合理性，进一步保障患者用药安全。Abbassi 等^[15]研究信息技术在 PN 处方中的作用，构建了软件系统，发现利用软件后 PN 处方错误由 379 个减少至 147 个，减少了 61.2%。与本研究结果一致，软件系统减少不合理处方，提高 PN 处方准确性，提高患者营养支持治疗的安全性。

4.3 有效协助 NSP 进行药学监护

患者在接受营养支持治疗后，可能出现胃肠道不耐受或代谢不耐受，甚至严重营养不良或长期饥饿的患者有再喂养综合征 (RFS) 的风险^[16]，长期使用 PN 的患者出现感染性并发症、肝功能损伤、肠黏膜屏障功能损伤、电解质紊乱的风险很高。因此，NSP 有必要为接受营养支持治疗的患者进行药学监护。ALB、TP 可反映住院患者的营养状况^[17-18]，ALB 浓度低于 34 g·L⁻¹ 是患者死亡率的重要预测因素，营养治疗的患者 ALB 水平需密切监测^[19]。ALT、AST、TBIL 可反映肝功能是否损伤；CRP 可反映患者炎症水平；BUN、CR、UA 可反映患者肾的功能。两组患者接受营养支持治疗前、后各项生化指标差异无统计学意义，临床结局包括住院时长、营养支持时长、营养相关并发症差异也无统计学意义。这可能与两组患者都使用 NSP 为其制订个体化 PN 治疗方案，且在接受 PN 治疗期间，NSP 都对其进行监护与干预有关；也可能因为研究的样本量不足，软件系统对患者生化指标和临床结局的影响未完整显现，后期还需进一步大规模临床试验。

本研究中，患者出现异常的肝功能指标、电解质、血糖时，仅靠 NSP 人工的发现率为 57.1%，软件系统可协助 NSP 100% 发现，结合两组患者临床结局，A 组出现肝功能损伤 1 例，少于 B 组的 3 例。这表明软件系统协助 NSP 密切监护患者生化指标，从而降低患者在营养治疗期间出现营养相关并发症的风险，提高营养支持治疗效果。从 NSP 角度考虑，软件系统可 100% 协助 NSP 发现出现异常情况的患者，减轻了 NSP 的工作负担，也为能够监护

更多患者提供可能。Heuft 等^[20]在营养监护过程中设计出的算法可根据患者异常指标协助药师判断是否患有 RFS, 这一算法改善了 RFS 的识别, 有助于 RFS 患者后续的治疗和管理。

5 结论

营养支持治疗药学监护系统的应用可缩短 NSP 制订 PN 处方时间, 提高工作效率, 可为更多患者制订个体化营养治疗方案, 减少不合理 PN 处方, 提高处方准确性, 提高营养支持治疗安全性; 可协助 NSP 实时监护接受营养支持治疗的患者, 减轻 NSP 工作负担, 提高患者异常情况发现率, 改善营养支持治疗效果。综上, 软件系统在营养支持治疗的临床实践中发挥积极作用, 是改善营养支持治疗现状, 促进营养支持治疗发展的动力。

参考文献

- [1] Serón-Arbeloa C, Labarta-Monzón L, Puzo-Foncillas J, et al. Malnutrition screening and assessment [J]. *Nutrients*, 2022, 14 (12): 2392.
- [2] Song DH, Zhang L, Zhang Y, et al. Risk factors for inpatient malnutrition and length of stay assessed by 'NutritionDay' in China [J]. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2022, 31 (3): 561-569.
- [3] Yalcin N, Kasikci M, Celik HT, et al. Development and validation of machine learning-based clinical decision support tool for identifying malnutrition in NICU patients [J]. *Sci Rep*, 2023, 13 (1): 5227.
- [4] 任爱群. 智能化营养风险筛查系统在新入院患者中的应用 [A]/ 2018 浙江省医学会肠外肠内营养学学术年会论文摘要汇编 [C]. 温州市第三人民医院, 2018.
- [5] 傅唯佳, 顾莺, 杨玉霞, 等. 先天性心脏病患儿营养风险筛查及评估循证决策支持系统的构建与应用 [J]. *中华护理杂志*, 2023, 58 (17): 2059-2066.
- [6] Yin LY, Song CH, Cui JW, et al. A fusion decision system to identify and grade malnutrition in cancer patients: machine learning reveals feasible workflow from representative real-world data [J]. *Clin Nutr*, 2021, 40 (8): 4958-4970.
- [7] Ziemba KJ, Kumar R, Nuss K, et al. Clinical decision support tools and a standardized order set enhances early enteral nutrition in critically ill children [J]. *Nutr Clin Pract*, 2019, 34 (6): 916-921.
- [8] Thibault R, Abbasoglu O, Ioannou E, et al. ESPEN guideline on hospital nutrition [J]. *Clin Nutr*, 2021, 40 (12): 5684-5709.
- [9] 郭瑶尝, 袁媛, 张锦松, 等. 肠外营养自定义审方规则的建立及效果评价 [J]. *中国医院药学杂志*, 2021, 41 (24): 2577-2581.
- [10] 丛明华. 肠外营养安全管理中国专家共识 [J]. *肿瘤代谢与营养电子杂志*, 2021, 8 (5): 495-502.
- [11] Schuetz P, Fehr R, Baechli V, et al. Individualised nutritional support in medical inpatients at nutritional risk: a randomised clinical trial [J]. *Lancet*, 2019, 393 (10188): 2312-2321.
- [12] 张静, 乔高星, 康健, 等. 肠内肠外营养处方设计系统的开发和应用 [J]. *中国医院药学杂志*, 2024, 44 (5): 598-601.
- [13] 王小芊, 秦侃. 多种油脂脂肪乳对癌症患者术后非特异性炎症、肝功能和营养状态的影响 [J]. *中南药学*, 2024, 22 (1): 24-29.
- [14] 潘庆善, 陈盼盼, 叶群杰, 等. 某院胃肠外科肠外营养用药医嘱点评与合理性分析 [J]. *贵州医药*, 2024, 48 (8): 1286-1288.
- [15] Abbassi A, Hasni N, Ben HE. Impact of computerized physician order entry system on parenteral nutrition medication errors in a teaching neonatal intensive care unit [J]. *Ann Pharm Fr*, 2022, 80 (6): 819-826.
- [16] Hill A, Elke G, Weimann A. Nutrition in the intensive care unit-a narrative review [J]. *Nutrients*, 2021, 13 (8): 2851.
- [17] Zhang ZY, Pereira SL, Luo MH, et al. Evaluation of blood biomarkers associated with risk of malnutrition in older adults: a systematic review and meta-analysis [J]. *Nutrients*, 2017, 9 (8): 928.
- [18] Lee B, Han HS, Yoon YS, et al. Impact of preoperative malnutrition, based on albumin level and body mass index, on operative outcomes in patients with pancreatic head cancer [J]. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 2021, 28 (12): 1069-1075.
- [19] Eckart A, Struja T, Kutz A, et al. Relationship of nutritional status, inflammation, and serum albumin levels during acute illness: a prospective study [J]. *Am J Med*, 2020, 133 (6): 713-722.
- [20] Heuft L, Voigt J, Selig L, et al. Development, design and utilization of a CDSS for refeeding syndrome in real life inpatient care-a feasibility study [J]. *Nutrients*, 2023, 15 (17): 3712.

(收稿日期: 2024-10-30; 修回日期: 2024-12-30)

药物分析与检验

UPLC-MS/MS 法同时测定卷柏中 6 种双黄酮和炔酚的含量

温静^{1, 2}, 倪帅聪^{3, 4}, 王婷^{1, 2}, 阎新佳^{3, 4*} (1. 四川中医药高等专科学校药学院, 四川 绵阳 621000; 2. 绵阳市中药资源开发利用重点实验室, 四川 绵阳 621000; 3. 西南民族大学 药学与食品学院, 成都 610041; 4. 四川省羌彝药用资源保护与利用技术工程实验室, 成都 610225)

摘要: 目的 建立同时测定不同产地卷柏中穗花杉双黄酮、扁柏双黄酮、selaginellin、selaginellin A、selaginellin M 和 selaginellin E 含量的方法。方法 采用超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用 (UPLC-MS/MS) 法: 色谱柱为 Waters Acquity UPLC BEH C18 柱, 以乙腈-0.1% 甲酸水溶液为流动相梯度洗脱, 流速为 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温: 30°C 。采用电喷雾离子源正离子模式检测, 多反应监测扫描。结果 所建立的方法显示出良好的线性关系, 并具备优异的精密度、重现性和稳定性。15 个不同产地的卷柏在活性成分含量上存在显著差异, 层次聚类分析 (HCA) 和主成分分析 (PCA) 结果显示 15 批样品明显分为三类。结论 本研究建立了一种卷柏药材 UPLC-MS/MS 定量分析方法, 该方法快速、准确, 适用于双黄酮和炔酚类成分的测定, 为其质量控制和评价提供参考依据。

关键词: 卷柏; UPLC-MS/MS; 双黄酮; 炔酚; 多反应监测

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)04-1100-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.034

Simultaneous determination of 6 biflavonoids and selaginellins in *Selaginella tamariscina* by UPLC-MS/MS

WEN Jing^{1, 2}, NI Shuai-cong^{3, 4}, WANG Ting^{1, 2}, YAN Xin-jia^{3, 4*} (1. School of Pharmacy, Sichuan College of Traditional Chinese Medicine, Mianyang Sichuan 621000; 2. Mianyang Key Laboratory of Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Mianyang Sichuan 621000; 3. College of Pharmacy and Food, Southwest Minzu University, Chengdu 610041; 4. Sichuan Laboratory of Ethnic Qiang-Yi Medicinal Resources Protection and Utilization Technology Engineering, Chengdu 610225)

Abstract: Objective To determine the content of amentoflavone, hinokiflavone, selaginellin, selaginellin A, selaginellin M, and selaginellin E in *Selaginella tamariscina* from 15 regions. **Methods** Ultra performance liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method was used. The determination was performed on Waters Acquity UPLC BEH C18 with mobile phase consisting of acetonitrile-0.1% formic acid by gradient elution. The flow rate was $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, and the column temperature was 30°C . MS detection was conducted by electrospray ionization in the positive modes. Multiple reaction monitoring mode was used for quantitative analysis. **Results** The method exhibited a strong linear correlation and superior precision, repeatability, and stability. Analysis of 15 samples from different origins of *Selaginella tamariscina* showed great variations in the content of active ingredients. Hierarchical cluster analysis and principal component analysis indicated three distinct clusters among the 15

基金项目: 四川省自然科学基金 (面上) (No.2024NSFSC0706); 西南民族大学中央高校基本科研业务费专项资金资助 (No. ZYN2025085); 四川中医药高等专科学校高层次人才科研启动经费资助项目 (No.24ZRBS05); 四川中医药高等专科学校资助项目 (No.24SD02)。

作者简介: 温静, 女, 讲师, 主要从事中药药效物质基础及质量控制研究, email: dachitu@yeah.net * **通信作者:** 阎新佳, 男, 教授, 主要从事中药药效物质基础及质量控制研究, email: yanxinjia@yeah.net

batches. **Conclusion** The study successfully establishes a rapid and accurate UPLC-MS/MS quantitative analysis method for the determination of flavonoids and phenolic compounds in *Selaginella tamariscina*, providing a reference basis for their quality control and evaluation.

Key words: *Selaginella tamariscina*; UPLC-MS/MS; biflavonoid; selaginellin; multiple reaction monitoring

卷柏 [*Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring] 为卷柏科 (Selaginellaceae) 卷柏属 (*Selaginella*) 植物, 2020 年版《中国药典》记载卷柏 (*Selaginellae herba*) 具有活血通经之功效, 用于经闭痛经、癥瘕痞块、跌扑损伤^[1]。卷柏化学成分多样, 包括黄酮、炔酚、苯丙素、环肽等^[2-4]。现代药理学研究表明, 卷柏具有抗肿瘤、降血糖、抗菌、抗炎和抗氧化等药理作用^[5-6]。目前报道主要以穗花杉双黄酮 (amentoflavone) 为代表的双黄酮类成分, 是卷柏药材主要活性成分。Selaginellin 类为卷柏属植物中特有成分, 至今报道 60 余个, 结构新颖, 活性显著^[7]。徐燃等^[8]采用 HPLC 法对深绿卷柏和江南卷柏 3 种黄酮类成分的含量进行了测定; 刘丽芳等^[9]采用 HPLC 法同时测定了江南卷柏中 3 种双黄酮成分; 谭文超^[10]采用液相色谱质谱联用法测定了卷柏中熊果苷的含量。2020 年版《中国药典》一部规定穗花杉双黄酮的含量作为卷柏质量控制指标, 文献中也均以双黄酮类成分作为卷柏的控制指标, 选择特征性不强, 定量分析不够全面。Selaginellin 类系列成分作为卷柏中主要活性成分, 对其进行质量控制具有重要意义。

UPLC-MS/MS 法在复杂样品分析中具有准确性强、灵敏度高和定量能力强等优势。在中药样品分析中, 三重四极杆质谱采用多反应监测模式 (MRM), 通过特征母离子和子离子的一一对应, 提高检测的准确性与灵敏度, 适用于中药复杂成分的含量测定研究。本文利用 UPLC-MS/MS 技术建立了一种同时测定卷柏中双黄酮 (穗花杉双黄酮、扁柏双黄酮) 和炔酚 (selaginellin、selaginellin A、selaginellin M 和 selaginellin E) 两类特征性成分的定量分析方法, 该方法快速、准确、高效, 可为中药卷柏的质量控制研究提供依据。

1 材料

1.1 仪器

Waters Xevo TQ-S micro 三重四极杆串联质谱、Waters ACQUITY UPLC I-Class (美国沃特世公司); 超声波清洗器 (型号: F-040S, 深圳市福洋科技集团有限公司); 电子分析天平 (型号: LE204E/02, 美国密理博公司); Milli-Q 超纯水系统 (梅特勒-

托利多国际有限公司); 氮气吹扫仪 NDK200-1 (上海上天精密仪器有限公司); 快速混匀器 MT-360 (上海及恒实业有限公司); Thermo ST8R 离心机 (美国赛默飞世尔科技公司); METTLER TOLEDO 电子天平 (型号: ME204E, 梅特勒-托利多国际有限公司); PEAK 氮气发生器 (英国毕克气体仪器有限公司); DW-HL398 低温冰箱 (中科美菱公司)。

1.2 试药

乙腈、甲醇 (质谱纯, 德国 Merck); 甲醇 (分析纯, 美国 Fisher); 甲酸 (色谱纯, 美国 Acros Co., Ltd.); 屈臣氏蒸馏水 (广州屈臣氏蒸馏水有限公司)。微孔滤膜 (0.22 μm) (德国艾本德公司); 对照品穗花杉双黄酮、扁柏双黄酮、selaginellin、selaginellin A、selaginellin M 和 selaginellin E, 均为实验室自制^[2-3, 6], 采用 UV、IR、NMR 和 MS 等光谱学方法确认结构 (见图 1), 经 HPLC 面积归一化法测定其纯度均大于 98%。

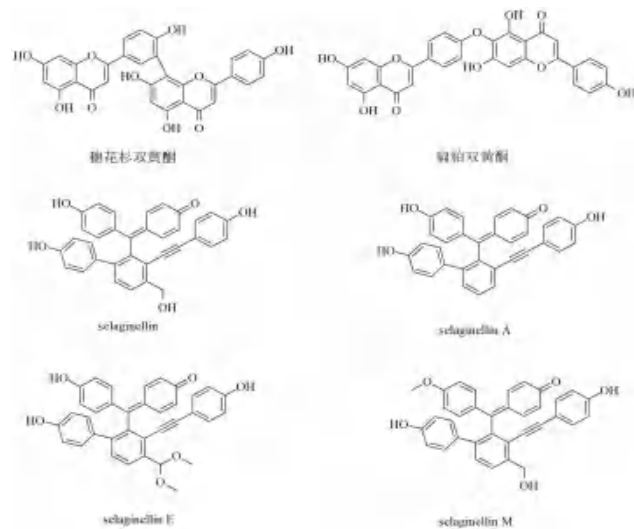


图 1 卷柏中 6 种化合物的结构式

Fig 1 Structures of 6 compounds in *Selaginella tamariscina*

药材来自黑龙江、山东、广西、山西、河南、安徽、四川、河北、云南、甘肃等 15 个产地, 经沈阳药科大学学生药学教研室吕重宁副教授鉴定为卷柏 *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring。

2 方法与结果

2.1 分析条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Waters Acquity UPLC

BEH C18 柱 (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流速: 0.3 mL·min⁻¹; 柱温: 30℃; 进样量: 2 μL。流动相由乙腈 (A) 和 0.1% 甲酸水 (B) 组成, 梯度洗脱 (0~1.0 min, 40%A; 1.0~3.0 min, 40%~90%A; 3.0~3.1 min, 90%~40%A; 3.1~4.0 min, 40%A)。

2.1.2 质谱条件 毛细管电压: 3.0 kV, 锥孔电压: 30 V, 毛细管温度: 50℃, 离子源温度: 150℃, 脱溶剂气体: 氮气, 脱溶剂气体流速: 1000 L·h⁻¹, 脱溶剂气体温度: 450℃, 碰撞气体: 氩气, 碰撞气压力: 0.2 Pa。采用多反应监测模式 (MRM), 6 种化合物的质谱分析条件参数见表 1, 提取离子流图, 见图 2。

表 1 6 种化合物的质谱分析条件参数及保留时间
Tab 1 UPLC-MS/MS parameters of 6 compounds

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	DP/V	CE/V	保留时间 /min
穗花杉双黄酮	539.1	377.1 ^a	32	42	1.05
		347.2	32	50	
扁柏双黄酮	539.1	257.1 ^a	40	45	2.73
		270.1	30	40	
selaginellin	513.0	121.0 ^a	32	26	0.76
		93.1	32	58	
selaginellin E	557.0	525.0 ^a	50	14	2.10
		510.0	50	26	
selaginellin A	483.0	389.0 ^a	20	22	2.68
		271.1	20	34	
selaginellin M	527.1	401.1	40	28	1.46
		107.1 ^a	56	46	

注 (Note): ^a 是定量离子 (^aquantitative ion)。

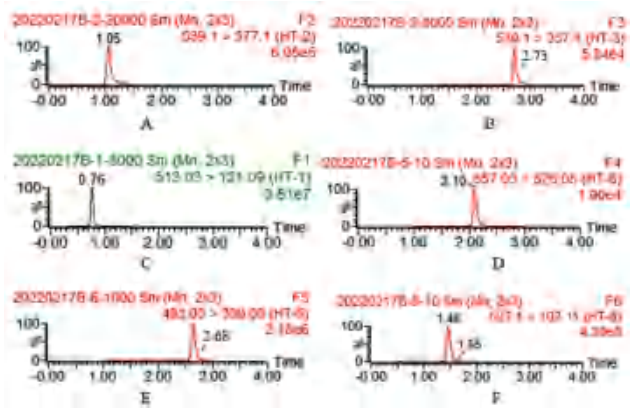


图 2 6 种化合物的提取离子流色谱图

Fig 2 Extracted ion chromatograms of 6 compounds

A. 穗花杉双黄酮 (amentoflavone); B. 扁柏双黄酮 (hinokiflavone); C. selaginellin; D. selaginellin E; E. selaginellin A; F. selaginellin M

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液制备 卷柏药材过 4 号筛, 取药材粉末 0.3 g, 精密称定, 放入锥形瓶中, 加入

75% 甲醇 10 mL, 密闭, 摇匀, 超声提取 30 min, 功率 240 W, 提取两次, 滤液合并, 减压浓缩后定容至 10 mL 量瓶中, 待冷却至室温, 用 0.22 μm 滤膜过滤后得供试品溶液。

2.2.2 混合对照品溶液制备 称取穗花杉双黄酮、扁柏双黄酮、selaginellin、selaginellin E、selaginellin A、selaginellin M 各 5.00 mg, 加入 50 mL 甲醇, 充分溶解后摇匀, 用微孔滤膜滤过得质量浓度均为 0.1 mg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系、定量限 (LOQ) 及检测限 (LOD) 考察 精密吸取各浓度混合对照品溶液, 逐级稀释, 配制成 6 个不同浓度的对照品溶液, 进样分析, 以各对照品特征定量离子峰面积为纵坐标 (Y), 各个对照品浓度 (ng·mL⁻¹) 为横坐标 (X)。结果表明, 6 个对照品在各自质量浓度范围内与峰面积线性关系良好 ($r > 0.999$), 各个对照品的线性关系、相关系数、线性范围及 LOD 和 LOQ 值见表 2。

2.3.2 精密度试验 按照 “2.2.1” 项下方法制备卷柏供试品溶液, 按 “2.1” 项下色谱条件连续进样 6 次, 测定峰面积并计算相对标准偏差 (RSD), 结果见表 3, RSD 值在 1.3%~2.5% 内, 说明该方法具有良好的精密度。

2.3.3 稳定性试验 按照 “2.2.1” 项下方法制备卷柏供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样测定, 结果见表 3, RSD 值在 1.4%~2.6% 内, 表明卷柏供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.4 重现性试验 取卷柏药材精密称取 6 份, 制备供试品溶液, 按 “2.1” 项下色谱条件进样分析, 结果见表 3, RSD 值在 0.90%~2.7% 内, 表明方法重现性良好。

2.3.5 回收试验 精密称取已知含量卷柏 0.3 g, 共 3 份, 精密加入等量对照品混合溶液。按 “2.2.1” 项下方法制备, 按 “2.1” 项下色谱条件进样分析, 计算平均加样回收率, 结果见表 3。6 种成分的回收率范围在 90.72%~108.62%, 符合相关要求。

2.4 样品含量测定

取 15 批不同产地卷柏药材, 按照 “2.2” 项下方法制备得到供试品溶液, 并进行含量测定, 计算不同产地卷柏中 6 种化合物的含量见表 4。结果表明, 穗花杉双黄酮的含量高于其他成分, 含量范围在 405~3771 μg·g⁻¹, 其中河南、安徽六安产地的穗花杉双黄酮含量相对较高; 扁柏双黄酮含量范围在 16.150~140.191 μg·g⁻¹, 云南和安徽六安产地的含量较高; selaginellin 含量范围在

表 2 6 种化合物的线性方程、线性范围、检测限及定量限

Tab 2 Calibration curves, linearity range, LOD and LOQ of 6 compounds

化合物	回归方程	<i>r</i>	线性范围 / (ng • mL ⁻¹)	LOD/ (ng • mL ⁻¹)	LOQ/ (ng • mL ⁻¹)
穗花杉双黄酮	<i>y</i> = 2.323 <i>x</i> + 6220	0.9992	11 767.3 ~ 118 217.2	5	15
扁柏双黄酮	<i>y</i> = 5.095 <i>x</i> + 354.8	0.9993	280.02 ~ 6044.08	5	15
selaginellin	<i>y</i> = 405.7 <i>x</i> - 54 960	0.9995	250.5 ~ 4983.7	1	3
selaginellin E	<i>y</i> = 153.2 <i>x</i> + 306.7	0.9991	5.83 ~ 197.38	0.1	0.3
selaginellin A	<i>y</i> = 241.1 <i>x</i> + 12 009	0.9992	269.19 ~ 3030.2	1	3
selaginellin M	<i>y</i> = 31.77 <i>x</i> - 151.7	0.9993	163.8 ~ 1003.2	1	3

表 3 6 种化合物的精密度、重现性、稳定性和加样回收率结果 (%)

Tab 3 Precision, accuracy, reproducibility and recoveries of UPLC-MS/MS analysis for the 6 compounds (%)

化合物	精密度 <i>RSD</i>	重现性 <i>RSD</i>	稳定性 <i>RSD</i>	加样回收率	
				平均值	<i>RSD</i>
穗花杉双黄酮	1.3	1.4	1.4	108.62	1.3
扁柏双黄酮	1.9	2.4	1.9	103.87	2.3
selaginellin	2.0	2.7	2.2	95.32	1.5
selaginellin E	1.8	2.8	2.6	90.72	3.4
selaginellin A	1.6	0.90	1.9	93.08	2.2
selaginellin M	2.5	2.3	2.3	105.91	2.8

19.635 ~ 136.378 μg • g⁻¹, 广西玉林、广西贺州、安徽 3 个产地的含量相对较高; selaginellin A 含量范围在 10.852 ~ 93.914 μg • g⁻¹, 广西玉林和广西贺州产地的含量相对较高; selaginellin M 含量范围

在 6.480 ~ 30.210 μg • g⁻¹, selaginellin E 含量范围在 2.351 ~ 6.164 μg • g⁻¹, 两者含量较低, 在多个产地样品中均未检测到。

表 4 不同产地卷柏药材中 6 种化合物的含量 (μg • g⁻¹)

Tab 4 Contents of 6 compounds in *Selaginellin tamariscina* from different regions (μg • g⁻¹)

编号	产地	来源	穗花杉双黄酮	扁柏双黄酮	selaginellin	selaginellin E	selaginellin A	selaginellin M
1	黑龙江	尚志市帽儿山	1450	72.973	42.380	4.466	23.371	11.899
2	山东东营	山东舜王城中药材市场	3548	95.045	39.629	—	27.040	—
3	山东潍坊	山东舜王城中药材市场	3294	87.40	22.493	3.415	30.395	—
4	广西玉林	玉林中药材专业市场	752	87.845	109.226	4.134	89.766	24.381
5	广西百色	玉林中药材专业市场	1650	82.178	29.701	6.164	18.794	15.324
6	广西贺州	玉林中药材专业市场	405	24.057	136.378	2.351	93.914	30.210
7	安徽六安	安徽亳州药材市场	3621	102.296	60.377	—	41.796	10.568
8	安徽黄山	安徽亳州药材市场	3539	40.514	39.004	3.179	79.625	16.854
9	安徽	安徽亳州药材市场	2017	65.245	107.363	—	10.852	6.480
10	河北	北京本草方源药业集团有限公司	1478	82.207	49.766	4.860	32.409	16.634
11	云南	淘宝网 (云南民族民间中药材批发)	3112	140.191	52.994	3.297	36.344	23.624
12	广东	淘宝网 (申奥中药材零售店)	2847	76.271	28.960	5.328	15.210	19.508
13	河南	哈尔滨市三棵树药材专业市场	3771	16.150	71.748	—	59.085	—
14	四川成都	淘宝网 (瑞丰成中药材批发零售店)	2279	54.330	67.547	6.005	75.067	8.857
15	甘肃陇南	淘宝网 (甘肃药材阿新零售店)	1473	32.563	19.635	3.475	25.640	—

2.5 层次聚类分析 (HCA) 和主成分分析 (PCA)

考察不同产地卷柏药材中 6 种化合物的含量差异, 将含量测定的数据作为变量, 导入 SPSS 25 软件, HCA 图见图 3。15 个样品被聚为三类, 其中黑龙江尚志、甘肃陇南、四川成都、安徽、河北、广西百色为第一类; 河南、云南、广东、安徽黄山、安徽六安、山东东营、山东潍坊为第

二类; 广西玉林和广西贺州为第三类。采用 PCA 来研究不同样品间的相似性或差异性的关系或趋势, 从 PCA 散点图上可以观察不同产地药材的离散程度。采用 SIMCA 14.0 软件对 15 个样品含量进行分析, 结果如图 4。15 个样品被分为三类, 与 HCA 的结果一致, 不同产地卷柏 6 个化合物的含量有一定的差异。

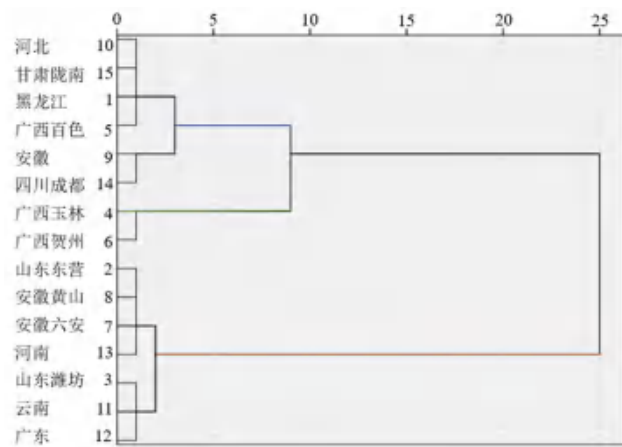


图 3 各产地卷柏药材 HCA 树状图

Fig 3 HCA of *Selaginella tamariscina* samples from different regions

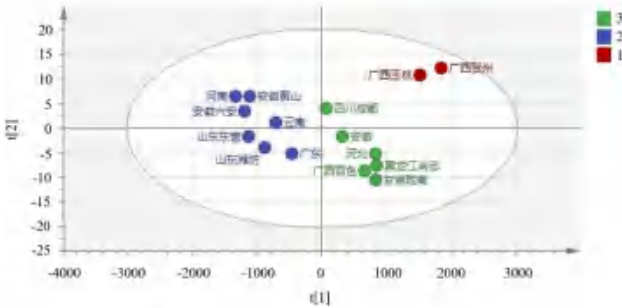


图 4 各产地卷柏药材 PCA 图

Fig 4 PCA plot of *Selaginella tamariscina* samples from different regions

3 讨论

本研究采用 UPLC-MS/MS 法对不同产地卷柏中 6 种化合物含量进行比较, 结合 HCA 和 PCA 分析方法探讨不同产地卷柏的质量差异, 结果表明 15 个不同产地卷柏成分的含量存在差异。研究表明, 黄酮类是卷柏的主要药效成分, 具有抗肿瘤、抗病毒和抑制磷酸二酯酶 -4 (PDE4) 活性等作用^[7]。中药化学成分复杂多样, 需要多成分间相互协同作用而发挥临床疗效, 单一成分无法准确表达其功效, 因此在卷柏的质量评价中, 应充分考虑各药效成分为卷柏的指标, 为卷柏质量标准的建立提供科学依据。本试验中不同产地卷柏 6 个指标成分的含量有一定的差异, 穗花杉

双黄酮的含量高于其他成分, 黄酮类成分每个样品间差异明显, 可能与部分样品未能追溯到确切详细的产地, 也未能排除其他可能的因素 (环境、采收时间、加工及贮藏时间等) 有关, 因此需要后续进一步研究。

4 结论

本研究采用 UPLC-MS/MS 技术同时测定卷柏中穗花杉双黄酮、扁柏双黄酮、selaginellin、selaginellin A、selaginellin M 和 selaginellin E 的含量, 方法快速、专属性强、灵敏度高, 结果准确, 可为卷柏质量控制研究及质量标准的完善提供依据。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 237.
- [2] 邓斌, 侯兵乔, 聂承冬, 等. 卷柏中黄酮类化学成分的分离与鉴定 [J]. 中国药物化学杂志, 2022, 32 (4): 300-304.
- [3] Jing W, Xin Z, Chang L, et al. Two new selariscinins from *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring [J]. J Asian Nat Prod Res, 2021, 23 (7): 675-680.
- [4] 阎新佳, 温静, 宋洋, 等. 卷柏中 1 个新的环肽 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47 (16): 4391-4394.
- [5] Jing W, Yuan L, Shao SZ, et al. A new cyclic peptide from *Selaginella tamariscina* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2022, 24 (12): 1169-1176.
- [6] Jing W, Dong MS, Xiao YH, et al. Selaginellin derivatives from *Selaginella tamariscina* and evaluation for anti-breast cancer activity [J]. Phytochemistry, 2024, (217): 113919.
- [7] Wei L, Gui HT, Sheng Y, et al. Selaginellins from the genus *Selaginella*: isolation, structure, biological activity, and synthesis [J]. Nat Prod Rep, 2021, 38: 822-842.
- [8] 徐燃, 丁奇, 万定荣, 等. 深绿卷柏和江南卷柏 HPLC 指纹特征及 3 种成分的含量测定研究 [J]. 中药材, 2017, 40 (7): 1638-1642.
- [9] 刘丽芳, 宋蕊, 陈骁, 等. HPLC 法同时测定江南卷柏中 3 种双黄酮成分 [J]. 现代中药研究与实践, 2016, 30 (4): 67-69.
- [10] 谭文超. 液相色谱质谱联用法测定卷柏中熊果苷的含量 [J]. 中华中医药学刊, 2015, 33 (5): 1227-1229.

(收稿日期: 2024-04-22; 修回日期: 2024-05-26)

红花清肝十三味丸中非法染色剂 808 猩红的测定

王秋实, 吴琦, 赵猛*, 李玲*, 王婷婷, 陈乃江 (江苏省连云港市食品药品检验检测中心, 江苏 连云港 222000)

摘要: **目的** 建立红花清肝十三味丸中非法染色剂 808 猩红的检测方法。**方法** 采用高效液相色谱法, 色谱柱: Phenomenex Gemini C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1% 甲酸 (80 : 20); 检测波长为 518 nm; 柱温为 30 ℃; 进样量: 10 μL; 流速: 1.0 mL·min⁻¹。液质联用采用色谱柱: Poroshell 120 EC-C₁₈ (50 mm×3.0 mm, 2.7 μm), 流动相: 乙腈-0.1% 甲酸 (80 : 20); 进样量: 1 μL; 流速: 0.2 mL·min⁻¹。ESI⁺扫描。**结果** 含量测定显示 808 猩红在 4.525 ~ 226.2 ng ($r = 0.9992$) 内与峰面积呈现良好的线性关系, 平均回收率为 98.67%, $RSD = 1.2\%$ ($n = 6$)。**结论** 本法操作简便, 专属性强, 重现性好, 可用于红花清肝十三味丸的质量控制。

关键词: 红花清肝十三味丸; 808 猩红; 含量测定; HPLC-QTOF-MS; 高效液相色谱法

中图分类号: O657.7, R927.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)04-1105-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.035

Detection of illegally added 808 scarlet in Honghua Qinggan Shisanwei pills

WANG Qiu-shi, WU Qi, ZHAO Meng*, LI Ling*, WANG Ting-ting, CHEN Nai-jiang (*Food and Drug Control Center of Lianyungang, Lianyungang Jiangsu 222000*)

Abstract: **Objective** To establish a method for the detection of illegally added 808 scarlet in Honghua Qinggan Shisanwei pills. **Methods** HPLC method with a Phenomenex Gemini C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used. The injection volume was 10 μL at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ with acetonitrile-0.1% formic acid (80 : 20). The wavelength was 518 nm and the column temperature was 30 ℃. HPLC-QTOF-MS was performed on an Poroshell 120 EC-C₁₈ (50 mm×3.0 mm, 2.7 μm); positive ESI mode; acetonitrile-0.1% formic acid (80 : 20) was used as the mobile phase. The injection volume was 1 μL. The flow rate was 0.2 mL·min⁻¹. **Results** Good linearity was found between 808 scarlet and peak area at 4.525 ~ 226.2 ng ($r = 0.9992$), with the average recovery of 98.67%, RSD of 1.2% ($n = 6$). **Conclusion** The presented procedure has easy operation, and good specificity and repeatability, which can be used for the quality control of Honghua Qinggan Shisanwei pills.

Key words: Honghua Qinggan Shisanwei pill; 808 scarlet; content determination; HPLC-QTOF-MS; HPLC

红花清肝十三味丸含红花、丁香、莲子、麦冬、木香、诃子、川楝子、栀子、紫檀香、麝香、水牛角浓缩粉、牛黄、银朱, 共十三味药材。在国家药品监督管理局近年组织开展的中药饮片违法染色问题专项抽检中发现, 药材中非法染色 808 猩红时有发生, 808 猩红为常见的偶氮类化工染色剂, 其在体内经过生物转化分解, 可引起中毒性肝病, 增加了人体癌变概率^[1-2]。红花清肝

十三味丸现行标准为卫生部药品标准 (蒙药分册) ZZ—8329, 没有 808 猩红检查项^[3]。前期研究中参考国家药品监督管理局药品补充检验方法及相关文献^[4-8], 在市售多批次红花清肝十三味丸样品中检出 808 猩红成分, 因此建立了红花清肝十三味丸中非法添加 808 猩红的检测方法, 以期有效地控制其内在质量, 保障人民群众的用药安全。

1 仪器与试药

基金项目: 国家药品监督管理局药品补充检验方法 (No. 2022019)。

作者简介: 王秋实, 女, 副主任药师, 主要从事药物分析研究, email: wqs861010@126.com *通信作者: 赵猛, 男, 副主任药师, 主要从事药物分析研究, email: zhaom202@sina.com; 李玲, 女, 主任药师, 主要从事药品质量研究, email: lilinhappy@163.com

1.1 仪器

Waters e2695 型高效液相色谱仪, 二极管阵列检测器 (美国沃特世公司); Agilent 6530B Accurate-Mass Q-TOF (美国安捷伦科技有限公司); Sartorius BP211D 型电子分析天平 (德国赛多利斯公司); KH-700DE 数控超声仪 (昆山禾创超声仪器有限公司)。

1.2 试药

808 猩红对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号: 111940-201804); 红花清肝十三味丸 (规格: 每 10 粒重 1 g。A 厂, 批号: 20170413、20180405、20180807、20181123、20190112、20190113、20190512、20191021、20200201、20200320、20200530、20201007、20210202、20201008、20210907; B 厂, 批号: 170118、180804; C 厂, 批号: 1809008、1812004125; D 厂, 批号: 18455017、20455001、20455002、20455003; E 厂, 批号: 210606); 乙腈、乙醇为色谱级 (默克公司); 甲酸为色谱级 (阿拉丁试剂), 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Phenomenex Gemini C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈-0.1% 甲酸 (80:20); 检测波长为 518 nm; 柱温为 30 °C; 进样量 10 μL, 流速: 1.0 mL · min⁻¹。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取 808 猩红对照品 10.21 mg, 置 1000 mL 量瓶中, 加乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成每 1 mL 约含 10 μg 的溶液, 即得。

2.3 供试品溶液的制备

取本品, 研细, 称取约 0.2 g, 置 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入乙醇 25 mL, 称定重量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定重量, 用乙醇补足减失的重量, 摇匀, 用 0.22 μm 有机微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 专属性试验

2.4.1 808 猩红的 HPLC 法测定 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪测定, 结果阳性样品呈现与对照品溶液保留时间相同的色谱峰, 而阴性样品则无相应的色谱峰, 见图 1。阳性样品中与 808 猩红对照品保留时间一致的色谱峰的吸收光谱与 808 猩红对照品溶液一致, 见图 2。可见采用 DAD 检测器在 200 ~ 700 nm 内的光谱图, 供试品色谱峰的吸收光谱与 808 猩红对照品紫外吸收光谱一致。

2.4.2 808 猩红的 LC-MS 法测定

① 色谱条件: 流动相为乙腈-0.1% 甲酸 (80:20); 进样量: 1 μL; 流速: 0.2 mL · min⁻¹, 色谱柱:

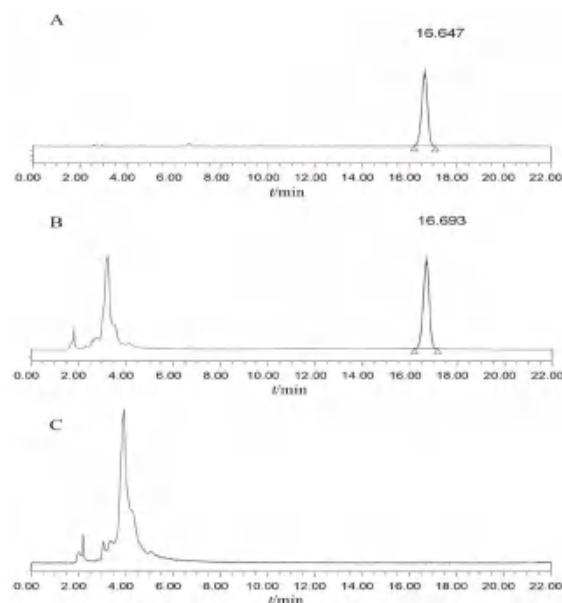


图 1 808 猩红对照品溶液 (A)、阳性样品溶液 (批号: 20181123) (B) 和阴性样品溶液 (批号: 20455002) (C) 的色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of 808 scarlet reference substance solution (A), positive sample solution (Lot No. 20181123) (B) and negative sample solution (Lot No. 20455002) (C)

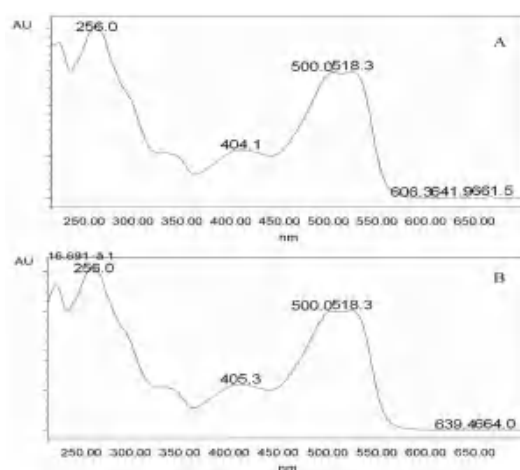


图 2 808 猩红对照品 (A) 和阳性样品溶液 (批号: 20181123) (B) 的紫外-可见吸收光谱图

Fig 2 Ultraviolet-visible absorption spectra of 808 scarlet reference substance and positive sample solution (Lot No. 20181123)

Poroshell 120 EC-C₁₈ (50 mm × 3.0 mm, 2.7 μm)。

② 质谱条件: ESI⁺扫描, 毛细管电压 4 kV, 毛细管出口电压 100 V, 干燥气温度: 325 °C, 干燥气流速: 8 L · min⁻¹, 雾化气压力: 35 psi, 碰撞能量: 10 V; 扫描范围: 100 ~ 1000 m/z。

分别取“2.2”项下 808 猩红对照品溶液、“2.3”项下供试品溶液 1 mL 置 20 mL 量瓶中, 加乙醇稀释至刻度, 摇匀。按“2.4.2”项下条件进样测定。结果红花清肝十三味丸阳性样品呈现与 808 猩红对照品保留时间相同的离子峰, 且一级质谱、二级质谱均与 808 猩红对照品一致, 阴性样品没有相同的质谱峰, 见图 3 和表 1。

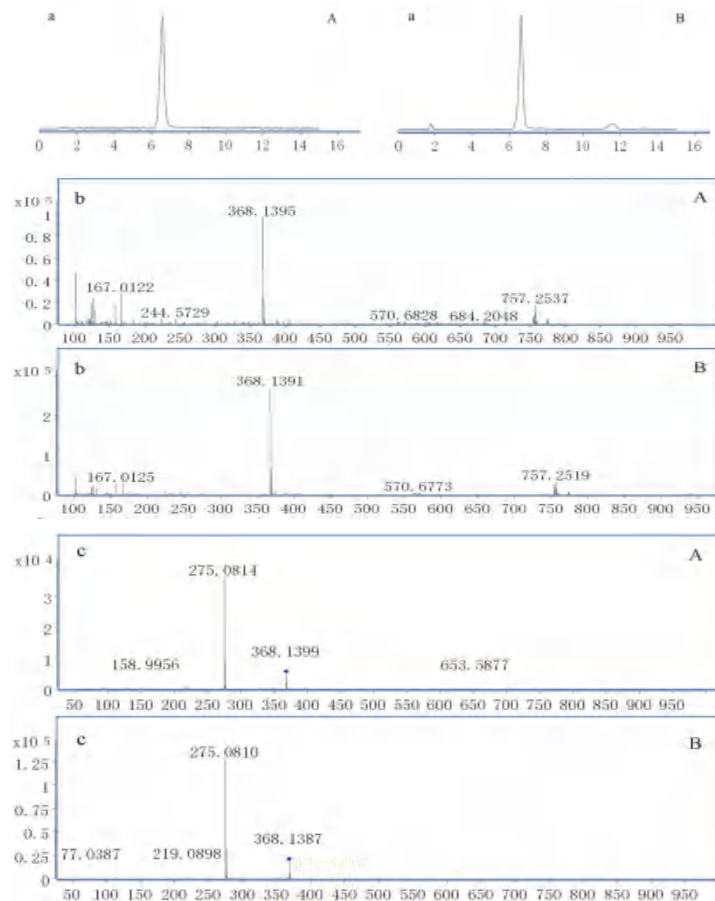


图 3 808 猩红对照品 (A) 和红花清肝十三味丸阳性样品 (批号 20181123)(B) 的离子色谱图 (a)、一级质谱图 (b)、二级质谱图 (c)

Fig 3 Total ion chromatograms (a), primary mass spectrum (b) and secondary mass spectrum (c) of 808 scarlet reference and positive sample of Honghua Qinggan Shisanwei pills samples (Lot No. 20181123) (B)

表 1 808 猩红对照品和红花清肝十三味丸阳性样品的数据

Tab 1 Data of 808 scarlet reference substance and Honghua Qinggan Shisanwei pills samples

名称	保留时间 /min	一级母 离子峰	主要的二级碎片 离子峰
808 猩红对照品	6.579	368.1	275.1、219.1、77.0
阳性样品 (批号: 20181123)	6.671	368.1	275.1、219.1、77.0
阳性样品 (批号: 20190112)	6.671	368.1	275.1、219.1、77.0
阳性样品 (批号: 20190113)	6.671	368.1	275.1、219.1、77.0
阳性样品 (批号: 20190512)	6.671	368.1	275.1、219.1、77.0

2.5 线性关系考察

精密称取 808 猩红对照品 18.10 mg, 置 1000 mL 量瓶中, 用乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀。精密量取上述溶液 5 mL, 置 20 mL 量瓶中, 用乙醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。分别精密吸取 808 猩红对照品储备液适量, 配制系列不同浓度对照品溶液, 注入液相色谱仪, 按“2.1”项下方法记录色谱图, 以质量 (ng)(X) 为横坐标, 以峰面积 (Y) 为纵坐标, 进行线性回归, 得回归方程: $Y = 2967.9X + 5188.1$ ($r = 0.9992$)。结果表明 808 猩红在 4.525 ~ 226.2 ng 内与峰面积线性关系良好。

2.6 检测限 (LOD) 与定量限 (LOQ)

参照《中国药典》2020 年版四部通则 9101 分析方法验证指导原则信噪比法。将 808 猩红对照品溶液逐步稀释, 以信噪比 $S/N = 3$ 时的溶液浓度计算 LOD 为 $0.12 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 以 $S/N = 10$ 时的溶液浓度计算 LOQ 为 $0.50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.7 精密度试验

精密吸取“2.2”项下的 808 猩红对照品溶液 10 μL , 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 根据峰面积计算得 808 猩红 RSD 为 0.60% ($n = 6$), 结果表明仪器精密度良好。

2.8 重复性试验

精密称取同一批号 (A 厂, 批号: 20181123) 样品 6 份, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 计算得 808 猩红含量的 RSD 为 1.2% ($n = 6$), 结果表明该方法重复性良好。

2.9 稳定性试验

精密吸取供试品溶液 (A 厂, 批号: 20181123) 10 μL , 分别在 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样

测定，测得 808 猩红峰面积的 *RSD* 为 1.1%，结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.10 加样回收试验

精密称取已知 808 猩红含量的同一批号供试品（批号：20190512）0.1 g，共 6 份，分别精密加入“2.5”项下 808 猩红对照品溶液（0.011 04 mg · mL⁻¹）10 mL。按“2.3”项下方法制备供试品溶液，测定 808 猩红含量，计算回收率。结果平均回收率为 98.67%，*RSD* 为 1.2%。符合药典要求。

2.11 样品测定

取不同厂家不同批次红花清肝十三味丸 24 批（涉及生产企业 5 家），按“2.3”项下方法制备供试品溶液，精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL 注入高效液相色谱仪，阳性样品再以液质联用法进一步确认，结果共 4 批（A 厂）检出，见表 2。根据样品检测结果，24 批次样品中有 4 批次检出 808 猩红，表明在红花清肝十三味丸生产过程中的所投料药材的质量未经过严格控制，存在非法染色现象。

表 2 红花清肝十三味丸中检出 808 猩红的含量结果
Tab 2 Detection of 808 scarlet in Honghua Qinggan Shisanwei pills

批号	808 猩红 / (mg · g ⁻¹)
20181123	0.6067
20190112	1.2495
20190113	1.2663
20190512	1.0600

3 讨论

针对染色来源问题，涉及 808 猩红染色的药材主要集中在西红花、血竭和朱砂三味药材^[9-12]，针对银朱药材，本研究在 A 厂生产的花红清肝十三味丸中检出 808 猩红成分，同时收集该企业药品处方中含银朱的其他制剂，在同期生产的其他品种中，多批次样品也大量检出 808 猩红成分，在市售银朱药材中多批次也检出 808 猩红，基本锁定 808 猩红来源为银朱药材。银朱，《本草纲目》载“乃硫黄同汞升炼而成，其性躁烈，亦能烂龈挛筋，其功过与轻粉同也”。《上海市中药材标准（1994 年版）》收载银朱药材，该药为人工合成的赤色硫化汞，分子式为 HgS，鲜红色的粉末，有毒。目前银朱主要是蒙药制剂用得较多。作者前期专门走访了安徽亳州药材市场和河北安国药材市场，收集了 23 批次的市售银朱药材并进行分析，结果表明 808 猩红检出率高达 60.8%，含量在 0.0699 ~ 5.3589 mg · g⁻¹ 内，说明银朱中非法添加 808 猩红已成为不良商家普遍做法。

采用 HPLC-DAD 法测定红花清肝十三味丸中 808 猩红的含量，必要时用 LC-MS 确认，能准确测定样品中 808 猩红的含量，且专属性很强。查阅相关文献，HPLC-DAD、HPLC-DAD-MS 联用的方法是 808 猩红检测普遍采用的方法。本文首次在红花清肝十三味丸中发现非法染色剂 808 猩红，表明染色药材危害存在向制剂中转移的现象。

对中药材、中药饮片进行染色危害公众用药安全，欺骗消费者，是严重的违法行为。中共中央、国务院关于促进中医药传承创新发展的意见中明确要求，强化中药质量监管及合理使用，加强上市产品市场抽检，严厉打击中成药非法添加化学品违法行为。完善中药质量监管法律制度，加大对制假制劣行为的责任追究力度。按本研究对 24 批红花清肝十三味丸进行检验，结果 4 批红花清肝十三味丸中检出 808 猩红成分，因此，亟须建立检验方法，健全完善中药全生命周期监管制度体系，坚守底线，强化中药质量安全监管，全面落实“四个最严”的要求，为药品监管机构提供技术支撑，保障用药安全。

参考文献

[1] 洗小敏, 林蔚文, 陈伟康, 等. HPLC-DAD 法测定血竭饮片中添加苏丹红 I、II、III、IV 及 808 猩红[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(5): 865-872.

[2] 胡浩彬. 当前中药材和中药饮片三大制假方法分析[J]. 药学与临床研究, 2012, 20(3): 261-263.

[3] 卫生部药品标准(蒙药)[S]. 1998: 170.

[4] 国家食品药品监督管理总局. 柏子养心丸中 808 猩红检查项补充检验方法 BJJY201703[S]. 2017.

[5] 国家食品药品监督管理总局. 跌打丸中 808 猩红检查项补充检验方法 BJJY201708[S]. 2017.

[6] 国家食品药品监督管理总局. 药品检验补充检验方法和检验项目批准件 2016003 牛黄清心丸(局方)[S]. 2016.

[7] 国家食品药品监督管理总局. 药品检验补充检验方法和检验项目批准件 2016004 朱砂安神丸[S]. 2016.

[8] 宋德芳, 李恒, 余平, 等. HPLC-DAD 结合 UPLC-MS/MS 法检测 18 种常见中药非法染色色素[J]. 中国药师, 2022, 25(1): 63-69.

[9] 陈霞, 张永文, 周刚. 中药补充检验方法和检验项目相关问题的探讨[J]. 中国新药杂志, 2021, 30(21): 1949-1955.

[10] 胡双丰. 血竭药材真伪鉴别[J]. 中南药学, 2008, 12(6): 766-767.

[11] 刘静, 刘燕, 郑笑为, 等. 基于 2008—2021 年国家药品抽检的 18 种中成药质量分析[J]. 中国现代中药, 2022, 24(11): 2066-2072.

[12] 黄宝斌, 许明哲, 杨青云, 等. 中成药和中药材添加化学物质补充检验方法分析[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(9): 1701-1708.

(收稿日期: 2024-01-21; 修回日期: 2024-02-25)

经典名方开心散基准样品 HPLC 指纹图谱及 多指标成分含量测定研究

李大伟^{1, 2, 3}, 单晓晓^{1, 2, 3}, 汪海宣⁴, 张晓倩^{1, 2, 3}, 杨璇^{1, 2, 3}, 陶稳稳^{1, 2, 3}, 黄顺旺^{5*}, 张彩云^{1, 2, 3*} (1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2. 药物制剂技术与应用安徽省重点实验室, 安徽省教育厅现代药物制剂工程技术研究中心, 安徽省道地中药材品质提升创新协同中心, 合肥 230012; 3. 安徽省中医药科学院药物制剂研究所, 中药复方安徽省重点实验室, 合肥 230012; 4. 合肥市食品药品安全检验检测中心, 合肥 230094; 5. 合肥创新医药技术有限公司, 合肥 231000)

摘要: **目的** 建立经典名方开心散基准样品的高效液相色谱 (HPLC) 指纹图谱及其 6 种指标性成分的定量分析方法, 为其质量标准的初步拟定提供参考。**方法** 根据开心散处方比例, 混合制备 15 批开心散基准样品, 采用 HPLC 法建立其指纹图谱, 同时定量测定指标性成分远志呋酮Ⅲ、3, 6'-二芥子酰基蔗糖、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁、β-细辛醚、α-细辛脑的含量。**结果** 15 批开心散基准样品的 HPLC 指纹图谱的相似度均大于 0.9, 在 203 nm 色谱条件下共识别出 8 个特征峰。所测定的 6 种指标性成分 (含量范围) 依次为远志呋酮Ⅲ (0.1802 ~ 0.3969 mg · g⁻¹)、3, 6'-二芥子酰基蔗糖 (1.0032 ~ 2.0445 mg · g⁻¹)、人参皂苷 Re (0.9586 ~ 1.5035 mg · g⁻¹)、人参皂苷 Rb₁ (0.4144 ~ 0.8271 mg · g⁻¹)、β-细辛醚 (2.3851 ~ 3.4561 mg · g⁻¹)、α-细辛脑 (0.0286 ~ 0.0346 mg · g⁻¹)。**结论** 本研究成功建立了开心散 HPLC 指纹图谱及多指标成分含量测定方法, 可为开心散制剂开发提供质量控制标准参考。

关键词: 开心散; 经典名方; 指纹图谱; 含量测定; 质量标准

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)04-1109-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.036

HPLC fingerprints and multi-index components content determination of classical prescription Kaixin powder

LI Da-wei^{1, 2, 3}, SHAN Xiao-xiao^{1, 2, 3}, WANG Hai-xuan⁴, ZHANG Xiao-qian^{1, 2, 3}, YANG Xuan^{1, 2, 3}, TAO Wen-wen^{1, 2, 3}, HUANG Shun-wang^{5*}, ZHANG Cai-yun^{1, 2, 3*} (1. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Key Laboratory of Pharmaceuticals Preparation and Application, Research Center for Modern Pharmaceutical Preparation Engineering Technology, Anhui Innovation Collaborative Center for Authentic Chinese Herbal Medicine Quality Improvement, Pharmaceuticals Institute of Anhui Academy of Chinese Medical Sciences, Hefei 230012; 3. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Compound of Anhui, Hefei 230012; 4. Hefei Food and Drug Safety Inspection and Testing Center, Hefei 230094; 5. Hefei Innovative Medical Technology Co., Ltd., Hefei 231000)

Abstract: Objective To establish the high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprints and quantitative analysis methods for six characteristic components of classical prescription Kaixin powder, and to provide a reference for its primary quality standards. **Methods** Fifteen batches of Kaixin powder were prepared by mixing according to its original prescription ratio. HPLC was used to establish its fingerprint and quantify polygalaxanthone Ⅲ, 3, 6'-disinapoyl

基金项目: 安徽省科技重大专项项目 (No.202203a07020031); 安徽省教育厅基金项目 (No. KJ2021ZD0065)。

作者简介: 李大伟, 男, 在读硕士研究生, 主要从事中药制剂研究, email: 545354976@qq.com *通信作者: 黄顺旺, 男, 主任药师, 主要从事中药新药研究与开发, email: 1151095184@qq.com; 张彩云, 女, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药制剂、缓控释纳米制剂及药代动力学研究, email: cyzhang6@ustc.edu.cn

sucrose, ginsenoside Re, ginsenoside Rb₁, β -asarone, and α -asarone in the Kaixin powder reference samples. **Results** The similarity of 15 batches of Kaixin powder reference samples was greater than 0.9, and eight characteristic peaks were identified at 203 nm. The content of the 6 components in Kaixin powder reference samples were as follows: polygalaxanthone III (0.1802 ~ 0.3969 mg·g⁻¹), 3, 6'-diisooctanoyl sucrose (1.0032 ~ 2.0445 mg·g⁻¹), ginsenoside Re (0.9586 ~ 1.5035 mg·g⁻¹), ginsenoside Rb₁ (0.4144 ~ 0.8271 mg·g⁻¹), β -asarone (2.3851 ~ 3.4561 mg·g⁻¹), and α -asarone (0.0286 ~ 0.0346 mg·g⁻¹). **Conclusion** HPLC fingerprint of Kaixin powder with its multi-index components content have been successfully established, providing a valuable reference for its quality control.

Key words: Kaixin powder; popular formula; fingerprint; content determination; quality standard

中医药作为中国的瑰宝, 凭借其悠长的发展史以及实践经验, 孕育了成百上千例有效的复方制剂^[1]。经典名方开心散 (Kaixin powder) 是《古代经典名方目录 (第一批)》中收录的百首方剂之一^[2], 始载于唐代医家孙思邈《备急千金要方》: “开心散, 治好忘。远志、人参各四分, 石菖蒲一两, 茯苓二两。右四味, 治下筛。饮服方寸匕, 日三”^[3]。开心散处方中远志有安神益智、交通心肾的作用, 具有“宁神强志、聪明耳目、不忘”之功^[4]; 人参大补元气、安神益智, 可增强远志补益、交通心肾之功效^[5]; 茯苓和石菖蒲则增加了全方开窍渗湿之力^[6]。开心散中四药配伍具有交通心肾、养心开窍、健脾祛湿之功, 可治疗心失所养、痰阻心窍、心肾不交所导致的善忘^[7]。现代药理学相关研究表明, 开心散具有抗抑郁、抗阿尔茨海默病、抗氧化、抗衰老等药理作用^[8-12], 证实了其巨大的药用潜力。

经典名方凝聚了古代医家的智慧, 是多年临床经验的总结, 是国家推动中医药产业传承创新发展的重要载体之一, 其复方制剂的传承与发展离不开对物质基准的深入研究^[13-14]。中药指纹图谱是一种专属性强、稳定性好的中药质量控制手段和鉴别方法, 其“整体性”和“模糊性”评价模式比较符合中医药整体学说^[15]。目前经典名方开心散的研究尚缺乏明确的指纹图谱和基准样品质量评价标准, 为促进经典名方开心散作为中药 3.1 类新药的研发, 本研究参考国家药监局药品评审中心发布的《按古代经典名方目录管理的中药复方制剂药学研究技术指导原则 (试行)》及课题组和国家发布的古代经典名方关键信息, 制备了 15 批开心散基准样品, 采用 HPLC 法建立了开心散指纹图谱, 明确了远志皂苷 III、3, 6'-二芥子酰基蔗糖、人参皂苷 Re 等 6 种指标性成分的含量

及范围, 为开发安全、有效、稳定的开心散制剂提供质量控制标准参考依据。

1 材料

1.1 仪器

MS105 型号十万分之一天平、PL1002E 型分析天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司), 赛默飞 U3000 型 HPLC [赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司], KS-250TDE 型高频液晶超声波清洗器 (昆山洁力美超声仪器有限公司), BJ-800A 型多功能粉碎机 (德清拜杰电器有限公司), HH-8 型数显恒温水浴锅 (上海叶拓科技有限公司), 数显鼓风干燥机 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂), ZNHW PTHW 型电热套 (巩义市予华有限责任公司), DQ-100 型调节式手动中药切片机 (温岭市林大机械有限公司)。

1.2 试药

处方药材远志、人参、茯苓、石菖蒲均购自主产区或道地产区, 由安徽中医药大学彭灿教授鉴定: 远志来自远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* Willd. 的干燥根、人参来自五加科人参属植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根及根茎、茯苓的基原为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核、石菖蒲的基原及用药部位为天南星科植物 *Acorus tatarinowii* Schott 的干燥根茎, 处方药材产地及批号具体见表 1。

对照品 β -细辛醚 (批号: 112018-201802, 纯度: 99.3%)、 α -细辛脑 (批号: 100298-201203, 纯度: 100%)、远志皂苷 III (批号: 111850-202207, 纯度: 95.8%)、3, 6'-二芥子酰基蔗糖 (批号: 111848-202006, 纯度: 96.5%)、人参皂苷 Re (批号: 110754-202129, 纯度: 96.0%)、人参皂苷 Rb₁ (批号: 110704-202330, 纯度: 95.1%) (中国食品药品检定研究院)。乙腈和甲醇为色谱纯 (OCEANPAK), 其余试剂为市售分析纯。

表 1 远志、人参、石菖蒲和茯苓的药材信息

Tab 1 Medicinal information of <i>Polygala tenuifolia</i> , <i>Panax ginseng</i> , <i>Acorus tatarinowii</i> , and <i>Poria cocos</i>								
No.	远志		人参		茯苓		石菖蒲	
	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地
1	YZ202201-1	山西省运城市	RS202201-1	吉林省白山市	FL202201-1	云南省腾冲市	SCP202201-1	安徽省六安市
2	YZ202201-2	山西省运城市	RS202201-2	吉林省白山市	FL202201-2	云南省腾冲市	SCP202201-2	安徽省六安市
3	YZ202201-3	山西省运城市	RS202201-3	吉林省白山市	FL202201-3	云南省腾冲市	SCP202201-3	安徽省六安市
4	YZ202202-1	山西省临汾市	RS202202-1	辽宁省抚顺市	FL202202-1	湖北省黄冈市	SCP202202-1	安徽省六安市
5	YZ202202-2	山西省临汾市	RS202202-2	辽宁省抚顺市	FL202202-2	湖北省黄冈市	SCP202202-2	安徽省六安市
6	YZ202202-3	山西省临汾市	RS202202-3	辽宁省抚顺市	FL202202-3	湖北省黄冈市	SCP202202-3	安徽省六安市
7	YZ202203-1	山西省运城市	RS202203-1	吉林省长白山	FL202203-1	安徽省六安市	SCP202203-1	江西省吉安市
8	YZ202203-2	山西省运城市	RS202203-2	吉林省长白山	FL202203-2	安徽省六安市	SCP202203-2	江西省吉安市
9	YZ202203-3	山西省运城市	RS202203-3	吉林省长白山	FL202203-3	安徽省六安市	SCP202203-3	江西省吉安市
10	YZ202204-1	陕西省榆林市	RS202204-1	吉林省敦化市	FL202204-1	安徽省六安市	SCP202204-1	福建省宁德市
11	YZ202204-2	陕西省榆林市	RS202204-2	吉林省敦化市	FL202204-2	安徽省六安市	SCP202204-2	福建省宁德市
12	YZ202204-3	陕西省榆林市	RS202204-3	吉林省敦化市	FL202204-3	安徽省六安市	SCP202204-3	福建省宁德市
13	YZ202205-1	山西省运城市	RS202205-1	黑龙江省宁安市	FL202205-1	安徽省安庆市	SCP202205-1	四川省达州市
14	YZ202205-2	山西省运城市	RS202205-2	黑龙江省宁安市	FL202205-2	安徽省安庆市	SCP202205-2	四川省达州市
15	YZ202205-3	山西省运城市	RS202205-3	黑龙江省宁安市	FL202205-3	安徽省安庆市	SCP202205-3	四川省达州市

2 方法与结果

2.1 开心散基准样品制备

根据 2020 年版《中国药典》对开心散方中远志、人参、茯苓、石菖蒲等药材进行炮制后，称取相应的饮片置粉碎机中进行粉碎。四味药粉过

6 号筛后，依照《古代经典名方关键信息表（25 首方剂）》中开心散处方，将人参、远志、石菖蒲、茯苓以 1：1：1：2 的比例混合均匀。根据四味饮片的编号，采用随机数表法组合制备 15 批基准样品并编号，具体信息见表 2。

表 2 开心散物质基准样品信息

Tab 2 Reference sample information of Kaixin powder				
基准样品批次	药材批号			
	人参	远志	茯苓	石菖蒲
KXP202301	RSYP202201-1	YZYP202201-3	FLYP202201-1	SCPYP202202-1
KXP202302	RSYP202203-1	YZYP202204-2	FLYP202202-1	SCPYP202202-1
KXP202303	RSYP202205-1	YZYP202205-1	FLYP202202-3	SCPYP202202-1
KXP202304	RSYP202204-2	YZYP202202-1	FLYP202203-1	SCPYP202205-1
KXP202305	RSYP202201-3	YZYP202203-2	FLYP202201-3	SCPYP202204-3
KXP202306	RSYP202205-2	YZYP202204-2	FLYP202203-3	SCPYP202204-3
KXP202307	RSYP202201-2	YZYP202204-1	FLYP202204-2	SCPYP202204-1
KXP202308	RSYP202204-1	YZYP202204-3	FLYP202205-2	SCPYP202202-1
KXP202309	RSYP202204-1	YZYP202205-2	FLYP202204-3	SCPYP202205-1
KXP202310	RSYP202205-2	YZYP202205-1	FLYP202205-1	SCPYP202205-2
KXP202311	RSYP202203-3	YZYP202204-3	FLYP202201-2	SCPYP202203-1
KXP202312	RSYP202205-2	YZYP202204-1	FLYP202202-2	SCPYP202204-1
KXP202313	RSYP202201-1	YZYP202203-3	FLYP202203-2	SCPYP202201-3
KXP202314	RSYP202204-3	YZYP202201-2	FLYP202205-3	SCPYP202201-2
KXP202315	RSYP202203-2	YZYP202205-2	FLYP202204-1	SCPYP202201-2

2.2 开心散指纹图谱的建立

2.2.1 混合对照品溶液的制备 精密称取远志呋酮Ⅲ、3，6'-二芥子酰基蔗糖、人参皂苷 Rb₁、β-细辛醚对照品，加 75% 甲醇制成每 1 mL 含远志呋酮Ⅲ 10 μg、3，6'-二芥子酰基蔗糖 30 μg、人

参皂苷 Rb₁ 30 μg、β-细辛醚 120 μg 的混合对照品溶液，即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取开心散粉末约 1.000 g，置具塞锥形瓶中，精密加入 75% 甲醇 25 mL，称定重量，超声处理（功率 250 W，频率

50 kHz) 30 min, 放冷, 再称定重量, 用 75% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 色谱条件 色谱柱为 Thermo TM120-C18 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以乙腈 (A) -0.05% 磷酸溶液 (B) 为流动相; 梯度洗脱 (0~15 min, 5%~15%A; 15~30 min, 15%~16%A; 30~40 min, 16%~23%A; 40~70 min, 23%~32%A; 70~72 min, 32%~42%A; 72~92 min, 42%~52%A; 92~94 min, 52%~77%A; 94~109 min, 77%~88%A; 109~119 min, 80%~95%A; 119~124 min, 95%A); 柱温 30℃; 检测波长为 203 nm; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 进样量 10 μL。

2.2.4 精密度考察 精密称取开心散 (KXP202301) 粉末, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.3”项下色谱条件重复进样 6 次, 计算 8 个特征峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值。结果发现各特征峰与参照峰 S (3, 6'-二芥子酰基蔗糖, 下同) 的相对保留时间的 RSD 分别为 0.038%、0.00%、0.061%、0.040%、0.032%、0.031%、0.029%、0.030%, 各特征峰与参照峰 S 的相对峰面积的 RSD 分别为 2.1%、0.00%、0.047%、0.036%、0.030%、0.033%、0.027%、0.026%, 与生成的对照图谱计算特征峰相似度均大于 0.90, 表明仪器精密度良好。

2.2.5 重复性考察 精密称取开心散 (KXP202301) 粉末, 按“2.2.2”项下方法制备 6 份供试品溶液, 按“2.2.3”项下方法测定, 计算 8 个特征峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值, 结果各特征峰与参照峰 S 的相对保留时间的 RSD 分别为 0.23%、0.00%、0.031%、0.062%、0.029%、0.10%、0.11%、0.11%, 各特征峰与参照峰 S 的相对峰面积的 RSD 分别为 2.0%、0.00%、1.6%、1.0%、1.1%、4.0%、1.1%、2.3%, 与生成的对照图谱计算特征峰相似度均大于 0.90, 表明本方法重复性良好。

2.2.6 稳定性考察 精密称取开心散 (KXP202301) 粉末, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.3”项下色谱条件分别在 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样, 计算 8 个特征峰相对保留时间和峰面积的 RSD 值, 结果各特征峰与参照峰 S 的相对保留时间的 RSD 分别为 0.28%、0.00%、0.028%、0.063%、0.031%、0.10%、0.11%、0.11%, 各特征峰与参照峰 S 的相对峰面积的 RSD 分别为 2.8%、0.00%、0.75%、0.44%、0.27%、2.2%、0.42%、1.8%, 与生成的对照图谱计算特征峰相似度均大于 0.90, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定, 符合测定要求。

2.2.7 开心散基准样品指纹图谱评价以及化学成分指认和归属 精密称取开心散粉末, 按“2.2.2”项下方法制备 15 批开心散基准样品的供试品溶液 (S1~S15)。按“2.2.3”项下色谱条件测定, 对 15 批开心散基准样品的指纹图谱进行测定, 并生成对照图谱 (R)。结果表明 15 批开心散基准样品呈现 8 个特征峰; 以相似度评价系统计算得到 15 批开心散基准样品与 R 的相似度均不低于 0.90, 说明建立的指纹图谱评价方法稳定可靠。与对照品进行比较, 指认了其中 3 个共有峰, 即峰 1 为远志吡啶Ⅲ, 峰 2 为 3, 6'-二芥子酰基蔗糖, 峰 5 为 β-细辛醚。通过比对分析, 对开心散物质基准共有峰进行归属, 其中 3、4、8 号峰来自远志, 6 号峰来自人参, 结果见图 1~2 和表 3。

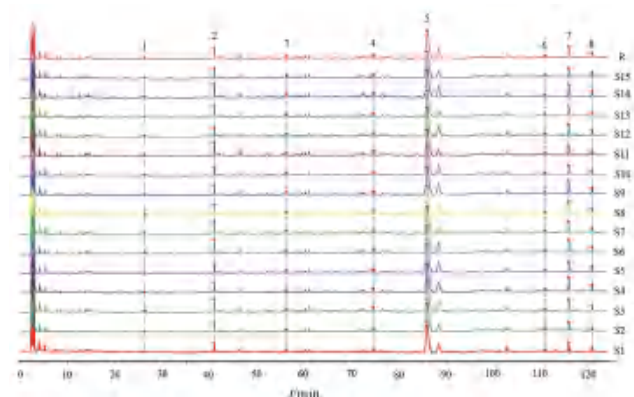


图 1 开心散基准样品 (S1~S15) 指纹图谱

Fig 1 Fingerprints of Kaixin powder reference samples (S1~S15)

2.3 化学识别模式分析

2.3.1 聚类分析 以 15 批开心散样品的 8 个共有峰面积结果为变量, 建立开心散基准样品的聚类分析图 (见图 3)。平方欧氏距离为 5 时, 15 批开心散可分为三大类: KXP202301 为一类, KXP202303 和 KXP202310 聚为一类, 余下批次聚为一类。

2.3.2 主成分分析 (PCA) 以 8 个共有峰的峰面积为变量进行 PCA, 结果显示 KMO = 0.561, 按 Bartlett 球型检验 $P < 0.05$, 说明研究数据适合该分析, 以特征值 > 1 为标准筛选得到 3 个主成分, 具体见图 4~5 和表 4。

2.4 开心散基准样品的含量测定

2.4.1 供试品溶液的制备 精密称取开心散粉末 1.000 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 75% 甲醇 25 mL, 称定重量, 超声处理 (功率 250 W, 频率 50 kHz) 30 min, 放冷, 再称定重量, 用 75% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称取远志吡啶Ⅲ、3, 6'-二芥子酰基蔗糖、人参皂苷 Re、人参

表 3 15 批开心散基准样品相似度结果

Tab 3 Similarity of 15 batches of Kaixin powder reference samples

批号	相似度
对照图谱	1.000
KXP202301	0.999
KXP202302	0.999
KXP202303	1.000
KXP202304	0.999
KXP202305	1.000
KXP202306	0.999
KXP202307	1.000
KXP202308	1.000
KXP202309	0.999
KXP202310	0.999
KXP202311	0.999
KXP202312	1.000
KXP202313	1.000
KXP202314	0.999
KXP202315	1.000

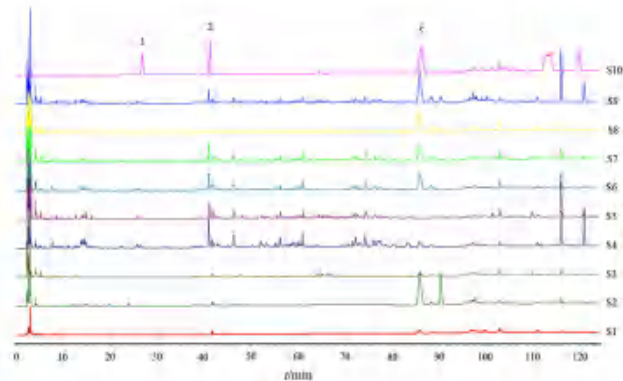


图 2 开心散指纹图谱色谱峰指认图谱

Fig 2 Chromatographic identification of Kaixin powder fingerprints
1. 远志卟酮Ⅲ (polygalaxanthone Ⅲ); 2. 3, 6'-二芥子酰基蔗糖 (3, 6'-diisooctanoyl sucrose); 5. β -细辛醚 (β -asarone)

注 (Note): S1. 茯苓 (Poria cocos); S2. 石菖蒲 (Acorus tatarinowii); S3. 人参 (Ginseng); S4. 远志 (Polygalae Radix); S5. 缺石菖蒲阴性样品溶液 (negative sample solution without Acorus tatarinowii); S6. 缺人参阴性样品溶液 (negative sample solution without Ginseng); S7. 缺茯苓阴性样品溶液 (negative sample solution without Poria cocos); S8. 缺远志阴性样品溶液 (negative sample without Polygalae Radix); S9. 开心散供试品溶液 (Kaixin powder sample solution); S10. 混合对照品溶液 (mixed reference solution)。

皂苷 Rb₁、 β -细辛醚、 α -细辛脑对照品, 加 75% 甲醇制成每 1 mL 含远志卟酮Ⅲ 10 μ g、3, 6'-二芥子酰基蔗糖 30 μ g、人参皂苷 Re 25 μ g、人参皂苷 Rb₁ 30 μ g、 β -细辛醚 120 μ g、 α -细辛脑 2 μ g 的混合对照品溶液。

2.4.3 阴性样品溶液制备 分别精密称取缺远志、人参、茯苓、石菖蒲的 4 个阴性样品约 1.000 g, 按“2.4.1”项下方法制备, 即得。

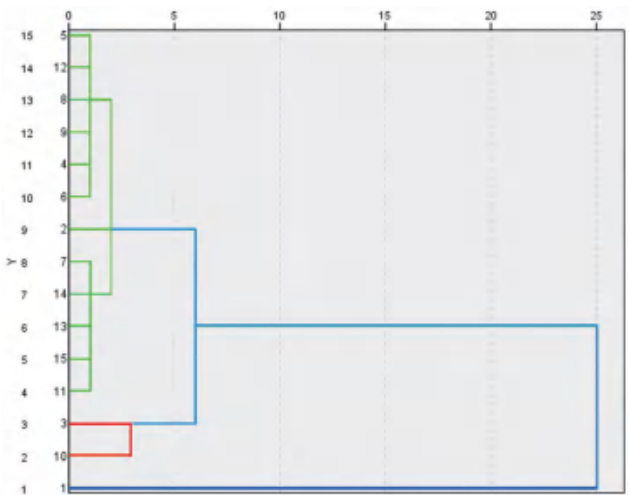


图 3 15 批开心散聚类分析图

Fig 3 Cluster analysis of 15 batches of Kaixin powder

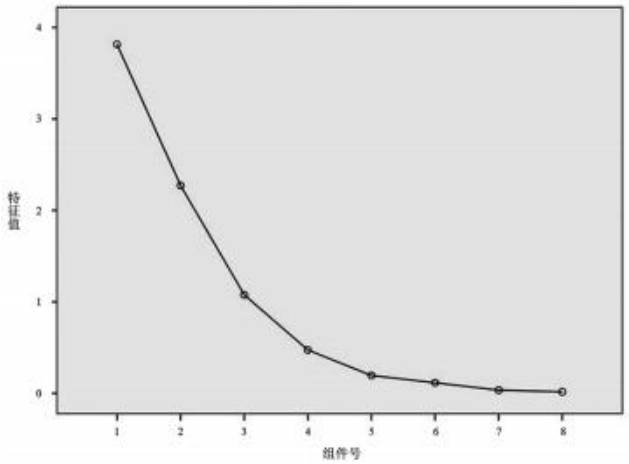


图 4 15 批开心散主成分分析碎石图

Fig 4 Gravel plot of principal component analysis of 15 batches of Kaixin powder

表 4 15 批开心散中 3 个主成分的成分矩阵

Tab 4 Composition matrix of 3 main components of 15 batches

Kaixin powder			
共有峰	PC1	PC2	PC3
1	0.902	0.326	0.128
2	0.951	0.187	-0.064
3	0.640	0.551	-0.302
4	0.924	-0.209	0.025
5	-0.787	0.225	0.197
6	0.235	0.238	0.927
7	-0.239	0.934	0.099
8	-0.320	0.897	-0.240

2.4.4 色谱条件 色谱柱为 Thermo TM120-C18 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 以乙腈 (A) -0.05% 磷酸溶液 (B) 为流动相进行梯度洗脱 (0 ~ 3 min, 15% ~ 16%A; 3 ~ 5 min, 16% ~ 20%A; 5 ~ 16 min, 20%A; 16 ~ 21 min, 20% ~ 25%A; 21 ~ 31 min, 25% ~ 27%A; 31 ~ 38 min, 27% ~ 33%A;

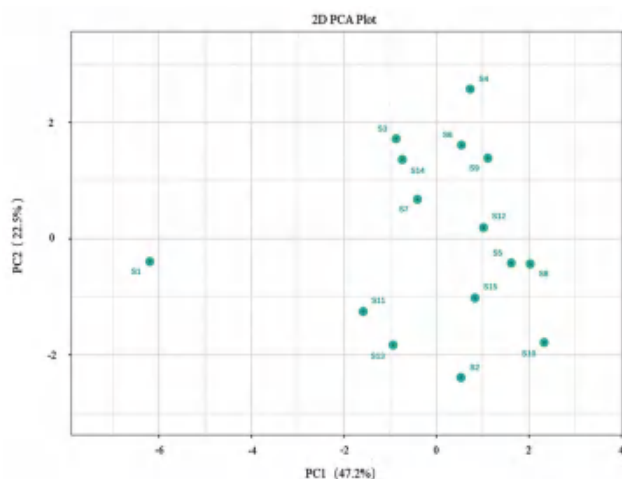


图5 15批开心散的PCA得分图

Fig 5 PCA score plot of 15 batches of Kaixin powder

38 ~ 47 min, 33% ~ 40%A; 47 ~ 59 min, 40%A; 59 ~ 62 min, 40% ~ 48%A; 62 ~ 70 min, 48% ~ 52%A); 检测波长为 203 nm; 柱温为 30 °C; 流速为 1.0 mL · min⁻¹; 进样量为 10 μL。

2.4.5 开心散基准样品含量测定专属性考察 分别吸取空白溶剂 (75% 甲醇)、缺远志阴性样品溶液、缺人参阴性样品溶液、缺茯苓阴性样品溶液、缺石菖蒲阴性样品溶液、开心散供试品溶液以及混合对照品溶液进行检测。结果表明空白溶剂对检测无干扰, 其中远志呋酮Ⅲ (峰 1)、3, 6'-二芥子酰基蔗糖 (峰 2) 来自远志, 人参皂苷 R₁ (峰 3) 来自人参, β-细辛醚 (峰 4) 来自石菖蒲, 结果见图 6。

2.4.6 线性关系考察 精密称取远志呋酮Ⅲ、3, 6'-二芥子酰基蔗糖、β-细辛醚、人参皂苷 Re、α-细辛脑、人参皂苷 R_{B1} 对照品, 配制成质量浓度分别为 0.084、0.24、0.44、0.46、0.49、0.076 mg · mL⁻¹ 的混合对照品母液。精密量取混合对照品母液, 逐级稀释, 按“2.4.4”项下色谱条件测定线性关系。以测得的响应信号作为被测物浓度的函数, 再用最小二乘法进行线性回归。结果远志呋酮Ⅲ、3, 6'-二芥子酰基蔗糖、β-细辛醚、人参皂苷 Re、α-细辛脑、人参皂苷 R_{B1} 的线性回归方程分别为: $Y = 271.55X - 0.0142$ (0.0013 ~ 0.0420 mg · mL⁻¹)、 $Y = 218.72X + 0.1954$ (0.0037 ~ 0.1200 mg · mL⁻¹)、 $Y = 908.69X + 1.592$ (0.0076 ~ 0.2440 mg · mL⁻¹)、 $Y = 35.55X + 0.0339$ (0.0069 ~ 0.2200 mg · mL⁻¹)、 $Y = 561.33X + 0.2038$ (0.0012 ~ 0.0380 mg · mL⁻¹)、 $Y = 27.652X + 0.029$ (0.0073 ~ 0.2320 mg · mL⁻¹), r 均大于 0.999, 表明各成分与峰面积线性关系良好。

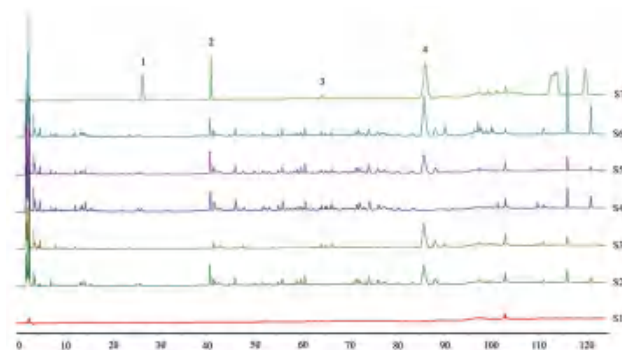


图6 开心散含量测定方法学专属性色谱图

Fig 6 Specificity chromatogram of the content determination for Kaixin powder

1. 远志呋酮Ⅲ (polygalaxanthone Ⅲ); 2. 3, 6'-二芥子酰基蔗糖 (3, 6'-diisooctanoyl sucrose); 3. 人参皂苷 R_{B1} (ginsenoside R_{B1}); 4. β-细辛醚 (β-asarone)

注 (Note): S1. 75% 甲醇 (75% methanol); S2. 缺人参阴性样品溶液 (negative sample solution without Ginseng); S3. 缺远志阴性样品溶液 (negative sample solution without Polygalae Radix); S4. 缺石菖蒲阴性样品溶液 (lack of acorus tatarinowii Schott negative sample solution); S5. 缺茯苓阴性样品溶液 (negative sample solution without Poria cocos); S6. 开心散供试品溶液 (Kaixin powder sample solution); S7. 混合对照品溶液 (mixed reference solution)。

2.4.7 加样回收试验 精密称取同一批次开心散 (KXP202301) 粉末, 按“2.4.1”项下方法制备 6 份供试品溶液, 取同一批号的供试品溶液 6 份, 分别检测 6 种指标性成分的含量。结果显示加样回收率范围均在 90% ~ 108%, 计算得 6 个峰的峰面积 RSD 值均小于 2.0%, 表明开心散含量测定 6 种指标性成分的加样回收率良好。

2.4.8 重复性考察 精密称取同一批号开心散 (KXP202301) 粉末, 按“2.4.1”项下方法制备 6 份供试品溶液, 分别测定 6 种成分含量, 结果 RSD 值均小于 2.0%, 表明本方法重复性良好。

2.4.9 精密度考察 精密称取同一批号开心散 (KXP202301) 粉末, 按“2.4.1”项下方法制备供试品溶液, 连续测定 6 次, 计算得 6 种成分含量的 RSD 值均小于 2.0%, 表明仪器精密度良好。

2.4.10 稳定性考察 精密称取同一批开心散 (KXP202301) 粉末按“2.4.1”项下方法制备, 分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 进样, 测定 6 种成分的峰面积。与 0 h 相比, 各峰面积变化值的 RSD 值均小于 2.0%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.11 开心散基准样品含量测定结果 精密称取 15 批开心散基准样品粉末, 按“2.4.1”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.4.4”项下方法测定。结果表明, 15 批开心散基准样品中远志呋酮Ⅲ含量为 0.1802 ~ 0.3969 mg · g⁻¹, 3, 6'-二芥子酰基

蔗糖含量为 $1.0032 \sim 2.0445 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、人参皂苷 Re 含量为 $0.9586 \sim 1.5035 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、人参皂苷 Rb₁ 含量为 $0.4144 \sim 0.8271 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 β -细辛醚含量为 $2.3851 \sim 3.4561 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、 α -细辛脑含量为 $0.0286 \sim 0.0346 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ，见表 4。

表 4 15 批开心散基准样品含量测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
Tab 4 Content of 15 batches of Kaixin powder reference samples ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

批号	远志呋喃酮Ⅲ	3, 6'-二芥子酰基蔗糖	人参皂苷 Re	人参皂苷 Rb ₁	β -细辛醚	α -细辛脑
KXP202301	0.3969	2.0445	1.2565	0.6690	3.2827	0.0327
KXP202302	0.2596	1.3218	1.1034	0.5234	3.1155	0.0329
KXP202303	0.2918	1.2537	1.1774	0.5460	3.0661	0.0294
KXP202304	0.2832	1.2577	1.4462	0.6881	3.1365	0.0288
KXP202305	0.3368	1.9440	0.9586	0.5106	3.0877	0.0287
KXP202306	0.2513	1.2742	1.0756	0.4144	2.9745	0.0291
KXP202307	0.2349	1.3578	1.3565	0.5750	2.9790	0.0328
KXP202308	0.2588	1.3290	1.5035	0.7489	3.0752	0.0322
KXP202309	0.2926	1.2400	1.4253	0.7970	3.2709	0.0320
KXP202310	0.1802	1.0032	1.1358	0.6711	3.1199	0.0286
KXP202311	0.2571	1.3762	1.0486	0.5077	2.3851	0.0346
KXP202312	0.2354	1.4120	1.1357	0.5116	3.2944	0.0327
KXP202313	0.3393	1.7719	1.2829	0.5708	3.4561	0.0343
KXP202314	0.2160	1.2942	1.4893	0.8271	3.4053	0.0311
KXP202315	0.1849	1.0830	1.0896	0.6685	3.0949	0.0316

3 讨论

3.1 开心散指标成分的确定

现有研究表明，开心散的人血成分主要有入参中的人参皂苷 Rb₁、Rg₁、Rd、Re，石菖蒲中的 α -细辛醚、 β -细辛醚以及远志中的西伯利亚远志糖、远志呋喃酮Ⅲ和 3, 6'-二芥子酰基蔗糖等成分^[16-19]。其中，人参皂苷 Rb₁、Re 是人参中的有效成分，具有抗抑郁、抗氧化、抗衰老、改善认知障碍等作用^[20-21]。石菖蒲中有效成分主要为挥发性成分 α -细辛醚和 β -细辛醚，它们具有抗肿瘤、抗炎、抗癫痫、抗血栓等药理作用^[22-23]。在 2020 年版《中国药典》中，远志呋喃酮Ⅲ和 3, 6'-二芥子酰基蔗糖为远志含量测定的指标成分，研究表明其具有抗焦虑、抗抑郁、保护神经、改善记忆等作用^[24-25]，是远志的主要活性成分。

因此，本研究选择远志呋喃酮Ⅲ、3, 6'-二芥子酰基蔗糖、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁、 β -细辛醚、 α -细辛脑作为开心散含量测定的指标性成分。

3.2 开心散指纹图谱色谱条件考察

在开心散指纹图谱检测中，本研究以乙腈和 0.05% 磷酸溶液作为流动相，对开心散基准样品进行梯度洗脱，还考察了不同柱温（25、30、35℃）、不同波长（203、245 nm）对开心散基准样品溶液分离效果的影响，结果发现在 30℃、203 nm 条件下能获得适宜的保留时间和分离度。

3.3 化学模式识别及含量测定的结果分析

本研究建立了开心散 HPLC 指纹图谱，共确定了 8 个共有峰，并指认了 1 号峰为远志呋喃酮Ⅲ、2 号峰为 3, 6'-二芥子酰基蔗糖、4 号峰为 β -细辛醚。15 批开心散指纹图谱的相似度均在 0.900 以上，表明制备的开心散基准样品间一致性良好，整体质量稳定。在化学模式识别分析中，15 批开心散被分为三类，PCA 结果发现不同批次的开心散存在一定差异，这可能与不同产地药材的含量有关^[26]。在开心散含量测定结果中，不同批次的指标性成分含量也存在一定差异，这可能与药材的产区、采收、炮制加工以及储存运输等因素相关^[27]。

4 结论

本研究采用 HPLC 指纹图谱与多指标成分含量测定相结合的方法，对经典名方开心散 15 批基准样品进行了系统考察，所建立的指纹图谱和含量测定方法是开心散质量控制标准的重要组成部分，为后续经典名方开心散的开发及质量评价提供了参考依据。

参考文献

- [1] 任宏丽, 章林, 梁尚华, 等. 从“两个结合”视角全面理解“中医学是中国古代科学的瑰宝, 也是打开中华文明宝库的钥匙”[J]. 中医药管理杂志, 2023, 31 (7): 5-7.
- [2] 国家中医药管理局. 古代经典名方目录 (第一批) [EB/

- OL] (2018-04-13) [2024-09-30]. https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2018-12/31/content_5429153.htm.
- [3] 殷俊梅, 王偲, 丁侃, 等. 经典名方开心散及其类方中医文献研究概述[J]. 中国医药导刊, 2023, 25(4): 416-419.
- [4] 冯佳鑫, 葛珈铭, 赵容, 等. 远志的本草考证[J]. 中国民族民间医药, 2019, 28(11): 35-39.
- [5] 刘亚新, 崔为, 张承坤. 人参“开心”与“补心”考辨[J]. 中医学报, 2024, 39(4): 717-721.
- [6] 孙思邈. 备急千金要方[M]. 鲁兆麟主校. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1997: 222-223.
- [7] 单晓晓, 周乐乐, 李大伟, 等. 经典名方开心散治疗阿尔茨海默病的机制研究进展[J]. 中草药, 2023, 54(11): 3685-3695.
- [8] 曲苏晨. 开心散调控中枢神经炎症系统抗抑郁作用机制研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2021.
- [9] 史宝瑞, 程美佳, 袁常斌, 等. 开心散及其组方中药治疗阿尔茨海默病研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(5): 112-122.
- [10] 汪海芹, 刘彦廷, 蔡忠明, 等. 开心散联合盐酸多奈哌齐治疗老年相关性痴呆的临床分析[J]. 老年医学与保健, 2022, 28(2): 242-245, 251.
- [11] 刘彦宏, 徐红丹, 董晓红, 等. 开心散抗抑郁和抗阿尔茨海默病的药理作用及其机制研究[J]. 中药材, 2023, 46(7): 1835-1841.
- [12] 李少瑜. 基于 SIRT3/NLRP3 通路探究开心散改善 APP/PS1 小鼠认知障碍的机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2023.
- [13] 杨洪军, 黄璐琦. 经典名方的研发: 中医药传承发展的突破口之一[J]. 中国现代中药, 2018, 20(7): 775-779.
- [14] 蒋近近, 吴磊, 朱育凤, 等. 不同煎煮时间桑白皮汤煮散与汤剂的特征图谱及多指标成分含量比较[J]. 中国药房, 2023, 34(5): 565-568, 574.
- [15] 孙国祥, 孙万阳, 张晶, 等. 中药质量一致性评价体系 - 基于定量指纹图谱检查的中药标准制剂控制模式的解析[J]. 中南药学, 2018, 16(1): 2-13.
- [16] 张爱华, 王喜军, 孙晖, 等. 基于代谢组学策略研究开心散治疗的药效物质和作用机理[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2016.
- [17] 吴曦. 经典名方开心散的物质基准研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2023.
- [18] 姜艳艳, 戴莹, 巴寅颖, 等. 基于开心散 - 远志类药有效组分特征图谱的远志质量表征研究[J]. 北京中医药大学学报, 2011, 34(8): 544.
- [19] 杨璇, 李俊莹, 单晓晓, 等. 开心散化学成分、药理作用的研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(8): 2077-2085.
- [20] 辛高杰, 陈原原, 刘子馨, 等. 人参皂苷 Re 通过 Nrf2/HO-1/PGC-1 α 通路调控线粒体生物发生减轻 H9c2 心肌细胞缺氧/复氧损伤的研究[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(4): 1064-1072.
- [21] 张桐. 人参皂苷 Re 对衰老小鼠的记忆作用研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2022.
- [22] 孙晓雪, 王宁宁, 李琳, 等. 石菖蒲有效成分对 APP/PS1 双转基因小鼠 GAP-43 表达的影响[J]. 中国医学创新, 2020, 17(25): 21-25.
- [23] Lam KYC, Wu QY, Hu WH, et al. Asarones from *Acori Tatarinowii* Rhizoma stimulate expression and secretion of neurotrophic factors in cultured astrocytes[J]. *Neurosci Lett*, 2019, 707: 134308.
- [24] 张洁. 远志中 3, 6'-二芥子酰基蔗糖酯的抗焦虑作用及药代动力学研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2022.
- [25] 李晓青, 赵佳奇, 田雅娟, 等. 远志、石菖蒲及其对药改善记忆的物质基础和作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(3): 190-199.
- [26] 张丽慧, 周秀岚, 王阳. HPLC 梯度洗脱法同时测定前列舒通胶囊中 9 种成分的含量[J]. 中国药师, 2021, 24(7): 383-387.
- [27] 孙萌, 刘雪纯, 赵玥瑛, 等. 基于 QbD 理念的散偏汤提取工艺设计空间预测[J]. 中国现代中药, 2024, 26(2): 348-356.

(收稿日期: 2024-10-02; 修回日期: 2024-11-20)

医院药学

基于 R 语言分析我院药物相关性跌倒管理数据及经验分享

文洋¹, 侯君², 李咏冰¹, 廖常菊¹, 李长英¹, 宋宗辉^{1*} (1.自贡市第一人民医院, 四川 自贡 643100; 2.成都市第三人民医院, 成都 610014)

摘要: **目的** 回顾性分析我院 2018—2023 年药物相关性跌倒或坠床事件数据, 发现潜在致跌倒的药物, 并提供药物相关性跌倒管理经验。**方法** 采用 Excel 和 R 语言分析管理成效情况、科室分布情况等数据。**结果** 通过实施 6 年的药物相关性跌倒管理措施, 我院药物相关性跌倒的年度发生例数明显减少, 且跌倒前风险评估 ≥ 4 分患者跌倒后重伤比率显著降低, 发生跌倒或坠床的前五个科室分别为呼吸科、神经内科、心内科、内分泌科、肿瘤科。**结论** 我院成功降低了药物相关性跌倒事件的发生率, 并改善了跌倒患者的安全状况, 本研究为药物相关性跌倒的预防和管理提供了实践依据, 也为其他医疗机构提供了可借鉴的经验。

关键词: 药物相关性跌倒; 坠床; R 语言

中图分类号: R95

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)04-1117-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.037

Drug-related fall management data and experience in a hospital based on R language

WEN Yang¹, HOU Jun², LI Yong-bing¹, LIAO Chang-ju¹, LI Chang-ying¹, SONG Zong-hui^{1*} (1. Zigong First People's Hospital, Zigong Sichuan 643100; 2. Chengdu Third People's Hospital, Chengdu 610014)

Abstract: **Objective** To retrospectively analyze the data of drug-related falls or falls from bed in a hospital from 2018 to 2023, identify potential fall causing drugs, and provide experience in management. **Methods** Excel and R language were used to analyze data on management effectiveness and departments involved. **Results** Through the implementation of 6-year drug related fall management, the incidence of annual drug-related falls in this hospital significantly decreased, and the incidence of serious injuries after the falls in patients with a pre fall risk assessment score higher than 4 also decreased. The top five departments with patient falls or falls from bed were department of respiration, neurology, cardiology, endocrinology, and oncology. **Conclusion** The incidence of drug-related falls has been successfully reduced and improved the safety of patients. This study provides practical basis for the prevention and management of drug-related falls, as well as valuable experience for other medical institutions.

Key words: drug-related fall; fall from bed; R language

2015 年全国疾病监测系统死因监测结果显示, 我国 65 岁及以上老年人跌倒死亡数为 58.03/10 万, 占该年龄人群全部伤害致死原因的 34.83%, 是老年人首位伤害死因^[1]。为减少跌倒或坠床的发生率, 我

院对全院所有病区发生的跌倒或坠床事件进行了详细统计并汇总到护理部。“词云”通过“像素累加”形成关键词渲染, 可对数据中出现频率较高的“关键词”进行视觉突出, 以减少冗余的表格, 是近年流行

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No.81900339)。

作者简介: 文洋, 女, 护师, 主要从事临床护理研究, email: 1601387910@qq.com * **通信作者:** 宋宗辉, 男, 主管药师, 主要从事医院药学工作, email: 756164339@qq.com

的一种统计学方式^[2]，本研究采用 R 语言进行词云统计，回顾性分析我院药物相关性跌倒或坠床数据，并进行分类总结，探寻潜在致跌倒药物，以期为临床用药过程中预防跌倒或坠床提供一定的参考价值，从而减少由药物相关性跌倒带来的医患纠纷发生率。

1 材料与方法

1.1 数据来源

联合护理部、信息科从我院 2018—2023 年期间共筛选得到 657 例与药物相关的跌倒或坠床事件记录，提取跌倒事件相关信息备用。

1.2 评价内容

以药物相关性跌倒患者所在的科室、院内或院外、跌倒或坠床、性别、年龄、时间段、地点、主要临床诊断、可疑使用药物、跌倒前风险最高分、伤害级别等为统计指标，分析患者基本情况、伤害级别分布情况、跌倒时间段及地点分布情况，另单独分析潜在致跌倒 / 坠床药物。

1.3 统计学方法

采用 Excel 2010 版进行数据分析，统计结果以数值或百分率 (%) 表示。通过 R 语言统计我院药物相关性跌倒发生率较高的科室、主要临床诊

断、易致跌倒药品信息，并绘制相应科室、诊断及药物类别词云。

2 结果

2.1 患者基本情况

回顾性分析我院 2018—2023 年 657 例与药物相关的跌倒或坠床事件记录，统计基本分布情况，包括性别年龄分布情况，年度例数分布情况，并根据“改良版 Morse 跌倒评估表”^[3]结合实际情况简化得到《跌倒 / 坠床危险因素评估及护理措施表》中的数据（主要统计数据包括风险评估分数和伤害级别分数），统计其中跌倒前风险评估分数 ≥ 4 患者跌倒后的伤害级别分布情况，具体数据分别见表 1、2。

表 1 药物相关性跌倒患者性别、年龄分布情况
Tab 1 Sex and age of patients with drug-related fall

年龄段 / 岁	男		女	
	例数	占比 / %	例数	占比 / %
0 ~ 17	6	0.91	7	1.07
18 ~ 45	20	3.04	14	2.13
46 ~ 69	136	20.70	117	17.81
> 69	207	31.51	150	22.83
合计	369	56.16	288	43.84

表 2 药物相关性跌倒患者伤害级别分布情况 [n(%)]
Tab 2 Damage levels of patients with drug-related fall [n(%)]

年度	例数 / n	跌倒前风险评估分数 ≥ 4 的患者跌倒后的伤害级别分布					
		0 级	1 级	轻度伤害	2 级	3 级	中重度伤害
2018 年	84	15 (17.86)	10 (11.9)	25 (29.76)	9 (10.71)	7 (8.33)	16 (19.04)
2019 年	129	20 (15.5)	34 (26.36)	54 (41.86)	32 (24.81)	11 (8.53)	43 (33.34)
2020 年	134	38 (28.36)	34 (25.37)	72 (53.73)	32 (23.88)	4 (2.99)	36 (26.87)
2021 年	108	44 (40.74)	28 (25.93)	72 (66.67)	9 (8.33)	0 (0)	9 (8.33)
2022 年	107	15 (14.02)	23 (21.5)	38 (35.52)	15 (14.02)	8 (7.48)	23 (21.5)
2023 年	95	25 (26.32)	37 (38.95)	62 (65.27)	9 (9.47)	4 (4.21)	13 (13.68)

由表 1 计算可知，药物相关性跌倒的患者男：女 = 1.28 : 1，年龄分布以中老年居多；由表 2 可以发现，自实行药物相关性跌倒管理的科室从 2018 年的少数试点科室推广到 2019 年度的全院以来，药物相关性跌倒或坠床例次呈先上升后下降趋势，表明我院护理工作人员在患者防跌倒的意识正在逐年加强。自 2019 年我院重视药物相关性跌倒管理以后，跌倒前风险评估分数 ≥ 4 患者跌倒后的中重度伤害比率逐年降低，尤以 2021 年防跌倒管理效果最好，轻度伤害：中重度伤害 = 8 : 1，达成该效果可能与该年度为新冠期间管理力度较大有关，间接表明我院药物相关性跌倒管理较为成功。

2.2 跌倒基本情况

分析药物相关性跌倒或坠床事件的时间段分

布情况，地点分布情况，院内外分布及跌倒坠床情况，具体数据见表 3。

由表 3 计算可知，发生药物相关性跌倒或坠床的时间段以下夜（1：00—8：00）和上夜（17：30—次日 1：00）记录较多，两者占比达 60% 以上；事件发生地点以床旁和厕所的记录较多，两者占比达 70% 以上。

2.3 患者科室分布排名情况及词云图

根据统计结果，我院 657 例药物相关性跌倒记录中排名前五的科室分别为呼吸科、神经内科、心内科、内分泌科、肿瘤科，采用“1.3”项下词云绘制方法绘制科室词云结果见图 1A，另分析上述重点科室的易致跌倒排名前三位的药物类别，结果见表 4。

表 3 药物相关性跌倒基本情况

Tab 3 Basic information on drug-related falls

时间段	例次	占比 /%	地点	例次	占比 /%	院内外分布	例数	占比 /%	跌倒坠床情况	例数	占比 /%
下夜	210	31.96	床旁	248	37.75	院内	602	91.63	跌倒	592	90.11
上夜	186	28.31	厕所	217	33.03	院外	55	8.37	坠床	65	9.89
上午	110	16.74	其他地方	102	15.52						
下午	97	14.76	走廊	54	8.22						
中午	54	8.22	病房	36	5.48						

表 4 重点科室易致跌倒药物分布情况

Tab 4 Distribution of fall-risk-increasing drugs in key departments

科别	总例次 [n (%)]	位次 1	位次 2	位次 3
呼吸科	88 (13.39)	利尿药	扩血管药	降压药
神经内科	78 (11.87)	扩血管药	降颅内压药	镇静催眠药
心内科	71 (10.81)	扩血管药	降压药	抗心律失常药
内分泌科	69 (10.5)	降糖药	降压药	利尿药
肿瘤科	52 (7.91)	化疗药	麻醉镇痛药	镇静催眠药

由表 4 可知，呼吸科在药物相关性跌倒或坠床事件比例占比最高，占 657 例事件中的 13.39%，产生该现象的原因可能是我院呼吸科为国家级重点专科，危重症患者较多，且统计年度涵盖整个新型冠状病毒感染期间管理年度。

2.4 主要诊断词云绘制

采用“1.3”项下方法统计我院药物相关性跌倒的主要诊断，统计频数大于 2 的诊断，绘制主要诊断词云，诊断词云结果见图 1B。由图 1B 可知，我院药物相关性跌倒患者主要诊断为脑梗死、糖尿病、慢性肾衰竭（CRF）、冠心病、高血压、慢性阻塞性肺疾病（COPD）、肺癌、肺部感染、贫血、心力衰竭等。

2.5 药物类别词云绘制

采用“1.3”项下方法整体统计我院药物相关性跌倒记录中的具体使用药物，将具体药物转换为类别后绘制药物类别词云，药物类别词云结果见图 1C。由图 1C 可发现，我院导致患者发生药物相关性跌倒的主要药物为传统降压药（主要为硝苯地平）、降糖药（主要为胰岛素）、利尿药（主要为呋塞米）、扩血管药（主要为硝普钠）等。



图 1 科室词云（A）、主要诊断词云（B）、药物类别词云（C）的绘制

Fig 1 Drawing of departments word cloud (A), main diagnostic word cloud (B), and drug category word cloud (C)

2.6 易致跌倒药物数据分布情况

采用“1.3”项下方法统计我院药物相关性跌倒事件记录中的使用药物，将具体使用药物转化为药物类别，统计药物类别频数大于 40 次的即视为易致跌倒药物。

2.6.1 降压药 根据统计结果，我院降压药中容易引起跌倒的主要为传统降压药（频数为 178，其中单药频数为 70，联合用药频数为 108）、利尿剂（频数为 109，其中单药频数为 25，联合用药频数为 84）、扩血管药（频数为 117，其中单药频数为 32，联合用药频数 85）和降颅内压药（如甘露醇注射液等，频数为 20，其中单药频数为 10，联合用药频数为 10）。

2.6.2 降糖药 我院易致跌倒降糖药中以胰岛素以及口服降糖药中的磺酰脲类、双胍类、格列奈类促胰岛素分泌剂、胰岛素增敏剂为主，其中总

频数为 109，单药频数为 38，联合用药频数 71。其中，有频数为 82 的患者在跌倒前出现体虚乏力的共同特征。

2.6.3 镇静催眠镇痛药 镇静镇痛药中易引起患者跌倒的多为以地西洋为主的镇静催眠药以及兼有中枢性麻醉作用的麻醉镇痛药，其中总频数为 125，单药频数为 55，联合用药频数为 70。

2.6.4 抗肿瘤药 主要包括以多西他赛、奥沙利铂等为主的抗肿瘤（化疗）药物，总频数为 45，单药频数为 33，联合用药频数为 12。

3 讨论

3.1 药物相关性跌倒人群特征

由表 1 可知，药物相关性跌倒患者中，0～17 岁未成年患者占比约 2%，18～45 岁青年患者占比约 5%，46 岁及以上的中老年患者占比约 93%，因此，我院 657 例与药物相关的跌倒或坠床的患者以

中老年人居多,且不同年龄段的男性患者均多于女性患者,但这与赵萌姝^[4]研究论文结论中“女性跌倒率要比男性高”不一致,主要原因可能为本研究样本为医院患者,存在一定的健康差异。另袁亚运等^[5]的研究表明,中国老年人跌倒存在性别差异的主要因素为健康状态,医院患者的健康状态均较差,因此女性跌倒率高于男性不是绝对的,相反 69 岁以上老年男性患者在用药后发生跌倒的概率大幅提升,为老年女性患者的 1.38 倍,可适当加以重视。

3.2 易致跌倒药物分析

易致跌倒药物的类别主要为降压药、降糖药、镇静催眠镇痛药、抗肿瘤药,其致跌倒的机制主要为导致低血压、低血糖、嗜睡、眩晕、精神混乱、认知受损、共济失调、肌肉松弛、体虚乏力、平衡系统障碍。

3.2.1 降压药 对于降压药而言,联合用药更易导致药物相关性跌倒。值得注意的是,应用降压药后发生药物相关性跌倒的科室中,呼吸科、神经内科、中医科等科室总频数远超过内分泌、心内科等科室频数,故建议这些科室在应用降压药过程中适当增加会诊次数、减少联合用药,以安全有效地使用药物,减少药物相关性跌倒。另外,赵霞等^[6]研究表明,利尿药就药物自身而言不会增加跌倒的风险,但《高血压合理用药指南》^[7]显示大剂量应用利尿药治疗时还需注意其导致直立性低血压等不良反应的可能性,因此,利尿药的应用需引起额外关注。

3.2.2 降糖药 在应用降糖药的患者中,大部分患者出现体虚乏力的共同特征,部分甚至出现意识模糊,因此,降糖药导致跌倒的主要共同点可能为当血糖降低时,大脑或机体可能会因为缺乏能量而出现异常反应^[8],如意识丧失或体虚乏力,这可能导致患者失去平衡感或无力支持身体站立,从而导致跌倒。

3.2.3 镇静催眠镇痛药 统计数据发现,发生频数较高的科室主要为患者高度需要镇静催眠及麻醉镇痛的科室,如神经内科、肿瘤科以及部分手术科室,应用该类药物后可能产生较强的嗜睡、晕眩、精神混乱、认知受损、肌肉松弛、运动失调等不良反应^[9-10],此外,Neutel 等^[11-12]研究显示,在开始服用苯二氮草类药物后的两周内跌倒风险最高。

3.2.4 抗肿瘤药 根据统计结果,患者应用抗肿瘤(化疗)药物以后,大多自理能力变得极差,主要原因因为该类药使用后容易出现身体虚弱、四肢乏力的不良反应,故建议使用抗肿瘤药的患者可适当增加家属陪护次数。

3.3 易忽视致跌倒药物分析

由“2.5”项下分析可知,常见易致跌倒药物除传统降压药(主要为硝苯地平)、降糖药(主要为胰岛素)、利尿药(主要为呋塞米)、扩血管药(主要为硝普钠);以外,还有眼科用药、抗菌消炎药、调血脂药、抗心律失常药、强心类药物、神经系统药物(包括抗精神病药、抗抑郁药、抗癫痫药、抗帕金森药)、抗组胺药、肌肉松弛药等药物容易被忽视。

3.3.1 眼科用药 据统计结果,眼科容易引起药物相关性跌倒的药品主要为验光使用的散瞳药阿托品滴眼液。李双莲等^[16]研究报道,使用散瞳药后,瞳孔散大,视网膜及黄斑接受到更多的光线,可能会对视网膜和视神经产生光损害,易出现畏光、视近困难、视物模糊等不良反应,并引起视觉平衡系统障碍而导致身体失去平衡感觉,进而发生药物相关性跌倒。因此,患者在使用该类药物时,需引起重视。

3.3.2 抗菌消炎药 与本次研究相关的抗菌消炎代表药物主要为阿奇霉素、哌拉西林、莫西沙星、氨基糖苷类。根据事件描述,上述药物导致的跌倒均非过敏性休克所致,根据文献调研发现,阿奇霉素^[17]使用后可导致肌肉无力、心动过速、意识丧失等不良反应,哌拉西林^[18]和莫西沙星^[19]均存在头晕的不良反应,而氨基糖苷类^[20]易引起前庭功能失调,造成眩晕、眼球震颤及平衡障碍,因而,这可能是患者使用该类药物出现药物相关性跌倒的重要因素。

3.3.3 调血脂药 由统计结果可知,以阿托伐他汀钙片与瑞舒伐他汀钙片等他汀类药物在药物相关性跌倒中出现频数较高。罗焯等^[21]研究报道长期服用该类药物可能导致一些严重不良反应,如横纹肌溶解、头痛、头晕等,因此,患者服用此类药物需要采取预防跌倒措施。

3.4 潜在致跌倒药物分析

根据统计数据,本研究将发生 2~5 例跌倒事件记录的相关药物作为潜在致跌倒风险药物,经过文献及说明书调研,分析如下。

坦索罗辛为治疗良性前列腺增生的药物,但因其能抑制 α_1 受体,容易引起直立性低血压,并能产生头晕、头痛、嗜睡等不良反应,故存在跌倒风险。

升高血细胞药物如促红细胞生成素,该类药可导致血压升高或现有高血压加重而出现意识障碍,而导致跌倒,需引起注意。

噻托溴铵为治疗呼吸系统疾病的药物,是老年患者可能长期应用的药物,该药具有全身抗胆

碱作用，容易引发药源性青光眼及产生视力模糊^[22]，进而导致跌倒。

抗跌打损伤的外科药如正红花油喷雾也值得关注，该药物成分复杂，因其特殊气味可能会导致过敏性休克的发生^[23]，进而引起跌倒。

此外，以中药番泻叶^[24]、聚乙二醇电解质散为主的肠道准备药，导泻强度大，老年人在用药的过程中容易导致体虚乏力，进而出现头昏、行

走不稳等不良反应而导致跌倒。

4 结论

经过 6 年的药物相关性跌倒管理，我院医护人员已可以进行有意识的预防，并取得了较为显著的成效，降低了患者在我院的药物相关性跌倒发生率和跌倒后中重度伤害率，现将我院药物相关性跌倒管理经验及 PDCA 流程图（见图 2）分享如下，以期减少药物相关性跌倒纠纷提供参考。

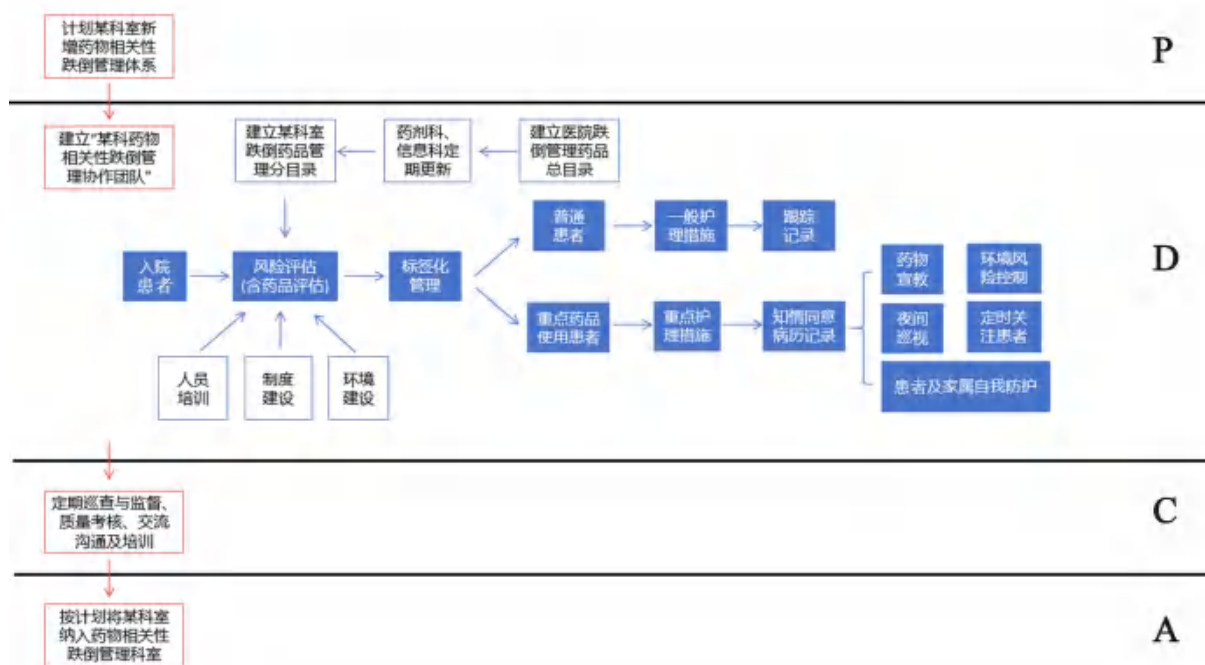


图 2 药物相关性跌倒 PDCA 管理流程图

Fig 2 PDCA management flowchart of drug-related falls

4.1 组建药物相关性跌倒合作团队

在药物相关性跌倒管理过程中，我们组建了一支以护理部为核心，药剂科、临床科室、信息科等多部门紧密协作的“跌倒管理团队”。护理部作为团队的灵魂，承担方案制订、实施管理、宣传资料制作及张贴、科室巡查与监督等重要职责，药剂科则负责药品论证、数据更新、致跌倒药物培训等工作，临床科室则负责患者管理、健康宣教、数据记录等工作，信息科负责数据维护工作。

4.2 建立易致跌倒药品目录

临床药师在上述统计结果的基础上，根据医院药品目录，结合专业知识，建立了易致跌倒药品总目录，该目录涵盖十九类药品共计 200 余品种，临床科室根据实际情况在该目录基础上建立本科室易致跌倒药品清单，该清单上的药物参照“高警示药品”管理。如有新药引进或某药品致跌倒频率增加，则该药品会及时纳入目录中并同步更新在 HIS 系统上，另标“跌”字样以提醒医护人员。

4.3 强化患者风险评估

对于每位即将使用易致跌倒药物的患者，尤其是儿童、老年人、孕妇、行动不便和残疾等患者，护士都要根据改良版“Morse 跌倒量表”对其进行风险评估，记录患者的基本信息、精神状态、体能状态及视力听力状况等，定期对患者跌倒风险进行评分，对于评分较高的患者实行标签化管理，我们建议根据医院实际情况使用防跌倒“腕带连接警示扣”或“警示贴签”（见图 3）。



图 3 腕带警示扣和警示贴签式样

Fig 3 Warning buckle and warning label style of wrist strap

4.4 重视药物使用宣教

护士会在教育患者及家属如何正确使用药物、介绍药品不良反应的基础上,着重向患者及家属强调即将使用的易致跌倒药物特征、跌倒后二次伤害后果的严重性,并告知他们如何预防跌倒。

4.5 强化夜间巡视与观察

目前我院已实行“夜间打卡”制度,对于使用易致跌倒药物的患者或跌倒风险较高的患者,护士都会在夜间每隔 1 h 进行巡视与观察,密切关注上述患者的病情变化及药物反应,一旦发现患者有跌倒倾向或已发生跌倒,及时采取相应措施,确保患者的安全。

4.6 注重科室巡查与监督

护理部通过询问患者、质控检查等方式不定期对临床科室进行“飞行检查”,尤其是神经内科、内分泌科等易发生药物相关性跌倒科室,对科室药物相关性跌倒管理纳入绩效考核,以确保管理方案的有效实施。

参考文献

- [1] 中国疾病预防控制中心慢性非传染性疾病预防控制中心,国家卫生和计划生育委员会统计信息中心.中国死因监测数据集 2015 [M]. 北京:中国科学技术出版社,2016.
- [2] 宋宗辉,刘跃辉,周义录,等.基于 R 语言分析我院处方点评大数据 [J]. 中国药业,2022,31 (23): 20-23.
- [3] 游永豪,胡俊,张阳,等.我国常用老人跌倒风险评估量表分析 [J]. 牡丹江医学院学报,2017,38 (4): 123-126.
- [4] 赵萌姝.内科老年住院患者跌倒事件原因分析及其护理干预 [J]. 护理实践与研究,2011,8 (20): 138-139.
- [5] 袁亚运,李红芳.中国城乡老年人跌倒的性别差异研究——基于 CHARLS 2015 数据 [J]. 人口与社会,2020,36 (4): 46-57.
- [6] 赵霞,高静,吴晨曦,等.利尿药与老年人跌倒风险关系的系统评价 [J]. 中华护理杂志,2017,52 (12): 1509-1515.
- [7] 国家卫生计生委合理用药专家委员会,中国医师协会高血压专业委员会.高血压合理用药指南 (第 2 版) [J]. 中国医学前沿杂志 (电子版),2017,9 (7): 28-126.
- [8] 陈守奎.常用口服降糖药分类及评价 [J]. 医药导报,2016,35 (S1): 79-81.
- [9] 刘青,董文伟.中枢神经系统用药与老年人跌倒风险的相关性研究 [J]. 实用药物与临床,2015,18 (2): 235-237.
- [10] 彭单云,董正华.我院麻醉性镇痛药的使用情况调查分析 [J]. 中南药学,2004,2 (4): 248-249.
- [11] Neutel CI, Hirdes JP, Maxwell CJ, et al. New evidence on benzodiazepine use and falls: the time factor [J]. Age Ageing, 1996, 25 (4): 273-278.
- [12] Neutel CI, Perry S, Maxwell CJ. Medication use and risk of falls [J]. Pharmacoepidemiol Drug Saf, 2002, 11 (2): 97-104.
- [13] 刘国华,杨苏芳,袁洪.抗肿瘤药物 MEK 激酶抑制剂的研究进展 [J]. 中南药学,2013,11 (5): 372-376.
- [14] 谭书想.常见铂类抗肿瘤药物耐药机制和不良反应的比较分析 [J]. 中南药学,2015,13 (5): 517-520.
- [15] 杨璐,余聂芳.长春碱类抗肿瘤药物的研究进展 [J]. 中南药学,2016,14 (6): 625-630.
- [16] 李双莲,殷小龙.阿托品滴眼液眼部不良反应的研究进展 [J]. 南昌大学学报 (医学版),2020,60 (4): 99-102.
- [17] 张玉玲,蒋睿,徐飞格,等.注射用阿奇霉素致过敏性休克及呕吐 1 例 [J]. 中南药学,2018,16 (6): 879.
- [18] 沈霞,薛健楠.205 例哌拉西林钠他唑巴坦钠不良反应报告分析 [J]. 海峡药学,2021,33 (10): 175-177.
- [19] 王宝华,肇丽梅,朱旭,等.莫西沙星 82 例不良反应报告分析 [J]. 中国药事,2020,34 (1): 114-120.
- [20] 张蓬华,董永成,卢伟.常见抗菌药物神经系统不良反应及作用机制研究进展 [J]. 中南药学,2019,17 (10): 1746-1750.
- [21] 罗烨,何桂林,左丽.阿托伐他汀与瑞舒伐他汀药品不良反应/事件报告对比分析 [J]. 罕见疾病杂志,2021,28 (4): 94-98.
- [22] 张慧明,吴朝辉.噻托溴铵吸入剂致急性青光眼 1 例分析 [J]. 实用临床医学,2012,13 (11): 27, 44.
- [23] 林阳.正红花油的不良反应 [J]. 中国药理学杂志,1999,34 (3): 193-194.
- [24] 邹会英.番泻叶临床不良反应的毒理研究与合理用药分析 [J]. 中国中医药现代远程教育,2015,13 (19): 157-158.

(收稿日期:2024-07-05;修回日期:2024-09-05)

依沃西单抗联合卡铂和培美曲塞一线治疗晚期非鳞状非小细胞肺癌患者的成本-效用分析

唐玺^{1, 2}, 胡林², 苏远², 何鸽飞^{2*} (1. 中南大学湘雅医院, 长沙 410008; 2. 中南大学湘雅医学院附属长沙医院, 长沙 410005)

摘要: **目的** 从中国卫生体系角度出发, 评价依沃西单抗联合化疗治疗 EGFR 突变晚期或转移性非鳞状非小细胞肺癌 (NSCLC) 的经济性, 为相关卫生决策提供依据。**方法** 建立分区生存模型, 以质量调整生命年 (QALYs) 作为健康效果指标计算增量成本-效果比 (ICER)。生存数据来自一项多中心随机对照开放的 III 期临床试验 HARMONi-A (AK112-301), 成本数据来自中标价格, 健康效果数据来源于已发表文献。对关键参数进行单因素敏感性分析和概率敏感性分析。**结果** 基础分析结果表明, 与单独化疗组相比, 依沃西单抗联合化疗方案的 ICER 为 1 865 375.28 元/QALY, 远高于本研究设定的意愿支付 (WTP) 阈值 (3 倍我国 2023 年人均国内生产总值, 268 074 元)。单因素敏感性分析显示依沃西单抗成本、年贴现率、无进展生存状态的效用值、疾病进展状态的效用值以及培美曲塞的价格对 ICER 有较大影响。概率敏感度分析结果表明, 在本研究设定的 WTP 阈值下, 依沃西单抗联合化疗方案具有经济性的概率为 0%。**结论** 从中国卫生体系角度, 以 3 倍我国 2023 年人均国内生产总值为 WTP 阈值, 依沃西联合化疗对比单独化疗治疗 EGFR 突变晚期或转移性非鳞状 NSCLC 不具有经济性。

关键词: 非鳞状非小细胞肺癌; 依沃西单抗; 分区生存模型; 成本-效用分析

中图分类号: R95, R96 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)04-1123-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.038

Cost-utility analysis of ivonescimab in combination with carboplatin and pemetrexed for the first-line treatment of patients with advanced nonsquamous non-small cell lung cancer

TANG Xi^{1, 2}, HU Lin², SU Yuan², HE Ge-fei^{2*} (1. Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008; 2. The Affiliated Changsha Hospital of Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410005)

Abstract: Objective To evaluate the economics of ivonescimab in combination with chemotherapy for the treatment of EGFR-mutated advanced or metastatic non-squamous non-small cell lung cancer (NSCLC) from the perspective of China's health system, and to provide a basis for related health decisions. **Methods** A compartmentalized survival model was developed to calculate the incremental cost-effectiveness ratio (ICER) with quality-adjusted life-years (QALYs) as the health outcome indicator. The survival data were obtained from a multicenter randomized controlled open phase III clinical trial HARMONi-A (AK112-301). The cost data were obtained from the winning price in bidding, and health effect data were obtained from published literatures. Deterministic sensitivity analysis and probabilistic sensitivity analysis were conducted for key parameters. **Results** The baseline analysis showed that the ICER of ivonescimab in combination with chemotherapy, as compared with that of chemotherapy alone, was 1 865 375.28 yuan/QALY, much higher than the willingness-to-pay value (3 times the gross domestic product per capita, 268 074 yuan). Univariate sensitivity analyses showed that the cost of

基金项目: 湖南省自然科学基金 (No.2022JJ80036)。

作者简介: 唐玺, 女, 在读硕士研究生, 主要从事临床药学方面的研究, email: 2022865910@qq.com * 通信作者: 何鸽飞, 女, 主任药师, 主要从事临床药学、个体化用药方面的研究, email: 326366726@qq.com

ivonescimab, the annual discount rate, the utility value of the progression-free survival state, the utility value of the progressive disease state, and the cost of pemetrexed largely affected the ICER. Probabilistic sensitivity analysis showed the probability of ivonescimab being economical at a willingness-to-pay value (3 times the value of gross domestic product per capita) was 0%. **Conclusion** Ivonescimab in combination with chemotherapy is no more economical for the treatment of EGFR-mutated advanced or metastatic non-squamous NSCLC than chemotherapy alone.

Key words: non-squamous non-small cell lung cancer; ivonescimab; partitioned survival model; cost-effectiveness

肺癌是全球范围内发病率和死亡率最高的癌种之一^[1]。我国国家癌症中心 2022 年的报告显示,肺癌发病人数达 82.8 万人,死亡人数达 65.7 万人^[2]。肺癌可分为小细胞肺癌 (SCLC) 和非小细胞肺癌 (NSCLC), 其中 NSCLC 占 85% ~ 90%。在 NSCLC 患者中,表皮生长因子受体 (EGFR) 基因突变发生率较高,亚洲 NSCLC 患者的总体突变率达到 51.4%^[3]。目前,EGFR-酪氨酸激酶抑制剂 (TKI) (EGFR-TKI) 是 EGFR 突变 NSCLC 的标准一线治疗,但获得性耐药不可避免。目前临床上 EGFR 突变尤其是第三代 TKI 治疗肺癌进展患者,最佳的治疗选择仍然有限^[4]。

近年来,免疫检查点抑制剂在 NSCLC 治疗中取得重要进展,尤其是程序性死亡受体 1 (PD-1) 单抗联合化疗已成为一线治疗非鳞状 NSCLC 的标准方案。但对于 EGFR 突变且经 EGFR-TKI 治疗后发生疾病进展的 NSCLC 患者,抗 PD-1 单抗联合化疗效果有限^[5]。血管内皮生长因子 (VEGF) 抑制剂与免疫检查点抑制剂具有协同作用^[6]。IMpower150 研究的亚组分析结果揭示了在贝伐单抗和化疗的基础上增加阿替利珠单抗能显著改善疾病无进展生存期 (PFS),证实了免疫检查点抑制剂、VEGF 抑制剂与化疗的联合使用在提高疗效方面的潜在优势^[7]。

依沃西单抗注射液是一种靶向结合 VEGF-A 和 PD-1 的 IgG1 亚型人源化双特异性抗体,竞争性阻断 VEGF-A、PD-1 与其配体的相互作用,发挥抗肿瘤活性。HARMONi-A (AK112-301) 研究是第一项双盲、安慰剂对照、随机 III 期研究,旨在比较依沃西单抗联合化疗与单独化疗在 EGFR-TKI 耐药的 EGFR 突变晚期或转移性 NSCLC 患者的疗效,结果表明,在中位随访时间为 17.6 个月时,依沃西单抗联合化疗组患者的总生存期 (OS) 和 PFS 分别为 17.6 个月和 7.1 个月,而单独化疗组患者的 OS 和 PFS 分别为 14.5 个月和 4.8 个月,联合

化疗的生存时间显著延长^[8]。

分区生存模型在肿瘤药物经济学评价中的优势在于其直接应用临床试验报告中的 PFS 和 OS 数据,简化了状态间转移概率的计算与验证,尤其适合处理长期生存数据的外推。与 Markov 模型相比,分区生存模型提供了一种更直观、简洁的分析方法^[9]。本研究基于 HARMONi-A (AK112-301) 研究,从我国卫生体系角度出发,评价了依沃西单抗联合化疗相比单纯化疗治疗晚期或转移性非鳞状 NSCLC (EGFR 突变型) 的经济性,希望能够为临床合理用药提供参考。

1 资料与方法

1.1 患者资料

研究人群来源于 HARMONi-A (AK112-301) 研究。人群纳入标准为:① 年龄不小于 18 岁且不大于 75 岁;② 确诊为转移性和局部晚期非鳞状 NSCLC 并伴有 EGFR 突变的患者;③ 既往 EGFR-TKI 治疗失败的患者。排除标准为:① 组织学或细胞学证实有小细胞癌成分,或主要成分为鳞状细胞癌;② 既往接受过免疫治疗的受试者;③ 已接受过 EGFR 抑制剂以外的全身性抗肿瘤治疗;④ 有症状的中枢神经系统转移者。

1.2 治疗方案

在 HARMONi-A 研究中,322 例患者按照分层随机化法分成两组,各 161 例,其中观察组接受依沃西单抗联合培美曲塞和卡铂注射剂治疗,对照组接受安慰剂联合培美曲塞和卡铂注射剂治疗。本研究所构建模型中两组患者的初始治疗方案与 HARMONi-A 研究一致 (见表 1)。药物治疗持续至疾病进展 (PD) 状态或发生严重不良反应以及不可接受的毒性时。在 PD 状态下,患者均进行二线药物治疗或最佳支持治疗方案。

1.3 模型的构建

根据疾病发展过程,研究使用三状态分区生存模型对疾病进程进行模拟:PFS、PD 和死亡状态,

表 1 模型中患者的治疗方案

Tab 1 Treatment regimens for patients in the model		
组别	初始治疗方案 (共 4 周期)	维持治疗方案
依沃西单抗组	依沃西单抗: 20 mg · kg ⁻¹ , 第一日	依沃西单抗: 20 mg · kg ⁻¹ , 每 3 周一次
	培美曲塞: 500 mg · m ⁻² , 第一日	培美曲塞: 500 mg · m ⁻² , 每 3 周一次
化疗组	卡铂: AUC 5 mg/ (mL · min), 第一日	
	安慰剂: 20 mg · kg ⁻¹ , 第一日	安慰剂: 20 mg · kg ⁻¹ , 每 3 周一次
	培美曲塞: 500 mg · m ⁻² , 第一日	培美曲塞: 500 mg · m ⁻² , 每 3 周一次
	卡铂: AUC 5 mg/ (mL · min), 第一日	

模型结构见图 1。假设模拟开始时所有患者均处于 PFS 状态, 依据临床实际用药疗程以 3 周为一循环周期, 研究时限为 10 年。参照《中国药物经济学评价 (2020)》, 意愿支付阈值 (WTP) 设为 2023 年人均 GDP 的 3 倍 (WTP = 268 074 元 /QALY), 成本和效用值采用 5% 的年贴现率进行贴现处理^[10]。以增量 - 成本效果比 (ICER) 作为主要输出指标, 其他次要指标还包括质量调整生命年 (QALYs)、增量 QALYs、总成本和增量成本。模型构建使用 Microsoft Excel 2016。

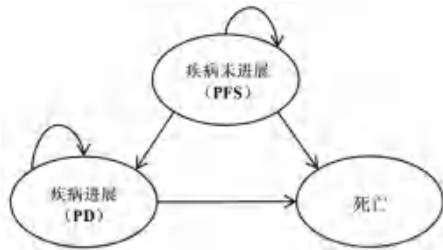


图 1 三状态分区生存模型示意图
Fig 1 Schematic diagram of the three-state partitioned survival model

1.4 生存分析

当模拟时间处于随访期内时, 从 OS 和 PFS 曲线中直接获取各健康状态的人数分布, PFS 状态人数比例可由 PFS 曲线提供, 死亡状态人数比例由 (1 - 总体生存率) 获得, 进展状态人数比例为 OS 与 PFS 曲线生存率之差。当模拟时间超出随访期时, 使用参数法来计算生存函数^[11]。首先, 使用 Engauge Digitizer 软件从 HARMONi-A 研究汇报的 Kaplan-Meier 曲线进行数字化取点, 再通过 R 语言^[12] 重构依沃西单抗组与化疗组的 OS 和 PFS 曲线, 重构后的中位值见表 2, 与原始曲线相比差异较小。根据赤池信息准则 (AIC) 和贝叶斯信息准则 (BIC) 判断最优的拟合分布, 不同风险函数的 AIC 值和 BIC 值见表 3。本研究中依沃西单抗组的 PFS 和 OS 曲线分别采用 loglogistic 分布和 lognormal 分布, 化疗组的 PFS 曲线和 OS 曲线均采用 lognormal 分布, 形状参数和尺度参数见表 4。获取拟合曲线的分布参数从而计算生存率。

表 2 两组 PFS 与 OS 拟合曲线的中位值

Tab 2 Median time after PFS and OS curve remodeling in both groups			
组别	生存指标	中位时间 / 月 (95%CI)	
		原始曲线	拟合曲线
化疗组	PFS	4.8 (4.2, 5.6)	4.8 (4.21, 5.59)
	OS	14.5 (12.8, 18.1)	14.5 (13.12, 19.91)
依沃西单抗组	PFS	7.1 (5.9, 8.7)	7.07 (5.88, 10.2)
	OS	17.1 (12.8, NE)	17.13 (14.67, NE)

注 (Note): NE. 未达到 (not estimable)。

表 3 生存曲线拟合分布的 AIC 和 BIC 值

Tab 3 AIC and BIC values for survival curve-fitting distributions					
组别	参数分布	PFS 曲线		OS 曲线	
		AIC	BIC	AIC	BIC
依沃西单抗组	Exponential	509.0636	512.1450	670.9900	674.0714
	Weibull	467.9918	474.1546	653.2630	659.4258
	loglogistic	461.9095	468.0723	648.5096	654.6724
	lognormal	466.0246	472.1874	647.5968	653.7596
化疗组	Exponential	621.9975	625.0789	746.7803	749.8617
	Weibull	589.5896	595.7524	725.4706	731.6334
	loglogistic	585.4612	591.6240	719.6272	725.7900
	lognormal	582.6201	588.7829	718.8601	725.0229

表 4 生存曲线最优拟合分布及分布参数

Tab 4 Optimally fitted distribution of survival curves and distribution parameters				
组别	曲线	拟合分布类型	形状参数	尺度参数
依沃西单抗组	OS	lognormal	2.8899	0.8885
	PFS	loglogistic	2.711	7.3130
化疗组	OS	lognormal	2.7219	0.8534
	PFS	lognormal	1.5368	0.7648

1.5 成本和效用分析

本研究从卫生体系角度出发, 计算直接医疗成本, 主要包括药品成本、不良事件 (≥ 3 级且发生率 ≥ 5%) 处理成本、随访成本、最佳支持治疗成本和疾病管理成本。其中随访成本包括影像学检查 (CT) 和实验室检查 (如血常规) 的费用。疾病管理成本包括给药费用、床位费和护理费用等。药品价格来自药智网 (<http://www.yaozhi.com/>), 参考中国人群中位体表面积 1.72 m²、体重 65 kg 和肌酐清除率 70 mL · min⁻¹ 来计算药物剂量^[13]。不良事

件处理成本、随访成本、最佳支持治疗以及管理成本均来自文献报道。由于 HARMONi-A 未收集效用数据，故各状态的效用值来自 Nafees 等^[14]报道的中国 NSCLC 患者的健康状态效用值，PFS 状态效用为 0.804，PD 状态效用为 0.321，效用值进行半周期矫正。全部单位成本、不良事件（ ≥ 3 级且发生率 $\geq 5\%$ ）发生率及效用值见表 5。

表 5 主要医疗成本、不良事件发生率、效用值以及贴现率的参数值及其分布					
Tab 5 Parameter values and their distribution for major medical costs, adverse event rates, utility values, and discount rates					
参数	基础值	下限	上限	分布	来源
成本 / 元					
依沃西单抗 100 mg	2299	1839.2	2758.8	Gamma	药智网
培美曲塞 100 mg	526	420.8	631.2	Gamma	药智网
卡铂 100 mg	51.6	41.3	61.9	Gamma	药智网
最佳支持治疗 / (每周期)	3115	2492	3738	Gamma	[15]
随访成本 / (每周期)	805	644	966	Gamma	[15]
疾病管理成本 / (每周期)	115	92	138	Gamma	[15]
不良事件处理费用 / 元					
白细胞计数减少	1291	1032.8	1549.2	Gamma	[16]
贫血	38.2	30.6	45.9	Gamma	[16]
中性粒细胞计数减少	462	369.6	554.4	Gamma	[16]
血小板计数减少	1798	1438.4	2157.6	Gamma	[16]
依沃西单抗组不良事件发生率 / %					
白细胞计数减少	20.5	16.4	24.6	Beta	[8]
贫血	15.5	12.4	18.6	Beta	[8]
中性粒细胞计数减少	31.3	25.0	37.6	Beta	[8]
血小板计数减少	16.1	12.9	19.3	Beta	[8]
化疗组不良事件发生率 / %					
白细胞计数减少	16.8	13.4	20.2	Beta	[8]
贫血	14.3	11.4	17.2	Beta	[8]
中性粒细胞计数减少	19.3	15.4	23.2	Beta	[8]
血小板计数减少	12.4	9.9	14.9	Beta	[8]
效用值					
PFS 状态效用	0.804	0.6432	0.9648	Beta	[14]
PD 状态效用	0.321	0.2568	0.3852	Beta	[14]
贴现率 / %	5	10	8	Beta	[10]

1.6 不确定性分析

本研究对相关成本数值、健康效用值、贴现率及不良反应发生率等模型中的重要参数设定范围以执行单因素敏感性分析（DSA），确定不同参数在一定范围内变化时对 ICER 的影响程度，结果以旋风图形式呈现。基于现实情况，依沃西单抗价格不存在继续升高空间，所以设定其上限为基础值，下限设置为其基础值的 80%。贴现率取

0% ~ 8%，其他参数在基础值的上下浮动 20%^[17]（见表 5）。根据变量范围和设定的参数分布进行概率敏感性分析（PSA），通过重复抽样执行 1000 次二阶蒙特卡洛模拟，结果用成本 - 效用散点图和成本 - 效用可接受曲线表示。

2 结果

2.1 基础分析结果

依沃西单抗组以 539 463.99 元的成本获得了 1.02 个 QALYs；单独化疗组的成本是（132 544.39 元，获得了 0.80 个 QALYs；两组相比的 ICER 为 1 865 375.28 元 / QALY，远高于 WTP（268 074 元 / QALY）；即与单独化疗方案相比，使用依沃西单抗联合化疗方案的患者每多获得 1 个 QALY 需多支付 1 865 375.28 元），结果见表 6。因此，依沃西单抗联合化疗治疗晚期或转移性 ERFR 突变非鳞状 NSCLC 不具有经济性。

表 6 两种方案的基础分析结果					
Tab 6 Underlying analysis of the two treatment strategies					
方案	成本 / 元	增量成本 / 元	增量 QALYs	增量 QALYs	ICER
依沃西单抗	539 463.99	406 919.59	1.02	0.22	1 865 375.28
化疗组	132 544.39	—	0.80	—	—

2.2 单因素敏感性分析结果分析

单因素敏感性分析结果见图 2，依沃西单抗成本、PFS 状态与 PD 状态的效用值、年贴现率以及培美曲塞价格对模型结果的影响较大，卡铂价格、疾病管理费用、不良事件发生率以及处理不良事件费用等对结果的影响较小。所有参数在一定范围内变化并未使结果发生翻转，表明基础分析结果较为稳健。

2.3 概率敏感性分析结果

概率敏感性分析结果见图 3、4。由图 3 可知，当 WTP 阈值为 3 倍我国 2023 年人均 GDP 时，散点全部落在第一象限且在阈值线上方，表明在获得更好的效用时，成本也较高。由图 4 可知，当 WTP 阈值为 268 074 元 / QALY 时，依沃西单抗联合化疗方案具有经济性的概率为 0%；当 WTP 阈值为 1 500 000 元 / QALY 时，依沃西单抗联合化疗方案具有经济性的概率开始升高；当 WTP 阈值为 2 087 500 元 / QALY 时，依沃西单抗联合化疗方案具有经济性的概率为 50%；随着 WTP 阈值增大，依沃西单抗联合化疗方案具有经济性的概率也随之增高。

3 讨论

EGFR 是一种跨膜酪氨酸激酶受体，属于人表皮生长因子受体（HER）家族成员之一。在

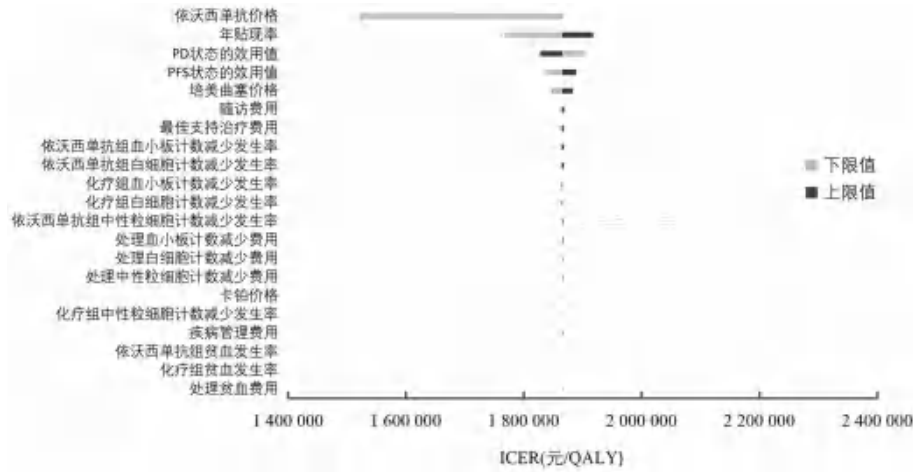


图 2 单因素敏感性分析的旋风图

Fig 2 Cyclorama for one-factor sensitivity analysis

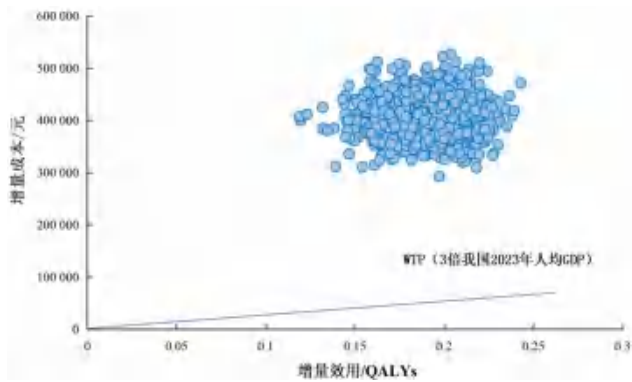


图 3 概率敏感性分析的成本 - 效用散点图

Fig 3 Cost-utility scatterplot for probabilistic sensitivity analysis

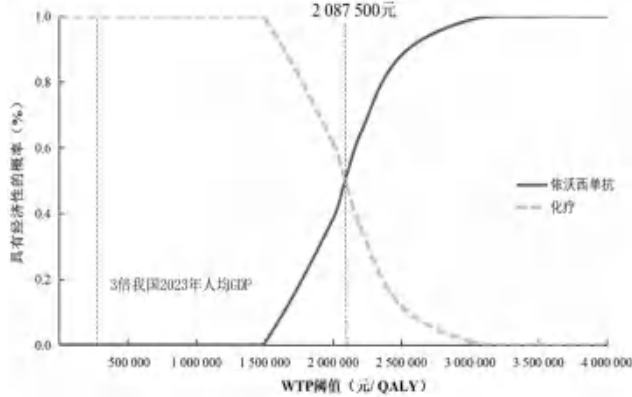


图 4 概率敏感性分析的成本 - 效用可接受曲线

Fig 4 Cost-utility acceptable curve for probabilistic sensitivity analysis

NSCLC 患者中, *EGFR* 基因的突变是导致肿瘤发生和发展的关键驱动因素^[18]。针对 *EGFR* 突变的晚期 NSCLC 患者, TKI 是主要的治疗手段。第一代 *EGFR*-TKI, 如吉非替尼和厄洛替尼, 对携带敏感突变的 NSCLC 患者显示出显著的临床效益。然而, 随着治疗的进行, 患者会不可避免地出现对 TKI 耐药, 其中最常见的是 T790M 突变, 这需要使用第三代 *EGFR*-TKI 如奥希替尼来克服^[19]。免

疫检查点抑制剂常用于非癌基因驱动 NSCLC 患者, 但其在 *EGFR* 突变 NSCLC 患者中的疗效并不理想, 可能与非炎症表型微环境和弱的免疫原性相关^[20]。有研究表明, 抑制 VEGF 可对肿瘤微环境进行重编程, 使其恢复到免疫容许状态^[21], 这意味着抗血管生成疗法可能与免疫检查点抑制剂产生协同作用, ATLAS 试验^[22]也证实了这一点。

依沃西单抗作为一种人源化单克隆抗体在 HARMONi-A (AK112-301) 研究中展现出了较好的疗效, 其中位无进展生存期 (mPFS) 以及中位生存期 (mOS) 都较化疗组有明显的突破。目前依沃西单抗已被批准其联合培美曲塞和卡铂, 适用于经 *EGFR*-TKI 治疗后进展的 *EGFR* 基因突变阳性的局部晚期或转移性 NSCLC 患者的治疗。依沃西单抗价格相对昂贵, 每 100 mg 售价高达 2299 元, 且未被纳入国家医保药品目录, 这可能导致 NSCLC 患者在使用该药物时面临较重的经济压力; 因此需要对依沃西单抗用于非鳞状 NSCLC 的药物经济性作出评价, 探讨其生存获益是否达到与定价相匹配的预期值。本研究从我国卫生体系角度出发, 运用分区生存模型评价了依沃西单抗联合化疗对比单独化疗对晚期 *EGFR* 突变型非鳞状 NSCLC 的经济性, 结果表明, 在以 3 倍 2023 年我国人均 GDP 作为 WTP 阈值时, 依沃西单抗联合化疗方案相较于单纯化疗方案不具有经济性。

本研究存在一定的局限性: ① 模型中的各成本和效用值数据均来源于药智网或文献, 会与实际情况存在一定误差, 尤其是 PFS 和 PD 状态的效用值均来源于国外文献, 缺乏我国人群在该疾病状态下的效用值; ② 模型只分析了 ≥ 3 级且发生率 $\geq 5\%$ 的不良事件, 未考虑 1 ~ 2 级或发生率

较低的不良事件;③ 本文采用分区生存模型,从 HARMONi-A (AK112-301) 研究公布的 PFS 和 OS 曲线取点并拟合,根据 AIC 和 BIC 选取最优分布进行参数外推,与实际生存曲线存在偏倚。

综上所述,在以 3 倍我国 2023 年人均 GDP 作为 WTP 阈值时,依沃西单抗联合化疗治疗 EGFR 基因突变阳性的局部晚期或转移性非鳞状 NSCLC 不具有经济性。本研究为治疗 EGFR 基因突变的局部晚期或转移性非鳞状 NSCLC 提供了用药决策,也可为今后依沃西单抗的医保准入谈判和价格调整提供依据。

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] Zheng RS, Zhang SW, Zeng HM, et al. Cancer incidence and mortality in China [J]. *J Natl Cancer Cent*, 2022, 2 (1): 1-9.
- [3] Shi Y, Au JS, Thongprasert S, et al. A prospective, molecular epidemiology study of EGFR mutations in Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology (PIONEER) [J]. *J Thorac Oncol*, 2014, 9 (2): 154-162.
- [4] Fu K, Xie FC, Wang F, et al. Therapeutic strategies for EGFR-mutated non-small cell lung cancer patients with osimertinib resistance [J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15 (1): 173.
- [5] Mok T, Nakagawa K, Park K, et al. Nivolumab Plus chemotherapy in epidermal growth factor receptor-mutated metastatic non-small-cell lung cancer after disease progression on epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: final results of CheckMate 722 [J]. *J Clin Oncol*, 2024, 42 (11): 1252-1264.
- [6] Hack SP, Zhu AX, Wang Y. Augmenting anticancer immunity through combined targeting of angiogenic and PD-1/PD-L1 pathways: challenges and opportunities [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 598877.
- [7] Socinski MA, Jotte RM, Cappuzzo F, et al. Impower 150 study group. atezolizumab for first-line treatment of metastatic nonsquamous NSCLC [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378 (24): 2288-2301.
- [8] Fang WF, Zhao YY, Luo YZ, et al. Ivonescimab plus chemotherapy in non-small cell lung cancer with EGFR variant: a randomized clinical trial [J]. *JAMA*, 2024, 332 (7): 561-570.
- [9] 邵荣杰,唐文熙,马爱霞. 分区生存模型在药物经济学评价中的应用 [J]. *中国卫生经济*, 2019, 38 (9): 60-63.
- [10] 刘国恩. 中国药物经济学评价指南 2020 [M]. 北京: 中国市场出版社, 2020: 27-46.
- [11] 徐赫,马爱霞. 基于分区生存模型的帕博利珠单抗单药与化疗一线治疗 PD-L1 肿瘤比例分数不同的非小细胞肺癌的成本-效果分析 [J]. *中国医院药学杂志*, 2020, 40 (23): 2468-2473.
- [12] 石丰豪,商叶,芮明军,等. R 语言 survHE 程序包在卫生经济学评价中的应用 [J]. *中国卫生经济*, 2020, 39 (9): 9-14.
- [13] 丁樱,王旋辉,宫春博. 帕博利珠单抗联合化疗方案一线治疗晚期或不可切除胆道恶性肿瘤的成本-效用分析 [J]. *中国药房*, 2023, 34 (23): 2891-2895.
- [14] Nafees B, Stafford M, Gavriel S, et al. Health state utilities for non small cell lung cancer [J]. *Health Qual Life Outcomes*, 2008, 6: 84.
- [15] 苏广全,易仁平,方莘莘,等. 伏美替尼对比吉非替尼单药一线治疗表皮生长因子受体突变晚期非小细胞肺癌的成本-效果分析 [J]. *医药导报*, 2024, 43 (8): 1245-1251.
- [16] 陈叶莉,龙云春,陈方,等. 度伐利尤单抗对比阿替利珠单抗一线治疗广泛期小细胞肺癌的成本-效果分析 [J]. *中国医院药学杂志*, 2024, 44 (7): 815-821.
- [17] 张小涵,朱文涛,居文祥,等. 阿得贝利单抗联合化疗一线治疗广泛期小细胞肺癌的成本-效果分析 [J]. *中国医院药学杂志*, 2023, 43 (22): 2545-2550.
- [18] 李玉婷,颜琦璐,宋启斌. 非小细胞肺癌表皮生长因子受体靶向治疗的研究进展 [J]. *实用医学杂志*, 2024, 40 (15): 2166-2171.
- [19] 曹雨婷,郭中原,刘晓谦,等. 表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂研究进展 [J]. *中国药理学杂志*, 2023, 58 (22): 2016-2027.
- [20] Dong ZY, Zhang JT, Liu SY, et al. EGFR mutation correlates with uninflamed phenotype and weak immunogenicity, causing impaired response to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer [J]. *Oncoimmunology*, 2017, 6 (11): e1356145.
- [21] Qiao TY, Zhao JB, Xin XB, et al. Combined pembrolizumab and bevacizumab therapy effectively inhibits non-small-cell lung cancer growth and prevents postoperative recurrence and metastasis in humanized mouse model [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2023, 72 (5): 1169-1181.
- [22] Park S, Kim TM, Han JY, et al. Randomized study of atezolizumab plus bevacizumab and chemotherapy in patients with EGFR- or ALK-mutated non-small-cell lung cancer (ATLAS, KCSG-LU19-04) [J]. *J Clin Oncol*, 2024, 42 (11): 1241-1251.

(收稿日期: 2024-07-31; 修回日期: 2024-09-04)

递法明片在某院眼科门诊的超说明书用药分析及循证评价

王静, 张颖, 张慧芝, 孙惠斌, 韩露 (郑州市第二人民医院药学部, 郑州 450006)

摘要: **目的** 调查某院眼科门诊递法明片超说明书用药情况进行循证评价, 给临床用药提供参考。**方法** 采用回顾性调查的方法, 调取 2022 年 11 月 15 日至 2023 年 11 月 15 日眼科门诊使用递法明片的处方, 根据药品说明书判定, 发现超说明书用药处方 495 张, 通过查阅国内外指南、文献等对超说明书用药进行循证评价及分析。**结果** 495 张超说明书用药处方中涉及 3 种超说明书用药类型, 分别为超适应证用药 (76.86%)、超用法用量用药 (15.37%)、超适应人群用药 (7.77%)。对超说明书用药处方进行循证评价, 超适应证处方中有 11 个相关诊断有循证医学证据支持; 超适应人群处方中用于 6 岁以上儿童有证据支持。**结论** 对于推荐等级为 I 类的超适应证如玻璃体积血、眼底出血、视网膜血管病等推荐使用; 对于推荐等级为 II a 或 II b 类的超适应证如青光眼、屈光不正、弱视等可以考虑使用; 其他超适应证如白内障、角膜溃疡等不推荐使用。

关键词: 递法明片; 越橘提取物; 花青素; 超说明书用药

中图分类号: R969.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)04-1129-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.039

Evidence-based evaluation of the off-label use of difrarel tablets in the ophthalmology clinic of a hospital

WANG Jing, ZHANG Ying, ZHANG Hui-zhi, SUN Hui-bin, HAN Lu (Department of Pharmacy, Zhengzhou Second Hospital, Zhengzhou 450006)

Abstract: **Objective** To determine the off-label use of difrarel tablets in the ophthalmology clinic of a hospital and conduct evidence-based evaluation. **Methods** We retrospectively surveyed the prescriptions of difrarel tablets in the ophthalmology clinic from November 15, 2022 to November 15, 2023. According to the drug instruction manual, 495 prescriptions had off-label use. We conducted evidence-based evaluation of the off-label use of difrarel tablets by reviewing domestic and foreign guidelines, literatures, etc. **Results** The 495 prescriptions covered 3 types of off-label drug use, namely off-label indications (76.86%), off-label dosages (15.37%) and off-label population medication (7.77%). Evidence-based evaluation of the prescriptions showed 11 related diagnoses of the off-label indications were supported by evidence-based medicine. Evidence also supported the use of difrarel tablets for children aged 6 and above. **Conclusion** We recommended the off-label use of the tablets (class I), in vitreous hemorrhage, fundus hemorrhage, retinal vascular disease, etc, possible off-label use (Class II a or II b), in glaucoma, refractive errors, amblyopia, etc. We do not recommend any off-label use for cataracts and corneal ulcers.

Key words: difrarel tablet; vaccinium extract; anthocyanin; off-label drug use

递法明片每片中含有欧洲越橘提取物 100 mg 和 β -胡萝卜素 5 mg。越橘又名蓝莓、越桔等, 果实中富含花青素, 营养价值较高, 欧洲将花青素含量 $\geq 24\%$ 的色素提取物作为药用^[1]。越橘提取物具有抗氧化、抗炎、延缓神经衰老、改善认知、保护心血管系统等作用^[2-3]。 β -胡萝卜素在肠

基金项目: 河南省医学科技攻关计划联合共建项目 (No. LHGJ20210728); 河南省医学科技攻关计划联合共建项目 (No. LHGJ20230727)。

作者简介: 王静, 女, 主管药师, 主要从事医院药学方面的研究, email: 1294495773@qq.com ***通信作者:** 张颖, 女, 副主任药师, 主要从事临床药学、个体化用药监测方面的研究, email: 61303405@qq.com

黏膜细胞内转变成维生素 A，在视觉细胞内参与维持暗视感光物质的循环^[4]。递法明片为法国原研制剂，我国国家药品监督管理局（NMPA）批准其适应证是 2 型糖尿病所致的轻、中度非增殖性糖尿病视网膜病变，用法用量为每日 2 次，每次 3 片。但临床使用中存在超说明书用药的现象，目前尚无递法明片在眼科患者中用药的循证评价。本研究对某院眼科门诊递法明片使用情况进行调查分析，旨在为临床合理用药提供参考。

1 资料与方法

1.1 资料来源

从 HIS 系统调取某院 2022 年 11 月 15 日至 2023 年 11 月 15 日期间眼科门诊患者使用递法明片的全部处方。使用 Excel 软件对处方中患者的就诊号、科室、姓名、性别、年龄、诊断、处方医师、药品名称、用法用量等信息汇总分析。排除诊断为“一般性医学检查”的处方。

1.2 超说明书用药处方的判断

以 NMPA 批准的递法明片说明书为依据，从适应证、适应人群、用法用量 3 个方面判断是否为超说明书用药处方。递法明片说明书中未提及儿童用药信息，本研究将 18 岁以下使用递法明片的患者判定为超适应人群。若同一处方同时存在多种超说明书用药类型，则按照不同类型逐一记录。

1.3 循证医学证据等级

以“递法明片”“花青素”和“近视”“青光眼”等本次调查涉及的眼科疾病名称为关键词检索中国知网、万方等中文数据库，以“diffrarel”“anthocyanin”“myopia”和“glaucoma”等为关键词检索 PubMed、ScienceDirect、Micromedex 等数据库。查阅国内外相关诊疗指南、专家共识等，并参照 Micromedex 的 Thomson 分级系统^[5]，由课题小组成员共同对超说明书用药处方的用法进行循证医学证据等级评价，详见表 1。

表 1 循证医学证据等级

Tab 1 Evidence levels of evidence-based medicine

有效性等级	推荐等级	证据等级
I 治疗有效	I 推荐使用	A 随机对照试验的荟萃分析；多个、设计良好、大规模的随机临床试验
II a 证据支持有效	II a 大多数情况下推荐使用	B 结论冲突的随机对照试验的荟萃分析；小规模或研究方法有显著缺陷的随机对照试验；非随机研究
II b 有效性具有争议	II b 在某些情况下推荐使用	C 专家意见或共识；个案报道或系列案例
III 治疗无效	III 不推荐使用	D 没有证据

2 结果

2.1 超说明书用药处方情况

共收集到超说明书用药处方 495 张，其中男性 267 例，女性 228 例；年龄最大 86 岁，最小 5 岁（6 例）。涉及 3 种超说明书用药类型，同一张处方可能涉及 2 种以上的超说明书用药类型，详见表 2。超用法用量的处方均为在说明书规定的剂量基础上减小剂量使用，无增加剂量使用的情况，本研究不再讨论此类处方。

表 2 眼科门诊患者递法明片超说明书用药类型

Tab 2 Type of off-label use of diffrarel tablets in ophthalmology outpatients

超说明书用药类型	处方数 [n (%)]
超用法用量	93 (15.37)
超适应人群	47 (7.77)
超适应证	465 (76.86)
合计	605 (100)

2.2 超适应证处方所涉及的诊断及数量

对超适应证处方的诊断按疾病分类统计，具体诊断及数量见表 3。

2.3 超说明书用药的循证医学证据

Micromedex 数据库没有收录递法明片的超说明书用法。共有 11 个超适应证相关诊断有循证医学证据支持，递法明片用于 6 ~ 18 岁儿童有证据支持，具体内容见表 4。

3 讨论

3.1 递法明片超适应证用药分析

3.1.1 用于玻璃体体积血、眼底出血等疾病 玻璃体是眼睛屈光介质的组成部分，正常状况呈凝胶状态，玻璃体本身无血管，不发生出血。但眼内血管性疾病或眼外伤可引起玻璃体体积血，常见病因有视网膜裂孔、视网膜脱离、视网膜中央静脉阻塞、视网膜分支静脉阻塞、黄斑视网膜下出血等^[6]。视网膜后极部的凹陷区称为黄斑，黄斑区没有血管，黄斑水肿是由于眼球后极部毛细血管管壁发生损伤渗漏，液体积聚在黄斑视网膜外丛状层，多继发于视网膜血管病、葡萄膜炎、青光眼术后、白内障术后等^[6]。递法明片的主要成分是花青素，可以抑制胶原酶、弹性酶对微血管

表 3 超适应证处方的主要诊断名称及数量
Tab 3 Main diagnostic names and quantities of off-label indication prescriptions

疾病分类	具体诊断名称	诊断数量
晶状体疾病	白内障、人工晶体植入状态等	32
玻璃体疾病	玻璃体积血、玻璃体切割术后等	147
青光眼	青光眼、新生血管性青光眼等	19
视网膜病	黄斑水肿、视网膜病、眼底出血、老年性黄斑变性、黄斑变性、视网膜脱离、黄斑出血、视网膜静脉阻塞、视网膜动脉栓塞、视网膜色素变性、糖尿病性牵拉性视网膜脱离等	146
视神经疾病	缺血性视神经病变、视神经萎缩等	23
屈光不正	屈光不正、高度近视	57
斜视与弱视	弱视	3
眼表疾病、角膜病	干眼症、角膜溃疡等	16
结膜病	结膜炎、结膜出血等	9
巩膜病	巩膜外层炎	1
其他	复视、后循环缺血、维生素缺乏、关节炎、胃胀气、眼挫伤、眼疲劳、眼术后、一过性黑朦、糖尿病	12

表 4 超说明书用药的循证医学证据
Tab 4 Evidence-based medicine evidence for off-label drug use

超说明书内容	循证依据	文献类别	有效性等级	推荐等级	证据强度
用于玻璃体积血、眼底出血、视网膜血管病（动脉阻塞、静脉阻塞）、黄斑水肿、后循环缺血、缺血性视神经病变	参考文献 ^[8]	国外药品说明书	I	I	A
用于青光眼	参考文献 ^[9-10]	小规模随机对照试验	II a	II a	B
用于屈光不正（近视）	参考文献 ^[14-15]	参考文献 ^[14] 小规模随机对照试验； 参考文献 ^[15] 非随机研究	II a	II b	B
用于弱视	参考文献 ^[19-20]	小规模随机对照试验	II a	II b	B
用于干眼症	参考文献 ^[21-22]	小规模随机对照试验	II a	II b	B
用于视疲劳	参考文献 ^[23-24]	小规模随机对照试验	II a	II b	B
超适应人群（用于 6 ~ 18 岁儿童）	参考文献 ^[8]	国外药品说明书	I	I	A

壁基质的破坏，增加血管壁的张力，改善微循环^[7]。法国和罗马尼亚的说明书中递法明片可用于静脉循环障碍、毛细血管脆性病变、源于循环的眼科视觉障碍^[8]。玻璃体积血、眼底出血、视网膜血管病（动脉阻塞、静脉阻塞）、黄斑水肿、后循环缺血、缺血性视神经病变均属于源于循环的眼科视觉障碍，使用递法明片的循证医学证据充足（证据等级 A，推荐等级 I），推荐使用。

3.1.2 用于青光眼 青光眼是以视野缺损和视神经萎缩为特征的疾病，主要的危险因素是病理性眼压升高。Ohguro 等^[9]研究花青素对开角型青光眼（OAG）的作用，进行了一项随机、双盲、安慰剂-对照临床研究，试验组患者每日服用富含花青素 50 mg 的制剂，为期 24 个月，结果表明，与基线相比，试验组患者眼组织的血流量明显增加，视野未发生明显恶化；而安慰剂组视野发生恶化，两组之间差异有统计学意义。Yoshida 等^[10]研究发现花青素的作用机制可能是通过影响 OAG 患者内皮素-1（ET-1）的代谢及其受体的平衡，增加眼部血流，降低眼压，控制青光眼的进展。

递法明片中的主要成分即为花青素，青光眼患者使用递法明片的循证医学证据充足（证据等级 B，推荐等级 II a），推荐使用。

3.1.3 用于屈光不正（近视） 花青素可以控制近视的进展^[11-13]。Lee 等^[14]研究发现高剂量花青素（100 mg · d⁻¹）可以提高近视受试者的夜间视力。周薇薇等^[15]研究发现，口服递法明片对于轻度（< - 3.00 D）、高度（> - 6.00 D）近视儿童的近视进展有控制作用，对高度近视儿童的控制效果最佳，对中度（- 3.00 ~ - 6.00 D）近视儿童的作用不明显；且短期口服递法明片对于青少年（6 ~ 13 岁）由于环境因素引起的近视控制效果较好，对于学龄前儿童（< 6 岁）由于遗传因素引起的近视控制效果不明显。近视眼最常见的结构异常是眼轴过长，和焦距不匹配，产生了负屈光不正。眼球增长和巩膜生物力学性能紧密相关，花青素可能是通过抑制人巩膜成纤维细胞基质金属蛋白酶-2（MMP-2）的表达，使巩膜组织中 I 型胶原蛋白的降解减少，影响巩膜的重塑，控制近视的进展^[16]。递法明片用于近视的循证医学证据比较充足（证据等级 B，推荐等级 II b），可考

虑与其他治疗方法联合用于控制近视的进展。

3.1.4 用于弱视 弱视按发病原因可分为斜视性、屈光参差性、屈光不正性及形觉剥夺性弱视^[17]。根据原始的最佳矫正视力,弱视分为轻度(视力 0.6~0.8)、中度(视力 0.2~0.5)、重度(视力 ≤ 0.1)^[18]。奉辉等^[19]发现递法明片对高度近视性弱视的治疗作用显著,将 200 例患儿随机分为治疗组和对照组。治疗 6 个月、随访 6 个月后,治疗组患儿平均视力得到提高,屈光度、眼轴、角膜厚度均较治疗前显著改善,与治疗前比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。治疗组的各项指标均优于对照组,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。夏艳平^[18]及梁玲玲等^[20]研究发现中度弱视患儿口服递法明片,可优化双眼调节功能,改善患儿眼底视细胞活性,促进视力较快提高,缩短治疗周期。递法明片用于弱视的循证医学证据比较充足(证据等级 B,推荐等级 II b),可考虑与其他治疗方法联合用于治疗弱视。

3.1.5 用于干眼症 干眼症是各种因素引起的泪液质、量或动力学异常,导致泪膜稳定性下降,并伴有眼部不适或眼表组织病变的疾病^[6]。Yu 等^[21]对严重干眼症患者进行 3 个月的观察,试验组每日补充富含花青素 150 mg 的越橘提取物,在第 0、1、3 个月收集所有受试者干眼评分量表(OSDI)评分,并测试非接触式泪膜破裂时间(NIBUT)等,结果发现试验组受试者 OSDI 评分明显降低,NIBUT 明显增加,即受试者的泪膜稳定性增加,干眼症状得到明显改善。Riva 等^[22]开展的临床试验表明越橘提取物组受试者的泪液分泌量显著增加($P = 0.019$),而安慰剂组没有明显变化。递法明片用于干眼症的循证医学证据比较充足(证据等级 B,推荐等级 II b),可考虑与其他治疗方法联合用于改善干眼症状。

3.1.6 用于视疲劳 长时间近距离视物或过度使用手机电脑时易出现眼胀、干涩、视物不清等视疲劳症状。姜水红等^[23]研究发现试验组受试者服用欧洲越橘提取物制剂 40 d 后,视疲劳症状显著减轻,明视持久度与对照组比较显著提高($P < 0.05$),可能是因为花青素具有抗氧化作用,可清除自由基对眼组织的损伤,改善眼部微循环,增加睫状肌的血流量而改善眼疲劳。Ozawa 等^[24]以每日面对视频终端的办公室工作人员作为受试者进行研究,也发现越橘提取物可以明显改善眼痛、眼睛沉重、异物感及不适感。递法明

片用于视疲劳的循证医学证据比较充足(证据等级 B,推荐等级 II b),可考虑与其他治疗方法联合用于改善视疲劳症状。

3.1.7 其他超适应证 周婉祎等^[25]研究发现花青素能有效减轻氧化应激损伤,保护人晶状体上皮细胞(HLECs)及晶状体功能,延缓白内障的病理进程。Huang 等^[26]发现,蓝莓提取物可以降低过氧化氢诱导的人视网膜色素上皮细胞的氧化应激反应,可降低血管内皮细胞生长因子水平并激活 Akt(蛋白激酶 B)信号通路,故可以抑制年龄相关性黄斑变性的发展。Song 等^[27]研究发现高浓度($1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的蓝莓提取物可使角膜上皮细胞(HCLEC)活性增加,有利于角膜上皮细胞的生理更新和稳态。但以上均为动物研究或体外研究,属于循证医学证据金字塔中最低的一级^[28],证据不充足,不建议使用。

结膜炎、巩膜外层炎等超适应证尚无相关循证医学证据,不建议使用。

3.2 递法明片超适应人群用药分析

递法明片中花青素为天然的活性物质,文献报道其安全性高,尚未发现毒副作用^[29-30],罗马尼亚说明书批准递法明片可用于 6 岁及以上的儿童^[8]。我国 NMPA 批准的递法明片说明书中未提及详细的儿童用药信息,但提及少数患者可出现腹泻、肠鸣等胃肠道不良反应,过敏反应罕见。故递法明片用于 6~18 岁儿童的循证医学证据比较充足(证据等级 A,推荐等级 I),可以使用;6 岁以下儿童不推荐使用。

4 结论

本研究对递法明片的超说明书用药情况及循证医学证据进行了调查与评价。对于推荐等级为 I 类的超适应证如玻璃体积血、眼底出血、视网膜血管病等推荐使用;推荐等级为 II a 或 II b 类的超适应证如青光眼、屈光不正、弱视等可以考虑使用;其他的超适应证不推荐使用。递法明片可以用于 6 岁以上儿童及成人,6 岁以下儿童不推荐使用。

本研究的不足之处在于仅纳入门诊患者,未对住院患者进行综合分析,后续需开展不同地区、不同级别医疗机构的协作研究,才能全面地了解递法明片在国内眼科诊疗中的应用现状。递法明片中的主要成分花青素具有较强的抗氧化能力,能促进微血管循环,对多种眼科疾病有益处,但需要更多的临床研究做进一步的探索。

参考文献

- [1] 冯贵涛. 蓝莓花青素提取、纯化、成分鉴定及抗氧化活性的研究[D]. 贵州: 贵州大学, 2016.
- [2] Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols[J]. *Nutrients*, 2010, 2(12): 1231-1246.
- [3] 王莹, 王鸿, 蔡东联. 蓝莓及其提取物保健功效的研究进展[J]. *医学研究杂志*, 2013, 42(7): 180-182.
- [4] 汪之顷. 维生素 A[A]// 中国营养学会第二次膳食营养素参考摄入量研讨会论文集[C]. 北京: 中国营养学会, 2011: 82.
- [5] 李雨, 黎苏, 孙博. 某院白蛋白结合型紫杉醇应用分析与合理性评价[J]. *中南药学*, 2021, 19(1): 143-148.
- [6] 杨培增, 范先群. 眼科学[M]. 9 版. 北京: 人民卫生出版社, 2018.
- [7] 惠颖, 丁凤奎, 王志安, 等. 递法明片对糖尿病视网膜病变暗适应功能的保护作用[J]. *国际眼科杂志*, 2017, 17(3): 556-558.
- [8] 广东省药学会. 超药品说明书用药目录(儿科 2023 年版)[J]. *今日药学*, 2023, 33(12): 881-900.
- [9] Ohguro H, Ohguro I, Katai M, et al. Two-year randomized, placebo-controlled study of black currant anthocyanins on visual field in glaucoma[J]. *Ophthalmologica*, 2012, 228(1): 26-35.
- [10] Yoshida K, Ohguro I, Ohguro H. Black currant anthocyanins normalized abnormal levels of serum concentrations of endothelin-1 in patients with glaucoma[J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2013, 29(5): 480-487.
- [11] Nomi Y, Iwasaki-Kurashige K, Matsumoto H. Therapeutic effects of anthocyanins for vision and eye health[J]. *Molecules*, 2019, 24(18): 3311.
- [12] 邓宏伟, 陈青山, 刘春民, 等. 口服递法明片对控制儿童高度近视回顾性研究[J]. *中国实用眼科杂志*, 2013, 31(8): 1006-1008.
- [13] 张金嵩. 高度近视[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 422.
- [14] Lee J, Lee HK, Kim CY, et al. Purified high-dose anthocyanoside oligomer administration improves nocturnal vision and clinical symptoms in myopia subjects[J]. *Br J Nutr*, 2005, 93(6): 895-899.
- [15] 周薇薇, 邓宏伟, 廖灿鹏, 等. 口服递法明片对控制儿童近视的短期研究[J]. *国际眼科杂志*, 2016, 16(3): 575-578.
- [16] 田原. 越橘花青素对人巩膜成纤维细胞表达 MMP-2、Collagen I 蛋白的影响[D]. 广州: 暨南大学, 2016.
- [17] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 弱视诊治指南[J]. *中国实用乡村医生杂志*, 2019, 26(2): 3-5.
- [18] 夏艳平. 递法明片口服联合验光配镜及常规弱视训练对中度弱视患儿最佳矫正视力及 P-VEP 潜伏期的影响[J]. *包头医学院学报*, 2021, 37(4): 56-58.
- [19] 奉辉, 邓宏伟, 周薇薇. 递法明片改善儿童高度近视弱视的临床观察[J]. *现代药物与临床*, 2014, 29(12): 1410-1413.
- [20] 梁玲玲, 幸正茂, 廖洪斐. 递法明片在儿童弱视治疗中的临床研究[J]. *江西医药*, 2018, 53(8): 799-801.
- [21] Yu WY, Chan LYL, Chung A, et al. Bilberry-containing supplements on severe dry eye disease in young and middle-aged adults: a 3-month pilot analysis[J]. *Front Nutr*, 2023, 10: 1061818.
- [22] Riva A, Togni S, Franceschi F, et al. The effect of a natural, standardized bilberry extract (Mirtoselect®) in dry eye: a randomized, double blinded, placebo-controlled trial[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(10): 2518-2525.
- [23] 姜水红, 查圣华, 张宏. 欧洲越橘提取物制剂缓解视疲劳的功效研究[J]. *现代中药研究与实践*, 2014, 28(6): 38-40.
- [24] Ozawa Y, Kawashima M, Inoue S, et al. Bilberry extract supplementation for preventing eye fatigue in video display terminal workers[J]. *J Nutr Health Aging*, 2015, 19(5): 548-554.
- [25] 周婉祎, 赵一秀, 安娜, 等. 花青素对晶状体上皮细胞氧化应激损伤和上皮间充质转化的抑制作用[J]. *药理学学报*, 2018, 53(4): 538-545.
- [26] Huang WY, Wu H, Li DJ, et al. Protective effects of blueberry anthocyanins against H₂O₂-induced oxidative injuries in human retinal pigment epithelial cells[J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(7): 1638-1648.
- [27] Song JX, Li YQ, Ge J, et al. Protective effect of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extracts on cultured human corneal limbal epithelial cells (HCLEC)[J]. *Phytother Res*, 2010, 24(4): 520-524.
- [28] 李幼平, 李静. 循证医学[M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2020: 22.
- [29] 徐璐, 郑建仙. 欧洲越橘花色苷的研究概况[J]. *中国食品添加剂*, 2005(4): 43-46, 64.
- [30] 闫淑萍, 王硕, 陈涛, 等. 黑果枸杞花青素提取物的初步毒性评价[J]. *现代食品科技*, 2023, 39(9): 33-41.

(收稿日期: 2024-07-22; 修回日期: 2024-10-11)

基于网状 meta 分析的三唑类药物预防血液病患者侵袭性真菌感染的安全性和有效性评价

杨学英¹, 杨亮蕊^{2*}, 任雁飞¹, 曹治宝¹, 李杨¹ (1. 大理大学药学院, 云南 大理 671000; 2. 大理大学第一附属医院药剂科, 云南 大理 671000)

摘要: **目的** 通过网状 meta 分析, 评价 5 种三唑类药物预防血液病患者侵袭性真菌感染方面的有效性和安全性。**方法** 计算机检索 PubMed、Embase、迈特思创、the Cochrane Library、中国知网、万方和维普等中英文数据库。收集截至 2024 年 7 月已发表的三唑类药物预防血液病患者侵袭性真菌感染的随机对照试验和病例对照研究或队列研究, 利用 R 软件进行网状 meta 分析, 文献质量评价采用 Review Manager 5.4 软件内置的 Cochrane 偏倚风险评估工具。**结果** 共纳入 23 篇文献, 涉及 4926 例患者。在有效性方面, 两两比较结果及等级概率排序显示艾沙康唑与氟康唑 [5.66 (1.71, 22.88)]、伊曲康唑 [3.46 (1.06, 14.14)], 氟康唑与伏立康唑 [0.36 (0.18, 0.65)]、泊沙康唑 [0.2 (0.09, 0.36)], 伏立康唑与泊沙康唑 [0.54 (0.36, 0.81)] 的差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 不同干预措施预防侵袭性真菌感染发生率排序为: 氟康唑 > 伏立康唑 > 伊曲康唑 > 泊沙康唑 > 艾沙康唑; 在安全性方面, 艾沙康唑与伊曲康唑 [4.96 (1.4, 15.5)], 伏立康唑 [3.84 (1.27, 10.75)], 泊沙康唑与伏立康唑 [0.56 (0.34, 0.88)], 伊曲康唑 [0.43 (0.22, 0.86)] 的差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 不同干预措施预防侵袭性真菌感染不良反应发生率排序为: 伊曲康唑 > 伏立康唑 > 泊沙康唑 > 氟康唑 > 艾沙康唑。**结论** 艾沙康唑在安全性与有效性方面展现出显著优势, 但考虑到当前其估计值存在较大的不确定性, 因此需要进一步深入研究和临床试验, 以精确验证其治疗效果及安全性。相比之下, 泊沙康唑与伏立康唑作为次优选择, 在安全性和有效性方面亦表现良好, 且已有广泛的研究和临床试验数据支持。

关键词: 网状 meta 分析; 三唑类药物; 血液病患者; 侵袭性真菌感染; 安全性及有效性

中图分类号: R978.5, R519 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)04-1134-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.040

Safety and efficacy of mesh meta-analysis of triazole for prevention of invasive fungal infections in patients with hematologic diseases

YANG Xue-ying¹, YANG Liang-rui^{2*}, REN Yan-fei¹, CAO Zhi-bao¹, LI Yang¹ (1. Department of Pharmacology, Dali University, Dali Yunnan 671000; 2. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Dali University, Dali Yunnan 671000)

Abstract: Objective To evaluate the efficacy and safety of five triazoles in the prevention of invasive fungal infection in patients with hematologic disease by mesh meta-analysis. **Methods** PubMed, Embase, Mettec, the Cochrane Library, CNKI, Wanfang and VIP databases were searched by computer. Published randomized controlled trials and case-control studies or cohort studies on prevention of invasive fungal infections in hematologic patients as of July 2024 were collected. We used with mesh meta-analysis with R software, and evaluated with literature quality the Cochrane bias risk assessment tool built in Review Manager 5.4 software. **Results** Totally 23 articles were included, involving 4926 patients. In terms of therapeutic efficacy, pairwise comparisons and rank probability ranking showed that isavuconazole and fluconazole [5.66 (1.71, 22.88)], itraconazole [3.46 (1.06, 14.14)], fluconazole and voriconazole [0.36 (0.18, 0.65)], posaconazole [0.2 (0.09, 0.36)], voriconazole and posaconazole [0.54 (0.36, 0.81)] showed

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金项目 (No.2023J0962)。

作者简介: 杨学英, 女, 在读硕士研究生, 主要从事临床药学方面的研究, email: 2430086408@qq.com * **通信作者:** 杨亮蕊, 女, 副主任药师, 主要从事临床药学方面的研究, email: 1029205982@qq.com

a statistical difference ($P < 0.05$). The incidence of invasive fungal infection for invasion and prevention of fungal infection ranked as follows: fluconazole > voriconazole > itraconazole > posaconazole > isavuconazole. In terms of safety, isavuconazole and itraconazole [4.96 (1.4, 15.5)], voriconazole [3.84 (1.27, 10.75)], posaconazole and voriconazole [0.56 (0.34, 0.88)], itraconazole [0.43 (0.22, 0.86)] showed a significant difference ($P < 0.05$). The incidence of adverse reactions to invasion and prevention of fungal infections ranked as follows: itraconazole > voriconazole > posaconazole > fluconazole > isavuconazole. **Conclusion** Isavuconazole has obvious advantages in safety and efficacy, but given the uncertainty in its current estimates, further studies and clinical trials are needed to accurately verify its efficacy and safety. In contrast, posaconazole and voriconazole, as suboptimal options, perform well in safety and efficacy, with extensive research and clinical trial data support in safety and efficacy.

Key words: mesh meta-analysis; triazole; hematological patient; invasive fungal infection; safety and efficacy

侵袭性真菌感染 (invasive fungal infection, IFI) 是指真菌通过侵入人体组织、器官或血液, 进行生长与繁殖, 进而触发机体的炎症反应, 并最终导致组织损伤的一种具有显著病理改变的感染性疾病^[1]。IFI 多见于异基因造血干细胞移植 (allo-HSCT)、急性髓系白血病 (AML)、骨髓增生异常综合征 (MDS)、急性淋巴细胞白血病 (ALL) 初次诱导或挽救化疗、持续中性粒细胞减少等患者^[2]。绝大多数 IFI 由念珠菌、曲霉菌引起, 侵袭性念珠菌病最常见 (尤其是在血流感染中), 曲霉菌感染以肺部受累最常见^[3-4]。这些感染由机会性真菌病原体引起, 在患有血液恶性肿瘤的患者中表现为不同的播散性感染症状。在健康人群中, 这些真菌感染通常不会造成严重问题, 因此易被忽略, 影响患者疾病的诊治。此外, 由于 IFI 的症状缺乏特异性, 发热可能是恶性血液病合并真菌感染时唯一的表现, 而发热在恶性血液病本身也很常见^[5]。因此, 对于高危人群的早期预防尤其重要。国家指南建议 AML 和 MDS 患者进行 IFI 预防, 直至血小板减少症消退^[6]。

目前用于预防 IFI 的抗真菌药物主要包括三唑类、多烯类和棘白菌素类^[7]。第一代三唑类药物如氟康唑和伊曲康唑在临床上广泛应用, 但逐渐出现耐药菌株。新一代三唑类药物如泊沙康唑和艾沙康唑具有更广泛的抗菌谱, 但价格较高。多烯类药物如两性霉素 B 虽然抗菌效果显著, 但其不良反应 (ADR) 较多^[8]。与伏立康唑相比, 艾沙康唑治疗包括肝胆、皮肤和眼部疾病在内的 ADR 的发生率较低。目前大多数指南建议对高风险血液病患者采用预防性抗真菌药物治疗, 但在实施过程中存在多个挑战, 例如确定预防性抗真菌治疗的适用对象、选择合适的抗真菌药物以及确定预防治疗的时程等问题^[9]。在《血液病/恶性肿瘤患者侵袭性真菌病的诊断标准与治疗原则》(第六次修订版) 中, 泊沙康唑与伏立康唑都被推荐作为预防性抗真菌药物^[10], 但目前在血液系统恶性肿瘤患者中,

比较它们预防 IFI 的效果和不良反应的证据相对偏少。国内外关于三唑类药物预防血液病患者 IFI 的研究较少, 且大多数研究未涵盖新研制的艾沙康唑, 缺乏完整的网状 meta 分析为其应用提供充分的证据支持。

本研究旨在探讨和比较三唑类药物在恶性血液病患者预防性抗真菌治疗中的安全性和有效性, 旨在探索一种安全有效的预防性抗真菌药物, 以提升恶性血液病患者的生存率。

1 资料与方法

1.1 纳入标准

① 研究设计类型: 临床随机对照试验或病例对照研究或队列研究。② 研究对象: 需要预防使用抗真菌药物的患者, 包括 IFI 发生风险较高 (但尚未发生)、血液恶性肿瘤患者等。③ 干预措施: 试验组采用 5 种抗真菌药物中的一种, 对照组采用另一种抗真菌药物或安慰剂。④ 结局指标: 有效性指标, 血液病患者总 IFI 发生率; 安全性指标, 总不良反应发生率。

1.2 排除标准

① 不能获取数据或全文的文献; ② 综述、meta 研究相关的文献及病例报道; ③ 药动学研究; ④ 细胞或动物实验; ⑤ 不以疗效及不良反应为观察指标, 未能获取有效数据的; ⑥ 重复发表的文献; ⑦ 无法获得全文或进行数据提取的摘要。

1.3 文献检索策略

计算机检索 PubMed、Embase、迈特思创、the Cochrane Library 等英文文献数据库, 以及中国知网 (CNKI)、万方和维普 (VIP) 等中文文献数据库。同时手工检索纳入研究的相关参考文献。检索日期均为从建库至 2024 年 7 月。

1.4 资料提取及质量评价

在进行文献筛选时, 基于确定的检索策略来检索, 首先利用文献管理软件 (EndNote X9) 删除重复文献; 接着, 由两位专业人员独立依据标题和摘要进行初步筛选, 排除不相关文献。

使用 Review Manager 5.4 软件内置的 Cochrane 偏倚风险评估工具对其进行偏倚风险评估。

1.5 统计方法

使用 RevMan 5.4 软件制作文献偏倚风险图。利用 R 语言软件进行网状 meta 分析，主要包括绘制网状关系图、联赛图以及累计概率排序图。计数资料合并后的效应量使用比值比 (OR) 及其 95% 置信区间 (CI) 来表达。对包含的研究进行异质性检验，采用 χ^2 检验并计算 I^2 值。若无统计学异质性 ($P > 0.10$, $I^2 < 50\%$)，则采用固定效应模型进行分析；若存在统计学异质性 ($P \leq 0.10$, $I^2 \geq 50\%$)，则采用随机效应模型进行分析。

2 结果

2.1 文献筛选结果

通过检索上述数据库，共得到 920 条引文，通过手动检索和其他途径获得 5 条引文。EndNote 9 识别并手动排除不相关文献，最终纳入文献 23 篇，见图 1。

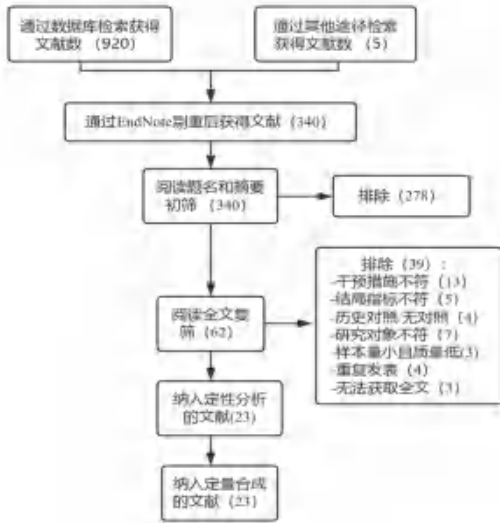


图 1 文献筛选流程图

Fig 1 Flow chart of literature screening

2.2 纳入研究的基本特征

共纳入 23 篇研究，包括 4926 名患者。发表年份在 2007—2024 年，9 篇来自国内，14 篇来自国外。其中使用泊沙康唑 1874 例、氟康唑 979 例、伏立康唑 1335 例、伊曲康唑 578 例和艾沙康唑 160 例，各研究的基本情况详见表 1。

2.3 纳入文献的质量评价

研究质量评价如图 2 所示，共纳入 23 项研究，其中提及并采用了正确的随机序列生成方式的研究只有 9 项，未提及随机分组的研究有 6 项，进行正确的分配隐藏的研究有 4 项，详细说明研究结局的盲法评价过程的有 2 项，所有研究结局无缺失数据且所有预先声明的结局都已报告，因此均为低偏倚风险，其他偏倚评价被评为低风险的研究有 20 项。

2.4 网状 meta 分析结果

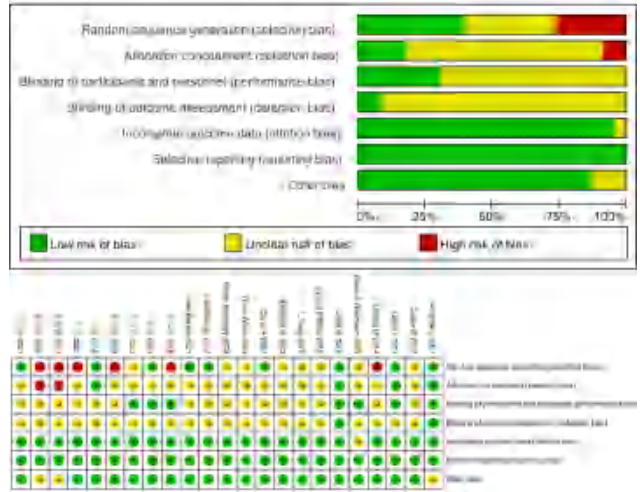


图 2 Cochrane 风险偏倚评估图

Fig 2 Cochrane risk of assessment plot

2.4.1 网状关系图结果 以预防后的临床有效率为结局指标绘制网状关系图，本网状 meta 分析共计 5 种抗真菌药物干预措施，图中每一个蓝色圆点代表一种干预措施，连线代表两种干预措施间有直接比较，两个圆点之间的连线越粗代表两种干预措施直接比较的原始研究的数量越多。从图 3 和 4 中可以看出伏立康唑与泊沙康唑间研究最多，氟康唑与艾沙康唑间无相关性研究。

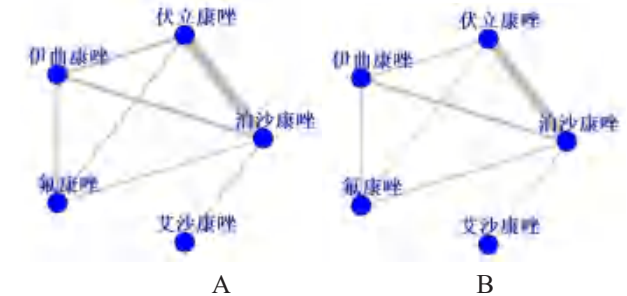


图 3 IFI 发生率 (A) 及 ADR (B) 证据图

Fig 3 Evidence plot of IFI incidence (A) and ADR (B)

2.4.2 模型收敛程度检验 本研究通过调整预迭代次数和迭代运算次数，最终参数设置为 n.adapt: 20 000, n.iter: 100 000, thin: 10, 步长为 4 时收敛程度满意。获得 53 个数据点，通过 R 软件计算出 IFI 发生率残差项为 59.544 44，与实际数据点相接近，计算出的 ratio 为 1.123，接近于 1， I^2 等于 13%；而不良反应发生率有 43 个数据点，通过 R 软件计算出残差项为 43.881 17，与实际数据点相接近，计算出的 ratio 为 1.02，接近于 1，异质性 $I^2 = 4\% \leq 50\%$ ，所以选用随机效应模型时的收敛程度较好。

2.4.3 两两比较结果及等级概率排序 对临床有效性及安全性结局进行网状 meta 分析，得泊沙康唑、伏立康唑、伊曲康唑、氟康唑、艾沙康唑 5 种干预措施两两比较的 OR 值及 95%CI，5 种干

表 1 纳入研究的基本特征
Tab 1 Characteristics of the included studies

作者	例数		干预措施		疗程
	实验组	对照组	实验组	对照组	
王菀菀等 ^[11]	22	24	泊沙康唑混悬液 200 mg/ 次, po tid	伏立康唑第 1 日口服, 400 mg/ 次, bid; 随后 200 mg/ 次, bid	治疗持续至粒细胞缺乏恢复, 或临床考虑出现 IFI
张远 ^[12]	29	25	泊沙康唑 < 13 岁 (每次 4 mg · kg ⁻¹ , 最大单次剂量 200 mg, tid), ≥ 13 岁 (200 mg/ 次, tid)	伏立康唑 9 mg/ (kg · 次), bid, 最大单次剂量 200 mg	治疗持续至粒细胞缺乏恢复, 或临床考虑出现 IFI
宫本法等 ^[13]	60	42	泊沙康唑混悬液 200 mg/ 次, po tid	伏立康唑第 1 日口服, 400 mg/ 次, bid; 随后 200 mg/ 次, bid	预防药物均用至患者外周血中性粒细胞恢复或患者出院
Zeng 等 ^[14]	66	129	泊沙康唑组 200 mg/ 次, po tid	伏立康唑先口服 400 mg/ 次, bid; 然后口服 200 mg/ 次, bid	持续到中性粒细胞恢复
Pci 等 ^[15]	47	61	泊沙康唑混悬液 200 mg/ 次, po tid	伏立康唑 4 mg/ (kg · 次), po bid	预防药物均用至患者外周血中性粒细胞恢复或患者出院
Almutairy 等 ^[16]	50	80	泊沙康唑第 1 日 1300 mg bid, 随后 300 mg qd	伏立康唑 200 mg, bid	持续到中性粒细胞恢复
Tang 等 ^[17]	81	83	泊沙康唑 200 mg/ 次, po tid	伏立康唑 200 mg/ 次, po bid	NA
Döring 等 ^[18]	50	50	泊沙康唑 200 mg/ 次, po tid	伏立康唑 200 mg/ 次, po bid; 伊曲康唑 2.5 mg/ (kg · 次), po bid	从使用药物的前一日到口服抗真菌预防结束后 2 周的时间段, 最长可达移植后 220 d
彭英楠等 ^[19]	54	50	口服泊沙康唑混悬液, 疗程移植后 180 d	口服伏立康唑混悬液, 移植后 180 d	观察期为移植后 180 d
李文星等 ^[20]	44	29	泊沙康唑 200 mg/ 次, po bid	第 1 日口服, 负荷剂量 400 mg q12h, 之后维持剂量为 200 mg q12h	连续治疗至中性粒细胞恢复正常或发生 IFI 或发生无法耐受的不良反应
Phillips 等 ^[21]	43	34	泊沙康唑 200 mg/ 次, po tid	口服伏立康唑	100 d
袁凯锋等 ^[22]	42	42	伊曲康唑 200 mg/ 次, po qd	氟康唑 150 mg/ 次, po qd	15 d
王俊等 ^[23]	25	30	泊沙康唑 200 mg, po tid	伊曲康唑 200 mg, po bid	治疗持续至粒细胞缺乏恢复, 或者临床考虑出现 IFI
郎涛等 ^[24]	25	25	泊沙康唑预防, 200 mg + 0.9% 氯化钠注射液 500 mL ivgtt, 第 1 日和第 2 日早晚各 1 次, 从第 3 日起改为 qd	伊曲康唑每次 1 瓶 (105 mL 混悬液) po	治疗持续至粒细胞缺乏恢复, 或者临床考虑出现 IFI
Wingard 等 ^[25]	305	295	伏立康唑 200 mg/ 次, po bid	氟康唑 400 mg/ 次, po qd	移植后 0 d 持续到 100 d
Cornely 等 ^[26]	304	58	泊沙康唑 200 mg/ 次, po tid	伊曲康唑 200 mg/ 次, po bid	持续治疗至中性粒细胞减少症恢复和完全缓解
Ullmann 等 ^[27]	301	299	泊沙康唑 200 mg/ 次, po tid	氟康唑 400 mg/ 次, po qd	112 d
Marks 等 ^[28]	224	241	第 1 日静脉注射伏立康唑 (6 mg · kg ⁻¹ , bid) 后, 口服伏立康唑 200 mg/ 次, bid	曲康唑口服液 200 mg/ 次, bid	100 d
Xu 等 ^[29]	19	73	泊沙康唑 200 mg/ 次, po tid	伊曲康唑 2.5 mg/ (kg · 次), po bid	持续到中性粒细胞减少症消失
	37	46	伏立康唑 200 mg/ 次, po bid	氟康唑 200 mg/ 次, po qd	
Ananda-Rajah 等 ^[30]	68	59	泊沙康唑 200 mg/ 次, po tid	伊曲康唑 2.5 mg/ (kg · 次), po bid; 氟康唑 200 mg/ 次, po qd	持续到中性粒细胞恢复到 0.5 个 · L ⁻¹ 以上、出现确诊或疑似 IFI
Rausch 等 ^[31]	140	84	泊沙康唑 200 mg/ 次, po tid	伏立康唑 200 mg/ 次, po bid	未提及
		53		艾沙康唑 372 mg/ 次, po qd	
White 等 ^[32]	229	12	泊沙康唑 200 mg/ 次, po tid	艾沙康唑 372 mg/ 次, po qd	30 d
			伏立康唑 200 mg/ 次, po bid		
Bogler 等 ^[33]	210	95	伏立康唑 200 mg/ 次, po bid	艾沙康唑 372 mg/ 次, po qd	100 d

预措施均能够降低 IFI 和不良反应的发生。

表 2 可看出艾沙康唑与氟康唑 [5.66 (1.71, 22.88)]、伊曲康唑 [3.46 (1.06, 14.14)], 氟康唑与伏立康唑 [0.36 (0.18, 0.65)]、泊沙康唑 [0.2 (0.09, 0.36)], 伏立康唑与泊沙康唑 [0.54 (0.36, 0.81)] 的差异有统计学意义, 表明艾沙康唑与上述治疗措施相比有明显有效性优势。

表 3 可看出艾沙康唑与伊曲康唑 [4.96 (1.4, 15.5)]、伏立康唑 [3.84 (1.27, 10.75)]、泊沙康

唑与伏立康唑 [0.56 (0.34, 0.88)]、伊曲康唑 [0.43 (0.22, 0.86)] 的差异有统计学意义, 表明艾沙康唑与上述治疗措施相比有明显安全性优势。

图 5 及图 6 为根据网状 meta 分析结果计算得出的 IFI 和不良反应发生率排序概率 SUCRA 图, 结果显示不同干预措施预防 IFI 发生率排序为: 氟康唑 > 伏立康唑 > 伊曲康唑 > 泊沙康唑 > 艾沙康唑, 不良反应发生率排序为: 伊曲康唑 > 伏立康唑 > 氟康唑 > 泊沙康唑 > 艾沙康唑。

表 2 IFI 发生率的 OR 比较

Tab 2 OR comparison of the incidence of IFI

泊沙康唑	1.84 (1.23, 2.79)	3.11 (1.7, 6.39)	5.09 (2.77, 10.59)	0.91 (0.27, 2.57)
0.54 (0.36, 0.81)	伏立康唑	1.69 (0.93, 3.39)	2.75 (1.55, 5.58)	0.49 (0.14, 1.45)
0.32 (0.16, 0.59)	0.59 (0.29, 1.08)	伊曲康唑	1.64 (0.86, 3.11)	0.29 (0.07, 0.94)
0.2 (0.09, 0.36)	0.36 (0.18, 0.65)	0.61 (0.32, 1.16)	氟康唑	0.18 (0.04, 0.58)
1.1 (0.39, 3.65)	2.03 (0.69, 7.12)	3.46 (1.06, 14.14)	5.66 (1.71, 22.88)	艾沙康唑

表 3 不良反应发生率的 OR 比较

Tab 3 OR comparison of the incidence of adverse reactions

泊沙康唑	1.77 (1.14, 2.92)	2.31 (1.17, 4.57)	1.12 (0.54, 2.43)	0.46 (0.18, 1.37)
0.56 (0.34, 0.88)	伏立康唑	1.31 (0.63, 2.52)	0.64 (0.29, 1.35)	0.26 (0.09, 0.79)
0.43 (0.22, 0.86)	0.76 (0.4, 1.58)	伊曲康唑	0.49 (0.21, 1.19)	0.2 (0.06, 0.71)
0.89 (0.41, 1.84)	1.57 (0.74, 3.43)	2.05 (0.84, 4.84)	氟康唑	0.41 (0.12, 1.51)
2.16 (0.73, 5.7)	3.84 (1.27, 10.75)	4.96 (1.4, 15.5)	2.45 (0.66, 8.14)	艾沙康唑

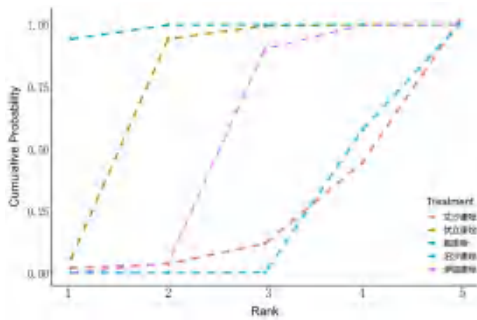


图 5 IFI 发生率概率排序 SUCRA 图

Fig 5 SUCRA plot of IFI incidence probability

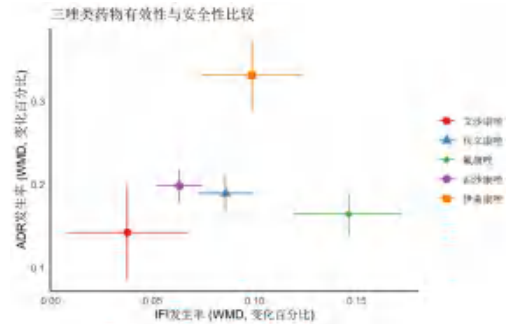


图 7 双变量的误差线图

Fig 7 Error line plot of bivariables

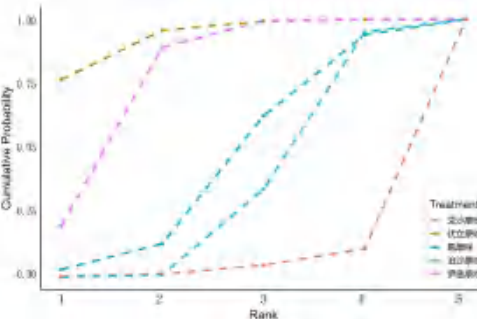


图 6 不良反应概率排序 SUCRA 图

Fig 6 SUCRA plot of adverse reaction probability

2.4.4 有效性及安全性两个结局指标综合比较

如图 7 所示, 艾沙康唑显示了最低的不良反应发生率, 同时 IFI 发生率也较低。这表明该药物在安全性和有效性方面有明显优势。泊沙康唑为第二个有效性及安全性均较好的药物。氟康唑 IFI 发生率最高, 但同时也伴随较高的不良反应发生率。该药物在使用时需要密切监控其 IFI 发生率。误差条较长的药物 (如伊曲康唑、氟康唑和艾沙康唑) 显示其估计值存在较大的不确定性, 需要进一步的研究和临床试验来验证其疗效和安全性。

2.4.5 不一致性检验 在闭合环中, 3 种治疗措施比较的 P 值均大于 0.05, 并且直接比较和间接比较的结果 (OR 值和 95% CI) 非常相近, 表明不存在不一致性, 见图 8、9。

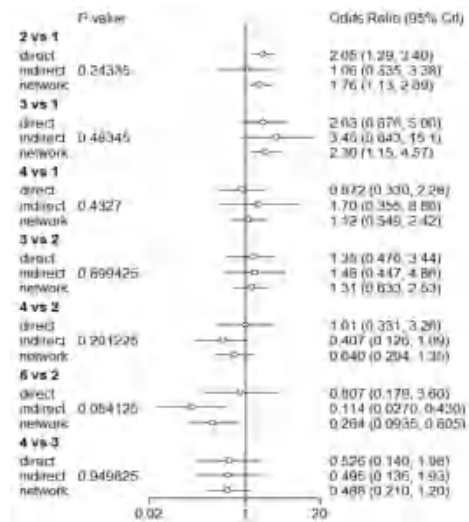


图 8 IFI 发生率不一致性检验图

Fig 8 IFI incidence inconsistency test plot

2.4.6 异质性检验 i^2 .pair 表示直接比较 I^2 值, i^2 .cons 表示网状比较 I^2 值, 其值小于或等于 50% 表明异质性小, 反之则异质性大。incons.p 表示不一致性检验 P 值, P 值 > 0.05 , 则表明一致性良好。如表 4 所示, 在直接比较和网状比较方面, IFI 发生率 i^2 .pair $\leq 50\%$ 、 i^2 .cons $\leq 50\%$, 全局 Global i^2 .pair $\leq 50\%$, Global i^2 .cons $\leq 50\%$, 表明不存在显著异质性。不良反应发生率大部分 i^2 .pair $\leq 50\%$ 、 i^2 .cons $\leq 50\%$ (i^2 .pair 和 i^2 .cons 在泊沙康唑与伊曲康唑和氟康唑、伊曲康唑与氟

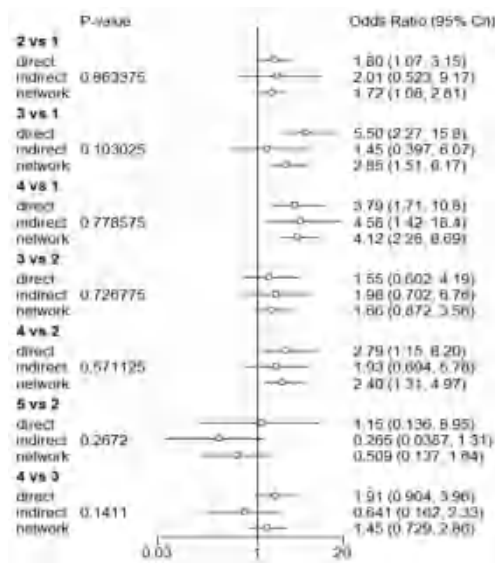


图 9 不良反应不一致性检验图
Fig 9 Inconsistency test plot for adverse reactions

表 4 IFI 发生率及不良反应发生率异质性分析结果
Tab 4 Incidence heterogeneity and of IFI and ADR

t1	t2	IFI 发生率 /%			不良反应发生率 /%		
		i ² .pair	i ² .cons	incons.p	i ² .pair	i ² .cons	incons.p
泊沙康唑	伏立康唑	14.552 65	14.552 65	0.259 851	36.648 77	39.713 80	0.074 29
泊沙康唑	伊曲康唑	0.000 00	0.000 00	0.385 289	0.000 00	0.000 00	0.838 51
泊沙康唑	氟康唑	0.000 00	0.000 00	0.876 448	65.593 81	42.033 91	0.331 52
泊沙康唑	艾沙康唑	27.594 79	20.396 81	NA	81.754 94	86.001 91	NA
伏立康唑	伊曲康唑	0.000 00	0.000 00	0.567 393	13.060 71	24.947 90	0.705 82
伏立康唑	氟康唑	28.851 88	36.731 88	0.417 948	0.000 00	0.000 00	0.339 01
伏立康唑	艾沙康唑	NA	1.331 071	0.323 847	NA	67.923 75	0.127 43
伊曲康唑	氟康唑	20.110 53	31.652 88	0.178 531	48.208 42	14.891 82	0.610 82
Global i ² /%		1.621 614	1.214 526		34.957 27	34.135 11	

沙康唑。其中艾沙康唑的安全性和耐受性最好，其次是泊沙康唑，而伊曲康唑和氟康唑的安全性和耐受性最差。艾沙康唑在安全性和有效性方面有明显优势，但其估计值存在较大的不确定性，这需要进一步的研究和临床试验来验证。泊沙康唑为第二个疗效及安全性较好的药物，已有较多的研究验证过其安全性及有效性。White 等^[32]的研究中表明艾沙康唑与泊沙康唑在预防 AML 时艾沙康唑比泊沙康唑组患者对该药物的耐受性也很好，在接受诱导的 AML 患者中，使用艾沙康唑或泊沙康唑作为曲霉菌活性 IFI 预防剂的 IFI 发生率似乎没有差异，但是艾沙康唑缺乏大数据的随机对照研究，国外权威指南对于经验性及诊断驱动治疗的意见不一。

综上，艾沙康唑预防血液病患者 IFI 的疗效优于其他三唑类抗真菌药，且未增加患者不良反应发生率，但目前相关研究较少，且纳入的临床病例数较少，还需要进一步的临床研究数据来验证。综合考虑各药物的有效性和安全性，可以看出三唑类药物在临床应用中具有不同的适应证和使用场景。需要权衡其疗效和潜在风险来选择合适的药物。未来

康唑比较时 $\geq 50\%$ ），但是全局 $\text{Global } i^2.\text{pair} \leq 50\%$ ， $\text{Global } i^2.\text{cons} \leq 50\%$ ，表明不存在显著异质性。

3 讨论

本研究采用网状 meta 分析的方法，对 5 种三唑类抗真菌药物（包括氟康唑、伊曲康唑、泊沙康唑、伏立康唑和艾沙康唑）预防血液病患者 IFI 的有效性及安全性进行比较。结果表明泊沙康唑、伏立康唑、伊曲康唑、氟康唑与艾沙康唑均能降低血液病患者 IFI 总发生率。艾沙康唑、泊沙康唑预防血液病患者 IFI 效果最佳的可能性最大，但具体药物的选择应根据检出的菌种特性选择。Zhao 等^[34]通过网状 meta 分析对血液病化疗患者或干细胞移植患者进行了研究，包括氟康唑、伊曲康唑、泊沙康唑和伏立康唑 4 种唑类药物，结果泊沙康唑在预防 IFI 方面效果最佳，其次是伏立康唑。各种抗真菌药物总不良反应发生率依次为：伊曲康唑 > 伏立康唑 > 氟康唑 > 泊沙康唑 > 艾

应进一步关注这些药物的长期效果和和不良反应，以提供更为详尽的证据支持临床决策。

本研究存在一定的局限性：① 由于研究数量的限制，未能对不同血液病患者分层进行亚组分析；② 部分文献没有报告关于随机化和分配隐藏的具体信息，可能会限制上述结果的准确评估；③ 未进行成本效益分析，成本为药物选择时继有效性和安全性之外的一个重要考虑因素，未来的研究尚可探讨不同抗真菌药物预防血液病患者 IFI 的成本效益分析。

参考文献

- [1] 李文星, 王蓓蓓, 许霞青, 等. 泊沙康唑预防血液系统恶性肿瘤患者侵袭性真菌病的疗效和安全性分析[J]. 中国合理用药探索, 2022, 19 (6): 18-22.
- [2] 中国医师协会血液科医师分会, 中国侵袭性真菌感染工作组. 血液病/恶性肿瘤患者侵袭性真菌病的诊断标准与治疗原则(第六次修订版)[J]. 中华内科杂志, 2020, 59 (10): 754-763.
- [3] 中华医学会儿科学分会血液学组. 儿童血液系统疾病及恶性肿瘤侵袭性真菌病诊疗建议[J]. 中华儿科杂志, 2014, 52 (6): 426-429.
- [4] 姚远, 卢伟, 吕光辉. UPLC-MS/MS 法同时测定人血浆中 5 种抗真菌药物的血药浓度[J]. 中南药学, 2021, 19 (8):

- 1590-1594.
- [5] 李旭玲. 恶性血液病侵袭性真菌感染的研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18 (59): 34-35.
 - [6] 曹兆流, 张玮, 单国法, 等. 1 例伏立康唑不耐受的侵袭性肺曲霉病患者抗真菌药物的选择 [J]. 中南药学, 2019, 17 (1): 135-137.
 - [7] 张李刚. 伏立康唑预防 / 治疗恶性血液病患者侵袭性真菌感染的用药行为及相关因素的真实世界研究及经济学评估 [D]. 天津: 天津医科大学, 2020.
 - [8] 左微, 肖青. 恶性血液肿瘤患者侵袭性真菌感染防治进展 [J]. 中国真菌学杂志, 2018, 13 (4): 252-256.
 - [9] 张贵玲, 程雪晴, 王惟一, 等. 侵袭性真菌性鼻 - 鼻窦炎的病因机制与诊断治疗研究新进展 [J]. 中国眼耳鼻喉科杂志, 2022, 22 (2): 186-190.
 - [10] 王彪, 房文通, 傅源源. 泊沙康唑预防血液恶性肿瘤患者侵袭性真菌感染的快速卫生技术评估 [J]. 药物流行病学杂志, 2021, 30 (10): 661-669.
 - [11] 王菟菟, 刘桂玲. 泊沙康唑与伏立康唑预防成人恶性血液病患者侵袭性真菌感染的效果分析 [J]. 淮海医药, 2020, 38 (4): 400-403.
 - [12] 张远. 泊沙康唑与伏立康唑预防儿童血液肿瘤侵袭性真菌病对比 [D]. 长沙: 中南大学, 2023.
 - [13] 宫本法, 林冬, 魏辉, 等. 伏立康唑在急性髓系白血病诱导化疗期间初级预防侵袭性肺曲霉感染的研究 [J]. 中国实验血液学杂志, 2018, 26 (5): 1269-1274.
 - [14] Zeng HL, Wu ZM, Yu B, et al. Network meta-analysis of triazole, polyene, and echinocandin antifungal agents in invasive fungal infection prophylaxis in patients with hematological malignancies [J]. BMC Cancer, 2021, 21 (1): 404.
 - [15] Pei RZ, Lu Y, Zhang PS, et al. Breakthrough of invasive fungal disease with posaconazole as primary prophylaxis after induction chemotherapy for acute myeloid leukemia [J]. Zhonghua Nei Ke Za Zhi, 2020, 59 (3): 213-217.
 - [16] Almutairy R, Khan MA, Shahbar A, et al. Posaconazole versus voriconazole as antifungal prophylaxis for invasive fungal diseases in patients with hematological malignancies [J]. J Oncol Pharm Pract, 2024, 24: 10781552241246119.
 - [17] Tang L, Yang XF, Qiao M, et al. Posaconazole vs. voriconazole in the prevention of invasive fungal diseases in patients with haematological malignancies: a retrospective study [J]. J Mycol Med, 2018, 28 (2): 379-383.
 - [18] Döring M, Blume O, Haufe S, et al. Comparison of itraconazole, voriconazole, and posaconazole as oral antifungal prophylaxis in pediatric patients following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2014, 33 (4): 629-638.
 - [19] 彭英楠, 边志磊, 曹伟杰, 等. 泊沙康唑与伏立康唑预防异基因造血干细胞移植后侵袭性真菌感染的疗效和安全性 [J]. 实用医学杂志, 2023, 39 (6): 742-746.
 - [20] 李文星, 王蓓蓓, 许霞青, 等. 泊沙康唑预防血液系统恶性肿瘤患者侵袭性真菌病的疗效和安全性分析 [J]. 中国合理用药探索, 2022, 19 (6): 18-22.
 - [21] Phillips K, Cirrone F, Ahuja T, et al. Posaconazole versus voriconazole as antifungal prophylaxis during induction therapy for acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome [J]. J Oncol Pharm Pract, 2019, 25 (2): 398-403.
 - [22] 袁凯峰, 唐君玲, 景莉, 等. 伊曲康唑与氟康唑预防成人急性白血病侵袭性真菌感染的疗效比较 [J]. 现代医学, 2012, 40 (1): 42-44.
 - [23] 王俊, 蔡成森, 徐明珠, 等. 泊沙康唑与伊曲康唑预防恶性血液病患者侵袭性真菌病的临床对照研究 [J]. 中国新药与临床杂志, 2016, 35 (11): 784-787.
 - [24] 郎涛, 徐艳芳, 王增胜, 等. 泊沙康唑在预防恶性血液病患者侵袭性真菌病中的应用研究 [J]. 现代生物医学进展, 2021, 21 (1): 108-111.
 - [25] Wingard JR, Carter SL, Walsh TJ, et al. Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network. Randomized, double-blind trial of fluconazole versus voriconazole for prevention of invasive fungal infection after allogeneic hematopoietic cell transplantation [J]. Blood, 2010, 116 (24): 5111-5118.
 - [26] Cornely OA, Maertens J, Winston DJ, et al. Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia [J]. N Engl J Med, 2007, 356 (4): 348-359.
 - [27] Ullmann AJ, Lipton JH, Vesole DH, et al. Posaconazole or fluconazole for prophylaxis in severe graft-versus-host disease [J]. N Engl J Med, 2007, 356 (4): 335-347.
 - [28] Marks DI, Pagliuca A, Kibbler CC, et al. Voriconazole versus itraconazole for antifungal prophylaxis following allogeneic haematopoietic stem-cell transplantation [J]. Br J Haematol, 2011, 155 (3): 318-327.
 - [29] Xu XH, Zhang L, Cao XX, et al. Evaluation of the implementation rate of primary antifungal prophylaxis and the prognosis of invasive fungal disease in acute leukemia patients in China [J]. J Infect Chemother, 2017, 23 (6): 360-367.
 - [30] Ananda-Rajah MR, Grigg A, Downey MT, et al. Comparative clinical effectiveness of prophylactic voriconazole/posaconazole to fluconazole/itraconazole in patients with acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome undergoing cytotoxic chemotherapy over a 12-year period [J]. Haematologica, 2012, 97 (3): 459-463.
 - [31] Rausch CR, DiPippo AJ, Jiang Y, et al. Comparison of mold active triazoles as primary antifungal prophylaxis in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia in the era of molecularly targeted therapies [J]. Clin Infect Dis, 2022, 75 (9): 1503-1510.
 - [32] White O, Kennedy E, Huckabee JB, et al. Isavuconazonium or posaconazole for antifungal prophylaxis in patients with acute myeloid leukemia [J]. J Oncol Pharm Pract, 2024, 30 (3): 527-534.
 - [33] Bogler Y, Stern A, Su Y, et al. Efficacy and safety of isavuconazole compared with voriconazole as primary antifungal prophylaxis in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients [J]. Med Mycol, 2021, 59 (10): 970-979.
 - [34] Zhao YJ, Khoo AL, Tan G, et al. Network meta-analysis and pharmacoeconomic evaluation of fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole in invasive fungal infection prophylaxis [J]. Antimicrob Agents Ch, 2015, 60 (1): 376-386.

(收稿日期: 2024-06-05; 修回日期: 2024-07-20)

生殖医药联合门诊管理多囊卵巢综合征患者的药学服务实践

赵路, 张梅, 姚尧, 马新秀, 张富青, 雷伟, 程晓* (郑州市妇幼保健院, 郑州 450003)

摘要: **目的** 为促进安全合理用药, 降低患者因复杂用药带来的风险, 以管理多囊卵巢综合征患者为抓手, 探索生殖医药联合门诊药学服务模式。**方法** 选取 2023 年 6 月—2023 年 12 月于我院生殖中心门诊就诊的多囊卵巢综合征患者, 生殖医师门诊为对照组, 医药联合门诊为观察组, 对照组患者给予常规医嘱和护理, 观察组由临床药师参与, 提供规范药学服务, 比较两组患者的疾病转归情况、处方合理率、用药依从性、不良事件发生率、超说明书用药管理和药学服务满意度。**结果** 观察组门诊促排卵妊娠患者比例 (38.0%) 高于对照组 (23.3%), 处方合理率 (99.3%) 高于对照组 (97.4%), 用药总依从率 (98.6%) 高于对照组 (91.3%), 不良事件的总发生率 (3.4%) 显著低于对照组 (10.7%), 药学服务的总满意度 (95.2%) 显著高于对照组 (86.0%) ($P < 0.05$)。**结论** 生殖医药联合门诊药学服务模式, 促进了安全合理用药, 降低了不良反应发生率, 提高了患者依从性, 真正做到“1 + 1 > 2”的专业用药指导。

关键词: 生殖医药联合门诊; 药学服务; 临床药师; 多囊卵巢综合征

中图分类号: R95, R969.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)04-1141-06
doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.041

Pharmaceutical care for patients with polycystic ovary syndrome via reproductive medicine combined with outpatient pharmaceutical care

ZHAO Lu, ZHANG Mei, YAO Yao, MA Xin-xiu, ZHANG Fu-qing, LEI Wei, CHENG Xiao* (Zhengzhou Maternal and Child Health Care Hospital, Zhengzhou 450003)

Abstract: Objective To promote safe and rational drug use and reduce the risk caused by complex individualized drug use in patients, to manage out patients with polycystic ovary syndrome (PCOS), and to explore the model of reproductive medicine combined with outpatient pharmaceutical care. **Methods** Patients with PCOS who visited the outpatient department of reproductive center of our hospital from June 2023 to December 2023 were selected. The outpatients counseled by reproductive physicians were assigned to the control group, while outpatients from the combined medical care were assigned to the observation group. Patients in the control group received routine medical advice and nursing care, while clinical pharmacists provide standardized pharmaceutical care in the observation group. The prescription qualification rate, medication compliance, adverse event incidence, off-label medication management and satisfaction with pharmaceutical care were all compared between the two groups. **Results** The proportion of outpatient ovulation induction for pregnant patients in the observation group (38.0%), was higher than that in the control group (23.3%). The qualified rate of prescriptions in the observation group (99.3%), was higher than that in the control group (97.4%); the medication compliance rate (98.6%), was much higher than that in the control group (91.3%), and the incidence of adverse events (3.4%), was much lower than that in the control group (10.7%). The satisfaction rate of pharmaceutical care (95.2%) was obviously higher than that of the control group (86.0%) ($P < 0.05$). **Conclusion** The model of reproductive medicine combined with outpatient pharmaceutical care promotes safe and rational drug use, reduces the incidence of adverse reactions, and improves patient compliance.

基金项目: 河南省医学科技攻关联合共建项目 (No.LHGJ20210779)。

作者简介: 赵路, 女, 副主任药师, 主要从事临床药学工作, email: zhaolu1202@163.com * **通信作者:** 程晓, 男, 副主任药师, 主要从事医院药学及药事管理工作, email: 41253996@qq.com

Key words: reproductive medicine combined with outpatient pharmaceutical care; pharmaceutical care; clinical pharmacist; polycystic ovary syndrome

药学服务是为满足医、护、患获得安全、有效、经济的合理用药支持,保障医疗质量和医疗安全,满足患者的健康需求,使患者获得预期的用药效果而为医、护、患提供的负责任的药物治疗服务^[1]。目前,国内的医疗机构依据各自专科发展的特点和需求,陆续开设了独立的药学门诊或内分泌科、心内科医药联合门诊等^[2-3],尚未见报道生殖医药联合门诊。

作为一家三级甲等妇幼保健专科医院,我院药学部 2016 年选送培养妇产科临床药师,2017 年我院获批郑州市首家生殖中心,随后行辅助生殖技术助孕患者越来越多,她们的用药具有品种多、周期长、个体化、给药途径多^[4]、超说明书用药^[5-6]、需考虑对胎儿的安全性等特点,我院药师团队积极探索实行医师药师联合门诊,在实际工作中,多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)患者是门诊管理的难点和重点,因此借助医药联合门诊的优势,以管理 PCOS 患者为抓手,拓展药学服务方向,拓宽药物服务方向,促进了安全合理用药,降低了不良反应发生率,提高了患者依从性,现将药学服务实践进行分析总结。

1 生殖医药联合门诊工作模式构建

1.1 资源与配置

医药联合门诊设置独立诊间,诊间配置电脑、电话、打印机、医学药学服务工具书;信息化支持医师工作病历系统和合理用药信息支持系统;宣教室配备示教电子屏和科普资料。

1.2 团队构成

由 1 名生殖科主任医师和 1 名妇产科临床药师组成。临床药师职称要求主管药师及以上,通过规范化临床药师学员培训并取得临床药师岗位培训证书。

1.3 流程规范及服务内容

由符合上述人员资质的医师和临床药师共同出诊。医师对患者进行临床诊疗,临床药师提供药学服务,具体内容如下,流程见图 1。

① 病史信息采集:重点关注用药史、药物疗效、不良反应处置情况及依从性评估,为制订药物治疗方案提供参考依据,并节省医师看诊时间。

② 处方审核:对方剂的规范性、适应证、用法用量、相互作用、配伍禁忌等进行审核。

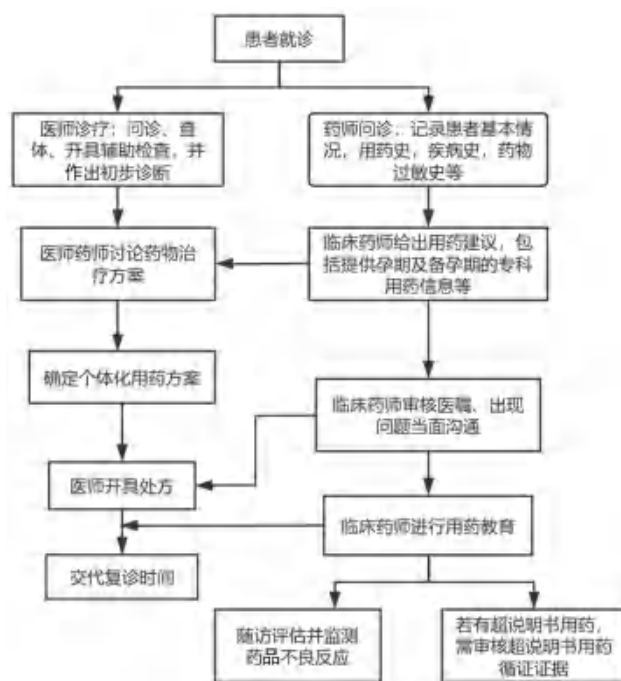


图 1 医药联合门诊工作流程图

Fig 1 Working flow chart of medical joint clinic

③ 对医、护、患进行用药教育(包括人文关怀和心理疏导):尤其是激素类药物,作为生殖科使用较多的一类药物,其具有个体化差异,临床药师会为患者详细讲解用法用量及用药注意事项等。

④ 接受医、护、患的用药咨询、提供孕期及备孕期的专科用药信息:目前高血压、糖尿病及精神疾病等合并症的妊娠患者有增加的趋势,临床药师提供专科药物信息,协助医师管理特殊患者。

⑤ 药品不良反应的监测及上报。

⑥ 开展药学知识讲座:包括对患者的科普讲座和对医护的专业药学知识讲座。

⑦ 对临床药物使用过程中的问题进行循证药物评价,尤其是超说明书用药的循证证据审核。

⑧ 科研与临床深度融合:与临床医师共同申请了河南省卫生健康委科技攻关联合共建科研项目。

2 资料与方法

2.1 一般资料

对 2023 年 6—12 月在我院生殖中心门诊治疗的 PCOS 患者的一般资料进行回顾性分析(伦理批准文号:ZZFY-LL-2021016)。纳入标准:采用 2003 年美国生殖医学会及欧洲人类生殖与胚

胎学学会在鹿特丹会议上推荐的 PCOS 诊断标准^[7]。排除标准：患有急性生殖泌尿道传染病或性传播疾病；有严重的遗传、躯体或精神心理疾病者。生殖医药联合门诊中诊断为 PCOS 的患者共计 147 例纳入本研究作为观察组；随机抽取医师门诊诊断为 PCOS 的患者 150 例纳入本研究为对照组。

2.2 评价指标

2.2.1 疾病转归情况 根据不同的就诊需求评估疾病转归情况，无生育要求调节月经者以规律月经认定为疾病治愈；有生育要求行门诊促排卵和行辅助生殖者，均以 B 超提示宫内早孕认定为疾病治愈。

2.2.2 处方合理率 分别以医院处方点评结果为准，统计观察组和对照组的处方合理率。

2.2.3 用药依从性 参考 Morisky 服药依从性量表，根据实际工作修订，自制用药依从性量表评价患者的用药依从性（见表 1），量表满分为 10 分，得分 10 分为完全依从，7～9 分为部分依从，≤6 分为不依从。总用药依从性=完全依从+部分依从。

2.2.4 不良事件发生率 统计患者在就诊期间的不良事件总发生情况，包括用药错误和不良反应。

2.2.5 超说明书用药情况 统计两组患者超说明书用药处方比例，其中经医院备案的超说明书用

表 1 用药依从性量表

Tab 1 Medication compliance scale				
序号	项目	是	否	
1	您是否清楚所服药物的用药目的？	1	0	
2	您是否知道这些药物的使用途径和剂量？	1	0	
3	您是否清楚药物的保管方法？	1	0	
4	您是否知道药品不良反应？	1	0	
5	您是否清楚药物的有效期？	1	0	
6	您是否掌握注射笔的使用方法？	1	0	
7	您从未漏服过药物吗？	1	0	
8	促排卵治疗中要按时检查激素水平？	1	0	
9	您是否有遵医嘱定期复诊？	1	0	
10	您是否有定期监测卵泡生长？	1	0	

药处方数认定为合理，未经医院备案的超说明书用药处方认定为不合理。

2.2.6 药学服务满意度 对照组患者给予常规医嘱、护理和调剂药师的用药交代，观察组由临床药师参与，在常规治疗基础上，提供规范药学服务。参考计建军等^[8]设计的调查问卷，根据实际工作进行调整，自制药学服务满意度调查问卷评价患者的药学服务满意度（见表 2），量表满分为 10 分，得分 10 分为非常满意，7～9 分为满意，4～6 分为一般满意，<4 分为不满意。总满意度（%）=（非常满意数+满意数）/总数×100%。

表 2 药学服务满意度调查问卷

Tab 2 Questionnaire on satisfaction of pharmaceutical care				
序号	项目	是	否	
1	您对药物的治疗效果是否满意？	1	0	
2	您对临床药师的服务态度是否满意？	1	0	
3	您对临床药师的沟通能力是否满意？	1	0	
4	当您向临床药师求助时，您对其提供的答复和帮助是否满意？	1	0	
5	您对临床药师提供的用药宣教（包括服药方法、服药时间、不良反应、用药注意事项）是否满意？	1	0	
6	您对临床药师提供的疾病知识讲座是否满意？	1	0	
7	您对临床药师在您病情及用药方面的隐私保护是否满意？	1	0	
8	您对临床药师的咨询效率是否满意？	1	0	
9	您对临床药师关于您用药情况进行的随访、监督是否满意？	1	0	
10	您对临床药师关于您将药品带回家后的贮藏建议是否满意？	1	0	

2.3 统计方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件分析。计数资料以率（%）表示，行 χ^2 检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 门诊概况

两组患者年龄、体质量指数、用药品种数、患病年限及文化程度差异均无统计学意义（ $P > 0.05$ ），具有可比性，见表 3。两组不同就诊需求构成比见表 4。

表 3 两组患者基本情况

Tab 3 Basic information of two groups					
组别	年龄 / 岁	体质量指数 / ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$)	用药品种数 / 种	患病年限 / 年	高中及以上学历人数占比 / %
观察组 ($n = 147$)	28.55±3.70	24.10±3.44	5.97±1.35	2.14±0.76	34.0
对照组 ($n = 150$)	29.25±3.55	24.08±3.29	5.95±1.18	2.10±0.76	37.6
P 值	0.851	0.095	0.953	0.674	0.765

表 4 就诊需求构成比 (%)

Tab 4 Composition ratio of medical demand (%)

组别	无生育要求调 节月经患者比例	有生育要求, 门诊 促排卵患者比例	有生育要求, 辅助 生殖患者比例
观察组	19.1	68.0	12.9
对照组	16.7	68.6	14.7

3.2 疾病转归情况

以是否满足就诊需求评估疾病转归情况, 就诊需求为调整月经者疾病转归率均为 100%; 有生育要求行门诊促排卵者, 观察组妊娠率 (38.0%) 高于对照组 (23.3%) ($P < 0.05$); 有生育要求行辅助生殖者, 两组妊娠率差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 5。

3.3 处方合理率

观察组由临床药师实时审核处方的规范性和合理性, 处方合理率 (99.3%) 显著高于对照组

表 5 疾病治疗结果 (%)

Tab 5 Disease treatment outcomes (%)

组别	月经规律 患者比例	门诊促排卵 妊娠患者比例	辅助生殖 妊娠患者比例
观察组	100.0	38.0	52.6
对照组	100.0	23.3	59.1
P 值	1.000	0.023	0.292

(97.4%), 见表 6。不合理处方主要有:

① 临床诊断书写不全: 如为 PCOS 患者开具来曲唑对应的临床诊断仅为健康查体、咨询或不良孕产史; ② 适应证不适宜: 如异常子宫出血患者应用抗菌药物; ③ 遴选药品不适宜: 合并肝功能损伤患者应用盐酸二甲双胍片; ④ 用法用量不适宜: 黄体酮注射液 60 mg im qd、尿促性素起始剂量为 150 U im qd; ⑤ 联合用药不适宜: 来曲唑片和枸橼酸氯米芬片联合应用等。

表 6 处方合理率及不合理处方情况

Tab 6 Rational rate of prescription and unreasonable prescription situation

组别	总处方 数 / 张	处方 合理率 / %	处方不合 理率 / %	不合理处方 / 张				
				临床诊断 书写不全	适应证 不适宜	遴选药品 不适宜	用法用量 不适宜	联合用药 不适宜
观察组	1233	99.3	0.7	4	1	1	2	1
对照组	1098	97.4	2.6	12	4	3	7	2
P 值		< 0.001						

3.4 用药依从性

观察组患者完全依从 132 例, 部分依从 13 例, 用药总依从性为 98.6%, 显著高于对照组 (91.3%) ($P < 0.05$)。

3.5 不良事件发生率

观察组患者用药错误发生率为 0%, 不良反应发生率为 3.4%, 显著低于对照组的 10.7% ($P < 0.05$), 见表 7。

表 7 不良事件发生情况

Tab 7 Occurrence of adverse events

组别	用药错误发生率 / %				不良反应发生率 / %		
	给药途径错误	漏服药物	药物保存错误	用药品种错误	腹泻 / 恶心 / 呕吐	药物过敏	总发生率 / %
观察组	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4	2.0	3.4
对照组	0.7	1.3	1.3	0.7	4.7	2.0	10.7
P 值							0.015

3.6 超说明书用药的管理

观察组的超说明书用药处方比例 (15.2%) 明显低于对照组 (21.5%), 合理率 (90.3%) 明显高于对照组 (70.0%) ($P < 0.05$)。

3.7 药学服务满意度

观察组患者对药学服务的总满意度为 95.2%, 显著高于对照组的 86.0% ($P < 0.05$)。

3.8 解决 PCOS 门诊患者存在的药物治疗相关问题

将纳入医药联合门诊管理的 147 例患者, 从适宜性、有效性、安全性和依从性 4 个方面评估分析患者的药物治疗相关问题, 结果发现有 32

例患者存在药物治疗相关问题, 平均每个患者存在 1.56 个药物治疗相关问题, 见表 8。

4 讨论

4.1 生殖医药联合门诊为合理用药提前把关

医药联合门诊的优势之一是发现问题及时干预, 把合理用药关口前移。本次药学服务实践将处方合理率从 97.4% 提高至 99.3%, 将不良事件发生率从 10.7% 降低至 3.4%, 其中超说明书用药的管理是重中之重。

妇科尤其是生殖科超说明书用药情况较为普遍, 虽然《中华人民共和国医师法》在立法上对医

表 8 药物治疗相关问题分析汇总
Tab 8 Analysis and summary of problems related to drug therapy

评价指标	药物治疗相关问题	常见原因	发现问题数 [n (%)]	解决问题数 [n (%)]
适宜性	治疗过度	未进行生活方式干预就开始进行药物治疗	22 (44)	21 (95)
		自行购买处方药进行药物减重		
		自己购买中药或保健品		
有效性	使用无效的药物	无适应证用药	7 (14)	6 (86)
	药物治疗不足	需要增加药物治疗	5 (10)	4 (80)
	给药剂量过低	服药频次低或单次剂量低	3 (6)	3 (100)
安全性	剂量过大	服药剂量太大	4 (8)	3 (75)
		时间太长		
		药物不良事件		
依从性	药物相互作用	相互作用导致治疗无效或毒性反应	1 (2)	1 (100)
	用药依从性差	没有充分理解药物作用	5 (10)	4 (75)
		忘记服药		
		觉得药物太贵		
总计			50 (100)	45 (90)

师超说明书用药给予合法性确认，但在临床实践中依然存在着法律风险和安全隐患，是药学服务的重点。本研究对照组超说明书用药比例和文献报道的 24.23% 较为接近^[9]，两组超说明书用药类型占比从高到低依次为超适应证、超用法用量及超用药途径，与文献报道一致^[10]。观察组的超说明书用药处方比例明显减少，且合理率提升，如减少不合理用法用量（如地屈孕酮片 20 mg bid po，黄体酮 60 mg qd im 等）；减少循证证据低的超适应证用药（如硫酸沙丁胺醇用于抑制宫缩、生长激素用于治疗子宫内膜薄等）。其他常见的超说明书用药如来曲唑促排卵、二甲双胍或吡格列酮二甲双胍治疗 PCOS 引起的胰岛素抵抗、阿司匹林用于治疗心磷脂综合征等，此类循证医学证据较高，且经医院审核通过并备案，认定为合理。

4.2 医药联合门诊助力 PCOS 综合治疗

本次筛选 PCOS 患者作为生殖医药联合门诊的服务人群，一是因为疾病特点：PCOS 是青春期及育龄期女性最常见的内分泌及代谢异常疾病，病因不明，多以对症治疗为主，除了生活方式干预^[11]，还需要采取个体化药物治疗措施^[12]；二是部分患者依从性差，影响治疗效果：如改变生活方式或减重太困难、无生育要求的 PCOS 患者往往对激素治疗会存在抗拒心理、有生育要求的患者对复方口服避孕药的应用也存在诸多顾虑等，临床医师无法分出大量时间来对患者进行疾病宣教和用药教育。以上均是临床药师易参与的治疗环节，进而通过制作用药教育材料和开展科普小课堂，对患者讲解生活方式干预的必要性^[13]，并

进行整体药物治疗管理^[14]，缓解临床医师的时间压力的同时很好地照护到患者（见图 2），提高了患者的妊娠率，并将患者总依从性从 91.1% 提升至 98.6%，药学服务满意度也随之提升。

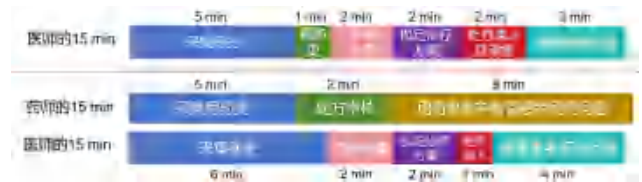


图 2 医师门诊和医药联合门诊的时间分配
Fig 2 Time allocation in physician clinics vs pharmacist-integrated joint clinics

在药物治疗管理过程中，对以下药物治疗相关问题进行干预，取得较好效果。适应证不适宜的问题占 58%，如正常体重者自行服用奥利司他，临床药师详细告知奥利司他的作用机制和不良反应；有效性不足的问题占 16%，如合并盆腔炎患者治疗方案中未覆盖支原体、衣原体等非典型病原体等，针对此问题开展业务学习，纠正共性问题，医师同意整改；安全性较低的处方占 16%，如二甲双胍剂量偏大引起胃肠道反应重、低分子肝素类药物致皮肤瘙痒、黄体酮注射液致注射部位硬结多见，告知医师严格把握用药适应证，积极上报药品不良反应并为医护患培训不良反应发生时的具体处理办法；共解决问题比例达 90%，与文献报道一致^[15]，表明临床药师已从各个专业肩负起了合理用药的重任，生殖医药联合门诊的模式亦具有可复制性。

4.3 生殖医药联合门诊开展的局限性及展望

目前临床药师人员非常有限，远远不能覆盖

所有患者^[16]，为保障特殊患者的药学服务，临床药师队伍的培养和壮大刻不容缓！国家卫健委于 2019 年已启动实施临床药师紧缺人才培养项目，目前紧缺人才-药师岗位培训正在全国开展中，国家切实看到了临床药师这支专业队伍在临床治疗团队中不可或缺、不可替代的专业支撑作用，期待临床药师队伍越来越壮大，更好地发挥合理用药“守门人”之责。

另外，随着年龄的增加和合并疾病的增多，同时服用降压药、降糖药、抗癫痫药^[17]、精神科用药^[18]等的患者越来越多，临床医师迫切需要临床药师共同管理这些患者，可见生殖医药联合门诊甚至药师独立门诊均有很大的发展空间，而要让患者常态化地到药学门诊主动进行药物重整及其他合理用药咨询，需要药师不断提高专业素养，提供更加细致全面个体化的药学服务。

参考文献

- [1] Hepler CD, Strand LM. Opportunities and responsibilities in pharmaceutical care [J]. *Am J Hosp Pharm*, 1990, 47 (3): 533-543.
- [2] 杨丽娟, 万明媛, 张威, 等. 我国医疗机构药学门诊开展现状调查 [J]. *中国药房*, 2024, 35 (2): 134-139.
- [3] 石晨阳, 谈仪炯, 范国荣. 拓展医院药学服务, 打造特色医药联合门诊 [J]. *上海医药*, 2023, 44 (23): 9-11, 17.
- [4] 王丽, 张伶俐, 郭远超. 在生殖内分泌科开展临床药学服务的模式探讨 [J]. *中南药学*, 2016, 14 (1): 94-97.
- [5] 陈颖, 宋雅琳, 侯宁. 辅助生殖药物处方中超说明书用药分析 [J]. *临床药物治疗杂志*, 2022, 20 (1): 67-71.
- [6] 吴雯, 杨剑辉. 多囊卵巢综合征患者超说明书用药循证医学分析 [J]. *中国药物经济学*, 2021, 16 (10): 40-42, 46.
- [7] The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus of diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS) [J]. *Hum Reprod*, 2004, 19 (1): 41-47.
- [8] 计建军, 张慧, 王长江, 等. 基于德尔菲法的临床药师对住院患者药学服务满意度调查表的设计 [J]. *中国现代应用药学*, 2020, 37 (10): 1254-1259.
- [9] 卢山, 孙小玲, 杜世正, 等. 多囊卵巢综合征患者生活方式管理的最佳证据总结 [J]. *生殖医学杂志*, 2021, 30 (9): 1180-1188.
- [10] 吴秋红, 薛子成, 龙凤, 等. 全程药学服务用于辅助生殖规范化治疗效果评价 [J]. *中国药业*, 2022, 31 (23): 121-124.
- [11] 程攀, 黄继勋, 薛婷, 等. 风湿免疫医药联合门诊服务模式的建立与实践 [J]. *药学与临床研究*, 2023, 31 (4): 380-384.
- [12] 周建华. 某院妇科门诊处方超说明书用药情况分析 [J]. *中国处方药*, 2019, 17 (9): 63-65.
- [13] 张明子, 凌静, 孙业红, 等. 临床药师与妇科医生合作进行多囊卵巢综合征患者门诊管理的药学实践 [J]. *今日药学*, 2020, 30 (5): 343-347.
- [14] 晋雪然, 史莉, 罗丽燕, 等. 多囊卵巢综合征生活方式干预治疗中患者依从性的研究进展 [J]. *中国性科学*, 2022, 31 (7): 36-39.
- [15] 中华医学会妇产科学分会内分泌学组及指南专家组. 多囊卵巢综合征中国诊疗指南 [J]. *中华妇产科杂志*, 2018, 53 (1): 2-6.
- [16] 金杨红, 崔晓飞, 王淑贞, 等. 临床药师与妇科医师合作进行更年期患者门诊管理的药学实践 [J]. *中南药学*, 2022, 20 (10): 2436-2439.
- [17] 厉星, 赵蕊, 应苗法. 精神药物在妊娠期使用的安全性探讨 [J]. *中国医院药学杂志*, 2021, 41 (8): 860-866.
- [18] Claudia CF, Mattia MMC, da Silva H, et al. Psychotropic medication use among women seeking assisted reproductive technology (ART) therapy: a cross-sectional study [J]. *J Affect Disord*, 2021, 292: 386-390.

(收稿日期: 2024-07-23; 修回日期: 2024-09-07)

基于真实世界数据的集采注射用醋酸卡泊芬净治疗 真菌感染的有效性、安全性和经济性评价

李红桥^{1, 2}, 夏雯¹, 李兰¹, 柯敏¹, 周倩^{1*}, 饶志威³ (1.黄石市中心医院(湖北理工学院附属医院), 湖北黄石 435000; 2.肾脏疾病发生与干预湖北省重点实验室, 湖北黄石 435000; 3.咸宁中心医院(湖北科技学院附属第一医院), 湖北咸宁 437100)

摘要: **目的** 从真实世界数据中评价集采注射用醋酸卡泊芬净治疗真菌感染的有效性、安全性和经济性, 为临床治疗和合理用药决策提供参考。**方法** 回顾性选取某三甲医院 2020 年 1 月至 2024 年 6 月住院期间收治的 522 例使用注射用醋酸卡泊芬净的患者, 根据使用集采或者原研药分为试验组和对照组, 采用倾向性评分匹配方法获取组间协变量并减少数据偏倚, 比较两组药物在临床综合疗效、安全性和有效性方面的差异。**结果** 根据纳排标准, 试验组和对照组各纳入 117 例用药患者, 试验组痊愈率为 69.37%, 对照组的是 72.65%; 试验组的不良反应发生率是 14.52%, 对照组的是 11.96%, 两组比较差异均无统计学意义。经济性评价中对照组和试验组在住院期间的其他费用差异无统计学意义, 而住院总费用、药品费用、抗菌药物总费用差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 对于真菌感染, 集采的注射用醋酸卡泊芬净与原研药具有相同的有效性和安全性, 从经济学来考虑, 选择集采的醋酸卡泊芬净对控制治疗费用有一定优势。

关键词: 醋酸卡泊芬净; 真实世界研究; 倾向性评分匹配; 集中采购; 有效性; 安全性; 成本-效果

中图分类号: R969.3, R95 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)04-1147-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.042

Effectiveness, safety, and cost-effectiveness of centralized procurement of caspofungin acetate injection for fungal infections based on real-world data

LI Hong-qiao^{1, 2}, XIA Wen¹, LI Lan¹, KE Min¹, ZHOU Qian^{1*}, RAO Zhi-wei³ (1. Huangshi Central Hospital, Affiliated Hospital of Hubei Polytechnic Institute, Huangshi Hubei 435000; 2. Hubei Key Laboratory of Kidney Disease Pathogenesis and Intervention, Huangshi Hubei 435000; 3. Xianning Central Hospital, The First Affiliated Hospital of Hubei Institute of Science and Technology, Xianning Hubei 437100)

Abstract: Objective To determine the effectiveness, safety, and cost-effectiveness of centralized procurement of caspofungin acetate injection for fungal infections from real-world data, and to provide reference for clinical treatment and rational drug use. **Methods** We retrospectively studied 522 patients admitted to a tertiary hospital between January 2020 and June 2024 who received intravenous cabozantine acetate. The patients were divided into an experimental group and a control group based on the use of centralized procurement of drug or the original drug. The propensity score matching method was used to obtain covariates between the groups and reduce data bias. The differences in comprehensive efficacy, safety, and effectiveness between the two groups of drugs were compared. **Results** Respectively 117 patients were included in both groups meeting the criteria. The recovery rate of the experimental group was 69.37%, while that of the control group was 72.65%. The

基金项目: 黄石市社会科学研究项目 (No.2024sk303); 湖北省自然科学基金面上项目 (No.2020CFB868)。

作者简介: 李红桥, 男, 主管药师, 主要从事临床药学、药品综合评价及药物经济学研究, email: lixiaoganggg@163.com * 通信作者: 周倩, 女, 主治医师, 主要从事老年病学及神经病学研究, email: 375577150@qq.com

incidence of adverse reactions of the experimental group was 14.52%, while that of the control group was 11.96%. In the economic evaluation, no difference in other expenses was found between the two groups during hospitalization, while significant difference was found in total hospitalization expenses, drug expenses, and total antibiotic expenses between the two groups ($P < 0.05$). **Conclusion** For patients with fungal infections, the injection of cabozantine acetate in centralized procurement has the same efficacy and safety as the original drug. From an economic perspective, centralized procurement of cabozantine acetate injection is preferable in controlling costs.

Key words: caspofungin cetate; real world study; propensity score matching; centralized procurement; effectiveness; safety; cost-effectiveness

真菌感染性疾病是指病原体侵入组织、器官、血液后生长及繁殖所致的感染性疾病，主要由念珠菌、隐球菌和曲霉菌等机会病原体引起^[1]。近些年，真菌感染发病率和致死率呈现较快增长趋势，所以在临床治疗中愈发引起关注^[2]。醋酸卡泊芬净作为治疗真菌感染一线药物且具有良好的安全性和耐受性，其使用愈加广泛^[3-4]。

国务院办公厅在 2019 年印发《国家组织药品集中采购和使用试点方案》，政府通过“以量换价”来降低药品价格，从而减轻人民群众负担来提高生活幸福感。由于集中采购政策的深入推行，导致药品价格较前有较大的降幅；随着集采药的广泛使用，临床医师和患者对仿制药的临床疗效、安全性和经济性越来越关注^[5-6]。

真实世界数据的研究能够在当前的医疗环境下高效、快捷和经济地提供有效性和安全性的问题研究，为药品上市后再评价提供新的研究思路 and 方向，从而被广泛应用^[7-9]。

本研究基于临床的真实世界数据，对集采和原研的注射用醋酸卡泊芬净的有效性、安全性和经济性开展研究，以期集采政策的实施和抗真菌药物的合理使用提供证据支持。

1 资料与方法

1.1 患者来源

本研究基于真实世界数据，回顾性选取某三甲医院 2020 年 1 月 1 日—2024 年 6 月住院期间收治的 522 例使用注射用醋酸卡泊芬净治疗真菌感染患者，本研究已经通过医院伦理委员会批准[批件号：伦快审(2024-35)]。

1.2 纳排标准

纳入标准：① 确定、临床诊断为真菌感染；② 注射用醋酸卡泊芬净疗程 ≥ 72 h；③ 年龄、性别不限。排除标准：① 住院治疗期间混合使用集采和原研的注射用醋酸卡泊芬净的患者；② 怀孕

和哺乳期患者；③ 使用注射用卡泊芬净期间联用其他抗真菌药物患者；④ 使用注射用醋酸卡泊芬净前或后接受其他抗真菌药物治疗患者（除以下情况：至少接受其他抗真菌治疗 72 h 后，感染的患者症状和其他治疗指标没有明显好转或恶化）；⑤ 有严重的肝肾功能不全患者；⑥ 病历资料不全患者。

1.3 治疗方案

所有入组患者在入院后根据病情变化按需给予退热药、止咳化痰、维护电解质平衡以及吸氧处理，同时实施真菌抗原检测、血培养及痰培养。其中对照组在常规的基础上使用注射用醋酸卡泊芬净（Merck Sharp & Dohme B.V.，规格：50 mg，价格：1049.98 元），试验组在常规基础上使用注射用醋酸卡泊芬净（海南海灵化学制药有限公司，规格：50 mg，价格：223.32 元），两组药物均溶解在 250 mL 的 0.9% 氯化钠溶液中，第 1 日负荷剂量是 70 mg，第 2 日及以后是 50 mg，静脉滴注。

1.4 信息收集和临床观察

以使用原研厂家为对照组，集采的厂家为试验组，收集患者的性别、体重、年龄、肝功能、肾功能、合并疾病、感染部位及感染菌种等信息。

1.5 疗效评价

根据 2014 年国家药品监督管理局药品审评中心^[10]和 2004 年原卫生部发布的《抗菌药物临床应用指导原则》中针对感染性疾病综合疗效评价一般从临床疗效、微生物学和影像学三个方面进行分析。临床疗效可分为临床治愈（包括临床治愈和临床改善）和临床无效（临床无效和临床复发）；微生物疗效可分为清除、假定清除、未清除、假定未清除、部分清除和其他；影像学表现分为好转吸收、同前、进展。综合疗效是指患者的临床疗效为临床治愈和改善、影像学表现为好转吸收、微生物疗效为清除和假定清除，同时

符合为痊愈，否则为无效。其中临床疗效痊愈率 (%) = (临床治愈数 + 临床改善数) / 患者总数 × 100%; 影像学好转率 (%) = 好转吸收数 / 患者总数 × 100%; 微生物清除率 (%) = (清除数 + 假定清除数) / 患者总数 × 100%。

1.6 安全性评价

记录两组患者的不良事件发生情况，不良事件定义及不良事件与研究药物因果关系判断参考《药物临床试验管理规范》和国家不良反应监测中心评价标准^[11]。其中肝功能损伤可定义为谷丙转氨酶 > 2 倍正常上限或总胆红素 > 2 倍正常上限；肾功能损伤可定义为肾小球滤过率 < 60 mL / (min · 1.73 m²)^[12]。

1.7 经济性评价

1.7.1 药物经济学 评价中的成本包括直接成本、间接成本和隐性成本，其中直接成本中又包括直接医疗成本和直接非医疗成本^[13]。由于直接非医疗成本、间接成本和隐性成本难以计算，本研究的成本主要以直接医疗成本来计算，包括患者住院期间的总费用、药品费用、抗菌药物费用和其他费用等。

1.7.2 敏感性分析 随着医疗综合体制改革和药品集中采购政策的落地和推进，药品的费用一般呈现下降趋势。为了保证基础分析的稳健性，对单个不确定性参数进行识别。本研究中纳入单因素敏感性分析包括成本和临床有效率，假设药品总费用和抗菌药物总费用下降 10%，住院总费用和其他费用上升 10%。

1.8 统计学方法

运用 SPSS 26.0 统计软件中倾向性评分匹配 (PSM) 扩展程序对纳入患者的观测指标进行 PSM，以期获得组间协变量均衡的样本 (可以认为经过 PSM 的患者在数学模型上的各项指标均符合对照研究标准)，组间比较用费希尔精确检查。根据 1:1 对两组基线进行匹配和平衡，将卡钳值设置在 0.1。符合正态分布的采用独立样本 *t* 检验，计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示；不符合正态分布的采用 $[M(P_{25}, P_{75})]$ 表示，两组间采用卡方检验或者非参数检验进行评估， $P < 0.05$ 表示研究结果具有统计学意义。

2 结果

2.1 患者筛选信息

根据图 1 筛选流程，在时间段内某院住院患者使用注射用醋酸卡泊芬净治疗真菌感染患者 522 例，经排除不符合同时使用集采和原研、联用其他抗真菌药物等患者 198 例，最终纳入 324 例患者。为了将分布差距较大时难以保证匹配质量的个体剔

除，将符合标准的患者在 PSM 进行匹配，最终采用对照组 117 例患者，试验组 117 例患者。本试验取卡钳值 0.1，纳入患者基线特征概述如图 1 所示。

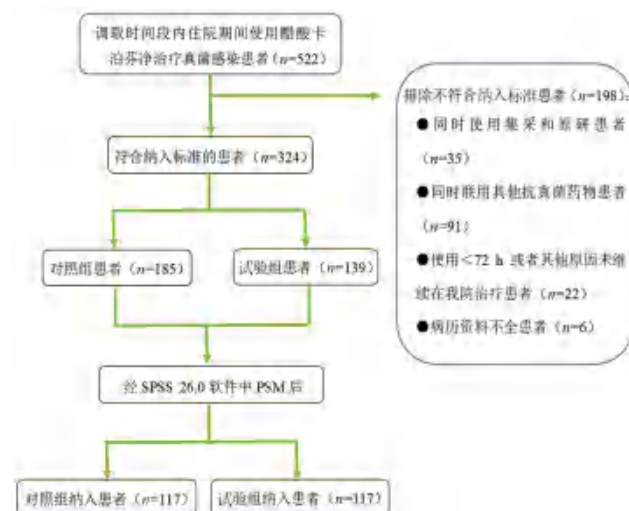


图 1 目标患者的筛选过程和结果

Fig 1 Screening process and outcome of target patients

2.2 PSM 结果

对照组和试验组在年龄、体重、合并疾病中 (高血压、冠心病、恶性肿瘤、其他疾病)、感染部位 (肺部、泌尿道、中枢感染、其他部位)、曲霉菌菌种、醋酸卡泊芬净疗程以及住院时长等差异均无统计学意义；而在性别、合并疾病中的糖尿病、消化道感染部位和念珠菌菌种等基线特征差异具有统计学意义 (每个变量的 $P < 0.05$)。采用统计学软件 SPSS 26.0 的倾向性评分匹配插件进行 PSM 分析后，试验组以及对照组均纳入患者 117 例。因此，使具有差异的混合变量达到同一基线水平，减少数据偏倚，从而使研究对象在卡钳值允许的范围存在有效的可比性，结果见表 1。

2.3 有效性评价结果

试验组和对照组经 PSM 后的综合疗效比较结果如表 2 所示：试验组痊愈率为 69.37%，对照组痊愈率是 72.65%。试验组和对照组比较各指标差异均无统计学意义。

2.4 安全性评价结果

根据《药物临床试验管理规范》和国家不良反应监测中心评价标准发现，两组的不良反应主要是肝功能异常、肾功能异常、恶心和呕吐、电解质紊乱和皮疹等。其中试验组的不良反应发生率是 14.52%，对照组是 11.96%，两组比较差异无统计学意义。

2.5 经济性评价结果

基于试验组和对照组在综合疗效性和安全性

表 1 PSM 前后两组患者观测指标
Tab 1 Indexes of the two groups before and after the PSM

变量	匹配前		P 值	匹配后		P
	试验组 (n = 185)	对照组 (n = 139)		试验组 (n = 117)	对照组 (n = 117)	
年龄 (范围) / 岁	51 (3, 78)	58 (4, 86)	0.235	52 (3, 77)	55 (4, 84)	0.521
男 [n (%)]	70 (37.84)	87 (62.58)	< 0.01	71 (60.68)	73 (62.39)	0.447
体重 (范围) /kg	58.32 (12.38, 92.81)	54.91 (10.56, 96.42)	0.261	57.96 (13.56, 90.91)	55.56 (11.32, 94.57)	0.624
谷丙转氨酶 / (U · L ⁻¹)	30 (3, 176)	26 (2, 169)	0.121	29 (3, 154)	27 (4, 159)	0.622
谷草转氨酶 / (U · L ⁻¹)	31 (2, 164)	27 (1, 182)	0.143	30 (3, 159)	28 (2, 178)	0.437
血肌酐 / (μmol · L ⁻¹)	73 (52, 97)	65 (47, 94)	0.214	71 (52, 95)	68 (49, 93)	0.452
尿素氮 / (mmol · L ⁻¹)	5.2 (2.6, 8.5)	5.7 (2.1, 8.6)	0.341	5.3 (2.8, 8.5)	5.5 (2.2, 8.4)	0.621
合并疾病 [n (%)]						
高血压	72 (38.91)	58 (41.72)		46 (39.31)	48 (41.03)	0.447
糖尿病	39 (21.08)	36 (25.90)	0.01	25 (21.36)	27 (23.08)	0.438
冠心病	43 (23.24)	42 (30.21)	0.146	30 (25.64)	34 (29.05)	0.330
恶性肿瘤	29 (15.67)	38 (27.33)	0.008	22 (18.80)	26 (22.22)	0.314
其他	36 (19.46)	22 (15.83)	0.224	20 (17.09)	21 (17.95)	0.500
感染部位 [n (%)]						
肺部	131 (70.81)	105 (75.54)	0.254	84 (71.79)	86 (73.54)	0.563
消化道	32 (117.30)	13 (9.35)	0.028	14 (7.69)	12 (6.83)	0.442
泌尿道	28 (15.13)	19 (13.66)	0.418	16 (13.67)	15 (12.8)	0.500
中枢感染	4 (2.16)	1 (0.72)	0.287	2 (1.71)	1 (0.85)	0.500
其他	51 (27.56)	42 (30.21)	0.210	33 (28.20)	35 (29.91)	0.443
感染菌种 [n (%)]						
念珠菌	92 (49.72)	84 (60.43)	0.036	61 (52.13)	64 (54.71)	0.346
曲霉菌	26 (14.05)	14 (10.07)	0.182	16 (13.68)	13 (11.11)	0.547
给药方式 [n (%)]						
静脉滴注	66 (35.68)	59 (42.45)	0.215	43 (36.75)	47 (40.17)	0.591
微量泵入	115 (62.16)	77 (55.40)	0.220	72 (61.54)	68 (58.12)	0.594
其他	4 (2.16)	3 (2.15)	0.998	2 (1.71)	2 (1.71)	1.000
卡泊芬净疗程 /d	9 (4, 14)	6 (4, 12)	0.213	7 (4, 13)	7 (4, 12)	0.652
住院时长 /d	13 (5, 18)	10 (5, 15)	0.129	12 (6, 15)	11 (5, 14)	0.457

评估结果中没有明显的差异，可考虑采用最小成本法进行经济性评价。由表 3 可知，对照组和试验组在住院期间其他费用在两组间差异无统计学意义，而住院总费用、药品费用、抗菌药物总费用差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。敏感性分析结果与前一致，显示试验组住院期间其他费用差异无统计学意义，而住院总费用、药品费用、抗菌药物总费用差异有统计学意义，试验组显示成本更低，更具有经济性 (见表 4)。

3 讨论

醋酸卡泊芬净是棘白类抗真菌药物，通过抑制真菌细胞壁 β - (1, 3) -D 葡聚糖的合成，使细胞壁完整性发生改变，从而破坏真菌细胞的渗透压平衡，导致真菌细胞溶解凋亡^[14]。由于人体细胞没有该成分，因此醋酸卡泊芬净对人体具有良好的安全性^[15]。临床医务人员较为关注醋酸卡泊

芬净生物等效性是否等同于临床等效性。因此本文回顾性地提取醋酸卡泊芬净患者使用信息，探讨醋酸卡泊芬净集采药物的临床有效性、安全性和经济性，为临床医务人员和政策管理部分提供证据支持。

在真实世界情况下，采用 PSM 集采注射用醋酸卡泊芬净治疗真菌感染的临床综合评价^[16]，将多个混杂变量综合为一个变量，通过平衡若干组变量，均衡混杂因素，从而达到减少数据偏倚和事后随机化的效果。本次研究显示，性别合并疾病中的糖尿病、消化道感染部位和念珠菌菌种等基线特征差异具有统计学意义，经 PSM 后，组间的偏倚和混杂因素达到均衡，得到的试验组和对照组的疗效一致性更加可靠^[17]。

在本次研究中，两组的综合有效率差异无统计学意义，说明两组药物在临床应用过程中，药

表 2 PSM 后两组患者疗效对比 [n(%)]
Tab 2 Efficacy of both groups after PSM [n(%)]

疗效	项目	试验组 (n = 117)	对照组 (n = 117)	P
疗效治愈率	治愈+改善	87 (74.36)	93 (79.49)	0.883
	治愈	55 (47.01)	62 (52.99)	
	改善	32 (27.35)	31 (26.50)	
	无效	18 (15.38)	16 (13.68)	
	复发	7 (5.98)	5 (4.27)	
	死亡	5 (4.27)	3 (2.56)	
影像学好转率	好转吸收	80 (69.37)	85 (72.65)	0.283
	同前	26 (22.22)	22 (18.80)	
	进展	11 (9.41)	10 (8.55)	
微生物清除率	清除+假定清除	86 (73.50)	89 (76.06)	0.382
	清除	29 (24.79)	34 (29.6)	
	假定清除	57 (48.71)	55 (47.01)	
	未清除	12 (10.26)	11 (9.41)	
	假定未清除	4 (3.42)	4 (3.42)	
	部分清除	5 (4.27)	4 (3.42)	
	其他	10 (8.54)	9 (7.69)	
综合疗效	痊愈	80 (69.37)	85 (72.65)	0.283
	无效	37 (31.63)	32 (27.35)	

表 3 两组患者成本-效果分析结果
Tab 3 Cost-effectiveness analysis of both groups

组别	住院总费用 / 元	药品总费用 / 元	抗菌药物总费用 / 元	住院期间其他费用 / 元
试验组	16 562.61 (9369.29, 26 837.19)	3478.02 (1967.55, 5635.81)	1391.26 (787.21, 2254.32)	13 084.59 (7399.74, 21 201.38)
对照组	24 053.37 (16 580.31, 37 870.98)	9621.34 (6632.12, 15 148.39)	8562.16 (5348.23, 13 748.25)	14 432.01 (9948.19, 22 722.59)
P	< 0.01	< 0.01	< 0.001	0.364

表 4 敏感性分析各项费用比较
Tab 4 Sensitivity analysis of both groups

组别	住院总费用 / 元	药品总费用 / 元	抗菌药物总费用 / 元	住院期间其他费用 / 元
试验组	18 218.21 (10 306.22, 29 520.91)	3130.22 (1770.78, 5072.23)	1254.13 (708.49, 2028.91)	14 393.05 (8139.71, 23 321.52)
对照组	26 458.63 (18 238.34, 41658.08)	8659.21 (5968.10, 13 633.55)	7705.94 (4813.41, 12 373.43)	15 875.21 (10 943.01, 22 994.85)
P	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.231

物的等效性能够保持一致。张瑞佳等^[18]采用通过一致性评价的醋酸卡泊芬净治疗真菌感染的有效率是 71.83%，与本研究的有效率相当。

不良反应发生情况试验组是 17 例，对照组是 14 例，两组差异无统计学意义，主要是肝功能异常、肾功能异常、恶心和呕吐、电解质紊乱（主要是低钾血症）、皮疹等，其中肝功能异常发生率是 7.96%，与陈凡等^[19]报道在真实世界中醋酸卡泊芬净导致的肝损伤率（6.9%）相当，主要表现是谷丙转氨酶的升高，这是由于醋酸卡泊芬净能够激活 MMP-9 转导子和 STAT3 转录子造成的^[20]。

本研究选择成本-效果进行经济学评价。相对于对照组，试验组的住院总费用、总药品费用、抗菌药物总费用差异有统计学意义，其他费用差

异没有统计学意义，这说明住院总费用和总药费的差异主要是抗菌药物产生。

本研究也存在一些局限性：① 未开展多中心研究，单中心纳入的样本量少；② 采用 PSM 法对真实数据进行匹配，虽在一定程度上可减少数据的偏倚，但是也导致部分数据未匹配成功，样本量减少；③ 本文是回顾性研究，所获取的数据均是以往病历，存在数据的滞后性，同时对出院患者未做到完整的随访。

综上，集采的醋酸卡泊芬净在治疗真菌感染中具有与原研制剂相当的疗效和安全。从经济学来考虑，选择集采的醋酸卡泊芬净对控制治疗费用有一定优势。但是这仍需要开展大规模、多中心随机对照试验和真实世界研究来确认。

参考文献

- [1] 宋静楠, 李佳, 何秋毅, 等. 伏立康唑片剂原研药与仿制药治疗侵袭性真菌感染的有效性与安全性比较[J]. 今日药学, 2022, 32 (10): 757-761.
- [2] 曲莎莎. 伏立康唑联合氟康唑治疗肺侵袭性真菌感染患者的效果分析[J]. 中国现代药物应用, 2023, 17 (15): 88-90.
- [3] 王冠儒, 宋再伟, 姜丹, 等. 卡泊芬净用于侵袭性真菌病的药物经济学系统评价[J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42 (5): 544-548.
- [4] 乔智灏, 李嘉莹, 刘昶. 卡泊芬净对重症侵袭性假丝酵母菌感染降阶梯治疗的效果评价[J]. 西北药学杂志, 2021, 36 (5): 812-815.
- [5] 宋沧桑, 邓雨琴, 刘璐, 等. 基于多中心真实世界数据的集采注射用头孢曲松治疗细菌性感染的临床综合评价[J]. 中国医院药学杂志, 2024, 44 (5): 585-590, 597.
- [6] 陈思煌, 谢茵, 魏璟璇, 等. 药品集中采购政策背景下仿制药与原研药有效性和安全性对比的系统综述[J]. 中南药学, 2023, 21 (10): 2787-2792.
- [7] 张兰, 董宪喆, 王之舟. 真实世界研究在国产仿制药临床疗效与安全性评价中的应用及展望[J]. 药品不良反应杂志, 2023, 25 (3): 129-132.
- [8] 程瑶瑶, 宋沧桑, 李兴德, 等. 基于真实世界数据的药品临床综合评价研究进展[J]. 中南药学, 2024, 22 (2): 473-476.
- [9] 汪春楠, 秦诗如, 章萌, 等. 多中心真实世界数据评价药品安全性研究进展[J]. 中国药物警戒, 2024, 21 (6): 703-708, 720.
- [10] 《抗菌药物临床试验技术指导原则》写作组. 抗菌药物临床试验技术指导原则[J]. 中国临床药理学杂志, 2014, 30 (9): 844-856.
- [11] 刘丹, 李海龙, 曾力楠, 等. 胆木浸膏糖浆与小儿豉翘清热颗粒治疗小儿急性上呼吸道感染的最小成本分析[J]. 中国循证医学杂志, 2022, 22 (9): 1007-1011.
- [12] 唐甘翎, 谢祥威, 罗鲜丹, 等. 伏立康唑原研药与仿制药的有效性、安全性及经济性评价[J]. 中国药房, 2024, 35 (7): 831-836.
- [13] 王李婷, 彭六保, 彭烨, 等. 2020 年版和 2011 年版中国药物经济学评价指南比较分析[J]. 中国药物经济学, 2021, 16 (3): 5-8, 15.
- [14] 郭宗儒. 芬净类抗真菌药物的研制[J/OL]. 药学学报. <https://link.cnki.net/urlid/11.2163.R.20230928.1621.002>.
- [15] 蒙明薇, 莫凯, 韦汝华, 等. 基于加权 TOPSIS 法的卡泊芬净药物利用评估[J]. 临床合理用药, 2023, 16 (14): 1-4.
- [16] 彭晓霞, 舒啸尘, 谭婧, 等. 基于真实世界数据评价治疗结局的观察性研究设计技术规范[J]. 中国循证医学杂志, 2019, 19 (7): 779-786.
- [17] 刘雨蒙, 熊培, 胡琪, 等. 替加环素原研药和仿制药的有效性和安全性评价[J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42 (22): 2378-2382.
- [18] 张佳瑞, 周景润, 曹裕孟, 等. 米卡芬净与卡泊芬净分别联合复方磺胺甲噁唑治疗耶氏肺孢子菌肺炎的疗效、安全性和药物经济学评价[J]. 武汉大学学报(医学版), 2024, 45 (11): 1370-1373, 1385.
- [19] 陈凡, 胡述立, 张韶辉, 等. 卡泊芬净相关肝损伤的真实世界研究[J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41 (13): 1337-1340.
- [20] 吴彬, 邓小莹, 阙慧卿, 等. 基于生物信息学和分子对接分析卡泊芬净引起转氨酶升高的作用机制[J]. 今日药学, 2022, 32 (9): 669-675.

(收稿日期: 2024-07-25; 修回日期: 2024-09-12)

临床药师主导整合的妇科术后分级镇痛管理模式的建立与评价

雷伟¹, 张梅¹, 马新秀¹, 赵路¹, 程晓¹, 刘爱珍², 苗杨³, 宫宏宇² (郑州市妇幼保健院, 1.药学部, 2.妇产科, 3.麻醉科, 郑州 450013)

摘要: **目的** 建立临床药师主导整合的妇科术后分级镇痛管理模式, 优化妇科术后疼痛管理, 并评价其临床价值。**方法** 2022 年 12 月—2023 年 12 月, 在我院妇科某病区实施临床药师主导整合的妇科术后分级镇痛管理模式, 并通过对比分析试验组 (临床药师主导整合的分级镇痛管理) 与对照组 (真实世界无临床药师参与的妇科手术术后疼痛管理) 在术后镇痛效果、不良反应发生率及药物经济学相关指标上的差异, 初步评估该管理模式的实践效果。**结果** 对照组和试验组镇痛达标率分别为 81.2%、90.6% ($P = 0.007$); 不良反应发生率分别为 81.2%、41.4% ($P = 0.002$); 人均药物镇痛成本分别为 (1196.2±25.07) 元、(133.2±16.76) 元; 成本/效果比 (C/E) 分别为 1473.20、147.02。成本以对照组为参照, 试验组的增量成本-效果比 ($\Delta C/\Delta E$) 为 -113.08。**结论** 临床药师主导整合的妇科术后分级镇痛管理模式在有效性、安全性、经济性方面均有明显优势, 可以为妇科术后疼痛管理以及临床药师参与术后用药管理提供借鉴。

关键词: 妇科术后; 分级镇痛管理; 经济性

中图分类号: R95, R969.3 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)04-1153-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.043

Establishment and evaluation of a graded pain management model after gynecological surgery led by clinical pharmacists

LEI Wei¹, ZHANG Mei¹, MA Xin-xiu¹, ZHAO Lu¹, CHENG Xiao¹, LIU Ai-zhen², MIAO Yang³, GONG Hong-yu² (1. Department of Pharmacy, 2. Department of Obstetrics and Gynecology, 3. Department of Anesthesiology, Zhengzhou Maternal and Child Health Hospital, Zhengzhou 450013)

Abstract: **Objective** To establish a graded pain management model led by clinical pharmacists after gynecological surgery, optimize pain management in gynecological surgery, and evaluate its clinical value. **Methods** From December 2022 to December 2023, an integrated graded analgesia management model led by clinical pharmacists was implemented in a gynecological ward of a hospital. By comparing and analyzing the differences in postoperative analgesia efficacy, incidence of adverse reactions, and pharmacoeconomic indicators between the experimental group (integrated graded analgesia management model led by clinical pharmacists) and the control group (real-world postoperative gynecological pain management model without pharmacist participation), the practical effect of this graded management model was evaluated. **Results** The analgesic compliance rates of the control group and the experimental group were 81.2% and 90.6%, respectively ($P = 0.007$). The incidence of adverse reactions was 81.2% and 41.4%, respectively ($P = 0.002$). The per capita cost of medication analgesia were (1196.2±25.07) yuan and (133.2±16.76) yuan, respectively. The cost/effectiveness ratios (C/E) of both groups were 1473.20 and 147.02, respectively. With the cost control group as a reference, the incremental cost-effectiveness ratios ($\Delta C/\Delta E$) of the experimental group was -113.08. **Conclusion** The postoperative graded pain management model led by clinical pharmacists is safe, effective, and economic, and can provide reference for gynecological postoperative pain management and clinical pharmacist participation.

Key words: gynecological postoperative; graded pain management; economic feasibility

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目 (No.LHGJ20220887)。

作者简介: 雷伟, 女, 硕士研究生, 副主任药师, 主要从事妇产科临床药学方面的研究, email: leiwei3511@163.com

随着现代医疗技术的飞速发展,微创理念在妇科领域的应用日益广泛,推动了妇科手术向更加精准、创伤小、恢复快的方向迈进^[1]。妇科微创技术,包括经阴道手术、内镜技术及介入治疗等,凭借其独特的优势,已成为妇科疾病治疗的重要手段。然而,尽管微创手术显著减少了手术创伤和术后瘢痕,但术后疼痛管理仍然是影响患者康复质量的关键因素之一^[2]。妇科手术种类繁多,手术范围广泛,加之个体对疼痛感知的差异,使得术后疼痛管理面临诸多挑战。

当前,妇科微创手术后的疼痛管理缺乏统一、标准化的方案^[2],不同医师间采用的镇痛策略差异较大,导致镇痛效果参差不齐,甚至可能出现过度镇痛或镇痛不足的情况,进而增加患者痛苦、延长住院时间,并可能引发一系列药品不良反应,造成医疗资源的浪费。因此,探索一种科学、合理、个体化的妇科术后分级镇痛管理模式,以平衡镇痛效果与药品不良反应之间的关系,成为临床亟须解决的问题。

在此背景下,临床药师作为药物治疗的专业团队,其在术后疼痛管理中的作用日益凸显^[3-5]。临床药师不仅具备深厚的药专业知识,还熟悉患者的临床情况,能够综合运用药理学、药代动力学及临床实践经验,为患者提供个性化的用药指导^[6]。鉴于此,本研究旨在通过临床药师主导,建立并评价一种整合的妇科术后分级镇痛管理模式。该模式依据手术类型、手术范围及患者个体差异,制订差异化的镇痛方案,并通过对比分析试验组(临床药师主导整合的分级镇痛管理)与对照组(真实世界无临床药师参与的妇科手术术后疼痛管理)在术后镇痛效果、不良反应发生率及药物经济学相关指标上的差异,初步评估该管理模式的实践效果。

本研究不仅有助于优化妇科术后疼痛管理流程,提高镇痛效果,减少药品不良反应,还能为临床药师在围术期开展药学服务提供科学依据,推动临床药学与临床实践的深度融合,进一步提升妇科患者的整体康复质量。

1 资料

1.1 研究对象

我院妇科试点病区与非试点病区择期手术的患者,入选标准:① 在我院妇科行手术治疗的患者;② 年龄 14~80 岁,美国麻醉医师协会健康状况分级(ASA 分级)Ⅰ~Ⅲ级;③ 理解能力良好,可配合术后疼痛随访。排除标准:① 存在镇痛药物滥用史;② 存在镇痛药物过敏史或禁忌证;③ 语言沟通障碍或不配合术后疼痛随访者。2022 年 12 月—2023 年 12 月临床药师参与主导下的

妇科术后分级镇痛管理的妇科手术患者为试验组(222 例),同期真实世界无临床药师参与的妇科手术患者为对照组(218 例)。

1.2 镇痛药物信息

酒石酸布托啡诺注射液(江苏恒瑞医药股份有限公司,规格:2 mL/4 mg,单价:105.21 元);地佐辛注射液(扬子江药业集团有限公司,规格:10 mg,单价:250.8 元);氟比洛芬酯注射液(武汉大安制药有限公司,规格:5 mL/50 mg,单价:21.2 元);盐酸右美托咪定注射液(扬子江药业集团有限公司,规格:200 μg/支,单价:56 元);纳布啡注射液(宜昌人福药业有限责任公司,规格:1 mL/10 mg,单价:60 元);盐酸羟考酮注射液(江苏恩华药业股份有限公司,规格:1 mL/10 mg,单价:180.0 元);微电子输注泵(河南驼人医疗器械集团有限公司,单价:38.8 元);吲哚美辛片(百正药业股份有限公司,规格:25 mg/片,100 片/瓶,单价:12.63 元/瓶);布洛芬缓释胶囊(华北制药股份有限公司,规格:300 mg/粒,20 粒/盒,单价:4.05 元/盒);对乙酰氨基酚片(地奥集团成都药业股份有限公司,规格:500 mg/片,100 片/瓶,单价:3.33 元/瓶)。

2 方法

2.1 干预方法

收集患者相应研究信息。对照组手术患者实施真实世界无临床药师参与的妇科手术术后疼痛管理,进行观察随访研究。试验组手术患者,实施术后分级镇痛管理模式,由临床药师实施药学服务措施,参与主导妇科术后疼痛管理工作。本研究经医院医学伦理委员会审批同意(批件号:ZZFY-LL-2022021)。本研究中试验组患者术后镇痛药物方案是以非甾体抗炎药(NSAIDs)为基础的分级镇痛管理,阿片类药物只保留用于 NSAIDs 镇痛不足的患者。对照组患者术后一般采用阿片类药物和 NSAIDs 联合右美托咪定的多药联合镇痛方案。

本研究涉及的 NSAIDs 主要包括氟比洛芬酯、吲哚美辛、布洛芬。阿片类药物主要包括纳布啡、布托啡诺、地佐辛、羟考酮。

2.2 临床药师主导的分级镇痛管理模式

临床药师通过我院妇科临床实际调研数据分析,根据妇科手术类型、手术部位、手术范围,预判术后手术部位疼痛程度,参考术后疼痛管理相关指南和文献^[1-2, 7-11],将妇科手术术后疼痛程度分为 3 个等级,不同等级对应不同的镇痛方案。常用的术后镇痛方案一般有外周神经阻滞、伤口局麻药浸润、全身用镇痛药物以及多模式联合镇痛,本文主要以术后镇痛药物的应用作为主要研究内容。具体分级及对应镇痛方案见图 1、2。

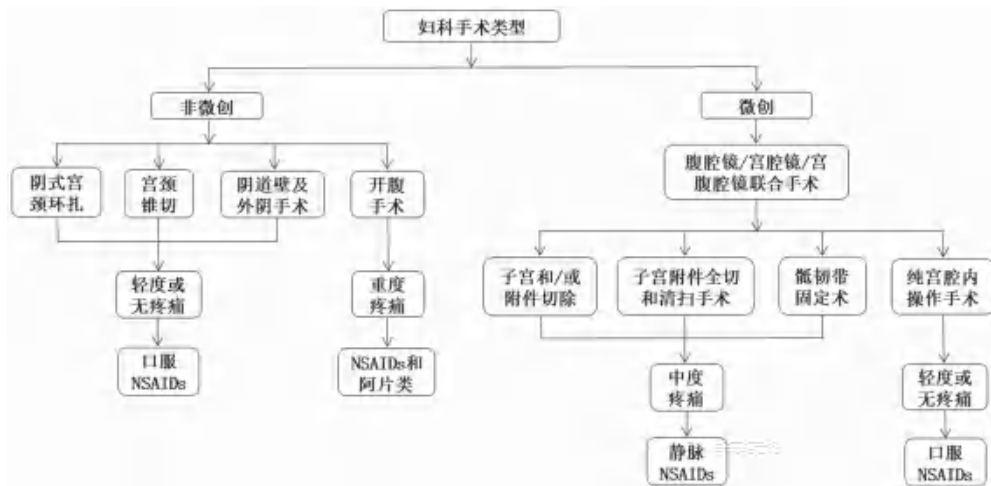


图 1 妇科术后疼痛分级及分级镇痛方案

Fig 1 Gynecological postoperative pain grading and graded analgesia management



图 2 妇科手术类型及分级镇痛策略

Fig 2 Types of gynecological surgeries and graded analgesia strategies

由妇产科的专职临床药师入住妇科病区，临床药师与医师根据相关指南和文献^[7-11]，制订妇科常见手术术后疼痛分级目录表及对应镇痛方案，并在试验组实施。临床药师在术前对手术患者进行数据采集，内容包括既往手术史、本次择期手术类型、镇痛药物应用史、药物过敏史、既往疾病史及用药史，同时进行镇痛宣教包括术后疼痛管理的意义、镇痛药物的选择、不良反应、镇痛泵的正确使用等。结合采集数据，临床药师与麻醉医师、手术医师共同制订患者术后镇痛方案，术后由临床药师和病区护士共同完成疼痛随访，评价镇痛方案的效果，对于镇痛不佳者及时查找原因，调整镇痛方案。同时由临床药师收集相关不良反应并及时反馈给医师做出相应处理，详细药学服务流程见图 3。

2.3 药学服务措施

2.3.1 成立妇科疼痛管理团队 多学科妇科术后疼痛管理团队由妇科临床药师 1 名、疼痛管理责任护士 2 名、疼痛联络医师 2 名、麻醉医师 1 名组成，形成有临床药师参与的多学科妇科术后疼痛管理团队。

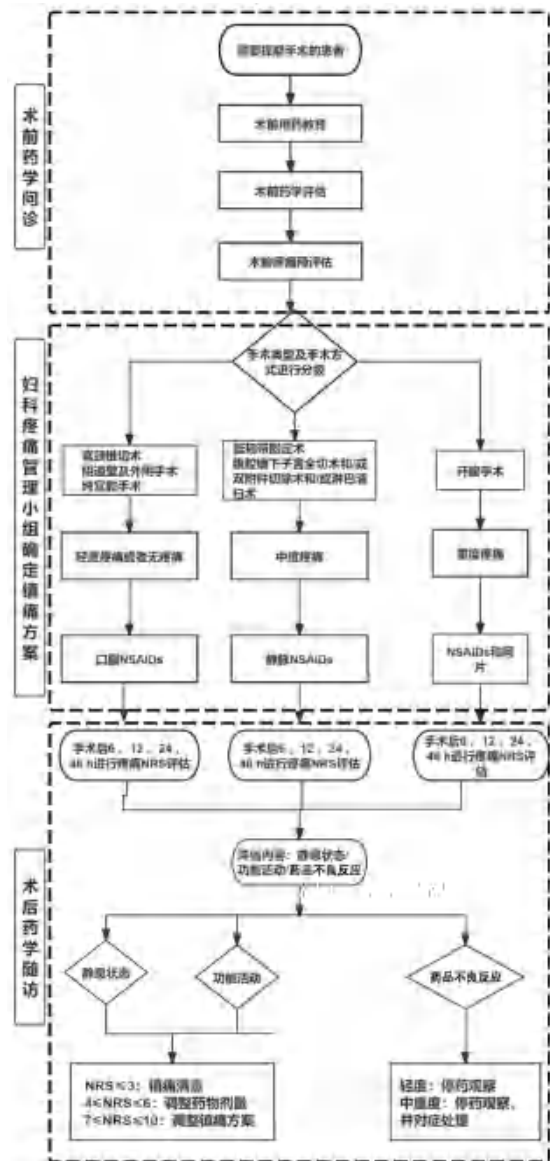


图 3 临床药师主导整合的妇科术后镇痛管理模式流程图

Fig 3 Gynecological postoperative analgesia management model led by clinical pharmacists

2.3.2 开展同质化、规范化管理培训 定期开展疼痛评估、镇痛药物的安全使用等相关专业培训并进行质量控制,以保证疼痛评估的同质化、规范化;对镇痛不充分、术后疼痛疑难患者等通过药学会诊协助医师制订及调整镇痛药物方案;对患者及陪护进行疼痛健康教育,减少认识误区,

指导患者使用疼痛评估工具,积极参与到自我疼痛管理工作中。

2.3.3 制订不良反应处理预案 临床药师针对术后常见的镇痛药药品不良反应,提前与妇科疼痛管理团队沟通商议,并做出处理预案,详见表 1。

表 1 合并胃肠道和心血管风险 NSAIDs 使用者预防方案推荐

Tab 1 Recommended prevention strategies for NSAIDs users with combined gastrointestinal and cardiovascular risks	
心血管风险	胃肠道风险
	低 中 高
低心血管风险	仅 NSAIDs (最低有效剂量) NSAIDs + 质子泵抑制剂 (PPI) / 米索前列醇 替代治疗或环氧合酶-2 (COX-2) 抑制剂 + PPI / 米索前列醇
高心血管风险 (需小剂量阿司匹林)	避免 NSAIDs 或 COX-2 抑制剂应用,使用替代治疗如乙酰氨基酚 0.5 g po (24 h 内不超过 2 g,肝功能不全禁用)

2.3.4 提供药学专业支撑 临床药师根据术后疼痛管理相关指南或诊疗策略,从患者个体情况、药物配伍禁忌、不同给药方式、药物镇痛效能、不良反应等多个方面提供参考,为团队成员提供相关用药安全和最佳用药时间的教育。对使用镇痛泵的患者根据药物特点从患者个体情况、配伍禁忌、患者自控镇痛泵 (patient controlled analgesia, PCA) 给药方式等多个方面参与优化镇痛泵的给药方案和撤泵后镇痛方案的调整。

2.3.5 实施药学监护 妇产科专职临床药师通过药学查房,进行持续的术后疼痛随访工作,检查镇痛泵的运行情况,通过患者疼痛强度评分变化,评估镇痛药物是否不足或过量、监测不良反应,评价患者术后镇痛方案的疗效,优化镇痛方案及不良反应的处理。

2.3.6 发挥临床药师桥梁纽带作用 产科医师与手术室麻醉医师,以及麻醉科护士与病区护士之间,由于时空差异和学科差异,对于患者镇痛方案及术后疼痛的现状的沟通交流往往不足。而术后疼痛的管理工作应该是多学科协作管理模式,临床药师在团队中作为懂医精药的队友,可发挥患者与临床医师、麻醉医师、护士之间的桥梁作用,提升团队沟通协商的效率。

2.4 评价指标

比较组间术后镇痛效果、疼痛管理达标率、镇痛成本、成本/效果比 (C/E)、增量成本-效果比 ($\Delta C/\Delta E$)、不良反应发生率等。

2.4.1 镇痛效果评定 镇痛效果以术后疼痛缓解率和不良反应发生率共同评价,理想的镇痛效果应该是术后疼痛缓解良好同时不良反应发生率较低。

所有入组患者按照不同的镇痛方案用药后,术后疼痛发生情况以疼痛发生率统计,由疼痛管理护士按照疼痛评估流程,分别在术后 6、12、24、48 h 开展疼痛评估,必要时增加评估频次。

采用疼痛数字评分法 (NRS) 对各组患者静息状态疼痛和功能活动状态 (翻身、坐起、下床活动) 的疼痛进行评分。根据 NRS 评估结果进行疼痛分级,轻度为 $NRS \leq 3$ (不影响睡眠, A 级),中度为 $4 \leq NRS \leq 6$ (轻度影响睡眠, B 级),重度为 $NRS \geq 7$ (不能入睡或痛醒, C 级)。为了保证术后疼痛评估的一致性,评估人员结合疼痛对睡眠的影响,采用相同的语言描述方法,为患者进行评估量表的讲解,使患者更清晰地了解评估方法,更好地进行术后评估。

分别以术后 24 h 内和 24 ~ 48 h 内疼痛评估最高分统计,计算出各时间段内静息状态疼痛和功能活动状态下各组轻、中、重度疼痛发生率。

2.4.2 疼痛管理的达标率 基于《成人手术后疼痛处理专家共识》及加速康复外科相关指南推荐^[1-2, 4-5, 9-11],本研究将妇科手术患者术后疼痛管理目标定为:①最大程度 ($NRS \leq 3$) 的镇痛;②无或仅有易于忍受的轻度不良反应;③疼痛不影响患者睡眠;④药物解救次数 ≤ 3 次。收集试验组和对照组达到该疼痛管理目标患者例数,统计达标、未达标患者例数及概率,比较两组达标率。达标率 (%) = (达标例数 / 总例数) $\times 100\%$ 。

2.4.3 安全性指标 收集统计试验组和对照组患者不良反应发生例数、概率和总发生率,比较两组不良反应发生情况是否存在差异。不良反应发生率 (%) = (不良反应发生例数 / 总例数) $\times 100\%$ 。

2.4.4 经济学评定方法 研究中所涉及的成本主要包括直接成本、间接成本和隐性成本。由于回顾性分析中后两者 (如误工费、陪护费、家属往返交通费、精神损失费等) 有很多不确定因素,因此本研究仅纳入直接医疗成本,包括镇痛药品的直接药物成本 ($C_{药}$);电子微泵费用 ($C_{辅}$): 电子自控微泵注射;不良反应处理费用 ($C_{附}$): 根据

国家药品不良反应监测中心“药品与不良反应关联的五标准”，评估镇痛药物导致的不良反应，统计对症处理产生的额外费用（如头晕、恶心、呕吐、皮疹等不良反应处理产生的相关费用）。总成本（元）=药品成本（ $C_{药}$ ）+电子微泵费用（ $C_{辅}$ ）+不良反应处理费用（ $C_{附}$ ）。材料费、检查费、住院费用等因组间差别较小，不纳入成本计算。

计算各组术后镇痛成本、成本/效果比（ C/E ）、增量成本-效果比（ $\Delta C/\Delta E$ ）等。

2.5 统计学处理

采用 Excel 2016 对数据进行记录整理，SPSS

23.0 软件进行统计学分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 进行比较；两组之间的均数差异使用独立样本的 t 检验。对计量资料统计占比或发生率，差异使用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 患者基本信息

收集手术患者 440 例，对照组 218 例，试验组 222 例，基本信息见表 1。入组患者年龄、体质质量指数（BMI）、美国麻醉医师协会（ASA）分级差异均无统计学意义，病历情况基本一致，具有可比性，见表 2。

表 2 两组患者基本信息

Tab 2 Basic information of patients between two groups

组别	病例数	平均 年龄/岁	BMI/ ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$)	ASA 分级/例			宫颈锥 切术/例	阴道及 外阴病 灶切除 术/例	卵巢/输卵管 病灶切除手术 和/或盆腔粘 连松解术/例	子宫全 切除 术/例	子宫及双附 件切除和/ 或盆腔淋巴 清扫术/例	开腹手 术/例	平均住院 时间/d
				I	II	III							
对照组	218	56.8±12.74	16.8±9.7	148	69	1	30	23	53	55	43	14	4.3±2.77
试验组	222	54.9±13.43	18.2±8.46	150	70	2	32	25	52	57	44	12	4.2±2.80
t/χ^2	0.56	0.88	1.13		1.17		2.13	1.24	4.29	2.98	3.13	1.30	0.77
P	0.78	0.97	0.68		0.87		0.98	0.78	0.73	0.92	0.91	0.95	0.98

3.2 有效性指标

3.2.1 镇痛效果比较

与对照组相比，试验组术后

24 h 内静息状态、功能活动（翻身/坐起/下床）NRS 评分差异无统计学意义，结果见表 3。

表 3 两组间妇科术后疼痛发生情况

Tab 3 Incidence of postoperative pain in gynecology between two groups

组别	病例 数	术后 24 h 内疼痛发生率/%						术后 48 h 内疼痛发生率/%					
		静息状态 NRS 评分			功能活动 NRS 评分			静息状态 NRS 评分			功能活动 NRS 评分		
		3 分以下	4~6 分	7~10 分	3 分以下	4~6 分	7~10 分	3 分以下	4~6 分	7~10 分	3 分以下	4~6 分	7~10 分
试验组	222	93.7	6.3	0	90.2	9.3	0.5	99.1	0.9	0	98.2	1.8	0
对照组	218	94.8	5.2	0	93.1	6.9	0	98.2	1.8	0	96.8	3.2	0
χ^2		8.286	5.534	2.227	5.183	2.321	1.616	9.81	0.188	5.83	17.3	3.86	3.87
P 值		0.0226	0.162	0.447	0.754	0.528	0.349	0.807	0.665	0.954	0.997	0.059	0.931

3.2.2 睡眠情况比较 患者术后睡眠情况随着术后时间延长自身机能的恢复逐渐好转，睡眠情况 A 等级患者比率逐渐增多。数据显示术后 6、24、48 h 试验组 A 等级患者比例均显著高于对照组，结果见表 4。

3.2.3 镇痛达标率 临床药师主导的妇科术后分级镇痛管理模式患者达到本研究术后疼痛控制目标的比例明显多于对照组（90.6% vs 81.2%， $P < 0.05$ ），结果见表 5。

3.3 安全性指标

妇科术后患者不良反应发生率普遍偏高，主要表现为恶心、呕吐、头晕头痛。但试验组不良反应总发生率低于对照组（41.4% vs 81.2%， $P < 0.05$ ）。结果详见表 6。

3.4 经济学指标

3.4.1 成本-效果分析

成本效果分析是为寻找

表 4 两组间术后不同时间段患者睡眠情况 [n(%)]

Tab 4 Sleep status of patients at different postoperative time periods between the two groups [n(%)]

分组	睡眠情况	6 h	24 h	48 h
对照组 ($n = 218$)	A	146 (67.0)	187 (85.7)	200 (91.7)
	B	71 (32.6)	30 (13.6)	18 (8.3)
	C	1 (0.4)	1 (0.4)	0 (0.0)
试验组 ($n = 222$)	A	196 (88.2)	213 (95.9)	220 (99.1)
	B	25 (11.2)	9 (4.1)	2 (0.9)
	C	1 (0.6)	0 (0.0)	0 (0.0)
χ^2		32.54	38.37	72.34
P		0.000 12	0.0053	0.0048

在镇痛效果相同时成本最低的方案，即在成本和效果之间找到最佳的平衡点。每位患者的药品费用（元）=药品某规格剂量价格（元）×治疗疗程用药总数量。本研究中试验组人均术后镇痛成

表 5 临床药师主导的妇科术后分级镇痛管理模式
Tab 5 Clinical pharmacist led management model for postoperative graded analgesia in gynecology

项目	达标率 / %
对照组 (n = 218)	81.2
试验组 (n = 222)	90.6
χ^2	7.29
P	0.007

本为 (133.2±16.76) 元, 对照组人均术后镇痛成本为 (1196.2±25.07) 元, 差异具有统计学意义 (P < 0.0001)。以对照组为参照组, 计算试验组的 $\Delta C/\Delta E$ 为 -113.08, 临床药师主导的妇科术

表 6 不良反应发生情况 [n(%)]
Tab 6 Adverse reaction events [n(%)]

组别	不良反应类型				总计
	恶心	头晕头疼	呕吐	嗜睡	
对照组 (n = 218)	45 (20.1)	30 (13.3)	23 (10.2)	5 (2.4)	177 (81.2)
试验组 (n = 222)	144 (66.0)	107 (48.9)	79 (36.2)	28 (12.8)	92 (41.4)
χ^2	16.542	14.571	12.972	16.937	23.149
P	0.008	0.023	0.012	0.021	0.002

后分级镇痛管理模式具有绝对的成本 - 效果优势, 详见表 7。

表 7 两组间术后镇痛成本 - 效果分析
Tab 7 Cost effectiveness analysis of postoperative analgesia between two groups

组别	镇痛药物成本				镇痛药物成本 - 效果			
	药品成本 / 元	电子微泵 / 元	不良反应处理费用 / 元	总成本 / 元	平均成本 (C) / 元	镇痛达标率 (E) / %	C/E	$\Delta C/\Delta E$
对照组 (n = 218)	239 240.3	7760.0	5829.2	252 829.5	1196.2±25.07	81.2	1473.20	
试验组 (n = 222)	39 988.4	892.4	1764.1	42 644.9	133.2±16.76	90.6	147.02	-113.08
P 值	< 0.0001							

3.4.2 敏感性分析 药物经济学研究中所用的变量通常较难准确地测量出来, 应用的数据具有不确定性和潜在的偏倚, 所以有必要进一步进行敏感度分析, 以验证不同假设条件对分析结果的影响。本研究两组治疗方案的总成本为 295 474.4 元, 其中药品成本 ($C_{药}$) = 279 228.7 元, 占总费用的 94.5%; 电子微泵成本 8652.4 元, 占总费

用的 2.9%; 不良反应处理费用 ($C_{附}$) = 7593.3 元, 占总费用的 2.5%。可见药品成本 ($C_{药}$) 是对分析结果影响最大的因素, 故主要对其进行敏感性分析。假设药价价格下降 15%, 而有效率不变, 结果两种镇痛方案成本 - 效果分析受参数影响不大, 临床药师主导的妇科术后分级镇痛管理模式成本 - 效果仍具有绝对优势, 详见表 8。

表 8 两组间的成本 - 效果敏感度分析
Tab 8 Cost effectiveness sensitivity analysis between two groups

组别	镇痛药物成本				镇痛药物成本 - 效果			
	药品成本 / 元	电子微泵 / 元	不良反应处理费用 / 元	总成本 / 元	平均成本 (C) / 元	疼痛缓解率 (E) / %	C/E	$\Delta C/\Delta E$
对照组 (n = 218)	203 354.3	6596.0	4954.8	214 905.1	1016.77±23.08	81.2	1252.2	
试验组 (n = 222)	33 990.1	758.5	1499.5	36 248.2	113.22±12.03	90.6	124.9	-96.12
P 值	0.0076							

4 讨论

4.1 临床药师主导整合的妇科术后分级镇痛管理模式的建立

在妇科临床实践中, 术后镇痛作为提升患者恢复质量、减少术后并发症的重要环节^[1], 其重要性不言而喻。然而, 长期以来, 妇科术后镇痛领域面临着高质量循证证据的匮乏, 导致临床实践中“一刀切”式的术后镇痛方案难以适应不同手术类型及患者个体差异, 进而影响了镇痛效果与安全性。

鉴于上述挑战, 临床药师作为药学服务的重要力量^[12-14], 积极承担起优化妇科术后镇痛管理的责任。通过深入的院内术后镇痛情况调查研究,

结合数据分析、技术策划及行政支持, 我们创新性地提出了妇科术后患者分级镇痛管理策略:

针对不同手术类型制订详细的分级镇痛管理模式: 对于疼痛程度较轻的宫颈锥切术及宫腔镜手术患者, 倡导在密切观察下采取非药物性镇痛措施, 必要时可口服镇痛药物, 以减少不必要的药物干预; 对于子宫切除术、附件囊肿剥除术及附件切除术等中度疼痛手术患者, 推荐使用 NSAIDs 如氟比洛芬酯注射液等作为首选镇痛药物, 以平衡镇痛效果与不良反应; 而对于恶性肿瘤根治术等重度疼痛手术患者, 则采取以 NSAIDs 为基础, 联合阿片类药物的多模式镇痛方案, 并辅以镇痛泵持续给药, 以有效控制疼

痛,同时加强不良反应的监测与防治。

本模式的建立,不仅借鉴了癌症疼痛管理的先进理念与阶梯式镇痛方法在临床的成功实践^[15-16],还充分考虑了妇科手术疼痛的多因素性质及NSAIDs为基础的多模式镇痛理念的普及趋势。尽管目前尚缺乏直接证明该策略在妇科术后镇痛中有效性的I级证据,但其基本原则为妇科手术疼痛管理提供了一个科学、合理且易于操作的框架,为临床药师在疼痛管理领域的进一步探索提供了有力支撑。

4.2 妇科术后分级镇痛管理的药学价值

本研究通过临床药师主导整合的妇科术后镇痛管理模式的建立与实践,不仅确保了治疗效果,更在医疗资源成本上实现了显著的节约。数据显示,术后镇痛成本从人均(1196.2±25.07)元大幅降至(133.2±16.76)元,成本节约效果显著,同时,患者不良反应发生率的明显下降,不仅提升了医疗服务质量,也显著改善了患者的诊疗舒适度,进一步彰显了药学服务的临床价值。

在DRG/DIP支付方式改革的背景下,药品成本的控制成为医院管理的重要议题。临床药师通过主导整合妇科术后疼痛管理,将药品固定成本转化为高质量的医疗服务,不仅减少了药学信息检索时间,提高了药学决策效率,还通过减少不良反应的发生,实现了医疗成本的降低和服务质量的提升。

4.3 妇科术后分级镇痛管理模式的思考

本研究中,试验组患者相较于对照组在不良反应发生率方面显著降低,这一结果可能与试验组镇痛方案中阿片类药物应用较少有关。然而,本研究中不良反应发生率高于其他研究报道^[12, 17],这提示妇科术后镇痛管理仍存在一定的优化空间。

深入分析发现,恶心、呕吐为不良反应的主要类型,其高发生率可能与妇科患者群体的特殊性 & 手术操作、麻醉药物使用等多重因素有关。女性本身及腹腔手术操作均为恶心、呕吐的独立风险因素^[10],而术中麻醉药物的使用则可能进一步加剧这一不良反应。因此,未来的研究和实践应更加注重术前预防措施的实施,如预防性使用抗恶心、呕吐药物,以及术中合理控制阿片类药物的剂量,以从源头上防止不良反应的发生。

此外,本研究主要聚焦于妇科手术术后的镇痛管理,对于术前药物应用及相关预防措施的关注尚显不足。这提示我们在构建妇科围术期疼痛管理体系时,也要关注术前阶段,实现全流程的疼痛管理覆盖。

综上所述,临床药师主导整合的妇科术后分级镇痛管理模式,不仅实现了术后镇痛效果与成本的双重优化,还为公立医院在“药品零加成”及医保支付模式改革背景下的高质量发展提供了新的思路。未来,随着临床药师团队的不断壮大和专业能力的提升,必将在医疗高质量发展的道路上发挥不可替代的作用。

参考文献

- [1] 中华医学会妇产科学分会加速康复外科协作组. 妇科手术加速康复的中国专家共识[J]. 中华妇产科杂志, 2019, 54(2): 73-39.
- [2] 肖洁, 刘志强, 俞卫锋. 加速康复外科理念下妇科手术围术期疼痛的管理及优化[J]. 实用妇产科杂志, 2021, 37(2), 87-89.
- [3] 雷伟, 赵路, 李亚丽, 等. DRG/DIP支付模式下临床药师在剖宫产术后合理应用镇痛药物中的作用探讨[J]. 中国合理用药探索, 2023, 20(6): 108-115.
- [4] 李慧, 饶跃峰. 对2016年版美国《术后疼痛管理指南》的药学解读[J]. 中国药房, 2017, 35(28): 5007-5011.
- [5] 临床药师术后疼痛管理指引[J]. 今日药学, 2019, 29(4): 217-227.
- [6] 席晓宇, 姚东宁, 黄元楷, 等. 我国三级医院临床药学服务现状及问题研究(一): 研究简介及临床药学服务基本条件分析[J]. 中国药学杂志, 2017, 52(19): 1746-1752.
- [7] 李静, 王旋, 蔡永桥, 等. 新医改形式下的我院药事管理工作实践与DIP政策下的思索[J]. 中南药学, 2023, 21(1): 275-278.
- [8] 霍丹, 游一中. 英美药学高等教育及临床药师体系对我国临床药学工作的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(7): 870-872.
- [9] 中华医学会麻醉学分会. 成人手术后疼痛处理专家共识[J]. 临床麻醉学杂志, 2017, 33(9): 911-917.
- [10] 中国加速康复外科围手术期非甾体抗炎药临床应用专家共识[J]. 中华普通外科杂志, 2019, 34(3): 283-288.
- [11] 上海市医学会麻醉科专科分会, 上海市医学会普通外科专科分会, 楼文晖, 等. 普通外科围手术期疼痛管理上海专家共识(2020版)[J]. 中国实用外科杂志, 2021, 41(1): 31-37.
- [12] 谢菡, 薛敏, 丁艺, 等. 临床药师参与胆道日间手术疼痛管理工作模式与成效[J]. 中国药学杂志, 2021, 56(9): 770-775.
- [13] 黄瀚, 李仕剑, 刘世坤. 临床药师在医疗机构药学服务过程中的服务策略探讨[J]. 中国合理用药探索, 2020, 17(11): 19-22.
- [14] 于慧斌. 临床药师在提高医联体临床药学服务能力中的作用探讨[J]. 中华医院管理杂志, 2020, 36(8): 14-15.
- [15] 覃旺军, 任夏洋, 李然, 等. 癌症疼痛管理药学专家共识[J]. 中国疼痛医学杂志, 2019, 25(11): 801-807.
- [16] 苗杨, 雷伟, 张金良, 等. 阶梯性镇痛在妇科腹腔镜术患者中的应用效果[J]. 河南医学研究, 2024, 33(7): 1228-1231.
- [17] 谢菡, 马正良, 仇毓东, 等. 临床药师参与术后患者自控镇痛泵管理的工作模式与成效[J]. 中国药学杂志, 2019, 54(19): 1622-1625.

(收稿日期: 2024-07-17; 修回日期: 2024-08-20)

基于加权逼近理想解排序法的肠外营养用药合理性评价

赵晓晓¹, 刘智化¹, 祝子明¹, 李海霞¹, 宁丽娟^{2*} (1. 皖南医学院附属宣城医院, 安徽 宣城 242000; 2. 中国科学技术大学附属第一医院药剂科, 合肥 230001)

摘要: **目的** 评价某院 2023 年重症医学科全年肠外营养 (PN) 医嘱, 并对其合理性进行分析。**方法** 制订 PN 医嘱评价细则, 采用加权逼近理想解排序 (TOPSIS) 法对该院 PN 病历进行合理性评价。**结果** 227 份病历中, C_i 最高为 100.00%, 最低为 46.82%。 C_i 为 100.00% 的 43 例 (18.94%), $80\% \leq C_i < 90\%$ 的 49 例 (21.59%), $70\% \leq C_i < 80\%$ 的 63 例 (27.75%), $60\% \leq C_i < 70\%$ 的 61 例 (26.87%), $< 60\%$ 的 11 例 (4.85%)。不合理用药主要表现在 PN 中添加未经验证相容性的药物 179 例 (78.85%)、多种微量元素剂量不达标 94 例 (41.41%)、非蛋白热氮比不合理 63 例 (27.75%)、丙氨酰谷氨酰胺占全部氨基酸占比 34 例 (14.98%)、存在禁忌证用药 17 例 (7.49%)、遴选药品的适宜性不合理 15 例 (6.61%)、糖脂比不适宜 14 例 (6.17%)。**结论** 基于加权 TOPSIS 法实施 PN 点评较为科学, 该院 PN 医嘱的临床应用基本合理, 但仍需加强管控。

关键词: 加权逼近理想解排序法; 肠外营养; 用药合理性评价

中图分类号: R96, R95 **文献标识码:** A

文章编号: 1672-2981(2025)04-1160-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.044

Evaluation of rationality of parenteral nutrition based on TOPSIS

ZHAO Xiao-xiao¹, LIU Zhi-hua¹, ZHU Zi-ming¹, LI Hai-xia¹, NING Li-juan^{2*} (1. *The Affiliated Xuancheng Hospital of Wannan Medical College, Xuancheng Anhui 242000*; 2. *Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China (Anhui Provincial Hospital), Hefei 230001*)

Abstract: Objective To evaluate the annual order of parenteral nutrition (PD) in intensive care department of a hospital in 2023 and determine its rationality. **Methods** The evaluation criteria of parenteral nutrition (PN) medical orders were established, and the rationality of PN medical order was evaluated by weighted approaching ideal solution ranking (TOPSIS). **Results** The highest C_i was 100.00% and the lowest C_i was 46.82% in 227 records. Totally 43 cases (18.94%) had C_i 100.00%, 49 cases (21.59%) had $80\% \leq C_i < 90\%$, 63 cases (27.75%) $70\% \leq C_i < 80\%$, 61 cases (26.87%) $60\% \leq C_i < 70\%$, and 11 cases (4.85%) $< 60\%$. The main manifestations of irrational drug use included addition of drugs without proven compatibility in PN [179 cases (78.85%)], dose of various trace elements failing to reach the standard [94 cases (41.41%)], unreasonable non-protein heat nitrogen ratio [63 cases (27.75%)], alanyl glutamine accounting for the total amino end [34 cases (14.98%)], and contraindications 17 cases (7.49%). The suitability of selected drugs was not reasonable in 15 cases (6.61%), and the ratio of sugar to lipid was in appropriate in 14 cases (6.17%). **Conclusion** The evaluation of PN use based on weighted TOPSIS method is scientific, and the PN medical orders in this hospital is basically reasonable.

Key words: weighted approaching ideal solution ranking; parenteral nutrition; evaluation of rational drug use

重症患者由于病情复杂, 炎症 / 免疫应答、氧化应激等因素加速营养物质分解代谢, 使得患者普

遍存在营养不足。重症患者因很少具备经口进食的能力或存在肠内营养 (EN) 禁忌证或 EN 不能满足

基金项目: 宣城市卫生健康科研项目 (No.XCWJ2023011)。

作者简介: 赵晓晓, 女, 主管药师, 主要从事肠外肠内营养研究, email: 837693873@qq.com * **通信作者:** 宁丽娟, 女, 副主任药师, 主要从事临床药学研究, email: ninglijuan@126.com

患者需求,此时可行肠外营养(PN)治疗。PN作为一种营养支持方式是重症医学科营养治疗的重要手段,临床应用十分普遍。2019 年我国将 PN 药品列入高警示药品目录中^[1]。PN 使用不当可能会对患者造成严重的影响,甚至死亡。加权逼近理想解排序(TOPSIS)法通过计算目标与理想解间的欧氏距离来衡量被评价对象的优劣,越接近理想,评价对象就越好^[2]。加权 TOPSIS 法目前已开始应用于抗菌药物与抗肿瘤药物的评价领域^[3-4],尚未有其在 PN 中的应用研究。本研究通过制订 PN 医嘱合理性评价细则,采用加权 TOPSIS 法评价 PN 临床应用的合理性,以期临床合理用药提供参考。

1 资料和方法

1.1 一般资料

利用 PASS 系统抽取皖南医学院附属宣城医院重症医学科 2023 年 1—12 月使用 PN 的归档病历 227 例,弃去无效病例,以此为研究对象。

1.2 建立 PN 医嘱合理性评价细则

依据 PN 相关药物,我院涉及的药品为脂肪乳氨基酸(17)葡萄糖(11%)注射液、葡萄糖注射液

(5%、10%、50%)、复方氨基酸注射液(18AA-Ⅱ)、复方氨基酸注射液(18AA-V Ⅱ)、复方氨基酸注射液(3AA)、丙氨酰谷氨酰胺注射液、脂肪乳注射液、中/长链脂肪乳、多种油脂肪乳注射液(C6-24)、氯化钠注射液、氯化钾注射液、硫酸镁注射液、葡萄糖酸钙注射液、多种微量元素注射液、脂溶性维生素注射液、胰岛素注射液,共 18 种。以药品说明书为基础,结合我院实际情况及《临床药物治疗学》营养支持治疗分册^[5]、《肠外肠内营养临床药学实践共识(2022 年版)》^[6]、《肠外营养临床药学共识(第二版)》^[7]、《规范肠外营养液配置》^[8]、欧洲临床营养和代谢协会^[9]及美国肠外肠内营养协会肠外肠内营养相关指南^[10]等,针对 PN 处方涉及的常见不合理要点,从药品遴选、禁忌证、处方配比等方面确定了 13 个评价指标,初步建立了基于加权 TOPSIS 法的 PN 的合理性评价细则,征求院内重症医学科、普外科、营养科高级职称医师(各 1 名)及临床药师(3 名)意见并完善细则,参照评价细则对 227 份病历 PN 的具体指标进行合理性分析。细则详见表 1。

表 1 PN 医嘱合理性评价细则

Tab 1 Rules for the rationality evaluation of PN medical orders

评价指标	评价依据	评价结果
遴选药品适宜性	①肝病适用型:复方氨基酸注射液(3AA)、复方氨基酸注射液(6AA);②肾病适用型:0;符合①和②和③和④;1:复方氨基酸注射液(9AA);③创伤适用型:复方氨基酸注射液(18AA-VII);④对于肝功能异常的患者建议选择中/长链脂肪乳等	不符合①或②或③或④
糖脂比	①糖脂比是指肠外营养液中葡萄糖与脂肪乳供能之比,通常范围为 7:3~6:4;②特殊情况下如呼吸衰竭或肿瘤患者等可增加至 5:5;③脂肪比例(占非蛋白热量)小于 60%	0:符合①和②和③;1:①和②和③
非蛋白热氮比	①通常认为 100:1~200:1 为合理	0:符合①;1:不符合①
氨基酸终浓度	①≥2.5%	0:符合①;1:不符合①
葡萄糖终浓度	①3.3%~23%	0:符合①;1:不符合①
丙氨酰谷氨酰胺注射液	①不应超过 20%	0:符合①;1:不符合①
占全部氨基酸比值		
钾离子浓度	①经外周静脉补钾时,输液中的含钾量≤45 mmol·L ⁻¹	0:符合①;1:不符合①
一价阳离子浓度	①<150 mmol·L ⁻¹	0:符合①;1:不符合①
二价阳离子浓度	①<10 mmol·L ⁻¹	0:符合①;1:不符合①
添加未见验证相容性的药物(维生素 C 注射液)	①不推荐加入维生素 C 注射液	0:符合①;1:不符合①
多种微量元素注射液	①成人常规剂量 1 支(10 mL)	0:符合①;1:不符合①
脂溶性维生素	①不超过 1 支	0:符合①;1:不符合①
禁忌证用药	①血流动力学不稳定;②终末期肝肾衰竭;③胃肠道功能正常能经口饮食或肠内营养者;④严重凝血障碍、急性心肌梗死、中风、急性血栓栓塞、休克状态;⑤休克和严重脂	0:符合①和②和③和④和⑤和⑥和⑦;1:不符合①或②或③或④或⑤或⑥或⑦
	⑥严重肾功能不全(肌酐清除率<25 mL·min ⁻¹)或严重肝功能不全患者禁用;⑦严重胆汁淤积患者(血清总胆红素水平>140 μmol·L ⁻¹)禁用多种微量元素	

注(Note):0 为合理,1 为不合理(0 refers to rationality, and 1 refers to irrationality)。

1.3 建立调查表格

PN 医嘱合理用药评价表内容包括患者入院基本信息(住院号、姓名、性别、年龄、入院诊断等)和 13 项评价指标,用 N₁~N₁₃ 表示,临床药师根据评价细则对每份病历中的各项指标进行评价。建

立重症患者 PN 营养合理性评价的数据矩阵,并给结果赋分,合理为 10 分,不合理为 0 分,对 227 份病历的评价结果进行统计并录入 Excel 表。

1.4 计算指标的相对权重

AHM 赋权法^[11-12]确定各评价指标的相对权重。

本次共拟定 13 个指标。 N_{ij} 表示第 i 个指标对第 j 个指标的相对重要性, 两者满足 $\mu_{ij} + \mu_{ji} = 1$, 且 μ_{ij} 、 μ_{ji} 均 ≥ 0 。构造判断矩阵, 当属性矩阵满足一致性评价时, 利用公式 1 计算各指标的相对权重。

$$W_c(j) = 2/[n(n-1)]\sum_{j=1}^m \mu_{ij} \quad \text{公式 1}$$

1.5 加权 TOPSIS 法进行评价

应用加权 TOPSIS 法计算各病历与最优方案和最劣方案的差值 (D_i^+ 和 D_i^-), 分别用公式 2 与公式 3 计算。 C_i 表示病历与最优方案的相对接近度, 采用公式 4 计算。 C_i 越接近 100%, 表示评价对象越接近最优水平。参照相关研究接近度的评价标准^[3, 13], $C_i \geq 80\%$ 评价为合理, $60\% \leq C_i < 80\%$ 评价为基本合理, $C_i < 60\%$ 评价为不合理。

$$D_i^+ = \sqrt{\sum_{j=1}^m [W_j(Z_{ij} - Z_j^+)]^2} \quad \text{公式 2}$$

$$D_i^- = \sqrt{\sum_{j=1}^m [W_j(Z_{ij} - Z_j^-)]^2} \quad \text{公式 3}$$

$$C_i = D_i^- / (D_i^+ + D_i^-) \quad \text{公式 4}$$

2 结果

2.1 一般资料

227 份病历中男 147 例 (64.76%)、女 80 例 (35.24%), 年龄 (70.69 ± 15.20) 岁, 疾病类型复杂, 常合并多种疾病。

2.2 不合理用药情况及评价指标相对权重系数

采用加权 TOPSIS 法对 227 例使用 PN 的医嘱进行评价, 不合理用药主要表现在遴选药品不适宜、糖脂比不适宜、非蛋白热氮比不适宜、氨基酸终浓度不适宜、葡萄糖终浓度不适宜、钾离子浓度超量、二价阳离子浓度超量、一价阳离子浓度超量、添加未见验证相容性的药物、丙氨酰谷氨酰胺注射液占全部氨基酸占比、多种微量元素注射液剂量不合理、存在禁忌证用药。各评价指标相对权重系数见表 2。

表 2 227 份病历中不合理用药情况及评价指标相对权重系数
Tab 2 Irrational drug use in 227 medical orders and the relative weight coefficient of evaluation indicators

评价指标	不合理例次 [n (%)]	相对权重系数
遴选药品的适宜性	15 (6.61)	0.1036
糖脂比	14 (6.17)	0.0737
非蛋白热氮比	63 (27.75)	0.0607
氨基酸终浓度	2 (0.88)	0.0791
葡萄糖终浓度	1 (0.44)	0.0812
钾离子浓度	17 (7.19)	0.0810
二价阳离子浓度	0 (0)	0.0953
一价阳离子浓度	2 (0.88)	0.0780
添加未见验证相容性的药物 (维生素 C 注射液)	179 (78.85)	0.0784
丙氨酰谷氨酰胺注射液占全部氨基酸占比	34 (14.98)	0.0662
多种微量元素注射液	94 (41.41)	0.0502
禁忌证	17 (7.49)	0.1066
脂溶性维生素注射液	0 (0)	0.0496

2.3 加权 TOPSIS 法评价结果

227 份病历加权 TOPSIS 法评价结果显示, C_i 最高为 100.00%, 最低为 46.82%, 详见表 3。

表 3 227 份病历相对接近度 (C_i) 情况
Tab 3 Relative proximity (C_i) of 227 cases

C_i	例数	构成比 /%
$\geq 80\%$	92	40.53
60% ~ 80%	124	54.62
$< 60\%$	11	4.85

3 讨论

3.1 加权 TOPSIS 法合理性评价

采用加权 TOPSIS 法对 227 份使用 PN 的医嘱的合理性进行评价, 对 $C_i \geq 80\%$ 的合理用药病历点评发现, 存在的问题为 PN 处方中添加未经验证相容性的药物 (维生素 C 注射液); 对 $60\% \leq C_i < 80\%$ 的基本合理病历点评发现, 主要问题为添加未经验证相容性的药物 (维生素 C 注射液)、糖脂比不适宜、热氮比不适宜、丙氨酰谷氨酰胺注射液占全部氨基酸占比超量、多种微量元素注射液剂量不适宜, 部分病历涉及 2 ~ 3 个问题; 对 $C_i < 60\%$ 的不合理用药病历点评发现, 涉及 4 ~ 6 项不合理问题, 包括遴选药品不适宜、添加未经验证相容性的药物 (维生素 C 注射液)、糖脂比不适宜、热氮比不适宜、丙氨酰谷氨酰胺注射液占全部氨基酸占比超量、多种微量元素注射液剂量、存在禁忌证用药等。

3.2 PN 不合理用药分析

3.2.1 糖脂比不合理 葡萄糖和脂肪乳是全肠外营养 (TNA) 中最主要的两种能量来源。糖脂比是指 TNA 中葡萄糖与脂肪乳供能之比。葡萄糖与脂肪乳需要按一定的比例补充, 通常 50% ~ 70% 的葡萄糖和 30% ~ 50% 的脂肪乳是住院患者供能的适宜比例^[7]。依据专家共识建议脂肪占非蛋白热量比 $\leq 60\%$, 以免发生脂肪廓清障碍^[6]。脂肪含量过高, 可能导致脂质过度代谢, 继而易引起酮症酸中毒。本次点评中有 14 例病例糖脂比不符合要求, 脂肪乳占比大于 60%。

3.2.2 热氮比不合理 氨基酸是 TNA 中不可缺少的一部分, 专家共识明确氨基酸浓度 $\geq 2.5\%$, 可维持 TNA 中的脂肪乳的稳定^[7]。除脂肪乳氨基酸 (17) 葡萄糖 (11%) 注射液 1440 mL 中氨基酸终浓度未达到 2.5%, 未能达标外, 本次医嘱点评中氨基酸的终浓度未达标的有 2 例, 其中 1 例为脂肪乳氨基酸 (17) 葡萄糖 (11%) 注射液 1440 mL 中添加 10% 葡萄糖注射液 500 mL; 另外 1 例为使用复方氨基酸注射液 (3AA) 作为“全合一”PN 中的唯一氮源, 最终导致氨基酸浓度过低。

3.2.3 丙氨酰谷氨酰胺注射液 谷氨酰胺是人体氨基酸之一, 也是 PN 的重要组成部分。当机体处于全身炎症反应、创伤及大手术等危重状态时, 谷氨酰胺参

与多种应激反应过程,自身合成的谷氨酰胺无法满足机体所需,需额外补充^[14]。丙氨酰谷氨酰胺注射液说明书明确其量不应超过全部氨基酸供给量的 20%,占比大于 20% 的共 34 例,其中大于 30% 的 18 例(52.94%)。专家共识指出丙氨酰谷氨酰胺注射液在全部氨基酸的比例,可保持在 20%~30%^[15]。依此标准,超量现象依然存在:有 6 例医嘱为脂肪乳氨基酸(17)葡萄糖(11%)注射液 1440 mL 中添加 20 g 丙氨酰谷氨酰胺注射液(规格为 50 mL/10 g)。脂肪乳氨基酸(17)葡萄糖(11%)注射液中含有 34 g 氨基酸,在不添加其他氨基酸的情况下,最多可加入 10 g 丙氨酰谷氨酰胺注射液。临床加入 20 g,即存在超量现象。丙氨酰谷氨酰胺注射液说明书明确提到严重肾功能不全或严重肝功能不全的患者禁用。227 例患者中有 16 例严重肾功能不全及 1 例严重肝功能不全的患者使用了丙氨酰谷氨酰胺注射液。临床在使用 PN 时需结合患者的肝肾功能情况,谨慎添加丙氨酰谷氨酰胺注射液。

3.2.4 电解质、阳离子浓度超限 氯化钾注射液说明书提到,一般用法钾浓度不超过 $45 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。此次点评中共有 17 例不符合要求,其中 12 例为脂肪乳氨基酸(17)葡萄糖(11%)注射液 1 440 mL 加用了 40 mL 10% 氯化钾注射液。脂肪乳氨基酸(17)葡萄糖(11%)注射液 1440 mL 中含有钾 24 mmol,10 mL/1 g 的氯化钾注射液中含钾约 13.4 mmol。添加 4 支氯化钾注射液浓度超出了说明书限度。钾离子超量可能引起患者心率减慢、心律失常甚至心搏骤停,在临床使用时一定要严格把控。为保证 PN 的稳定性,要严格限制电解质的用量,一般推荐一价阳离子浓度 $< 150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,二价阳离子浓度 $< 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[6]。此次医嘱中共有 2 例一价阳离子浓度超限,1 例为 $159 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,1 例为 $218 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.2.5 维生素及微量元素相关问题 维生素和微量元素是机体有效利用葡萄糖、脂肪乳进行供能及蛋白质合成的基础^[16]。TNA 中添加其他药品时不得超出肠外营养液组成成分范围^[8]。维生素 C 化学性质不稳定,易降解为草酸,与钙制剂形成草酸钙沉淀^[5],因此不推荐额外补充维生素 C 注射液^[17]。此次 227 例医嘱中,共有 179 例 TNA 中添加了维生素 C 注射液。多种微量元素注射液剂量成人推荐剂量为每日 10 mL^[18],本研究中有 94 例添加了多种微量元素注射液,其中 90 例添加 2 mL,4 例添加了 4 mL,均不符合日剂量需求。

3.3 加强 PN 合理应用的改进措施

针对该院 PN 不合理使用的具体原因,为规范 PN 的合理使用,我院制订的干预措施如下:临床药师去临床培训,加强医务人员对 PN 制剂使用的学习;每月组织临床药师对 PN 的医嘱进行专项点评,并反馈给临床医师,及时改正;对缺少水溶性维生素的情况及时报上级领导,避免因缺药导致的临床

不合理使用维生素 C 问题。

3.4 小结

本研究建立的 PN 医嘱合理性评价细则可用于 PN 药物的合理性评价,对规范 PN 的使用具有一定的参考价值,为临床规范 PN 使用提供参考。

参考文献

- [1] 中国药学会医院药专业委员会. 高警示药品推荐目录(2019 版) [EB/OL]. [2019-07-08] (2024-05-06). Available at <https://www.cpa.org.cn/in-dex.php?do=info&cid=75011>.
- [2] 毛新妍, 闫岩, 任淑珍, 等. 基于加权 TOPSIS 法的注射用盐酸万古霉素药物利用评价 [J]. 临床和实验医学杂志, 2023, 22 (16): 1762-1766.
- [3] 李宇, 冯晓俊, 王运红, 等. 基于加权逼近理想解排序法的卡瑞利珠单抗用药合理性评价 [J]. 中国药业, 2024, 33 (5): 10-14.
- [4] 韩兆欢, 赵兴辉, 安琪, 等. 基于加权逼近理想解排序法建立儿童注射用伏立康唑的药物利用评价细则 [J]. 儿科药理学杂志, 2024, 30 (2): 10-13.
- [5] 梅丹, 于健春. 临床药物治疗学 - 营养支持治疗分册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2016.
- [6] 曾英彤, 周婧. 肠外肠内营养临床药学实践共识 (2022 年版) [J]. 今日药学, 2023, 33 (6): 414-421.
- [7] 肠外营养临床药学共识 (第二版) [J]. 今日药学, 2017, 27 (5): 289-303.
- [8] 赵彬, 老东辉, 商永光. 规范肠外营养液配制 [J]. 协和医学杂志, 2018, 9 (4): 320-331.
- [9] Singer P, Blaser AR, Berger MM, et al. ESPEN guideline on clinical nutrition in the intensive care unit [J]. Clin Nutr, 2019, 38 (1): 48-79.
- [10] McClave SA, Taylor BE, Martindale RG, et al. Guidelines for the Provision and Assessment of Nutrition Support Therapy in the Adult Critically Ill Patient: Society of Critical Care Medicine (SCCM) and American Society for Parenteral and Enteral Nutrition (A.S.P.E.N.) [J]. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2016, 40 (2): 159-211.
- [11] Shen MX, Zeng N, Hu JX, et al. Weighted TOPSIS method and weighted RSR method in the construction of drug supervision and supply networks in rural areas of Hunan [J]. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2013, 38 (3): 301-306.
- [12] 刘继斌, 曲成毅, 王瑞花. 基于属性 AHM 的 TOPSIS 综合评价及其应用 [J]. 现代预防医学, 2006, 33 (10): 1862-1863.
- [13] 章登政, 姜琼, 张聪子, 等. 基于熵权 TOPSIS 法综合评价应用 PDCA 法管控抗菌药物的成效——以某三甲医院为例 [J]. 中国药师, 2024, 27 (2): 264-271.
- [14] 薛长勇, 江华, 陈伟, 等. 谷氨酰胺在危重症患者中临床应用的专家推荐意见 (节录) [J]. 营养学报, 2016, 38 (5): 421-426.
- [15] 朱明炜, 杨桦, 陈伟, 等. 静脉用丙氨酰-谷氨酰胺双肽临床应用专家共识 (2021) [J]. 中华临床营养杂志, 2021, 29 (4): 193-200.
- [16] 吴丽丽, 闭远旺, 李斌, 等. 我院 PIVAS 肠外营养医嘱合理性分析 [J]. 海峡药学, 2021, 33 (9): 153-156.
- [17] 丛明华. 肠外营养安全管理中国专家共识 [J]. 肿瘤代谢与营养电子杂志, 2021, 8 (5): 495-502.
- [18] 石汉平, 方玉, 吕全军, 等. 多种微量元素注射液临床应用中国专家共识 (2021) [J]. 肿瘤代谢与营养电子杂志, 2021, 8 (4): 366-373.

(收稿日期: 2024-05-06; 修回日期: 2024-08-07)

中药与临床

中药复方疗效预测的算法及应用

陈亚飞¹, 王国玉², 于亚南¹, 王忠^{1*} (1. 中国中医科学院, 中医临床基础医学研究所, 北京 100700; 2. 首都医科大学附属北京世纪坛医院, 北京 100038)

摘要: 随着网络药理学、生物信息学、机器学习以及定量药理学等交叉学科的飞速发展, 中药复方疗效预测等相关研究也不断深入。这些交叉学科技术不仅提供了更加精准化、系统化的中药复方研究框架, 为中药复方的优化与改良提供坚实的科学基础, 为临床上的精准医疗提供重要指导, 也为进一步提升新药研发与转化效率创造了无限可能。本文基于现有文献数据和技术手段, 综合分析并探讨网络药理学、生物信息学、机器学习以及定量药理学等先进技术对中药复方疗效预测的方法及其进展, 为中药复方的临床价值评估及进一步的优化和提升提供参考与启发。

关键词: 中药复方; 疗效预测; 网络分析

中图分类号: R284, R283 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)04-1164-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.045

Algorithms and applications of efficacy prediction of traditional Chinese medicine compound formulas

CHEN Ya-fei¹, WANG Guo-yu², YU Ya-nan¹, WANG Zhong^{1*} (1. *Institute of Basic Research in Clinical Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700*; 2. *Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038*)

Abstract: With the rapid development in interdisciplinary fields such as network pharmacology, bioinformatics, machine learning, and quantitative pharmacology, research on efficacy prediction of traditional Chinese medicine (TCM) compound formulas has made great progress. These interdisciplinary technologies not only provide a more precise and systematic research framework for TCM compound formulas but also offer a solid scientific foundation for the optimization and improvement of TCM compounds, providing important guidance and creating unlimited possibilities for new drug research and development. Based on the existing literature data and technical means, this paper comprehensively analyzes and discusses reviewed the methods and progress in network pharmacology, bioinformatics, machine learning, and quantitative pharmacology in efficacy prediction of TCM compound formulas, to provide reference for clinical value assessment, and optimization of TCM compound formulas.

Key words: traditional Chinese medicine compound formula; efficacy prediction; network analysis

中药复方(方剂)是中医临床治疗的主要应用形式和手段, 具有“天人一体”的整体调理策略和“因人制宜”的个性化治疗特点, 在临床实

践中积累了丰富的经验, 历经数千年的检验仍旧保持着旺盛的生命力。然而, 悠久的历史与丰富的经验也带了庞大的方剂体量, 比如《普济

基金项目: 中国中医科学院重大攻关项目 (No.CI2021A05033); 国家重大科技专项重大新药开发 (No.2017ZX09301059)。

作者简介: 陈亚飞, 男, 在读博士研究生, 主要从事中药临床药理研究, email: 252228312@qq.com *通信作者: 王忠, 男, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事中药临床药理研究, email: zhonw@vip.sina.com

方》一书便载有方剂 61 739 首, 经过国家批准的已上市中成药品种有 9000 余种^[1], 单是治疗冠心病的中成药便多达 266 种^[2], 仅仅是冠心病气滞血瘀证这一证型的中成药就有 60 余种。尽管丰富的中药复方对于疾病治疗提供了更多的方案, 但同时也给临床医师、患者以及药物研发者等带来了选择上的困扰, 如何准确评估中药复方的临床疗效成为一个关键问题。

传统的中医基础理论、组方配伍规则及临床经验虽然可以提供一定的借鉴和指导, 但是这些方法往往有较高的主观性, 缺少客观统计学的数据支持。随机对照临床试验 (randomized clinical trial, RCT) 是判断临床治疗效果的“金标准”^[3], 但其实施需要大量的资源投入, 包括人力、物力和时间。体内或体外的动物实验虽然可以用于探索药物的疗效作用, 但对于中医证型的动物模型属性判别仍然充满质疑。

随着生物大数据爆发的浪潮, 井喷式的生物信息和科学技术的迅猛进步带动了基因组学、蛋白组学、代谢组学等组学技术的蓬勃发展, 结合网络药理学、生物信息学、机器学习、定量药理学等现代科技手段, 中药复方的研究逐渐趋向于量化、系统化^[4]。这些前沿技术不仅能够揭示复方中药物成分与生物靶点之间复杂的相互作用, 预测复方的临床疗效, 为复方的优化与改良提供坚实的科学基础, 还可以大大提高新药开发和老药新用的研发效率, 缩短研发时间, 减少研发成本, 并为临床上的精准医疗提供重要指导。不同于西药的研究, 中药复方有着多组分、多靶点、多通路的作用特点, 繁杂的网状关系映射, 给研究者带来了巨大的挑战。当前, 研究者们已采用网络分析、机器学习、定量药理学等多种手段对中药复方进行疗效预测, 但这一领域尚缺乏系统性的综述和总结。本文旨在对中药及中药复方的临床疗效预测研究进行全面梳理, 以期对中药复方的临床疗效评估和进一步的研究提供参考和启发。

1 网络药理学分析

网络药理学作为一门融合了虚拟计算、高通量组学数据分析以及网络数据库检索等技术的交叉学科, 旨在通过构建药物作用的多层次网络映射并进行拓扑学与生物学分析, 深入探索药物的效果、毒性和代谢特性。从生物网络平衡的视角解读疾病的发展过程, 理解药物与生物体之间的相互作用, 从而引导新药的发现, 对药物研发的理念、策略和方法产生了深远的影响^[5]。在应用

网络药理学建立中药与疾病治疗关系的过程中, 主要手段是将中药成分的作用靶点与疾病相关基因进行关联分析^[6], 这种分析分为直接干扰和间接干扰两种方式。

1.1 直接干扰作用

直接干扰作用指的是当中药成分的作用靶点与疾病基因有重叠时, 表明中药成分对疾病基因产生了直接的干预效果。这种作用是许多网络药理学研究的基础, 并且通过体内外实验以及临床试验得到了验证。例如, 李兵等^[7]通过计算三种中成药的靶点模块与中风病表型网络的杰卡德相似性, 发现芪蛭通络胶囊在改善下肢运动功能方面相较于其他两种中成药表现出更高的优势, 这一发现随后也在临床试验中得到验证。之后, 在一项包括 13 个研究中心、622 名受试者的随机对照、适应性设计临床研究中, 从治疗第 4 周开始至发病第 90 日及治疗第 12 周, 芪蛭通络胶囊在改善下肢运动功能障碍方面均显著优于对照组和安慰剂组^[8]。杨洪军课题组^[9]开发的 TCMATCOV (TCM Anti COVID-19) 平台, 通过将中药的作用靶点与疾病基因重叠的蛋白视为干预蛋白, 计算网络变化值来评估中药的药效干扰, 使用网络平均最短路径长度、连接度中心性、平均连接度及紧密度中心性等指标来评估网络稳定性, 预测结果与中医临床实际用药间显示出良好的相关性, 进一步的研究利用 TCMATCOV 平台揭示了在治疗慢性阻塞性肺疾病以及心肌梗死至心力衰竭转变过程中的有效中药复方^[10-11]。李鹏^[12]采用 PEA (Probability Ensemble Approach) 模型——一种综合考虑分子化学空间、药理空间、基因注释和生物网络构建的新颖算法, 通过计算已知药物对的 6 个相似性特征 (化学结构相似性、基于 ATC 药物分类的相似性、基于不良反应的相似性、药物靶标间的蛋白质序列相似性、基于蛋白互作网络距离的相似性和基于生物富集功能的相似性) 并使用贝叶斯网络整合这些特征, 以预测有效药物组合及潜在的不良反应相互作用, 为心血管疾病中药复方组合研究提供了新的思路。

1.2 间接干扰作用

间接干扰作用是指中药成分影响疾病的方式, 并不直接作用于疾病相关基因, 而是通过与疾病相关的网络或系统层面产生作用。这种作用模式通过网络邻近性及网络扩散性来进行研究和解释。

1.2.1 网络邻近性 Barabási 团队^[13]发现, 美国

食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准的药物靶点与在线孟德尔遗传疾病手册 (OMIM) 中记录的病症基因之间很少有直接重叠, 因此, 他们引入了一种基于网络的无监督、无偏见的方法——网络邻近性, 用于分析药物与疾病之间的关系。这一方法通过测量药物靶点到表型网络的平均最短距离, 展现了优于其他方法的性能, 能够更好地预测药物的有效性。网络邻近性核心思想是, 药物靶点与疾病相关成分 (如病毒与宿主之间的相互作用) 的距离越近, 药物影响不良表型的概率越高。随后, 网络邻近性的概念被用来解释中药与疾病或表型之间的关系^[14]。例如, Yang 等^[15]利用网络邻近性计算了治疗冠心病的 8 个中药复方靶标与九类 FDA 批准用于治疗冠心病的西药靶标之间的距离, 发现中药与西药的靶标在网络距离上密切相关, 暗示它们可能具有重叠的作用机制。Gan 等^[16]则采用网络邻近性方法, 通过将症状相关基因和草药靶点映射到人类蛋白互作网络, 并分析它们在网络中的拓扑关系, 建立了中医网络医学框架。这种方法显示了草药治疗特定症状的有效性, 并通过经验数据和现实世界的临床数据进行了验证。Guo 等^[17]提出的基于网络导向的基因熵方法 (NOGEA) 通过将疾病相关基因映射到网络并标准化相互作用强度, 量化每个疾病相关基因在特定疾病网络中的扰动能力。这一方法进一步将疾病基因分类, 并定义了草药干扰熵, 通过评估每个疾病相关基因与草药靶标在蛋白互作网络中的连接强度, 并将其转换为调控概率, 从而推断药物与疾病之间的关联性, 为药物重定位提供了新的思路。

1.2.2 网络扩散性 Cao 等^[18]提出最短路径的分析方法难以在密集的网络中更加精细地分类与计算, 并且忽略了相邻节点的相互作用以及整体的拓扑属性, 为了弥补网络邻近性的不足, 他基于网络扩散的方式提出了网络扩散距离的概念, 即节点通过随机游走 (迭代步数固定) 到达另一节点的预期次数, 获得节点间的扩散状态, 使用 L1 范式计算两节点间的距离。之后这种方法也被用作预测干扰 COVID-19 疾病的药物排名^[19]。Wang 等^[20]在筛选抗 COVID-19 的中药研究中, 应用网络邻近性和网络扩散性两种打分方法, 分别得到两种方法的单一排名, 进而综合两种方法加权得到抗 COVID-19 候选药物综合排名。Chen 等^[21]基于系统药理学和网络扩散扰动, 综合分

析疾病的基因表达谱和中药成分的分子作用靶标, 构建了一个全面的草药-疾病关系映射框架, 该研究利用了 189 种疾病的基因表达数据和 502 种草药的化学信息学及药理学数据, 通过匹配草药扰动特征与疾病的基因表达变化, 系统地预测了中药复方对特定疾病的疗效。

尽管基于网络分析的方法能有效预测药物疗效, 但研究表明直接干扰作用和间接干扰作用之间存在一定的互补和交叉。直接干扰可能忽视了间接作用的影响, 而间接干扰又可能削弱直接作用的力度。因此, 如何整合和衡量这两种干扰效应之间的关联, 可能成为未来疗效预测研究的一个重要方向。

2 分子对接

分子对接技术是一种通过模拟小分子配体与生物大分子 (如蛋白质) 之间的相互作用, 以预测它们之间最优结合方式的计算方法。此技术计算配体在受体的结合位点内的潜在位置、方向和构象, 同时评估配体与受体之间的相互作用能量^[22]。依托先进的算法和计算技术, 分子对接能够在庞大的化合物库中有效识别出有潜力的活性化化合物, 从而为药物的发现与设计提供强有力的支持。比如, Dan 等^[23-24]使用分子对接计算疾病核心蛋白与中药药物分子亲和性, 从而预测了治疗放射性肺炎和病理性血管生成的中药复方。邹吉宇等^[25]通过逆向网络药理学方法结合分子对接技术, 预测了 COVID-19 感染后肺纤维化的潜在治疗靶点、信号通路、活性成分及其对应中药处方预测, 为中医临床辨证论治和组方用药提供了新思路。

在药物开发的多个阶段, 分子对接的应用不仅限于寻找新的候选药物分子, 它还能帮助揭示药物的作用机制, 包括药物如何与靶标蛋白结合以及这种结合如何影响蛋白的功能。通过深入分析结合位点, 研究人员能够设计出更加选择性强、效能高的药物分子, 以减少潜在的不良反应。分子对接在中药研究领域同样展现了其独特的价值。中药复方的药效通常源于其中多个成分的协同作用, 分子对接技术可以揭示复方中的单个或多个成分与特定蛋白质的结合方式, 有助于理解其复杂的作用机制, 推进中药的现代化研究^[26]。

尽管分子对接技术在药物设计和生物学领域取得了重大进展, 但其预测的准确性仍面临挑战。这些挑战包括处理蛋白质的灵活性、水分子的影响以及准确计算配体与受体之间的非共价相

互作用。中药复方的研究更为复杂，因为它们往往包含数十种至数百种成分，这些成分间可能存在复杂的相互作用和协同效应。因此，未来的研究将需要开发更精确、更高效的对接算法，并结合其他计算及实验方法来验证对接结果的准确性。同时，运用网络药理学探索中药成分的多靶点作用机制，并与分子对接技术结合，将进一步深化对中药整体疗效的理解，推动中药研究迈向更高的发展水平。分子对接作为验证中药复方核心成分与关键蛋白结合的方法，需要进一步的体内外实验或临床试验验证^[27]。

3 机器学习 (machine learning)

机器学习技术，通过分析和学习大量数据样本，能够教会计算机识别模式和知识，从而辅助提高决策性能。在中医药领域，机器学习已经展现出强大的应用潜力，尤其在症状和体征识别、证候诊断与预测、药物鉴别和使用、疗效预测等方面。例如，杨敏杰^[28]的研究通过结合马尔可夫预测模型、灰色预测模型以及灰色马尔可夫预测模型，构建了针对气阴两虚型慢性肾脏病的中医疗效预测模型，这些模型能够预测患者临床症状的未来状态、实验室数值的具体预测及其变化趋势，从而为中医药治疗提供预测性指导。李庚^[29]利用随机森林算法抽取中药使用规则，考虑了症状和已开具中药的影响，通过“变量重要性评分”来评估自变量对中药使用的影响大小和方向，提取的用药规则能够辅助中医诊疗系统实现更加精准的药物配伍。Niu 等^[30]提出了一种结合中医、人工智能和网络科学算法的中药配方预测方法 (TCMFP)，以高效筛选疾病的最佳中药配方，该方法整合了基于网络目标重要性的草药评分、基于经验学习的配对评分及基于智能优化和遗传算法的草药配方预测评分，成功预测用于治疗阿尔茨海默病、哮喘和动脉粥样硬化三种疾病的中药组方，为中药配方优化、中药临床治疗和药物开发提供新的策略。

此外，机器学习在生物信息学的应用中确实显示出了高效的预测性能和广阔的应用前景。通过分析大量生物医学数据，机器学习模型可以识别出生物标志物、药物反应和疾病相关模式，为疗效预测提供强有力的工具。然而，这一过程需要大量的样本数据以确保模型的准确性和泛化能力。机器学习模型的“黑箱”性质也是一个挑战，这使得模型的决策过程缺乏透明度，可能影响医疗专业人士对模型预测结果的信任度。因此，未

来的研究需要在提高机器学习模型的预测准确性和解释能力方面做出努力，同时应结合其他计算方法和实验验证，以推动中医药研究和临床应用的进一步发展。

4 定量药理学

定量药理学是一门应用数学和生物统计学方法来解析药物效应的科学，通过建立基于实验数据的药理学模型，模拟药物作用过程，以实现药物作用机制的定量理解和预测。这一领域不仅为药物的试验设计提供了工具，也是评估药物效果的重要方法^[31]。在中医药领域，定量药理学的应用展现了其独特的价值。贺琪珺等^[32]研究者通过建立基于生物流量平衡的网络动力学方程，研究了丹膝颗粒治疗缺血性脑卒中的成分与靶点之间的作用机制。通过运用因子旋转分析，研究了药物成分的作用层次、组合、强度与方向，揭示了中药复方配伍原理的科学基础。贾欢欢等^[33]通过正交模拟法与非线性混合效应模型 (NONMEM)，研究了护骨胶囊各成分对成骨细胞增殖和分化的协同和拮抗作用，进而对不同组合的复方进行药效模拟。吴郡一^[34]利用已建立的绝经后骨质疏松药效学模型，借助中药复方干预后的临床试验数据，评价了青娥方、补肾活血方和强骨饮在骨转换标志物中的药效，并准确预测了其长期的骨密度。

这些研究表明，定量药理学能够阐明“量-时-效”关系，为中药复方的研究提供深入的理解和精确的药效评价。然而，中药复方的成分复杂性对定量药理学的应用提出了挑战。中药复方通常包含多种成分，这些成分之间可能存在复杂的相互作用和协同效应，使得建立准确的药效模型变得更加困难。因此，发展高级的数学模型和计算技术，以及结合高通量实验数据，对于提高定量药理学在中药复方研究中的应用准确性和效率至关重要。此外，进一步整合机器学习和网络药理学等现代科技手段，将为揭示中药复方的作用机制和优化药物设计提供更为强大的工具。

5 虚拟临床试验 (virtual clinical trials)

虚拟临床试验代表了一种前沿的研究方法，它通过计算机模拟技术对药物在生物体内的处理过程及其药理作用机制进行数学建模和仿真分析^[35]。这种方法通过对药物的吸收、分布、代谢和排泄 (ADME) 等关键生理过程进行数学化表达和抽象处理，构建相应的数学模型，从而实现计算机模拟实验。此技术涵盖了群体药代动力学 (PopPK)、

药代动力学/药效动力学(PK/PD)、群体药代动力学/药效动力学(PPK/PPD)、基于生理的药代动力学(PBPK)以及定量系统药理学(QSP)等领域的建模与仿真技术^[36]。随着人工智能(artificial intelligence, AI)技术的融入,这些方法已被广泛应用于虚拟临床试验的研究中,以期更高效、准确地预测药物的临床表现和潜在风险。例如,孟海华等^[37]通过QSP模型和虚拟临床试验成功模拟了莫妥珠单抗(mosunetuzumab)的临床试验方案。该方案在首次人体(First-in-Human)临床试验中获得验证,并获得FDA突破性疗法认定,加速了该创新抗肿瘤药物的开发和上市进程。尽管目前尚无中医药虚拟临床试验相关报道,但中医药临床研究已开始采用移动设备、可穿戴诊断监测设备及电子病历报告表(eCRF)等技术,为中医药虚拟临床试验设计奠定了基础^[38]。

对于中药复方来说,虽然目前在进行虚拟临床试验方面存在一定的挑战,主要是因为缺少具体的药代动力学及药效动力学信息,这使得模型构建和仿真分析面临难题。然而,随着科技的进步和研究方法的不断革新,这些障碍预计将逐步被克服。通过深入研究和应用先进的计算模型及仿真技术,可以期待在未来能够有效地开展中药复方的虚拟临床试验研究,这不仅将加速中药复方的研发过程,还有助于揭示其复杂的作用机制,推动中药复方的现代化和国际化进程,最终实现其在全球范围内的应用和认可。

6 小结与展望

中药复方疗效预测的发展潜力巨大,但同时也面临众多挑战。网络药理学、系统生物学、机器学习以及定量药理学等跨学科领域的快速进展,不仅能够为中药复方的临床应用提供科学依据,还能大幅度提高新药研发的效率。

网络药理学将专注于构建更加精确全面的生物网络模型,深入挖掘靶点与成分间的直接及间接作用,以及网络动态变化。利用网络分析的复杂方法,如网络扩散性和网络邻近性分析,有助于揭示中药复方中成分的协同效应和相互作用机制,精准预测中药复方疗效。机器学习和人工智能技术将在中药复方研究中得到更广泛深入的应用。当然,单一的技术往往存在局限,多种技术融合可以通过大数据、深度学习等技术,可以高精度预测复方疗效,挖掘新的有效成分和作用机制。这些技术还将助力于个体化治疗方案的制订,贯彻中医“因人制宜”的治疗理念。定量药理学

在中药复方研究中的作用日益重要,通过非线性混合效应模型、动态系统模型等,量化研究复方成分的药代动力学/药效动力学特性,为复方设计和优化提供精确指导。虚拟临床试验作为中药复方研究的重要工具,借助计算机和仿真技术预测复方的临床效果,有望显著降低研发成本和时间,加速中药复方的市场推广和应用。

然而,目前各类生物信息学方法在中药复方预测中仍存在一些局限:网络药理学方法过分依赖已知的蛋白互作网络数据,难以发现新的作用靶点和通路^[39];机器学习模型受限于训练数据的质量和数量,且“黑箱”特性导致预测结果缺乏可解释性^[40];分子对接技术难以准确模拟中药复方多组分间的协同作用;QSP模型构建需要大量的实验数据支持,且难以处理中药复方成分复杂、作用机制多样的特点。这些局限性提示我们需要建立更完善的中药化学成分数据库,开发能够处理复杂相互作用的新算法,加强生物信息学与实验验证的结合。

在科技迅猛发展和信息爆炸的当下,中药复方研究领域面临前所未有的机遇和挑战。研究者们被赋予了通过不断创新、充分利用现代科技力量来突破传统研究限制的重要任务,旨在推动中药复方的研发和应用向着更高水平发展。此过程中,还需充分考虑伦理、法律和技术挑战,确保研究工作的科学性、安全性和可持续发展。

参考文献

- [1] 曹俊岭, 李学林, 李春晓, 等. 中成药临床应用专家共识(第一版)[J]. 中国药理学杂志, 2022, 57(6): 502-506.
- [2] 毛静远, 吴永健, 史大卓. 中成药治疗冠心病临床应用指南(2020年)[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2021, 19(9): 1409-1435.
- [3] 吴千言, 徐小港, 张清源, 等. 中医药治疗阿尔茨海默病随机对照试验结局指标的现状分析[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(11): 3113-3124.
- [4] Zhao L, Zhang H, Li N, et al. Network pharmacology, a promising approach to reveal the pharmacology mechanism of Chinese medicine formula [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 309: 116306.
- [5] Hopkins AL. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery [J]. Nat Chem Biol, 2008, 4(11): 682-690.
- [6] 谌攀, 吴博文, 张鹏, 等. 基于生物网络的中医药学原理探索[J]. 科学通报, 2024, 69(1): 17-29.
- [7] 李兵, 韩飞, 王忠, 等. 多组学网络背景下方剂临床价值的考量[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(5): 848-851.
- [8] Yu YN, Tang L, Cui FY, et al. Effect of Qizhitongluo

- capsule on lower limb rehabilitation after stroke: a randomized clinical trial [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 165: 105464.
- [9] 郭非非, 张雨绮, 唐仕欢, 等. 中药抗 COVID-19 药效预测分析平台构建及常用中药潜在作用分析 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45 (10): 2257-2264.
- [10] 席玉婕, 唐璇, 唐仕欢, 等. 基于多靶标药效评价体系的经典方治疗慢性阻塞性肺疾病用药规律解析 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46 (21): 5710-5718.
- [11] 唐璇, 席玉婕, 郭非非, 等. “心梗-心衰”疾病演变过程概述与疾病动态分子网络研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28 (8): 255-264.
- [12] 李鹏. 心血管疾病及中药治疗的系统药理学研究 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2015.
- [13] Guney E, Menche J, Vidal M, et al. Network-based in silico drug efficacy screening [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10331.
- [14] Wang YY, Yang HB, Chen LX, et al. Network-based modeling of herb combinations in traditional Chinese medicine [J]. *Brief Bioinform*, 2021, 22 (5): bbab106.
- [15] Yang J, Tian SS, Zhao J, et al. Exploring the mechanism of TCM formulae in the treatment of different types of coronary heart disease by network pharmacology and machining learning [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 159: 105034.
- [16] Gan X, Shu ZX, Wang XY, et al. Network medicine framework reveals generic herb-symptom effectiveness of traditional Chinese medicine [J]. *Sci Adv*, 2023, 9 (43): eadh215.
- [17] Guo ZH, Fu YX, Huang C, et al. NOGEA: a network-oriented gene entropy approach for dissecting disease comorbidity and drug repositioning [J]. *Genom Proteom Bioinf*, 2021, 19 (4): 549-564.
- [18] Cao MF, Zhang H, Park J, et al. Going the distance for protein function prediction: a new distance metric for protein interaction networks [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (10): e76339.
- [19] Morselli GD, Do VÍ, Zitnik M, et al. Network medicine framework for identifying drug-repurposing opportunities for COVID-19 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118 (19): e2025581118.
- [20] Wang H, Zhang JQ, Lu ZG, et al. Identification of potential therapeutic targets and mechanisms of COVID-19 through network analysis and screening of chemicals and herbal ingredients [J]. *Brief Bioinform*, 2022, 23 (1): bbab373.
- [21] Chen XT, Zheng CL, Wang C, et al. Systems-mapping of herbal effects on complex diseases using the network-perturbation signatures [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1174.
- [22] 张春艳, 曹晓璐, 刘嵩, 等. 基于分子对接和分子动态模拟探讨葛根素缓解大鼠心肌缺血再灌注损伤的作用机制 [J]. *华中科技大学学报 (医学版)*, 2024, 53 (1): 26-32.
- [23] Dan WC, Wu C, Xue CY, et al. Rules of Chinese herbal intervention of radiation pneumonia based on network pharmacology and data mining [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 7313864.
- [24] Yun WY, Dan WC, Liu JL, et al. Investigation of the mechanism of traditional Chinese medicines in angiogenesis through network pharmacology and data mining [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 5539970.
- [25] 邹吉宇, 高天奇, 李德众, 等. 基于逆向网络药理学及分子对接探讨新型冠状病毒感染后肺纤维化发病机制及中药组方预测 [J]. *中华中医药学刊*, 2024, 42 (11): 14-17.
- [26] 袁素素, 叶秀云, 鄢仁祥. 基于蛋白质受体的药物分子计算机辅助设计策略 [J]. *生物信息学*, 2024, 22 (3): 159-173.
- [27] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. *中草药*, 2021, 52 (14): 4119-4129.
- [28] 杨敏杰. 基于灰色马尔可夫的气阴两虚型慢性肾脏病中医疗效预测模型的设计与构建 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [29] 李庚. 基于电子病历的冠心病心绞痛中药用药规律及其预测模型构建研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2023.
- [30] Niu QK, Li HT, Tong L, et al. TCMFP: a novel herbal formula prediction method based on network target's score integrated with semi-supervised learning genetic algorithms [J]. *Brief Bioinform*, 2023, 24 (3): bbad102.
- [31] 郑青山. 模型引导新药研发模式: 原理与案例 [J]. *中国新药杂志*, 2023, 32 (19): 1946-1952.
- [32] 贺琪珺, 王敏存, 陈定芳, 等. 中药复方配伍的整体定量药理学表征体系建立与实验验证 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2023, 37 (S1): 36-37.
- [33] 贾欢欢, 曾昭利, 曾雯, 等. 一种定量药理学方法研究护骨胶囊的药效并分析各味药对药效的协同和拮抗作用 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2012, 18 (5): 440-443.
- [34] 吴郡一. 绝经后骨质疏松药效学模型的构建及其中药临床评价 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2019.
- [35] 刘懿贤, 郑莉. 虚拟临床试验应用现状及趋势 [J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2024, 31 (2): 216-222.
- [36] 赵宸, 李改玲, 王亚宁. 新药研发中的定量系统药理学 (QSP) 模型与虚拟临床试验: 发展及前沿应用 [J]. *药科学报*, 2023, 58 (11): 3296-3310.
- [37] 孟海华, 孙立, 陈明伟. 虚拟临床试验的发展趋势及对策建议 [J]. *生命科学*, 2024, 36 (11): 1315-1320.
- [38] 陈芷涵, 梁丹, 万李娜, 等. 中医药临床研究的未来发展趋势及思考 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30 (22): 102-109.
- [39] 李朝, 费楠, 李海悦, 等. 中药复方的网络药理学研究进展 [J]. *中医临床研究*, 2024, 16 (21): 108-112.
- [40] 郑琰莉, 苏文星, 宋元涛. 机器学习在心血管疾病中应用的研究进展 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2024, 22 (10): 1813-1817.

(收稿日期: 2024-11-04; 修回日期: 2025-01-01)

临床药师在临床

1 例牙髓卟啉单胞菌所致化脓性脑膜炎药学实践分析

姚佳¹, 郭玉金¹, 陈玉民^{2*}, 张曼曼¹, 赵秀珍² (1. 济宁市第一人民医院临床药学科, 山东 济宁 272000; 2. 济宁市第一人民医院神经内科, 山东 济宁 272000)

摘要: 牙髓卟啉单胞菌所致的化脓性脑膜炎较为罕见。临床药师通过对 1 例因牙髓卟啉单胞菌致化脓性脑膜炎患者治疗过程进行分析, 根据患者临床表现, 结合脑脊液 mNGS 结果和抗菌药物特点, 制订抗感染治疗方案。患者通过抗感染治疗后, 临床表现明显好转, 脑脊液常规等感染指标显著下降, 最终痊愈出院。因此对来源于口腔或鼻窦等部位的中枢神经系统感染应考虑厌氧菌。

关键词: 牙髓卟啉单胞菌; 化脓性脑膜炎; 鼻窦炎

中图分类号: R969.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)04-1170-04

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.046

牙髓卟啉单胞菌于 1976 年首先从感染根管中的产黑色素类杆菌群中分离出来, 现已被认为是感染根管生态环境中的核心细菌之一^[1]。它是牙髓病、根尖周病的主要优势菌, 在根尖周炎患者根管中检出率可达 63%, 可通过细菌协同作用形成窦道、脓肿^[2-4]。即使有病原微生物宏基因组测序 (mNGS) 等诊断工具, 牙髓卟啉单胞菌导致的颅内感染仍比较少见。本文报道了临床药师参与 1 例因牙髓卟啉单胞菌所致化脓性脑膜炎患者的抗感染方案制订和药学监护, 可为类似疾病的临床治疗提供参考。

1 病历资料

患者女, 48 岁, 既往无高血压、糖尿病、冠心病病史, 因“发热 5 d、头痛 2 d”于 2024 年 5 月 16 日入院。入院前患者无明显诱因发热, 体温最高 39℃, 给予青霉素等抗感染治疗后未见好转, 近 2 日出现头疼, 主要表现为前额部疼痛严重, 疼痛呈持续性, 纳差, 精神不振, 伴恶心及呕吐, 呕吐物为非血性内容物。颅脑磁共振 (MRI) 示脑多发缺血、梗死灶、鼻旁窦炎性病变。血常规示白细胞 $5.39 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, 中性粒细胞百分比 92.6%↑, C 反应蛋白 $26.24 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ ↑; 肾功能正常。考虑中枢神经系统感染, 经验性给予头孢曲松 2 g q12h 联合更昔洛韦 0.4 g q12h 抗感染治疗, 同时给予甘露醇降颅内压等对症支持治疗。

2 主要诊疗过程及抗感染治疗方案制订

入院第 2 日完善相关检查。脑脊液常规示脑脊液较浑浊、乳白色, 白细胞总数 $4016 \times 10^6 \cdot L^{-1}$ ↑, 葡萄糖水平 $2.83 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$, 氯化物正常, 84% 多形核细胞, 潘氏试验阳性, 蛋白为 $1.10 \text{ g} \cdot L^{-1}$ 。常规脑脊液培养未见细菌或真菌生长。血常规检查示白细胞 $15.72 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ ↑, 中性粒细胞 $13.93 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ ↑, 中性粒细胞百分比为 88.7%↑。血沉为 $30 \text{ mm} \cdot h^{-1}$ ↑; 血培养未见明显异常。鼻窦 CT 示鼻窦炎炎症, 鼻中隔偏曲, 双侧中、下鼻甲轻度增厚 (见图 1)。入院第 4 日, 感染指标高, 抗菌药物调整为美罗培南 2 g q8h ivgtt, 停用更昔洛韦。使用美罗培南 3 d 后, 患者仍无好转, 头痛、发热, 精神状态逐渐改变, 出现精神错乱。血常规示白细胞 $11.80 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ ↑, 中性粒细胞 $9.76 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ ↑, 中性粒细胞百分比 82.7%↑, 降钙素原 $1.75 \text{ ng} \cdot mL^{-1}$ ↑。脑脊液 mNGS 显示牙髓卟啉单胞菌、中间链球菌、微小单胞菌、口腔消化链球菌和侵袭链球菌 (见表 1)。医师请临床药师会诊, 临床药师根据 mNGS 结果, 考虑病原菌可能来源于口腔、鼻窦, 不排除厌氧菌感染可能, 建议加用氨苄西林 2 g q6h 联合美罗培南针对牙髓卟啉单胞菌进行治疗, 医师采纳会诊建议。同时全麻下行内镜鼻窦开窗手术+鼻窦真菌清除+左中鼻甲切除术+鼻中隔脊柱切除术。鼻窦内可见霉菌团块和脓性分泌物; 分泌物培养阴性, 真菌 D 葡聚糖、真菌 GM 试验阴

基金项目: 济宁市重点研发计划项目 (No.2023YXNS184); 济宁市重点研发计划项目 (No.2022YXNS136)。

作者简介: 姚佳, 女, 硕士, 主管药师, 主要从事临床药学工作, email: yj8398@163.com *通信作者: 陈玉民, 男, 硕士, 主治医师, 主要从事神经内科专业工作, email: 18853732615@163.com

性。颅脑 (MRI, 见图 2) 示蝶鞍、鞍上区、鞍前池、双侧脑室后角多发异常信号, 提示感染性病变; 鼻窦炎症。入院第 9 日血常规示白细胞 $9.51 \times 10^9 \cdot L^{-1} \uparrow$, 中性粒细胞 $6.16 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, 中性粒细胞百分比 64.8%。降钙素原 $0.43 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \uparrow$ 。脑脊液微浑浊, 微黄, 白细胞总数 $1743 \times 10^6 \cdot L^{-1} \uparrow$, 葡萄糖 $0.90 \text{ mmol} \cdot L^{-1} \downarrow$, 氯离子正常, 多形核细胞 61.9%, 潘氏试验阳性, 脑脊液蛋白 $1.50 \text{ g} \cdot L^{-1} \uparrow$ 。脑脊液培养未见细菌或真菌生长。入院第 10 日, 血常规白细胞、中性粒细胞正常, 降钙素原 $0.15 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \uparrow$ 。脑脊液无色透明, 白细胞总数 $360 \times 10^6 \cdot L^{-1}$, 葡萄糖 $2.30 \text{ mmol} \cdot L^{-1} \downarrow$, 氯离子正常, 多形核细胞 17%, 潘氏试验阳性, 脑脊液蛋白 $0.82 \text{ g} \cdot L^{-1} \uparrow$ 。常规脑脊液培养未见细菌或真菌生长。虽然感染指标明显下降, 但患者仍有间歇性发热、头痛等症状, 外院专家建议可给予复方磺胺甲噁唑 (SMZ-TMP) 抗感染治疗, 临床药师建议给药剂量为磺胺甲噁唑 (SMZ) 800 mg/甲氧苄啶 (TMP) 160 mg q12h 口服, 并监护患者有无肝肾功能损伤等不良反应。复查脑脊液 mNGS 结果 (见表 1) 显示新的病原体——中间普雷沃菌和卡他莫拉菌, 但序列丰度较低。中间普雷沃菌是一种口腔厌氧菌, 卡他莫拉菌可在鼻咽部定植, 因此继续目前抗感染治疗。

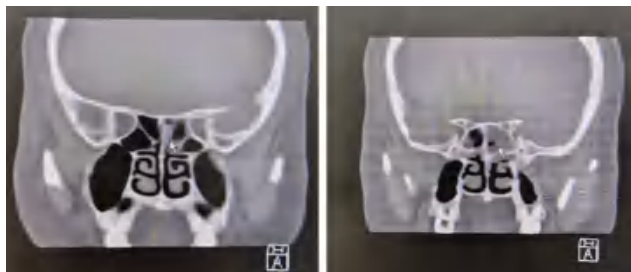


图 1 患者 2024 年 5 月 18 日鼻窦 CT



图 2 患者 2024 年 5 月 22 日颅脑 MRI

2024 年 5 月 28 日颅脑 MRI (见图 3A) 示蝶鞍区、鞍上区、鞍前池、双侧脑室后角多发异常信号, 范围无明显变化, 提示感染性病变; 鼻窦炎症。患者发热好转, 神志清醒, 一般情况稳定, 逐渐停用氨苄西林和美罗培南。6 月 9 日, 复查颅脑 MRI (见图 3B), 双侧脑室后角多发异常信号, 范围明显缩小, 提示治疗后感染性疾病改变; 鼻窦炎症。复查血常规、降钙素原及肝肾功能正常, 5 d 后患者出院。

表 1 患者标本的 mNGS 分析

日期	菌种	序列丰度	比例 / %
2024 年 5 月 7 日	牙髓卟啉单胞菌	332	38.34
	中间链球菌	18	5.97
	微小单胞菌	81	10.06
	口腔消化链球菌	71	8.73
	侵肺戴阿李斯特菌	55	8.48
2024 年 5 月 27 日	牙髓卟啉单胞菌	36	30.34
	中间普雷沃菌	10	6.85
	口腔消化链球菌	12	10.80
	侵肺戴阿李斯特菌	8	7.89
	卡他莫拉菌	5	6.14



A



B

图 3 患者 2024 年 5 月 28 日 (A) 及 6 月 9 日 (B) 颅脑 MRI

3 分析与讨论

3.1 mNGS 在中枢神经系统感染病原学诊断中的作用

细菌性中枢神经系统感染的死亡率较高, 常规脑脊液培养无法明确病原学是其主要原因之一。脑脊液 mNGS 已逐步用于中枢神经系统感染性疾病的病原学诊断。随着 mNGS 在临床的广泛使用, 脑脊液的病原体检出率越来越高, 包括一些特殊病原体如真菌^[5]。该患者脑脊液培养未检测出细菌、真菌, 但表现出头痛、发热等中枢神经系统感染症状, 脑脊液常规示葡萄糖低, 白细胞升高。《中枢神经系统感染性疾病的脑脊液宏基因组学第二代测序应用专家共识》^[6]中指出, 对于社区获得性急性脑炎和脑膜炎, 非重症患者一般可以先开展脑脊液传统微生物学检查, 仍不能明确病因时再送检脑脊液 mNGS。该患者合并鼻窦炎, 真菌易在此部位定植, 鼻窦内可见霉菌团块和脓性分泌物, 但分泌物培养为阴性, 真菌 D 葡聚糖、真菌 GM 试验阴性, 且患者无鼻塞等症状, 脑脊液培养及 mNGS 结果未提示真菌感染,

因此不考虑颅内真菌感染,手术清创后未给予抗真菌治疗。根据脑脊液 mNGS 检测结果为牙髓卟啉单胞菌、中间链球菌、微小单胞菌、口腔消化链球菌和侵肺戴阿利斯特菌,其中牙髓卟啉单胞菌序列丰度稍高,结合患者临床表现和检查结果,怀疑其为主要致病菌。

3.2 针对牙髓卟啉单胞菌抗感染方案的选择

成人脑膜炎中的厌氧菌非常罕见,因此经常被忽视和治疗不足^[7]。侵肺戴阿利斯特菌是一种小型的、非发酵的革兰氏阴性厌氧菌,是从流感患者的鼻咽分泌物中获得,混合菌群中含有的侵肺戴阿利斯特菌除了引起牙周或机会性感染外,还可能作为一种致命的病原体,特别是在大脑中^[8]。继发性中枢神经系统感染以脑脓肿最为典型,其感染源大多来自临近颅底结构的组织器官感染,如鼻窦炎、中耳炎、牙周脓肿等^[9]。Heintz 等^[10]报道了 1 例因接受过义齿植入发展成由牙髓卟啉单胞菌引起的脑膜脑炎,该患者口腔卫生尚可,合并鼻旁窦炎,术中可见鼻窦内充满霉菌团块及脓性分泌物,常规分泌物培养阴性,未做 mNGS 检测。但仍考虑患者颅内感染来源于鼻窦。

细菌性脑膜炎患者抗感染治疗最重要的是避免延误治疗和选择用药方案。该患者入院时未明确病原学,所以经验性给予更昔洛韦、头孢曲松、美罗培南等抗菌药物覆盖常见病毒、链球菌、肠杆菌等病原菌。但治疗效果欠佳,患者病情明显加重。待脑脊液 mNGS 结果回报后,临床药师考虑病原菌主要为口腔、鼻窦中牙髓卟啉单胞菌感染。中间链球菌对 β -内酰胺类、头孢曲松、左氧氟沙星、万古霉素、利奈唑胺等敏感^[11-12]。侵肺戴阿利斯特菌可能对针对胃肠道感染的抗菌药物(如氟喹诺酮类药物、万古霉素、黏菌素和大环内酯类药物)具有耐药性,但未发现侵肺戴阿利斯特菌对 β -内酰胺类、甲硝唑的耐药情况^[13-15]。因此对于该患者,首选对厌氧菌具有杀菌活性的药物。同时需考虑抗菌药物在脑脊液中的杀菌活性受抗菌药物渗透性、浓度和内在活性的影响。脑脊液中抗菌药物有效治疗浓度应是致病菌最低抑菌浓度值的 10 ~ 20 倍^[9]。氨苄西林为广谱半合成 β -内酰胺类抗菌药物,能覆盖常见的链球菌和厌氧菌,体外药敏试验显示氨苄西林对链球菌属、脑膜炎奈瑟菌及厌氧革兰氏阳性菌(如消化链球菌)有较好的敏感性。氨苄西林很容易扩散到身体组织和液体中,细菌性脑膜炎患者按体重静脉滴注 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,前 3 d 脑脊液中氨苄西林浓度可达 $2.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。因此临床药师建议加

氨苄西林抗感染治疗。目前美国临床实验室标准化委员会尚无牙髓卟啉单胞菌药敏推荐方法,无法确定最低抑菌浓度,考虑到患者为化脓性脑膜炎,建议大剂量给药,给予氨苄西林 2 g q6h ivgtt ;同时行清创治疗,患者脑脊液常规和其他感染指标有所好转。

使用氨苄西林抗联合美罗培南感染治疗后,患者仍有间断发热等临床表现。SMZ-TMP 是由 TMP 和 SMZ 以固定剂量(1:5)组成的复方制剂。SMZ-TMP 对消化链球菌等常见厌氧革兰氏阳性菌体外敏感性欠佳,但对卡他莫拉菌等病原菌有良好的敏感性。SMZ-TMP 在体内广泛分布,包括脑脊液、阴道分泌物、痰液、中耳液、支气管分泌物、胎盘和母乳,但组织浓度通常低于血清浓度。SMZ-TMP 的脑脊液渗透性一般较好,脑脊液中 TMP 浓度介于血清浓度的 20% ~ 60%,SMZ 浓度介于血清浓度的 12% ~ 50%,TMP-SMX 在血液和脑脊液中的比例约为 1:20^[16]。SMZ-TMP 与早期一些其他抗菌药物一样,在现代药物审批程序建立之前就已经被引入临床应用。有关药代动力学/药效学研究、药敏折点以及不同类型感染的适当剂量和疗效数据相对匮乏^[17],因此,根据药品说明书建议 SMZ-TMP (SMZ 800 mg/TMP 160 mg) q12h 口服给药,用药期间监测患者肝肾功能,同时需注意 SMZ-TMP 可致全血细胞减少^[18]等不良反应。

细菌性脑膜炎治疗疗程较长,不同的病原体治疗疗程存在一定的差异。对于轻中度革兰氏阴性菌引起的中枢神经系统感染建议治疗疗程为 21 d,金黄色葡萄球菌治疗疗程为 10 ~ 14 d^[9]。具体治疗疗程需结合患者临床表现及影像学等综合判断。该患者先后使用美罗培南、氨苄西林及 SMZ-TMP 抗感染治疗 20 余日,出院后继续口服 SMZ-TMP 1 ~ 2 周。

4 结论

综上所述,mNGS 已经成为明确细菌性中枢神经系统感染病原学的重要手段之一,当脑脊液常规培养未检测出病原学时,尤其患者合并口腔、鼻窦疾病时应考虑到是否由这些部位混合病原菌引起,可进行 mNGS 检测,同时对脑脊液进行厌氧菌培养,如考虑口腔、鼻窦来源的中枢神经系统感染可经验性给予氨苄西林、复方磺胺甲噁唑等抗菌药物进行抗感染治疗。临床药师通过积极查阅文献,根据微生物结果分析和抗菌药物特点,协助临床医师制订合理的抗感染治疗方案,对于类似中枢系统感染的经验性治疗提供了参考。

参考文献

- [1] 杨帝, 李任, 仇丽鸿, 等. 牙髓卟啉单胞菌内毒素对成骨细胞表达 IL-1 β mRNA 和 IL-6 mRNA 的影响 [J]. 上海口腔医学, 2009, 18 (2): 194-197.
- [2] Rôças IN, Siqueira JF. Frequency and levels of candidate endodontic pathogens in acute apical abscesses as compared to asymptomatic apical periodontitis [J]. PLoS One, 2018, 13 (1): e0190469.
- [3] Qi ZN, Cao HM, Jiang H, et al. Combinations of bacterial species associated with symptomatic endodontic infections in a Chinese population [J]. Int Endod J, 2016, 49 (1): 17-25.
- [4] Cao HM, Qi ZN, Jiang H, et al. Detection of porphyromonas endodontalis, porphyromonas gingivalis and prevotella intermedia in primary endodontic infections in a Chinese population [J]. Int Endod J, 2012, 45 (8): 773-781.
- [5] 刘清慧, 张颖佩. 1 例脑脊液二代测序检出解脂耶氏酵母菌病例分析 [J]. 中南药学, 2023, 22 (3): 818-820.
- [6] 中华医学会神经病学分会感染性疾病与脑脊液细胞学学组. 中枢神经系统感染性疾病的脑脊液宏基因组学第二代测序应用专家共识 [J]. 中华神经科杂志, 2021, 54 (12): 1234-1240.
- [7] Lee JJ, Lien CY, Chien CC, et al. Anaerobic bacterial meningitis in adults [J]. J Clin Neurosci, 2018, 50: 45-50.
- [8] Rousée JM, Bermond D, Piémont Y, et al. Dialister pneumosintes associated with human brain abscesses [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40 (10): 3871-3873.
- [9] 中国医师协会神经外科医师分会神经重症专家委员会, 北京医学会神经外科学分会神经外科危重症学组. 神经外科中枢神经系统感染诊治中国专家共识 (2021 版) [J]. 中华神经外科杂志, 2021, 37 (1): 2-15.
- [10] Heintz E, Pettengill AM, Gangat AM, et al. Oral flora meningoencephalitis diagnosis by next-generation DNA sequencing [J]. Access Microbio, 2019, 1 (9): e000056.
- [11] Pandya D, Kannangara D. Streptococcus intermedius: a study of 107 isolates [J]. Open Forum Infect Dis, 2019, 6 (Supplement 2): S111.
- [12] Cobo F, Sampedro A, Rodriguez-Granger J, et al. Clinical and microbiologic characteristics of pleuro-pulmonary infection due to Streptococcus intermedius [J]. Rev ESP Quimioter, 2018, 31 (2): 146-151.
- [13] Morio F, Jean-Pierre H, Dubreuil L, et al. Antimicrobial susceptibilities and clinical sources of Dialister species [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51 (12): 4498-4501.
- [14] Goldstein EJ, Citron DM, Warren YA, et al. In vitro activity of moxifloxacin against 923 anaerobes isolated from human intra-abdominal infections [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50 (1): 148-155.
- [15] Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP, et al. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections [J]. J Clin Microbiol, 2001, 39 (9): 3282-3289.
- [16] Smego RA, Moeller MB, Gallis HA. Trimethoprim-sulfamethoxazole therapy for Nocardia infections [J]. Arch Intern Med, 1983, 143 (4): 711.
- [17] 《复方磺胺甲噁唑治疗药物监测临床应用专家共识》编写组. 复方磺胺甲噁唑治疗药物监测临床应用专家共识 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2024, 24 (5): 497-506.
- [18] 张灵, 张津翌, 范茂飞, 等. 复方磺胺甲噁唑致全血细胞减少伴药物性肝损伤 1 例 [J]. 中南药学, 2024, 22 (1): 276-278.

(收稿日期: 2024-12-08; 修回日期: 2025-02-10)

罕见突变肺癌患者使用谷美替尼致重度水肿 1 例

崔苏云^{1, 2}, 罗芬^{2*}, 王可欣^{2, 3}, 肖轶雯², 李玲¹, 任思颖² (1. 大理州人民医院药剂科, 云南 大理 671000; 2. 中南大学湘雅二医院药学部, 长沙 410011; 3. 中山市中医院临床药学部, 广东 中山 528400)

关键词: 谷美替尼; MET-TKIs; 水肿; 不良反应; METex 14 跳突

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2025)04-1173-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.04.047

间质-上皮细胞转化因子 (MET) 是非小细胞肺癌 (NSCLC) 的驱动基因之一, MET 基因在临床上三种常见的突变形式, 包括 MET 14 外显子跳跃突变 (METex 14 跳突)、MET 基因扩增、MET 蛋白过表达。中国大陆 NSCLC 人群中 METex 14 跳突的比例为 0.9% ~ 2.0%^[1]。METex

14 跳突 NSCLC 患者目前主要使用靶向药物 MET 酪氨酸激酶抑制剂 (MET-TKIs) 进行治疗, 常用的药物有卡马替尼、特泊替尼、赛沃替尼、谷美替尼及伯瑞替尼^[2-3]。MET-TKIs 常见共同不良反应包括外周水肿、恶心呕吐、肝脏毒性^[4-5]。由于 METex 14 跳突 NSCLC 患者是一个年龄更大的人

基金项目: 中国药学会科技开发中心科普项目 (No.CMEI2024KPYJ001179)。

作者简介: 崔苏云, 女, 主管药师, 主要从事抗肿瘤药物相关临床药学工作, email: 252485922@qq.com * 通信作者: 罗芬, 女, 主管药师, 主要从事呼吸内科临床药学工作, email: luofen@csu.edu.cn

群，需要更加重视不良反应管理，但由于 METex 14 跳突在 NSCLC 中为罕见突变，临床病例较少见，临床上缺少这类患者使用 MET-TKIs 后相关不良反应（ADR）的诊疗经验。基于一项单臂临床试验（GLORY 研究）^[5-6]，2023 年 3 月谷美替尼在我国获批附条件适应证：用于治疗具有 METex 14 跳突的局部晚期或转移性 NSCLC。笔者通过分析 1 例中年男性 METex 14 跳突肺癌患者口服谷美替尼导致重度水肿的不良反应，探讨其处理措施、可能发生的机制及患者后续治疗为临床治疗提供一定的参考。

1 病历资料

患者，男，59 岁，2024 年 6 月 18 日因“确诊右上肺腺癌 6 月余，四肢肿胀 4 月余，胸痛半月”收入我院。患者 2023 年 12 月 22 日确诊为原发性支气管肺癌（右上肺腺癌伴鳞状分化 cT4N2M0 IIIb 期）。2024 年 1 月 2 月送检基因检测结果提示：MET exon14 p.D1010N，EGFR 扩增，于门诊就诊，予以谷美替尼 300 mg po qd 治疗至收入院，其间规律复查血常规、肝肾功能未见明显异常。患者主诉 2 月 19 日左右无明显诱因出现面部水肿，未特殊处理；3 月初颜面部水肿消退，四肢出现水肿，水肿程度呈进行性加重，明显的皮肤褶皱消除，并伴有脚部触地疼痛及手部无力症状，影响生活自理；3 月中旬上述疼痛及无力症状缓解，但四肢水肿仍持续，以右上臂最重；6 月初出现右侧锁骨处疼痛，自诉性质难以描述，躺下时出现，坐起及行走站立时消失，为持续性，影响睡眠，每日需坐位睡觉。入院查体：四肢重度凹陷性水肿，右前臂重于左前臂，四肢肌张力正常。心脏彩超（经胸）提示：高血压所致心脏改变，三尖瓣反流（轻度），左室收缩功能测值正常范围。双下肢深静脉彩超双下肢深静脉所示节段血流通畅。6 月 20 日给予呋塞米注射液 20 mg 静脉推注 bid，6 月 21 日—22 日给予呋塞米片 40 mg po qd，螺内酯片 100 mg po qd。经利尿处理后，患者水肿稍好转，左侧水肿减轻，皮肤褶皱稍恢复。6 月 22 日临床药师开展药学巡诊，关注到该患者的水肿情况，建议医师暂停谷美替尼，继续使用呋塞米及螺内酯利尿处理。患者 6 月 23 日停用谷美替尼，6 月 26 日水肿较前明显好转，左前臂轻度水肿，皮肤褶皱恢复，右前臂及腿部中度水肿，皮肤褶皱稍恢复。患者体重减轻 2.5 kg，继续使用利尿药物。6 月 28 日，双上肢水肿基本消除，双腿轻度水肿，停用利尿药物（见图 1）。同时患者诉躺卧时右侧锁骨处疼痛明显好转，夜间可躺下睡觉 2 h。



图 1 患者水肿情况变化过程

2 分析与讨论

2.1 谷美替尼致水肿关联性评价

患者使用谷美替尼约 1 个月半后出现颜面部水肿，十余天后颜面部水肿好转，四肢出现水肿，呈进行性加重，符合时间相关性；谷美替尼的说明书及相关文献均提到水肿的不良反应，在其说明书中水肿的总体发生率为 59.3%^[5]，在其上市前的 II 期临床研究 GLORY 中水肿的发生率高达 80%^[6]，属于已知的不良反应类型；在停药及利尿脱水对症处理后，水肿减轻；患者既往未使用其他药品，全身水肿与其本身疾病进展不相关，患者右前臂水肿重于左侧考虑与患者癌性淋巴管炎及右侧胸腔积液阻塞淋巴回流相关，并排除了其他因素引起的水肿，如心源性水肿[患者心脏彩超未提示严重心脏功能障碍、无尿量减少的情况，其水肿首先出现在颜面部及上肢，而非心源性水肿常见的身体下垂部位（如下肢）]、低蛋白血症、甲状腺功能减退、肢体血管栓塞等因素导致的水肿。采用诺氏（Naranjo）药品不良反应评估量表^[7]评估疑似药物与不良反应之间的关联性，得分 7 分，提示很可能有关。

表 1 谷美替尼引起患者水肿的诺氏药品不良反应评估结果

评价标准	是	否	未知
该 ADR 之前是否有结论性报告	+ 1		
该 ADR 是否在使用可疑药物后出现	+ 2		
停药或使用拮抗剂、ADR 是否改善	+ 1		
再次用药，ADR 是否复现			0
其他原因是否也可引起该 ADR		+ 2	
给予安慰剂，ADR 是否复现			0
血药浓度是否为中毒浓度			0
ADR 轻重程度是否与剂量增减有关			0
患者之前使用该药或相似药物是否发生类似的不良反应			0
该不良反应是否经过客观检查证实	+ 1		
总分值	7		

注：≥ 9 分为肯定；5 ~ 8 分为很可能；1 ~ 4 分为可能有关；≤ 0 分为可疑。

2.2 谷美替尼致水肿的原因分析

水肿是血管、淋巴管和浆膜腔体液平衡紊乱

的结果。许多药物可以通过几种不同机制导致外周水肿，可能的机制包括毛细血管前小动脉血管扩张（血管扩张性水肿）、钠和/或水滞留（肾脏相关水肿）、淋巴功能不全（淋巴水肿）和毛细血管通透性增加（通透性水肿）。尽管在接受 MET 抑制剂治疗的患者中，外周水肿的发生率很高，但因为距离全球首个 MET-TKIs——特泊替尼（2020 年 3 月在日本上市）上市的时间不足 5 年，文献中对其机制探索得较少。目前认为 MET 基因的蛋白产物可与肝细胞生长因子（HGF）结合，调控多种细胞或生理功能，包括增殖、运动、迁移和侵袭。HGF 是一种促血管生成蛋白，还参与抑制血管通透性和炎症，并减轻凝血酶诱导的内皮通透性。MET 抑制剂对 HGF/MET 信号通路产生干扰可以破坏血管内皮细胞的通透性平衡，从而导致组织水肿^[8-9]。MET 抑制剂导致水肿的另一种潜在机制是通过影响肾功能，因为 MET 可以表达于正常肾组织中，在既往的临床研究中部分患者在治疗期间出现剂量依赖性的血清肌酐水平升高，在谷美替尼的 II 期临床研究 GLORY 研究中^[6]，13 例报告血肌酐升高的患者均发生水肿。但是大多数报告水肿的患者没有出现血肌酐升高（80.6%，54/67），这表明肾脏损伤会加快一些患者水肿的发展，但可能不是水肿发展的主要原因。除了肾小球滤过外，MET 抑制剂还可通过抑制肾脏转运功能相关多药及毒性化合物外排转运蛋白（MATE 蛋白），从而导致血肌酐升高。然而，这些血清肌酐的变化似乎并没有伴随着有临床意义的肾功能损伤，因此这不太可能是水肿发生的主要机制^[10]。作用其他靶点的 TKIs，如 ALK-TKIs 劳拉替尼作用靶点不包括 c-MET，但其水肿的发生率也高达 43%^[11]，提示可能存在别的途径导致水肿发生。

2.3 MET-TKIs 致水肿的发生率

外周水肿被认为是 MET-TKIs 最常见的不良反应，总体发生率为 50%~63%，3 级或以上发生率为 1%~11%。从开始服药到水肿发生的中位时间为 50 d^[12]。目前上市的 MET-TKIs 有卡马替尼、特泊替尼、赛沃替尼、谷美替尼及伯瑞替尼。卡马替尼的 GEOMETRY mono-1 II 期临床研究中外周水肿总发生率为 51%，3 级和 4 级水肿的发生率为 9%^[13]。特泊替尼的 VISION II 期临床研究中，外周水肿总发生率为 67.1%，其中 11.2% 患者出现 3 级或更高级别外周水肿^[14]。赛沃替尼 II 期临床研究（NCT02897479）数据显示其外周水肿的总发生率为 54%，3 级及以上发生率为 9%^[15]。谷美替

尼 II 期临床研究 GLORY 中外周水肿的发生率高达 80%，3 级以上水肿的发生率为 21%，23% 的患者因水肿中断治疗^[6]。伯瑞替尼的 KUNPENG II 期临床研究中，外周水肿的总发生率为 56.6%，3 级以上水肿的发生率为 7.1%^[16]。

2.4 谷美替尼致水肿的处理措施

MET 抑制剂诱发的水肿的管理需要分级处理。根据 2017 年 CTCAE 5.0 版^[17] 四肢水肿分级标准，分级 1：在体积或周长差异最大处比较，肢体间差异为 5%~10%，仔细检查时发现肿胀或解剖学轮廓模糊；分级 2：在体积或周长差异最大处比较，肢体间差异为 10%~30%，明显的解剖学轮廓模糊，皮肤褶皱消除，与正常的解剖学轮廓有明显偏差，影响家务活动；分级 3：在体积或周长差异最大处比较，肢体间差异为 30% 以上，显著的解剖学轮廓模糊，影响自理性日常生活活动。参考谷美替尼说明书^[5] 及《MET 14 外显子跳跃突变 NSCLC 靶向治疗专家共识》^[4]：① 通常发生 1 级水肿可继续使用药物。② 发生 2 级水肿时对症综合治疗后未减轻，并且暂停给药 3~5 d 后仍未恢复 1 级者，则下调一个剂量水平给药；暂停给药 3~5 d 后仍恢复至 1 级者，原剂量继续用药后水肿再次加重为 2 级，可综合考虑则下调一个剂量水平给药。③ 发生 3 级水肿需暂停用药，直至恢复至 1 级：如可恢复至 1 级，则下调剂量后继续使用谷美替尼，否则需永久停药。

本例患者属于 3 级重度水肿。患者暂停使用谷美替尼并给予呋塞米和螺内酯利尿脱水对症处理后，患者四肢凹陷性水肿下降至 1 级，平卧时的右侧锁骨痛较前缓解。嘱其限制盐摄入，可多摄入含钾的食物，睡觉时可抬高下肢，适当锻炼，必要时可穿弹力袜。

2.5 是否重启谷美替尼治疗

参考谷美替尼说明书^[5] 及专家共识^[4]，决定是否继续使用谷美替尼需充分评估患者病情，在病情稳定时可继续使用。本患者入院完善相关检查评估，目前病情进展，局部病灶增大，出现恶性胸腔积液，不排除谷美替尼耐药的可能，如果继续减量使用谷美替尼，对控制肿瘤进展不利，后未减量继续使用谷美替尼。其实在治疗过程中 MET-TKIs 的耐药不可避免，但由于 METex 14 跳突相对少见，且 MET-TKIs 临床应用时间尚短，耐药机制尚不完全清楚。谷美替尼是 IB 型高选择性 MET-TKIs，D1228H/N 和 Y1230C/H/S 突变是 IB 类抑制剂常见的耐药机制，这些突变对福瑞替尼、美沙替尼等 II 类 MET 抑制剂敏感^[18-19]。因此，I

类 MET 抑制剂耐药后, 可以尝试 II 类 MET 抑制剂。这需通过精准检测来明确该患者的耐药机制, 以指导选择药物。由于费用及 II 类 MET 抑制剂可及性的原因患者未继续使用 MET-TKIs 治疗。

3 小结

由于临床上肿瘤患者非药物因素的水肿较多, 常导致此类药物治疗出现的水肿被低估和误诊, 经常导致处方联级^[4], 严重的水肿会影响患者的日常生活活动, 严重降低患者的生活质量。对于该类上市时间较短的新型抗肿瘤药物, 临床药师应重视其药品不良反应相关检查评估, 提高肿瘤患者的用药安全性。

参考文献

- [1] 中华医学会病理学分会, 非小细胞肺癌 MET 临床检测中国专家共识[J]. 中国病理学杂志, 2022, 51 (11): 1094-1103.
- [2] NCCN. NCCN clinical practice guidelines in oncology: non-small cell lung cancer version 5.2024 [EB/OL]. <https://www.nccn.org/>.
- [3] 徐瑜, 李梦侠.《CSCO 非小细胞肺癌诊疗指南 2024》更新解读[J]. 现代医药卫生, 2024, 40 (11): 1801-1808.
- [4] 陈军, 李昕, 刘夏, 等. MET 14 外显子跳跃突变 NSCLC 靶向治疗专家共识[J]. 中国肺癌杂志, 2023, 26 (6): 416-428.
- [5] 谷美替尼药品说明书[Z]. 上海海和药物研究开发股份有限公司. 2023-03-07.
- [6] Yu YF, Zhou JY, Li XY, et al. Gumarontinib in patients with non-small-cell lung cancer harbouring *MET* exon 14 skipping mutations: a multicentre, single-arm, open-label, phase 1b/2 trial[J]. *EClinicalMedicine*, 2023, 59: 101952.
- [7] Naranjo CA, Busto U, Sellers EM, et al. A method for estimating the probability of adverse drug reactions[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1981, 30 (2): 239-245.
- [8] Gallo S, Sala V, Gatti S, et al. HGF/MET axis in heart function and cardioprotection[J]. *Biomedicine*, 2014, 2 (4): 247-262.
- [9] Hack SP, Bruey JM, Koeppen H. HGF/MET-directed therapeutics in gastroesophageal cancer: a review of clinical and biomarker development[J]. *Oncotarget*, 2014, 5 (10): 2866-2880.
- [10] Nishio M, Kato T, Toyozawa R, et al. Management of peripheral edema in patients with *MET* Exon 14-mutated non-small cell lung cancer treated with small molecule *MET* inhibitors[J]. *Target Oncol*, 2022, 17 (5): 597-604.
- [11] 侯举, 孙吉, 欧阳丽辉, 等. 劳拉替尼在 ALK 阳性非小细胞肺癌中的应用[J]. 中南药学, 2021, 19 (12): 2597-2602.
- [12] Lu S, Fang J, Li XY, et al. Once-daily savolitinib in Chinese patients with pulmonary sarcomatoid carcinomas and other non-small-cell lung cancers harbouring *MET* exon 14 skipping alterations: a multicentre, single-arm, open-label, phase 2 study[J]. *Lancet Respir Med*, 2021, 9 (10): 1154-1164.
- [13] Wolf J, Seto T, Han JY, et al. Capmatinib in *MET* exon 14-mutated or *MET*-amplified non-small-cell lung cancer[J]. *N Engl J Med*, 2020, 383 (10): 944-957.
- [14] Paik PK, Felip E, Veillon R, et al. Tepotinib in non-small-cell lung cancer with *MET* exon 14 skipping mutations[J]. *N Engl J Med*, 2020, 383 (10): 931-943.
- [15] Lu S, Fang J, Li XY, et al. Once-daily savolitinib in Chinese patients with pulmonary sarcomatoid carcinomas and other non-small-cell lung cancers harbouring *MET* exon 14 skipping alterations: a multicentre, single-arm, open-label, phase 2 study[J]. *Lancet Respir Med*, 2021, 9 (10): 1154-1164.
- [16] Yang JJ, Zhang Y, Wu L, et al. 1379P preliminary results of phase II KUNPENG study of vebreltinib in patients (Pts) with advanced NSCLC harboring c-MET alterations[J]. *Annals Oncol*, 2023, 34 (S2): S791-S791.
- [17] 2017 年美国卫生及公共服务部常见不良事件评价标准 (CTCAE) 5.0 版 - 中文翻译版[J]. 美国卫生及公共服务部, 2017.
- [18] Recondo G, Bahcall M, Spurr LF, et al. Molecular mechanisms of acquired resistance to *MET* tyrosine kinase inhibitors in patients with *MET* exon 14-mutant NSCLC[J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26 (11): 2615-2625.
- [19] Fujino T, Kobayashi Y, Suda K, et al. Sensitivity and resistance of *MET* exon 14 mutations in lung cancer to eight *met* tyrosine kinase inhibitors invitro[J]. *J Thorac Oncol*, 2019, 14 (10): 1753-1765.

(收稿日期: 2024-07-25; 修回日期: 2024-09-04)