

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



ISSN 1672-2981
CN 43-1408/R

中南药学

ZHONGNAN YAOXUE

2025年5月 第23卷 第5期

Volume 23 Number 5 May 2025

CENTRAL

SOUTH

PHARMACY

- ◆ 基于双噻吩结构的吡啶盐型光敏剂的设计、合成及体外抗肿瘤活性研究
- ◆ 基于BTLA/HVEM通路研究茯苓多糖对免疫抑制小鼠的免疫调节作用
- ◆ 基于胆汁酸代谢探讨中医药治疗精神疾病的研究进展
- ◆ 局部给药制剂的非临床评价专题

ISSN 1672-2981



9 771672 298255

05>

5
2025



中国科技核心期刊

(中国科技论文统计源期刊)

收录证书

CERTIFICATE OF SOURCE JOURNAL
FOR CHINESE SCIENTIFIC AND TECHNICAL PAPERS AND CITATIONS

中南药学

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

特颁发此证书。

中国科学技术信息研究所

Institute of Scientific and Technical Information of China

北京复兴路 15 号 100038

www.istic.ac.cn

2024年9月

证书编号: 2023-G599-0867
有效期至: 2025年12月





中南药 学

ZHONGNAN YAOXUE

月刊 2003 年 4 月创刊 第 23 卷 第 5 期 (总第 232 期) 2025 年 5 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

- (1177) 基于双噻吩结构的吡啶盐型光敏剂的设计、合成及体外抗肿瘤活性研究 董玮, 汪奎, 杨泽泰, 等
- (1183) 基于 BTLA/HVEM 通路研究茯苓多糖对免疫抑制小鼠的免疫调节作用 房悦, 黄佳静, 张越, 等
- (1190) 磷酸胆碱聚合物对光甘草定的增溶作用及机制研究 董爽, 胡祖成, 王浩捷, 等
- (1198) 基于胆汁酸水平探索二氢杨梅素改善利福平所致肝损伤的作用 罗细林, 张婵娟, 石雅宁, 等
- (1205) 负载蛇床子素外泌体的制备及其对类风湿关节炎大鼠的药效学研究 周政署, 华重钧, 孙佳归, 等
- (1210) 模拟失重条件下苯海拉明的药代动力学变化 刁春妍, 林佳艳, 孙定康, 等
- (1215) 基于 5-LOX/LTB4 信号通路探讨黄芩苷 / 栀子苷对“痰瘀互结”型脑卒中大鼠的保护作用与机制 周雪薇, 张嘉豪, 呼田, 等
- (1221) 桂枝芍药知母汤通过调节 AMPK/mTOR/ULK-1 信号通路改善胶原诱导的类风湿关节炎大鼠相关炎症 华重钧, 周政署, 梁霄, 等
- (1229) 硬脂胺脂质体包载核酸 DICAR-JP 在夹层动脉瘤中的作用及机制初步研究 陈凤, 詹琳, 马文韬, 等
- (1235) 紫云英种子化学成分研究 谢尚龙, 童传旺, 郁阳, 等
- (1240) 麻花秦艽通过 STAT1/STAT6 途径调控小胶质细胞极化抗慢性脑低灌注损伤 呼田, 张嘉豪, 周雪薇, 等
- (1248) 山茱萸炮制前后及其配伍入六味地黄汤中 5 种有效成分的含量变化研究 龙群赓, 黄雍, 王璐, 等
- (1255) 从肠道微生态探究麻黄和石膏药对的相须机制 伍冲梅, 舒雁, 任佳合, 等
- (1262) 基于量值传递 - 多元统计 - 亲和作用的护肝片关键质量标志物筛选 李苗, 王滢悦, 张娜, 等
- (1270) 髓母细胞瘤患儿尿液代谢组学研究 时正媛, 杨春静, 续茜桥, 等
- (1275) 基于 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术分析香苏饮的化学成分及入血成分 王鹏, 于泳, 刘力莉, 等

《中南药学》杂志第六届编委会

主编

李焕德

副主编 (排名不分先后)

陈卫东 刘 韶 苏薇薇 孙国祥
向大雄 颜 苗 阳国平 原永芳
张毕奎 赵志刚 左笑丛

常务编委 (排名不分先后)

曹 玲 常福厚 巢志茂 董亚琳
范国荣 冯 星 傅 强 谷福根
姜德建 蒋孟良 金鹏飞 李文莉
刘塔斯 刘雁鸣 孟宪生 彭文兴
孙 进 孙铁民 汤海峰 王 玉
王 峰 魏高文 杨 波 余自成
肇丽梅 朱运贵

编委 (排名不分先后)

边 原 卞晓岚 蔡骅琳 蔡天革
蔡 宇 陈 力 陈 琦 陈勇川
邓 晟 邓远雄 丁 骁 董得时
杜恩明 方平飞 高会乐 高利臣
宫 建 郭怀忠 郭 韧 郭 智
韩立峰 韩晓鹏 何 丹 何江江
何 艳 贺 敏 呼庆勋 胡汉昆
胡 楠 黄 芳 黄 勋 季 波
贾素洁 江俊麟 江 沛 姜 敏
姜志平 蒋德旗 蒋利和 金 锐
孔维军 劳海燕 黎 敏 李健和
李 娟 李文龙 李湘平 李 昕
李新刚 廖德华 刘高峰 刘剑敏
刘丽华 刘梦扬 刘 娜 刘文虎
刘新义 刘秀菊 刘艺平 刘应蛟
刘玉峰 娄月芬 卢海儒 鲁 虹
罗 聪 麻兵继 马恩龙 梅升辉
蒙光义 秦红岩 秦绪军 史志华
舒 畅 隋 峰 孙丙军 孙 逸
覃 丽 唐 芳 田雪松 王朝辉
王春江 王 刚 王 洪 王立辉
王永军 温金华 夏道宗 肖贵南
肖 雪 肖轶雯 谢 诚 徐必学

- (1283) 基于 UHPLC-Q-TOF-MS^E 和梯度提升算法的防风及其伪品水防风
辨识分析 王献瑞, 武浩楠, 贺方良, 等
- (1289) 乙酰唑胺低共熔药物体系的筛选及药效评价
..... 王婷, 蒋志涛, 韩怡, 等
- (1296) 基于生信分子对接及动物实验研究清营汤对于川崎病的作用机制
..... 颜荆芬, 朱焱林
- (1303) 人参皂苷 Rg₃ 联合布格替尼对非小细胞肺癌细胞增殖和迁移的
影响 鲍灵芝, 沈蕾, 冯天意, 等
- (1310) 不同配伍比例对大黄-牡丹皮药对 6 种有效成分溶出量的影响研究
..... 王雪芹, 康玉欣, 叶方, 等
- (1315) 基于网络药理学和实验验证研究高良姜甲醇提取物通过 MAPK
途径抑制铁死亡改善顺铂诱导的急性肾损伤的机制
..... 夏彬, 陈江龙, 王金辉, 等
- (1326) 老鹳草乙酸乙酯部位化学成分及抗氧化活性研究
..... 范潇晓, 陈恒, 余少君, 等
- (1335) 基于网络药理学和动物实验探讨锯叶棕-黄芩提取物对雄激素性
脱发的作用机制 杨赛赛, 郑秀娟, 邓思瑶, 等
- (1344) 锯叶棕-黄芩提取物调节雄激素转化治疗雄激素脱发的作用研究
..... 项雨杰, 陆立煌, 王旭, 等
- (1351) 巴西人参总皂苷对双酚 A 诱导的 TM4 细胞凋亡改善作用研究
..... 刘佳, 路娟, 薛宏伟, 等

综述

- (1357) 基于胆汁酸代谢探讨中医药治疗精神疾病的研究进展
..... 张格, 吴民民, 朱路文
- (1362) ADAM10 在动脉粥样硬化中的作用
..... 陈耿超, 何俊冰, 张隆盛, 等
- (1369) 中药通过 AMPK 信号通路防治高脂血症研究进展
..... 张依娜, 赵锋, 唐瑜, 等
- (1377) 双黄连注射剂的质量控制研究进展 黄楠楠, 笔雪艳, 谭秀尧, 等
- (1385) 口崩片制备工艺与质量评价研究进展 吴春芝, 刘红在, 谷福根
- (1393) 细菌溶解产物防治过敏性疾病的相关免疫学机制研究进展
..... 胡俊, 张洪瑜, 黄琳, 等
- (1398) 靶向整合素 $\alpha_v\beta_3$ 和免疫检查点 NRP-1 的双靶点分子影像探针研
究进展 周雨萱, 葛曼宣, 蔡舒玥, 等

药物分析与检验

- (1404) 药用辅料聚山梨酯 80 (II) 质量评价及质量研究
..... 张悦, 李昌亮, 蒋赞, 等
- (1408) HPLC 法测定蝉蜕不同煎煮时间下 4 种成分含量变化
..... 陈美汝, 孙锋, 高松, 等

徐华丽 徐 萍 徐 珽 杨树龙
杨献文 杨星钢 杨志平 叶喜德
于海洋 袁 成 张程亮 张纯刚
张 峻 张 俐 章超凡 赵 娣
赵立波 赵 亮 赵龙山 郑杭生
周 权 朱荣华 邹振兴

青年编委（排名不分先后）

蔡 明 柴玉娜 陈富超 陈国宁
陈 凯 陈 璐 陈 倩 陈滔彬
程 军 戴立波 董德刚 杜群群
樊启猛 方 玲 方伟进 龚力民
杭永付 侯志飞 黄亚辉 贾王平
姜 雷 姜琪坤 蒋跃平 寇龙发
兰丽丽 黎 赛 黎 苏 李 丹
李三望 李语玲 厉彦翔 梁光平
廖文婷 刘 畅 刘 检 刘天龙
刘心如 刘雅婷 刘怡曼 刘震营
柳 芳 柳鹏程 龙建飞 秦 超
秦崇臻 邱玉玲 邵莹莹 沈秉正
宋开超 苏 丹 孙孟驰 孙万阳
谭国欣 王 淳 王丽明 王莉宁
王 娜 王胜峰 王 玮 王一男
王悦全 魏 博 吴成军 吴晓毅
肖朝江 谢悦良 徐 建 徐 硕
徐文峰 徐 艺 寻延滨 尹双双
于世慧 张 弘 张洪财 张妙红
张 凭 张 倩 张永杰 周志旭
朱 岚 朱志红

编辑：郭志娟 彭金飞 李 科
陆窃窃

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。

（1412）蒙药材牛心的 PCR 鉴别及质量标准提升

..... 马玲，唐辉，刘乐乐，等

局部给药制剂的非临床评价专题

（1418）鼻腔给药制剂非临床安全性评价的一般考虑及挑战

..... 江芝，刘学武，姚芙，等

医院药学

（1430）人类免疫缺陷病毒阴性马尔尼菲篮状菌病患者的临床特征分析与药物治疗实践 李彭宇，卢艳风，陈敬

（1434）口腔黏膜医药联合门诊中药学服务切入点探讨

..... 程海婷，刘洪涛，付洁

（1439）奈玛特韦在我国重型新型冠状病毒感染患者中的群体药代动力学及疗效研究 付饶，陈金兰，谭凌，等

（1446）内蒙古乌兰察布市农牧民安全用药现状调查及其影响因素研究

..... 李学粉，杜银环，张叶叶，等

（1452）基于循证医学证据的门诊儿童用药前置审核规则库的精细化管理 张慧丽，徐贞贞，田京辉，等

（1459）门诊风湿免疫疾病处方点评与用药指导

..... 胡永恒，郝顺，王婧，等

（1463）区域性老年患者用药安全风险量化评价标准指标体系的构建

..... 葛艳慧，杜书章

药事管理

（1468）美国实验室自建检验方法质量监管政策研究及对我国的启示

..... 王珍，梁毅

药学教育

（1474）基于线上线下混合式教学模式建设《药物分析学》一流课程的思路与实践 袁洁，李玉玲，王瑞珂，等

药品不良反应

（1479）基于中国药品不良反应监测自发呈报数据的左氧氟沙星安全警戒信号挖掘与分析 廖文志，柳鹏程

（1486）培塞利珠单抗上市后的 ADR 文献分析

..... 李巧玲，刘茂昌，刘林慧，等

（1492）复方福尔可定致急性泛发性发疹性脓疱病 1 例

..... 李嫦珍，付志媛，王小兵

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*m*A4*318*zh*P*30.0*700*49*2025-5

本期责任编辑：彭金飞，郭志娟，李科，陆窃窃

英文编辑：周静

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 23, Number 5 May 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) 82258487/84895602

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

- (1177) Design, synthesis, and in vitro anti-tumor activity of pyridinium salt photosensitizer based on bithiophene structure
..... DONG Wei, WANG Kui, YANG Ze-tai, et al
- (1183) Immunomodulatory effect of *Poria cocos* polysaccharides on immuno-suppressed mice based on the BTLA/HVEM pathway
..... FANG Yue, HUANG Jia-jing, ZHANG Yue, et al
- (1190) Solubilization effect and mechanisms of phosphorylcholine polymers on glabridin DONG Shuang, HU Zu-cheng, WANG Hao-jie, et al
- (1198) Effect of dihydromyricetin on rifampicin induced liver injury based on bile acid levels
..... LUO Xi-lin, ZHANG Chan-juan, SHI Ya-ning, et al
- (1205) Preparation of exosomes loaded with osthole and its pharmacodynamic effect on rats with rheumatoid arthritis
..... ZHOU Zheng-shu, HUA Chong-jun, SUN Jia-gui, et al
- (1211) Pharmacokinetic changes of diphenhydramine under simulated weightlessness conditions
..... DIAO Chun-yan, LIN Jia-yan, SUN Ding-kang, et al
- (1215) Protective effect of baicalin/gardenoside on phlegm-blood stasis syndrome in stroke rats via the 5-LOX/LTB4 signaling pathway and related mechanism
..... ZHOU Xue-wei, ZHANG Jia-hao, HU Tian, et al
- (1221) Effect of Guizhi Shaoyao Zhimu decoction on collagen-induced inflammation in rats with rheumatoid arthritis by modulating AMPK/mTOR/ULK-1 signaling pathway
..... HUA Chong-jun, ZHOU Zheng-shu, LIANG Xiao, et al
- (1229) Role of stearylamine liposome-encapsulated nucleic acid DICAR-JP in aortic aneurysm and dissection and related mechanism
..... CHEN Feng, ZHAN Lin, MA Wen-tao, et al
- (1235) Chemical components of seeds of *Astragalus sinicus* L.
..... XIE Shang-long, TONG Chuan-wang, YU Yang, et al
- (1240) *Gentiana Straminea* Maxim. regulates microglia polarisation against chronic cerebral hypoperfusion injury via STAT1/STAT6 pathway
..... HU Tian, ZHANG Jia-hao, ZHOU Xue-wei, et al
- (1248) Content changes of 5 active ingredients in *Cornus officinalis* before and after the processing and their compatibility in Liuwei Dihuang decoction
..... LONG Qun-geng, HUANG Yong, WANG Lu, et al
- (1255) Synergistic mechanism of Ephedra and Gypsum herbal pair based on intestinal microecology
..... WU Chong-mei, SHU Yan, REN Jia-he, 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.

- (1262) Screening of key quality markers for Huguang tablets based on quantitative value transfer-multivariate statistical analysis-affinity interaction
..... LI Miao, WANG Ying-yue, ZHANG Na, et al
- (1270) Urine metabolomics in pediatric medulloblastoma
..... SHI Zheng-yuan, YANG Chun-jing, XU Xi-qiao, et al
- (1275) Chemical components and components migrating to the blood of Xiangsu Yin by UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS
..... WANG Peng, YU Yong, LIU Li-li, et al
- (1283) Identification of *Saposhnikovia Radix* and counterfeit *Libanotidis Radix* based on UHPLC-Q-TOF-MS^E and gradient boosting
..... WANG Xian-rui, WU Hao-nan, HE Fang-liang, et al
- (1290) Screening and pharmacodynamic evaluation of acetazolamide deep eutectic drug systems WANG Ting, JIANG Zhi-tao, HAN Yi, et al
- (1296) Mechanism of Qingying decoction on Kawasaki disease based on bioinformatics molecular docking and animal experiments
..... YAN Jing-fen, ZHU Yan-lin
- (1303) Effect of ginsenoside Rg₃ combined with brigatinib on the proliferation and migration of non-small cell lung cancer cells
..... BAO Ling-zhi, SHEN Lei, FENG Tian-yi, et al
- (1310) Effect of different compatibility proportion of drug pair Rhei Radix et Rhizoma and Moutan Cortex on dissolution of 6 active components
..... WANG Xue-qin, KANG Yu-xin, YE Fang, et al
- (1315) Methanol extract of *Alpinia officinarum* Hance inhibits ferroptosis via the MAPK pathway to ameliorate cisplatin-induced acute kidney injury-based on network pharmacology and experimental validation
..... XIA Bin, CHEN Jiang-long, WANG Jin-hui, et al
- (1326) Chemical constituents and antioxidant activity of the ethyl acetate fraction of *Geranium wilfordii* Maxim.
..... FAN Xiao-xiao, CHEN Heng, YU Shao-jun, et al
- (1335) Mechanism of saw palmetto-scutellaria baicalensis extract on androgenic alopecia based on network pharmacology and animal experiment
..... YANG Sai-sai, ZHENG Xiu-juan, DENG Si-yao, et al
- (1344) Effect of saw palmetto-scutellaria baicalensis extract in regulating androgen conversion for androgenetic alopecia
..... XIANG Yu-jie, LU Li-huang, WANG Xu, et al
- (1351) Improvement of bisphenol A-induced apoptosis in TM4 cells by total saponins in *Pfaffia glomerata* LIU Jia, LU Juan, XUE Hong-wei, et al
- (1357) Research progress in traditional Chinese medicine for mental illness based on bile acid metabolism ZHANG Ge, WU Min-min, ZHU Lu-wen
- (1363) Role of ADAM10 in atherosclerosis
..... CHEN Geng-chao, HE Jun-bing, ZHANG Long-sheng, et al
- (1369) Research progress in traditional Chinese medicine for hyperlipidemia via AMPK signaling pathway
..... ZHANG Yi-na, ZHAO Feng, TANG Yu, et al
- (1377) Research progress in quality control of Shuanghuanglian injection
..... HUANG Nan-nan, BI Xue-yan, TAN Xiu-yao, et al
- (1385) Research progress in preparation process and quality evaluation of orally disintegrating tablets WU Chun-zhi, LIU Hong-zai, GU Fu-gen

- (1393) Research progress in immunological mechanism of bacterial lysates in the prevention and treatment of allergic diseases
..... HU Jun, ZHANG Hong-yu, HUANG Lin, et al
- (1398) Research progress in dual-targeted molecular imaging probes targeting integrin $\alpha_v\beta_3$ and immune checkpoint NRP-1
..... ZHOU Yu-xuan, GE Man-xuan, CAI Shu-yue, et al
- (1404) Quality evaluation and polysorbate 80 (Ⅱ) as a medicinal excipient
..... ZHANG Yue, LI Chang-liang, JIANG Yun, et al
- (1408) HPLC determination of content changes of the 4 components in cicada slough at different decoction time
..... CHEN Mei-ru, SUN Feng, GAO Song, et al
- (1412) PCR identification of Mongolian medicine bovine hearts and its quality standard improvement MA Ling, TANG Hui, LIU Le-le, et al
- (1418) Challenges for non-clinical safety evaluation of nasal drug delivery preparations
..... JIANG Zhi, LIU Xue-wu, YAO Fu, et al
- (1434) Entry points of pharmaceutical services in oral mucosal physician-pharmacist collaborative clinics
..... CHENG Hai-ting, LIU Hong-tao, FU Jie
- (1439) Population pharmacokinetic analysis and efficacy of nirmatrelvir in Chinese critically ill patients with severe COVID-19 infection
..... FU Rao, CHEN Jin-lan, TAN Ling, et al
- (1446) Safe medication and influential factors study among farmers and herdsmen in Ulanqab City of Inner Mongolia
..... LI Xue-fen, DU Yin-huan, ZHANG Ye-ye, et al
- (1452) Refined management of pre-screening rules for outpatient children's medication based on evidence-based medicine
..... ZHANG Hui-li, XU Zhen-zhen, TIAN Jing-hui, et al
- (1463) Quantitative evaluation standard index system for regional drug safety risks in elderly patients GE Yan-hui, DU Shu-zhang
- (1468) Quality supervision policy for laboratory developed tests in America and enlightenment for China WANG Zhen, LIANG Yi
- (1479) Mining and analysis of levofloxacin safety alert signals based on Spontaneous Reporting data from China Adverse Drug Reaction Monitoring
..... LIAO Wen-zhi, LIU Peng-cheng
- (1486) Literature analysis of adverse drug reactions after the listing of certolizumab pegol LI Qiao-ling, LIU Mao-chang, LIU Lin-hui, et al

研究论文

基于双噻吩结构的吡啶盐型光敏剂的设计、合成及体外抗肿瘤活性研究

董玮, 汪奎, 杨泽泰, 杨灵坤, 吴旭晨, 关静* (哈尔滨医科大学药学院有机化学教研室, 哈尔滨 150081)

摘要: **目的** 设计并合成一种基于双噻吩结构的吡啶盐型光敏剂 (TS2CNP-Me), 研究其光物理性质及体外抗肿瘤活性。**方法** 通过傅克酰基化反应、Knoevenagel 缩合反应、Suzuki-Miyaura 偶联反应、阳离子化反应合成一种具有 D- π -A 结构的新型有机 I/II 型光敏剂 TS2CNP-Me; 核磁共振氢谱、碳谱、质谱确定其分子结构; DFT 计算了解 TS2CNP-Me 的电子行为和系间窜越过程; 紫外可见吸收光谱法、荧光光谱法研究其光物理性质; ABDA、DHR123、HPF 分别评估 TS2CNP-Me 的 $^1\text{O}_2$ 、 $\text{O}_2 \cdot^-$ 、 $\cdot\text{OH}$ 生成能力; MTT 法检测其抗肿瘤活性。**结果** 通过核磁共振氢谱、碳谱、质谱确证其结构; 通过 DFT 计算, TS2CNP-Me 的 $\Delta E_{\text{S}_1\text{T}_1}$ 值为 0.5373 eV, 表明分子在 S_1 到 T_1 态之间存在系间窜越, 有助于高效生成活性氧; ABDA、DHR123 和 HPF 探针检测结果发现 TS2CNP-Me 相较于市售光敏剂孟加拉玫瑰红、亚甲基蓝具有更显著的光敏活性; MTT 实验结果表明, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TS2CNP-Me 对宫颈癌细胞 HeLa 生长抑制率高于 80%, 具有良好的光动力杀伤效果。**结论** 基于 D- π -A 结构, 成功合成了小分子有机光敏剂 TS2CNP-Me, 同时具备 I/II 型光敏剂的性质, 有良好的体外抗肿瘤活性。

关键词: 双噻吩; 吡啶盐; I/II 型光敏剂; 光物理性质; 体外抗肿瘤活性中图分类号: R914, R96 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)05-1177-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.001

Design, synthesis, and in vitro anti-tumor activity of pyridinium salt photosensitizer based on bithiophene structure

DONG Wei, WANG Kui, YANG Ze-tai, YANG Ling-kun, WU Xu-chen, GUAN Jing* (Department of Organic Chemistry, College of Pharmacy, Harbin Medical University, Harbin 150081)

Abstract: Objective To design and synthesize a bithiophene-based pyridine salt photosensitizer (TS2CNP-Me), and determine its photophysical properties and anti-tumor activity in vitro. **Methods** A novel organic I/II photosensitizer with D- π -A structure was synthesized by Friedel-Crafts acylation reaction, Knoevenagel condensation reaction, Suzuki-Miyaura coupling reaction and cationization reaction. The molecular structure was characterized by ^1H -NMR, ^{13}C -NMR and MS. DFT calculation was performed to investigate the electronic behavior and intersystem crossing process of TS2CNP-Me. UV-visible absorption and fluorescence spectra were used to assess its photophysical properties. The $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2 \cdot^-$ and $\cdot\text{OH}$ generating capacity of TS2CNP-Me was evaluated by ABDA, DHR123 and HPF, respectively. MTT assay was used to study its anti-tumor activity in vitro. **Results** The structure was confirmed by ^1H -NMR, ^{13}C -NMR and MS. According to the DFT calculation, the $\Delta E_{\text{S}_1\text{T}_1}$ value of TS2CNP-Me was 0.5373 eV, indicating an intersystem crossing over between S_1 and T_1 states, which was conducive to efficient generation of reactive oxygen species (ROS). The results of ABDA, DHR123 and HPF probes showed that TS2CNP-Me had stronger photosensitive

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.81601542); 哈尔滨医科大学药学院优秀青年人才资助项目 (No.2019-YQ-05); 黑龙江省博士后科研启动基金项目 (No.LBHQ21125)。

作者简介: 董玮, 女, 硕士, 主要从事有机药物合成及肿瘤学研究, email: dw3227220457@163.com *通信作者: 关静, 女, 副教授, 主要从事有机化学及药物合成化学的相关研究, email: guanjing@ems.hrbmu.edu.cn

activity than that of the commercial photosensitizers rose bengal (RB) and methylene blue (MB). MTT experiment showed that the growth inhibition rate of $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TS2CNP-Me on human cervical cancer cell HeLa was higher than 80%, with fairly good photodynamic killing effect. **Conclusion** Based on the D- π -A structure, the small-molecule organic photosensitizer TS2CNP-Me is successfully synthesized, possessing the properties of type I / II photosensitizers, and good anti-tumor activity in vitro.

Key words: bithiophene; pyridinium salt; type I / II photosensitizer; photophysical property; anti-tumor activity in vitro

宫颈癌是世界第四大最常见的肿瘤，是导致妇女死亡的主要原因之一^[1]，传统治疗方式主要是放疗、化疗、术疗等^[2]，但这些治疗方式在某种程度上对人体都会产生明显的毒副作用^[3]。与传统治疗方式相比，光动力疗法具有更多优势，如精准的时空控制、微创性以及高生物相容性等^[4]。光动力疗法主要是指在特定波长的光照条件下光敏剂吸收光子会产生活性氧 (ROS)，产生的 ROS 会对肿瘤细胞造成氧化损伤，从而引发细胞凋亡或坏死^[5-6]。

光动力疗法的三要素是光敏剂、光和氧气 (O_2)^[7]，其作用机制是在特定波长的光照射下，光敏剂吸收光子，从基态跃迁到单线激发态，单线激发态会经过内部能量转换到达单重激发态。单重激发态的光敏剂分子一部分会通过发出荧光或者放热的形式回到基态，另一部分会经过系间窜越 (ISC) 过程，到达寿命相对较长的三重激发态，从而产生两种促进 ROS 生成的途径 (I 型和 II 型)。I 型反应途径是三重激发态光敏剂分子通过电子转移产生羟自由基 ($\cdot\text{OH}$)、过氧化氢 (H_2O_2)、超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2 \cdot^-$)；II 型反应途径是三重激发态光敏剂分子经过能量转移，从基态分子氧 ($^3\text{O}_2$) 转变为高反应活性的单线态氧 ($^1\text{O}_2$)^[8]。II 型能量转移过程较 I 型电子转移过程快很多，但 II 型反应过度依赖氧，限制了其在缺氧肿瘤中的应用，而 I 型反应虽然在治疗缺氧肿瘤方面有优势，但其设计策略有限^[9-10]。因此，开发同时具备 I / II 型性质的光敏剂是一种寻求更高效肿瘤治疗方式的策略。

本研究主要是以双噻吩结构作为 π 桥，给电子基团三苯胺作为电子供体，吸电子基团氰基吡啶盐作为强电子受体，赋予光敏剂 TS2CNP-Me 以 D- π -A 结构，可以促进激发态的电荷分离，从而有助于减小单重激发态和三重激发态的能量差 (ΔE_{ST})，有利于 ISC，从而促进 ROS 的生成^[11]。研究还对 TS2CNP-Me 的光物理性质及抗肿瘤活性进行了初步研究。

1 材料

1.1 试剂

噻吩并 [3, 2-b] 噻吩 (HSSH)、N-溴代丁二

酰亚胺 (NBS)、烟酰氯盐酸盐、无水三氯化铝 (AlCl_3)、哌啶、碘甲烷、四氢呋喃 (THF, 安徽泽升科技有限公司, 分析纯), 二氯甲烷 (DCM)、石油醚 (PE)、乙酸乙酯 (EA) (天津市富宇精细化工有限公司, 分析纯), 甲醇 (西陇科学股份有限公司, 分析纯), 碳酸钾、氢氧化钠 (天津市凯通化学试剂有限公司), 氯化钠、无水硫酸钠 (天津市天力化学试剂有限公司), 丙二腈 (上海阿达玛斯试剂有限公司), 四氯化钛 (TiCl_4) (上海易恩化学技术有限公司), 4-(二苯基氨基) 苯硼酸、四 (三苯基膦) 钯 [$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$]、亚甲基蓝 (MB) (毕得医药科技有限公司), 二甲基亚砜 (DMSO) (中国 BioFroxx 公司), 孟加拉玫瑰红 (RB) (萨恩化学技术上海有限公司), 9, 10-蒽二基-双 (亚甲基) 二甲酸 (ABDA) (上海凇恩科技发展有限公司), 二氢罗丹明 123 (DHR123) (上海阿拉丁生化科技股份有限公司), 羧基荧光素 (HPF) (上海懋康生物科技有限公司), DMEM 高糖培养基 (美国 Gibco 公司), 人宫颈癌细胞 (HeLa) (武汉普诺赛生命科技有限公司), 胰酶细胞消化液、青霉素-链霉素溶液 (中国碧云天生物技术有限公司)。

1.2 仪器

数显加热磁力搅拌器 (德国艾卡公司), 旋转蒸发仪 (中国上海爱朗仪器有限公司), 核磁共振波谱仪 (德国布鲁克公司), 紫外可见分光光度计、荧光分光光度计 (中国岛津企业管理有限公司), 酶标仪 (瑞士 Tecan 公司)。

2 方法与结果

2.1 TS2CNP-Me 的合成 (合成路线见图 1)

2.1.1 中间体 HSSBr 的合成 将化合物 HSSH (1.0 g, 7.13 mmol) 溶于 DCM 中, 冰浴下分次加入 NBS (1.27 g, 7.13 mmol), 氩气保护, 反应过夜, 薄层色谱 (TLC) 监测反应完全。用旋转蒸发仪减压蒸馏除去有机溶剂, 得到粗产物。将粗产物通过硅胶柱层析分离, 洗脱剂为纯石油醚, 初步提纯得到目标产物 HSSBr。HSSBr 为白色固体, 收率为 83.17%。

2.1.2 中间体 BrSSPy 的合成 将中间体 HSSBr (500 mg, 2.28 mmol) 和烟酰氯盐酸盐 (610 mg, 3.42 mmol) 溶于二氯甲烷中, 剧烈搅拌下加入无水

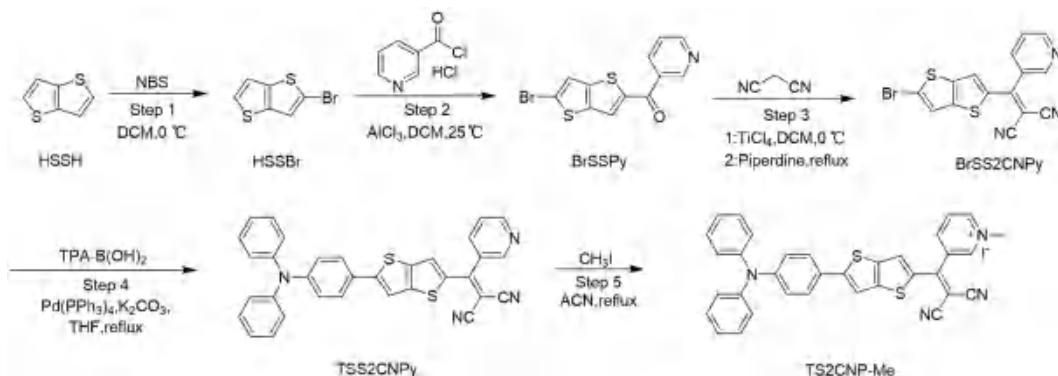


图 1 TS2CNP-Me 的合成路线

Fig 1 Synthesis route of TS2CNP-Me

三氯化铝 (1.52 g, 11.41 mmol), 氩气保护, 室温反应过夜, 次日 TLC 监测反应完全。将稀氢氧化钠溶液加至反应体系中, 搅拌后立即使用二氯甲烷、饱和食盐水进行分液, 有机相盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 加一层硅藻土干燥, 用旋转蒸发仪减压蒸馏除去有机溶剂, 得到粗产物。将粗产物通过硅胶柱层析 (洗脱剂: 石油醚-乙酸乙酯 = 3 : 1) 分离提纯得到目标产物 BrSSPy。BrSSPy 为黄色固体, 收率为 25.54%。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 9.09 (s, 1H), 8.84 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 8.17 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.50 (dd, J = 7.8, 4.8 Hz, 1H), 7.37 (s, 1H)。

2.1.3 中间体 BrSS2CNPpy 的合成 将中间体 BrSSPy (155 mg, 0.48 mmol) 和 丙二腈 (100 mg, 1.44 mmol) 溶于二氯甲烷中, 反应体系在冰浴下降温, 反应 10 min 之后加入 TiCl₄ (0.15 mL), 反应 30 min 后加入哌啶 (0.15 mL), 40 °C 回流反应 4 h, TLC 监测反应完全。使用二氯甲烷、水进行分液, 有机相盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 用旋转蒸发仪减压蒸馏除去有机溶剂, 得到粗产物。将粗产物通过硅胶柱层析 (洗脱剂: 二氯甲烷-甲醇 = 200 : 1) 分离, 初步提纯得到目标产物 BrSS2CNPpy。BrSS2CNPpy 为紫色固体, 收率为 53.7%。

2.1.4 中间体 TSS2CNPpy 的合成 将中间体 BrSS2CNPpy (126.3 mg, 0.34 mmol)、4-(二苯基氨基)苯硼酸 (118.5 mg, 0.41 mmol)、碳酸钾 (114.3 mg, 0.82 mmol) 和四(三苯基膦)钯 (16.2 mg, 0.014 mmol) 溶于四氢呋喃 (7 mL) 中, 置换氩气, 70 °C 回流反应 4 h, TLC 监测反应完全。用旋转蒸发仪减压蒸馏除去有机溶剂后, 使用二氯甲烷、水进行分液, 有机相盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 用旋转蒸发仪减压蒸馏除去有机溶剂, 得到粗产物。将粗产物通过硅胶柱层析 (洗脱剂: 石油醚-乙酸乙酯 = 3 : 1) 分离提纯得到目标产物 TSS2CNPpy。TSS2CNPpy 为紫色固体, 收率为 26%。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.85 ~ 8.83 (m, 2H), 8.10 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.93 (d, J =

6.4 Hz, 2H), 7.68 ~ 7.64 (m, 3H), 7.37 (t, J = 7.8 Hz, 4H), 7.15 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.11 (d, J = 8.4 Hz, 4H), 6.99 (d, J = 8.7 Hz, 2H)。

2.1.5 化合物 TS2CNP-Me 的合成 将中间体 TSS2CNPpy (64.5 mg, 0.12 mmol) 溶于乙腈中, 在氩气保护下加入碘甲烷 (150 μ L, 2.4 mmol), 87 °C 回流反应 2 h, TLC 监测反应完全。用旋转蒸发仪减压蒸馏除去有机溶剂, 得到粗产物。将粗产物通过硅胶柱层析 (洗脱剂: 二氯甲烷-甲醇 = 20 : 1) 分离提纯得到目标产物 TS2CNP-Me。TS2CNP-Me 为紫色固体, 收率为 77.31%。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.43 (s, 1H), 9.26 (d, J = 6.2 Hz, 1H), 8.95 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.43 (dd, J = 8.0, 6.2 Hz, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.67 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.37 (t, J = 7.9 Hz, 4H), 7.16 ~ 7.10 (m, 6H), 6.99 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 4.43 (s, 3H); ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 156.43, 155.22, 149.75, 148.89, 147.59, 146.25, 145.78, 145.51, 138.11, 136.66, 135.05, 134.36, 129.81, 128.13, 127.42, 125.66, 125.12, 124.32, 121.50, 115.62, 76.11, 54.90, 48.56, 40.05, 39.94, 39.80, 39.66, 39.52, 39.38, 39.24, 39.10。MALDI-TOF MS, m/z C₃₄H₂₃N₄S₂ 551.1。各结构表征谱图见图 2。

2.2 密度泛函理论计算

使用 Gaussian 16 程序, 在 B3LYP/6-31G 水平上对分子进行几何优化, 在 B3LYP/6-311G 水平上获得电子在最高占据分子轨道 (HOMO) 与最低未占据分子轨道 (LUMO) 上的分布。通过 TD-DFT 方法在 B3LYP/6-311G 水平上测定了分子 S₁ 和 T₁ 态的能量。如图 3 所示, TS2CNP-Me 的 HOMO 主要分布在三苯胺部分, LUMO 主要分布在吡啶盐部分, 这表明 TS2CNP-Me 存在有效的分子内电荷转移 (ICT 效应)。HOMO 和 LUMO 的值分别为 -5.25 eV 和 -3.20 eV, 从而计算出单线态与三线态能隙差为 2.05 eV, 相对窄的带隙会导致吸收波长红移以及较小的 ΔE_{SIT} 。此外, 通过计算得知,

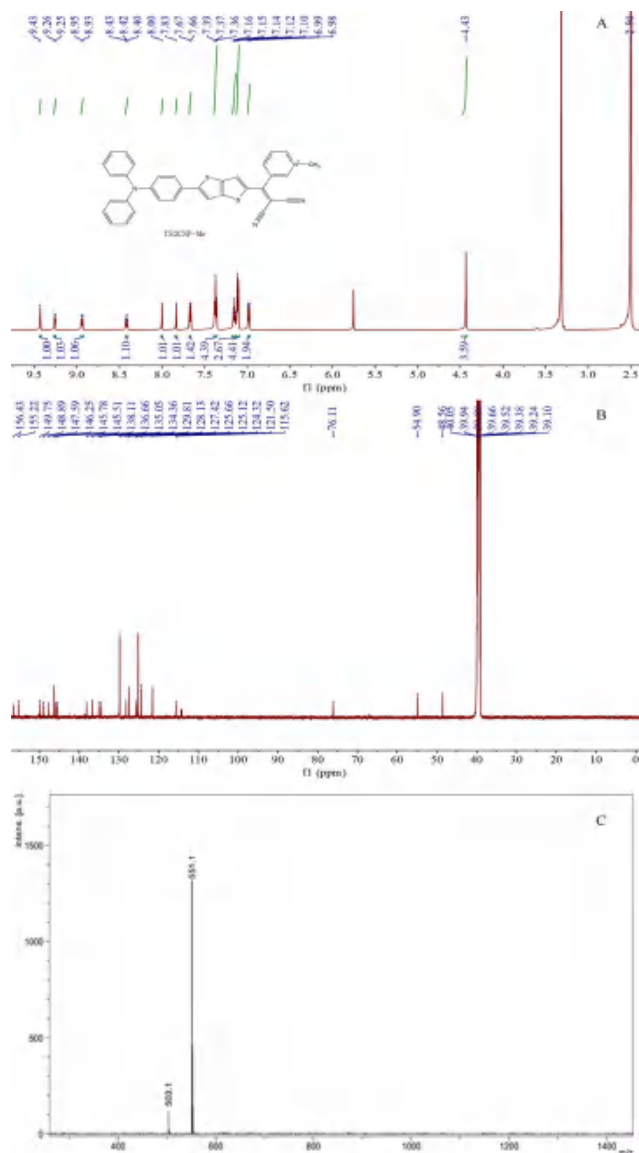


图2 TS2CNP-Me 结构表征

Fig 2 Structural characterization of TS2CNP-Me

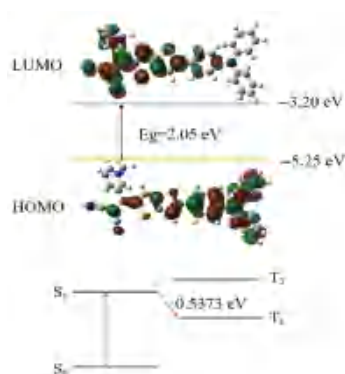
A. 核磁共振氢谱 (^1H -NMR spectra); B. 核磁共振碳谱 (^{13}C -NMR spectra); C. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS spectra)

TS2CNP-Me 的 S_1 和 T_1 分别为 1.8445 eV 和 1.3072 eV, 其 ΔE_{SIT1} 为 0.5373 eV, 表明其在 S_1 态到 T_1 态之间存在有效的 ISC 过程, 有利于 ROS 生成。

2.3 紫外-可见吸收光谱法

使用紫外-可见分光光度计对 TS2CNP-Me 进行表征, 将 TS2CNP-Me 分别溶于 DCM、DMSO 和磷酸盐缓冲液 (PBS) 中, 终浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 在 $300 \sim 800 \text{ nm}$ 内对溶液进行紫外-可见吸收测试, 其在 DCM、DMSO、PBS 中的紫外-可见吸收光谱如图 4 所示, 随着溶剂极性的增强, 从 DCM 到 PBS, TS2CNP-Me 的吸收蓝移, 表明 TS2CNP-Me 具有很强的分子内电荷转移 (ICT) 效应, 符合理论计算结果。

2.4 产生 ROS 性能检测

图3 TS2CNP-Me 在基态 (S_0) 下的前沿分子轨道图及 TS2CNP-Me 可能的 ISC 途径Fig 3 Frontier molecular orbital diagram of TS2CNP-Me in their ground state (S_0) and possible ISC channels for TS2CNP-Me

DHR123 和 HPF 分别用于检测 $\text{O}_2 \cdot^-$ 和 $\cdot\text{OH}$, 为 I 型 ROS 检测试剂; ABDA 用于检测 $^1\text{O}_2$, 为 II 型 ROS 检测试剂。

2.4.1 $\text{O}_2 \cdot^-$ 测试 采用 DHR123 考察 TS2CNP-Me 和市售光敏剂 MB 在相同光照条件下 $\text{O}_2 \cdot^-$ 的产生性能。将 DHR123 溶于 PBS 中, 使其终浓度为 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 向含 DHR123 的 PBS 溶液中加入 MB、TS2CNP-Me 的母液, 使得光敏剂 MB、TS2CNP-Me 的终浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 在白光下照射 ($5 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$), 并收集不同光照时间下 525 nm 处的荧光光谱。从图 5 中可以观察到, 随着光照时间的延长, 可以观察到含有 TS2CNP-Me 和 MB 的 DHR123 溶液在 525 nm 处荧光光谱吸收峰显著增强, 而只含有 DHR123 的溶液荧光光谱吸收峰无明显变化, 表明 TS2CNP-Me 和 MB 都具有良好的产生 $\text{O}_2 \cdot^-$ 能力。TS2CNP-Me 和 MB 与空白 DHR123 在 525 nm 处荧光相对强度对比图, 相较于 MB, TS2CNP-Me 具有更高的 $\text{O}_2 \cdot^-$ 生成能力。

2.4.2 $\cdot\text{OH}$ 测试 采用 HPF 考察 TS2CNP-Me 与 HPF 自身在相同光照条件下的 $\cdot\text{OH}$ 产生性能。将 HPF 溶于 PBS 中, 向 HPF 的 PBS 溶液中加入 TS2CNP-Me 的母液, 使得光敏剂 TS2CNP-Me 的终浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 在白光下照射 ($5 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$), 并收集不同光照时间下 515 nm 处的荧光光谱。从图 6 中可以观察到, 随着光照时间的延长, 将含有 TS2CNP-Me 的 HPF 溶液置于荧光光谱仪中检测, 可以观察到在 515 nm 处荧光光谱吸收峰显著增强, 而只有 HPF 的溶液荧光光谱吸收峰无明显变化, TS2CNP-Me 具有优异的 $\cdot\text{OH}$ 产生能力, TS2CNP-Me 与空白 HPF 在 515 nm 处荧光相对强度对比图, 相较于 HPF 自身, TS2CNP-Me 具有更高的 $\cdot\text{OH}$ 生成能力。

2.4.3 $^1\text{O}_2$ 测试 采用 ABDA 考察 TS2CNP-Me 和市售光敏剂 RB 在相同光照条件下的 $^1\text{O}_2$ 产生性能。ABDA 与 $^1\text{O}_2$ 反应时, ABDA 的吸光度降低。在黑暗条件下将 ABDA ($60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 与 TS2CNP-Me 或 RB 溶液

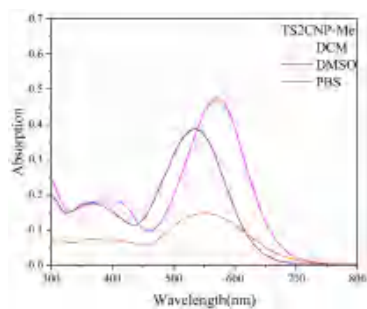


图 4 TS2CNP-Me 在不同溶剂中的紫外吸收

Fig 4 Absorption spectra of TS2CNP-Me

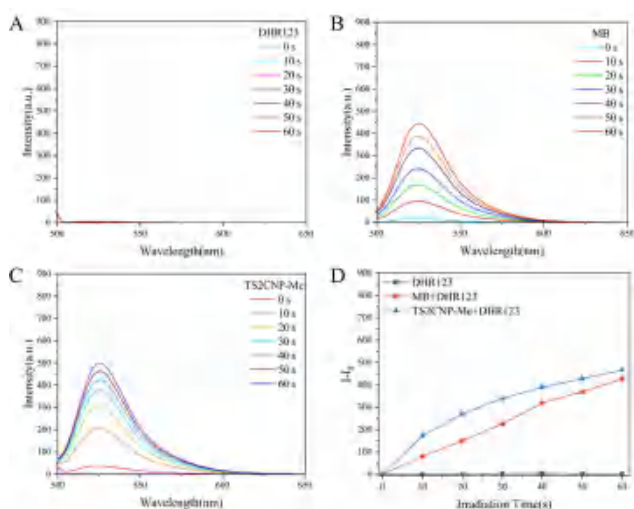


图 5 光照条件下 DHR123 探针加入光敏剂后的荧光光谱

Fig 5 Fluorescence spectrum of DHR123 probe after adding photosensitizer under light conditions

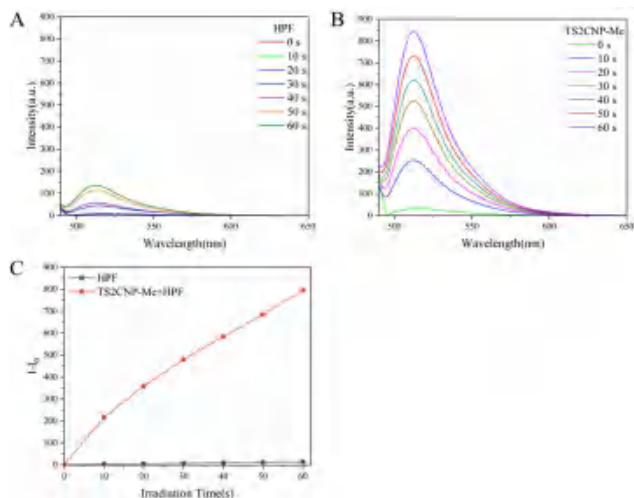


图 6 光照条件下 HPF 探针加入光敏剂后的荧光光谱

Fig 6 Fluorescence spectrum of HPF probe after adding photosensitizer under light conditions

混合,使得光敏剂的终浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,用白光照射 ($5 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$),每次照射间隔一定时间后,立即记录溶液吸光度,通过 378 nm 处的吸光度下降情况来监测 ABDA 的分解情况。从图 7 中可以观察到,随着光照时间的延长,将含有 TS2CNP-Me 的 ABDA 溶

液置于紫外-可见分光光度计中检测,含有 TS2CNP-Me、RB 的 ABDA 溶液特征吸收峰随着光照时间的延长而下降,在 ABDA 溶液吸收峰无明显变化。如图 7A ~ 7C 所示,在白光照下,RB 和 TS2CNP-Me 均能产生 $^1\text{O}_2$,通过图 7D 所示,TS2CNP-Me、RB 与 ABDA 纯溶液在 378 nm 的吸光度对比图可以明显看出 TS2CNP-Me 产生 $^1\text{O}_2$ 的效率远超过 RB。说明 TS2CNP-Me 是同时具有 I / II 型性质的光敏剂。

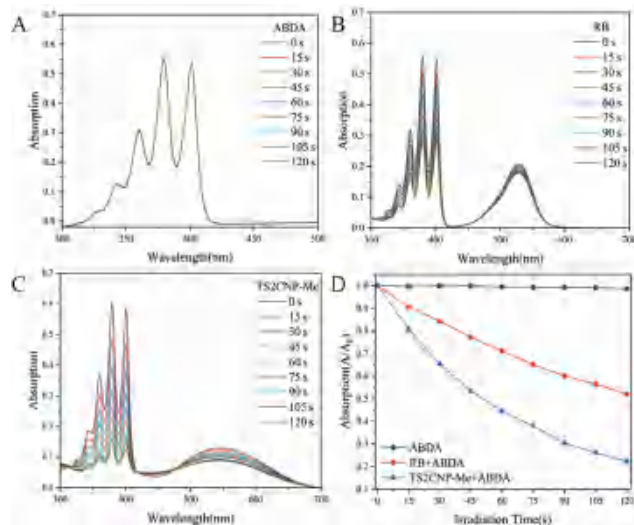


图 7 光照条件下 ABDA 探针加入光敏剂后的紫外-可见吸收光谱

Fig 7 UV-Vis absorption spectra of ABDA probe after adding photosensitizer under light conditions

2.5 体外抗肿瘤活性检测

将 HeLa 细胞悬液均匀铺于两块 96 孔细胞培养板中,待 24 h 细胞贴壁后,向对照组 HeLa 细胞加入不含血清的 DMEM 培养基,向实验组 HeLa 细胞加入含不同浓度 TS2CNP-Me 的不含血清的 DMEM 培养基。12 h 后吸弃培养基,加入新鲜培养基,其中一块置于孵箱中避光孵育 4 h,另一块对其白光照射 ($40 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$, 10 min),再置于孵箱中避光孵育 4 h。使用酶标仪进行 MTT 实验,检测其在 562 nm 下的吸光度值。结果如图 8 所示,阳离子性质会导致 TS2CNP-Me 具有一定的暗毒性,在白光照射下 ($40 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$, 10 min),HeLa 细胞活力随光敏剂 TS2CNP-Me 浓度的增加而降低,对肿瘤细胞具有良好的杀伤能力。

2.6 统计学结果分析

采用 GraphPad Prism 9.0.0 统计软件分析,计量数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 说明差异具有统计学意义。

3 讨论

宫颈癌是全球影响女性健康的第二大常见恶性肿瘤^[12]。每年有超过 500 000 例宫颈癌新发病例和约 250 000 例宫颈癌死亡病例,其中 80% 发生在发展中国家^[13]。由于非特异性靶向,手术、放

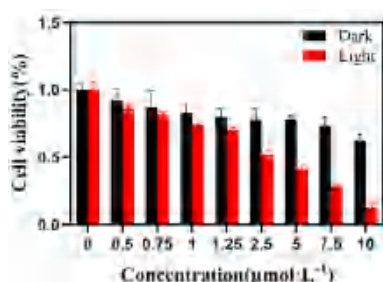


图 8 不同浓度 TS2CNP-Me 对 HeLa 细胞的细胞毒性

Fig 8 HeLa cytotoxicity of TS2CNP-Me at different concentrations

疗和化疗等传统治疗技术通常治疗效果不佳,会产生相当大的不良反应^[14]。光动力疗法作为一种新兴治疗方法,已被应用于宫颈癌治疗。然而,低氧肿瘤微环境削弱了氧依赖性的光动力疗法作用,因此亟须开发一种同时具有 I / II 型性质的光敏剂。

本文以三苯胺作为强给电子基团,双噻吩作为 π 桥,增加了共轭长度,氰基吡啶盐部分作为电子受体基团,设计并合成了 D- π -A 型光敏剂 TS2CNP-Me;通过氢谱、碳谱、质谱验证其结构正确;通过 DFT 和 TD-DFT 理论计算结果可知,TS2CNP-Me 的 HOMO 和 LUMO 完全分离, ΔE_{SITI} 数值很小,意味着 TS2CNP-Me 具有极强的 ISC 过程,从而促进 ROS 生成;通过紫外-可见吸收光谱法可知,随着溶剂极性增大,吸收波长蓝移,说明 TS2CNP-Me 具有很强的 ICT 效应,与理论计算结果相符,且其光稳定性良好;分别使用 DHR123、HPF、ABDA 评估 TS2CNP-Me 的 $\text{O}_2 \cdot^-$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 $^1\text{O}_2$ 生成能力,TS2CNP-Me 在白光照射下均可以高效生成三种不同的自由基,且产生效率均高于商用光敏剂 MB 和 RB,说明其能同时产生 I 型和 II 型 ROS,有良好的应用前景。对 TS2CNP-Me 进行体外抗肿瘤活性检测,结果表明,其对宫颈癌 HeLa 细胞具有良好的杀伤效果。本研究仅在体外水平初步验证了 TS2CNP-Me 的活性,进一步的体内活性研究将在后续进行。

4 结论

基于 D- π -A 结构,本研究设计并合成一种小分子有机光敏剂 TS2CNP-Me,具有较小的 ΔE_{SITI} ,为 0.5373 eV,具有高效的 ISC,可以促进 ROS 生成。TS2CNP-Me 同时具有 I / II 型光敏剂的性质,有良好的体外抗肿瘤活性,在未来的宫颈癌疾病治疗中具有潜在的临床应用价值。

参考文献

- [1] Liang ML, Sheng LY, Ke YM, et al. The research progress on radiation resistance of cervical cancer [J]. *Front Oncol*, 2024, 14: 1380448.
- [2] Cao YF, Si JL, Zheng MJ, et al. X-ray-responsive prodrugs and polymeric nanocarriers for multimodal cancer therapy [J]. *Chem Commun*, 2023, 59 (54): 8323-8331.
- [3] Zeng YY, Gao YJ, He LM, et al. Smart delivery vehicles for cancer: categories, unique roles and therapeutic strategies [J]. *Nanoscale Adv*, 2024, 6 (17): 4275-4308.
- [4] Celli JP, Spring BQ, Rizvi I, et al. Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization [J]. *Chem Rev*, 2010, 110 (5): 2795-2838.
- [5] Chen YZ, Ai WT, Guo X, et al. Mitochondria-targeted polydopamine nanocomposite with AIE photosensitizer for image-guided photodynamic and photothermal tumor ablation [J]. *Small*, 2019, 15 (30): e1902352.
- [6] Wang S, Wang X, Yu LM, et al. Progress and trends of photodynamic therapy: from traditional photosensitizers to AIE-based photosensitizers [J]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2021, 34: 102254.
- [7] Zhao WC, Wang LQ, Zhang MH, et al. Photodynamic therapy for cancer: mechanisms, photosensitizers, nanocarriers, and clinical studies [J]. *MedComm*, 2024, 5 (7): e603.
- [8] Kar B, Das U, Roy N, et al. Recent advances on organelle specific Ru (II) / Ir (III) / Re (I) based complexes for photodynamic therapy [J]. *Coord Chem Rev*, 2023, 474: 214860.
- [9] Li CL, Li J, Pang YD, et al. Harnessing donor cyclization strategy: converting type II to type I photosensitizers and enhancing AIE performance for NIR- II FL/MR imaging-guided photodynamic therapy under hypoxia condition [J]. *Chem Eng J*, 2024, 498: 155471.
- [10] Jiang JA, Lv XY, Cheng HJ, et al. Type I photodynamic antimicrobial therapy: principles, progress, and future perspectives [J]. *Acta Biomater*, 2024, 177: 1-19.
- [11] Wu XP, Zhu ZR, Liu ZX, et al. Tricyano-methylene-pyridine based high-performance aggregation-induced emission photosensitizer for imaging and photodynamic therapy [J]. *Molecules*, 2022, 27 (22): 7981.
- [12] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65 (2): 87-108.
- [13] Habtemariam LW, Zewde ET, Simegn GL. Cervix type and cervical cancer classification system using deep learning techniques [J]. *Med Devices (Auckl)*, 2022, 15: 163-176.
- [14] Yadav R, Das PP, Sharma S, et al. Recent advancement of nanomedicine-based targeted delivery for cervical cancer treatment [J]. *Med Oncol*, 2023, 40 (12): 347.

(收稿日期: 2024-10-05; 修回日期: 2024-12-05)

基于 BTLA/HVEM 通路研究茯苓多糖对免疫抑制小鼠的免疫调节作用

房悦¹, 黄佳静¹, 张越^{1, 2}, 张艳艳⁵, 王雷^{1, 2, 3}, 俞年军^{1, 2, 4}, 彭代银^{1, 2, 3, 4}, 陈卫东^{1, 2, 3, 4*}, 王妍妍^{1, 2*} (1. 安徽中医药大学, 合肥 230012; 2. 省部共建安徽道地中药材品质提升协同创新中心, 合肥 230012; 3. 中药复方安徽省重点实验室, 合肥 230012; 4. 中药资源保护与开发研究所, 合肥 230012; 5. 安徽中医药大学第一附属医院, 合肥 230031)

摘要: **目的** 探讨茯苓多糖 (PCP) 对免疫抑制小鼠的免疫调节作用及其潜在机制。**方法** 采用物理化学方法分析 PCP, 并进行结构表征; 建立环磷酰胺 (CTX) 诱导的免疫抑制小鼠模型, 评价 PCP 对免疫抑制模型小鼠免疫器官、免疫细胞和免疫因子的调节作用。**结果** PCP 分子量约为 13.10 kDa, 主要由半乳糖、葡萄糖、甘露糖、岩藻糖组成。PCP 对 CTX 诱导的免疫抑制小鼠具有免疫保护作用。PCP 能增加免疫抑制模型小鼠体重, 改善其脾脏和胸腺损伤, 提高脏器指数; 能提高 T 淋巴细胞 CD4⁺/CD8⁺ 比值, 提高小鼠血清白细胞介素 (IL)-2、IL-4、IL-10、IL-12、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和干扰素- γ (IFN- γ) 的表达; 能降低免疫抑制小鼠脾脏组织中 B/T 淋巴细胞弱化因子 (BTLA) 和疱疹病毒侵入介质 (HVEM) 的表达, 促进 T 淋巴细胞的增殖和分化。**结论** PCP 可能通过抑制 BTLA/HVEM 通路, 提高免疫抑制小鼠的免疫功能, 本研究提示 PCP 可作为新型免疫调节剂进行深入研究。

关键词: 茯苓多糖; 环磷酰胺; 免疫调节剂; BTLA/HVEM

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)05-1183-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.002

Immunomodulatory effect of *Poria cocos* polysaccharides on immunosuppressed mice based on the BTLA/HVEM pathway

FANG Yue¹, HUANG Jia-jing¹, ZHANG Yue^{1, 2}, ZHANG Yan-yan⁵, WANG Lei^{1, 2, 3}, YU Nian-jun^{1, 2, 4}, PENG Dai-yin^{1, 2, 3, 4}, CHEN Wei-dong^{1, 2, 3, 4*}, WANG Yan-yan^{1, 2*} (1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. MOE-Anhui Joint Collaborative Innovation Center for Quality Improvement of Anhui Genuine Chinese Medicinal Materials, Hefei 230012; 3. Anhui Key Laboratory of Chinese Medicinal Formula, Hefei 230012; 4. Institute of Traditional Chinese Medicine Resources Protection and Development, Hefei 230012; 5. The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031)

Abstract: **Objective** To determine the immunoregulatory effect of *Poria cocos* polysaccharide (PCP) on immunosuppressed mice and its potential mechanism. **Methods** The structure of PCP was characterized with physical and chemical methods. The immunosuppressed mouse model induced by cyclophosphamide (CTX) was established to evaluate the regulatory effects of PCP on the immune organs, immune cells and immune factors in immunosuppressed model mice. **Results** The molecular weight of PCP was about 13.10 kDa, mainly composed of galactose, glucose, mannose and fucose. PCP exerted a protective effect on CTX-induced immunosuppressed mice by increasing the body weight, improving the spleen and thymus damage,

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No. 82073923); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (No. 82204748); 中华中医药学会青年人才托举工程项目 (No. CACM-2022-QNRC2-B03); 高水平中医药重点学科建设项目 (国中医药人教函 [2023]85 号); 安徽省教育厅自然科学重点项目 (No. 2022AH050512); 安徽省高校科研计划项目团队项目 (No. 2022AH010036)。

作者简介: 房悦, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药药理学研究, email: 2993457779@qq.com ***通信作者:** 陈卫东, 男, 博士生导师, 主要从事药代动力学、药剂学方面的研究, email: wdchen@ahtcm.edu.cn; 王妍妍, 女, 硕士研究生导师, 主要从事中药药代动力学方面的研究, email: wangyanyan@ahtcm.edu.cn

and enhancing the organ index. It elevated the proportion of $CD4^+$ / $CD8^+$ T lymphocytes, and increased the expression of interleukin (IL)-2, IL-4, IL-10, IL-12, tumor necrosis factor- α and interferon- γ in the serum of mice. PCP reduced the expression of B and T lymphocyte attenuator and herpesvirus entry mediator in the spleen tissue of immunosuppressed mice, and promoted the proliferation and differentiation of T lymphocytes. **Conclusion** PCP may improve the immune function in immunosuppressed mice by inhibiting BTLA/HVEM pathway, suggesting the potential of PCP as a new immunomodulator.

Key words: *Poria cocos* polysaccharide; cyclophosphamide; immunity; BTLA/HVEM

现代医学研究表明,人体超过 90% 以上的疾病与免疫系统失调有关,在免疫系统的免疫反应过程中,免疫细胞与免疫因子相互作用,促进或抑制免疫反应,以维持系统的免疫平衡^[1]。T 淋巴细胞是主要的免疫细胞,在人体内执行细胞免疫功能,T 淋巴细胞的活化需要共刺激分子或共抑制分子参与,B/T 淋巴细胞弱化因子(BTLA)作为一种新型的免疫抑制共刺激分子受体,是免疫调节和免疫相关疾病方面的研究热点之一^[2]。BTLA 的激活抑制 T 淋巴细胞增殖,并抑制 $CD3^+$ 介导的白细胞介素(IL)-10 和干扰素(IFN)- γ 的分泌^[3]。BTLA 的配体——疱疹病毒侵入介质(HVEM),是肿瘤坏死因子受体超家族的成员,BTLA 和 HVEM 组合介导的广泛而强大的免疫效应在免疫调节活性中起着至关重要的作用^[4]。

茯苓为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw) Wolf 的干燥菌核,主要含有多糖、三萜类、甾醇等成分^[5]。活性多糖具有抗肿瘤、抗氧化、免疫调节等作用^[6-8],被认为是生物免疫调节剂,可以多靶点、多位点、多方向调节机体的免疫功能^[9]。与合成化学药物相比,天然多糖具有增强免疫功能、安全性更高等优点,具有临床应用潜力。课题组前期研究表明茯苓多糖(PCP)可改善小鼠肠道的生理状态、免疫屏障功能^[10]。同时,经筛选 PCP 免疫多糖活性组分,解析其免疫调节作用的构效关系,论证了其对于巨噬细胞的免疫激活作用^[11]。相关研究表明,PCP 能够促进 T 淋巴细胞增殖,发挥细胞免疫作用,但 PCP 具体如何促进 T 淋巴细胞增殖的机制尚不明确^[12]。

本研究旨在进一步对 PCP 结构进行表征,探究 PCP 对免疫抑制小鼠免疫功能的影响,并探讨其作用机制,为 PCP 免疫调节活性机制的深入研究及应用提供参考。

1 材料

1.1 动物

SPF 雄性 BALB/c 小鼠,8 周龄,体重(20±2)g [杭州子源实验动物科技有限公司,动物许可证号:SCXK(浙)2021-0004]。实验经安徽中

医药大学实验动物伦理委员会审核并批准(批件号:AHUCM-MOUSE-2021033)。实验过程中保持室温 20~25℃,湿度 50%~60%,12 h 光照周期循环,允许自由饮水、进食。

1.2 试剂

茯苓[安徽省金寨县,经安徽中医药大学老年军教授鉴定为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw) Wolf 的干燥菌核];普通透析袋(3500 Da,批号:MD3555,上海源叶生物科技有限公司);香菇多糖片(LNT,批号:2203010,湖北广仁药业有限公司);环磷酰胺(CTX,批号:H2124176,阿拉丁生化科技股份有限公司);IFN- γ (批号:JYM0540)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α ,批号:JYM0218)、IL-2 (批号:JYM0010)、IL-4 (批号:JYM0011)、IL-10 (批号:JYM0005)、IL-12 (批号:JYM0550)酶联免疫吸附试剂盒(武汉基因美生物科技有限公司);改良 RPMI 培养基[格来赛生命科技(上海)有限公司];FITC CD3e 抗体、APC CD49b 抗体、PerCP Ly-6G 抗体[安诺伦(北京)生物科技有限公司];BTLA、HVEM (武汉贝茵莱生物科技有限公司)。

1.3 仪器

CFX Connect 型荧光定量 PCR 仪、ChemiDoc 型化学发光仪[伯乐生命医学产品(上海)有限公司];EPS300 型电泳仪、VE-186 型转膜仪(上海天能科技有限公司);BDFACSCelesta 型流式细胞仪(美国 BD 公司);Quattro S 型扫描电镜、Ultimate3000 型高效液相色谱仪、NanoDrop2000 型微量分光光度计(美国赛默飞公司)。

2 方法

2.1 PCP 的制备

根据课题组前期建立的方法制备 PCP^[13]。用 95% 乙醇对烘干后的茯苓粉末脱脂,经水提醇沉后,采用 Sevag 法除蛋白,经蒸馏水透析、冷冻干燥后即得 PCP。

2.2 PCP 的结构表征

2.2.1 PCP 总多糖和总蛋白含量测定 总多糖含量测定采用苯酚-硫酸法^[14],总蛋白含量测定采

用考马斯亮蓝法^[15]。

2.2.2 红外光谱分析 PCP 粉末与溴化钾混合, 研磨, 压成薄片, 用波长范围为 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ 的傅里叶红外光谱扫描。

2.2.3 分子量测定 根据课题组前期建立的方法, 采用凝胶排阻色谱测定 PCP 的分子量^[13]。

2.2.4 单糖组成分析 精密称取 PCP 样品 5 mg, 加入 1 mL 三氟乙酸 (TFA) 溶液, 121°C 加热 2 h, 氮气吹干, 加 3 mL 甲醇清洗, 氮气吹干, 重复甲醇清洗 2~3 次, 加入 5 mL 无菌水使其溶解, 转移至色谱瓶中进行检测。使用 Thermo U3000 液相色谱系统, 色谱柱为 ZORBAX Eclipse XDB-C18 ($5 \mu\text{m}$, $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$), 波长 250 nm , 流动相为磷酸盐缓冲液 (PBS) - 乙腈 = 84:16 (V/V), 流速为 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 30°C 。

2.2.5 扫描电子显微镜和原子力显微镜分析 PCP 粉末经喷金制样, 置于扫描电镜下, 在放大 5 万倍和 1 万倍的视野下进行观察; PCP 溶液滴在云母片表面, 通过原子力显微镜观察多糖的形态和构象。

2.3 分组、模型建立及给药

将 45 只小鼠随机分为正常组、模型组、PCP $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组、PCP $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组、阳性药组 (LNT $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。适应性喂养结束后, PCP 组和阳性药组分别灌胃给予相应剂量的 PCP 和 LNT, 预防免疫抑制, 正常组、模型组给予等量生理盐水, 共计 14 d。在给药的第 4、8 和 12 日, 除正常组外, 所有小鼠均腹腔注射 CTX ($60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 诱导小鼠免疫抑制模型, 正常组小鼠注射等量生理盐水。

2.4 胸腺和脾脏指标的测定

2.4.1 胸腺和脾脏指数 给药结束后, 颈椎脱臼处死小鼠, 分离小鼠胸腺和脾脏并称重。计算脏器指数: 胸腺或脾脏指数 = 胸腺或脾脏重量 (mg) / 体重 (g)。

2.4.2 胸腺和脾脏病理学检查 取小鼠脾脏和胸腺固定于 4% 多聚甲醛中, 石蜡包埋, 切片后进行苏木精 - 伊红 (HE) 染色, 生物光学显微镜下观察其病理变化。

2.5 白细胞、淋巴细胞和中性粒细胞计数

给药 14 d 后, 小鼠眼眶取血, 全血置于抗凝管中充分混匀, 立即转移至全自动血液分析仪检测分析 PCP 对白细胞 (WBC)、淋巴细胞 (LYM) 和中性粒细胞 (NE) 的影响。

2.6 免疫细胞的表达

取小鼠脾脏, 加入适量 PBS, 置 200 目滤网上研磨, 4°C 、 $2500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清液, 红细胞裂解液裂解红细胞, 离心, 弃去上清

液, 加入 1 mL PBS 重悬得单细胞悬液, 加入适量抗体, 混匀, 避光孵育 30 min, 离心弃上清液, 加入 $300 \sim 500 \mu\text{L}$ PBS 重悬, 将样本转移至流式管, 上机检测。利用流式细胞检测仪分别检测小鼠脾脏 T 细胞 ($\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$)、中性粒细胞 (Ly-6G) 以及 NK 细胞 ($\text{CD3}^+/\text{CD49}^+$) 免疫表型。

2.7 血清、胸腺和脾脏中 IL-2、IL-4、IL-10、IL-12、TNF- α 、IFN- γ 水平测定

小鼠眼眶取血, 室温静置 30 min, 离心 ($3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min, 4°C), 取上清液; 小鼠胸腺/脾脏组织和生理盐水按照 1:9 的比例研磨, 取上清液, 备用。按照酶联免疫吸附测定试剂盒说明书的操作步骤, 测定血清、胸腺和脾脏中 IL-2、IL-4、IL-10、IL-12、TNF- α 和 IFN- γ 的水平。

2.8 Western blot 检测脾脏组织中 BTLA、HVEM 蛋白表达水平

取 $50 \sim 100 \text{ mg}$ 脾脏组织, 液氮研磨, 按照组织:裂解液 = 1:9 的比例加入裂解液, 提取总蛋白。采用 BCA 法测定蛋白浓度, 按 4:1 加入上样缓冲液, 100°C 金属浴样品 10 min, 用 10% SDS-PAGE 分离蛋白样品, 并转移至聚偏二氟乙烯膜 (PVDF) 上, 经脱脂牛奶封闭后转移至 GAPDH (1:1000)、BTLA (1:1000)、HVEM (1:500) 一抗中孵育过夜, 再将膜放入对应二抗 (1:10 000) 中, 室温孵育 2 h。最后, 用增强型 ECL 试剂检测抗原抗体复合物, 使用 Image J 软件进行灰度值分析。

2.9 qRT-PCR 检测脾脏组织中 BTLA、HVEM 表达水平

使用 TRIZOL 从脾脏组织中分离总 RNA, 并通过逆转录试剂盒获得 cDNA。SYBR Premix ExTaqTM 用于扩增和分析 cDNA 片段, 以确定基因表达变化。通过 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法进行数据分析。

2.10 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 PCP 的结构表征

课题组研究表明, PCP 的得率为 0.7%, 总多糖含量为 $(85.82 \pm 0.10)\%$ ^[10, 13]。PCP 的红外光谱如图 1A 所示, 在 3401 cm^{-1} 处有一个明显的强峰, 对应于样品中的 O-H 拉伸振动, 在 2917 cm^{-1} 处有一个特征吸收峰, 对应于样品中的 C-H 拉伸振动。 1645 cm^{-1} 处对应于羰基中的 C=O 拉伸振动。 1390 cm^{-1} 处的特征吸收峰对应于 $-\text{CH}_2$ 的拉伸振动。 $1000 \sim 1200 \text{ cm}^{-1}$ 区域的吸收峰代表 C-O-H 或 C-O-C 的拉伸振动。红外光谱的结果表明 PCP

具有多糖的特征峰。测得其分子量约为 13.10 kDa，分散系数为 1.16，趋近 1，可认为其具有较窄的分子量分布。通过与单糖对照品（见图 1B）进行比较计算，PCP 是一种杂多糖，主要由甘露糖、葡萄糖、半乳糖和岩藻糖组成，摩尔分数分别为 15.64%、26.88%、30.56% 和 25.88%。PCP 的主要单糖组成是半乳糖，这表明其主链可能由半乳糖构成。扫描电镜结果显示，PCP 的微观结构呈不规则的网状结构，并存在一些孔隙，多糖结构无定形（见图 1C）。利用原子力显微镜对 PCP 的聚集形态和分子构象进行分析，结果表明 PCP 的平均垂直厚度为 $-20 \sim 20$ nm（见图 1D ~ 1E）。

3.2 PCP 对免疫抑制模型小鼠免疫器官的影响

实验方案见图 2A，在给药的第 4、8 和 12 日，除正常组外，所有小鼠均腹腔注射 CTX 建立免疫抑制模型小鼠。PCP 和 LNT 干预后 CTX 诱导的免疫抑制模型小鼠体重明显增加，其中，PCP 300 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组效果更为显著（ $P < 0.05$ ）（见图 2B）。由图 2C ~ 2D 可见：模型组小鼠胸腺和脾脏指数明显降低，PCP 和 LNT 能显著上调小鼠胸腺和脾脏指数（ $P < 0.001$ ）。与正常组相比，CTX 模型组小鼠脾细胞和胸腺细胞的数量减少，坏死面积增加，白色髓质和红色髓质之间的边界不清楚，PCP 和 LNT 组小鼠的脾细胞和胸腺细胞排列紧密有序，与正常组细胞排列接近（见图 2E ~ 2F）。以上结果提示，PCP 可减轻 CTX 诱导的小鼠脾脏和胸腺损伤。

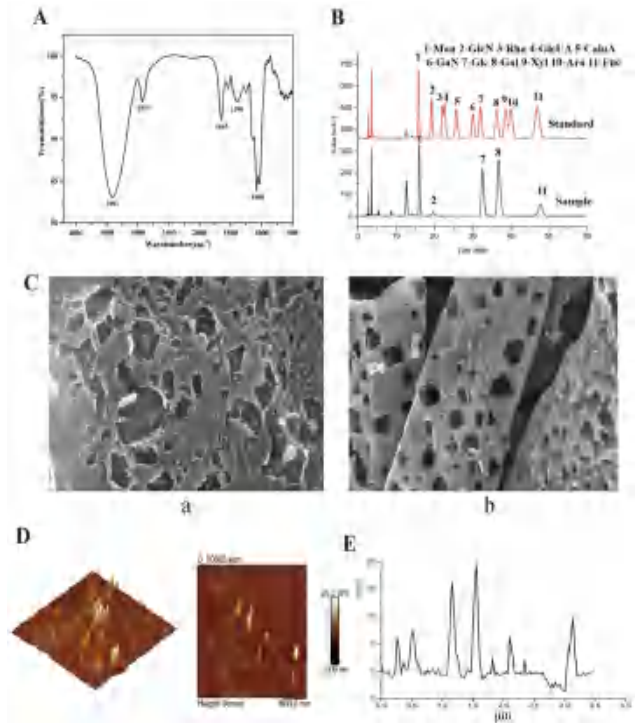


图 1 PCP 的结构表征

Fig 1 Structural characterization of PCP

A. 红外图谱 (FT-IR profile); B. 单糖组成 (monosaccharide composition): 1. 甘露糖 (Man), 2. 氨基葡萄糖盐酸盐 (GlcN), 3. 鼠李糖 (Rha), 4. 葡糖醛酸 (Glc-UA), 5. 半乳糖醛酸 (Gal-UA), 6. 氨基半乳糖盐酸盐 (GalN), 7. 葡萄糖 (Glc), 8. 半乳糖 (Gal), 9. 木糖 (Xyl), 10. 阿拉伯糖 (Ara), 11. 岩藻糖 (Fuc); C. 扫描电镜图 (SEM a: $\times 50$, b: $\times 10$); D、E. 原子力显微镜图 (AFM images)

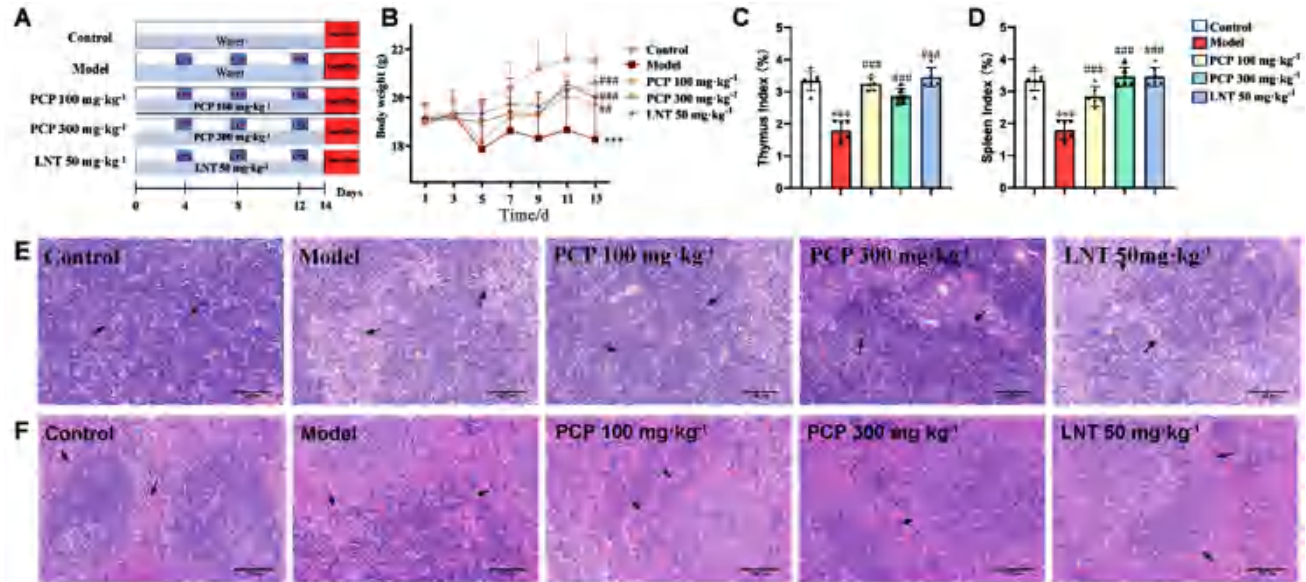


图 2 PCP 对免疫抑制小鼠免疫器官的影响

Fig 2 Effect of PCP on immune organs in immunosuppressed mice

A. 免疫抑制模型诱导和 PCP/LNT 给药的示意图 (schematic diagram of immunosuppressed model induction and PCP/LNT administration); B. 小鼠的体重 (body weight of mice); C. 胸腺指数 (thymus index); D. 脾脏指数 (spleen index); E. 胸腺 HE 染色 (thymus HE staining, $\times 200$); F. 脾脏 HE 染色 (spleen HE staining, $\times 200$)

注：与正常组相比，*** $P < 0.001$ ；与模型组相比，#### $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the normal group, *** $P < 0.001$; compared with the model group, #### $P < 0.001$.

3.3 PCP 对免疫细胞的影响

3.3.1 PCP 对小鼠外周血 WBC、LYM 和 NE 水平的影响 由表 1 可见,与正常组相比,免疫抑制模型组小鼠 WBC 和 LYM 数量显著减少,而 NE 数量显著增加 ($P < 0.01$);与模型组比较,PCP 干预后 WBC 和 LYM 数量显著增加 ($P < 0.05$),NE 数量显著下降 ($P < 0.05$)。

表 1 PCP 对免疫抑制小鼠外周血中 WBC、LYM 和 NE 水平影响
Tab 1 Effect of PCP on the levels of WBC, LYM and NE in peripheral blood of immunosuppressed mice

组别	WBC/ ($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	LYM/ ($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	NE/ ($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)
正常组	6.73 $\pm$ 0.56	5.1 $\pm$ 0.36	0.46 $\pm$ 0.26
模型组	1.57 $\pm$ 0.13***	0.4 $\pm$ 0.05**	2.3 $\pm$ 0.51**
PCP 100 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ 组	2.23 $\pm$ 0.49 [#]	1.13 $\pm$ 0.08 [#]	1.13 $\pm$ 0.08 [#]
PCP 300 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ 组	2.87 $\pm$ 0.82 [#]	1.37 $\pm$ 0.13 ^{##}	1.0 $\pm$ 0.21 [#]
LNT 50 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ 组	5.2 $\pm$ 0.42 ^{##}	4.06 $\pm$ 0.3 ^{##}	0.43 $\pm$ 0.15 ^{##}

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

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

3.3.2 PCP 对小鼠脾组织中 CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ 比值的影响 CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ 比值是评估人体免疫功能是否紊乱的重要指标^[16-17]。流式细胞术检测各组小鼠脾组织中 CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ 比值:与正常组相比,模型组小鼠 CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ 比值显著降低 ($P < 0.05$),与模型组相比,PCP 和 LNT 组小鼠 CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ 比值显著升高 ($P < 0.05$),见表 2。作为免疫反应的重要组成部分,自然杀伤细胞(NK)也起着重要作用^[18-19];PCP 和 LNT 均可以降低 NE (Ly-6G) 表达 ($P < 0.05$),增加 NK 细胞 (CD3 $^{+}$ /CD49 $^{+}$) 的表达 ($P < 0.05$)。以上结果表明 PCP 可以调节免疫抑制小鼠的细胞免疫功能。

表 2 PCP 对免疫抑制小鼠脾脏免疫细胞的影响

Tab 2 Effect of PCP on spleen immune cells in immunosuppressed mice

组别	CD4 $^{+}$ / CD8 $^{+}$ /%	Ly-6G/%	CD3 $^{+}$ / CD49 $^{+}$ /%
正常组	4.29 $\pm$ 0.17	4.87 $\pm$ 0.27	7.20 $\pm$ 1.85
模型组	1.59 $\pm$ 0.19***	8.20 $\pm$ 0.29***	3.25 $\pm$ 0.67***
PCP 100 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ 组	3.02 $\pm$ 0.28 [#]	5.98 $\pm$ 0.37 ^{##}	4.94 $\pm$ 0.37 [#]
PCP 300 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ 组	3.35 $\pm$ 0.34 ^{##}	6.58 $\pm$ 0.49 [#]	4.68 $\pm$ 0.57 [#]
LNT 50 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ 组	3.50 $\pm$ 0.20 ^{##}	5.06 $\pm$ 0.21 ^{##}	6.53 $\pm$ 0.37 ^{##}

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

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

3.4 PCP 对血清、胸腺和脾脏细胞因子的影响 辅助性 T 细胞 (Th) 在机体免疫应答过程中

能释放重要免疫调节因子,其中 Th1 细胞分泌 IL-2、IL-12、TNF- α 和 IFN- γ 因子,介导细胞免疫应答;Th2 细胞分泌 IL-4 和 IL-10 因子,介导体液免疫应答^[20-21]。采用酶联免疫吸附测定分析免疫抑制小鼠血清、脾脏和胸腺中 IL-2、IL-4、IL-10、IL-12、TNF- α 和 IFN- γ 的水平(见图 3),与正常组相比,模型组小鼠机体中上述细胞因子水平明显降低 ($P < 0.05$);与模型组相比,PCP (300 mg $\cdot$ kg $^{-1}$) 组小鼠机体 IL-2、IL-4、IL-10、IL-12、TNF- α 和 IFN- γ 的水平明显上调 ($P < 0.05$)。血清、胸腺和脾脏细胞因子检测分析再次验证了 PCP 能促进 Th 细胞分泌调节机体的免疫功能。

3.5 PCP 对免疫抑制小鼠 BTLA/HVEM 通路的影响

BTLA 具有调节免疫应答的功能,并能延缓 T 淋巴细胞的增殖和活化,HVEM 作为 BTLA 特异性配体,与其结合并影响免疫反应^[22]。如图 4 所示,与正常组相比,无论是在 mRNA 水平还是蛋白水平上,模型组小鼠脾组织 BTLA 和 HVEM 的相对表达量均显著增加 ($P < 0.05$),证实 CTX 能诱导 BTLA/HVEM 激活,抑制 T 淋巴细胞的增殖。PCP 和 LNT 干预组小鼠脾组织 BTLA/HVEM mRNA 水平和蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$),表明 PCP 可通过下调 BTLA/HVEM 的基因与蛋白表达水平,促进 T 淋巴细胞的增殖和分化。

4 讨论

活性植物多糖具有复杂的结构,多糖活性的差异与单糖组成、糖苷键连接方式、支链位点和空间构象的差异相关^[23]。本研究选用的阳性对照药 LNT 是一种植物多糖,已被证明可以提高免疫功能^[24]。本次通过分析 PCP 的单糖组成和分子量,证明 PCP 是一种主要由甘露糖、葡萄糖、半乳糖和岩藻糖等成分组成的水溶性多糖,分子量约为 13.10 kDa。相关研究表明,单糖组成中的葡萄糖、半乳糖和甘露糖更容易被细胞表面的受体识别,触发免疫反应^[25-26],PCP 具有相似的结构特征。

CTX 是肿瘤患者常用的化疗药物,CTX 抗肿瘤的同时,其细胞毒素会破坏机体的免疫系统,引起免疫缺陷^[27]。本研究给予小鼠腹腔注射 CTX 建立免疫抑制模型小鼠用以评估 PCP 对免疫抑制机体的免疫器官的保护作用以及对细胞免疫的影响。结果显示,与正常组相比,CTX 模型组小鼠的体重、脾脏和胸腺重量明显下降,脾细胞和胸腺细胞的数量减少,坏死面积增加,白色髓质和红色髓质间边界不清楚,PCP 干预后上述情况被逆转。CTX 诱导的免疫抑制小鼠脾脏组织中淋

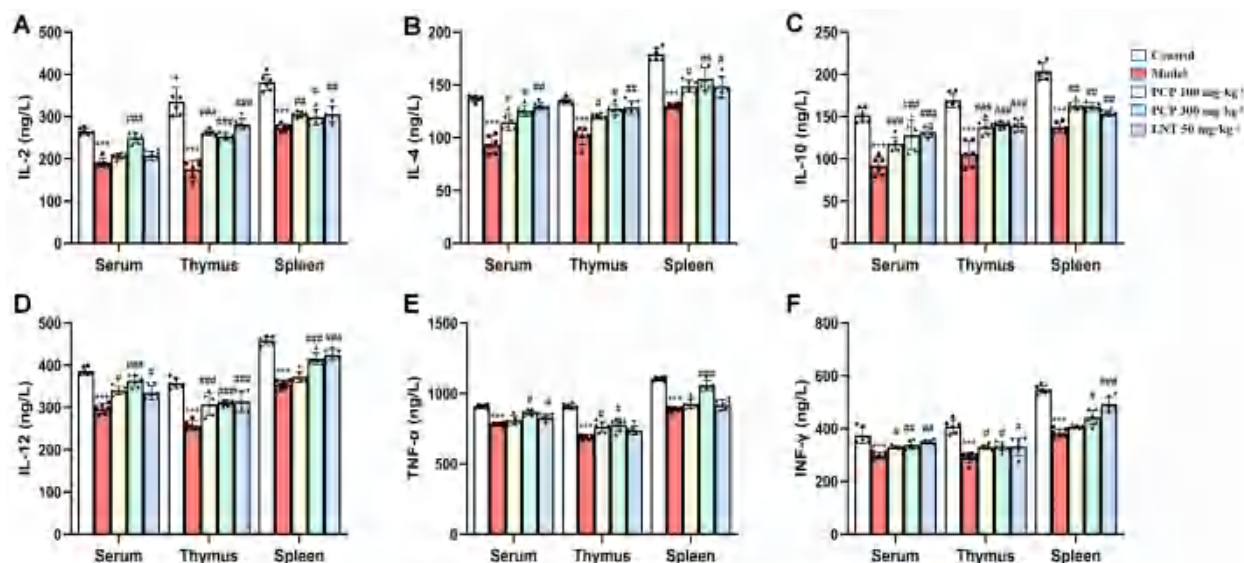


图3 PCP对免疫抑制小鼠血清、胸腺和脾脏中免疫因子的影响

Fig 3 Effect of PCP on immune factors in serum, thymus and spleen of immunosuppressed mice

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

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

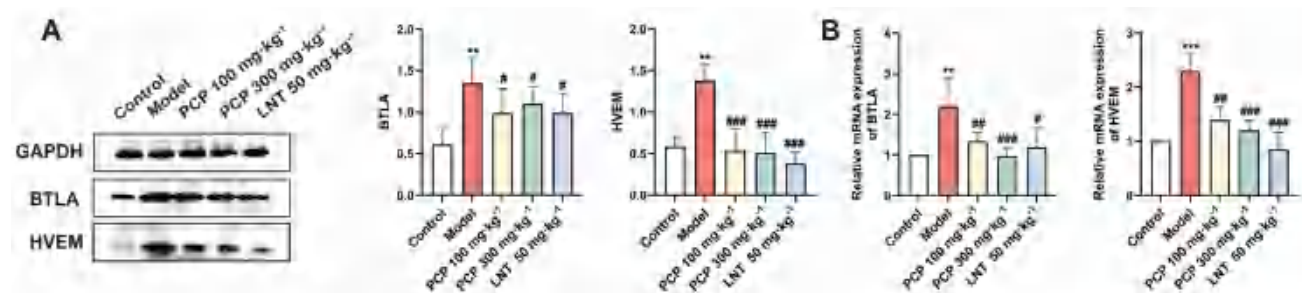


图4 PCP对免疫抑制小鼠脾脏组织中BTLA/HVEM通路的影响

Fig 4 Effect of PCP on BTLA/HVEM pathway in spleen of immunosuppressed mice

A. 脾脏中BTLA和HVEM的蛋白表达 (the protein expression of BTLA and HVEM in spleen); B. 脾脏中BTLA和HVEM的mRNA表达 (the mRNA expression of BTLA and HVEM in spleen)

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

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

巴细胞增殖能力下降,PCP干预后小鼠脾组织中 $CD4^+/CD8^+$ 比值上调,从而提高免疫抑制小鼠的细胞免疫。外周血中白细胞、淋巴细胞在CTX作用下数量明显减少,而PCP干预后这种现象被逆转,表明PCP可以影响机体多种免疫细胞。

BTLA是一种共抑制受体,在免疫细胞中主要表达于 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T细胞表面,通过与其配体HVEM结合抑制T细胞的增殖、活化以及细胞因子生成,从而促进疾病的发展^[28]。本次研究模型组小鼠在CTX诱导下外周血、胸腺、脾脏组织中的Th1、Th2细胞释放的主要细胞因子IL-2、IL-4、IL-10、IL-12、TNF- α 和IFN- γ 水平均明显低于正常组,而PCP作用后IL-2、IL-4、IL-10、IL-12、TNF- α 和IFN- γ 的水平均明显上调。

HVEM和BTLA组合诱导BTLA中免疫受体

酪氨酸抑制基序的磷酸化,从而抑制淋巴细胞增殖^[22]。比较发现BTLA/HVEM的mRNA及其蛋白在CTX作用下明显增加,因此推测PCP可能通过抑制BTLA/HVEM通路,从而促进T淋巴细胞的增殖和活化;促进Th1/Th2细胞平衡,以发挥免疫保护作用。由于多糖组成和结构的复杂性,仍需对多糖的功效和结构之间的关系进行更深入的研究。

参考文献

- [1] Shilts J, Severin Y, Galaway F, et al. A physical wiring diagram for the human immune system [J]. Nature, 2022, 608 (7922): 397-404.
- [2] Stienne C, Virgen-Slane R, Elmén L, et al. Btla signaling in conventional and regulatory lymphocytes coordinately tempers humoral immunity in the intestinal mucosa [J]. Cell Rep,

- 2022, 38 (12): 110553.
- [3] Sordo-Bahamonde C, Lorenzo-Herrero S, Martínez-Pérez A, et al. BTLA dysregulation correlates with poor outcome and diminished T cell-mediated antitumor responses in chronic lymphocytic leukemia [J]. Cancer Immunol Immunother, 2023, 72 (7): 2529-2539.
- [4] 宁召臣, 王晓彤, 熊化保. B/T 淋巴细胞弱化因子在免疫调控和免疫相关疾病中的作用 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2021, 37 (11): 1466-1473.
- [5] 邓桃妹, 彭代银, 俞年军, 等. 茯苓化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 中草药, 2020, 51 (10): 2703-2717.
- [6] 王蓉, 李胜男, 陈春, 等. 沙棘多糖对巨噬细胞和免疫抑制小鼠的免疫调节作用研究 [J]. 中南药学, 2020, 18 (3): 384-388.
- [7] 孙明杰, 张越, 姚亮, 等. 茯苓多糖的分离纯化、组成及其抗氧化活性研究 [J]. 安徽中医药大学学报, 2022, 41 (1): 86-91.
- [8] Guo YL, Zhang ZX, Wang ZX, et al. Astragalus polysaccharides inhibit ovarian cancer cell growth via microRNA-27a/FBXW7 signaling pathway [J]. Biosci Rep, 2020, 40 (3): BSR20193396.
- [9] 熊宏泰, 胡佳奇, 杜炎远, 等. 五种植物多糖调节环磷酰胺诱导免疫抑制小鼠免疫功能的网状 Meta 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29 (6): 210-221.
- [10] Duan YT, Huang JJ, Sun MJ, et al. *Poria cocos* polysaccharide improves intestinal barrier function and maintains intestinal homeostasis in mice [J]. Int J Biol Macromol, 2023, 249: 125953.
- [11] Sun MJ, Yao L, Yu QM, et al. Screening of *Poria cocos* polysaccharide with immunomodulatory activity and its activation effects on TLR4/MD2/NF- κ B pathway [J]. Int J Biol Macromol, 2024, 273 (Pt 1): 132931.
- [12] 肖颖, 吴梦琪, 张文清, 等. 茯苓多糖 HPLC 指纹图谱与免疫活性的相关分析 [J]. 华东理工大学学报 (自然科学版), 2020, 46 (5): 672-679.
- [13] Cheng Y, Xie Y, Ge JC, et al. Structural characterization and hepatoprotective activity of a galactoglucan from *Poria cocos* [J]. Carbohydr Polym, 2021, 263: 117979.
- [14] 张越, 程玥, 刘洁, 等. 不同生长环境下茯苓总三萜和水溶性总多糖含量比较 [J]. 安徽中医药大学学报, 2019, 38 (4): 81-84.
- [15] 孙明杰, 张越, 姚亮, 等. 茯苓多糖的分离纯化、组成及其抗氧化活性研究 [J]. 安徽中医药大学学报, 2022, 41 (1): 86-91.
- [16] Yang QK, Su YN, Wang W, et al. CONUT score or/and peripheral blood CD4⁺/CD8⁺ ratio-based web dynamic nomograms to predict the individualized survival of patients with advanced osteosarcoma [J]. Cancer Manag Res, 2020, 12: 4193-4208.
- [17] Cao X, Kong YL, Wang L, et al. Circulating low CD4⁺/CD8⁺ ratio is associated with poor prognosis in Waldenstrom macroglobulinemia patients [J]. Ann Hematol, 2021, 100 (4): 995-1002.
- [18] Linde IL, Prestwood TR, Qiu J, et al. Neutrophil-activating therapy for the treatment of cancer [J]. Cancer Cell, 2023, 41 (2): 356-372.
- [19] Lee YE, Go GY, Koh EY, et al. Synergistic therapeutic combination with a CAF inhibitor enhances CAR-NK-mediated cytotoxicity via reduction of CAF-released IL-6 [J]. J Immunother Cancer, 2023, 11 (2): e006130.
- [20] Ruan SL, Xu L, Sheng YJ, et al. Th1 promotes M1 polarization of intestinal macrophages to regulate colitis-related mucosal barrier damage [J]. Aging (Albany NY), 2023, 15 (14): 6721-6735.
- [21] Kang K, Deng XY, Xie WT, et al. Rhodotorula mucilaginosa ZTHY2 attenuates cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice [J]. Animals (Basel), 2023, 13 (21): 3376.
- [22] Park SJ, Riccio RE, Kopp SJ, et al. Herpesvirus entry mediator binding partners mediate immunopathogenesis of ocular herpes simplex virus 1 infection [J]. mBio, 2020, 11 (3): e00790-20.
- [23] Liang XF, Liu MQ, Wei Y, et al. Structural characteristics and structure-activity relationship of four polysaccharides from *Lycii fructus* [J]. Int J Biol Macromol, 2023, 253 (Pt 5): 127256.
- [24] 张屿楠, 杨侃侃, 金鑫, 等. 香菇多糖对环磷酰胺致免疫抑制小鼠脾淋巴细胞功能的调节作用 [J]. 饲料研究, 2022, 45 (24): 84-90.
- [25] Chen YC, Wu YJ, Hu CY. Monosaccharide composition influence and immunomodulatory effects of probiotic exopolysaccharides [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 133: 575-582.
- [26] Xu XQ, Liu Y, Pan CL, et al. Antioxidant and immunomodulatory activities of polysaccharides from fermented wheat products of *Grifola frondosa*: in vitro methods [J]. Int J Food Sci, 2023, 2023: 3820276.
- [27] Li YG, Yu P, Fu WW, et al. Ginseng-astragalus-oxymatrine injection ameliorates cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice and enhances the immune activity of RAW264.7 cells [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 279: 114387.
- [28] Wojciechowicz K, Kunciewicz K, Lisowska KA, et al. Peptides targeting the BTLA-HVEM complex can modulate T cell immune response [J]. Eur J Pharm Sci, 2024, 193: 106677.

(收稿日期: 2024-09-02; 修回日期: 2024-11-28)

磷酸胆碱聚合物对光甘草定的增溶作用及机制研究

董爽¹, 胡祖成¹, 王浩捷¹, 梅立友¹, 张馨雨¹, 刘笑洋¹, 李小虎², 钱佳², 陆洋^{1*} (1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2. 上海奥利实业有限公司, 上海 200051)

摘要: **目的** 采用细胞膜仿生材料磷酸胆碱聚合物 Poly (MPC-random-BMA) (PMB) 来提高疏水性异黄酮光甘草定 (GLD) 的水溶性及经皮渗透性。**方法** 通过摇瓶法测定 GLD 在不同质量浓度 PMB 体系中的饱和溶解度, 通过粒径测定、分子动力学 (MD) 模拟、扫描电镜 (SEM)、核磁共振氢谱 (¹H NMR)、芘荧光极性测定、热重分析 (TG)、X-射线衍射 (X-RD) 等分析 PMB 增溶机制。采用 Franz 扩散池法测定 GLD 在 PMB 体系中通过小鼠皮肤的经皮渗透量和皮肤滞留量, 并与 GLD 其他的增溶体系做比较。**结果** PMB 疏水侧链在水溶液中形成极性类似于正己烷的纳米级分子聚集体, 包裹疏水性的 GLD 形成新的高度无定形物质, 进而提高 GLD 溶解度。GLD 的溶解度随着 PMB 质量浓度的增加呈线性增加 ($r = 0.994$), PMB 质量浓度为 $30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, GLD 溶解度约为 $485 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 比在纯水中溶解度提高了 68 倍。经皮渗透实验结果表明, 与羟丙基- β -环糊精包合、30% 聚乙二醇 400 潜溶剂体系相比, PMB 对于提高 GLD 的经皮渗透量及皮肤滞留量均有显著优势。**结论** 磷酸胆碱聚合物可以显著提高 GLD 的水溶性及经皮渗透性, 解决了因其水溶性差、经皮渗透量低在应用中受限的问题。

关键词: 磷酸胆碱聚合物; 光甘草定; 增溶机制; 分子动力学模拟; 分子聚集体; 经皮渗透

中图分类号: R914

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)05-1190-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.003

Solubilization effect and mechanisms of phosphorylcholine polymers on glabridin

DONG Shuang¹, HU Zu-cheng¹, WANG Hao-jie¹, MEI Li-you¹, ZHANG Xin-yu¹, LIU Xiao-yang¹, LI Xiao-hu², QIAN Jia², LU Yang^{1*} (1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488; 2. Shanghai OLI Enterprise Co., Ltd., Shanghai 200051)

Abstract: Objective To improve the solubility and transdermal penetration of hydrophobic isoflavone glabridin (GLD) by using a cell membrane bionic material, phosphocholine polymer Poly (MPC-random-BMA) (PMB). **Methods** The saturation solubility of GLD in PMB system with different concentrations was determined by shaking bottle method. The solubility improvement mechanism was determined by particle size measurement, molecular dynamics simulation, scanning electron microscopy, ¹H NMR, pyrene fluorescence polarity determination, thermogravimetric analysis and X-ray diffraction. The transdermal penetration and intradermal retention amount of GLD in PMB system were measured by Franz diffusion cell method, and were compared with other GLD systems. **Results** The hydrophobic side chains of PMB formed nanoscale molecular aggregates with polarity similar to *n*-hexane in aqueous solution, wrapped the hydrophobic GLD to form a new highly amorphous substance, and then improved the solubility of GLD. The solubility of GLD increased linearly with the concentration of PMB ($r = 0.994$). When the concentration of PMB was $30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, the solubility of GLD was about $485 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, which was 68 times higher than that in the pure water. The transdermal penetration showed that PMB had obvious advantages in increasing the transdermal penetration and intradermal retention of GLD compared with that of hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) inclusion and 30% polyethylene glycol 400 (PEG400) cosolvent systems. **Conclusion** PMB can substantially improve the water solubility and transdermal penetration of GLD, and solve the problem of application limit due to poor water solubility and low transdermal penetration.

基金项目: 北京市科技新星计划 (No. 20240484544)。

作者简介: 董爽, 女, 硕士研究生, 主要从事药用辅料评价方面的研究, email: ds19990623@163.com *通信作者: 陆洋, 男, 教授, 主要从事中药新剂型与新技术、药用辅料评价方面的研究, email: luyang@bucm.edu.cn

Key words: phosphocholine polymer; glabridin; solubilization mechanism; molecular dynamics simulation; molecular aggregate; transdermal penetration

光甘草定 (glabridin, GLD) 是光果甘草特有的疏水性异黄酮化合物, 是一种有效的美白^[1]、抗炎^[2]、抗氧化成分, 在化妆品领域具有广阔的应用前景, 但水溶性极差^[3-6], 经皮渗透量低, GLD 饱和水溶液 6 h 累积经皮渗透量为 $3.82 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2[7]}$, 24 h 累积经皮渗透量为 $7.99 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2[8]}$, 极大地限制了其经皮应用。常采用多种增溶方法来提高 GLD 的溶解度, 例如羟丙基- β -环糊精 (HP- β -CD) 包合^[5]、潜溶剂^[9]或者各种类型的脂质体^[10]。本研究尝试用一种细胞膜仿生材料——水溶性两亲性磷酸胆碱聚合物 Poly (MPC-random-BMA) (PMB) 来提高 GLD 的水溶性及经皮渗透性。PMB 由 2-甲基丙烯酰羟乙基磷脂酰胆碱 (MPC) 与单聚体的疏水性丁基甲基丙烯酸酯 (BMA) 构成^[11], 已有研究表明 PMB 可以提高硝苯地平、吡哆美辛等化合物在水中的溶解度^[12]。

为深入研究 PMB 对 GLD 的增溶作用和相关机制, 以及体外经皮渗透的效果。本文采用摇瓶法测定 GLD 在不同质量浓度 PMB 体系中的饱和溶解度, 分析 PMB 质量浓度与 GLD 溶解度的关系。通过粒径测定初步分析溶液中的结构性质, 通过分子动力学 (MD) 模拟两者在水溶液中的相互作用行为, 并对模拟过程进行可视化分析, 通过扫描电镜 (SEM) 观察结构特性、核磁共振氢谱 (^1H NMR) 分析客体和宿主之间的分子间相互作用、荧光测定微环境的极性、热重分析 (TG) 和 X-射线衍射 (X-RD) 分析热力学性质以及固体状态等, 综合分析 PMB-GLD 之间的相互作用形式, 分析 PMB 增溶机制。进一步通过 Franz 扩散池法测定 GLD 在 PMB 溶液体系中通过小鼠皮肤的体外经皮渗透量及皮肤滞留量, 并与 GLD 其他的增溶体系做比较, 评价 PMB 促经皮渗透效果, 以期为其他疏水性原料的应用研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

赛多利斯 BSA223S 电子分析天平 [赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司]; HJ-4H 多头恒温磁力搅拌器 (常州市凯航仪器有限公司); SHA-C 水浴恒温振荡器 (常州金坛良友仪器有限公司); TGL-16 型医用离心机 (长沙高新技术产业开发区湘仪离心机仪器有限公司); 马尔文激光粒度仪 (型号: S/N 601-0723, 英国马尔文仪器有限公司); Thermo Fisher U3000 高效液相色谱仪 [DAD

检测器, CM7.2 色谱工作站, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司]; 扫描电镜 (型号: ZEISS Gemini 300, Carl Zeiss Jena); NMR 核磁共振波谱仪 (型号: AVANCE NEO 400M, 布鲁克); 多功能酶标仪 [型号: SpectraMax i3x, 美谷分子仪器 (上海) 有限公司]; 热重分析仪 (型号: SDT Q600, TA Instruments); X 射线衍射仪 (型号: SmartLab SE, 日本 Rigaku); TK-20B 型透皮扩散试验仪 (上海锴凯科技贸易有限公司)。

1.2 试药

PMB (批号: 22112302)、GLD (含量 $\geq 95\%$, 批号: 22102503)、HP- β -CD (批号: 22111501) (上海奥利实业有限公司); GLD 对照品 (HPLC $\geq 98\%$, 批号: 59870-68-7, 上海源叶生物科技有限公司); 芘 (含量 $\geq 99\%$, 批号: C15585728)、聚乙二醇 400 (批号: C14739742) (上海麦克林生化科技有限公司); 无水甲醇 (AR, 天津市大茂化学试剂厂); 乙腈、乙酸 (色谱纯, Fisher 公司); 纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司); 氘代水 (纯度: 99.96%, Cambridge Isotope Laboratories, Inc. USA); 氯化钠注射液 (石家庄四药有限公司)。

1.3 动物

雄性 KM 小鼠 (SPF 级), 体重 (20 ± 1) g, 由斯贝福 (北京) 生物技术有限公司提供, 合格证号 SCXK (京) 2019-0010。

2 方法

2.1 GLD 在不同质量浓度 PMB 溶液中的饱和溶解度

系列不同质量 PMB 分别加入 25 mL 量瓶中, 置于磁力搅拌器上加入去离子水使充分溶解, 制成 PMB 浓溶液。分别少量多次加入过量 GLD, 磁力搅拌 30 min。少量多次补加去离子水至溶液总体积为 25 mL。在 37°C 恒温机械摇床浴中以 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 连续振摇 24 h, 取出静置离心, 除沉淀, 取上清液用无水甲醇稀释 2 倍, 测定 GLD 质量浓度。每组平行 3 个实验。取上清液冷冻干燥即得 PMB/GLD 冻干粉。

2.2 GLD 的含量测定方法

色谱柱为 Thermo Hypersil Gold C18 ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) 柱, 以乙腈-水-冰乙酸 (55:44:1) 为流动相, 检测波长 280 nm, 流速为 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量为 $20 \mu\text{L}$, 柱温 30°C , 洗脱时间 15 min。

2.3 粒径及 Zeta 电位测定

取 PMB/GLD 溶液体系用去离子水稀释 10

倍, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 采用马尔文粒度仪测定粒径和 Zeta 电位。

2.4 磷酸胆碱聚合物增溶机制研究

2.4.1 MD 模拟

通过 MD 模拟分别研究了 GLD、PMB 两种分子的单体体系及混合体系在水溶液中的相互作用行为。单体体系分别包括 10 个 GLD 分子, 15 个 PMB 分子; 混合体系为 10 个 GLD 与 15 个 PMB 分子混合, 随机添加在 7 nm $\times$ 7 nm $\times$ 7 nm 的模拟盒子中, 获得初始模拟模型。

原子电荷计算采用 B3LYP 泛函以及 6-311g(d, p) 基函数, 采用 GAFF 力场参数化所有原子, 包括键参数、角度参数和二面角等^[13]。所有 MD 模拟在 GROMACS 2023.2 软件中进行^[14-15]。

在正式计算之前, 所有体系均进行能量最小化处理, 先使用最陡下降法迅速释放体系中的斥力, 再用共轭梯度法加速收敛。模拟计算过程中, 在 X、Y、Z 三个方向上均采用周期性边界条件, 采用 Leap-frog 算法对牛顿运动方程进行积分。分子间相互作用的模拟在等温等压 (NPT) 系统下进行, 步长为 2 fs。在 NPT 模拟中, 先预平衡 100 ps, 采用 Berendsen 恒压器并以各向同性的方式将压力维持在 1 bar, 采用 V-rescale 型调温器控制系统温度在 313 K。正式模拟时间为 100 ns, 采用 Parrinello-rahman 恒压器, 各向同性控压, 控温方式不变。采用具有四阶插值的 Particle-Mesh-Ewald (PME) 方法计算静电相互作用, 并且将网格间距设为 1.0 Å, 采用 1.0 nm 的截止值来计算近程范德华相互作用力^[16]。通过 VMD 1.9.3 软件进行模拟过程可视化分析^[17]。

2.4.2 SEM

分别将 GLD 甲醇溶液、PMB 水溶液、PMB/GLD 溶液稀释 400 倍, 超声 20 min 分散均匀, 取微量稀释液滴到导电胶上, 置于 50℃ 烘箱干燥, 待水分挥干后喷金处理, 喷金为 10 mA, 用 SEM 观察样品形貌。

2.4.3 ¹H NMR

取适量 PMB 粉末, PMB/GLD 冻干粉用适量氘代水充分溶解, 各组溶液进行 ¹H NMR 分析, 以四甲基硅烷 (TMS) 为内标, 报告化学位移。

2.4.4 不同质量浓度 PMB 水溶液极性测定

以系列不同质量浓度的 PMB 水溶液为溶剂配制质量浓度为 0.05 mg $\cdot$ mL⁻¹ 的芘-PMB 溶液, 超声 30 min, 并在 60℃ 水浴中恒温 30 min, 降至室温后测定溶液的荧光光谱图。荧光扫描的激发波长为 334 nm, 发射波长为 368 ~ 490 nm, 每步 5 nm。

2.4.5 TG

取适量 GLD 粉末, PMB 粉末, PMB/GLD 冻干粉放置在样品盘上, 升温速度 10℃ $\cdot$ min⁻¹, 扫描范围 25 ~ 300℃, N₂ 气氛, 流速为 50 mL $\cdot$ min⁻¹。分别检测, 记录每个样品的 TG 曲线。

2.4.6 X-RD

取适量 GLD 粉末, PMB 粉末, PMB/GLD 冻干粉和 PMB、GLD 粉末物理混合物分别进行 X-RD 分析: Cu 靶 K α 射线, 电压 40 kV, 电流 40 mA, 扫描 2 θ 范围为 5° ~ 40°, 步长 0.02°, 扫描速率为 10 (°) $\cdot$ min⁻¹。

2.5 GLD 在不同增溶体系中的体外经皮渗透研究

2.5.1 离体皮肤的制备

取雄性 KM 小鼠, 断颈椎处死, 除去腹部鼠毛, 确保角质层完好, 分离腹部皮肤, 用脱脂棉擦去脂肪组织和结缔组织, 生理盐水冲洗干净。用铝箔包裹后 -20℃ 冷冻保存, 1 周内用完。

2.5.2 小鼠皮肤的体外经皮渗透量和皮肤滞留量

将离体皮肤自然解冻备用。接收池分别加入 8 mL 透皮接收液 (PEG400-生理盐水 = 3:7) (因 GLD 在该体系中溶解度高于 1 mg $\cdot$ mL⁻¹^[9], 满足漏槽条件, 且该体系对皮肤屏障影响较小^[18]), 池内置磁力搅拌子。鼠皮随机分组, 重复 6 份, 将鼠皮固定在渗透扩散装置的供给室与接收室之间, 角质层朝向供给室 (有效扩散面积 3.14 cm²), 皮肤里层与接收液保持紧密接触, 排尽皮肤下的空气。供给室内分别加入 2 mL GLD 不同增溶体系溶液 (PMB 体系、30% PEG400 潜溶剂体系、HP- β -CD 包合体系), GLD 质量浓度为 1 mg $\cdot$ mL⁻¹。Franz 扩散池转速 350 r $\cdot$ min⁻¹, 温度 (32.0 $\pm$ 0.2)℃。分别于 1、2、4、6、8 h 取样 1 mL, 同时补加等体积同温度的新鲜接收液。所取接收液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, HPLC 测定 GLD 质量浓度, 按公式 (1) 计算相应时间的 GLD 累积渗透量 (Q_n)。

$$Q_n = (VC_n + 1.0 \times \sum_{i=1}^{n-1} C_i) / S \quad (1)$$

公式中 Q_n 为第 n 个时间点的单位面积累积渗透量 ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$), V 为接收液的体积 (8 mL), C_n 为第 n 个取样点接收液的质量浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), S 为扩散池的有效面积 (3.14 cm²)。

以累积渗透量 Q_n 为纵坐标, 时间 t 为横坐标绘制累积渗透量-时间曲线, 线性回归后可得各组渗透动力学方程。取曲线的直线部分进行线性回归, 其斜率即为稳态透皮速率 (J_{ss}) ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$), 直线部分反向延长线与 X 轴的交点即为滞后时间 t_{lag} (h), 对各组的渗透动力学参数进行分析。

体外经皮渗透实验结束后, 用生理盐水洗净皮肤表面残留药物, 沿扩散池边缘剪下有效渗透面积的皮肤并剪碎置组织研磨器中, 加入 5 mL 甲醇充分研磨, 超声提取 30 min。离心取上清液, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, HPLC 测定 GLD 质量浓度, 计算 GLD 皮肤滞留量。

2.5.3 透皮接收液中 GLD 含量测定的线性关系考

察 称取 GLD 对照品 (纯度 $\geq 98\%$) 5.44 mg, 置 10 mL 棕色量瓶中, 用 30% PEG400 溶液定容, 摇匀, 即得质量浓度为 $0.544 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 GLD 对照品母液。取 GLD 对照品母液, 用 30%PEG400 溶液稀释, 分别配制质量浓度为 1.09、5.44、10.88、21.76、32.64、54.40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 GLD 对照品溶液, 测定并记录峰面积。以峰面积积分值 (Y) 为纵坐标, 对照品进样量 (X) 为横坐标进行线性回归, 绘制标准曲线, 计算其回归方程, 考察线性关系。

2.6 统计分析

采用 IBM SPSS Statistics 20 软件进行单因素方差分析 (ANOVA)、 t 检验和非参数检验, 数据以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果与讨论

3.1 GLD 在不同质量浓度 PMB 溶液中的饱和溶解度及粒径测定

根据 GLD 在不同质量浓度 PMB 溶液中的饱和溶解度结果, 发现 GLD 的饱和溶解度随着 PMB 质量浓度的增加呈线性增加, 线性回归方程为 $Y = 14.93X + 9.029$, $r = 0.994$ 。PMB 质量浓度为 30 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, GLD 溶解度约为 $485 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 比在纯水中溶解度提高了 68 倍。两者在水溶液中形成的粒子粒径均匀, 平均粒径为 $(37.81 \pm 0.06) \text{ nm}$, Zeta 电位为 $-(4.27 \pm 2.02) \text{ mV}$ 。

3.2 PMB 增溶机制

3.2.1 MD 模拟 均方根偏差 (RMSD) 表示体系某一时刻的构象与目标构象所有原子偏差的加和, 是评价分子体系稳定性的最重要依据之一^[19]。溶剂可及表面积 (SASA) 与体系中的疏水基团和溶剂水间存在不利接触的数量成正比, 即疏水基团越聚集, 与水的不良接触越少, 则 SASA 值越小, 通常用于表征给定体系中分子的紧凑度^[20]。GLD 体系的 RMSD 值开始时波动较大, 一段时间后逐渐收敛, SASA 值快速下降后趋于稳定 (见图 1A), GLD 分子 5 ns 后逐渐聚集, 到 10 ns 完全聚集成团至 100 ns 稳定持续不散 (见图 1B), 表明 GLD 分子疏水作用较强, 在水中难以溶解分散。PMB 体系的 RMSD 值增加一段时间后趋于稳定, SASA 值缓慢下降至平衡 (见图 1A), 部分分子逐渐组装在一起形成若干团簇, 但不会完全成团 (见图 1B), 说明 PMB 分子稳定分散在水溶液中。单体体系的模拟结果与事实一致, 接下来对 PMB 与 GLD 混合体系在水溶液中的聚集行为进行模拟, 分析两者之间的相互作用力, 并对模拟结果进行可视化分析。

混合体系的 RMSD 值刚开始迅速升高后逐渐趋于稳定 (见图 2A), 表明混合体系逐渐平衡;

对整个模拟过程形成的氢键数量进行分析 (见图 2A), 可见体系中 GLD 与 PMB 分子间形成氢键数量多于 GLD 单体体系; 对体系相互作用能进行分解, GLD 与 PMB 分子间静电相互作用能为 $-(281.6 \pm 86.3901) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 范德华相互作用力为 $-(1022.17 \pm 176.816) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 负值表示分子间相互作用为吸引作用 (见图 2A); 体系 SASA 值逐渐下降, 其中主要为疏水部分 SASA 下降, 亲水部分 SASA 几乎不变 (见图 2A), 表明 PMB 疏水部分能很好地与 GLD 密切组装, 亲水部分则与水亲和力较强。所有 GLD 分子均能被 PMB 包裹, 共组装形成若干团簇均匀分散在水溶液中, 至 100 ns 稳定不变 (见图 2B), 进而增加 GLD 的溶解度。综上, GLD 与 PMB 共组装的驱动力包括氢键、静电力、范德华力以及疏水相互作用, 其中范德华力为主要驱动力。

3.2.2 SEM 不同组样貌形态的 SEM 结果如图 3 所示。由图 3 可以看出 GLD 粒子呈柱状晶体 (制样时醇挥发干后, GLD 晶体析出), PMB 粒子呈颗粒状。由于制样时水分挥发, PMB/GLD 结构发生多分子聚集现象, 析出的粒子呈正方体, 边缘清晰, 均匀分布。PMB/GLD 粒子形状不同于 PMB 和 GLD 粒子, 说明两者在溶液中形成了新的增溶结构。

3.2.3 ^1H NMR 通过 ^1H NMR 比较 PMB/GLD 复合物形成前后 PMB 亲水性磷酸胆碱基团的 H 化学位移值, 分析客体 GLD 和宿主 PMB 之间的分子间相互作用形式^[21], 判断 GLD 与 PMB 结构中的结合部位。PMB 及 PMB/GLD 的 ^1H NMR 结果如图 4 所示, 对 PMB 亲水性磷酸胆碱基团的 H 进行归属^[22], 各部位 H 的化学位移值如表 1 所示。两者形成复合物 PMB/GLD 后, 各部位 H 的化学位移值变化不明显 ($\Delta\delta < 0.004$), 说明两者形成复合物过程中, GLD 对于 PMB 亲水性磷酸胆碱基团没有影响, 而是进入由 PMB 疏水侧链在水溶液中形成的聚集体中, 从而实现增溶作用, 与已有研究结果一致^[23]。

3.2.4 不同质量浓度 PMB 水溶液极性测定 通过芘荧光测定 PMB 侧链在水溶液中形成的疏水聚集体内部的极性。芘溶液的荧光发射光谱有 5 个荧光峰, 分别在 373、379、384、394、480 nm 附近。第一发射峰与第三发射峰的荧光强度之比 I_1/I_3 值常用来表示芘所处的微环境的极性, 极性越大则比值越大, 反之则比值越小, 在极性溶剂水中, I_1/I_3 值可以达到约 1.8, 而在非极性溶剂正己烷中, I_1/I_3 值则约为 0.6^[24]。不同 PMB 质量浓度与芘在 PMB 水溶液中溶解的荧光强度 I_1/I_3 比值的的关系如图 5 所示, 随着 PMB 质量浓度增大, I_1/I_3 值稳定在 0.6 ~ 0.7, 说明在 1.5 ~ 45 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内 PMB 形成的疏水聚

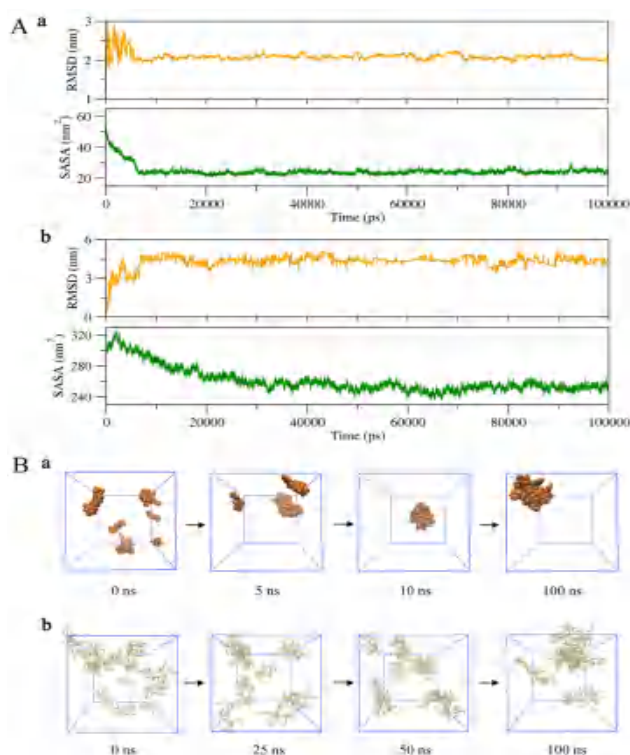


图1 单体体系的模拟结果

Fig 1 Simulation of monomer system

A. 单体体系 RMSD 和 SASA 值随模拟时间的变化 (changes of RMSD and SASA values in monomer system with simulation time); B. 单体体系模拟快照结果 (simulation snapshot of monomer system); a. GLD; b. PMB

集体内部的极性不变, 极性与正己烷相似。

聚合物 PMB 具有不同的分子结构, 如随机型单体单元序列和嵌段型序列, 当它们溶解在水中时形成聚合物聚集体^[23]。随机型聚合物疏水链的缔合是按照“开放缔合”机制以多分子方式发生的, 并且聚集体可能随着聚合物浓度的增加而增长。根据溶解度结果, GLD 的溶解度随着 PMB 质量浓度的增加呈线性增加, 推测原因为 PMB 疏水聚集体随着聚合物浓度的增加而增长, 从而溶解更多的 GLD 在疏水聚集体内部。

3.2.5 TG TG 是一种重要且广泛应用的热分析技术, 用于区分各种非晶材料, 包括高分子材料和药物包合物^[25]。TG 可以提供样品的失重比例、失重温度 (包括起始点、峰值和终止点等) 以及分解残留量等信息。采用 TG 法研究了 GLD、PMB、PMB/GLD 的热稳定性。根据 TGA-DTG 热重分析图研究 (见图 6), GLD 在 227.62 °C 时开始降解, 单次放热事件的质量损失为 1.434%。PMB 显示两个热事件, 一个是脱水吸热事件, 发生在 88.59 °C, 水分损失 7.010%; 另一个放热降解事件发生在 263.29 °C, 质量损失 21.99%。对 PMB/GLD 的热重分析图进行分析, 发现了两个热分解事件, 一个是脱水吸热事

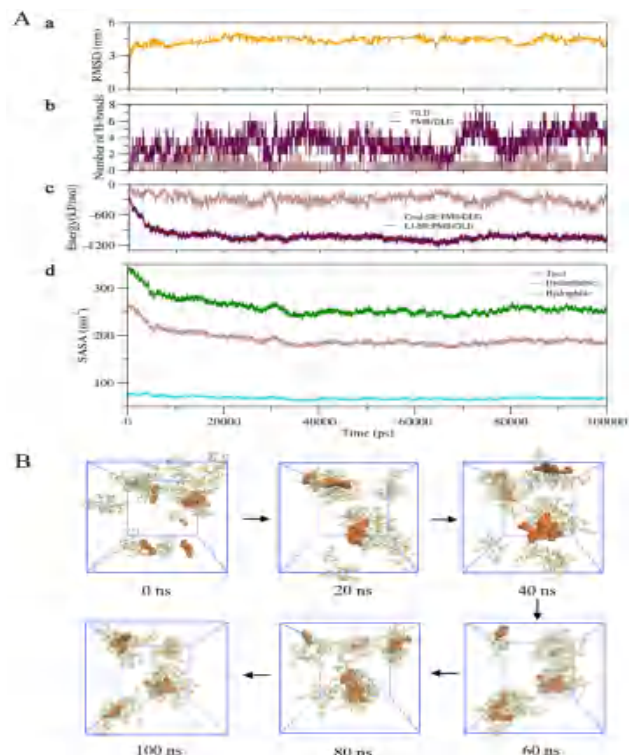


图2 混合体系的模拟结果

Fig 2 Simulation of mixed system

A: a. 混合体系的 RMSD 值 (RMSD value of the mixed system); b. GLD 单体体系与混合体系氢键数量比较 (the number of hydrogen bonds in GLD monomer system and the mixed system); c. GLD 与 PMB 的静电相互作用能和范德华相互作用能 (electrostatic interaction energy and van der Waals interaction energy of GLD and PMB); d. 混合体系 SASA 值 (SASA values of the mixed system); B: 混合体系模拟快照结果 (simulation snapshot of the mixed system)



图3 不同组样貌形态的扫描电镜观察结果 (×20 000)

Fig 3 SEM observation results of different groups of appearance and morphology (×20 000)

A. GLD; B. PMB; C. PMB/GLD

件, 发生在 62.24 °C, 水分损失 9.958%; 另一个放热降解事件发生在 264.1 °C, 质量损失 24.39%。与 PMB 相比, PMB/GLD 聚合物脱水吸热峰向低温移动, 这表明在相互作用过程中, GLD 分子取代了 PMB 疏水聚集体内部的大部分溶剂分子。与 GLD 相比, PMB/GLD 聚合物放热降解峰向高温移动, 提高了 GLD 的热稳定性, 表明在水溶液中两者形成了结晶度较低的高度无定形物质^[26]。

3.2.6 X-RD 分析 X-RD 分析对于识别固体材料的状态, 无论是晶体状态还是无定形状态都起着重要的作用, 此外它还揭示了晶体材料的化学组成和其他结构参数^[27]。GLD、PMB、两者物理混

表 1 ^1H 化学位移

Tab 1 ^1H chemical shift

部位 H	δ_{PMB}	$\delta_{\text{PMB/GLD}}$	$\Delta\delta$
H ₁	3.181 23	3.180 61	- 0.000 62
H ₂	3.626 76	3.623 24	- 0.003 52
H ₃	4.031 69	4.031 69	0
H ₄	4.169 01	4.165 49	- 0.003 52
H ₅	4.242 96	4.239 44	- 0.003 52

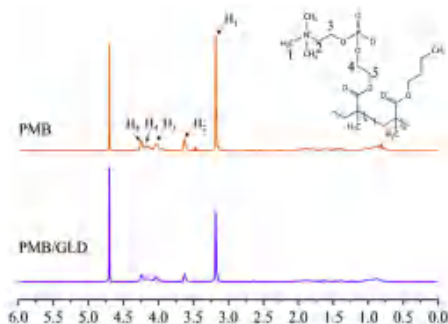


图 4 PMB 及 PMB/GLD 的 ^1H NMR 图谱

Fig 4 ^1H NMR spectrums of PMB and PMB/GLD

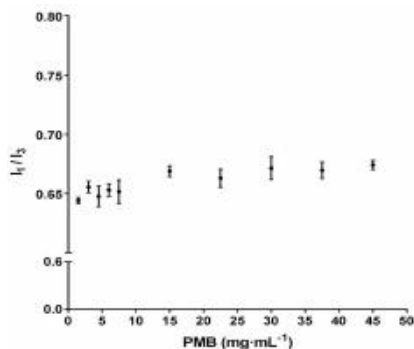


图 5 不同 PMB 质量浓度与吡在 PMB 水溶液中溶解的荧光强度 I_1/I_3 比值的关系

Fig 5 Relation between PMB concentration and I_1/I_3 ratio of fluorescence intensity of pyrene dissolved in PMB aqueous solution

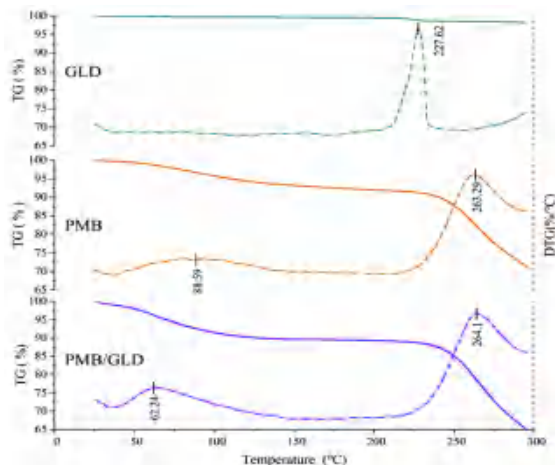


图 6 GLD、PMB 和 PMB/GLD 的热重分析图

Fig 6 Thermogravimetric analysis diagram of GLD, PMB and PMB/GLD

合及 PMB/GLD 聚合物的 X-RD 谱图见图 7。GLD 的衍射图谱在 8.3° 、 14.6° 、 16.0° 、 17.6° 、

19.3° 等多处有明显特征性结晶峰，表明该物质以结晶形式存在^[5]。PMB 的 X-RD 图无衍射峰，说明其具有无定形性质。两者物理混合呈现 GLD 衍射图谱和 PMB 衍射图谱的叠加，GLD 的特征性结晶峰依然存在，这表明经过物理混合后两者之间没有相互作用或仅有微弱的相互作用。而在 PMB/GLD 衍射图谱中 GLD 的结晶峰完全消失，呈粉末状无定形，这说明 GLD 进入了 PMB 形成的疏水聚集体内部以非晶态形成了新的结构。

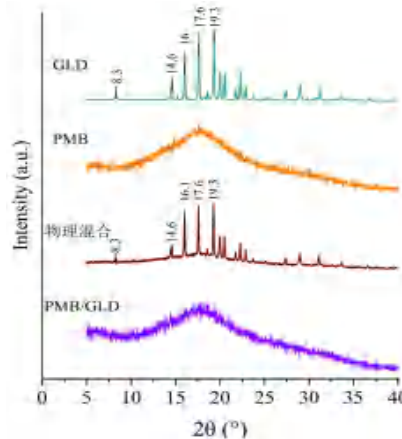


图 7 GLD、PMB、两者物理混合及 PMB/GLD 聚合物的 X-RD 衍射图谱

Fig 7 X-RD diffraction spectra of GLD, PMB, mixture and PMB/GLD

3.3 GLD 在不同增溶体系中通过小鼠皮肤的体外经皮渗透研究

3.3.1 线性关系考察 以峰面积积分值 (Y) 为纵坐标，GLD 对照品进样量 (X) 为横坐标进行线性回归，绘制标准曲线，得 GLD 的线性回归方程为 $Y = 0.5522X + 0.1871$ ， $r = 0.9994$ ，表明 GLD 在 $1.09 \sim 54.40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与峰面积值线性关系良好。

3.3.2 通过小鼠皮肤的体外经皮渗透量和皮肤滞留量 各组 GLD 的累积经皮渗透量-时间曲线如图 8A 所示，经皮渗透动力学参数如表 2 所示。稳态经皮渗透速度为：PMB > 30% PEG400 > HP- β -CD，PMB 具有显著的经皮渗透优势。HP- β -CD 组 8 h 累积经皮渗透量为 $(4.53 \pm 1.36) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ，低于 PMB 组 $(10.04 \pm 0.77) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ($P < 0.01$)，30% PEG400 组 8 h 累积经皮渗透量为 $(6.90 \pm 1.05) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ 低于 PMB 组 ($P < 0.01$) (见图 8B)。分析各组的皮肤滞留量，结果如图 8C。PMB 组 8 h 皮肤滞留量为 $(5.85 \pm 0.15) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ 高于 HP- β -CD 组 $(2.49 \pm 0.43) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ($P < 0.01$)，高于 30% PEG400 组 $(3.25 \pm 0.64) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ($P < 0.01$) (见图 8C)。说明与 HP- β -CD 包合、30% PEG400 潜溶剂体系相比，PMB 对于提高 GLD 经皮渗透量及皮肤滞留量均有显著优势。

表 2 GLD 在不同增溶体系中的 8 h 经皮渗透动力学参数 (n = 6)

组别	渗透动力学方程	相关系数	累积渗透量 / ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)	稳态透皮速率 / ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)	滞后时间 / h
PMB/GLD	$Q_n = 1.422t - 1.878$	0.9933	10.04 ± 0.77	1.51	1.62
HP- β -CD/GLD	$Q_n = 0.614t - 0.458$	0.9983	4.53 ± 1.36	0.64	0.98
30%PEG400/GLD	$Q_n = 0.984t - 1.223$	0.9964	6.90 ± 1.05	1.03	1.47

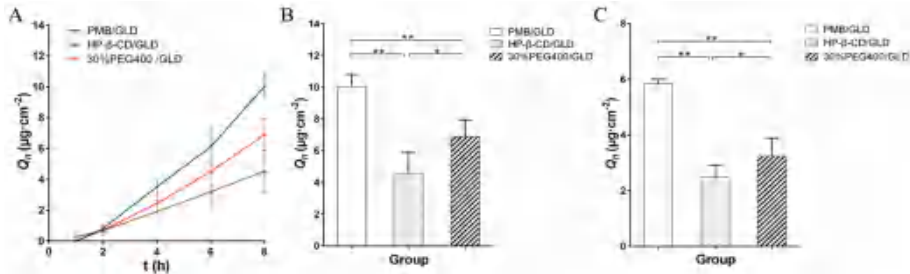


图 8 GLD 不同增溶体系的经皮渗透结果 (n = 6, *P < 0.05, **P < 0.01)

Fig 8 Transdermal permeation of different solubilization systems of GLD (n = 6, *P < 0.05, **P < 0.01)

A. 不同 GLD 组的累积经皮渗透量 - 时间曲线 (cumulative transdermal permeation amount-time curve of different GLD groups); B. 不同 GLD 组 8 h 累积经皮渗透量 (8 h cumulative transdermal permeation amount of different GLD groups); C. 不同 GLD 组的皮内滞留量 (intradermal retention of different GLD groups)

4 结论

影响疏水性活性成分经皮递送效能的核心因素主要是其溶解特性、扩散及跨皮肤屏障渗透能力。本研究创新性地采用水溶性两亲性磷酸胆碱聚合物 PMB 作为增溶载体,通过分子自组装策略显著提高了疏水性 GLD 的生物利用度。采用 MD 模拟结合可视化分析可知, PMB 结构中的疏水性 BMA 侧链通过范德华力主导的分子间相互作用,与 GLD 结合形成稳定的共组装复合物,均匀分散在水溶液中。粒径测定结果显示, PMB 和 GLD 两者在水介质中形成粒径为 (37.81 ± 0.06) nm 的纳米结构, ^1H NMR 及苾荧光微环境极性测定结果显示, PMB 的疏水侧链在水溶液中可以形成分子聚集体,其内部极性与正己烷相当,这为疏水分子 GLD 提供了理想的溶解微环境, TG 及 X-RD 实验结果也证实 PMB 和 GLD 两者形成了新的高度无定形物质。研究发现,随着 PMB 质量浓度增加, GLD 饱和溶解度呈现显著线性增长 ($r = 0.994$), PMB 质量浓度为 $30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, GLD 饱和溶解度约为 $485 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,较纯水体系提高了 68 倍。这种浓度依赖性增溶效应源于 PMB 疏水聚集体的动态重构:随浓度升高,聚合物的疏水侧链通过“开放缔合”机制形成延伸的纳米级聚集体,有效扩大了药物负载空间^[23]。本研究所用的磷酸胆碱聚合物 PMB 中疏水侧链 (BMA 单元) 占比为 10 mol% ~ 50 mol%, 分子量为 $50\,000 \sim 500\,000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。聚合物的增溶能力与疏水分子和聚合物之间的相互作用有关,后续研究工作尝试调整聚合物结构中疏水侧链的组成及占比,进而调节聚合物聚集体内部的极性、黏度等物理参数及疏水分子与聚合物相互作用的强度^[12, 28-29]等,形成一系列类似聚合物,

以期实现对不同极性疏水分子的包载增溶。

体外经皮渗透实验结果表明, PMB 对于提高 GLD 经皮渗透量及皮肤滞留量均有显著优势。在同等 GLD 浓度下, PMB 体系 8 h 累积经皮渗透量达 $(10.04 \pm 0.77) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, 分别是 HP- β -CD 包合体系和 30% PEG400 潜溶剂体系的 2.2 倍和 1.5 倍 ($P < 0.01$), 同时提高皮肤滞留量至 $(5.85 \pm 0.15) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, 提示 PMB 可能具有相关的促经皮渗透机制。PMB 具有与细胞膜结构类似的磷酸胆碱头部基团,推测 PMB 可以通过分子拟态作用与皮肤角质层脂质双分子层 (主要成分为神经酰胺、胆固醇酯) 产生特异性相互作用,进而可逆性调节皮肤屏障功能。后续工作将深入研究 PMB 对于皮肤角质层微观结构和脂质排列有序度的影响,阐释其对于皮肤屏障的作用,深入分析 PMB 促进经皮渗透的机制,并通过 MD 模拟揭示 PMB 与皮肤脂质膜蛋白的相互作用位点,以期实现经皮递送系统的精准调控。

综上,本研究证实了磷酸胆碱聚合物作为新型增溶载体的优越性能,能显著提高 GLD 的水溶性及经皮渗透性;提出了药物-载体共组装理论,并通过多尺度表征阐明了聚合物分子聚集体“结构-性质-效能”间的构效关系,可为其他疏水性原料的应用研究提供参考。

参考文献

- [1] Pan CX, Liu XY, Zheng YT, et al. The mechanisms of melanogenesis inhibition by glabridin: molecular docking, PKA/MITF and MAPK/MITF pathways [J]. Food Sci Hum Wellness, 2023, 12 (1): 212-222.
- [2] Parlar A, Arslan SO, Çam SA. Glabridin alleviates inflamma-

- tion and nociception in rodents by activating BK_{Ca} channels and reducing no levels [J]. *Biol Pharm Bull*, 2020, 43 (5): 884-897.
- [3] Hespeler D, Kaltenbach J, Pyo SM. Glabridin smartpearls-silica selection, production, amorphous stability and enhanced solubility [J]. *Int J Pharm*, 2019, 561: 228-235.
- [4] Razzak MA, Lee JE, Choi SS. Structural insights into the binding behavior of isoflavonoid glabridin with human serum albumin [J]. *Food Hydrocolloid*, 2019, 91: 290-300.
- [5] Wei YQ, Zhang J, Zhou Y, et al. Characterization of glabridin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex with robust solubility and enhanced bioactivity [J]. *Carbohydr Polym*, 2017, 159: 152-160.
- [6] Wei Y, Vrieskoop F, Yuan Q, et al. β -lactoglobulin as a nanotransporter for glabridin: exploring the binding properties and bioactivity influences [J]. *ACS Omega*, 2018, 3 (9): 12246-12252.
- [7] Liu C, Hu J, Sui H, et al. Enhanced skin permeation of glabridin using eutectic mixture-based nanoemulsion [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2017, 7 (2): 325-332.
- [8] 王艳, 叶柳青, 刘园园, 等. 氢化胡椒碱对光甘草定软膏透皮渗透性的影响 [J]. *天津中医药*, 2016, 33 (3): 177-181.
- [9] 胡艳萍, 廖朗坤, 廖士季, 等. 光甘草定包合物缓释微针的制备及其体内外释药性能评价 [J]. *中国新药杂志*, 2022, 31 (5): 455-463.
- [10] 王丽峰, 丁苗苗, 何新, 等. 光甘草定醇质体与立方液晶纳米粒皮肤滞留量比较及抗豚鼠皮肤老化作用观察 [J]. *药物评价研究*, 2020, 43 (10): 1944-1950.
- [11] Ishihara K, Mu MW, Konno T. Water-soluble and amphiphilic phospholipid copolymers having 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine units for the solubilization of bioactive compounds [J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2018, 29 (7-9): 844-862.
- [12] Yoshie K, Yada S, Ando S, et al. Effects of inner polarity and viscosity of amphiphilic phospholipid polymer aggregates on the solubility enhancement of poorly water-soluble drugs [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2020, 195: 111215.
- [13] Ho TH, Hien TD, Wilhelmsen O, et al. Thermophysical properties of polyethylene glycol oligomers via molecular dynamics simulations [J]. *RSC Adv*, 2024, 14 (38): 28125-28137.
- [14] Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, et al. Gromacs: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers [J]. *SoftwareX*, 2015, 1-2: 19-25.
- [15] Irrgang ME, Davis C, Kasson PM. Gmxapi: a gromacs-native python interface for molecular dynamics with ensemble and plugin support [J]. *PLoS Comput Biol*, 2022, 18 (2): e1009835.
- [16] Pederson JP, McDaniel JG. DFT-based QM/MM with particle-mesh Ewald for direct, long-range electrostatic embedding [J]. *J Chem Phys*, 2022, 156 (17): 174105.
- [17] Spivak M, Stone JE, Ribeiro J, et al. Vmd as a platform for interactive small molecule preparation and visualization in quantum and classical simulations [J]. *J Chem Inf Model*, 2023, 63 (15): 4664-4678.
- [18] 李璐, 周建明, 杨一帆, 等. 复方南星止痛膏活性成分在不同接收介质中的透皮扩散行为比较 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24 (3): 1-7.
- [19] Wu JH, Zhou Y, Zhang JL, et al. Molecular dynamics simulation investigation of the binding and interaction of the EphA6-odin protein complex [J]. *J Phys Chem B*, 2022, 126 (26): 4914-4924.
- [20] Rahman MM, Junaed M, Hosen SMZ, et al. Mollusc-derived brominated indoles for the selective inhibition of cyclooxygenase: a computational expedition [J]. *Molecules*, 2021, 26 (21): 6538.
- [21] 王新月, 徐小虎, 张海洋, 等. 维生素 A 醋酸酯 / 环糊精包合及性质研究 [J]. *化工学报*, 2024, 75 (z1): 321-328.
- [22] Ohshio M, Ishihara K, Yusa S. Self-association behavior of cell membrane-inspired amphiphilic random copolymers in water [J]. *Polymers*, 2019, 11 (2): 327.
- [23] Mu M, Konno T, Inoue Y, et al. Solubilization of poorly water-soluble compounds using amphiphilic phospholipid polymers with different molecular architectures [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017, 158: 249-256.
- [24] 周艳, 冯真雅, 奚志林, 等. 荧光探针法测定聚氧化乙烯与 SDS 的作用 [J]. *化学研究与应用*, 2018, 30 (2): 237-242.
- [25] Newman A, Zografi G. Commentary: considerations in the measurement of glass transition temperatures of pharmaceutical amorphous solids [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2019, 21 (1): 26.
- [26] Hujran TAA, Magharbeh M, Habashneh AY, et al. Insight into the inclusion complexation of fluconazole with sulfonatocalix[4] naphthalene in aqueous solution, solid-state, and its antimycotic activity [J]. *Molecules*, 2022, 27 (14): 4425.
- [27] Bunaciu AA, Udristoiu EG, Aboul-Enein HY. X-ray diffraction: instrumentation and applications [J]. *Crit Rev Anal Chem*, 2015, 45 (4): 289-299.
- [28] Yoshie K, Ishihara K. Improvement of oral absorption of poorly water-soluble drugs by solid dispersions with amphiphilic phospholipid polymer [J]. *J Pharm Sci*, 2022, 111 (11): 3141-3148.
- [29] Yoshie K, Yada S, Ando S, et al. Chemical structural effects of amphipathic and water-soluble phospholipid polymers on formulation of solid dispersions [J]. *J Pharm Sci*, 2021, 110 (8): 2966-2973.

(收稿日期: 2025-01-19; 修回日期: 2025-03-06)

基于胆汁酸水平探索二氢杨梅素改善利福平所致肝损伤的作用

罗细林^{1, 2}, 张婵娟¹, 石雅宁¹, 吴雄³, 覃丽^{1*} (1. 湖南中医药大学药学院干细胞中药调控与应用实验室, 长沙 410208; 2. 长沙市第三医院药学部, 长沙 410015; 3. 平江县第一人民医院药学部, 湖南 岳阳 414500)

摘要: **目的** 通过检测胆汁酸 (BAs) 水平分析二氢杨梅素 (DMY) 改善利福平 (RIF) 所致小鼠药物性肝损伤 (DILI) 的减毒机制。**方法** 采用 32 只 ICR 小鼠, 随机分为空白组 (Vehicle 组)、RIF 组、DMY 组和 RIF + DMY 组。Vehicle 组灌胃生理盐水, RIF 组灌胃 442.5 mg · kg⁻¹ RIF 溶液, DMY 组灌胃 577.6 mg · kg⁻¹ DMY 溶液, RIF + DMY 组首次给予 DMY 后 1 h 再灌胃 RIF, 间隔 8 h 后再次给药 DMY, 并连续 14 d 建立 DILI 模型。测定血生化肝功能指标水平以及 BAs 谱, 并观察肝组织病理学改变。**结果** RIF 组中小鼠肝系数增加, 谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、碱性磷酸酶 (ALP)、总胆红素 (TBIL)、直接胆红素 (DBIL)、间接胆红素 (IBIL)、总胆汁酸 (TBA) 等指标显著升高, 同时观察到肝脏结构紊乱以及细胞损伤或坏死现象, 并且 BAs 谱胆酸 (CA) 和鹅去氧胆酸 (CDCA) 显著升高; 经 RIF 和 DMY 联用后, 小鼠肝系数呈下降趋势, 同时 ALT、AST、TBIL、DBIL、IBIL、TBA 水平明显减少。此外, 肝组织病理损伤得到明显改善, 细胞坏死减少, 血清 CA 和 CDCA 显著接近于正常小鼠的水平。**结论** DMY 能够显著改善 RIF 所致 DILI, 而血清 CA 和 CDCA 可能作为 DILI 潜在生物标志物。

关键词: 胆汁酸; 二氢杨梅素; 利福平; 药物性肝损伤

中图分类号: R286

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)05-1198-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.004

Effect of dihydromyricetin on rifampicin induced liver injury based on bile acid levels

LUO Xi-lin^{1, 2}, ZHANG Chan-juan¹, SHI Ya-ning¹, WU Xiong³, QIN Li^{1*} (1. Laboratory of Stem Cell Regulation with Chinese Medicine and Its Application, School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208; 2. Department of Pharmacy, The Third Hospital of Changsha, Changsha 410015; 3. Department of Pharmacy, The First People's Hospital of Pingjiang, Yueyang Hunan 414500)

Abstract: Objective To determine the detoxification mechanism of dihydromyricetin (DMY) on rifampicin (RIF) induced liver injury (DILI) in mice based on bile acid (BA) levels. **Methods** Thirty-two ICR mice were randomly divided into a normal group (the Vehicle group), a RIF group, a DMY group, and a RIF + DMY group. The Vehicle group received normal saline. The RIF group was given RIF 442.5 mg · kg⁻¹ solution. The DMY group was given 577.6 mg · kg⁻¹ DMY solution. The RIF + DMY group was first given DMY and followed by RIF 1 h later, and DMY again 8 h later. The DILI model was established following this schedule 14 consecutive days later. The levels of serum biochemical indicators of liver function and BAs spectrum were measured. The liver histopathological changes were observed. **Results** The liver index of the RIF group was increased, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, total bilirubin, direct bilirubin,

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.82274159); 湖南省自然科学基金科药联合基金 (No.2022JJ80088); 湖南省卫生健康委员会重点指导课题 (No.202213055529); 湖南省自然科学基金青年项目 (No.2023JJ40485); 湖南省教育厅优秀青年项目 (No.22B0355)。

作者简介: 罗细林, 男, 硕士研究生, 主要从事药理学研究, email: 843520850@qq.com ***通信作者:** 覃丽, 女, 教授, 博士研究生导师, 主要从事肿瘤、心血管疾病的发病机制及其中医药防治研究, email: Lqin@hnucm.edu.cn

indirect bilirubin, and total bile acid were increased substantially. Disordered liver structure and cell damage or necrosis were also observed along with greatly increased cholic acid and chenodeoxycholic acid levels in the BAs spectrum. However, after combined use of RIF and DMY, the liver coefficient of mice decreased. The levels of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, total bilirubin, direct bilirubin, indirect bilirubin, and total bile acid obviously reduced. In addition, the liver pathological damage was noticeably improved after the treatment, cell necrosis reduced, and serum cholic acid and chenodeoxycholic acid levels close to normal level in mice. **Conclusion** DMY can effectively improve DILI induced by RIF, while serum cholic acid and chenodeoxycholic acid may serve as potential biomarkers for DILI.

Key words: bile acid; dihydromyricetin; rifampicin; drug-induced liver injury

药物性肝损伤 (DILI) 在普通人群中的发生率超过 23.80/10 万, 在住院患者中更是高达 1% ~ 6%, 其最主要的病因是服用传统中药和抗结核药物^[1]。在长期以利福平 (RIF) 和异烟肼为基础用药方案的抗结核治疗中, 患者应用 RIF 可出现肝细胞功能障碍、胆汁淤积性肝损伤等 DILI^[2-8]。目前对此有诊断意义的辅助检查手段较为缺乏, 其中通过检测转氨酶进行临床确诊也较为困难^[9-10]。已有研究发现藤茶主要活性成分二氢杨梅素 (DMY) 对 DILI 具有较好的减毒和保肝作用, 且其减毒效果与剂量相关^[11]。前期研究表明单一胆汁酸 (BAs) 组分可能成为 DILI 的潜在早期标志物, 并反映肝损伤的初始反应和严重程度^[10, 12-13], 本研究测定 DMY 干预 RIF 所致 DILI 时主要指标变化, 从 BAs 代谢的角度深入探讨 DMY 的保肝作用机制, 并进一步探索单一 BAs 作为 DILI 潜在标志物的证据, 为抗结核治疗的临床用药提供更多理论基础。

1 材料

1.1 试药与仪器

RIF、DMY (大连美仑生物技术有限公司, 纯度 $\geq 98\%$, 批号分别为 O0706A 和 D1208A); 谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 测定试剂盒 (中山标佳生物科技有限公司); 碱性磷酸酶 (ALP) 检测试剂盒 (中元汇吉生物技术股份有限公司); 直接胆红素测定试剂盒 (DBIL)、总胆红素测定试剂盒 (TBIL) (北京华宇亿康生物工程技术有限公司); 总胆汁酸 (TBA) 检测试剂盒 (北京利德曼生化股份有限公司); 胆酸 (CA)、鹅去氧胆酸 (CDCA)、去氧胆酸 (DCA)、熊去氧胆酸 (UDCA)、牛磺熊去氧胆酸 (TUDCA)、牛磺鹅去氧胆酸 (TCDCA) (长沙昂诺生物科技有限公司); 牛磺胆酸 (TCA)、石胆酸 (LCA)、牛磺去氧胆酸 (TDCA) (美国 Sigma 试剂公司)。醋酸环丙孕

酮 (中国食品药品检定研究院, 纯度: 100%), 乙腈和甲醇 (色谱纯, Merck), 甲酸、乙酸铵 (色谱纯, ROEScientificinc.)。东芝 TBA-2000FR 全自动干式生化分析仪 (日本株式会社三广医疗公司), LCMS-8050 质谱仪 (日本岛津公司)。

1.2 实验动物

32 只 18 ~ 22 g 雄性 ICR 健康小鼠 (SPF 级) [湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可证号: SCXK (湘) 2019-0004]。标准化饲养于湖南省中医药研究院中药研究所实验室。

2 方法

2.1 实验设计

实验动物适应环境 5 d 后, 正式开始动物实验, 将此时小鼠体重计为初始体重。所有小鼠随机化分为 4 组, 每组 8 只, 分组如下: ① 空白组 (Vehicle 组), ② RIF 组 ($442.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ RIF), ③ DMY 组 ($577.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ DMY), ④ RIF + DMY 组 ($442.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ RIF + $577.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ DMY)。Vehicle 组灌胃等量的生理盐水; RIF 组灌胃 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液; DMY 组灌胃 DMY 溶液; RIF + DMY 组: 先给予 DMY, 1 h 后再灌胃 RIF, 在间隔 8 h 后再灌一次 DMY。以上方案连续 14 d。

实验中每 3 日测量一次小鼠体重, 密切观察各组小鼠体重变化情况, 初步评估 RIF 与 DMY 对小鼠的毒性影响。为了消除采样时饮食对于 RIF 造模的影响, 所有小鼠在第 14 日晚上禁食不禁水, 第 15 日乙醚麻醉动物, 称重, 计为最终体重。眼眶静脉采血, 静置 30 min 后, 4°C 、 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液分为两份, 一份用于生化指标分析, 另一份于 -70°C 下冻存备用。取血后, 将小鼠颈椎脱臼处死, 开腹腔迅速摘取新鲜肝脏。肝组织切片采用苏木精-伊红 (HE)

染色比较形态异同。

2.2 小鼠血生化肝功能指标测定

应用全自动干式生化分析仪,按相应试剂盒操作规程分别测定小鼠血清中肝功能相关指标 ALT、AST、ALP、TBIL、DBIL、IBIL、TBA 的水平。

2.3 小鼠肝组织病理形态学观察

一部分肝组织置于 4% 多聚甲醛中室温下固定 24 h,脱水、浸蜡固定、切片后进行 HE 染色,并在光显微镜下观察各组小鼠肝细胞的形态变化,进一步拍照分析。

2.4 液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS) 测定血清 BAs 谱^[10]

采用 Xtimate C18 色谱柱 (2.1 mm×150 mm, 3.0 μm, Welch), 预柱: C18 色谱柱 (Guard cartridge System), 柱温为 40℃, 流动相 A 为 0.005% 甲酸 (含 7 mmol·L⁻¹ 乙酸铵), 流动相 B 为甲醇, 流速为 0.25 mL·min⁻¹, 梯度洗脱 (0~2 min, 40%A; 13.0~17.3 min, 5%A; 17.4~29.3 min, 40%A)。质谱在电喷雾负极模式下用于 MRM 功能。其他质谱参数为: 幕气 207 kPa; 碰撞气体媒介; 离子喷涂电压 5500.0 V; 离子源温度 550.0℃。

在 50 μL 的血清上清液加入 150 μL 的内标液 (醋酸环丙孕酮溶液), 涡旋 2 min, 在 15 000 r·min⁻¹、4℃ 下离心 10 min, 取上清液 150 μL, 挥干, 用 50 μL 50% 甲醇复溶。在 LC-MS/MS 系统中进样 5 μL 分析血清 BAs。

2.5 数据处理

本研究仅在获得 5 个以上独立样品时进行统计学分析,实验数据以平均值±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。采用多组间 ANOVA 单因素方差分析,以 LSD 检验进行事后比较, $P < 0.05$ 为差异存在统计学意义。BAs 结果通过 Simca-P14.0 软件进行偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA), BAs 结果的灵敏度和特异性采用受试者工作特征 (ROC) 曲线分析。综合评价 PLS-DA 中 VIP 值 > 1 和 SPSS 统计分析 ($P < 0.05$) 的结果以筛选重要 BAs 差异标志物。所有实验数据以 SPSS 25.0 整理,柱状图及相关性分析以 GraphPad Prism 8.0 软件完成。

3 结果

3.1 小鼠体重和肝系数变化情况

各组小鼠的体重经喂养后均有不同程度的增长,但差异无统计学意义 (见图 1A)。与 Vehicle 组相比,DMY 组肝系数无显著差异,而 RIF 组和 RIF + DMY 组均显著升高;与 RIF 组小鼠相比, RIF + DMY 组呈下降趋势 (见图 1B)。该结果表

明 RIF 可引起肝系数升高,而联用 DMY 可减缓该变化趋势。

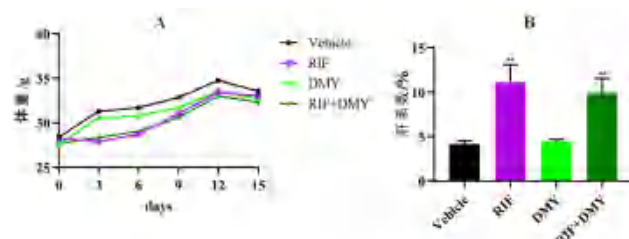


图 1 RIF 和 DMY 对小鼠体重 (A) 及肝系数 (B) 的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n = 8$)

Fig 1 Effect of RIF and DMY on body weight (A) and liver index (B) in mice ($\bar{x}\pm s$, $n = 8$)

注: 与 Vehicle 组比较, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the Vehicle group, ** $P < 0.01$.

3.2 小鼠主要血清肝功能指标变化

小鼠主要血清生化肝功能指标见图 2, 与 Vehicle 组相比, RIF 模型组小鼠的 ALT、AST、ALP、TBIL、DBIL、IBIL、TBA 均显著升高, 说明建模成功。RIF + DMY 组 ALT、ALP 显著升高, 而 AST、TBIL、DBIL、IBIL 呈升高趋势, 表明该组小鼠可能存在一定肝损伤。与 RIF 组相比, RIF + DMY 组小鼠的 ALT、AST、TBIL、DBIL、IBIL、TBA 值显著下调, 表明 DMY 能明显缓解 RIF 引起的肝功能损伤。

3.3 肝组织 HE 染色病理学改变

在光镜下察看肝组织切片 (见图 3), RIF 组显示肝索排列紊乱, 肝细胞大面积水肿变性, 且肝细胞增大, 有少量细胞核消失、胞质空亮, 核嗜碱性, 肝细胞出现空泡变性、脂肪变性或坏死, 肝细胞大量坏死, 肝小叶结构塌陷, 出现明显病理损伤。而 Vehicle 组和 DMY 组肝细胞索呈放射状排列, 分布整齐, 无组织结构破坏或其他病理改变。与 RIF 组相比, RIF + DMY 组小鼠肝组织结构明显改善, 肝细胞肥大、空泡及坏死少, 表明 DMY 可以改善由 RIF 所致的肝损伤。

3.4 血浆 BAs 浓度测定结果

本研究采用 LC-MS/MS 分析小鼠血清的主要 BAs 谱 (见图 4)。与 Vehicle 组小鼠血清 BAs 相比, RIF 组小鼠的游离型 BAs (FBA) 和总 BAs (TBA) 水平显著升高; 而 RIF + DMY 组小鼠的 FBA 和 TBA 比 RIF 组显著降低。其次, 在初级 BAs 中, RIF 组小鼠的 CA 和 CDCA 水平显著升高; 而 RIF + DMY 组小鼠比 RIF 组显著降低。在次级 BAs 中, RIF 组的 DCA、LCA、TDCA、TUDCA 水平显著降低, 而 UDCA 呈升高趋势; 与 RIF 组 BAs

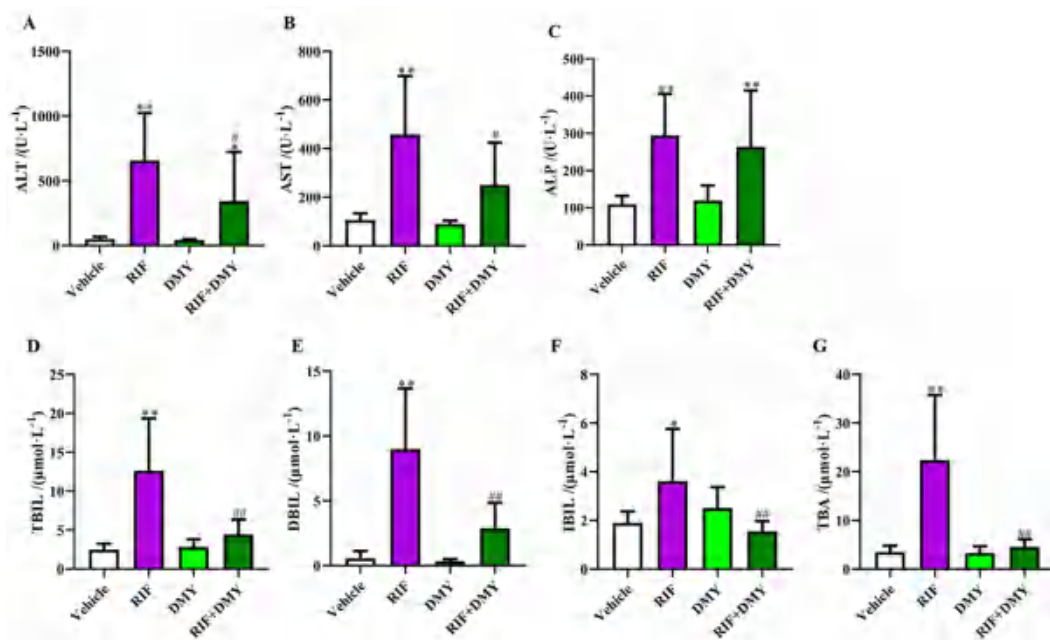


图2 RIF和DMY对各组血清ALT(A)、AST(B)、ALT(C)、TBIL(D)、DBIL(E)、IBIL(F)及TBA(G)值的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig 2 Effect of RIF and DMY on serum value of ALT (A), AST (B), ALT (C), TBIL (D), DBIL (E), IBIL (F), and TBA (G) in all groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与RIF组比较,# $P < 0.05$,### $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the Vehicle group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with the RIF group, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$.

谱相比,RIF + DMY组小鼠的UDCA水平下调,DCA、LCA和TDCA显示上升趋势。此外,RIF组小鼠主要次级BAs与初级BAs比值DCA/CA以及DCA + LCA/CA + CDCA显著降低;而与RIF组相比,RIF + DMY组小鼠该比值呈上升趋势。综上,RIF引起小鼠肝损伤时,血清中CA和CDCA等初级BAs的水平显著上升,而联用DMY显著降低CA和CDCA水平,并改善初级BAs向次级BAs转化,有提高次级BAs水平的趋势。

3.5 差异性BAs可能为肝毒性潜在标志物

根据以上LC-MS/MS检测的血清BAs谱结果,以BA为 x 变量,分组为 y 变量,采用SIMCA-P14.0软件进行PLS-DA矩阵模型分析,并检测组间显著变化的代谢产物($VIP > 1$, $P < 0.05$),得到PLS-DA图以及VIP图谱^[10]见图5。与Vehicle组相比,RIF组和RIF + DMY组均表现出一定的分化和聚类趋势。以Vehicle组、RIF组和RIF + DMY组BAs水平建立的PLS-DA三维模型中,模型解释度(R^2X)为0.759,预测度(R^2Y)为0.594,稳定性为 $Q^2Y = 0.521$,通过变量VIP值($VIP > 1$)评估分析,CA、CDCA、DCA、LCA、TDCA受RIF肝损伤及DMY影响较大。而四组共同比较的PLS-DA模型中,各参数分别为 $R^2X = 0.689$, $R^2Y = 0.359$, $Q^2Y = 0.29$,经变量VIP值($VIP > 1$)评估,CA、CDCA、LCA、

TDCA受RIF和DMY影响较大。

评估本实验中血清BAs水平,结合PLS-DA中VIP值 > 1 和 $P < 0.05$ 的结果,CA和CDCA可能作为重要的差异标志物。将三组PLS-DA模型的VIP评估结果与血清肝功能指标ALT、AST、TBIL、IBIL建立相关性分析热图进行评估并进行相关性Pearson检验。在正常生理条件下,CA和CDCA是人体最主要的初级BAs,而CDCA水平在小鼠体内含量很低^[14]。因此CA在热图中显示明显的区分度,而CDCA组间辨识度稍弱。CA、CDCA与ALT、AST、TBIL、IBIL呈较强的正相关性,CA的相关系数 r 值分别为0.67、0.57、0.94和0.88,CDCA的相关系数 r 值分别为0.56、0.44、0.78和0.69;而DCA、LCA、TDCA与ALT、AST、TBIL、IBIL具有一定的负相关性。最后,对RIF组和RIF + DMY组中血清CA和CDCA水平采用ROC曲线分析的结果显示,血清CA和CDCA表现出高度敏感性和特异性。以上结果表明DMY通过下调RIF所致肝损伤的CA、CDCA水平起到保护肝脏作用。

4 讨论

4.1 DMY减轻RIF所致肝损伤

RIF是主要引起肝损伤的抗结核药物,患者在治疗过程中长期或大剂量应用可能引起肝细胞功能障碍、胆汁淤积性肝损伤,但其机制尚不明确,可

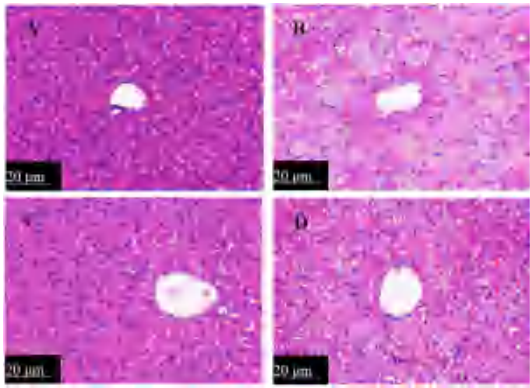


图 3 RIF 和 DMY 对肝组织的影响 (×400)

Fig 3 Effect of RIF and DMY on liver tissue (×400)

A. 空白组 (the Vehicle group); B. RIF 组 (the RIF group); DMY 组 (the DMY group); D. RIF + DMY 组 (the RIF + DMY group)

能与 BAs 蓄积、氧化应激、细胞凋亡、线粒体损伤和炎症等相关^[4, 10, 15-17]。DMY 是我国传统中药藤茶中含量最高的黄酮类化合物成分之一, 具有抗肿瘤、抗菌、调节糖脂代谢等功能, 可对急性肝损伤、脂肪变性肝病、酒精性肝病等发挥保护作用^[11, 18-19]; 其护肝机制主要与减少氧化应激、减少炎症因子、抗凋亡、改善脂质代谢等相关^[20-21]。本研究中, DMY 单独给药对小鼠肝系数平均值、血生化肝功能指标及肝组织形态无明显影响。而 RIF 组给药使肝系数水平显著升高, 肝组织可能出现明显增生。经血生化肝功能指标测定发现, 转氨酶 ALT、AST 和胆汁淤积相关指标 ALP、TBIL、DBIL、IBIL、TBA 显著增高。HE 染色可见 RIF 引

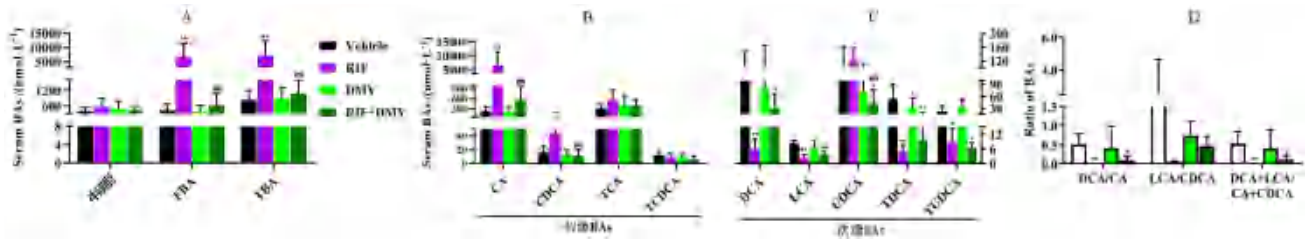


图 4 DMY 调节 RIF 引起的血清 BAs 浓度的变化

Fig 4 Effect of DMY on the serum levels of RIF-induced liver injury mice

注: 与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 RIF 组比较, ## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the Vehicle group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with the RIF group, ## $P < 0.01$.

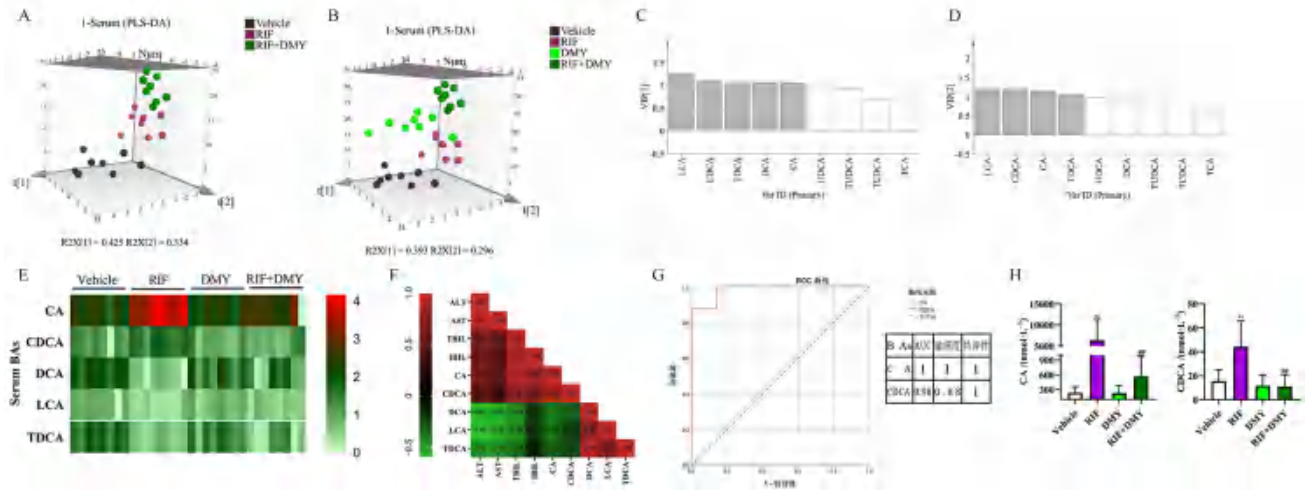


图 5 潜在 BAs 肝损伤标志物筛选

Fig 5 Differential biomarkers of liver injury with targeted metabolomics assay

A、C. 三组模型 (three-group model); B、D. 四组模型 (four-group model); E. VIP > 1 的 BAs 热图 [heatmap of BAs (VIP > 1)]; F. 相关性分析热图 (heatmap of correlation); G. 以 CA 和 CDCA 绘制 ROC 曲线 (ROC curves of CA and CDCA); H. 血清 BAs 潜在肝损伤标志物筛查 (screening of potential target biomarkers for liver injury in the serum BAs)

起了肝细胞与肝组织明显损伤, 表明 RIF 致小鼠 DILI 造模成功。此外, DMY 显著改善多项 RIF 所致肝功能异常指标, 且明显减轻肝细胞坏死和肝小叶结构破坏。

4.2 RIF 和 DMY 对小鼠血清 BAs 的影响

BAs 作为胆汁的主要成分, 与 DILI 或肝胆疾病密切相关, 探索血清 BAs 代谢变化对了解 DILI 毒理机制、探索相应护肝机制以及筛选或评价护肝药物都非常重要^[10, 22]。人体胆固醇在肝内合成初级 BAs (CA 和 CDCA) 后, 可与甘氨酸或牛磺

酸结合形成结合型 BAs, 并随胆汁分泌到肠道; 95%BAs 在回肠末端通过门静脉吸收进行肠肝循环, 未被吸收的少量初级 BAs 则在结肠的菌群作用下转化为次级 BAs^[22]。RIF 可诱导 BAs 代谢相关基因异常表达, 影响 BAs 的肝内合成和体内转运, 同时, RIF 抑制肠道菌群而减少初级 BAs 向次级 BAs 的生物转化^[14]。肝损伤时 BAs 代谢失衡, 肝内 BAs 蓄积, 血清 BAs 水平升高。有研究表明, DMY 可调控 BAs 代谢网络, 通过影响不同 BAs 水平来改善肝损伤^[23]。DMY 可促进 BAs 外排, 降低胆汁淤积风险^[11]。本研究通过分析 RIF 与 DMY 联用对 BAs 水平的影响, 进一步阐述 DMY 护肝减毒机制。结果显示在各组血清 BAs 水平的 PLS-DA 模型中, BAs 水平均表现出一定的分化和聚类趋势。RIF 联合 DMY 可显著降低 RIF 引起的 BAs 升高, 在本研究中表现为 CA、CDCA 以及 UDCA 等 FBA 水平降低。人与鼠类都以结合型 BAs 为主, 且鼠类结合型 BAs 中牛磺型 > 95%^[14, 24]。本研究主要测定了血清中 CA、CDCA、DCA、LCA 和 UDCA 等 FBA 及 TCA、TCDCA、TDCA 和 TUDCA 等牛磺型 BAs, 结果显示初级 BAs 如 CA 和 CDCA 在 RIF 组小鼠出现肝损伤时显著升高, 而在 RIF 联合 DMY 给药时蓄积程度显著下调。我们认为肝损伤时血清 CA、CDCA 的上升与胆汁淤积时肝内 CA、CDCA 经 BAs 转运体 Mrp3 和 Mrp4 转运入血增加有关; RIF + DMY 组小鼠肝损伤减轻, 较 RIF 组血清 CA、CDCA 水平下降或恢复正常。CDCA 可在部分肠道菌群的作用下生成 UDCA, CDCA 与 UDCA 可在肝药酶 Cyp2c70 作用下分别代谢为 α -鼠胆酸 (α -MCA) 和 β -鼠胆酸 (β -MCA), 同时大多数 β -MCA 由 α -MCA 转化而来, 以致 BAs 相关酶障碍时 UDCA 蓄积程度可能远低于 CDCA^[25]; 此外, 有研究认为无肠道菌小鼠也可检测到 UDCA, 小鼠肝内 UDCA 与 CA、CDCA 同属于初级 BAs^[14, 26]。这也解释了本研究中组间 UDCA 变化与 CDCA 相似, RIF + DMY 组小鼠 UDCA 较 RIF 组显著降低, 而与 Vehicle 组相比, RIF 组的 UDCA 呈上升趋势。RIF 给药既可能抑制了肠道梭菌、真杆菌属等 7α 脱氢酶的去羟化, 也可能使肠道产生胆盐水解酶的拟杆菌、乳杆菌、双歧杆菌、梭菌等菌群减少, 从而减少 CA 和 CDCA 转化为 DCA 和 LCA^[14]。由于 DMY 抑制肠道炎症的作用, RIF 单独给药明显降低了次级/初级 BAs (DCA/CA) 比值, 但在 RIF 联用 DMY 后仍显示了升高 DCA/CA 的趋势。

4.3 血清 CA 和 CDCA 可能作为潜在肝损伤标志物

BAs 水平紊乱是肝损伤的重要表现, 血清 BAs 比 ALT 和 AST 更能预测 DILI 的严重程度, 不同 BAs 组分有助于区分和诊断不同类型的肝损伤, 在某些研究中被认为是肝损伤潜在的诊断生物标志物^[27-28]。本研究测定血生化指标以初步评估肝脏功能和 BAs 代谢变化, DMY 显著下调了 RIF 引起的 ALT、AST、TBIL、DBIL、IBIL、TBA 水平异常升高; 在光镜下观察小鼠肝组织结构的组间形态学的明显改善, 其结果进一步显示了 DMY 的护肝作用; 最后以 LC-MS/MS 测定 BAs 水平, 通过 BAs 代谢网络变化探讨 RIF 和 DMY 对肝脏的毒理/减毒的可能机制, 并建立相关性热图评估血清的 CA、CDCA 与血生化指标的相关性。本实验表明 RIF 明显升高血清 CA、CDCA 的浓度, 并抑制次级 BAs (DCA、LCA、TDCA、TUDCA) 的浓度, 而 RIF + DMY 联合治疗可以显著下调 CA、CDCA 水平, 同时 DCA、LCA、TDCA 和次级/初级 BAs 显示升高的趋势。综上所述, 血清 CA 和 CDCA 在反映 RIF 所致 DILI 以及 DMY 护肝作用都具有一定的价值, 可反映肝损伤的初始反应和严重程度, 可能作为潜在生物标志物为临床早期检测 RIF 致 DILI 提供一定参考。

参考文献

- [1] 马世武, 刘成海, 刘晓琰, 等. 中国药物性肝损伤诊治指南 (2023 年版) [J]. 胃肠病学, 2022, 27 (6): 341-375.
- [2] Kastrinou Lampou V, Poller B, Huth F, et al. Novel insights into bile acid detoxification via CYP, UGT and SULT enzymes [J]. Toxicol In Vitro, 2023, 87: 105533.
- [3] Henkel AS. Genetic disorders of bile acid transport [J]. Clin Liver Dis, 2021, 18 (5): 237-242.
- [4] Yang J, Peng T, Huang JY, et al. Effects of medium-and long-chain fatty acids on acetaminophen-or rifampicin-induced hepatocellular injury [J]. Food Sci Nutr, 2020, 8 (7): 3590-3601.
- [5] 罗细林, 覃丽, 李昕, 等. 利福平致肝损伤的毒理机制及中药配伍减毒研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2021, 38 (9): 1125-1132.
- [6] Wu T, Shen MY, Liu SH, et al. Ameliorative effect of cyclocarya paliurus polysaccharides against carbon tetrachloride induced oxidative stress in liver and kidney of mice [J]. Food Chem Toxicol, 2020, 135: 111014.
- [7] Moussavian MR, Laschke MW, Schlachtenberger G, et al. Perigraft vascularization and incorporation of implanted Dacron prostheses are affected by rifampicin coating [J]. J Vasc Surg, 2016, 64 (6): 1815-1824.
- [8] Ezhilarasan D. Antitubercular drugs induced liver injury:

- an updated insight into molecular mechanisms [J]. *Drug Metab Rev*, 2023, 55 (3): 239-253.
- [9] McGill MR, Jaeschke H. Biomarkers of drug-induced liver injury [J]. *Adv Pharmacol*, 2019, 85: 221-239.
- [10] Deng Y, Luo XL, Li X, et al. Screening of biomarkers and toxicity mechanisms of rifampicin-induced liver injury based on targeted bile acid metabolomics [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 925509.
- [11] 邓阳, 张毕奎, 颜苗, 等. 基于 Nrf2 信号通路和胆汁酸代谢网络分析二氢杨梅素对急性肝损伤的保护作用 [C]// 2016 年中国药学会大会暨第十六届中国药师周论文集. 中国药学会, 2016: 204-217.
- [12] Sanoh S, Tamura Y, Fujino C, et al. Changes in bile acid concentrations after administration of ketoconazole or rifampicin to chimeric mice with humanized liver [J]. *Biol Pharm Bull*, 2019, 42 (8): 1366-1375.
- [13] Slopianka M, Herrmann A, Pavkovic M, et al. Quantitative targeted bile acid profiling as new markers for DILI in a model of methapyrilene-induced liver injury in rats [J]. *Toxicology*, 2017, 386: 1-10.
- [14] Fiorucci S, Distrutti E, Carino A, et al. Bile acids and their receptors in metabolic disorders [J]. *Prog Lipid Res*, 2021, 82: 101094.
- [15] Grobelaar M, Louw GE, Sampson SL, et al. Evolution of rifampicin treatment for tuberculosis [J]. *Infect Genet Evol*, 2019, 74: 103937.
- [16] 罗细林, 杜青, 邓阳, 等. 利福平致小鼠药物性肝损伤的模型建立及肾毒性的评价 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36 (11): 1488-1491.
- [17] Kim JH, Nam WS, Kim SJ, et al. Mechanism investigation of rifampicin-induced liver injury using comparative toxicoproteomics in mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18 (7): 1417.
- [18] 沈佳妍, 徐婧淇, 刘森, 等. 天然黄酮类化合物改善酒精性肝病作用及机制的研究进展 [J]. *中南药学*, 2022, 20 (2): 371-381.
- [19] 康萌, 李雪梅, 万静之, 等. 二氢杨梅素肝脏疾病保护作用及机制研究进展 [J]. *中南药学*, 2024, 22 (5): 1300-1304.
- [20] Hou LJ, Jiang FY, Huang B, et al. Dihydromyricetin ameliorates inflammation-induced insulin resistance via phospholipase C-CAMKK-AMPK signal pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 8542809.
- [21] Guo L, Zhang HF, Yan XP. Protective effect of dihydromyricetin reverts fatty liver through nuclear factor- κ B/p53/B-cell lymphoma 2-associated X protein signaling pathways in a rat model [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19 (3): 1638-1644.
- [22] Chiang JYL, Ferrell JM. Bile acid receptors FXR and TGR5 signaling in fatty liver diseases and therapy [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2020, 318 (3): G554-G573.
- [23] Qin Y, Fan RY, Liu YX, et al. Exploring the potential mechanism of rubus corchorifolius l. fruit polyphenol-rich extract in mitigating non-alcoholic fatty liver disease by integration of metabolomics and transcriptomics profiling [J]. *Food Funct*, 2023, 14 (20): 9295-9308.
- [24] Karsten REH, Krijnen NJW, Maho W, et al. Mouse precision-cut liver slices as an ex vivo model to study drug-induced cholestasis [J]. *Arch Toxicol*, 2022, 96 (9): 2523-2543.
- [25] Honda A, Miyazaki T, Iwamoto J, et al. Regulation of bile acid metabolism in mouse models with hydrophobic bile acid composition [J]. *J Lipid Res*, 2020, 61 (1): 54-69.
- [26] Li J, Dawson PA. Animal models to study bile acid metabolism [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019, 1865 (5): 895-911.
- [27] Li M, Wang Q, Li Y, et al. Apical sodium-dependent bile acid transporter, drug target for bile acid related diseases and delivery target for prodrugs: current and future challenges [J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 212: 107539.
- [28] Luo LN, Aubrecht J, Li DZ, et al. Assessment of serum bile acid profiles as biomarkers of liver injury and liver disease in humans [J]. *PLoS One*, 2018, 13 (3): e0193824.

(收稿日期: 2024-11-01; 修回日期: 2025-03-12)

负载蛇床子素外泌体的制备及其对类风湿关节炎大鼠的药效学研究

周政署¹, 华重钧¹, 孙佳归¹, 曹玉琪¹, 文武龙², 王锐², 柳成刚^{1*} (1. 黑龙江中医药大学基础医学院, 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040)

摘要: **目的** 制备装载蛇床子素 (Ost) 的外泌体 (EXOs), 并考察其对类风湿关节炎大鼠的疗效。**方法** 采用超速离心法从巨噬细胞中提取外泌体, 透射电镜检测其形貌, 粒径仪检测其粒径, Western blot 检测外泌体膜特征蛋白 CD9 和 TSG101 的表达。采用超声法将蛇床子素负载到外泌体中, 紫外分光光度计法检测其载药量与包封率。MTT 法检测其对 HFLS-RA 细胞与 RAW 264.7 细胞的抑制效果以考察体外药效与制剂安全性, 胶原抗体诱导法建立胶原诱导性关节炎 (CIA) 大鼠模型, 药效实验设对照组、模型组、Ost 组、Ost-EXOs 组、阳性药 (地塞米松) 组。以足肿胀度、免疫器官指数、滑膜组织病理学检查, 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测血清炎症因子水平变化为指标进行药效学研究。**结果** 巨噬细胞源性外泌体平均粒径为 (113.72 ± 2.51) nm, 载药后其粒径增长为 (138.63 ± 3.87) nm, 透射电镜下外泌体形貌呈茶托状, 符合外泌体形貌特征, Western blot 结果显示外泌体特征蛋白 CD9 与 TSG101 在载药前后均正常表达。外泌体对蛇床子素包封率为 $(21.43 \pm 1.07)\%$ 、载药量为 $(1.79 \pm 0.46)\%$ 。体外细胞毒性实验结果表明与游离 Ost 相比, Ost-EXOs 对 HFLS-RA 细胞抑制率更强, 具备更好的体外药效, 且 Ost-EXOs 具备良好的生物相容性。药效实验结果显示, 与模型组相比, Ost 组、Ost-EXOs 组与阳性药组的足肿胀度与免疫器官指数均得到显著改善 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 血清中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 炎症因子水平显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 滑膜组织的病变均得到改善, 同时与 Ost 组相比, Ost-EXOs 组药效更佳 ($P < 0.05$)。**结论** 本研究成功制备了装载蛇床子素的外泌体, 其对 CIA 模型大鼠具有良好的疗效, 可有效解决蛇床子素生物利用度低、在体内代谢快等问题, 为扩展此类中药的应用及类风湿关节炎等疾病的治疗提供了新思路。

关键词: 外泌体; 蛇床子素; 类风湿关节炎

中图分类号: R286, R283 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)05-1205-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.005

Preparation of exosomes loaded with osthole and its pharmacodynamic effect on rats with rheumatoid arthritis

ZHOU Zheng-shu¹, HUA Chong-jun¹, SUN Jia-gui¹, CAO Yu-qi¹, WEN Wu-long², WANG Rui², LIU Cheng-gang^{1*} (1. College of Basic Medical, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040; 2. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040)

Abstract: **Objective** To prepare exosomes loaded with osthole and determine their therapeutic macrophages effect on rats with rheumatoid arthritis. **Methods** The exosomes were extracted from RAW 264.7 by ultracentrifugation. The morphology was detected by transmission electron microscope (TEM), the particle size was detected by particle size analyzer, and the expression of markers CD9 and TSG101 on the membrane of exosomes were detected by Western blot. Osthole was loaded into exosomes by the ultrasonic method, and its drug loading and encapsulation efficiency were detected by UV spectrophotometer. MTT assay was used to detect its inhibitory effect on HFLS-RA and RAW 264.7 cells to determine its efficacy and safety in vitro. The collagen-induced arthritis (CIA) rat model was established by collagen antibody

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.82074271)。

作者简介: 周政署, 男, 在读硕士研究生, 主要从事经方临床应用与实验研究, email: 1336929623@qq.com * **通信作者:** 柳成刚, 男, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事经方临床应用与实验研究, email: liukaifu86904003@126.com

induction. The pharmacodynamic experiments included a control group, a model group, an Ost group, an Ost-EXOs group and a positive drug (dexamethasone) group. The foot swelling, immune organ index, synovial histopathological examination, and the serum inflammatory factors were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** The average particle size of exosomes derived from macrophages was (113.72 ± 2.51) nm, and the particle size increased to (138.63 ± 3.87) nm after the drug loading. The transmission electron microscope showed that the exosomes were saucer-shaped, which was consistent with the characteristics of exosomes. Western blot showed that exosomes characteristic proteins CD9 and TSG101 were normally expressed before and after the drug loading. The encapsulation efficiency of exosomes for osthole was $(21.43 \pm 1.07)\%$, and the drug loading was $(1.79 \pm 0.46)\%$. In vitro cytotoxicity test showed that Ost-EXOs had stronger inhibition rate on HFLS-RA cells and better efficacy in vitro than those of free Ost. Meanwhile, toxicity test results on RAW 264.7 cells showed that Ost-EXOs had good biocompatibility. The pharmacodynamic experiment showed that compared with the model group, the foot swelling and immune organ index were significantly improved ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in the Ost group, Ost-EXOs group and positive drug group, while the levels of inflammatory factors such as $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ and IL-6 in the serum were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The synovial tissue lesions were improved. Each index in the Ost-EXOs group improved more than that in the Ost group ($P < 0.05$). **Conclusion** Exosomes loaded with osthole are successfully prepared in this study, and have a good therapeutic effect on CIA rats. They can effectively solve the problem of low bioavailability and rapid metabolism of osthole in vivo, and provide a new idea for the treatment of rheumatoid arthritis with traditional Chinese medicine.

Key words: exosome; osthole; rheumatoid arthritis

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以持续性、全身性关节滑膜炎为特征进而致使关节疼痛肿胀的自身免疫性疾病, 由于其发病机制尚未明确, 临床上主要以药物治疗作为缓解手段^[1-2]。蛇床子素 (osthole, Ost) 是从中药蛇床子中提取得到的一种香豆素, 具有抗肿瘤、抗炎和保护心脏等多种生理作用^[3], 研究表明蛇床子素对关节炎具有显著的改善作用^[4]。然而, 蛇床子素存在溶解度差、生物利用度低等缺陷, 极大地限制了其在临床上的广泛应用^[5]。外泌体 (exosomes, EXOs) 是一种粒径在 30 ~ 200 nm, 具有脂质双层膜结构的细胞囊泡^[6], 使其具有低免疫原性、高生物相容性等优势, 可有效解决药物低生物利用度和低溶解度问题^[7]。基于此, 本研究从巨噬细胞中提取外泌体, 采用超声法将蛇床子素载入其中后考察其对 RA 模型大鼠的疗效, 以期蛇床子素类生物利用度低、溶解度差等药物的开发提供参考。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级 6 ~ 8 周龄 SD 雄性大鼠 40 只, 体重 180 ~ 220 g [黑龙江中医药大学实验动物中心, 动物使用许可证号 SYXK (黑) 2022-006], 所有动物实验程序符合《实验动物管理和使用指南》相关要求, 由黑龙江中医药大学动物伦理委员会批准 (批件号: 2022032701)。

1.2 试药

巨噬细胞 RAW 264.7 (武汉普诺赛生命科技有限公司, 批号: CL-0190), 类风湿关节炎滑膜 (HFLS-RA) 细胞 (深圳豪地华拓生命科技有限公司, 批号: HTX1835)。蛇床子素 (纯度: 99%, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 批号: L2122261); 牛 II 型胶原蛋白 (C II) (北京博奥拓达科技有限公司, 批号: 20230819); 弗氏完全佐剂 (美国 Sigma 公司, 批号: F5881); 肿瘤坏死因子 ($\text{TNF-}\alpha$)、白细胞介素 (IL) - 1β 酶联免疫吸附法 (ELISA) 试剂盒 (深圳欣博盛生物科技有限公司, 批号: ERC102a、ERC007); IL-6 ELISA 试剂盒 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 批号: GEM0010); CD9 抗体 (武汉博士德生物工程有限公司, 批号: BM4212); TSG101 抗体 (英国 Abcam 公司, 批号: ab125011)。

1.3 仪器

CP100MX 型超速离心机 (日本株式会社日立制作所); DM3000 型光学显微镜 (德国徕卡仪器有限公司); DYCZ-2DN 型电泳仪、WD-9405F 型脱色摇床、WD-9423B 型化学发光分析仪 (北京六一生物科技有限公司); ZS90 型粒径电位分析仪 (英国马尔文仪器有限公司); HT-7700 型透射电镜 (日本株式会社日立制作所); Microfuge 20R 小型台式冷冻离心机 (美国贝克曼库尔特有限公司)。

2 方法

2.1 RAW 264.7 源性外泌体的提取^[7]

RAW 264.7 (CL-0190) 鉴定结果显示其分型良好、无污染,在 ExPASy 细胞库中找到与其细胞分型 97.56% 相匹配的细胞,细胞名称为 RAW 264.7。RAW 264.7 使用无血清培养基培养,待细胞状态良好且密度达到 70%~80% 时,先后在 3000 g、4℃,离心 15 min; 10 000 g、4℃ 离心 45 min。过 0.45 μm 滤膜后,以 4℃、100 000 g 离心 70 min,重复离心两次即得 RAW 264.7 源性外泌体。

2.2 外泌体的表征

采用 BCA 试剂盒测定外泌体总蛋白浓度。Western blot 法检测外泌体膜特征蛋白 CD9 和 TSG101 的表达。粒径仪测定其粒径,透射电镜观察其形貌。

2.3 超声法载药

将 20 mg 的蛇床子素溶于 410 μL 的二甲基亚砜 (DMSO),并用磷酸盐缓冲液 (PBS) 稀释至 4 mL,与等体积的外泌体混悬液混合后按文献条件^[8]进行超声处理 (20% 振幅,6 个 30 s 的开/关循环,每个循环之间的冷却时间为 2 min),于 37℃ 水浴孵育 1 h,恢复外泌体膜后即得 Ost-EXOs。

2.4 Ost-EXOs 包封率与载药量的测定

用 PBS 将蛇床子素对照品稀释为质量浓度 2、4、6、8、10 mg·mL⁻¹ 的溶液,采用紫外分光光度仪在 320 nm 波长测定吸光度并绘制标曲,参照文献^[9]方法超声处理 (20% 振幅,6 个 30 s 的开/关循环,每个循环之间的冷却时间为 2 min),将超声处理后的混悬液于 4℃、10 000 g 条件下离心 15 min 以分离游离药物与外泌体,通过测定载药前后上清液中蛇床子素浓度变化来确定包封率与载药量。包封率 (%) = $(W_{\text{总}} - W_{\text{游离}}) / W_{\text{总}} \times 100\%$,载药量 (%) = $(W_{\text{总}} - W_{\text{游离}}) / (W_{\text{总}} + W_{\text{载体}}) \times 100\%$ 。

2.5 体外细胞毒性实验

使用 MTT 法评估 Ost-EXOs 对 HFLS-RA 细胞增殖的抑制作用以考察体外药效,评估 Ost-EXOs 对 RAW 264.7 细胞存活率的影响以考察制剂的安全性。将 HFLS-RA 细胞与 RAW 264.7 细胞接种在 96 孔板中,HFLS-RA 细胞用 PBS、游离蛇床子素、Ost-EXOs 处理,RAW 264.7 细胞用 PBS 与 Ost-EXOs 处理,孵育 24 h 后,加入 10 μL 的 MTT 溶液 (5 mg·mL⁻¹) 孵育 2 h。加入 100 μL DMSO 终止反应,然后使用酶标仪测量 490 nm 处的吸光度,计算细胞存活率。

2.6 Ost-EXOs 对 RA 的治疗作用

2.6.1 动物造模、分组与给药 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、阳性药 (地塞米松) 组 (1.0 mg·kg⁻¹)、Ost 组 (2.0 mg·kg⁻¹) 与 Ost-EXOs 组 (2.0 mg·kg⁻¹),每组 8 只。除对照组外其余各组采用胶原抗体诱导法^[10]建立胶原诱导性关

节炎 (CIA) 大鼠模型,随后 Ost 组、Ost-EXOs 组关节腔注射给药,阳性药组灌胃给药,对照组与阳性药组仅进行关节腔穿刺,不注射药物。

2.6.2 一般情况及足肿胀度观察 给药期间记录各组大鼠进食量、毛发等一般状况,采用水容积法^[9]测量足肿胀度。

2.6.3 免疫器官指数 称量大鼠体重,取材后称量脾脏和胸腺重量,免疫器官指数 = 脏器湿重量 (mg) / 大鼠体重 (g)。

2.6.4 ELISA 法检测血清中炎症因子水平 按 ELISA 试剂盒说明书测定各组大鼠血清中 TNF-α、IL-1β、IL-6 的水平。

2.6.5 滑膜组织病理学检查 大鼠踝关节滑膜组织经 4% 多聚甲醛固定 48 h,梯度乙醇脱水,二甲苯透明后浸蜡、包埋、切片,苏木精-伊红 (HE) 染色,封片后用显微镜拍照记录。

2.7 统计学分析

采用 GraphPad Prism V 8.0.2 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,多组样本比较采用单因素方差分析/重复测量方差分析,以 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 载蛇床子素外泌体的表征

粒径仪测得巨噬细胞源性外泌体平均粒径为 (113.72 ± 2.51) nm,载药后其粒径有所增长,平均粒径为 (138.63 ± 3.87) nm,见图 1。透射电镜下外泌体形貌均呈现茶托状,超声法装载蛇床子素后其形态未发生明显变化,同时在载药前与载药后的外泌体中均可检测到外泌体膜特征蛋白 CD9 与 TSG101 的表达,表明载药后外泌体仍具备生物膜特征,见图 2。

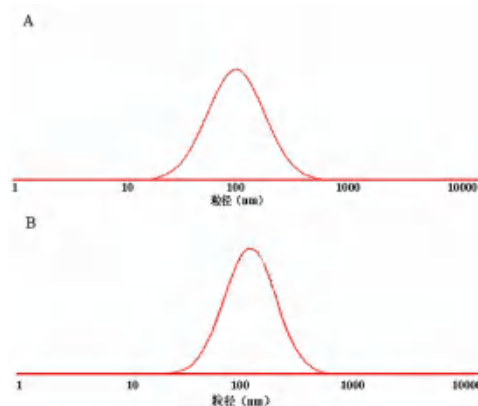


图 1 外泌体载药前 (A)、载药后 (B) 的粒径图

Fig 1 Particle size of exosome before (A) and after (B) the drug-loaded

3.2 蛇床子素包封率与载药量的测定

蛇床子素回归方程: $y = 0.05291x + 0.005253$ ($R^2 = 0.9979$),在 2~10 mg·mL⁻¹ 与峰面积呈现良好的线性关系。外泌体对蛇床子素包封率为

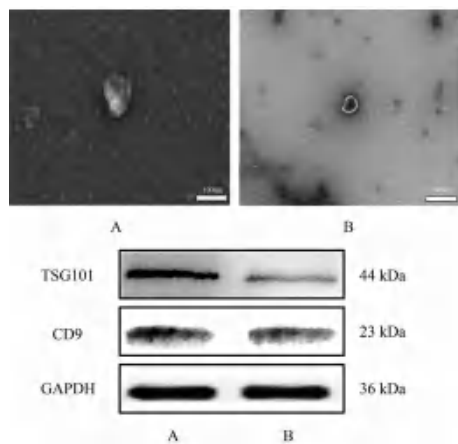


图 2 外泌体载药前 (A) 与载药后 (B) 电镜图及 TSG101 与 CD9 蛋白表达图

Fig 2 Electron microscopy of exosomes and expression of proteins TSG101 and CD9 before (A) and after (B) the drug-loaded

(21.43 ± 1.07)%、载药量为 (1.79 ± 0.46)%。

3.3 体外细胞毒性实验

采用 MTT 法测定 Ost-EXOs 对 HFLS-RA 细胞存活率的影响,在各浓度梯度下, Ost-EXOs 对 HFLS-RA 细胞抑制率均优于 Free Ost,而当浓度在 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上时,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),结果见图 3A;同时考察了使用 DMSO 作助溶剂后载药外泌体的细胞毒性,结果在所有测试浓度中, RAW 264.7 细胞的存活率均在 85% 以上,细胞的增殖情况未受明显影响,表明小剂量 DMSO 作助溶剂并未影响到制剂安全性, Ost-EXOs 仍具有良好的生物相容性,见图 3B。

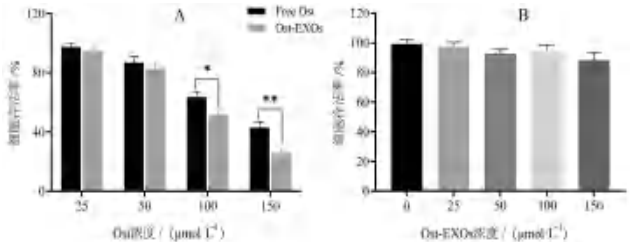


图 3 Ost-EXOs 对 HFLS-RA 细胞 (A)、RAW 264.7 细胞 (B) 存活率的影响

Fig 3 Effect of Ost-EXOs on the cell viability of HFLS-RA cells (A) and RAW 264.7 cells (B)

注:与 Free Ost 组相比, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 。

Note: Compared with the Free Ost group, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 。

3.4 大鼠一般状况与足肿胀度观察

给药结束后,对照组大鼠状态良好,食、水摄入量正常,四肢正常;与对照组相比,模型组大鼠状态萎靡,食、水摄入量减少,四肢显著肿胀 ($P < 0.01$)。与模型组相比,给药组足肿胀度得到显著改善 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),同时与 Ost 组相比,阳性药组和 Ost-EXOs 组改善程度更佳 ($P < 0.05$),见图 4。

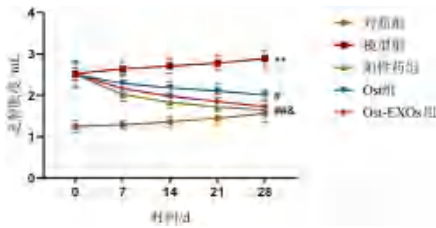


图 4 各组足肿胀度变化图

Fig 4 Changes of foot swelling degree of each group

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

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

3.5 Ost-EXOs 对大鼠免疫器官指数的影响

与对照组比较,模型组大鼠胸腺、脾脏指数显著升高 ($P < 0.01$),与模型组相比,各给药组免疫器官指数均得到显著改善 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),与 Ost 组相比,阳性药组和 Ost-EXOs 组改善程度更佳 ($P < 0.05$),见表 1。

表 1 免疫器官指数变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Tab 1 Changes of immune organ index ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)			
组别	剂量 / ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	胸腺指数 / ($\text{mg} \cdot \text{ng}^{-1}$)	脾脏指数 / ($\text{mg} \cdot \text{ng}^{-1}$)
对照组	0	1.15 ± 0.22	2.41 ± 0.22
模型组	0	$2.40 \pm 0.26^{**}$	$3.78 \pm 0.24^{**}$
阳性药组	1	$1.26 \pm 0.18^{##\&}$	$2.59 \pm 0.35^{##\&}$
Ost 组	2	$1.82 \pm 0.21^{\#}$	$3.12 \pm 0.28^{\#}$
Ost-EXOs 组	2	$1.37 \pm 0.17^{##\&}$	$2.65 \pm 0.12^{##\&}$

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

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

3.6 各组大鼠血清炎症因子水平变化

与对照组相比,模型组大鼠血清中 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-6 水平显著上升 ($P < 0.01$);与模型组比较,各治疗组 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-6 水平显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);且与 Ost 组相比,阳性药组与 Ost-EXOs 组改善程度更佳 ($P < 0.05$),见表 2。

3.7 HE 染色观察踝关节滑膜组织病理学变化

对照组滑膜未见增生,无炎性细胞浸润,形态正常。模型组滑膜显著增厚并形成大量空腔结构,伴有较多结缔组织增生与淋巴细胞浸润。与模型组相比,阳性药组与 Ost-EXOs 组滑膜组织增生程度与淋巴细胞浸润程度大幅减轻,病理状态得到显著改善,而 Ost 组滑膜状态虽得到一定程度的改善,但仍呈现部分淋巴细胞浸润,推断可能与其生物利用度低、半衰期短导致 Ost 在体内大量代谢消除有关,见图 5。

表 2 血清炎症因子水平变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Tab 2 Serum levels of inflammatory factors ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)				
组别	剂量 / ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	TNF- α / ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	IL-1 β / ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	IL-6 / ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)
对照组	0	86.39 $\pm$ 5.61	47.24 $\pm$ 3.17	40.98 $\pm$ 2.88
模型组	0	211.69 $\pm$ 9.81**	117.83 $\pm$ 5.35**	104.71 $\pm$ 6.15**
阳性药组	1	100.55 $\pm$ 5.82 ^{###} &	62.05 $\pm$ 4.32 ^{###} &	58.49 $\pm$ 5.07 ^{###} &
Ost 组	2	178.36 $\pm$ 8.45 [#]	98.82 $\pm$ 7.78 [#]	85.29 $\pm$ 6.33 [#]
Ost-EXOs 组	2	115.06 $\pm$ 8.32 ^{###} &	67.39 $\pm$ 3.83 ^{###} &	60.11 $\pm$ 2.49 ^{###} &

注：与对照组相比，** $P < 0.01$ ；与模型组相比，[#] $P < 0.05$ ，^{###} $P < 0.01$ ；与 Ost 组相比，& $P < 0.05$ 。

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



图 5 踝关节滑膜组织形态学变化 (HE 染色, $\times 100$)

Fig 5 Histomorphological changes in the synovial membrane of the ankle joint (HE staining, $\times 100$)

噬细胞源性外泌体的包封使得细胞对 Ost 的摄取增加从而增强了其体外药效，同时对 RAW 264.7 细胞的毒性实验结果表明，Ost-EXOs 具有良好的生物相容性。免疫器官指数是评估疾病免疫状态与病理状态的重要参数，通过测定给药后免疫器官指数的变化可在一定程度上反映出药物对疾病的治疗效果^[12]。在本研究中，模型组免疫器官指数显著升高，给药后各组大鼠免疫器官指数均得到改善，且相较于 Ost 组，Ost-EXOs 组免疫器官指数改善效果更佳，提示在外泌体的保护下，蛇床子素在体内的抗炎效果得到充分发挥，进而改善疾病状态下免疫器官指数的异常升高。研究表明，在 RA 的发生和发展过程中，炎症细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平显著升高并诱导关节软骨与滑膜组织产生炎症反应，进而造成软骨组织的损伤^[13]。本研究中各给药组大鼠 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的表达量较模型组均显著下降，而 Ost-EXOs 组炎症因子表达量较 Ost 组更接近对照组，这可能是蛇床子素包载于外泌体后，其在病灶部位的代谢消除得以延缓，生物利用度提高使得其对炎症因子的调节效果更持久有效。RA 的症状表现为关节软骨与滑膜组织的侵袭破坏，最终导致关节畸形和功能丧失^[14]。本研究中，模型组大鼠滑膜大量增生并伴有显著的

4 讨论

中药成分蛇床子素已被证实对 RA、肿瘤等疾病具有较佳的疗效^[3]，然而生物利用度低等缺陷极大地限制了其发展。研究表明，巨噬细胞源性外泌体在 RA 的发生发展及治疗中发挥着重要的作用^[11]，基于此，本研究将蛇床子素装载于巨噬细胞源性外泌体得到 Ost-EXOs，透射电镜与 Western blot 结果显示 Ost-EXOs 具备外泌体的形态与生物膜特征。

本研究考察了 Ost-EXOs 对 RA 的疗效，体外细胞实验表明相较于 Ost，Ost-EXOs 对 HFLS-RA 细胞具备更强的抑制效果，这可能是由于巨

炎性细胞侵袭，阳性药组与 Ost-EXOs 组滑膜组织病理状态大幅改善，然而 Ost 组滑膜仍显示出一定的淋巴细胞侵袭，可能是由于蛇床子素直接暴露于病灶微环境从而被大量消除代谢，而 Ost-EXOs 组蛇床子素在巨噬细胞源性外泌体的保护下一定程度上逃避机体代谢消除从而延长其作用时间发挥更强的疗效。

综上所述，本研究成功制得了负载蛇床子素的外泌体，载药后的外泌体仍具备生物膜特性，经关节腔注射后，可有效富集在病灶部位，同时可避免全身毒副作用^[15]，其疗效比 Ost 组更佳，这意味着 Ost-EXOs 可有效提高 Ost 的生物利用度，同时发挥更稳定持久的药效。然而本研究参照文献条件制得的 Ost-EXOs 载药量与包封率相对较低，这可能是导致 Ost-EXOs 组疗效略低于阳性药组的原因，相比于阳性药，Ost-EXOs 优势在于拥有良好的生物相容性且更易被病灶细胞摄取，可有效降低药物全身毒副作用，后续可通过调整超声功率、超声时间、药物与载体比例等条件优化载药工艺从而进一步挖掘外泌体负载此类药物的应用前景，本研究为扩展蛇床子素等低生物利用度类药物的应用及 RA 的治疗提供了参考，为促进传统中药与新剂型的结合提供了新思路。

参考文献

- [1] 苏安宇, 黄伟斌, 莫静媛, 等. 基于系统药理学结合 LC-MS/MS 技术探讨温性经筋通贴膏治疗类风湿关节炎的药效物质基础与作用特点[J]. 中药新药与临床药理, 2024, 35 (5): 706-718.
- [2] 陈娜, 臧雷, 刘芳. 过氧化物酶体增殖活化因子受体 γ 及其激动剂在类风湿关节炎中的作用研究进展[J]. 中南药学, 2024, 22 (5): 1311-1316.
- [3] 果秋婷, 李昱, 冯华, 等. 蛇床子素自乳化释药系统的制备与质量评价[J]. 中南药学, 2018, 16 (7): 958-962.
- [4] Xu RG, Liu Z, Hou JD, et al. Osthole improves collagen-induced arthritis in a rat model through inhibiting inflammation and cellular stress[J]. Cell Mol Bio Lett, 2018, 23 (1): 19.
- [5] 张楠, 景永帅, 张丹参. 蛇床子素抗癌作用机制及其剂型研究[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33 (9): 729-730.
- [6] 田有溪, 师嘉欣, 李子毅, 等. 细胞外囊泡产生机制研究进展[J]. 中南药学, 2023, 21 (12): 3247-3255.
- [7] 李明莉, 胡冬生, 杨秀竹, 等. 外泌体装载蛇床子素的方法探究[J]. 中国药理学通报, 2023, 39 (10): 1994-1998.
- [8] Xiang XJ, Chen J, Jiang T, et al. Milk-derived exosomes carrying siRNA-KEAP1 promote diabetic wound healing by improving oxidative stress[J]. Drug Deliv Transl Res, 2023, 13 (9): 2286.
- [9] 文武龙, 张伟烨, 贺雨欣, 等. 基于牛乳外泌体与脂质体的杂化外泌体制备及其负载青藤碱治疗类风湿关节炎的药效学研究[J]. 中国中药杂志, 2024, 49 (15): 4069-4077.
- [10] 梁霄, 李娅兰, 张筠昊, 等. 基于 TLR2/p38 MAPK/NF- κ B 信号通路探讨独活寄生汤对类风湿关节炎大鼠的抗炎作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29 (11): 43.
- [11] 原日明, 李建军. 巨噬细胞及其外泌体在骨科疾病中的作用[J]. 中国医科大学学报, 2024, 53 (5): 464-467, 472.
- [12] 段睿洁, 张航瑜, 武玲, 等. 蚯蚓蛋白提取物对免疫抑制小鼠肠黏膜免疫功能的调节作用[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2022, 37 (4): 597-603.
- [13] Barranco C. Rheumatoid arthritis: anti-TNF agent choice impacts cardiovascular risk[J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12 (3): 132.
- [14] Sakthiswary R, Rajalingam S, Hussein H, et al. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in rheumatoid arthritis and its correlation with sonographic knee cartilage thickness and disease activity[J]. Clin Rheumatol, 2017, 36 (12): 1-6.
- [15] 张筠昊, 梁霄, 白皓天, 等. 关节腔注射剂青藤碱纳米晶自稳定 Pickering 乳液的制备及药效学研究[J]. 中草药, 2022, 53 (20): 6412.

(收稿日期: 2024-09-30; 修回日期: 2024-12-22)

模拟失重条件下苯海拉明的药代动力学变化

刁春妍¹, 林佳艳¹, 孙定康², 何金穗³, 马丽莎¹, 王庆伟^{3, 4}, 高建义⁵, 李勇枝⁵, 刘雪英^{1*} (1. 空军军医大学药学院, 西安 710032; 2. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046; 3. 西安秦皇医院, 西安 710600; 4. 西安文森医药科技有限公司, 西安 710600; 5. 中国航天员科研训练中心, 北京 100094)

摘要: **目的** 研究模拟失重条件下 SD 大鼠体内苯海拉明的药代动力学变化, 并探讨其治疗空间运动病的潜在影响。**方法** 12 只健康雄性 SD 大鼠随机分为模拟失重组和常重组, 每组 6 只, 模拟失重组尾部悬吊 3 d。两组大鼠单次灌胃给予苯海拉明 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 后, 分别在 0.083、0.167、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、4、8、12 h 采集血液, 建立 LC-MS/MS 方法并测定血浆药物浓度, 使用 Phoenix WinNonlin 软件计算药代动力学参数。**结果** 与常重组相比, 模拟失重组 SD 大鼠苯海拉明 $t_{1/2z}$ 缩短, $AUC_{0 \sim t}$ 显著增加, 提示药物在体内暴露量增大。达峰浓度升高, V_z/F 减小, CL/F 下降, 药物体内分布发生变化, 体内消除速度减慢。**结论** 模拟失重 3 d 后 SD 大鼠体内苯海拉明的吸收程度增加, 分布减小, 代谢减慢, 排泄加快, 提示进入失重环境早期, 苯海拉明的服用剂量有可能需要调整。

关键词: 苯海拉明; 模拟失重; 药代动力学; 空间运动病; 尾吊模型

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)05-1210-05

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.006

基金项目: 1226 工程卫生专业重点项目 (No.AWS16J018, No.BWS17J028); 陕西省重点研发计划一般项目 (No.2023-YBSF-504)。

作者简介: 刁春妍, 女, 硕士研究生, 主要从事药物分析与药代动力学研究, email: diaocyzz@163.com * **通信作者:** 刘雪英, 女, 副教授, 主要从事药代动力学及药物合成与活性研究, email: xylu0427@163.com

Pharmacokinetic changes of diphenhydramine under simulated weightlessness conditions

DIAO Chun-yan¹, LIN Jia-yan¹, SUN Ding-kang², HE Jin-sui³, MA Li-sha¹, WANG Qing-wei^{3,4}, GAO Jian-yi⁵, LI Yong-zhi⁵, LIU Xue-ying^{1*} (1. Department of Pharmacy, Air Force Medical University, Xi'an 710032; 2. Department of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712046; 3. Xi'an Qinhuang Hospital, Xi'an 710600; 4. Xi'an Vincent Meditech Co., Ltd., Xi'an 710600; 5. Research and Training Center for Astronaut in China, Beijing 100094)

Abstract: Objective To determine the pharmacokinetic changes of diphenhydramine in SD rats under simulated weightlessness and its potential effect on space motion sickness. **Methods** Twelve healthy male SD rats were randomly divided into a simulated weightlessness group and a normal group (6 rats in each group). The simulated weightlessness group was tail-suspended for 3 days, while the normal group was not. After a single oral administration of diphenhydramine ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) to both groups, the blood was collected at 0.083, 0.167, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 4, 8 and 12 h. The plasma drug concentration was determined with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and the pharmacokinetic parameters were calculated with Phoenix WinNonlin software. **Results** Compared with the normal group, the $t_{1/2z}$ of diphenhydramine in the simulated weightless SD rats was shortened and $AUC_{0 \sim t}$ was much increased, indicating increased drug exposure in the body. The peak concentration increased, V_z/F and CL/F decreased, showing that the distribution of the drug in the body changed, and the elimination rate in the body slowed down. **Conclusion** After three days of simulated weightlessness, the absorption of diphenhydramine in SD rats increases, its distribution decreases, its metabolism slows down, and its excretion accelerated, indicating that it is necessary to adjust the medication strategy when using diphenhydramine in the early stage of entering a weightless environment.

Key words: diphenhydramine; simulated weightlessness; pharmacokinetics; space motion sickness; tail-suspension model

空间运动病 (space motion sickness, SMS) 是宇航员在太空飞行中常见的一种疾病, 前 3 d 症状最为严重, 表现为恶心、呕吐、头晕等不适, 严重影响宇航员的健康和航天任务的执行^[1-3]。苯海拉明作为一种抗组胺药物, 被广泛用于治疗和预防正常重力环境下的运动病^[4-5]。然而, 在微重力或模拟失重环境下, 苯海拉明的药代动力学特性是否发生变化, 以及这些变化是否影响其治疗空间运动病的效果, 目前尚不清楚^[6-7]。

为了深入探究苯海拉明在模拟失重条件下的药代动力学行为, 本实验拟通过大鼠尾吊模型模拟失重模型, 研究模拟失重对苯海拉明体内吸收、分布、代谢和排泄过程的影响, 进而评估其在太空环境下治疗空间运动病的潜在有效性和安全性。

1 材料

1.1 动物

12 只 7 周龄的 SPF 级雄性 Sprague-Dawley 大鼠, 体重 180 ~ 220 g [空军军医大学实验动物中心, 生产许可证号: SCXK (陕) 2019-001, 使用

许可证号: SYXK (军) 2017-0044], 实验方案经空军军医大学实验动物中心福利与伦理委员会审核, 动物实验伦理审查编号: IACUC-20240027。

1.2 试药

盐酸苯海拉明对照品 (纯度: 99.8%, 批号: 100066-202108)、伪麻黄碱对照品 (纯度: 99.8%, 批号: 171237-202211) (中国食品药品检定研究院); 安息香、松香 (上海麦克林生化科技股份有限公司); 甲醇 (色谱纯, 赛默飞世尔科技有限公司); 乙酸铵 (分析纯, 天津科密欧化学试剂有限公司); 实验用水为自制超纯水; 其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器

Agilent 6460C 三重四极杆质谱联用仪、Agilent 1260 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); CV100-DNA 吉艾姆真空离心浓缩仪 (北京吉艾姆科技有限公司); MIX-25P 涡旋振荡器 (晟联合科技有限公司); Sorvall ST 40R 冷冻离心机 (美国 Thermo Fisher 科技有限公司); AB135-S 十万分之一天平 (瑞士梅特勒托利多科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 储备液配制 精密称取苯海拉明和内标 (IS) 伪麻黄碱, 用甲醇配制成质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的苯海拉明和伪麻黄碱储备液, 4°C 保存备用。

2.1.2 标准工作液配制 取适量储备液, 用甲醇逐级稀释配制成标准工作液, 苯海拉明标准工作液质量浓度分别为 5000、2000、1000、500、200、100、50、20、10、5 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 伪麻黄碱的工作溶液质量浓度为 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2 动物模型的建立

大鼠适应性喂养一周后, 随机分成模拟失重组和常重组, 每组 6 只。模拟失重组参照尾部悬吊法^[8-9]建立模拟失重大鼠模型, 使大鼠躯干与地面呈 30° , 大鼠可自由移动和饮食, 模拟失重 3 d 后给药, 采集血浆样品。

2.3 血浆样品采集

大鼠禁食 12 h 后灌胃给予 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 苯海拉明的生理盐水溶液, 分别于给药后 0.083、0.167、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、4、8、12 h 通过眼眶取血采集血液于肝素钠离心管中, 4°C 、 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 10 min, 分离上层血浆, -20°C 冰箱冻存。

2.4 血浆样品处理

血浆样品处理方法参照文献报道的方法^[10], 并

进行了适当调整。取大鼠血浆 $100 \mu\text{L}$, 加入 $100 \mu\text{L}$ 内标溶液和 $100 \mu\text{L}$ 氢氧化钠溶液 ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 涡旋混合 5 min, 加入 1 mL 正己烷-乙酸乙酯 (3:2, V/V) 溶液萃取, 涡旋混合 5 min 后, 4°C 、 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取 0.7 mL 上清液用 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 45°C 、 $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 真空离心 30 min 挥干, 残余物加入 $100 \mu\text{L}$ 流动相涡旋 5 min, 4°C 下 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液进行分析。

2.5 测定条件

2.5.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent Eclipse Plus C18 柱 ($4.6 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$, $3.5 \mu\text{m}$), 柱温 30°C 。流动相为甲醇-水 (含 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵和 0.1% 甲酸) ($68:32$, V/V), 流速 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量 $5 \mu\text{L}$ 。

2.5.2 质谱条件 离子源为电喷雾离子源 (ESI); 检测方式为正离子多反应监测模式 (MRM); 毛细管电压 4000 V ; 脱溶剂气温度 300°C ; 雾化器压力 15 psi ; 苯海拉明和伪麻黄碱的检测离子对质荷比 (m/z) 分别为 $256.2 \rightarrow 167.2$ 、 $166.1 \rightarrow 148.2$, 去簇电压分别为 83、72 V, 碰撞能量分别为 7、6 eV。

2.6 方法学验证

2.6.1 专属性 分别取空白血浆、空白血浆加苯海拉明和内标溶液、常重组大鼠给药后 1 h 血浆, 按照“2.4”项下方法处理, 进样分析。结果见图 1, 内源性物质对样品含量测定无干扰, 苯海拉明和内标峰形良好, 色谱峰能够有效分离。

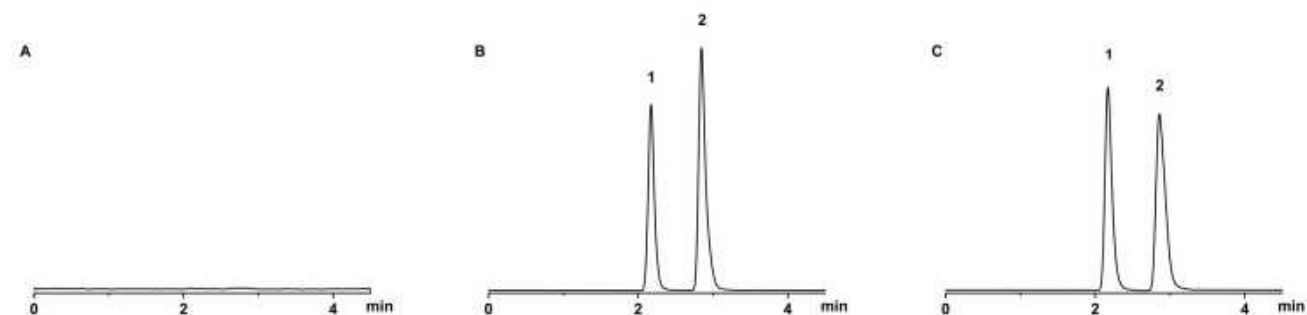


图 1 血浆中苯海拉明和伪麻黄碱的液质联用色谱图

Fig 1 LC-MS/MS chromatogram of diphenhydramine and pseudoephedrine in the plasma

A. 空白血浆 (blank plasma); B. 空白血浆加苯海拉明和伪麻黄碱 (blank plasma with diphenhydramine and pseudoephedrine); C. 常重组血浆 (plasma in normal group); 1. 伪麻黄碱 (pseudoephedrine); 2. 苯海拉明 (diphenhydramine)

2.6.2 线性范围与定量下限 取大鼠空白血浆, 加入系列标准工作液, 制备质量浓度分别为 500、200、100、50、20、10、5、2、1、0.5 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的含药血浆, 按照“2.4”项下方法处理样品, 按“2.5”项下条件进样测定。以苯海拉明和内标的峰面积之比为纵坐标 (Y), 以苯海拉明浓度为横坐标 (X), 加权最小二乘法进行线性回归 (权重为 $1/\chi^2$), 标准曲线方程为 $Y = 0.0294X + 0.0101$, r 为 0.9959, 线性范围为 $0.5 \sim 500 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,

定量下限为 $0.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.6.3 精密度与准确度 空白血浆中定量加入苯海拉明对照品溶液, 平行制备定量下限、低、中、高浓度质控样品各 6 份, 质量浓度分别为 0.5、1、20、400 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 按照“2.4”和“2.5”项下方法操作, 连续分析 3 d, 计算得到各浓度日内和日间准确度的偏差 (RE) 在 $-7.5\% \sim 8.8\%$, 不超过 11.95% , 结果符合分析要求。

2.6.4 稳定性 制备低、中、高质量浓度 (1、

20、400 ng · mL⁻¹) 的质控样品各 6 份, 分别室温放置 12 h、反复冻融 3 次、-20 °C 存放 30 d, 按照“2.4”和“2.5”项下方法操作, 计算不同情况下的准确度 *RSD* 不超过 11.03%, 表明方法稳定性良好。

2.6.5 基质效应与提取回收率 制备低、中、高质量浓度 (1、20、400 ng · mL⁻¹) 质控样品各 6 份, 按照“2.4”项下方法处理后, 测得苯海拉明和内标峰面积之比 A_1 ; 取空白血浆经萃取后, 向上清液中加入内标对照品溶液和低、中、高质量苯海拉明对照品溶液, 按照“2.4”项下萃取后的步骤处理样品, 测得苯海拉明和内标峰面积之比 A_2 ; 取 100 μ L 流动相代替血浆, 制备低、中、高质量浓度 (1、20、400 ng · mL⁻¹) 样品, 经处理后测得苯海拉明和内标峰面积之比 A_3 。计算 A_1 与 A_2 的比值得到提取回收率, 计算 A_2 与 A_3 的比值得到基质效应。苯海拉明的提取回收率均值在 98.5% ~ 103.7%, *RSD* 不超过 10.9%, 基质效应均值在 101.5% ~ 103.3%, *RSD* 不超过 9.0%, 表明该方法提取回收率和基质效应符合生物样品测定要求。

2.7 药代动力学研究

计算得到不同时间点血药浓度后, 使用 GraphPad Prism 8.0 软件绘制血药浓度 - 时间曲线图, 见图 2。使用 Phoenix WinNonlin 软件计算药代动力学参数, 使用 IBM SPSS Statistics 26 软件进行统计学分析, 计算结果见表 1。与常重组相比, 模拟失重组的 $AUC_{0 \sim t}$ 、 $AUC_{0 \sim \infty}$ 增大, V_z/F 、 CL/F 减小, 差异有统计学意义。模拟失重组在给药后 45 min 左右, 苯海拉明在血浆中出现第二个血药浓度峰, 峰高低于第一个血药浓度峰。

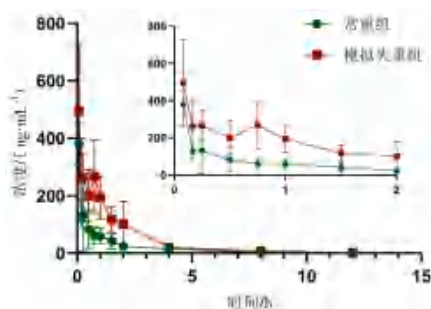


图2 模拟失重组和常重组中苯海拉明的血药浓度 - 时间曲线图

Fig 2 Plasma concentration-time curve of rats in the simulated weightlessness group and normal group

3 讨论

3.1 样品前处理方法的选择与优化

常用的生物样品前处理方法有蛋白沉淀法、液液萃取法、固相萃取法等, 在血浆样品前处理方法优化时, 用乙腈和甲醇作为蛋白沉淀剂处理

表1 模拟失重组和常重组中苯海拉明的药代动力学参数

Tab 1 Pharmacokinetic parameters of rats in the simulated weightlessness group and normal group

参数	常重组	模拟失重组
$AUC_{0 \sim t} / (h \cdot ng \cdot mL^{-1})$	215.48 ± 103.63	538.85 ± 203.12**
$AUC_{0 \sim \infty} / (h \cdot ng \cdot mL^{-1})$	221.04 ± 104.15	542.68 ± 204.64**
$MRT_{0 \sim t} / h$	1.94 ± 0.29	1.83 ± 0.29
$MRT_{0 \sim \infty} / h$	2.32 ± 0.45	1.92 ± 0.31
$t_{1/2} / h$	2.11 ± 0.38	1.80 ± 0.41
t_{max} / h	0.083 ± 0	0.11 ± 0.068
$C_{max} / (ng \cdot mL^{-1})$	380.15 ± 72.20	518.65 ± 208.04
$V_z / F / (L \cdot kg^{-1})$	178.07 ± 108.44	55.64 ± 28.64*
$CL / F / [L / (h \cdot kg)]$	54.96 ± 25.54	21.46 ± 10.28*

注: 与常重组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the normal group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

血浆样品, 分析物和内标回收率较低, 测得的峰形不佳, 所以选用液液萃取法处理血浆样品, 最终参照文献报道^[10]的方法, 进行适当修改后确定了本文血浆样品的处理方法。液相条件优化方面, 有机相为甲醇, 水相为含甲酸的水时, 色谱峰存在明显的拖尾现象, 将水相更换为含乙酸铵和甲酸的水后, 拖尾现象有了明显改善, 经过调整流动相的比例, 最终确定当前的流动相。

3.2 模拟失重对苯海拉明药代动力学的影响

通过构建大鼠模拟失重模型, 探究了苯海拉明在模拟失重条件下的药代动力学行为, 并与常重组大鼠进行了对比分析。实验结果揭示了模拟失重环境对苯海拉明体内吸收、分布、代谢和排泄过程具有显著影响, 为苯海拉明在太空环境下治疗空间运动病的合理应用提供了重要的依据。

与常重组相比, 模拟失重组药物浓度时间曲线形状发生了变化, 在 $(0.83 \pm 0.13) h$ 出现第二个血药浓度峰 $(271.01 \pm 122.05) ng \cdot mL^{-1}$ 。出现双峰现象可能与胃肠道运动功能改变、肝肠循环等因素有关^[7, 11], 具体原因仍需要进一步研究。模拟失重组大鼠的苯海拉明末端消除半衰期 ($t_{1/2}$) 相较于常重组减小, 说明药物在体内的消除速度加快。这一变化可能是由于模拟失重环境下, 代谢酶活性发生改变, 导致药物更快地被代谢和排泄^[12-13]。同时, 模拟失重组的达峰时间 (t_{max}) 虽略有延长, 但达峰浓度 (C_{max}) 增加, 表明在模拟失重条件下, 苯海拉明可能吸收进入血液循环的程度更高, 达到更高的血药浓度, 这可能与模拟失重条件下胃排空改变、肠道血容量增加、整体血容量减少有关^[14-16]。

曲线下面积 (AUC) 是评价药物吸收程度和速度的综合指标, 模拟失重组的 $AUC_{0 \sim t}$ 和 $AUC_{0 \sim \infty}$ 均显著大于常重组, 意味着药物在体内的暴露量增加。表观分布容积 (V_z/F) 反映了药物在体内的

分布范围,模拟失重组大鼠的 V_z/F 显著减小,可能是因为模拟失重条件下整体血容量减少^[17],药物更多地集中在某些组织或器官中,而清除率的降低则表明药物从体内消除的速度减慢。这些变化可能是由模拟失重环境下,大鼠体内的血流动力学改变或药物转运机制的变化所致^[18]。

3.3 研究结果的应用前景

本研究结果对于苯海拉明在太空环境下治疗空间运动病的应用具有重要意义。一方面,模拟失重组大鼠体内苯海拉明暴露量的增加可能有助于提高药物的疗效,从而更好地缓解空间运动病症状;另一方面,药物代谢和排泄速度的改变也可能影响药物的持续时间和给药频率,因此在制订太空环境下的药物使用方案时,需要考虑这些因素。

3.4 研究局限性与未来方向

本研究也存在一定的局限性。大鼠模拟失重模型与真实的太空环境仍存在一定的差异,将实验结果推广至太空环境下的实际应用时,需要谨慎对待。在未来的研究中,有必要进一步开展生理药代动力学等实验,以全面评估苯海拉明在太空环境下的应用潜力和可能风险。

参考文献

- [1] Russomano T, Da RM, Dos SM. Space motion sickness: a common neurovestibular dysfunction in microgravity [J]. *Neurol India*, 2019, 67 (Supplement): S214-S218.
- [2] Lackner JR, Dizio P. Space motion sickness [J]. *Exp Brain Res*, 2006, 175 (3): 377-399.
- [3] Thornton WE, Bonato F. Space motion sickness and motion sickness: symptoms and etiology [J]. *Aviat Space Environ Med*, 2013, 84 (7): 716-721.
- [4] Karrim N, Byrne R, Magula N, et al. Antihistamines for motion sickness [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2022, 10 (10): CD012715.
- [5] Tyler DB. Dramamine and motion sickness [J]. *Science*, 1949, 110 (2850): 170.
- [6] Blue RS, Bayuse TM, Daniels VR, et al. Supplying a pharmacy for NASA exploration spaceflight: challenges and current understanding [J]. *NPJ Microgravity*, 2019, 5: 14.
- [7] Kast J, Yu Y, Seubert CN, et al. Drugs in space: pharmacokinetics and pharmacodynamics in astronauts [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2017, 109S: S2-S8.
- [8] Morey-Holton ER, Globus RK. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects [J]. *J Appl Physiol*, 2002, 92 (4): 1367-1377.
- [9] 付子豪,王臻,吴洁,等.改良的大鼠模拟失重模型制备方法 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2019, 35 (2): 189-192.
- [10] Wang C, Fan GR, Lin M, et al. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay for the simultaneous determination of D-amphetamine and diphenhydramine in beagle dog plasma and its application to a pharmacokinetic study [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 854 (1-2): 48-56.
- [11] Ogungbenro K, Pertinez H, Aarons L. Empirical and semi-mechanistic modelling of double-peaked pharmacokinetic profile phenomenon due to gastric emptying [J]. *AAPS J*, 2015, 17 (1): 227-236.
- [12] Lu SK, Bai S, Javeri K, et al. Altered cytochrome P450 and P-glycoprotein levels in rats during simulated weightlessness [J]. *Aviat Space Environ Med*, 2002, 73 (2): 112-118.
- [13] Graebe A, Schuck EL, Lensing P, et al. Physiological, pharmacokinetic, and pharmacodynamic changes in space [J]. *J Clin Pharmacol*, 2004, 44 (8): 837-853.
- [14] Hoenemann JN, Moestl S, de Boni L, et al. Cardiopulmonary deconditioning and plasma volume loss are not sufficient to provoke orthostatic hypertension [J]. *Hypertens Res*, 2024, 47 (8): 2211-2216.
- [15] Watenpaugh DE. Fluid volume control during short-term space flight and implications for human performance [J]. *J Exp Biol*, 2001, 204 (Pt 18): 3209-3215.
- [16] Gandia P, Bareille MP, Saivin S, et al. Influence of simulated weightlessness on the oral pharmacokinetics of acetaminophen as a gastric emptying probe in man: a plasma and a saliva study [J]. *J Clin Pharmacol*, 2003, 43 (11): 1235-1243.
- [17] Kurazumi T, Ogawa Y, Morisaki H, et al. The effect of mild decrement in plasma volume simulating short-duration spaceflight on intracranial pressure [J]. *NPJ Microgravity*, 2018, 4: 19.
- [18] Norsk P. Adaptation of the cardiovascular system to weightlessness: surprises, paradoxes and implications for deep space missions [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2020, 228 (3): e13434.

(收稿日期: 2024-10-30; 修回日期: 2024-12-05)

基于 5-LOX/LTB4 信号通路探讨黄芩苷 / 栀子苷对 “痰瘀互结”型脑卒中大鼠的保护作用与机制

周雪薇^{1, 3}, 张嘉豪^{1, 3}, 呼田^{1, 3}, 巩洁^{1, 3}, 李媛^{1, 3}, 刘继平^{1, 2, 3}, 王川^{1, 2, 3}, 王斌^{1, 2, 3*} (1. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 中医药脑健康产业陕西省高校工程研究中心, 陕西 咸阳 712046; 3. 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)

摘要: **目的** 探讨黄芩苷与栀子苷配伍 (BC/GD) 对“痰瘀互结”型脑卒中大鼠炎症及血脂水平的改善作用及机制。**方法** 采用高脂饲料喂养和双侧颈动脉结扎法建立“痰瘀互结”型脑卒中模型, 分别给予 60 mg · kg⁻¹ 的 BC/GD 与 0.625 g · kg⁻¹ 的醒脑解郁胶囊治疗, 空白组、假手术组与模型组灌胃等体积生理盐水。激光多普勒检测大鼠脑血流量; 全自动生化分析仪检测大鼠血清三酰甘油 (TG)、总胆固醇 (TC)、高密度脂蛋白 (HDL-C) 和低密度脂蛋白 (LDL-C) 水平; 全自动凝血分析仪检测大鼠血浆活化部分凝血活酶时间 (APTT)、凝血酶原时间 (PT) 和纤维蛋白原 (FIB) 水平; ELISA 法检测大鼠血清白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 (TNF-α)、超敏 C 反应蛋白 (hs-CRP) 和同型半胱氨酸 (Hcy) 含量。HE 染色观察大鼠脑组织与肝脏病理学改变。**结果** 与空白组相比, 模型组大鼠脑血流量显著降低; TG、TC、LDL-C 水平显著升高, HDL-C 水平显著降低; APTT、PT、FIB 值显著降低; TNF-α、IL-6、Hcy 和 hs-CRP 含量显著升高; 脑组织中 5-LOX、BLT1 与 BLT2 蛋白水平显著升高。与模型组相比, 60 mg · kg⁻¹ 的 BC/GD 可以降低大鼠血清 TG、TC、LDL-C 水平, 升高 HDL-C 水平及 APTT 值, 降低 TNF-α、IL-6、Hcy、hs-CRP 水平及 5-LOX、BLT1 和 BLT2 蛋白表达水平。**结论** BC/GD 可通过抑制 5-LOX/LTB4 信号通路表达, 改善血脂水平与凝血功能, 降低血清炎症因子表达, 改善脑组织损伤。

关键词: 痰瘀互结; 缺血性脑卒中; 炎症; 血脂异常; 5-LOX/LTB4 信号通路

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)05-1215-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.007

Protective effect of baicalin/gardenoside on phlegm-blood stasis syndrome in stroke rats via the 5-LOX/LTB4 signaling pathway and related mechanism

ZHOU Xue-wei^{1, 3}, ZHANG Jia-hao^{1, 3}, HU Tian^{1, 3}, GONG Jie^{1, 3}, LI Yuan^{1, 3}, LIU Ji-ping^{1, 2, 3}, WANG Chuan^{1, 2, 3}, WANG Bin^{1, 2, 3*} (1. School of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712046; 2. Shaanxi University Engineering Research Center of Traditional Chinese Medicine Brain Health Industry, Xianyang Shaanxi 712046; 3. Key Laboratory of Pharmacodynamics and Material Basis of Traditional Chinese Medicine, Shaanxi Administration Bureau of Traditional Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712046)

Abstract: Objective To determine the effect and underlying mechanism of baicalin/gardenoside (BC/GD) combination on the inflammation and lipid levels in stroke rats with phlegm-blood stasis syndrome. **Methods** A phlegm-blood stasis stroke model was established via a high-fat diet and bilateral common carotid artery ligation. The rats were treated with BC/GD (60 mg · kg⁻¹) and Xingnao Jieyu capsules (0.625 g · kg⁻¹), while the blank group, the sham operation group, and the model group received an equivalent volume of normal saline. The cerebral blood flow was measured by laser Doppler flowmetry.

基金项目: 陕西省重点研发计划项目 (No.2024SF-GJHX-3); 中医药“双链整合”中青年科研创新团队 (No.2022-SLRH-YQ-006); 咸阳市重点研发项目 (No.I2023-zdyf-SF-014); 陕西中医药大学科教合作教育成果转化项目 (No. 2024kC03)。

作者简介: 周雪薇, 女, 硕士研究生, 主要从事中药药理与心脑血管疾病方面的研究, email: 13772988014@163.com *通信作者: 王斌, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心脑血管病的方药研究, email: wangbin812@126.com

The serum triglycerides (TG), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels were determined by an automatic biochemical analyzer. The plasma coagulation markers, including activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT), and fibrinogen (FIB), were assessed with an automatic coagulation analyzer. ELISA was used to measure the serum levels of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF)- α , high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), and homocysteine (Hcy). The pathological changes in the brain and liver tissues were examined with hematoxylin-eosin (HE) staining. **Results** Compared with the blank group, the model group exhibited obviously reduced cerebral blood flow, elevated serum levels of TG, TC, and LDL-C, and decreased HDL-C levels. The levels of APTT, PT, and FIB were much lower, while the levels of TNF- α , IL-6, Hcy, and hs-CRP were markedly elevated. Additionally, protein expression of 5-lipoxygenase (5-LOX), BLT1, and BLT2 in the brain tissue was greatly increased. In contrast, BC/GD (60 mg $\cdot$ kg⁻¹) reduced the serum TG, TC, and LDL-C levels, increased HDL-C level, improved APTT, but decreased the levels of TNF- α , IL-6, Hcy, and hs-CRP. BC/GD also substantially downregulated the expression of 5-LOX, BLT1, and BLT2 proteins in the brain. **Conclusion** BC/GD protects stroke rats with phlegm-blood stasis syndrome by inhibiting the 5-LOX/LTB4 signaling pathway, improving lipid metabolism, restoring coagulation function, reducing serum inflammatory markers, and protecting the brain tissue from damage.

Key words: phlegm-blood stasis; cerebral ischemic stroke; inflammation; dyslipidemia; 5-LOX/LTB4 signal pathway

缺血性脑卒中 (cerebral ischemic stroke, CIS) 是全球最严重的公共健康问题之一, 其发生与多种因素密切相关, 包括心源性栓塞、大脑中动脉闭塞、高脂血症及动脉粥样硬化等^[1-3]。现代研究表明, CIS 的病理基础主要源于动脉硬化性狭窄, 脂质代谢异常是动脉粥样硬化的关键因素。脂质沉积于血管内膜, 形成斑块, 斑块累积, 导致血管壁狭窄血液循环受阻, 诱发 CIS^[4]。

课题组前期基于“清热解毒”疗法与脑血管疾病的研究发现, 黄芩苷 (baicalin, BC) 与栀子苷 (gardenoside, GD) 以最佳比例 7:3 联合应用能协同增效^[5], 可改善脑缺血后的炎性损伤和血脑屏障透过率, 通过调节小胶质细胞极化与降低兴奋性氨基酸毒性等途径抗缺血性脑损伤, 最佳有效剂量为 60 mg $\cdot$ kg⁻¹^[6-9]。因此, 本研究进一步探讨 BC/GD 配伍对“痰瘀互结”证型的缺血性脑损伤的作用机制。

1 材料

1.1 仪器

激光多普勒血流灌注成像仪 (瑞典 Perimed); 高速离心机 (上海知信实验仪器技术有限公司); 电泳仪、转膜仪 (北京六一生物科技有限公司); 石蜡切片机 (德国 Leica); 酶标仪 (美国 Bio Tek 公司); 全自动生化分析仪 (深圳雷杜生命科技); 全自动凝血分析仪 (上海全自动凝血分析仪希森美康医用电子有限公司)。

1.2 试剂

黄芩苷 (陕西正禾药业生物工程有限公司, 批

号: 2024040-022, 规格: 50 g/袋); 栀子苷 (南京春秋生物工程有限公司, 批号: ZZG20240321, 规格: 10 g/袋); 戊巴比妥钠 (上海山浦化工有限公司); 5-LOX 抗体、BLT1 抗体、BLT2 抗体、ACTIN 抗体、HE 染液套装、DAB 试剂盒 (武汉赛维尔生物科技有限公司); 三酰甘油 (TG)、总胆固醇 (TC)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 测定试剂盒 (深圳雷杜生命科学股份有限公司); 活化部分凝血活酶时间 (APTT)、凝血酶原时间 (PT)、纤维蛋白原 (FIB) 试剂盒 (上海希森美康医用电子有限公司); 白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 (TNF- α)、超敏 C 反应蛋白 (hs-CRP) 和同型半胱氨酸 (Hcy) 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒 (陕西丽明康德生物科技有限公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天生物科技有限公司)。醒脑解郁胶囊 (陕西中医药大学附属医院, 批号: 20230831, 规格: 50 粒/瓶)。

1.3 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只, 体重 (180 $\pm$ 20) g [成都达硕实验动物有限公司, 动物许可证编号: SCXK (川) 2020-0030], 饲养于陕西中医药大学药理实验室动物房, 温度 23 $\sim$ 25 $^{\circ}$ C, 相对湿度 45% $\sim$ 55%, 自由摄食, 饮水充足, 适应性喂养一周确保其生理状态稳定。本实验通过动物实验伦理审查 (伦理批件号: SUCMDL20240310001)。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

适应性喂养结束后,采用随机数字法将 50 只大鼠随机分为 5 组,即空白组、假手术组、模型组、BC/GD (7:3) 组以及醒脑解郁组。空白组大鼠喂养普通饲料,其余各组喂养高脂饲料(上海书玉生物科技有限公司,配方为 49% 基础饲料、17% 猪油、3% 麻油、9% 蔗糖、8% 全脂奶粉、8% 酪蛋白、2% 实验动物预混料、2% 磷酸氢钙、0.5% 胆酸钠和 1.5% 胆固醇)。喂养 8 周后,在高脂饲料喂养的大鼠中随机抽取 3 只观察舌象,眼眶取血测定血脂四项(TG、TC、HDL-C 和 LDL-C)变化,大鼠舌象与血脂水平均异常即为“瘀瘀互结”型造模成功。大鼠禁食不禁水 12 h,造模参照 Sarti 等^[10]的改良双侧颈总动脉结扎法制作慢性脑缺血模型,具体造模方法为:戊巴比妥钠麻醉大鼠,沿颈部中线切开皮肤,逐层分离皮下结缔组织,暴露并仔细分离双侧颈总动脉、颈动脉鞘及迷走神经,在远心端分叉处使用缝合线将双侧颈总动脉永久结扎,消毒后缝合皮肤。假手术组仅暴露颈动脉但不结扎,手术完成后注射青霉素钠防止感染。术后 3 d 以灌胃方式开始给药,黄芩苷 1.68 g 与栀子苷 0.72 g 溶于 400 mL 生理盐水中,灌胃剂量为 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,醒脑解郁组每粒(2 g)溶于 32 mL 生理盐水中,灌胃剂量为 $0.625 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,其余各组灌胃等量生理盐水。

2.2 大鼠舌部图像采集

造模 6 周后,各组大鼠在光源相同和环境固定的情况下,由实验员用镊子轻轻将大鼠舌部拉出,另一名实验员快速拍照。

2.3 激光多普勒检测脑血流量

戊巴比妥钠麻醉大鼠,剃毛后切开头皮,使用微型颅骨打磨机对颅骨进行适度打磨。将处理后的大鼠头部置于激光多普勒仪探测器下方,设置激光多普勒血流成像灌注仪的检测距离为 13 cm,参数面积为 $3 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$,进行全脑扫描,结束后使用配套统计软件量化血液灌注量。

2.4 血脂水平检测

腹主动脉取血,4℃下静置 30 min 后,3500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清液。使用试剂盒及全自动生化分析仪检测大鼠 TG、TC、HDL-C 和 LDL-C 水平。

2.5 凝血功能检测

腹主动脉取血,4℃下静置 2 h,3500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清液。采用试剂盒及全自动凝血分析仪分别测定 APTT、PT 以及 FIB 水平。

2.6 血清炎症因子检测

按说明书步骤,使用 ELISA 试剂盒检测大鼠血清中 IL-6、TNF- α 、Hcy、hs-CRP 水平。

2.7 脑组织与肝组织病理学分析

脑组织与肝组织取出后使用 4% 多聚甲醛固定

48 h,石蜡包埋后切片(4~6 μm)处理。切片脱蜡后使用苏木素染色,分化、返蓝后脱水,用伊红染色,脱水后封片,在倒置显微镜下观察脑组织及肝组织的病理结构。

2.8 免疫组织化学检测大鼠脑组织中 5-LOX 的表达量

石蜡切片经脱蜡、复水与抗原修复后,放入 3% 过氧化氢溶液中避光孵育 25 min,使用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 3 次,浸入 3% 牛血清蛋白中封闭 30 min。切片依次孵育 I 抗、II 抗,用 DAB 显色,苏木精复染,脱水后封片。使用显微摄像系统对切片进行图像采集,通过 Image J 分析样本平均光密度值。

2.9 Western blot 检测脑组织蛋白表达

提取大鼠脑组织蛋白,BCA 法测定样品蛋白浓度。将蛋白质样品装载到 10% 的 SDS-PAGE 凝胶上,随后转移到 PVDF 膜上。5% 的脱脂奶粉封闭 1 h,加入一抗,4℃下孵育过夜,TBST 洗涤去除多余的一抗。加入相应的二抗并孵育 2 h,用 ECL 试剂曝光,Image J 软件分析蛋白条带。

2.10 统计学方法

使用 SPSS 26.0 对数据进行处理,单因素方差分析比较组间数据;方差齐用 LSD 法,方差不齐用 Tamhane' T² 法。 $P < 0.05$ 表明差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠舌部图像分析

空白组大鼠舌质淡红,舌下静脉无明显异常。与空白组相比,假手术组与模型组大鼠舌质暗紫,舌下静脉迂曲清晰可见,符合“瘀瘀互结”的证候表现。与模型组相比,BC/GD 组与醒脑解郁组的舌质颜色与静脉迂曲均得到改善(见图 1)。

3.2 各组大鼠脑血流量变化

与空白组相比,假手术组与模型组大鼠的脑血流量显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组相比,BC/GD 组与醒脑解郁组脑血流量显著上升($P < 0.01$)(见表 1 及图 2)。

3.3 BC/GD 对大鼠血脂四项影响

与空白组比较,假手术组和模型组大鼠血清 TG、TC、LDL-C 水平显著升高($P < 0.01$),HDL-C 水平显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较,BC/GD 组与醒脑解郁组 TG、TC、LDL-C 水平显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),HDL-C 水平显著升高($P < 0.01$)(见图 3)。

3.4 BC/GD 对大鼠凝血功能影响

与空白组比较,假手术组和模型组 APTT、PT、FIB 水平显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较,BC/GD 组和醒脑解郁组 APTT 水平显著升高($P < 0.01$);醒脑解郁组 PT 水平显著升高($P < 0.05$),BC/GD 组 PT 仅有升高趋势($P > 0.05$);BC/GD 组和醒脑解郁组 FIB 水平差异无统计学意义($P > 0.05$)(见表 2)。

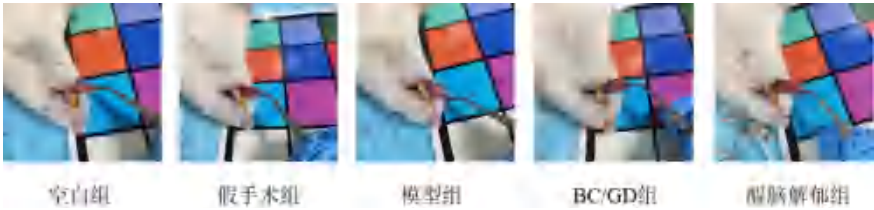


图 1 各组大鼠舌象变化

Fig 1 Changes in tongue appearance of rats in each group

表 1 各组大鼠脑血流量比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Tab 1 Cerebral blood flow perfusion in rats of each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	平均脑血流量 /PU
空白组	194.72±6.29
假手术组	167.34±10.82 [#]
模型组	118.98±8.32 ^{##}
BC/GD 组	139.98±8.47 ^{**}
醒脑解郁组	141.53±12.63 ^{**}

注: 与空白组比较, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{**} $P < 0.01$ 。

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

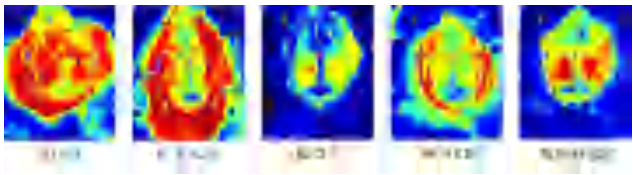


图 2 各组大鼠脑血流变化量

Fig 2 Changes in cerebral blood flow in rats of each group

表 2 BC/GD 对大鼠凝血功能影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Tab 2 Effect of BC/GD on coagulation function in rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	ATPP/s	PT/s	FIB/(g·L ⁻¹)
空白组	26.18±1.48	13.28±1.02	1.92±0.21
假手术组	18.63±0.66 ^{##}	10.55±0.73 ^{##}	1.43±0.08 ^{##}
模型组	17.08±1.59 ^{##}	10.13±0.69 ^{##}	1.37±0.12 ^{##}
BC/GD 组	21.35±1.73 ^{**}	11.13±0.93	1.58±0.32
醒脑解郁组	22.88±1.61 ^{**}	11.7±0.8 [*]	1.67±0.22

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, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$.

3.5 BC/GD 对大鼠血清炎症因子影响

与空白组比较, 假手术组大鼠血清 IL-6、hs-CRP、Hcy 水平显著升高 ($P < 0.01$); 模型组大鼠 TNF- α 、IL-6、hs-CRP 与 Hcy 水平显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组大鼠相比, BC/GD 组与醒脑解郁组大鼠 TNF- α 、IL-6、hs-CRP 和 Hcy 水平显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)(见图 3)。

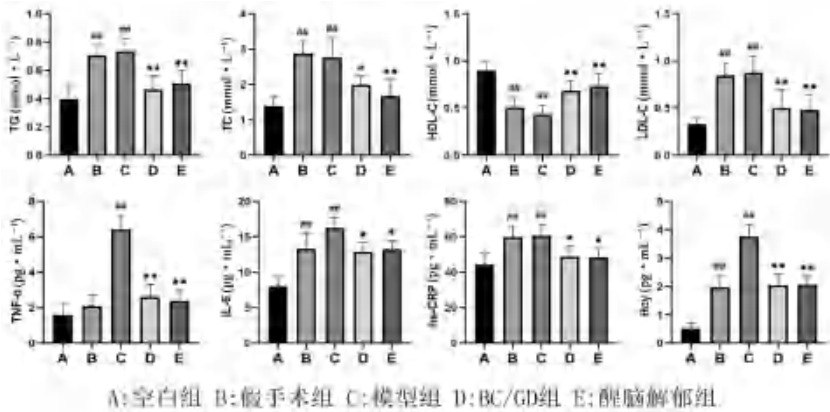


图 3 BC/GD 对大鼠血脂四项与炎症因子水平的影响

Fig 3 Effect of BC/GD on blood lipid levels and inflammatory factor levels in rats

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, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$.

3.6 BC/GD 对大鼠脑组织与肝组织损伤影响

如图 4 所示, 大鼠大脑皮层染色显示: 空白组、假手术组大鼠脑组织形态结构正常, 神经细胞排列整齐、细胞核轮廓清晰, 神经纤维结构完整。模型组大鼠组织形态不完整, 细胞排列散乱, 细胞核溶解消失或固缩, 神经纤维排列杂乱, 脑组织损伤严重。与模型组相比, BC/GD 组与醒脑解郁

组大鼠脑组织损伤明显减轻, 神经细胞较为完整, 可见少量被不同程度破坏的细胞。肝组织切片染色显示: 空白组肝小叶结构正常, 无明显肝细胞脂肪变性与炎症浸润。假手术组与模型组大鼠肝组织可见大量弥漫性脂质空泡, BC/GD 组与醒脑解郁组的脂肪变性均有不同程度的减轻, 肝细胞间隙的脂滴和空泡减少。

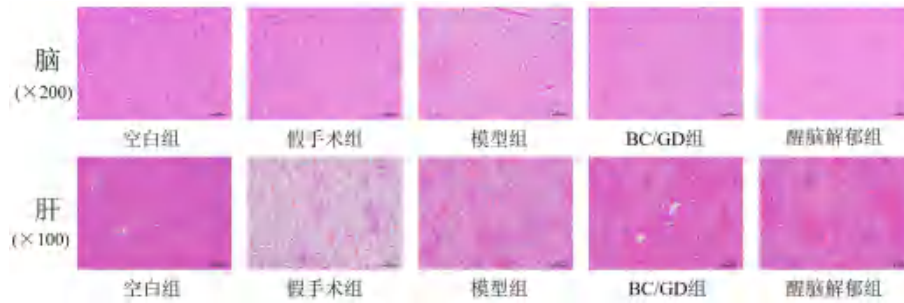


图 4 HE 染色观察脑组织与肝脏组织病理情况

Fig 4 HE staining observations of pathological changes in brain and liver tissues

3.7 BC/GD 对大鼠皮层 5-LOX 表达影响

在空白组与假手术组中,可见少量浅棕色颗粒表达 5-LOX。与空白组比较,模型组 5-LOX 阳性颗粒表达显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,BC/GD 组和醒脑解郁组的 5-LOX 表达显著降低 ($P < 0.01$)(见图 5 及表 3)。

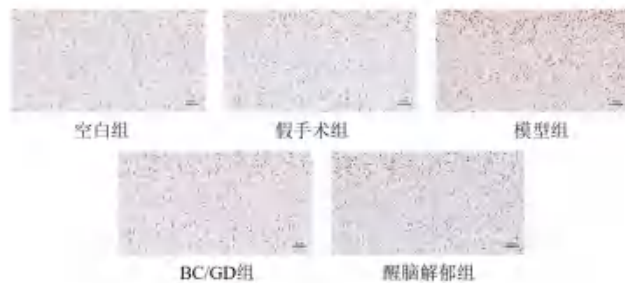


图 5 各组大鼠大脑皮层 5-LOX 阳性表达图 (×200)

Fig 5 5-LOX positive expression in the cerebral cortex in rats of each group (×200)

表 3 各组大鼠大脑皮层 5-LOX 蛋白表达水平测定结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Tab 3 Expression level of 5-LOX protein in the cortical tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	5-LOX 的表达水平
空白组	0.94 ± 0.05
假手术组	1.13 ± 0.29
模型组	3.79 ± 0.06 ^{##}
BC/GD 组	2.04 ± 0.42 ^{**}
醒脑解郁组	2.09 ± 0.38 ^{**}

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, ^{**} $P < 0.01$.

3.8 BC/GD 对大鼠脑组织相关蛋白表达影响

与空白组比较,假手术组与模型组大鼠 5-LOX、BLT1、BLT2 蛋白水平显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,BC/GD 组与醒脑解郁组大鼠的 5-LOX、BLT1、BLT2 蛋白水平显著降低 ($P < 0.01$)(见图 6)。

4 讨论

中医学认为饮食不节、忧思恼怒、过劳内伤等是 CIS 的常见病因,由此引起的阴阳失调、气血逆乱,产生风、火、痰、瘀等损伤脑络,其中以“痰湿”“血瘀”为突出。痰可成瘀,瘀可致痰,痰瘀互生,且相互胶结,可阻遏气机,引发气血逆乱,因而导致中风,而“痰瘀互结”证型也是缺血性中风的核心病机^[11-12]。饮食不当使得脾虚失运是痰瘀的主要内因,因此,本研究采用高脂饲料喂养结合双侧颈动脉结扎的方法制作“痰瘀互结”型缺血性脑卒中动物模型,通过长时间高脂、高糖、高蛋白饲料的喂养,使大鼠脂质代谢紊乱,模拟“痰”症,结扎颈总动脉阻塞血液流通模拟“瘀”症。

“痰浊”多反映现代医学的高脂血症和高凝状态,脂质代谢异常,即 TG、TC、LDL-C 的升高可视为“痰浊”的物质基础,血液的高黏滞性以及血小板功能的改变与“血瘀”病理呈一致性变化^[13-14]。脂质代谢异常与炎症之间存在着密切的相互关系,胆固醇作为一种炎症因子,可诱发机体内炎症反应,其跨膜转运失衡引起的脂质代谢紊乱可导致 TG、TC、LDL-C 水平过高或 HDL-C 过低等^[15]。当 LDL-C 水平升高,会造成血管内皮

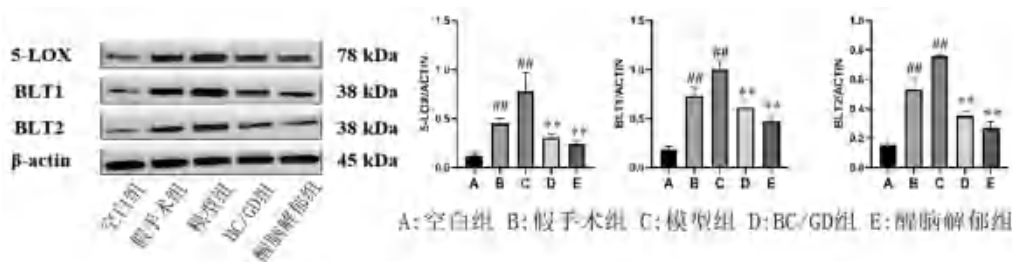


图 6 BC/GD 对各组大鼠 5-LOX、BLT1、BLT2 蛋白表达影响

Fig 6 Effect of BC/GD on the expression of 5-LOX, BLT1, and BLT2 proteins in rats of each group

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, ^{**} $P < 0.01$.

与平滑肌细胞损伤,继而引发血管壁的炎症反应,同时使血小板聚集功能增加,降低纤溶酶原激活物的活性导致纤溶酶原激活物抑制剂的活性增高,加速血栓的形成^[16-18]。

醒脑解郁胶囊为闫咏梅教授创制,目前是陕西中医药大学附属医院获批的院内制剂,由石菖蒲、远志、丹参、柴胡、合欢皮、郁金、巴戟天等组成。石菖蒲开窍豁痰、理气活血;远志安神益智、祛痰;丹参活血散瘀、通经止痛;柴胡疏肝解郁、升举阳气。四味共奏解郁化痰、行气活血之功^[19]。

课题组前期对 5-脂氧合酶(5-LOX)/白三烯 B₄(LTB₄)信号通路介导的机体损伤进行了初步研究。5-LOX 可以氧化游离和酯化多不饱和脂肪酸,是花生四烯酸(AA)代谢的关键酶之一。当 CIS 发生时,脑内细胞膜磷脂被磷脂酶 A₂(PLA₂)激活释放大量的 AA,在 5-LOX 的作用下,经过一系列酶催化反应生成半胱氨酰白三烯(Cys LTs)和 LTB₄,使血管通透性增加,白细胞趋化、游走和聚集,引发炎症级联反应进一步加重脑损伤^[20-21]。因此,本研究继续选用该通路,从 BC/GD 改善脂质代谢机制进行探讨。结果显示,模型组大鼠舌质紫暗,舌下静脉迂曲清晰可见;脑血流平均灌注量显著下降;血清中 TG、TC、LDL-C 水平显著升高,HDL-C 水平显著下降;血浆 APTT、PT、FIB 值显著上升;血清中 TNF- α 、IL-6、Hcy、hs-CRP 水平显著升高;脑组织中 5-LOX、BLT1 与 BLT2 的蛋白表达显著上调。60 mg·kg⁻¹的 BC/GD 干预后,大鼠舌质状态有所好转;血清中 TG、TC、LDL-C 水平显著降低,HDL-C 水平显著升高,TNF- α 、IL-6、hs-CRP、Hcy 水平显著降低,5-LOX、BLT1 与 BLT2 的蛋白表达显著下调。提示 BC/GD 可能通过抑制 5-LOX/LTB₄ 信号通路活化,改善脂质代谢异常,减少炎症的级联反应。

综上所述,BC/GD 可通过抑制 5-LOX/LTB₄ 信号通路表达,改善血脂水平与凝血功能,降低血清炎症因子表达,改善脑组织损伤。

参考文献

- [1] Pandian JD, Gall SL, Kate MP, et al. Prevention of stroke: a global perspective [J]. *Lancet*, 2018, 392 (10154): 1269-1278.
- [2] Kelley RE, Kelley BP. Heart-brain relationship in stroke [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2023, 81 (2): 136-152.
- [3] Balling M, Afzal S, Smith GD, et al. Elevated LDL triglycerides and atherosclerotic risk [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2023, 81 (2): 136-152.
- [4] 岳怡珂,韩萍,王新陆,等.基于血浊理论探讨痰瘀内阻型进展性卒中的中医辨证施治[J].*天津中医药*, 2024, 41 (2): 137-141.
- [5] 李豪,何林,高原雪,等.微透析法测定脑缺血损伤后黄芩苷、栀子苷及兴奋性氨基酸含量变化[J].*中药药理与临床*, 2019, 35 (1): 107-112.
- [6] 赵麓,张行行,孙欠欠,等.基于 NLRP3 炎症小体研究黄芩苷联合栀子苷防治缺血性脑卒中及并发心肌损伤的作用机制[J].*中草药*, 2023, 54 (6): 1833-1841.
- [7] 李敏,王斌,曹慧,等.基于 AQP-4、P-gp 黄芩苷、栀子苷配伍对缺血/再灌注损伤大鼠血脑屏障保护机制研究[J].*中国药理学通报*, 2017, 33 (3): 443-444.
- [8] 刘阿萍,李敏,王斌,等.黄芩苷和栀子苷配伍对大鼠脑缺血再灌注损伤的作用研究[J].*中药药理与临床*, 2016, 32 (1): 46-48.
- [9] 李敏,曹慧,王斌,等.基于 AQP-4、GFAP 的黄芩苷、栀子苷配伍抗脑缺血大鼠神经功能损伤的研究[J].*中药药理与临床*, 2017, 33 (2): 56-59.
- [10] Sarti C, Pantoni L, Bartolini L, et al. Persistent impairment of gait performances and working memory after bilateral common carotid artery occlusion in the adult Wistar rat [J]. *Behav Brain Res*, 2002, 136 (1): 13-20.
- [11] 吴光亮,蔡海燕,李国铭,等.痰瘀互结对缺血性中风的辨治意义及其分子生物学机制研究概况[J].*广州中医药大学学报*, 2022, 39 (11): 2724-2728.
- [12] 俞璐,张秋娟.痰瘀论治缺血性脑卒中的古今机制探讨[J].*天津中医药*, 2022, 39 (8): 999-1004.
- [13] 李树红,赵海军,刘宁,等.基于痰浊血瘀理论浅谈冠心病的发病机制及中医治疗策略[J].*中国中医药现代远程教育*, 2024, 22 (13): 168-170.
- [14] 迟显苏,梁晓,魏竞竞,等.基于血浊理论从痰、瘀、毒论治缺血性脑卒中[J].*陕西中医*, 2023, 44 (7): 917-921.
- [15] Xuan XY, Zhang JY, Fan JL, et al. Research progress of traditional Chinese medicine (TCM) in targeting inflammation and lipid metabolism disorder for arteriosclerosis intervention: a review [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2023, 102 (18): e33748.
- [16] Goldstein JL, Brown MS. A century of cholesterol and coronaries: from plaques to genes to statins [J]. *Cell*, 2015, 161 (1): 161-172.
- [17] 李元陶.D-二聚体、Hcy 及 LDL-C 在急性脑梗死中的表达及其急诊溶栓后再出血的预测价值分析[J].*新疆医学*, 2022, 52 (1): 74-76.
- [18] Yuan HW, Yang YN, Chen HF, et al. Rise in low-density lipoprotein cholesterol during hospitalization is related with poor outcome at discharge in patients with acute ischemic stroke [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2020, 49 (1): 88-96.
- [19] 李庆,张慧,王道,等.醒脑解郁胶囊治疗帕金森病合并抑郁 30 例[J].*西部中医药*, 2024, 37 (6): 125-129.
- [20] 周爽,王琰,孙光强,等.过表达 5-脂氧合酶通路对氧糖剥夺/复氧小胶质细胞增殖、凋亡的影响[J].*陕西医学杂志*, 2022, 51 (4): 410-414, 418.
- [21] 周爽,李慧敏,张行行,等.基于 LTB₄/BLTR 通路探讨黄芩苷-栀子苷配伍对局灶性脑缺血大鼠再灌注损伤的影响[J].*中南药学*, 2022, 20 (6): 1255-1261.

(收稿日期: 2024-12-04; 修回日期: 2025-01-10)

桂枝芍药知母汤通过调节 AMPK/mTOR/ULK-1 信号通路改善胶原诱导的类风湿关节炎大鼠相关炎症

华重钧¹, 周政署¹, 梁霄², 王锐², 姜德友^{1*} (1. 黑龙江中医药大学基础医学院, 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040)

摘要: **目的** 探讨桂枝芍药知母汤 (GSZD) 的抗类风湿关节炎 (RA) 作用, 并初步探讨其可能的作用机制。**方法** 72 只雌性 Wistar 大鼠随机分为对照组, 模型组, 阳性药组, GSZD 低、中、高剂量组, 除对照组外, 其余各组均采用胶原诱导法建立胶原诱导性关节炎 (CIA) 大鼠模型。建模成功后给予相应治疗方案, GSZD 低、中、高剂量组 [GSZD 0.8、1.6、3.2 g/(kg·d)] 分别每日灌胃 1 次; 阳性药组 [甲氨蝶呤 (0.75 mg/(kg·d))] 每 3 日灌胃 1 次; 对照组和模型组大鼠灌胃等体积生理盐水, 每日 1 次, 治疗周期为 14 d。记录大鼠关节炎指数 (AI) 评分、足肿胀度和免疫器官指数的变化情况; 通过 Micro-CT 和 HE 染色评估踝关节组织滑膜增生和关节软骨损伤情况; 酶联免疫吸附实验 (ELISA) 检测大鼠血清中炎症因子水平变化; 免疫组化和 Western blot 检测软骨中自噬相关蛋白的表达情况。**结果** 与对照组相比, 模型组大鼠出现滑膜增生、血管翳形成、软骨侵蚀和骨破坏等病理性改变, AI 评分、足肿胀度、免疫器官指数, 血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 (IL)-1 β 、IL-6 水平, 踝关节组织和软骨中 p62、p-mTOR 蛋白表达显著升高; 血清 IL-10、踝关节组织和软骨中 LC3B II/LC3B I、p-AMPK、p-ULK-1 蛋白表达水平显著降低。与模型组相比, GSZD 各剂量组和阳性药组大鼠病理性关节损伤明显改善; AI 评分, 足肿胀度, 免疫器官指数, 血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平, 踝关节组织和软骨中 p62、p-mTOR 蛋白表达显著降低; 血清 IL-10, 踝关节组织和软骨中 LC3B II/LC3B I、p-AMPK、p-ULK-1 蛋白表达水平显著升高。**结论** GSZD 能够抑制 CIA 大鼠的炎症症状和骨破坏, 其机制可能与调节 AMPK/mTOR/ULK-1 信号通路促进自噬有关。

关键词: 桂枝芍药知母汤; 胶原诱导; 类风湿关节炎; AMPK/mTOR/ULK-1 通路; 炎症

中图分类号: R285, R286 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)05-1221-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.008

Effect of Guizhi Shaoyao Zhimu decoction on collagen-induced inflammation in rats with rheumatoid arthritis by modulating AMPK/mTOR/ULK-1 signaling pathway

HUA Chong-jun¹, ZHOU Zheng-shu¹, LIANG Xiao², WANG Rui², JIANG De-you^{1*} (1. Basic Medical College, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040; 2. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040)

Abstract: Objective To determine the anti-rheumatoid arthritis (RA) effect of Guizhi Shaoyao Zhimu decoction (GSZD) and its potential mechanism. **Methods** Totally 72 female Wistar rats were randomly allocated into six groups: a control group, a model group, a positive (methotrexate) group, and GSZD low, medium, and high doses groups. Except for the control group, collagen-induced arthritis (CIA) model was induced in the remaining groups with collagen. Upon successful establishment of the model, the treatment protocols were implemented as follows: the GSZD low, medium, and high dose

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.81603418); 国家中医药管理局龙江医学流派传承工作室建设项目 (No.LPGZS2012-14)。

作者简介: 华重钧, 女, 硕士研究生, 主要从事经方治疗疑难病的临床与基础研究, email: 3489975689@qq.com *通信作者: 姜德友, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事经方治疗疑难病的临床与基础研究, email: jiangdeyou@126.com

groups received oral administrations of 0.8, 1.6, and 3.2 g/(kg · d), respectively, once daily while the positive group received an oral dose of 0.75 mg/(kg · d) methotrexate every three days. The control and model groups were given equivalent volumes of normal saline via gavage once daily over 14 days. We monitored changes in the arthritis index score, foot swelling, and immune organ index in the rats. Synovial hyperplasia and articular cartilage damage in the ankle joint tissue were assessed with Micro-CT and HE staining. ELISA was used to measure changes in inflammatory cytokine levels in the rat serum, while immunohistochemistry and Western blot were used to determine the expression of autophagy-related proteins in the cartilage. **Results** Compared with the control group, the model group displayed notable pathological alterations, including synovial hyperplasia, vascular opacity formation, cartilage erosion, and bone destruction. There was a significant increase in the arthritis index score, foot swelling degree, immune organ index, and serum inflammatory factors such as levels of tumor necrosis factor (TNF)- α , Interleukin (IL)-1 β , and IL-6, as well as the expression of p62 and p-mTOR proteins in the ankle joint tissue and cartilage. Conversely, the expression levels of serum IL-10, LC3B II/LC3B I, p-AMPK, and p-ULK-1 proteins in the ankle joint tissue and cartilage were significantly decreased. In contrast, rats in the GSZD dose groups and the positive drug group demonstrated significant improvements in pathological joint injuries as compared with those of the model group. There was a marked reduction in arthritis index scores, foot swelling degree, immune organ index, serum levels of inflammatory factors TNF- α , IL-1 β , and IL-6 levels, and the expression of p62 and p-mTOR proteins in the ankle joint tissue and cartilage. There was a significant increase in the expression levels of serum IL-10, LC3B II/LC3B I, p-AMPK, and p-ULK-1 proteins in the ankle joint tissue and cartilage. **Conclusion** GSZD can mitigate inflammatory symptoms and prevent bone destruction in collagen-induced arthritis rats, which may be potentially mediated through the modulation of the AMPK/mTOR/ULK-1 signaling pathway to promote autophagy.

Key words: Guizhi Shaoyao Zhimu decoction; collagen induction; rheumatoid arthritis; AMPK/mTOR/ULK-1 signaling pathway; inflammation

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种由多因素引起的多系统性炎症性自身免疫性疾病, 其主要临床病理特征是由炎性细胞浸润、滑膜增生、血管生成以及破骨细胞分化引起的滑膜炎、血管翳、软骨侵蚀和骨破坏^[1]。随着 RA 的发展, 患者最终将遭受多关节疼痛、肿胀、畸形、残疾以及其他器官的功能障碍和精神问题, 生活质量降低^[2]。现有的 RA 药物治疗方案包括非甾体抗炎药、糖皮质激素、缓解疾病的抗风湿药以及生物制剂四大类。然而, 这些药物的长期应用将不可避免地带来诸多不良反应, 导致对免疫系统不可忽视的损伤, 并增加肝毒性和肿瘤发生的风险^[3]。因此, 开发安全有效的 RA 治疗药物具有重要意义。

近年来, 中医药尤其是中药方剂在 RA 的临床观察、生物学、药理学和治疗机制方面都取得了显著进展^[4]。桂枝芍药知母汤 (Guizhi Shaoyao Zhimu decoction, GSZD) 是源自中医经典名著《金匱要略》的著名中药方剂, 其成分包括桂枝、芍药、甘

草、麻黄、生姜、白术、知母、防风以及附子, 可减轻疼痛, 驱邪散寒, 恢复体内平衡^[5]。GSZD 在中医临床中用于治疗 RA、痛风性关节炎、骨关节炎等“痹症”, 在中国已有两千多年的历史^[6]。既往研究显示, GSZD 具有骨保护作用, 能够缓解关节炎相关的疼痛和肿胀, 减轻炎症反应并抑制成纤维样滑膜细胞活化^[7]。但是, GSZD 缓解 RA 的具体机制仍未完全阐明, 阻碍了其进一步应用。

自噬是溶酶体中蛋白质和细胞器周转的关键细胞内机制, 自噬失调参与 RA 的发生发展, 使得靶向自噬成为治疗 RA 有前景的方法。腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 是一种进化保守的异三聚体丝氨酸/苏氨酸激酶, 对调节细胞和生物体的能量代谢稳态至关重要^[8]。AMPK 通过哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 调节线粒体功能, mTOR 是细胞生长和代谢的关键调节因子, 与关节炎中的炎症和自噬密切相关^[9]。AMPK/mTOR/ULK-1 通路是一个复杂的网络, 调节包括细胞自噬、能量平衡和细胞生长等诸多细胞过程^[10]。本研究旨在探讨 GSZD 能

否通过调节 AMPK/mTOR/ULK-1 信号通路抑制 RA 大鼠相关炎症反应, 以期为进一步探索 GSZD 治疗 RA 的可能药理机制提供基础。

1 材料

1.1 动物

72 只雌性 Wistar 雌性大鼠 (8 周龄, 体重 180 ~ 220 g, 黑龙江中医药大学实验动物中心)。所有大鼠给予标准饮食, 保持 12 h 的光/暗交替条件, 相对湿度为 55% ~ 65%, 温度保持在 22 ~ 24 °C, 适应性喂养 1 周后进行实验。所有动物实验均严格遵循《实验动物管理条例》。

1.2 试药

桂枝 (批号: 200306)、芍药 (批号: 190317)、甘草 (批号: 201207)、麻黄 (批号: 190703)、生姜 (批号: 201107)、白术 (批号: 20201102)、知母 (批号: 201031)、防风 (批号: 210715)、附子 (批号: 200606) 均购自哈尔滨云济堂大药房, 所有药材经黑龙江中医药大学中药资源教研室周博副教授鉴定, 均符合规定。用量和配伍比例参照《金匱要略》的记载执行^[11]: 将上述药材 (桂枝 12 g、芍药 9 g、甘草 6 g、麻黄 6 g、生姜 15 g、白术 15 g、知母 12 g、防风 12 g、附子 6 g) 用纯化水 (1:10, w/V) 浸泡 30 min, 加热回流提取 2 次, 每次 1 h。将两次滤液混合后以 4000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 去除杂质, 并将过滤后的滤液浓缩至生药质量浓度为 2.30 g·mL⁻¹; 甲氨蝶呤 (上海信谊药厂有限公司)。

牛Ⅱ型胶原蛋白 (CⅡ, 美国 Chondrex 公司, 批号: 20022); 弗氏完全佐剂 (CFA, 美国 Chondrex 公司, 批号: 7001); 4% 多聚甲醛 (泰州云科生物技术有限公司, 批号: PH0427); 大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α , 批号: PT516)、白细胞介素 (IL)-1 β (IL-1 β , 批号: PI303)、IL-6 (批号: PI328)、IL-10 (批号: PI525) (上海碧云天生物技术有限公司); HE 染色试剂盒 (上海尚宝生物科技有限公司, 批号: R23533); AMPK 抗体、磷酸化 AMPK (p-AMPK) 抗体、mTOR 抗体、p-mTOR 抗体、ULK-1 抗体、p-ULK-1 抗体、p62、LC3B、GAPDH 抗体、HRP 标记的山羊抗兔抗体 (英国 Abcam 公司)。

1.3 仪器

Elx808 型多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司); CKX53 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); AI600 型多功能成像仪 (美国 Aplegen 公司); SKYSCAN 1276 型 Micro-CT 扫描仪 (美国 Bruker 公司)。

2 方法

2.1 胶原诱导性关节炎 (CIA) 大鼠模型的建立

将 CⅡ 溶解于 0.05 mol·L⁻¹ 的冰乙酸溶液制备 2 mg·mL⁻¹ 的 CⅡ 乳液, 并使用 CFA 以 1:1 的比例在冰浴中混合, 直至完全乳化。使用涡旋振荡器进行均质化, 每个循环进行 3 min, 停止 30 s, 共进行 10 个循环, 直至乳液滴入水中不扩散。用酒精棉球擦拭大鼠尾根部, 将 200 μ L 乳液经皮下注射至大鼠尾根部进行初次免疫; 在第 21 日, 于大鼠尾根部注射 100 μ L 乳液以增强免疫反应确保诱导 CIA^[12]。对照组大鼠以相同方式注射等量生理盐水。

2.2 分组与干预

将大鼠随机分为对照组 (Control), 模型组 (Model), 阳性药组 (MTX), 桂枝芍药知母汤低 (GSZD-L)、中 (GSZD-M)、高 (GSZD-H) 剂量组, 每组 12 只。GSZD-L、GSZD-M、GSZD-H 组分别每日灌胃 1 次给予 0.8、1.6、3.2 g/(kg·d) GSZD, 中剂量组相当于 RA 患者每日推荐剂量, 共 14 次; MTX 组每 3 日灌胃 1 次 0.75 mg/(kg·d), 共 5 次; 对照组和模型组大鼠灌胃等体积生理盐水, 每日 1 次, 共 14 次。

2.3 关节炎指数 (AI) 评分

从初次免疫后开始, 每 7 日测量一次 AI。AI 具体评分标准如下: 0 分, 无关节红肿; 1 分, 脚趾关节肿胀/轻微发红; 2 分, 所有关节和脚趾红肿; 3 分, 踝关节以下红肿; 4 分, 包括踝关节在内的所有关节红肿。AI 是四肢得分的总和, 最大值为 16^[13]。

2.4 足肿胀度

从初次免疫开始, 在大鼠患侧脚跟骨突上做一标记, 测量大鼠后爪肿胀程度, 并记录后爪周长。实验过程中, 保证每次均选择相同的后爪进行测量, 每 7 日测量一次大鼠后爪肿胀程度。

2.5 免疫器官指数

每组大鼠在实验结束前称重, 实验结束处死后收集大鼠胸腺和脾脏, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗后称重并记录, 每 7 日测量一次大鼠免疫器官指数。使用以下公式计算免疫器官指数: 免疫器官指数 (mg·g⁻¹) = 器官重量 (mg) / 体重 (g)。

2.6 血清炎症因子水平检测

经腹主动脉采集大鼠全血 3 mL, 2000 r·min⁻¹ 离心 15 min 以从全血样品中分离血清, 根据 ELISA 试剂盒说明测量血清炎症性细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 水平。

2.7 Micro-CT 分析

对大鼠实施安乐死后, 从踝关节上方 4 ~ 5

mm 处截去后肢, 置于 4% 多聚甲醛中固定, 用 Micro-CT 扫描样本并构建三维骨图像^[14]。扫描条件为: 20 kV 4 mA、0.1 mGy、4 帧叠加、曝光时间 100 ms, 观察关节变化情况。

2.8 组织病理学分析

取大鼠踝关节组织并置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h, 随后在 4℃ 下使用 10%EDTA 溶液进一步脱钙处理, 持续 4 周^[15-16]。然后使用二甲苯和不同浓度的乙醇对组织进行脱蜡和脱水, 将关节组织石蜡包埋处理并切片 (5 μm), 用 HE 溶液对组织进行染色, 在显微镜下观察显微结构以评估组织病理学特征。

2.9 免疫组化检测自噬相关蛋白表达

将收集的关节软骨于 4% 多聚甲醛中固定 24 h, 随后在 10%EDTA 溶液中脱钙两周。将组织石蜡包埋后切成 5 μm 厚度的切片, 切片置于二甲苯中脱蜡、不同梯度乙醇水合后, 在微波炉中进行抗原修复以去除抗原位点^[17]。在 37℃ 用 3% 过氧化氢 (H₂O₂) 封闭内源过氧化物酶, 随后用 1.5% 的山羊血清封闭 20 min。将切片与 LC3B、p62 抗体在 4℃ 下孵育过夜, 随后进行第二抗体孵育。在 DAB 可视化和苏木精染色后, 利用显微镜观察切片并使用 Image J 软件进行分析。

2.10 Western blot 检测相关蛋白表达

用预冷的 RIPA 裂解液充分裂解大鼠踝关节组织, 并离心以获得蛋白质样品, 使用 BCA 蛋白定量试剂盒对总蛋白进行定量。样品经 10% SDS-PAGE 凝胶分离后, 将印迹转移至 PVDF 膜上, 将膜在无蛋白快速封闭缓冲液中封闭 15 min^[18], 并以 1:1000 的比例与 AMPK、p-AMPK、mTOR (1:800)、ULK-1、p-ULK-1、p62、LC3B 以及 p-mTOR (1:800) 抗体在 4℃ 下孵育过夜, 然后将膜与 HRP 偶联的二抗 (1:5000) 在 37℃ 下孵育 1 h。使用 ECL 发光试剂盒显示免疫反应蛋白条带, 通过 Image J 软件以 GAPDH 为内参对条带强度进行定量分析^[19-20]。

2.11 统计学分析

使用 SPSS 26.0 对研究数据进行统计分析, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 GraphPad Prism 8.0.2 软件绘制图表, 采用单因素方差分析 (ANOVA) 来确定各组之间的统计差异。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 GSZD 对大鼠 AI 评分及足肿胀度的影响

大鼠 AI 评分及足肿胀度变化情况见图 1。与对照组相比, CIA 大鼠 AI 评分和足肿胀度在第 7 日开始急剧增加, 第 21 日达到峰值, 峰值分别

为 (12.2±2.4) 和 (1.26±0.21) cm, 表明 CIA 大鼠模型成功建立; 与模型组相比, 各给药组大鼠 AI 评分和足肿胀度均得到不同程度的缓解, 其中 GSZD-H 组与阳性药组改善最为明显。

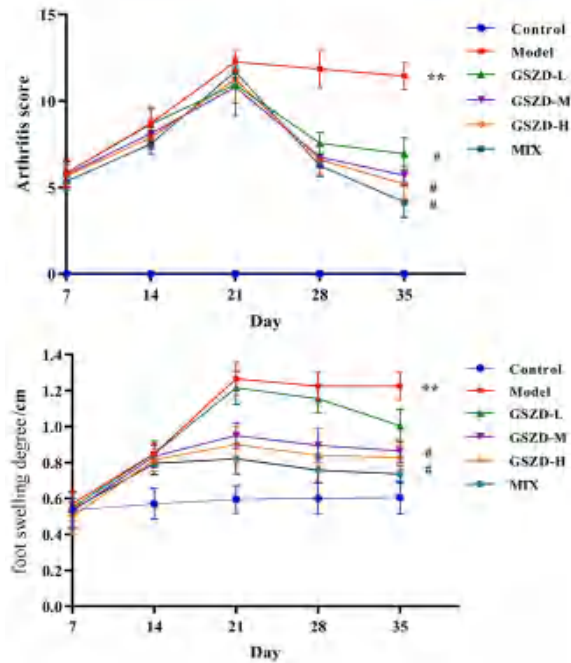


图 1 各组大鼠 AI 评分及足肿胀度变化

Fig 1 Changes in AI scores and foot swelling degree of rats in each group
注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$ 。

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

3.2 GSZD 对大鼠免疫器官指数的影响

各组大鼠免疫器官指数见表 1。与对照组相比, 反映免疫反应强度的胸腺指数和脾脏指数在模型组中显著增加; 与模型组相比, 各给药处理组大鼠的免疫器官指数均显著降低。

表 1 各组大鼠免疫器官指数变化			
Tab 1 Changes in immune organ index of rats in each group			
组别	剂量 / (g · kg ⁻¹)	胸腺指数	脾脏指数
Control	—	1.60±0.17	2.15±0.22
Model	—	2.31±0.15**	3.48±0.33**
MTX	0.000 75	1.63±0.24##	2.54±0.27##
GSZD-L	0.8	1.91±0.28#	3.01±0.26#
GSZD-M	1.6	1.72±0.25##	2.81±0.22##
GSZD-H	3.2	1.59±0.18##	2.73±0.19##

注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

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

3.3 GSZD 对大鼠血清炎症因子水平的影响

ELISA 结果显示, 与对照组相比, 模型组大鼠血清 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平显著增加; 与模

型组相比, GSZD 各组与阳性药组上述 3 种炎症因子水平均显著降低; 相反, 模型大鼠血清 IL-10 水平显著低于对照组, 并且在使用 GSZD 和 MTX

治疗后, 各治疗组大鼠血清 IL-10 水平明显高于模型组 (见图 2)。

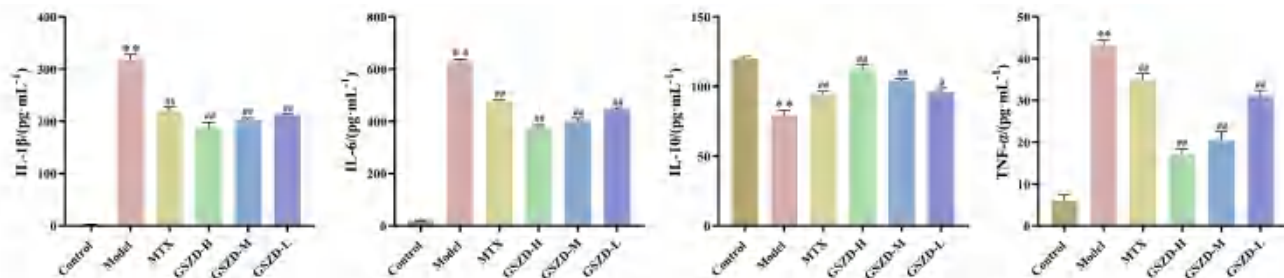


图 2 各组大鼠血清炎症因子水平变化

Fig 2 Changes in serum inflammatory cytokine levels of rats in each group

注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ 。

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

3.4 GSZD 对大鼠踝关节骨变形的改善作用

Micro-CT 图像分析显示, 对照组大鼠踝关节清晰光滑、结构完整; 模型组大鼠趾骨关节间隙增大、骨表面粗糙, 表明骨侵袭严重、骨密度降低, 整体骨破坏明显; 经 GSZD 治疗后, CIA 大鼠踝关节变形、骨侵蚀以及密度损失得到明显的改善, 关节更加完整, 其中 GSZD-H 组与阳性药组显示出最显著的疗效 (见图 3)。

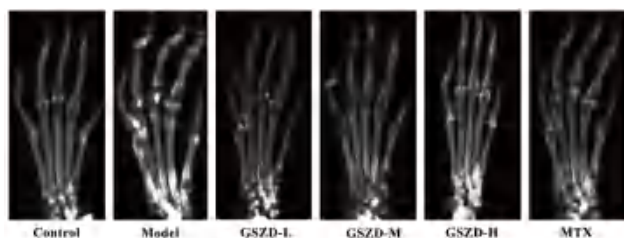


图 3 各组大鼠足爪 Micro-CT 图像

Fig 3 Micro-CT images of rat paw in each group

3.5 GSZD 对大鼠踝关节组织病理学的影响

组织病理学分析显示, 对照组大鼠踝关节结构清晰、软骨细胞排列有序、无增生; 模型组大鼠踝关节显示出滑膜增生增加、关节腔变窄、炎性细胞浸润及血管翳形成; 与模型组相比, GSZD 各组呈剂量依赖性改善上述关节病理变化。其中, GSZD-H 组与阳性药组的缓解效果最为明显, 踝关节结构正常、软骨损伤轻微、少量炎性细胞聚集、破骨细胞形成非常少 (见图 4)。

3.6 免疫组化检测自噬相关蛋白的表达

免疫组化结果显示, 与对照组相比, 模型组大鼠软骨细胞中 LC3B 表达明显降低、p62 表达明显升高; 与模型组相比, GSZD 各组 and 阳性药组大鼠软骨细胞中 LC3B 表达明显升高、p62 表达明显降低, 见图 5。

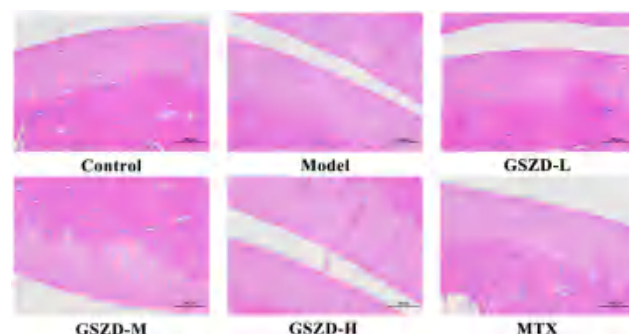


图 4 各组大鼠踝关节组织病理学分析 (HE, $\times 200$)

Fig 4 Pathological analysis of ankle joint tissues of rats in each group (HE, $\times 200$)

3.7 Western blot 检测 AMPK/mTOR/ULK-1 通路和自噬相关蛋白的表达

与对照组相比, 模型组大鼠踝关节 LC3B II/LC3B I、p-AMPK、p-ULK-1 蛋白表达水平显著降低, 同时 p62、p-mTOR 蛋白表达水平显著升高; 与模型组比较, GSZD 各组 and 阳性药组大鼠踝关节上述蛋白表达水平均被显著逆转 (见图 6)。

4 讨论

RA 是一种典型的以滑膜微血管形成为特征的自身免疫性疾病。鉴于对 RA 病理生理学的不完全了解, 实现 RA 的有效治疗具有挑战性^[21]。中医药因其多成分、多靶点、多途径、不良反应少等特点, 已成为炎症性疾病治疗的研究热点^[22]。已报道的研究表明, GSZD 可通过调节 NF- κ B 信号通路来抑制炎症反应并减轻骨侵蚀^[23]。CIA 大鼠的病理学和免疫学特征与人类 RA 相似, 被认为是研究 RA 发病机制和药物干预治疗效果的金标准动物模型^[24]。考虑到女性 RA 发病率高于男性, 本研究使用雌性 CIA 大鼠模型作为本研究的体内模型。在本研究的治疗评估中, GSZD 能够

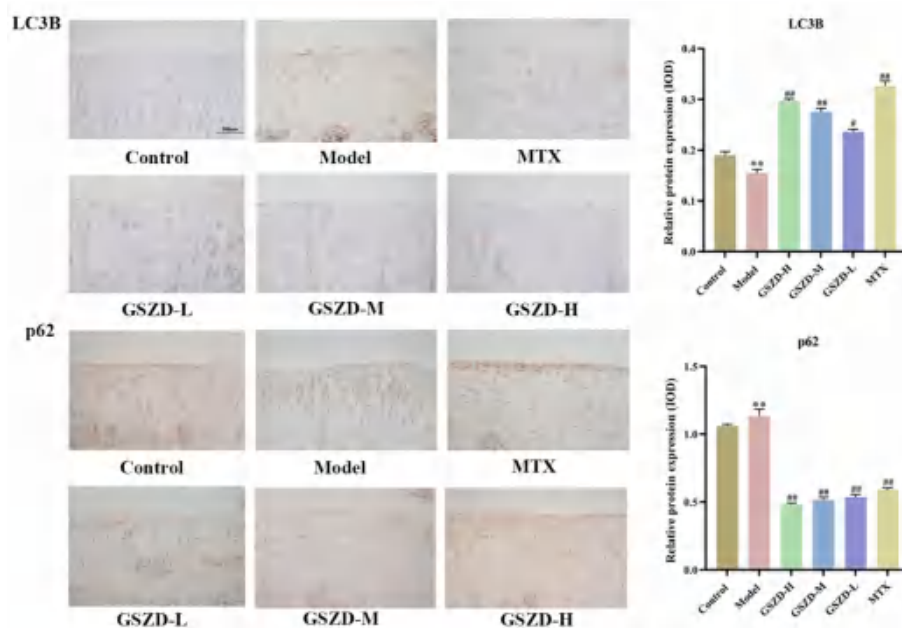


图5 各组大鼠软骨中自噬相关蛋白表达变化

Fig 5 Changes in autophagy related protein expressions in the cartilage of rats in each group

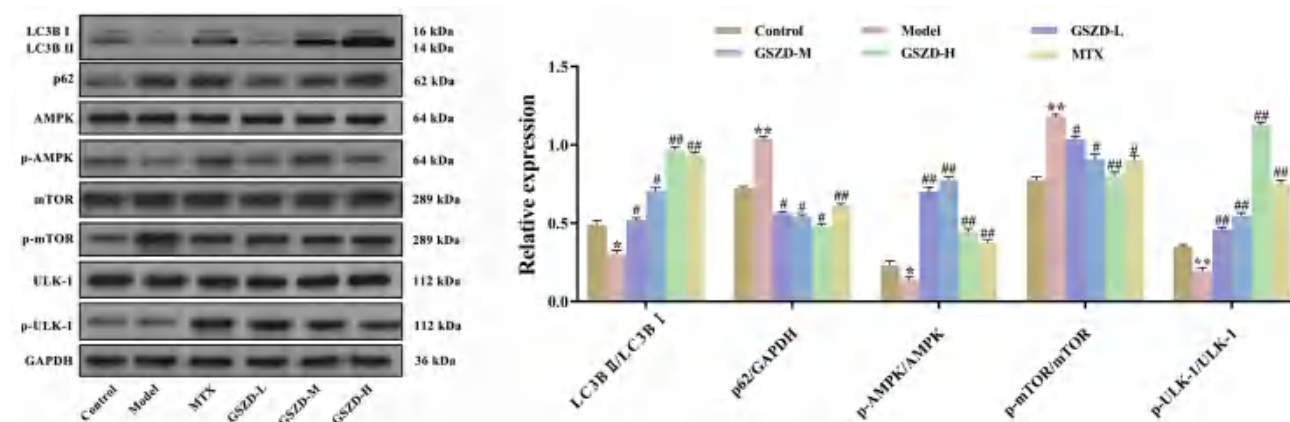
注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。Note: Compared with the control group, ** $P < 0.01$; compared with the model group, * $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

图6 各组大鼠踝关节 AMPK/mTOR/ULK-1 通路和自噬相关蛋白的表达

Fig 6 Expression of AMPK/mTOR/ULK-1 pathway and autophagy related proteins in the ankle joints of rats in each group

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with the model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

显著抑制 CIA 大鼠的足肿胀度、AI 评分以及免疫器官指数, 改善骨损伤并延缓 RA 进展。组织病理学分析显示, GSZD 减轻了 CIA 大鼠滑膜增生、炎性细胞浸润及血管翳形成等症状, 从而证实了 GSZD 对 CIA 大鼠的治疗作用。

在 RA 的发病机制和进展中, 促炎细胞因子起着至关重要的作用。研究表明, 关节滑液中的成纤维样滑膜细胞通常分泌多种促介质向炎症微环境募集并激活更多的免疫细胞, 而免疫细胞又会分泌更多的促炎细胞因子来维持滑膜炎, 形成恶性循环, 加剧致病过程^[25-26]。因此, 抑制促炎细胞

因子水平是预防 RA 炎症和骨侵蚀的有效手段。本研究结果显示, GSZD 能够剂量依赖性地显著降低 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-6 水平。此外, GSZD 还能够增加抗炎细胞因子 IL-10 的水平, 表明 GSZD 可以调节促炎和抗炎细胞因子之间的平衡以缓解 RA 的病理过程。

自噬是一种参与自我降解和再循环的细胞过程, 通过促进细胞存活和在特定条件下诱导细胞死亡发挥双重作用^[27]。当自噬发生时, 参与自噬体形成的蛋白 LC3B 被降解, 细胞质 LC3B 酶解一小段多肽形成 LC3B I, 与膜表面的磷脂酰

乙醇胺结合形成 LC3B II^[28], LC3B II/LC3B I 的比率增加表示自噬体形成增加。p62 蛋白作为信号传导通路中的衔接蛋白,介导细胞的多种生物学功能,在选择性自噬中起核心作用^[29]。研究表明,p62 与选择性自噬降解成负相关,选择性自噬降解可以通过直接结合 LC3B II 在自溶体内降解^[30]。因此,LC3B 的转换及 p62 的表达可作为观察是否发生自噬的标准^[31]。免疫组化及 Western blot 结果显示,GSZD 治疗后大鼠踝关节组织和软骨中 LC3B 蛋白表达显著升高,p62 蛋白表达显著降低,提示 GSZD 可通过调节自噬对 CIA 大鼠发挥治疗作用。

越来越多的证据表明自噬和凋亡共享许多共同的调节分子,异常的 AMPK 和 mTOR 在 RA 发病机制中起着至关重要的作用^[32]。据报道,AMPK 的激活能够调节包括自噬在内的多种代谢过程,并通过磷酸化自噬相关蛋白如 mTORC1 和 ULK-1 直接促进细胞自噬和细胞凋亡^[33]。此外,mTOR 在抑制自噬和维持细胞生长中起着关键作用,针对 mTOR 的治疗方法已成为当前 RA 治疗研究的重要方向^[34]。ULK-1 可以通过磷酸化控制自噬的启动,磷酸化是受 AMPK/mTOR 等许多信号通路调节的过程,活化的 AMPK 诱导 ULK1 磷酸化、促进自噬启动,从而 mTOR 抑制 ULK1、阻碍自噬进展^[35]。本研究结果显示,经 GSZD 治疗可使 p-AMPK、p-ULK-1、LC3B II/LC3B I 表达水平增加,p62、p-mTOR 表达水平降低,表明 GSZD 在体内能够有效抑制 RA 的炎症反应的机制可能是通过调节 AMPK/mTOR/ULK-1 信号通路从而促进 RA 中的细胞自噬来实现的。

综上所述,GSZD 能够改善胶原诱导性关节炎的炎症症状、骨破坏、减缓踝关节病理损伤、促进关节软骨的恢复,从而防止 CIA 的发展,其作用机制可能与调节 AMPK/mTOR/ULK-1 信号通路,提高自噬活性有关。本研究的发现为 GSZD 在 RA 治疗中的潜在临床应用提供了理论框架,有助于促进 GSZD 的临床发展。未来,可通过结合透射电镜/细胞实验以直观观察自噬体的超微结构并阐明其在体外的抗 RA 活性,进一步完善本文的结论。

参考文献

[1] 罗书曼,朱星,陈帅,等. 四妙汤对类风湿关节炎大鼠维生素 D 系统及中性粒细胞胞外诱捕网的影响研究[J]. 中国全科医学, 2024, 27 (3): 348-356.

[2] Aletaha D, Smolen JS. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis: a review [J]. JAMA, 2018, 320 (13): 1360-1372.

[3] Prasad P, Verma S, Surbhi, et al. Rheumatoid arthritis: advances in treatment strategies [J]. Mol Cell Biochem, 2023, 478 (1): 69-88.

[4] Pan ZZ, Li FC, Xu YJ, et al. Fu-zi decoction attenuate rheumatoid arthritis in vivo and in vitro by modulating RANK/RANKL signaling pathway [J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1423884.

[5] 李楠,杨海芯,曾珊,等. 桂枝芍药知母汤对胶原诱导性关节炎小鼠软骨破坏及 JAK2/STAT3 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29 (2): 52-58.

[6] Shen JY, Chen QW, Yang GH, et al. Observation of the curative effect of Guizhi-Shaoyao-Zhimu decoction combined with methotrexate in the treatment of early rheumatoid arthritis based on ultrasonic evaluation: study protocol of a randomized, double-blind, controlled clinical trial [J]. Trials, 2021, 22 (1): 764.

[7] Zhang Q, Peng W, Wei SJ, et al. Guizhi-Shaoyao-Zhimu decoction possesses anti-arthritis effects on type II collagen-induced arthritis in rats via suppression of inflammatory reactions, inhibition of invasion & migration and induction of apoptosis in synovial fibroblasts [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 118: 109367.

[8] 张源源,王琪. 二甲双胍改善卵巢癌预后及相关机制的研究进展[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2022, 51 (4): 567-573, 584.

[9] 孙璐,郑群,范晓东,等. 早发性卵巢功能不全病因学及发病机制的研究进展[J]. 吉林大学学报(医学版), 2023, 49 (2): 534-541.

[10] Kim J, Kundu M, Viollet B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1 [J]. Nat Cell Biol, 2011, 13 (2): 132-141.

[11] Zhou GQ, Chen G, Yang J, et al. Guizhi-Shaoyao-Zhimu decoction attenuates monosodium urate crystal-induced inflammation through inactivation of NF-kappaB and NLRP3 inflammasome [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 283: 114707.

[12] 梁霄,李娅兰,张筠昊,等. 基于 TLR2/p38 MAPK/NF-κB 信号通路探讨独活寄生汤对类风湿关节炎大鼠的抗炎作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29 (11): 43-52.

[13] Sun YQ, Liu J, Xin L, et al. Xinfeng capsule inhibits inflammation and oxidative stress in rheumatoid arthritis by up-regulating LINC00638 and activating Nrf2/HO-1 pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 301: 115839.

[14] 周桂娟,周君,肖子建,等. 伊班膦酸钠对膝关节炎大鼠自噬相关蛋白 LC3 II 的影响[J]. 中国疼痛医学杂志, 2020, 26 (2): 91-97.

[15] 童远武,董方,李艳莉,等. 颗粒蛋白前体 PGRN 对实验性根尖周炎的炎症进程及骨质破坏的作用机制初探[J]. 临床口腔医学杂志, 2023, 39 (2): 67-72.

- [16] 林婉娜, 苏慧琳, 李慧敏, 等. 黄芩桂枝五物汤抗类风湿关节炎的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(9): 9-15.
- [17] 李阳, 张丽曼, 张立颖, 等. 骨痹汤对膝关节炎大鼠软骨中基质金属蛋白酶-13 及转化生长因子- β 1 的影响[J]. 世界中医药, 2021, 16(10): 1530-1533.
- [18] 黄绪群, 刘国军. TRPM8 激活 Calcineurin-NFATc3 通路调节结肠癌细胞免疫逃逸[J]. 中国癌症防治杂志, 2020, 12(3): 310-316.
- [19] 邓慧兰, 韩文慧, 王辉, 等. 微小 RNA-145-5p 与脓毒症急性肺损伤的相关性研究[J]. 临床内科杂志, 2021, 38(8): 552-555.
- [20] 易菲妮, 余贤君, 马超, 等. 七氟醚通过调节 JNK 信号通路对幼鼠空间探索能力及认知功能的影响[J]. 现代生物医学进展, 2020, 20(14): 2629-2634.
- [21] McInnes IB, Schett G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis[J]. Lancet, 2017, 389(10086): 2328-2337.
- [22] 吴宁, 黄雨霄, 石雪, 等. 苗药“杆努尽烟”对慢性支气管炎大鼠 TLR4-MyD88-NF- κ B 信号通路的影响[J]. 贵州医科大学学报, 2020, 45(11): 1283-1288.
- [23] Wei SJ, Zhang Q, Xiang YJ, et al. Guizhi-Shaoyao-Zhimu decoction attenuates bone erosion in rats that have collagen-induced arthritis via modulating NF-kappaB signalling to suppress osteoclastogenesis[J]. Pharm Biol, 2021, 59(1): 262-274.
- [24] Djuretic J, Dimitrijevic M, Stojanovic M, et al. Infrared radiation from cage bedding moderates rat inflammatory and autoimmune responses in collagen-induced arthritis[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 2882.
- [25] Lin YJ, Anzaghe M, Schulke S. Update on the pathomechanism, diagnosis, and treatment options for rheumatoid arthritis[J]. Cells, 2020, 9(4): 880.
- [26] Li N, Li XJ, Deng LJ, et al. 6-Shogaol inhibits the proliferation, apoptosis, and migration of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes via the PI3K/AKT/NF-kappaB pathway[J]. Phytomedicine, 2023, 109: 154562.
- [27] Chadha S, Behl T, Bungau S, et al. Focus on the multimodal role of autophagy in rheumatoid arthritis[J]. Inflammation, 2021, 44(1): 1-12.
- [28] 马智, 胡俊, 邓煜, 等. 白藜芦醇调节 Akt/mTOR 通路对大鼠多囊卵巢综合征颗粒细胞自噬的影响机制研究[J]. 重庆医科大学学报, 2021, 46(4): 388-393.
- [29] Wang FY, Zhang HB, Lu XF, et al. Chlamydia trachomatis induces autophagy by p62 in HeLa cell[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2021, 37(3): 50.
- [30] Liu FF, Tang LM, Tao MY, et al. Stichoposide C exerts anticancer effects on ovarian cancer by inducing autophagy via inhibiting AKT/mTOR pathway[J]. Onco Targets Ther, 2022, 15: 87-101.
- [31] 梁霄, 李娅兰, 张筠昊, 等. 乌药挥发油通过 AMPK/mTOR 信号通路诱导胃癌 AGS 细胞凋亡和自噬[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(15): 42-50.
- [32] 李岩, 安芸, 张赫彬, 等. 华良姜素对 PDGF-BB 刺激下血管平滑肌细胞增殖和迁移的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(10): 865-871.
- [33] Yang TS, Xiao Y, Liu S, et al. Isorhamnetin induces cell cycle arrest and apoptosis by triggering DNA damage and regulating the AMPK/mTOR/p70S6K signaling pathway in doxorubicin-resistant breast cancer[J]. Phytomedicine, 2023, 114: 154780.
- [34] Zhang F, Cheng T, Zhang SX. Mechanistic target of rapamycin (mTOR): a potential new therapeutic target for rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2023, 25(1): 187.
- [35] 杨明环, 张波, 邓爱平, 等. 颅内动脉瘤组织中 Septin4 的表达及其通过调节自噬对人脑血管平滑肌细胞的作用研究[J]. 东南大学学报(医学版), 2021, 40(6): 795-802.

(收稿日期: 2025-01-14; 修回日期: 2025-02-20)

硬脂胺脂质体包载核酸 DICAR-JP 在夹层动脉瘤中的作用及机制初步研究

陈凤¹, 詹琳¹, 马文韬², 杨帆³, 李春红⁴, 舒丹¹, 周乾毅¹, 袁琼^{1, 4*} (1. 武汉科技大学医学部, 武汉 430065; 2. 华南理工大学医学院, 广州 510641; 3. 广东省人民医院, 广州 510080; 4. 西南医科大学心血管医学研究所, 四川泸州 643000)

摘要: **目的** 探讨硬脂胺脂质体 (CL) 包载核酸 DICAR-JP 在小鼠夹层动脉瘤 (AAD) 中的潜在治疗作用及其可能机制。 **方法** 实验分为 Control 组 ($n = 9$)、CL 组 ($n = 9$)、DICAR-JP/CL 组 ($n = 9$)。AAD 模型采用 3 周龄 C57BL/6J 小鼠饮用含 0.25% β -氨基丙腈的水 28 d; 采用尾静脉注射 CL 或 DICAR-JP/CL; 采用 EVG 和 HE 染色评价血管形态学改变; 采用免疫组化检测巨噬细胞和 T 淋巴细胞标志物 F4/80、CD206、iNOS、CD8 α 的表达。 **结果** 在建模第 28 日, CL 组和 DICAR-JP/CL 组皆发生小鼠死亡, 生存曲线显示出 CL 组出现更早死亡且死亡率达到 44%; 解剖发现, 与 Control 组相比, 其他两组血管皆有不同程度的膨大, DICAR-JP/CL 组在 28 d 后血管直径扩大比率明显小于 CL 组 ($P < 0.05$); HE 和 EVG 染色结果发现, CL 组小鼠血管壁有明显增厚, 炎性浸润明显, 血管弹力纤维出现大量断裂, 弹性蛋白降解严重, 且炎性细胞标志物 F4/80、CD206、iNOS、CD8 α 阳性细胞率显著增加 ($P < 0.05$), 而 DICAR-JP/CL 能明显抑制血管的病理解改变并降低炎症阳性细胞比率。 **结论** DICAR-JP/CL 可能作为抑制 AAD 进展的新型核酸治疗药物, 其作用机制与抑制巨噬细胞极化和巨噬细胞、T 淋巴细胞在血管中的募集有关。

关键词: 夹层动脉瘤; 纳米脂质体; 核酸治疗; 单核巨噬细胞

中图分类号: R543.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)05-1229-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.009

Role of stearylamine liposome-encapsulated nucleic acid DICAR-JP in aortic aneurysm and dissection and related mechanism

CHEN Feng¹, ZHAN Lin¹, MA Wen-tao², YANG Fan³, LI Chun-hong⁴, SHU Dan¹, ZHOU Qian-yi¹, YUAN Qiong^{1, 4*} (1. Department of Medicine, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065; 2. College of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou 510641; 3. Guangdong People's Hospital, Guangzhou 510080; 4. Institute of Cardiovascular Medicine, Southwest Medical University, Luzhou Sichuan 643000)

Abstract: Objective To determine the potential therapeutic effect of stearylamine liposome (CL)-encapsulated nucleic acid DICAR-JP in aortic aneurysm and dissection (AAD) and related mechanism. **Methods** Mice were divided into three groups, including a control group ($n = 9$), a CL group ($n = 9$), and a DICAR-JP/CL group ($n = 9$). The 3-week-old C57BL/6J mice were used to establish the AAD model, which were given water with 0.25% β -aminopropionitrile for 28 days. CL or DICAR-JP/CL was administered by tail vein injection. EVG and HE staining were used to determine the morphological changes in the blood vessels. The expressions of macrophage and T lymphocyte markers F4/80, CD206, iNOS and CD8 α were detected by immunohistochemistry. **Results** On the 28th day of the model establishment, death was observed in both the CL group and the DICAR-JP/CL group. The survival curve showed that mice in the CL group died earlier, with a mortality rate reaching 44%. Compared with the control group, the diameters of vascular were enlarged in the other two groups. Additionally, the ratio of vascular diameter enlargement in the DICAR-JP/CL group was significantly less than in the CL group

基金项目: 代谢性血管疾病四川省重点实验室开放基金 (No.2022MVDKL-K3); 四川省自然科学基金 (No.2024NSFTD0028)。

作者简介: 陈凤, 女, 在读硕士研究生, 主要从事心血管药理研究, email: 2403977576@qq.com * **通信作者:** 袁琼, 女, 教授, 主要从事心血管药理研究, email: yuanqiongwh@163.com

after 28 days ($P < 0.05$); HE and EVG staining showed that mice in the CL group exhibited obvious thickening of the vascular wall, pronounced inflammatory infiltration, substantial disruption of vascular elastic fibers, severe degradation of elastin, and a sharp increase in the positive cell rates of inflammatory markers F4/80, CD206, iNOS, and CD8 α ($P < 0.05$). In contrast, DICAR-JP/CL greatly inhibited the pathological changes in the blood vessels and reduced the ratio of inflammation-positive cells in AAD mice. **Conclusion** DICAR-JP/CL may serve as a novel nucleic acid therapeutic drug to inhibit AAD progression, and its mechanism may be related to the inhibition of macrophage polarization and the recruitment of macrophages and T lymphocytes in the blood vessels.

Key words: aortic aneurysm and dissection; nano-liposome; nucleic acid therapy; mononuclear macrophage

主动脉夹层动脉瘤 (aortic aneurysm and dissection, AAD) 是一类具有高致死率的血管疾病, 对人类生命构成了重大威胁^[1]。目前, AAD 的治疗主要为手术治疗和血管内支架植入治疗, 尚无特异的治疗药物^[2]。因此, 新型的特异性治疗药物的开发有助于为其带来新的治疗方案。免疫细胞炎症在 AAD 中发挥了重要作用, 其中主动脉壁中的 T 淋巴细胞和巨噬细胞浸润对 AAD 的发生至关重要^[3-4]。研究发现 T 淋巴细胞浸润与腹主动脉瘤大小密切相关^[5], 阻断巨噬细胞活化和血管炎症的发生能有效抑制主动脉瘤的形成^[6-7]。

核酸药物为近年来新药研究的热点, 大量二代测序发现的非编码 RNA (ncRNA) 核酸药物为人类疾病的治疗提供多个可能的作用靶点。环状 RNA (circRNA) 属于 ncRNA 的一种, 已被证明可以控制血管重塑、血管平滑肌细胞 (VSMC) 表型转化及凋亡、细胞增殖和炎症反应的调节^[8-11]。DICAR, 又名 circTULP4, 是课题组前期在糖尿病合并心脏病小鼠和糖尿病患者中发现的保护性 circRNA, 能抵抗糖尿病诱导的心肌细胞焦亡作用, 其有效作用功能区为 DICAR junction 位点, 即 DICAR-JP^[12]。由于核酸药物载体不易进入组织和细胞中, 目前其相关的介导手段主要为腺相关病毒和纳米脂质体。而纳米脂质体的有效载荷能力和自组装能力, 能有效克服细胞和组织摄取的障碍。研究发现纳米脂质体应用于主动脉瘤的治疗可改善药物对病变部位的靶向递送, 实现更加有效的治疗作用^[13]。利用带有正电荷的载体材料和带有负电荷的 RNA 通过静电吸附构建脂质体-核酸共载体系是常用的共载体构建方法。因此本研究使用硬脂胺阳离子纳米脂质体包载核酸 DICAR-JP 递送系统, 探讨 DICAR-JP 在 AAD 小鼠疾病模型中的作用以及从炎症免疫细胞角度探讨其可能机制。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠, 3 周龄 ($n = 27$), 体重 12 ~ 15 g [成都药康生物科技有限公司, 饲养于西南医科大学实验动物中心, 实验动物使用许可证号:

SYXK (川) 2023-0065], 饲养条件: 温度 (22 ± 2) °C, 相对湿度 (50 ± 10) %, 12 h 交替照明, 自由进食进水。本研究动物实验流程经西南医科大学实验动物伦理委员会审查批准 (批准号: swmu20240105)。

1.2 试剂

β -氨基丙腈富马酸盐 [BAPN, 西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司, 纯度 $\geq 98\%$]; 注射用蛋黄卵磷脂 (上海太伟药业股份有限公司, 纯度 $\geq 98\%$); 胆固醇 (国药集团化学试剂有限公司, 纯度 $\geq 99\%$); 硬脂胺 (纯度 $\geq 98\%$)、吐温-80 (药用级) (上海麦克林生化科技股份有限公司); DICAR-JP [生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 纯度 $> 99\%$, 批号: R3975]; 诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 抗体 (武汉赛维尔生物科技有限公司); CD206、CD8 α 、F4/80 抗体 (Cell Signaling Technology); 封闭山羊血清 (北京索莱宝科技有限公司)。

1.3 仪器

Vevo 3100 高分辨率小动物超声影像系统 (FUJIFILM VisualSonics 公司), KF-PRO-002 型数字切片扫描仪 (宁波江丰生物信息技术有限公司), Nano ZS 型马尔文激光粒度仪 (英国马尔文帕纳科公司), Tannon MINI Space 200 多功能凝胶成像分析系统 (上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 阳离子脂质体的制备

采用薄膜水合法制备空白脂质体^[14]。准确称取蛋黄卵磷脂 42.8 mg、胆固醇 7.2 mg、吐温-80 20.0 mg、硬脂胺 5.0 mg, 加入 6 mL 无水乙醇超声溶解。然后将混合物在 40 °C 水浴的旋转蒸发器中减压干燥。干燥后加入无酶水水化, 涡旋搅拌直至脂质膜完全分离并形成脂质体悬浮液, 再用超声探针对制备的阳离子脂质体超声, 直至其粒径为 100 nm, 得硬脂胺脂质体 (CL)。

2.2 DICAR-JP/CL 复合物的制备

阳离子脂质体带正电可与带负电的 DICAR-JP 通过静电吸附方式进行结合。将 CL 与 DICAR-JP

按不同的氮(N)、磷(P)配比(硬脂胺中的N与DICAR-JP中P的物质的量之比, N/P)混合, 4℃摇床孵育 30 min, 即得 DICAR-JP/CL 复合物。

2.3 处方筛选与表征

采用琼脂糖凝胶电泳、粒度及 Zeta 电位评价 DICAR-JP/CL 复合物中的 DICAR-JP 是否被 CL 完全包载。取不同 N/P 配比制备的 DICAR-JP/CL 复合物 10 μ L, 加入 1440 μ L 双蒸水, 混合均匀, 在马尔文激光粒度仪上测定粒度和 Zeta 电位。将不同 N/P 配比制备的 DICAR-JP/CL 复合物进行琼脂糖凝胶电泳, 分析 DICAR-JP 被 CL 包载的情况, 从而筛选出最佳配比。

2.4 动物模型制备与分组

将 27 只 3 周龄大小 C57BL/6J 小鼠, 进行正常饮水和含 0.25%BAPN 的特殊饮水 28 d。在饮水 7 d 后进行分组, 正常饮水为 Control 组, 特殊饮水的小鼠进行胸主动脉超声评估后, 按血管直径大小随机平均分为 CL 组和 DICAR-JP/CL 组两组, 每组 9 只。第 8 日开始给予 Control 组小鼠生理盐水、CL 组小鼠空载阳离子 CL 溶液(按 CL 与药物 DICAR-JP 的 N/P 比 7:1 计算所得)、DICAR-JP/CL 组小鼠 DICAR-JP/CL 25 μ g/20 g^[15-16], 以给药前一日晚上称量体重计算, 尾静脉注射。每 4 日一次, 共注射 5 次, 在最后一次注射后第 4 日进行超声测量胸主动脉直径大小, 并解剖取材。小鼠主动脉直径=(舒张末期直径-收缩末期直径)/3+舒张末期直径。

2.5 形态学和免疫组化分析

将主动脉血管病变部位和对照组同部位切 0.5 cm 长度, 常规固定、包埋、切片后进行染色。免疫组织化学染色切片用 0.01 mol·L⁻¹ 柠檬酸钠 (pH 6.0) 高压修复 30 min, 在 3% 过氧化氢 (H₂O₂) 溶液中孵育 30 min 去除内源性过氧化物酶。10% 山羊血清溶液中封闭 60 min 后加抗 F4/80、CD206、iNOS、CD8 α 一抗 (1:200 稀释), 4℃过夜。回收一抗后分别滴加 HRP 标记二抗孵育 30 min, 每个步骤之间使用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 3 次。用二氨基联苯胺 (DAB) 显色, 苏木精复染, 分化, 返蓝, 脱水, 透明, 中性树胶封固。每张切片在正置显微镜下随机选取 5 个视野, 用 Image J 分析各视野的阳性细胞表达率。

2.6 统计学方法

使用 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析及相关图片的绘制, 以均值 $\pm$ 标准误 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) 表示。两组间比较采用 *t* 检验, 多个组采用单因素方差分析, 进行 Tukey 事后检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。小鼠生存分析用 Log-rank 趋势检验, 采用 Bonferroni 校正后的阈值进行三组比较, 以 $P < 0.05/3$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 DICAR-JP/CL 复合物配比筛选及表征结果

随着 N/P 配比的增加, DICAR-JP 的亮度逐渐降低, 当 N/P 配比在 4:1 时, DICAR-JP 的亮度完全消失, 说明 CL 能将 DICAR-JP 完全包载 (见图 1A)。随着 N/P 配比的增大, 复合物粒径逐渐减小, Zeta 电位逐渐增加, CL 和 DICAR-JP 的结合由松散到紧密, 在 N/P 配比为 7:1 后, 复合物粒径和电位都趋于稳定, 说明在 CL 与 DICAR-JP 的 N/P 配比为 7:1 时, CL 能完全包载 DICAR-JP, 且有足够的正电性使 DICAR-JP/CL 复合物稳定并能够被带有负电的细胞摄取, 又不至于产生明显的阳离子毒性 (见图 1B)。因此, 本研究选择 N/P 配比为 7:1 的 DICAR-JP/CL 复合物进行后续实验。

3.2 DICAR-JP/CL 对 AAD 发生的影响

如图 2 所示, 在第 28 日主动脉超声中, 与 DICAR-JP/CL 组相比, CL 组小鼠主动脉血管明显增大; 与 Control 组相比, 其他两组小鼠皆有死亡且发生了 AAD。而相较于 DICAR-JP/CL 组 (死亡率 11%), CL 组小鼠出现更高死亡率 (死亡率 44%), 且出现死亡时间更早, 但差异无统计学意义; 在 AAD 的发病率上, CL 组比 DICAR-JP/CL 组更高 (见图 2)。

3.3 DICAR-JP/CL 对 AAD 发展的影响

解剖得到小鼠主动脉血管并采用大体显微镜观察发现, 与 Control 组相比, CL 组血管壁直径增大, 而 DICAR-JP/CL 的血管壁直径病变程度明显减轻 (见图 3A)。通过对给药前和给药后血管直径统计, 发现相较于模型 CL 组 [(2.3 $\pm$ 0.3) mm], DICAR-JP/CL 治疗组血管直径扩大比率明显降低 [(1.4 $\pm$ 0.1) mm, $P < 0.05$, 见图 3B]。HE 染色发现相较于 Control 组, CL 组小鼠血管壁有明显增厚膨大, 弹力纤维断裂紊乱, 并且有大量炎性细胞浸润, 而 DICAR-JP/CL 组则相较于 CL 组管壁有增厚, 但不明显 (见图 3C)。EVG 染色可见 Control 组小鼠血管壁无弹性蛋白降解, 弹性蛋白层结构清晰; 而 CL 组小鼠血管弹力纤维出现大量断裂, 弹性蛋白降解严重; 相较于 CL 组, DICAR-JP/CL 组弹力纤维有紊乱但未出现大量断裂, 弹性蛋白降解程度较轻 (见图 3D), 弹性蛋白评分相较于 CL 组低 ($P < 0.05$, 见图 3E)。

3.4 DICAR-JP/CL 对巨噬细胞的影响

F4/80 是总的巨噬细胞表面标志物, CD206 是巨噬细胞极化后 M2 型巨噬细胞表面标志物, iNOS 是 M1 型巨噬细胞表面标志物。免疫组化结果显示, 与 Control 组相比, CL 组小鼠主动脉血管 F4/80 阳性细胞数量显著增高 ($P < 0.001$), 而 DICAR-JP/CL 治疗组能明显抑制这个趋势 ($P < 0.05$, 见图 4A)。相较于 Control 组和 DICAR-JP/CL 组, CL 组小鼠主动脉血管 CD206 表达显著升高 ($P < 0.0001$, $P < 0.05$, 见图 4B)。相较于 CL 组, DICAR-JP/CL 组 iNOS 表

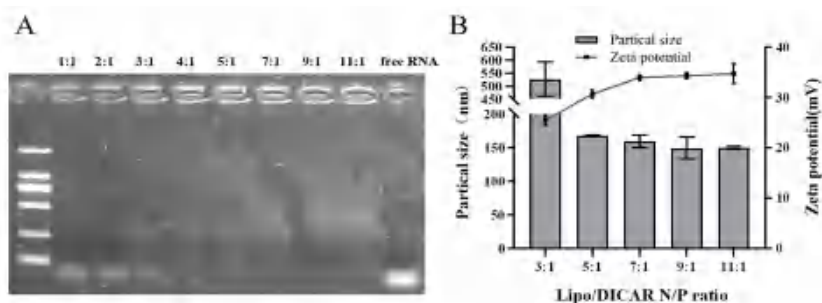


图 1 DICAR-JP/CL 复合物的表征结果 ($n = 3$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$)

Fig 1 Characterization of DICAR-JP/CL complex ($n = 3$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$)

A. 不同 N/P 配比的 DICAR-JP/CL 琼脂糖凝胶电泳图 (agarose gel electrophoresis of DICAR-JP/CL with different N/P ratios); B. 不同 N/P 配比的 DICAR-JP/CL 粒径和 Zeta 电位图 (particle size and Zeta potential of DICAR-JP/CL with different N/P ratios)

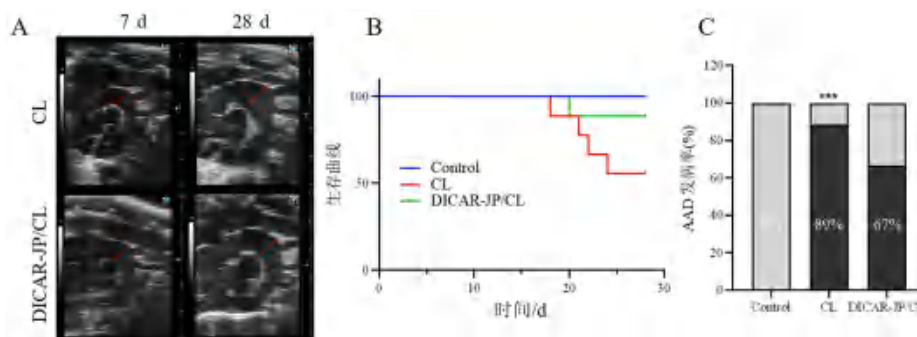


图 2 DICAR-JP/CL 对 AAD 发生的影响 ($n = 9$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$)

Fig 2 Effect of DICAR-JP/CL on the occurrence of AAD ($n = 9$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$)

A. 小鼠主动脉超声 (aortic vascular ultrasound); B. 生存曲线 (survival curve); C. AAD 发病率 (incidence of AAD)

注: 与 Control 组比较, $***P < 0.001$ 。

Note: Compared with the control group, $***P < 0.001$.

达降低 ($P < 0.05$, 见图 4C)。提示 DICAR-JP/CL 在血管损伤时能抑制巨噬细胞在血管聚集和抑制巨噬细胞向 M1 型极化引起炎症, 且在疾病晚期抑制巨噬细胞向 M2 型极化。

3.5 DICAR-JP/CL 对 T 淋巴细胞的影响

CD8 α 是 T 淋巴细胞表面标志物, 免疫组化结果显示, 与 Control 组和 DICAR-JP/CL 组相比, CL 组小鼠主动脉血管 CD8 α 的表达显著升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 提示 DICAR-JP/CL 在血管损伤时能抑制 T 淋巴细胞在血管募集浸润 (见图 5)。

4 讨论

本文研究的核酸 DICAR-JP 是一种人源性 circRNA——DICAR 的 junction 位点。然而外源 RNA 易被酶解且难进入细胞, 因此需要适宜载体将其递送到靶向部位。在 AAD 相关疾病中用到的递送系统有慢病毒、腺病毒以及细胞外囊泡^[17-19]。相较于病毒载体的高免疫原性和囊泡的难制取, 脂质纳米载体更安全, 更容易制得。有研究报道用茶多酚纳米颗粒可将 siRNA 有效封装并递送至腹主动脉瘤发生部位释放, 以沉默基质金属蛋白酶 (MMP)-2 和 MMP-9^[20]。因此, 本课题组选择了一种合成方便的阳离子纳米脂质体, 在能够保护核酸不受核酸酶的

降解之外还能介导核酸更好地进入靶标细胞。该脂质体主要以卵磷脂、胆固醇和硬脂胺为原料, 其中卵磷脂形成具有双亲性的双分子结构, 胆固醇稳固双分子结构, 并延缓磷脂降解, 硬脂胺的正离子能与带负电的核酸结合, 从而将核酸包载进脂质体空泡中^[14, 21]。本研究表明, 在脂质体/核酸的 N/P 配比为 7:1 时核酸 DICAR-JP 能被 CL 完全压缩包载且复合物粒径较小, 结构稳固。研究中发现 CL 包载 DICAR-JP 能明显降低小鼠的 AAD 发生率和死亡率, 还可以减少胸主动脉弹力层的断裂, 提示 DICAR-JP/CL 可能作为 AAD 治疗的有效候选核酸药物。

主动脉血管炎症环境是影响 AAD 疾病进展的重要环节, 其中巨噬细胞浸润和极化在其中发挥关键作用。单细胞测序表明在主动脉夹层中促炎巨噬细胞亚群均显著增加^[22]。用高选择性巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF) 受体酪氨酸激酶抑制剂 Ki20227 抑制主动脉中巨噬细胞的积累可以显著降低小鼠胸主动脉瘤和主动脉破裂的发生率^[23]。姜黄素和塞来昔布 (CC) 共载的仿生抗炎脂质体 (PM/TN-CCLP) 可作为 AAD 的潜在纳米疗法, 减轻血管的损伤和炎症浸润, 延长小鼠存活率^[24]。因此

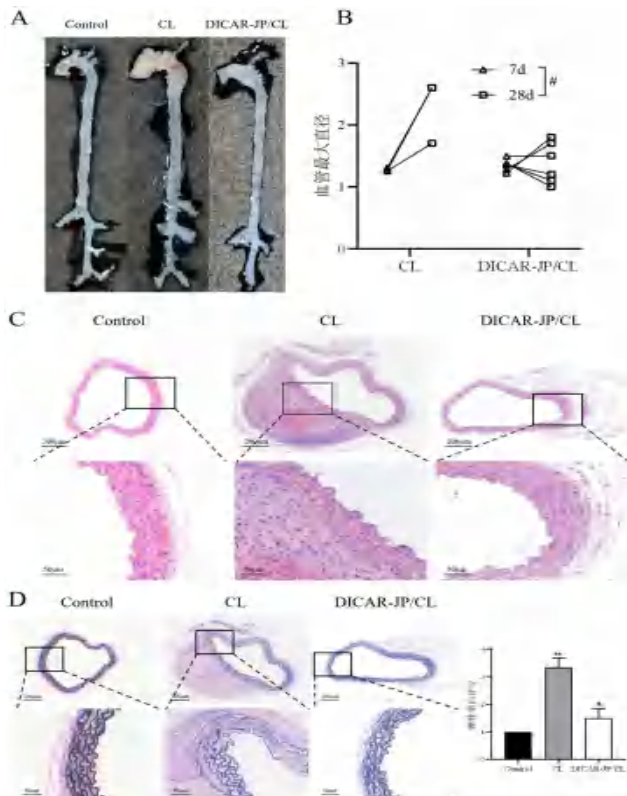


图 3 DICAR-JP/CL 对 AAD 发展的影响 (Control、CL 组, $n = 3$; DICAR-JP/CL 组, $n = 6$; $\bar{x} \pm \text{SEM}$)

Fig 3 Effect of DICAR-JP/CL on the development of AAD (Control and CL group, $n = 3$; DICAR-JP/CL group, $n = 6$; $\bar{x} \pm \text{SEM}$)

A. 血管代表性大体图 (representative gross image of blood vessels); B. 给药前后血管直径 (vessel diameter before and after the administration); C. HE 染色 (HE staining); D. EVG 染色 (EVG staining); E. 弹性蛋白评分 (elastin score)

注: 与 Control 组比较, $^{**}P < 0.01$; 与 DICAR-JP/CL 组比较, $^{#}P < 0.05$ 。

Note: Compared with the control group, $^{**}P < 0.01$; compared with the DICAR-JP/CL group, $^{#}P < 0.05$.

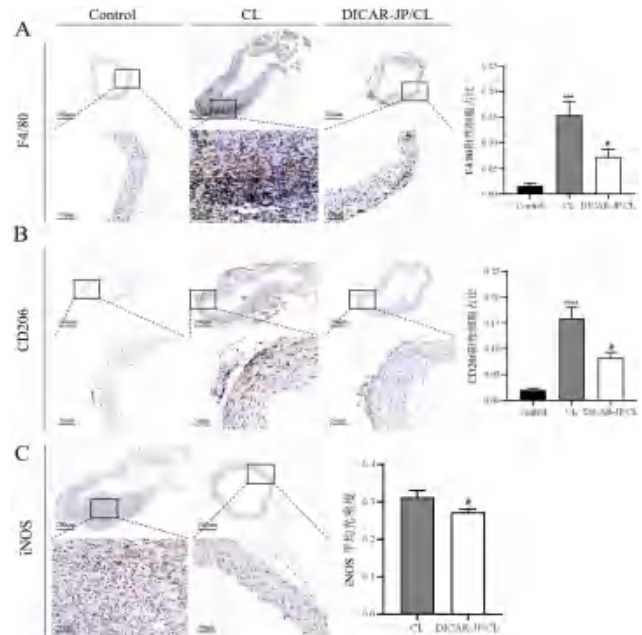


图 4 DICAR-JP/CL 对巨噬细胞的影响 ($n = 3$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$)

Fig 4 Effect of DICAR-JP/CL on macrophages ($n = 3$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$)

注: 与 Control 组比较, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.0001$; 与 DICAR-JP/CL 组比较, $^{#}P < 0.05$ 。

Note: Compared with the control group, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.0001$; compared with the DICAR-JP/CL group, $^{#}P < 0.05$.

靶向耗竭巨噬细胞和抑制其在主动脉壁的炎性浸润能有效防止主动脉瘤的发生和夹层的破裂。巨噬细胞 M1 极化在疾病早期加重局部炎症并促进主动脉扩张和血管重塑, 而 M2 极化则发挥抗炎和调节血管生成的作用。随着疾病的进展, 主动脉壁会经历从 M1 型向 M2 型巨噬细胞转变的代偿作用^[25]。有研究报道在连续 Ang II 输注期间积累在动脉瘤组织中的巨噬细胞主要表达 M2 型标志物^[26]。本研究结果显示巨噬细胞和 T 细胞标志物 F4/80、iNOS、

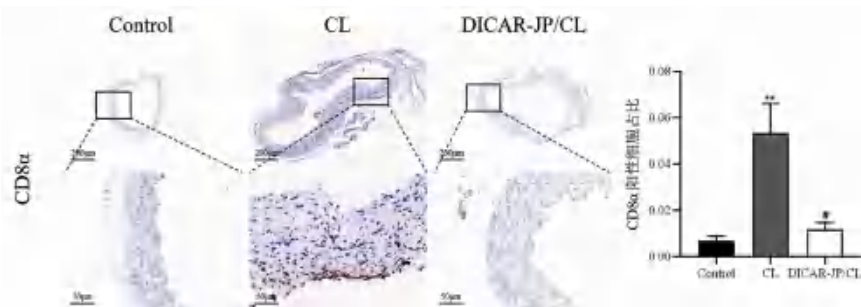


图 5 DICAR-JP/CL 对 T 淋巴细胞的影响 ($n = 3$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$)

Fig 5 Effect of DICAR-JP/CL on T cells ($n = 3$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$)

注: 与 Control 组比较, $^{**}P < 0.01$; 与 DICAR-JP/CL 组比较, $^{#}P < 0.05$ 。

Note: Compared with the control group, $^{**}P < 0.01$; compared with the DICAR-JP/CL group, $^{#}P < 0.05$.

CD206、CD8α 在 CL 和 DICAR-JP/CL 治疗组中皆高表达, 但核酸治疗组 DICAR-JP/CL 相对 CL 组表达较低, 提示 DICAR-JP/CL 在 AAD 中可能是通过抑制巨噬细胞和 T 淋巴细胞在血管的募集和浸润以

及调节巨噬细胞 M1/M2 表型转化来发挥作用。

综上所述, 本研究初步探讨了 DICAR-JP/CL 作为核酸治疗体系具有发挥治疗 AAD 的潜力, 其机制涉及抑制巨噬细胞和 T 淋巴细胞在血管的募

集、浸润和表型转化。此外,本研究存在一定的不足:首先,本研究动物实验数量不足,需要后续增加样本量;其次,本研究的核酸递送系统需要对药物在体内的药物分布情况进行探讨;再次,本研究没有细胞实验辅助证明 DICAR-JP 对免疫细胞表型转化的机制。相关不足,我们将在后续实验中进行探讨。

参考文献

- [1] Gouveia R, Mourão M, Caldeira D, et al. A systematic review and meta-analysis of the incidence of acute aortic dissections in population-based studies [J]. *J Vasc Surg*, 2022, 75 (2): 709-720.
- [2] Cui HT, Chen YH, Li K, et al. Untargeted metabolomics identifies succinate as a biomarker and therapeutic target in aortic aneurysm and dissection [J]. *Eur Heart J*, 2021, 42 (42): 4373-4385.
- [3] Yuan Z, Lu Y, Wei J, et al. Abdominal aortic aneurysm: roles of inflammatory cells [J]. *Front Immunol*, 2021, 11: 609-616.
- [4] Dang GH, Li TR, Yang DM, et al. T lymphocyte-derived extracellular vesicles aggravate abdominal aortic aneurysm by promoting macrophage lipid peroxidation and migration via pyruvate kinase muscle isozyme 2 [J]. *Redox Biol*, 2022, 50: 102-105.
- [5] Raffort J, Lareyre F, Clement M, et al. Monocytes and macrophages in abdominal aortic aneurysm [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2017, 14 (8): 457-71.
- [6] Cai DP, Sun CM, Murashita T, et al. ADAR1 non-editing function in macrophage activation and abdominal aortic aneurysm [J]. *Circ Res*, 2023, 132 (4): e78-e93.
- [7] Song HY, Yang Y, Sun YL, et al. Circular RNA Cdy1 promotes abdominal aortic aneurysm formation by inducing M1 macrophage polarization and M1-type inflammation [J]. *Mol Ther*, 2022, 30 (2): 915-931.
- [8] Ma XY, Xu JF, Lu QS, et al. Hsa_circ_0087352 promotes the inflammatory response of macrophages in abdominal aortic aneurysm by adsorbing hsa-miR-149-5p [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 107: 108-111.
- [9] Wang SZ, Yuan QW, Zhao WP, et al. Circular RNA RBM33 contributes to extracellular matrix degradation via miR-4268/EPHB2 axis in abdominal aortic aneurysm [J]. *PeerJ*, 2021, 9: e122-132.
- [10] Zhang LL, Zhao ZN, Quan XQ, et al. Circ_0008285 silencing suppresses angiotensin II -induced vascular smooth muscle cell apoptosis in thoracic aortic aneurysm via miR-150-5p/BASPI axis [J]. *Thorac Cancer*, 2023, 14 (22): 2158-2167.
- [11] Xu ZJ, Zhong K, Guo GJ, et al. circ_TGFB2 inhibits vascular smooth muscle cells phenotypic switch and suppresses aortic dissection progression by sponging miR-29a [J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14: 5877-5890.
- [12] Yuan Q, Sun YW, Yang F, et al. CircRNA DICAR as a novel endogenous regulator for diabetic cardiomyopathy and diabetic pyroptosis of cardiomyocytes [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8 (1): 99-110.
- [13] Cheng J, Zhang RJ, Li CW, et al. A targeting nanotherapy for abdominal aortic aneurysms [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2018, 72 (21): 2591-2605.
- [14] 何孔方. 共递送氯诺昔康和 microRNA-140 阳离子脂质体复合物的制备及在骨关节炎中的应用研究 [D]. 济南: 山东大学, 2021.
- [15] Christensen J, Litherland K, Faller T, et al. Biodistribution and metabolism studies of lipid nanoparticle-formulated internally [3H]-labeled siRNA in mice [J]. *Drug Metab Dispos*, 2014, 42 (3): 431-440.
- [16] Ishigooka H, Katsumata H, Saiga K, et al. Novel complement C5 small-interfering RNA lipid nanoparticle prolongs graft survival in a hypersensitized rat kidney transplant model [J]. *Transplantation*, 2022, 106 (12): 2338-2347.
- [17] Schellinger IN, Dannert AR, Mattern K, et al. Unresolved issues in RNA therapeutics in vascular diseases with a focus on aneurysm disease [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 571-576.
- [18] Remes A, Arif R, Franz M, et al. AAV-mediated AP-1 decoy oligonucleotide expression inhibits aortic elastolysis in a mouse model of Marfan syndrome [J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 117 (12): 2459-2473.
- [19] Wu J, Wang J, Li XO, et al. MicroRNA-145 mediates the formation of angiotensin II -induced murine abdominal aortic aneurysm [J]. *Heart Lung Circ*, 2017, 26 (6): 619-626.
- [20] Wu Z, Zhang P, Yue J, et al. Tea polyphenol nanoparticles enable targeted siRNA delivery and multi-bioactive therapy for abdominal aortic aneurysms [J]. *J Nanobiotechnology*, 2024, 22 (1): 471-475.
- [21] Majzoub RN, Ewert KK, Safinya CR. Cationic liposome-nucleic acid nanoparticle assemblies with applications in gene delivery and gene silencing [J]. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*, 2016, 374 (2072): 2015-2019.
- [22] Zhang B, Zeng K, Guan RC, et al. Single-cell RNA-Seq analysis reveals macrophages are involved in the pathogenesis of human sporadic acute type A aortic dissection [J]. *Biomolecules*, 2023, 13 (2): 399-403.
- [23] Liu XY, Chen W, Zhu GY, et al. Single-cell RNA sequencing identifies an Il1rn⁺/Trem1⁺ macrophage subpopulation as a cellular target for mitigating the progression of thoracic aortic aneurysm and dissection [J]. *Cell Discov*, 2022, 8 (1): 11.
- [24] Liu JX, Yang YY, Liu X, et al. Macrophage-biomimetic anti-inflammatory liposomes for homing and treating of aortic dissection [J]. *J Control Release*, 2021, 337: 224-235.
- [25] Raffort J, Lareyre F, Clément M, et al. Monocytes and macrophages in abdominal aortic aneurysm [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2017, 14 (8): 457-471.
- [26] Rateri DL, Howatt DA, Moorleghen JJ, et al. Prolonged infusion of angiotensin II in apoE (- / -) mice promotes macrophage recruitment with continued expansion of abdominal aortic aneurysm [J]. *Am J Pathol*, 2011, 179 (3): 1542-1548.

(收稿日期: 2024-10-01; 修回日期: 2024-11-20)

紫云英种子化学成分研究

谢尚龙¹, 童传旺², 郁阳^{1, 3}, 蔡百祥^{1, 3*}, 王举涛^{1, 3*} (1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2. 芜湖职业技术学院 食品与生物工程学院, 安徽 芜湖 241000; 3. 安徽省活性天然产物重点实验室, 合肥 230012)

摘要: **目的** 研究豆科黄芪属紫云英 (*Astragalus sinicus* L.) 种子的化学成分。**方法** 采用大孔树脂、ODS、硅胶柱色谱及半制备高效液相等色谱分离技术对紫云英种子部位进行分离纯化, 根据其理化性质及波谱数据进行结构鉴定。**结果** 从紫云英种子中分离鉴定 10 个化合物, 分别为紫云英苷 B (1)、大豆苷元 (2)、saussureoside B (3)、大豆苷 (4)、新甘草苷 (5)、金圣草素 -4'-O-β-D-葡萄糖苷 (6)、染料木苷 (7)、大豆苷元 -4'-葡萄糖苷 (8)、木犀草素 -4'-O-β-D-葡萄糖苷 (9)、柯伊利素 -7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷 (10)。**结论** 化合物 1 为新的降倍半萜苷类化合物, 所有化合物均为首次从该植物中分离得到。

关键词: 紫云英种子; 化学成分; 提取分离; 结构鉴定; 紫云英苷 B

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)05-1235-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.010

Chemical components of seeds of *Astragalus sinicus* L.

XIE Shang-long¹, TONG Chuan-wang², YU Yang^{1, 3}, CAI Bai-xiang^{1, 3*}, WANG Ju-tao^{1, 3*} (1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. School of Food and Biotechnology, Wuhu Vocational and Technical College, Wuhu Anhui 241000; 3. Anhui Key Laboratory of Bioactive Natural Products, Hefei 230012)

Abstract: Objective To determine the chemical components from the seeds of *Astragalus sinicus* L.. **Methods** The seeds of *Astragalus sinicus* L. were isolated and purified with various chromatographic techniques, including macroporous resin, ODS, silica gel column chromatography, and semi-preparative high-performance liquid chromatography. Structure identification was based on their physicochemical properties and spectral data. **Results** Totally 10 compounds were isolated and identified from the seeds of *Astragalus sinicus* L., namely as astragalin B (1), daidzein (2), saussureoside B (3), daidzin (4), neoglycyrol (5), apigenin-4'-O-β-D-glucoside (6), genistin (7), daidzein-4'-glucoside (8), luteolin-4'-O-β-D-glucoside (9), and koialoside-7-O-β-D-glucuronide (10). **Conclusion** Compound 1 is a new sesquiterpene glycoside, and all compounds have been isolated from this plant for the first time.

Key words: seed of *Astragalus sinicus* L.; chemical component; extraction and isolation; structure identification; astragalin B

紫云英 (*Astragalus sinicus* L.) 是豆科黄芪属中重要的药用植物, 其根、全草及种子均可入药。其中, 种子部分即紫云英种子, 其味甘、平, 具有“主风邪久痹, 补益五脏, 轻身延年”的功效^[1]。紫云英种子性状特征为肾形, 栗褐色, 长

约 3 mm^[2]。有研究报道紫云英中含有黄酮苷类、酚类、三萜苷类等成分, 在其种子中含有游离的氨基酸、脂肪酸等化学成分, 具有抗炎、保肝、抗病毒等药效作用^[3-7], 但是当前关于紫云英种子的化学成分研究报道较少, 不利于其进一步的

基金项目: 安徽省高等学校科学研究项目 (No. 2023AH050775, No.2023AH040323); 安徽中医药大学校级人才支持计划 (No. 2023rczd008)。

作者简介: 谢尚龙, 男, 硕士研究生, 主要从事中药化学研究, email: M156558533512@163.com *通信作者: 王举涛, 男, 教授, 主要从事中药化学成分与质量评价研究, email: wjt591@ahtcm.edu.cn; 蔡百祥, 男, 讲师, 主要从事中药药效物质基础与质量评价研究, email: caibx@ahtcm.edu.cn

综合开发利用。本研究以紫云英种子为研究对象,采用乙醇-水溶剂系统对其进行提取^[8],结合现代分离和结构鉴定技术分析其化学成分,旨在为紫云英种子资源的开发利用提供实验依据,拓展其在药用资源开发中的应用前景。

1 材料与方法

1.1 药材

植物种子于 2022 年 9 月在安徽省芜湖市南陵县采集,由安徽中医药大学药学院杨青山教授鉴定为豆科黄芪属紫云英(*Astragalus sinicus* L.)的种子。样本(No.zyys-2022-0906)保存于安徽中医药大学药学院天然药物化学实验室。样品在室温下风干后粉碎,室温保存备用。

1.2 仪器与试剂

Bruker 400、500、600 MHz 核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司); Shimadzu LC-IT-TOF-MS 型质谱仪(日本岛津公司); METTLER TOLEDO AB135-S 型电子天平(精度:十万分之一,瑞士梅特勒-托利多公司); Waters1525 分析型高效液相色谱仪、Waters XBridge C18 分析型色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)、制备型色谱柱(20 mm×250 mm, 5 μm)(美国 Waters 公司); KQ2200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

柱色谱硅胶 200~300 目和 100~200 目(山西诺泰生物科技有限公司);反相 C18 柱色谱硅胶填充材料(日本 Fujisilysia 化工有限公司);Sephadex LH-20 凝胶(美国 GE 公司);氘代二甲基亚砜(DMSO)、氘代氯仿、氘代甲醇(美国 Cambridge Isotope Laboratories 公司);GF254 薄层硅胶板(100 mm×100 mm)(青岛海洋化工有限公司);纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司);甲醇、乙腈(色谱级,上海萨恩化学技术有限公司);甲酸、二氯甲烷等其他试剂均为分析纯(成都科隆化学有限公司)。

1.3 提取与分离

紫云英种子 5 kg,粉碎,将粉末与 70% 乙醇(1:10)加热回流提取 3 次,每次 2 h,浓缩得到浸膏 405 g。以水混悬,经 AB-8 大孔树脂分离,分别用水、30% 乙醇、60% 乙醇、90% 乙醇洗脱,得到 4 个部位浸膏:水部位(156.6 g),30% 乙醇部位(75.6 g),60% 乙醇部位(88.3 g),90% 乙醇部位(23.1 g)。

60% 乙醇部位经硅胶柱色谱(200~300 目)分离,以二氯甲烷-甲醇(100:0→0:1)洗脱,硅胶薄层色谱检识合并相同馏分,得到馏分 Fr A1~A8。Fr A3(2.6 g)经过中压反相色

谱(甲醇-水为洗脱溶剂,50:50→100:0)和 Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇为洗脱剂)分离,后经 HPLC[乙腈-0.01% 甲酸水=45:55(V/V)作为流动相]等度洗脱得到化合物 1(3 mg)。Fr A4(3.3 g)经过中压制备色谱(甲醇-水为洗脱溶剂,50:50→100:0)和 Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇为洗脱剂)分离,后经 HPLC[乙腈-0.01% 甲酸水=50:50(V/V)作为流动相]等度洗脱得到化合物 2(22 mg)。Fr A6(2.8 g)经过中压反相制备色谱(甲醇-水为洗脱溶剂,40:50→100:0)和 Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇为洗脱剂)分离,后经 HPLC[乙腈-0.01% 甲酸水=55:45(V/V)作为流动相]等度洗脱得到化合物 3(11 mg)。

30% 乙醇部位经硅胶柱色谱(200~300 目)分离,以二氯甲烷-甲醇(100:0→0:1)洗脱,合并得到馏分 Fr B1~B5。Fr B3(3.6 g)经过中压反相色谱(甲醇-水为洗脱溶剂,60:50→100:0)和 Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇为洗脱剂)分离,后经 HPLC[乙腈-0.01% 甲酸水=50:50(V/V)作为流动相]等度洗脱得到化合物 4(133 mg)、5(29 mg)、6(42 mg)。Fr B4(4.5 g)经过中压反相色谱(以甲醇-水为洗脱剂,60:50→100:0)和 Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇为洗脱溶剂)分离,后经 HPLC[以乙腈-0.01% 甲酸水=50:50(V/V)作为流动相]等度洗脱得到化合物 7(16 mg)、8(38 mg)、9(12 mg)。Fr B5(1.2 g)经过中压色谱(以甲醇-水为洗脱剂,60:50→100:0)和 Sephadex LH-20 柱色谱(甲醇为洗脱溶剂)分离,后经 HPLC[以乙腈-0.01% 甲酸水=60:40(V/V)作为流动相]等度洗脱得到化合物 10(82 mg)。各化合物的结构式如图 1 所示。

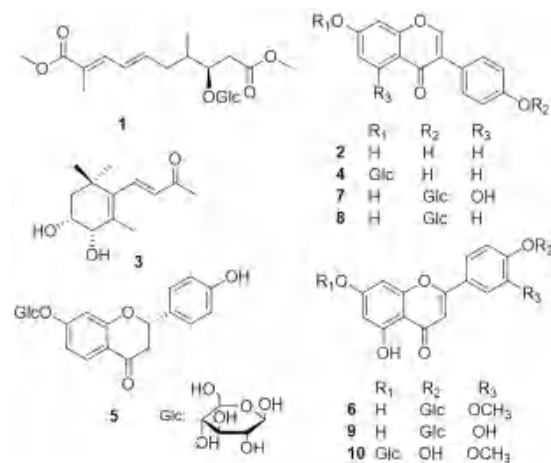


图 1 分离所得化合物 1~10 的结构式

Fig 1 Chemical structures of the isolated compounds 1~10

2 结果

2.1 结构鉴定

化合物 **1**, 白色粉末状物质 (甲醇), 易溶于甲醇。高分辨质谱 (HR-ESI-MS) 显示化合物的准分子离子峰为 m/z 455.1886 $[M + Na]^+$ (计算值 455.1888), 结合 ^{13}C -NMR 谱数据 (见表 1), 推测化合物的分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_{10}$ 。 ^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) 谱显示 3 个反式烯氢质子信号 7.17 (1H, d, $J = 11.5$ Hz)、6.47 (1H, dd, $J = 14.9, 11.5$ Hz)、6.12 (1H, dt, $J = 14.9, 7.3$ Hz), 2 个甲氧基氢信号 3.72 (3H, s)、3.67 (3H, s), 2 个甲基氢信号 1.94 (3H, s), 0.96 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-12)。 ^{13}C -NMR 和 DEPT (150 MHz, CD_3OD) 谱显示化合物 **1** 有 20 个碳信号, 其中包括 2 个碳基碳信号 (δ_{C} 170.6, 174.7), 4 个烯键碳信号 (δ_{C} 126.0, 128.8, 140.1, 143.0), 2 个甲氧基碳信号 (δ_{C} 52.2, 52.2), 2 个甲基碳信号 (δ_{C} 12.7, 15.4), 此外结合氢谱高场区相关信号可以明显看到结构中还存在 1 个 β -葡萄糖基信号 [其端基质子信号 4.31 (1H, d, $J = 7.8$ Hz) 和 104.6]。 ^1H - ^1H COSY 谱结合 HSQC 谱可以看到 $\text{H}_3\text{-H}_4\text{-H}_5\text{-H}_6\text{-H}_7\text{-H}_8\text{-H}_9$ 相关, 表明其存在 C3-C4-C5-C6-C7-C8-C9 的结构片段。其 HMBC 谱可以看到 δ 4.31 (H-1') 与 81.4 (C-8) 的相关, 表明葡萄糖基通过氧原子连在 C-8 位上, 其他的相关如图 2 所示。化合物 **1** 的核磁数据与报道化合物 Falandioside D 十分相似^[9], 不同之处在于化合物 **1** 中多 1 个甲氧基碳信号, 其 HMBC 谱中 δ 3.73 与 170.6 (C-1) 相关表明化合物 Falandioside D 中的 1 位的羟基变成了甲氧基。由上述信息确定了化合物 **1** 的平面结构见图 2, 核磁数据见表 1。经 SCI-Finder 数据库检索, 确定化合物 **1** 为 1 个新的降倍半萜苷类化合物: 1, 10-dimethoxy-2, 7-dimethyl-8- (*O*-glucoside) deca-2E, 4E-dienedioate, 命名为紫云英苷 B。

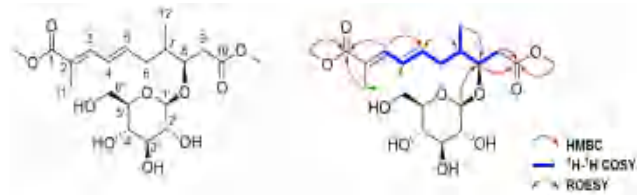


图 2 化合物 **1** 结构式及其部分二维相关图

Fig 2 Chemical structure and some 2D correlations of compound **1**

化合物 **2**, 白色结晶状粉末 (甲醇)。ESI-MS m/z 255 $[M + H]^+$ 。 ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 10.78 (1H, s, OH-7), 9.52 (1H, s, OH-4'), 8.29 (1H, s, H-2), 7.98 (1H, d, $J =$

表 1 化合物 **1** 的核磁数据 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据 (600/150 MHz, CD_3OD)

Tab 1 ^1H -NMR and ^{13}C -NMR data of compound **1** (600/150 MHz, CD_3OD)

碳位	δ_{H}	δ_{C}
1	—	170.6
2	—	126.0
3	7.17 (d, $J = 11.5$ Hz)	140.1
4	6.47 (dd, $J = 14.9, 11.5$ Hz)	128.8
5	6.12 (dt, $J = 14.9, 7.3$ Hz)	143.0
6	2.44 (m)	36.9
	2.13 (dt, $J = 14.0, 8.5$ Hz)	
7	1.94 (m)	38.5
8	4.01 (m)	81.4
9	2.67 (dd, $J = 15.6, 7.6$ Hz)	38.8
	2.58 (dd, $J = 15.6, 4.1$ Hz)	
10	—	174.7
11	1.91 (s)	12.7
12	0.96 (d, $J = 6.8$ Hz)	15.4
1'	4.31 (d, $J = 7.8$ Hz)	104.6
2'	3.13 (dd, $J = 8.8, 7.8$ Hz)	75.3
3'	3.31 (overlapped)	78.1
4'	3.24 (dd, $J = 8.7, 5.6$ Hz)	71.7
5'	3.20 (m)	77.4
6'	3.79 (dd, $J = 11.8, 2.2$ Hz)	62.9
	3.62 (m)	
1-OCH ₃	3.72 (s)	52.2
10-OCH ₃	3.67 (s)	52.2

8.5 Hz, H-5), 7.40 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2', 6'), 6.93 (1H, dd, $J = 8.5, 1.0$ Hz, H-6), 6.86 (1H, s, H-8), 6.80 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3', 5')。 ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ : 174.7 (C-4), 162.5 (C-7), 157.5 (C-4'), 157.2 (C-8a), 152.9 (C-2), 130.1 (C-2', 6'), 127.3 (C-5), 123.5 (C-3), 122.6 (C-1'), 116.6 (C-4a), 115.2 (C-6), 115.0 (C-3', 5'), 102.1 (C-8)。以上化合物的核磁数据与文献^[10]对照基本一致, 由此确定化合物 **2** 为大豆苷元。

化合物 **3**, 白色粉末 (甲醇): ^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.28 (1H, d, $J = 16.4$ Hz, H-7), 6.45 (1H, d, $J = 16.4$ Hz, H-8), 3.88 (1H, d, $J = 3.7$ Hz, H-4), 3.79 (1H, dt, $J = 12.6, 3.7$ Hz, H-3), 2.32 (3H, s, H-10), 1.88 (3H, s, H-11), 1.83 (1H, t, $J = 12.6$ Hz, H-8b), 1.49 (1H, m, H-8a), 1.14 (3H, s, H-12), 1.10 (3H, s, H-13); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 200.6 (C-9), 144.4 (C-7), 140.6 (C-6), 134.5 (C-5), 133.4 (C-8), 72.4 (C-

4), 67.5 (C-3), 41.7 (C-2), 37.8 (C-1), 30.2 (C-13), 27.7 (C-12), 27.2 (C-10), 20.0 (C-11), 以上化合物的核磁数据与文献^[11]报道的基本一致, 由此确定化合物 **3** 为 saussureoside B。

化合物 **4**, 白色粉末 (甲醇)。¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ : 9.56 (1H, s, OH-4'), 8.40 (1H, s, H-2), 8.05 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 7.42 (2H, dd, $J = 9.0, 2.4$ Hz, H-2', 6'), 7.24 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-8), 7.16 (1H, dd, $J = 8.4, 2.4$ Hz, H-6), 6.82 (2H, d, $J = 9.0, 2.4$ Hz, H-3', 5'), 5.09 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, H-1'), 3.71 ~ 3.74 (1H, m, H-6a"), 3.45 ~ 3.51 (2H, m, H-5', 6b"), 3.31 ~ 3.34 (2H, m, H-2", 3"), 3.18 ~ 3.22 (1H, m, H-4")。 ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ : 174.8 (C-4), 161.4 (C-7), 157.3 (C-4), 157.1 (C-9), 153.4 (C-2), 130.1 (C-2', 6'), 127.0 (C-5), 123.7 (C-3), 122.3 (C-1'), 118.5 (C-10), 115.7 (C-6), 115.0 (C-3', 5'), 103.4 (C-8), 100.0 (C-1"), 77.2 (C-5"), 76.5 (C-3"), 73.2 (C-2"), 69.6 (C-4"), 60.1 (C-6")。以上化合物的波谱数据与文献^[12]报道的基本一致, 故鉴定该化合物结构为大豆苷。

化合物 **5**, 黄色粉末。ESI-MS m/z : 441.07 [M + Na]⁺, 417.13 [M-H]⁻。 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 3.12 (1H, dd, $J = 16.5, 12.1$ Hz, H-3), 5.39 (1H, dd, $J = 12.8, 3.0$ Hz, H-2), 5.40 (1H, dd, $J = 7.5$ Hz, H-1'), 6.80 (1H, s, H-2), 6.81 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-3', 5'), 7.32 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2', 6'), 7.80 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-5)。 ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 78.2 (C-2), 44.8 (C-3), 190.2 (C-4), 129.2 (C-5), 112.2 (C-6), 165.5 (C-7), 105.3 (C-8), 165.1 (C-9), 116.3 (C-10), 129.1 (C-2', 6'), 117.0 (C-3', 5'), 101.4 (C-1"), 74.7 (C-2"), 77.8 (C-3"), 71.2 (C-4"), 78.2 (C-5"), 62.4 (C-6")。以上化合物的波谱数据与文献^[13]报道的基本一致, 故鉴定化合物 **5** 为新甘草苷。

化合物 **6**, 黄色粉末 (甲醇)。 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 3.18 ~ 3.48 (m, Glc-H), 4.57 (s, H-1"), 5.35 (d, $J = 7.5$ Hz, H-1"), 6.19 (d, $J = 1.9$ Hz, H-6), 6.20 (d, $J = 1.9$ Hz, H-8), 7.16 (s, H-2', 6')。 ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 181.8 (C-4), 165.0 (C-7), 163.0 (C-2), 161.4 (C-5), 157.5 (C-9), 149.7 (C-4'), 149.2 (C-3'), 124.1 (C-1'), 119.7 (C-

6'), 115.0 (C-5'), 110.2 (C-2'), 104.1 (C-3), 103.6 (C-10), 99.5 (C-1"), 99.1 (C-6), 94.3 (C-8), 77.2 (C-3"), 76.9 (C-5"), 73.1 (C-2"), 69.6 (C-4"), 60.6 (C-6"), 56.0 (OMe)。上述氢、碳谱数据与文献^[14]报道的基本一致, 故鉴定化合物 **6** 为金圣草素 -4'-O- β -D-葡萄糖苷。

化合物 **7**, 白色粉末 (甲醇), ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.44 (1H, s, H-2), 7.42 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2', 6'), 7.40 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3', 5'), 6.83 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.73 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 154.6 (C-2), 122.6 (C-3), 180.5 (C-4), 161.6 (C-5), 99.8 (C-6), 163.0 (C-7), 94.5 (C-8), 157.5 (C-9), 106.0 (C-10), 121.0 (C-1), 130.2 (C-2, 6), 115.1 (C-3, 5), 157.2 (C-4), 99.6 (C-1), 73.1 (C-2), 77.2 (C-3), 69.6 (C-4), 76.4 (C-5), 60.6 (C-6)。以上化合物的波谱数据与文献^[15]报道的基本一致, 故鉴定该化合物为染料木苷。

化合物 **8**, 白色粉末, 分子式为 C₂₁H₂₀O₉。 ¹H-NMR (400 Hz, DMSO-*d*₆) δ : 4.91 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-1"), 6.73 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.83 (1H, dd, $J = 8.8, 2.0$ Hz, H-6), 7.08 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', 5'), 7.49 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-2', 6'), 7.89 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5), 8.26 (1H, s, H-2)。 ¹³C-NMR (125 Hz, DMSO-*d*₆) δ : 153.3 (C-2), 123.1 (C-3), 174.6 (C-4), 127.3 (C-5), 115.3 (C-6), 162.9 (C-7), 102.2 (C-8), 157.5 (C-9), 116.0 (C-10), 125.6 (C-1'), 130.0 (C-2', 6'), 116.0 (C-3', 5'), 157.1 (C-4'), 100.4 (C-1"), 73.3 (C-2"), 76.7 (C-3"), 69.7 (C-4"), 77.1 (C-5"), 60.7 (C-6")。化合物的波谱数据与文献^[16]报道的基本一致, 故鉴定该化合物为大豆苷元 -4'-葡萄糖苷。

化合物 **9**, 淡黄色粉末。 ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ : 12.91 (1H, s, OH-5), 7.53 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-2'), 7.51 (1H, dd, $J = 8.4, 2.4$ Hz, H-6'), 7.43 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-2'), 7.22 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.81 (1H, s, H-3), 6.50 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-8), 6.19 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-6), 4.89 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1")。 ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ : 164.5 (C-2), 103.8 (C-3), 181.8 (C-4), 161.5 (C-5), 99.0 (C-6), 163.2 (C-7), 94.1 (C-8), 157.4

(C-9), 104.0 (C-10), 124.7 (C-1'), 113.6 (C-2'), 147.0 (C-3'), 148.6 (C-4'), 116.0 (C-5'), 118.5 (C-6'), 101.2 (C-1''), 73.3 (C-2''), 75.9 (C-3''), 69.8 (C-4''), 77.3 (C-5''), 60.7 (C-6''). 以上数据与文献^[17]报道的基本一致故鉴定该化合物为木犀草素-4'-O- β -D-葡萄糖苷。

化合物 **10**, 淡黄色粉末, ESI-MS m/z 507.1 $[M+H]^+$ 。¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.60 (1H, dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz, H-6'), 7.58 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 6.97 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.95 (1H, s, H-3), 6.87 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.45 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.13 (1H, d, $J = 7.1$ Hz, H-1''), 3.89 (3H, s, 3-OCH₃), 3.17 ~ 3.65 (4H, m, H-2'', 3'', 4'', 5''); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.2 (C-2), 103.4 (C-3), 182.1 (C-4), 161.1 (C-5), 99.5 (C-6), 162.9 (C-7), 94.8 (C-8), 157.0 (C-9), 105.3 (C-10), 121.3 (C-1), 110.3 (C-2), 148.1 (C-3), 151.0 (C-4), 116.0 (C-5), 120.5 (C-6), 99.5 (C-1''), 73.0 (C-2''), 76.2 (C-3''), 71.3 (C-4''), 74.4 (C-5''), 171.3 (C-6''), 56.0 (O-CH₃)。以上波谱数据与文献^[18]比对基本一致, 故鉴定化合物 **10** 为柯伊利素-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷。

3 讨论

紫云英种子具有一定的药用价值, 但其种子化学成分研究相对匮乏, 不利于其综合利用开发。本次研究通过综合运用多种色谱分离方法及波谱学技术对紫云英种子化学成分进行系统的分离和鉴定, 从紫云英种子中分离并鉴定了 10 个化合物, 包括黄酮类和萜类化合物, 均为首次从药材中分离得到, 其中化合物 **1** 为一个新的降倍半萜苷类化合物。这一研究不仅丰富了紫云英种子的化学成分结构类型, 也为后续药效学研究提供了物质基础。综上所述, 后续可继续深入研究紫云英种子中的倍半萜、黄酮类成分, 进一步挖掘其药用价值。

参考文献

[1] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.

- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1993.
- [3] 施海帆, 郭振飞. 紫云英种质资源与遗传育种研究进展[J]. 草业科学, 2020, 37(12): 2507-2519.
- [4] Kim BH, Oh I, Kim JH, et al. Anti-inflammatory activity of compounds isolated from *Astragalus sinicus* L. in cytokine-induced keratinocytes and skin [J]. Exp Mol Med, 2014, 46(3): e87.
- [5] 蒋新龙, 蒋益花, 张雨生. 超声-微波协同提取紫云英籽油及脂肪酸组成分析[J]. 中国粮油学报, 2020, 35(2): 63-69.
- [6] 王小红, 王晨, 谷祥勇, 等. 菜用紫云英中硒赋存形态及含硒有机化合物提取工艺研究[J]. 湖北民族大学学报(自然科学版), 2024, 42(2): 151-157.
- [7] 张晓斌, 周静伟, 孟祥勇, 等. 紫云英在食品产业中的应用研究进展[J]. 安徽农学通报, 2021, 27(17): 63-64.
- [8] 沈文娟, 岳亮, 何英翠, 等. 天然药物常用提取技术与方法研究概况[J]. 中南药学, 2011, 9(2): 127-130.
- [9] Yang D, Liang J, Xie HH, et al. Norsesquiterpenoids and triterpenoids from strawberry cv. Falandi [J]. Food Chem, 2016, 203, 67-72.
- [10] Yasuda T, Kano Y, Saito KI, et al. Urinary and biliary metabolites of daidzin and daidzein in rats [J]. Biol Pharm Bul, 1994, 17(10): 1369.
- [11] Xie HH, Wang T, Matsuda H, et al. Bioactive constituents from Chinese natural medicines. XV. inhibitory effect on aldose reductase and structures of saussureosides A and B from *Saussurea medusa* [J]. Chem Pharm Bull, 2005, 53(11): 1416-1422.
- [12] Nawaf AM, Nigel PB. An efficient method for the Glycosylation of isoflavones [J]. Eur J Org Chem, 2008, 2008(33): 5622.
- [13] 李晓, 来国防, 王易芬, 等. 滇黄精的化学成分研究(II)[J]. 中草药, 2008, 39(6): 825-828.
- [14] Lu YR, Sun Y, Foo LY, et al. Phenolic glycosides of forage legume *Onobrychis viciifolia* [J]. Phytochemistry, 2000, 55(1): 67-75.
- [15] 李宝强, 宋启示. 大叶千斤拔根的化学成分[J]. 中草药, 2009, 40(2): 179-182.
- [16] 桑已曙, 史海明, 闵知大. 峨嵋葛根的化学成分研究(II)[J]. 中草药, 2002, 33(9): 11-13.
- [17] 张援虎, 何丽, 关焕玉, 等. 追风伞中黄酮类成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(14): 1824-1826.
- [18] Kwak JH, Kim HJ, Lee KH, et al. Antioxidative iridoid glycosides and phenolic compounds from *Veronica peregrina* [J]. Arch Pharm Res, 2009, 32(2): 207-213.

(收稿日期: 2024-11-11; 修回日期: 2025-02-05)

麻花秦艽通过 STAT1/STAT6 途径调控小胶质细胞极化 抗慢性脑低灌注损伤

呼田^{1, 2, 3}, 张嘉豪¹, 周雪薇¹, 巩洁¹, 李媛¹, 赵勤^{4, 5}, 王川^{1, 2, 3}, 刘继平^{1, 2, 3}, 王斌^{1, 2, 3*}

(1. 陕西中医药大学药学院, 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. 中医药脑健康产业陕西省高校工程研究中心, 陕西 咸阳 712046; 4. 西藏民族大学, 陕西 咸阳 712082; 5. 西藏民族大学藏药检测技术教育部工程研究中心, 陕西 咸阳 712082)

摘要: **目的** 探究麻花秦艽对慢性脑低灌注 (CCH) 的作用及其机制。**方法** 运用网络药理学技术预测麻花秦艽抗 CCH 的作用靶点和信号通路。通过永久性双侧颈总动脉结扎法 (2-VO) 建立 CCH 大鼠模型。造模 3 d 后开始灌胃对应药物, 持续 28 d。Zea Longa 评分法评价大鼠神经功能; Morris 水迷宫检测大鼠认知功能; HE 染色观测大鼠脑组织病理损伤; 免疫组化染色检测大鼠脑组织中小胶质细胞标志物离子钙结合衔接分子 1 (IBA-1) 阳性细胞数; ELISA 法检测 M1 型促炎因子和 M2 型抑炎因子水平; Western blot 检测大鼠脑 STAT1/STAT6 相关蛋白表达。**结果** 网络药理学筛选出麻花秦艽治疗 CCH 的潜在作用靶点有 143 个, PPI 网络核心靶点为 STAT1、IL-6、IL-10、IL-4、STAT3 等炎症因子, GO 和 KEGG 富集分析结果显示涉及 JAK-STAT、TNF 等多条信号通路。动物实验显示麻花秦艽能改善 CCH 大鼠神经功能缺损、认知障碍和病理损伤; 减少小胶质细胞活化和 M1 极化, 增加 M2 极化; 显著降低 p-STAT1/STAT1 表达, 增加 p-STAT6/STAT6 表达。**结论** 麻花秦艽可能通过调控 STAT1/STAT6 表达抑制小胶质细胞活化和 M1 极化, 促进 M2 极化, 进而抑制炎症反应来发挥对 CCH 大鼠的保护作用。

关键词: 麻花秦艽; 慢性脑低灌注; 小胶质细胞; STAT1/STAT6 途径

中图分类号: R286 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)05-1240-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.011

Gentiana Straminea Maxim. regulates microglia polarisation against chronic cerebral hypoperfusion injury via STAT1/STAT6 pathway

HU Tian^{1, 2, 3}, ZHANG Jia-hao¹, ZHOU Xue-wei¹, GONG Jie¹, LI Yuan¹, ZHAO Qin^{4, 5}, WANG Chuan^{1, 2, 3}, LIU Ji-ping^{1, 2, 3}, WANG Bin^{1, 2, 3*} (1. School of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712046; 2. Key Laboratory of Pharmacodynamics and Material Basis of Chinese Medicine of Shaanxi Administration Bureau of Traditional Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712046; 3. Engineering Research Center of Brain Health Industry of Chinese Medicine, Universities in Shaanxi, Xianyang Shaanxi 712046; 4. Xizang Minzu University, Xianyang Shaanxi 712082; 5. Engineering Center for Xizang Medicine Testing Technology, Ministry of Education, Xizang Minzu University, Xianyang Shaanxi 712082)

Abstract: Objective To determine the effect and mechanism of *Gentiana Straminea* Maxim. (GSM) on chronic cerebral hypoperfusion (CCH). **Methods** Network pharmacology was used to predict the potential targets and signaling pathways of GSM against CCH. The CCH rat model was established by permanently ligating the bilateral common carotid arteries (2-VO). Three days post-surgery, the rats received GSM treatment by gavage for 28 days. Neurological function was assessed with the Zea Longa score. Cognitive function was evaluated with the Morris water maze. Pathological changes in the rat brain tissue were observed

基金项目: 陕西省重点研发计划项目 (No.2024SF-GJHX-31); 国家自然科学基金项目 (No.81473385); 咸阳市重点研发科技项目 (No. JBGS-001); 西藏民族大学藏药检测技术教育部工程研究中心项目 (No.2022-ZYZXK05)。

作者简介: 呼田, 女, 硕士研究生, 主要从事中药抗脑缺血与神经药理研究, email: hutian19991107@163.com * **通信作者:** 王斌, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心脑血管病的方药研究, email: wangbin812@126.com

by hematoxylin and eosin (HE) staining. Immunohistochemical staining quantified the number of cells positive for microglia markers, namely ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA-1) in brain tissue. ELISA was used to measure the levels of M1 (pro-inflammatory) and M2 (anti-inflammatory) cytokines. Western blot determined the expression of STAT1/STAT6-related proteins in the brain. **Results** Network pharmacology identified 143 potential targets of GSM for CCH treatment. Core targets in the protein-protein interaction (PPI) network included inflammatory factors such as STAT1, IL-6, IL-10, IL-4, and STAT3. Gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses implicated multiple signaling pathways, such as JAK-STAT and TNF. In vivo experiments demonstrated that GSM ameliorated the neurological deficits, cognitive impairment, and pathological damage in rats with CCH. GSM reduced microglia activation and M1 polarization while increased M2 polarization. GSM significantly decreased p-STAT1/STAT1 expression and increased p-STAT6/STAT6 expression. **Conclusion** GSM may protect CCH by regulating STAT1/STAT6 expression to inhibit microglia activation and M1 polarization, promote M2 polarization, and consequently suppress inflammatory responses.

Key words: *Gentiana Straminea* Maxim.; chronic cerebral hypoperfusion; microglia; STAT1/STAT6 pathway

慢性脑低灌注 (chronic cerebral hypoperfusion, CCH) 的病症是由于多种原因导致的脑部血液流动不足, 这种状况会逐步恶化至无法满足正常脑组织的生理需要, 从而引发一系列神经系统症状^[1]。CCH 临床表现多种多样, 包括认知能力下降、记忆障碍、抑郁、焦虑等症状^[2-4]。CCH 会产生一系列的病理生理变化, 其中慢性炎症、氧化应激和血脑屏障受损是 CCH 进展的关键病理生理机制^[5-7]。目前治疗方法主要是干预危险因素、针对病因治疗、药物改善脑循环等, 如丁苯酞 (NBP)^[8]。小胶质细胞是一种存在于大脑中枢神经系统中的常驻免疫细胞, 是对各种伤害情况作出第一层防御措施的重要角色者。一旦出现血液供应不足, 因不同小胶质细胞表型可能会发生有利及不利的作用^[9], M1 型群体主要是破坏性的, 而 M2 型群体是神经保护性的^[10-11]。已有研究表明, 某些药物能够通过减轻炎症反应来改善 CCH 的症状。例如, 富马酸二甲酯在动物实验中显著减轻了慢性脑缺血大鼠的空间记忆缺陷, 这可能与该药物的抗炎作用密切相关^[12-13]。这一发现为人们提供了新的治疗思路, 即通过调控炎症反应来干预 CCH 的进程, 从而改善患者的预后。因此, 深入研究炎症在 CCH 中作用机制及开发具有抗炎作用的新型治疗药物, 对于防治 CCH 具有重要意义。

藏医药学是中国传统医学的关键元素之一。本文的研究对象是产自西藏高原的藏药——麻花秦艽 (*Gentiana straminea* Maxim., 简称 GSM), 它是藏医药中的常用药物^[14], 属于龙胆科龙胆属植物, 主要分布在中国西部的高海拔地带, 并被证实有祛风湿、清湿热、止痹痛的作用^[15]。在实际应用中,

GSM 可以单独使用或者与其他药物组合来治疗心脏和脑血管疾病、呼吸系统问题、面部神经病变等多种疾病^[16]。然而, GSM 对 CCH 的作用及机制目前尚不完全清楚。本研究的目的是深入探究 GSM 对 CCH 介导的神经炎症的影响机制, 为其作为 CCH 有效治疗方法提供理论支持, 同时也为 GSM 药物的开发和临床应用提供更多实验数据。

1 材料

1.1 实验动物

50 只 SPF 级 SD 雄性大鼠 (200±20 g) [成都达硕实验动物有限公司, 许可证号为 SCXK (川) 2020-0030]。所有实验动物操作符合陕西中医药大学实验动物伦理委员会的规定 (伦理批号: SUCMDL20241208002)。

1.2 试剂

GSM 干燥根由西藏民族大学提供, 经陕西中医药大学胡本祥教授鉴定为龙胆科植物麻花秦艽的干燥根。丁苯酞软胶囊 (批号: 1182212113, 石药集团恩必普药业有限公司); 离子钙结合衔接分子 1 (IBA-1) 抗体 (成都正能生物技术有限公司); p-STAT6 抗体 (磷酸化位点: Y641, 南京川博生物技术有限公司)。p-STAT1 抗体 (磷酸化位点: Y701)、STAT1、STAT6 抗体 (武汉赛维尔生物技术有限公司); 肿瘤坏死因子 α (TNF- α) ELISA 试剂盒 (货号: KE20018, 美国 Proteintech 公司); 白细胞介素 (IL) -6、IL-4、IL-10 ELISA 试剂盒 (批号: YJ102828、YJ102825、YJ002813, 上海源桔生物科技有限公司)。

1.3 仪器

NW10LVF 型超纯水系统 (力康生物医疗科技控股集团); 800TS 型酶标仪 (美国 Bio-Tek 公

司); SH01D 型高速离心机(上海知信实验仪器技术有限公司); 电泳仪和转膜仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 网络药理学

2.1.1 GSM 活性成分和靶点的筛选 在中国知网和万方数据库中搜集 GSM 的化学成分信息, 并使用中药系统药理学分析平台(TCMSP)(<http://tcmsp.com/tcmssp.php>)进行筛选, 其标准是生物利用度(OB) $\geq 20\%$, 类药性(DL) ≥ 0.09 , 同时剔除了没有靶点、过于繁杂(如结构复杂且数据库中找不到匹配成分或靶点的化合物)的物质。在 TCMSP 数据库中寻找这些化合物的靶点, 去掉重复的靶点后, 再用 uniprot 数据库(<http://www.uniprot.org/>)对其进行规范处理。

2.1.2 疾病靶点和药物-疾病交集靶点的筛选 以“chronic cerebral hypoperfusion”为关键词在 OMIM (<https://www.omim.org/>)、TTD (<https://db.idrblab.net/ttd/>)、DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>) 和 GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 数据库中检索, 收集疾病靶点。将 GSM 预测的靶点和 CCH 疾病的靶点导入 venny 2.1.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) 获取交集基因。

2.1.3 药物-活性成分-交集基因的网络图构建 采用软件 Cytoscape 进行网络图的构建。将 GSM 的活性成分、靶基因和交集基因创建为 Network 文件和 Tape 文件, 把这些文件导入到 cytoscape 软件中, 以此构筑出可视化的网络图。同时利用“Analyze Network”工具对活性成分进行相关性分析。

2.1.4 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络图制作 利用 STRING 数据库(<http://string-db.org/>)引入交集基因的信息; 同时设定“Homo sapiens”作为目标生物种类并且对最小化相互作用分数进行设置, 其数值应 ≥ 0.400 。接着使用 Cytoscape 处理 STRING 的数据以生成 PPI 关系网状模型。

2.1.5 GO 功能与 KEGG 通路富集分析 将共同的靶点导入 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>)进行 GO 功能和 KEGG 通路的富集分析, 最后使用生物信息学在线工具进行绘图。

2.2 动物实验验证

2.2.1 GSM 醇提物的制备 取 GSM 干燥根, 粉碎, 按 1:5 的比例加入 95% 乙醇, 静置 24 h, 冷凝回流提取 3 次, 每次持续 1 h, 合并收集过滤后的溶液, 旋转蒸发蒸干, 得到浸膏。使用预热的蒸馏水定容, 超声混匀后得 GSM 的醇提物($1 \text{ g 生药} \cdot \text{mL}^{-1}$), 冷藏保存待用^[17-18]。

2.2.2 大鼠 CCH 模型建立和分组 通过双侧颈总动脉永久结扎法(2-VO)制备大鼠 CCH 模型^[19-20]: 麻醉后将大鼠固定在鼠板上, 颈部剃毛, 碘伏消毒。沿颈中段切开约 1.5 cm 的切口, 采用钝性分离显露出双侧颈总动脉进行结扎。假手术组大鼠按相同方法处理, 不结扎。对手术成功的 40 只大鼠进行分组, 根据随机数字表法分为 4 组: 模型组(Model 组), 阳性药组(NBP, $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), GSM 低剂量组(GSM-L, $3.33 \text{ g 生药} \cdot \text{kg}^{-1}$), GSM 高剂量组(GSM-H, $6.66 \text{ g 生药} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组 10 只。同时还设立了一个假手术组(Sham 组, 10 只)。手术后第 3 日开始灌胃相应药物, 按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给药, 持续 28 d。

2.2.3 Zea Longa 评分评价大鼠神经功能 依据 Zea Longa 评级体系执行神经系统损伤评估^[21]。该评级体系的定义如下: 0 分, 无神经功能缺损的大鼠; 1 分, 悬尾时对侧前爪屈曲且不能完全伸展; 2 分, 行走时不能走直线且出现追尾现象; 3 分, 行走时向对侧倾倒; 4 分, 无自主活动或意识丧失。

2.2.4 Morris 水迷宫实验 给药第 23 ~ 27 日, 大鼠进行连续 5 d 的定位航行训练。在此过程中, 观察大鼠在 90 s 内寻找并到达指定平台所花费的时间(即为逃避潜伏期)。定位航行训练后第 2 日, 将平台移除以执行空间探索实验。在这个阶段, 统计大鼠在 90 s 内穿越之前放置平台的位置的次数及停留在平台所在象限的时长。

2.2.5 HE 染色观测大鼠脑组织病理损伤 大鼠麻醉后, 腹主动脉采血, 断头取脑, 每组中 3 只大鼠的脑组织放于 4% 组织固定液中固定 48 h, 然后进行常规的脱水、浸蜡、包埋、切片处理, 最后按照 HE 染色步骤进行操作, 于显微镜下观察。

2.2.6 免疫组化染色检测大鼠脑组织中小胶质细胞标志物 IBA-1 石蜡切片经过处理, 孵育相关抗体, 二氨基联苯胺(DAB)和苏木精染色后于显微镜下观察。IBA-1 显出的阳性细胞表达为棕黄色, Image pro plus 计数每张图像阳性细胞数。

2.2.7 ELISA 法检测 M1 型促炎因子和 M2 型抑炎因子水平 利用 ELISA 方法分析大鼠血清中促炎因子 TNF- α 、IL-6 以及抑炎因子 IL-4、IL-10 的含量, 严格按照相关试剂盒说明书操作步骤进行。

2.2.8 Western blot 法检测大鼠脑 STAT1/STAT6 相关蛋白表达 将总蛋白经过 SDS-PAGE 凝胶分离后, 移至 PVDF 膜上, 用 5% 的脱脂牛奶进行封闭 1 h。随后在 4℃ 孵育一抗过夜, 然后洗涤。接着在室温下孵育对应的二抗 1 h, 再次洗涤。最后使用发光液进行曝光, 并使用 Image J 软件分析条带。

2.2.9 统计分析 所有的数据都经过 SPSS 26.0 软

件和 GraphPad Prism 8 软件进行处理与解析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对于不同组之间的对比, 采用单因素方差分析 (ANOVA), 同时对是否具有方差齐性进行 LSD 和 Tamhane 验证, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 麻花秦艽的活性成分和靶点

根据 TCMSP 数据库的分析结果, 总结了满足要求的化合物及其相应的靶点。熊果酸和獐芽菜苷是 GSM 的主要成分之一, 并表现出良好的抗炎效果, 所以本文将它们也包含在了这次的研究中, 共得到 18 个活性成分见表 1, 共 233 个药物靶标。

表 1 GSM 的活性成分

Tab 1 Active ingredients in GSM

编号	MOL ID	活性成分	OB/%	DL
M1	MOL000656	落干酸	114.65	0.09
M2	MOL000646	龙胆苦苷	22.98	0.39
M3	MOL000511	熊果酸	16.77	0.75
M4	MOL000357	胡萝卜苷	20.63	0.62
M5	MOL000358	β -谷甾醇	36.91	0.75
M6	MOL000676	邻苯二甲酸二丁酯	64.54	0.13
M7	MOL000006	木犀草素	36.16	0.25
M8	MOL004560	山柰苷	117.77	0.10
M9	MOL000098	槲皮素	46.43	0.28
M10	MOL002322	异牡荆素	31.29	0.72
M11	MOL000449	豆甾醇	43.83	0.76
M12	MOL000263	齐墩果酸	29.02	0.76
M13	MOL000422	山柰酚	41.88	0.24
M14	MOL010590	苦参酮	29.23	0.64
M15	MOL000498	异荭草素	23.3	0.76
M16	MOL000650	獐芽菜苷	4.96	0.38
M17	MOL002083	苜蓿素	27.86	0.34
M18	MOL004101	草木犀苷	36.85	0.26

3.2 疾病靶点和药物-疾病的交集靶点

在 OMIM、TTD、DisGeNET 和 GeneCards 四大数据库中进行搜索, 剔除重复靶点后, 共获得 1424 个疾病靶标。采用 Venny 2.1.0 制作韦恩图, 获得 143 个共同靶点。

3.3 药物-活性成分-交集基因网络图

通过 Cytoscape 软件构建可视化的药物-活性成分-交集基因网络图 (见图 1)。该成分在疾病中的影响力与其 Degree 值的大小密切相关, Degree 值越高, 说明该成分对疾病的疗效越好。齐墩果酸、龙胆苦苷、槲皮素、邻苯二甲酸二丁酯、落干酸可能为 GSM 抗 CCH 的主要活性成分 (见表 2)。

3.4 药物-疾病交集靶点的 PPI 网络图

在 PPI 网络图中, 共有 143 个节点, 3491 条边,

表 2 GSM 活性成分的网络拓扑学分析结果

Tab 2 Network topology analysis of GSM active ingredients

编号	活性成分	介数中心性	接近中心性
M12	齐墩果酸	0.6094	0.6053
M2	龙胆苦苷	0.1999	0.4282
M9	槲皮素	0.1356	0.4259
M6	邻苯二甲酸二丁酯	0.0817	0.4107
M1	落干酸	0.0753	0.3833
M15	异荭草素	0.0670	0.3710
M17	苜蓿素	0.0498	0.3676
M18	草木犀苷	0.0259	0.3659
M14	苦参酮	0.0168	0.3594
M11	豆甾醇	0.0018	0.3546
M7	木犀草素	0.0065	0.3531
M5	β -谷甾醇	0.0010	0.3531
M16	獐芽菜苷	0.0051	0.3515
M10	异牡荆素	0.0002	0.3500
M4	胡萝卜苷	0.0010	0.3500
M8	山柰苷	0.0062	0.3485
M3	熊果酸	0.0019	0.3485
M13	山柰酚	0.0062	0.3485

包括如 STAT1、IL-6、IL-10、IL-4、STAT3 等可能对 GSM 治疗 CCH 有重大影响的关键靶蛋白 (见图 2)。

3.5 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析

GO 功能富集分析得到了 166 种生物过程 (BP)、94 种细胞构成 (CC) 以及 140 种分子功能 (MF), 并对其中的前 20 名进行了可视化 (见图 3A)。KEGG 通路富集主要涉及 JAK-STAT、TNF 等信号通路, 并将其中的前 20 项进行了可视化 (见图 3B)。

3.6 GSM 改善 CCH 大鼠神经功能缺损和认知障碍

采用 Zea Longa 评分法评价大鼠神经功能, 结果见图 4。与 Sham 组相比较, Model 组神经功能评分明显升高 ($P < 0.01$), 与 Model 组相比, GSM 组神经功能评分明显降低 ($P < 0.01$)。进一步用 Morris 水迷宫测试评估 CCH 大鼠的空间学习能力和记忆缺陷情况, 结果见图 5。与 Sham 组比较, Model 组逃避潜伏期明显延长 ($P < 0.01$), 与 Model 组比较, 而 GSM-L 和 GSM-H 组逃避潜伏期缩短 ($P < 0.01$)。与 Sham 组相比, Model 组穿过移除平台区域的频率较低 ($P < 0.01$), 待在平台象限的时间减少 ($P < 0.01$), 与 Model 组比较, GSM-L 和 GSM-H 组穿过移除平台区域的频率增高 ($P < 0.01$), 处于平台象限的时间也显著延长 ($P < 0.01$)。

3.7 GSM 改善 CCH 大鼠脑病理损伤

如图 6A 所示, Sham 组的大鼠大脑组织的细胞呈现出紧密的排列, 其细胞形态保持完好并具有明确的边界线, 同时细胞核较大并且形状饱满, 核仁也相对明显; 然而, Model 组中的细胞则表现出了明显的变化, 包括细胞数减少, 细胞排列散乱, 细胞变性, 胞质消失, 细胞核不规则

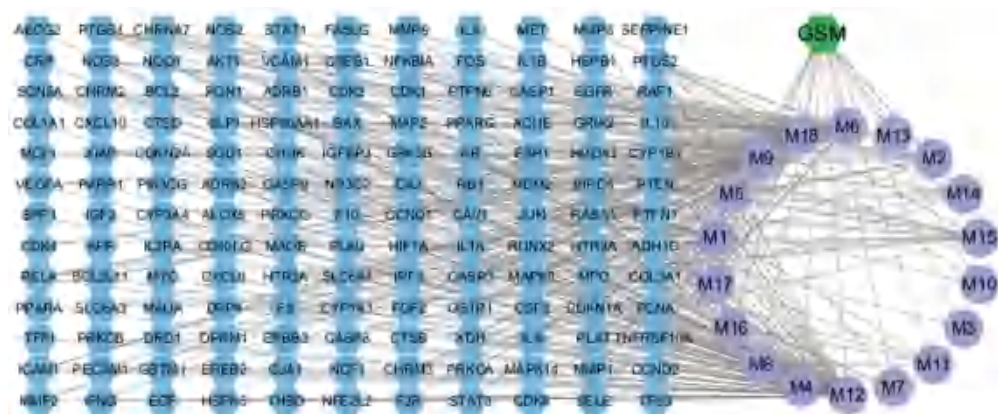


图 1 药物-活性成分-交集基因网络图
Fig 1 Drug-active ingredient-intersecting gene network map

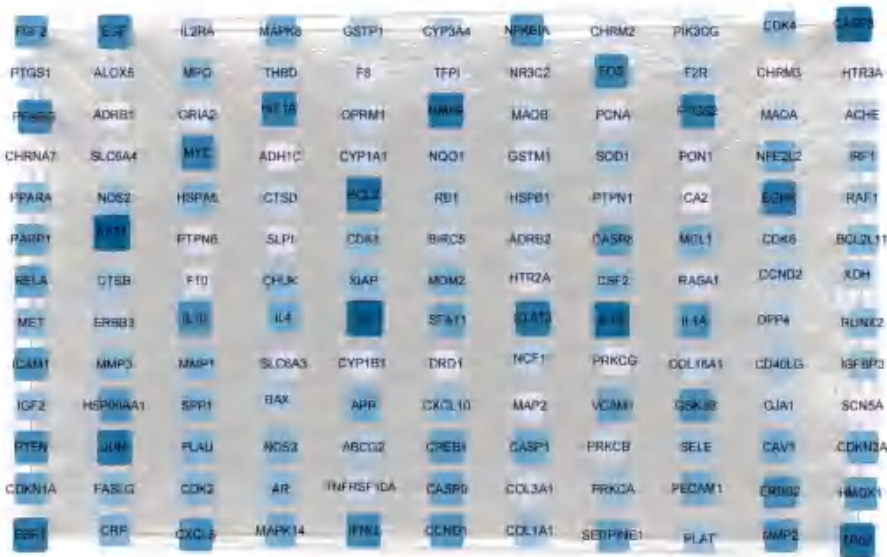


图 2 药物-疾病交集靶点的 PPI 网络图
Fig 2 PPI network map of drug-disease intersection targets

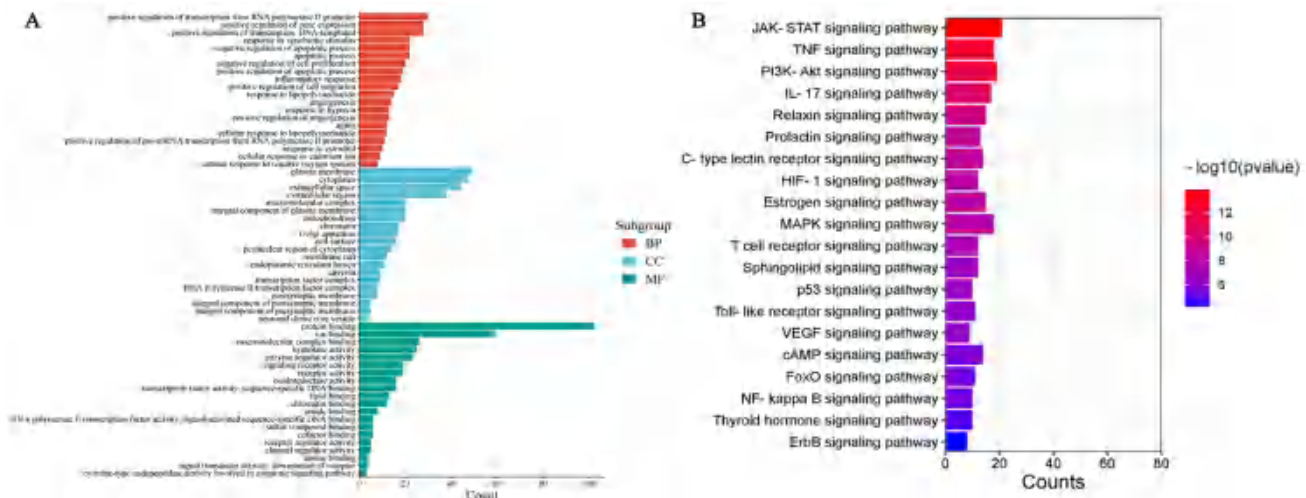


图 3 GO 功能富集 (A) 和 KEGG 通路富集 (B) 分析图
Fig 3 GO functional enrichment (A) and KEGG pathway enrichment (B)

且固缩深染；与 Model 组比较，GSM 能显著改善此损伤，如细胞数相对增多，细胞排列较为整齐，细胞核不规则且固缩深染的变性细胞减少。

3.8 GSM 抑制 CCH 大鼠 M1 型极化，促进 M2 型极化
结果显示（见图 6B），与 Sham 组比较，Model

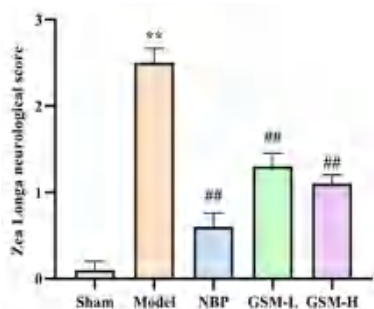


图 4 GSM 对 CCH 大鼠神经功能的影响

Fig 4 Effect of GSM on the neurologic function in CCH rats

 注: 与 Sham 组比较, ** $P < 0.01$; 与 Model 组比较, ## $P < 0.01$ 。

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

组的 IBA-1 阳性细胞数量显著增加 ($P < 0.01$), 与 Model 组比较, GSM IBA-1 阳性细胞数量明显减少 ($P < 0.05$)。为了深入了解这一现象, 本文使用 ELISA 方法对 M1 型炎症因子及 M2 型抗炎因子的浓度进行了测定 (见图 7)。对比 Sham 组, Model 组中的 TNF- α 和 IL-6 含量明显上升 ($P < 0.01$), 同时 IL-4 和 IL-10 的量也大幅下降 ($P < 0.01$)。与 Model 组比较, GSM-L 和 GSM-H 能够有效地减缓 TNF- α 和 IL-6 的增长 ($P < 0.01$), 并提升 IL-4 和 IL-10 的水平 ($P < 0.01$)。以上数据表明, CCH 会造成 M1 型极化, 而 GSM 给药后减少小胶质细胞活化和 M1 型极化, 增加 M2 型极化。

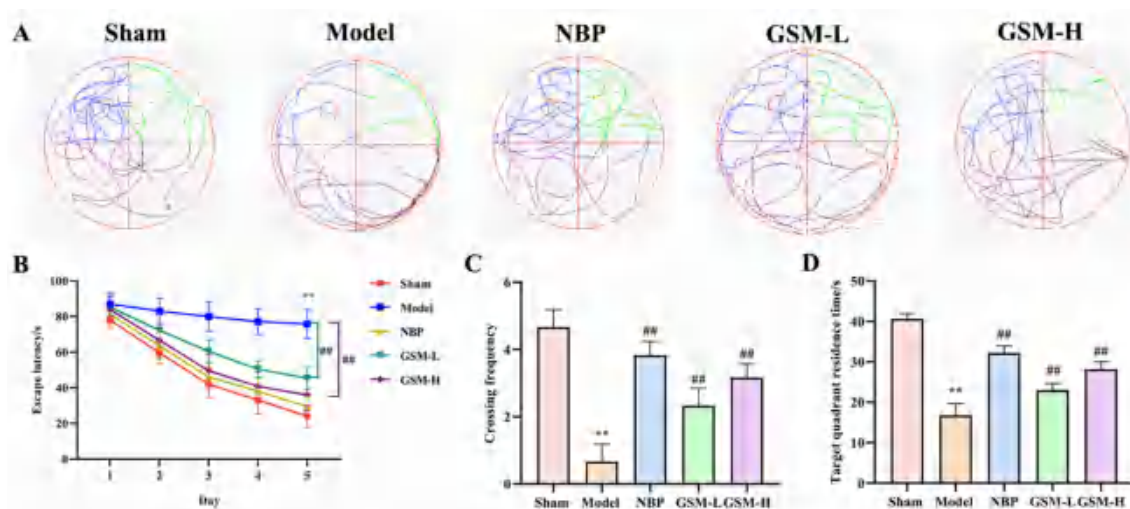


图 5 GSM 对 CCH 大鼠认知障碍的影响

Fig 5 Effect of GSM on the cognitive impairment in CCH rats

 注: A. 水迷宫中空间探测实验轨迹图。与 Sham 组比较, ** $P < 0.01$; 与 Model 组比较, ## $P < 0.01$ 。

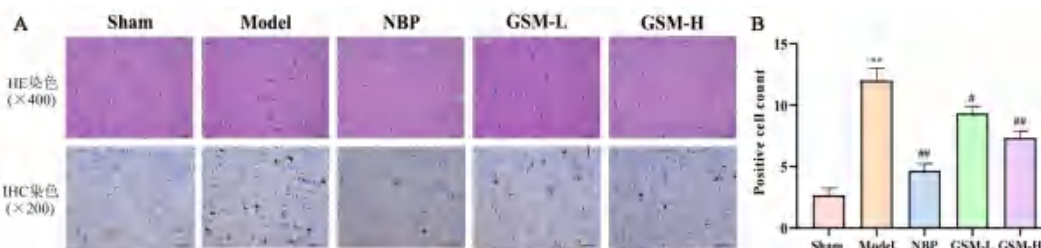
 Note: A. Trajectory map of a space probe experiment in a water maze. Compared with the Sham group, ** $P < 0.01$; compared with the Model group, ## $P < 0.01$.


图 6 GSM 对 CCH 大鼠脑组织病理损伤的影响

Fig 6 Effect of GSM on the pathological injury of brain tissue in CCH rats

 注: 与 Sham 组比较, ** $P < 0.01$; 与 Model 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

 Note: Compared with the Sham group, ** $P < 0.01$; compared with the Model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

3.9 GSM 对 CCH 大鼠 STAT1/STAT6 相关蛋白的影响

与 Sham 组比较, Model 组 p-STAT1/STAT1, p-STAT6/STAT6 表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 Model 组相比, GSM 干预后可显著降低 p-STAT1/STAT1 表达 ($P < 0.01$), 显著增加 p-STAT6/STAT6

表达 ($P < 0.01$)。GSM-H 组效果更佳, 见图 8。

4 讨论

小胶质细胞介导的炎症反应是缺血性脑卒中等炎症性疾病中的一种重要病理机制^[22]。缺血性卒中的临床研究表明, 在缺血性卒中的急性、亚急性和慢性阶段可以检测到小胶质细胞活化^[23]。

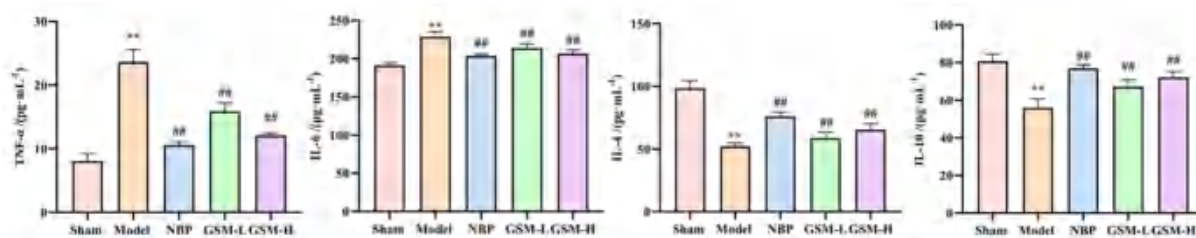


图 7 GSM 对 CCH 大鼠血清 TNF- α 、IL-6、IL-4、IL-10 水平的影响

Fig 7 Effect of GSM on the serum TNF- α , IL-6, IL-4 and IL-10 levels in CCH rats

注：与 Sham 组比较，** $P < 0.01$ ；与 Model 组比较，## $P < 0.01$ 。

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

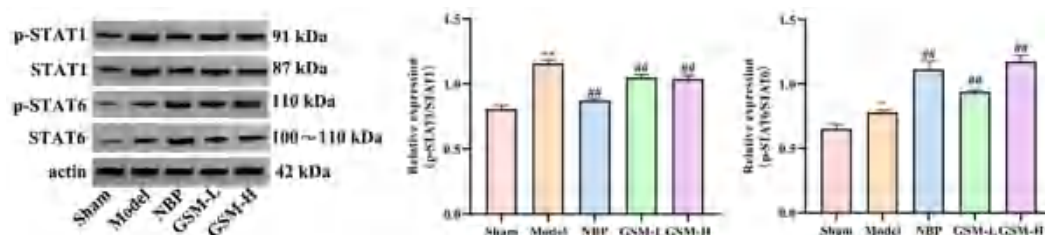


图 8 GSM 对 CCH 大鼠脑组织 STAT1/STAT6 相关蛋白表达的影响

Fig 8 Effect of GSM on the expression of STAT1/STAT6-related proteins in the brain tissues of CCH rats

注：与 Sham 组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与 Model 组比较，## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the Sham group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with the Model group, ## $P < 0.01$.

小胶质细胞形态和功能变化与缺血后危险信号的释放有关。当缺血后损伤相关分子模式过度激活时，它们可以加重炎症和脑损伤。小胶质细胞的可修饰和适应性也可能有利于脑修复，而不仅仅是导致损伤^[24-25]。

GSM 临床上常用于心脑血管等疾病的治疗。有研究表明，GSM 通过清除氧自由基和调节能量代谢对缺氧大鼠肺和脑组织提供保护作用^[17]；通过调控 Bcl-2/BAX/Caspase3 信号通路减少心肌缺血再灌注后细胞凋亡^[15]。然而，GSM 对 CCH 的作用机制尚不完全清楚。在本研究中，首先利用网络药理学分析方法，对 GSM 抗 CCH 的药理作用靶点及相关通路进行了深入的研究，发现 GSM 治疗 CCH 的主要靶点为 STAT1、IL-6、IL-1B、STAT3、IL-10、IL-4、NF- κ B1A、AKT1、BCL2 等，这些靶点主要与炎症反应、凋亡和增殖相关。GO 和 KEGG 富集分析显示，其抗 CCH 作用关键依赖于 JAK-STAT、TNF 等通路。通过分析预测的靶点和通路，推测 GSM 可能通过调控 STAT1/STAT6 改善炎症反应而发挥抗 CCH 的治疗作用。进一步的研究结果表明，GSM 能明显改善 CCH 大鼠的神经功能缺损和病理损伤，改善认知障碍。这些结果表明 GSM 可以有效地减轻 CCH 相关损伤并提供神经保护作用。

小胶质细胞作为中枢神经系统内的常驻巨噬细胞，代表缺血损伤的初始应答者之一，并在缺血后的神经炎症过程中发挥关键作用。因此，本

文通过寻找小胶质细胞生物标志物 IBA-1 来评估巨噬细胞浸润。结果观察到 GSM 显著减少 CCH 大鼠的小胶质细胞活化。此外，本文还对小胶质细胞 M1/M2 型因子进行检测来评估 GSM 对小胶质细胞极化的影响。结果发现，GSM 降低 M1 型极化因子 TNF- α 和 IL-6 水平，升高 M2 型极化因子 IL-4 和 IL-10 水平。小胶质细胞激活加重损伤的主要机制就是通过激活促炎因子如 TNF- α 和 IL-6 等^[26-27]，促进神经细胞凋亡加重损伤。IL-4 可以驱动小胶质细胞极化到 M2 型。IL-10 由小胶质细胞和巨噬细胞分泌，可增强单核细胞的吞噬作用。综上所述，GSM 可以抑制小胶质细胞 M1 型极化，促进 M2 型极化，进而改善大鼠 CCH 炎性损伤。

转录抑制因子 (STAT) 家族在细胞因子和免疫调节中具有重要作用。STAT 家族的一些关键组分，如 STAT1 与 STAT6 等，都对小胶质细胞的形态转变产生影响^[28-29]。比如，当受到干扰素- γ (IFN- γ) 的影响时，STAT1 会增强其 M1 型极化，而在塑造由 IL-13 及 IL-4 引发的 M2 型极化过程中，STAT6 起到了至关重要的作用。在本研究中，Sham 组小胶质细胞处于静息状态，STAT1/STAT6 相关蛋白表达较低，处于微平衡状态。CCH 大鼠中激活的小胶质细胞不仅产生促炎因子，加重脑损伤，还会分泌一些抑炎因子等启动脑损伤的修复过程，故 STAT1/STAT6 相关蛋白表达均上调。GSM 干预改善脑损伤，发挥脑保护作用，STAT6

相关蛋白表达上调, STAT1 相关蛋白表达下调。综上, 提示 GSM 可能通过调控 STAT1/STAT6 表达, 抑制 M1 极化, 促进 M2 极化。

总而言之, 本研究表明 GSM 治疗有效减轻了 CCH 大鼠的大脑病理损伤和神经元损伤, 并改善了神经功能缺损和认知障碍。GSM 通过调整 STAT1/STAT6 的表达水平, 阻止小胶质细胞的活化和 M1 型极化, 同时推动 M2 型极化, 从而有效地抑制炎症反应。这些发现表明 GSM 在治疗 CCH 中具有一定的潜力。

参考文献

- [1] Fu PJ, Chen YH, Wu MX, et al. Effect of ferroptosis on chronic cerebral hypoperfusion in vascular dementia [J]. *Exp Neurol*, 2023, 370: 114538.
- [2] 郭羽晨. 虎杖清脉饮改善慢性脑缺血小鼠认知功能障碍的作用研究[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2023.
- [3] 常亚娟, 黄树明, 吴丹, 等. 小檗碱对慢性低灌注脑损伤小鼠神经保护作用的机制研究[J]. *现代生物医学进展*, 2024, 24(10): 1843-1847.
- [4] 项丽玲, 李艳, 曹利华, 等. 基于临床病症特点的慢性脑缺血动物模型分析[J]. *中药新药与临床药理*, 2021, 32(1): 93-98.
- [5] Enzmann G, Kargaran S, Engelhardt B. Ischemia-reperfusion injury in stroke: impact of the brain barriers and brain immune privilege on neutrophil function [J]. *Ther Adv Neurol Disord*, 2018, 11: 1756286418794184.
- [6] Macrez R, Ali C, Toutirais O, et al. Stroke and the immune system: from pathophysiology to new therapeutic strategies [J]. *Lancet Neurol*, 2011, 10(5): 471-480.
- [7] Wu LQ, Xiong XX, Wu XM, et al. Targeting oxidative stress and inflammation to prevent ischemia-reperfusion injury [J]. *Front Mol Neurosci*, 2020, 13: 28.
- [8] 李润泽, 陈思宇, 王宏, 等. 补阳还五汤联合丁苯酞治疗气虚血瘀型慢性脑缺血的临床观察[J]. *云南中医中药杂志*, 2024, 45(4): 72-77.
- [9] Yu ZN, Su GJ, Zhang LM, et al. Icaritin inhibits neuroinflammation in a rat cerebral ischemia model by regulating microglial polarization through the GPER-ERK-NF- κ B signaling pathway [J]. *Mol Med*, 2022, 28(1): 142.
- [10] Zhong Y, Gu LJ, Ye YZ, et al. JAK2/STAT3 axis intermediates microglia/macrophage polarization during cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Neuroscience*, 2022, 496: 119-128.
- [11] 赵耀, 付剑亮. 慢性脑低灌注致认知障碍的神经炎症机制[J]. *医学综述*, 2021, 27(2): 220-225.
- [12] Yan N, Xu ZP, Qu CH, et al. Dimethyl fumarate improves cognitive deficits in chronic cerebral hypoperfusion rats by alleviating inflammation, oxidative stress, and ferroptosis via NRF2/ARE/NF- κ B signal pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 98: 107844.
- [13] 陈利佳, 倪蕾, 赫英龙, 等. 炎症反应在慢性脑缺血脑损伤中的作用机制[J]. *中国老年学杂志*, 2024, 44(18): 4604-4607.
- [14] 吴晓军, 李桂新, 徐雅, 等. 麻花秦艽醇提物对高原缺氧大鼠心肌组织的保护作用[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(7): 3383-3388.
- [15] 刘杜霞, 姜一, 孔秀梅, 等. 麻花秦艽乙酸乙酯部位对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡的影响[J]. *中药药理与临床*, 2022, 38(4): 107-112.
- [16] 聂安政, 林志健, 王雨, 等. 秦艽化学成分及药理作用研究进展[J]. *中草药*, 2017, 48(3): 597-608.
- [17] 吴晓军, 李桂新, 徐雅, 等. 麻花秦艽醇提物对高原低氧大鼠肺组织和脑组织的保护作用[J]. *中药药理与临床*, 2019, 35(3): 77-82.
- [18] 赵勤, 王乐乐, 魏立鹏, 等. 麻花秦艽醇提物对佐剂性关节炎大鼠的影响[J]. *中药药理与临床*, 2015, 31(1): 145-147.
- [19] Xu LL, Qu CH, Liu Y, et al. The environmental enrichment ameliorates chronic cerebral hypoperfusion-induced cognitive impairment by activating autophagy signaling pathway and improving synaptic function in hippocampus [J]. *Brain Res Bull*, 2023, 204: 110798.
- [20] Severiano DLR, Oliveira-lima OC, Vasconcelos GA, et al. Cerebral lipid dynamics in chronic cerebral hypoperfusion model by DESI-MS imaging [J]. *Neuroscience*, 2020, 426: 1-12.
- [21] 严澎, 杨斌, 李文波, 等. 促红细胞生成素对慢性脑缺血大鼠脑组织促凋亡相关蛋白表达水平的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2020, 18(18): 2986-2990.
- [22] Rajeev V, Chai YL, Poh L, et al. Chronic cerebral hypoperfusion: a critical feature in unravelling the etiology of vascular cognitive impairment [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2023, 11(1): 93.
- [23] Xu X, Gao WW, Li L, et al. Annexin A1 protects against cerebral ischemia-reperfusion injury by modulating microglia/macrophage polarization via FPR2/ALX-dependent AMPK-mTOR pathway [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 119.
- [24] Xiong X, Liu L, Yang QW. Functions and mechanisms of microglia/macrophages in neuroinflammation and neurogenesis after stroke [J]. *Prog Neurobiol*, 2016, 142: 23-44.
- [25] Cai QY, Zhao CY, Xu YY, et al. Qingda granule alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting TLR4/NF- κ B/NLRP3 signaling in microglia [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 324: 117712.
- [26] 刘宗梅, 王晓玲, 宋发萍, 等. 基于 NF- κ B 通路研究平肝活血合剂对脑缺血再灌注损伤的作用机制[J]. *中南药学*, 2024, 22(4): 902-907.
- [27] 王绍展, 朱青霞, 陈井霞, 等. 异欧前胡素通过 NF- κ B 和 JAK1/STAT1 信号通路抑制巨噬细胞 M1 极化发挥抗炎镇痛作用[J]. *中南药学*, 2023, 21(8): 1985-1990.
- [28] Huang Z, Xin JP, Coleman J, et al. IFN-gamma suppresses STAT6 phosphorylation by inhibiting its recruitment to the IL-4 receptor [J]. *J Immunol*, 2005, 174(3): 1332-1337.
- [29] Deszo EL, Brake DK, Kelley KW, et al. IL-4-dependent CD86 expression requires JAK/STAT6 activation and is negatively regulated by PKCdelta [J]. *Cell Signal*, 2004, 16(2): 271-280.

(收稿日期: 2024-11-26; 修回日期: 2025-01-15)

山茱萸炮制前后及其配伍入六味地黄汤中 5 种有效成分的含量变化研究

龙群赓¹, 黄雍¹, 王璐¹, 朱茜茜¹, 谭佳颖², 黄莉¹, 肖望重¹, 戴冰^{1*} (1. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410000; 2. 湖南中医药大学, 长沙 410208)

摘要:目的 探讨山茱萸炮制前后及其配伍入六味地黄汤后水煎液中 5 种有效成分的变化规律。**方法** 取山茱萸及其炮制品(酒制山茱萸、盐制山茱萸、清制山茱萸), 分别配伍入六味地黄汤制得六味地黄汤山茱萸[六(生)]、六味地黄汤酒制山茱萸[六(酒)]、六味地黄汤盐制山茱萸[六(盐)]、六味地黄汤清制山茱萸[六(清)]; 采用 HPLC 法测定上述各药物水煎液中 5 种有效成分[没食子酸、5-羟甲基糠醛(5-HMF)、环烯醚萜苷类(莫诺苷、马钱苷、獐芽菜苷)]的含量, 并通过 SPSS、Origin 软件进行数据分析处理。**结果** 山茱萸炮制前后及其配伍入方六味地黄汤后水煎液中均含有: 没食子酸、5-HMF、莫诺苷、马钱苷、獐芽菜苷, 与山茱萸比较, 各炮制品中没食子酸、5-HMF 含量均升高, 莫诺苷、马钱苷含量均降低($P < 0.05$), 5 种有效成分总量以酒制山茱萸最高; 配伍入方后, 与六(生)组比, 六(酒)组、六(盐)组、六(清)组的水煎液中没食子酸、5-HMF、马钱苷成分含量均升高。**结论** 中药饮片的炮制及配伍可以明显改变有效成分的含量, 山茱萸炮制及其配伍入六味地黄汤后没食子酸、5-HMF 含量均呈逐渐上升趋势, 莫诺苷、马钱苷含量均呈逐渐下降趋势; 可为山茱萸炮制品成分变化规律及临床选择合适的山茱萸炮制品配伍入六味地黄汤研究提供参考。

关键词: 山茱萸; 炮制; 配伍; 六味地黄汤; 有效成分

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)05-1248-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.012

Content changes of 5 active ingredients in *Cornus officinalis* before and after the processing and their compatibility in Liuwei Dihuang decoction

LONG Qun-geng¹, HUANG Yong¹, WANG Lu¹, ZHU Xi-xi¹, TAN Jia-ying², HUANG Li¹, XIAO Wang-zhong¹, DAI Bing^{1*} (1. *The First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410000*; 2. *Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208*)

Abstract: Objective To determine the 5 active ingredients in the aqueous decoction of *Cornus officinalis* before and after the processing and their compatibility in Liuwei Dihuang decoction. **Methods** *Cornus officinalis* and its processed derivatives (wine-processed, salt-processed, and water-processed) were respectively compatibility into Liuwei Dihuang decoction, yielding four variants: Liuwei Dihuang decoction with raw *Cornus officinalis*, Liuwei Dihuang decoction with wine-processed *Cornus officinalis*, Liuwei Dihuang decoction with salt-processed *Cornus officinalis*, and Liuwei Dihuang decoction with water-processed *Cornus officinalis*. High-performance liquid chromatography (HPLC) was employed to quantify the contents of 5 active ingredients, namely gallic acid, 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), and iridoid glycosides (morroneiside, loganin, and sweroside). The data were analyzed using SPSS and Origin software. **Results** All the water decoctions of *Cornus officinalis* before and after the processing and after its compatibility into Liuwei Dihuang decoction contained 5 ingredients: gallic acid, 5-HMF, morroneiside, loganin, and sweroside. Compared with the

基金项目: 湖南省教育厅科学研究项目 (No.23C0180)。

作者简介: 龙群赓, 男, 在读硕士研究生, 主要从事临床中药研究, email: longqungeng@icloud.com * 通信作者: 戴冰, 女, 教授, 博士研究生导师, 主要从事临床中药研究, email: 1092341361@qq.com

Cornus officinalis, the content of gallic acid and 5-HMF all increased in the wine-processed *Cornus officinalis*, salt-processed *Cornus officinalis* and water-processed *Cornus officinalis*, while the content of morroniside and loganin decreased. Among them, the total content of the 5 ingredients was the highest in the wine-processed *Cornus officinalis*. After compatibility into Liuwei Dihuang decoction, compared with the decoction with raw *Cornus officinalis*, the contents of gallic acid, 5-HMF and loganin all increased in decoction with wine-processed, salt-processed and water-processed *Cornus officinalis*. **Conclusion** The processing and compatibility of traditional Chinese medicine decoction pieces can obviously change the content of effective components. After the processing of *Cornus officinalis* and its compatibility into Liuwei Dihuang decoction, the content of gallic acid and 5-HMF increases, while that of morroniside and loganin gradually decreases, which provides a reference for clarifying the patterns of components in processed *Cornus officinalis* and the clinical selection of appropriately processed *Cornus officinalis* for compatibility into Liuwei Dihuang decoction.

Key words: *Cornus officinalis*; processing; compatibility; Liuwei Dihuang decoction; effective component

山茱萸来源于山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟的果肉, 味酸、涩, 微温, 主归肝肾经, 具有补益肝肾、收涩固脱的功效^[1]。研究发现山茱萸中主要含有没食子酸、莫诺苷、马钱苷、獐芽菜苷(环烯醚萜苷类)等成分^[2-3], 其中没食子酸具有抗肝损伤、抗氧化等作用, 莫诺苷、马钱苷、獐芽菜苷具有保护肝脏、抗糖尿病肾病等作用, 上述成分可能与其发挥补益肝肾功效有关^[4-8]。

山茱萸临床应用以炮制品酒制山茱萸、盐制山茱萸、清制山茱萸为多^[9], 这可能与传统中医理论中山茱萸酒制后滋补作用增强, 盐制后引药入肾, 清蒸后则补肾涩精力胜相关^[10]。山茱萸因其补益肝肾功效常配伍入补益代表方六味地黄汤^[11], 该方由熟地黄、山茱萸、山药、茯苓、牡丹皮、泽泻六味药组成, 方中臣药山茱萸与君药熟地黄配伍共奏“三阴并补”之功, 是该方发挥滋阴补肾功效不可或缺方组之一。然历年来关于六味地黄汤中山茱萸炮制品的选择各有不同, 如最早起源于宋代钱乙《小儿药证直诀》中的六味地黄汤以山茱萸配伍入方; 1977—2005 年共计 6 版《中国药典》中均以制山茱萸配伍入方, 但并未明确具体炮制品, 而制山茱萸又多见于酒制、盐制及清蒸等, 2010—2020 年共计 3 版《中国药典》中均以酒制山茱萸配伍入方六味地黄汤, 但究竟山茱萸以何品种入六味地黄汤? 山茱萸炮制及其配伍入六味地黄汤后有效成分如何变化? 尚缺乏一定的实验依据。

基于此, 本实验以山茱萸及其经典方六味地黄汤为研究对象, 在课题组前期山茱萸炮制工艺研究

基础上, 将山茱萸按酒制、盐制、清蒸法分别制得酒制山茱萸、盐制山茱萸及清制山茱萸^[12-18], 并分别配伍入六味地黄汤[后文分别简称六(生)、六(酒)、六(盐)及六(清)], 按照传统煎药法制备得水煎液, 建立 HPLC 法测定上述各水煎液中 5 种有效成分[没食子酸、5-羟甲基糠醛(5-HMF)、环烯醚萜苷类(莫诺苷、马钱苷、獐芽菜苷)]的含量, 研究山茱萸炮制前后及其配伍入六味地黄汤后 5 种成分的变化规律, 探讨炮制、配伍其他不同药材对山茱萸中各有效成分的影响, 旨在为山茱萸炮制品成分变化规律研究提供一定的实验依据, 也为临床选择合适的山茱萸炮制品配伍入六味地黄汤提供参考。

1 材料

1.1 仪器

安捷伦 1260 infinity II 型四元高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司); Kromasil 100-5-C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)(荷兰 Akzo Nobel 公司); LC-85DL 隔膜真空泵(上海力辰邦西仪器科技有限公司); SK5200H 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司); AUW220D 电子分析天平、电子分析 AUX220 天平(岛津公司); RE-2000A 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); TG16-WS 高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); DL-1 实验电炉(北京市永光明医疗仪器有限公司)。

1.2 材料

对照品没食子酸(批号: 110831-201906, 纯度: 91.5%)、5-HMF(批号: 111626-201610, 纯度: 99.8%)、莫诺苷(批号: 111998-202205, 纯度: 98.4%)、马钱苷(批号: 111640-201808, 纯

度: 99.0%)、獐芽菜苷(批号: 111742-200501, 浓度 $\geq 98\%$)(中国食品药品检定研究院); 色谱纯甲醇(默克股份两合公司); 色谱醇乙腈(霍尼韦尔贸易有限公司); 磷酸(国药集团化学试剂有限公司); 黄酒(浙江古越龙山绍兴酒股份有限公司)。熟地黄、山茱萸、山药、泽泻、牡丹皮、茯苓饮片均购自湖南春可回中药饮片有限公司, 经湖南中医药大学第一附属医院王璐主管药师鉴定均为正品, 均符合 2020 年版《中国药典》规定, 酒制山茱萸、盐制山茱萸、清制山茱萸均自制。

2 方法

2.1 山茱萸炮制品的制备

2.1.1 酒制山茱萸的制备 取洗净后的山茱萸生品适量, 置于 1000 mL 烧杯中, 按 30% 的药辅比加入 16% 的黄酒, 混合均匀, 密封, 室温下闷润

30 min 至黄酒吸收完全, 置蒸制容器内, 隔水蒸制 360 min, 蒸制完成后, 取出阴干, 即得酒制山茱萸样品(见图 1)。

2.1.2 盐制山茱萸的制备 取洗净后的山茱萸生品适量, 置于 1000 mL 烧杯中, 按 2% 的药辅比加入 14% 的食盐水, 混合均匀, 密封, 室温下闷润 360 min 至食盐水被吸收完全, 置蒸制容器内, 隔水蒸制 73 min, 蒸制完成后, 取出阴干, 即得盐制山茱萸样品(见图 1)。

2.1.3 清制山茱萸的制备 取洗净后的山茱萸生品适量, 置于 1000 mL 烧杯中, 按 28% 的药辅比加入蒸馏水, 混合均匀, 密封, 室温下闷润 167 min 置蒸馏水被吸收完全, 置蒸制容器内, 隔水蒸制 262 min, 蒸制完成后, 取出阴干, 即得清蒸制茱萸(见图 1)。

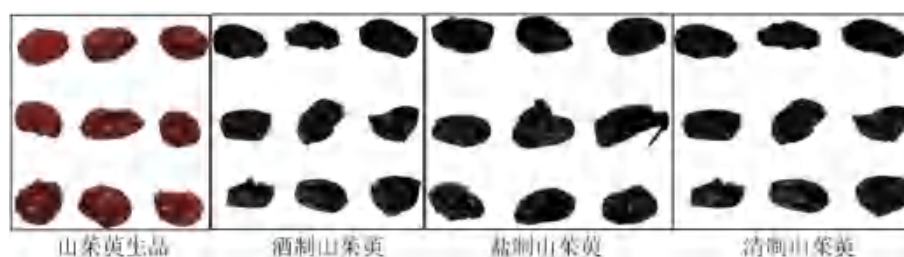


图 1 山茱萸、酒制山茱萸、盐制山茱萸及清制山茱萸药材图

Fig 1 *Cornus officinalis*, wine-processed *Cornus officinalis*, salt-processed *Cornus officinalis*, and water-processed *Cornus officinalis*

2.2 山茱萸炮制前后及其配伍入六味地黄汤水煎液的制备

2.2.1 山茱萸、酒制山茱萸、盐制山茱萸、清蒸制山茱萸水煎液的制备 分别称取山茱萸生品、酒制山茱萸、盐制山茱萸、清制山茱萸各 12 g, 分别置于煎药锅中, 加入 10 倍量水浸泡 30 min, 武火煮沸后, 改文火煎煮 30 min, 趁热用纱布过滤, 重复煎煮两次, 合并两次滤液, 滤液经旋转蒸发仪浓缩定容, 置于 50 mL 量瓶中, 摇匀, 即得山茱萸、酒制山茱萸、盐制山茱萸及清茱萸的水煎液。

2.2.2 六(生)、六(酒)、六(盐)及六(清)水煎液的制备 按比例称取六味地黄汤各味药材饮片: 熟地黄 24 g, 山茱萸或酒制山茱萸或盐制山茱萸或清制山茱萸 12 g, 山药 12 g, 泽泻 9 g, 茯苓 9 g, 牡丹皮 9 g 于煎药锅中, 分别加入 10 倍量水浸泡 30 min, 武火煮沸, 后改文火煎煮 30 min, 趁热用纱布过滤, 重复煎煮两次, 合并滤液经旋转蒸发仪浓缩定容置于 50 mL 量瓶中, 摇匀, 分别得六(生)、六(酒)、六(盐)及六(清)水煎液。

2.3 色谱条件

色谱柱: Kromasil 100-5-C18 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈(A)-0.05% 磷酸水溶液(B), 柱温: 30 $^{\circ}$ C, 流速: 1 mL $\cdot$ min $^{-1}$, 进样量: 10 μ L, 梯度洗脱(0~7 min, 2%~8%A; 7~15 min, 8%~10%A; 15~20 min, 10%~16.5%A; 20~24 min, 16.5%~17.3%A; 24~27 min, 17.3%~17.6%A; 27~29 min, 17.6%~17.8%A; 29~35 min, 17.8%~18.0%A; 35~45 min, 18%~27%A; 45~80 min, 27%~29%A), DAD 检测器: 检测波长 240 nm (莫诺苷、马钱苷、獐芽菜苷), 274 nm (没食子酸、5-HMF)。色谱图见图 2。

2.4 混合对照品溶液的制备

精密称取没食子酸、5-HMF、莫诺苷、马钱苷、獐芽菜苷对照品适量, 加 80% 的甲醇定容至 25 mL, 得混合对照品母液。精密吸取上述母液 5 mL, 加 80% 甲醇定容置于 50 mL 量瓶中, 制成每 1 mL 含有没食子酸 46.88 μ g、5-HMF 53.71 μ g、莫诺苷 20.76 μ g、马钱苷 36.30 μ g、獐芽菜苷 23.60 μ g 的混合对照品溶液。

2.5 供试品溶液的制备

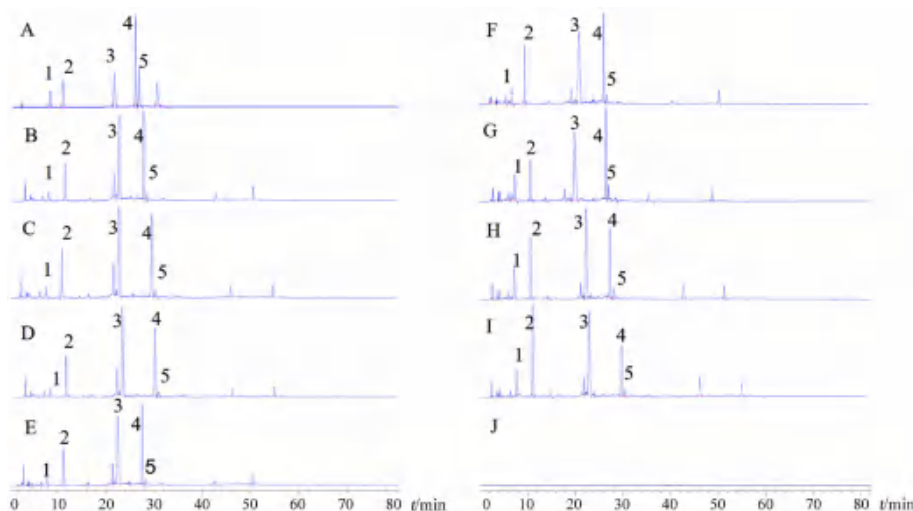


图2 山茱萸炮制前后及其配伍入方六味地黄汤 HPLC 色谱图

Fig 2 HPLC chromatogram of *Cornus officinalis* before and after the processing and its compatibility with Liuwei Dihuang decoction

A. 对照品 (1. 没食子酸、2. 5-HMF、3. 莫诺苷、4. 马钱苷、5. 獐芽菜苷) [control sample (1. gallic acid, 2. 5-hydroxymethylfurfural, 3. morroniside, 4. loganin, and 5. sweroside)]; B. 山茱萸 (*Cornus officinalis*); C. 酒制山茱萸 (wine-processed *Cornus officinalis*); D. 盐制山茱萸 (salt-processed *Cornus officinalis*); E. 清制山茱萸 (water-processed *Cornus officinalis*); F. 六 (生) (Liuwei Dihuang decoction with raw *Cornus officinalis*); G. 六 (酒) (Liuwei Dihuang decoction with wine-processed *Cornus officinalis*); H. 六 (盐) (Liuwei Dihuang decoction with salt-processed *Cornus officinalis*); I. 六 (清) (Liuwei Dihuang decoction with water-processed *Cornus officinalis*); J. 空白溶剂 (blank solvent)

精密吸取“2.2”项下制备得到的山茱萸炮制前后及其配伍入六味地黄汤各水煎液 2 mL, 分别置于 25 mL 量瓶中, 加入 80% 甲醇适量, 超声提取 (220 W, 50 Hz) 30 min, 取出放冷, 用 80% 甲醇定容至 25 mL, 摇匀, 取 4 mL 于离心管中, 4000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 15 min, 取上清液, 过滤, 滤液过 0.22 μm 微孔滤膜, 滤液置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 备用。

2.6 方法学考察

2.6.1 精密度试验 精密量取“2.4”项下混合对照品溶液 10 μL , 连续进样 6 次, 记录峰面积, 计算得没食子酸、5-HMF、莫诺苷、马钱苷、獐芽菜苷峰面积的 *RSD* 分别为 0.74%、1.7%、0.11%、1.2%、0.37%, 表明仪器的精密度良好。

2.6.2 重复性试验 精密移取同一六 (酒) 供试品 6 份, 每份 4 mL, 照“2.5”项下方法平行制备, 进样记录峰面积, 计算得没食子酸、5-HMF、莫诺苷、马钱苷、獐芽菜苷峰面积的 *RSD* 分别为 2.1%、0.81%、0.56%、2.0%、1.5%, 表明该方法的重复性良好。

2.6.3 线性关系考察 取“2.4”项下混合对照品溶液, 用 80% 甲醇稀释成系列质量浓度, 进样测定, 记录峰面积, 以溶液质量浓度为横坐标 (*X*), 以峰面积为纵坐标 (*Y*), 分别绘制标准曲线, 计算回归方程, 结果见表 1, 表明 5 种成分在相应范围内与峰面积线性关系良好。

表 1 线性关系考察结果

Tab 1 Linearity

成分	线性方程	<i>r</i>	线性范围/ μg
没食子酸	$Y = 562.0X - 465.0$	0.9990	46.8 ~ 936.0
5-HMF	$Y = 247.1X - 213.6$	0.9995	53.7 ~ 1074.2
莫诺苷	$Y = 22.46X + 3.765$	0.9991	20.8 ~ 415.2
马钱苷	$Y = 121.1X - 78.63$	0.9991	36.30 ~ 726.0
獐芽菜苷	$Y = 87.97X - 65.37$	0.9990	23.6 ~ 472.0

2.6.4 稳定性试验 精密吸取“2.5”项下六 (酒) 水煎液供试品 10 μL , 分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 进样分析, 记录峰面积, 计算得没食子酸、5-HMF、莫诺苷、马钱苷、獐芽菜苷 5 种成分峰面积的 *RSD* 值分别为 0.84%、0.47%、2.5%、0.99%、1.5%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.6.5 加样回收试验 精密吸取已知浓度的六 (酒) 水煎液 6 份, 每份 2 mL, 分别加入相当于该样品中指标成分量 100% 的没食子酸、5-HMF、莫诺苷、马钱苷和獐芽菜苷对照品储备液适量, 按照“2.5”项下方法制备成供试品溶液, 进样测定, 记录峰面积, 计算得没食子酸、5-HMF、莫诺苷、马钱苷、獐芽菜苷的加样回收率分别为 92.23%、96.12%、95.19%、97.15%、94.16%, *RSD* 值分别为 1.4%、0.92%、1.6%、1.4%、1.0%, 表明方法回收率符合要求。

2.7 样品含量测定

取“2.5”项下所制备的山茱萸、酒茱萸、盐茱萸、清茱萸及配伍入方六 (生)、六 (酒)、六

(盐)、六(清)供试品溶液,进样 10 μL ,平行测定 3 次,记录色谱图,取平均值,根据色谱峰面积计算各成分含量。

2.7.1 山茱萸炮制前后水煎液中 5 种有效成分含量测定结果 山茱萸炮制前后水煎液中均含有没食子酸、5-HMF、莫诺昔、马钱苷、獐芽菜苷,与山茱萸组比,酒制山茱萸组、盐制山茱萸

组、清制山茱萸组水煎液中没食子酸、5-HMF 含量均升高,以酒制山茱萸组中最高,莫诺昔、马钱苷含量均降低,提示炮制后山茱萸中没食子酸、5-HMF 成分含量均明显增加,莫诺昔、马钱苷含量均明显降低,以酒制山茱萸中 5 种成分含量最高,表明炮制能够明显影响山茱萸中有效成分的含量,以酒制山茱萸为优(见表 2)。

表 2 山茱萸炮制前后水煎液中 5 种成分含量测定结果 ($n = 3$, $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Contents of 5 ingredients in decoction of cornus officinalis before and after the processing ($n = 3$, $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	没食子酸	5-HMF	环烯醚萜苷				5 种成分总量
			莫诺昔	马钱苷	獐芽菜苷	总量	
山茱萸	0.080 $\pm$ 0.003	0.005 $\pm$ 0.001	1.588 $\pm$ 0.103	1.151 $\pm$ 0.127	0.078 $\pm$ 0.007	2.788 $\pm$ 0.237	2.880 $\pm$ 0.238
酒制山茱萸	0.174 $\pm$ 0.013**	0.508 $\pm$ 0.173**	1.404 $\pm$ 0.108*	1.074 $\pm$ 0.040	0.079 $\pm$ 0.004	2.583 $\pm$ 0.104	3.081 $\pm$ 0.266
盐制山茱萸	0.158 $\pm$ 0.002**	0.287 $\pm$ 0.013*	1.248 $\pm$ 0.048*	0.847 $\pm$ 0.053**	0.078 $\pm$ 0.004	2.173 $\pm$ 0.103**	2.462 $\pm$ 0.143*
清制山茱萸	0.155 $\pm$ 0.021**	0.249 $\pm$ 0.089*	1.388 $\pm$ 0.028*	0.919 $\pm$ 0.029*	0.077 $\pm$ 0.001	2.383 $\pm$ 0.055*	2.766 $\pm$ 0.161

注:与山茱萸组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the Cornus officinalis group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.7.2 山茱萸炮制前后及其配伍入六味地黄汤水煎液中 5 种成分含量测定结果 山茱萸炮制前后及其配伍入方六味地黄汤后水煎液中均含有没食子酸、5-HMF、莫诺昔、马钱苷、獐芽菜苷。与六(生)组比,六(酒)组、六(盐)组、六(清)组水煎液

中没食子酸、5-HMF 含量均升高,马钱苷成分除六(盐)组外均升高,提示山茱萸炮制后配伍入六味地黄汤后水煎液中上述 3 种成分含量除六(盐)组中马钱苷外均显著升高,表明配伍入六味地黄汤能够明显影响山茱萸中有效成分的含量,见表 3。

表 3 山茱萸炮制前后配伍入六味地黄汤水煎液中 5 种成分含量测定结果 ($n = 3$, $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Content of 5 ingredients in Liuwei Dihuang decoction of different processing products of Cornus officinalis ($n = 3$, $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	没食子酸	5-HMF	环烯醚萜苷				5 种成分总量
			莫诺昔	马钱苷	獐芽菜苷	总量	
六(生)	0.250 $\pm$ 0.006	0.012 $\pm$ 0.003	0.988 $\pm$ 0.056	0.635 $\pm$ 0.018	0.058 $\pm$ 0.011	1.681 $\pm$ 0.073	1.936 $\pm$ 0.071
六(酒)	0.364 $\pm$ 0.015**	0.590 $\pm$ 0.005**	0.964 $\pm$ 0.031	0.685 $\pm$ 0.014*	0.055 $\pm$ 0.002	1.704 $\pm$ 0.031	2.226 $\pm$ 0.153
六(盐)	0.270 $\pm$ 0.008**	0.438 $\pm$ 0.112*	0.785 $\pm$ 0.00**	0.554 $\pm$ 0.008**	0.046 $\pm$ 0.001	1.388 $\pm$ 0.013	1.993 $\pm$ 0.025
六(清)	0.284 $\pm$ 0.010**	0.878 $\pm$ 0.024*	1.022 $\pm$ 0.043	0.802 $\pm$ 0.032**	0.067 $\pm$ 0.009	1.866 $\pm$ 0.005	2.744 $\pm$ 0.02

注:与六(生)组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the group of Liuwei Dihuang decoction with raw Cornus officinalis, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.7.3 山茱萸炮制前后及其配伍入方六味地黄汤后水煎液中 5 种成分含量变化 与山茱萸组比较,山茱萸经炮制及其配伍入方六味地黄汤后,没食子酸、5-HMF 含量均升高,莫诺昔、马钱苷成分均降低,提示山茱萸炮制后没食子酸、5-HMF 成分含量均升高,莫诺昔、马钱苷含量均降低,配伍入方后没食子酸、5-HMF 含量均进一步升高,莫诺昔、马钱苷均进一步降低,表明山茱萸炮制前后及其配伍入方六味地黄汤后有效成分含量明显变化,其没食子酸、5-HMF 成分呈逐步升高趋势,莫诺昔、马钱苷成分呈逐步降低趋势(见表 4、图 3)。

2.8 统计学分析

数据采用 SPSS 27.0 与 Origin 2024 软件进行

数据分析,所用数据用($\bar{x} \pm s$)表示,满足正态分布且方差齐则采用单因素方差分析,不满足正态性或方差不齐则用非参数检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 讨论

本研究发现山茱萸中含有没食子酸、5-HMF 成分,炮制成酒制山茱萸、盐制山茱萸、清制茱萸后,两种成分含量均明显升高,且将山茱萸及其各炮制品分别配伍入六味地黄汤后,两种成分含量均进一步升高^[19-20];该发现可能与以下因素有关:

其一,山茱萸在其酒制、盐制、清制过程中,随着温度升高,山茱萸中多糖类成分发生美拉德反应:即多糖成分发生脱羧缩合等化学反应生成小分子化合物 5-HMF^[21],导致上述 3 个山茱萸

表 4 山茱萸炮制前后及其配伍入方六味地黄汤的水煎液中 5 种成分含量变化结果 ($n=3$, $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 4 Content of 5 ingredients in Cornus officinalis before and after the processing and Liuwei Dihuang decoction ($n=3$, $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)

组别		没食子酸	5-HMF	环烯醚萜苷			总量	5 种成分总量
				莫诺苷	马钱苷	獐芽菜苷		
酒制组	山茱萸	0.080±0.003	0.005±0.001	1.588±0.103	1.151±0.127	0.078±0.007	2.788±0.237	2.880±0.238
	酒茱萸	0.174±0.013**	0.508±0.173**	1.404±0.108	1.074±0.040	0.079±0.004	2.583±0.104	3.081±0.266
	六(酒)	0.364±0.015***	0.590±0.005***	0.964±0.031***	0.685±0.014***	0.055±0.002**	1.704±0.031***	2.226±0.153***
盐制组	山茱萸	0.080±0.003	0.005±0.001	1.588±0.103	1.151±0.127	0.078±0.007	2.788±0.237	2.880±0.238
	盐茱萸	0.158±0.002**	0.287±0.013#	1.248±0.048*	0.847±0.053*	0.078±0.004	2.173±0.103*	2.462±0.143*
	六(盐)	0.270±0.008**	0.438±0.112**	0.785±0.00***	0.554±0.008**	0.046±0.001***	1.388±0.013***	1.675±0.025**
清制组	山茱萸	0.080±0.003	0.005±0.001	1.588±0.103	1.151±0.127	0.078±0.007	2.788±0.237	2.880±0.238
	清茱萸	0.155±0.021**	0.249±0.089**	1.388±0.028*	0.919±0.029*	0.077±0.001	2.383±0.055*	2.766±0.161
	六(清)	0.284±0.010***	0.878±0.024***	1.022±0.043***	0.802±0.032*	0.067±0.009	1.866±0.005***	2.744±0.020

注:与山茱萸比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与山茱萸炮制品比较,# $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the Cornus officinalis, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with the processing products of Cornus officinalis, # $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

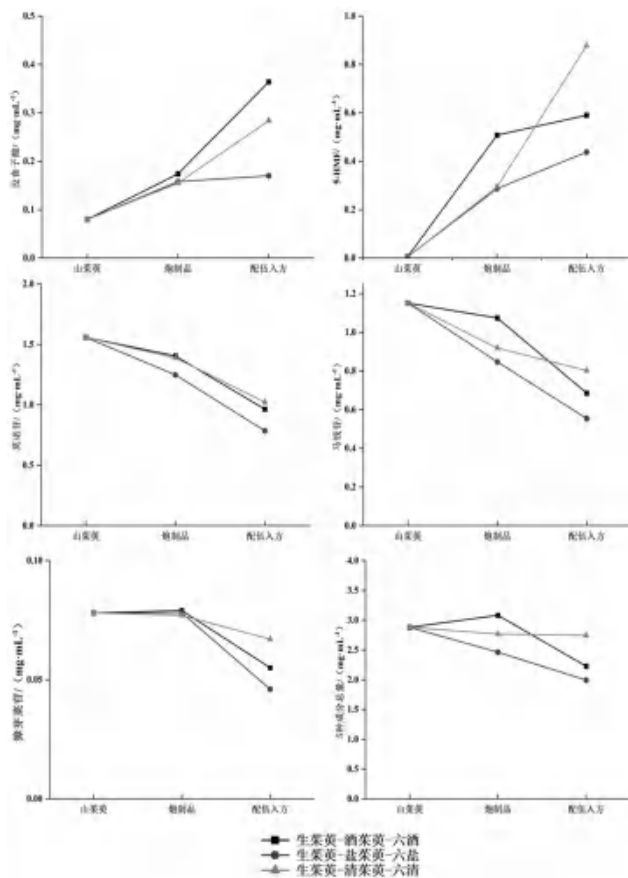


图 3 山茱萸不同炮制品及其配伍入方前后 5 种有效成分变化曲线图
Fig 3 Variation curves of 5 ingredients in Cornus officinalis before and after the processing and Liuwei Dihuang decoction

炮制品中 5-HMF 成分含量均明显升高;配伍入方六味地黄汤后,由于熟地黄药材也含有多糖类成分^[22],在煎煮过程中,也发生了美拉德反应生成 5-HMF,致使山茱萸及其炮制品配伍入复方后 5-HMF 含量进一步升高。

其二,山茱萸在炮制的高温条件下,山茱萸中的鞣质类成分发生高温水解^[23],生成了没食子酸,

致使 3 个山茱萸炮制品中没食子酸含量升高;配伍入六味地黄汤后,在与方中熟地黄药材配伍协同作用下,进一步促进了没食子酸的溶出,导致配伍入方后的水煎液中没食子酸含量进一步升高^[24]。

本研究发现山茱萸中含有莫诺苷、马钱苷成分,炮制成酒制山茱萸、盐制山茱萸、清制山茱萸后,该两种成分含量均明显降低;并伴随外观颜色由紫红色逐渐变为紫黑色或黑色。这可能与莫诺苷、马钱苷等环烯醚萜苷类成分在高温条件下发生氧化水解、糖类成分与氨基化合反应^[25-26],生成棕色或深色大分子物质有关,最终导致山茱萸炮制后颜色变为紫黑色,即山茱萸炮制后颜色变深,环烯醚萜苷类成分莫诺苷、马钱苷含量降低^[27-29]。同时,文献报道莫诺苷、马钱苷具有抗休克与固虚脱等作用^[30],传统中医理论中山茱萸炮制后固脱敛汗作用降低可能与这两种成分含量降低有关。研究发现山茱萸及其炮制品配伍入六味地黄汤后,莫诺苷、马钱苷含量均继续降低,这可能为六味地黄汤中山茱萸与熟地黄在共煎过程中,熟地黄药材中的寡糖等成分抑制了山茱萸中莫诺苷、马钱苷成分的溶出,致该两种成分含量降低^[31-32]。

研究还发现山茱萸及其各炮制品中 5 种成分总含量以酒制山茱萸中最高,这可能与酒制法所使用的黄酒或白酒中均含有醇类,醇类兼具极性与非极性溶媒性质,能够产生助溶与脱吸附的作用,山茱萸酒制过程中包含浸入与加热两个过程^[33-35],使得酒制山茱萸中有效成分的溶出较盐制山茱萸、清制山茱萸增多有关;该研究为《中国药典》选择以酒制山茱萸配伍入方六味地黄方提供依据,但究竟山茱萸以何品种入六味地黄汤最佳仍待进一步研究。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 29-30.
- [2] 向俊, 范倩, 陈雪冰, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 联和 GNPS 技术对山茱萸及其炮制品的化学成分差异研究[J]. 中草药, 2023, 54 (24): 7989-8006.
- [3] 杨梦, 郝志友, 王小兰, 等. 山茱萸的化学成分及其抗阿尔茨海默病作用研究[J]. 中药材, 2023, 46 (11): 2749-2753.
- [4] 贾红梅, 庾延和, 于猛, 等. 基于化学计量学的酒萸肉特征性成分识别及定量测定[J]. 中草药, 2020, 51 (5): 1294-1301.
- [5] 陈倩, 张馨月, 刘俊伶, 等. 山茱萸的现代药理作用及机制研究进展[J]. 环球中医药, 2025, 18 (2): 388-396.
- [6] 薄颖异. 山茱萸化学成分及药理作用研究进展[J]. 医学信息, 2024, 37 (16): 189-192.
- [7] 李俊松, 余宗亮, 王明艳, 等. 山茱萸炮制前后对小鼠急性肝损伤保护作用的研究[J]. 南京中医药大学学报, 2008, 24 (4): 236-238.
- [8] 李毛, 杨东东, 徐江雁. 莫诺苷药理作用研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41 (10): 70-75.
- [9] 谭增亮. 中药盐制山茱萸的炮制工艺探究[J]. 中国卫生标准管理, 2015, 6 (18): 150-152.
- [10] 陆兔林, 李飞. 中药炮制学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2021: 12.
- [11] 李冀, 左铮云. 方剂学[M]. 5 版. 北京: 中国中医药出版社, 2021: 131.
- [12] 戴冰, 杨磊, 雷欣东, 等. 两种不同干燥温度下盐茱萸、蒸茱萸中 5 种有效成分及水分含量研究[J]. 中医药导报, 2020, 26 (13): 40-44.
- [13] 雷欣东, 于慧, 杨磊, 等. 研究不同炮制山茱萸入方的六味地黄汤对去卵巢绝经后骨质疏松症大鼠的干预作用及机制[J]. 中南药学, 2020, 18 (3): 439-443.
- [14] 黄莉, 杨磊, 李玉星, 等. 多指标-响应面法优选山茱萸酒制工艺[J]. 中医药导报, 2021, 27 (11): 74-77, 90.
- [15] 于慧, 杨磊, 黄莉, 等. 不同山茱萸炮制品入方的六味地黄汤中六种有效成分含量比较研究[J]. 时珍国医国药, 2022, 33 (3): 608-610.
- [16] 龙琼, 于慧, 谭佳颖, 等. 基于活性成分探讨山茱萸酒制前后干预绝经后骨质疏松症大鼠的动态药效学变化及其机制[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40 (11): 1461-1468.
- [17] 谭佳颖, 王璐, 黄雍, 等. 六味地黄汤对 PMOP 模型大鼠股骨 MAPK 通路动态干预研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2023, 29 (10): 1478-1483.
- [18] 文枝, 于慧, 龙琼, 等. 基于药效成分比较研究山茱萸酒制前后分别配伍入六味地黄汤对绝经后骨质疏松症模型大鼠的干预作用[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2023, 25 (8): 2717-2725.
- [19] 常增荣, 李姣, 郝博, 等. 中药山茱萸炮制前后特征化学成分的分析[J]. 药物分析杂志, 2015, 35 (2): 338-343.
- [20] 肖红, 王东春, 舒琴, 等. 山茱萸不同炮制品中 8 个化学成分的含量测定[J]. 中国现代中药, 2021, 23 (8): 1444-1450.
- [21] 王凯, 曲珍妮, 毕钰, 等. 中药炮制加工过程中美拉德反应的研究进展[J/OL]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31 (8): 268-278.
- [22] 孟祥龙, 马俊楠, 张朔生, 等. 熟地黄炮制(九蒸九晒)过程中药效化学成分量变化及炮制辅料对其影响研究[J]. 中草药, 2016, 47 (5): 752-759.
- [23] 段天璇, 王静竹, 冯鹏, 等. 山茱萸炮制前后没食子酸溶出及煎出量比较[J]. 中国中药杂志, 1999, 24 (4): 213-214.
- [24] 张琳, 汪轩, 邢婧, 等. HPLC-DAD 同时测定左归丸药液中没食子酸、原儿茶酸、绿原酸、马钱苷、阿魏酸含量[J]. 药物分析杂志, 2016, 36 (8): 1364-1369.
- [25] 李晓庆, 王云, 张雪, 等. 基于表里关联的栀子饮片炮制过程中表观颜色变化与其内在成分含量的相关性分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24 (13): 1-5.
- [26] 管彦辉, 梁正维, 施扬, 等. 滇黄精炮制前后化学成分变化研究[J]. 中草药, 2024, 55 (11): 3647-3658.
- [27] 方莹洁, 杨柳, 叶佩, 等. 山茱萸炮制品特征性成分与色度的相关性分析[J]. 中成药, 2024, 46 (4): 1301-1306.
- [28] 丁霞, 蔡宝昌. 山茱萸炮制前后有效成分含量比较[J]. 中成药, 2006, 28 (11): 1597-1600.
- [29] 朱敏, 刘志辉, 姚毅, 等. 山茱萸肉炮制前后 4 种环烯醚萜苷类成分的含量变化研究[J]. 中国药房, 2014, 25 (47): 4464-4466.
- [30] 刘云. 山茱萸炮制前后几种主要成分的含量比较[J]. 中药材, 2019, 42 (5): 1077-1079.
- [31] 邹清. 山茱萸与熟地配伍时主要组分变化规律研究[J]. 临床合理用药杂志, 2017, 10 (33): 118-119.
- [32] 周莉莉, 刘志强, 吴国光, 等. 山茱萸炮制过程中环烯醚萜苷类成分的质谱研究[J]. 化学学报, 2008, 66 (24): 2712-2716.
- [33] 杨锦妮, 刘新月, 张艳. 中药“酒制升提”炮制理论的研究进展与探讨[J]. 中草药, 2023, 54 (18): 6139-6149.
- [34] 李华鹏, 桑立红, 侯准, 等. 中药酒制研究概况[J]. 中药材, 2011, 34 (3): 478-481.
- [35] 钮敏洁, 蔡皓, 曹岗. 中药酒制及其机理研究概述[J]. 中药材, 2020, 43 (11): 2837-2841.

(收稿日期: 2024-10-14; 修回日期: 2025-01-14)

从肠道微生态探究麻黄和石膏药对的相须机制

伍冲梅¹, 舒雁², 任佳合¹, 谢果珍¹, 惠华英^{1*} (1. 湖南中医药大学药学院, 长沙 410208; 2. 广州华立科技职业学院, 广州 511325)

摘要: **目的** 从肠道菌群角度探讨麻黄-石膏药对相须机制。**方法** 将 20 只 SPF 级昆明小鼠随机分为正常组、麻黄组、石膏组和麻黄-石膏组, 给药 7 d 后无菌提取各组小鼠肠黏膜进行 16S rRNA 测序分析, 提取各组肠内容物进行肠道消化酶活性测定。**结果** 高通量测序结果分析发现, 显著差异菌群 *Lactobacillus* 在各组中所占比例相对大小顺序为: 麻黄-石膏组 > 石膏组 > 麻黄组 > 正常组, *Candidatus_Arthromotus* 在各组中所含相对丰度顺序为: 麻黄-石膏组 < 石膏组 < 麻黄组 < 正常组, *Achromobacter* 在各组中相对含量顺序为: 麻黄-石膏组 > 石膏组 > 正常组 > 麻黄组。与正常组比较, 麻黄组显著提高了肠道中淀粉酶、蔗糖酶、木聚糖酶活性 ($P < 0.05$), 石膏组显著降低了蔗糖酶和纤维素酶活性 ($P < 0.05$)。麻黄-石膏组中各种消化酶活性均显著低于其他组。**结论** 麻黄-石膏药对对肠道菌群构成及肠道消化酶活性的影响均显著高于麻黄或石膏单独使用, 提示麻黄-石膏药对对肠道生物屏障构成及肠道消化酶活性的影响可能是药对相须机制之一。

关键词: 麻黄; 石膏; 药对; 肠道菌群; 消化酶

中图分类号: R285.5, R286 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)05-1255-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.013

Synergistic mechanism of Ephedra and Gypsum herbal pair based on intestinal microecology

WU Chong-mei¹, SHU Yan², REN Jia-he¹, XIE Guo-zhen¹, HUI Hua-ying^{1*} (1. College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208; 2. Guangzhou Huali Science and Technology Vocational College, Guangzhou 511325)

Abstract: **Objective** To explore the synergistic mechanism of Ephedra and Gypsum herbal pair from the perspective of intestinal flora. **Methods** Totally 20 SPF Kunming mice were divided into a control group (MC), an Ephedra group (MH), a Gypsum group (SG), and an Ephedra-Gypsum group (MHSG). The mice were given corresponding drugs for 7 days before the small intestinal mucosa were collected under sterile condition for 16S rRNA analysis. The intestinal contents were collected to measure the activity of intestinal digestive enzymes. **Results** High-throughput sequencing analysis revealed that the obviously differential bacterial community *Lactobacillus* exhibited relative proportions in the following order in each group: MHSG > SG > MH > MC, the relative abundance of genus *Candidatus_Arthromotus* was MHSG < SG < MH < MC, and the relative content of *Achromobacter* was MHSG > SG > MC > MH. Compared with the MC group, the activities of amylases, sucrases and cellulases in the MH group were significantly increased ($P < 0.05$), but the activities of sucrases and cellulases of the SG were evidently decreased ($P < 0.05$). The activity of involved digestive enzymes in the MHSG group was lower than that of other groups. **Conclusion** The impact of Ephedra-Gypsum herbal pair on the composition of intestinal flora and the activity of intestinal digestive enzymes are much stronger than that of Ephedra or Gypsum alone. It suggests that

基金项目: 湖南省卫生健康委科研计划项目 (No.D202303038538)。

作者简介: 伍冲梅, 女, 硕士研究生, 主要从事中药防治疾病的肠道微生态机制研究, email: 916582032@qq.com * **通信作者:** 惠华英, 女, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事中医药防治消化系统疾病的机制研究, email: huihuaying2003@126.com

the formation of intestinal biological barrier and activity of intestinal digestive enzymes by the herbal pair may be a mechanism for the synergistic effect.

Key words: Ephedra; Gypsum; herbal pair; intestinal flora; digestive enzyme

药对指两味中药形成相对固定的配伍单位,通过相互作用发挥综合药效,是历代前辈经临床反复实践验证所得。《神农本草经》中指出:“药有阴阳配合”“有相须者,有相使者,有相畏者,有相恶者,有相反者,有相杀者”。两药配合使用后,药与药之间能发生某些相互作用,从而产生与原有药物均不同的功效,性能主治发生变化;或能协同增效;或能减少毒副作用,专取所长。药对是许多方剂的主要组成部分,是药物配伍的发展,是单药到方剂的过渡,历来受到医家的重视。如麻黄辛温发散力强,有汗者不宜,若与石膏配伍形成药对,温燥之性受制,可用于汗出而喘之证。临床广泛运用的经典方剂中,药对亦常出现。

中药四气(寒、热、温、凉)是药性理论的核心,指导中药分类和用药方案。目前,有研究人员基于能量、物质和信息三个角度来阐释中药四气^[1],从生物热动力学参数来表征药物寒、热药性以及寒、热配伍对药性的佐制作用^[2-4],这在一定程度上阐释了药对机制,但对于药对功效改变的机制阐释还远远不够。药物经口进入胃肠道,会与居住在肠道中的菌群发生作用,并在肠道消化酶催化作用下进行转化。肠道菌群对药物药效的发挥具有重要影响,同时药物对肠道菌群具有调控作用。那么,不同属性的药物对肠菌的影响如何不同呢?不同属性药物形成的药对与肠道菌群间的相互作用如何呢?基于此,本研究以麻黄-石膏药对为研究对象,以实验动物为载体,研究不同寒热药物形成药对后对肠道菌群的影响,以期在一定程度上说明药对的相须机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性昆明小鼠 20 只,体重(20±2)g[湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物生产许可证号:SCXK(湘)2019-0004]。小鼠饲养于湖南中医药大学实验动物中心,实验单位使用许可证号:SYXK(湘)2019-0009,饲养温度维持在(24±2)℃,相对湿度设定为 50%~60%,小鼠生活环境遵循 12 h 光照与 12 h 黑夜循环,除取材前 12 h 禁食外,其余时间自由进食饮水。

1.2 试药

麻黄 8 g(内蒙古产,批号:2004060)、石膏 16 g(广东产,批号:20220701)(湖南中医药大学第一附属医院)。

福林酚(批号:C14414468)、三氯乙酸(批号:C12376439)(上海麦克林生化科技有限公司);3,5-二硝基水杨酸(DNS,批号:20200106)、柠檬酸(批号:20210108)、柠檬酸三钠(批号:20201105)、羧甲基纤维素钠(批号:20200918)、L-酪氨酸(批号:20200622)、D(+)-木糖(批号:20191211)、D(+)-麦芽糖(批号:20220715)(国药集团化学试剂有限公司);蔗糖(批号:20200831,广东光华科技股份有限公司);葡萄糖(批号:20200727,天津市科密欧化学试剂有限公司)。

1.3 仪器

722 型分光光度计(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);TGL-16M 型高速台式冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);手提式压力蒸汽灭菌器(上海力辰邦西仪器科技有限公司)。

2 方法

2.1 分组、给药及取材

麻黄水煎液的制备:先将已浸泡的麻黄武火煮沸,后文火煎煮 30 min,过滤出汤液后再加水文火煎煮 30 min,两次汤液合并,浓缩至 0.05 g·mL⁻¹。石膏水煎液的制备:纱布包裹石膏,先武火煎煮,后转文火煎 50 min,过滤石膏汤,再加水煎煮 30 min,两次汤液合并,浓缩至 0.10 g·mL⁻¹。麻黄-石膏药对水煎液的制备:麻黄先浸泡 30 min,同时煎煮石膏 20 min,再加入麻黄一起煎煮 30 min,过滤汤液,再加水煎煮 30 min,合并两次汤液,浓缩至麻黄与石膏生药浓度为 1:2。药液均存放于 4℃ 冰箱备用。

20 只 SPF 级雄性小鼠,随机分为正常组(MC)、麻黄组(MH)、石膏组(SG)及麻黄-石膏组(MHSG),每组 5 只。适应性饲养 4 d 后,麻黄组、石膏组、麻黄-石膏组分别灌胃麻黄水煎液、石膏水煎液、麻黄-石膏药对水煎液每次各 0.35 mL,一日 2 次,给药 7 d。正常组给予等体积无菌水。末次给药后禁食 12 h,快速脱颈处死实验小鼠,无菌提取各小鼠小肠内容物用于消

化酶活性测定, 提取肠黏膜用于 16S rRNA 测序。

2.2 肠道菌群 16S rRNA 测序分析

提取小鼠肠黏膜基因组 DNA, 设计携带 Barcode 序列的上游引物 (5'-ACTCCTACGGGAGGCAG-CAG-3') 和下游引物 (5'-GGACTACHVGGGTWTCTA-AT-3'), 对 V3~V4 可变区的目标 DNA 进行 PCR 扩增, 扩增产物进行纯化、定量与均一化, 建立相应菌群文库后利用 Illumina 公司的 PE300 平台进行测序。样本 DNA 的提取、纯化和测序分析由上海美吉生物科技有限公司完成。

2.3 酶活性测定

称取每组小鼠肠内容物样本 3 g, 加入装有 50 mL 无菌生理盐水和玻璃珠的离心管中, 振荡 2 min 后离心 ($3000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min), 取上层清即为粗酶液, 使用 DNS 法测定小鼠肠道中的淀粉酶、木聚糖酶、纤维素酶和蔗糖酶活性^[5-7]。

2.4 统计学分析

本实验数据采用 SPSS 26.00 软件进行统计学分析。数据符合正态分布和方差齐性时, 多组间比较采用单因素方差分析, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示; 当数据不满足正态分布或方差齐性时, 采用 Kruskal-Wallis H 检验进行比较, 数据以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示。 $P < 0.05$ 表示组间差异有统计学意义。

3 结果

3.1 麻黄、石膏及麻黄 - 石膏药对对肠道菌群的影响

表 1 麻黄、石膏及麻黄 - 石膏药对对小鼠肠道菌群 Alpha 多样性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	Shannon 指数	Simpson 指数	ACE 指数	Chao 指数
正常组	0.641 ± 0.556	0.807 ± 0.185	96.140 ± 30.390	95.670 ± 30.910
麻黄组	1.287 ± 0.918	0.525 ± 0.331	89.580 ± 45.840	89.610 ± 45.570
石膏组	1.893 ± 1.167	0.434 ± 0.306	129.500 ± 115.400	127.800 ± 115.400
麻黄 - 石膏组	1.446 ± 0.192	$0.354 \pm 0.040^*$	68.890 ± 54.490	69.010 ± 53.180

注: 与正常组比较, $^*P < 0.05$ 。

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

3.1.4 Beta 多样性分析 主坐标分析 (PCoA) 图中样本距离越接近, 表示物种结构越相似。由图 3 可见, 正常组和麻黄 - 石膏组样本可聚为一类, 麻黄组和石膏组的样本分布较为分散, 但均与正常组样本间分离, 说明药物使肠道菌群构成发生改变。特别是麻黄 - 石膏组样本主要位于第四象限, 远离正常组样本, 提示麻黄 - 石膏组肠道菌群组成与正常组间存在较大的差异性。

3.1.5 各组优势菌群组成分析 对各组样本所获 OTU 代表序列进行分类学分析, 可知不同组在各分类水平上的群落组成情况, 图 4 显示正常

3.1.1 有效序列的分析评估 通过质量过滤后获得的有效序列平均长度在 401 ~ 450 bp 内, 且各组样品的 Coverage 指数都在 0.98 以上, 稀释曲线趋于平缓 (见图 1), 说明测序深度足够, 可有效反映出样本中细菌的真实情况, 所得数据可用于后续分析。

3.1.2 各组对小鼠肠道操作分类单元 (OTU) 数目的影响 由图 2 可以看出, 正常组有 OTU 165 个, 麻黄组有 OTU 128 个, 石膏组有 OTU 333 个, 麻黄 - 石膏组有 OTU 152 个。四组共有 OTU 57 个, 正常组独有 OTU 38 个, 麻黄组独有 OTU 22 个, 石膏组独有 OTU 205 个, 麻黄 - 石膏组独有 OTU 44 个, 说明麻黄使肠道中细菌种类多样性减少, 石膏使肠道细菌种类多样性增加, 而麻黄 - 石膏药对对肠道细菌多样性影响不大。

3.1.3 Alpha 多样性分析 Alpha 多样性指数可衡量微生物群落的丰富度和多样性。Chao 指数和 ACE 指数值越大表明群落丰富度越高; Shannon 指数越大或 Simpson 指数越小说明样品所含群落多样性增加。由表 1 得知, 与正常组比较, 麻黄组 Chao 指数和 ACE 指数变化不大, 石膏组 Chao 指数和 ACE 指数均升高, 而麻黄 - 石膏组均降低, 提示麻黄对肠道菌群的丰富度影响较小, 石膏增加肠道菌群丰富度, 而麻黄 - 石膏药对降低肠道菌群丰富度。麻黄组、石膏组、麻黄 - 石膏组均出现了 Shannon 指数升高而 Simpson 指数降低, 说明这些药物均使肠道菌群的多样性增加。

组、麻黄组、石膏组、麻黄 - 石膏组在门及属水平上相对丰度前 10 位的群落组成。在小鼠肠道中, 厚壁菌门 (Firmicute) 是四组样本中所含丰度最高的门类。麻黄组、石膏组及麻黄 - 石膏组所含厚壁菌门比例与正常组所含该菌的含量之比分别为 0.98、0.84、1.01, 可见石膏明显地降低了厚壁菌门丰度。与正常组相比, 放线菌门 (Actinobacteriota) 在麻黄组、石膏组和麻黄 - 石膏组中所含比例均升高, 且麻黄组放线菌门的相对丰度约是麻黄 - 石膏组的 2 倍, 而石膏组放线菌门的比例约是麻黄 - 石膏组的 10 倍。可见, 麻

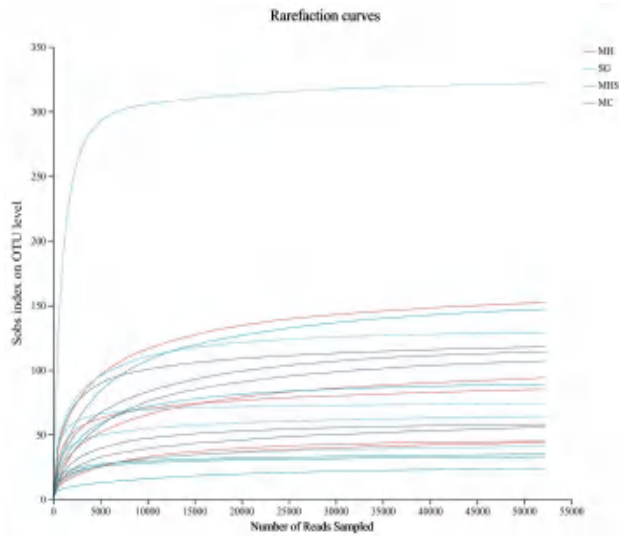


图 1 麻黄、石膏及麻黄 - 石膏药对小鼠肠道菌群的稀释曲线
Fig 1 Rarefaction curve of Ephedra, Gypsum and the Ephedra-Gypsum herbal pair on the intestinal flora in the mice

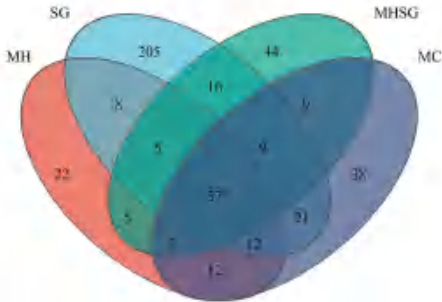


图 2 小鼠肠道菌群 OTU 数目的 Venn 图
Fig 2 Venn diagram of OTU counts intestinal flora in mice

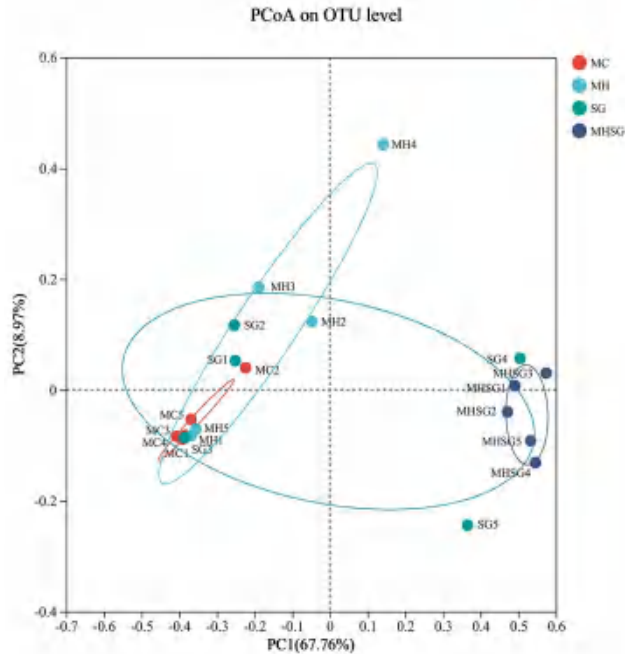


图 3 麻黄、石膏及麻黄 - 石膏药对小鼠肠道菌群 Beta 多样性的影响
Fig 3 Effect of Ephedra, Gypsum and the Ephedra-Gypsum herbal pair on the Beta diversity of intestinal flora in the mice

黄 - 石膏药对对放线菌门增殖作用低于麻黄、石膏单独使用。另外, 石膏组所含变形菌门和拟杆菌门 (*Bacteroidota*) 的比例与正常组的比值 (4.79 和 4.12) 均高于麻黄组和麻黄 - 石膏组与正常组的相应比值, 可见寒性药物石膏对厚壁菌门具有抑制作用, 而对放线菌门、拟杆菌门和变形菌门则具有促进增殖作用。

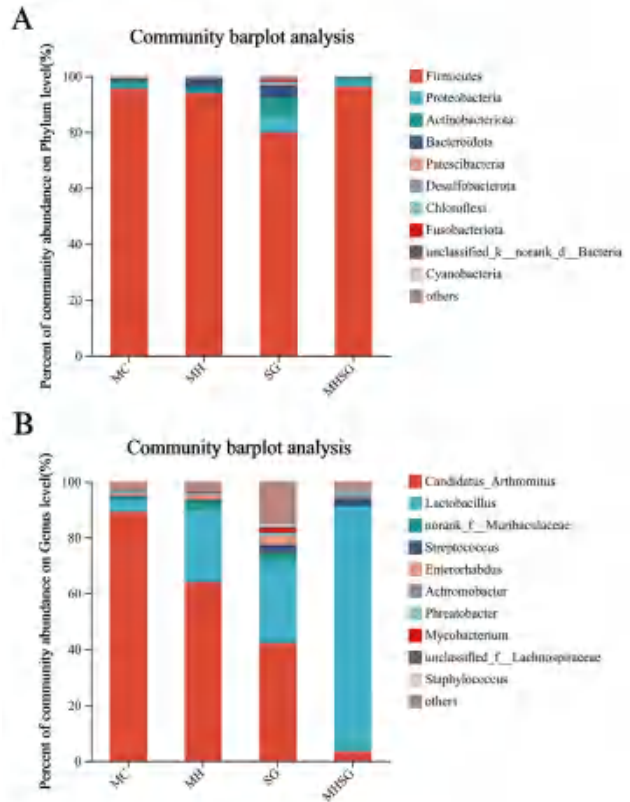


图 4 麻黄、石膏及麻黄 - 石膏药对小鼠肠道菌群门、属水平的影响
Fig 4 Effect of Ephedra, Gypsum and the Ephedra-Gypsum herbal pair on the phylum and genus levels of intestinal flora in the mice
A. 门水平上相对丰度前 10 的肠道菌群相对丰度 (relative abundance of the top 10 intestinal flora of at the phylum level); B. 属水平上相对丰度前 10 的肠道菌群相对丰度 (relative abundance of the top 10 intestinal flora at genus level)

在纲、目、科、属水平上对差异菌群做进一步组间比较分析发现, 与正常组比较, 麻黄组、石膏组和麻黄 - 石膏组所含 *Bacilli*、*Lactobacillales*、*Lactobacillaceae*、*Lactobacillus* 比例均显著升高, 且麻黄 - 石膏组中这些菌的比例最高 ($P < 0.05$); 相反, 三组中所含 *Clostridia*、*Clostridiales*、*Clostridiaceae*、*Candidatus_Arthromitus* 水平均降低, 且麻黄 - 石膏组中这些菌的含量降低幅度最大 ($P < 0.05$)。由表 2 可知, 石膏组所含 *Alcaligenaceae* 和 *Achromobacter* 丰度明显升高, 且与麻黄 - 石膏组含量差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 2 麻黄、石膏及麻黄 - 石膏药对小鼠肠道菌群物种相对丰度的影响 [$M(P_{25}, P_{75})$, $n = 5$, %]

Tab 2 Effect of Ephedra, Gypsum and the Ephedra-Gypsum herbal pair on the relative abundance of intestinal flora in the mice [$M(P_{25}, P_{75})$, $n = 5$, %]

菌群种类	正常组	麻黄组	石膏组	麻黄 - 石膏组
p_Firmicute	96.969 (92.615, 97.947)	95.798 (87.588, 99.076)	83.328 (62.571, 95.526)	97.548 (92.795, 99.061)
p_Actinobacteriota	0.251 (0.140, 2.621)	1.334 (0.169, 3.657)	7.000 (1.429, 10.092)	0.699 (0.075, 1.769)
c_Bacilli	2.442 (1.143, 9.843)	30.601 (5.784, 46.040) *	9.031 (2.893, 77.733)	90.013 (86.428, 95.385) ***▲▲
c_Clostridia	94.989 (82.700, 96.590)	65.141 (41.603, 93.271)	46.768 (10.477, 80.525)	6.439 (3.094, 7.379) ***▲
o_Clostridiales	94.513 (79.460, 96.100)	64.453 (34.475, 93.223)	44.799 (5.524, 78.042)	3.759 (0.277, 6.723) ***
o_Lactobacillales	2.371 (1.070, 9.550)	30.590 (5.692, 45.829)	8.921 (2.135, 72.522)	89.779 (85.643, 95.253) ***▲▲
f_Alcaligenaceae	0.232 (0.168, 1.183)	0.140 (0.040, 0.204)	0.439 (0.240, 0.801)	0.337 (0.245, 2.798) #
f_Clostridiaceae	94.475 (79.417, 96.111)	64.412 (34.425, 93.168)	44.559 (5.530, 78.011)	3.845 (0.259, 6.685) ***
f_Lactobacillaceae	1.953 (0.893, 8.700)	30.436 (4.255, 45.574)	7.956 (1.710, 66.607)	86.923 (81.142, 94.326) ***▲
g_Candidatus_Arthromitus	94.513 (79.458, 96.100)	64.453 (34.474, 93.223)	43.942 (5.524, 78.042)	3.737 (0.277, 6.719) ***
g_Lactobacillus	1.999 (0.907, 8.718)	30.446 (4.323, 45.725)	7.918 (1.741, 66.559)	86.947 (81.090, 94.386) ***▲
g_Achromobacter	0.211 (0.175, 1.193)	0.136 (0.042, 0.198)	0.429 (0.427, 0.784)	0.343 (0.242, 2.812) #

注：与正常组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与麻黄组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ；与石膏组比较，▲ $P < 0.05$ ，▲▲ $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with the Ephedra group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; compared with the Gypsum group, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$.

3.1.6 物种差异性分析 LEfSe 常用来分析多层级的差异物种，找到与丰度差异有统计学意义的生物标识，并用线性判别分析 (LDA) 值评估物种对差异效果的影响力。由图 5 可看出，正常组、麻黄组、石膏组及麻黄 - 石膏组共发现 22 个差异物种。从门到属水平上，除麻黄组未发现显著差异物种外，其余各组均有显著差异微生物类别的发现。正常组发现显著差异的微生物物种有 Clostridia (梭菌纲) - Clostridiales (梭菌目) - Clostridiaceae (梭菌科) - *Candidatus_Arthromitus* (分节丝状菌属)、Oscillospiraceae (颤螺菌科) 及 Rikenellaceae (文肯菌科)，但 Oscillospiraceae (颤螺菌科) 及 Rikenellaceae (文肯菌科) 在除正常组外的其他各组中所含比例均低于 0.1%。石膏组发现的显著差异物种有 Proteobacteria (变形菌门) - Gammaproteobacteria (γ -变形菌纲) - Pseudomonadales (假单胞菌目) - Moraxellaceae (莫拉氏菌科) - *Acinetobacter* (不动杆菌属)、Sphingobacteriales (鞘氨醇杆菌目) - Sphingobacteriaceae (鞘氨醇杆菌科) - *Pedobacter* (土地杆菌属) 和 *Marvinbryantia*，但除了 Proteobacteria (变形菌门) - Gammaproteobacteria (γ -变形菌纲) 外，其余物种含量在各组间比例均低于 0.1%。麻黄 - 石膏组发现的特征菌群有 Bacilli (芽孢杆菌纲) - Lactobacillales (乳杆菌目) - Lactobacillaceae (乳杆菌科) - *Lactobacillus* (乳杆菌属) 和 Alcaligenaceae (产碱杆菌科) - *Achromobacter* (无色杆菌属)。由以上分析可知，不同属性药物对小鼠肠道微生物构成的影响具有显著差异性，且麻黄 - 石膏药对对肠道微生物构成的影响亦不同于单味药。

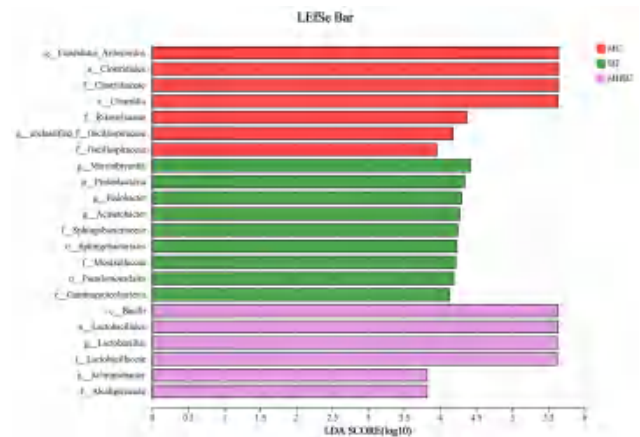


图 5 不同组别小鼠肠道菌群的 LEfSe 分析

Fig 5 LEfSe analysis of intestinal flora in different groups of mice

3.2 麻黄、石膏及麻黄 - 石膏药对对肠道酶活性的影响

肠道消化酶参与肠道中物质的转化，对于由胃初加工后的食物的消化、分解和吸收具有不可或缺的作用。正常情况下，肠道酶活性保持在一个相对稳定的状态。当机体出现疾病或药物干预时，肠道酶活性受到影响，进而影响到机体的消化吸收功能。如表 3 所示，与正常组比较，麻黄组的蔗糖酶、淀粉酶、木聚糖酶活性显著增加 ($P < 0.05$)，石膏组肠道所含蔗糖酶、纤维素酶活性显著减弱，且石膏组的蔗糖酶、纤维素酶和木聚糖酶活性显著低于麻黄组 ($P < 0.05$)。上述结果说明，药物的寒、热属性可能会影响肠道消化酶活性。进一步比较发现，麻黄 - 石膏组中所含 4 种酶的活性均显著低于其他组 ($P < 0.01$)。

表 3 麻黄、石膏及麻黄-石膏药对对小鼠消化酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Tab 3 Effect of Ephedra, Gypsum and the Ephedra-Gypsum herbal pair on the digestive enzyme activity in mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)				
组别	蔗糖酶 / ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)	纤维素酶 / ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)	淀粉酶 / ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)	木聚糖酶 / ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)
正常组	0.424 ± 0.024	0.127 ± 0.007	0.185 ± 0.012	0.119 ± 0.07
麻黄组	1.137 ± 0.021**	0.123 ± 0.001	0.211 ± 0.009*	0.152 ± 0.009**
石膏组	0.240 ± 0.028***	0.110 ± 0.001***	0.207 ± 0.012	0.116 ± 0.004##
麻黄-石膏组	0.096 ± 0.001***▲▲	0.043 ± 0.001***▲▲	0.074 ± 0.006***▲▲	0.055 ± 0.002***▲▲

注：与正常组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与麻黄组比较，### $P < 0.01$ ；与石膏组比较，▲▲ $P < 0.01$ 。
Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with the Ephedra group, ### $P < 0.01$; compared with the Gypsum group, ▲▲ $P < 0.01$.

4 讨论

药对可扩大药物适用范围以应对复杂多变的临床病症，或使药物的毒性和烈性受到制约，减轻或规避不良反应^[8]。麻黄辛温，中空而浮，长于升散，宣肺气、开腠理以发汗，温化膀胱，行水利尿以消肿。石膏辛、甘、寒，体重而降，清热解肌，发汗消郁，生津止渴。两药伍用，一温一寒，一升一降，相互制约，相互为用，宣肺平喘，发越水气，清热降火，利水消肿的力量增强^[9]。麻黄-石膏以 1 : 2 配成药对，外能散表邪，内又清里热，共奏宣肺清热平喘之功^[10]。麻杏石甘汤是辛温与寒凉配伍用药的经典方，方中麻黄和石膏共为君药，且都是日常中高频使用的常规药。大量研究表明，药物口服后，进入胃肠道，与肠道中的消化酶及肠道菌群相互作用而被转化或吸收，从而到达病灶发挥调节功能。

肠道菌群在人体中扮演重要角色，涉及发育、代谢、免疫及疾病进程等^[11]。肠道菌群通过代谢食物生成的终产物短链脂肪酸（short-chain fatty acids, SCFAs）可滋养肠壁细胞，促进细胞生长与再生，还能刺激肠壁产生更多的消化酶，如乳杆菌属促进乳糖酶、蛋白酶等的产生，拟杆菌门有助于产生纤维素酶等，这些消化酶帮助宿主分解难以消化的食物成分^[12]。此外，SCFAs 可调节肠道的 pH 值，影响消化酶的活性^[13]。同时，肠道消化酶也会影响肠道菌群的组成。肠道消化酶与菌群相互依赖、相互调节，共同影响宿主的消化效率和代谢活动^[14]。本研究运用高通量测序技术分析麻黄-石膏药对对小鼠肠黏膜菌群的影响，发现温性麻黄引起了肠道菌群多样性的增加，寒性石膏增加了肠道菌群的丰富度和多样性，而麻黄-石膏药对降低了菌群的丰富度但增加了菌群的多样性。对肠道菌群门水平分析发现，石膏降低厚壁菌门相对丰度，升高放线菌门、拟杆菌门及变形菌门的比例，而麻黄及麻黄-石膏药对对各门水平的影响不显著，提示寒性药物

对肠道菌群构成的影响较温性药物强，麻黄-石膏药对可能会削弱部分石膏对肠道菌群的显著影响，这可能给我们一些关于不同药性药物配伍后功效发生改变的有用信息。

通过对各组不同分类水平上含量在 0.1% 以上的菌群进行统计分析，结合 LEfSe 结果发现，正常组所含的特征细菌 *Candidatus_Arthromitus*（分节丝状菌属）的相对丰度在麻黄组、石膏组和麻黄-石膏组中均减少，特别是在麻黄-石膏组中其含量降低到了正常组的 4%，这进一步提示配伍后的药物对菌群影响异于单味药。乳杆菌属（*Lactobacillus*）和无色杆菌属（*Achromobacter*）是麻黄-石膏组的特征菌群。乳杆菌属为肠道有益菌群，参与机体许多生理过程，抑制有害菌群的繁殖，其丰度的增加能促进机体免疫功能^[15]。本研究中，乳杆菌属含量在麻黄组、石膏组及麻黄-石膏组中均升高，且麻黄-石膏组中显著增多，说明麻黄-石膏药对对乳杆菌的促进作用更好。通过对比发现，无色杆菌属在麻黄-石膏组中相对丰度最高，在麻黄组中最低，说明麻黄对无色杆菌属的抑制作用较强。性味功效相反的药物既可通过配伍来拮抗药物的偏性和抑制毒性，也可利用性质对立的药物相互协作以达“相反相成”之效，麻黄与石膏药性相反，然而在麻杏石甘汤、越婢汤、大青龙汤等经方中互补为助^[16]。本研究结果提示，麻黄-石膏药对可增加乳杆菌属的相对丰度，降低分节丝状菌属的相对丰度。肠道菌群参与机体的物质和能量代谢，其构成的改变可能会影响到进入肠道中的药物的代谢产物以及能量，进一步造成药对功效不同于单味药的功效。

肠道微生物产生的多种代谢物对肠道 pH 水平和消化酶功能具有一定的调节作用，如 SCFAs^[13]。SCFAs 中的乙酸、丙酸和丁酸是肠道微生物分解膳食纤维产生的主要代谢物，它们通过降低肠道 pH 值间接影响肠道消化酶的活性。

小肠的 pH 值相对中性时, 肠道消化酶的活性较高^[17]。SCFAs 降低小肠的 pH 值, 消化酶的活性降低, 进而影响营养物质的消化和吸收。研究表明, 干姜(热性)和白术(温性)显著提高正常小鼠的肠道消化酶活性, 而薏苡仁(凉性)和黄连(寒性)抑制其活性^[18]。本研究中, 麻黄增加了小鼠肠道中的蔗糖酶、淀粉酶和木聚糖酶活性, 石膏仅增加了淀粉酶活性, 麻黄-石膏药对显著降低了各消化酶的活性, 这可能与麻黄-石膏药对引起肠道中某些产 SCFAs 菌增加(如乳杆菌属)有关。因此, 温性麻黄表现出促肠道消化酶活性作用, 寒性石膏在一定程度上抑制消化酶活性, 麻黄-石膏药对对消化酶活性的影响作用增强, 可能是药对药效异于单味药的另一原因。

综上所述, 温性麻黄、寒性石膏对肠道菌群影响趋势基本一致, 但寒性药物石膏对肠道菌群构成影响的强度高于麻黄, 麻黄-石膏药对增强了肠道菌群的影响作用, 其药效增加的机制可能与麻黄-石膏药对改变肠道微生态, 增加 *Lactobacillus* 的相对丰度及降低 *Candidatus Arthromitus* 的相对丰度有关。麻黄提高了肠道消化酶活性, 而石膏和麻黄-石膏药对对肠道消化酶活性的促活作用较差。本研究初步探究了寒性和温性药物及麻黄-石膏药对对肠道微生态机制的影响, 浅析了药物相须为用的机制。然而, 肠道菌群结构改变会引起菌群代谢物变化, 本研究对麻黄-石膏药对的相须机制探索仍有不足, 后续将结合肠道代谢物的分析, 从多方面、多角度揭示药物相须的具体机制。

参考文献

- [1] 宋振光, 颜冬梅, 黄璐琦, 等. 中药药性——四气、五味、归经研究的方法学进展[J]. 江西中医药大学学报, 2023, 35(3): 110-114.
- [2] 段秀俊, 刘培, 陈飞, 等. 寒性药大黄配伍四味不同热性药所致药性变化规律研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2020, 27(8): 79-85.
- [3] 樊冬丽, 廖庆文, 鄢丹, 等. 基于生物热力学表达的麻黄汤和麻杏石甘汤的寒热药性比较[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(5): 421-424.
- [4] 肖小河, 王伽伯, 赵艳玲, 等. 药性热力学观及实践[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(16): 2207-2213.
- [5] 贺倩, 刘翠, 李新欣, 等. 麦芽炒制过程中消化酶活性的研究[J]. 化学工程师, 2020, 34(8): 73-76, 56.
- [6] 朱佳源, 谭周进, 刘又嘉, 等. 养胃四君子茶对脾虚便秘小鼠肠道微生物、酶活性及胃动力的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2022, 34(1): 18-22, 28.
- [7] 黄莉莉, 谭周进, 朱佳源, 等. 葛根素对正常小鼠肠道微生物活度及消化酶活性的影响[J]. 湖南农业科学, 2022(2): 40-43.
- [8] 吕景山. 施今墨对药(第二版)[M]. 北京: 人民军医出版社, 2001.
- [9] 高晓山. 中药药性论[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1992.
- [10] 钟赣生, 杨柏灿. 中药学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2021.
- [11] 刘瑞雪, 李勇超, 张波. 肠道菌群微生态平衡与人体健康的研究进展[J]. 食品工业科技, 2016, 37(6): 383-391.
- [12] Su XY, Yao B. Exploiting enzymes as a powerful tool to modulate the gut microbiota[J]. Trends Microbiol, 2022, 30(4): 314-317.
- [13] Fan Y, Pedersen O. Gut microbiota in human metabolic health and disease[J]. Nat Rev Microbiol, 2021, 19(1): 55-71.
- [14] Qi QQ, Zhang HJ, Jin ZY, et al. Hydrogen sulfide produced by the gut microbiota impairs host metabolism via reducing GLP-1 levels in male mice[J]. Nat Metab, 2024, 6(8): 1601-1615.
- [15] Dao MC, Everard A, Aron-Wisnewsky J, et al. Akkermansia muciniphila and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology[J]. Gut, 2016, 65(3): 426-436.
- [16] 张西俭. 方剂相反相成配伍的思想渊源和历史沿革[J]. 实用中医药杂志, 2005, 21(4): 240-242.
- [17] 郭江鹏, 王俊, 李发弟, 等. 断奶日龄对舍饲羔羊小肠内容物中主要消化酶活性的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(9): 2603-2612.
- [18] 许仕杰. “五性”归脾经常用中药对脾虚动物模型的干预作用比较研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.

(收稿日期: 2025-01-02; 修回日期: 2025-03-20)

基于量值传递 - 多元统计 - 亲和作用的 护肝片关键质量标志物筛选

李苗, 王滢悦, 张娜, 王颖, 罗赣*, 高晓燕* (北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

摘要: **目的** 为提升护肝片的质量标准, 在已明确护肝片 9 种指标成分的基础上, 筛选护肝片关键质量标志物。 **方法** 测定 9 种指标成分在护肝片处方药材、中间体、成药中的含量, 计算其在药材 - 中间体 - 成药制备过程中的转移率, 明确符合量值传递规律的护肝片潜在质量标志物。在此基础上, 采用主成分分析筛选出对护肝片质量影响较大的成分, 确定为关键质量标志物。最后, 基于 PPI 分析筛选出的 2 个关键靶点 AKT1 和 JUN, 采用表面等离子体共振 (SPR) 技术验证护肝片关键质量标志物与关键靶点的结合。 **结果** 柴胡皂苷 b_2 、绿原酸、(R, S)-告依春、五味子成分组合物 (五味子甲素、五味子丙素、五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲)、甘氨酸猪去氧胆酸在相应药材 - 成药中平均转移率分别为 $(23.4 \pm 11)\%$ 、 $(2.65 \pm 1.4)\%$ 、 $(22.6 \pm 13)\%$ 、 $(7.39 \pm 3.0)\%$ 、 $(59.8 \pm 8.9)\%$ 。主成分分析结果显示柴胡皂苷 b_2 、甘氨酸猪去氧胆酸和五味子成分组合物是对护肝片整体质量影响较大的指标成分。SPR 技术测得柴胡皂苷 b_2 、甘氨酸猪去氧胆酸、五味子甲素、五味子丙素、五味子醇甲、五味子醇乙和五味子酯甲与 AKT1 的亲动力学参数 K_D 值分别为 0.0349、3230、0.737、0.0659、0.248、441、 $0.474 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 与 JUN 的亲动力学参数 K_D 值分别为 0.0387、3.45、198、382、105、0.0395、 $0.643 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 不同的靶点蛋白所结合的关键质量标志物存在差异。 **结论** 基于量值传递规律, 结合主成分分析、SPR 技术, 发现柴胡皂苷 b_2 、甘氨酸猪去氧胆酸为护肝片关键质量标志物, 五味子甲素、五味子丙素、五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲为护肝片组合质量标志物。

关键词: 护肝片; 质量标志物; 量值传递; 主成分分析; 表面等离子体共振

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)05-1262-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.014

Screening of key quality markers for Hupan tablets based on quantitative value transfer-multivariate statistical analysis-affinity interaction

LI Miao, WANG Ying-yue, ZHANG Na, WANG Ying, LUO Gan*, GAO Xiao-yan* (School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488)

Abstract: Objective To screen the key quality markers for Hupan tablets based on 9 index components to improve their quality standard. **Methods** Nine index components were quantified in the medicinal materials, intermediates, and Chinese patent medicines of Hupan tablets. Their transfer rates in the manufacturing process of medicinal materials-intermediates-Chinese patent medicines were determined. The potential quality markers of Hupan tablets were verified, and principal component analysis was used to screen the components with great impact on the quality of Hupan tablets as the key quality markers. Then, two key targets were selected based on PPI analysis, and the binding interactions between the key quality markers and the key targets of Hupan tablets were verified with surface plasmon resonance (SPR). **Results** The average transfer rates from medicinal materials to Chinese patent medicines of saikosaponin b_2 , chlorogenic acid, (R, S)-goitrin, schisandra chinensis ingredient combination (schisandrol A, schisandrol B, schisantherin A, schizandrin A, schisandrin C), and glycohyodeoxycholic acid were $(23.4 \pm 11)\%$, $(2.65 \pm 1.4)\%$, $(22.6 \pm 13)\%$, $(7.39 \pm 3.0)\%$ and $(59.8 \pm 8.9)\%$, respectively. The principal

作者简介: 李苗, 女, 硕士研究生, 主要从事中药分析研究, email: lm15731876830@163.com *通信作者: 高晓燕, 女, 教授, 主要从事中药分析及药效物质研究, email: gaoyaoyan@bucm.edu.cn; 罗赣, 男, 副教授, 主要从事中药质量控制研究, email: luna049@126.com

component analysis showed that saikosaponin b_2 , glycohyodeoxycholic acid and schisandra chinensis ingredient combination were the index components with significant impact on the overall quality of Hugan tablets. The K_D values of saikosaponin b_2 , glycohyodeoxycholic acid, schisandrol A, schisandrol B, schisantherin A, schizandrin A and schisandrin C for AKT1 determined by SPR were 0.0349, 3230, 0.737, 0.0659, 0.248, 441, and $0.474 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, and the K_D values for JUN were 0.0387, 3.45, 198, 382, 105, 0.0395, and $0.643 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. **Conclusion** Based on the transmissibility of quality markers, together with principal component analysis and SPR technology, saikosaponin b_2 , and glycohyodeoxycholic acid are the key quality markers for Hugan tablets. Schisandrol A, schisandrol B, schisantherin A, schizandrin A, and schisandrin C serve as combination quality markers.

Key words: Hugan tablet; quality marker; quantitative value transfer; principal component analysis; surface plasmon resonance

护肝片处方由《伤寒论》中小柴胡汤和茵陈蒿汤化裁而来,含柴胡、茵陈、五味子、板蓝根、猪胆粉和绿豆,具有疏肝理气、健脾消食、降低转氨酶的功效^[1]。目前,《中国药典》中收录的护肝片仅对五味子醇甲进行含量测定^[2],不能全面控制其质量。虽有研究报道护肝片对脂肪肝^[3]、慢性肝炎^[4-5]、药物性肝损伤^[6-7]等具有确切的治疗作用,但药效物质基础和作用机制尚不明确,质量控制标准较为单一,对于提高其临床疗效具有局限性。已有研究建立护肝片中多成分含量测定方法,但绝大部分研究局限于护肝片中单一药材或部分药材成分^[8-9],难以全面测定护肝片指标性成分含量。在此基础上,有研究利用指纹图谱结合化学模式识别全面筛选定量指标成分,将其定为差异性质量标志物^[10],但未见进一步进行含量测定及基于转移率的量值传递规律分析的文献报道,而这正是确保护肝片整体生产过程中质量和疗效一致性的关键。课题组前期利用 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap/MS 技术,对护肝片化学成分进行全面分析,依据质量标志物的特异性、可测性、有效性、复方配伍原则^[11],对护肝片中的化学成分逐级筛选,初步确定了柴胡皂苷 b_2 、绿原酸、(R,S)-告依春、五味子甲素、五味子醇甲、五味子酯甲、五味子醇乙、五味子丙素、甘氨猪去氧胆酸 9 种化学成分为护肝片重要指标成分^[12]。在此基础上,对这 9 种重要指标成分进行含量测定及传递规律分析,明确护肝片的质量标志物及其作用机制,对其生产质量控制及质量标准提高具有重要意义。

量值传递规律通过构建科学、合理、可行的质量追溯体系,能够提高护肝片药材-中间体-成药供应链间的质量控制效率,促进质量评价体系的完善^[13]。多元统计分析已广泛应用于质

量标志物预测^[14-15],其中主成分分析(principal component analysis, PCA)是一种将多个变量通过线性变换以选出较少个数重要变量的多元统计分析方法,通过对多成分的定量测定结果进行提取和降维,能够找出对质量控制具有显著贡献的关键成分^[16]。表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)技术通过共振角变化获得药物与靶标分子之间的亲和力、解离常数等相关参数,是研究分子间相互作用的有力工具^[17]。本课题组前期研究构建的“中药复方-单味药-成分-靶点-通路”网络发现了护肝片与肝病作用的关键靶点,而利用 SPR 技术对网络药理学的预测结果进行验证,可提升预测结果的准确性和可靠性。

因此,本研究以护肝片为对象,明确符合量值传递规律的护肝片潜在质量标志物,并结合 PCA 筛选护肝片关键质量标志物,采用 SPR 亲和力分析对筛选结果进行验证,为中药复方中的质量标志物筛选提供参考。

1 材料

1.1 试药

对照品(R,S)-告依春(批号:DST221201-122)、甘氨猪去氧胆酸(批号:DST220318-136)、柴胡皂苷 b_2 (批号:DSTDC001002)、五味子酯甲(批号:DST230104-012)、五味子甲素(批号:DST230225-008)、五味子丙素(批号:DST-DW001401)(纯度均大于 98%,成都德斯特生物技术有限公司);绿原酸(批号:A22GB158496)、五味子醇乙(批号:P05J9F52197)(纯度均大于 98%,上海源叶生物科技有限公司);五味子醇甲(批号:110857-201815,纯度大于 98%,中国食品药品检定研究院)。蛋白激酶 $B\alpha$ (AKT1)、V-JUN 肉瘤病毒癌基因同源物(JUN)重组蛋白(纯度大于 90%,Cloud-Clone);CM5 传感芯片(思拓凡公司)。

14 批护肝片(批号分别为 202212099、202212109、202212113、202212137、202212159、202212163、202212177、202212184、202212187、202212194、202212195、202212204、202212208、202212209)和原料药材柴胡、茵陈、板蓝根、五味子、猪胆粉以及保肝干膏、五味子干膏等中间体均由黑龙江葵花药业股份有限公司提供,方中各药材经北京中医药大学中药鉴定教研室杨瑶珺教授鉴定为正品。

乙腈、甲醇(色谱纯,赛默飞世尔科技有限公司);磷酸(分析纯,天津市致远化学试剂有限公司);色谱用水为娃哈哈纯净水;微孔滤膜(LM45SX)[赛普锐斯(北京)科技有限公司];Tween-20(上海碧云天生物技术有限公司)。

1.2 仪器

Thermo Fisher Ultimate 3000 高效液相色谱仪,

DAD 检测器, Sorvall ST 8R 高速冷冻离心机(赛默飞世尔科技有限公司); ME155DU 型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; KQ5200DA 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); SE-150 高速粉碎机(永康市圣象电器有限公司); Biacore T200(美国 GE Healthcare 公司)。

2 方法

2.1 护肝片中 9 种重要指标成分含量测定方法的建立

护肝片制备工艺及重要指标成分如图 1 所示,柴胡、茵陈、板蓝根加水煎煮浓缩得保肝浸膏,五味子粗粉经乙醇提取浓缩得五味子浸膏,之后分别与绿豆细粉混匀干燥得保肝干膏、五味子干膏;猪胆粉与上述干膏细粉混匀得护肝粉,加入辅料,制成护肝颗粒,干燥,压制成药片,包糖衣或薄膜衣,最终制得护肝片成药。

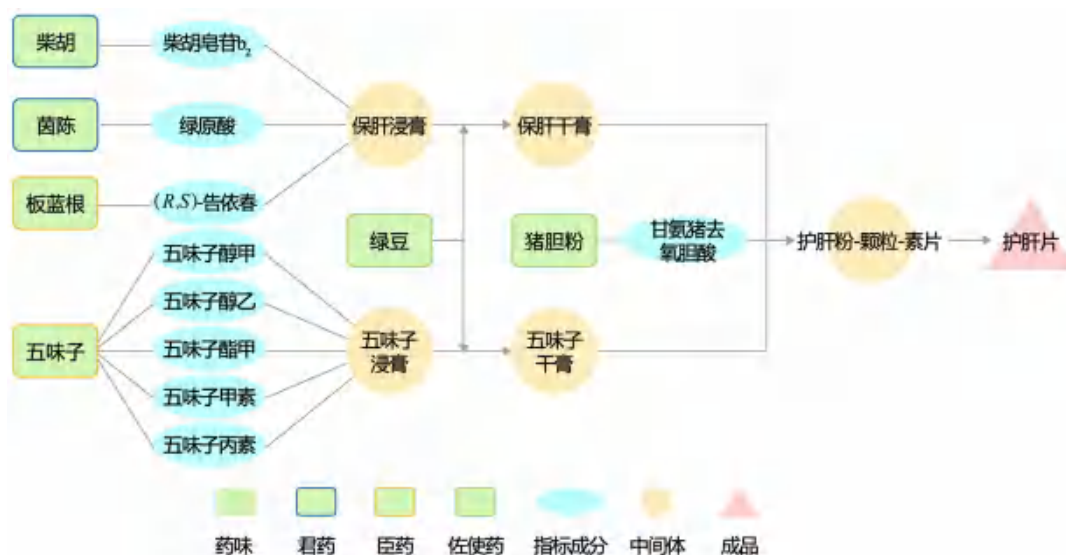


图 1 护肝片制备工艺图

Fig 1 Process diagram for preparing Huguang tablets

2.1.1 色谱条件 护肝片中柴胡皂苷 b_2 、绿原酸、(R, S)-告依春、五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素、五味子丙素、甘氨酸猪去氧胆酸含量测定参考前期建立的方法^[12]。

色谱柱 Thermo Synchronis C_{18} (250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 流动相为 0.3% 磷酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~10 min, 2%~7%B; 10~18 min, 7%B; 18~25 min, 7%~15%B; 25~30 min, 15%B; 30~35 min, 15%~20%B; 35~40 min, 20%~26%B; 40~50 min, 26%~40%B; 50~68 min, 40%~69%B; 68~72 min, 69%B; 72~86 min, 69%~98%B; 86~105 min, 98%B); 柱温 35 $^{\circ}$ C, 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 200 nm 和 250 nm, 进样量 10 μ L。

2.1.2 对照品溶液制备 取柴胡皂苷 b_2 、绿原酸、(R, S)-告依春、五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素、五味子丙素、甘氨酸猪去氧胆酸对照品适量,精密称定,分别置于量瓶中,加甲醇配制成质量浓度分别为 0.200、0.500、0.100、0.500、0.400、0.400、0.300、0.400、3.30 mg·mL⁻¹ 的各对照品储备液;依次取上述对照品储备液适量置于 10 mL 量瓶中,配制成质量浓度分别为 0.0250、0.220、0.0100、0.450、0.150、0.100、0.150、0.0500、1.00 mg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液制备

① 单味药供试品溶液:板蓝根、茵陈、猪胆粉、柴胡、五味子供试品溶液均参照《中国药典》

含量测定项下供试品溶液制备方法制备。

② 保肝浸膏、保肝干膏、五味子浸膏、五味子干膏、护肝粉、护肝颗粒、护肝片素片、护肝片成药供试品溶液：分别取浸膏或粉末（过四号筛）约 2 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，加 70% 甲醇 25 mL，称定重量，超声提取 1 h，放冷，再次称定重量，70% 甲醇补足减失的重量，摇匀，取适量在 14 825 g、4 ℃ 离心 10 min，取上清液。

2.1.4 方法学考察

① 线性关系考察：取“2.1.2”项下各对照品母液分别进行系列浓度稀释，进样测定，记录不同质量浓度对应的峰面积，以对照品溶液质量浓度作为横坐标（ x ），以峰面积为纵坐标（ y ），分别绘制标准曲线，进行线性回归，得到各成分线性方程信息见表 1。结果表明，9 种成分在各自的质量浓度范围内与峰面积线性关系良好。

表 1 9 种指标成分的线性关系考察结果

Tab 1 Linearity of 9 index components

成分	线性方程	r	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
柴胡皂苷 b_2	$y = 0.2667x - 0.0582$	0.9998	0.61 ~ 153
绿原酸	$y = 0.2386x - 4.2531$	0.9990	14.45 ~ 289
(R, S)-告依春	$y = 0.5983x - 0.8200$	1.000	2.58 ~ 258
五味子醇甲	$y = 0.5494x + 9.9466$	0.9991	7.16 ~ 895
五味子醇乙	$y = 0.7921x - 3.0459$	0.9996	6.60 ~ 330
五味子酯甲	$y = 0.9341x - 1.0790$	0.9995	0.76 ~ 192
五味子甲素	$y = 0.6498x - 0.1086$	0.9999	7.74 ~ 774
五味子丙素	$y = 0.7461x + 0.8146$	0.9995	1.65 ~ 165
甘氨酸猪去氧胆酸	$y = 0.0465x - 0.0816$	1.000	59.20 ~ 1480

② 精密度实验：取同一供试品溶液，结果连续进样 6 次，柴胡皂苷 b_2 、绿原酸、(R, S)-告依春、五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素、五味子丙素、甘氨酸猪去氧胆酸峰面积的 RSD 分别为 1.1%、1.2%、2.4%、0.72%、2.1%、1.3%、1.9%、1.5%、1.2%，表明仪器精密度良好。

③ 稳定性实验：取同一供试品溶液，分别于样品制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样检测，结果柴胡皂苷 b_2 、绿原酸、(R, S)-告依春、五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素、五味子丙素、甘氨酸猪去氧胆酸峰面积的 RSD 分别为 1.3%、2.1%、1.5%、1.6%、2.1%、1.3%、1.2%、2.1%、1.1%，表明样品在 24 h 内稳定性良好。

④ 重复性实验：按“2.1.3”项下方法分别平行制备 6 份供试品溶液，进样检测，得到柴胡皂苷 b_2 、绿原酸、(R, S)-告依春、五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素、五味子丙素、甘氨酸猪去氧胆酸峰面积的 RSD 分别为

2.4%、2.3%、3.4%、3.2%、3.5%、3.6%、3.5%、3.8%、2.9%，表明方法重复性良好。

⑤ 加样回收实验：分别以 50%、100%、150% 的对照品加入量进行待测定成分的加样回收率考察，每种浓度平行 3 份，计算加样回收率及其 RSD 。结果显示柴胡皂苷 b_2 、绿原酸、(R, S)-告依春、五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素、五味子丙素、甘氨酸猪去氧胆酸在 50% 浓度下的平均加样回收率在 96.2% ~ 105%， RSD 在 1.3% ~ 4.8%；100% 浓度下的平均加样回收率在 95.1% ~ 105%， RSD 在 0.4% ~ 8.2%；150% 浓度下的平均加样回收率在 95.4% ~ 104%， RSD 在 0.6% ~ 5.8%，表明该方法准确可靠。

2.2 基于 SPR 技术的护肝片潜在质量标志物验证

2.2.1 芯片上蛋白的偶联 精密吸取 AKT1、JUN 蛋白，加无菌磷酸盐缓冲液（PBS）稀释成 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的蛋白母液，取 $1 \mu\text{L}$ AKT1 和 JUN 蛋白溶液，分别加入 $99 \mu\text{L}$ pH 4.0、4.5、5.0 和 5.5 的乙酸钠缓冲液，充分混匀后进行 pH 预实验，流速为 $10 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ ，接触时间为 120 s，以确定缓冲液的最佳 pH 值。

使用预富集实验确定的最佳 pH 值的乙酸钠缓冲液将重组蛋白稀释至 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，注入 SPR 仪器中，通过 EDC/NHS 交联反应将其偶联在 CM5 芯片上，并采用乙醇胺溶液进行封闭。

2.2.2 配体溶液制备 分别称取柴胡皂苷 b_2 、绿原酸、(R, S)-告依春、五味子甲素、五味子醇甲、五味子酯甲、五味子醇乙、五味子丙素、甘氨酸猪去氧胆酸对照品适量，用 DMSO 配成 $4 \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的母液。

2.2.3 潜在质量标志物与关键蛋白亲和力分析 将“2.2.2”项下配制的母液溶解于含有 5% 二甲基亚砜（DMSO）的 PBST（含 Tween-20 的 PBS 缓冲液）中，配制成 $1.5625 \sim 100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的梯度浓度。参数设置结合时间为 120 s，解离时间为 120 s，流速为 $30 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ ；再生过程中，接触时间为 30 s，流速为 $30 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。采用 Biacore Insight Evaluation 软件对实验结果进行分析，所采用的模型为 1:1 稳态亲和力模型。

3 结果与分析

3.1 护肝片中 9 种重要指标成分在药材、中间体和成药中的含量测定结果及传递规律分析

以随行对照品溶液为对照，护肝片中 9 种重要指标成分含量测定色谱图见图 2。计算药材-中间体-成药中重要指标成分的转移率，以转移率考察过程中的传递规律。转移率（%）= $W/M \times 100\%$ ， M 、 W 分别表示指标性成分转移前、后的质量。

各药味重要指标成分在 14 批原料药材、中间

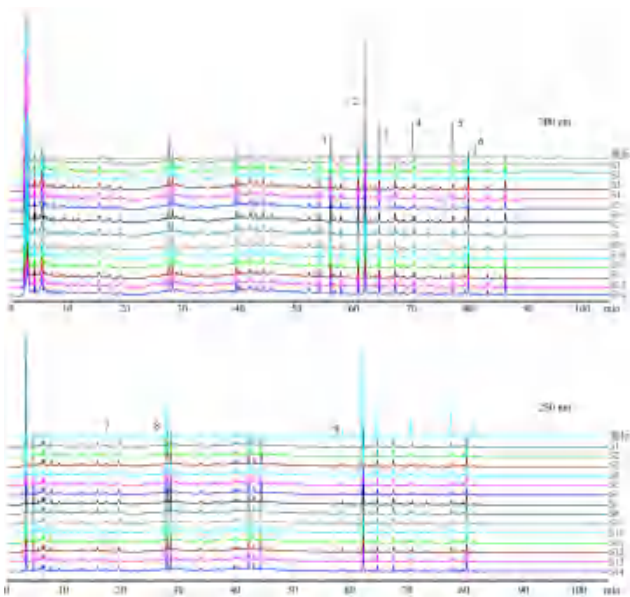


图 2 14 批护肝片 (S1 ~ S14) 和对照品溶液的 HPLC 图
Fig 2 HPLC chromatogram of 14 batches of Huguang tablets (S1 ~ S14) and reference solution

1. 甘氨酸猪去氧胆酸 (glycohyodeoxycholic acid); 2. 五味子醇甲 (schisandrol A); 3. 五味子醇乙 (schisandrol B); 4. 五味子酯甲 (schisantherin A); 5. 五味子甲素 (schizandrin A); 6. 五味子丙素 (schizandrin C); 7. (R, S)-告依春 [(R, S)-goitrin]; 8. 绿原酸 (chlorogenic acid); 9. 柴胡皂苷 b_2 (saikosaponin b_2)

体和护肝片成药中的平均含量及转移率测定结果如表 2 所示。其中, 14 批护肝片成药中柴胡皂苷 b_2 、

(R, S)-告依春、甘氨酸猪去氧胆酸的质量分数范围分别在 0.0088% ~ 0.011%、0.0026% ~ 0.0061%、0.71% ~ 0.91%, 从药材至成药的平均转移率分别为 (23.4±11)%、(22.6±13)%、(59.8±8.9)%, 平均转移率均大于 20%, 且这 3 种成分的转移率均在均值 ±3SD 范围内, 可以稳定传递。五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素、五味子丙素的质量分数范围分别在 0.14% ~ 0.18%、0.042% ~ 0.049%、0.011% ~ 0.014%、0.023% ~ 0.031%、0.051% ~ 0.072%, 从药材至成药的平均转移率分别为 (7.7±3.1)%、(8.14±3.2)%、(5.20±2.2)%、(6.73±3.0)%、(5.77±2.0)%, 转移率小于 20%, 但这 5 种成分均来源于五味子, 考虑到来源于五味子的重要指标成分占比及含量, 即使这 5 种成分的转移率较低, 但其对整体药效的影响可能会通过数量优势占比较大, 故将其作为潜在的组合质量标志物, 其质量分数范围为 0.22% ~ 0.28%, 从药材至成药的平均转移率为 (7.39±3.0)%。绿原酸质量分数范围为 0.090% ~ 0.14%, 转移率为 (2.65±1.4)%, 转移率较低, 不建议作为潜在质量标志物。因此基于质量标志物“传递性”要求, 确定护肝片中柴胡皂苷 b_2 、(R, S)-告依春、五味子成分组合物 (五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子甲素、五味子丙素)、甘氨酸猪去氧胆酸为护肝片潜在质量标志物。

表 2 9 种指标成分在药材 - 中间体 - 成药中的含量及转移率
Tab 2 Content and transfer rates of 9 index components in medicinal materials-intermediates-Chinese patent medicines

成分	各药味重要指标成分含量 /%							各药味重要指标成分转移率 /%						
	药材	浸膏	干膏	护肝粉	护肝颗粒	护肝片素片	护肝片成药	药材 - 浸膏	浸膏 - 干膏	干膏 - 护肝粉	护肝粉 - 护肝颗粒	护肝颗粒 - 护肝片素片	护肝片素片 - 护肝片成药	药材 - 肝片成药
柴胡皂苷 b_2	0.054	0.026	0.012	0.013	0.014	0.013	0.0097	43.5	49.4	144	104	97.7	75.8	23.4
绿原酸	5.12	0.52	0.16	0.16	0.16	0.16	0.11	8.24	35.0	132	102	104	70.1	2.65
(R, S) 告依春	0.021	0.011	0.0065	0.0050	0.0047	0.0045	0.0038	41.0	70.8	101	97.9	95.4	86.1	22.6
五味子醇甲	5.12	0.96	1.07	0.23	0.20	0.20	0.17	7.14	141	114	87.0	102	82.5	7.70
五味子醇乙	1.31	0.65	0.28	0.063	0.054	0.055	0.046	18.5	54.3	116	85.6	106	83.2	8.14
五味子酯甲	0.59	0.12	0.091	0.018	0.018	0.016	0.013	7.86	93.2	101	106	107	83.6	5.20
五味子甲素	0.1	0.53	0.18	0.038	0.033	0.033	0.027	20.9	42.2	107	86.5	103	82.3	6.73
五味子丙素	0.25	0.20	0.071	0.0095	0.0086	0.0081	0.0065	29.0	43.5	69.6	91.6	97.3	80.6	5.77
甘氨酸猪去氧胆酸	23.2	/	/	1.48	1.00	1.02	0.81	/	/	/	68.3	101	79.9	59.8

注: 护肝片制备工艺流程中, 干膏、浸膏的制备未使用猪胆粉末, 因此干膏、浸膏中甘氨酸猪去氧胆酸的含量数据空缺, 用“/”表示。
Note: During the preparation of Huguang tablets, Pulvis Fellis Suis was not used in making the dry paste or paste. Therefore, glycohyodeoxycholic acid resulting in missing data represented by “/”.

3.2 基于 PCA 的护肝片关键质量标志物筛选
以 14 批样品中柴胡皂苷 b_2 、(R, S)-告依春、五味子成分组合物、甘氨酸猪去氧胆酸的峰面积为变量, 导入 Metware Cloud 网站, 进行 PCA (见图 3)。PCA 得分图显示, 不同批次间质量标

志物含量无明显差异, 进一步表明 14 批护肝片样品质量稳定。以累计贡献率 > 80% 作为判定依据, 提取到 3 个主成分, 其累计方差贡献率为 89.05%, 表明这 3 个主成分可以代表 89.05% 的质量标志物峰面积信息 (见图 4)。根据各成分色

谱峰面积在 3 个主成分上的载荷值，可提取出每个主成分所反映的信息（见表 3）。柴胡皂苷 b₂、甘氨猪去氧胆酸是对第一主成分影响较大的特征向量，主要与柴胡和猪胆粉有关；五味子成分组合物是对第二主成分影响较大的特征向量，主要与五味子有关。在“3.1”项下筛选的潜在质量标志物基础上，结合 PCA 分析，发现柴胡皂苷 b₂、甘氨猪去氧胆酸和五味子成分组合物是对护肝片整体质量影响较大的指标成分。

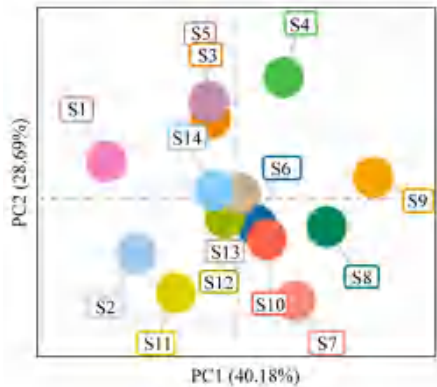


图 3 14 批 (S1 ~ S14) 护肝片样品的 PCA 得分图
Fig 3 PCA score plot of 14 batches of Hupan tablets (S1 ~ S14)

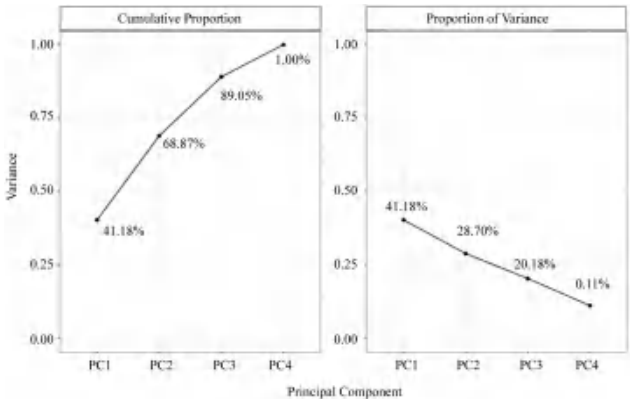


图 4 护肝片中各个主成分因子方差贡献率
Fig 4 Variance contribution rate of principal component factors in Hupan tablets

表 3 护肝片中主成分因子载荷矩阵

Tab 3 Principal component factor loading matrix of Hupan tablets

质量标志物	主成分一	主成分二	主成分三
(R, S)-告依春	- 0.467	0.448	- 0.668
甘氨猪去氧胆酸	- 0.654	- 0.283	- 0.113
柴胡皂苷 b ₂	- 0.593	- 0.099	0.623
五味子成分组合物	0.041	- 0.842	- 0.391

3.3 基于 SPR 的护肝片关键质量标志物与关键靶点蛋白的亲合力验证

以护肝片治疗的常见肝病为疾病模型，建立“中药复方-单味药-成分-靶点-通路”网络，揭示其复杂的相互作用；利用相应的数据库，获得了血清中 26 种成分的 597 个潜在靶点，并收

集了 1762 个与肝脏疾病相关的人类靶点。将化合物的靶点与疾病靶点相交，形成 213 个重叠靶点，并根据它们的相互作用建立蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络。其中，排名前 4 位的靶点蛋白为 AKT1、TNF、EGFR、JUN^[12]。根据网络药理学筛选和现代生物医学对肝病相关通路分析，PI3K-AKT 信号通路是其主要作用的信号通路之一。研究表明，AKT1 是细胞信号传导途径中的一个关键分子，在多种细胞生长过程中发挥关键作用，参与调控肝细胞癌变进程^[18-19]；JUN 是细胞增殖、分化和凋亡过程中发挥关键作用的调控因子，TNF 和 EGFR 均可通过调控 PI3K-AKT 信号途径将增殖信号和抗凋亡信号传递给 JUN 蛋白^[20-21]，参与多种疾病发生发展过程。文献也表明 JUN 靶点成为肝病领域研究的热点^[22]。因此本文选择 AKT1 和 JUN 作为护肝片的候选蛋白靶点，构建 Q-Marker 筛选模型。

为了确定 AKT1 和 JUN 蛋白在芯片上的最佳偶联条件，首先对芯片进行蛋白的预富集。由图 5 可知，pH 值为 4.0 时 AKT1 和 JUN 蛋白响应值最高，在后续实验中，选择 pH 为 4.0 的乙酸钠缓冲液进行偶联。

通过计算机拟合，检测了柴胡皂苷 b₂、五味子甲素、五味子丙素、五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、甘氨猪去氧胆酸等关键质量标志物与 AKT1、JUN 间的亲和力，结果见表 4，K_D 反映了分子结合的强度，根据与 AKT1、JUN 的亲合力大小对指标成分进行排序。排名第一的柴胡皂苷 b₂ 与 AKT1、JUN 蛋白结合的传感信号图与拟合曲线图见图 6，K_D 值分别为 0.0349 μmol·L⁻¹、0.0387 μmol·L⁻¹。

表 4 护肝片中关键质量标志物与靶点蛋白的亲合力

Tab 4 Affinities of key quality markers compounds in Hupan tablets with target protein

化学成分	与 AKT1 间的亲合力		与 JUN 间的亲合力	
	K _D / (μmol·L ⁻¹)	R _{max} /RU	K _D / (μmol·L ⁻¹)	R _{max} /RU
柴胡皂苷 b ₂	0.0349	32.72	0.0387	18.62
甘氨猪去氧胆酸	3230	11.88	382	4.06
五味子甲素	0.737	22.95	105	3.57
五味子醇甲	0.248	5.38	0.643	6.52
五味子醇乙	441	7.59	198	4.52
五味子丙素	0.0659	21.34	0.0395	3.53
五味子酯甲	0.474	27.61	3.45	5.58

SPR 结果显示护肝片存在多靶点的作用途径。绿原酸在质量传递规律分析中发现其转移率较低，(R, S)-告依春在 PCA 分析中发现其对护肝片整体质量影响较小，因此仅对其余指标成

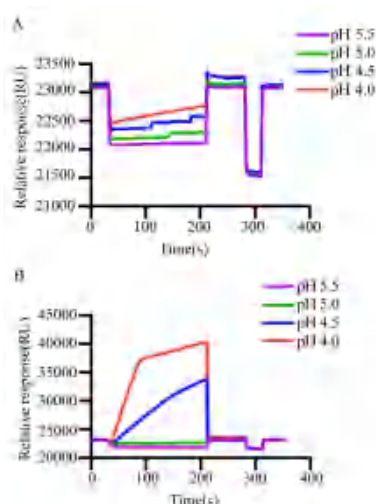
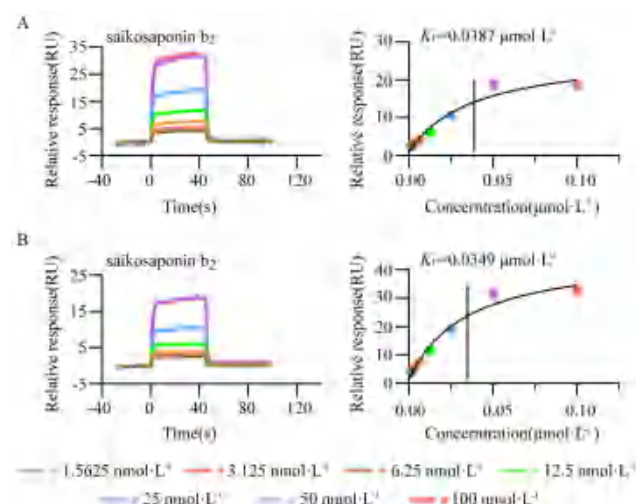


图 5 AKT1 (A) 和 JUN (B) 蛋白的 pH 筛选考察结果

Fig 5 pH scouting results of AKT1 (A) and JUN (B) proteins

图 6 柴胡皂苷 b_2 与 AKT1 蛋白 (A)、JUN 蛋白 (B) 的 SPR 亲和力和测试结果Fig 6 SPR analysis of saikosaponin b_2 and AKT1 (A) and JUN (B)

分即护肝片关键质量标志物与关键靶点蛋白进行了 SPR 亲和力验证。基于 AKT1 靶点蛋白, 发现了与其亲和力强的指标成分包括柴胡皂苷 b_2 、五味子丙素、五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素, 而五味子醇乙、甘氨酸猪去氧胆酸与其亲和力较弱; 基于 JUN 靶点蛋白, 发现了与其亲和力强的指标成分包括柴胡皂苷 b_2 、五味子醇乙、五味子酯甲、甘氨酸猪去氧胆酸, 而五味子醇甲、五味子甲素、五味子丙素与其亲和力较弱。

4 讨论

4.1 重要指标成分选择依据

以君臣佐使配伍原则为序, 进行指标成分选择。在《中国药典》^[2] 所收载的药材和饮片中, 柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、绿原酸、(R, S)-告依春分别为君药柴胡、茵陈, 臣药板蓝根的指标成

分, 其中柴胡药材在煎煮过程中, 柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 会发生转化, 生成柴胡皂苷 b_2 ^[23]。且课题组前期建立护肝片特征图谱时也发现, 未检测到柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d^[12], 推测柴胡煎煮后皂苷类成分发生了转化, 故将柴胡皂苷 b_2 、绿原酸、(R, S)-告依春作为护肝片的重要指标成分。五味子醇甲、五味子酯甲为《中国药典》规定的臣药五味子指标性成分, 联苯环烯辛木脂素类成分为五味子属植物的特征性成分, 而五味子甲素是联苯环烯辛木脂素类产生的直接前体, 其结构修饰进一步产生的五味子醇甲、五味子醇乙和五味子丙素均考虑作为护肝片的重要指标成分。佐使药猪胆粉基于有效性原则选择甘氨酸猪去氧胆酸作为指标成分, 同时护肝片指纹图谱中未发现绿豆的专属性成分, 因此未选择绿豆药味的指标成分。基于以上内容, 确定了护肝片 9 种重要指标成分: 柴胡皂苷 b_2 、绿原酸、(R, S)-告依春、五味子甲素、五味子醇甲、五味子酯甲、五味子醇乙、五味子丙素、甘氨酸猪去氧胆酸。

4.2 量值传递规律分析

在护肝片重要指标成分含量测定过程中, 系统误差、随机误差均有可能出现, 但可以通过多种方式减少误差。如将实验室环境温度控制在 20 ~ 30 °C 内, 确保 HPLC 仪器的稳定性和检测结果的准确性; 确保供试品处理过程中遵循标准化的操作程序, 减少操作者由于技术问题带来的误差; 在色谱峰积分时, 不同的基线校正方法会对峰面积的计算产生影响, 进而影响含量的计算, 选择适当的积分方法并统一分析标准。尽管已对可能出现的误差进行了控制, 在护肝片潜在质量标志物传递规律研究中, 仍发现 (R, S)-告依春在药材、中间体、成药中含量差异较大。有研究表明, (R, S)-告依春仅在 (25 ± 2) °C、相对湿度 (65 ± 5) % 条件下基本稳定^[24], 温度湿度要求较高。煎煮条件、加入辅料^[25] 等均可能导致护肝片制备过程中 (R, S)-告依春含量、转移率发生变化。绿原酸从药材到保肝浸膏的转移率较低, 可能是因绿原酸加热易分解, 长时间煎煮使其含量降低^[26]。后期生产可考虑适当剔除部分批次转移率过低的药材来保证量值传递的均一性。

4.3 局限性

本研究仅对同一厂家不同批次的护肝片进行量值传递规律研究, 样品选择的代表性有限, 而同一厂家不同批次、不同厂家间药品的质量一致性是确保临床疗效稳定可靠与临床试验结果可重复的重要前提^[27-28], 因此后续会进一步探究不同厂家护肝片中关键质量标志物的质量差异, 提高

样品选择的代表性。除此之外,本研究仅在传统网络药理学预测护肝片治病靶点的基础上,利用 SPR 初步验证了护肝片质量标志物可能作用的靶点,但未体现下游生物效应的表达情况,后续会进一步建立动物模型探究护肝片质量标志物治疗肝病的药效与作用机制,验证通路蛋白表达情况,探究关键靶点相关作用机制。

5 结论

综上,本实验通过测定各单味药材、中间体、成药中重要指标成分的含量,以药材投入配方的处理过程为序,逐级进行药材-中间体-成药量值传递规律研究。结合 PCA、SPR 技术筛选发现柴胡皂苷 b_2 、甘氨酸去氧胆酸为护肝片关键质量标志物,五味子甲素、五味子丙素、五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲为护肝片组合质量标志物。

参考文献

- [1] 刘垲,王融冰,谢雁鸣,等.护肝片临床应用专家共识[J].中国中药杂志,2019,44(14):2943-2946.
- [2] 中国药典 2020 年版.一部[S].2020:1031.
- [3] 毛蕾.水飞蓟宾胶囊治疗酒精性脂肪 30 例的疗效观察[J].世界最新医学信息文摘,2016,16(68):140.
- [4] 董亚云,向阳.护肝片联合恩替卡韦对老年慢性乙型肝炎患者疗效观察及对内皮功能和肝纤维化的影响[J].中国老年学杂志,2019,39(20):4990-4992.
- [5] 朴美善,李宪.恩替卡韦联合护肝片对慢性乙型肝炎治疗效果观察[J].中国社区医师,2018,34(22):42-43.
- [6] Li J, Zhang JZ, Xu XR, et al. Huan tablets for the treatment of RUCAM based drug-induced liver injury: a propensity score matching analysis using a nationwide database [J]. Expert Rev Clin Phar, 2021, 14(12): 1543-1550.
- [7] 康钦思.护肝片防治抗结核药物肝损害的临床效果分析[J].中国现代药物应用,2019,13(3):111-113.
- [8] 赵志远,张金朋,赵硕,等.UPLC 法同时测定护肝片中 8 种五味子木脂素的含量[J].中成药,2024,46(1):10-14.
- [9] 邹惠亮,陈柯,陈敏,等.HPLC-DAD 双波长法测定护肝片中 5 个柴胡皂苷的含量[J].药物分析杂志,2019,39(12):2248-2253.
- [10] 杨琳,李廷利.基于 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别的护肝片质量控制研究[J].中草药,2019,50(14):3351-3356.
- [11] 张铁军,白钢,陈常青,等.基于“五原则”的复方中药质量标志物(Q-Marker)研究路径[J].中草药,2018,49(1):1-13.
- [12] Jiang YH, Chen MY, Gang HC, et al. A funnel-type step-wise filtering strategy for identification of potential Q-markers of traditional Chinese medicine formulas [J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1143768.
- [13] 蔡璐瑶,柳思洋,郑云枫,等.HPLC-UV-ELSD 法研究经典名方泽泻汤的量值传递规律[J].中草药,2024,55(13):4373-4385.
- [14] 历帅帅,李鹏飞,任萃姣,等.网络药理学结合指纹图谱与多元统计分析预测蟾皮质量标志物[J].中成药,2024,46(4):1272-1278.
- [15] 李泽,杜鹤,解玉军,等.基于多元统计分析和网络药理学的炒酸枣仁饮片质量标志物预测分析[J].中草药,2021,52(16):4811-4824.
- [16] 叶霖,李睿旻,曾华武,等.基于整体观中药质量标志物的发现及研究进展[J].中草药,2019,50(19):4529-4537.
- [17] Homola J, Vaisocherová H, Dostálék J, et al. Multi-analyte surface plasmon resonance biosensing [J]. Methods, 2005, 37(1): 26-36.
- [18] Liu GJ, Wang NN, Zhang CZ, et al. Fructose-1, 6-bisphosphate aldolase B depletion promotes hepatocellular carcinogenesis through activating insulin receptor signaling and lipogenesis [J]. Hepatology, 2021, 74(6): 3037-3055.
- [19] Shearer AM, Wang YL, Fletcher EK, et al. PAR2 promotes impaired glucose uptake and insulin resistance in NAFLD through GLUT2 and Akt interference [J]. Hepatology, 2022, 76(6): 1778-1793.
- [20] Song JJ, Liu YP, Wan J, et al. SIMPLE is an endosomal regulator that protects against NAFLD by targeting the lysosomal degradation of EGFR [J]. Hepatology, 2021, 74(6): 3091-3109.
- [21] Zong C, Meng Y, Ye F, et al. AIF1⁺ CSF1R⁺ MSCs, induced by TNF- α , act to generate an inflammatory microenvironment and promote hepatocarcinogenesis [J]. Hepatology, 2023, 78(2): 434-451.
- [22] Wang JY, Ma JP, Nie HY, et al. Hepatic regulator of G protein signaling 5 ameliorates nonalcoholic fatty liver disease by suppressing transforming growth factor beta-activated kinase 1-c-Jun-N-terminal kinase/p38 signaling [J]. Hepatology, 2021, 73(1): 104-125.
- [23] 刘树强,王术玲,高晓玲,等.柴胡水煎过程中皂苷成分的变化规律[J].中药新药与临床药理,2013,24(6):602-606.
- [24] 方宇,张昀,李钦.感冒解毒灵颗粒中(R,S)-告依春的稳定性的研究[J].中成药,2013,35(7):1484-1486.
- [25] 韩文凯,曹帅,李丽敏,等.复方板蓝根颗粒中(R,S)-告依春稳定性的研究[J].时珍国医国药,2022,33(6):1369-1372.
- [26] 孙阳,黄和,胡焱.绿原酸提取纯化方法的研究进展[J].化学试剂,2017,39(3):257-262.
- [27] 张贻昌,王明耿.中药产品质量过程控制的重要性[J].中成药,2012,34(8):1581-1585.
- [28] 张明华,顾俊菲,封亮,等.中药“多维结构过程动态质量控制体系”的研究策略和实践[J].中国中药杂志,2013,38(21):3608-3612.

(收稿日期:2024-12-23;修回日期:2025-02-25)

髓母细胞瘤患儿尿液代谢组学研究

时正媛¹, 杨春静¹, 续茜桥¹, 宝丽¹, 武万水², 姜德春¹ (1. 首都医科大学附属北京世纪坛医院药学部, 北京 100038; 2. 首都医科大学附属北京世纪坛医院儿科, 北京 100038)

摘要: 目的 运用代谢组学方法分析髓母细胞瘤患者和其他类型的脑恶性肿瘤患者尿液代谢物的差异, 为髓母细胞瘤的鉴别诊断提供依据。**方法** 采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱检测髓母细胞瘤患儿 ($n = 20$) 和其他类型的脑恶性肿瘤患儿 ($n = 27$) 的尿液中小分子代谢物。通过搜索参考库和正交偏最小二乘判别分析, 鉴定差异表达代谢物。**结果** 两组的代谢谱分离良好, 共鉴定了 10 个与髓母细胞瘤相关的差异代谢物, 它们可能在苯丙氨酸代谢、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成、甘油磷脂代谢中发挥作用。**结论** 该方法可区分髓母细胞瘤和其他颅内肿瘤, 鉴定的代谢物有望成为鉴别诊断的潜在生物标志物。

关键词: 髓母细胞瘤; 尿液代谢组学; 超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱; 诊断; 潜在生物标志物

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)05-1270-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.015

Urine metabolomics in pediatric medulloblastoma

SHI Zheng-yuan¹, YANG Chun-jing¹, XU Xi-qiao¹, BAO Li¹, WU Wan-shui², JIANG De-chun¹ (1. Department of Pharmacy, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038; 2. Department of Pediatrics, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038)

Abstract: Objective To analyze the difference in urine metabolites between medulloblastoma and other types of brain malignant tumors by metabolomics, and to provide evidence for early differential diagnosis of medulloblastoma. **Methods** Ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry was used to detect small molecular metabolites in the urine of a medulloblastoma group ($n = 20$) and a non-medulloblastoma group ($n = 27$). Differentially expressed metabolites were identified by searching reference library and orthogonal partial least squares discriminant analysis. **Results** The metabolic profiles of the two groups were well separated, and 10 medulloblastoma-related differential metabolites were identified, which might play some role in phenylalanine metabolism, phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis and glycerophosphate metabolism. **Conclusion** This method can distinguish medulloblastoma from other intracranial tumors sensitively and specifically, and the identified metabolites may become potential biomarkers in differential diagnosis.

Key words: medulloblastoma; urine metabolomics; UPLC-Q-TOF-MS; diagnosis; potential biomarker

髓母细胞瘤 (medulloblastoma, MB) 是儿科患者中常见的中枢神经系统恶性肿瘤, 恶性程度高, 在所有儿童中枢神经系统肿瘤的发病率中位居第二, 对儿童健康影响极大^[1-4]。儿童 MB 与星形细胞瘤、室管膜瘤等其他颅内肿瘤在临床症状和发病年龄上具有相似性, 鉴别比较困难。常规

MRI 平扫+增强是目前诊断 MB 最常用的方法, 但其诊断准确率低, 对临床诊疗仅起参考作用, 目前还没有可用于区别诊断的代谢组学生物标志物^[5-9]。尿液的收集具有易获得、非侵害性、体积限制小等特点, 已经越来越多地被用于代谢组学的研究中。因此在尿液中寻找肿瘤生物标志物将

基金项目: 首都医科大学附属北京世纪坛医院科研基金项目 (No.2022-C06)。

作者简介: 时正媛, 女, 副主任药师, 主要从事基于液质联用的代谢组学研究, email: zhengyuan9999@126.com

有助于 MB 的鉴别诊断, 并且对于预后判断、监测肿瘤复发及治疗也有着重要的临床意义。

尿液含有丰富的代谢物信息, 如氨基酸、脂类、糖类、激素、有机酸等内源性代谢物, 超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱 (UPLC-Q-TOF-MS) 具有分辨率高、灵敏度高、代谢物覆盖范围广等特点, 可以实现对未知代谢物的定性分析, 已经成为非靶标代谢组学研究中不可或缺的工具。本研究以尿液样本为研究对象, 建立基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的非靶标代谢组学分析方法, 分析 MB 和其他颅内肿瘤患儿尿液中的差异代谢物, 为 MB 鉴别诊断提供依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

确诊 MB 的患者和其他类型的脑恶性肿瘤患者, 来自首都医科大学附属北京世纪坛医院儿科, 所有样本获取及使用过程均获伦理委员会批准 [伦理批件号为 sjtkyll-lx-2021 (21)] 及患者父母知情同意。纳入标准: 年龄小于 14 岁, 临床资料齐全, 有完整可靠的手术记录, 病理结果为 MB。排除标准: 肿瘤有中枢外转移; 合并影响全身炎症反应标志物的疾病或用药 (如感染、自身免疫性疾病等); 病历资料不完整或失访。其他类型的脑恶性肿瘤的纳入标准: 年龄小于 14 岁, 临床资料齐全, 有完整可靠的手术记录, 病理结果为除 MB 以外的其他颅内肿瘤的患儿。排除标准: 肿瘤有中枢外转移; 合并影响全身炎症反应标志物的疾病或用药 (如感染、自身免疫性疾病等); 病历资料不完整或失访。对于所有受试者, 尿液样本取样时间为夜间禁食至少 10 h, 收集清晨空腹尿液样本, 并储存于 -80°C 冰箱中, 直至完成分析。从患者病历中回顾性收集患者的信息和实验室检测值。

1.2 尿液样本提取方法

取 100 μL 尿液高速离心 20 min (4°C 、14 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$) 去除杂质, 取 50 μL 按照 1:2 的比例加水稀释后, 进样 2 μL 检测分析。

1.3 QC 样本的制备

从每份尿样中取等体积混合, 按“1.2”项下方法进行前处理。制备足够体积分量的 QC 样本穿插分析于整个分析批中。

1.4 色谱条件

ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm) (美国 Waters); 柱温: 40°C ; 进样器温度: 4°C ; 进样量: 5 μL ; 流动相 A: 0.1% 甲酸水溶液; 流动相 B: 0.1% 甲酸乙腈溶液; 流速: 0.5

$\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 梯度洗脱 (0 ~ 1.0 min, 1%B; 1.0 ~ 3.0 min, 1% ~ 15%B; 3.0 ~ 6.0 min, 15% ~ 50%B; 6.0 ~ 9.0 min, 50% ~ 95%B; 9.0 ~ 10.0 min, 95%B; 10.0 ~ 10.1 min, 95% ~ 1%B)。

1.5 质谱条件

采用 Xevo G2-S Q-TOF 串联四极杆飞行时间质谱系统及电喷雾离子源 (ESI), 在正、负离子模式下分别检测。数据采集方式为全信息质谱数据采集 (MS^E)。采集速率为 0.25 s, 扫描范围为 m/z 50 ~ 1200, 质量偏差为 50 ppm ($\times 10^{-6}$), 毛细管电压: 2/-2 kV; 锥孔电压: 30 V; 离子源电压: 30 V; 离子源温度: 120°C ; 去溶剂气温度: 500°C ; 锥孔气流速: 50 $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$; 去溶剂气流速: 800 $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

按相关 SOP 配制 200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的亮氨酸脑啡肽 (LE) 和 0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甲酸钠溶液, 在选定模式下对仪器进行校正, 完成 Detector Check/Setup; LockSpray Check/Setup 和 Calibration Check/Setup 后, 保证仪器状态稳定, 然后对样品进行检测。

1.6 数据分析

把原始数据导入 Progenesis QI 软件进行数据预处理, 获得质荷比 (m/z) 联合保留时间 (t_R) 标识的峰强度的数据矩阵。应用 MetaboAnalyst 5.0 在线分析数据库建立主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 多元统计分析模型, 根据多变量与单变量统计的筛选标准, 通过 OPLS-DA 模型得 VIP 值, t 检验的 P 值和 FC 值来筛选差异性代谢物, 根据 $VIP > 1.0$, $P < 0.05$, $FC > 2.0$ 或 $FC < 0.5$ 的标准, 筛选后在公共数据库 HMDB 中进行一级与二级质谱片段的比对, 确定差异代谢物结构与分子式^[10]。根据上述步骤, 筛选并鉴定差异代谢物。应用 MetaboAnalyst 5.0 平台对差异代谢物进行初步代谢通路分析, 并根据文献调研和受试者工作特征曲线 (ROC curve) 分析把与代谢通路相关的差异代谢物确定为候选生物标志物^[11]。

2 结果

2.1 临床基线结果

本研究共纳入 47 名儿童颅内肿瘤患者, 包括 MB 20 例, 其他颅内肿瘤 27 例, 其临床基线特征无明显的组间差异, 数据汇总见表 1。

2.2 代谢谱分析

PCA 用于研究代谢物的天然分布情况, MB 组和其他颅内肿瘤 (Con) 组的 PCA 图见图 1。如图 1 所示, 尿液样本在不同生理状态下分布在不同区域, 说明代谢物成分和浓度存在差异, 揭示了颅内肿瘤会引起患儿代谢途径的紊乱。PCA 图

表 1 各组临床基线特征
Tab 1 Clinical characteristics of the patient cohort

变量	其他颅内肿瘤组 (n = 27)	MB 组 (n = 20)	P
年龄 / 岁	7.44±2.72	8.15±3.23	0.422
体重 /kg	28.30±12.28	29.09±11.86	0.996
身高 /cm	128.07±17.11	128.05±19.35	0.827
谷丙转氨酶 / (U·L ⁻¹)	17.22±10.00	27.75±12.02	0.002
谷草转氨酶 / (U·L ⁻¹)	21.51±4.85	28.10±9.66	0.010
总蛋白 / (g·L ⁻¹)	67.49±5.78	68.55±5.09	0.516
白蛋白 / (g·L ⁻¹)	41.78±7.05	42.94±3.01	0.498
球蛋白 / (g·L ⁻¹)	23.25±4.65	29.51±35.28	0.388
尿酸 / (μmol·L ⁻¹)	294.52±59.00	326.60±88.59	0.143
尿素氮 / (mmol·L ⁻¹)	5.03±1.18	4.31±1.18	0.043
血清肌酐 / (μmol·L ⁻¹)	38.22±11.30	36.15±9.07	0.504
肌酐清除率 / (mL·min ⁻¹)	175.85±23.72	178.20±22.59	0.734
白细胞 / (×10 ⁹ ·L ⁻¹)	5.31±2.15	4.01±1.32	0.014
红细胞 / (×10 ¹² ·L ⁻¹)	4.17±0.75	3.40±0.47	< 0.001
血红蛋白 / (g·L ⁻¹)	122.21±18.26	110.58±12.36	< 0.001
红细胞平均体积 /fL	89.96±5.78	90.63±6.82	0.721
血小板计数 / (×10 ⁹ ·L ⁻¹)	279.21±103.09	295.37±218.51	0.737

中 QC 样本聚集在一起,表明数据采集的准确可靠。与 PCA 结果相比,OPLS-DA 模型能更清楚地展示 MB 组与其他颅内肿瘤组之间的差异。两组间 OPLS-DA 得分图和差异代谢物的火山图见图 2,两组有明显的分离趋势,这意味着两组之间的代谢谱存在显著差异。模型验证结果显示, $R^2 = (0.0, 0.992)$ 、 $Q^2 = (0.0, -0.664)$,模型可靠不存在过拟合。

2.3 差异代谢物筛选和代谢通路分析

最终共鉴定出 61 个在 MB 患者和其他颅内肿瘤患者中差异明显的代谢物,分别属于氨基酸类、脂肪酸类、有机酸类和脂类物质,其中有 14 个

在 MB 患者中明显升高,47 个代谢物在 MB 患者中明显降低,部分差异代谢物的热图如图 3 所示。将鉴定的 61 个差异代谢物导入 MetaboAnalyst 5.0 平台进行代谢通路富集与分析,血浆差异代谢途径如图 4 所示。差异代谢物改变最显著的代谢通路分别是苯丙氨酸代谢、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成、甘油磷脂代谢。

对于组间具有显著性差异的代谢物,用 ROC 评价了诊断效果,同时满足 AUC 大于 0.7、文献调研中与 MB 关系密切、与最相关代谢通路密切相关的 10 个差异代谢物被确定为候选生物标志物,用于进一步验证,具体信息如表 2 所示。

表 2 MB 组与其他颅内肿瘤组尿液中潜在差异生物标志物
Tab 2 Potential biomarkers of urine samples from MB and other intracranial tumors patients

No.	保留时间 /min	m/z	代谢物	P	AUC	相关代谢通路
1	3.81	160.0977	酪胺	0.0085	0.8000	酪氨酸代谢
2	2.17	258.1091	甘油磷酸胆碱	0.0015	0.7630	甘油磷脂代谢
3	2.73	231.1340	L-脯氨酸	0.0008	0.7889	精氨酸和脯氨酸代谢
4	2.60	295.1386	甲羟戊酸	0.0087	0.8074	萜类骨架生物合成
5	2.83	227.1023	胆色素原	0.0429	0.7074	卟啉和叶绿素代谢
6	2.08	221.0916	5-羟基-L-色氨酸	0.0002	0.8056	色氨酸代谢
7	0.71	176.1026	瓜氨酸	0.0289	0.7167	精氨酸生物合成
8	2.09	166.0717	L-苯丙氨酸	0.0270	0.7315	苯丙氨酸代谢
9	1.83	121.0644	苯乙醛	0.0006	0.8074	苯丙氨酸代谢
10	5.14	480.3106	溶血磷脂酰胆碱 (15: 0)	0.0002	0.8833	甘油磷脂代谢

3 讨论

在所涉及的各种样本类型中,尿液和血液是最常被用于人体代谢组学研究的^[12]。血清样本(微创)

提供即时收集的代谢组,而尿样(非侵入性)包含平均一段时间内的代谢组学变化,能够汇集大量的疾病相关变化,从而更好地反映早期微小的变化,是

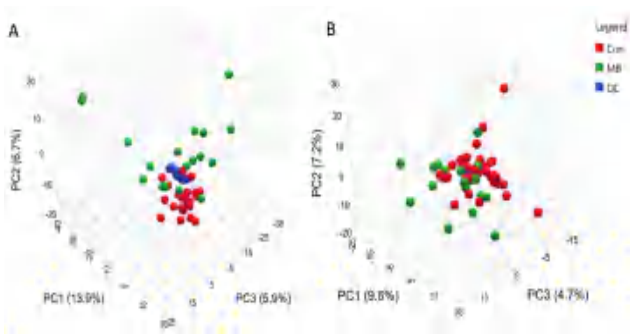


图 1 正 (A)、负 (B) 离子模式下的 PCA 图

Fig 1 PCA in positive-ion mode (A) and negative-ion mode (B)

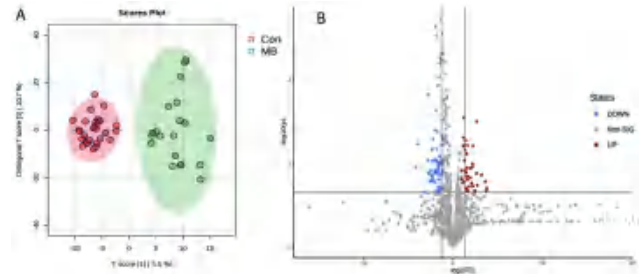


图 2 MB 组与其他颅内肿瘤组之间的 OPLS-DA 得分图 (A) 和火山图 (B)

Fig 2 OPLS-DA score plots (A) and volcano plot (B) between other intracranial tumors patients and MB group

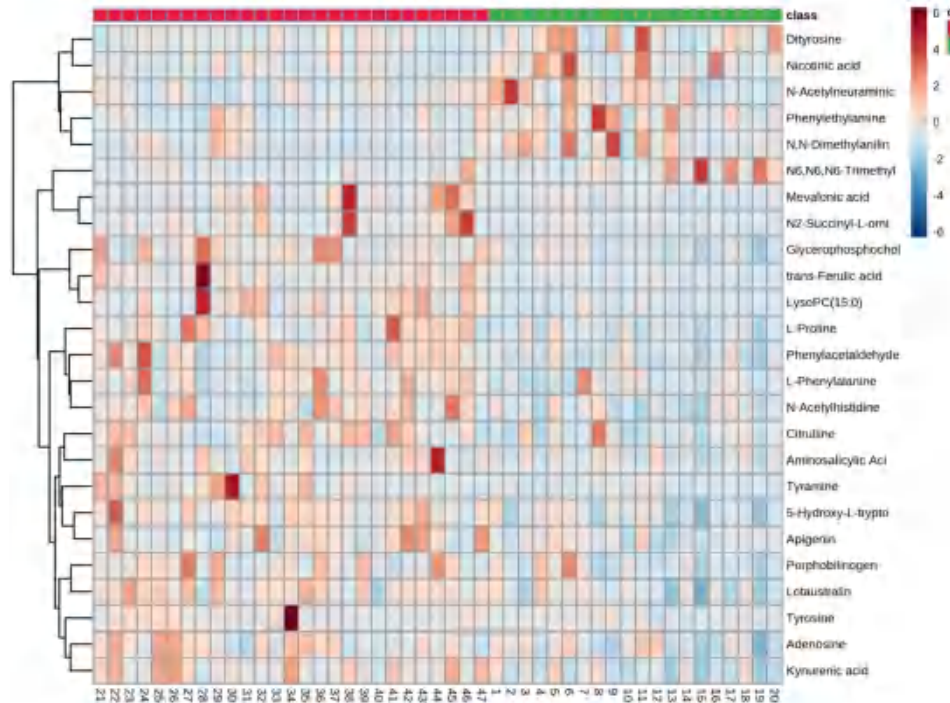


图 3 MB 组与其他颅内肿瘤组尿液差异代谢物热图

Fig 3 Heat map of normalized metabolites in urine samples from between other intracranial tumors patients and MB group

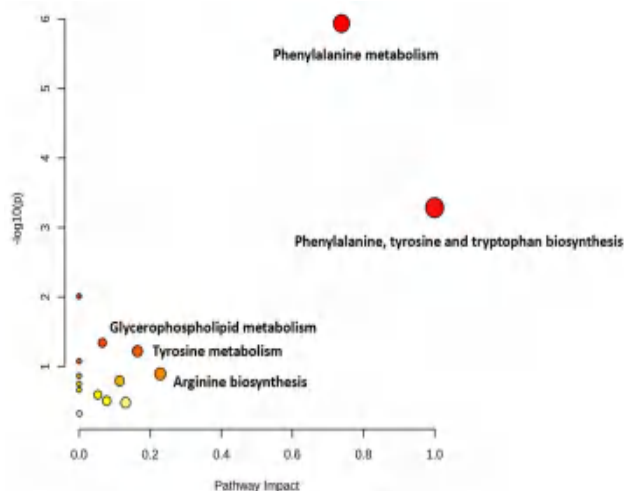


图 4 MB 组与其他颅内肿瘤组尿液中差异代谢通路富集气泡图

Fig 4 Summary plot for differential pathway analysis in urine between other intracranial tumors patients and MB group

生物标志物的更好体液来源^[13]。本课题组前期研究了血浆代谢组 MB 的生物标志物, 这些代谢物主要参与包括甘油磷脂代谢、 α - 亚麻酸代谢、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成和苯丙氨酸代谢^[14]。本研究中发现的差异代谢物主要在苯丙氨酸代谢、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成以及甘油磷脂代谢中发挥作用, 与之前血浆的结果部分一致。在各种儿科脑肿瘤中, 流动性脂质通常与恶性肿瘤相关^[15], 并且, 它们也与细胞凋亡、代谢性细胞应激和活力丧失等其他细胞过程相关^[16]。代谢通路从富集分析结果来看, 推测甘油磷脂代谢途径是一个与 MB 区别于其他颅内肿瘤相关的明显被扰动的途径。

根据代谢组学数据构建 ROC 曲线并计算 AUC 值, 结果显示 L- 苯丙氨酸的 AUC 值为 0.7315, 具有一定的可靠性。L- 苯丙氨酸是人体必需氨基酸, 在

正常情况下经苯丙氨酸 4-羟化酶作用生成 L-酪氨酸并进一步代谢。L-苯丙氨酸作为 L-酪氨酸上游的代谢物质，其含量变化与 L-酪氨酸密不可分。L-苯丙氨酸含量下降，最直接的就是影响体内 L-酪氨酸合成而导致甲状腺素水平降低，影响其代谢活动。

磷脂是脂质的主要成分，参与细胞膜的生成、代谢和细胞信号传导。磷脂的失调和肿瘤的发展密切相关^[17-18]，也是报道较多的针对肿瘤诊断的潜在脂质标志物^[19]。另一项在 20 份儿童脑肿瘤的完整组织样本中进行的 HR-MAS 分析证明了儿童脑肿瘤类型之间的代谢差异，包括室管膜瘤、MB 和毛细胞星形细胞瘤。这项研究的结果表明，MB 中磷脂酰胆碱（PC）水平高^[20]。此外，磷脂还具有一定的抗肿瘤活性，但其在单一治疗研究中的治疗潜力较低，仍需要进一步研究证实磷脂在化疗中的作用与优势^[21]。本研究结果显示溶血磷脂酰胆碱（15:0）AUC 为 0.8833，具有良好的诊断性能。

本研究通过对 MB 患儿和其他颅内肿瘤患儿的尿液代谢组的研究，初步确定了与 MB 相关的尿液代谢标志物及其代谢通路的变化。尿液采集较血液容易，对人体无损伤，收集过程对患者的危害较小。尿液中某些代谢物作为复合变量能很好地区分 MB 与非髓母细胞瘤。但本研究样本量较少，可能会影响检测结果的准确性，未来还需在更大的研究队列中利用非靶向代谢组学和靶向代谢组学深入表征 MB 的尿液代谢组学特征，以期 MB 人群的鉴别诊断和生物标志物检测提供方法。

参考文献

- [1] Louis DN, Perry A, Wesseling P, et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary [J]. *Neuro Oncol*, 2021, 23 (8): 1231-1251.
- [2] Hill RM, Richardson S, Schwalbe EC, et al. Time, pattern, and outcome of medulloblastoma relapse and their association with tumour biology at diagnosis and therapy: a multicentre cohort study [J]. *Lancet Child Adolesc Health*, 2020, 4 (12): 865-874.
- [3] Ostrom QT, Price M, Neff C, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2016—2020 [J]. *Neuro Oncol*, 2023, 25 (12 Suppl 2): iv1-iv99.
- [4] Li HS, Liu YQ, Liu YT, et al. Tumor-associated astrocytes promote tumor progression of sonic hedgehog medulloblastoma by secreting lipocalin-2 [J]. *Brain Pathol*, 2024, 34 (1): e13212.
- [5] 武林, 顾维, 吴继志, 等. 儿童髓母细胞瘤的磁共振成像影像表现及病理对照分析 [J]. *影像研究与医学应用*, 2024, 8 (3): 172-174.
- [6] Malbari F. Pediatric neuro-oncology [J]. *Neurol Clin*, 2021, 39 (3): 829-845.
- [7] 张俊, 葛亚文, 周霄颖, 等. 基于非靶向代谢组学的儿童川崎病血浆生物标志物筛选研究 [J]. *中南药学*, 2023, 21 (7): 1726-1732.
- [8] Jackson K, Packer RJ. Recent advances in pediatric medulloblastoma [J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2023, 23 (12): 841-848.
- [9] 胡晓渝, 王树杰, 杨康, 等. 瘤内及瘤周表观弥散系数影像组学特征预测髓母细胞瘤患儿预后 [J]. *中国医学影像技术*, 2024, 40 (2): 198-202.
- [10] Wishart DS, Guo A, Oler E, et al. HMDB 5.0: the Human Metabolome Database for 2022 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50 (D1): D622-D631.
- [11] Pang ZQ, Chong J, Zhou GY, et al. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights [J]. *Nucl Acids Res*, 2021, 49 (W1): W388-W396.
- [12] Khodadadi M, Pourfarzam M. A review of strategies for untargeted urinary metabolomic analysis using gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Metabolomics*, 2020, 16 (6): 66.
- [13] Bergner RT, Onida S, Velineni R, et al. Metabolic profiling reveals changes in serum predictive of venous ulcer healing [J]. *Ann Surg*, 2023, 277 (2): e467-e474.
- [14] Shi ZY, Yang CJ, Xu XQ, et al. Plasma metabolite profiles identify pediatric medulloblastoma and other brain cancer [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2023, 415 (3): 471-480.
- [15] Groux-Degroote S, Delannoy P. Cancer-associated glycosphingolipids as tumor markers and targets for cancer immunotherapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (11): 6145.
- [16] Wang SS, Tang K, Lu YJ, et al. Revealing the role of glycerophospholipid metabolism in asthma through plasma lipidomics [J]. *Clin Chim Acta*, 2021, 513: 34-42.
- [17] Stoica C, Ferreira AK, Hannan K, et al. Bilayer forming phospholipids as targets for cancer therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (9): 5266.
- [18] Li ZW, Hu YM, Zheng HQ, et al. LPCAT1-mediated membrane phospholipid remodelling promotes ferroptosis evasion and tumour growth [J]. *Nat Cell Biol*, 2024, 26 (5): 811-824.
- [19] Chang WG, Xiao DD, Fang XY, et al. Phospholipids in small extracellular vesicles: emerging regulators of neurodegenerative diseases and cancer [J]. *Cytotherapy*, 2022, 24 (2): 93-100.
- [20] Cuellar-Baena S, Morales JM, Martinetto H, et al. Comparative metabolic profiling of paediatric ependymoma, medulloblastoma and pilocytic astrocytoma [J]. *Int J Mol Med*, 2010, 26 (6): 941-948.
- [21] Saito RF, Andrade LNS, Bustos SO, et al. Phosphatidylcholine-derived lipid mediators: the crosstalk between cancer cells and immune cells [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 768606.

(收稿日期: 2024-09-11; 修回日期: 2024-11-17)

基于 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术分析香苏饮的化学成分及入血成分

王鹏¹, 于泳², 刘力莉², 叶婉婷¹, 白阳¹, 张诗芸¹, 孙毅坤^{1*}, 林宏英^{1*} (1.北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2.数源汇通(北京)医药科技有限公司, 北京 100089)

摘要: **目的** 采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱质谱(UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS)技术对香苏饮中的化学成分及大鼠口服后的入血成分进行研究。**方法** 采用 Waters HSS T3 UPLC C₁₈ 色谱柱(1.7 μm, 2.1 mm×150 mm), 以 0.1% 甲酸水溶液-乙腈为流动相进行梯度洗脱, 柱温为 40℃, 流速为 0.3 mL·min⁻¹, 进样量为 5 μL。质谱采用 ESI 源, 在正、负离子两种模式下采集数据。结合相关文献及化合物裂解规律, 比对各化合物的色谱保留时间、精确分子质量和碎片离子等信息, 分析香苏饮的化学成分; 通过对比含药血浆和香苏饮样品的色谱及质谱信息, 分析入血成分。**结果** 从香苏饮中分离鉴定了 96 个化合物, 包括有机酸类 38 个, 黄酮类 26 个, 三萜类 8 个, 挥发油类 7 个, 香豆素类 7 个, 蒽醌类 3 个, 生物碱类 3 个, 氨基酸类 2 个及其他类 2 个。在口服香苏饮的大鼠血浆中共鉴定出 36 个吸收入血的原型成分。**结论**

建立的 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 方法可对香苏饮的化学成分及入血成分进行快速表征, 为香苏饮质量控制以及进一步的药效物质基础研究奠定了基础。

关键词: 香苏饮; 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱质谱法; 化学成分; 入血成分

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)05-1275-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.016

Chemical components and components migrating to the blood of Xiangsu Yin by UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS

WANG Peng¹, YU Yong², LIU Li-li², YE Wan-ting¹, BAI Yang¹, ZHANG Shi-yun¹, SUN Yi-kun^{1*}, LIN Hong-ying^{1*} (1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488; 2. Shuyuan Huitong (Beijing) Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Beijing 100089)

Abstract: Objective To qualitatively analyze the chemical components of Xiangsu Yin and its components migrating to the blood after the oral administration in rats by UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS. **Methods** Waters HSS T3 UPLC C₁₈ column (1.7 μm, 2.1 mm×150 mm) was used, with 0.1% formic acid aqueous solution-acetonitrile as the mobile phase. The column temperature was 40℃, the flow rate was 0.3 mL·min⁻¹, and the injection volume was 5 μL. In mass spectrometry, we used ESI sources to collect data in both positive and negative ion modes. Based on relevant literatures and compound fragmentation patterns, we compared the chromatographic retention time, precise molecular weight and fragment ions of each compound to identify the main chemical components of Xiangsu Yin. By comparing the chromatographic and mass spectrometry information of medicated plasma and Xiangsu Yin samples, the components migrating to the blood were analyzed. **Results** Totally 96 chemical components were identified from Xiangsu Yin, including 38 organic acids, 26 flavonoids, 8 triterpenoids, 7 volatile oils, 7 coumarins, 3 anthraquinones, 3 alkaloids, 2 amino acids, and 2 others. After the oral administration of Xiangsu Yin to rats, totally 36 prototype components were identified in the rat plasma. **Conclusion** UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS can rapidly characterize the chemical compositions in Xiangsu Yin and components migrating to the blood, laying

作者简介: 王鹏, 男, 硕士研究生, 主要从事中药学研究, email: 18810282691@163.com * **通信作者:** 孙毅坤, 男, 教授, 主要从事中药药效物质及质量控制研究, email: sunyk@bucm.edu.cn; 林宏英, 女, 讲师, 主要从事中药药效物质及质量控制研究, email: linhy2012@qq.com

the foundation for quality control and further studies on its therapeutic material basis.

Key words: Xiangsu Yin; UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS; chemical component; component migrating to the blood

香苏饮由紫苏、甘草、芡实、藿香、鱼腥草、薄荷、白芷 7 味药组成。紫苏解表散寒，行气和胃；甘草补脾益气，清热解毒；芡实益肾固精，补脾止泻；藿香芳香化浊，发表解暑；鱼腥草清热解毒，消痈排脓；薄荷疏散风热，清利头目；白芷解表散寒，祛风止痛。诸药合用，可用于调理特禀体质^[1-5]。

目前对于香苏饮的化学成分缺少全面、完整的表征，其调理特禀体质的药效物质基础也未得到阐明。因香苏饮药味较多，成分较为复杂，为对其进行全面系统的成分分析，本实验采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱质谱(UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS)技术，利用其高通量、高灵敏度的特性^[6]对香苏饮的化学成分进行快速、全面的分析与鉴定，并探讨大鼠给药后吸收入血的成分，为其药效物质基础与质量控制研究提供理论依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

EPS-202 型电子天平(精度: 0.01 g, 长沙湘平科技发展有限公司); 磁力搅拌水浴锅(上海力辰邦西仪器科技有限公司); Milli-Q Advantage A10 超纯水系统(北京五洲东方科技有限公司); 超高速低温冷冻离心机(美国 Thermo Fisher 公司); 大龙 MX-S 可调式混匀仪[大龙兴创实验仪器(北京)股份公司]; U3000 型超高效液相色谱、Q-Exactive 型质谱仪[美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 配有电喷雾离子源(ESI)及 Xcalibur 3.0 数据处理系统]。

1.2 试药

香苏饮(批号: 202101031, 规格: 5 g/袋, 山西亚宝九合医药科技有限公司); 超纯水(由 Milli-Q Advantage A10 超纯水系统制得); 甲醇、乙腈、甲酸(质谱级, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.3 动物

6 只 SPF 级雄性 SD 大鼠(180 ~ 200 g)[斯贝福(中国北京)生物技术有限公司, 许可证号: SCXK(京)2024-0001]。大鼠实验饲养条件为 12 h/12 h 光/暗循环, 室温为 25 ℃, 相对湿度(60 ± 5)%, 实验前适应性饲养 7 d。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

精密称取香苏饮颗粒 2.00 g 置于 100 mL 具塞锥形瓶中, 按照料液比 1:10(g/mL)精密加入 20 mL 水, 摇匀, 水浴加热回流 1 h, 取出静置放

冷, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2 色谱条件

色谱柱: Waters HSS T3 UPLC C₁₈ 柱(1.7 μm, 2.1 mm × 150 mm); 流动相: 0.1% 甲酸水溶液(A)和乙腈(B), 梯度洗脱(0 ~ 3 min: 2% ~ 8%B; 3 ~ 6 min: 8% ~ 20%B; 6 ~ 17 min: 20% ~ 98%B; 17 ~ 20 min: 98%B); 柱温: 40 ℃; 进样量: 5 μL; 流速: 0.3 mL · min⁻¹。

2.3 质谱条件

采用 ESI 源; 正负离子模式分别扫描, 扫描模式为 Full Scan/dd MS², 质量扫描范围为 *m/z* 100 ~ 1300 Da; 毛细管温度为 350 ℃, 喷嘴加热温度为 300 ℃。负离子模式下喷雾电压为 3200 V, 正离子模式下喷雾电压为 3800 V; 鞘气流速为 35 arb; 辅助气流速为 15 arb。采用低、中、高的 3 种碰撞能量对母离子进行二级破裂: 25、35、45 V。一级质谱分辨率为 Full Scan 70 000 FWHM, 二级质谱分辨率为 MS/MS 17 500 FWHM。

2.4 动物实验

灌胃前, 大鼠尾尖取空白血样于抗凝管中, 随后以 11.7 g/(kg · d) 灌胃给药, 连续 3 d。最后一次给药后 15 min、30 min、1 h、2 h, 进行尾尖取血, 置于抗凝管中。所有血样立刻在 4 ℃ 下 4000 r · min⁻¹ 离心 15 min, 取上层血浆储存于 -80 ℃ 冰箱, 备用。

2.5 血浆样品的预处理

分别将各大鼠空白血浆等体积混合, 各大鼠给药后各时间点的含药血浆等体积混合。分别取混合后的大鼠空白血浆和含药血浆各 1.6 mL, 加入 3 倍乙腈, 涡旋混合 3 min, 离心(4 ℃、8000 r · min⁻¹) 15 min, 取上清液氮吹仪吹干。残渣中加入 200 μL 50% 甲醇复溶, 涡旋 3 min, 离心(4 ℃、13 000 r · min⁻¹) 15 min, 取上清液, 即得空白血浆和含药血浆样品溶液。

2.6 化学成分检测与分析

取“2.1”项下供试品溶液及“2.5”项下空白血浆和含药血浆样品溶液各 5 μL, 按照“2.2”“2.3”项下的色谱条件及质谱条件进样测定, 得到香苏饮、含药血浆在正负离子模式下的基峰离子流(BPI)色谱图。采用 Xcalibur 3.2 软件进行质谱数据处理分析, 并结合相关文献及化合物裂解规律鉴定化学成分, 保证结果的准确性。

3 结果与分析

3.1 香苏饮化学成分分析

查找相关文献整理香苏饮中 7 味药材的质谱信息, 建立化学成分数据库, 包括所含成分的色谱保留时间、母离子质荷比和二级质谱特征碎片离子信息, 与本文通过 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 检测到的香苏饮化学成分信息进行了对比, 并结合化学物的质谱裂解规律, 共推测和鉴定出 96 个化学成分。香苏饮正、负离子模式下的 BPI 色谱图见图 1, 鉴定的化学成分信息见表 1^[7-34]。

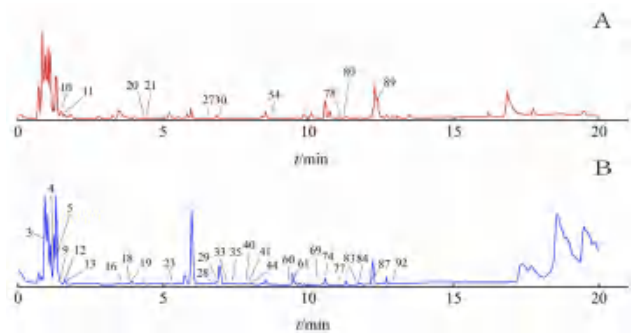


图 1 ESI⁺模式下 (A) 和 ESI⁻模式下 (B) 香苏饮的 BPI 图

Fig 1 BPI diagram of Xiangsu Yin under the ESI⁺ mode (A) and ESI⁻ mode (B)

3.2 大鼠入血成分分析

结合香苏饮体外化学成分的质谱分析数据, 根据色谱和质谱信息, 在大鼠的含药血浆中共推测和鉴定出 36 个化学成分。香苏饮含药血浆正、负离子模式下的 BPI 色谱图见图 2, 入血成分信息在表 1 中标注^[7-34]。

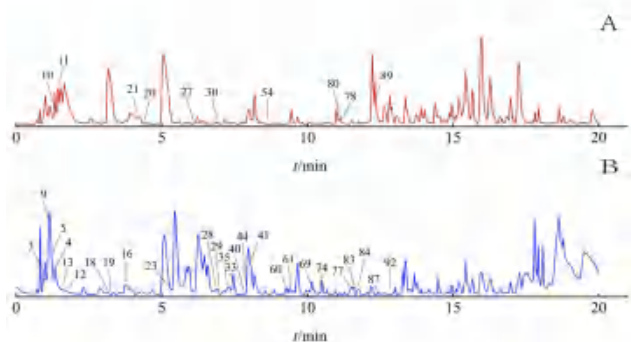


图 2 ESI⁺模式下 (A) 和 ESI⁻模式下 (B) 大鼠血浆的 BPI 图

Fig 2 BPI diagram of rat plasma under the ESI⁺ mode (A) and ESI⁻ mode (B)

3.3 质谱裂解规律

3.3.1 有机酸类成分质谱解析 从香苏饮中共鉴定出 38 个有机酸类化合物。有机酸类化合物主要丢失 H₂O 以及羧基断裂失去 CO、CO₂ 等小分子碎片而形成一系列特征碎片离子。以化合物 **69** 为例说明解析过程。

化合物 **69** 的保留时间为 10.31 min, 可观察到准分子离子峰 m/z 193.0506 [M-H]⁻, 推断其分子式为 C₁₀H₁₀O₄; 二级质谱图中母离子失去一分子 COOH 得到 m/z 149.0607 [M-H-COOH]⁻, 再失去一分子 CH₃

得到 m/z 134.0373 [M-H-COOH-CH₃]⁻, 母离子失去一分子 CH₃ 得到 m/z 178.0270 [M-H-CH₃]⁻。结合负离子模式下的准分子离子及质谱裂解规律, 比对相关文献^[8], 可确定该化合物为阿魏酸, 其二级质谱图及特征裂解规律见图 3。

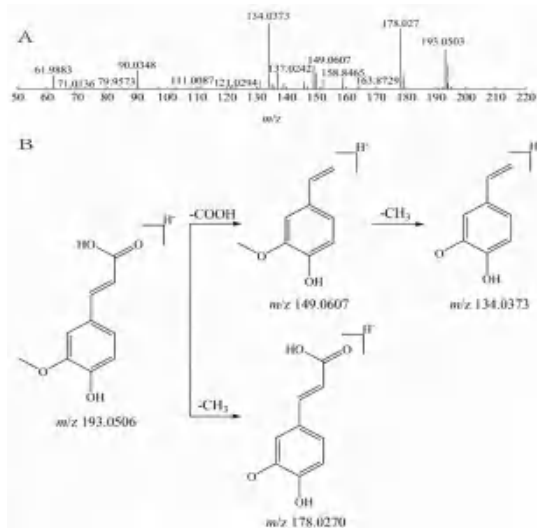


图 3 阿魏酸的二级质谱图 (A) 和质谱裂解途径 (B)

Fig 3 Secondary mass spectrum (A) and mass spectrometry fragmentation pathway (B) of ferulic acid

3.3.2 黄酮类成分质谱解析 从香苏饮中共鉴定出 26 个黄酮类化合物。黄酮类化合物主要以游离态为主, 或与糖结合以糖苷的形式存在, 断裂方式主要有 C 环发生逆狄尔斯-阿德尔反应 (RDA) 裂解以及糖基的断裂等。以化合物 **74** 为例说明解析过程。

化合物 **74** 的保留时间为 10.57 min, 可观察到准分子离子峰 m/z 283.0814 [M-H]⁻, 推断其分子式为 C₁₆H₁₂O₅; 二级质谱图中母离子通过丢失 CH₃ 和 CO₂, 得到碎片离子 m/z 268.0378 [M-H-CH₃]⁻ 和 m/z 239.0355 [M-H-CO₂]⁻, 再通过连续丢失 CO 后生成 m/z 240.0424 [M-H-CH₃-CO]⁻。结合负离子模式下的准分子离子及质谱裂解规律, 比对相关文献^[12, 30], 可确定该化合物为金合欢素, 其二级质谱图及特征裂解规律见图 4。

3.3.3 香豆素类成分质谱解析 从香苏饮中共鉴定出 7 个香豆素类化合物。香豆素类化合物主要连续丢失 CO、H₂O、CH₃ 或 OCH₃ 等小分子碎片而形成一系列特征碎片离子。以化合物 **78** 为例说明解析过程。

化合物 **78** 的保留时间为 11.14 min, 可观察到准分子离子峰 m/z 271.0961 [M + H]⁺, 推断其分子式为 C₁₆H₁₄O₄; 二级质谱图中母离子失去 C8 位上的侧链形成碎片离子 m/z 203.0343 [M + H-C₅H₇]⁺, 再连续丢失两分子 CO 得到 m/z 147.0454 [M + H-CO-CO]⁺。结合正离子模式下的准分子离子及质谱裂解规律, 比对相关文献^[31], 可确定该化合物为欧前胡素, 其二级质谱图及特征裂解规律见图 5。

表 1 香苏饮中化学成分鉴定
Tab 1 Identification of chemical components in Xiangsu Yin

No.	t_R / min	m/z		误差 / ($\times 10^{-6}$)	加和 离子	分子式	m/z	化合物	归属	类型
		测定值	理论值							
1	0.62	161.0245	161.0244	0.62	[M-H] ⁻	C ₉ H ₆ O ₃	132.9809, 76.9696	7-羟基香豆素 ^[7-8]	白芷、紫苏	香豆素
2	0.81	175.1185	175.1190	-2.57	[M+H] ⁺	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	175.1188, 158.0923, 130.0974, 70.0651, 60.0558	精氨酸 ^[9-10]	芡实、紫苏	氨基酸
3	1.05	191.0560	191.0561	-0.58	[M-H] ⁻	C ₇ H ₁₂ O ₆	127.0400, 111.0449, 93.0345, 85.0294	奎尼酸 ^{*[11]}	鱼腥草	有机酸
4	1.21	133.0142	133.0143	-0.38	[M-H] ⁻	C ₄ H ₆ O ₅	133.0141, 115.0036, 71.0138	苹果酸 ^{*[8]}	紫苏	有机酸
5	1.28	173.0090	173.0092	-0.92	[M-H] ⁻	C ₆ H ₆ O ₆	154.9985, 129.0193, 111.0087, 85.0294	乌头酸 ^{*[12]}	薄荷	有机酸
6	1.36	153.1270	153.1274	-2.61	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₆ O	153.0411, 135.0304, 107.0603	紫苏醇 ^[13]	紫苏	挥发油
7	1.38	177.0191	177.0193	-1.13	[M-H] ⁻	C ₉ H ₆ O ₄	159.0297, 133.0295, 115.0400, 97.0293	5, 7-二羟基色原酮 ^[14]	芡实	黄酮
8	1.41	188.0566	188.0565	0.80	[M-H] ⁻	C ₇ H ₁₁ NO ₃	128.0352, 102.0559, 59.0138, 144.0665, 102.0559, 100.0767	N-乙酰谷氨酸 ^[10, 15]	紫苏、鱼腥 草	氨基酸
9	1.45	191.0197	191.0197	-0.16	[M-H] ⁻	C ₆ H ₈ O ₇	173.0092, 129.0193, 111.0087, 87.0086, 85.0294	柠檬酸 ^{*[10, 16]}	紫苏	有机酸
10	1.50	165.0908	165.0910	-1.21	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	165.0545, 147.0440, 137.0597, 123.0439	丁香酚 ^{*[13]}	紫苏	挥发油
11	1.53	165.0544	165.0546	-1.33	[M+H] ⁺	C ₉ H ₈ O ₃	147.0440, 119.0491, 91.0542	对香豆酸 ^{*[10]}	紫苏	有机酸
12	1.55	147.0299	147.0299	0.00	[M-H] ⁻	C ₅ H ₈ O ₅	129.0192, 87.0086, 85.0294	柠草酸 ^{*[10]}	紫苏	有机酸
13	1.59	117.0193	117.0193	-0.26	[M-H] ⁻	C ₄ H ₆ O ₄	99.0087, 73.0294	琥珀酸 ^{*[10]}	紫苏	有机酸
14	1.86	137.1323	137.1325	-1.46	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₆	137.0457, 95.0854, 81.0698, 67.0543	α -蒎烯 ^[17]	薄荷	挥发油
15	2.43	169.0142	169.0143	-0.59	[M-H] ⁻	C ₇ H ₆ O ₅	169.0141, 125.0243, 110.9851, 78.9589	没食子酸 ^[7, 14]	白芷、芡实	有机酸
16	3.63	153.0193	153.0193	-0.20	[M-H] ⁻	C ₇ H ₆ O ₄	153.0192, 125.0241, 109.0293	原儿茶酸 ^{*[14]}	芡实	有机酸
17	3.78	167.0349	167.0350	-0.48	[M-H] ⁻	C ₈ H ₈ O ₄	149.0244, 137.0241, 123.0451, 105.0346	香草酸 ^[15, 18]	紫苏、鱼腥 草	有机酸
18	3.85	197.0456	197.0455	0.51	[M-H] ⁻	C ₉ H ₁₀ O ₅	197.0456, 179.0349, 135.0450, 123.0450	丹参素 ^{*[12]}	薄荷	有机酸
19	3.89	197.0455	197.0455	0.00	[M-H] ⁻	C ₉ H ₁₀ O ₅	179.0349, 135.0454, 123.0450	水杨酸 A ^{*[18]}	紫苏	有机酸
20	4.35	384.1145	384.1150	-1.30	[M+H] ⁺	C ₁₄ H ₁₇ N ₅ O ₈	252.0724, 234.0620, 162.0773	N-(9-(β -呋喃核糖基)-9H-嘌呤-6-基)-天冬氨酸 ^{*[8]}	紫苏	有机酸
21	4.38	225.1119	225.1119	0.00	[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	203.0334, 185.0231, 159.9691, 139.1228	广藿香酮 ^{*[19]}	藿香	挥发油
22	5.10	353.0880	353.0878	0.55	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	191.0559, 173.0456, 179.0348, 161.0242, 135.0451	绿原酸 ^[10, 14-15]	芡实、鱼腥 草、紫苏	有机酸
23	5.32	181.0506	181.0506	-0.17	[M-H] ⁻	C ₉ H ₁₀ O ₄	163.0400, 135.0451, 119.0501, 72.9930	4-羟基苯乳酸 ^{*[10]}	紫苏	有机酸
24	5.85	139.0386	139.0390	-2.88	[M+H] ⁺	C ₇ H ₆ O ₃	139.1118, 121.0395, 111.0440	原儿茶醛 ^[13]	紫苏	有机酸
25	5.90	303.0513	303.0499	4.52	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	229.7305, 153.9655, 137.9838	槲皮素 ^[20]	甘草	黄酮
26	5.94	165.0556	165.0557	-0.73	[M-H] ⁻	C ₉ H ₁₀ O ₃	121.0658, 119.0499, 93.0344, 59.0138	根皮酸 ^[20]	甘草	有机酸
27	6.54	223.2051	223.2056	-2.42	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₆ O	121.0647, 111.0805, 109.0646, 107.9503	蓝桉醇 ^{*[13]}	紫苏	挥发油
28	6.78	177.0193	177.0193	-0.18	[M-H] ⁻	C ₉ H ₆ O ₄	151.0383, 149.0241, 123.0440, 133.0294, 105.0344, 89.0396	秦皮乙素 ^{*[8, 10]}	紫苏、鱼腥 草	香豆素
29	6.89	179.0349	179.0350	-0.56	[M-H] ⁻	C ₉ H ₈ O ₄	181.0853, 179.0348, 165.0906, 163.0751, 135.0450, 109.0645	咖啡酸 ^{*[18]}	紫苏	有机酸
30	6.98	195.0652	195.0652	0.00	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	195.1126, 163.0383, 135.0913	3-甲基咖啡酸 ^{*[17]}	薄荷	有机酸
31	7.00	355.1035	355.1035	0.00	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₂₀ O ₉	193.0503, 178.0267, 134.0372	阿魏酸-3-O-葡萄糖 ^[18]	紫苏	有机酸
32	7.20	305.1019	305.1020	-0.20	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₆ O ₆	305.0697, 174.9558, 147.0811	水合氧哌丁宁 ^[21]	白芷	香豆素
33	7.22	157.0367	157.0366	0.64	[M-H] ⁻	C ₄ H ₆ N ₄ O ₃	157.0504, 139.8727, 113.0607	尿囊素 ^{*[14]}	芡实	生物碱
34	7.29	593.1516	593.1512	0.67	[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	473.1089, 353.0667, 325.0717, 297.0763	芹菜素-双-C-己糖苷 ^[12]	薄荷	黄酮
35	7.36	153.0193	153.0193	-0.20	[M-H] ⁻	C ₇ H ₆ O ₄	153.0192, 135.0087, 109.0293, 91.0188, 65.0396	龙胆酸 ^{*[17]}	薄荷	有机酸

续表 1

No.	t_R / min	m/z		误差 / ($\times 10^{-6}$)	加和 离子	分子式	m/z	化合物	归属	类型
36	7.44	337.0932	337.0929	0.92	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	191.0560, 163.0401, 119.0503	4- <i>O</i> -对香豆酰奎宁酸 ^[15]	鱼腥草	有机酸
37	7.47	377.0873	377.0878	-1.34	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₁₈ O ₉	377.1449, 341.1093, 197.0453, 135.0451, 179.0349	丹酚酸 C ^[22]	紫苏	有机酸
38	7.49	593.1509	593.1512	-0.51	[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593.1505, 575.1417, 503.1191, 473.1089	维采宁-2 ^[23]	藿香	黄酮
39	7.81	197.0455	197.0456	-0.51	[M-H] ⁻	C ₉ H ₁₀ O ₅	182.0219, 166.9985, 153.0556, 121.0294, 106.0059	紫丁香酸 ^[12]	薄荷	有机酸
40	7.84	367.1036	367.1037	-0.27	[M-H] ⁻	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	173.0453, 93.0345	3- <i>O</i> -阿魏酰奎尼酸 ^{*[7]}	白芷	有机酸
41	7.91	225.1134	225.1142	-3.56	[M-H] ⁻	C ₁₂ H ₁₈ O ₄	211.1441, 209.1169, 207.1019, 181.1234, 165.0923, 154.9899, 149.0959, 147.0812, 105.0695, 95.0854, 91.0540	茉莉酸 ^{*[16]}	紫苏	有机酸
42	7.93	314.1744	314.1751	-2.13	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₃ NO ₃	283.1322, 237.0910, 151.0754, 145.0646, 121.0644, 107.0491	杏黄碱 ^[14]	芡实	生物碱
43	7.95	563.1412	563.1406	1.01	[M-H] ⁻	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	563.1401, 545.1290, 473.1075, 443.0984, 353.0667, 117.0343	夏佛塔苷 ^[20]	甘草、芡实	黄酮
44	7.99	239.0927	239.0925	0.84	[M-H] ⁻	C ₁₂ H ₁₆ O ₅	195.1025, 177.0918, 151.1126	3, 4'-二羟基-3'-甲氧基苯并紫苏 戊二酸 ^{*[16]}	紫苏	有机酸
45	8.23	169.1220	169.1223	-1.78	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	151.1115, 141.0547, 133.1011, 139.9878, 123.1166, 109.1011	(1 <i>R</i> , 4 <i>R</i>)-3, 3, 5-trimethyl -2-oxabicyclo[2.2.2]oct-5-en- 4-ol ^[24]	薄荷	其他
46	8.24	447.0939	447.0933	1.39	[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	285.0403, 151.0038, 133.0298	木犀草苷 ^[10]	紫苏	黄酮
47	8.34	623.1231	623.1243	-1.89	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₇	623.1212, 447.0891, 271.0596	芹菜素-7-氧-二葡萄糖醛酸苷 ^[8]	紫苏	黄酮
48	8.35	577.1570	577.1563	1.25	[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	457.1159, 383.0770, 353.0664	异佛莱心苷 ^[20]	甘草	黄酮
49	8.39	549.1614	549.1613	0.18	[M-H] ⁻	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	417.1198, 255.0661, 135.0086	芹菜素 ^[20]	甘草	黄酮
50	8.50	609.1467	609.1465	0.33	[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	301.0349, 257.0732, 151.0034	芦丁 ^[14, 25]	薄荷、芡实	黄酮
51	8.64	463.0889	463.0882	1.51	[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.0869, 301.0336, 300.0272	异槲皮苷 ^[14]	芡实	黄酮
52	8.66	193.0493	193.0495	-1.24	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₈ O ₄	178.0258, 161.0235, 107.9595	东莨菪内酯 ^[26]	紫苏	生物碱
53	8.68	417.1199	417.1191	1.89	[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	417.1162, 255.0662, 135.0087, 119.0499	新甘草苷 ^[20]	甘草	黄酮
54	8.70	167.1062	167.1067	-2.75	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	167.0702, 149.0958, 139.1231, 125.9860	香薷酮 ^{*[13]}	紫苏	挥发油
55	8.72	419.1349	419.1337	2.86	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	257.0804, 239.0698, 211.0753, 147.0439, 137.0232, 119.0491	异甘草苷 ^[20]	甘草	黄酮
56	8.75	521.1304	521.1301	0.58	[M-H] ⁻	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₃	359.0760, 197.0453, 179.0348, 161.0243, 135.0451	迷迭香酸- <i>O</i> -己糖苷 ^[12]	薄荷	有机酸
57	9.08	565.1569	565.1563	1.10	[M-H] ⁻	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₄	565.1586, 271.0610, 151.0034, 119.0500	6'-羟基异橘皮苷 ^[20]	甘草	黄酮
58	9.19	447.0939	447.0933	1.39	[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	284.0321, 255.0300, 227.0349	山柰酚-3- <i>O</i> -葡萄糖苷 ^[10]	紫苏	黄酮
59	9.26	445.0781	445.0776	1.06	[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	269.0455, 175.0246, 113.0243	黄芩苷 ^[10]	紫苏	黄酮
60	9.34	287.0567	287.0561	2.09	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	287.1499, 243.0673, 207.1387	圣草酚 ^{*[10]}	芡实	黄酮
61	9.41	359.0775	359.0772	0.84	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	197.0405, 179.0348, 161.0243, 135.0451, 133.0293	迷迭香酸 ^{*[12, 18]}	紫苏、薄荷	有机酸
62	9.50	209.0805	209.0808	-1.44	[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	209.0802, 177.0545, 149.0597	阿魏酸甲酯 ^[13]	紫苏	有机酸
63	9.70	717.1472	717.1461	1.52	[M-H] ⁻	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	519.0920, 339.0502, 321.0403	丹酚酸 B ^[27]	芡实	有机酸
64	9.81	725.2097	725.2087	1.37	[M-H] ⁻	C ₃₆ H ₃₈ O ₁₆	549.1624, 531.1504, 255.0663	甘草苷 A ^[20]	甘草	黄酮
65	9.97	255.0647	255.0652	-1.92	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	255.0648, 199.0752, 155.0334	大黄酚 ^[17]	薄荷	蒽醌
66	10.21	373.0932	373.0929	0.80	[M-H] ⁻	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	197.0454, 179.0348, 175.0399, 135.0451	迷迭香酸甲酯 ^[18]	紫苏	有机酸
67	10.24	537.1042	537.1039	0.65	[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₂	197.0455, 179.0348, 135.0451	紫草酸 ^[12]	薄荷	有机酸
68	10.28	255.0664	255.0663	0.39	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	255.0663, 135.0087, 119.0501, 91.0188	甘草素 ^[10, 20]	甘草、芡实	黄酮
69	10.31	193.0506	193.0506	-0.67	[M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	178.0270, 149.0607, 134.0373	阿魏酸 ^{*[8]}	紫苏	有机酸
70	10.35	257.0815	257.0808	2.72	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	137.0232, 147.0439, 119.0491	乔松素 ^[20]	甘草	黄酮
71	10.37	455.3512	455.3520	-1.76	[M+H] ⁺	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	95.0855, 105.0699, 161.0965	白桦脂酮酸 ^[28]	紫苏	三萜

续表 1

No.	t_R / min	m/z		误差 / ($\times 10^{-6}$)	加和 离子	分子式	m/z	化合物	归属	类型
		测定值	理论值							
72	10.46	285.0406	285.0405	0.49	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.0767, 241.0508, 226.8874, 181.0083, 175.0400, 151.0035, 133.0293, 107.0138	木犀草素 ^[10, 14]	紫苏、芡实	黄酮
73	10.55	447.1274	447.1286	-2.62	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	285.0754, 242.0568, 153.0187, 133.0647	田蓟苷 ^[17, 29]	藿香、薄荷	黄酮
74	10.57	283.0814	283.0612	-0.71	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	268.0378, 240.0424, 239.0355	金合欢素 ^{*[12, 30]}	薄荷	黄酮
75	10.82	983.4501	983.4493	0.78	[M-H] ⁻	C ₄₈ H ₇₂ O ₂₁	983.4492, 821.3972, 351.0569, 803.3864	甘草皂苷 A ₃ ^[20]	甘草	三萜
76	10.96	181.0506	181.0506	0.00	[M-H] ⁻	C ₉ H ₁₀ O ₄	181.0144, 163.0008, 135.0456, 119.9469	二氢咖啡酸 ^[17]	薄荷	有机酸
77	11.11	271.0613	271.0612	0.37	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271.0602, 243.0662, 193.0514, 177.0199, 151.0036, 119.0502, 107.0138	柚皮素 ^{*[10, 14]}	紫苏、芡实	黄酮
78	11.14	271.0961	271.0965	4.46	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	271.0960, 203.0343, 147.0454	欧前胡素 ^{*[31]}	白芷	香豆素
79	11.18	271.0977	271.0965	4.50	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	271.0979, 203.9192, 159.0453, 147.0055, 119.0502	异欧前胡素 ^[31]	白芷	香豆素
80	11.20	271.0596	271.0601	-1.85	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	271.0596, 211.0602, 153.0182	芦荟大黄素 ^{*[17]}	薄荷	蒽醌
81	11.25	837.3919	837.3914	0.57	[M-H] ⁻	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	351.0568, 193.0352, 113.0244	甘草皂苷 G ₂ ^[20]	甘草	三萜
82	11.45	439.3565	439.3571	-1.28	[M+H] ⁺	C ₃₀ H ₄₆ O ₂	203.1795, 189.1636, 95.0855	灵芝醇 A ^[28]	紫苏	三萜
83	11.69	329.2335	329.2334	0.46	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	229.1444, 211.1339, 193.1232, 171.1026	12, 13, 17-三羟基十八碳-9-烯酸 ^{*[15]}	鱼腥草	有机酸
84	11.72	329.2335	329.2333	0.61	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	311.2227, 229.1444, 211.1339, 171.1026	蕈烷酸 ^{*[18]}	紫苏	有机酸
85	11.74	489.1382	489.1391	-1.84	[M+H] ⁺	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₁	489.1371, 285.0753, 270.06518, 242.0568	藿香苷 ^[29]	藿香	黄酮
86	11.94	339.0846	339.0839	2.06	[M+NA] ⁺	C ₁₇ H ₁₆ O ₆	339.1997, 254.9857, 239.0742	白当归脑 ^[32]	白芷	香豆素
87	12.04	267.0663	267.0663	0.07	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	267.0662, 252.0427, 208.0527	芒柄花黄素 ^{*[27]}	芡实	黄酮
88	12.20	471.3456	471.3469	-2.74	[M+H] ⁺	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	453.3360, 317.2109, 431.1821	坡模酮酸 ^[8]	紫苏	三萜
89	12.35	318.2993	318.3003	-3.05	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₃₀ NO ₃	300.2891, 256.2631, 102.0912	2-氨基-1, 3, 4-十八烷三醇 ^{*[8]}	紫苏	醇
90	12.54	807.4174	807.4172	0.20	[M-H] ⁻	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₅	807.4187, 351.0570, 193.0352	甘草皂苷 B ₂ ^[20]	甘草	三萜
91	12.64	821.3972	821.3965	0.85	[M-H] ⁻	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	645.3724, 469.3336, 351.0568	甘草酸 ^[33]	鱼腥草	三萜
92	12.89	283.0251	283.0248	1.41	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₈ O ₆	239.0349, 211.0398, 183.0450	大黄酸 ^{*[34]}	薄荷	蒽醌
93	13.26	805.4024	805.4016	1.01	[M-H] ⁻	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₅	805.4024, 351.0568, 193.0352	乌拉尔甘草皂苷 W/V ^[20]	甘草	三萜
94	13.54	279.1582	279.1589	-2.51	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	147.1167, 149.0233, 119.0854	邻苯二甲酸二丁酯 ^[20]	甘草	挥发油
95	13.59	279.2312	279.2319	-2.51	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	279.0929, 109.1009, 95.0854	亚麻酸 ^[13]	紫苏	有机酸
96	13.72	195.1389	195.1380	4.82	[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	195.1389, 176.9965, 149.0020, 93.0343	蛇床内酯 ^[32]	白芷	香豆素

注 (Note): * 为入血成分 (* Indicate the blood components)。

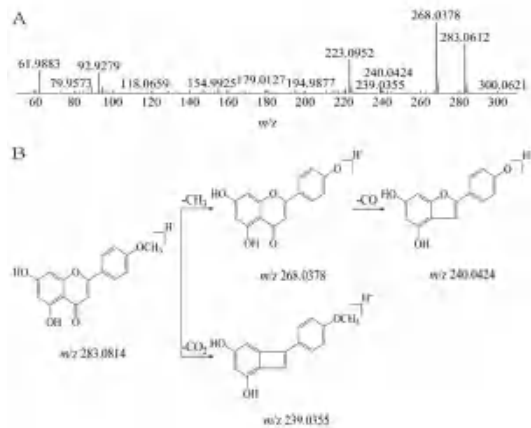


图 4 金合欢素的二级质谱图 (A) 和质谱裂解途径 (B)
Fig 4 Secondary mass spectrum (A) and mass spectrometry fragmentation pathway (B) of acacetin

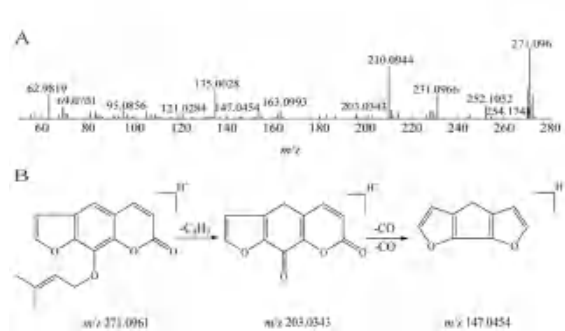


图 5 欧前胡素的二级质谱图 (A) 和质谱裂解途径 (B)
Fig 5 Secondary mass spectrum (A) and mass spectrometry fragmentation pathway (B) of imperatorin

4 讨论
4.1 香苏饮的成分研究

本研究前期优化了香苏饮的提取方法,通过比较不同提取溶剂(水、甲醇、75%乙醇)、不同稀释倍数(5、10、15)和不同提取方法(超声 30 min、加热回流 1 h),得到采用 10 倍量水加热回流 1 h 的提取方法,结果表明该方法得到的色谱峰较多且相应强度较好。

本研究采用 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术对香苏饮的化学成分进行系统分析,共鉴定化合物 96 个,包括有机酸类 38 个,黄酮类 26 个,三萜类 8 个,挥发油类 7 个,香豆素类 7 个,蒽醌类 3 个,生物碱类 3 个,氨基酸类 2 个,其他类 2 个。随后,通过动物实验鉴定香苏饮入血成分,以期为进一步明晰其物质基础提供依据。对香苏饮的入血成分进行系统分析,共鉴定化合物 36 个,包括有机酸类 22 个,黄酮类 4 个,挥发油类 4 个,香豆素类 2 个,蒽醌类 2 个,生物碱类 1 个,其他类 1 个,并对部分化合物的裂解规律进行了详细描述。

4.2 香苏饮防治特禀体质相关疾病的研究

在中医体质学中,特禀体质是指主要由先天禀赋异常形成的体质缺陷^[35],在特禀体质中最为常见的是过敏体质。现代医学认为过敏性疾病发生的机制主要是 I 型变态反应,具有遗传因素,比如过敏性鼻炎、过敏性哮喘等疾病的发生均与患者的体质有关,医者常从过敏原切入,多通过炎症反应和免疫系统治疗疾病,而这与中医的治疗观念高度重合,中医学和西医学对特禀体质中过敏性疾病的防治具有认识上的一致性^[36-37]。

综合分析香苏饮化学成分和入血成分的研究结果,香苏饮的各类成分中以有机酸类、黄酮类、挥发油类为主。紫苏、薄荷、鱼腥草等药物的有机酸类含量较高,紫苏、鱼腥草等植物中有机酸类物质因具有抗过敏作用被广泛应用于过敏性哮喘、过敏性鼻炎等过敏性疾病。紫苏水提物可显著抑制复合物 48/80 诱导的大鼠全身过敏反应和抗 - 二硝基苯酚 IgE (anti-DNP-IgE) 诱导的局部过敏反应,对复合物 48/80 的大鼠过敏抑制效果呈剂量依赖性^[38]。研究发现,紫苏、薄荷等中的有机酸类成分具有抗炎、抗过敏的作用,如迷迭香酸可以抑制丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 和核转录因子 κ B (NF- κ B) 信号通路的活化,抑制炎症介质一氧化氮 (NO) 和促炎性细胞因子肿瘤坏死因子 (TNF) α 、白细胞介素 (IL) -1β 、IL-6 的分泌,从而发挥抗炎作用^[39-41]。此外,Chen 等^[41]发现,迷迭香酸可促进体内的细胞因子和抗过敏抗体的生成,具有治愈过敏性哮喘的效果。香苏饮中黄酮类成分则多来自紫苏和芡实,其药材中的黄酮类成分具有抗炎、抑菌和抗过敏的作用^[42-43]。例如黄酮类成分木犀草

素可以通过抑制血清中 TNF- α 和细胞间黏附分子 1 (ICAM-1) 表达,还可抑制细胞中 NF- κ B 和 MAPK 的活化,抑制 PGE₂、NO 和 IL-6 等产生,减弱炎症反应^[44]。木犀草素对大肠埃希菌等常见细菌有良好的抑菌效果^[45]以及对致敏小鼠有较好的抗过敏效果^[46]。香苏饮挥发油类成分主要来自紫苏、薄荷和藿香等药材。研究表明,各药材的挥发油类成分具有良好的抗炎效果,其抗炎机制与挥发油类成分对免疫系统的调控密切相关^[41, 47-48]。

综上所述,香苏饮的体内鉴定为阐明其防治特禀体质相关疾病的药效物质基础提供了理论依据,可为其合理应用提供数据支撑,也为其质量控制研究奠定基础。

参考文献

- [1] 钱会南, 苏俊, 王琦, 等. 特禀体质特点初步研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2008, 35 (6): 824-825.
- [2] 闫春迪. 针灸对特禀质干预作用的临床研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2018.
- [3] 王琦, 朱燕波. 中国一般人群中中医体质流行病学调查——基于全国 9 省市 21948 例流行病学调查数据 [J]. 中华中医药杂志, 2009, 24 (1): 7-12.
- [4] Prescott S, Nowak-Węgrzyn A. Strategies to prevent or reduce allergic disease [J]. Ann Nutr Metab, 2011, 59 (Suppl 1): 28-42.
- [5] 邸洁, 朱燕波. 中医体质干预研究现状及展望 [J]. 天津中医药, 2014, 31 (5): 314-317.
- [6] 覃翔, 廖强. 静电场轨道阱高分辨质谱技术在中药分析中的应用进展 [J]. 中国药师, 2022, 25 (7): 1240-1245.
- [7] 夏玉英, 李菁, 李楚源, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析感冒清热颗粒化学成分 [J]. 中药材, 2022, 45 (2): 359-367.
- [8] 毛祈萍, 何明珍, 黄小方, 等. 基于超高效液相色谱和飞行时间质谱联用的紫苏化学成分鉴定 [J]. 现代食品科技, 2021, 37 (1): 282-291, 259.
- [9] 刘宇翔, 方敬爱, 李荣山. 基于 UPLC-Triple Q-TOF-MS/MS 整合网络药理学初步探究益肾胶囊治疗糖尿病肾病的物质基础及机制 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2022, 23 (5): 388-395, 473.
- [10] 沈璐, 冯芳. 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 的半夏厚朴汤化学成分分析 [J]. 广州化工, 2022, 50 (15): 105-109.
- [11] 金汉台, 刘建庭, 王建方, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 的复方鱼腥草合剂大鼠血清药物化学研究 [J]. 中草药, 2021, 52 (10): 2890-2896.
- [12] 严雅慧, 吴涛, 陈菊, 等. 乃孜来颗粒中化学成分的 UHPLC-Q-Orbitrap-MS 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27 (21): 156-166.
- [13] 黄海英, 康俊丽, 余亚辉, 等. 基于 UPLC-Q-Orbitrap MS 法分析补肺益肾方的化学成分 [J]. 分析测试学报, 2019, 38 (1): 1-13.
- [14] 林慧敏, 任强强, 许文, 等. 基于 UHPLC-Q Exactive 轨道阱高分辨质谱分析八珍方化学成分 [J]. 福建中医药, 2021, 52 (9): 31-38.
- [15] Ju LL, Zhang JX, Wang FJ, et al. Chemical profiling of *Houttuynia cordata* Thunb. by UPLC-Q-TOF-MS and analysis

- of its antioxidant activity in C2C12 cells [J]. J Pharm Biomed Anal, 2021, 204: 114271.
- [16] 史月姣, 王瑛, 朱惠照, 等. LC-MS 快速分析紫苏水煎液中的主要化学成分 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35 (8): 1417-1423.
- [17] 张昱, 马惠玲, 麦曦, 等. 基于 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 技术鉴定薄荷在大鼠体内的入血成分及代谢产物 [J]. 中草药, 2017, 48 (19): 3927-3934.
- [18] Zheng YF, Li DY, Sun J, et al. Comprehensive comparison of two color varieties of *Perillae Folium* using rapid resolution liquid chromatography coupled with Quadruple-Time-of-Flight Mass Spectrometry (RRLC-Q/TOF-MS)-based metabolic profile and in vivo/in vitro anti-oxidative activity [J]. J Agric Food Chem, 2020, 68 (49): 14684-14697.
- [19] 潘玄玄, 宋粉云, 李华. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术的沉香化气丸化学成分分析 [J]. 中草药, 2018, 49 (13): 2984-2992.
- [20] 张柳. 西北道地药材数据库的建立与应用 [D]. 兰州: 兰州大学, 2020.
- [21] 陈扬, 李朝峰, 张雪, 等. 伤湿祛痛膏的 UPLC-Orbitrap-MSⁿ 成分分析及其抗氧化、抗炎作用研究 [J]. 中医药信息, 2021, 38 (8): 14-22.
- [22] Razgonova MP, Kon'kova NG, Zakharenko AM, et al. Polyphenols of *Perilla frutescens* of the family Lamiaceae identified by tandem mass spectrometry [J]. Vavilovskii Zhurnal Genet Selektzii, 2022, 26 (7): 637-644.
- [23] 吴琦, 宋粉云, 李华. UPLC-Q-TOF/MS 结合指纹图谱在抱龙丸质量控制中的应用 [J]. 中药材, 2021, 44 (5): 1155-1160.
- [24] 张艳, 周严严, 高文雅, 等. 基于 UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS 技术的小儿豉翘清热颗粒化学成分鉴定及网络药理学研究 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46 (23): 6163-6177.
- [25] 朱亚楠. 痤疮消方 LC-MS 成分表征及凝胶剂适用性研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2016.
- [26] 亢倩丽, 李壮壮, 范珊珊, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 的紫苏叶与紫苏梗化学成分分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26 (13): 156-162.
- [27] 吴福林, 李平亚, 董庆海, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 分析止痛化微胶囊的入血成分 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43 (21): 4339-4346.
- [28] 李宇, 张凯, 孙静, 等. 基于 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 的柴胡疏肝丸的化学成分解析 [J]. 中南药学, 2022, 20 (12): 2758-2766.
- [29] 贾瑞芳. 苏藿香化学成分研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2021.
- [30] 尹金妥. 基于液质联用技术的四种黄酮类成分的体内外代谢研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2020.
- [31] 田世民, 谢锦, 尚强, 等. 基于 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 和 GC-MS 技术的抗病毒颗粒化学成分分析 [J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43 (2): 134-144.
- [32] Kang J, Zhou L, Sun JH, et al. Chromatographic fingerprint analysis and characterization of furocoumarins in the roots of *Angelica dahurica* by HPLC/DAD/ESI-MSn technique [J]. J Pharm Biomed Anal, 2008, 47 (4-5): 778-785.
- [33] 于华, 贾伟娜, 刘金平, 等. UPLC-Q-TOF-MS 法分析连花清瘟胶囊的入血成分 [J]. 天津中医药, 2016, 33 (12): 756-759.
- [34] 王银洁, 刘本臣, 刘军, 等. UPLC-Q-TOF-MS 法鉴定消肿止痛液有效部位的化学成分 [J]. 中国药房, 2019, 30 (23): 3232-3239.
- [35] 赵蔚波, 王雅琦, 赵海虹, 等. 中医特禀 (过敏) 体质相关疾病及防治思路探析 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37 (8): 4499-4502.
- [36] 申荣旻, 张妍, 王济, 等. 王琦教授调体治疗过敏性疾病方法探微 [J]. 北京中医药大学学报, 2016, 39 (1): 73-76.
- [37] 李雯雯, 陈慧. 中医药治疗过敏性疾病研究进展 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2019, 17 (14): 126-129.
- [38] 余顺波, 龙久铃, 陈长艳, 等. 紫苏的生理活性研究进展 [J]. 贵州农业科学, 2021, 49 (6): 75-83.
- [39] Sanbongi C, Takano H, Osakabe N, et al. Rosmarinic acid in perilla extract inhibits allergic inflammation induced by mite allergen, in a mouse model [J]. Clin Exp Allergy, 2004, 34 (6): 971-977.
- [40] 陈向阳. 薄荷酚类部位化学成分及抗炎活性研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- [41] Chen XY, Zhang SJ, Xuan ZN, et al. The phenolic fraction of mentha haplocalyx and its constituent linarin ameliorate inflammatory response through inactivation of NF- κ B and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW264.7 cells [J]. Molecules, 2017, 22 (5): 811.
- [42] 曹娅, 张金龙, 王强. 紫苏活性成分及其生物功能的研究进展 [J]. 中国食物与营养, 2021, 27 (8): 42-49.
- [43] 杨晓曦, 张庆林. 中药芡实的研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2015, 42 (2): 160-164.
- [44] Jeon IH, Kim HS, Kang HJ, et al. Anti-inflammatory and antipruritic effects of luteolin from *Perilla* (*P. frutescens* L.) leaves [J]. Molecules, 2014, 19 (6): 6941-6951.
- [45] 郭群群. 紫苏抗菌活性成分研究 [D]. 青岛: 青岛大学, 2002.
- [46] Ueda H, Yamazaki C, Yamazaki M. Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of *Perilla frutescens* [J]. Biol Pharm Bull, 2002, 25 (9): 1197-1202.
- [47] 杨慧, 马培, 林明宝, 等. 紫苏叶化学成分、抗炎作用及其作用机制研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2017, 31 (3): 279-286.
- [48] Oh HM, Kang YJ, Kim SH, et al. Agastache rugosa leaf extract inhibits the iNOS expression in ROS 17/2.8 cells activated with TNF- α and IL-1 β [J]. Arch Pharm Res, 2005, 28 (3): 305-310.

(收稿日期: 2024-08-10; 修回日期: 2024-09-27)

基于 UHPLC-Q-TOF-MS^E 和梯度提升算法的防风及其伪品水防风辨识分析

王献瑞^{1, 2}, 武浩楠^{1, 4}, 贺方良^{1, 3}, 郭晓晗^{1, 2}, 李明华^{1, 2}, 荆文光^{1, 2*}, 程显隆^{1, 2*}, 魏锋^{1, 2}
(1. 中国食品药品检定研究院, 药品监管科学全国重点实验室, 北京 102629; 2. 中国食品药品检定研究院, 中药民族药检定研究所, 北京 102629; 3. 中国药科大学中药学院, 南京 211198; 4. 沈阳药科大学功能食品与葡萄酒学院, 沈阳 110016)

摘要: **目的** 基于超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱 (UHPLC-Q-TOF-MS^E) 和梯度提升算法 (GB) 对防风及其伪品水防风进行数字化辨识分析。**方法** 首先利用 UHPLC-Q-TOF-MS^E 对防风、水防风进行分析, 并经 Progenesis QI 量化处理; 然后基于信息增益率算法 (IGR) 进行特征筛选, 结合 GB 算法构建数据模型。与此同时, 根据准确率、精确率、平衡分数等进行模型评价; 最后利用 GB 模型进行防风及水防风辨识, 并从信息增益率特征筛选的角度探索两者的差异性化学成分。**结果** 基于 IGR 特征筛选, 共得到 32 个特征数据变量; 结合 GB 算法构建的数据模型具有优秀的辨识效果, 准确率和精确度以及平衡分数均为 100%, 且外部验证正确率为 100%。此外, 通过信息增益率特征筛选, 明确两者的差异化学成分为 3' (R), 4' (R)-双当归酰氧基-3', 4'-二氢花椒内酯、Divaricatol、6"-β-D-芹糖亥茅酚苷等。**结论** 基于 UHPLC-Q-TOF-MS^E 和 GB 算法能够实现防风及其伪品水防风的辨识分析, 同时基于信息增益率的特征筛选有助于探索两者的差异性化学成分。

关键词: 防风; 水防风; 梯度提升算法; 超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)05-1283-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.017

Identification of *Saposhnikovia Radix* and counterfeit *Libanotidis Radix* based on UHPLC-Q-TOF-MS^E and gradient boosting

WANG Xian-rui^{1, 2}, WU Hao-nan^{1, 4}, HE Fang-liang^{1, 3}, GUO Xiao-han^{1, 2}, LI Ming-hua^{1, 2}, JING Weng-guang^{1, 2*}, CHENG Xian-long^{1, 2*}, WEI Feng^{1, 2} (1. State Key Laboratory of Drug Regulatory Science, National Institute for Food and Drug Control, Beijing 102629; 2. Institute for Control of Traditional Chinese Medicine and Ethnic Medicine, National Institute for Food and Drug Control, Beijing 102629; 3. School of Chinese Materia Medica, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198; 4. Faculty of Functional Food and Wine, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016)

Abstract: Objective To identify *Saposhnikovia Radix* (SR) and *Libonotidis Radix* (LR) based on UHPLC-Q-TOF-MS^E and gradient boosting (GB). **Methods** UHPLC-Q-TOF-MS^E was used to analyze SR and LR, and the mass spectrometry was quantified by Progenesis QI. Then based on the information gain rate (IGR) algorithm, the features were screened to establish a data model by combining with GB. At the same time, the model was evaluated with classification accuracy (CA), precision (P), F1 score (F1), etc. Finally, the GB model was used to identify SR and LR, and their chemical components were determined with feature screening based on IGR. **Results** Based on IGR feature screening, 32 feature data variables were obtained. The data model combined with GB

基金项目: 药品监管科学全国重点实验室项目 (No.2023SKLDRS0101); 国家重点研发计划“中医药现代化”重大专项 (No.2023YFC3504105); 中国食品药品检定研究院学科带头人培养基金 (No.2023X10)。

作者简介: 王献瑞, 男, 博士, 主要从事中药质量控制及数字化鉴定, email: niuyun006097@163.com * **通信作者:** 程显隆, 男, 研究员, 主要从事中药数字化质量控制及评价研究, email: cxl@nifdc.org.cn; 荆文光, 男, 副研究员, 主要从事中药质量控制及评价研究, email: jingwenguang@nifdc.org.cn

showed an excellent identification effect, with the *CA*, *P* and *FI* was 100%. Moreover, the external verification accuracy is 100%. In addition, through IGR feature screening, the differential components of LR and SR included xanthalin, Divaricatol, 6''-apiosylsec-*O*-glucosylhamaudol and so on.

Conclusion The identification of SR and LR based on UHPLC-Q-TOF-MS^E and GB, and the IGR feature screening help differentiate chemical components of SR and LR.

Key words: *Saposhnikovia Radix*; *Libonotidis Radix*; gradient boosting; UHPLC-Q-TOF-MS^E

中药防风是伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. 的干燥根, 具有祛风解表, 胜湿止痛的功效, 临床常用于感冒头痛, 风湿痹痛, 破伤风等^[1-3]。而水防风则是伞形科岩风属植物宽萼岩风 *Libonotis laticalycina* Shan et Shen. 的干燥根, 主产于河南, 又被称为“河南小防风”“小防风”“汜水防风”等, 收录于众多地方药材标准中。就其功效而言, 水防风解热作用弱于防风, 但毒性强于防风^[4-5]。然而, 水防风作为防风同科属的近缘品种, 其性状、显微及理化性质等均与防风十分相似^[6]。因此, 市场上经常出现水防风充当防风或掺入防风销售的情况, 严重侵犯消费者利益, 甚至影响生命安全^[7]。

为实现防风及水防风的鉴定, 杨春艳^[8]总结了两者的性状和显微特征。Maruyama 等^[9]确定了水防风专有的化学成分为 3' (*R*), 4' (*R*)-双当归酰氧基-3', 4'-二氢花椒内酯。邓俊杰等^[10]采用 UHPLC-Q-TOF-MS 分析了防风及水防风, 结合主成分分析及聚类分析建立了识别模型。另有学者基于水防风的专属成分 3' (*R*), 4' (*R*)-双当归酰氧基-3', 4'-二氢花椒内酯开展了防风或中成药中掺伪水防风的研究^[7, 11], 上述研究为防风及水防风的鉴定分析提供了重要的技术支撑。

一方面, 超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱因其准确率、分辨率和灵敏度高优点, 能够在有限时间内反馈海量的化学成分数据信息。因此其被广泛应用于中药、中成药以及中药复方物质基础研究, 比如鉴定中药复方中的化学成分, 探索药效物质基础等。另一方面, 机器学习也已被广泛应用于中医药领域^[12-13], 其中, 梯度提升算法 (GB) 可通过结合多个弱分类器 (多为决策树) 来构建一个强分类器, 后续分类器都会纠正前一个分类器的错误。因此, 该算法因能够逐步提高模型的准确性和泛化能力而受到青睐^[14-15]。GB 算法流程大致如下: (1) 初始化常数分类器 $f(C) = i$, 其中 i 是训练数据的平均目标值。(2) 对于每个迭代步骤 $t = 1, 2, \dots, T$: ① 计算每个训练样本的残差 $r_t = x -$

$f_{t-1}(C)$, 其中 x 是真实目标值, $f_{t-1}(C)$ 是上一步的预测值; ② 拟合一个弱分类器 $M_t(C)$, 用以预测残差 r_t ; ③ 计算并优化步长参数 N_t , 控制分类器的贡献程度, 从而使损失函数最小化; ④ 新的分类器加权后结合到之前分类器中, 即更新分类器 $f_t(C) = f_{t-1}(C) + N_t M_t(C)$ 。(3) 得到最终分类器 $f_T(C)$, 用于辨识分析^[15]。因此, 在中医药数字化背景下, 为实现防风及水防风的数字化辨识, 丰富其鉴定方法, 本研究基于 GB 算法和 UHPLC-Q-TOF-MS^E 技术开展研究, 首先通过 UHPLC-Q-TOF-MS^E 对防风及水防风进行质谱分析并量化处理; 然后基于信息增益率算法 (IGR) 进行特征数据变量筛选, 去除冗杂、无效数据; 最后结合 GB 算法和特征变量数据进行建模并进行内部和外部验证, 同时基于特征筛选探索防风及水防风的差异性化学成分。

1 材料

1.1 试药

质谱级甲醇、甲酸和乙腈 (赛默飞世尔科技有限公司); 3' (*R*), 4' (*R*)-双当归酰氧基-3', 4'-二氢花椒内酯对照品 (纯度: 98.0%, 上海诗丹德标准技术服务有限公司, 批号: STG1240110); 68 批防风和 26 批水防风的具体信息详见表 1 (其中 FF01 ~ FF58、SFF01 ~ SFF23 用于数据建模, FF59 ~ FF68、SFF24 ~ SFF26 用于鉴定验证), 样品经魏锋研究员鉴定为伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. 和伞形科岩风属植物宽萼岩风 *Libonotis laticalycina* Shan et Shen. 的干燥根。

1.2 仪器

2 mL 一次性注射器 (山东威高集团医用高分子制品股份有限公司); 0.22 μm 有机滤膜 (岛津实验器材有限公司); 质谱进样小瓶、Xevo G2-XS QTOF 高分辨质谱仪、ACQUITY UPLC 液相色谱仪 (美国沃特世有限公司); KQ-500DE 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); XS-105DU 十万分之一天平 (瑞士梅特勒-托利多有限

表 1 样品的具体信息及用途

Tab 1 Information and application of samples

名称	批号	产地	培育方式
防风	FF01 ~ FF04	内蒙古	籽播 2 年+移栽 1 年
	FF05 ~ FF07	辽宁	籽播 3 年
	FF08 ~ FF10	辽宁	籽播 2 年+移栽 1 年
	FF11 ~ FF15	内蒙古	籽播 3 年
	FF16 ~ FF20	内蒙古	籽播 1 年+移栽 2 年
	FF21 ~ FF24	内蒙古	野生
	FF25 ~ FF27	河北	籽播 1 年+移栽 1 年
	FF28 ~ FF30	河北	籽播 1 年
	FF31 ~ FF33	黑龙江	籽播 1 年+移栽 3 年
	FF34 ~ FF35	黑龙江	籽播 2 年+移栽 3 年
	FF36 ~ FF39	黑龙江	籽播 3 年+移栽 1 年
	FF40 ~ FF43	黑龙江	野生
	FF44 ~ FF45	俄罗斯联邦	野生
	FF46 ~ FF48	辽宁	籽播 1 年+移栽 3 年
	FF49 ~ FF50	辽宁	野生
	FF51 ~ FF58	河北	野生
	FF59 ~ FF62	蒙古	野生
	FF63 ~ FF65	吉林	野生
	FF66 ~ FF68	内蒙古	籽播 2 年+移栽 1 年
水防风	SFF01 ~ SFF18	河南	野生
	SFF19 ~ SFF23	陕西	野生
	SFF24 ~ SFF26	甘肃	野生

公司); Purelab Chorus 1 LS 超纯水仪 (上海威立雅水处理技术有限公司)。

2 方法

2.1 色谱条件

采用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) 进行色谱分离, 流动相为乙腈 (A 相)-0.1% 甲酸水 (B 相); 梯度洗脱 (0~3 min, 5%~10%A; 3~18 min, 10%~22%A; 18~30 min, 22%~33%A; 30~35 min, 33%~52%A; 35~50 min, 52%~70%A; 50~55 min, 70%~95%A; 55~55.01 min, 95%~5%A; 55.01~61 min, 5%A); 柱温: 35℃; 进样盘温度: 10℃; 进样量: 1 μL。

2.2 质谱条件

采用 ESI⁺ 及 MS^E 采集模型, 毛细管电压 3.0 kV, 离子源温度 120℃, 质荷比 (m/z) 范围 50~1500, 采集速率 0.2 s, 锥孔电压 40 V, 碰撞能量 10~40 V, 离子源偏压 80 V, 脱溶剂温度 450℃, 脱溶剂气流量 800 L·h⁻¹。样品分析前进行质谱校正, 在样品分析过程中则利用亮氨酸脑啡肽实时校正质量轴。

2.3 样品预处理

所有原料经粉碎机打碎后过 3 号药筛, 精密称取各批次防风及水防风 0.50 g, 置于 50 mL 锥形瓶内, 精密加入 25.00 mL 70% 的甲醇水溶液, 超声提取 30 min (功率 500 W, 频率 40 kHz), 取出, 放冷, 用 0.22 μm 有机滤膜滤过, 得到待测样品, 保存至 4℃ 冰箱备用。同时取等量各批次防风及水防风制备混合样品后, 同样精密称取 0.50 g 混合样品, 置于 50 mL 锥形瓶内, 精密加入 25.00 mL 70% 的甲醇水溶液, 超声提取 30 min (功率 500 W, 频率 40 kHz), 取出, 放冷, 用 0.22 μm 有机滤膜滤过, 得到质控样品, 后续用以峰位校正和提取。

2.4 数据处理

2.4.1 量化处理 将各批次防风、水防风以及质控样品的 raw 文件导入 Progenesis QI 软件 (2.3 版本)^[16], 以质控样品为标准进行数据转化, 相关参数设定如下: 高分辨质谱, ESI⁺ 模型, 保留时间 0.05~55.00 min, 峰提取限制不低于 10⁴。基于数字化处理获得“保留时间-质荷比”与离子强度的二维数据矩阵。

2.4.2 特征筛选 将“2.4.1”获得的二维数据矩阵导入 Orange 分析软件 (3.35.0 版本), 利用 Rank 模块的 IGR 特征筛选算法, 以不小于增益率最大值的 1/2 为标准进行特征筛选。

2.4.3 数据建模分析 将特征筛选后的数据矩阵, 导入 Orange 分析软件 (3.35.0 版本), 利用 Model 模块的 GB 算法构建数据模型, 同时以 70% 的数据为训练集, 30% 的数据为测试集, 进行内部交叉验证 20、50、100 次。根据曲线下面积 (AUC)、准确率 (CA)、精确率 (P)、平衡分数 (F1)、召回率 (R) 等评估参数评价模型, 并基于构建的 GB 模型对未用于数据建模的样品进行外部鉴定验证分析。与此同时, 基于 IGR 特征筛选算法探索两者差异性化学成分。

3 结果与讨论

3.1 UHPLC-Q-TOF-MS^E 结果及讨论

以溶剂甲醇为空白, 获得的空白和各批次防风及水防风的质谱信息基峰离子流图见图 1。不同产地的防风之间或水防风之间分别呈现出相似的离子流图, 且防风与水防风的离子流图相似度也较高, 仅离子强度有差异, 极易造成误判。因此, 有必要从数据建模的角度探索数字化鉴定方法。

与此同时, 考察了甲醇、50% 甲醇水、70% 甲醇水的萃取效果以及质谱检测条件, 结果表明 70% 甲醇水的萃取效果最好。在数据采集之前, 我们比较了正负离子模式下的样品质谱信息, 结

果表明相较于负离子模式，分析样品在正离子模式下的质谱信息量更多且离子强度明显较高。因此，最终选择在正离子模式下对样品进行质谱数据采集。此外，MS^E 检测模式可同时获取一级母离子及二级碎片离子，提高分析效率，有利于探索防风及水防风的差异性化学成分。

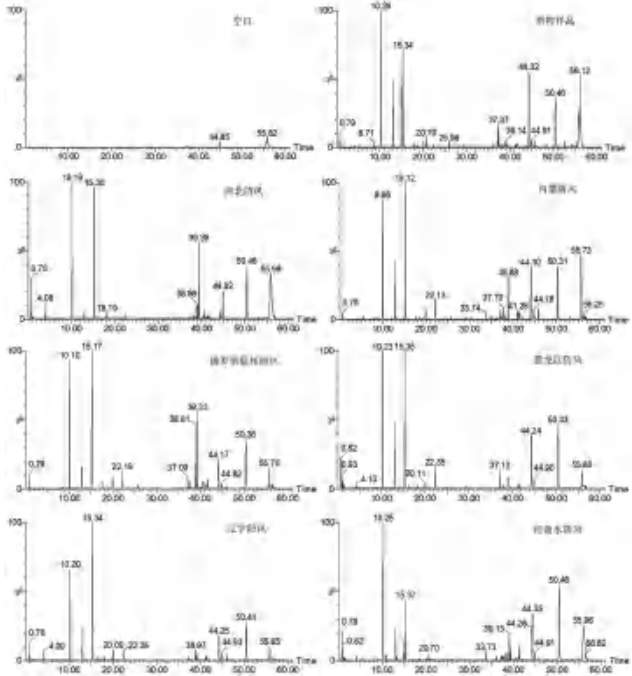


图 1 防风及水防风的基峰离子流图
Fig 1 Base peak ion chromatograms of *Saposhnikovia Radix* and *Libonotis Radix*

3.2 量化处理及特征筛选结果及讨论

基于“2.4”项下方法，获得 204 个特征变量数据（“保留时间 - 质荷比”的数据对）。但上述 204 个特征变量并非都有利于防风与水防风的辨识，为剔除冗杂的无效数据，进行了 IGR 特征筛选^[17]，其中，44.27_427.1614m/z 和 44.28_875.3238m/z 的增益率最大为 0.657。因此，以 0.3285 (0.657/2) 为标准，最后筛选得到 32 个特征变量，具体详见表 2。在分析过程中，以混合质控样品为标准进行数据转化，最大程度保留各批次样品的原始数据信息。选择 IGR 特征筛选算法，其通过引入分裂熵，解决信息增益倾向于取值较多变量的问题，侧重于取值较少的特征变量，而这与探索差异性化学成分（仅在防风或水防风的一方有取值）的思路一致。以 0.3285 (0.657/2) 为标准筛选特征变量是考虑到变量增益率的整体分布情况，尽可能地去除冗杂、无关数据信息，只提取前 15% 的数据信息，从而提高模型的精确度及运算效率。此外，上述 32 个特征变量包括防风和水防风的共有成分表征数据及专

属性成分表征数据，可在不同批次、不同产地的样品中稳定检测到。

表 2 特征筛选后的 32 个特征变量及增益率值
Tab 2 Thirty-two feature variables and gain ratio values after feature filtering

特征变量	增益率值	特征变量	增益率值
44.27_427.1614m/z	0.657	20.63_439.1614m/z	0.373
44.28_875.3238m/z	0.657	10.09_601.2130m/z	0.373
33.68_287.0935m/z	0.519	38.99_203.0356m/z	0.373
14.84_585.4580m/z	0.508	36.11_256.2654m/z	0.373
38.62_387.1451m/z	0.376	50.60_203.1808m/z	0.373
37.62_191.1085m/z	0.373	45.56_429.1919m/z	0.356
10.85_387.0758m/z	0.373	30.52_335.1088m/z	0.355
0.84_291.1297m/z	0.373	24.44_217.0474m/z	0.355
37.30_258.2803m/z	0.373	38.91_329.1362m/z	0.355
14.84_585.2188m/z	0.373	38.91_229.0831m/z	0.355
1.11_349.1344m/z	0.373	37.72_275.0873m/z	0.355
39.07_329.1399m/z	0.373	37.72_375.1387m/z	0.355
20.63_571.2031m/z	0.373	22.31_277.1041m/z	0.355
18.47_277.1089m/z	0.373	22.31_439.1540m/z	0.355
20.63_277.1090m/z	0.373	44.28_327.1241m/z	0.347
18.47_571.2034m/z	0.373	41.33_243.1740m/z	0.341

3.3 数据建模分析及讨论

基于 32 个特征变量的数据信息和 GB 算法构建数据模型，其评价参数详见表 3。

表 3 基于 32 个特征变量所建 GB 模型的评价参数
Tab 3 Evaluation parameters of the GB model based on 32 feature variables

模型	AUC	CA	FI	P	R	内部验证次数
GB	1.000	0.976	0.976	0.977	0.976	20
GB	1.000	0.978	0.977	0.978	0.978	50
GB	1.000	0.958	0.957	0.960	0.958	100
平均	1.000	0.971	0.970	0.972	0.971	—

AUC 和 CA 分别是衡量 GB 模型整体分类效果的指标和 GB 模型预测的准确率^[18]。P 代表的是模型预测为真样本中实际也为真样本的比例，而 R 则是模型正确预测的真样本数占所有为真样本数的比例^[18-19]。此外，FI 是 P 和 R 的调和平均值，其适用于数据不均衡时。以上参数越接近于 1.000，则 GB 模型效果越好。如表 3 所示，当进行 100 次内部验证时，除 AUC 外的评价参数均低于 20、50 次内部验证时的对应评价参数，是因为内部验证采用随机模式，即随机选取数据作为测试集进行 100 次判定分析。随着内部验证次数增加，一些分类错误的数据亦会被随机重复地选为测试数据进行分析，从而导致评价参数降低。另一方面，无论进行多少次内部交叉验证，都是针对 GB 模型本身的验

证,且随着验证次数的增加,反而更能体现模型的稳健性,不代表模型效果较差。此外,无论进行 20、50 还是 100 次内部交叉验证,GB 模型的各项评价参数均大于 0.955。其平均评价参数 $AUC = 1.000$, $CA = 0.971$, $P = 0.972$ 等,均表明 GB 模型效果较佳,准确率较高,能够满足分析要求。

在 GB 模型构建中,对 GB 算法的超参数进行优化,结果表明,当随机森林树的数量为 10,学习率为 0.1,树的最大深度为 5,节点分裂最大为 3 时的模型效果最佳。而在上述相同条件下,基于 204 个特征变量构建的 GB 模型的评价参数详见表 4。

表 4 基于 204 个变量所建 GB 模型的评价参数
Tab 4 Evaluation parameters of the GB model based on 204 variables

模型	AUC	CA	FI	P	R	内部验证次数
GB	0.973	0.878	0.866	0.893	0.878	20
GB	0.978	0.877	0.865	0.894	0.877	50
GB	0.980	0.862	0.846	0.884	0.862	100
平均	0.977	0.872	0.859	0.890	0.872	—

结合表 3 和表 4 可知,GB 模型的平均 CA 提高了 0.099,FI 提高了 0.111,其他参数均有所提高,表明 204 个变量中确实存在不利于两者辨识的无关数据,而基于 IGR 的特征筛选可有效去除无关数据,提高模型的精确度。

3.4 外部鉴定验证结果与讨论

基于 32 个特征变量构建的 GB 模型对 10 批防风样品及 3 批水防风样品进行外部验证鉴定,结果见表 5。

表 5 基于 GB 模型的数字化鉴定结果
Tab 5 Digital identification results based on GB model

样品	批号	输出结果	概率值 /%	样品	批号	输出结果	概率值 /%
防风	FF59	防风	86	防风	FF66	防风	90
防风	FF60	防风	90	防风	FF67	防风	90
防风	FF61	防风	90	防风	FF68	防风	90
防风	FF62	防风	90	水防风	SFF24	水防风	75
防风	FF63	防风	90	水防风	SFF25	水防风	73
防风	FF64	防风	90	水防风	SFF26	水防风	74
防风	FF65	防风	90	—	—	—	—

水防风与防风的辨识分析,本质上即二分类问题。默认情况下,当某方概率值大于 50%,即会偏向该方,比如防风输出概率值为 55%,水防风输出概率值即为 45%,则会判定为防风。为进一步提高判定的准确度,我们将阈值设定为 70%。如表 5 所示,虽然 FF59 ~ FF68 的防风样品数据均未用于构建 GB 模型,且其产地不同于构建模型所

用防风的产地,但基于 GB 模型依然能够准确实现防风的数字化辨识,且概率值均大于 85%,同样,水防风也能够实现准确的数字化辨识,概率值均大于 72%。综上所述,GB 模型的外部鉴定验证的正确率为 100%,并未出现在内部交叉验证结果较佳,而在外部测试集表现较差的情况,表明模型具有一定的稳健性。当然,不可否认的是,水防风的样品相对较少,后续需要增加样本量,基于构建的 GB 模型进一步探索,从而优化 GB 模型等。

3.5 差异性成分分析结果及讨论

如表 2 所示,基于 IGR 算法可获取变量增益率值,该值越大,其变量对于防风及水防风的区分越重要。在特征筛选后 32 个特征变量中,44.27_427.1614m/z 的增益率值最大。其在防风与水防风样品中的分布见图 2。

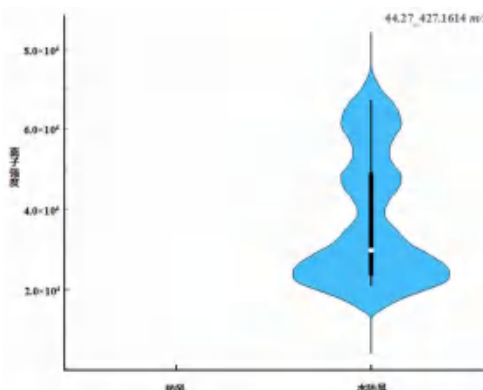


图 2 44.27_427.1614m/z 在防风及水防风样品中的分布
Fig 2 Distribution of 44.27_427.1614m/z in *Saposhnikovia Radix* and *Libonotis Radix* samples

如图 2 所示,427.1614m/z 在水防风样品存在,但在防风样品中未检出,是水防风的专属成分。同时在 MS^E 模式下能够提取出其碎片离子 327.1099m/z, $[M + H]^+$; 245.0712m/z, $[M + H]^+$ 。经查阅文献和对照品比对(对照品质谱信息见图 3),确定该化学成分就是 3' (R), 4' (R) - 双当归酰氧基 -3', 4' - 二氢花椒内酯^[5, 7, 20]。不同保留时间下的 571.2034 和 571.2031 同样是水防风的专属化学成分,且两者是同分异构体,均具有典型的碎片离子 439.1422m/z, 277.0955m/z 和 259.0859m/z,经文献比对,两者为 6"-β-D- 芹糖亥茅酚苷的异构体^[20]。此外,如图 4 所示,防风中独有的化学成分为 30.52_335.1088m/z,为 Divaricatol,与文献报道一致^[20]。综上所述,基于 IGR 算法的特征筛选同样可以锁定防风与水防风的关键差异化学成分,说明基于信息增益率的特征筛选有助于探索两者的差异性化学成分。

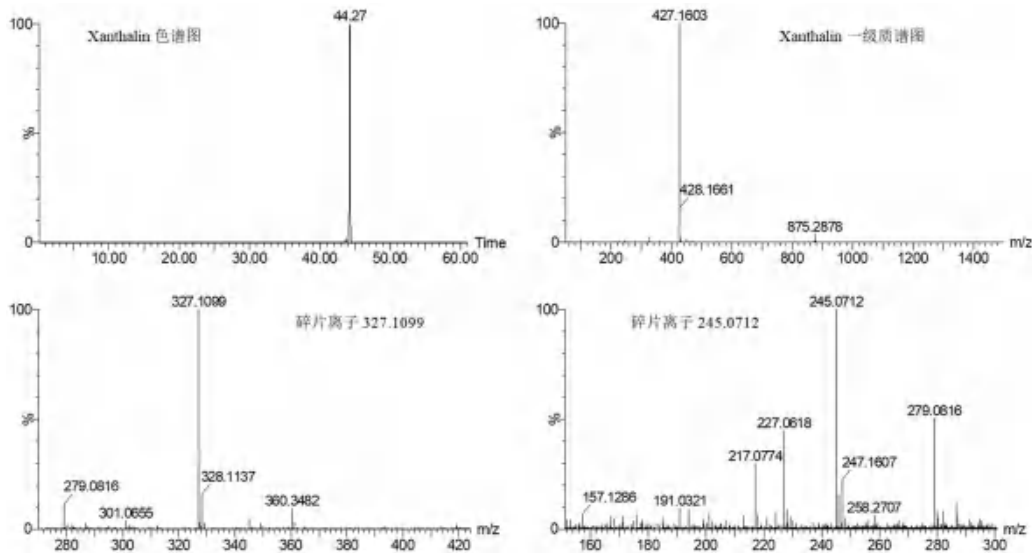


图 3 3' (R), 4' (R) - 双当归酰氧基 -3', 4'- 二氢花椒内酯对照品的质谱信息

Fig 3 Mass spectrometry information of xanthalin standard

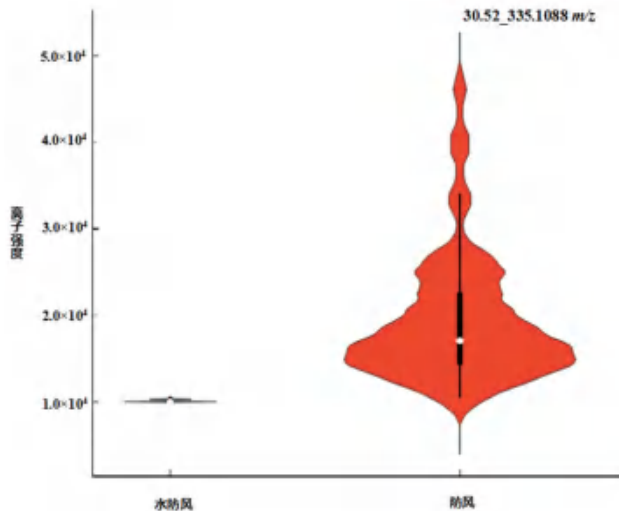


图 4 30.52_335.1088m/z 在防风及水防风样品中的分布

Fig 4 Distribution of 30.52_335.1088m/z in *Saposhnikoviae Radix* and *Libonotis Radix* samples

4 结论

防风是一种临床常用的中药, 目前含有防风成分的中成药超过 500 种, 其组方多样, 且临床使用量较大。然而, 在国家中药材饮片抽检专项中发现, 市场上存在水防风掺杂防风饮片的现象^[21]。刘珍等^[11]研究表明, 龙泽熊胆胶囊中存在水防风掺伪防风投料的情况, 并基于 3' (R), 4' (R) - 双当归酰氧基 -3', 4'- 二氢花椒内酯成分建立了 TLC、HPLC、UPLC-MS/MS 等检测方法, 用于鉴别龙泽熊胆胶囊中的水防风掺伪。本研究基于 UHPLC-Q-TOF-MS^E 技术, 对防风和水防风进行了分析, 构建 GB 数据模型, 成功实现了防风及其伪品水防风的辨识分析。同时, 基于信息

增益率的特征筛选, 筛选出了两者的差异性化学成分, 这些结果与化学计量学分析的结果一致。该研究为未来防风药材饮片的掺伪鉴别提供了重要依据, 并为进一步提高中药材的质量控制提供了科学支持。

参考文献

- [1] Yang M, Wang CC, Wang WL, et al. *Saposhnikovia divaricata*-an ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological review [J]. *Chin J Integr Med*, 2020, 26 (11): 873-880.
- [2] Gao JW, Zhan Y, Wang YH, et al. Advances in phytochemistry and modern pharmacology of *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk [J]. *Chin J Integr Med*, 2023, 29 (11): 1033-1044.
- [3] Liu CL, Yang MQ, Tang ZS, et al. Research on the improvement effect of *Saposhnikovia divaricata* (Trucz.) Schischk on rheumatoid arthritis based on the "component-target-pathway" association [J]. *Anal Biochem*, 2023, 674: 115184.
- [4] 王建华, 崔景荣, 朱燕, 等. 防风及其地区习用品解热镇痛作用的比较研究 [J]. *中国医药学报*, 1989, 4 (1): 20-22, 79.
- [5] 胥爱丽, 钟惠娴, 孙冬梅, 等. 基于 HPLC 指纹图谱成分含量和化学模式识别不同产地防风与水防风 [J]. *中成药*, 2023, 45 (5): 1557-1565.
- [6] 张萍, 李宁新, 李明华, 等. 2019 年全国中药材及饮片质量分析报告 [J]. *中国现代中药*, 2020, 22 (5): 663-671.
- [7] 杜娟, 李玮, 崔宇宏, 等. 防风饮片中掺有易混品水防风检测方法的研究 [J]. *药物分析杂志*, 2022, 42 (6): 1054-1064.
- [8] 杨春艳. 防风伪品硬阿魏、水防风、葛缕子 (根) 的鉴

- 定[J]. 黑龙江中医药, 2006 (5): 50-51.
- [9] Maruyama T, Ezaki M, Shiba M, et al. Botanical origin and chemical constituents of commercial *Saposhnikovia* radix and its related crude drugs available in Shaanxi and the surrounding regions [J]. *J Nat Med*, 2018, 72 (1): 267-273.
- [10] 邓俊杰, 谢浙裕, 毛威. 基于 HPLC-Q-TOF-MS 结合多元统计分析的防风与水防风快速识别模型建立及差异性标志物的核磁鉴定[J]. *中国现代应用药学*, 2023, 40 (7): 928-933.
- [11] 刘珍, 陆佳, 张万青, 等. 龙泽熊胆胶囊中水防风掺伪的检测方法研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2024, 35 (4): 570-579.
- [12] Deo RC. Machine learning in medicine [J]. *Circulation*, 2015, 132 (20): 1920-1930.
- [13] Ma SY, Liu JL, Li WH, et al. Machine learning in TCM with natural products and molecules: current status and future perspectives [J]. *Chin Med*, 2023, 18 (1): 43.
- [14] Zhang ZH, Zhao YM, Canes A, et al. Predictive analytics with gradient boosting in clinical medicine [J]. *Ann Transl Med*, 2019, 7 (7): 152.
- [15] Zhang B, Griesbach C, Bergherr E. Bayesian learners in gradient boosting for linear mixed models [J]. *Int J Biostat*, 2022, 20 (1): 123-141.
- [16] Wang XR, Zhang JT, He F, et al. Identification Analysis of *Angelicae sinensis* radix and *Angelicae pubescentis* radix based on quantized "Digital Identity" and UHPLC-Q-TOF-MSE analysis [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2024, 35 (9): 2222-2229.
- [17] 朱焱丹, 陈兴荣, 李秋萍. 基于信息增益率的超高维变量选择[J]. *统计与决策*, 2021, 37 (22): 18-21.
- [18] Jiang T, Gradus JL, Rosellini AJ. Supervised machine learning: a brief primer [J]. *Behav Ther*, 2020, 51 (5): 675-687.
- [19] Gong YG, Ding W, Wang PP, et al. Evaluating machine learning methods of analyzing multiclass metabolomics [J]. *J Chem Inf Model*, 2023, 63 (24): 7628-7641.
- [20] 钟惠娴, 胥爱丽, 肖观林, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 结合薄层色谱法分析防风与其伪品水防风的化学成分差异[J]. *中药新药与临床药理*, 2022, 33 (2): 242-248.
- [21] 冯贞, 崔宇宏, 李民生, 等. 防风药材及饮片质量控制和评价思路[J]. *中国现代中药*, 2021, 23 (10): 1686-1691.

(收稿日期: 2024-11-04; 修回日期: 2025-03-03)

乙酰唑胺低共熔药物体系的筛选及药效评价

王婷¹, 蒋志涛¹, 韩怡¹, 施周梦楠^{2*} (1. 张家港市中医医院药学部, 江苏 苏州 215600; 2. 张家港市中医医院医务处, 江苏 苏州 215600)

摘要: **目的** 筛选合适的低共熔溶剂 (DES), 提高难溶性药物乙酰唑胺的溶解度和生物利用度。 **方法** 以乙酰唑胺的溶解度为指标, 筛选出增溶能力最强的 DES, 采用差示扫描量热法 (DSC) 验证低共熔混合物的形成; 通过细胞毒性和动物毒性实验评估 DES 的毒性, 并采用 Caco-2 细胞模型研究 DES 对乙酰唑胺细胞转运的影响; 最终在大鼠体内验证 DES 对乙酰唑胺生物利用度和药效的影响。 **结果** 由甜菜碱-苹果酸-葡萄糖-水 (1:1:1:6) 组成的 DES 显著增强了乙酰唑胺的溶解度, 一定浓度范围内未发现明显的细胞毒性和动物器官毒性; Caco-2 细胞转运实验证明 DES 可以增强乙酰唑胺的肠道转运吸收; 动物实验表明 DES 增加了乙酰唑胺的血浆药物暴露量, 并能提升其利尿活性。 **结论** 由甜菜碱-苹果酸-葡萄糖-水 (1:1:1:6) 组成的 DES 能提升乙酰唑胺的溶解度和生物利用度, 有望成为难溶性口服药物的增溶剂。

关键词: 乙酰唑胺; 低共熔溶剂; 生物利用度; 溶解度; 细胞毒性; 药动学; 利尿剂; 渗透性

中图分类号: R943, R965 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)05-1289-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.018

基金项目: 江苏省卫生健康委医学科研项目 (No.Z2022028); 苏州市医疗卫生科技发展计划项目 (No.SKYD2023228, No.SKYXD2022066); 南京中医药大学自然科学基金项目 (No.XZR2023099)。

作者简介: 王婷, 女, 主管药师, 主要从事药理学活性评价研究, email: 18261860618@163.com ***通信作者:** 施周梦楠, 男, 主管药师, 主要从事药物质量评价研究, email: zhoumengn2023@163.com

Screening and pharmacodynamic evaluation of acetazolamide deep eutectic drug systems

WANG Ting¹, JIANG Zhi-tao¹, HAN Yi¹, SHI Zhou-meng-nan^{2*} (1. Department of Pharmacy, Zhangjiagang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Suzhou Jiangsu 215600; 2. Department of Medical Affairs Section, Zhangjiagang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Suzhou Jiangsu 215600)

Abstract: Objective To screen a suitable deep eutectic solvent (DES) to improve the solubility and bioavailability of the poorly soluble drug acetazolamide. **Methods** The solubility of acetazolamide was used as an indicator to select the DES with the strongest solubility, and differential scanning calorimetry was used to verify the formation of the DES. The toxicity of the DES was evaluated through cytotoxicity and animal toxicity tests, and the effect of the DES on the cellular transport of acetazolamide was determined with a Caco-2 cell model. Finally, the effect of the DES on the bioavailability and pharmacological activity of acetazolamide was verified in rats. **Results** The DES composed of betaine-malic acid-glucose-water (1 : 1 : 1 : 6) greatly enhanced the solubility of acetazolamide, and no significant cytotoxicity or organ toxicity in the rats was observed within a certain concentration range. The Caco-2 cell transport experiment demonstrated that the DES enhanced the intestinal absorption of acetazolamide. Animal experiments showed that the DES increased the plasma drug exposure to acetazolamide and enhanced its diuretic activity. **Conclusion** The DES composed of betaine-malic acid-glucose-water (1 : 1 : 1 : 6) can improve the solubility and bioavailability of acetazolamide, which holds promise as a solubilizer for poorly soluble oral drugs.

Key words: acetazolamide; deep eutectic solvent; bioavailability; solubility; cytotoxicity; pharmacokinetics; diuretics; permeability

在药物研发过程中,近 40% 的上市药物和 70% 的候选药物显示出水溶性差^[1]。药物溶解度差会阻碍药物的吸收,造成口服制剂生物利用度低。生物药剂学分类系统 (biopharmaceuticals classification system, BCS) 根据药物的溶解性及渗透性高低,对药物进行分类^[2-3],其中 BCS IV 类的药物具有低溶解性、低渗透性的特点,药物在胃肠道的溶解度为其吸收的限制因素。因此提高难溶性药物的溶解度来改善口服给药生物利用度具有重要的临床意义^[4]。

乙酰唑胺是一种磺酰胺类碳酸酐酶抑制剂,属于 BCS IV 类药物。它能抑制肾小管的碳酸酐酶,减少 H^+ 和 HCO_3^- 的生成,从而减少 H^+ 与 Na^+ 的交换,起到利尿作用,亦能抑制睫状体的碳酸酐酶,使眼压下降。目前临床口服给药主要用于辅助治疗各种类型青光眼及某些内眼手术时降低眼压^[5]。但是其连续用药的利尿作用减弱,也会引起不良反应如四肢麻木、恶心等,严重者引起急性肾衰竭^[6]。乙酰唑胺本身的溶解性差、口服生物利用度相对较低,使用剂量大,限制了其在临床中的应用。

低共熔溶剂 (deep eutectic solvents, DES) 是一

种由氢键受体和氢键供体以一定化学计量比在一定条件下形成的低共熔混合物,具有环境友好、制备容易、毒性低等优点^[7]。DES 良好的生物相容性使其在医药领域中展现出巨大的潜力,目前已被应用于改善难溶药物的溶解度^[8]、改善药物的经皮渗透或口服吸收、增强药物的生物活性^[9]及促进药物的跨膜能力^[10]等。另外,通过低共熔技术可直接将药物制成低共熔混合物,改善其理化或生物学性质^[11-12]。乙酰唑胺分子具有氢键受体及供体,在 DES 体系中是理想的模型药物,可作为 BCS IV 类难溶药的代表性药物用于增加溶解度和生物利用度的研究。

因此,本研究旨在制备、筛选 DES 用于改善乙酰唑胺的溶解度及生物利用度,以期乙酰唑胺新剂型的研究和应用提供更多理论支撑,也为其他 BCS IV 类药物低共熔体系的筛选提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪、Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统串联 G6470A 三重四极杆串联质谱仪 (美国安捷伦公司), BT25S 型电子分析天平 (北京赛多利斯公司), TGL-16C 型离心机

(上海安亭仪器厂), KQ-500E 超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司), ZNCL-BS 智能磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司), TGyrate Basic 涡旋混匀仪(北京天根生化科技有限公司), BB150 二氧化碳培养箱、LUX 多功能酶标仪(美国 Thermo Fisher 科技有限公司), Chemtron PREMIUM 多功能旋转黏度计(优莱博技术有限公司), DSC3500 差示扫描量热计(德国 NETZSCH 仪器有限公司)。

1.2 试药

利多卡因(分析纯, 索莱宝科技有限公司, 纯度 $\geq 98.5\%$, 批号: 201805), 乙酰唑胺(分析纯, 索莱宝科技有限公司, 纯度 $\geq 99\%$, 批号: 230510), 甲醇(分析纯, 天津永大化工试剂有限公司), 甲醇(色谱级, 美国 Fisher Scientific 公司)。薄荷醇(批号: 30138518)、乳酸(批号: O0901A)、氯化胆碱(批号: S0910C)、百里酚(批号: M0506B)、甜菜碱(批号: M0506B)、苹果酸(批号: M0122A)、葡萄糖(批号: N1129A)、木糖醇(批号: J0501A)(阿拉丁工业公司), 大鼠尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST) ELISA 试剂盒(南京建成有限公司)。CCK8 试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司)。

1.3 动物与细胞

SPF 级 SD 大鼠, 体重 200 ~ 250 g [江苏集萃药康生物科技股份有限公司, 生产许可证号 SCXK(苏) 2022-0009, 质量合格证号 202200567001], 在受控环境中饲养, 所有实验方案均按照张家港市中医医院动物伦理委员会制定的标准和规定执行(伦理批件号: KY-2022-1207-1)。人胚肾细胞 HEK293T(批号: SCSP-5291)、人正常肝细胞 L02(批号: SCSP-3591)和人结直肠腺癌细胞 Caco-2(批号: SCSP-4031)细胞[中国科学院(中国上海)细胞库]。

2 方法

2.1 DES 的制备

设计并考察 6 种 DES, 种类如表 1 所示。按照 DES 中氢键供体和氢键受体的摩尔比分别称量各组分后, 置于玻璃烧杯中混匀。将烧杯置于磁力搅拌器中, 以 $800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速连续搅拌并加热, 直至形成均一、澄清的液体^[13], 得到的 DES 冷却后置于干燥器中, 室温保存待用。

2.2 乙酰唑胺在低共熔体系中的溶解度的测定

2.2.1 色谱条件 采用 C18 柱(Agilent, 250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), 流动相为水-甲醇(20:80, V/V), 等度洗脱, 进样量 5 μL , 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 254 nm, 柱温 35°C ^[14]。

2.2.2 标准曲线的建立 称取乙酰唑胺对照品 5

表 1 6 种不同 DES 的组成比例及反应条件

Tab 1 Composition ratios and reaction conditions for 6 different DESs

组成成分	化学计量比	反应温度 / $^\circ\text{C}$
薄荷醇-乳酸	1:1	80
氯化胆碱-乳酸	1:1	80
百里酚-乳酸	1:1	60
甜菜碱-苹果酸-葡萄糖-水	1:1:1:6	60
苹果酸-木糖醇-水	1:1:4	60
丙氨酸-乳酸	1:4	110

mg, 精密称定。用色谱级甲醇溶解并定容, 配制成含 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 乙酰唑胺的对照品储备液。逐级稀释得到质量浓度为 0.05、0.1、0.5、2、10、50、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列对照品溶液。经 0.45 μm 滤膜滤过后, 进行 HPLC 分析。以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

2.2.3 回收率与精密度试验 取 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的乙酰唑胺对照品溶液, 连续进样 6 次, 记录乙酰唑胺的峰面积值, 计算精密度。另取已知浓度的乙酰唑胺甲醇溶液 6 份, 每份 0.5 mL, 精密加入 0.5 mL 质量浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的乙酰唑胺对照品溶液, 测定含量并计算回收率。

2.2.4 不同饱和溶剂中乙酰唑胺的含量测定 移取 1 mL 的 DES 转移至 5 mL 的 EP 管中, 继续加入过量的乙酰唑胺, 涡旋 30 s, 制备饱和溶液, 用铝箔避光, 在 25°C 下静置 24 h。目视确认过饱和后, 将混合物离心 5 min (离心力 3330 g), 取上清液, 离心, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取 100 μL 滤液用甲醇稀释 1000 倍, 进样测定。记录色谱峰面积, 计算溶液中乙酰唑胺的含量, 计算溶解度。使用相同的方法测定乙酰唑胺在甲醇、水中的溶解度。

2.3 差示扫描量热法(DSC)表征 DES 的形成

使用差示扫描量热计对特定的 DES 进行热分析。分别称取 DES 或单一化合物样品约 5 mg, 置于铝坩埚中, 在 $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 流量氮气吹扫下加热至 60°C 保持 20 min, 使用 $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速率加热, 升温至 300°C , 记录升温曲线。

2.4 DES 的细胞毒性研究

2.4.1 细胞培养 HEK293T、L02 和 Caco-2 细胞分别在 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基(含 $100 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素、 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素和 $0.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 新霉素)中培养。细胞以 $6000 \text{ 个} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的密度接种在培养皿中, 并置于 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养, 培养基每 2 日更换一次。

2.4.2 细胞活力测定 使用 CCK8 法评估 DES 对 HEK293T、L02 和 Caco-2 的细胞毒性。将细胞以每孔 2×10^4 个细胞的密度接种到 96 孔板中, 并在 37°C 、5% CO_2 培养箱中孵育 24 h。将每孔原有培养基吸出, 分别加入 $0.8 \sim 6.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 梯度

浓度 DES 的培养液, 继续孵育 24 h, 加入 10 μL CCK8 溶液, 继续孵育 4 h, 用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度 (OD), 计算细胞存活率。以空白培养基为空白组, 正常培养细胞为对照组。细胞存活率 (%) = $(OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{空白组}}) / (OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

2.5 DES 的动物器官毒性评价

选取 SD 大鼠 12 只, 雌雄各半, 分为对照组和 DES 组, 每组 6 只。DES 组大鼠给予含有 10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ DES 的水溶液, 自由饮用。对照组大鼠自由饮水, 连续 7 d。在实验期间, 监测动物的毒性迹象, 如行为变化、死亡率和体重变化。于 0、7 d 采集大鼠血样, 使用 ELISA 试剂盒分别测定血浆中 ALT、AST、Cr 和 BUN 的含量。大鼠处死后, 收集肝脏、肾脏和结肠组织, 在中性缓冲的 10% 甲醛中固定 18 h, 在 70% 乙醇中脱水, 然后包埋在石蜡中进行组织学检查。将组织切片切成 5 μm 的厚度, 脱蜡, 再水化, 并用 HE 染色, 最后用中性树胶封片。在光学显微镜下观察图像, 分析各组织病理状况。

2.6 乙酰唑胺在 DES 中的药动学研究

2.6.1 生物样本的采集 选取 SD 大鼠 12 只, 雌雄各半, 随机分为两组, 所有大鼠在实验前禁食 12 h。每组按照 10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量灌胃乙酰唑胺, 给药溶媒分别为水 (对照组) 或 DES (DES 组)。在特定时间点 (0、0.5、1、1.5、2、2.5、3.5、8、12 和 24 h), 自大鼠眼内眦采血 300 μL 至肝素处理过的离心管中, 并立即在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 3 min (离心力 17 300 g), 吸取上清液, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

2.6.2 血浆样品处理 取血浆样品 100 μL 置于 1.5 mL 的 EP 管中, 加入 10 μL 的 100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 利多卡因甲醇溶液 (内标), 加 300 μL 乙腈沉淀蛋白, 涡旋 1 min 后离心 (离心力 17 300 g , 10 min), 取上清液置于 35 $^{\circ}\text{C}$ 氮气流下吹干。残渣中加入 100 μL 甲醇-水 (1:1, V/V) 复溶, 涡旋混匀, 经过 0.22 μm 滤膜滤过后进样分析。

2.6.3 LC-MS 分析条件 色谱分离采用安捷伦 ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱 (2.1 $\text{mm} \times 50 \text{ mm}$, 1.8 μm), 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$, 流动相 A 为水, 流动相 B 为乙腈, 梯度洗脱 (0 ~ 1.5 min, 30%B; 1.5 ~ 3.5 min, 80%B; 3.5 ~ 3.6 min, 30%B; 3.6 ~ 4 min, 30%B), 流速 0.3 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量 2 μL 。使用多反应监测 (MRM) 扫描以电喷雾电离 (ESI) 负离子模式进行质谱分析。质谱电离源温度为 500 $^{\circ}\text{C}$, 喷雾电压为 3.5 kV。MRM 扫描包括母离子和产物离子 m/z 221 > 83 (乙酰唑胺) 和 233 > 84 (利多卡因)^[15], 通过计算待测物与内标的面积比值, 代

入标准曲线计算血药浓度。

2.6.4 线性关系考察 取 100 μL 空白血浆 10 份, 加入系列含内标的混合对照品溶液 10 μL , 再按照 “2.6.2” 项下方法处理, 制得相当于含乙酰唑胺 1、2、5、10、20、50、100、200、500 和 1000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品。以血浆中待测物的浓度为横坐标 (x), 待测物与内标的峰面积比值为纵坐标 (y), 用加权最小二乘法进行线性回归, $1/\chi^2$ 为权重系数, 得回归方程。

2.6.5 药动学参数计算 将测得的血药浓度结果代入 DAS (v3.2.6) 软件处理, 以非房室模型计算药动学参数 $AUC_{0 \sim t}$ 、 $AUC_{0 \sim \infty}$ 、 t_{max} 、 CL_z/F 、 C_{max} 、 $t_{1/2}$ 。DES 与水提取物的相对生物利用度通过计算血浆浓度-时间曲线下面积 (AUC) 来确定。

2.7 DES 对乙酰唑胺经 Caco-2 细胞跨膜转运的影响

2.7.1 Caco-2 细胞单层模型的建立 取对数生长期的细胞进行消化和离心处理, 重悬细胞于完全培养基中, 再接种到 Transwell 培养板中。在培养板的顶侧加入 0.5 mL 细胞悬液, 在底侧加入 1.5 mL 培养基后, 置于培养箱中连续培养 21 d^[16], 得到分化完全的细胞单层模型。

2.7.2 乙酰唑胺 Caco-2 细胞跨膜转运实验 去除 Transwell 培养板两侧的培养液, 用适量预热的 HBSS 缓冲液清洗两次。分别向 Caco-2 细胞的肠腔侧 (AP) 和基底侧 (BL) 加入预热的 HBSS 缓冲液 0.5 mL 和 1.5 mL, 将处理后的培养板置于培养箱中平衡 30 min 后取出, 弃去 HBSS 缓冲液。AP 侧加入含 6.4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ DES 和 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 乙酰唑胺的 HBSS 混合溶液 0.5 mL, BL 侧加入 1.5 mL 的 HBSS 缓冲液。把 Transwell 培养板置入培养箱中继续培养, 分别在不同时间点 (0、0.5、1、2、4、8 h) 从接收室吸取转运液 0.5 mL, 同时补加等量 HBSS 缓冲液。同时以不含 DES 的 HBSS 溶液加入 AP 侧作为对照组, 利用 LC-MS 检测转运液中的乙酰唑胺的浓度。转运液中乙酰唑胺质量 (μg) = (乙酰唑胺浓度 $\times$ 0.5 mL) / 3。

2.8 DES 中乙酰唑胺的利尿活性测定

选取 24 只健康 SD 大鼠, 雌雄各半, 随机分为 4 组。第一组大鼠灌胃乙酰唑胺的水混悬液 2 mL, 第二组大鼠灌胃乙酰唑胺的 DES 溶液 2 mL (给药剂量均为 10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 第三组、第四组大鼠分别灌胃 2 mL 水及 2 mL 的 DES。使用代谢笼在 6 h 内收集每只大鼠的尿液样本, 并使用量筒测量尿液体积。

2.9 统计分析

采用 SPSS 23.0 软件, 多组之间采用单因素方差分析, 两组之间用 t 检验, $P < 0.05$ 表明差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 乙酰唑胺在不同 DES 中的溶解度

3.1.1 HPLC 分析的标准曲线和方法学验证 对乙酰唑胺的系列对照品溶液进行 HPLC 进样分析, 以浓度为横坐标 (x), 峰面积为纵坐标 (y), 计算得到回归方程为 $y = 412x + 310$, $r = 0.9995$, 表明乙酰唑胺在 $0.05 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与峰面积线性关系良好, 定量限为 $0.05 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。乙酰唑胺对照品溶液连续进样 6 次分析, 色谱峰面积的 RSD 为 0.17%。平均加样回收率为 96.6%, 对应 RSD 为 2.2%, 说明该方法精密度与准确性良好。

3.1.2 乙酰唑胺在不同溶剂中的溶解度 在室温下测量乙酰唑胺的溶解度, 发现乙酰唑胺在水中几乎不溶。由甜菜碱 - 苹果酸 - 葡萄糖 - 水形成的 DES 使乙酰唑胺的溶解度提升最明显 (见表 1), 故选择甜菜碱 - 苹果酸 - 葡萄糖 - 水 (1 : 1 : 1 : 6) 组成的 DES 进行后续研究。

表 2 溶解乙酰唑胺不同溶剂的理化性质对比

Tab 2 Physicochemical properties of different solvents for dissolving acetazolamide

溶剂	溶解度 / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	密度 / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	黏度 / ($\text{mPa} \cdot \text{s}$)
水	—	1.00	2.99
甲醇	7.12	0.79	0.56
薄荷醇 - 乳酸 (1 : 1)	5.51	1.28	74.2
氯化胆碱 - 乳酸 (1 : 1)	4.38	1.58	103
百里酚 - 乳酸 (1 : 1)	6.57	1.39	57.5
苹果酸 - 木糖醇 - 水 (1 : 1 : 4)	3.67	1.15	68.8
丙氨酸 - 乳酸 (1 : 4)	5.98	1.21	85.1
甜菜碱 - 苹果酸 - 葡萄糖 糖 - 水 (1 : 1 : 1 : 6)	10.68	1.34	121

3.2 DSC 表征甜菜碱 - 苹果酸 - 葡萄糖 - 水组成的 DES

甜菜碱、苹果酸和葡萄糖均表现出较为尖锐的吸热峰, 表明随着温度升高出现熔化的过程。由甜菜碱 - 苹果酸 - 葡萄糖 - 水组成的 DES 未观察到和单一组分类似的吸热峰, 表明甜菜碱 - 苹果酸 - 葡萄糖 - 水形成了混溶的 DES (见图 1)。

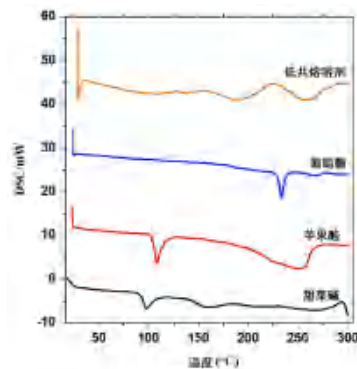


图 1 DES 及其单体成分 DSC 扫描图

Fig 1 DSC scan of DES and its individual components

3.3 DES 的细胞毒性研究

采用 CCK8 测定 HEK293T、L02、Caco-2 细胞, 结果见图 2。随着 DES 浓度 ($0.8 \sim 6.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的增加, HEK293T、L02、Caco-2 细胞的存活率下降, 但均高于 80%。说明 DES 细胞毒性较低。

3.4 DES 的器官毒性评价

大鼠自由摄取含甜菜碱 - 苹果酸 - 葡萄糖 - 水 (1 : 1 : 1 : 6) 的饮用水 7 d 后, 未观察到大鼠有明显的中毒症状或死亡的现象。与对照组大鼠相比, 给予 DES 的大鼠体重均稳定增加 (见图 3A)。采用 ELISA 法测定对大鼠血液中的 ALT、AST、Cr

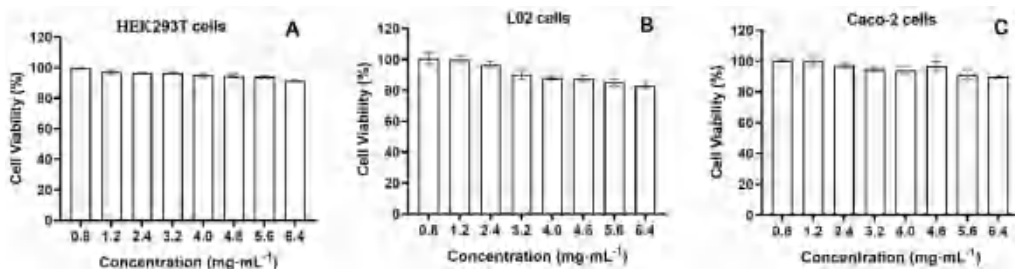


图 2 DES 对 HEK293T (A)、L02 (B) 和 Caco-2 (C) 的细胞毒性作用

Fig 2 Cytotoxicity of DES on HEK293T (A), L02 (B) and Caco-2 (C) cells

和 BUN 含量, 0 d 和 7 d 数值差异无统计学意义 (见图 3B ~ 3E)。此外, HE 染色的组织病理学分析显示, 肾脏、肝脏和结肠没有明显的形态学改变 (见图 3F)。以上结果表明甜菜碱 - 苹果酸 - 葡萄糖 - 水 (1 : 1 : 1 : 6) 不会导致明显的大鼠肝、肾损伤, 该 DES 在吸收、代谢、排泄代谢过程中具有优异的生物相容性, 适用于口服给药。

3.5 DES 对乙酰唑胺经 Caco-2 细胞跨膜转运的影响

小肠为药物口服的主要吸收部位, 通过建立 Caco-2 单层细胞模型模拟小肠上皮细胞, 可对乙酰唑胺的经肠吸收转运状况进行研究。药物从 Caco-2 单层细胞 AP 侧到 BL 侧方向的转运可用于评价药物的口服吸收程度。结果如图 4 所示,

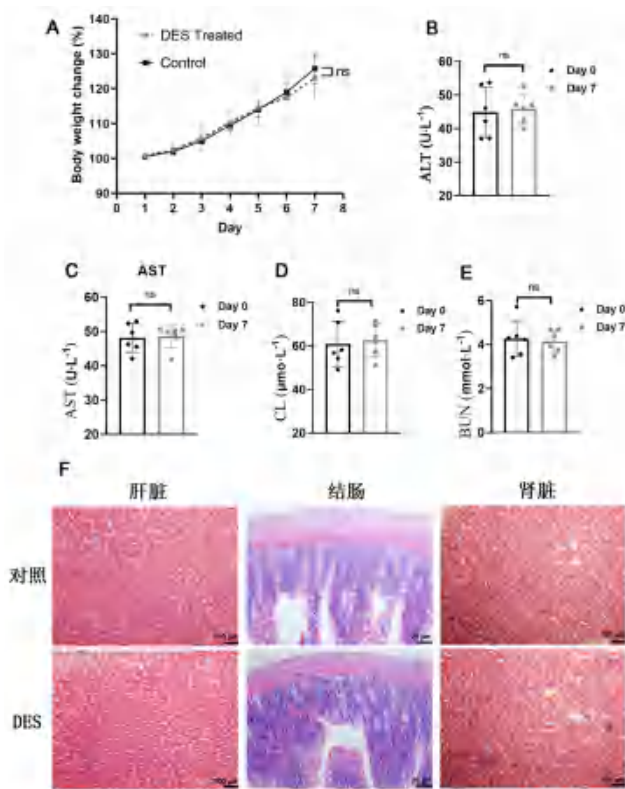


图 3 口服甜菜碱-苹果酸-葡萄糖-水 (1:1:1:6) 对大鼠器官毒性

Fig 3 Organ toxicity of oral betaine-malate-glucose-water (1:1:1:6) in rats

在实验过程中,乙酰唑胺的转运量随着时间推移而增加,具有明显的时间依赖性。加入 DES 后乙酰唑胺由 AP 侧到 BL 侧方向的转运量显著增加 ($P < 0.05$),从细胞水平上验证了甜菜碱-苹果酸-葡萄糖-水 (1:1:1:6) 组成的 DES 可以提高乙酰唑胺的渗透性。

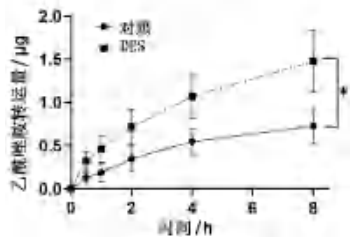


图 4 DES 对乙酰唑胺由 AP 侧到 BL 侧转运的影响 (* $P < 0.05$)
Fig 4 Effect of DES on the transport of acetazolamide from the AP to the BL side (* $P < 0.05$)

表 3 口服乙酰唑胺主要药动学参数对比

Tab 3 Major pharmacokinetic parameters following oral administration of acetazolamide

组别	$AUC_{0 \sim t} / (ng \cdot h \cdot mL^{-1})$	$AUC_{0 \sim \infty} / (ng \cdot h \cdot mL^{-1})$	$C_{max} / (ng \cdot mL^{-1})$	$t_{1/2} / h$	t_{max} / h	$CL_z / F / (L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1})$
对照组	10 712 ± 395	12 087 ± 1195	1651 ± 317	5.75 ± 1.9	2	0.88 ± 0.078
DES 组	18 885 ± 967*	21 109 ± 1577*	2472 ± 512*	6.91 ± 1.1	2	0.46 ± 0.041*

注 (Note): 与对照组相比, * $P < 0.05$ (Compared with the control group, * $P < 0.05$).

4 讨论

口服药物是目前临床治疗疾病的主要手段之

3.6 乙酰唑胺在大鼠体内的药动学对比

口服乙酰唑胺后,血药浓度-时间曲线如图 5 所示。与以水作为溶媒的对照组相比,以甜菜碱-苹果酸-葡萄糖-水 (1:1:1:6) 作为给药溶媒使乙酰唑胺血药浓度显著升高,主要药动学参数见表 3。两组之间乙酰唑胺的平均半衰期 ($t_{1/2}$) 和 t_{max} 值差异没有统计学意义,与对照组相比,DES 组乙酰唑胺的 CL 的平均值显著降低 ($P < 0.05$), C_{max} 与对照组相比显著升高 ($P < 0.05$), $AUC_{0 \sim \infty}$ 显著增加 ($P < 0.05$)。通过计算 $AUC_{0 \sim \infty}$ 确定乙酰唑胺的相对生物利用度,发现 DES 组中乙酰唑胺的 $AUC_{0 \sim \infty}$ 相较对照组明显增加 ($P < 0.05$),表明使用 DES 作为口服溶媒可增强乙酰唑胺的口服生物利用度。这种改善可能是由于 DES 提高了乙酰唑胺的溶解度和渗透性,并在其吸收过程中发挥了促进作用。

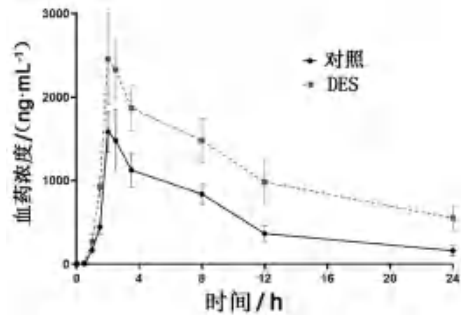


图 5 大鼠口服乙酰唑胺后血药浓度-时间曲线图
Fig 5 Plasma concentration-time curves of acetazolamide in rats after the oral administration

3.7 DES 溶解乙酰唑胺后的利尿活性

采用利尿活性评估甜菜碱-苹果酸-葡萄糖-水 (1:1:1:6) 作为给药溶媒对乙酰唑胺药效的影响。结果显示,无论以水或 DES 作为溶媒,口服乙酰唑胺均会导致大鼠尿量增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。如图 6 所示,与单独口服 DES 相比,乙酰唑胺 DES 溶液组的尿量显著增加 ($P < 0.01$),而单独口服 DES 不会显著影响尿量。以上结果表明,DES 作为口服的溶媒,不仅可以改善乙酰唑胺的生物利用度,还可以增强乙酰唑胺在大鼠体内的利尿作用。

一,其有效成分在机体内的吸收、分布、代谢和排泄极大地影响了药物的疗效,而其中吸收过程尤为

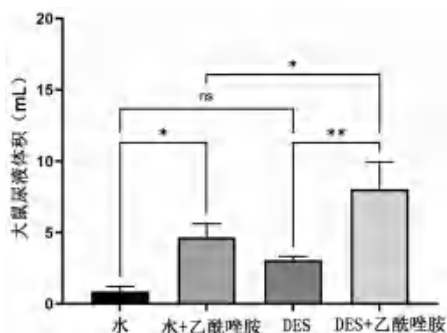


图 6 大鼠 6 h 尿量对比图 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig 6 6-hour urine volume in rats (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

关键^[17]。乙酰唑胺在水中的溶解度和渗透性较差,实现治疗效果的一个关键方面是提高乙酰唑胺的生物利用度。本研究表明,与水 and 甲醇等传统溶剂相比,由甜菜碱、苹果酸、葡萄糖和水组成的 DES 提高了乙酰唑胺的溶解度和渗透性,从而增加了口服利尿活性。药动学研究发现,乙酰唑胺在 DES 中的生物利用度有所增加,并与对照组表现出相似的药动学特征,这表明观察到的生物利用度的提高主要归因于 DES 的增溶特性。原理推测为乙酰唑胺分子可以与 DES 体系形成大量氢键,以及通过分子间的 π - π 堆积作用增加乙酰唑胺的溶解度。

作为给药溶媒,DES 的毒性作用不容忽视。鉴于药物的吸收、代谢、清除过程主要发生在肠道、肝脏、肾脏,故本研究选用了 HEK293T、L02、Caco-2 细胞进行了细胞层面的毒性研究。同时,在动物层面考察了 DES 对肾脏、肝脏、结肠器官的毒性。DES 的组成成分中,甜菜碱富含于植物和动物体内,是一种能够调节生物体内部环境、增强机体活性的天然物质^[18]。苹果酸常见于苹果、葡萄等水果中,是三羧酸循环的中间体,经常用作食品添加剂或药物赋形剂^[19]。葡萄糖是生命体的必需物质,可作为人体的能量补充剂。甜菜碱、苹果酸和葡萄糖均具有较高的生物安全性,因此以甜菜碱-苹果酸-葡萄糖-水(1:1:1:6)组成的 DES 有望作为药物赋形剂。

5 结论

通过测定乙酰唑胺在不同 DES 中的溶解度,筛选得到由甜菜碱、苹果酸、葡萄糖-水(1:1:1:6)组成的 DES 为有前途的给药溶媒。毒性研究表明,灌胃 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DES 未观察到大鼠肝脏、肾脏的明显损伤,同时,DES 提高了乙酰唑胺的生物利用度和利尿活性。因此,利用 DES 是提高乙酰唑胺的溶解度和口服生物利用度可行且安全的策略,也为乙酰唑胺或 BSCIV 类药物口服制剂的开发提供了新思路。

参考文献

- [1] Kimoto K, Yamamoto M, Karashima M, et al. Pharmaceutical cocrystal development of TAK-020 with enhanced oral absorption [J]. Crystals, 2020, 10 (3): 211.
- [2] Miranda C, Pérez-Rodríguez Z, Hernández-Armengol R. et al. Biowaiver or bioequivalence: ambiguity in sildenafil citrate BCS classification [J]. AAPS PharmSciTech, 2018, 19 (4): 1693-1698.
- [3] 祝文静,李娜,王萌,等.雷公藤甲素生物药剂学分类研究[J].时珍国医国药,2023,34(7):1586-1589.
- [4] 贾米,张心泰,彭睿,等.O-羧甲基壳聚糖提高生物药剂学分类系统 II 类药物溶解度能力的研究[J].华西药杂志,2021,36(3):248-253.
- [5] 沈素.乙酰唑胺引起的急性肾衰竭与临床治疗[J].中国医刊,2007,42(3):23-25.
- [6] 许立平,王水湘,王丽艳.利尿剂在临床中的运用及不良反应[J].实用临床医学,2001,2(1):96-97.
- [7] 宣婧婧,武喜营,戚建平,等.天然低共熔溶剂在药剂学中的应用[J].药学学报,2021,56(1):146-157.
- [8] Erlund I, Kosonen T, Alfthan G, et al. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers [J]. Eur J Clin Pharmacol, 2000, 56 (8): 545-553.
- [9] Radosevic K, Curko N, Srcek VG, et al. Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity [J]. LWT-Food Sci Technol, 2016, 73: 45-51.
- [10] Wu XY, Chen ZJ, Li Y, et al. Improving dermal delivery of hydrophilic macromolecules by biocompatible ionic liquid based on choline and malic acid [J]. Int J Pharm, 2019, 558: 380-387.
- [11] Dai YT, Witkamp GJ, Verpoorte R, et al. Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications [J]. Food Chem, 2015, 187: 14-19.
- [12] 李元春,董雪晴,李聪伟,等.双啞达莫低共熔药物体系的筛选、表征及性质评价[J].河北大学学报(自然科学版),2023,43(4):387-394.
- [13] 全洛慧,朱越,李佳凝,等.低共熔溶剂对黄连中生物碱绿色提取工艺的优化[J].中成药,2023,45(9):3014-3017.
- [14] 李谷辛,张振中,孙卫东,等.乙酰唑胺缓释胶囊体内外一致性评价研究[J].中国临床药理学杂志,2021,37(19):2547-2552.
- [15] 刘平,张金亮,安晓霞,等.乙酰唑胺缓释胶囊在比格犬的药动学[J].中国医院药学杂志,2014,34(6):464-468.
- [16] 张雨晴,郝星慧,王飞,等.染料木素-川芎嗪共晶在 Caco-2 细胞模型中的转运研究[J].动物医学进展,2024,45(2):40-47.
- [17] 高燕,何少明.基于体内过程的民族药药效物质基础研究进展[J].亚太传统医药,2016,12(6):16-18.
- [18] 李顺泽,伍振煌,王俊龙.甜菜碱的生物功能、药理活性及其在动物生产中的应用研究进展[J].饲料研究,2022,45(21):150-155.
- [19] 盛明俊,詹凯,马龙.L-苹果酸的生产方法、生理功能及其应用[J].安徽农学通报,2024,30(1):82-87.

(收稿日期:2024-08-09;修回日期:2024-10-09)

基于生信分子对接及动物实验研究清营汤 对于川崎病的作用机制

颜荆芬, 朱焱林* (深圳大学第三附属医院, 广东 深圳 518000)

摘要: **目的** 探讨清营汤治疗川崎病的作用机制。**方法** 采用网络药理学筛选清营汤治疗川崎病(KD)的关键靶点。并通过分子对接验证核心靶点与药物成分的结合活性。动物实验采用 C57BL/6JSD 小鼠随机分成空白对照组(NC)、川崎病模型组(KD)、清营汤低剂量组(QYT-L)、清营汤高剂量组(QYT-H)、阿司匹林组(ASC), 每组各 10 只。采用干酪乳酸杆菌(LCWE)造模, 造模成功后, QYT-L 组、QYT-H 组、ASC 组分别灌胃给予 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ QYT、 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ QYT 及 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ASC, NC 组及 KD 组灌胃等体积磷酸盐缓冲液(PBS), $1 \text{ 次} \cdot \text{d}^{-1}$, 持续干预 7 d。记录小鼠体重变化; 心脏超声检查小鼠左心室射血分数与短轴收缩率; 酶联免疫吸附法测定小鼠血清中白细胞介素(IL)-6、IL-1 β 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 含量; 蛋白免疫印迹法检测小鼠心脏冠脉组织中 PI3K、Akt、p-Akt、TNF- α 蛋白表达情况, 以论证清营汤对 KD 模型小鼠的作用。**结果** 筛选获得清营汤活性成分与 KD 的关键核心靶点(包括 AKT1、IL6、TNF、STAT3、MMP9、TGFB1 等), 与关键核心成分木犀草素、黄连素、汉黄芩素、山柰酚、柳杉酚、槲皮素的分子对接结果显示普遍具有良好结合活性。动物实验结果显示, 清营汤能有效改善 KD 小鼠的心肌功能指标, 抑制炎症因子释放, 降低 TNF- α 、PI3K、p-AKT 蛋白表达。**结论** 清营汤可能是通过木犀草素、山柰酚、槲皮素等活性成分作用于 IL6、AKT1、TNF- α 、IL-1 β 、TGF- β 1 等靶点, 调控 TNF、PI3K-AKT 信号通路与 Th17 细胞等介导一系列炎症反应, 抑制炎症因子释放等方式发挥对 KD 的治疗作用。

关键词: 网络药理学; 分子对接; 川崎病; 清营汤

中图分类号: R966, R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)05-1296-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.019

Mechanism of Qingying decoction on Kawasaki disease based on bioinformatics molecular docking and animal experiments

YAN Jing-fen, ZHU Yan-lin* (*The Third Affiliated Hospital of Shenzhen University, Shenzhen Guangdong 518000*)

Abstract: Objective To determine the mechanism of Qingying decoction (QYT) for Kawasaki disease (KD). **Methods** Network pharmacology was used to screen the core targets of QYT for KD. Then the binding activity of the core targets with the drug components was verified by molecular docking. In the experiments, 50 C57BL/6JSD mice were randomly divided into a blank control group (NC group), a Kawasaki disease model group (KD group), a QYT low-dose group (QYT-L group), a QYT high-dose group (QYT-H group), and an aspirin group (ASC group), with 10 mice in each group. The mice were modeled with lactobacillus casei (LCWE). After successful modeling, $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ QYT, $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ QYT and $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ASC were given by gavage in the QYT-L, QYT-H and ASC groups, respectively, while an equal volume of phosphate buffer solution was given by gavage in the NC group and the KD group, continuous intervention for 7 d. Changes in body weight of the mice were recorded. Cardiac ultrasonography was used to examine the left ventricular ejection fraction and short-axis fractional shortening. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to determine the

基金项目: 深圳市罗湖区软科学研究计划 (No.LX202402004)。

作者简介: 颜荆芬, 女, 主治医师, 主要从事中医儿科学研究, email: forworkiii@126.com *通信作者: 朱焱林, 男, 主治医师, 主要从事中医儿科学研究, email: 52167166@qq.com

serum levels of interleukin (IL)-6, IL-1 β , and tumor necrosis factor (TNF)- α in mice. Western blot was used to detect the expression of PI3K, Akt, p-Akt, and TNF- α proteins in the coronary tissues of mouse hearts. **Results** The core targets of QYT's active ingredients, including AKT1, IL6, TNF, STAT3, MMP9, and TGFB1 were screened. The molecular docking with the active ingredients luteolin, berberine, wogonin, kaempferol, sugiol, quercetin showed generally good binding activities. The animal experiments showed that QYT effectively improved the myocardial function indexes, inhibited the release of inflammatory factors, and reduced the expression of TNF- α , PI3K and p-AKT in KD mice. **Conclusion** QYT achieves its therapeutic effect on KD through luteolin, kaempferol, and quercetin, etc. via the targets of IL6, AKT1, TNF- α , IL-1 β , and TGF- β 1 to modulate the TNF and PI3K-AKT signaling pathway with Th17 cells, etc., which mediates a series of inflammatory responses and inhibits the release of inflammatory factors.

Key words: network pharmacology; molecular docking; Kawasaki disease; Qingying decoction

川崎病 (Kawasaki disease, KD), 又称黏膜皮肤淋巴结综合征 (mucocutaneous lymph node syndrome, MCLS), 主要临床表现为全身非特异性血管炎症, 常见于 5 岁以下儿童, 主要危害中小动脉, 其中又以冠状动脉炎症损伤 (coronary artery lesions, CALs) 为甚^[1]。关于 KD 的发病机制尚未明晰, 有研究者认为其与遗传因素有关, 感染导致自身免疫系统异常激活而引发一系列症状^[2]。西医针对 KD 的治疗策略以抗炎和抗血小板为主^[3-4]。中医学根据 KD 临床表现将其归为“温病”范畴, 小儿阴常不足, 气阴两虚, 血行不畅, 温毒之邪游走体内, 治疗上以卫气营血理论为准则, 清热凉血, 养阴生津, 通窍活血^[5]。清营汤首载于温病条辨, 在现代临床应用中广泛应用于感染性疾病、皮肤病、病毒性脑炎、免疫性疾病等^[6]。原方中犀牛角今以水牛角代, 为君药, 其性寒, 入营入血, 既能清除营分热毒, 又可凉血散瘀; 生地黄可清热凉血、养阴生津; 玄参可凉血滋阴、清热泻火、解毒散结; 麦冬可养阴生津、清心除烦, 共为臣药, 三者合用, 在清热养阴基础上, 加强了清营凉血解毒功效; 佐以竹叶心、丹参、黄连、金银花、连翘, 共奏清热除烦之功; 以甘草调和诸药为使^[7]。本方清营凉血、化瘀通络, 正合 KD 持续高热、结膜充血、杨梅舌、皮疹等热伤营血之证, 相关研究表明清营汤对于 KD 有治疗作用, 但其作用机制有待进一步明确^[8-9]。中药复方的显著特征是多成分、多靶点、多途径, 借助网络药理学分析中药复方成分作用以及对复杂疾病的潜在机制有独特优势, 对筛选关键作用明星分子有指导性意义。本研究先通过借助网络药理学分析清营汤成分及其对 KD 的潜在作用靶点, 结合计算机模拟分子对接, 并使用清营汤干预 KD 小鼠模型, 观察小鼠心肌功能、血清炎症因子以及通路蛋白表达的相关变化, 以研究清营汤对 KD 的治疗作用与机制, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 基于生信技术寻找清营汤作用 KD 核心靶点

通过 HERB 本草组鉴数据库分别搜索复方中单药成分, 结合 PubChem 数据库补充成分具体信息, 根据 Lipinski 五规则^[10][化合物的分子量小于 500 Da, 化合物结构中的氢键供体数量不超过 5 个, 氢键受体数量不超过 10 个, 脂水分配系数的对数值 (logP) 在 -2 ~ 5, 可旋转键的数量不超过 10 个] 以及 Veber 规则^[11][药物分子极性表面积 (PSA) 不超过 140 Å² 或氢键总数量不超过 12 个、可旋转化学键数量不超过 10 个], 对药物成分信息进行筛选得到药物主要成分。通过 SwissTargetPrediction 数据库关联主要成分对应靶点, Probability* > 1 筛选主要靶点。分别通过 TTD、OMIM、GeneCards 数据库检索“Kawasaki Disease”或“Mucocutaneous Lymph Node Syndrome”下载并整理 KD 靶点基因。对 KD 差异基因与清营汤活性成分靶点取交集, 得到清营汤作用于 KD 靶点。通过对作用靶点构建蛋白互作网络 (PPI) 分析提取核心靶点。

1.2 计算机模拟分子对接

结合 PPI 网络、相关文献研究选择关键核心靶点作为分子对接的大分子受体, 通过 RCSB PDB 数据库, 选择物种为人, 构象分辨率 ≤ 2.5 Å, 结晶 pH 值接近人体正常生理范围, 选择核心靶点的蛋白 3D 结构 *.pdb 文件^[12]。结合药物-成分-靶点对应关系、文献研究、药物典型成分选择关键核心成分作为分子对接小分子配体, 利用 TCMSP 数据库下载活性成分 *.mol2 文件。通过 AutoDock Tools 软件对分子进行去水、加氢处理并导出为 *.pdbqt 格式的配体与受体文件, 通过 AutoDock Vina 进行分子对接, 通过结合能 Affinity 值判断结合效果, 统计结合能, 通过 PyMOL 绘制分子对接结果。

1.3 实验验证

1.3.1 动物 50 只 SPF 级雌性 C57BL/6J 小鼠, 周

龄 4 ~ 6 周, 体重 (16.05 ± 0.78) g [广州维通利华实验动物技术有限公司, SCXK (粤) 2022-0063]。动物生存条件: 12 h 循环明暗灯光, 恒温 23 °C, 恒湿 50%, 自由饮食进水。所有研究小鼠处置均依照科技部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》规定, 并经深圳大学附属第三医院动物伦理委员会批准 (批件号: DW-2022015007)。

1.3.2 药物 清营汤 (水牛角 30 g, 连翘 6 g, 黄连 5 g, 麦冬 9 g, 生地黄 15 g, 金银花 9 g, 丹参 6 g, 玄参 9 g, 竹叶心 3 g), 由深圳大学第三附属医院提供, 并经药学部王晓聪副主任中药师鉴定为合格药材, 均符合《中国药典》标准。清营汤 92 g 生药/剂, 生药煎剂 $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 干酪乳酸杆菌 ATCC393 (LCWE) (深圳子科生物科技有限公司, 货号: ZIKER0225); 阿司匹林 (ASC, 湖北巨胜生物科技有限公司, 货号: JS0444)。MRS 培养基 (货号: M8330, 北京索莱宝科技有限公司); 白细胞介素 1β (IL- 1β) (货号: PI301)、白细胞介素 6 (IL-6) (货号: PI326)、小鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α) (货号: PT512) ELISA 试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司)。兔抗 PI3K、Akt、p-Akt、TNF- α 、 β -actin 抗体 (Cell Signaling Technology 公司, 批号分别为 4292、9272、9271、38519、4970); 驴抗兔 IgG 辣根过氧化物酶 (HRP) (批号: 62027915, 北京普利莱基因技术有限公司)。

1.3.3 仪器 Vevo2100 型高分辨率超声心动图仪 (加拿大 Visual Sonics 公司); H1204 型全自动血凝分析仪 (江苏鸿恩医疗器械有限公司); HED-SY96S 型多功能酶联免疫分析仪 (山东莱恩德智能科技有限公司); 11178160 型超低温高速离心机 (赛默飞世尔科技有限公司); 5810R 型高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); 165-8001 型 Western blot 电泳仪、1703935 型转膜仪 (Bio-Rad 生命医学产品有限公司)。

1.3.4 造模及分组干预 将 LCWE 接种于无菌 MRS 培养基中, 37 °C 厌氧环境培养 48 h。将培养基以 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min 后弃上清液, 沉淀加入 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 十二烷基硫酸钠 (SDS) 充分裂解, 以 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 洗涤后, 依次用 10 倍体积 $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ RNase 溶液、DNase I 溶液、胰蛋白酶混匀, 37 °C 孵育 4 h, 每一步孵育后均离心, 弃上清液, 重复 3 次。沉淀以 4 倍体积 PBS 重悬, 冰浴超声破碎 2 h, 4 °C 条件下以 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 1 h, 上清液为 LCWE, 稀释至 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 待用。

所有小鼠适应性饲养 1 周后, 随机选取 40 只小鼠单次腹腔注射 LCWE 溶液 0.5 mL, 建立 KD 小鼠模型^[13]。造模成功的 40 只小鼠随机分为模

型组 (KD 组)、清营汤低剂量组 (QYT-L 组)、清营汤高剂量组 (QYT-H 组)、阿司匹林组 (ASC 组), 每组 10 只, 未造模的 10 只小鼠作为对照组 (NC 组)。参照相关文献^[14], QYT-L 组、QYT-H 组、ASC 组分别灌胃给予 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ QYT、 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ QYT 及 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ASC, NC 组及 KD 组灌胃等体积 PBS, 1 次 $\cdot \text{d}^{-1}$, 持续干预 7 d。

1.3.5 小鼠体重测定 于造模开始至给药最后一日, 每日对小鼠进行体重测定。

1.3.6 心脏超声检查 小鼠在处死前, 应用异氟烷 (5% , $0.8 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$) 麻醉, 脱毛固定后行经胸壁超声心动图扫描, 测量小鼠左心室射血分数 (LVEF) 与短轴收缩率 (FS), 连续 3 次计算平均值。

1.3.7 血清炎症因子测定 取各组小鼠腹主动脉血, 离心后取上清液, 使用 ELISA 试剂盒检测 TNF- α 、IL-6、IL- 1β 含量, 操作按照说明书进行, 绘制标准曲线, 得到回归方程, 并根据回归方程及样品吸光度 (OD) 值, 计算 TNF- α 、IL-6、IL- 1β 水平。

1.3.8 组织相关蛋白表达情况 使用蛋白免疫印迹法 (Western blot)^[15] 检测小鼠心脏组织 PI3K、Akt、p-Akt、TNF- α 相关蛋白的表达情况。实验最后 1 d, 处死小鼠后分离心脏组织并剪成细小碎片, 加 RIPA 裂解液混合匀浆, 离心, 取上清液, BCA 法测定样本蛋白浓度。95 ~ 100 °C 煮至蛋白变性。配制浓缩胶与分离胶, 上样, 电泳 1.5 ~ 2 h。电泳完成, 转至 PVDF 膜。转移至封闭液, 室温封闭 15 min, 加入一抗混合液 (β -actin、PI3K、Akt、p-Akt、TNF- α 均为 1 : 1000), 4 °C 摇床过夜孵育。回收一抗, TBST 洗膜 10 min, 重复 3 次, 二抗孵育 (1 : 5000), 室温摇床振荡 1 h。TBST 洗膜, 加 ECL 显色剂, 放入成像分析仪显影、定影。通过 Image J 软件分析显影条带灰度值。

1.3.9 统计学方法 采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行数据分析与统计图绘制, 计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 核心靶点提取

从 HERB 数据库搜索清营汤复方中各单药对应成分, 通过 Lipinski 五原则与 Veber 规则得到主要活性成分 85 种: 水牛角 4 种、生地黄 13 种、玄参 5 种、麦冬 9 种、丹参 29 种、黄连 11 种、金银花 10 种、连翘 13 种、竹叶心 1 种 (其中多个药味包含几种相同的活性成分)。关联主要作用靶点 626 个。通过 OMIM、TTD、GeneCards 数据库对 KD 关联靶点进行搜索汇总, 合并获得关联基因靶点 2171 个。将 KD 靶点与清营汤活性成分靶点取交集得到清营汤作用川崎病 (QYT-KD) 靶点 212 个。

QYT-KD 靶点导入 STRING 数据库得到交集靶点的 PPI 网络关系, 导出的节点网络关系文件导入 Cytoscape, 去除游离节点并进一步视觉化 PPI 关系得到 QYT-KD 靶点 PPI 网络图, 如图 1A 所示。通过 CentiScaPe 插件计算得到该网络 Betweenness 阈值 175.669、Closeness 阈值 0.002 645、Degree 阈值

53.0943, 通过筛选器调整 B、C、D 值大于以上阈值进一步拓扑分析提取核心靶点网络, 如图 1D 所示, 核心网络包含 46 个节点, 4934 条边。可以认为该 46 个节点为核心靶点中的核心靶点, 节点大小与度值大小成正相关。

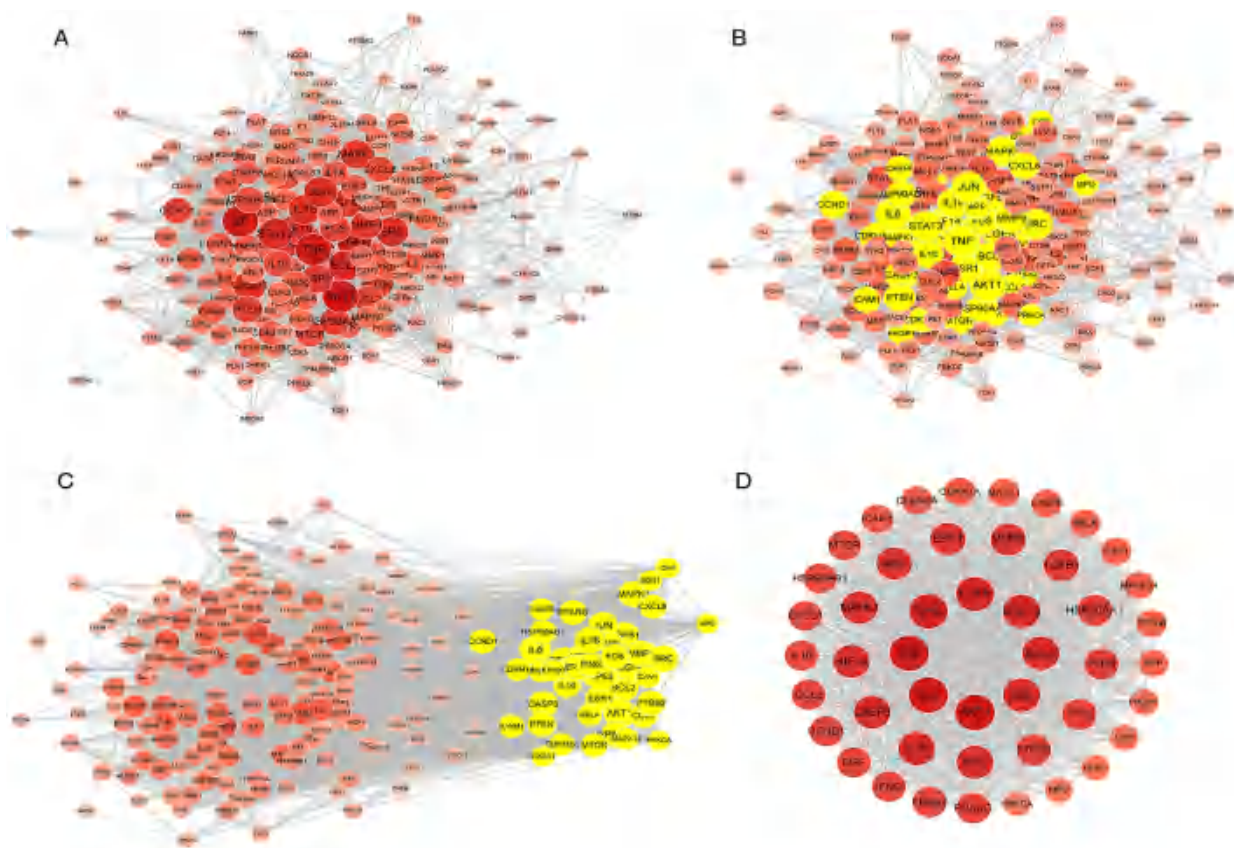


图 1 蛋白与蛋白相互作用网络

Fig 1 Protein-protein interaction (PPI) network

A. 交集基因蛋白互作网络图 (PPI network of intersecting gene targets); B. BCD 值大于阈值蛋白选取 (pick targets with BCD value greater than threshold); C. 拓扑分析过渡图 (topology analysis transition diagram); D. 核心靶点网络图 (PPI network of core gene targets)

2.2 分子对接

结合 PPI 网络、KEGG 通路富集结果、相关文献研究选择关键核心靶点蛋白 AKT1、IL6、TNF、STAT3、MMP9、TGFB1 作为依据选择分子对接的大分子受体。结合“药物-成分-靶点-通路”中主要成分、文献研究、药物典型成分选择关键核心成分木犀草素 (luteolin)(M2)、小檗碱 (berberine)(HL1)、汉黄芩素 (wogonin)(LQ1)、山柰酚 (kaempferol)(M1)、柳杉酚 (sugiol)(M4)、槲皮素 (quercetin)(M3) 作为分子对接小分子配体。分子对接结果见表 1。在分子对接结果中, 结合能的数值越低, 则两者的结合能力越强。分子对接结果显示结合能均 $< -20.93 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 说明关键成分与关键靶点蛋白均有一定的结合力。结合最为稳定的分子对接组合为木犀草素 (M2) 与 IL6 (5SFK),

结合能为 $-34.33 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。IL6 (5SFK) 与所选清营汤关键成分的结合能普遍较低。将结合能较小的 9 对组合通过 PyMol 进行可视化处理, 标记蛋白质结合位点上的氨基酸以及氢键值, 如图 2 所示。

2.3 动物实验结果

2.3.1 小鼠体重变化 自造模 0 d 开始记录小鼠体重情况, 其变化趋势如图 3 所示, NC 组缓慢增高, 参与造模各组在造模后 0 ~ 3 d 呈下降趋势, 在 3 d 开始给药干预后 QYT-L、QYT-H、ASC 组小鼠体重开始上升, 被处死之前最后测量, QYT-L、QYT-H、ASC 组小鼠体重显著高于 KD 组 ($P < 0.05$)。

2.3.2 心脏功能指标 心脏超声结果显示, 相较于 NC 组, KD 组 LVEF、FS 水平显著降低 ($P < 0.05$); QYT-L、QYT-H、ASC 组干预后的 LVEF、FS 水平显著高于 KD 组 ($P < 0.05$)(见图 4)。

表 1 分子对接结合能 ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)
Tab 1 Affinity of molecular docking ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)

配体与受体	AKT1 (4EJN)	IL6 (5SEK)	TNF (5UUI)	STAT3 (6GFA)	MMP9 (6ESM)	TGFB1 (5VQP)
木犀草素 (M2)	- 31.82	- 34.33	- 28.47	- 31.82	- 29.73	- 29.31
小檗碱 (HL1)	- 31.82	- 33.49	- 28.89	- 30.15	- 30.56	- 29.31
汉黄芩素 (LQ1)	- 31.40	- 29.31	- 27.21	- 26.80	- 27.63	- 25.54
山柰酚 (M1)	- 30.98	- 32.66	- 28.05	- 28.05	- 28.89	- 25.96
柳杉酚 (M4)	- 30.15	- 31.82	- 27.21	- 27.63	- 28.47	- 26.38
槲皮素 (M3)	- 31.40	- 29.73	- 28.47	- 27.21	- 29.73	- 27.21

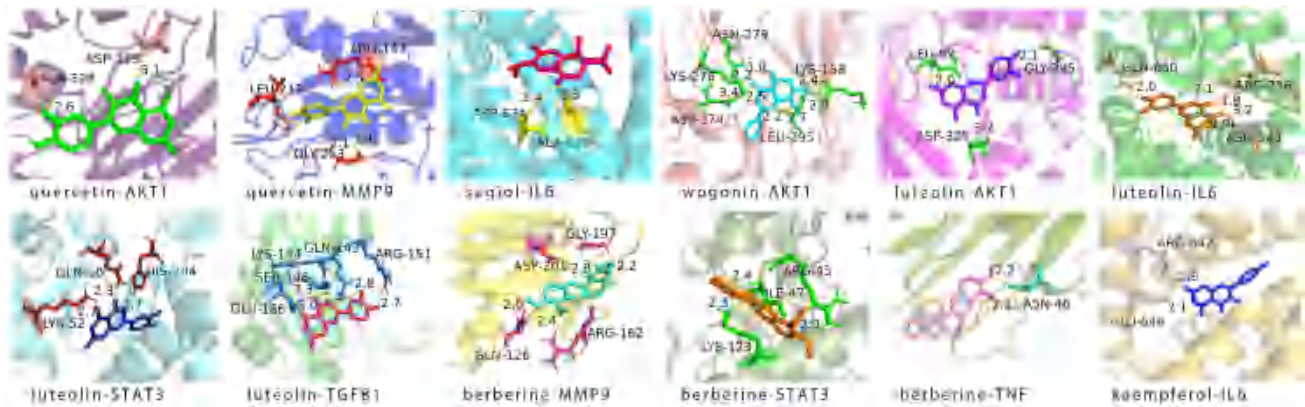


图 2 结合能较低的部分分子对接结果
Fig 2 Partial molecular docking with lower affinity

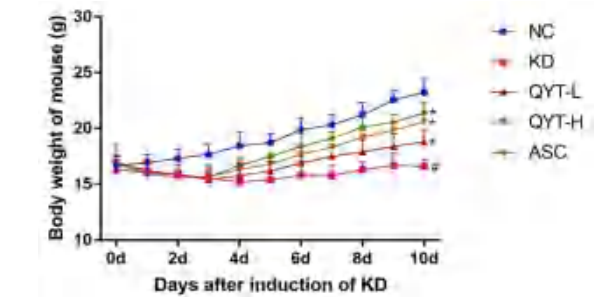


图 3 不同干预方式对小鼠体重的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
Fig 3 Effect of different interventions on the body weight of mouse ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

注：与 NC 组比较， $^{*}P < 0.05$ ；与 KD 组比较， $^{*}P < 0.05$ 。
Note: Compared with the NC group, $^{*}P < 0.05$; compared with the KD group, $^{*}P < 0.05$.

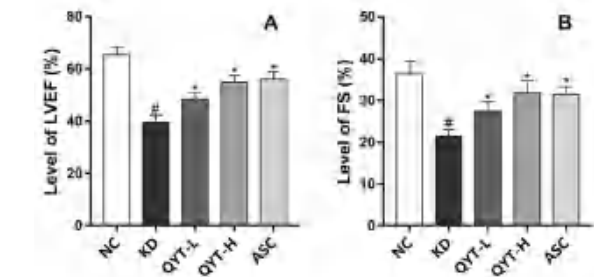


图 4 不同干预方式对小鼠心脏功能指标的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
Fig 4 Effect of different interventions on the indicators of heart function of mouse ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

注：与 NC 组比较， $^{*}P < 0.05$ ；与 KD 组比较， $^{*}P < 0.05$ 。
Note: Compared with the NC group, $^{*}P < 0.05$; compared with the KD group, $^{*}P < 0.05$.

2.3.3 血清炎症因子含量 相较于 NC 组，KD 组血清 $\text{TNF-}\alpha$ 、 IL-6 、 $\text{IL-1}\beta$ 水平显著升高 ($P < 0.05$)；QYT-L、QYT-H 组与 ASC 组干预后的血清 $\text{TNF-}\alpha$ 、 IL-6 、 $\text{IL-1}\beta$ 含量显著低于 KD 组 ($P < 0.05$) (见图 5)。
2.3.4 蛋白表达 与 NC 组相比，KD 组 PI3K、p-Akt、 $\text{TNF-}\alpha$ 蛋白表达量明显增加 ($P < 0.05$)；与 KD 组相比，QYT-L、QYT-H、ASC 组小鼠 PI3K、p-Akt、 $\text{TNF-}\alpha$ 蛋白表达量明显下降 ($P < 0.05$) (见图 6)。

3 讨论

在我国传统医学中，KD 归属“温病”范畴，温热初期温邪犯胃，累及五脏，熏蒸营血，导致口咽充血，散于体外则易致发热、皮疹。温热之邪进一步深重，热毒炽盛，热邪入里，滞于肌理、经络，耗伤气阴^[5]。温热之邪在损伤气阴的同时，累及脏腑，津液不足，气血不行，心失所养。营分证为温病发病进展中较重的情况，邪热入里，耗伤营阴，从而导致心神扰动^[6]。临床表现为身热夜甚，心烦，甚则神昏谵语，口不甚渴，这与 KD 表现相似。由于营分证是瘟病传变深重的特殊时期，此时临床中也兼见气分证或热毒窜络血分证表现，这与 KD 中皮疹、口唇出血、高热等具有相似症状。清营汤首载于《温病条辨》^[8]，其可清营透热，养阴活血，症见：壮热不退，皮肤斑疹，口唇皸裂，杨梅舌。在清营汤的活性成分中，槲皮素抗炎、抗氧化的作用已被诸多研究所

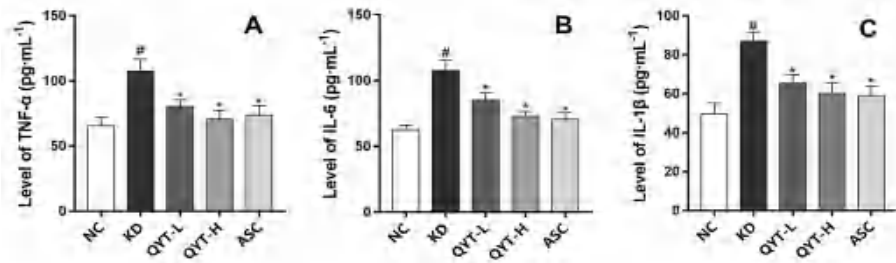


图 5 不同干预方式对小鼠血清因子的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig 5 Effect of different interventions on the inflammatory factor levels of mouse ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

注：与 NC 组比较，[#] $P < 0.05$ ；与 KD 比较，^{*} $P < 0.05$ 。

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

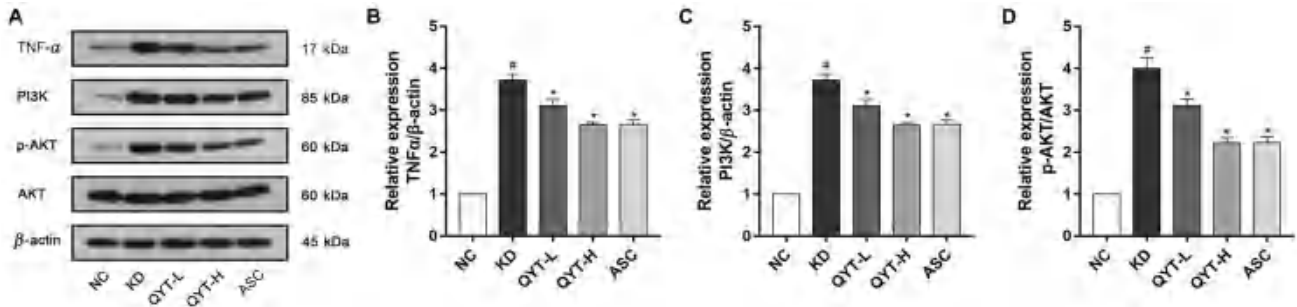


图 6 不同干预方式对小鼠冠状动脉组织蛋白相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig 6 Effect of different interventions on the expression of protein in coronary artery of mouse ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

注：与 NC 组比较，[#] $P < 0.05$ ；与 KD 比较，^{*} $P < 0.05$ 。

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

证实，被广泛应用于抗病毒、肿瘤治疗等领域^[16]。对于 KD 冠状动脉炎症细胞素的抗炎机制体现在阻止 ASC 寡聚化从而抑制 NLRP3 和 AIM2 炎症体^[17]。相关研究表明，口服摄入槲皮素有助于降低血栓形成风险，体外实验显示其作用机制在于抑制血小板信号传导^[18]。山柰酚属于常见的黄酮类化合物，有抗炎、抗肿瘤等诸多功效。根据报道，山柰酚可通过抑制 IL-32 进而抑制促炎细胞因子的产生，还可直接抑制胸腺基质淋巴细胞生成素 (TSLP)、IL-1β、TNF-α 及 IL-8 等促炎因子的产生^[19]。本研究中清营汤对于 LCWE 诱导的小鼠 KD 模型 LVEF 与 FS 心肌功能指标有改善作用，对于小鼠血清炎症因子 TNF-α、IL-6、IL-1β 也有抑制作用，由此可以证明清营汤可以调节小鼠心脏收缩舒张等心肌功能，且能抑制炎症因子释放，降低炎症对心脏的损伤。

大量研究表明，炎症因子失调与 KD 冠脉损伤以及血管炎症关系密切^[20]。本研究中通过对 QYT-KD 靶点拓扑分析得到的 KD 相关关键基因中炎症因子，涉及众多，例如 TNF-α、IL-1β、IL-6、TGF-β1 等。其中 TNF-α 在血管性疾病中扮演重要角色，与 KD 关联密切，会导致血管内皮细胞功能紊乱、损伤、凋亡等病理性变化，初期表现为冠状动脉炎症，逐渐发展为脉管狭窄动脉瘤等^[21]。

TGF-β1、IL-10 是调节性 T 细胞，可抑制自身免疫性疾病的发生，也是维持机体免疫及外周免疫耐受的重要因子^[22]。同样是促炎因子的 IL-6，由 Th17 细胞分泌，在感染外伤等因素作用下大量分泌并刺激 B 细胞前体产生抗体，促进巨核细胞增殖，激活凝血系统，进而造成血管损伤、血栓以及动脉粥样硬化^[23]。本研究动物实验结果显示清营汤对 KD 小鼠血清炎症因子 TNF-α、IL-6、IL-1β 有显著抑制作用。PI3K-AKT 通路与血栓关系密切，PI3K 通过调节整合素功能从而影响血小板的聚集、活化、黏附等一系列细胞活动，血小板的活动异常又导致 KD 患儿血管炎症，因此 PI3K-AKT 通路与 KD 相关研究有重要意义^[24-25]。与 PI3K-AKT 通路相似，TNF 通路属于经典免疫性疾病相关通路，是许多炎症相关疾病均会涉及的关键通路，TNF 本身作为促炎因子，本研究中分子对接结果显示，清营汤核心活性成分槲皮素、木犀草素、山柰酚等关键化合物与 IL6、AKT1、MMP9、TNF 等富集于 TNF 信号通路中的关键靶点呈现良好结合活性，在一定程度上佐证了清营汤活性成分借由调控 TNF 信号通路控制 KD 相关炎症。并且 Western blot 结果显示清营汤明显抑制了 KD 小鼠 PI3K、p-AKT、TNF-α 蛋白表达情况，说明其抗炎作用与调控 PI3K-AKT、TNF 信号通路有所关联。

综上所述,本研究利用网络药理学对清营汤治疗 KD 的活性成分、关键靶点及可能的作用机制进行分析,揭示了清营汤是以“多组分-多靶点-多通路”的方式发挥治疗作用;通过分子对接验证了化合物与靶点之间的结合活性,通过动物实验验证了清营汤能有效改善 KD 小鼠的心肌功能、凝血功能,抑制 PI3K-AKT、TNF 信号通路激活进而抑制炎症因子大量释放,从而发挥对于 KD 冠脉损伤的治疗作用。

参考文献

- [1] Newburger JW, Takahashi M, Burns JC. Kawasaki disease [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2016, 67 (14): 1738-1749.
- [2] Yalta K, Muhammet G, Tülin Y, et al. Multisystem inflammatory syndrome versus Kawasaki disease: potential differences in pathogenetic and clinical implications [J]. *Anatol J Cardiol*, 2023, 27 (1): 50-51.
- [3] 焦富勇, 穆志龙, 杜忠东, 等. 儿童不完全性川崎病的诊治 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2023, 25 (3): 238-243.
- [4] Shirakawa Y, Fujita Y, Ando Y, et al. The effectiveness of high-dose intravenous immunoglobulin for clostridioides difficile infection complicated by Kawasaki disease: a pediatric case report [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2024, 43 (7): e254-e255.
- [5] 刘弼臣, 宋祚民, 安效先, 等. 川崎病的中医证治 [J]. *北京中医*, 1990 (4): 10-11.
- [6] 张宙, 赖来清, 罗秋燕, 等. 清营汤联合丙种球蛋白治疗川崎病的临床效果 [J]. *国际医药卫生导报*, 2021, 27 (14): 2121-2124.
- [7] 董静.《温病条辨》中清营汤的运用及发挥 [J]. *中医药临床杂志*, 2007, 19 (1): 74-75.
- [8] 刘淑梅, 阳建军. 清营汤合生脉散加减治疗脓毒症(热入营血证)的临床研究 [J]. *中国中医急症*, 2021, 30 (2): 309-311.
- [9] 罗志春. 加味清营汤治疗气营两燔型川崎病的临床疗效研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.
- [10] Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings 1 [J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 2001, 46 (13): 3-26.
- [11] Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates [J]. *J Med Chem*, 2002, 45 (12): 2615-2623.
- [12] Wang SC, Li YY, Wang JM, et al. ADMET evaluation in drug discovery. 12. development of binary classification models for prediction of hERG potassium channel blockage [J]. *Mol Pharm*, 2012, 9 (4): 996-1010.
- [13] 金洛卿, 刘源源, 曹新冉, 等. IL-37 对 LCWE 诱导的川崎病小鼠炎症反应影响的研究 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2022, 21 (23): 2465-2468.
- [14] 熊远珍. 实验动物与人用药量的新换算 [J]. *南昌大学学报(医学版)*, 1997, 39 (4): 41.
- [15] Huang JH, Zhao CM, Zhang SW. Semaphorin 7A promotes endothelial permeability and inflammation via plexin C1 and integrin $\beta 1$ in Kawasaki disease [J]. *BMC Pediatrics*, 2024, 24 (1): 285.
- [16] 王绍展, 王媛媛, 顾妍秋, 等. 槲皮素通过抑制 TGF- β /TAK1/JNK 和 TGF- β /Smad2 信号通路发挥抗肝纤维化的作用 [J]. *中南药学*, 2022, 20 (5): 965-972.
- [17] Zhong Y, Li XY, Liang TJ, et al. Effects of NLRP3 inflammasome mediated pyroptosis on cardiovascular diseases and intervention mechanism of Chinese medicine [J]. *Chin J Integr Med*, 2024, 30 (5): 468-479.
- [18] 赵唯宇, 李世一, 辛光, 等. 槲皮素对高血压小鼠缺血性脑卒中的保护作用及其机制 [J]. *华西药学杂志*, 2021, 36 (2): 173-177.
- [19] 张丽阳, 孙军, 陈迪. 山奈酚抑制脑缺血/再灌注大鼠的脑损伤、炎症、氧化应激和凋亡 [J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2022, 31 (4): 381-386.
- [20] 蔡泽波, 韦明, 贾高泉, 等. 小儿川崎病 EMPs、TNF- α 、IL-6 的水平变化及其与冠状动脉病变的关系 [J]. *吉林医学*, 2022, 43 (4): 922-925.
- [21] 刘青. 中西医结合疗法治疗川崎病患儿的疗效及对血清 TNF- α 、IL-6、CRP 水平的影响 [J]. *内蒙古中医药*, 2021, 40 (10): 12-13.
- [22] 孙欠欠, 张行行, 赵麓, 等. 基于 5-LOX/LTB4 信号通路探讨黄芩苷/栀子苷对 PM_{2.5} 暴露致血管内皮功能障碍的干预作用及其机制 [J]. *中南药学*, 2024, 22 (2): 307-315.
- [23] 杨向娜. 加味清营汤治疗川崎病血管炎的 Th17 细胞机制相关研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2023.
- [24] Chen ZS, Li TL, Kareem K, et al. The role of PI3K/Akt signaling pathway in non-physiological shear stress-induced platelet activation [J]. *Artif Organs*, 2019, 43 (9): 897-908.
- [25] Zhang J, Weng HB, Pei QF, et al. The relationship between TNF-like protein 1A and coronary artery aneurysms in children with Kawasaki disease [J]. *Clin Exp Med*, 2022, 22 (1): 57-63.

(收稿日期: 2024-07-25; 修回日期: 2024-09-30)

人参皂苷 Rg₃ 联合布格替尼对非小细胞肺癌 细胞增殖和迁移的影响

鲍灵芝^{1, 2, 3}, 沈蕾^{1, 2, 3}, 冯天意^{1, 2, 3}, 赵飞³, 邱云良^{4, 5*} (1. 安徽中医药大学, 合肥 230013; 2. 长三角高等药物研究院, 江苏 南通 226133; 3. 南通益诺思生物技术有限公司, 江苏 南通 226133; 4. 上海益诺思生物技术有限公司, 上海 201203; 5. 中国医药工业研究总院, 上海 201203)

摘要: **目的** 探讨人参皂苷 Rg₃ 联合布格替尼对非小细胞肺癌 (NSCLC) 细胞增殖与迁移的影响, 并探索其可能的作用机制。 **方法** 选择 NSCLC 细胞株 NCI-H2228 和 NCI-H3122 细胞进行实验。采用 CellTiter-Glo 发光法检测细胞的活力; Hoechst 33342 染色观察细胞形态; PI 法检测细胞周期; 划痕实验分析细胞的迁移能力; 蛋白免疫印迹法检测细胞中 PI3K、p-PI3K、AKT 与 p-AKT 蛋白的表达。 **结果** 与布格替尼组比较, 联合用药组显著抑制肿瘤细胞活力、增殖与迁移 ($P < 0.01$); 细胞 S 期明显减少, 细胞被阻滞在 G₁ 期, 细胞凋亡增多; 细胞中 p-PI3K 与 p-AKT 蛋白的磷酸化均被显著抑制 ($P < 0.05$)。 **结论** 人参皂苷 Rg₃ 联合布格替尼可有效抑制 NSCLC NCI-H2228 和 NCI-H3122 细胞增殖并促进其凋亡, 其机制可能与抑制 PI3K/AKT 信号通路有关。

关键词: 人参皂苷 Rg₃; 布格替尼; 非小细胞肺癌; 联合用药; PI3K/AKT

中图分类号: R286 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)05-1303-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.020

Effect of ginsenoside Rg₃ combined with brigatinib on the proliferation and migration of non-small cell lung cancer cells

BAO Ling-zhi^{1, 2, 3}, SHEN Lei^{1, 2, 3}, FENG Tian-yi^{1, 2, 3}, ZHAO Fei³, QIU Yun-liang^{4, 5*} (1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230013; 2. Yangtze Delta Pharmaceutical College, Nantong Jiangsu 226133; 3. Nantong Innostar Biotechnology Co., Ltd., Nantong Jiangsu 226133; 4. Shanghai Innostar Biotechnology Co., Ltd., Shanghai 201203; 5. China Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203)

Abstract: Objective To determine the effect and mechanism of ginsenoside Rg₃ combined with brigatinib on the proliferation and migration of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells, and its possible mechanism of action. **Methods** NSCLC cells NCI-H2228 and NCI-H3122 were selected for the experiments. CellTiter-Glo luminescent method was used to detect the cell viability. The cell morphological changes were observed by Hoechst 33342 staining. The cell cycle was detected by PI method. The scratch assay analyzed the migration ability of the cells. Western blot was used to detect the expression of PI3K, p-PI3K, AKT, and p-AKT proteins in the cells. **Results** Compared with the brigatinib group, the combined medication group significantly inhibited tumor cell viability, proliferation, and migration ($P < 0.01$). The cell S phase was significantly reduced, cells were arrested in the G₁ phase, and there was an increase in the cell apoptosis. The phosphorylation of p-PI3K and p-AKT proteins in the cells was significantly inhibited ($P < 0.05$). **Conclusion** The combination of ginsenoside Rg₃ and brigatinib effectively inhibits the proliferation and promote the apoptosis of NCI-H2228 and NCI-H3122 cells, whose mechanism is related to the inhibition of the PI3K/AKT signaling pathway.

Key words: ginsenoside Rg₃; brigatinib; non-small cell lung cancer; medication combination; PI3K/AKT

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

作者简介: 鲍灵芝, 女, 在读硕士研究生, 主要从事药理学研究, email: 2695836986@qq.com * **通信作者:** 邱云良, 男, 研究员, 硕士研究生导师, 主要从事药物毒理学与药物临床前安全性评价, email: ylqiu@innostar.cn

据世界卫生组织报道,肺癌是肿瘤死亡的首要原因,其中非小细胞肺癌(NSCLC)占有肺癌病例的85%,在我国尤为突出,发病率和病死率居高不下^[1]。近年来治疗方法包括手术切除、放疗、化疗及靶向治疗,但NSCLC患者的五年生存率仍然低于20%,因此,开发基于化疗药物的新治疗策略尤为重要。布格替尼作用于多个靶点(ALK、EGFR、FLT3、ROS1),作为二代间变性淋巴瘤激酶抑制剂(ALK-TKI),其疗效相比一代更为显著^[2-3],且研究发现布格替尼可通过抑制ALK基因来抑制PI3K/AKT信号通路活性,从而抑制NSCLC细胞NCI-H2228的增殖^[4],但临床上化疗药物一直面临耐药性和毒性问题^[5]。中草药天然提取物因高效低毒的特点在肿瘤治疗领域备受关注,与化疗药物或靶向药物联合使用,能够增效减毒^[6-7]。

人参皂苷Rg₃是人参提取物中有效成分之一,具有多种药理作用。人参皂苷Rg₃作用于细胞周期,抑制肿瘤细胞有丝分裂前期蛋白质和三磷酸腺苷(ATP)的合成;调节Bcl-2家族蛋白的表达、激活caspase等诱导细胞凋亡;能够抑制血管生成^[8];还可抑制PI3K/AKT^[9-10]、NF-κB^[11-12]、MAPK^[13-14]等多个信号通路的活化。因此本研究应用人参皂苷Rg₃与布格替尼对具有EML4-ALK融合基因突变的NCI-H2228和NCI-H3122细胞进行实验,探讨人参皂苷Rg₃联合布格替尼对NSCLC细胞增殖迁移的影响,并进一步探索其作用机制。

1 材料

1.1 细胞

人NSCLC细胞株NCI-H2228(南京科佰生物技术有限公司),人NSCLC细胞株NCI-H3122(上海瑾原生物科技有限公司)。

1.2 试剂

人参皂苷Rg₃(纯度≥99.8%,成都曼思特生物技术有限公司,批号:A0239);胎牛血清(FBS)、青霉素链霉素双抗(美国Gibco公司);RPMI-1640培养液、DMEM培养液、磷酸盐缓冲液(PBS)(上海泰坦科技股份有限公司);二甲基亚砜(DMSO,北京索莱宝科技有限公司);布格替尼(纯度:99.7%,批号:HY-12857)、细胞周期与凋亡试剂盒(PI法)、Hoechst 33342(MCE公司);CellTiter-Glo发光法试剂盒(普洛麦格公司,批号:G7572);磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)、蛋白激酶B(AKT)、磷酸化PI3K(p-PI3K)、磷酸化AKT(p-AKT)、山羊抗兔IgG二抗(HRP)(批号:4292S、9272S、4228S、4060S、7074S)(Cell Signaling Technology公司);β-actin—抗

(美国Abcam公司,批号:ab213262)。

1.3 仪器

二氧化碳细胞孵育箱、离心机、超净台(赛默飞公司);荧光显微镜(Leica);Countstar细胞计数仪(上海睿钰生物科技有限公司);i3x多功能酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司];电泳仪(Bio-RAD);凝胶成像仪(培清科技有限公司);BD Accuri C6 Plus流式仪(BD Biociences)。

2 方法

2.1 细胞培养

将NCI-H2228细胞在含有10%FBS、100 U·mL⁻¹青霉素和100 μg·mL⁻¹链霉素的RPMI-1640培养基中传代培养。将NCI-H3122细胞在含有10%FBS、100 U·mL⁻¹青霉素和100 μg·mL⁻¹链霉素的DMEM培养基中传代培养。细胞均置于37℃、5%CO₂培养箱中培养。

2.2 药物配制

取20.0 mg人参皂苷Rg₃粉末溶于318.5 μL DMSO中,配制为80 mmol·L⁻¹人参皂苷Rg₃母液,分装后于-80℃避光保存备用。取1.0 mg布格替尼加入1.712 mL DMSO中溶解,配制成1 mmol·L⁻¹的布格替尼母液,后保存于-80℃。使用时将母液加至培养基中配制成相应浓度,并过0.22 μm滤膜。

2.3 细胞活力检测

2.3.1 检测细胞半数抑制浓度(IC₅₀) NCI-H2228、NCI-H3122细胞以4×10³个/孔接种于96孔板,分别加入不同浓度布格替尼(NCI-H2228细胞中加入25、50、100、200、400、800、1600 nmol·L⁻¹; NCI-H3122细胞中加入400、800、1600、3200、6400 nmol·L⁻¹),或者加入不同浓度人参皂苷Rg₃^[15-16](50、100、200、400、800、1600 μmol·L⁻¹),分别于培养箱中培养72 h后,每孔加入100 μL CTG工作液,避光孵育5 min,用酶标仪检测相对光单位(RLU)值。对照组为不加药的细胞组,空白组为只含CTG溶液的媒介组。细胞存活率(%)=(给药组RLU值-空白组RLU值)/(对照组RLU值-空白组RLU值)×100%。

2.3.2 检测细胞增殖抑制率 NCI-H2228、NCI-H3122细胞以4×10³个/孔接种于96孔板,实验分为对照组(0.1%DMSO)、人参皂苷Rg₃组(160 μmol·L⁻¹)、布格替尼组(NCI-H2228细胞中为400 nmol·L⁻¹, NCI-H3122细胞中为900 nmol·L⁻¹)以及人参皂苷Rg₃联合布格替尼组(NCI-H2228细胞中160 μmol·L⁻¹与400 nmol·L⁻¹, H3122细胞中160 μmol·L⁻¹与900 nmol·L⁻¹),置于培养

箱中分别培养 24、48、72 h 后, 每个时间点取出一块 96 孔板, 每孔加入 100 μL CTG 工作液, 避光孵育 5 min, 检测 RLU 值。

2.4 细胞形态学观察

NCI-H2228、NCI-H3122 细胞以 1×10^5 个/孔接种于 24 孔板, 按不同组别方法干预后, 于培养箱中培养 24 h 后, 弃去上清液, 加入 PBS 洗涤, 每孔加入 100 μL 10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Hoechst 33342 染料工作液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 10 min, 弃去染料使用培养基洗涤 3 次, 每次 5 min, 取出爬片置于载玻片, 荧光显微镜下观察各组细胞形态, 每组 3 个复孔。

2.5 划痕实验

NCI-H2228、NCI-H3122 细胞以 2×10^6 个/孔接种于 6 孔板。待细胞汇合度达 90% 以上后, 利用 10 μL 枪头在每个细胞孔中划出 3 条垂直划痕, 使用 PBS 洗去漂浮细胞。按不同组别方法干预后, 于培养箱继续培养。记录 0 h、24 h (NCI-H3122 细胞) 和 48 h (NCI-H2228 细胞) 细胞的划痕状态。通过 Image J 软件分析计算细胞迁移率。

2.6 流式细胞术检测细胞周期

按“2.3”项下不同组别方法干预 48 h 后, 收集各组细胞。制备细胞悬液, 离心 (1000 g, 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$), 去除上清液, 70% 乙醇重悬细胞, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜。PBS 洗 2 次, 后加入 500 μL PI 工作液重悬细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20 min。利用流式细胞仪在激发波长 488 nm 处检测红色荧光强度。采用 FlowJo 10.9 软件分析细胞周期。实验重复 3 次, 取平均值。

2.7 Western blot 法检测细胞中 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT 蛋白相对表达量

按“2.3”项下不同组别方法干预 48 h 后, 收集各组细胞。加入 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白含量。取适量细胞蛋白样品

与 Loading Buffer 混匀, 移液枪吹打混匀后水浴 (100 $^{\circ}\text{C}$, 5 min), 制得 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 样本溶液, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。4%~20% 聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳, 转膜 55 min, 5% 牛血清白蛋白 (BSA) 封闭 1.5 h, 加入稀释过的一抗溶液 PI3K (1:1000)、p-PI3K (1:1000)、AKT (1:1000)、p-AKT (1:1000) 以及 β -actin (1:2000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 缓冲液洗 3 次, 每次 5 min, 加入二抗 (1:5000), 室温摇床孵育 2 h, 再次使用 TBST 缓冲液洗 3 次, 每次 5 min, 后加入 ECL 发光液进行曝光显影。使用 Image J 软件分析条带灰度值, 以目的蛋白与内参灰度值比值表示蛋白相对表达量。实验重复 3 次, 取平均值。

2.8 统计学处理

采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行统计学分析, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 药物浓度对细胞活力的影响

结果显示, 布格替尼对 NCI-H2228 和 NCI-H3122 细胞活力有抑制作用, 且呈剂量依赖关系, IC_{50} 分别为 $443.6 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $974.3 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 见图 1A 和图 1B。因此, 选择布格替尼浓度为 $400 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (NCI-H2228) 和 $900 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (NCI-H3122) 进行后续实验。

人参皂苷 Rg_3 对 NCI-H2228 细胞和 NCI-H3122 细胞活力有抑制作用, 且呈剂量依赖关系, IC_{50} 分别为 $307.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $236.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 见图 1C 和图 1D。结果显示在 $160 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下人参皂苷 Rg_3 对 NSCLC 细胞活性抑制率较小。因此, 选择 $160 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度人参皂苷 Rg_3 进行与布格替尼联合用药实验。

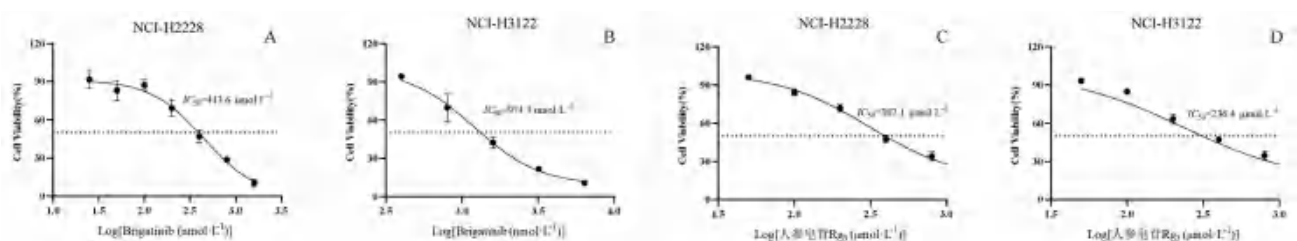


图 1 布格替尼和人参皂苷 Rg_3 对 NCI-H2228 细胞和 NCI-H3122 细胞活力的影响

Fig 1 Effect of brigatinib and ginsenoside Rg_3 on the viability of NCI-H2228 cells and NCI-H3122 cells

3.2 药物作用时间对细胞活力影响

实验结果显示, 在不同作用时间 (24、48、72 h) 下, 人参皂苷 Rg_3 与布格替尼联合用药组细胞活力随药物作用时间增加而显著降低, 见图 2A 和图 2C。

作用 72 h 时, 人参皂苷 Rg_3 组、布格替尼组和

人参皂苷 Rg_3 联合布格替尼组的细胞活力均显著低于对照组 ($P < 0.01$); 且人参皂苷 Rg_3 联合布格替尼组细胞活力显著低于人参皂苷 Rg_3 组和布格替尼组 ($P < 0.01$) (见图 2B 和图 2D)。表明人参皂苷 Rg_3 与布格替尼联合用药能显著抑制 NSCLC 细胞增殖。

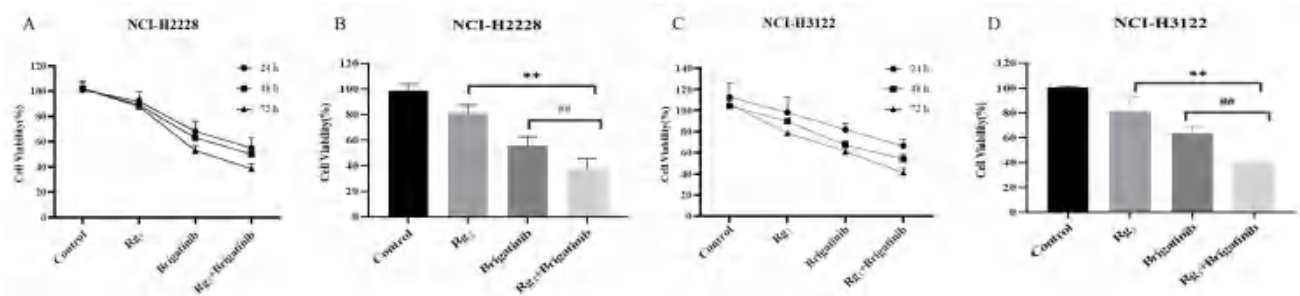


图2 布格替尼和人参皂苷 Rg_3 作用不同时间对 NCI-H2228 和 NCI-H3122 细胞活力的影响

Fig 2 Effect of different treatment time of brigatinib and ginsenoside Rg_3 on the cell viability in NCI-H2228 and NCI-H3122 cells

注: 与 人 参 皂 苷 Rg_3 组 比 较, $^{**}P < 0.01$; 与 布 格 替 尼 组 比 较, $^{##}P < 0.01$ 。

Note: Compared with the ginsenoside Rg_3 group, $^{**}P < 0.01$; compared with the brigatinib group, $^{##}P < 0.01$.

3.3 药物对细胞形态的影响

药物作用 NCI-H2228 细胞和 NCI-H3122 细胞 24 h 后, 对照组细胞形态未见明显改变, 人参皂苷 Rg_3 组、布格替尼组和人参皂苷 Rg_3 联合布格替尼组细胞均出现不同程度的核固缩、核碎裂, 部分细胞出现凋亡小体, 人参皂苷 Rg_3 联合布格替尼组形态变化最显著, 细胞凋亡多, 大部分细胞出现染色质凝集现象 (见图 3)。

3.4 药物对细胞迁移影响

如图 4 所示, 在 NSCLC 细胞系中, 人参皂苷 Rg_3 显著抑制 NCI-H2228 和 NCI-H3122 细胞的迁移, 与人参皂苷 Rg_3 组和布格替尼组相比, 人参皂苷 Rg_3 联合布格替尼组对 NSCLC 细胞的迁移抑制作用更强 ($P < 0.01$)。

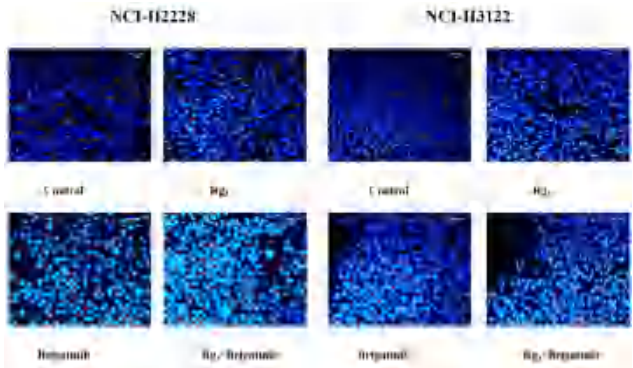


图3 布格替尼和人参皂苷 Rg_3 对 NCI-H2228 和 NCI-H3122 细胞形态的影响 (Hoechst 33342, $\times 100$)

Fig 3 Effect of brigatinib and ginsenoside Rg_3 on the morphology of NCI-H2228 and NCI-H3122 cells (Hoechst 33342, $\times 100$)

3.5 药物对细胞周期影响

在 NSCLC 细胞系中, 人参皂苷 Rg_3 联合布格替尼组细胞周期 S 期缩短, G_1 期比例增多 ($P < 0.01$)。细胞可能被阻滞在 G_1 期, 细胞 DNA 复制和合成被抑制 (见图 5)。

3.6 药物对细胞中 PI3K、 p -PI3K、AKT、 p -AKT 蛋白表达影响

在 NCI-H2228 细胞中, 与对照组比较, 给药组细胞 PI3K 和 AKT 蛋白表达水平均无明显差异 ($P > 0.05$), p -PI3K 与 p -AKT 蛋白表达量显著降低 ($P < 0.05$)。其中, 人参皂苷 Rg_3 联合布格替尼组抑制作用最显著 ($P < 0.01$)。在 NCI-H3122 细胞中, 与对照组比较, 给药组细胞 PI3K 和 AKT 蛋白表达均无显著差异 ($P > 0.05$); 人参皂苷 Rg_3 联合布格替尼组 p -PI3K 和 p -AKT 蛋白表达量降低 ($P < 0.05$); 人参皂苷 Rg_3 组与布格替尼组 p -PI3K 蛋白表达无显著差异 ($P > 0.05$); 人参皂苷 Rg_3 组与布格替尼组 p -AKT 蛋白表达量均显著降低 ($P < 0.01$) (见图 6)。

4 结论

人参皂苷 Rg_3 联合布格替尼有效抑制 NSCLC 细胞系 NCI-H2228 和 NCI-H3122 细胞的增殖、迁移; 阻滞细胞 DNA 的合成和复制, 促进细胞凋亡; 抑制 PI3K 和 AKT 蛋白的磷酸化。人参皂苷 Rg_3 能够协同增强布格替尼抗肿瘤作用, 其机制与抑制 PI3K/AKT 信号通路有关。

近年来, NSCLC 的发病率和死亡率持续上升, 已成为全球公共卫生的重要问题。 $EML4$ - ALK 融合基因是 NSCLC 的重要致病驱动基因之一, 在年轻、腺癌、不吸烟或轻度吸烟的 NSCLC 患者中的突变率较高。同时, $EML4$ - ALK 融合基因表达阳性患者可受益于 ALK 抑制剂的治疗。2013 年的一项研究指出, 酪氨酸激酶抑制剂 (TKIs) 和抗间变性淋巴瘤激酶药物对于携带特定突变的 NSCLC 患者的治疗效果显著^[17]。布格替尼作为二代 ALK 抑制剂在临床应用中效果显著^[18], 但化疗药物一直面临毒性大和耐药性等问题。

人参皂苷 Rg_3 是人参中发挥抗肿瘤作用的核心成分, 被广泛应用于肿瘤治疗。中草药及其提取物因高效低毒特点掀起抗肿瘤热潮, 与化学药物或靶向药物联合使用, 能降低传统治疗方法不

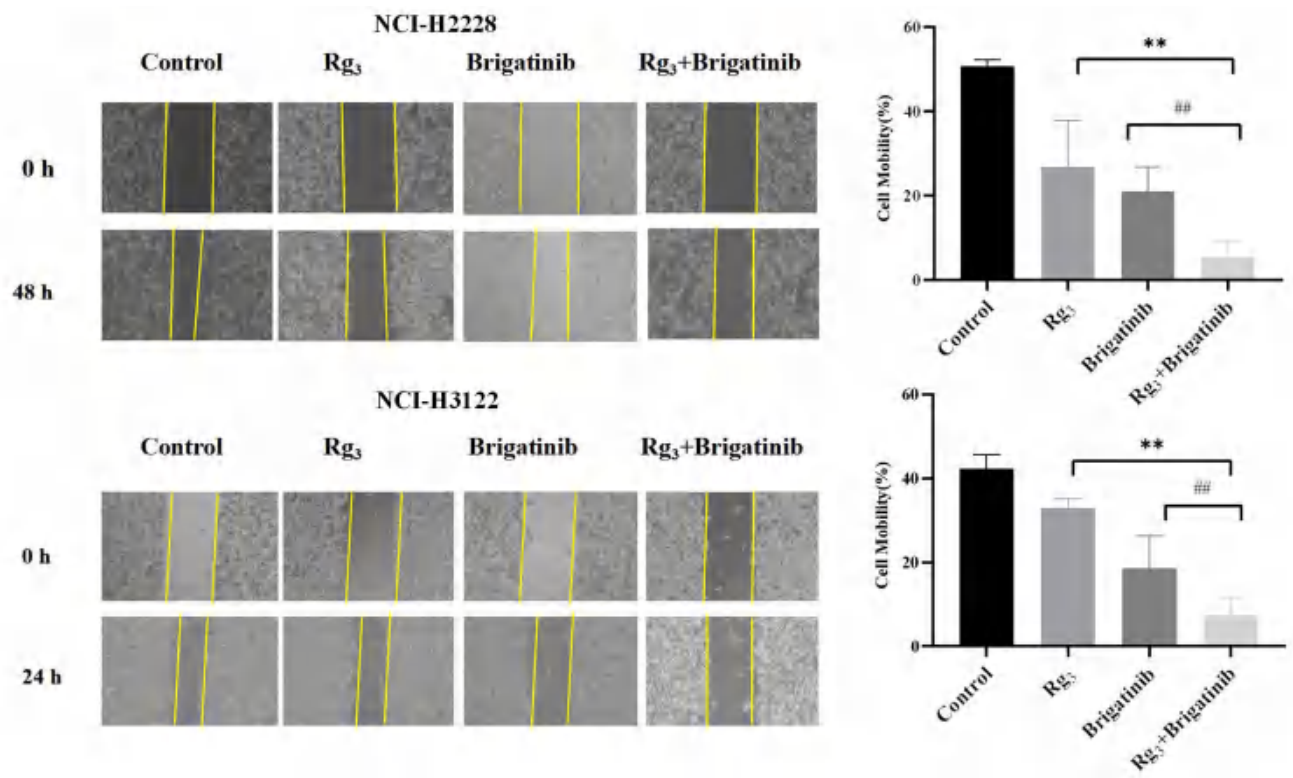

 图 4 布格替尼和人参皂苷 Rg₃ 对 NCI-H2228 和 NCI-H3122 细胞划痕愈合的影响

 Fig 4 Effect of ginsenoside Rg₃ and brigatinib on the healing status of NCI-H2228 and NCI-H3122

 注：与人参皂苷 Rg₃ 组比较，** $P < 0.01$ ；与布格替尼组比较，## $P < 0.01$ 。

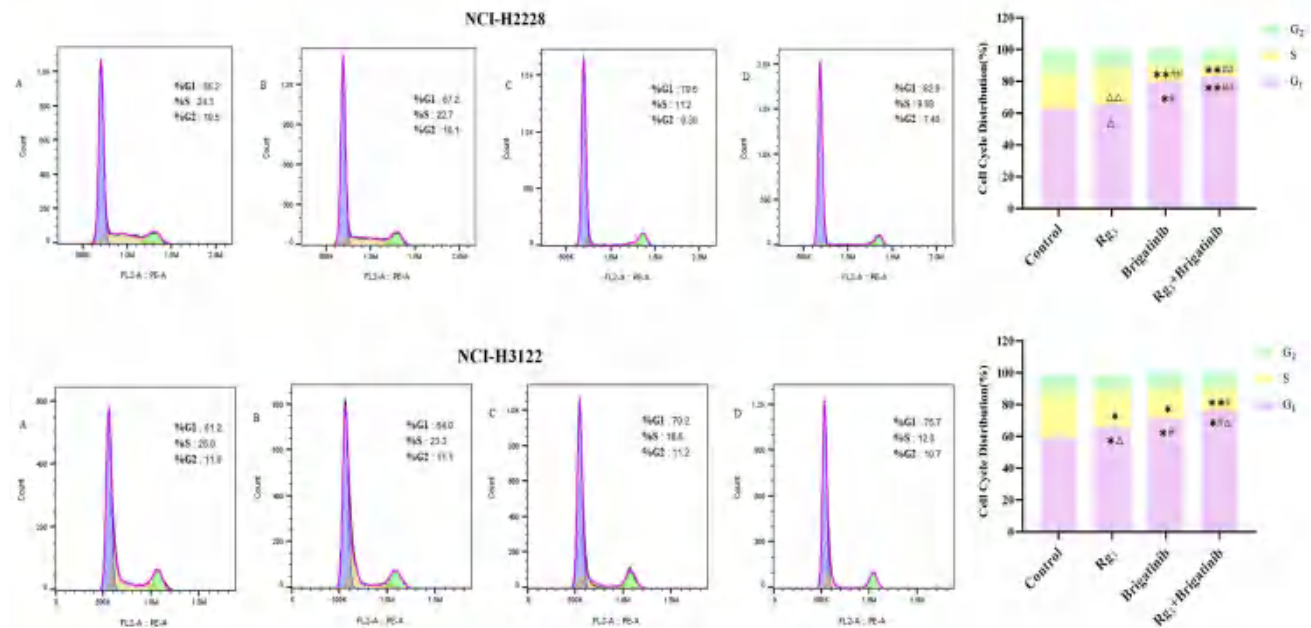
 Note: Compared with the ginsenoside Rg₃ group, ** $P < 0.01$; compared to brigatinib group, ## $P < 0.01$.

 图 5 布格替尼和人参皂苷 Rg₃ 对 NCI-H2228 和 NCI-H3122 细胞周期的影响

 Fig 5 Effect of ginsenoside Rg₃ and brigatinib on the cell cycle NCI-H2228 and NCI-H3122 cells

 A. 对照组 (control group); B. 人参皂苷 Rg₃ 组 (ginsenoside Rg₃ group); C. 布格替尼组 (brigatinib group); D. 人参皂苷 Rg₃ 联合布格替尼组 (ginsenoside Rg₃ combined with brigatinib group)

 注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与人参皂苷 Rg₃ 组比较， $^{\Delta}P < 0.05$ ， $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ ；与布格替尼组比较， $^{\triangle}P < 0.05$ ， $^{\triangle\triangle}P < 0.01$ 。

 Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；compared with the ginsenoside Rg₃ group, $^{\Delta}P < 0.05$ ， $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ ；compared with the brigatinib group, $^{\triangle}P < 0.05$ ， $^{\triangle\triangle}P < 0.01$.

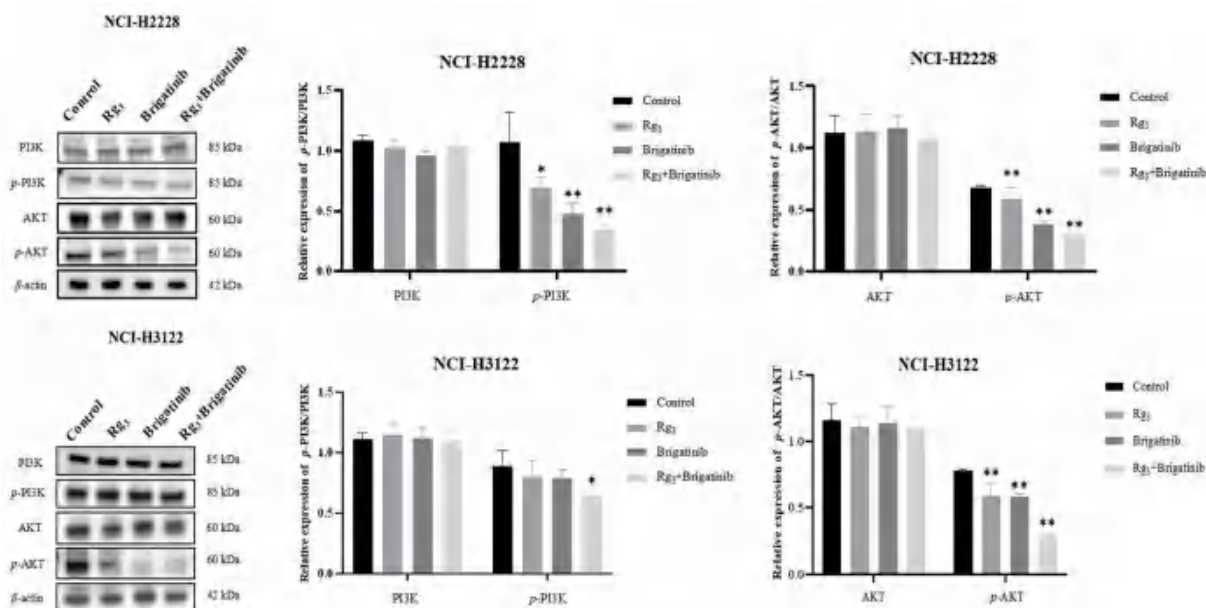


图6 布格替尼和人参皂苷 Rg_3 对 NCI-H2228 和 NCI-H3122 细胞中 PI3K、 p -PI3K、AKT、 p -AKT 蛋白表达

Fig 6 Effect of ginsenoside Rg_3 and brigatinib on the expression of PI3K, p -PI3K, AKT, p -AKT and protein in NCI-H2228 and NCI-H3122 cells
注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

良反应的同时增强抗肿瘤功效。人参皂苷 Rg_3 与化疗药物联合使用^[19-20], 通过抑制信号通路活化, 抑制细胞迁移能力^[21], 促进细胞凋亡^[22]等, 提高 NSCLC 细胞对奥希替尼或吉非替尼等的敏感性, 增强抗肿瘤作用。有研究报道, 人参皂苷 Rg_3 常作为临床辅助药物用于患者肿瘤治疗^[23-26]。

本研究以人参皂苷 Rg_3 为实验对象, 选择两种具有 EML4-ALK 融合基因的细胞系, 探索布格替尼减毒增效的方法。研究发现, 与对照组比较, 各药物干预组细胞的形态和周期均发生变化, 细胞增殖抑制率均升高, 且人参皂苷 Rg_3 联合布格替尼组对 NSCLC 细胞的增殖抑制作用最显著。人参皂苷 Rg_3 与布格替尼均能影响 PI3K/AKT 信号通路, 但由于体外细胞环境单一, 与对照组比较, 给药组 PI3K 和 AKT 蛋白表达并无明显变化, p -PI3K 与 p -AKT 蛋白表达均被显著抑制, 人参皂苷 Rg_3 联合布格替尼组抑制作用最显著。 p -PI3K 和 p -AKT 的表达降低, 表明 PI3K/AKT 通路对 AKT 的募集能力下降, PI3K 和 AKT 表达不变, 表明未影响蛋白质合成。本研究表明人参皂苷 Rg_3 联合布格替尼能有效抑制 NSCLC 细胞增殖, 原因可能是两者联合使用协同增强抗肿瘤疗效。

本研究为临床上 ALK 阳性 NSCLC 晚期患者治疗提供重要实验基础。然而, 人参皂苷 Rg_3 与布格替尼联合用药疗效可能与体内微环境有关, 这可能造成结果具有一定的差异性, 因此后续仍需要进行

体内的联合用药作用机制探索, 以更深一步了解联合用药作用机制。

参考文献

- [1] Li C, Lei SY, Ding L, et al. Global burden and trends of lung cancer incidence and mortality [J]. Chin Med J (Engl), 2023, 136 (13): 1583-1590.
- [2] Zhang S, Anjum R, Squillace R, et al. The potent ALK inhibitor brigatinib (AP26113) overcomes mechanisms of resistance to first-and second-generation ALK inhibitors in preclinical models [J]. Clin Cancer Res, 2016, 22 (22): 5527-5538.
- [3] 郑晓辉, 赵振营, 张惠娟, 等. 布格替尼治疗间变性淋巴瘤激酶阳性非小细胞肺癌的研究进展 [J]. 中国药业, 2023, 32 (9): 129-132.
- [4] 曹锦秀. 布格替尼通过 PI3K/AKT/mTOR 通路影响非小细胞肺癌进程研究 [D]. 天津: 天津医科大学, 2018.
- [5] 臧美彤, 孟帅, 张洁, 等. 基于 FAERS 数据库的布格替尼不良反应信号挖掘与分析 [J]. 中国医院药学杂志, 2024, 44 (15): 1790-1794.
- [6] Dai YM, Wang WR, Sun QC, et al. Ginsenoside Rg_3 promotes the antitumor activity of gefitinib in lung cancer cell lines [J]. Exp Ther Med, 2019, 17 (1): 953-959.
- [7] 王爱华, 刘维, 金玥, 等. 人参皂苷 Rg_3 : 一种潜在的治疗非小细胞肺癌的天然药物 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40 (2): 156-159, 272.
- [8] 赵娅菽, 邓丽聪, 曹玥, 等. 人参皂苷 Rg_3 与 5-氟尿嘧啶联用对结肠癌小鼠肿瘤的血管生成与肿瘤生长抑制效果的实验研究 [J]. 四川大学学报 (医学版), 2024, 55 (1): 111-117.

- [9] Wei Q, Ren Y, Zheng X, et al. Ginsenoside Rg₃ and sorafenib combination therapy relieves the hepatocellular carcinomaprogression through regulating the HK2-mediated glycolysis and PI3K/AKT signaling pathway [J]. Bioengineered, 2022, 13 (5): 13919-13928.
- [10] Cao Y, Ye Q, Zhuang MF, et al. Ginsenoside Rg₃ inhibits angiogenesis in a rat model of endometriosis through the VEGFR-2-mediated PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. PLoS One, 2017, 12 (11): 0186520.
- [11] Ren B, Feng JP, Yang N, et al. Ginsenoside Rg₃ attenuates angiotensin II-induced myocardial hypertrophy through repressing NLRP3 inflammasome and oxidative stress via modulating SIRT1/NF-κB pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2021, 98: 107841.
- [12] Cheng ZQ, Li L. Ginsenoside Rg₃ ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice through inactivating the nuclear factor-κB (NF-κB) signaling pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2016, 34: 53-59.
- [13] Lee YH, Park A, Park YJ, et al. Ginsenoside 20 (R) - Rg₃ enhances natural killer cell activity by increasing activating receptor expression through the MAPK/ERK signaling pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2022, 107: 108618.
- [14] Choi RJ, Mohamad ZSZ, Alexander-Dann B, et al. Combination of ginsenosides Rb₂ and Rg₃ promotes angiogenic phenotype of human endothelial cells via PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 618773.
- [15] 安辉, 李思思, 高野, 等. 人参皂苷 Rg₃ 协同 TRAIL 促进肺癌 H358 细胞凋亡的机制 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26 (9): 988-992.
- [16] 韩宁, 李秋实, 王鑫洋, 等. 人参皂苷 Rg₃ 抑制肺癌细胞增殖和侵袭的作用及机制 [J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39 (20): 2942-2945.
- [17] Ulivi P, Puccetti M, Capelli L, et al. Molecular determinations of EGFR and EML4-ALK on a single slide of NSCLC tissue [J]. J Clin Pathol, 2013, 66 (8): 708-710.
- [18] Dai Y, Wei QX, Schwager C, et al. Oncogene addiction and radiation oncology: effect of radiotherapy with photons and carbon ions in ALK-EML4 translocated NSCLC [J]. Radiat Oncol, 2018, 13 (1): 1.
- [19] 杨晓瑞, 王江, 潘琼, 等. 奥希替尼联合人参皂苷 Rg₃ 对非小细胞肺癌 H1975 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 新乡医学院学报, 2020, 37 (11): 1007-1012, 10-17.
- [20] 江冠铭, 谭钦全, 刘淳, 等. 人参皂苷 Rg₃ 联合奥希替尼治疗一代 EGFR-TKI 耐药型晚期非小细胞肺癌的疗效及安全性 [J]. 新医学, 2019, 50 (7): 505-509.
- [21] 兰金剑, 高瑞兰, 赵燕娜, 等. 20 (S) - 人参皂苷 Rg₃ 抑制人急性单核细胞白血病 THP-1 细胞迁移和侵袭 [J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38 (2): 284-291.
- [22] 衣同辉, 吴艳敏, 刘睿, 等. 人参皂苷 Rg₃ 联合肿瘤抑素 19 肽对肝癌 HepG2 细胞凋亡的影响及机制 [J]. 北京中医药大学学报, 2020, 43 (7): 575-582.
- [23] 姜振蕊, 李泉星, 曲霞. 参一胶囊联合吉非替尼对晚期非小细胞肺癌患者外周血清基质金属蛋白酶 -9 的影响 [J]. 世界中医药, 2018, 13 (8): 1883-1886, 90.
- [24] 靳彩玲, 寇小格, 苗战会. 人参皂苷 Rg₃ 联合化学治疗对老年非小细胞肺癌术后辅助治疗的临床观察 [J]. 新乡医学院学报, 2011, 28 (2): 229-230, 32.
- [25] 康太荣. 参一胶囊联合 DP 化疗治疗不能手术 IIIb/IV 期初治非小细胞肺癌患者的疗效分析 [J]. 现代诊断与治疗, 2020, 31 (19): 3032-3034.
- [26] 康军英, 李复红, 韩蓓. 参一胶囊联合羟基喜树碱和顺铂治疗晚期非小细胞肺癌的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35 (1): 133-137.

(收稿日期: 2024-08-12; 修回日期: 2024-10-07)

不同配伍比例对大黄 - 牡丹皮药对 6 种有效成分溶出量的影响研究

王雪芹¹, 康玉欣², 叶方^{1*}, 黄良永¹, 卢伟¹, 柯洪琴¹ (1. 十堰市太和医院 (湖北医药学院附属医院), 湖北 十堰 442000; 2. 湖北医药学院, 湖北 十堰 442000)

摘要: **目的** 建立大黄 - 牡丹皮药对中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、芍药苷、丹皮酚 6 种成分的含量测定方法, 并考察不同配伍比例对上述 6 种成分溶出率的影响。 **方法** 采用 HPLC 双波长切换法测定大黄 - 牡丹皮药对不同配伍比例水煎液 (0 : 1、1 : 4、2 : 4、3 : 4、1 : 1、4 : 3、4 : 2、4 : 1、1 : 0) 中上述 6 种活性成分的含量; 色谱条件: Waters C18 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈 - 0.1% 磷酸水溶液, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长分别为 230 nm、274 nm, 柱温 30 °C。 **结果** 芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、芍药苷、丹皮酚质量浓度分别在 1.409 ~ 45.100 μg · mL⁻¹ ($r = 1.000$)、0.694 ~ 22.200 μg · mL⁻¹ ($r = 0.9999$)、0.514 ~ 16.443 μg · mL⁻¹ ($r = 1.000$)、0.556 ~ 17.800 μg · mL⁻¹ ($r = 1.000$)、18.208 ~ 582.642 μg · mL⁻¹ ($r = 1.000$)、4.550 ~ 145.600 μg · mL⁻¹ ($r = 0.9999$) 内与峰面积呈良好的线性关系。平均加样回收率为 95.65% ~ 98.93%, $RSD < 3\%$ ($n = 6$)。大黄与牡丹皮配伍后, 6 种成分的溶出率均有明显变化, 且各成分溶出率的大小与配伍比例有关。当大黄 - 牡丹皮配伍比例为 1 : 4 时, 芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚的总溶出率最高, 且芍药苷、丹皮酚的溶出率也较高; 当大黄 - 牡丹皮配伍比例为 4 : 2 时, 芍药苷、丹皮酚的总溶出率最高。 **结论** 所建立的方法可快速、准确测定大黄 - 牡丹皮药对中 6 种成分的含量; 大黄 - 牡丹皮配伍比例为 1 : 4 时最有利于上述 6 种成分的溶出。

关键词: 大黄 - 牡丹皮药对; 配伍比例; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R283

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)05-1310-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.021

Effect of different compatibility proportion of drug pair Rhei Radix et Rhizoma and Moutan Cortex on dissolution of 6 active components

WANG Xue-qin¹, KANG Yu-xin², YE Fang^{1*}, HUANG Liang-yong¹, LU Wei¹, KE Hong-qin¹ (1. Taihe Hospital Affiliated with Hubei University of Medicine, Shiyan Hubei 442000; 2. Hubei University of Medicine, Shiyan Hubei 442000)

Abstract: **Objective** To simultaneously determine the content of 6 ingredients (aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol, paeoniflorin, and paeonol) in drug pair Rhei Radix et Rhizoma and Moutan Cortex, and effect of different compatibility proportions of Rhei Radix et Rhizoma and Moutan Cortex on the dissolution of the 6 active components. **Methods** An HPLC method was established to simultaneously determine 6 active components in different compatibility proportions (0 : 1, 1 : 4, 2 : 4, 3 : 4, 1 : 1, 4 : 3, 4 : 2, 4 : 1, and 1 : 0) of Rhei Radix et Rhizoma-Moutan Cortex. A Waters C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used with the mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution flowing at 1.0 mL · min⁻¹ in a gradient elution. The detection wavelengths were 230 nm and 274 nm. The column temperature was 30 °C. **Results** The linearity of aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol, paeoniflorin, and paeonol were 1.409 ~ 45.100

基金项目: 2021 年度引导性科研项目 (No.21Y03)。

作者简介: 王雪芹, 女, 主管药师, 主要从事中药质量研究, email: 403297000@qq.com * 通信作者: 叶方, 男, 副教授, 主任药师, 主要从事中药资源开发与药品质量控制研究, email: yxwen8801129@sina.com

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r = 1.000$), $0.694 \sim 22.200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r = 0.9999$), $0.514 \sim 16.443 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r = 1.000$), $0.556 \sim 17.800 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r = 1.000$), $18.208 \sim 582.642 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r = 1.000$), and $4.550 \sim 145.600 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r = 0.9999$), respectively. The average recoveries ranged from 95.65% to 98.93%, and the *RSDs* were all less than 3.0% ($n = 6$). Compared with single decoction, the dissolution rates of the 6 components in the mixed decoctions were all obviously changed. When the compatibility proportion of Rhei Radix et Rhizoma and Moutan Cortex (*m/m*) was 1 : 4, the total dissolution rate of aloemodin, rhein, emodin, and chrysophanol was the highest, while the dissolution rates of paeoniflorin and paeonol were higher than those in the single decoction of Moutan Cortex. When the compatibility proportion of Rhei Radix et Rhizoma and Moutan Cortex (*m/m*) was 4 : 2, the total dissolution rate of paeoniflorin and paeonol was the highest. **Conclusion** The method is simple and accurate, and can determine the 6 components in Rhei Radix et Rhizoma and Moutan Cortex drug pair. The mixed decoction of Rhei Radix et Rhizoma and Moutan Cortex with proportion of 1 : 4 leads to the best dissolution of the 6 components.

Key words: drug pair Rhei Radix et Rhizoma and Moutan Cortex; compatibility proportion; HPLC; content determination

药对又称对药,是临床上常用且相对固定的两味药的配伍形式,是历代医家实践经验的总结升华^[1]。大黄、牡丹皮药对来源于《金匱要略》大黄牡丹汤,大黄清热泻下,牡丹皮凉血散瘀,两者共为君药,能够相互促进,共收清热解毒,散结破瘀之功。方中大黄和牡丹皮的配伍比例为 4 : 1,用于治疗肠痈时 1 : 1、1 : 2 的比例也有使用^[2],说明配伍比例可能会影响功效,而化学成分是药物发挥药效的基础。现代研究表明,大黄中的蒽醌类成分不仅是大黄质量控制的指标性成分,也是其重要活性成分,具有泻下、抗炎、抗肿瘤、保肝等作用^[3-5]。牡丹皮中的丹皮酚及芍药苷是其发挥活血化瘀作用的重要药效成分,也是质量控制的指标性成分,具有抗炎、抗血栓、抗血小板聚集等药理作用^[6-7]。研究表明大黄、牡丹皮配伍后蒽醌类成分及丹皮酚的溶出量与单煎液相比会发生改变^[8],但配伍比例对上述成分溶出量的影响尚未见研究,因此本试验以大黄中的芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚及牡丹皮中的芍药苷、丹皮酚为指标性成分考察配伍比例对上述 6 个成分溶出量的影响,为探讨大黄、牡丹皮药对配伍变化的一般规律提供参考,并为中医传统方剂研究奠定物质基础。

1 仪器与试药

1.1 仪器

ThermoFisher Vanquish UHPLC 仪(美国赛默飞公司,配有 Chromeleon 工作站 7.3.1 中文版);红景天万能高速粉碎机(浙江红景天工贸有限公司);

MH-1000 型号电热套(北京科伟永兴仪器有限公司);KM-410D 型号超声波清洗机(广州市科洁盟科技公司);金叶 RE2000A 型号旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);D5M 低速离心机(上海卢湘仪离心机有限公司);SHIMADZU AUW-120D 型号电子分析天平(精度:0.01 mg,日本岛津公司)。

1.2 试药

对照品芦荟大黄素(纯度:98.3%,批号:110795-201710)、大黄酸(纯度:99.3%,批号:110757-201607)、大黄素(纯度:95.6%,批号:110756-200110)、大黄酚(纯度:99.6%,批号:110796-201017)、芍药苷(纯度:96.4%,批号:110736-201438)、丹皮酚(纯度:99.9%,批号:110708-201407)(中国食品药品检定研究院)。乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂为分析纯,水为自制超纯水。大黄饮片(批号:20210201,产地湖北)(湖北神农本草中药饮片有限公司);牡丹皮(批号:230601,产地安徽)(湖北清大中药饮片有限公司)。经湖北医药学院药学院叶方副教授鉴定大黄为蓼科植物掌叶大黄(*Rheum palmatum* L.)的干燥根及根茎,牡丹皮为毛茛科植物牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.)的干燥根皮,将上述药材粉碎为粗粉备用。

2 方法与结果

2.1 色谱条件和系统适用性试验

色谱柱:Waters C18 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~5 min, 83%A; 5~20 min,

83% ~ 20%A; 20 ~ 24 min, 20%A; 24 ~ 25 min, 20% ~ 83%A; 25 ~ 30 min, 83%A); 检测波长为 230 nm (0 ~ 15 min, 芍药苷), 274 nm (15 ~ 30 min, 丹皮酚、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚); 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样量: $10 \mu\text{L}$; 柱温: 30°C 。在上述色谱条件下分析, 理论塔板数按各成分计算均不低于 3000, 分离度均大于 1.5。色谱图见图 1。

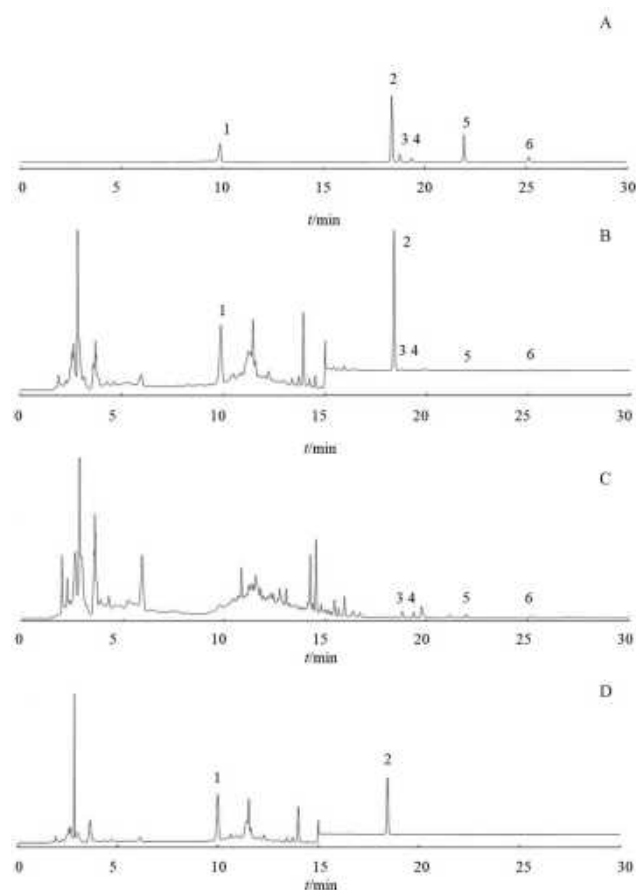


图 1 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

A. 混合对照品溶液 (mixed reference substances); B. 大黄-牡丹皮 (1:4) 药对 [Rhei Radix et Rhizoma and Moutan Cortex drug pair (1:4)]; C. 大黄 (Rhei Radix et Rhizoma); D. 牡丹皮 (Moutan Cortex); 1. 芍药苷 (paeoniflorin); 2. 丹皮酚 (paeonol); 3. 芦荟大黄素 (aloe-emodin); 4. 大黄酸 (rhein); 5. 大黄素 (emodin); 6. 大黄酚 (chrysophanol)

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 分别精密称取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、芍药苷、丹皮酚对照品 4.51、5.55、1.72、1.78、15.11、7.28 mg, 加甲醇超声溶解, 分别定容至 10、50、10、10、5、10 mL 量瓶中, 即得质量浓度分别为 451.000、111.000、164.432、178.000、2913.208、728.000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。分别精密吸取上述对照品储备液芦

荟大黄素 1 mL、大黄酸 2 mL、大黄素 1 mL、大黄酚 1 mL、芍药苷 2 mL、丹皮酚 2 mL, 置同一 10 mL 量瓶中, 加甲醇制成每 1 mL 含芦荟大黄素 45.100 μg 、大黄酸 22.200 μg 、大黄素 16.443 μg 、大黄酚 17.800 μg 、芍药苷 582.642 μg 、丹皮酚 145.600 μg 的溶液, 即得混合对照品储备液。

2.2.2 供试品溶液 分别精密称取大黄、牡丹皮不同配伍比例 (0:1、1:4、2:4、3:4、1:1、4:3、4:2、4:1、1:0) 混合物 5 g, 置于具塞圆底烧瓶中, 加入 10 倍水, 浸泡 0.5 h, 回流煎煮 0.5 h, 放至室温, 离心取上清液, 药渣再加入 10 倍水同法处理, 合并两次上清液, 减压浓缩至体积约 30 mL, 纯水定容至 50 mL, 摇匀得浓缩水煎液。精密量取 25 mL 浓缩水煎液置 50 mL 量瓶中, 加无水乙醇定容, 充分摇匀, 静置 12 h, 离心, 取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系的考察 精密量取混合对照品储备液适量, 用甲醇稀释得系列浓度的混合对照品溶液 (芦荟大黄素: $1.409 \sim 45.100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 大黄酸: $0.694 \sim 22.200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 大黄素: $0.514 \sim 16.443 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 大黄酚: $0.556 \sim 17.800 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 芍药苷: $18.208 \sim 582.642 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 丹皮酚: $4.550 \sim 145.600 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 按照“2.1”项下色谱条件进样测定, 以色谱峰峰面积 (Y) 为纵坐标, 质量浓度 (X , $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程。检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 分别按信噪比 (S/N) 的 3:1 和 10:1 为基准推算, 结果见表 1。

2.3.2 精密度试验 取“2.2.1”项下混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 连续进样 6 次, 记录峰面积。结果芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、丹皮酚和芍药苷平均峰面积的 RSD 值分别为 1.7%、1.5%、1.2%、1.2%、1.9%、1.8%, 表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验 取同一批药材, 精密称取大黄-牡丹皮 (4:1) 6 份, 按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份, 按“2.1”项下色谱条件进样, 记录色谱图, 计算各成分含量及 RSD 。结果芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、芍药苷和丹皮酚的平均含量分别为 0.2243、0.2749、0.0805、0.0889、13.0248、1.3807 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 1.9%、1.9%、1.8%、1.8%、2.0%、2.0%, 表明本方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 取“2.2.2”项下制备的大黄-牡丹皮 (4:1) 同一供试品溶液, 室温下放置,

表 1 大黄-牡丹皮药对中 6 个成分的线性关系

Tab 1 Linearity of 6 components in Rhei Radix et Rhizoma and Moutan Cortex versus drug pair					
成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围 / (μg · mL ⁻¹)	LOQ/ (μg · mL ⁻¹)	LOD/ (μg · mL ⁻¹)
芦荟大黄素	<i>Y</i> = 0.025 <i>X</i> + 0.0078	1.000	1.409 ~ 45.100	0.352	0.117
大黄酸	<i>Y</i> = 0.0257 <i>X</i> - 0.000 03	0.9999	0.694 ~ 22.200	0.174	0.058
大黄素	<i>Y</i> = 0.0877 <i>X</i> + 0.0974	1.000	0.514 ~ 16.443	0.129	0.043
大黄酚	<i>Y</i> = 0.0291 <i>X</i> + 0.0342	1.000	0.556 ~ 17.800	0.139	0.046
芍药苷	<i>Y</i> = 0.0098 <i>X</i> + 0.2294	1.000	18.208 ~ 582.642	4.552	1.517
丹皮酚	<i>Y</i> = 0.0611 <i>X</i> + 0.3266	0.9999	4.550 ~ 145.600	1.138	0.379

分别在 0、2、4、8、12 h，按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图，结果 6 个成分峰面积的 *RSD* 分别为 1.9%、1.3%、1.9%、1.8%、1.9%、1.9%，表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.3.5 加样回收试验 取 2.5 g 已知各成分含量的大黄-牡丹皮（4：1）药材，共 6 份，分别精密加入芦荟大黄素、大黄素、大黄酚、丹皮酚对照品储备液各 1 mL，大黄酸对照品储备液 5 mL，芍药苷对照品适量。按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，按照“2.1”项下色谱条件进样测定，计算各成分的加样回收率和 *RSD* 值。结果芍药苷、丹皮酚、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚平均回收率（*n* = 6）分别为 98.24%、96.90%、98.93%、97.01%、95.65%、96.38%，*RSD* 分别为 1.9%、1.2%、2.5%、2.4%、2.2%、2.7%。

2.4 不同配伍比例大黄-牡丹皮药对活性成分的含量测定

按“2.2.2”项下方法分别制备不同比例的大黄-牡丹皮合煎液（0：1、1：4、2：4、3：4、1：1、4：3、4：2、4：1、1：0），按“2.1”项下色谱条件进样测定，计算各成分含量，并计算各成分的溶出率，结果见表 2～3。

表 2 不同配比大黄-牡丹皮药对中 6 个成分的溶出率 (mg · g⁻¹, *n* = 3)

Tab 2 Dissolving amounts of 6 components in Rhei Radix et Rhizoma and Moutan Cortex at different compatibility proportions (mg · g ⁻¹ , <i>n</i> = 3)						
配伍比例 (大 芦荟 黄:牡丹皮) 大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	芍药苷	丹皮酚	
0：1	0	0	0	10.2438	2.3050	
1：4	0.3541	0.3708	0.1216	0.2554	10.6666	2.8575
2：4	0.2821	0.3726	0.1059	0.1358	10.9541	2.4534
3：4	0.2493	0.2859	0.1551	0.2017	10.8593	2.4213
1：1	0.2544	0.2903	0.1115	0.0936	10.9391	2.5369
4：3	0.2729	0.2529	0.0796	0.1080	12.1480	2.3268
4：2	0.2366	0.2302	0.0898	0.0663	12.5009	2.2649
4：1	0.2243	0.2749	0.0805	0.0889	13.0248	1.3807
1：0	0.2109	0.2797	0.0775	0.0746	0	0

表 3 不同配伍比例大黄-牡丹皮药对中 6 个成分溶出量相对于单煎液的百分比 (%)

Tab 3 Percentage of dissolution of 6 components in Rhei Radix et Rhizoma and Moutan Cortex versus at different compatibilities that of single respective decoction (%)

配伍比例 (大黄:牡 丹皮)	芦荟大 黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	芍药苷	丹皮酚
1：4	167.90	132.57	156.84	342.36	104.13	123.97
2：4	133.76	133.23	136.62	182.04	106.93	106.44
3：4	118.21	102.24	200.00	270.38	106.01	105.05
1：1	120.63	103.78	143.77	125.47	106.79	110.06
4：3	129.40	90.43	102.71	144.77	118.59	100.95
4：2	112.19	82.30	115.78	88.87	122.03	98.26
4：1	106.35	98.27	103.82	119.17	127.15	59.90

3 讨论

3.1 样品的处理

由于临床汤剂的制备均采用水煎煮法，本试验亦采用该方法制备样品溶液，但水煎液中杂质较多，样品溶液澄清度差，因此本研究采用醇沉法进行纯化，比较了不同浓度乙醇（40%、50%、60%、80%）对样品芦荟大黄素、大黄素、大黄酸、大黄酚、芍药苷、丹皮酚溶出率的影响，结果显示乙醇含量为 50% 时，上述成分溶出较多，因此本研究选用 50% 乙醇进行纯化处理。

3.2 色谱条件的选择

根据大黄和牡丹皮中化学成分的含量及其药理活性^[3-10]，选定芦荟大黄素、大黄素、大黄酸、大黄酚、芍药苷、丹皮酚 6 个成分对大黄-牡丹皮进行考察。查阅文献发现在同时测定上述成分时多以乙腈-0.1% 磷酸水溶液为流动相^[11-12]，因此选择乙腈-0.1% 磷酸水溶液为流动相，根据保留时间、分离度、峰形确定最佳洗脱程序。

由于所测成分较多且检测波长不尽相同，如大黄中芦荟大黄素、大黄素、大黄酸、大黄酚的检测波长为 254 nm^[7]，牡丹皮中丹皮酚检测波长为 274 nm^[7]，芍药苷的检测波长为 230 nm^[8-10]，采用单波长检测效果不理想，为确定最佳检测波

长, 分别在上述 3 个波长下进样, 结果丹皮酚、芦荟大黄素、大黄素、大黄酸、大黄酚在 274 nm 波长处均有较大吸收, 芍药苷在 230 nm 波长处有较大吸收, 因此本研究以 230 nm、274 nm 为检测波长。

3.3 含量测定结果分析

不同配伍比例大黄-牡丹皮药对中芦荟大黄素、大黄素、大黄酸、大黄酚、芍药苷、丹皮酚的溶出率与单味药材相比均有明显差异, 且各成分的溶出率与两者的配伍比例有关。随着大黄比例的增加, 芦荟大黄素、大黄素、大黄酸、大黄酚、丹皮酚的溶出率整体呈下降趋势, 芍药苷的溶出率升高。大黄-牡丹皮配伍比例为 1:4 时, 大黄有效成分芦荟大黄素、大黄素、大黄酸、大黄酚的总溶出率最高。大黄-牡丹皮配伍比例为 4:2 时, 丹皮有效成分芍药苷和丹皮酚的总溶出率最高。大黄-牡丹皮配伍比例为 1:4 时, 大黄的药效成分及牡丹皮的药效成分芍药苷、丹皮酚的溶出率均较高, 综合考虑大黄和牡丹皮的药效成分可确定该比例最有利于上述 6 个成分的溶出。

4 小结

本研究建立了 HPLC 双波长切换法同时测定大黄-牡丹皮药对中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、芍药苷、丹皮酚的含量, 该方法前处理简单, 所测成分分离度好, 测定结果稳定可靠, 重复性好, 可用于大黄-牡丹皮药对的含量测定。配伍比例影响考察表明, 与单煎液相比, 大黄与牡丹皮配伍后上述有效成分的溶出率均会发生改变, 且溶出率的大小与两者的配伍比例有关, 综合考虑芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、芍药苷、丹皮酚的溶出率, 可初步确定大黄-牡丹皮配伍比例为 1:4 最有利于上述成分的

溶出。本研究通过比较大黄-牡丹皮药对配伍前后大黄和牡丹皮有效成分溶出量的变化, 可为大黄-牡丹皮药对配伍化学本质的阐明提供依据, 为临床使用大黄-牡丹皮药对提供参考。

参考文献

- [1] 王旭华, 徐顶巧, 黄露, 等. 黄连-吴茱萸药对配伍机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(3): 266-274.
- [2] 李冀, 左铮云. 方剂学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2021: 83-88.
- [3] 刘桂元, 罗利亚, 李晓, 等. 大黄蒽醌类化合物抗炎作用研究进展[J]. 中成药, 2023, 45(11): 3693-3701.
- [4] 肖先, 李春燕, 薛金涛. 大黄的主要化学成分及药理作用研究进展[J]. 新乡医学院学报, 2024, 41(5): 486-490, 496.
- [5] 许波, 窦志华, 卞理, 等. 多指标综合加权评分法优选大黄药材中蒽醌类成分提取工艺[J]. 中南药学, 2016, 14(4): 370-374.
- [6] 张树蓉, 赵宏苏, 佟沫儒, 等. 牡丹皮化学成分、药理作用及其质量标志物(Q-Marker)的预测分析[J]. 中草药, 2022, 53(16): 5215-5224.
- [7] 陈箫箫, 赵宏苏, 章芳珍, 等. 安徽主产区牡丹皮药材质量差异研究[J]. 中南药学, 2020, 18(4): 680-684.
- [8] 汪显阳. 大黄牡丹汤不同配伍对有效成分煎出的影响[J]. 中国中医药科技, 2002, 9(3): 161-162.
- [9] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 24-25, 179-180.
- [10] 邓开英, 朱必越, 朱照静. 改良 RP-HPLC 法同时测定牡丹皮药材中芍药苷和丹皮酚的含量[J]. 中国药房, 2013, 24(15): 1406-1408.
- [11] 刘丽, 尹运涵, 吴健, 等. HPLC 法同时测定大黄牡丹汤中大黄酸、丹皮酚和芍药苷的含量[J]. 中国药物警戒, 2010, 7(3): 139-141.
- [12] 谢剑琳, 张振秋, 梁朔, 等. HPLC 波长切换法同时测定大黄、牡丹皮药对提取物中 11 个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(1): 103-107.

(收稿日期: 2024-08-15; 修回日期: 2024-10-21)

基于网络药理学和实验验证研究高良姜甲醇提取物通过 MAPK 途径抑制铁死亡改善顺铂诱导的急性肾损伤的机制

夏彬¹, 陈江龙¹, 王金辉², 李大龙³, 张雪¹, 万天真¹, 李光^{1, 2*} (1. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040; 2. 中国医学科学院&北京协和医学院药用植物研究所云南分所药理中心, 云南 景洪 666100; 3. 东北农业大学园林与风景艺术学院, 哈尔滨 150040)

摘要: **目的** 通过网络药理学和实验验证相结合探究高良姜甲醇提取物 (MEAO) 对顺铂诱导的急性肾损伤 (cis-AKI) 的保护作用及潜在机制。**方法** 采用超高效液相色谱-四极杆串联飞行时间质谱 (UPLC-Q-TOF-MS/MS) 技术鉴定 MEAO 中的化学成分, 通过网络药理学及分子对接方法预测活性化学成分、关键靶点及相关信号通路。通过腹腔注射顺铂建立小鼠急性肾损伤模型, 通过酶联免疫吸附实验、蛋白免疫印迹、免疫组化法等手段验证其药效及作用机制。**结果** 通过 UPLC-Q-TOF-MS/MS 方法从 MEAO 中鉴定出 29 种化学成分。通过网络药理学方法获得 24 种活性成分及 316 个潜在交集靶点。确定了 5 种关键活性化学成分, 分别为 5-羟基-1, 7-二苯基-6-庚烯-3-酮、1, 7-二苯基-4-庚烯-3-酮、白杨素、柚皮素、高良姜素; 涉及 9 个关键靶点, 分别为 AKT1、SRC、EGFR、STAT3、HSP90AA1、ESR1、MAPK3、PPARG、PTGS2。基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 的分析表明 MEAO 对 cis-AKI 的治疗主要涉及细胞对脂质的反应、调控有丝分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路以及脂质过氧化等相关途径。分子对接表明关键活性成分与关键靶点均具有较强的结合活性。实验表明 MEAO 可以显著降低血清肌酐、血尿素氮的水平并改善肾小管损伤, 明显减轻肾脏炎症反应和脂质过氧化反应; 可能通过调控 MAPK 信号通路从而抑制铁死亡发挥治疗 cis-AKI 的作用。**结论** MEAO 对 cis-AKI 具有保护作用, 其作用机制可能是通过调控 MAPK 信号通路从而抑制铁死亡, 本研究为丰富高良姜的临床应用和寻找预防顺铂肾毒性的药物提供了理论依据。

关键词: 高良姜; 顺铂; 急性肾损伤; 网络药理学; MAPK; 铁死亡

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)05-1315-11

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.022

Methanol extract of *Alpinia officinarum* Hance inhibits ferroptosis via the MAPK pathway to ameliorate cisplatin-induced acute kidney injury based on network pharmacology and experiment validation

XIA Bin¹, CHEN Jiang-long¹, WANG Jin-hui², LI Da-long³, ZHANG Xue¹, WAN Tian-zhen¹, LI Guang^{1, 2*} (1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040; 2. Yunnan Branch of Institute of Medicinal Plants, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Jinghong Yunnan 666100; 3. School of Horticulture and Landscape Architecture, Northeast Agricultural University, Harbin 150040)

Abstract: Objective To determine the protective effect and potential mechanism of the methanol extract of *Alpinia officinarum* Hance (MEAO) on cisplatin-induced acute kidney injury (cis-AKI) by network pharmacology and experiment verification. **Methods** The chemical constituents in the MEAO were identified by ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS). The active compounds, hub target proteins, and related signal pathways were predicted

基金项目: 云南省重大科技专项计划 (No.202402AA310041); 西双版纳“雨林英才”创新团队项目; 西双版纳“雨林英才”青年人才项目; 云南省王金辉专家工作站 (No.202405AF140073)。

作者简介: 夏彬, 女, 硕士研究生, 主要从事民族药药理及开发研究, email: 2752931843@qq.com * **通信作者:** 李光, 男, 研究员, 主要从事民族药药理及开发研究, email: lhb311@hotmail.com

by network pharmacology and molecular docking. Based on this, a mouse acute kidney injury model was established by intraperitoneal injection of cisplatin, whose mechanism was verified by enzyme-linked immunosorbent assay, Western blot and immunohistochemistry. **Results** Totally 29 chemical components in the MEAO were identified via network pharmacology, 24 active components and 316 potential intersection targets were obtained. Five hub active chemical components were confirmed: 5-hydroxyl-1, 7-diphenyl-6-hepten-3-one, 1, 7-diphenyl-4-hepten-3-one, chrysin, naringenin, and galangin, involving nine hub targets (AKT1, SRC, EGFR, STAT3, HSP90AA1, ESR1, MAPK3, PPARG, and PTGS2). Gene Ontology and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes analyses indicated that MEAO treatment in cis-AKI primarily involved cellular responses to lipid, the regulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway and lipid peroxidation. Molecular docking confirmed strong binding affinities between the hub active components and the targets. MEAO obviously reduced the serum creatinine and blood urea nitrogen, and alleviated renal tubular injury, renal inflammatory reaction, and lipid peroxidation. MEAO might inhibit ferroptosis by regulating the MAPK signaling pathway. **Conclusion** MEAO can protect against cis-AKI, and its mechanism may be related to inhibiting ferroptosis through regulating the MAPK signaling pathway. This study provides a theoretical basis for clinical application of *Alpinia officinarum* Hance and possible drugs to prevent cisplatin nephrotoxicity.

Key words: *Alpinia officinarum* Hance; cisplatin; acute kidney injury; network pharmacology; MAPK; ferroptosis

顺铂 (cisplatin, cis) 作为最早的金属化疗药物之一, 广泛用于肺癌、宫颈癌、胃癌等多种实体瘤的治疗^[1]。但由于其显著的肾、耳、肝、神经等毒性, 严重限制了其临床应用^[2]。顺铂肾毒性发生的风险在 20% ~ 35%, 最严重和最常见的表现是急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI)^[3]。AKI 是一种短时间内肾小球滤过功能快速减退的临床综合征。据统计, AKI 每年影响 1300 多万患者, 年死亡率超过 50%, 已逐步成为全球关注的公共卫生问题^[4]。但截至目前, 临床上尚无有效的药物来预防或治疗顺铂诱导的急性肾损伤 (cis-AKI), 因此探索有效的治疗药物并阐明其机制至关重要。

高良姜为姜科山姜属多年生草本植物高良姜 (*Alpinia officinarum* Hance) 的干燥根茎, 药用历史悠久, 最早记载于《名医别录》^[5], 书中载: “高良姜, 大温。主治暴冷, 胃中冷逆, 霍乱腹痛。味辛、性热, 归脾、胃经。具有温胃止呕, 散寒止痛的功效。”高良姜中主要化学成分包括二苯基庚烷类、黄酮类等, 显示出强大的抗肿瘤、抗氧化、抗炎、抗菌等活性^[6], 对胃肠道疾病^[7]、神经系统疾病^[8]、高血压^[9]、糖尿病^[10]、癌症^[11]等的治疗已经有相关报道。有研究表明, 高良姜甲醇提取物 (methanol extract of *Alpinia officinarum* Hance, MEAO) 具有抗炎、抗氧化、抗菌等药理活性, 显示出强大的炎症因子抑制、DPPH 自由基清除和超氧阴离子清除能力, 具有潜在的肾脏保护作用^[12-13], 但其药理作用及机制尚未充分研究。

网络药理学和分子对接作为一种新方法已广泛用于预测中药治疗相关疾病的作用机制^[14], 其特点为整体性、系统性、相关性和可预测性, 能够通过系统生物学的研究方法, 应用大数据分析获得关键成分的网络靶标, 从而阐明药物的作用机制^[15]。本文旨在应用网络药理学、分子对接筛选及预测 MEAO 治疗 cis-AKI 的关键靶点、生物过程以及信号通路并通过体内实验验证其作用机制, 为后期高良姜抗肾损伤药物的开发提供理论依据。

1 材料

1.1 试药

高良姜饮片购自西双版纳傣族自治州景洪市, 储存于中国医学科学院药用植物研究所云南分所药理中心药材室, 编号为 502-YP-B4; 成人每日用量为 3 ~ 6 g, 小鼠等效剂量为 0.39 ~ 0.78 g · kg⁻¹, 实验分为高、中、低剂量组, 分别为生药量 0.8、0.4、0.2 g / (kg · d)。乙腈 (ACS/HPLC, Honeywell), 甲醇 (Adamas 公司), 甲酸 (HPLC, Aladdin 公司), 双蒸水 (屈臣氏蒸馏水公司), 顺铂 (北京百灵威科技有限公司), 肾功七项检测试剂盒 (成都普利泰生物科技有限公司), 苏木精-伊红 (HE) 染色试剂盒、Masson 三色染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司), 小鼠超氧化物歧化酶 (SOD) 和丙二醛 (MDA) 检测试剂盒 (艾迪生生物科技有限公司), 小鼠白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-1β (IL-1β)、肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 试剂盒 (上海源桔生物科技中心), BCA 蛋白检测试剂盒、超敏

化学发光试剂盒(康为世纪生物科技有限公司),前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2) 抗体、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 抗体(杭州华安生物技术有限公司),磷酸化 P38 丝裂原活化蛋白激酶 (p-P38) 抗体(沈阳万类生物科技有限公司)。

1.2 动物

SPF 级雄性 ICR 小鼠 45 只, 体重 18 ~ 22 g [北京华阜康生物科技股份有限公司, 许可证号: SCXK(京) 2024-0003]。实验动物饲养于在中国医学科学院药用植物研究所云南分所动物研究中心 SPF 级动物房, 动物房内 12 h/12 h 光暗循环, 温度 (22±2) °C, 相对湿度 40% ~ 70%, 本研究经中国医学科学院药用植物研究所机构伦理审查委员会的批准(批件号: 20230920028)。

1.3 仪器

DV215CD 分析天平(万分之一)(美国奥豪斯公司); SB-800D 超声波清洗机(宁波新意超声波设备有限公司); N-1300 旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司); DZF-6092 真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司); LC400 超高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司); X500B Q-TOF 飞行时间质谱(美国 AB SCIEX 公司); SpectraMax13 酶标仪(美谷分子仪器有限公司); Tanon-5200Multi 凝胶成像系统(上海天能科技有限公司); DP53 显微镜(日本 Olympus 公司); Gemini AS 自动染色机、HM 355S 石蜡切片机、Hisostar 组织包埋机、MICROMSTP120 自动脱水机(赛默飞世尔科技公司); SMT-120VP 全自动生化分析仪(成都斯玛特科技有限公司)。

2 方法

2.1 高良姜醇提物 (MEAO) 的制备

称取高良姜细粉 100 g (过 40 目筛), 加入 10 倍量甲醇回流提取两次, 每次 30 min, 过滤并合并两次提取液, 减压浓缩至浸膏, 置于真空干燥箱干燥得 MEAO, 保存于 4 °C 冰箱中待用。取 1 mg MEAO 干燥粉末精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 加入适量甲醇, 超声溶解, 于室温放置, 甲醇定容至刻度, 经过 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 滤液转移至自动进样小瓶进行分析。

2.2 超高效液相色谱-四极杆串联飞行时间质谱 (UPLC-Q-TOF-MS) 分析

使用 UPLC-Q-TOF-MS 进行 IDA 采集模式的 LC-MS 在线分析。采用 Acquity HSS T3 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 流动相: A (0.1% 甲酸-水), B (0.1% 甲酸-乙腈), 洗脱梯度 (0 ~ 2 min, 5%B; 2 ~ 7 min, 30%B; 7 ~ 10 min, 30% ~ 60%B; 10 ~ 13 min, 60% ~ 80%B; 13 ~ 17 min, 90%B;

17 ~ 20 min, 100%B; 20 ~ 23 min, 5%B); 流速: 0.3 mL·min⁻¹; 柱温: 40 °C; 进样量: 5 μL。采用配有电喷雾离子源 (ESI) 的 X500B Q-TOF 分离化合物, 一级质谱扫描范围为 100 ~ 1200 Da, 二级质谱扫描范围为 50 ~ 1200 Da; 各气路均使用氮气。离子化电压 ±5500 V, 喷雾器 60 psi, 辅助加热气 60 psi, 气帘气 35 psi, 锥孔电压 ±100 V, 碰撞能量 ±10 V。

2.3 网络药理学和分子对接

通过 UPLC-Q-TOF-MS 分析出 MEAO 的化学成分后, 使用 SwissADME 数据库 (<http://www.swissadme.ch/>) 以胃肠吸收度及药物相似性为条件筛选出活性成分。利用 Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 进行活性成分的潜在作用靶点预测。通过 OMIM (<https://www.omim.org/>)、GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、TTD (<http://db.idrblab.net/ttd/>) 和 DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>) 数据库以 “cisplatin nephrotoxicity” “cisplatin induced acute kidney injury” “acute kidney injury” 为关键词检索 cis-AKI 的相关靶点。对以上药物靶点及疾病靶点取交集, 获得高良姜治疗 cis-AKI 的靶点集并通过微生物网站绘制韦恩图。将靶点集导入 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>), 物种设定为 H. sapiens, 置信度 > 0.4, 构建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络, 然后将结果导入 Cytoscape 3.7.1 软件进行可视化分析, 并使用插件 CytoNCA 以度 (degree) 值、中介中心性 (betweenness) 值、接近中心性 (closeness) 值进行排序, 均排名前 9 位的靶点为关键靶点。使用 Cytoscape 3.7.1 构建和可视化成分-治疗靶标网络, 并使用 CytoNCA 插件对该网络进行进一步分析。采用 Degree 值方法, 选取数值最高的 5 个活性成分作为关键活性成分。将靶点集导入 Metascape 数据库 (<http://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>) 进行基因本体 (GO) 富集分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路分析。使用微生物网站绘制 GO 富集分析及 KEGG 通路分析图。利用 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) 获取关键靶点的三维结构。使用 AutoDock 可视化软件进行关键成分与关键靶点的分子对接并分析结合能, 使用 PyMOL2.1.0 将结果可视化。

2.4 cis-AKI 模型的建立

将 45 只雄性 ICR 小鼠随机分 5 组, 分别为正常组 (Normal)、模型组 (Cis)、MEAO 高剂量组 [H-MEAO, 0.8 g/(kg·d)], MEAO 中剂量组 [M-MEAO, 0.4 g/(kg·d)], MEAO 低剂量组 [L-MEAO, 0.2 g/(kg·d)], 每组 9 只。给药组小鼠预灌胃不同剂

量的 MEAO 7 d。第 7 日灌胃给药 2 h 后正常组腹腔注射 0.9% NaCl, 其余组单剂量腹腔注射顺铂 ($13 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 再连续给药 3 d, 末次给药 2 h 后, 小鼠禁食不禁水, 眼眶采血后以 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 收集血清, 储存在 -80°C 冰箱中备用; 肾组织称重后左肾固定在 4% 多聚甲醛中, 右肾储存在 -80°C 冰箱中备用。

2.5 肾功能检测和肾脏组织学检查

取出储存在 -80°C 冰箱中的血清样本, 使用肾功七项检测试剂盘在生化仪上检测血清肌酐 (Scr) 及血尿素氮 (BUN) 水平。取肾组织, 用 4% 多聚甲醛固定 24 h, 脱水、石蜡包埋、制作 $4 \mu\text{m}$ 切片、每个标本取 3 张切片, 脱蜡后行 HE 及 Masson 染色, 光镜下观察肾小球、近曲小管、远曲小管、肾小球基底膜等肾脏结构变化。

2.6 脂质过氧化水平及炎症因子水平检测

取出储存在 -80°C 冰箱中的肾组织及血清样本, 按照试剂盒检测肾组织中 SOD 活性、MDA 水平变化及血清中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的含量变化。

2.7 免疫组织化学 (IHC) 染色

肾组织石蜡切片脱蜡和水化后置于 $1 \times$ 柠檬酸钠抗原修复液中煮沸 10 min, 冷却至室温, 在 3% 过氧化氢下孵育 10 min 后, 滴加 10% 山羊血清室温封闭 1 h, 弃去山羊血清, 切片滴加 PTGS2 抗体 ($1:500$)、GPX4 抗体 ($1:1000$) 于 4°C 过夜。用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 3 次后, 滴加相应二抗孵育 1 h, 再次用 PBS 洗涤 3 次, 使用 DAB 试剂盒检测抗体, 最后滴加苏木精染色, 封片。

2.8 蛋白质印迹 (Western blot) 分析

在肾组织中加入含有 1% 蛋白酶抑制剂和 1% 磷酸酶抑制剂的 RIPA 缓冲液后匀浆, 静置 2 h 使组织裂解, 然后 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min。用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。使用 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶分离蛋白质, 并将其转移到 PVDF 膜上。室温下用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 2 h 后, 用 PTGS2 抗体 ($1:1000$)、GPX4 抗体 ($1:5000$)、p-P38 抗体 ($1:2000$) 在 4°C 下过夜, 用 TBST 洗涤 3 次后, 将膜放入相应二抗中室温孵育 2 h。使用超敏化学发光试剂盒检测蛋白条带。免疫印迹分析使用 TANOON 分子成像软件, 并使用 Image ProPlus 5.0 图像处理系统扫描条带。

2.9 统计分析

使用 SPSS 2021 软件分析数据, 多组间采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 组间两两比较用最小显著性差异法 (LSD) 检验。所有数据均以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 表示差

异有统计学意义。使用 GraphPad Prism 9.0 软件绘制图片。

3 结果

3.1 MEAO 的化学成分表征

基于 UPLC-Q-TOF-MS 分析, 结合数据库及相关文献, 根据化合物多级质谱信息, 从 MEAO 中鉴定出 29 种化学成分, 其中黄酮类 18 个, 二苯基庚烷类 5 个, 其他化合物 6 个。MEAO 化学成分表征见表 1, 正、负离子模式基峰色谱图 (BPC) 见图 1。

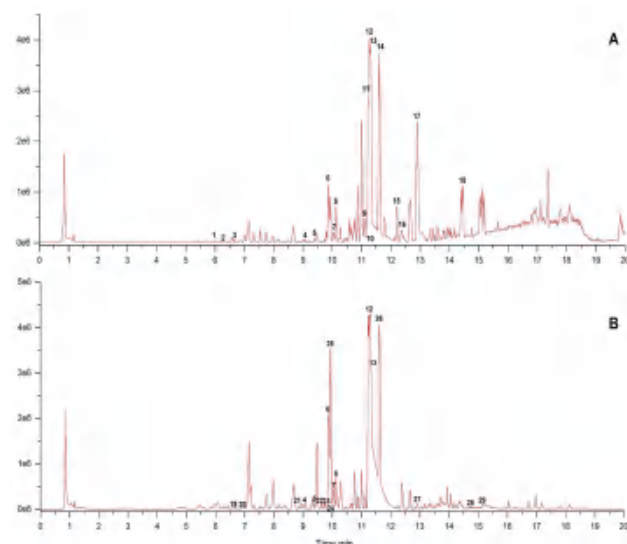


图 1 正 (A)、负 (B) 离子模式下 MEAO 的 BPC 图

Fig 1 BPC of MEAO under positive (A) and negative (B) ion modes

3.2 网络药理学与分子对接

3.2.1 药物和疾病靶标的预测以及药物-疾病交叉靶点的获取 共筛选出 24 种活性成分和 507 个活性成分的靶点, 并检索出相关非重复疾病靶点 2514 个。将药物靶点与疾病靶点取交集共获得交集靶点 316 个。

3.2.2 活性成分-靶点网络的构建 按照 Degree 排名, 排名最高的 5 个生物活性化合物为 5-羟基-1, 7-二苯基-6-庚烯-3-酮、1, 7-二苯基-4-庚烯-3-酮、白杨素、柚皮素、高良姜素。

3.2.3 PPI 网络分析 连接度、中介中心性、接近中心性数值均排名前 9 位的为关键靶点, 分别为蛋白激酶 B (AKT1)、酪氨酸蛋白激酶 Src (SRC)、表皮生长因子受体 (EGFR)、信号传导和转录激活因子 3 (STAT3)、热休克蛋白 HSP 90- $\alpha 1$ (HSP90AA1)、雌激素受体 1 (ESR1)、MAP 激酶激活蛋白激酶 3 (MAPK3)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG)、前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2)(见图 2 及表 2)。

表 1 正负离子模式下 MEAO 主要成分的表征

Tab 1 Characterization of main components in MEAO under positive and negative ion modes

No.	化合物	t_R /min	实际值 (m/z)	分子式	离子模式	误差 / $\times 10^{-6}$	二级碎片
1	儿茶素 ^{*[16]}	5.97	291.0860	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	[M+H] ⁺	-1.1	207.0660, 189.0551, 179.0706, 165.0551, 139.0395, 123.0444
2	山奈酚-3-鼠李糖苷 ^[17]	6.27	433.1130	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M+H] ⁺	0.2	271.0599, 259.0607, 229.0456, 163.0324, 147.0455, 135.0443
3	香草醛 ^{*[18]}	6.69	53.0552	C ₈ H ₈ O ₃	[M+H] ⁺	3.8	138.0341, 125.0596, 110.0498, 93.0336, 65.0386
4	槲皮素 ^{*[16]}	9.08/	303.0500/	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	[M+H] ⁺ /	0.2/	303.0499, 179.0340, 153.0180, 127.0545/301.0347,
		9.08	301.0352		[M-H] ⁻	-0.6	273.0397, 178.9981, 163.0035, 151.0032, 107.0140
5	3-O-甲基槲皮素 ^{*[16]}	9.40/	317.0654/	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	[M+H] ⁺	-0.6/	317.0653, 302.0420, 285.0397, 274.0477, 245.0453,
		9.40	315.0509		/[M-H] ⁻	-0.4	228.0423, 153.0188, 137.0241/315.0514, 300.0267, 283.0217, 272.0246, 243.0298, 151.0334
6	山奈酚 ^{*[16]}	9.88/	287.0552/	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M+H] ⁺ /	0.7/	269.0451, 258.0525, 231.0654, 213.0546, 185.0600,
		9.87	285.0399		[M-H] ⁻	-2.0	165.0182, 153.0178, 121.0285/229.0504, 183.0455, 151.0036, 119.0503
7	异鼠李素 ^{*[16]}	10.05/	317.0660/	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	[M+H] ⁺ /	1.3/	302.0414, 285.0399, 257.0446, 245.0445, 229.0498,
		10.06	315.0509		[M-H] ⁻	-0.4	217.0498, 153.0182, 137.0245/300.0264, 283.0245, 255.0298, 243.0304, 227.0352, 215.0352, 151.0036, 135.0087
8	3-O-甲基山奈酚 ^{*[18]}	10.13/	301.0699/	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	[M+H] ⁺ /	-2.5/	301.0692, 229.0493, 213.0546, 153.0185/299.0554,
		10.13	299.0554		[M-H] ⁻	-2.4	227.0337, 211.0394, 151.0038
9	儿茶素四甲基醚 ^[18]	11.10	347.1483	C ₁₉ H ₂₂ O ₆	[M+H] ⁺	-1.8	209.0817, 193.0857, 167.0697, 162.0674, 151.0571, 147.0443, 137.0598
10	白杨素 ^{*[17]}	11.15	255.0651	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	[M+H] ⁺	-0.4	255.0647, 213.0550, 153.0184, 129.0341, 103.0346
11	乔松素 ^{*[16]}	11.24	257.0797	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	[M+H] ⁺	-4.4	257.0802, 215.0704, 179.0343, 153.0181, 131.0487, 79.0541
12	高良姜素 ^{*[16]}	11.27/	271.0584/	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M+H] ⁺ /	-6.3/	271.0598, 215.0711, 197.0591, 153.0186, 105.0339/
		11.29	269.0440		[M-H] ⁻	-5.8	269.0463, 239.0347, 213.0549, 195.0443, 151.0554
13	山奈酚-4'-O-甲醚 ^{*[16]}	11.31/	301.0690/	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	[M+H] ⁺ /	-5.5/	286.0457, 258.0507, 229.0480, 213.0539, 185.0596/
		11.33	299.0553		[M-H] ⁻	-2.7	284.0326, 255.0289, 227.0340, 151.0025, 132.0210
14	黄豆黄素 [*]	11.60	307.0580	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M+Na] ⁺	1.0	307.0621, 105.0698
15	麦角异柯宁碱	12.16	584.2795	C ₃₁ H ₃₉ N ₅ O ₅	[M+Na] ⁺	-8.3	584.2785, 464.2216, 446.2117, 418.2166, 354.1855, 298.1609, 250.1218
16	5-羟基-1, 7-二苯基-6-庚烯-3-酮 ^{*[19]}	12.39	303.1347	C ₁₉ H ₂₀ O ₂	[M+Na] ⁺	-2.9	303.1349, 197.0829, 91.0527
17	5-羟基-1, 7-二苯基-3-庚酮 ^{*[19]}	12.90	283.1692	C ₁₉ H ₂₂ O ₂	[M+H] ⁺	-0.2	265.1572, 161.0984, 133.0650, 131.0860, 117.0700, 105.0698, 91.0545, 77.0392
18	1, 7-二苯基-4-庚烯-3-酮 ^{*[19]}	14.45	265.1582	C ₁₉ H ₂₀ O	[M+H] ⁺	-1.8	247.1496, 161.0964, 133.1022, 131.0860, 117.0694, 105.0692, 91.0537
19	芦丁 ^[20]	6.64	609.1463	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	[M-2H] ⁻	0.3	609.1472, 300.0284, 271.0261, 151.0042
20	阿魏酸 ^{*[17]}	7.02	193.0510	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻	1.9	178.0257, 134.0385, 133.0304, 132.0243
21	1, 7-双(4-羟基苯基)庚烷-3, 5-二醇 ^{*[16]}	8.73	315.1605	C ₁₉ H ₂₄ O ₄	[M-H] ⁻	1.0	315.1599, 149.0609, 131.0505, 106.0425
22	六氢姜黄素 ^{*[20]}	9.62	373.1657	C ₂₁ H ₂₆ O ₆	[M-H] ⁻	0.1	355.1531, 193.0876, 179.0709, 164.0478, 135.0456, 121.0297
23	柚皮素 ^{*[18]}	9.73	271.0603	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	-3.3	271.0609, 227.0713, 151.0034, 119.0499, 107.0137, 93.0347
24	芹菜素 ^{*[16]}	9.76	269.0454	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	-0.6	269.0456, 241.0480, 227.0366, 225.0561, 201.0630, 151.0042, 117.0347, 107.0138
25	7, 2'-二羟基黄酮 [*]	9.94	253.0511	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	[M-H ₂ O-H] ⁻	1.9	253.0501, 225.0572, 197.0600, 115.0549, 65.0032
26	鹰嘴豆芽素 A [*]	11.62	283.0596	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	-5.7	283.0599, 268.0365, 239.0336, 211.0390, 167.0490
27	大黄素 ^{*[21]}	12.90	269.0448	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	-2.8	269.0449, 241.0513, 227.0354, 225.0559
28	棕榈酸 ^{*[22]}	14.74	255.2328	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	[M-H] ⁻	-0.6	255.2324, 237.2215, 212.0267, 169.0151
29	油酸 ^[22]	15.11	281.2484	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	[M-H] ⁻	-0.7	281.2494, 65.9979

注 (Note): * 为 MEAO 中的活性化学成分 (* Means active chemical components in MEAO)。

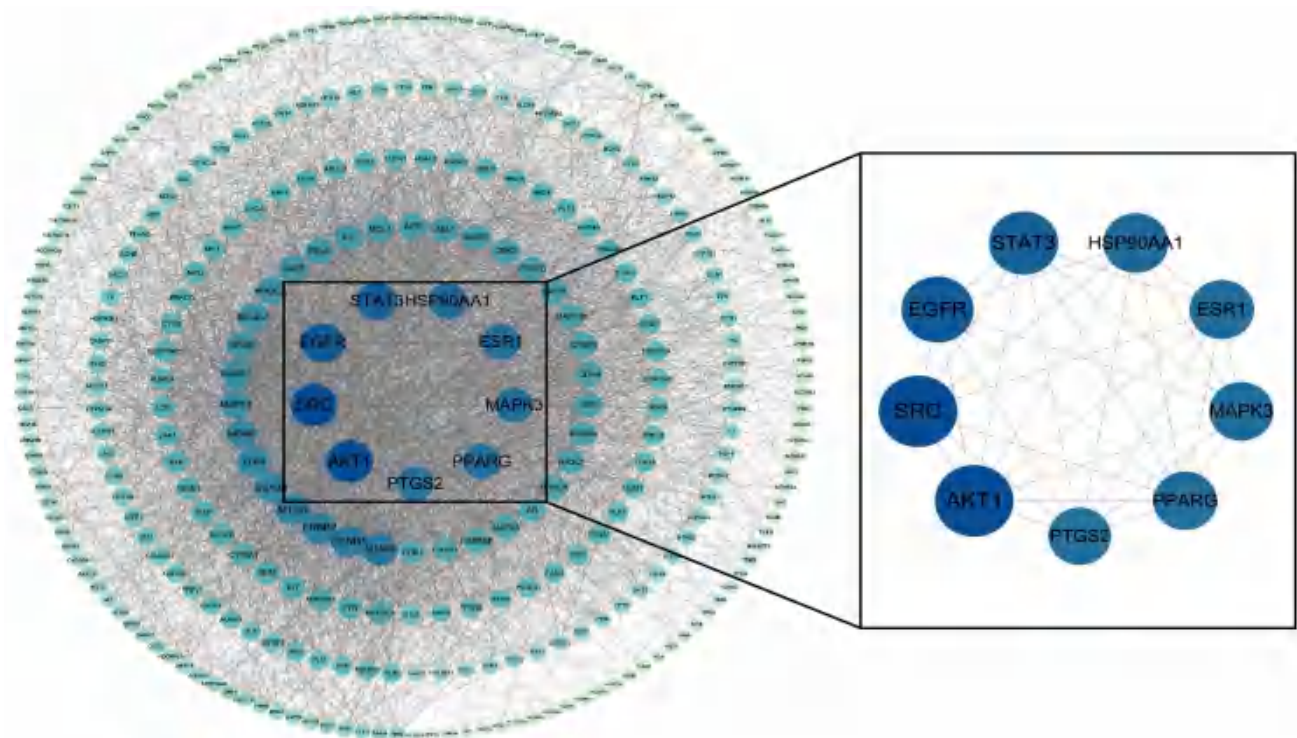


图 2 MEAO 治疗 cis-AKI 的网络可视化节点图

Fig 2 Network visualization node-link diagram of MEAO for cis-AKI

注：颜色代表靶点的重要性，颜色越深，靶点越重要。

Note: Color represents importance of targets, the darker the color, the more important the target.

表 2 9 个关键靶点的拓扑性质

Tab 2 Topological properties of 9 hub targets

关键靶点	连接度	中介中心性	接近中心性
AKT1	154	6275.1200	0.655 532 36
SRC	154	12 031.6290	0.655 532 36
EGFR	137	3590.1538	0.606 177 60
STAT3	129	2933.5833	0.625 498 00
HSP90AA1	118	2554.3594	0.601 532 60
ESR1	116	3354.4722	0.606 177 60
MAPK3	115	3560.3910	0.603 846 13
PPARG	114	3981.0588	0.599 236 67
PTGS2	111	4211.7905	0.600 382 40

3.2.4 KEGG 通路分析和 GO 富集分析 MEAO 治疗 cis-AKI 共涉及 204 条通路，其中共同靶点显著影响癌症相关通路、磷脂酰肌醇 3-激酶-蛋白激酶 B 信号通路、有丝分裂原活化蛋白激酶信号通路、脂质和动脉硬化等（见图 3A）。在 GO 富集分析中，共有 2397 个生物学过程，160 个细胞组分和 340 个分子功能被显著富集，包括 MAPK 级联反应的调节，细胞对脂质的反应等（见图 3B）。结合 KEGG 通路分析和 GO 富集分析结果，MEAO 可能通过调控 MAPK 信号通路以及脂质过氧化来改善 cis-AKI。

3.2.5 分子对接 对接结果以结合能 ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) 表示，结果显示了 PTGS2 与白杨素、高良姜素、5-羟基-1, 7-二苯基-6-庚烯-3-酮和柚皮素有较强的结合活性（见表 3）。在此基础上，使用 Pymol 可

视化分析显示 PTGS2 与上述生物活性成分之间的特定相互作用，PTGS2 通过残基 GLY45、CYS47、HIS39、CYS36 与白杨素相互作用，利用高良姜素与残基 TYR130、CYS36、AGLY45、HIS90 形成氢键，分别在 GLN203 位点和 CYS47 位点与 5-羟基-1, 7-二苯基-6-庚烯-3-酮和柚皮素结合（见图 4）。

3.3 MEAO 调控 MAPK 信号通路抑制铁死亡改善 cis-AKI

3.3.1 MEAO 对 cis-AKI 小鼠体重、肾脏指数及肾功能的影响 注射顺铂后，小鼠出现体重减轻和肾脏指数增加。与模型组相比，用 MEAO 治疗后小鼠的体重显著增加，肾脏指数显著降低，其中高剂量组效果最显著（见图 5A 和 5B）。Scr 与 BUN 是肾功能的重要指标，注射顺铂后小鼠 Scr 及 BUN 水平显著升高，表明顺铂导致了小鼠肾毒性的产生，与模型组相比，治疗组均可以使 Scr 及 BUN 水平显著降低（见图 5C 和 5D），显示出剂量依赖性的肾脏保护作用。

3.3.2 MEAO 对 cis-AKI 小鼠肾组织形态学的影响 顺铂诱导后，小鼠肾组织出现胶样管型、肾小管扩张、肾小管上皮细胞脱落，肾小球萎缩（见图 6A）。Masson 染色结果显示，模型组肾组织出现严重的纤维化情况（见图 6B）。MEAO 预处理可显著改善肾小球病变，肾小管坏死及炎性细胞浸润情况，可剂量依赖性地减轻肾脏病变。以上结果表明，MEAO 对顺铂诱导的小鼠急性肾损伤有明显的改善作用。

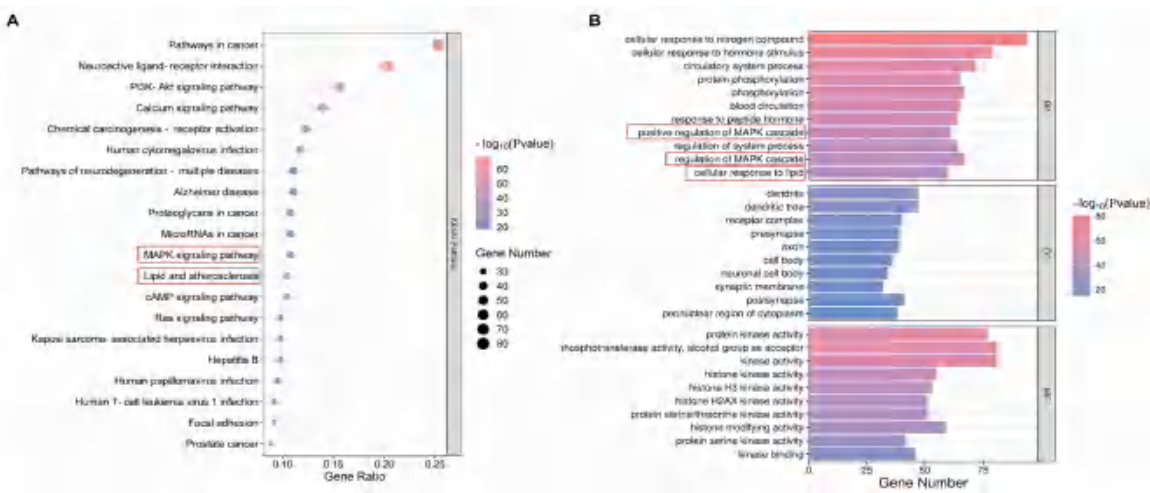


图 3 MEAO 治疗 cis-AKI 的 KEGG 通路分析 (A) 和 GO 富集分析 (B)
 Fig 3 KEGG pathways (A) and GO enrichment (B) analysis of MEAO for cis-AKI

表 3 关键活性成分与关键靶点的对接结合能

关键活性成分	结合能 / (kJ · mol ⁻¹)								
	AKT1	SRC	EGFR	STAT3	HSP90AA1	ESR1	MAPK3	PPARG	PTGS2
5-羟基-1, 7-二苯基-6-庚烯-3-酮	-21.35	-29.30	-15.91	-25.53	-31.39	-31.39	-17.58	-25.53	-34.32
1, 7-二苯基-4-庚烯-3-酮	-20.51	-29.72	-21.77	-28.05	-28.46	-30.14	-20.51	-26.37	-27.21
白杨素	-25.53	-33.49	-34.74	-30.98	-36.00	-31.39	-35.16	-32.23	-37.67
柚皮素	-25.53	-33.91	-33.49	-33.07	-37.67	-37.25	-36.42	-32.23	-39.77
高良姜素	-24.70	-36.00	-32.23	-31.81	-35.16	-30.56	-31.81	-31.39	-38.09

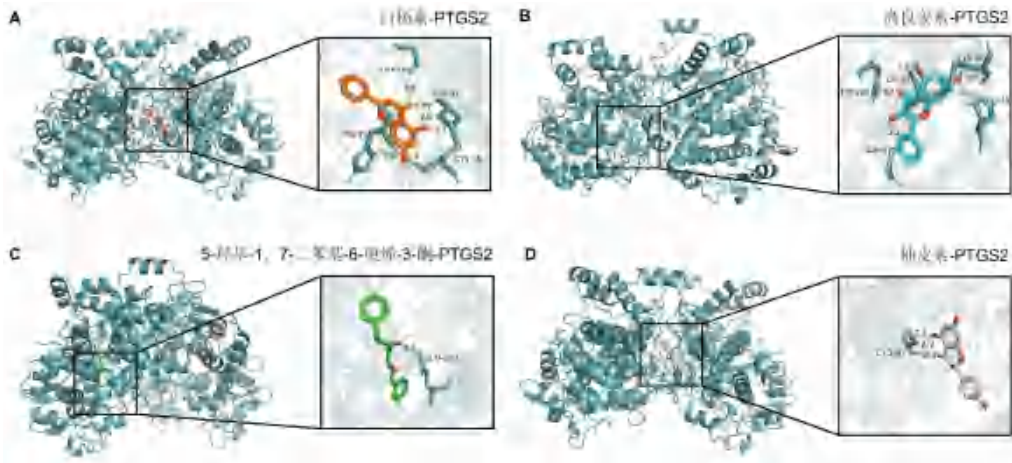


图 4 关键活性成分与 PTGS2 的分子对接模式图
 Fig 4 Molecular docking mode diagram of hub active component with PTGS2

3.3.3 MEAO 对 cis-AKI 小鼠炎症及脂质过氧化水平的影响 结果显示, 顺铂诱导后 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的血清水平显著升高, 但经 MEAO 治疗后, 三者水平显著降低且呈剂量依赖性 (见图 7A ~ 7C)。脂质过氧化在 AKI 发病过程中发挥重要作用。与正常组相比, 顺铂诱导后肾组织 SOD 活性显著降低, MDA 水平显著升高。而 MEAO 治疗后显著逆转了这种改变 (见图 7D 和 7E)。

3.3.4 MEAO 抑制肾组织铁死亡 PTGS2 和 GPX4 在铁死亡过程中发挥重要作用, 是铁死亡的重要检测指标。如图 8A 和 8B 所示, IHC 染色结果显示, 顺

铂诱导后小鼠肾脏中 PTGS2 的表达明显上调, GPX4 的表达明显下调, MEAO 治疗后逆转了两者的表达水平。此外, Western blot 结果显示, 与模型组相比, MEAO 高、中剂量治疗组的小鼠肾脏中 PTGS2 的蛋白表达水平明显降低, GPX4 的蛋白表达水平显著升高 (见图 8C ~ 8E), 这与 IHC 染色的结果一致, 证实 MEAO 治疗可显著抑制铁死亡, 达到改善 cis-AKI 的作用。

3.3.5 MEAO 调控 MAPK 信号通路 MAPK 通路参与脂质过氧化和能量应激的调节, 是铁死亡的关键。Western blot 结果表明, 在顺铂诱导后, p-P38 被激活,

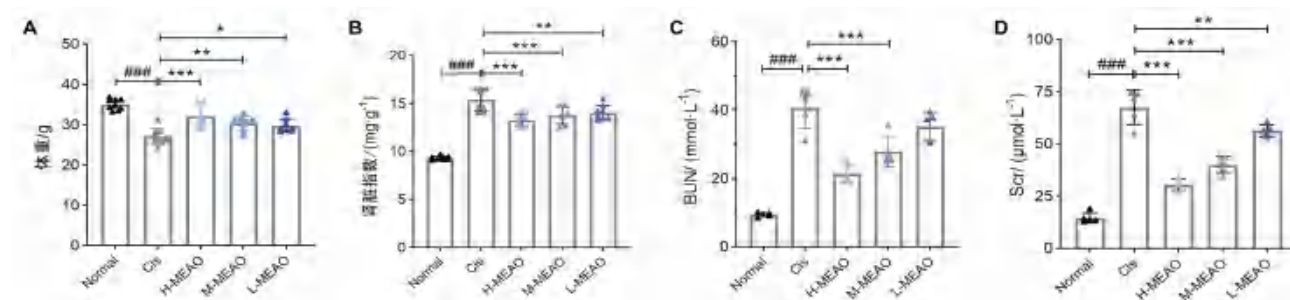


图5 MEAO对注射顺铂后小鼠体重、肾脏指数和肾功能的影响

Fig 5 Effect of MEAO on the body weight, kidney index and kidney function in mice treated with cisplatin

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

Note: Compared with the Normal group, $###P < 0.001$; compared with the Cis group, $*P < 0.05$ ， $**P < 0.01$ ， $***P < 0.001$ 。

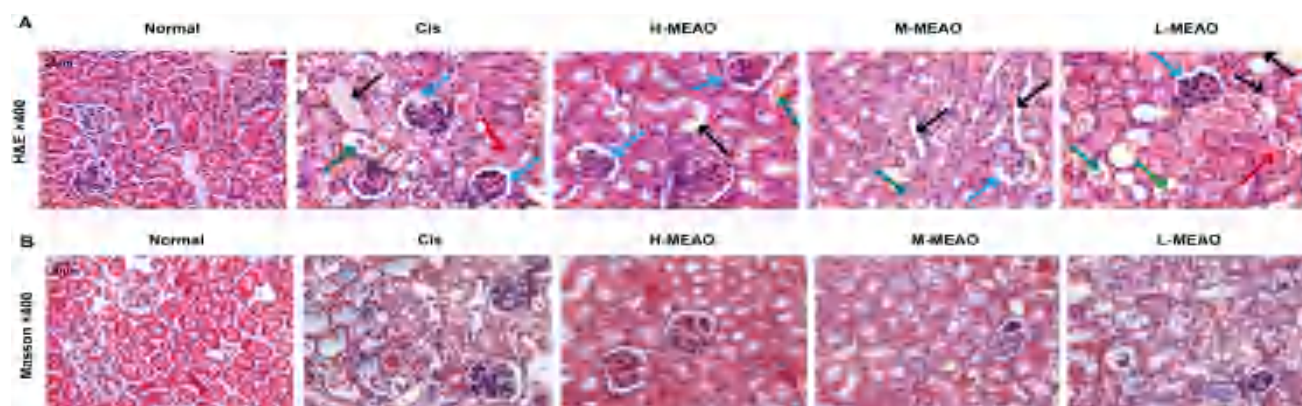


图6 MEAO对注射顺铂后小鼠肾组织形态学的影响 (×400)

Fig 6 Effect of MEAO on the histomorphology in the kidney tissues of mice treated with cisplatin (×400)

注：红色箭头表示橡胶状管型；绿色箭头代表肾小管上皮细胞脱落；黑色箭头代表肾小管扩张；蓝色箭头代表肾小球萎缩，比例尺：20 μm。

Note: The red arrow represents the rubber-like tube type; the green arrow represents the shedding of renal tubular epithelial cells; the black arrow represents renal tubular dilatation; the blue arrow represents glomerular atrophy; scale bar: 20 μm.

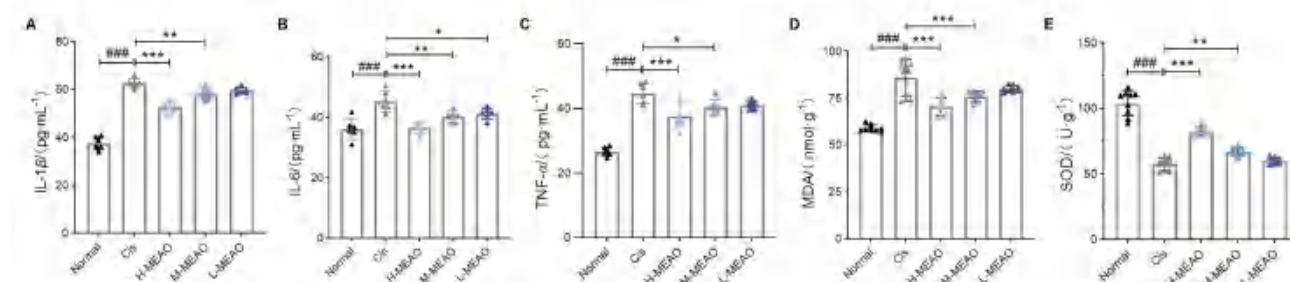


图7 MEAO对注射顺铂后小鼠炎症水平及脂质过氧化水平的影响

Fig 7 Effect of MEAO on inflammatory and lipid peroxidation level in mice treated with cisplatin

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

Note: Compared with the Normal group, $###P < 0.001$; compared with the Cis group, $*P < 0.05$ ， $**P < 0.01$ ， $***P < 0.001$ 。

其表达水平显著升高，而MEAO治疗则可以显著降低P38的磷酸化水平（见图9A和9B）。

4 讨论

目前，针对高良姜功能的研究集中在其对胃肠道疾病的治疗上，事实上，高良姜在《神农本草经》里被列为上品，是治肾、膀胱诸经的要药^[23]，且MEAO具有抗炎及抗氧化的功效，具有潜在的肾脏保护作用。尽管如此，目前关于高良姜治疗肾脏疾病的报道很少。因此，本文采用UPLC-Q-

TOF-MS结合网络药理学的方法，探究MEAO治疗cis-AKI的作用机制。

本研究通过UPLC-Q-TOF-MS在MEAO中鉴定出29种化合物，其中24种为活性化学成分，主要由黄酮和二苯基庚烷类化合物组成。现代药理学研究表明，黄酮类化合物显示出强大的抗氧化活性、抗炎活性、免疫调节活性、抗病毒活性、抗菌活性等^[24]，对炎症、神经系统疾病^[25]、糖尿病^[26]、癌症^[27]等的治疗已经有了广泛研究。二苯基庚烷类

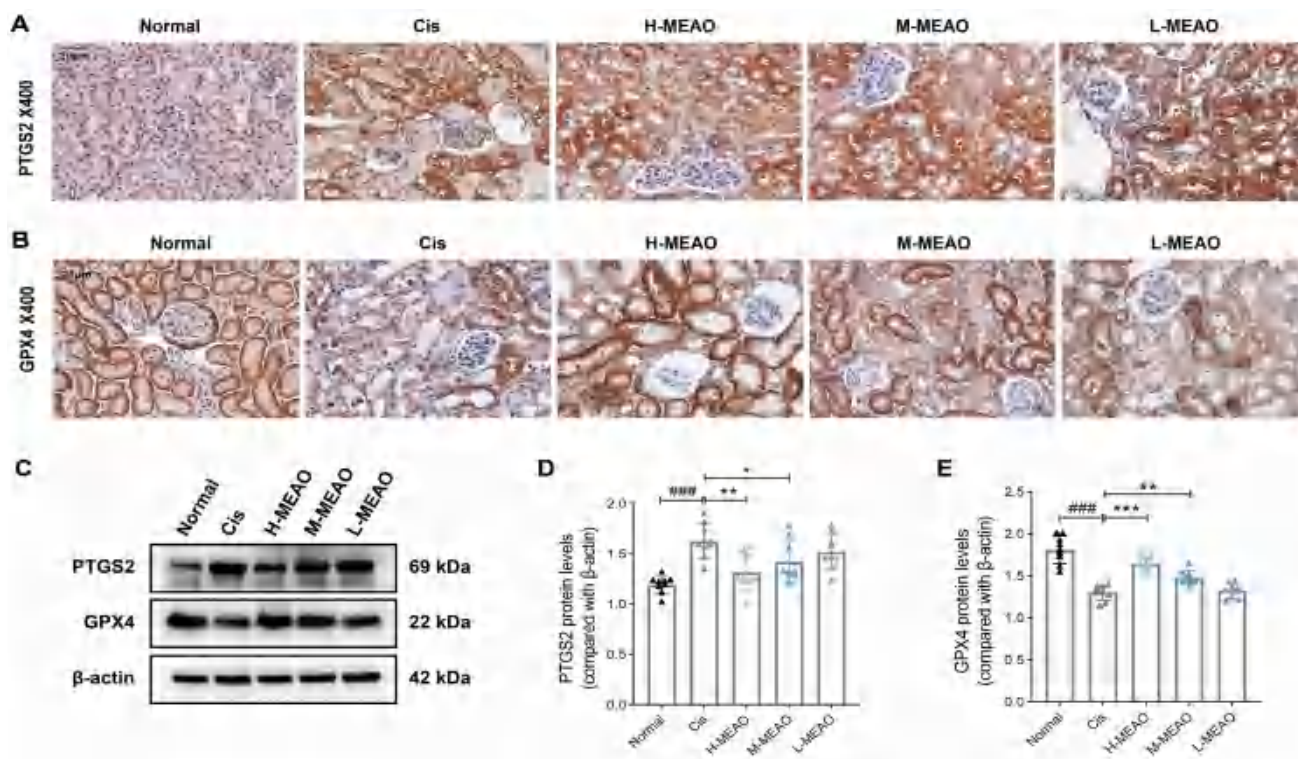


图 8 MEAO 对肾组织铁死亡的影响 (×400)

Fig 8 Effect of MEAO on the ferroptosis in kidney tissue (×400)

 注: 与正常组比较, $###P < 0.001$; 与模型组比较, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ 。比例尺: 20 μm 。

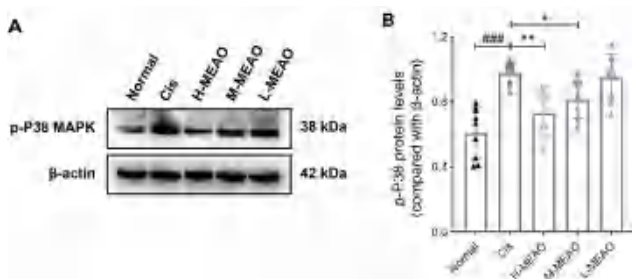
 Note: Compared with the Normal group, $###P < 0.001$; compared with the Cis group, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$. scale bar: 20 μm .


图 9 MEAO 对 MAPK 信号通路的影响

Fig 9 Effect of MEAO on the MAPK signaling pathway

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

 Note: Compared with the Normal group, $###P < 0.001$; compared with the Cis group, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。

合物以 1, 7-二苯庚烷为结构骨架, 许多药用特性已经被发现, 包括抗氧化、降糖、抗炎、抗肿瘤、抗菌、保肝等^[28]。

本研究通过 PPI 网络分析后获得 9 个关键靶点: AKT1、SRC、EGFR、STAT3、HSP90AA1、ESR1、MAPK3、PPARG、PTGS2。它们可能在整个 MEAO 靶向 cis-AKI 的相互作用网络中起着至关重要的作用。本研究通过分子对接的有效手段发现关键活性成分白杨素、高良姜素、柚皮素及 5-羟基-1, 7-二苯基-6-庚烯-3-酮与 9 个关键靶点均具有较强的结合能力, 其中与 PTGS2 的结合能力最强, 说明

MEAO 中关键活性成分与 PTGS2 等蛋白结合稳定。白杨素具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化等多种生物学功能^[29], 衣楠玲等^[30]通过实验证实白杨素对小鼠肾缺血再灌注损伤具有保护作用, 其机制可能与抑制 NLRP3 炎性小体活化有关。高良姜素具有抗炎、抗菌、抗氧化的药理活性, 已被证实可通过抑制 ERK 和 NF- κ B 信号通路减轻小鼠的氧化应激、炎症和细胞死亡, 从而改善顺铂诱导的肾毒性^[31]。柚皮素具有抑制炎症因子及氧化自由基等特性, 可有效降低脂多糖诱导的肾小球系膜细胞凋亡, 发挥肾保护作用^[32]。5-羟基-1, 7-二苯基-6-庚烯-3-酮被证实可与 PTGS2 活性位点良好结合, 发挥抗炎及抗氧化的作用^[13]。由此可见, 白杨素、高良姜素、柚皮素及 5-羟基-1, 7-二苯基-6-庚烯-3-酮在治疗肾脏疾病中发挥重要作用, 可能是 MEAO 治疗 cis-AKI 的药效物质基础, 但仍需要进一步的研究来证实这些化合物的有效性及安全性。

KEGG 通路分析和 GO 富集分析结果表明, MEAO 对 cis-AKI 的治疗主要涉及细胞对脂质的反应、调控 MAPK 信号通路以及脂质过氧化等相关途径。脂质过氧化在肿瘤和神经系统疾病等^[33]。有研究报道, 脂质过氧化也是 cis-AKI 的重要机制^[34]。本研究通过 GO 富集分析发现, 细胞对脂质的反应是 MEAO 治疗 cis-AKI 的关键生物学过程, 同时, 体内

实验证实,顺铂诱导后会导致过度脂质过氧化,而 MEAO 治疗后明显逆转了这种改变。脂质过氧化是铁死亡的重要驱动力^[35]。已有研究证实 GPX4 在限制脂质过氧化和铁死亡中起关键作用^[36]。GPX4 是一种谷胱甘肽过氧化物酶,可以减少多种氧化底物,从而保护细胞免受损伤^[37]。顺铂对富含硫醇的生物分子具有高亲和力^[38],在肾小管细胞中,顺铂通过耗尽 GPX4,使其无法消灭氧化底物,从而诱导活性氧(ROS)的过量积累,导致脂质过氧化从而激活铁依赖性肾小管细胞死亡^[39]。本研究结果表明,在顺铂诱导后,GPX4 明显失活,其在肾组织中的表达显著降低,MEAO 的治疗逆转了 GPX4 活性的降低,表明 MEAO 可能通过调控 GPX4 发挥抑制铁死亡作用。我们通过构建 PPI 可视化网络及分子对接发现了与关键成分对接最稳定的靶点——PTGS2。PTGS2 传统上被认为是炎症的关键角色^[40],研究表明,在铁死亡中 PTGS2 的表达升高,但抑制 PTGS2 的表达并没有导致铁死亡水平的降低,这证实了它是铁死亡的关键下游生物标志物^[41]。本实验观察到顺铂诱导后,PTGS2 表达增加,而 MEAO 治疗后,逆转了这种现象。

铁死亡伴随线粒体代谢障碍及氧化应激,而癌症相关信号通路可调节这两种应激反应^[42],在铁死亡中发挥重要作用。丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路是细胞感知环境刺激的关键传感器,通常在下游由氧化还原信号通路控制,并在细胞增殖、分化、转化和凋亡过程中发挥重要作用^[43]。MAPK 通路的激活有助于铁嗜癌细胞死亡^[44],是铁死亡的关键。P38 存在于 MAPK 级联反应的一个分支,可被各种促炎细胞因子以及应激刺激激活,它参与人体各种病理生理过程,如炎症、凋亡、细胞增殖等^[45]。同时,P38 MAPK 在铁死亡中也发挥重要作用,青蒿琥酯通过调节胶质母细胞瘤细胞中的 P38 信号通路诱导铁死亡^[46]。维生素 K₂ 通过抑制 P38 MAPK 信号传导从而抑制铁死亡来减轻脂多糖诱导的急性肺损伤^[47]。本文结合 GO 富集分析、KEGG 通路分析及实验证实,发现 MEAO 能够抑制顺铂诱导的 P38 MAPK 磷酸化,在抑制铁死亡方面发挥了重要作用。

综上所述,本研究通过 UPLC-Q-TOF-MS 与网络药理学相结合并进行实验验证,探讨了 MEAO 治疗 cis-AKI 的潜在靶点和作用机制。实验证实 MEAO 可以通过调控 MAPK 信号通路抑制铁死亡来改善 cis-AKI。本研究为丰富高良姜的临床应用和寻找预防顺铂肾毒性的药物提供了理论依据,但也存在一定的局限性,如 MEAO 成分覆盖面不够、依赖计算和预测等,另外,网络药理学得出的其余关键靶点和关键信号通路也可能在 cis-AKI 和其他肾脏疾病中发挥重要作用,值得进一步探索。

参考文献

- [1] Ghosh S. Cisplatin: the first metal based anticancer drug [J]. Bioorg Chem, 2019, 88: 102925.
- [2] Ozkok A, Edelstein CL. Pathophysiology of cisplatin-induced acute kidney injury [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 967826.
- [3] Fang CY, Lou DY, Zhou LQ, et al. Natural products: potential treatments for cisplatin-induced nephrotoxicity [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2021, 42 (12): 1951-1969.
- [4] Wise AF, Ricardo SD. Mesenchymal stem cells in kidney inflammation and repair [J]. Nephrology (Carlton), 2012, 17 (1): 1-10.
- [5] Abubakar IB, Malami I, Yahaya Y, et al. A review on the ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology of *Alpinia officinarum* Hance [J]. J Ethnopharmacol, 2018, 224: 45-62.
- [6] Lei X, Wang JP, Zuo K, et al. *Alpinia officinarum* Hance: a comprehensive review of traditional uses, phytochemistry, pharmacokinetic and pharmacology [J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1414635.
- [7] Gong JW, Zhang Z, Zhang XG, et al. Effects and possible mechanisms of *Alpinia officinarum* ethanol extract on indomethacin-induced gastric injury in rats [J]. Pharm Biol, 2018, 56 (1): 294-301.
- [8] Abd RI, Adam SH, Hamid AA, et al. Potential neuroprotective effects of *Alpinia officinarum* Hance (Galangal): a review [J]. Nutrients, 2024, 16 (19): 3378.
- [9] Lin LY, Peng CC, Yeh XY, et al. Antihyperlipidemic bioactivity of *Alpinia officinarum* (Hance) Farw Zingiberaceae can be attributed to the coexistence of curcumin, polyphenolics, dietary fibers and phytosterols [J]. Food Funct, 2015, 6 (5): 1600-1610.
- [10] Heidari H, Khalaj A, Khani S, et al. Hypoglycemic, hypolipidemic and hepatoprotective effects of *Alpinia officinarum* on nicotinamide/streptozotocin induced type II diabetic rats [J]. Horm Mol Biol Clin Investig, 2022, 43 (3): 289-296.
- [11] Atmaca H, Camli PC, Ilhan S. Synthesis of silver nanoparticles using *Alpinia officinarum* rhizome extract induces apoptosis through down-regulating Bcl-2 in human cancer cells [J]. Biol Futur, 2022, 73 (3): 327-334.
- [12] Basri AM, Taha H, Ahmad N. A Review on the pharmacological activities and phytochemicals of *Alpinia officinarum* (Galangal) extracts derived from bioassay-guided fractionation and isolation [J]. Pharmacogn Rev, 2017, 11 (21): 43-56.
- [13] Honmore VS, Kandhare AD, Kadam PP, et al. Isolates of *Alpinia officinarum* Hance as COX-2 inhibitors: evidence from anti-inflammatory, antioxidant and molecular docking studies [J]. Int Immunopharmacol, 2016, 33: 8-17.
- [14] Bisht A, Tewari D, Kumar S, et al. Network pharmacology, molecular docking, and molecular dynamics simulation to elucidate the mechanism of anti-aging action of *Tinospora cordifolia* [J]. Mol Divers, 2024, 28 (3): 1743-1763.
- [15] 毛丽斯, 朱晓红. 网络药理学在中药领域的应用进展 [J]. 中医药管理杂志, 2021, 29 (13): 98-102.
- [16] 李洪福, 李永辉, 王勇, 等. 高良姜化学成分及药理活性

- 的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20 (7): 236-244.
- [17] Khairullah AR, Solikhah TI, Ansori ANM, et al. A review of an important medicinal plant: *Alpinia galanga* (L.) Willd [J]. Sys Rev Pharm, 2020, 10 (11): 387-395.
- [18] 穆利萍, 王吉, 邱成省, 等. 高良姜中具有神经保护作用的化学成分研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2023, 38 (4): 627-635.
- [19] Zhang XG, Zhang XP, Wang Y, et al. A new diarylheptanoid from *Alpinia officinarum* promotes the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes [J]. Nat Prod Res, 2018, 32 (5): 529-535.
- [20] Zhang JQ, Wang Y, Li HL, et al. Simultaneous quantification of seventeen bioactive components in rhizome and aerial parts of *Alpinia officinarum* Hance using LC-MS/MS [J]. Analytical methods, 2015, 7 (12): 4919-4926.
- [21] 罗辉, 蔡春, 张建和, 等. 高良姜化学成分研究[J]. 中草药, 1998, 7 (21): 349-351.
- [22] Zhang YJ, Su RX, Yuan HL, et al. Widely targeted volatiles and metabolomics analysis reveal the metabolic composition and diversity of Zingiberaceae plants [J]. Metabolites, 2023, 13 (6): 700.
- [23] 刘静, 傅杰, 丁舸. 略论高良姜在方剂中的配伍意义[J]. 新中医, 2012, 44 (2): 124-125.
- [24] Juca MM, Cysne FF, de Almeida JC, et al. Flavonoids: biological activities and therapeutic potential [J]. Nat Prod Res, 2020, 34 (5): 692-705.
- [25] Khan A, Ikram M, Hahm JR, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of citrus flavonoid hesperetin: special focus on neurological disorders [J]. Antioxidants (Basel), 2020, 9 (7): 609.
- [26] Al Duhaidahawi D, Hasan SA, Al Zubaidy HFS. Flavonoids in the treatment of diabetes: clinical outcomes and mechanism to ameliorate blood glucose levels [J]. Curr Diabetes Rev, 2021, 17 (6): e461104506.
- [27] Dobrzynska M, Napierala M, Florek E. Flavonoid nanoparticles: a promising approach for cancer therapy [J]. Biomolecules, 2020, 10 (9): 1268.
- [28] Sun DJ, Zhu LJ, Zhao YQ, et al. Diarylheptanoid: a privileged structure in drug discovery [J]. Fitoterapia, 2020, 142: 104490.
- [29] 王芳, 王卫军, 张文涛, 等. 白杨素通过抑制 IRE1 α /TX-NIP/NLRP3 通路减轻糖尿病大鼠的肾组织损伤[J]. 局解手术学杂志, 2023, 32 (11): 979-984.
- [30] 衣楠玲, 李海明, 李永. 白杨素通过抑制 NLRP3 炎性小体活化减轻小鼠肾缺血再灌注损伤[J]. 广西医科大学学报, 2020, 37 (8): 1476-1482.
- [31] Wang DB, Chen J, Pu L, et al. Galangin: a food-derived flavonoid with therapeutic potential against a wide spectrum of diseases [J]. Phytother Res, 2023, 37 (12): 5700-5723.
- [32] 李东峰, 曾庆朗, 周华, 等. 柚皮素对脂多糖诱导的肾小球系膜细胞凋亡的作用研究[J]. 临床误诊误治, 2018, 31 (9): 93-97.
- [33] Valgimigli L. Lipid peroxidation and antioxidant protection [J]. Biomolecules, 2023, 13 (9): 1291.
- [34] Hu ZX, Zhang H, Yi B, et al. VDR activation attenuate cisplatin induced AKI by inhibiting ferroptosis [J]. Cell Death Dis, 2020, 11 (1): 73.
- [35] Jiang X, Stockwell BR, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021, 22 (4): 266-282.
- [36] Hadian K, Stockwell BR. SnapShot: ferroptosis [J]. Cell, 2020, 181 (5): 1188.
- [37] Ursini F, Maiorino M, Valente M, et al. Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides [J]. Biochim Biophys Acta, 1982, 710 (2): 197-211.
- [38] Min YZ, Mao CQ, Chen SM, et al. Combating the rug resistance of cisplatin using a platinum prodrug base delivery system [J]. Angew Chem Int Ed, 2012, 51 (27): 6742-6747.
- [39] Dong XQ, Chu LK, Cao X, et al. Glutathione metabolism rewiring protects renal tubule cells against cisplatin-induced apoptosis and ferroptosis [J]. Redox Report, 2023, 28 (1): 2152607.
- [40] Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development [J]. Oncogene, 1999, 18 (55): 7908-7916.
- [41] Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, et al. Regulation of ferroptosis cancer cell death by GPX4 [J]. Cell, 2014, 156 (1-2): 317-331.
- [42] Lee H, Zandkarimi F, Zhang Y, et al. Energy-stress-mediated AMPK activation inhibits ferroptosis [J]. Nat Cell Biol, 2020, 22 (2): 225-234.
- [43] Jalmi SK, Sinha AK. ROS mediated MAPK signaling in abiotic and biotic stress-striking similarities and differences [J]. Front Plant Sci, 2015, 6: 769.
- [44] Xie Y, Hou W, Song X, et al. Ferroptosis: process and function [J]. Cell Death Differ, 2016, 23 (3): 369-379.
- [45] Pearson G, Robinson F, Beers GT, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions [J]. Endocr Rev, 2001, 22 (2): 153-183.
- [46] Song QZ, Peng SX, Che FY, et al. Artesunate induces ferroptosis via modulation of p38 and ERK signaling pathway in glioblastoma cells [J]. J Pharm Sci, 2022, 148 (3): 300-306.
- [47] Wang YL, Yang WD, Liu LL, et al. Vitamin K₂ (MK-7) attenuates LPS-induced acute lung injury via inhibiting inflammation, apoptosis, and ferroptosis [J]. PLoS One, 2023, 18 (11): e294763.

(收稿日期: 2025-01-02; 修回日期: 2025-03-05)

老鹳草乙酸乙酯部位化学成分及抗氧化活性研究

范潇晓¹, 陈恒¹, 余少君¹, 李姝琪¹, 芦鑫¹, 王斯^{2*}, 刘永刚^{1*}, 张园园^{1*} (1.北京中医药大学中药学院, 北京 100029; 2.中国医科大学基础医学院, 沈阳 110122)

摘要: **目的** 研究老鹳草 *Geranium wilfordii* Maxim. 乙酸乙酯部位的化学成分及抗氧化活性。**方法** 利用溶剂萃取, 正/反相硅胶柱色谱, Sephadex LH-20 凝胶柱色谱以及半制备型高效液相色谱法对 *Geranium wilfordii* Maxim. 乙酸乙酯部位的化学成分进行分离纯化, 并使用 96 孔板对单体化合物进行抗氧化活性测试。**结果** 从老鹳草中分离得到 18 个化合物, 分别鉴定为香草酸 (1)、对香豆酸 (2)、2, 5-二羟基苯甲酸 (3)、对羟基苯甲酸 (4)、没食子酸乙酯 (5)、原儿茶酸 (6)、没食子酸 (7)、槲皮素 (8)、槲皮素-3-*O*- α -L-阿拉伯糖苷 (9)、槲皮素-3-*O*- α -L-鼠李糖苷 (10)、槲皮素-3-*O*-(6"-没食子酰基)- β -D-半乳糖苷 (11)、金丝桃苷 (12)、红花菜豆酸 (13)、吲哚醛 (14)、豆甾-4-烯-3-酮 (15)、 β -谷甾醇 (16)、棕榈酸 (17)、对苯二甲酸 (2-乙基) 己酯 (18), 并测定 18 个化合物的体外抗氧化活性。**结论** 化合物 14 为首次从牻牛儿苗科植物中分离得到, 化合物 13、15、18 为首次从老鹳草属分离得到, 化合物 1、2、3、9、10 为首次从老鹳草中分离得到。其中, 化合物 3、5、7、8 对 DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自由基均具有较强的抗氧化活性, 且抗氧化活性强于维生素 C。化合物 7 为抗氧化活性最强的单体化合物, 清除 DPPH 自由基的 IC_{50} 为 $(10.88 \pm 0.07) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 清除 ABTS⁺ 自由基的 IC_{50} 为 $(4.81 \pm 0.07) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

关键词: 老鹳草; 酚酸; 黄酮; 萜; 生物碱; 抗氧化

中图分类号: R285, R283

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)05-1326-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.023

Chemical constituents and antioxidant activity of the ethyl acetate fraction of *Geranium wilfordii* Maxim.

FAN Xiao-xiao¹, CHEN Heng¹, YU Shao-jun¹, LI Shu-qi¹, LU Xin¹, WANG Si^{2*}, LIU Yong-gang^{1*}, ZHANG Yuan-yuan^{1*} (1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029; 2. School of Basic Medical Sciences, China Medical University, Shenyang 110122)

Abstract: Objective To determine chemical constituents and antioxidant activity of the ethyl acetate fraction of *Geranium wilfordii* Maxim.. **Methods** The chemical components from the ethyl acetate fraction of *Geranium wilfordii* Maxim. were separated and purified by solvent extraction, normal/reversed-phase silica gel, Sephadex LH-20 gel column chromatography, and semi-preparative high-performance liquid column chromatographies, and the single compounds were tested for their antioxidant activity using the 96-well plate. **Results** From *Geranium wilfordii* Maxim., totally 18 compounds were isolated and identified as vanillic acid (1), *p*-coumaric acid (2), 2, 5-dihydroxybenzoic acid (3), *p*-hydroxybenzoic acid (4), gallic acid ethyl ester (5), protocatechuic acid (6), gallic acid (7), quercetin (8), quercetin-3-*O*- α -L-arabinopyranoside (9), quercetin 3-*O*- α -L-rhamnopyranoside (10), quercetin-3-*O*-(6"-galloyl)- β -D-galactopyranoside (11), hyperoside (12), phaseic acid (13), indole-3-carboxaldehyde (14), stigmast-4-en-3-one (15), β -sitosterol (16), palmitic acid (17), and bis-(2-ethylhexyl)terephthalate (18), and the in vitro antioxidant activity of 18 compounds was measured. **Conclusion** Compound 14 is isolated from Geraniaceae for the first time, compounds 13, 15, 18 are isolated from the genus *Geranium* for the first time, and compounds 1, 2, 3, 9, and 10 are isolated from *Geranium wilfordii* Maxim. for the

作者简介: 范潇晓, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药药效物质基础及天然产物合成与结构修饰研究, email: zilvixiaoxiao@126.com

***通信作者:** 王斯, 男, 副教授, 主要从事胞内菌与肿瘤微环境关系研究, email: swang@cmu.edu.cn; 刘永刚, 男, 研究员, 主要从事中药药效物质基础研究, email: liuyg0228@163.com; 张园园, 女, 副研究员, 主要从事天然产物合成与结构修饰研究, email: zyy10101@126.com

first time. Among them, compounds **3**, **5**, **7**, and **8** show strong antioxidant activity against both DPPH radicals and ABTS⁺ radicals, and the antioxidant activity is stronger than that of vitamin C. Compound **7** is the most active antioxidant compound, with an IC_{50} for scavenging of DPPH radicals of $(10.88 \pm 0.07) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, and that for scavenging of ABTS⁺ radicals of $(4.81 \pm 0.07) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Key words: *Geranium wilfordii* Maxim.; phenolic acid; flavonoid; terpenes; alkaloid; antioxidant

老鹳草为牻牛儿苗科植物牻牛儿苗 *Erodium stephanianum* Willd.、老鹳草 *Geranium wilfordii* Maxim. 或野老鹳草 *Geranium carolinianum* L. 的干燥地上部分, 其中老鹳草 *Geranium wilfordii* Maxim. 习称“短嘴老鹳草”^[1], 具有祛除风湿、疏通经络、缓解泻痢的功效, 主治关节湿痛、筋骨麻木、湿热、热毒泄泻等疾病^[2], 临床上着重用于治疗关节炎、胃炎、肠炎等风湿泻痢疾病^[3-5], 在中医药领域具有显著的药用价值^[6]。过去几十年里, 研究人员对老鹳草十分关注, 并不断对其开展了关节炎和肠炎等方面的药理活性和化学成分研究, 阐释和拓展了老鹳草的总提取物^[7-9]、分离部位^[10-11]、单体成分^[12-14]在抗炎、抑菌、抗肿瘤等方面的作用, 揭示了老鹳草以鞣质、黄酮、有机酸为主的化学成分^[15-19]。但是, 目前针对老鹳草药理作用和化学成分的研究多集中于总提取物或鞣质多糖类成分^[7-11], 对其他类的成分研究较少。而且, 也有研究证实除了这些主要成分外, 老鹳草中其他类成分在抗氧化^[20]、抗肿瘤^[21]、抗病毒^[22-23]、降糖^[24]等方面也表现出良好的活性。里宾斯基五规则提示老鹳草中那些具有适度脂溶性且分子量较小的化学成分是不可忽视的。而且, 实验室前期研究发现老鹳草乙酸乙酯部位不仅抗肿瘤活性最佳, 而且抗氧化活性也最佳^[25]。因此, 为进一步探究老鹳草中乙酸乙酯部位的活性成分及其在对抗肿瘤细胞和抗氧化能力之间的关系, 本文对老鹳草 60% 乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部位进行了精细分离和纯化处理, 并通过 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除实验来评估所分单体化合物在抵抗氧化方面的能力, 以期老鹳草的进一步开发利用奠定基础。

1 材料

老鹳草药材于 2021 年 5 月购自安徽戊庚中药饮片有限责任公司, 由北京中医药大学刘勇教授鉴定为老鹳草属牻牛儿苗科植物老鹳草 *Geranium wilfordii* Maxim. 全草, 凭证标本存放于北京中医药大学中药学院 (No. GW202105)。

LCMS-IT/TOF (日本岛津公司); LC 52 半制备液相色谱仪 (赛谱锐思北京科技有限公司); Cosmosil 5C₁₈-AR- II 色谱柱 (10 mm×250 mm, 5 μm , 日本 Nacalai tesque 株式会社); 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 (瑞典 GE Healthcare Bio-Sciences

AB 公司); ODS 柱色谱填料 (10 μm , 日本富士公司); 柱色谱硅胶 (200 ~ 300 目)、硅胶 GF₂₅₄ 预制板、薄层硅胶 GF₂₅₄ (青岛海洋化工有限公司); 分析纯甲醇 (天津市致远化学试剂有限公司), 重旋分析纯甲醇 (由重新旋蒸分析纯甲醇制得, 实验室自制), 分析纯正己烷、石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯 [福晨 (天津) 化学试剂有限公司]; DPPH (纯度: 96%, 批号: C16389061)、ABTS (纯度: 98%, 批号: C16494357) (上海麦克林生化科技有限公司); 抗坏血酸 (纯度: 99.7%, 批号: 20211011)、分析纯二甲基亚砜 (DMSO) (天津大茂化学试剂厂); PBS 缓冲液 ($0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 批号: Top0032, 北京博奥拓达科技有限公司); 娃娃哈水 (杭州娃娃哈集团有限公司); AVANCE NEO 400/600 型核磁共振波谱仪 (德国 Bruker 公司); EYELA SB-1300 旋转蒸发器 (上海爱朗仪器有限公司); BT224S 型十万分之一电子天平 (德国 Sartorius 公司); JM-B 6002 型百分之一电子天平 (余姚纪铭称重校验设备有限公司)。

2 方法

2.1 化合物的提取分离

取 7.5 kg 中药材, 用料液比为 1 : 8 的 60% 乙醇, 加热回流提取, 每次提取 2 h, 重复 3 次, 合并 60% 乙醇提取液抽滤, 旋蒸减压浓缩, 得到大约 1.6 kg (GW) 的浸膏。将浸膏与水混悬至静置后无沉淀, 以萃取试剂与悬浮液 1 : 1 的比例, 先用石油醚萃取 4 次, 再用乙酸乙酯萃取 4 次, 合并采用相同有机溶剂萃取的萃取液, 最后旋蒸减压浓缩干燥, 分别得到石油醚浸膏 69.0 g (GW1), 乙酸乙酯浸膏 116.3 g (GW2), 水部位浸膏 1212.4 g (GW3)。GW2 采用 200 ~ 300 目柱色谱硅胶分离, 石油醚 (PE) - 乙酸乙酯 (EtOAc) 系统 (100 : 0 ~ 0 : 100), 乙酸乙酯 - 甲醇 (MeOH) 系统 (20 : 1 ~ 0 : 1) 梯度洗脱, TLC 检测合并, 得到 20 个馏分 (GW2A ~ GW2T)。

馏分 GW2B (3.8 g) 经硅胶柱色谱分离, PE-EtOAc (18 : 1 ~ 0 : 1) 梯度洗脱, 合并后得到 9 个子馏分 (GW2Ba ~ GW2Bi)。经过 200 ~ 300 目柱色谱硅胶处理, 流动相比比例为 150 : 1 ~ 0 : 1 的二氯甲烷 (CH₂Cl₂) - 甲醇 (MeOH) 溶剂体系梯度洗脱, 馏分 GW2Ba (1.9 g) 被分为 8 个小馏分

(GW2Ba1 ~ GW2Ba8)。其中 GW2Ba4 (1.2 g) 馏分采用 Sephadex LH-20 凝胶处理, CH_2Cl_2 -MeOH = 2 : 1 流动相洗脱, 分离得到 3 个小馏分 (GW2Ba4a ~ GW2Ba4c)。GW2Ba4b (560.0 mg) 经硅胶柱色谱分离, CH_2Cl_2 -MeOH (50 : 1 ~ 0 : 1) 梯度洗脱得到 3 个更小的馏分 (GW2Ba4b1 ~ GW2Ba4b3), 其中 GW2Ba4b2 (270.0 mg) 经中性氧化铝柱色谱分离, 正己烷 (HEX) - CH_2Cl_2 (3 : 2) 等度洗脱得到化合物 **15** (28.8 mg), 再经 MeOH 加 0.5% 氨水等度洗脱得到馏分 GW2Ba4b2b (240.2 mg), 该馏分经硅胶柱色谱分离, PE-EtOAc (4 : 1) 等度洗脱, 得到化合物 **17** (104.7 mg)。

馏分 GW2C (2.6 g) 经硅胶柱色谱分离, PE-EtOAc (15 : 1 ~ 0 : 1) 梯度洗脱得 9 个子馏分 (GW2Ca ~ GW2Ci)。其中 GW2Ca (1.4 g) 经硅胶柱色谱分离, CH_2Cl_2 -MeOH (100 : 1 ~ 0 : 1) 梯度洗脱得到 10 个小馏分 (GW2Ca1 ~ GW2Ca10), 其中 GW2Ca5 (1.2 g) 经 Sephadex LH-20 (CH_2Cl_2 -MeOH = 2 : 1) 分离得到化合物 **16** (1.0 g)。

馏分 GW2E (3.4 g) 经硅胶柱色谱分离, PE-EtOAc (4 : 1 ~ 0 : 1) 梯度洗脱, 得到 7 个子馏分 (GW2Ea ~ GW2Eg)。其中 GW2Eb (2.9 g) 经硅胶柱色谱分离, CH_2Cl_2 -MeOH (200 : 1 ~ 0 : 1) 梯度洗脱得 11 个小馏分 (GW2Eb1 ~ GW2Eb11), 其中 GW2Eb1 (215.9 mg) 经制备薄层色谱 (HEX-EtOAc 10 : 1) 纯化得到化合物 **18** (148.8 mg)。

经过 Sephadex LH-20 凝胶处理, CH_2Cl_2 -MeOH = 2 : 1 流动相等度洗脱, 馏分 GW2F (716.9 mg) 被进一步分离纯化得到 8 个子馏分 (GW2Fa ~ GW2Fh)。其中 GW2Fg (81.5 mg) 经 Sephadex LH-20 (MeOH) 分离得到 5 个小馏分 (GW2Fb1 ~ GW2Fb15)。小馏分 GW2Fg3 (59.9 mg) 经制备薄层色谱 (CH_2Cl_2 -MeOH = 30 : 1) 纯化得到化合物 **1** (3.0 mg) 和化合物 **4** (53.7 mg)。

馏分 GW2G (3.2 g) 采用 200 ~ 300 目柱色谱硅胶, CH_2Cl_2 -MeOH (80 : 1 ~ 0 : 1) 流动相梯度洗脱, 纯化得到 6 个馏分 (GW2Ga ~ GW2Gf)。GW2Gc (1.1 g) 经硅胶柱色谱分离, PE-EtOAc (7 : 2) 等度洗脱得到 6 个子馏分 (GW2Gc1 ~ GW2Gc6)。GW2Ge (0.6 g) 经 Sephadex LH-20 (MeOH) 分离得到 10 个子馏分 (GW2Ge1 ~ GW2Ge10)。其中 GW2Gc3 (145.1 mg) 经 Sephadex LH-20 (MeOH) 分离得到 7 个子馏分 (GW2Gc3a ~ GW2Gc3g), GW2Ge5 (252.8 mg) 经硅胶柱色谱分离, HEX-EtOAc (6 : 2) 等度洗脱得到 5 个子馏分 (GW2Ge5a ~ GW2Ge5e)。GW2Gc3e (24.4 mg) 经硅胶柱色谱分离, PE-EtOAc (4 : 1) 等度洗脱得到化合物 **1** (5.1 mg)。GW2Ge5d (169.0 mg) 经

Sephadex LH-20 (MeOH) 分离得化合物 **2** (22.6 mg)。

采用 200 ~ 300 目柱色谱硅胶, 以比例为 25 : 1 ~ 0 : 1 的 CH_2Cl_2 -MeOH 流动相对 GW2H (2.0 g) 馏分进行分离纯化, 得到馏分 GW2Ha ~ GW2Hk。其中, 经过 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离, CH_2Cl_2 -MeOH = 2 : 1 等度洗脱的 GW2Hf (250.0 mg) 馏分被分离纯化为 8 个子馏分, 即 GW2Hf1 ~ GW2Hf8。其中 GW2Hf7 (10.93 mg) 经制备薄层色谱 (CH_2Cl_2 -MeOH = 400 : 11) 分离得到 4 个馏分 (GW2Hf7a ~ GW2Hf7d)。GW2Hf7b 经半制备液相 (MeOH- H_2O = 40 : 60, 3.0 mL · min⁻¹) 纯化, 在 16 min 得到化合物 **14** (0.8 mg)。

使用 200 ~ 300 目柱色谱硅胶对馏分 GW2I (1.9 g) 进行分离纯化, 经流动相 CH_2Cl_2 -MeOH (60 : 1 ~ 0 : 1) 梯度洗脱后, 最终得到了馏分 GW2Ia ~ GW2Io。经过 Sephadex LH-20 凝胶处理, MeOH 等度洗脱, GW2Ii (510.0 mg) 被分离纯化为 10 个子馏分 (GW2Ii1 ~ GW2Ii10)。其中 GW2Ii6 (10.1 mg) 经制备薄层色谱 (PE-EtOAc 1 : 1) 纯化得到化合物 **3** (3.45 mg)。

经硅胶柱色谱处理后, 馏分 GW2K (1.0 g) 被分为多个小馏分, 即采用流动相比比例为 20 : 1 : 1 ~ 0 : 0 : 1 的 CH_2Cl_2 -EtOAc-MeOH 溶剂体系梯度洗脱, 得到馏分 GW2Ka ~ GW2Kg。其中, GW2Ke (583.5 mg) 馏分通过使用 MeOH 洗脱, Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离, 纯化得到 3 个子馏分 (GW2Ke1 ~ GW2Ke3)。其中 GW2Ke3 (514.1 mg) 经硅胶柱色谱分离, CH_2Cl_2 -MeOH (23 : 1) 等度洗脱, 纯化得到化合物 **7** (452.6 mg)。

馏分 GW2L (18.3 g) 采用 200 ~ 300 目柱色谱硅胶, CH_2Cl_2 -MeOH = 19 : 1 等度洗脱, 得到馏分 GW2La ~ GW2Lc。GW2Lb (13.3 g) 经硅胶柱色谱分离, PE-EtOAc (3 : 2 ~ 0 : 1) 梯度洗脱得到 8 个子馏分 (GW2Lb1 ~ GW2Lb8)。GW2Lb6 (1.8 g) 采用正相硅胶柱色谱法分离, 使用 CH_2Cl_2 -MeOH (80 : 1 ~ 0 : 1) 流动相梯度洗脱, 得到馏分 GW2Lb6a ~ GW2Lb6c。其中 GW2Lb6b (280.0 mg) 经 Sephadex LH-20 凝胶, 使用 CH_2Cl_2 -MeOH = 2 : 1 流动相纯化得到化合物 **13** (7.9 mg)。

馏分 GW2N (16.0 g) 经 200 ~ 300 目柱色谱硅胶和 PE-EtOAc-MeOH (3 : 1 : 0 ~ 0 : 0 : 1) 流动相梯度洗脱, 得到馏分 GW2Na ~ GW2Ki。其中, 经过 Sephadex LH-20 凝胶处理, CH_2Cl_2 -MeOH = 6 : 5 流动相洗脱, GW2Nb (130.9 mg) 被分离纯化为子馏分 GW2Nb1 ~ GW2Nb3。子馏分 GW2Nb2 (80.3 mg) 经制备薄层色谱 (PE-EtOAc-MeOH = 20 : 40 : 0.5) 分离纯化为馏分 GW2Nb2a 和馏分 GW2Nb2b。其中, 馏分

GW2Nb2a (20.0 mg) 经 Sephadex LH-20 (MeOH) 和制备薄层色谱 (PE-EtOAc-MeOH = 30 : 30 : 1) 纯化得到化合物 **5** (6.6 mg)。馏分 GW2Nb2b (31.7 mg) 经制备薄层色谱 (PE-EtOAc-MeOH = 20 : 30 : 1) 纯化得到化合物 **6** (13.3 mg)。此外, 经过 Sephadex LH-20 凝胶处理, MeOH 等度洗脱, 馏分 GW2Nc (1.0 g) 被进一步分离纯化化为子馏分 GW2Nc1 ~ GW2Nc12。其中 GW2Nc10 (50.0 mg) 经 Sephadex LH-20 (MeOH) 纯化得到化合物 **8** (13.2 mg)。GW2Ng (912.4 mg) 经 ODS 柱色谱分离, MeOH-H₂O (50 : 50 ~ 100 : 0) 梯度洗脱, 得到 11 个馏分 (GW2Ng1 ~ GW2Ng11), 其中 GW2Ng3 (200.1 mg) 经 Sephadex LH-20 (MeOH) 分离得到 3 个小馏分 (GW2Ng3a ~ GW2Ng3c), GW2Ng3b (15.7 mg) 经半制备液相 (MeOH-H₂O = 45 : 55, 3.0 mL · min⁻¹) 纯化, 分别在 16 min 和 20 min 得到化合物 **9** (5.35 mg) 和化合物 **10** (3.05 mg)。GW2Nh (2.5 g) 依次经 EtOAc 和 MeOH 冲洗过滤, 得到 EtOAc 层 (GW2Nh1) 和 MeOH 层 (GW2Nh2), 其中 GW2Nh2 (980.0 mg) 经 ODS 柱色谱分离, MeOH-H₂O (50 : 50 ~ 100 : 0) 纯化得到化合物 **11** (43.4 mg)。

馏分 GW2O (6.3 g) 经甲醇冲洗过滤, 得到滤液 (GW2Oa) 和沉淀 (GW2Ob), 其中 GW2Ob (2.3 g) 经甲醇加热溶解, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 4 °C 冰箱放置 48 h, 重结晶纯化得到化合物 **12** (2.0 g)。

2.2 体外抗氧化活性研究

2.2.1 DPPH 自由基清除活性

将化合物用甲醇依次稀释成质量浓度为 500、250、125、62.5、0.03125、15.625、7.8125、3.9063 μg · mL⁻¹ 的溶液。参考文献报道方法^[26-27]并稍做调整, 以无水乙醇为溶剂, 将 DPPH 配制成浓度为 200 μmol · L⁻¹ 的溶液。将实验分为 3 组, 分别为阴性对照组 (40 μL 甲醇 + 160 μL DPPH)、样品组 (40 μL 样品 + 160 μL DPPH)、样品对照组 (40 μL 样品 + 160 μL 甲醇), 依次加入 96 孔板中。在室温避光黑暗处放置处理 30 min, 使用酶标仪在 517 nm 波长下测定每一个孔的吸光度 (*A*), 以维生素 C 为阳性对照, 平行独立重复此操作 3 次, 计算 DPPH 自由基清除率, 得到半数抑制浓度 (*IC*₅₀) 值。

2.2.2 ABTS⁺ 自由基清除活性

取“2.2.1”项下配制好的样品溶液。参考文献报道方法^[28]并稍作调整, 以 PBS 为溶剂, 将 ABTS 配制成浓度为 7.4 mmol · L⁻¹ 的溶液, 将过硫酸钾配制成浓度为 2.6 mmol · L⁻¹ 的溶液。将两种溶液等体积混合, 放在 4 °C 冰箱暗处理 12 h, 得到 ABTS⁺ 储备液。用 PBS 将 ABTS⁺ 储备液稀释至吸光度为 0.7 ± 0.02 的 ABTS⁺ 工作液。将实验分为 3 组, 分别为阴性对照组 (20 μL 甲醇 + 180 μL ABTS⁺)、样品组 (20 μL

样品 + 180 μL ABTS⁺)、样品对照组 (20 μL 样品 + 180 μL PBS), 依次加入 96 孔板中。在室温避光黑暗处放置处理 5 min, 使用酶标仪在 734 nm 波长下测定每一个孔的吸光度 (*A*), 以维生素 C 为阳性对照, 平行独立重复此操作 3 次, 计算 ABTS⁺ 自由基清除率, 得到 *IC*₅₀ 值。

3 结果

3.1 结构鉴定 (结构见图 1)

化合物 **1**: 白色粉末; ESI-MS: *m/z* 169.0 [*M* + *H*]⁺。¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ: 7.55 (2H, m, overlapped, H-2, 6), 6.83 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-5), 3.89 (3H, s, 3-OMe); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ: 170.1 (C-7), 152.7 (C-3), 148.7 (C-4), 125.3 (C-6), 123.2 (C-1), 115.8 (C-5), 113.8 (C-2), 56.4 (3-OMe)。上述数据均与文献^[29]所述相一致, 因此可以确认化合物 **1** 为香草酸 (vanillic acid)。

化合物 **2**: 白色粉末; ESI-MS: *m/z* 165.1 [*M* + *H*]⁺。¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ: 7.60 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-8), 7.44 (2H, dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz, H-2, 6), 6.81 (2H, dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz, H-3, 5), 6.28 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H-7); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ: 171.1 (C-9), 161.1 (C-4), 146.6 (C-7), 131.1 (C-2, 6), 127.2 (C-1), 116.8 (C-3, 5), 115.6 (C-8)。上述数据均符合文献^[30]中所述, 可以确认化合物 **2** 为对香豆酸 (*p*-coumaric acid)。

化合物 **3**: 白色粉末; ESI-MS: *m/z* 153.0 [*M* - *H*]⁺。¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ: 7.25 (1H, d, *J* = 3.1 Hz, H-6), 6.95 (1H, dd, *J* = 8.9, 3.1 Hz, H-4), 6.77 (1H, d, *J* = 8.9 Hz, H-3); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ: 173.4 (C-7), 156.5 (C-2), 150.5 (C-5), 124.7 (C-4), 118.7 (C-3), 116.0 (C-6), 113.8 (C-1)。以上结果均与文献中所描述的数据^[31]相一致, 确定化合物 **3** 为 2, 5-二羟基苯甲酸 (2, 5-dihydroxybenzoic acid)。

化合物 **4**: 白色粉末; ESI-MS: *m/z* 137.0 [*M* - *H*]⁺。¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ: 7.88 (2H, d, *J* = 8.3 Hz, H-2, 6), 6.82 (2H, d, *J* = 8.3 Hz, H-3, 5); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ: 170.2 (C-7), 163.3 (C-4), 133.0 (C-2, 6), 122.7 (C-1), 116.0 (C-3, 5)。以上结果均与文献中所描述的数据^[29]相一致, 确定化合物 **4** 为对羟基苯甲酸 (*p*-hydroxybenzoic acid)。

化合物 **5**: 白色粉末; ESI-MS: *m/z* 199.1 [*M* + *H*]⁺。¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ: 7.04 (2H, s, H-2, 6), 4.27 (2H, q, *J* = 7.1 Hz, H-8), 1.34 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, H-9); ¹³C NMR (CD₃OD,

150 MHz) δ : 168.6 (C-7), 146.5 (C-3, 5), 139.7 (C-4), 121.8 (C-1), 110.0 (C-2, 6), 61.7 (C-8), 14.6 (C-9)。上述数据均与文献报道相符合^[32], 确定化合物 5 为没食子酸乙酯 (gallic acid ethyl ester)。

化合物 6: 白色粉末; ESI-MS: m/z 153.0 [M-H]⁺。¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.44 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2), 7.43 (1H, dd, J = 8.1, 2.0 Hz, H-6), 6.80 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-5); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 170.3 (C-7), 151.5 (C-4), 146.0 (C-3), 123.9 (C-6), 123.1 (C-1), 117.7 (C-2), 115.8 (C-5)。上述数据符合文献中的描述^[33], 因此确定化合物 6 为原儿茶酸 (protocatechuic acid)。

化合物 7: 白色粉末; ESI-MS: m/z 193.0 [M + Na]⁺。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.06 (2H, s, H-3, 4, 6, 7), 4.25 (4H, m, H₂-1', 1''), 1.72 (2H, m, H-2', 2''), 1.49 ~ 1.27 (16H, m, H₂-3', 3'', 4', 4'', 5', 5'', 7', 7''), 0.94 (6H, t, J = 7.5 Hz, H₃-8', 8''), 0.89 (6H, t, J = 6.9 Hz, H₃-6', 6''); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 170.4 (C-7), 146.5 (C-3, 5), 139.6 (C-4), 122.0 (C-1), 110.3 (C-2, 6)。上述数据均符合文献中的报道^[34], 确定化合物 7 为没食子酸 (gallic acid)。

化合物 8: 黄色粉末; ESI-MS: m/z 303.0 [M + H]⁺。¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.74 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-2'), 7.64 (1H, dd, J = 8.4, 2.1 Hz, H-6), 6.88 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5'), 6.39 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.18 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 177.4 (C-4), 165.8 (C-7), 162.5 (C-5), 158.3 (C-9), 148.8 (C-2), 148.0 (C-4'), 146.3 (C-3'), 137.3 (C-3), 124.2 (C-1'), 121.7 (C-6'), 116.2 (C-2'), 116.0 (C-5'), 104.5 (C-10), 99.3 (C-6), 94.4 (C-8)。上述数据都符合文献报道^[35], 确定鉴定化合物 8 为槲皮素 (quercetin)。

化合物 9: 黄色粉末; ESI-MS: m/z 457.1 [M + Na]⁺。¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.74 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-2'), 7.58 (1H, dd, J = 8.5, 2.1 Hz, H-6'), 6.87 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5'), 6.37 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.19 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 5.15 (1H, d, J = 6.6 Hz, H-1''), 3.90 (1H, dd, J = 8.4, 6.5 Hz, H-2''), 3.83 (1H, overlapped, H-4''), 3.81 (1H, br s, overlapped, H-5''), 3.64 (1H, dd, J = 8.4, 3.0 Hz, H-3''), 3.45 (1H, dd, J = 13.5, 3.0 Hz, H-5''); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 179.4

(C-4), 167.0 (C-7), 163.0 (C-5), 158.6 (C-9), 158.5 (C-2), 150.0 (C-4'), 146.0 (C-3'), 135.6 (C-3), 123.0 (C-5'), 122.9 (C-1'), 117.4 (C-2'), 116.2 (C-6'), 105.4 (C-10), 104.7 (C-1''), 100.18 (C-6), 94.9 (C-8), 74.2 (C-3''), 72.9 (C-2''), 69.2 (C-4''), 67.0 (C-5'')。上述数据与文献报道相符^[36], 确认化合物 9 为槲皮素-3-*O*- α -L-阿拉伯糖苷 (quercetin-3-*O*- α -L-arabinopyranoside)。

化合物 10: 黄色粉末; ESI-MS: m/z 449.1 [M + H]⁺。¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ : 7.33 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-2'), 7.30 (1H, dd, J = 8.3, 2.1 Hz, H-6'), 6.91 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-5'), 6.35 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-8), 6.18 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-6), 5.35 (1H, d, J = 1.6 Hz, H-1''), 4.22 (1H, m, H-2''), 3.75 (1H, d, J = 6.4 Hz, H-3''), 3.42 (1H, m, H-5''), 3.35 (1H, d, J = 9.8 Hz, H-4''), 0.94 (3H, d, J = 6.2 Hz, H-6''); ¹³C NMR (CD₃OD, 150 MHz) δ : 179.5 (C-4), 167.0 (C-7), 163.2 (C-5), 159.2 (C-4'), 158.6 (C-9), 149.9 (C-2), 146.5 (C-3'), 136.2 (C-3), 123.0 (C-1'), 122.8 (C-6'), 116.9 (C-2'), 116.4 (C-5'), 105.6 (C-10), 103.5 (C-1''), 100.2 (C-6), 94.9 (C-8), 73.3 (C-4''), 72.1 (C-3''), 72.0 (C-5''), 71.9 (C-2''), 17.6 (C-6'')。上述数据得到文献^[37]支持, 以确定化合物 10 为槲皮素-3-*O*- α -L-鼠李糖苷 (quercetin 3-*O*- α -L-rhamnopyranoside)。

化合物 11: 黄色粉末; ESI-MS: m/z 615.1 [M-H]⁺。¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.78 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-2'), 7.56 (dd, J = 8.5, 2.2 Hz, 1H, H-6'), 6.89 (s, 2H, H-2''', 6'''), 6.82 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5'), 6.37 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-8), 6.18 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-6), 5.11 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-1''), 3.85 (1H, dd, J = 9.7, 7.8 Hz, H-2''), 3.88 (1H, br d, J = 3.5 Hz, H-4''), 3.80 (1H, br t, J = 6.5 Hz, H-5''), 3.59 (1H, dd, J = 9.7, 3.5 Hz, H-3''), 4.32 (1H, dd, J = 11.1, 7.0 Hz, H-6''), 4.21 (1H, dd, J = 11.1, 6.0 Hz, H-6''); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 179.5 (C-4), 168.0 (6''-C = O), 166.1 (C-7), 166.1 (C-7), 158.9 (C-2), 158.4 (C-9), 150.0 (C-4'), 146.3 (C-3''', 5'''), 145.8 (C-3'), 139.8 (C-4'''), 135.7 (C-3), 123.0 (C-6'), 122.8 (C-1'), 121.1 (C-1'''), 117.7 (C-2'), 116.1 (C-5'), 110.1 (C-2''', 6'''), 105.5 (C-1''), 105.5 (C-10), 100.0 (C-6), 94.9 (C-8), 75.0 (C-3''), 74.5 (C-5''), 73.1 (C-2''), 70.1 (C-4''), 63.8 (C-6'')。上述数据与文献^[38]中所述

相一致, 确定化合物 **11** 为槲皮素-3-*O*-(6"-没食子酰基)- β -D-半乳糖苷 [quercetin-3-*O*-(6"-galloyl)- β -D-galactopyranoside]。

化合物 **12**: 黄色粉末; ESI-MS: m/z 463.1 [$M-H$]⁺。¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 7.84 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2'), 7.59 (1H, dd, $J = 8.5, 2.2$ Hz, H-6'), 6.86 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.39 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.20 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 5.16 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1"), 3.88 ~ 3.49 (6H, m, H-Gal-); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 179.6 (C-4), 166.1 (C-7), 163.0 (C-5), 158.8 (C-9), 158.5 (C-2), 150.0 (C-4'), 145.8 (C-3'), 135.8 (C-3), 122.9 (C-1'), 122.9 (C-6'), 117.8 (C-5'), 116.1 (C-2'), 105.6 (C-10), 105.4 (C-1"), 99.9 (C-6), 94.7 (C-8), 77.2 (C-5"), 75.1 (C-3"), 73.2 (C-2"), 70.0 (C-4"), 61.9 (C-6")。上述数据和已知的文献^[39]报道数据相符, 因此确定化合物 **12** 为金丝桃苷 (hyperoside)。

化合物 **13**: 白色粉末; ESI-MS: m/z 303.1 [$M + Na$]⁺。¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 8.10 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-4), 6.46 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-5), 5.79 (1H, s, H-2), 3.94 (1H, dd, $J = 2.9, 7.6$ Hz, H-8'), 3.67 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-8'), 2.81 (1H, d, $J = 17.9$ Hz, H-3'), 2.71 (1H, dd, $J = 2.9, 18.0$ Hz, H-5'), 2.47 (1H, dd, $J = 2.6, 17.9$ Hz, H-3'), 2.39 (1H, dd, $J = 2.6, 18.0$ Hz, H-5'), 2.07 (3H, d, $J = 1.4$ Hz, 6-CH₃), 1.22 (3H, s, 7'-CH₃), 1.01 (3H, s, 9'-CH₃); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 210.9 (C-4'), 150.3 (C-3), 133.2 (C-5), 133.0 (C-4), 120.7 (C-2), 87.8 (C-2'), 83.0 (C-1'), 78.6 (C-8'), 54.0 (C-3'), 53.2 (C-5'), 49.6 (C-6'), 21.1 (6-CH₃), 19.4 (7'-CH₃), 15.8 (9'-CH₃)。上述数据和参考文献^[40]中报道的数据相符, 因此确定化合物 **13** 为红花菜豆酸 (phaseic acid)。

化合物 **14**: 白色粉末; ESI-MS m/z : 146.1 [$M + H$]⁺。¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 9.88 (1H, s, CHO), 8.16 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-4), 8.10 (1H, s, H-2), 7.48 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-7), 7.30 ~ 7.22 (2H, m, H-5, 6); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 187.5 (CHO), 139.8 (C-2), 138.9 (C-8), 125.7 (C-9), 125.0 (C-6), 123.6 (C-5), 122.4 (C-4), 120.1 (C-3), 113.2 (C-7)。通过与文献^[41]数据比对, 确认化合物 **14** 为吲哚醛 (indole-3-carboxaldehyde)。

化合物 **15**: 白色粉末; ESI-MS: m/z 413.4 [$M + H$]⁺。¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 5.71 (1H, s, H-4), 1.23 (3H, s, H-19), 0.96 (3H, d, $J =$

6.6 Hz, H-21), 0.77 (3H, s, H-18), 0.89 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H-29), 0.86 (3H, overlapped, H-26), 0.84 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-27); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ : 202.3 (C-3), 175.3 (C-5), 124.1 (C-4), 57.4 (C-17), 57.3 (C-14), 55.4 (C-9), 47.3 (C-24), 43.6 (C-13), 41.0 (C-12), 40.0 (C-10), 37.4 (C-20), 36.9 (C-8), 36.8 (C-1), 35.1 (C-22), 34.7 (C-2), 34.0 (C-6), 33.4 (C-7), 30.4 (C-25), 29.3 (C-16), 27.2 (C-23), 25.2 (C-15), 24.2 (C-28), 22.1 (C-11), 20.2 (C-26), 19.4 (C-27), 19.3 (C-21), 17.7 (C-19), 12.4 (C-18), 12.4 (C-29)。数据与我们参考文献^[42]中所述数据相符, 因此确认化合物 **15** 为甾甾-4-烯-3-酮 (stigmast-4-en-3-one)。

化合物 **16**: 白色粉末; ESI-MS: m/z 413.3 [$M-H$]⁺。¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 5.37 ~ 5.33 (1H, m, H-6), 3.56 ~ 3.48 (1H, m, H-3), 1.01 (3H, s, H-19), 0.93 ~ 0.91 (3H, m, H-21), 0.87 ~ 0.78 (9H, m, H-26, 27, 29), 0.68 (3H, s, H-18); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 140.9 (C-5), 121.9 (C-6), 72.0 (C-3), 56.9 (C-14), 56.2 (C-17), 50.3 (C-9), 46.0 (C-24), 42.5 (C-4), 42.5 (C-13), 39.9 (C-12), 37.4 (C-1), 36.7 (C-10), 36.3 (C-20), 34.1 (C-7), 32.1 (C-8), 32.1 (C-22), 31.8 (C-25), 29.3 (C-16), 28.4 (C-23), 26.2 (C-2), 24.5 (C-15), 23.2 (C-28), 21.2 (C-11), 20.0 (C-27), 19.6 (C-18), 19.2 (C-29), 18.9 (C-21), 12.1 (C-26), 12.0 (C-19)。数据与所参考文献^[43-44]报道相符, 因此确定化合物 **16** 为 β -甾甾醇 (β -sitosterol)。

化合物 **17**: 白色晶体 (氯仿); ESI-MS: m/z 257.4 [$M + H$]⁺。¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 2.35 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-2), 1.63 (2H, m, H-3), 1.21 ~ 1.34 (24H, m, 12 $\times$ CH₂, H-4 ~ 15), 0.88 (3H, t, $J = 6.9$ Hz, H-16); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 180.2 (C-1), 34.2 (C-2), 32.1 (C-3), 29.8 ~ 29.2 (C-4 ~ 13), 24.8 (C-14), 22.8 (C-15), 14.3 (C-16)。数据结果都与文献研究^[45]所相符, 因此确定化合物 **17** 为棕榈酸 (palmitic acid)。

化合物 **18**: 黄色油状物; ESI-MS: m/z 391.3 [$M + H$]⁺。¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 8.09 (4H, s, H-3, 4, 6, 7), 4.25 (4H, m, H₂-1', 1"), 1.72 (2H, m, H-2', 2"), 1.49 ~ 1.27 (16H, m, H₂-3', 3", 4', 4", 5', 5", 7', 7"), 0.94 (6H, t, $J = 7.5$ Hz, H₃-8', 8"), 0.89 (6H, t, $J = 6.9$ Hz, H₃-6', 6"); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ : 166.0 (C-1, 8), 134.3 (C-2, 5), 129.6 (C-3, 4, 6, 7), 67.8 (C-1',

1"), 39.0 (C-2', 2"), 30.7 (C-3', 3"), 29.1 (C-4', 4"), 24.1 (C-7', 7"), 23.1 (C-5', 5"), 14.1 (C-6', 6"), 11.2 (C-8', 8"). 数据与文献^[46]中所述的结果

基本一致, 因此确定化合物 **18** 为对苯二甲酸 (2-乙基己酯) 己酯 [bis-(2-ethylhexyl) terephthalate]。

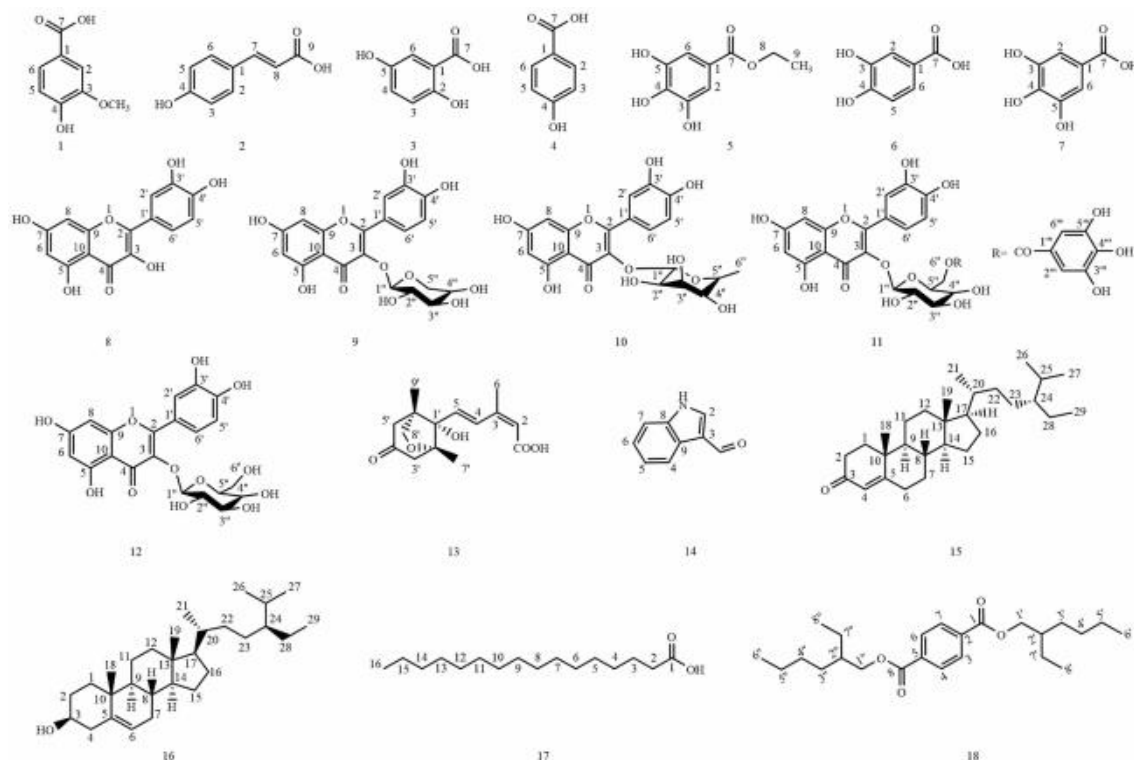


图1 化合物 1 ~ 18 的结构

Fig 1 Chemical structures of compounds 1 ~ 18

3.2 化合物体外抗氧化活性结果

单体化合物清除 DPPH 自由基的能力见表 1 和图 2。化合物 **13**、**14**、**15**、**16**、**17**、**18** 在 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度下清除率低于 50%，对 DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自由基几乎无清除能力。以维生素 C 为阳性对照，维生素 C 清除 DPPH 自由基的 IC_{50} 为 $(25.66 \pm 0.10) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，清除 ABTS⁺ 自由基的 IC_{50} 为 (22.03 ± 0.39)

$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。其中，化合物 **3**、**5**、**7**、**8** 对 DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自由基均具有较强的抗氧化活性，且抗氧化活性强于维生素 C。化合物 **7** 为抗氧化活性最强的单体化合物，清除 DPPH 自由基的 IC_{50} 为 $(10.88 \pm 0.07) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，清除 ABTS⁺ 自由基的 IC_{50} 为 $(4.81 \pm 0.07) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

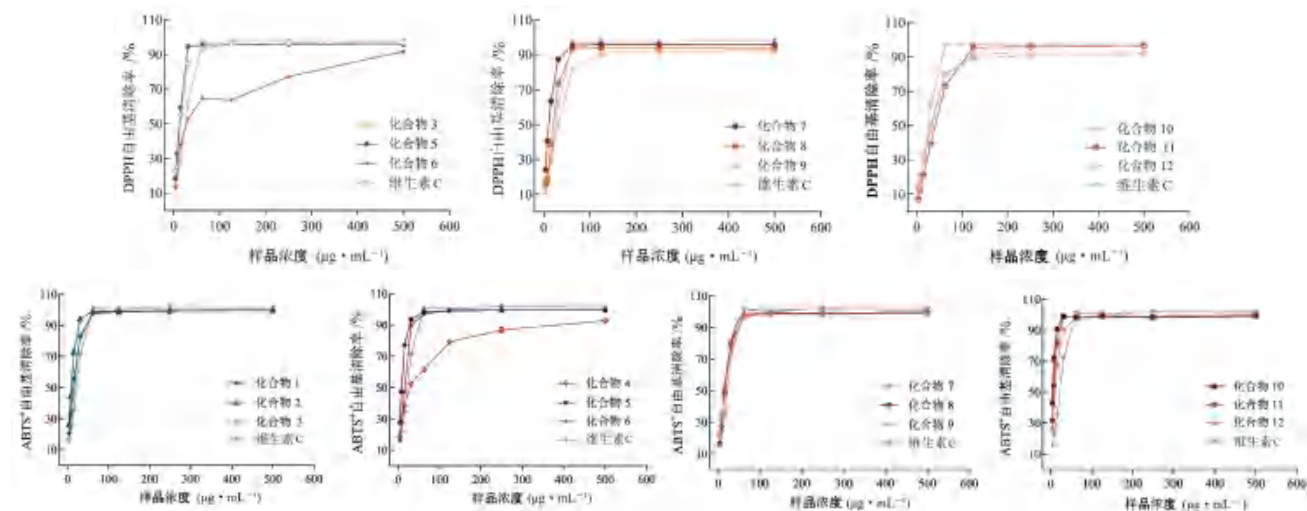


图2 不同浓度样品对 DPPH 和 ABTS⁺ 的清除率

Fig 2 Effect of samples at different concentrations on DPPH and ABTS⁺ radical scavenging activity

表 1 化合物 1 ~ 18 对 DPPH 和 ABTS⁺自由基的清除能力
($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

 Tab 1 Scavenging ability of compounds 1 ~ 18 on DPPH and ABTS⁺ radicals ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

化合物	DPPH 自由基清除率 $IC_{50}/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	ABTS ⁺ 自由基清除率 $IC_{50}/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$
化合物 1	> 100	13.70 ± 0.37
化合物 2	> 100	9.2 ± 0.34
化合物 3	14.68 ± 0.59	16.93 ± 0.26
化合物 4	> 100	30.27 ± 1.20
化合物 5	12.85 ± 0.11	8.44 ± 0.10
化合物 6	32.31 ± 0.04	16.18 ± 0.25
化合物 7	10.88 ± 0.07	4.81 ± 0.07
化合物 8	19.74 ± 0.15	7.28 ± 0.26
化合物 9	30.13 ± 0.15	10.31 ± 0.67
化合物 10	28.53 ± 0.14	16.92 ± 1.24
化合物 11	38.7 ± 0.23	16.32 ± 0.15
化合物 12	31.14 ± 0.46	14.36 ± 0.40
化合物 13	> 100	> 100
化合物 14	> 100	> 100
化合物 15	> 100	> 100
化合物 16	> 100	> 100
化合物 17	> 100	> 100
化合物 18	> 100	> 100
维生素 C	25.66 ± 0.10	22.03 ± 0.39

4 讨论与结论

本研究采用 60% 乙醇对干燥老鹳草的地上部分进行提取, 并依次用石油醚和乙酸乙酯有机溶剂萃取分段, 最后再进一步对中等极性的乙酸乙酯部位进行分离纯化, 得到 18 个化合物。化合物 14 为首次从牻牛儿苗科植物中分离得到, 化合物 13、15、18 为首次从老鹳草属分离得到, 化合物 1、2、3、9、10 为首次从老鹳草中分离得到。其中, 化合物 1 ~ 7 为酚酸, 化合物 8 为黄酮, 化合物 9 ~ 12 为黄酮苷, 化合物 13 为倍半萜, 化合物 14 为生物碱, 化合物 15 ~ 16 为甾体, 化合物 17 为脂肪酸, 化合物 18 为酯类。

对分离得到的单体化合物进行抗氧化活性测试, 实验结果显示化合物 3、5、7、8 对 DPPH 自由基和 ABTS⁺自由基均表现出良好的清除活性。其中, 化合物 7 在 18 个单体化合物中的自由基清除活性最强, 对 DPPH 自由基和 ABTS⁺自由基的清除率均显著强于阳性对照维生素 C。对具有抗氧化活性的化合物进行结构分析, 酚酸类化合物的抗氧化活性与酚羟基的个数及取代位置密切相关。其中, 对 DPPH 自由基来说, 酚羟基个数对抗氧化活性的影响大于酚羟基取代位置对抗氧化活性的影响。酚羟基个数越多, 抗氧化活性越强, 如具有 3 个酚羟基的化合物 5、7, 其 DPPH 自由基清除能力均强于具有 2 个酚羟基的化合物 3、6, 而化合物 3、6 的 DPPH 自由基清除能力则强于具有 1 个酚羟基的化

合物 1、2。酚羟基个数相同时, 2 个酚羟基处于对位时的抗氧化活性强于 2 个酚羟基处于邻位时的抗氧化活性, 如抗氧化活性化合物 3 > 化合物 6。对于 ABTS⁺自由基来说, 在酚羟基个数低于 3 时, 酚羟基取代位置对抗氧化活性的影响要大于酚羟基个数对抗氧化活性的影响, 如当酚羟基个数为 3 时, 化合物抗氧化活性与 DPPH 自由基清除实验结果一致, 当酚羟基个数 ≤ 2 时, 化合物 1、2 的抗氧化活性强于化合物 3、6, 且其抗氧化活性顺序刚好与 DPPH 自由基清除实验结果相反。这可能与 DPPH 自由基和 ABTS⁺自由基对特定结构敏感度不同所致。黄酮类化合物, DPPH 清除能力顺序为化合物 8 > 化合物 10 > 化合物 9 > 化合物 12 > 化合物 11, ABTS⁺清除能力顺序为化合物 8 > 化合物 9 > 化合物 12 > 化合物 11 > 化合物 10, 除化合物 10 外, 其抗氧化活性趋势一致, 由该结果可知, 黄酮苷元抗氧化活性均强于黄酮苷, 可能是苷元连接糖后既减少了酚羟基的个数, 又增加了化合物的空间位阻, 阻碍了化合物与自由基反应, 进而影响其抗氧化活性。化合物 13 ~ 18 分别类属于倍半萜、生物碱、甾体、脂肪酸、酯类, 其均不含有酚性羟基, 且 IC_{50} 值均大于 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 几乎没有 DPPH 自由基和 ABTS⁺自由基清除能力。综上所述, 由老鹳草中分离得到的 18 个化合物的抗氧化活性实验结果可知, 化合物抗氧化活性与酚羟基个数、酚羟基取代位置、化合物空间位阻、自由基种类等密切相关。总之, 以上结果丰富和补充了老鹳草非鞣质多糖类的化学成分及抗氧化活性, 为进一步阐明抗氧化剂与癌症间的联系, 开发利用老鹳草的药用价值, 研发老鹳草相关抗衰老产品提供参考。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 733.
- [2] 程小伟, 马养民, 康永祥, 等. 老鹳草化学成分研究[J]. 中药新药与临床药理, 2013, 24(4): 390-392.
- [3] 梁政亭, 杨明翰, 兰卫. 复方老鹳草颗粒制备工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2024, 35(4): 864-868.
- [4] 赵幻希. 基于转录组学与代谢组学研究老鹳草对高尿酸血症大鼠的治疗作用[D]. 吉林: 长春中医药大学, 2024.
- [5] 邢燕如, 张瑾宜. 老鹳草在儿科临床运用验案三则[J]. 浙江中医杂志, 2013, 48(6): 454.
- [6] 韩明, 蔺志铎, 薛福玲, 等. 三种中草药抗氧化性研究[J]. 光谱实验室, 2009, 26(6): 1480-1484.
- [7] 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.
- [8] 李祎, 刘利民, 李超, 等. 老鹳草提取物抗胃溃疡作用实验研究[J]. 南京中医药大学学报, 2016, 32(1): 54-57.
- [9] 丁云录, 柳怀玉, 李庆杰, 等. 老鹳草提取物对小鼠免疫性肝损伤的保护作用[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(16):

- 1554-1557.
- [10] 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.
 - [11] 苑振亭, 程丽萍, 王金辉. 老鹳草有效部位提取物的体外抑菌作用研究[A].《中国成人医药教育论坛》[C]. 陕西: 中国医药教育协会成人教育委员会, 2012: 223.
 - [12] 彭彩亮, 崔璇, 蒋宁, 等. 老鹳草素对大鼠心肌缺血再灌注损伤的作用及其机制[J]. 吉林中医药, 2023, 43 (9): 1063-1067.
 - [13] 王静, 李雪, 朱庆林, 等. 老鹳草素对 LPS 诱导的小鼠急性肺损伤的影响及机制研究[J]. 陆军军医大学学报, 2022, 44 (22): 2300-2306.
 - [14] 庞月文, 巩会杰, 王玲, 等. 老鹳草素对去势抵抗性前列腺癌细胞增殖与迁移能力的影响[J]. 昆明医科大学学报, 2019, 40 (8): 22-27.
 - [15] 孙仁爽, 赵敏婧, 顾地周. 老鹳草及其不同溶剂萃取物的红外光谱分析与鉴定[J]. 中草药, 2023, 54 (13): 4329-4333.
 - [16] 孔楚楚, 柳志诚, 叶丹阳, 等. 老鹳草化学成分及抗肿瘤活性研究[J]. 中国现代中药, 2023, 25 (6): 1187-1193.
 - [17] 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.
 - [18] 赵锐, 郭安军, 李新路, 等. 老鹳草的化学成分研究[J]. 中国现代中药, 2018, 20 (3): 262-264, 277.
 - [19] 李琳波, 杨金玲, 肖月星, 等. 青岛老鹳草挥发油成分研究[J]. 中药材, 1998, 21 (12): 616-618.
 - [20] Aayadi H, Mittal SPK, Deshpande A, et al. Cytoprotective effect exerted by geraniin in HepG2 cells is through microRNA mediated regulation of BACH-1 and HO-1 [J]. BMB Rep, 2017, 50 (11): 560-565.
 - [21] Kim JH, Kim YS, Choi JG, et al. Kaempferol and its glycoside, kaempferol 7-O-rhamnoside, inhibit PD-1/PD-L1 interaction in vitro [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21 (9): 3239.
 - [22] Zhang H, Li Z, Li CQ, et al. Antiviral effect of polyphenolic substances in *Geranium wilfordii* Maxim. against HSV-2 infection using in vitro and in silico approaches [J]. J Evidence-Based Complementary Altern Med, 2022, 19 (1): 7953728.
 - [23] Shahrajabian MH, Sun W, Cheng Q. The importance of flavonoids and phytochemicals of medicinal plants with antiviral activities [J]. Mini-Rev Org Chem, 2022, 19 (3): 293-318.
 - [24] Sohretoglu D, Sari S, Barut B, et al. Discovery of potent α -glucosidase inhibitor flavonols: insights into mechanism of action through inhibition kinetics and docking simulations [J]. Bioorg Chem, 2018, 79 (9): 257-264.
 - [25] 孔楚楚. 老鹳草中化学成分的分离、活性及机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2023.
 - [26] 朱敏, 王维玉, 陈文娇, 等. 壮药多裂黄檀化学成分及体外抗氧化活性研究[J]. 中药材, 2024, 47 (5): 1147-1152.
 - [27] 陈鑫, 李蓉涛, 曾建国. 盐肤木叶中化学成分及抗氧化活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2024, 36 (5): 755-761, 786.
 - [28] 包黎明, 李淑艳, 包晓华, 等. 蓝盆花提取物化学成分及其抗氧化活性研究[J]. 中成药, 2022, 44 (8): 2710-2714.
 - [29] 王暉, 杨崇仁, 张颖君. 草果果实中的酚性成分[J]. 云南植物研究, 2009, 31 (3): 284-288.
 - [30] 杨辉, 侯爱君, 姜北, 等. 三台花中的一新奇化合物——Serratumin A [J]. 云南植物研究, 2000, 22 (1): 75-80.
 - [31] 娜黑芽, 张晓玲, 陈怡璇, 等. 药用沙棘果汁中 1 个新的黄酮苷类化合物[J]. 中草药, 2022, 53 (3): 659-666.
 - [32] 尚小雅, 李帅, 王映红, 等. 红绒毛羊蹄甲的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31 (23): 1953-1955.
 - [33] 郑威, 周长新, 张水利, 等. 毛茛化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31 (11): 892-894.
 - [34] Zhang Y, Dewitt DL, Murugesan S, et al. Novel lipid-peroxidation-and cyclooxygenase-inhibitory tannins from *picrorhiza kurroa* seeds [J]. Chem Biodivers, 2004, 1 (3): 426-441.
 - [35] 王学贵, 沈丽淘, 曾芸芸, 等. 珍珠莲中的黄酮类化学成分[J]. 中草药, 2010, 41 (4): 526-529.
 - [36] Yoshida T, Maruyama T, Nitta A, et al. Eucalbanins A, B and C, monomeric and dimeric hydrolyzable tannins from *eucalyptus alba* REINW [J]. Chem Pharm Bull, 1992, 40 (7): 1750-1754.
 - [37] Kim YK, Kim YS, Choi SU, et al. Isolation of flavonol rhamnosides from *loranthus tanakae* and cytotoxic effect of them on human tumor cell lines [J]. Arch Pharmacol Res, 2004, 27 (1): 44-47.
 - [38] Masuda T, Iritani K, Yonemori S, et al. Isolation and antioxidant activity of galloyl flavonol glycosides from the seashore plant, *pemphis acidula* [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2001, 65 (6): 1302-1309.
 - [39] 段绪红, 何培, 马宗敏, 等. 荷梗中的黄酮类化合物及其细胞毒性[J]. 中国中药杂志, 2014, 39 (22): 4360-4364.
 - [40] 魏伟, 范春林, 王贵阳, 等. 广王不留行的化学成分研究[J]. 中草药, 2014, 45 (5): 615-621.
 - [41] 晏永明, 董小萍, 李艳, 等. 彝药日本琵琶甲虫的化学成分及其细胞毒性[J]. 中草药, 2013, 44 (3): 269-271.
 - [42] 储玲玲, 周旭东, 吴嘉, 等. 七叶鬼灯檠的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2023, 48 (10): 2767-2780.
 - [43] 李国强, 李韵仪, 谭卓杰. β -谷甾醇的波谱结构解析[J]. 广东化工, 2018, 45 (10): 128, 116.
 - [44] 杨超, 王立抗, 田文月, 等. 莲心脂肪酸类成分研究[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39 (10): 35-37.
 - [45] 吴石丽, 张凡, 任嘉佳, 等. 山楝果实的化学成分研究[J]. 中草药, 2022, 53 (3): 671-677.
 - [46] Dissanayake AA, Wagner CM, Nair MG. Chemical characterization of lipophilic constituents in the skin of migratory adult sea lamprey from the great lakes region [J]. PLoS One, 2016, 11 (12): e0168609.

(收稿日期: 2024-08-10; 修回日期: 2024-10-20)

基于网络药理学和动物实验探讨锯叶棕 - 黄芩提取物对雄激素性脱发的作用机制

杨赛赛¹, 郑秀娟², 邓思瑶¹, 姜波¹, 代浩然¹, 张贵民², 王旭¹, 吴修红^{1*} (1. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040; 2. 乐泰药业(兰西)有限公司, 黑龙江 绥化 151500)

摘要: **目的** 基于网络药理学、分子对接及动物实验探讨锯叶棕 - 黄芩提取物对雄激素性脱发(AGA)的改善作用及机制。**方法** 通过网络药理学得到锯叶棕 - 黄芩提取物改善 AGA 的关键活性成分及潜在作用靶点和通路; 采用分子对接对关键活性成分和核心靶点进行验证。利用丙酸睾酮诱导建立 AGA 大鼠模型, 随机分为模型组, 阳性药组, 锯叶棕 - 黄芩提取物低、中、高剂量组(另设空白组), 每日涂抹相应药物, 连续 42 d。肉眼观察大鼠毛发新生速度和毛发质量, 游标卡尺测量大鼠新生毛发长度, HE 染色观察大鼠皮肤病理组织, ELISA 检测大鼠皮肤组织睾酮(T)、二氢睾酮(DHT)、雌二醇(E₂)、II 型 5 α -还原酶(SRD5A2)、转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)、血管内皮生长因子(VEGF)水平。**结果** 网络药理学分析表明锯叶棕 - 黄芩提取物改善 AGA 的潜在作用靶点共 26 个, 其核心靶点包括 AR、CYP19A1、IGF1R、MAPK1 等; 富集分析结果显示这些靶点可能通过类固醇的生物合成、MAPK 信号通路等改善 AGA; 分子对接显示 α -亚麻酸、棕榈油酸、亚油酸、圣草酚、红花素等核心成分与核心靶点具有较好的结合能力。动物实验结果证实锯叶棕 - 黄芩提取物能加快 AGA 模型大鼠毛发新生速度, 提高毛发质量, 增加毛发长度、毛囊长度和毛囊数量; 同时, 锯叶棕 - 黄芩提取物可提高 AGA 模型大鼠皮肤组织中 E₂、VEGF 水平, 降低 T、DHT、SRD5A2、TGF- β_1 水平。**结论** 锯叶棕 - 黄芩提取物能促进 AGA 模型大鼠的毛发生长并提高新生毛发质量, 其作用机制可能与调节激素以及与血管内皮细胞增殖分化凋亡相关生长因子的表达水平有关。

关键词: 锯叶棕 - 黄芩提取物; 雄激素性脱发; 网络药理学; 激素; 生长因子; 毛发再生

中图分类号: R285.5, R286 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)05-1335-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.024

Mechanism of saw palmetto-scutellaria baicalensis extract on androgenic alopecia based on network pharmacology and animal experiment

YANG Sai-sai¹, ZHENG Xiu-juan², DENG Si-yao¹, JIANG Bo¹, DAI Hao-ran¹, ZHANG Gui-min², WANG Xu¹, WU Xiu-hong^{1*} (1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040; 2. Letai Pharmaceutical (Lanxi) Co., Ltd., Suihua Heilongjiang 151500)

Abstract: Objective To determine the effect of saw palmetto-scutellaria baicalensis extract (SPSB) on androgenic alopecia (AGA) and related mechanism based on network pharmacology, molecular docking and animal experiment. **Methods** The key active components, potential targets and pathways of SPSB were predicted by network pharmacology. Molecular docking was used to verify the key active components and core targets. The AGA rat model was induced by testosterone propionate. The rats were randomly divided into a blank control group, a model group, a positive drug group, and a low-, a medium- and a high-dose group. Corresponding drugs were given daily for 42 days continuously. The hair growth rate and hair quality in the depilation area of rats were observed by eyes. The length of newborn hair in the rats was measured by vernier caliper. HE staining was used to observe the pathological tissue of

基金项目: 黑龙江省应用技术与开发计划 (No.GA19C113)。

作者简介: 杨赛赛, 女, 硕士研究生, 主要从事中药药效物质基础及质量评价研究, email: y1594797983@126.com *通信作者: 吴修红, 女, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药药效物质基础及质量评价研究, email: wxh8088@163.com

the rats. The levels of testosterone (T), dihydrotestosterone (DHT), estradiol (E_2), 5 α -reductase type 2 (SRD5A2), transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the rat skin tissue were detected by ELISA. **Results** Network pharmacology showed that SPSB had 26 potential targets for AGA, and its core targets included AR, CYP19A1, IGF1R, and MAPK1, etc. The enrichment analysis showed that these targets improved AGA by steroid hormone biosynthesis and MAPK signaling pathway. Molecular docking displayed good binding ability between linolenic acid, palmitoleic acid, linoleic acid, (+)-eriodictyol and carthamidin with the core targets. SPSB accelerated the hair growth rate, improved the hair quality, and increased the hair length, hair follicle length and the number of follicles in AGA rats. At the same time, SPSB can increase the levels of E_2 and VEGF in the skin tissue of AGA model rats, and decrease the levels of T, DHT, SRD5A2 and TGF- β_1 . **Conclusion** SPSB can promote hair growth and improve hair quality in AGA, whose mechanism may be related to regulating the expression levels of hormones and growth factors related to the proliferation, differentiation and apoptosis of vascular endothelial cells.

Key words: saw palmetto-scutellaria baicalensis extract; androgenetic alopecia; network pharmacology; hormone; growth factor; hair regeneration

雄激素性脱发 (androgenetic alopecia, AGA) 是临床上最常见的非瘢痕性脱发类疾病, 其特征是毛囊的不断微型化^[1]。我国男性患病率约为 21.3%, 女性患病率约为 6.0%, 并呈不断年轻化趋势^[2]。AGA 因其损容性的特征, 严重影响患者的身心健康, 亟需有效的治疗方法^[3]。当前的治疗手段尚存在诸多弊端, 如手术治疗价格昂贵, 外涂米诺地尔治疗初期会出现头发大量脱落现象^[4], 口服非那雄胺存在勃起功能障碍等潜在的不良反应^[5]。因此, 开发一种安全、有效的中药生发产品备受患者期待。

锯叶棕-黄芩提取物具有调节激素紊乱、改善微循环障碍、促进血液流动等作用^[6-7]。据此, 本实验采用网络药理学、分子对接及动物实验探究锯叶棕-黄芩提取物改善 AGA 的作用机制, 以期锯叶棕-黄芩提取物改善 AGA 的临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级健康且毛发正常的雄性 SD 大鼠 60 只, 体重 (200±20) g [黑龙江中医药大学实验动物中心, 动物生产许可证号: SYXK (黑) 2020-004]。动物饲养在清洁级实验室, 温度为 (23±3) °C, 相对湿度为 40%~70%, 保持 12 h 的光照/黑暗循环, 适应性饲养 5 d, 提供充足并可自由获取的食物和水。实验动物伦理批件号: 20220301。

1.2 试药

锯叶棕-黄芩提取物 (批号: 20220617)、供试药物基质溶液 (批号: 20220616) [乐泰药业 (兰西) 有限公司]; 米诺地尔搽剂 (5%) (山西振东安欣生物制药有限公司, 批号: 20220804);

丙酸睾酮注射液 (哈尔滨三马药业有限公司, 批号: 20220201); 花生油 (山东鲁花集团有限公司, 批号: LD20220804); 脱毛膏 [利洁时家化 (中国) 有限公司, 批号: 8315358]; 睾酮 (T)、雌二醇 (E_2)、血管内皮生长因子 (VEGF) 试剂盒 (R&D Systems 公司); 二氢睾酮 (DHT)、II 型 5 α -还原酶 (SRD5A2)、转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 试剂盒 (R&D Systems 公司)。

1.3 仪器

PEARL 组织病理脱水机、EG1150 组织病理包埋机、RM2016 组织病理切片机、BOND-III 组织切片染色机、ST5010-CV5030 组织病理封片机 (德国 LEICA 公司); Synergy 4 全自动酶标仪 (BioTek 公司); Avanti-JXN-26 高性能离心机 (Beckman Coulter 公司); MagNA Lyser 组织匀浆仪 (Roche 公司); S02 头皮毛囊检测仪 (深圳市合才人力科技有限公司); DL90150 数显游标卡尺 (宁波得力工具有限公司); JQS-01 理发器 (余姚市杰奇森塑料有限公司)。

2 方法

2.1 基于网络药理学和分子对接的锯叶棕-黄芩提取物改善 AGA 的机制预测

2.1.1 锯叶棕-黄芩提取物活性成分的收集与筛选 在 PubMed 和中国知网等数据库收集锯叶棕和黄芩的化学成分, 并通过 Swiss ADME 数据库筛选出其中具有类药性的成分, 作为锯叶棕-黄芩提取物的活性成分。

2.1.2 锯叶棕-黄芩提取物和 AGA 靶点的获取 将筛选得到的锯叶棕-黄芩活性成分的结构导入 SwissTargetPrediction 数据库, 以 probability ≥ 0.01 为条件筛选出活性成分的靶点。从 GeneCards 数据库和 OMIM 数据库中以 “androgenetic alopecia”

为关键词进行检索,收集 AGA 的相关靶点。分别汇总锯叶棕-黄芩活性成分和 AGA 疾病的相关靶点,并去除重复值。使用 Venny 2.1.0 将活性成分靶点与 AGA 疾病靶点取交集,得到锯叶棕-黄芩提取物改善 AGA 的潜在作用靶点。

2.1.3 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络的构建 将锯叶棕-黄芩提取物改善 AGA 的潜在作用靶点导入 STRING 数据库进行分析,剔除离散蛋白后得到蛋白网络互作信息。将信息导入 Cytoscape 3.8.0 软件构建 PPI 网络,并使用插件 cytoHubba 以 degree 值为筛选要求确定核心靶点。

2.1.4 基因本体(GO)功能及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 将潜在作用靶点导入 DAVID 数据库进行 GO 功能注释和 KEGG 通路分析,并利用微生信(<http://www.Bioinformatics.com.cn/>)对 Top10 的 GO 条目和 Top20 的 KEGG 通路结果进行可视化分析。

2.1.5 锯叶棕-黄芩提取物改善 AGA 的“药物-成分-靶点-通路-疾病”调控网络构建 整理潜在作用靶点信息、PPI 网络信息、GO 和 KEGG 富集分析信息,导入 Cytoscape 3.8.0 软件,构建锯叶棕-黄芩提取物改善 AGA 的“药物-成分-靶点-通路-疾病”调控网络。

2.1.6 分子对接验证 将“药物-成分-靶点-通路-疾病”网络中 degree 值排名前 5 的有效活性成分与 PPI 网络中排名前 15 位的核心靶点进行分子对接。从 PubChem 数据库中获得小分子的三维结构,从 PDB 数据库中获得核心靶点的蛋白晶体结构。使用 PyMol 2.4.0 软件对所有蛋白进行去水等预处理,采用 AutoDock Vina 1.1.2 软件进行分子对接,最后使用 PyMol 2.4.0 软件将对接结果进行可视化。

2.2 基于动物实验的锯叶棕-黄芩提取物改善 AGA 的作用研究

2.2.1 模型制备及给药 用理发器和脱毛膏剃除大鼠背部皮肤中心约 4 cm×6 cm 区域的毛发,作为脱毛观察区。脱毛大鼠随机分为空白组,模型组,阳性药组和锯叶棕-黄芩提取物低、中、高剂量组,每组 10 只。除空白组外,其余各组每日颈后皮下注射丙酸睾酮混悬液(采用花生油将丙酸睾酮注射液稀释至 5 mg·mL⁻¹),每日 1 次,连续 42 d,建立 AGA 大鼠模型。造模第 1 日即给予外用药物干预:空白组和模型组大鼠脱毛区域外涂供试药物基质溶液,每只 0.04 mL,每日 3 次;阳性药组外涂米诺地尔搽剂,每只 0.02 mL,每日 1 次;锯叶棕-黄芩提取物组外涂提取物,每只 0.04 mL(相当于锯叶棕原药材 12 mg,黄芩

原药材 10 mg),低剂量组每日 1 次,中剂量组每日 2 次、高剂量组每日 3 次。各组均连续给药 42 d,给药间隔为每次 4 h。

2.2.2 背部毛发特征观察 观察大鼠的毛发生长情况,于第 0、7、14、21、28、35、42 日拍摄背部大体照片及背部皮肤毛发镜照片。

2.2.3 新生毛发长度检测 实验期间,于第 0、7、14、21、28、35、42 日在大鼠背部脱毛区域随机拔取毛发,用游标卡尺测定毛发长度。

2.2.4 皮肤组织病理学观察 末次给药后,禁食 12 h,采用 3% 戊巴比妥钠进行麻醉(1 mL·kg⁻¹),取大鼠背部实验区皮肤(背部近脊柱区中央左侧约 1 cm×1 cm),置于 10% 甲醛溶液中,固定 24 h,经过脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、脱蜡、染色等处理后,在光学显微镜下观察毛囊,对毛囊长度、总毛囊数量、生长期毛囊数量和休止期毛囊数量进行统计。

2.2.5 皮肤组织性激素和 SRD5A2 水平检测 取背部实验区皮肤(背部近脊柱区中央右侧约 1 cm×1 cm),称取约 0.1 g,剪碎放至 EP 管中,按照 1:9 的质量体积比加入生理盐水,放入匀浆机中匀浆,取悬浮液,3000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液。按相应试剂盒说明书,采用 ELISA 法检测皮肤组织匀浆中 T、DHT、E₂、SRD5A2 水平,并计算 T 和 E₂ 的比值。

2.2.6 皮肤组织生长因子水平检测 同“2.2.5”项下方法制备样品,按照相应试剂盒说明书,采用 ELISA 法检测皮肤组织匀浆中 TGF-β₁ 和 VEGF 水平。

2.2.7 统计学分析 采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,独立样本 *t* 检验用于组间比较,*P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 网络药理学和分子对接结果

3.1.1 锯叶棕-黄芩提取物的活性成分 通过文献收集锯叶棕和黄芩的化学成分,结果发现 41 个活性成分符合要求,其中 α-亚麻酸、棕榈油酸、亚油酸等 13 个成分归属于锯叶棕,圣草酚、红花素、柚皮素等 28 个成分归属于黄芩。

3.1.2 锯叶棕-黄芩提取物的活性成分与 AGA 的共同靶点 41 个活性成分靶点汇总去重后得到 404 个靶点,在 GeneCards 和 OMIM 数据库收集 AGA 的相关靶点,去重后得到 497 个靶点。将活性成分靶点与 AGA 靶点取交集,共得到 26 个可能是锯叶棕-黄芩提取物改善 AGA 的潜在作用靶点。

3.1.3 PPI 分析及核心靶点筛选结果 将潜在作用靶点导入 STRING 数据库得到 PPI 网络,共涉及 26 个节点,66 条边。根据 degree 值筛选出前

15 位为核心靶点, 分别为 AR、BCL2、PPARG、CYP19A1、IGF1R、CYP17A1、SRD5A1、SHBG、

MAPK1、INSR、IGFBP3、SRD5A2、KIT、STS、MAPT (见图 1)。

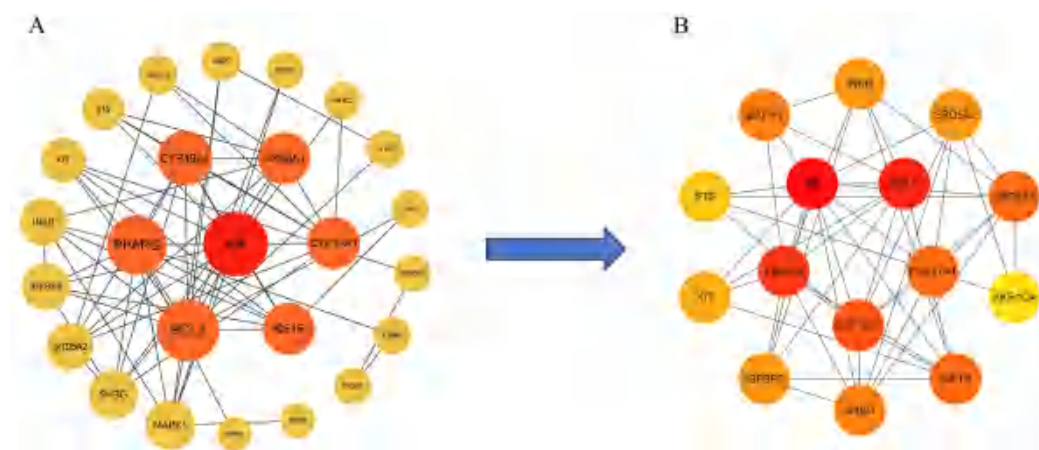


图 1 锯叶棕-黄芩活性成分改善 AGA 的 PPI 网络 (A) 和核心靶点 (B)

Fig 1 PPI network (A) and core targets (B) of improvement of AGA by saw palmetto-scutellaria baicalensis extract active components

3.1.4 GO 和 KEGG 富集分析结果 GO 富集分析共得到条目 130 条, 其中生物过程 90 条、细胞组分 13 条、分子功能 27 条。其中, 主要生物过程包括雄性性腺发育、丝裂原活化蛋白激酶级联的正向调节、类固醇的生物合成过程等; 细胞组分包括受体复合物、神经元胞体、内质网膜等; 分子功能包括跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性、核受体活性、胰岛素样生长因子 I 的结合等 (见图 2A)。

KEGG 富集分析结果显示 26 个潜在作用靶点共富集到 33 条通路, 涉及 11 个途径, 主要包括脂质代谢、信号传导和癌症概述等。富集分析气泡图显示脂质代谢、信号传导和癌症概述途径下的关键通路主要包括类固醇激素的生物合成、MAPK 信号通路和 PI3K-Akt 信号通路等 (见图 2B)。

3.1.5 “药物-成分-靶点-通路-疾病”调控网络结果 “药物-成分-靶点-通路-疾病”调控网络显示锯叶棕-黄芩提取物中的 α -亚麻酸、棕榈油酸、亚油酸、圣草酚、红花素等核心成分通过调控 AR、CYP19A1、IGF1R、MAPK1 等核心靶点, 影响类固醇的生物合成过程及 MAPK、PI3K-Akt 等关键通路, 从而发挥治疗 AGA 的作用 (见图 3)。

3.1.6 分子对接结果 锯叶棕-黄芩提取物中排名前 5 的活性成分与 15 个核心靶点的结合能均 $< -5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 表明活性成分与核心靶点均具有良好的结合能力 (见图 4A)。选择结合活性最好的 CYP19A1 与 α -亚麻酸、SRD5A1 与亚油酸、SRD5A1 与 α -亚麻酸、SHBG 与红花素进行可视化 (见图 4B ~ 4E)。

3.2 动物实验结果

3.2.1 锯叶棕-黄芩提取物对 AGA 大鼠毛发生

长状态的影响 脱毛后, 各组大鼠背部皮肤均呈粉色。第 14 日时, 空白组大鼠背部可见毛发生长, 且基本覆盖脱毛区域; 与空白组比较, 模型组大鼠脱毛区域仅见少量毳毛 (短小而细软的毛); 与模型组比较, 各给药组脱毛区域出现薄层覆盖, 毛发生长速度明显加快。第 21 ~ 28 日时, 空白组大鼠背部毛发基本生长完全, 终毛 (长而粗硬的毛) 较多; 与空白组比较, 模型组大鼠脱毛区域有薄层覆盖, 但不均匀; 与模型组比较, 阳性药组和锯叶棕-黄芩提取物高剂量组毛发生长速度明显加快, 且毛色光泽。第 35 ~ 42 日时, 空白组大鼠背部毛发生长浓密, 毛色光泽, 有韧性; 与空白组比较, 模型组大鼠毛发生长较之前略有好转, 但仍不均匀, 且抚摸时易脱落; 与模型组比较, 阳性药组和锯叶棕-黄芩提取物高剂量组大鼠背部毛发生长浓密, 毛色光泽, 有韧性 (见图 5)。

3.2.2 锯叶棕-黄芩提取物对 AGA 大鼠新生毛发生长度的影响 与空白组比较, 模型组大鼠毛发长度减少, 其中第 7 ~ 21 日时差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组毛发长度在一定程度上均呈增加趋势, 其中, 阳性药组在第 42 日时、锯叶棕-黄芩提取物低剂量组在第 21 日时、锯叶棕-黄芩提取物中剂量组在第 7 ~ 21 日时、锯叶棕-黄芩提取物高剂量组在第 7、14、21、42 日时显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) (见图 6)。

3.2.3 锯叶棕-黄芩提取物对 AGA 大鼠皮肤组织病理学的影响 空白组毛囊分布均匀, 终毛较多; 模型组毛囊分布稀疏, 毛囊微型化明显, 毳毛较多; 各给药组毛囊分布较为密集, 毛囊微型

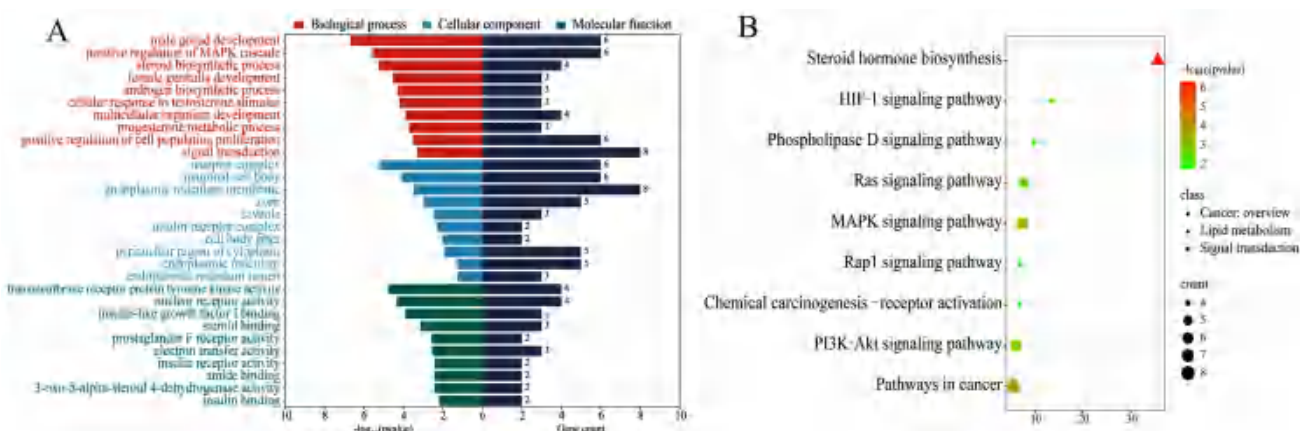


图2 GO (A) 和 KEGG (B) 富集分析

Fig 2 GO function (A) and KEGG pathway (B) enrichment analysis



图3 “药物-成分-靶点-通路-疾病”调控网络

Fig 3 “Drug-components-target-pathway-disease” network

化现象减轻, 终毛较多, 且锯叶棕-黄芩提取物治疗效果呈剂量依赖性 (见图 7A、7B)。

与空白组比较,模型组毛囊长度、总毛囊数量、生长期毛囊数量显著降低 ($P < 0.01$),休止期毛囊数量显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,阳性药组和锯叶棕-黄芩提取物高剂量组毛囊长度、总毛囊数量、生长期毛囊数量显著升高 ($P < 0.01$),休止期毛囊数量显著降低 ($P < 0.01$) (见图 7C ~ 7F)。

3.2.4 锯叶棕-黄芩提取物对 AGA 大鼠皮肤组织中中性激素和 SRD5A2 水平的影响 与空白组比较,模型组大鼠皮肤组织中 DHT、T/E₂、SRD5A2 水平显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), E₂ 水平显著降低 ($P < 0.05$), T 有升高趋势,但差异无统计学意义;与模型组比较,各给药组均能降低皮肤组织中 T、DHT、T/E₂、SRD5A2 水平,升高皮肤组织 E₂ 水平,其中各给药组 SRD5A2 水平均显著降低 ($P < 0.01$),锯叶棕-黄芩提取物高剂量组 DHT、

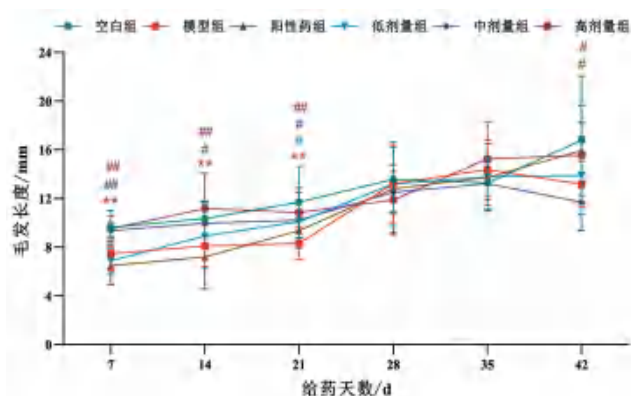


图 6 锯叶棕-黄芩提取物对 AGA 大鼠新生毛发长度的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig 6 Effect of saw palmetto-scutellaria baicalensis extract on the length of newborn hair in AGA rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

注: 与空白组相比, $**P < 0.01$; 与模型组相比, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ 。

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

而, 锯叶棕和黄芩联合使用的效果和作用机制尚不明确。为此, 本研究基于网络药理学和分子对接, 探讨中药多成分、多靶点、多途径的优势, 并通过动物实验对锯叶棕-黄芩提取物改善 AGA 的潜在机制进行初步探究。

本研究采用网络药理学分析预测了锯叶棕-黄芩提取物 41 个活性成分, 涉及 26 个治疗 AGA 的潜在作用靶点。基于 PPI 网络分析, AR、BCL2、PPARG、CYP19A1、IGF1R、CYP17A1、SRD5A1、SHBG、MAPK1、INSR、IGFBP3、SRD5A2、KIT、STS、MAPT 等 15 个靶点被确定为核心作用靶点。进一步应用分子对接验证, CYP17A1、SRD5A1、SHBG 等核心靶点与锯叶棕-黄芩提取物中的 α -亚麻酸、亚油酸和红花素等成分具有良好的结合能力。CYP17A1 是编码细胞色素 P450 酶超家族的成员, 该酶能够合成雄激素和雌激素等, 是类固醇生成途径中的关键

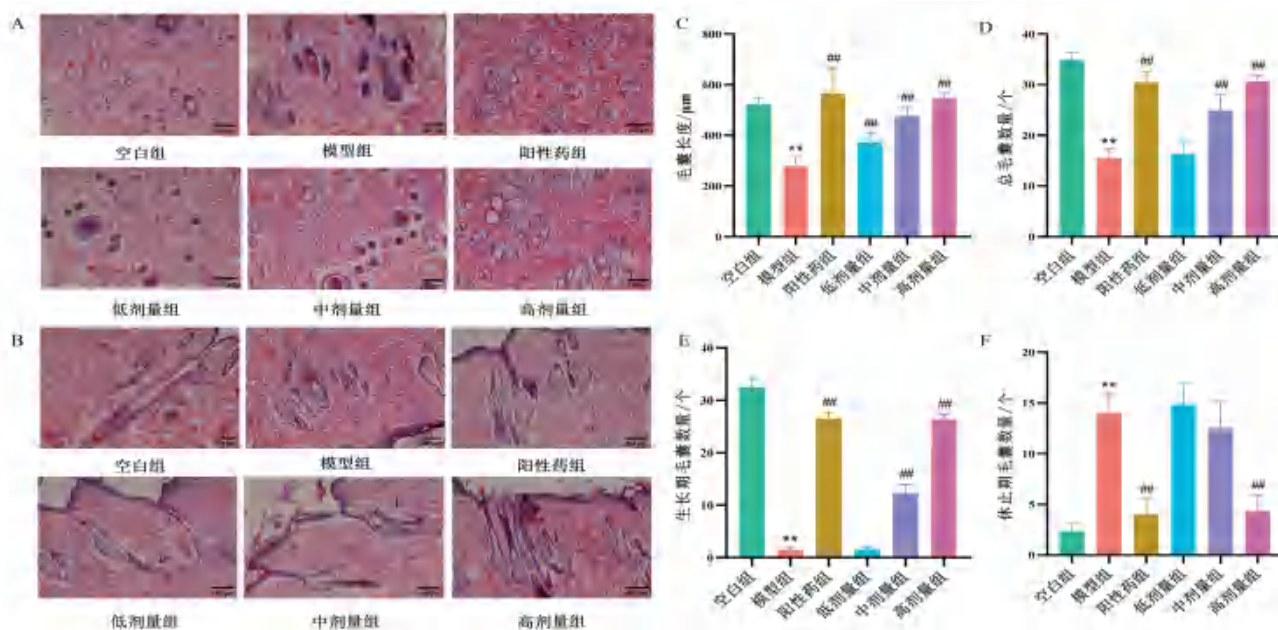


图 7 锯叶棕-黄芩提取物对 AGA 大鼠皮肤组织病理学的影响 ($\times 100$)

Fig 7 Effect of saw palmetto-scutellaria baicalensis extract on skin histopathological of AGA rats ($\times 100$)

注: “↓”标注的是休止期毛囊; 与空白组相比, $**P < 0.01$; 与模型组相比, $^{\#\#}P < 0.01$ 。

Note: “↓” is the telogen hair follicle; compared with the blank group, $**P < 0.01$; compared with the model group, $^{\#\#}P < 0.01$.

酶^[11]。SRD5A1 和 SRD5A2 均为类固醇 5 α 还原酶的同工酶, 两者位于微粒体, 能够催化 T 转化为生物活性更好的 DHT, 并且 SRD5A2 对类固醇底物尤其是睾酮, 比 SRD5A1 有更高的亲和力^[12]。SHBG 是一种可以特异性结合类固醇激素的 β 球蛋白, 通过与性激素结合, 将它们运输到身体的各个部位, 调节血液中游离性激素的浓度, 从而影响性激素的生物活性^[13]。IGF1R 是激素胰岛素样生长因子 1 的细胞表面受体, IGF1R

通过激活下游信号通路, 调节细胞的增殖、存活和代谢等, 在细胞的生长和发育过程中发挥着关键作用^[14]。研究表明锯叶棕-黄芩提取物中的脂肪酸类成分和黄酮类成分可以通过调节性激素的合成与代谢及细胞的增殖、分化与凋亡等发挥治疗 AGA 的作用^[15-16]。

GO 富集分析结果显示, AGA 的发生主要与雄性性腺发育、MAPK 级联的正向调节等生物过程密切相关。研究表明, 雄性性腺发育离不开雄激素、

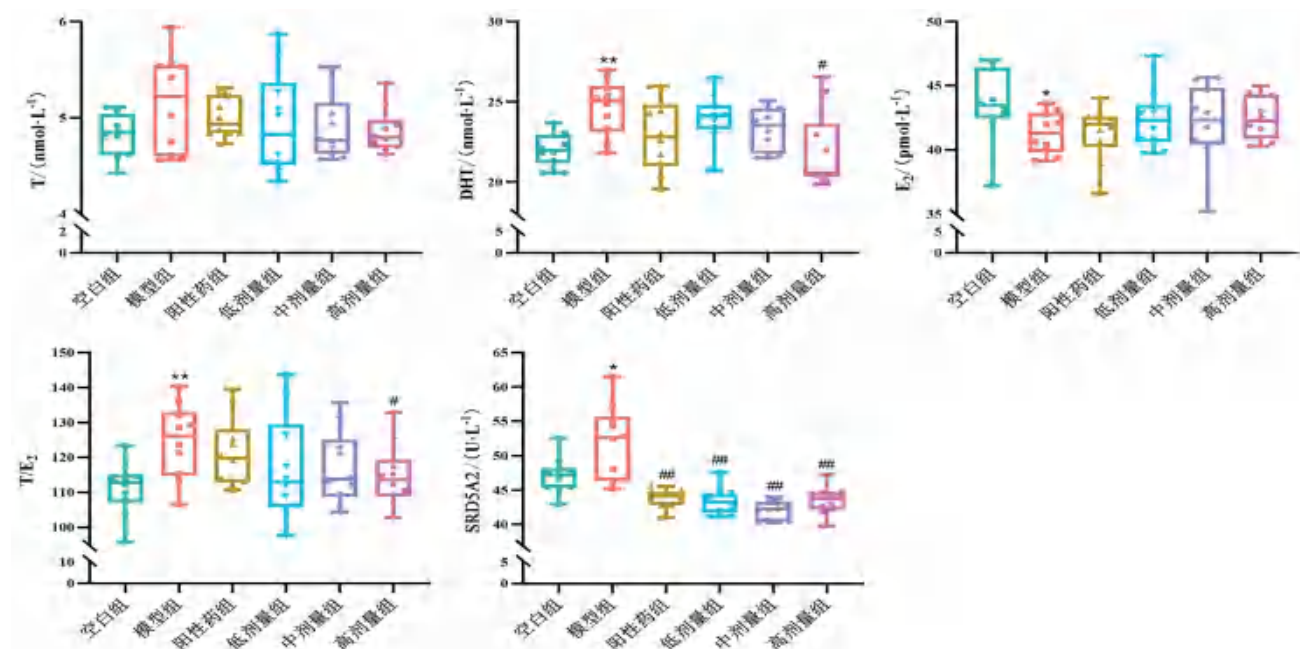


图8 锯叶棕-黄芩提取物对AGA大鼠皮肤组织中性激素和SRD5A2水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig 8 Effect of saw palmetto-scutellaria baicalensis extract on the level of sex hormone and SRD5A2 in skin tissue of AGA rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

注: 与空白组相比, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; 与模型组相比, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ 。

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

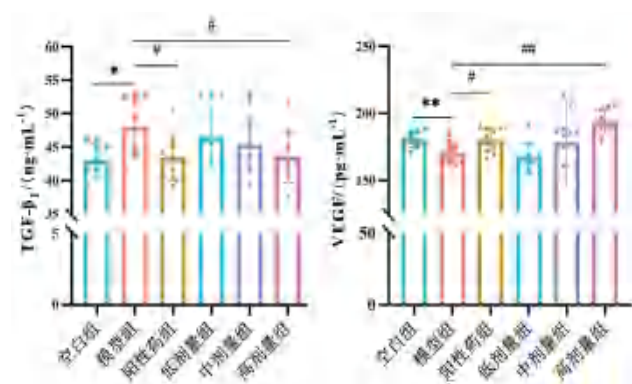


图9 锯叶棕-黄芩提取物对AGA大鼠皮肤组织中生长因子水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig 9 Effect of saw palmetto-scutellaria baicalensis extract on the level of growth factors in skin tissue of AGA rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

注: 与空白组相比, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; 与模型组相比, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$ 。

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

雌激素及其受体的协同作用^[17]; 另外, 当MAPK级联反应被激活时, 细胞的增殖、分化、凋亡等多种生理过程受到调控^[18]。KEGG富集分析结果显示, AGA的发生主要与类固醇激素的生物合成过程、MAPK信号通路等有关。在类固醇的生物合成途径中, 一方面, 当SRD5A2活性过高时, T会被转化为DHT, T与E₂的平衡被打破, 这可能导致脱发的发生^[19]; 另一方面, DHT与AR的结合活性优于T, DHT会优先与AR结合形成激素-受体

复合物, 这种复合物进入细胞核与雄激素靶标的启动子结合, 能够促进毛发生长抑制因子TGF- β_1 的基因表达^[20]。TGF- β_1 会诱导毛乳头周围的血管内皮细胞凋亡, 导致血管退化, 抑制毛发从休止期进入生长期^[21]。而在MAPK信号通路中, VEGF是一种刺激血管生成和血管新生的生长因子, 它可与内皮细胞膜上的VEGF受体结合, 引起受体的自身磷酸化, 从而激活下游MAPK信号通路, 诱导VEGF自身表达和血管生成相关基因的转录, 进而增加VEGF的表达^[22-23]。当VEGF在毛囊真皮乳头细胞和真皮鞘细胞中表达增高时, 能够刺激毛囊周围血管形成, 从而促进毛囊营养供应, 增加毛囊数量和毛干直径, 加速毛发生长^[24]。

在动物实验中, 本研究利用丙酸睾酮诱导建立AGA大鼠模型, 并给予锯叶棕-黄芩提取物治疗, HE染色结果显示, 锯叶棕-黄芩提取物可以增加生长期毛囊数量, 改善AGA。为了进一步阐明其作用机制, 本研究对激素和生长因子进行检测, 结果发现锯叶棕-黄芩提取物可提高AGA模型大鼠皮肤组织中E₂、VEGF水平, 降低T、DHT、SRD5A2、TGF- β_1 水平。

综上所述, 本文基于网络药理学和分子对接的研究方法, 发现锯叶棕-黄芩提取物可能通过 α -亚麻酸、亚油酸、红花素等关键成分, 作用于CYP17A1、SRD5A1、SHBG、IGF1R、SRD5A2等核心靶点, 调控类固醇的生物合成过程、MAPK

信号通路等,从而发挥改善 AGA 的作用。动物实验证实,锯叶棕-黄芩提取物能够通过调节激素,以及与血管内皮细胞增殖、分化、凋亡相关生长因子的表达水平来改善 AGA。本研究为锯叶棕-黄芩提取物改善 AGA 的临床应用提供了一定的参考。同时,本研究仍具有局限性,锯叶棕-黄芩提取物改善 AGA 的关键靶点和信号通路仍需进一步的机制验证,以期达到阐明锯叶棕-黄芩提取物治疗 AGA 的作用机制。

参考文献

- [1] Alessandrini A, Bruni F, Piraccini BM, et al. Common causes of hair loss-clinical manifestations, trichoscopy and therapy [J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2021, 35 (3): 629-640.
- [2] 胡志奇, 苗勇. 中国人雄激素性脱发诊疗指南 [J]. *中国美容整形外科杂志*, 2019, 30 (1): 8-12.
- [3] 曾文俊, 李芳梅, 颜艳. 雄激素性脱发的外治疗法研究进展 [J]. *中医外治杂志*, 2022, 31 (2): 122-124.
- [4] 杨晓双, 丁雨欣, 陈钰虹, 等. 5%米诺地尔联合口服抗雄药物治疗雄激素性秃发早期脱发现象的初步探讨 [J]. *临床皮肤科杂志*, 2024, 53 (4): 199-203.
- [5] Jimenez F, Alam M, Vogel JE, et al. Hair transplantation: basic overview [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2021, 85 (4): 803-814.
- [6] 孙欠欠, 张行行, 赵麓, 等. 基于 5-LOX/LTB4 信号通路探讨黄芩苷/槲皮苷对 PM_{2.5} 暴露致血管内皮功能障碍的干预作用及其机制 [J]. *中南药学*, 2024, 22 (2): 307-314.
- [7] Qian HZ, Ye Z, Hu Y, et al. Dahuang-Gancao decoction ameliorates testosterone-induced androgenetic alopecia in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 341: 119347.
- [8] Liu XX, Kong X, Xu L, et al. Synergistic therapeutic effect of ginsenoside Rg₃ modified minoxidil transfersomes on androgenic alopecia in C57BL/6 mice [J]. *Int J Pharm*, 2024, 654: 123963.
- [9] Shin SH, Bak SS, Kim MK, et al. Baicalin, a flavonoid, affects the activity of human dermal papilla cells and promotes anagen induction in mice [J]. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2015, 388 (5): 583-586.
- [10] Dhariwala MY, Ravikumar P. An overview of herbal alternatives in androgenetic alopecia [J]. *J Cosmet Dermatol*, 2019, 18 (4): 966-975.
- [11] Chen CC, Pan NR, Chen ZP, et al. The GG genotype of rs743572 in CYP17A1 gene regulating the decrease of T/E ratio can be an independent risk factor for MetS-BPH: a retrospective cohort study [J]. *World J Urol*, 2024, 42 (1): 439.
- [12] Lévesque É, Laverdière I, Lacombe L, et al. Importance of 5 α -reductase gene polymorphisms on circulating and intraprostatic androgens in prostate cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20 (3): 576-584.
- [13] Sun Y, Li SY, Liu HW, et al. Oxidative stress promotes hyperandrogenism by reducing sex hormone-binding globulin in polycystic ovary syndrome [J]. *Fertil Steril*, 2021, 116 (6): 1641-1650.
- [14] Kineman RD, Del Rio-Moreno M, Sarmento-Cabral A. 40 years of IGF1: understanding the tissue-specific roles of IGF1/IGF1R in regulating metabolism using the Cre/loxP system [J]. *J Mol Endocrinol*, 2018, 61 (1): T187-T198.
- [15] Choi YJ, Fan MQ, Wedamulla NE, et al. Inhibitory effects of centella asiatica (1) urban on enlarged prostate through androgen receptor and PI3K/Akt signaling pathways [J]. *Food Funct*, 2022, 13 (19): 10235-10247.
- [16] Kim AR, Kim SN, Jung IK, et al. The inhibitory effect of scutellaria baicalensis extract and its active compound, baicalin, on the translocation of the androgen receptor with implications for preventing androgenetic alopecia [J]. *Planta Med*, 2014, 80 (2-3): 153-158.
- [17] Alemany M. The roles of androgens in humans: biology, metabolic regulation and health [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (19): 11952.
- [18] Yue JC, López JM. Understanding MAPK signaling pathways in apoptosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (7): 2346.
- [19] 景林, 余志杰, 胡婷婷, 等. 补气活血生发酊对小鼠雄激素性脱发的影响 [J]. *中成药*, 2020, 42 (3): 767-773.
- [20] Muangsanguan A, Linsaenkart P, Chaitep T, et al. Hair growth promotion and anti-hair loss effects of by-products arabica coffee pulp extracts using supercritical fluid extraction [J]. *Foods*, 2023, 12 (22): 4116.
- [21] Redmond LC, Limbu S, Farjo B, et al. Male pattern hair loss: can developmental origins explain the pattern [J]. *Exp Dermatol*, 2023, 32 (7): 1174-1181.
- [22] Kim MH, Park SJ, Yang WM. Network pharmacology study and experimental confirmation revealing the ameliorative effects of decursin on chemotherapy-induced alopecia [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2021, 14 (11): 1150.
- [23] Ding YW, Li Y, Zhang ZW, et al. Hydrogel forming microneedles loaded with VEGF and ritlecitinib/polyhydroxyalkanoates nanoparticles for mini-invasive androgenetic alopecia treatment [J]. *Bioact Mater*, 2024, 38: 95-108.
- [24] 俞佳玉, 朱凤, 庞锦萍, 等. 银杏黄酮通过调节 VEGF 和 TGF- β 改善小鼠雄激素性脱发的研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2024, 59 (5): 425-432.

(收稿日期: 2025-01-02; 修回日期: 2025-03-10)

锯叶棕 - 黄芩提取物调节雄激素转化治疗 雄激素脱发的作用研究

项雨杰¹, 陆立煌¹, 王旭¹, 张贵民², 姜新刚^{2*}, 吴修红^{1*} (1. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040; 2. 乐泰药业(兰西)有限公司, 黑龙江 绥化 151500)

摘要: **目的** 探讨锯叶棕 - 黄芩提取物通过调节雄激素转化对雄激素脱发的治疗作用, 为其用于雄激素脱发的治疗提供科学依据。 **方法** 采用皮下多点注射丙酸睾酮混悬液诱导的方法构建雄激素脱发小鼠模型, 每日 1 次, 连续 42 d。C57BL/6 雄性小鼠随机分为对照组, 模型组, 锯叶棕 - 黄芩提取物低、中、高剂量组及米诺地尔组。各组小鼠每周拍摄背部大体照片并测定毛发长度, HE 染色并于显微镜下观察皮肤组织真皮厚度及毛囊的长度、数量。ELISA 法检测小鼠血清及皮肤组织中相关激素及因子水平。 **结果** 与模型组相比, 锯叶棕 - 黄芩提取物中、高剂量组可显著增加小鼠毛发长度和重量; 各剂量组可显著增加小鼠皮肤组织毛囊长度、毛球直径、真皮厚度、生长期毛囊数。锯叶棕 - 黄芩提取物高剂量组可显著降低小鼠血清及皮肤中睾酮 (T)、二氢睾酮 (DHT)、II 型 5 α -还原酶 (SRD5A2) 水平, 提高血管内皮生长因子 (VEGF) 和雌二醇 (E₂) 水平, 同时显著下调小鼠皮肤组织中白细胞介素 (IL-6) 和肿瘤坏死因子 (TNF- α) 水平; 低、中剂量组可显著降低小鼠血清及皮肤中 T、DHT 及 SRD5A2 水平。 **结论** 锯叶棕 - 黄芩提取物通过降低 DHT 和 SRD5A2 水平, 提高 E₂ 水平, 从而平衡激素紊乱; 提高 VEGF 水平, 改善毛囊血管微环境; 降低毛囊干细胞炎症水平等多方面发挥促进毛发生长的作用。

关键词: 锯叶棕 - 黄芩提取物; 雄激素脱发; 有效性

中图分类号: R286, R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)05-1344-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.025

Effect of saw palmetto-scutellaria baicalensis extract in regulating androgen conversion for androgenetic alopecia

XIANG Yu-jie¹, LU Li-huang¹, WANG Xu¹, ZHANG Gui-min², JIANG Xin-gang^{2*}, WU Xiu-hong^{1*} (1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040; 2. Letai Pharmaceutical (Lanxi) Co., Ltd., Suihua Heilongjiang 151500)

Abstract: Objective To determine the therapeutic effect of saw palmetto-scutellaria baicalensis extract on androgenetic alopecia by regulating androgen conversion, and to provide scientific basis for its application. **Methods** A mouse model of androgenetic alopecia was established by subcutaneous multi-point injection of testosterone propionate suspension once daily for 42 consecutive days. C57BL/6 male mice were randomly divided into a control group, a model group, a low-, a medium-and a high-dose extract group and a minoxidil group. The gross photos of the backs of the mice in each group were taken every week. We measured their hair length, stained them with HE, and observed the dermal thickness of the skin tissue and the length and number of hair follicles under the microscope. ELISA was used to detect the levels of related hormones and factors in the serum and skin tissues of mice. **Results** Compared with the model group, the medium and high dose groups of Saw Palmetto-scutellaria extract increased the length and weight of mouse hair; all dose groups obviously increased the length

基金项目: 黑龙江省应用技术研究及开发计划 (No. GA19C113)。

作者简介: 项雨杰, 男, 硕士, 主要从事中药药效物质基础及其代谢组学研究, email: 2540494797@qq.com *通信作者: 姜新刚, 男, 高级工程师, 主要从事中药新药与产业化转化研究, email: 1473740213@qq.com; 吴修红, 女, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药药效物质基础及其代谢组学研究, email: wxh8088@163.com

of hair follicles, the diameter of hair bulbs, the thickness of the dermis, and the number of anagen hair follicles in the mouse skin tissue. The high dose extract group reduced the levels of testosterone, dihydrotestosterone, and 5α -reductase type 2 in mouse serum and skin, and increase the levels of vascular endothelial growth factor and estradiol, and also substantially downregulated the levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α in mouse skin tissue; the low and medium dose groups greatly reduced the levels of testosterone, dihydrotestosterone, and 5α -reductase type 2 in mouse serum and skin. **Conclusion** Saw palmetto-scutellaria baicalensis extract effectively balances hormonal disorders by decreasing dihydrotestosterone and 5α -reductase type 2 levels and increasing estradiol levels; increase the level of vascular endothelial growth factor, to improve the vascular microenvironment of hair follicles; and promotes hair growth by reducing the inflammation level of hair follicle stem cells.

Key words: saw palmetto-scutellaria baicalensis extract; androgenetic alopecia; effectiveness

雄激素脱发 (androgenetic alopecia, AGA) 又称为脂溢性脱发, 是最常见的脱发性疾病, 随着人们生活节奏的不断加快, 工作压力增高, AGA 的发病率逐年提高, AGA 在男女两性均会发生, 但男性的 AGA 发病率高于女性, 影响我国 21.3% 的男性和 6% 的女性^[1-2], AGA 严重影响着患者的心理健康和生活质量。

锯叶棕中含有大量的 β -谷甾醇和脂肪酸, 这些成分能有效抑制 I 型 5α -还原酶 (SRD5A1) 和 II 型 5α -还原酶 (SRD5A2) 活性, 减少睾酮 (T) 向二氢睾酮 (DHT) 的转化, 并能竞争性抑制 DHT 与雄激素受体 (AR) 的结合^[3-5], 同时锯叶棕提取物可抑制白三烯 B_4 和前列腺素等炎症介质的生成, 进而发挥特异性抗炎作用^[6-7]。黄芩中的黄芩苷可增强毛乳头细胞活性进而促进毛发的生长^[8]; 黄芩苷还可促进血管内皮生长因子 (VEGF) 的分泌, 诱导毛囊周围微型血管合成增加进而为毛囊提供营养成分, 促进毛发生长^[9-10], 且黄芩苷还可激活 Wnt/ β -catenin 信号通路, 延长毛囊的生长期, 并推迟向休止期的转变^[11]。

目前治疗 AGA 的常用药物主要包括米诺地尔、非那雄胺和度他雄胺等药物, 但皆有着不同程度的毒副作用, 鉴于此, 研发具备高效、低毒副作用的新型治疗方案成为当前市场亟待解决的关键问题, 对改善患者生活质量具有重要意义。本研究就锯叶棕-黄芩提取物对 AGA 小鼠的药效作用进行探讨, 揭示其对 AGA 发病因素中激素紊乱、持续性炎症以及毛囊血管微循环等方面的调节作用, 以期阐明中医药治疗 AGA 的作用机制, 为临床用药提供理论基础。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 近交系小鼠, 雄性, 体重 20 ~ 24 g, 6 ~ 8 周龄 [北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号: SCXK (京) 2021-0006]。动物饲养在 SPF 级实验室, 温度 20 ~ 26 °C, 相对湿度 40% ~ 70%。

1.2 仪器

HistoCoreArcadia 组织包埋系统 (德国 Leica 公司); BX60 显微镜 (日本 Olympus 公司); 十万分之一电子分析天平 (上海良平仪器仪表有限公司); 头皮毛囊检测仪 (深圳市合才人力科技有限公司); 电子天平 (上海佑科仪器有限公司); 杰奇森理发器 (余姚市杰奇森塑料有限公司); 数显游标卡尺 (宁波得力工具有限公司)。

1.3 试药

丙酸睾酮注射液 (25 mg · mL⁻¹, 哈尔滨三马兽药业有限公司, 批号: 20220503); 鲁花 5S 压榨花生油 (山东鲁花集团有限公司, 批号: FA20230407); 薇婷丝滑沁香脱毛膏 [利洁时家化 (中国) 有限公司, 批号: 3228470]; 米诺地尔搽剂 (质量浓度为 50 mg · mL⁻¹, 山西振东安欣生物制药有限公司, 批号: 20230507); 锯叶棕-黄芩提取物配方 [质量浓度为 5.4 g · mL⁻¹, 乐泰药业 (兰西) 有限公司, 批号: 20220617]。雌二醇 (E₂) (批号: E20230801A)、T (批号: E20230801A)、DHT (批号: E20230801A)、VEGF (批号: E20230801A)、白细胞介素-6 (IL-6) (批号: E20230801A)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) (批号: E20230801A)、SRD5A2 ELISA 试剂盒 (批号: E20230901A) (R&D Systems 公司), 聚丙烯酰胺 (上海麦克林生化科技有限公司, 批号: P821239)、C13-14 异链烷烃 (茂名市正茂石化有限公司, 批号: IPC13), 月桂醇聚醚-7 (北京百灵威科技有限公司, 批号: H280285), 丙烯酸

钠/丙烯酸二甲基牛磺酸钠共聚物(法国赛比克公司,批号:38190L),雪松醇(北京百灵威科技有限公司,批号:C2854),薄荷醇(上海麦克林生化科技有限公司,批号:R813296),苯氧乙醇(北京百灵威科技有限公司,批号:538495)。

2 方法

2.1 制备工艺

黄芩提取物按照 2020 年版《中国药典》四部^[12]流浸膏剂项下渗漉法,制成流浸膏,并将浸膏制成均匀的溶液或混悬液,通过喷头雾化成为微小液滴,在热空气的作用下迅速干燥成粉末状浸膏,最后粉碎而成。锯叶棕提取物采用超临界二氧化碳萃取工艺制备而成^[13]。

在适量水中加入 4.5 g 聚丙烯酰胺、2.5 g C13-14 异链烷烃和 1 g 月桂醇聚醚-7,边加边搅拌使其分散均匀,搅拌 10~30 min 后,加入 25 g 锯叶棕提取物、1.2 g 黄芩提取物以及 8 g 丙酸钠/丙烯酸二甲基牛磺酸钠共聚物,继续搅拌 10~30 min,接着加入 12 g 雪松醇、12 g 薄荷醇及 16 g 苯氧乙醇,搅拌 2 h 后均质 5~20 min,即得。

2.2 动物分组及给药

健康 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠,60 只,适应性喂养 7 d 后,按体重随机分为 6 组,每组 10 只,分别为空白组,模型组,锯叶棕-黄芩提取物(下文简称为提取物)低、中、高剂量组及阳性药组。阳性药组:背部涂抹米诺地尔搽剂 0.01 mL,1 次·d⁻¹;空白组和模型组于背部涂抹生理盐水 0.02 mL,3 次·d⁻¹;提取物低剂量组于背部涂抹 0.02 mL,1 次·d⁻¹(相当于锯叶棕原药材 0.6 g,黄芩原药材 0.4 g);提取物中剂量组于背部涂抹 0.02 mL,2 次·d⁻¹(相当于锯叶棕原药材 1.2 g,黄芩原药材 0.8 g);提取物高剂量组于背部涂抹 0.02 mL,3 次·d⁻¹(相当于锯叶棕原药材 1.8 g,黄芩原药材 1.2 g)。

2.3 AGA 小鼠模型制备

实验开始前,选取小鼠背部大小约为 2 cm×4 cm 的区域作为脱毛观察区,用理发器将毛发剃短,并用脱毛膏去除残留毛发。采用文献方法皮下注射丙酸睾酮注射液(5 mg·mL⁻¹)制备 AGA 模型^[14-15],除空白组外,其余 5 组小鼠皮下多点(背部皮下、颈部皮下、腹部皮下)均匀注射丙酸睾酮注射液,1 次·d⁻¹,连续 42 d。

2.4 毛发生长情况观察

各组小鼠于给药第 0、7、14、21、28、35、

42 日拍摄背部大体照片。

2.5 毛发长度测定

从给药第 14 日开始,每周每只动物于脱毛区中间部位采集 5 根毛发,游标卡尺测量毛发长度取平均值。

2.6 毛发重量测定

给药结束次日,处死小鼠,用 10 mm 打孔器于每只小鼠背部脱毛区相同部位取圆形皮片,手术刀刮除皮片上所有的毛发,分析天平称取毛发重量。

2.7 组织学观察

2.7.1 HE 染色 小鼠处死后,剪切小鼠背部近脊柱区中央约 1 cm×1 cm 大小皮肤,置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h,流水冲去多余甲醛,梯度乙醇脱水后石蜡包埋、切片、HE 染色。

2.7.2 小鼠皮肤真皮厚度及毛囊的长度、数量的观察 于 200 倍镜下选取三个视野统计皮肤毛囊总数,观察皮肤组织的真皮厚度,测量毛球直径,测量真皮厚度及毛囊长度,统计生长期毛囊和休止期毛囊的数量,计算生长期毛囊数/休止期毛囊数比值。

2.8 血清及皮肤中主要激素及相关因子的检测

按照 ELISA 试剂盒说明书检测小鼠血清及皮肤中 E₂、T、DHT、SRD5A2、VEGF 及小鼠皮肤中 IL-6、TNF-α 的含量。

2.9 数据处理

数据以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,通过软件 SPSS 16.0 进行统计,独立样本 *t* 检验用于组间比较,*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 毛发生长情况

脱毛当日,各组小鼠背部均呈粉红色,表明各组小鼠毛发处于休止期状态,在给药第 7~14 日,空白组小鼠背部多转为黑色,可见短绒毛覆盖;模型组小鼠背部皮肤少量转为黑色,其余给药组小鼠背部皮肤多转为黑色,且提取物高剂量组小鼠背部可见短绒毛。在给药第 21~28 日,空白组小鼠背部毛发生长较快且基本实现呈现薄层覆盖;模型组仍有大部分皮肤裸露;阳性药组及提取物中、高剂量组小鼠背部皮肤均大部分区域实现毛发覆盖。在给药第 35~42 日,空白组小鼠大部分皮肤已被毛发覆盖;模型组毛发生长较前略有好转,但仍有部分皮肤裸露;阳性药及提取物中、高剂量组小鼠背部大部分被毛发覆盖,少见皮肤裸露(见图 1)。

3.2 锯叶棕-黄芩提取物对毛发长度的影响

给药第 14 ~ 42 日, 与空白组相比, 模型组小鼠毛发长度显著降低。给药第 14 ~ 28 日, 与模型组比较, 阳性药组及提取物高剂量组均可显著增加小鼠毛发长度, 提取物中剂量组于给药第 21 日

可显著增加小鼠毛发长度, 提取物低剂量组对小鼠毛发长度无明显作用。给药第 35 ~ 42 日, 与模型组相比, 阳性药组及提取物中、高剂量组均可显著增加小鼠毛发长度, 但与给药第 14 ~ 28 日相比, 毛发增长速度趋于平缓 (见表 1)。

表 1 锯叶棕-黄芩提取物对 AGA 模型小鼠毛发长度的影响 ($n = 10$, mm)

Tab 1 Effect of saw palmetto-scutellaria bacalensis extract on the hair length in mice with androgenetic alopecia ($n = 10$, mm)

组别	给药 14 d	给药 21 d	给药 28 d	给药 35 d	给药 42 d
空白组	2.33±0.44	6.64±0.43	7.44±0.23	7.59±0.28	7.64±0.26
模型组	0.93±0.46 ^{△△}	4.86±1.13 ^{△△}	6.02±0.21 ^{△△}	6.37±0.36 ^{△△}	6.81±0.33 ^{△△}
阳性药组	2.05±0.81 ^{**}	6.08±0.69 ^{**}	6.75±0.53 ^{**}	6.84±0.23 ^{**}	7.09±0.22 [*]
提取物低剂量组	1.24±0.74	5.27±0.85	6.13±0.47	6.46±0.50	6.76±0.26
提取物中剂量组	1.15±0.55	5.80±0.59 [*]	6.72±0.55 ^{**}	6.77±0.13 ^{**}	7.05±0.25 [*]
提取物高剂量组	1.92±0.74 ^{**}	6.07±0.30 ^{**}	6.90±0.29 ^{**}	6.84±0.09 ^{**}	7.10±0.27 [*]

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 锯叶棕-黄芩提取物对毛发重量的影响

给药结束后, 与空白组相比, 模型组小鼠背部单位区域内毛发重量显著降低; 与模型组小鼠相比, 提取物中、高剂量组可显著增加小鼠的毛发重量 (见表 2)。

剂量组毛囊分布均匀且较为密集, 生长期毛囊占比上升, 终毛占比增多; 提取物高剂量组毛囊较粗且终毛占比较高 (见图 2)。

3.5 锯叶棕-黄芩提取物对小鼠皮肤真皮厚度及毛囊的长度、数量的影响

与空白组相比, 模型组小鼠皮肤毛囊数量显著降低; 与模型组比较, 各给药组及阳性药组毛囊数量显著增多 (见表 3)。与空白组比较, 模型组小鼠毛囊长度、毛球直径、真皮厚度、生长期毛囊数、A/T 比值明显减少, 休止期毛囊数明显增加, 证明雄激素性脱发小鼠模型建立成功。药物治疗后, 与模型组相比, 提取物各给药组及阳性药组小鼠毛囊长度、毛球直径、真皮厚度、生长期毛囊数、A/T 比值显著增加; 各给药组的休止期毛囊数明显减少; 且提取物高剂量组小鼠的真皮厚度要高于阳性药组 (见表 4)。

表 2 锯叶棕-黄芩提取物对 AGA 模型小鼠毛发重量的影响 ($n = 10$)

Tab 2 Effect of saw palmetto-scutellaria bacalensis extract on hair weight in androgenetic alopecia model mice ($n = 10$)

组别	毛发重量 /mg
空白组	7.12±1.10
模型组	4.47±1.39 ^{△△}
阳性药组	6.02±2.25
提取物低剂量组	4.91±2.01
提取物中剂量组	5.82±1.25 [*]
提取物高剂量组	6.31±1.76 [*]

注: 与空白组比较, ^{△△} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$ 。

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

3.4 锯叶棕-黄芩提取物对小鼠皮肤组织病理学的影响

组织病理学结果显示, 空白组小鼠皮肤毛囊分布均匀, 真皮层厚, 毛囊长而直, 毛球直径长; 模型组小鼠皮肤毛囊数目少且稀疏, 多为微小毛囊, 生长期毛囊少, 休止期及退行期毛囊多, 皮脂腺增生、腺泡肥大, 真皮层薄, 毛囊萎缩; 与模型组小鼠相比, 阳性药组小鼠毛囊数量增多, 分布较为密集, 生长期毛囊数量增多, 真皮层较厚, 可见较粗毛干的终毛, 各给药组小鼠皮肤生长期毛囊数量增多, 休止期及退行期毛囊数量减少, 真皮层增厚, 毛球直径增长, 其中提取物低剂量组可见少量毛干细的毳毛; 提取物中

表 3 锯叶棕-黄芩提取物对 AGA 模型小鼠毛囊数量的影响 ($\times 200$, $n = 10$)

Tab 3 Effect of saw palmetto-scutellaria baicalensis extract on the number of hair follicles in androgenetic alopecia model mice ($\times 200$, $n = 10$)

组别	毛囊数量 / 个
空白组	83.33±4.52
模型组	42.90±3.93 ^{△△}
阳性药组	73.57±2.95 ^{**}
提取物低剂量组	58.97±7.33 ^{**}
提取物中剂量组	71.30±4.88 ^{**}
提取物高剂量组	71.10±3.81 ^{**}

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, ^{**} $P < 0.01$.

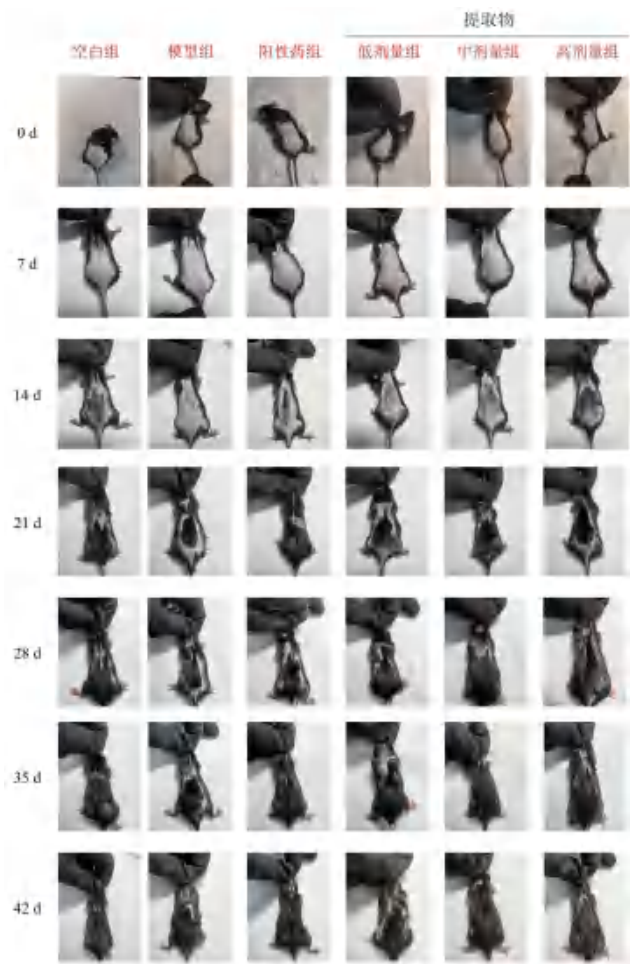


图 1 脱毛当日至给药 42 d 小鼠毛发生长情况
Fig 1 Hair growth from the day of hair removal to the 42nd day of administration

表 4 锯叶棕-黄芩提取物对 AGA 模型小鼠背部皮肤毛囊的长度、毛球直径以及真皮厚度的影响 (给药 42 d, $\times 200$) ($n = 10$)
Tab 4 Effect of saw palmetto-scutellaria bacalensis extract on the length and diameter of hair bulbs and the dermal thickness of the dorsal skin of androgenetic alopecia model mice (42 days of administration, $\times 200$) ($n = 10$)

组别	毛囊长度/ μm	毛球直径/ μm	真皮厚度/ μm	生长期毛囊数 (A)/个	休止期毛囊数 (T)/个	A/T
空白组	97.33 $\pm$ 10.16	71.60 $\pm$ 2.91	318.20 $\pm$ 8.22	27.20 $\pm$ 2.53	2.70 $\pm$ 0.25	10.61 $\pm$ 0.61
模型组	45.60 $\pm$ 3.69 $\Delta\Delta$	25.37 $\pm$ 2.24 $\Delta\Delta$	208.90 $\pm$ 16.39 $\Delta\Delta$	8.70 $\pm$ 0.82 $\Delta\Delta$	3.93 $\pm$ 0.70 $\Delta\Delta$	2.31 $\pm$ 0.38 $\Delta\Delta$
阳性药组	82.97 $\pm$ 7.12**	62.00 $\pm$ 3.97**	312.20 $\pm$ 13.52**	20.30 $\pm$ 2.46**	3.43 $\pm$ 0.67	6.81 $\pm$ 1.80**
提取物低剂量组	60.93 $\pm$ 5.72**	44.73 $\pm$ 3.96**	249.63 $\pm$ 21.07**	11.43 $\pm$ 1.21**	3.23 $\pm$ 0.55*	3.78 $\pm$ 0.41**
提取物中剂量组	73.70 $\pm$ 4.72**	52.23 $\pm$ 4.63**	293.70 $\pm$ 20.48**	17.30 $\pm$ 0.81**	3.30 $\pm$ 0.25*	5.49 $\pm$ 0.49**
提取物高剂量组	76.07 $\pm$ 3.19**	52.10 $\pm$ 3.73**	324.50 $\pm$ 16.20**	17.83 $\pm$ 1.33**	3.00 $\pm$ 0.44**	6.31 $\pm$ 0.76**

注: 与空白组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
Note: Compared with the blank group, $\Delta\Delta P < 0.01$; compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

法有效改善血清中 E_2 和 VEGF 水平; 提取物低剂量组仅可降低皮肤组织中 $TNF-\alpha$ 水平, 对 E_2 、VEGF 及 IL-6 无明显作用; 提取物中剂量组可增加皮肤组织中的 E_2 水平, 降低 IL-6 水平, 但对于 VEGF 和 $TNF-\alpha$ 无明显作用; 提取物高剂量组可显著降低小鼠血清及皮肤中 T、DHT、SRD5A2 水平, 提高 VEGF 和 E_2 水平, 同时下调小鼠皮肤组织中 IL-6 和 $TNF-\alpha$ 水平, 且提取物高剂量组对于皮肤组织中 E_2

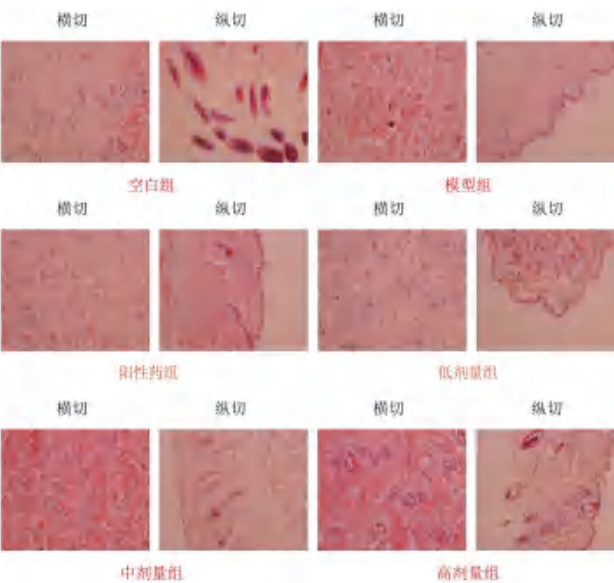


图 2 锯叶棕-黄芩提取物对小鼠皮肤组织病理学的影响 (HE 染色, $\times 200$)
Fig 2 Effect of saw palmetto-scutellaria bacalensis extract on the histopathology of dorsal skin in each group of mice (HE staining, $\times 200$)

3.6 锯叶棕-黄芩提取物血清及皮肤中主要激素及相关因子的影响

与空白组相比, 模型组小鼠血清及皮肤中 T、DHT 及 SRD5A2 水平均明显升高, E_2 和 VEGF 水平显著降低, 且皮肤组织中 IL-6 和 $TNF-\alpha$ 水平极显著升高; 提取物低、中剂量组可显著降低小鼠血清及皮肤中 T、DHT 及 SRD5A2 水平, 但两治疗组均无

及 $TNF-\alpha$ 的效果略优于阳性药 (见表 5、表 6)。

4 讨论

雄激素紊乱是 AGA 的关键致病因素之一, 皮肤中循环的 T 会被 SRD5A2 转化为 DHT, 而 DHT 对 AR 的亲合力较睾酮高出 10 倍^[14]。Wnt/ β -catenin 信号通路是控制毛发生长的主要信号通路, 可诱导毛囊干细胞的增殖和分化^[15-16]。当体内 T 的含量升高时, T 经 SRD5A2 转化为 DHT 并与其受体

表 5 锯叶棕-黄芩提取物对 AGA 模型小鼠血清中主要激素及相关因子水平的影响 (给药 42 d) (n = 10)
Tab 5 Effect of saw palmetto-scutellaria bacalensis extract on the serum levels of major hormones and related factors in androgenetic alopecia model mice (42 days of administration) (n = 10)

组别	E ₂ / (pmol · L ⁻¹)	T/ (pg · mL ⁻¹)	DHT/ (nmol · L ⁻¹)	VEGF/ (pg · mL ⁻¹)	SRD5A2/ (U · L ⁻¹)
空白组	42.93±2.79	420.17±44.68	22.11±1.73	157.74±7.64	44.85±1.69
模型组	35.57±2.32 ^{△△}	551.37±33.71 ^{△△}	26.21±1.46 ^{△△}	138.63±6.41 ^{△△}	50.75±2.07 ^{△△}
阳性药组	38.15±2.18 [*]	514.41±26.90 ^{**}	24.24±1.48 ^{**}	151.34±8.14 ^{**}	48.28±2.62 [*]
提取物低剂量组	37.02±2.60	471.54±31.38 ^{**}	24.52±1.83 [*]	141.00±9.67	48.65±1.53 [*]
提取物中剂量组	37.69±3.32	464.41±22.94 ^{**}	23.40±2.22 ^{**}	143.48±12.05	47.77±1.83 ^{**}
提取物高剂量组	39.07±1.84 ^{**}	459.07±20.61 ^{**}	22.80±1.20 ^{**}	147.10±9.31 [*]	47.85±1.51 ^{**}

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.

表 6 锯叶棕-黄芩提取物对 AGA 模型小鼠皮肤中主要激素及相关因子水平的影响 (给药 42 d)(n = 10)
Tab 6 Effect of saw palmetto-scutellaria bacalensis extract on the levels of major hormones and related factors in the skin of androgenetic alopecia model mice (42 days of administration) (n = 10)

组别	E ₂ / (pmol · L ⁻¹)	T/ (pg · mL ⁻¹)	DHT/ (nmol · L ⁻¹)	SRD5A2/ (U · L ⁻¹)	VEGF/ (pg · mL ⁻¹)	IL-6/ (pg · mL ⁻¹)	TNF-α/ (pg · mL ⁻¹)
空白组	45.54±2.02	442.22±31.24	25.72±1.35	46.65±4.06	154.39±8.80	63.51±5.24	335.09±21.53
模型组	38.96±2.38 ^{△△}	586.07±34.47 ^{△△}	31.58±1.59 ^{△△}	53.59±4.56 ^{△△}	132.81±9.41 ^{△△}	73.52±5.56 ^{△△}	414.32±32.65 ^{△△}
阳性药组	41.40±2.21 [*]	546.92±28.45 [*]	28.26±2.19 ^{**}	48.63±3.31 [*]	150.58±5.56 ^{**}	66.67±4.01 ^{**}	359.62±30.28 ^{**}
提取物低剂量组	40.12±1.75	502.75±30.06 ^{**}	27.92±1.83 ^{**}	48.68±4.61 [*]	136.54±5.07	70.63±6.00	368.91±26.75 ^{**}
提取物中剂量组	41.82±2.09 [*]	510.49±32.88 ^{**}	27.50±2.15 ^{**}	47.99±3.56 ^{**}	137.95±7.48	68.43±4.84 [*]	383.15±34.40
提取物高剂量组	42.17±2.51 ^{**}	493.50±24.88 ^{**}	26.47±1.89 ^{**}	47.01±3.56 ^{**}	142.23±5.48 [*]	67.34±3.99 [*]	371.28±31.87 ^{**}

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.

结合形成复合物，进而抑制 Wnt/β-catenin 信号传导通路，干扰毛囊向生长期转变，最终导致毛发脱落，该途径是雄激素参与 AGA 发生发展的重要途径^[17-18]。在本研究中，模型组小鼠血清及皮肤中 DHT、SRD5A2 含量显著升高。经锯叶棕-黄芩提取物治疗后，这种异常趋势得到了有效逆转，且 E₂ 水平显著上升。据此推测，锯叶棕-黄芩提取物可能通过促进 T 向 E₂ 的转化，同时抑制 SRD5A2 的活性，从而平衡体内的激素水平紊乱，发挥促进毛发生长的作用。

毛乳头细胞分泌的 VEGF 为一种生长因子，可作用于血管内皮细胞，诱导毛囊周围微型血管合成增加进而为毛囊提供营养成分，促进毛发生长，然而，当体内雄激素水平紊乱时，在 T 的作用下，VEGF 的分泌会减少，进而抑制毛囊周围血管的生成，导致脱发^[19-20]。与模型组相比，给药组小鼠体内 VEGF 水平显著升高。这一结果提示，锯叶棕-黄芩提取物可能通过促进毛囊周围血管的生成，改善毛囊血管微循环，从而发挥治疗脱发的作用，为 AGA 的治疗提供了一种新的潜在机制和有效途径。

持续性炎症也是 AGA 的重要诱因之一。大量

巨噬细胞、T 细胞等炎症细胞会聚集在毛囊周围，并渗透到真皮中，释放出 TNF-α 和 IL-6 等炎症因子。这些炎症因子会攻击毛囊干细胞并使其完全失活^[21]。在给予药物治疗后，小鼠皮肤组织中炎症相关因子的水平显著下降，这表明锯叶棕-黄芩提取物可能通过减轻炎症水平，维持毛囊干细胞的正常生理功能，进而促进毛发生长。

C57BL/6 小鼠的毛囊在不同时期会呈现不同的毛发颜色，这一特性让研究者可以通过肤色的变化来鉴别毛发的生长时期。因此，本研究选择 C57BL/6 小鼠来制备 AGA 模型。小鼠皮肤组织病理学结果显示，锯叶棕-黄芩提取物能够显著提升生长期毛囊的占比，同时毛囊的长度、毛球直径和真皮厚度也显著增加。这些结果提示锯叶棕-黄芩提取物对 AGA 模型小鼠具有显著的治疗效果，表明其在促进毛发生长方面具有潜在的应用价值。

综上，锯叶棕-黄芩提取物在干预 AGA 方面表现出显著效果。它能够有效促进毛囊的生长，显著提高真皮层的厚度，并增加生长期毛囊的占比。此外，锯叶棕-黄芩提取物还可调节激素水平、改善毛囊血管微环境以及降低炎症水平等，从而在治疗 AGA 方面发挥重要作用。锯叶棕提取

物已被证明可以抑制 SRD5A2, 从而减少雄性激素的转化, 这对于 AGA 有积极影响。因此, 锯叶棕-黄芩提取物为 AGA 患者提供了一种潜在的有效治疗选择。

参考文献

- [1] 崔伟霞. 脂溢性脱发与代谢综合征的相关性研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [2] 郑雨诗, 胡永轩, 刘康兴, 等. 凤仙花、散沫花及海娜花对小鼠雄激素性脱发的治疗作用及其机制 [J]. 南方医科大学学报, 2019, 39 (11): 1376-1380.
- [3] Bassino E, Gasparri F, Munaron L. Protective role of nutritional plants containing flavonoids in hair follicle disruption: a review [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21 (2): 523.
- [4] Allkanjari O, Vitalone A. What do we know about phytotherapy of benign prostatic hyperplasia? [J]. Life Sci, 2015, 126: 42-56.
- [5] Kwon Y. Use of saw palmetto (*Serenoa repens*) extract for benign prostatic hyperplasia [J]. Food Sci Biotechnol, 2019, 28 (6): 1599-1606.
- [6] 赵子楠, 张建军, 王淳, 等. 锯叶棕的研究进展及中药性能探讨 [J]. 环球中医药, 2019, 12 (7): 1032-1037.
- [7] Bernichtein S, Pigat N, Camparo P, et al. Anti-inflammatory properties of lipidosterolic extract of *Serenoa repens* (Permixon®) in a mouse model of prostate hyperplasia [J]. Prostate, 2015, 75 (7): 706-722.
- [8] 邢飞. 中药活性成分黄芩苷促进毛发生长的相关机制研究 [D]. 武汉: 武汉大学, 2018.
- [9] Wang J, Shen HC, Chen T, et al. Hair growth-promoting effects of Camellia seed cake extract in human dermal papilla cells and C57BL/6 mice [J]. J Cosmet Dermatol, 2022, 21 (10): 5018-5025.
- [10] 陈美琪, 杨嘉玮, 王国平, 等. 中药抑制脉络膜新生血管的研究进展 [J]. 中南药学, 2023, 21 (6): 1550-1556.
- [11] Kim D, Garza LA. The negative regulator CXXC5: making WNT look a little less dishevelled [J]. J Invest Dermatol, 2017, 137 (11): 2248-2250.
- [12] 中国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 29.
- [13] 黄秋伟. 锯叶棕果油的超临界二氧化碳萃取及抗氧化活性研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2019.
- [14] 景林, 余志杰, 胡婷婷, 等. 补气活血生发酊对小鼠雄激素性脱发的影响 [J]. 中成药, 2020, 42 (3): 767-773.
- [15] 刘会, 董文婷, 孙国东, 等. 豆豉对雄激素源性脱发小鼠的血液代谢组学研究 [J]. 中南药学, 2020, 18 (3): 389-395.
- [16] 金丽丽, 李坤, 杨义芳, 等. 抗良性前列腺增生药物作用靶点的研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2009, 44 (3): 161-165.
- [17] Kwack MH, Jang YJ, Won GH, et al. Overexpression of alkaline phosphatase improves the hair-inductive capacity of cultured human dermal papilla spheres [J]. J Dermatol Sci, 2019, 95 (3): 126-129.
- [18] McElwee KJ, Kissling S, Wenzel E, et al. Cultured peribulbar dermal sheath cells can induce hair follicle development and contribute to the dermal sheath and dermal papilla [J]. J Invest Dermatol, 2003, 121 (6): 1267-1275.
- [19] Chen XY, Liu B, Li Y, et al. Dihydrotestosterone regulates hair growth through the Wnt/beta-catenin pathway in C57BL/6 mice and in vitro organ culture [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 1528.
- [20] 张俊霞, 王利. β -catenin 在小鼠雄激素源性脱发模型毛囊分化发育中的作用 [J]. 生物技术, 2020, 30 (2): 194-201, 155.
- [21] Inui S, Itami S. Androgen receptor transactivity is potentiated by TGF-beta1 through Smad3 but checked by its co-activator Hic-5/ARA55 in balding dermal papilla cells [J]. J Dermatol Sci, 2011, 64 (2): 149-151.
- [22] 周乃慧. 血管生成素在人毛囊中的表达及其促毛发生长的作用研究 [D]. 南京: 南京医科大学, 2008.
- [23] Zhang ZWB, Li WB, Chang D, et al. A combination therapy for androgenic alopecia based on quercetin and zinc/copper dual-doped mesoporous silica nanocomposite microneedle patch [J]. Bioact Mater, 2023, 24: 81-95.

(收稿日期: 2024-12-27; 修回日期: 2025-02-25)

巴西人参总皂苷对双酚 A 诱导的 TM4 细胞凋亡改善作用研究

刘佳¹, 路娟², 薛宏伟², 王同瑾², 陈曦², 吴修红^{1*} (1. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040; 2. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193)

摘要: **目的** 探讨巴西人参总皂苷对小鼠睾丸支持细胞 (TM4) 增殖和凋亡的影响。**方法** 采用不同溶剂通过回流提取法对巴西人参总皂苷进行提取, 并测定其含量。建立双酚 A (BPA) 诱导的 TM4 细胞损伤模型, 将处于对数生长期的 TM4 细胞分为空白组、模型组、巴西人参总皂苷 (50、100、200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 组。采用 MTT 法测定细胞活力, 流式细胞术检测细胞凋亡情况, 蛋白免疫印迹法检测凋亡相关蛋白表达情况。**结果** 采用不同溶剂 (水、30% 乙醇、50% 乙醇、75% 乙醇、95% 乙醇) 提取得到的巴西人参提取物 (Pg1 ~ Pg5) 总皂苷含量分别为 20.89%、20.96%、24.26%、18.78%、13.78%。与空白组相比, 模型组细胞存活率显著降低, 细胞凋亡数量显著增加, Pg3 中、高浓度组细胞存活率显著升高, 细胞凋亡数量显著减少。**结论** 巴西人参总皂苷对 BPA 诱导的 TM4 细胞凋亡具有显著的改善作用。

关键词: 巴西人参总皂苷; TM4 细胞; 双酚 A; 细胞凋亡

中图分类号: R285, TS201.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)05-1351-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.026

Improvement of bisphenol A-induced apoptosis in TM4 cells by total saponins in *Pfaffia glomerata*

LIU Jia¹, LU Juan², XUE Hong-wei², WANG Tong-jin², CHEN Xi², WU Xiu-hong^{1*} (1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040; 2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193)

Abstract: Objective To determine the effect of total saponins in *Pfaffia glomerata* [ethanol of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] on the cell proliferation and apoptosis of mouse testis sertoli (TM4) cells. **Methods** The total saponins in *Pfaffia glomerata* were extracted by reflux extraction method with different solvents to assess the content. Injury model of TM4 cells was induced by bisphenol A (BPA), and TM4 cells in logarithmic growth phase were divided into a blank, a model, and 3 *Pfaffia glomerata* total saponin (50, 100, and 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) groups. The cell viability was determined by MTT assay and the apoptosis by flow cytometry, and the expression of apoptosis-related protein was detected by Western blot. **Results** The saponin contents of *Pfaffia glomerata* extract (Pg1 ~ Pg5) with water, 30% ethanol, 50% ethanol, 75% ethanol, and 95% ethanol were 20.89%, 20.96%, 24.26%, 18.78%, and 13.78%, respectively. Compared with the blank group, the cell viability of the model group was obviously reduced and the number of apoptotic cells increased; while the cell viability of the middle and high-dose Pg3 groups was higher and the number of apoptotic cells reduced. **Conclusion** The total saponin of *Pfaffia glomerata* can ameliorate BPA induced apoptosis in TM4 cells.

Key words: total saponin of *Pfaffia glomerata*; TM4 cell; bisphenol A; apoptosis

巴西人参, 又称珙菲亚参, 隶属于苣荬科双子叶植物, 广泛分布于巴西、厄瓜多尔、巴拿马等国的热带雨林地区。巴西人参的根部含有丰富的

活性成分^[1], 如皂苷、多糖、氨基酸、类固醇等, 具有较高的营养价值, 能够在抗炎、抗氧化、抗肿瘤和免疫调节等多个领域展现出显著的药理活

作者简介: 刘佳, 女, 硕士, 主要从事中药药效物质基础及质量评价研究, email: lj200929@126.com ***通信作者:** 吴修红, 女, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药药效物质基础及质量评价研究, email: wxh8088@163.com

性,对人体健康带来多方面的益处,因此在巴西被誉为“巴西仙草”^[2-4]。研究表明,巴西人参提取物在改善修复生殖系统损伤方面具有显著作用^[5],能够通过调节小鼠睾丸的微结构重组,影响曲细精管的组织^[6]。

生精障碍是男性不育的主要原因之一,它涉及精子生成的各个阶段,导致精子数量减少、质量下降或完全无精子。随着现代社会环境污染的加剧、生活节奏的加快、饮食习惯的改变以及心理压力的增大,生精障碍的发病率呈现上升趋势。生殖损伤不仅影响个体的生育能力,还可能对患者的心理健康和社会生活产生负面影响。目前,关于生精障碍的病因学研究认为,遗传因素、环境毒物、内分泌失调、感染、免疫异常、氧化应激以及生活方式等因素均可能参与其中^[7-8]。

TM4 细胞,作为一种与生殖系统密切相关的细胞类型,紧密附着于曲细精管的基膜上,其主要功能是为精原干细胞提供必要的生长、发育以及自我更新的细胞因子,从而保障精子生成过程的正常进行^[9]。研究表明,睾丸支持细胞之间的连接功能一旦损伤,可直接影响精子的生成过程,导致生精功能障碍,进而成为导致男性不育的关键因素之一。因此,减轻 TM4 细胞连接功能损伤可能是预防和治疗男性生殖功能障碍的有效措施之一^[10-11]。双酚 A (BPA) 被广泛用于聚碳酸酯塑料和金属罐内衬的环氧树脂生产、皮革处理,以及多种塑料制品(包括食品包装、儿童玩具等)^[12-13]。此外,BPA 亦能从某些牙科材料,如黏合剂和填充剂中浸出^[14]。BPA 对机体健康损害主要通过干扰细胞自噬、促进细胞凋亡、引起氧化应激和炎症相关通路^[15]。研究表明,BPA 能够诱导生精障碍,通过促进 TM4 细胞发生凋亡,从而对男性生殖系统造成损害^[16]。

本文探究了不同提取溶剂提取的巴西人参总皂苷 Pg1 ~ Pg5 对 BPA 诱导 TM4 细胞损伤模型的保护作用,并考察了 Pg3 对 BPA 诱导 TM4 细胞凋亡的改善情况。

1 材料

1.1 仪器

1000Y 高速多功能粉碎机(永康市铂欧五金制品有限公司);Cary 100 型变温紫外分光光度计(安捷伦科技有限公司);JHBE-50T 型闪式提取器(上海钜帆精密仪器设备有限公司);98-1-B 型电子调温电热套(天津市泰斯特仪器有限公司);JNB-30002 型电子天平(宁波群安实验仪器有限公司);KQ-500DE

型超声波清洗器(昆山舒美超声仪器有限公司);低温冷却液循环泵(DSB-5/20);RE-52AA 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器);FD-1C-50 真空冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);CLM-170B-8CO₂ 细胞培养箱(新加坡 Esco Micro Pte. Ltd. 公司);Multiskan FC 酶标仪(赛默飞世尔科技公司);LE-SH800SA 多功能流式细胞分选系统(日本索尼公司)。

1.2 试药及细胞

巴西人参购于宁波珙菲亚食品有限公司,经中国医学科学院药用植物研究所云南分所李海涛研究员鉴定为苋科植物巴西人参 *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen 的干燥根,采用高速粉碎机进行粉碎,过 3 号标准筛(50 目,孔径 0.3 mm),得到巴西人参粉,备用。

人参皂苷 Re (纯度:99.8%,上海融禾医药科技有限公司);无水乙醇、甲醇、正丁醇(天津市北联精细化学品开发有限公司);高氯酸(天津市鑫源化工有限公司);冰乙酸(天津市永大化学试剂有限公司);香草醛(天津市福晨化学试剂厂);盐酸(北京市通广精细化工公司);实验所用试剂均为分析纯;水为纯化水。DMEM/F12 培养基(南通飞宇生物科技有限公司);马血清(HS,新西兰 NEWZERUM 公司);胎牛血清(FBS,德国 PAN 公司);非必需氨基酸(NAAS)、噻唑蓝溴化四唑(MTT)、磷酸盐缓冲液(PBS)、二甲基亚砜(DMSO)(北京索莱宝科技有限公司);0.05%胰酶(北京迈瑞达科技有限公司);BPA(北京百灵威科技有限公司);FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒、一抗 Bcl-2、Bax(沈阳万类生物科技有限公司); β -actin(江苏亲科生物研究中心有限公司)。

TM4 细胞来源于中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心平台,资源编号为 1101MOU-PUMC000298,传代情况为第 10 代,贴壁生长上皮样细胞。

2 方法

2.1 巴西人参总皂苷的提取

称取巴西人参粉 20 g,分别加入 400 mL 水、30% 乙醇、50% 乙醇、75% 乙醇、95% 乙醇,回流提取 1 h,过滤,收集滤液;滤渣中再分别加入以上相应溶剂 200 mL,回流提取 1 h,过滤,合并滤液,加入其滤液重量 2% 的活性炭,脱色 4 h,抽滤后浓缩,冻干,得冻干粉,按照上述相应提取溶剂分别命名为 Pg1 ~ Pg5,保存备用。

2.2 总皂苷的检测

2.2.1 标准曲线绘制 配制 5% 的香草醛-冰乙酸反

应液及质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的人参皂苷 Re 对照品母液。分别移取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL 人参皂苷 Re 对照品母液置于 6 个 1 mL 量瓶中, 加入甲醇定容, 混匀, 得到不同浓度梯度的人参皂苷 Re 对照品溶液。分别移取 0.5 mL 不同浓度对照品溶液, 于 1.5 mL 离心管中, 70°C 挥发至干。再加入 0.2 mL 反应液及 0.8 mL 高氯酸于 1.5 mL 离心管中, 55°C 水浴 20 min。分别精密移取以上反应液 200 μL 置于 5 mL 离心管中, 加入 1 mL 冰乙酸, 充分混匀, 589 nm 下测定吸光度 (A)。以 A 为纵坐标, 人参皂苷 Re 质量浓度 (C) 为横坐标, 绘制标准曲线。

2.2.2 样本检测 称取待测样品 10 mg 溶解于 1 mL 甲醇中, 吸取 0.5 mL 上清液于 1.5 mL 离心管, 70°C 挥发至干, 加入 0.2 mL 反应液及 0.8 mL 高氯酸, 55°C 水浴 20 min。吸取反应液 200 μL 于 5 mL 离心管中, 加入 1 mL 冰乙酸, 充分混匀后, 589 nm 下检测 A 值。根据 A 值代入标准曲线中计算总皂苷含量。总皂苷得率 (%) = $(C \times V \times n) / m \times 100\%$ 。式中: C : 测定样品总皂苷质量浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); V : 提取液体积 (mL); n : 稀释倍数; m : 冻干粉称样量 (mg)。

2.3 细胞实验

2.3.1 细胞培养 将 TM4 细胞在含有 5%HS、2.5%FBS 及 1%NAAS 的 DMEM/F12 完全培养基培养, 置于 37°C , 5% CO_2 恒温细胞培养箱, 定期观察细胞状态并更换新鲜培养基。待细胞密度达 70% ~ 85% 后, 加入 0.05% 胰蛋白酶 (不含 EDTA, pH 7.2 ~ 7.8) 消化传代, 培养至对数生长期用于后续实验。

2.3.2 Pg1 ~ Pg5 对 TM4 细胞存活率的影响 采用 MTT 法测定细胞活力。取生长状态良好且处于对数生长期的细胞, 加入 0.05% 胰酶消化, 收集细胞悬液, 将 TM4 细胞以 2×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的密度, 每孔 100 μL 接种于 96 孔板中, 置于培养箱中培养 24 h, 弃去旧培养基, 分别加入 100 μL 不同质量浓度 [0 (对照组)、50、75、100、150、200、250、500、1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$] 的巴西人参总皂苷药液, 作用 24 h 后, 每孔加入 20 μL 5% MTT 溶液, 培养箱孵育 4 h, 弃去培养基, 每孔加入 150 μL DMSO, 将 96 孔板置于酶标仪中, 于 590 nm 波长下测定每孔 A 值。以培养基作为空白, 计算细胞存活率, 细胞存活率 (%) = $(\text{测定组 } A \text{ 值} - \text{空白组 } A \text{ 值}) / (\text{对照组 } A \text{ 值} - \text{空白组 } A \text{ 值}) \times 100\%$ 。

2.3.3 BPA 损伤 TM4 细胞模型建立

① 配制 BPA 染毒溶液: 精确称取 2.28 mg BPA

粉末, 溶于 10 mL 培养基中制得 $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BPA 储存液, 以此储存液配制 500、250、225、200、175、150、125、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的染毒液, 0.22 μm 无菌滤膜滤过除菌后, 置于 4°C 保存备用。

② 建立 BPA 诱导 TM4 细胞的损伤模型: 将对数生长期细胞接种于 96 孔板并生长至适宜密度, 弃去旧培养基, 分别加入终浓度为 500、250、225、200、175、150、125、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 染毒液处理 24 h, 分为空白组 (含药培养基), 对照组 (正常细胞 + 培养基) 和给药组 (正常细胞 + 不同浓度含药培养基), 每组设置 6 个重复。染毒结束后, 按照 “2.3.2” 项下方法测定 A 值。根据细胞存活率以及细胞状态等情况, 综合确定 BPA 诱导 TM4 细胞损伤模型的最终浓度。

2.3.4 MTT 法检测 Pg1 ~ Pg5 对 BPA 损伤的 TM4 细胞存活率影响 通过 MTT 法测定不同浓度 Pg1 ~ Pg5 对 BPA 损伤后的 TM4 细胞存活率的影响。待 96 孔板中细胞生长至适宜密度后, 除空白组和对照组外, 其余各组均加入 100 μL 浓度为 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BPA 染毒液, 染毒 24 h 后弃去培养基, 分别加入 100 μL 质量浓度为 50、100、200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (低、中、高浓度) 的 Pg1 ~ Pg5 药液, 模型组及对照组加入基础培养基进行平行实验操作。按照 “2.3.2” 项下方法测定 A 值, 计算各组细胞存活率。

2.3.5 流式细胞仪检测细胞凋亡情况 通过流式细胞仪考察 Pg3 高浓度组对 BPA 损伤的 TM4 细胞凋亡情况。使用 0.05% 胰酶对细胞进行消化, 收集细胞悬液, 以 2×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞密度将 TM4 细胞接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 置于 5% CO_2 的细胞培养箱中 37°C 培养 24 h。除空白组外, 模型组及 Pg3 给药组每孔加入 2 mL 浓度为 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BPA 染毒液, 培养 24 h 后弃去旧培养基, 模型组加入不完全培养基 2 mL, 给药组加入 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Pg3 给药溶液 2 mL, 作用 24 h。弃去旧培养基, 使用 PBS 清洗两遍后, 加入胰酶消化, 收集细胞至离心管中, 1000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心 5 min, 弃上清液, 收集细胞沉淀。加入 PBS, 吹打均匀, 进行细胞计数, 每组收集 5×10^5 个细胞。加入 250 μL Binding Buffer, 5 μL FITC 染料, 10 μL PI 染料, 混匀, 于室温避光孵育 15 min。1 h 内上机检测。

2.3.6 蛋白免疫印迹法检测凋亡相关蛋白 对造模给药后的 TM4 细胞提取蛋白质, 采用 BCA 蛋白浓度试剂盒测定蛋白浓度, 取 25 μg 蛋白样品进行电泳、转膜, 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 一抗 (Bax

1 : 500, Bcl-2 1 : 500, β -actin, 1 : 000) 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 二抗孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次。配制化学发光检测试剂 (试剂 A : 试剂 B = 1 : 1), 与膜孵育 1 min, 曝光显影。

2.4 统计学分析

所有实验结果采用 SPSS 软件进行统计分析, 用单因素方差分析进行组间比较检验。

3 结果

3.1 巴西人参总皂苷的含量

人参皂苷 Re 回归方程为 $y = 1.567x + 0.0948$, $R^2 = 0.9903$, 根据线性回归方程计算巴西人参总皂苷含量, 结果如图 1 所示, 巴西人参总皂苷含量从高到低依次为 Pg3 > Pg2 > Pg1 > Pg4 > Pg5。Pg3 提取物总皂苷含量最高为 24.26%, Pg5 总皂苷含量最低为 13.78%。

3.2 细胞实验结果

3.2.1 Pg1 ~ Pg5 对正常 TM4 细胞活力的影响 如图 2 所示, 正常 TM4 细胞给予不同质量浓度

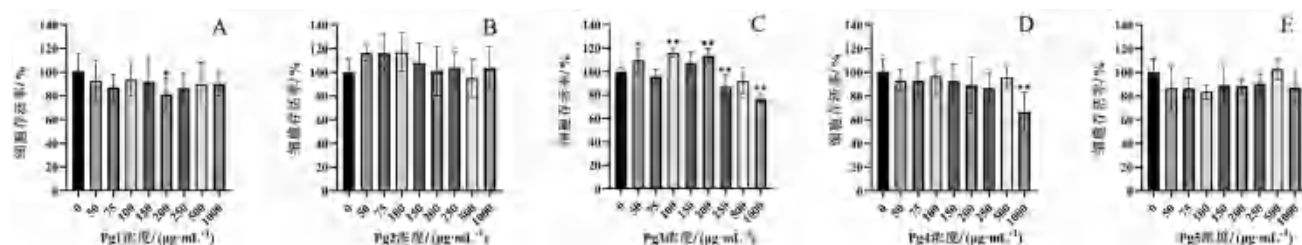


图 2 不同浓度 Pg1 ~ Pg5 对正常 TM4 细胞活力的影响

Fig 2 Effect of different concentrations of Pg1 ~ Pg5 on the viability of normal TM4 cells

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compare with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3.2.2 BPA 损伤 TM4 细胞模型建立 如图 3 所示, 与对照组相比, BPA 染毒液浓度小于 $125 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, BPA 对细胞存活率影响较小, 随着 BPA 暴露浓度升高, TM4 细胞存活率呈下降趋势。经计算, TM4 细胞 IC_{50} 为 $220 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。因此, 选择 BPA 损伤 TM4 细胞模型的条件为: 将细胞以 $2 \times 10^5 \text{ mL/孔}$ 的密度接种于 96 孔板, 每孔 $100 \mu\text{L}$, 置于 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 恒温培养箱中贴壁培养 24 h, 弃去旧培养基, 每孔加入 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BPA 染毒液 $100 \mu\text{L}$ 损伤细胞 24 h 作为后续细胞模型。

3.2.3 Pg1 ~ Pg5 对 BPA 损伤后 TM4 细胞活性的影响 由图 4 可知, 与模型组相比, Pg1 低、中浓度组, Pg2 低、中、高浓度组, Pg3 中、高浓度组及 Pg5 高浓度组可显著提高 BPA 损伤后的 TM4 细胞存活率。且由图 4 可知 Pg3 高剂量组改善效果最好。

3.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡及凋亡相关蛋白

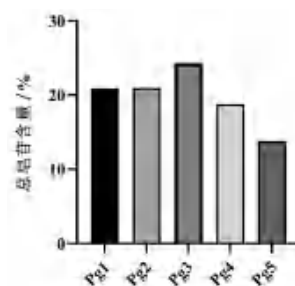


图 1 巴西人参提取物中的总皂苷含量

Fig 1 Total saponin content in *Pfaffia glomerata* extracts

($50 \sim 200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 Pg1 ~ Pg5 作用 24 h 后, 与对照组相比, Pg1、Pg4、Pg5 细胞存活率均呈下降趋势, Pg2 细胞存活率均呈上升趋势, Pg3 除 $75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 均呈上升趋势。Pg3、Pg4 给药质量浓度为 $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 与对照组相比, 细胞存活率差异有统计学意义, 结合光学倒置显微镜对细胞形态和状态进行观察, 其他浓度给药组可能与药物浓度过大致使渗透压变化有关。因此, 选择不超过 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质量浓度的 Pg 进行后续研究。

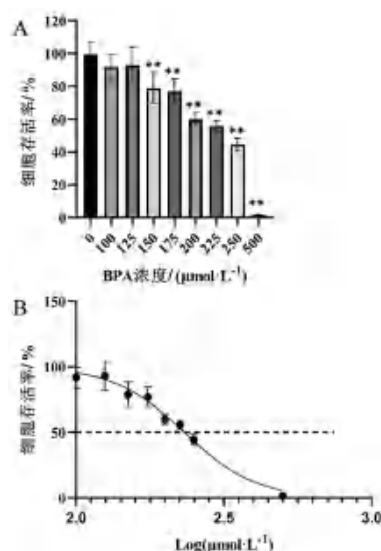


图 3 不同浓度 BPA 对 TM4 细胞存活率的影响

Fig 3 Effect of different concentrations of BPA on the viability of TM4 cells

注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compare with the control group, ** $P < 0.01$ 。

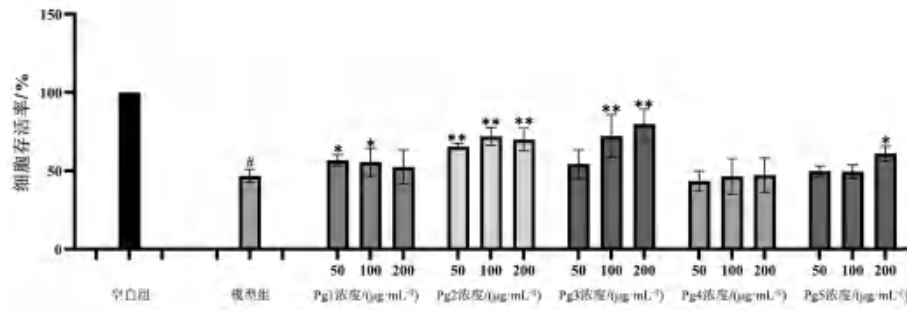


图 4 Pg1 ~ Pg5 对 BPA 损伤的 TM4 细胞存活率影响

Fig 4 Effect of Pg1 ~ Pg5 on the survival of BPA-injured TM4 cells

注：与空白组比较， $^{\#}P < 0.05$ ；与模型组比较， $^*P < 0.05$ ， $^{**}P < 0.01$ 。

Note: Compare with the blank group, $^{\#}P < 0.05$; compare with the model group, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$.

表达 如图 5 所示，空白组 TM4 细胞呈梭形，外形不规则，轮廓不清，细胞核呈椭圆形、三角形或不规则形。BPA 损伤后，细胞皱缩呈圆球状，细胞脱落数量增加，胞体变小，细胞核皱缩。Pg3 给药后细胞形态有所改善。

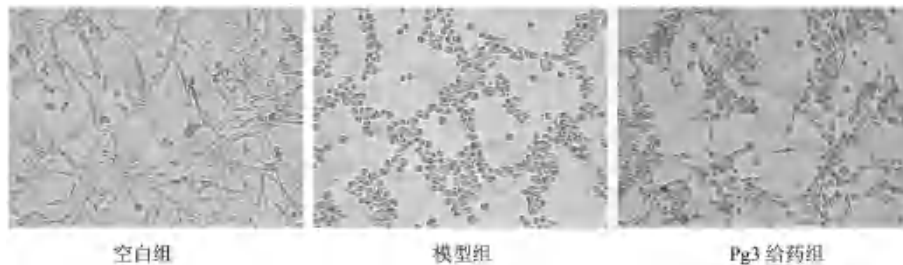


图 5 Pg3 对 BPA 损伤的 TM4 细胞状态的影响 (×200)

Fig 5 Effect of Pg3 on BPA-injured TM4 cells (×200)

由图 6A ~ 6B 可知，与模型组比较，Pg3 给药组细胞凋亡率显著下降。

免疫蛋白印迹法检测，结果表明，与空白组

相比，模型组 Bcl-2 蛋白表达减少，Bax 蛋白表达增加。经 Pg3 给药后，与模型组比较，Bcl-2 蛋白表达增加，Bax 蛋白表达减少 (见图 6C)。

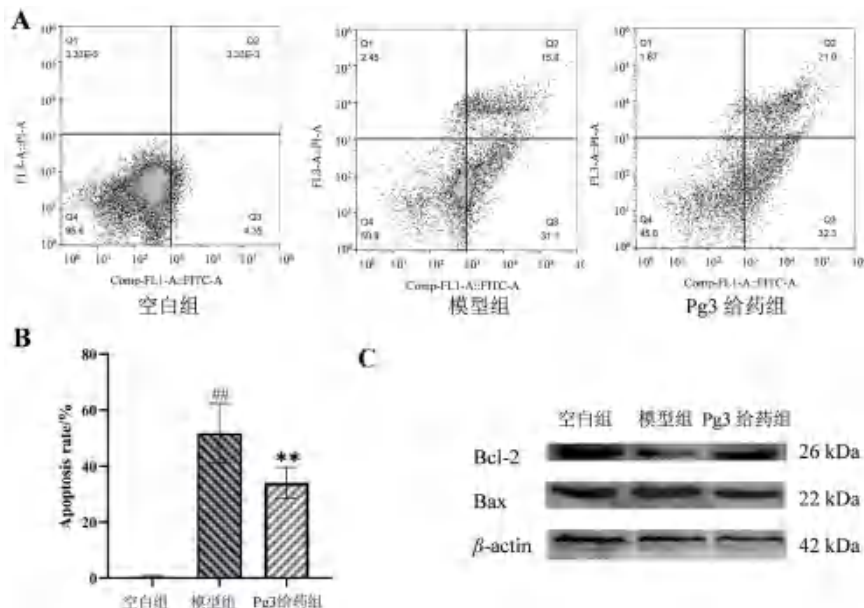


图 6 Pg3 对 TM4 细胞凋亡变化及凋亡相关蛋白的影响

Fig 6 Effect of Pg3 on apoptotic changes and apoptosis-related proteins in TM4 cells

注：与空白组比较， $^{\#}P < 0.05$ ；与模型组比较， $^{**}P < 0.01$ 。

Note: Compare with the blank group, $^{\#}P < 0.05$; compare with the model group, $^{**}P < 0.01$.

4 讨论

本研究初步探索了巴西人参总皂苷的最优提取工艺, 确认最佳提取工艺为: 使用 50% 乙醇进行回流提取、回流时间为 1 h、提取两次、液料比分别为 1:20 和 1:10 (g/mL), 总皂苷含量为 24.26%。相比之下, 回流提取法优于低共熔溶剂提取法 (总皂苷含量仅为 6.26%)^[17]。此外, 细胞存活率结果显示, 巴西人参总皂苷提取物对 TM4 细胞毒性较低。

研究表明, BPA 能诱导 TM4 细胞凋亡, 而导致细胞损伤^[18], 本研究使用 BPA 诱导 TM4 细胞损伤, 经过 Pg1 ~ Pg5 给药后, TM4 细胞损伤情况有所改善。细胞在 BPA 损伤后, 给予一定剂量的 Pg3, 细胞凋亡数量显著降低。这表明 Pg 可能通过抑制 BPA 诱导的细胞凋亡从而起到对 TM4 细胞的保护作用。

本实验显著提高了巴西人参总皂苷的提取效率与得率, 并揭示了其改善 BPA 诱导的 TM4 细胞凋亡的潜在作用, 可为巴西人参的深度开发提供科学依据。

参考文献

- [1] 叶鸿杰, 邓春梅. 巴西人参化学成分及药理作用研究进展 [J]. 广东化工, 2024, 51 (15): 101-103.
- [2] 赵凡, 侯新娟, 王禅缔, 等. 新外来中药巴西人参 (珙菲亚) 的药性探讨 [J]. 环球中医药, 2022, 15 (6): 925-932.
- [3] 路娟, 赵颖, 柴瑞平, 等. 珙菲亚 (巴西人参) 化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中医药信息, 2018, 35 (2): 118-122.
- [4] 吴章丽, 罗建华, 陈浪. 巴西人参栽培技术研究及药用概述 [J]. 热带林业, 2023, 51 (2): 41-44.
- [5] Huang QQ, Wu HY, Qin XM. Extract of *Pfaffia glomerata* ameliorates Paroxetine-induced sexual dysfunction in male mice and the characterization of its phytoconstituents by UPLC-MS [J]. Foods, 2023, 12 (17): 32-36.
- [6] Fernanda CRD, Ana LPM, Fabiana CSA, et al. Hydroalcoholic extract of *Pfaffia glomerata* alters the organization of the seminiferous tubules by modulating the oxidative state and the microstructural reorganization of the mice testes [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 233: 179-189.
- [7] 孟星圻, 彭莉轩, 唐筱涵, 等. BDNF 在生精功能障碍中潜在作用的研究进展 [J]. 中南医学科学杂志, 2024, 52 (1): 150-153.
- [8] 黄磊, 傅松涛, 李秀娟, 等. 间充质干细胞在生精障碍治疗中的应用 [J]. 生命的化学, 2020, 40 (7): 1017-1023.
- [9] 凌晓辉, 刘利敏, 陈佳鸿, 等. 小鼠睾丸支持细胞参与精子发生障碍的单细胞转录组研究 [J]. 中国男科学杂志, 2024, 38 (4): 38-47.
- [10] 赵淑琦, 王彦娜, 倪志晶, 等. 氟咯草酮对小鼠睾丸及 TM4 细胞凋亡和 Nrf2/HO-1 及 NF- κ B 信号通路的影响 [J]. 环境与职业医学, 2023, 40 (6): 673-680.
- [11] 姚志丽, 赵海霞, 马小玉, 等. D-半乳糖对小鼠睾丸 TM4 支持细胞连接功能损伤及淫羊藿素的改善作用研究 [J]. 中国药理学通报, 2024, 40 (9): 1634-1641.
- [12] 孙颖, 白林, 任润涵, 等. 食品接触材料中双酚 A 分析方法的建立及验证 [J]. 中国塑料, 2023, 37 (1): 81-86.
- [13] 肖湾, 马红青, 赵霞. 高效液相色谱法测定皮革中的双酚 A、双酚 F 和双酚 S [J]. 皮革与化工, 2024, 41 (1): 15-17, 22.
- [14] 乔明. 双酚环氧树脂合成的根管糊剂在封闭应用中的粘接效果比较 [J]. 粘接, 2023, 50 (3): 78-81.
- [15] 郭晓洁, 刘江正, 吴昊, 等. 双酚 A 诱导代谢性疾病的发生机制研究进展 [J]. 毒理学杂志, 2024, 38 (1): 71-77.
- [16] 刘暑霞, 柳赞昊, 张玲, 等. 自噬在双酚 A 诱导小鼠睾丸支持细胞凋亡中的作用 [J]. 环境与健康杂志, 2024, 41 (7): 571-578.
- [17] 董明然, 刘佳, 夏念桐, 等. Box-Behnken 响应面法优选低共熔溶剂提取巴西人参总皂苷工艺 [J]. 安徽农业科学, 2024, 52 (22): 162-166.
- [18] 刘暑霞, 张玲, 柳赞昊, 等. PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP 通路在双酚 A 诱导小鼠睾丸支持细胞凋亡中的作用 [J]. 卫生研究, 2023, 52 (4): 591-597.

(收稿日期: 2025-02-18; 修回日期: 2025-03-20)

综述

基于胆汁酸代谢探讨中医药治疗精神疾病的研究进展

张格¹, 吴民民¹, 朱路文^{2*} (1. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江中医药大学附属第二医院康复中心, 黑龙江省脑功能与神经康复重点实验室, 哈尔滨 150001)

摘要: 精神疾病是一类严重影响人类生活质量的疾病, 越来越多的研究表明胆汁酸代谢与精神疾病之间关系密切。胆汁酸代谢可通过影响肠道菌群、神经炎症、能量代谢及脑源性神经营养因子水平等多种途径参与精神疾病的发生发展。中医药在治疗精神疾病方面具有独特优势和丰富经验, 可通过多靶点、多途径调节胆汁酸代谢, 从而改善精神症状。本文探讨了胆汁酸代谢在精神疾病中的发病机制, 以及中医药调节胆汁酸代谢治疗精神疾病的作用, 旨在为中医药治疗精神疾病提供新的思路和靶点。

关键词: 胆汁酸代谢; 精神疾病; 中医药

中图分类号: R283, R285 文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)05-1357-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.027

Research progress in traditional Chinese medicine for mental illness based on bile acid metabolism

ZHANG Ge¹, WU Min-min¹, ZHU Lu-wen^{2*} (1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040; 2. Rehabilitation Center, The Second Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Heilongjiang Key Laboratory of Brain Function and Neurorehabilitation, Harbin 150001)

Abstract: Mental illness severely affects the quality of human life. Recently, growing evidence demonstrated that bile acids, which are metabolites of intestinal microbiota, are closely involved in psychiatric disorders. Bile acid metabolism is related with the occurrence and development of mental disorders by affecting the levels of intestinal flora, neuroinflammation, energy metabolism and brain-derived neurotrophic factors. Traditional Chinese medicine has unique advantages and rich experience in treating mental diseases, which can regulate bile acid metabolism through multiple targets and channels to improve mental symptoms. This article discussed the pathogenesis of the bile acid metabolism in mental diseases and the role of traditional Chinese medicine in regulating bile acid metabolism to treat mental disorders to provide new ideas for the treatment of mental disorders.

Key words: bile acid metabolism; mental disease; traditional Chinese medicine

精神疾病是一类严重危害人类健康的常见病、多发病, 包括抑郁症、焦虑症、精神分裂症等, 其发病机制复杂, 目前尚无完全有效的治疗方法^[1]。近年来研究发现, 胆汁酸代谢与多种精神疾病密切相关, 血液中胆汁酸水平紊乱与情绪

障碍有关^[2]。临床研究发现, 血清石胆酸(LCA)和甘氨胆酸(GCA)水平升高以及鹅脱氧胆酸(CDCA)水平降低与焦虑和抑郁有关^[3]。精神分裂症患者的胆汁酸谱也表现出明显紊乱, 起神经保护作用的胆酸(CA)、CDCA等胆汁酸的减少和

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.82174477)。

作者简介: 张格, 女, 硕士, 主要从事中医康复研究, email: zg1653675133@163.com *通信作者: 朱路文, 男, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 主要从事针康法治疗神经退行性疾病研究, email: zhuluwen1983@126.com

具有细胞毒性的 GCA 增多可能导致精神分裂症患者认知水平下降^[4]。这些胆汁酸可以通过多种方式进入并沉积于大脑中,如脂质转运和代谢、细胞信号传导和能量稳态调节,从而影响精神疾病的发生发展。传统中医药在治疗精神疾病方面具有潜在优势,通过多种成分的协同作用,对多个生物靶点产生影响,这种多靶点的作用机制有助于调节胆汁酸代谢,影响神经系统,从而缓解精神疾病的发展。本文就胆汁酸代谢参与精神疾病的发病机制以及中医药作用于胆汁酸代谢发挥治疗精神疾病作用的相关研究进行综述。

1 胆汁酸代谢概述

1.1 胆汁酸合成与代谢途径

胆汁酸合成包括经典途径与替代途径。经典途径即胆固醇在肝脏中经胆固醇 7 α -羟化酶(CYP7A1)催化生成 7 α -羟胆固醇,经过一系列反应生成游离型初级胆汁酸,如 CA 和 CDCA。初级胆汁酸与甘氨酸或牛磺酸结合生成结合型胆汁酸,随后通过胆管排泄至肠道^[5]。在肠道中,结合型胆汁酸被肠道细菌代谢为次级胆汁酸,如脱氧胆酸(DCA)和 LCA。替代途径是由胆固醇在肝脏以外的组织中经甾醇 27 α -羟化酶催化生成 27-羟基胆固醇,然后再通过氧固醇 7 α -羟化酶对 27-羟基胆固醇和其他氧甾醇的 7 α -羟基化来合成 CDCA^[6]。替代途径在胆汁酸合成中的比例较小,但在某些情况下,如肝脏疾病或肠道菌群失调时,替代途径可能会被激活,从而增加胆汁酸的合成。合成后的胆汁酸在肠道经主动或被动重吸收,由门静脉进入肝脏,在肝脏中游离型胆汁酸再转变为结合型胆汁酸,再随胆汁分泌至肠道,形成胆汁酸的肠肝循环^[7]。正常状态下,人体在一日内需完成 4~12 次肠肝循环以维持胆汁酸池稳态^[8]。

1.2 胆汁酸代谢相关受体

1.2.1 法尼醇 X 受体(FXR) FXR 是一种配体激活的转录因子,参与调节胆汁酸合成、转运和糖脂代谢等过程,在肝脏、回肠以及大脑的皮质神经元中均有高表达^[9]。CYP7A1 是胆汁酸合成过程中的关键限速酶,胆汁酸浓度过高时可激活 FXR,被激活的 FXR 通过小异二聚体伴侣(SHP)诱导负反馈机制使 CYP7A1 转录失活,抑制胆汁酸的产生^[10]。CDCA 被认为是一种高效的 FXR 配体。据报道,CDCA 可通过 FXR-肌球蛋白轻链激酶(MLCK)通路防止脂多糖诱导的肠上皮屏障功能受损,恢复肠道通透性^[11]。此外,FXR 缺失使小鼠记忆力受损,运动协调能力下降,表现出抑郁样和焦虑样行为,且增加了小

鼠血液中胆汁酸的浓度,改变了大脑中胆汁酸的组成及多个脑区神经递质的稳态^[12],表明 FXR 的缺失可产生神经毒性进而影响小鼠的情绪和认知功能。

1.2.2 武田 G 蛋白偶联受体 5(TGR5) TGR5 是第一个已知的胆汁酸特异性 G 蛋白偶联受体,主要分布于肠内分泌 L 细胞的基底外侧和大脑皮质神经元、星形胶质细胞和小胶质细胞中。胆汁酸浓度降低会导致 TGR5 活性下降,从而导致葡萄糖、脂质和能量代谢紊乱,影响免疫调节^[13]。此外,胆汁酸对 TGR5 的激活还介导了环磷酸腺苷(cAMP)-蛋白激酶 A(PKA)-环磷酸腺苷效应元件结合蛋白(CREB)信号传导通路,参与调节海马神经元谷氨酸的释放和摄取^[14]。过量的谷氨酸释放引起兴奋性毒性,进一步诱导突触功能障碍和神经元丢失。目前,胆汁酸受体 TGR5 的研究主要集中在外周系统,它们在中枢神经系统中的功能需要进一步研究。

2 胆汁酸代谢在精神疾病中的作用机制

2.1 调节肠道菌群

当肠道菌群的组成或功能发生变化,即肠道菌群失调时,可导致多种精神疾病的发生^[15]。肠道菌群和胆汁酸之间存在双向调节作用,肠道菌群可以通过脱氢酶及脱羟基酶等作用改变胆汁酸组成成分,还能通过影响 FXR 通路反馈机制调节胆汁酸的合成和重吸收^[16]。而较高浓度的胆汁酸通过干扰 RNA 二级结构、破坏大分子的稳定性、引起 DNA 损伤和促进蛋白质错误折叠,从而破坏肠道菌群的组成,表现出直接的抗菌活性^[17]。靶向代谢组学分析显示精神分裂症患者的 CDCA、熊去氧胆酸(UDCA)、总胆汁酸和非结合胆汁酸的浓度显著降低,且肠道菌群的胆汁酸去结合电位和 FXR 的亲合力指数显著降低,而减少 FXR 的激活可能有助于精神分裂症患者肠道通透性的增加及 C-反应蛋白(CRP)、白细胞介素(IL)-6 的上调^[18]。这项研究证实了精神分裂症患者的胆汁酸代谢异常,且该异常可能与肠道菌群-FXR 信号通路密切相关。此外,在特定潮湿高温环境下出现焦虑样行为的雄性小鼠中,微生物 16SrRNA 测序分析的结果也表明潮湿的高温环境可导致小鼠肠道菌群失调,从而引发血代谢紊乱,代谢组学显示小鼠血清次级胆汁酸水平升高^[19]。皮特霍普金斯综合征(PTHS)是一种严重的孤独症谱系障碍。梭状芽孢杆菌是已知的与孤独症相关的微生物,会化学修饰肠道中的胆汁酸^[20]。临床研究观察到 PTHS 个体中梭状芽孢杆菌的相对丰度较高,而许多经过化学修

饰的胆汁酸在 PTHS 患者中富集, 表明 PTHS 与胆汁酸以及梭状芽孢杆菌之间有潜在的关联^[21]。以上研究表明, 保持肠道菌群和胆汁酸之间的动态失衡可能与精神疾病的发病密切相关。

2.2 调节神经炎症

神经炎症是精神疾病的重要病理特征。在神经炎症过程中, 免疫细胞被激活并迁移到神经系统中, 小胶质细胞为神经系统中常驻的免疫细胞, 在感知到损伤或病原体相关分子后, 迅速被激活, 活化的小胶质细胞释放多种炎症因子, 如 IL-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等^[22]。研究发现胆汁酸代谢与炎症细胞因子的调节有关, 其中 DCA 和 CDCA 是一种强效促炎因子, 可对肝脏、肠道和其他组织造成伤害, 而 UDCA 和牛磺熊去氧胆酸 (TUDCA) 则具有抗炎作用^[23]。有研究发现, TUDCA 干预降低了抑郁小鼠中促炎因子、NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3) 和小胶质细胞活化标志物的含量, 也使氧化亚硝基和内质网应激的标志物正常化^[24], 表明 TUDCA 可能通过神经炎症和内质网应激影响抑郁症的病理进程。综上所述, 胆汁酸可通过激活其受体, 调节 NLRP3 等炎症通路, 导致促炎因子的释放, 从而影响神经炎症, 诱导精神疾病的发生。

2.3 调节能量代谢

能量代谢又被称为中心碳代谢, 是葡萄糖、脂肪酸等营养物质的无氧酵解和有氧呼吸中产生能量、生成小分子代谢物的过程。目前, 精神疾病代谢组学研究提示患者体内会出现能量代谢紊乱、氧化应激和神经递质代谢异常, 而能量代谢相关的代谢产物可作为精神疾病诊断的生物标志物, 指导性地阐明精神疾病的病理发展和致病机制^[25]。已有研究表明, 胆汁酸可通过激活 FXR、TGR5 等受体, 调节糖脂代谢, 从而影响大脑能量供应。例如, 抑郁大鼠会出现糖代谢异常^[26], 而胆汁酸-TGR5-胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 通路是糖代谢的重要途径之一, 通过肠肝循环, 胆汁酸可激活结肠中的 TGR5, 促进 GLP-1 的分泌, 增强 GLP-1 与胰高血糖素样肽-1 受体 (GLP-1R) 的结合, 进而调节肝脏葡萄糖代谢来改善抑郁样行为^[27]。这提示, 该胆汁酸通路导致的葡萄糖代谢紊乱可能为肝郁脾虚型抑郁症的发病机制。脂肪酸是能量供应、细胞膜组成和信号传导的重要组成部分, 也是脂质代谢的基本单元。基于代谢物的富集分析显示, 与正常小鼠相比, 孤独症小鼠肝脏中的代谢物发生变化, 并鉴定出 12 种差异代谢产物, 其中包括苯乙胺、牛磺胆酸和牛磺脱氧胆酸等, 这些代谢物的差异表明小鼠的脂质

代谢、氨基酸和能量代谢均受到干扰。该研究进一步揭示了胆汁酸水平下降可能会影响小鼠的脂质代谢和肝功能, 导致脂质代谢障碍加重疾病进程^[28]。总体来说, 胆汁酸及其受体可以影响糖代谢和脂质代谢过程导致精神疾病发生。

2.4 调节脑源性神经营养因子 (BDNF) 水平

BDNF 作为中枢神经系统中表达最丰富的神经营养因子, 在神经元发育和突触形成过程中发挥着重要作用^[29]。BDNF 水平下降会导致神经元损伤和功能紊乱, 是抑郁症、焦虑症等精神疾病的重要发病因素^[30-31]。部分胆汁酸如 DCA 和 LCA 可作用于 FXR, 抑制 BDNF 的合成, 从而导致焦虑和抑郁。Chen 等^[32]发现经慢性应激处理后的大鼠海马中 FXR 的水平明显增加, 过量表达的 FXR 会加剧抑郁症状, 并明显降低 BDNF 水平, 而敲除 FXR 基因可以防止这些情况的发展, 提示胆汁酸受体 FXR 可以通过调节 BDNF 水平影响抑郁症的发展。另有研究发现焦虑大鼠海马中 CREB 和 BDNF 水平呈下降趋势, CDCA 以浓度依赖性方式在血脑屏障中扩散, 扩散后激活海马神经元中的 FXR, 而 FXR 的激活会抑制 CREB 的活性和 BDNF 的表达, 说明过量的 CDCA 对海马神经元中 FXR 的激活可能会抑制 CREB/BDNF 通路, 损伤神经功能并导致焦虑症的发展^[33]。总之, 胆汁酸代谢紊乱会诱导 BDNF 的下降, 影响神经元存活和生长, 加重精神疾病的发展。

3 中医药调节胆汁酸代谢治疗精神疾病

3.1 单味中药及有效成分

中医认为精神疾病的发生与多种因素有关, 如情志失调、气血失调、脏腑功能紊乱, 对于精神疾病治疗原则以疏肝理气解郁为主。许多研究发现, 单味中药及有效成分在调节胆汁酸代谢治疗精神疾病过程中发挥着重要作用。

柴胡主入肝胆, 具有疏达经气、宣通内外、安肝解忧的作用, 在精神疾病的治疗中广泛应用^[34]。有研究显示, 柴胡低极性部位通过 FXR 受体及其靶基因调节胆汁酸的合成和肝肠循环及脑中相关基因, 抑制炎症因子的表达, 通过肝保护及神经保护作用发挥抗抑郁药效, 说明柴胡低极性部位具有调节脑-肝-肠轴胆汁酸稳态的抗抑郁作用^[35]。李浩然^[36]采用三种模型诱导抑郁症, 即行为绝望模型、脂多糖模型以及慢性社会挫败压力应激 (CSDS) 模型, 发现灵芝酸 A 能直接抑制抑郁小鼠中 NLRP3 炎性小体的活性, 并通过调节前额叶皮层中 FXR 激活 AMPA 受体的磷酸化, 抑制大脑神经炎症, 然而敲除 FXR 或注射 FXR 特异性抑制剂, 灵芝酸 A 的抗抑郁作用则完全消失, 表明灵芝酸 A 可通过调节 FXR

抑制神经炎症起到抗抑郁作用。这可能是灵芝调节神经内分泌和免疫功能,改善代谢以及保护神经系统的物质基础。现代医药学研究证实,熊胆粉主要成分为胆汁酸类,具有清热解毒、平肝利胆的作用^[37]。陶彦林^[38]发现熊胆粉可以有效提高抑郁小鼠去甲肾上腺素含量及血清中 TUDCA 和牛磺鹅去氧胆酸含量,降低血清皮质酮的含量,抑制小鼠肾上腺中 FXR 的基因和蛋白表达水平,提示熊胆粉抗抑郁的作用机制可能与调节胆汁酸稳态、减少糖皮质激素的生成、抑制下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴功能亢进有关。上述研究结果表明中药及其有效成分可能通过发挥肝保护和神经保护作用,抑制神经炎症、HPA 轴功能调节胆汁酸及其受体治疗精神疾病。

3.2 中药复方

除了单味中药外,中药复方也可以多途径地改善精神疾病的症状,中药复方的组成中药较多,具体作用机制较为复杂。柴胡疏肝散由陈皮、柴胡、川芎、香附、枳壳、芍药、甘草组成,以疏肝理气、活血止痛为主,通过大鼠肝组织的基因和代谢组学研究发现该复方可下调 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)和 B 淋巴细胞瘤相关 X 蛋白(Bax)mRNA 表达,增加 Bax/Bcl-2 mRNA 表达,抑制慢性应激引起的肝细胞凋亡,调节磷脂和胆汁酸代谢水平,进而改善抑郁大鼠的肝损伤^[39],表明柴胡疏肝散对抑郁症相关肝损伤具有保护作用。柴胡加龙骨牡蛎汤最早见于《伤寒论》,该方既可和解少阳又有安神定志的功效。研究发现柴胡加龙骨牡蛎汤可改善精神分裂大鼠的异常行为,

促进机体免疫因子水平的稳定,提高大鼠免疫功能,调节厚壁菌门和拟杆菌门的数量及原发性胆汁酸生物合成^[40],揭示了柴胡加龙骨牡蛎汤对精神分裂症的防治作用。逍遥散由柴胡、当归、白芍、白术、茯苓、炙甘草、薄荷和生姜组成,是治疗肝郁脾虚型抑郁症的经典方剂。逍遥散低极性部位可提高大鼠海马 BDNF 水平及微生物群的多样性,同时增加盲肠内容物中牛磺酸、亚牛磺酸代谢及初级胆汁酸生物合成,显著改善大鼠的抑郁样行为^[41]。丹栀逍遥散治疗肝郁化火证的经典名方,具有疏肝解郁、健脾清热之功效,现代临床常用来治疗肝郁化火型焦虑症。在慢性束缚应激诱导的大鼠焦虑症中,丹栀逍遥散能够上调左旋肉碱、棕榈酰肉碱、GCA 及 DCA 的水平,调节脂肪酸与胆汁酸代谢进而改善焦虑样行为^[42],该复方对胆汁酸的调节与中医里“木能疏土”的思想不谋而合。开心解郁丸以人参和柴胡为君药,具有培元补虚、益气开郁的作用。研究发现开心解郁丸能促进抑郁大鼠胆汁酸代谢恢复正常,抑制肝脏、回肠和下丘脑内的 FXR 水平,同时提高下丘脑内成纤维生长因子 19(FGF19)的表达^[43],该研究表明开心解郁丸可能通过调控 FXR-FGF19 通路,维护肠-肝-脑轴内胆汁酸代谢稳定而发挥作用。可见,中药复方主要通过抑制肝细胞凋亡、改善肠道菌群多样性、增加 BDNF 水平、调节脂肪酸代谢及 FXR 通路从而纠正胆汁酸代谢异常,以达到治疗精神疾病的目的。

单味中药及中药复方基于胆汁酸代谢对精神疾病的作用机制汇总见表 1。

表 1 单味中药及中药复方基于胆汁酸代谢对精神疾病的作用机制

Tab 1 Mechanism of single traditional Chinese medicine and traditional Chinese medicine compound on mental disorders based on bile acid metabolism

中药	作用模型	作用机制	文献
柴胡	慢性不可预测的轻度应激 (CUMS) 模型大鼠	血清和回肠总胆汁酸 (TBA) ↓, 肝和盲肠 TBA ↑, 血清 UDCA ↑, LCA ↓, TCA ↓, 肝脏 TCA ↓, UDCA ↑, FXR ↓, CYP7A1 ↑, CYP27A1 ↓, CYP7B1 ↓, TGR5 ↑, IL-1β ↓, TNF-α ↓, 回肠 TLCA ↓, FXR ↑, FGF15 ↑, IL-1β ↓, IL-6 ↓, 盲肠内容物 UDCA ↑, TUDCA ↑, TCDCA ↑, 海马 DCA ↓, FXR ↓, SHP ↓, IL-1β ↓, IL-6 ↓, TNF-α ↓, BDNF ↑, CREB ↑	[35]
灵芝酸 A	行为绝望模型、脂多糖模型、CSDS 模型小鼠	前额叶皮层 FXR ↑、半胱天冬酶 1 前体 (Pro-Caspase-1) ↓、Caspase-1 ↓、Pro-IL-1β ↓、IL-1β ↓、NLRP3 ↓, 抑制小胶质细胞和星形胶质细胞过度激活	[36]
熊胆粉	CUMS 模型小鼠	血清 NE ↑, TUDCA ↑, TCDCA ↑, 皮质酮 ↓, 肾上腺 FXR mRNA ↓	[38]
柴胡疏肝散	CUMS 模型大鼠	肝脏 Bax mRNA ↓, Bcl-2 mRNA ↓, Bax/Bcl-2 mRNA ↑, TUDCA ↑, 谷氨酸脱羧酶 1 (Gad1) mRNA ↓, 胆汁酸辅酶 A (Baat) mRNA ↑	[39]
柴胡加龙骨牡蛎汤	地卓西平马来酸盐 (MK-801) 模型大鼠	血清 IL-2 ↑, IFN-γ ↑, IL-6 ↓, TNF-α ↓, SOD ↑, 海马 DA ↑, 5-HT ↑, NE ↑, 厚壁菌门 ↓, 拟杆菌门 ↓, 促进胆汁酸代谢通路	[40]
逍遥散	CUMS 模型大鼠	海马 BDNF ↑, 盲肠牛磺酸 ↑、亚牛磺酸 ↑、胆汁酸 ↑、DCA ↑、TUDCA ↑, 菌群多样性 ↑, 拟杆菌门丰度 ↓、普雷沃氏菌属丰度 ↓、罗斯氏菌属丰度 ↑	[41]
丹栀逍遥散	慢性束缚应激大鼠	血浆 GCA ↑, DCA ↑、左旋肉碱 ↑、棕榈酰肉碱 ↑、吲哚 ↓	[42]
开心解郁丸	CUMS 模型大鼠	血清和丘脑 TBA ↓, 肝、肠、下丘脑 FXR ↓, 下丘脑 FGF-19 ↑	[43]

4 结论与展望

目前,胆汁酸代谢在精神疾病中的作用研究已经取得了一定的进展,研究初步揭示了两者在肠道菌群、神经炎症、能量代谢和 BDNF 方面的机制关系。单味中药及其有效成分或中药复方通过调节肠道菌群多样性、抑制神经炎症、增加 BDNF 含量、发挥肝保护和神经保护作用等多种途径达到治疗精神疾病的效果,而这都与胆汁酸及其受体密切相关。

虽然基于胆汁酸代谢为中医药治疗精神疾病提供了作用机制的理论依据,但是仍存在以下问题和挑战:①胆汁酸代谢与精神疾病的机制关系尚未完全阐明,需要进一步研究;②部分研究没有对精神疾病的轻重程度和证型做明确区分,在整个疾病的治疗过程中采用同种复方,阻碍了中药在临床研究中的广泛应用;③由于中药成分较为复杂,在用法和剂量上的选择需要慎重,其安全性有待进一步验证;④目前中药调节胆汁酸代谢治疗精神疾病的临床研究匮乏,仍有较大的研究空间和前景。未来需要针对以上不足建立更多高质量的研究,以期精神疾病的治疗提供更可靠的证据。

参考文献

- [1] 黄辰杰,樊明理,杜晓娜,等.合欢对精神疾病的药理作用及机制研究进展[J].药物评价研究,2024,47(8):1929-1936.
- [2] Wu LR, Zhao ML, Li MC, et al. The clinical and mechanistic roles of bile acids in depression, Alzheimer's disease, and stroke[J]. Proteomics, 2022, 22(15-16): e2100324.
- [3] MahmoudianDehkordi S, Bhattacharyya S, Brydges CR, et al. Gut microbiome-linked metabolites in the pathobiology of major depression with or without anxiety-a role for bile acids[J]. Front Neurosci, 2022, 16: 937906.
- [4] 戚志扬,马青艳,贾敏,等.急性期精神分裂症患者血清胆汁酸谱与认知功能的相关性[J].西安交通大学学报(医学版),2024,45(4):650-655.
- [5] 辜雪莲,李俊峰,毛小荣.肠道菌群在非酒精性脂肪性肝病中的研究进展[J].肝脏,2021,26(12):1418-1420.
- [6] 何逸飞,王奇金.胆汁酸与糖脂代谢疾病[J].第二军医大学学报,2017,38(6):780-784.
- [7] 段晓延,扈金萍.胆汁酸转运体与相关疾病及药物研发进展[J].药科学报,2022,57(12):3576-3586.
- [8] Collins SL, Stine JG, Bisanz JE, et al. Bile acids and the gut microbiota: metabolic interactions and impacts on disease[J]. Nat Rev Microbiol, 2023, 21(4): 236-247.
- [9] 李森,谢贞,郁昊.精神疾病的胆汁酸标记物研究进展[J].精神医学杂志,2022,35(5):540-542.
- [10] 冼锐,董昌昊,王广祥,等.法尼醇 X 受体在肠道疾病中的研究进展[J].胃肠病学和肝病学杂志,2024,33(10):1362-1367.
- [11] Song M, Ye JY, Zhang FL, et al. Chenodeoxycholic acid (CDCA) protects against the lipopolysaccharide-induced impairment of the intestinal epithelial barrier function via the FXR-MLCK pathway[J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(32): 8868-8874.
- [12] Huang F, Wang TT, Lan YY, et al. Deletion of mouse FXR gene disturbs multiple neurotransmitter systems and alters neurobehavior[J]. Front Behav Neurosci, 2015, 9: 70.
- [13] 吴玉琦,张安琪,万瑾毅,等.从胆汁酸代谢阐释肝脾失调在痰湿体质易发代谢紊乱中的作用机制[J].世界中医药,2024,19(15):2303-2307.
- [14] Riggs LM, Pereira EFR, Thompson SM, et al. cAMP-dependent protein kinase signaling is required for (2R, 6R)-hydroxynorketamine to potentiate hippocampal glutamatergic transmission[J]. J Neurophysiol, 2024, 131(1): 64-74.
- [15] 张思佳,高海女,李旭娟.粪菌移植在神经精神疾病治疗中的应用[J].中国微生态学杂志,2024,36(6):723-727, 732.
- [16] 曾忠花,刘容容,汤俐,等.肠道菌群与胆汁酸代谢的相互作用[J].中国微生态学杂志,2021,33(7):849-856.
- [17] Collins SL, Stine JG, Bisanz JE, et al. Bile acids and the gut microbiota: metabolic interactions and impacts on disease[J]. Nat Rev Microbiol, 2023, 21(4): 236-247.
- [18] Qing Y, Wang PK, Cui GP, et al. Targeted metabolomics reveals aberrant profiles of serum bile acids in patients with schizophrenia[J]. Schizophrenia (Heidelb), 2022, 8(1): 65.
- [19] Weng HD, Deng L, Wang TY, et al. Humid heat environment causes anxiety-like disorder via impairing gut microbiota and bile acid metabolism in mice[J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 5697.
- [20] Quinn RA, Melnik AV, Vrbanc A, et al. Global chemical effects of the microbiome include new bile-acid conjugations[J]. Nature, 2020, 579(7797): 123-129.
- [21] Dilmore AH, McDonald D, Nguyen TT, et al. The fecal microbiome and metabolome of pitt hopkins syndrome, a severe autism spectrum disorder[J]. mSystems, 2021, 6(6): e0100621.
- [22] 彭真,张晗,李新悦,等.小胶质细胞对缺血性卒中的双重调控及中药对其调节作用的研究进展[J].天津中医药大学学报,2024,43(9):825-833.
- [23] 刘辉,汪保英,许二平,等.胆汁酸代谢在抑郁症中的研究进展[J].中国病理生理杂志,2024,40(7):1351-1355.
- [24] Lu X, Yang RR, Zhang JL, et al. Tauroursodeoxycholic acid produces antidepressant-like effects in a chronic unpredictable stress model of depression via attenuation of neuroinflammation, oxido-nitrosative stress, and endoplasmic reticulum stress[J]. Fundam Clin Pharmacol, 2018, 32(4): 363-377.
- [25] 彭锐,李艳.基于代谢组学筛选精神疾病诊断生物标志物的研究进展[J].精神医学杂志,2017,30(4):310-313.

- [26] 卢宇佳, 邵晨, 张珊, 等. 电针通过 PI3K/Akt/GSK3 β 信号通路调节抑郁大鼠糖代谢紊乱 [J]. 针刺研究, 2023, 48 (3): 247-252.
- [27] 宋美芳. 从胆汁酸-TGR5-GLP-1 通路探讨抑郁模型大鼠糖代谢异常及逍遥散的作用机理 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [28] Cao C, Wang D, Zou MY, et al. Untargeted metabolomics reveals hepatic metabolic disorder in the BTBR mouse model of autism and the significant role of liver in autism [J]. Cell Biochem Funct, 2023, 41 (5): 553-563.
- [29] 王静, 赵义林, 肖文焕, 等. 精神分裂症与双相障碍患者血液学炎症标志物及脑源性神经营养因子的比较 [J]. 实用临床医药杂志, 2021, 25 (22): 74-77.
- [30] 冯敏瑶, 罗冬强, 潘梓珊, 等. 黄连温胆汤治疗经皮冠状动脉介入术后合并焦虑抑郁状态疗效观察 [J]. 广州中医药大学学报, 2023, 40 (12): 3006-3012.
- [31] 罗佳丽, 章杰, 万静, 等. 精神分裂症患者脑源性神经营养因子基因多态性与临床症状的关系 [J]. 四川精神卫生, 2023, 36 (5): 409-415.
- [32] Chen WG, Zheng JX, Xu X, et al. Hippocampal FXR plays a role in the pathogenesis of depression: a preliminary study based on lentiviral gene modulation [J]. Psychiatry Res, 2018, 264: 374-379.
- [33] Chen SM, Shao Q, Chen JY, et al. Bile acid signalling and its role in anxiety disorders [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2023, 14: 1268865.
- [34] 冯渝梅, 李惠珍, 艾志福, 等. 柴胡防治精神神经疾病的共有物质基础及其生物学机制系统解析 [J]. 中草药, 2024, 55 (1): 307-319.
- [35] 李静. 基于 FXR 调控胆汁酸稳态的柴胡低极性部位抗抑郁作用研究 [D]. 太原: 山西大学, 2021.
- [36] 李浩然. 灵芝酸 A 调控 FXR 受体抑制 NLRP3 炎症小体发挥抗抑郁作用的机制研究 [D]. 昆明: 云南大学, 2022.
- [37] 韩莹, 孙晖, 邱丽萍, 等. 熊胆药用特殊价值及其药效物质基础研究 [J]. 中医药信息, 2020, 37 (1): 12-18.
- [38] 陶彦林. 熊胆粉调节 FXR/ 糖皮质激素水平抗抑郁作用及机制研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2021.
- [39] Jia HM, Yu M, Ma LY, et al. Chaihu-Shu-Gan-San regulates phospholipids and bile acid metabolism against hepatic injury induced by chronic unpredictable stress in rat [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2017, 1064: 14-21.
- [40] 林佩琦. 柴胡龙骨牡蛎汤对精神分裂模型大鼠的肠道菌群多样性及代谢组学影响的研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2018.
- [41] 冯彦, 孟美黛, 冯建有, 等. 基于多维组学探究逍遥散低极性部位对 CUMS 模型大鼠的抗抑郁作用 [J]. 药学报, 2020, 55 (2): 305-314.
- [42] 韦姗姗, 陆登成, 陈帅, 等. 丹栀逍遥散干预焦虑行为大鼠的血浆代谢组学研究 [J]. 中药药理学与临床, 2023, 39 (10): 29-35.
- [43] 翟吴剑文. 开心解郁丸调控“肠-肝-脑轴”内胆胆汁酸代谢的抗抑郁机制研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2022.

(收稿日期: 2024-11-06; 修回日期: 2024-12-20)

ADAM10 在动脉粥样硬化中的作用

陈耿超¹, 何俊冰³, 张隆盛^{1, 4}, 徐名伟^{1, 2*} (1. 广东医科大学第一临床医学院, 广东 湛江 524023; 2. 揭阳市人民医院心血管内科, 广东 揭阳 522000; 3. 揭阳市人民医院揭阳市医学科研实验中心, 广东 揭阳 522000; 4. 揭阳市人民医院麻醉科, 广东 揭阳 522000)

摘要: 动脉粥样硬化 (AS) 是一种慢性炎症反应性疾病, 炎症机制贯穿了整个 AS 病变的起始、进展和并发症形成的全过程。去整合素金属蛋白酶 10 (ADAM10) 是去整合素金属蛋白酶中重要的一员, 可通过多种信号通路调节炎症从而影响 AS 的发生与发展。由此可见, ADAM10 有望为动脉粥样硬化性心血管疾病的诊断和治疗提供新的重要靶点, 本文旨在总结 ADAM10 在 AS 中的研究进展及未来治疗 AS 的前景。

关键词: 动脉粥样硬化; 去整合素金属蛋白酶 10; Notch 信号通路; fractalkine/CX3CR1 信号通路; 血管内皮生长因子; CXCL16/CXCR6 信号通路

中图分类号: R543.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)05-1362-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.028

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金项目 (No. 2024A1515011337); 广东省医学科学技术研究基金 (No. A2021400, No. B2018001); 广东省中医药局面上科研项目 (No. 20191409, No. 20201463)。

作者简介: 陈耿超, 男, 硕士研究生, 主要从事心血管内科方面的研究, email: 15989221870@163.com *通信作者: 徐名伟, 男, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事心血管内科方面的研究, email: 3054932080@qq.com

Role of ADAM10 in atherosclerosis

CHEN Geng-chao¹, HE Jun-bing³, ZHANG Long-sheng^{1,4}, XU Ming-wei^{1,2*} (1. *The First Clinical Medical College, Guangdong Medical University, Zhanjiang Guangdong 524023*; 2. *Department of Cardiology, Jieyang People's Hospital, Jieyang Guangdong 522000*; 3. *Jieyang Medical Research Center, Jieyang People's Hospital, Jieyang Guangdong 522000*; 4. *Department of Anesthesiology, Jieyang People's Hospital, Jieyang Guangdong 522000*)

Abstract: Atherosclerosis (AS) is a chronic inflammation reactive disease, and inflammation runs through the entire process of AS, including the initiation, progression and the complication development. A disintegrin and metalloproteinase 10 (ADAM10) is an important member of the disintegrin metalloproteinases, which can regulate inflammation through multiple signaling pathways and thus affect the occurrence and development of AS. It can be seen that ADAM10 is expected to become a new target for the diagnosis and treatment of atherosclerotic cardiovascular diseases. This article summarized the progress of ADAM10 in AS research and prospects for AS treatment.

Key words: atherosclerosis; ADAM10; Notch signaling pathway; fractalkine/CX3CR1 signaling pathway; VEGF; CXCL16/CXCR6 signaling pathway

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是常见的心脑血管系统疾病, 其主要表现为动脉壁变硬, 动脉内膜上脂质类物质聚集、纤维组织增生和钙质沉着。由于形成的斑块类似粥, 因此称为“动脉粥样硬化”^[1]。目前, 虽然有许多控制 AS 的药物, 包括他汀类药物、胆固醇吸收抑制剂、前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 抑制剂 (PCSK9 抑制剂) 以及抗炎药物等, 但随着生活质量的提升, 我国 AS 的发病率仍呈上升趋势。AS 所引起的动脉粥样硬化性心血管疾病是我国心血管疾病患者死亡的主要原因, 因此控制 AS 的形成及进展显得尤为重要。AS 的确切病因仍尚未明确, 关于 AS 的发病机制有多种学说, 包括脂质渗入学说、损伤-应答反应学说、慢性炎症学说等。其中慢性炎症学说认为炎症机制贯穿了 AS 病变的起始、进展和并发症形成的全过程, 通过慢性炎症过程可致使内皮细胞 (endothelial cells, ECs) 损伤, 进而使低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 和炎症细胞进入内皮下形成泡沫细胞进一步发展为 AS。炎症作为 AS 驱动因素的概念并没有取代低密度脂蛋白 (LDL) 等传统驱动因素, 反而是提供了更多传统危险因素诱导 AS 疾病及其并发症的机制。ADAM10 是去整合素金属蛋白酶 (ADAM) 中重要的一员, 其基因位于人类 15 号染色体 15q21.3-q23, 主要介导炎症反应^[2]。目前关于 ADAM10 导致 AS 机制的研究大多表明其通过调节炎症介质从而损伤血管 ECs, 促进巨噬细胞、平滑肌细胞等形成泡沫细胞, 进而影响 AS

的进展。因此, 研究 ADAM10 在 AS 发生发展中的作用机制有望为 AS 诊断及治疗提供新的思路。

1 AS 的发生、发展

AS 发生的首要条件便是血管 ECs 损伤, 在血管 ECs 损伤的基础上, 血液中大量的 LDL 被修饰为氧化 LDL (ox-LDL), 并进入动脉内膜中; 与此同时, 在炎症介质等的介导下, 巨噬细胞进入血管内膜, 与平滑肌细胞一起吞噬 ox-LDL, 形成泡沫细胞, 泡沫细胞聚集在一起, 最终便形成纤维帽, 进一步发展便形成了 AS; 而 AS 形成后, 若进一步进展, 当累及颈动脉、大脑动脉引起颈动脉、大脑动脉狭窄时, 可导致大脑动脉粥样硬化性脑梗死; 当累及冠状动脉时, 可引起冠状动脉粥样硬化性心脏病, 继续加重便可出现心绞痛、心肌梗死等。而在整个 AS 发生、发展过程中, 炎症反应几乎全程参与其中, AS 也被认为是一种慢性炎症性疾病^[3]。

2 ADAM10 的概述

去整合素金属蛋白酶是一类兼具蛋白水解酶活性和细胞黏附调节功能的跨膜或分泌型蛋白家族, 该家族含有 34 个跨膜蛋白成员, 典型的去整合素金属蛋白酶包括 N-末端信号序列、金属蛋白酶域、去整合素域、半胱氨酸富集域、表皮生长因子样结构域、跨膜域以及胞内域, 而其家族的每个成员均含有一个去整合素域和一个金属蛋白酶域。该家族主要具有两种功能, 一种是细胞黏附功能, 另一种是对不同细胞表面受体和信号分子的胞外结构域进行蛋白水解加工的功能。其中, ADAM10 为去

整合素金属蛋白酶中重要的成员之一,是一种具有 748 个氨基酸的 I 型跨膜糖蛋白,是一种重要的 α 分泌酶,能够触发连续的跨膜蛋白水解过程,可调控细胞内信号的传递以及调节生长因子、黏附分子、受体和细胞因子的活性,其在内皮细胞、血管平滑肌细胞、白细胞内均有所表达,而这些细胞均参与了 AS 的发生、发展。许多与 ADAM10 相关的底物,如 Notch、趋化因子 CX3CL1 等均参与血管生成、发育及再生的过程。目前已有大量研究证实 ADAM10 与炎症性疾病、肿瘤、AS 和阿尔茨海默病(AD)等疾病相关。

3 ADAM10 与 AS 关系的研究

近年来越来越多文献报道了 ADAM10 与 AS 的发生与发展密切相关。Donners 等^[4]在人体 AS 斑块组织中,斑块从早期到进展期再到破裂的过程中 ADAM10 显著增加,这充分说明了 ADAM10 与 AS 的发生及发展存在密切联系;另外, van der Vorst 等^[5]的研究则发现了内皮 ADAM10 控制细胞对 ox-LDL 的反应,ADAM10 缺乏会加剧小鼠 AS 伴斑块内出血和新生血管形成,可见 ADAM10 可能对于 AS 斑块的稳定有一定的作用;有研究^[6-7]通过对比 2 型糖尿病患者以及 2 型糖尿病合并颈动脉粥样硬化患者的血清中 ADAM10 的水平,均发现了血清中 ADAM10 水平升高会加重颈动脉粥样硬化的病情;Li 等^[8]通过检测 ADAM10 在 AS 斑块组织和 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞中的表达并计算巨噬细胞胆固醇外排率后发现,ADAM10 在 AS 中高度表达,沉默 ADAM10 可抑制 AS 中的炎症反应并促进胆固醇外排;Tang 等^[9]通过实验也发现了 ADAM10 能够促进 AS 并能调节 AS 中的炎症反应及胆固醇的外排。由此可见,ADAM10 调控着 AS 的发生发展,且对 AS 的发生发展主要表现为促进作用。

4 ADAM10 致 AS 可能的机制

4.1 ADAM10 与 Notch 信号通路

ADAM10 是 Notch 信号的关键调节因子之一,Notch 配体与 Notch 受体结合后暴露出 Notch 受体胞外结构域的切割位点,进而被 ADAM10 切割,而后其胞内结构域被称为 γ -分泌酶(γ -secretase)的膜内蛋白水解酶裂解或内吞,进而使 Notch 胞内域(NICD)从其膜锚定中释放出来,参与多种信号传导或进入细胞核激活 Notch 依赖的转录^[10](如图 1 所示)。由此可见如果没有 ADAM10 的预先处理,Notch 信号通路则无法顺利完成信号传导;且大量研究也表明在 ECs 缺失 ADAM10 基因的小鼠 Notch 相关靶基因会受损,进而导致小鼠心脏和血管床的缺陷而致使小鼠无法存活^[11]。此

外,在细胞生物学研究中,Alabi 等^[12]发现金属蛋白酶 ADAM10 是 Notch1 酶切位点 2 所必需的,而在对 Notch2 和 Notch3 的研究中也报告了类似的结果,它们也需要 ADAM10 来进行调控^[13],由此可见 ADAM10 为 Notch 信号通路的关键调节因子。

Notch 是一种进化上保守的细胞信号通路,介导细胞间通信,参与大多数组织发育和稳态的调节。越来越多的证据表明,Notch 可以防止炎症细胞因子引起的内皮功能障碍^[14],并且 Notch 受体介导 ECs 和血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)之间的通信,并调节细胞表型^[15-16]。活化的 Notch 提供抗炎、抗 AS 和促生存的环境^[17-18],并通过介导 ECs 中紧密连接复合物的形成来维持内皮的完整性^[19-20]。由此可见,似乎 Notch 信号通路能够阻止 AS 的发生。然而,也有研究表明,Notch 可通过控制巨噬细胞向 M1 或 M2 亚型分化来调节 AS^[21]。Notch1 可通过促进多种炎症因子[如白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等]的分泌,诱导巨噬细胞向 M1 分化,增强炎症反应。另外, γ -分泌酶抑制剂,即 Notch 抑制剂(DAPT),可以通过减少巨噬细胞的迁移、抑制巨噬细胞中细胞间黏附因子-1 的表达,从而减少载脂蛋白 E 基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠斑块中的巨噬细胞浸润^[22];另一项研究也表明,DAPT 能够增强肝 X 受体配体激动剂在 ApoE^{-/-}小鼠中的抗 AS 活性,同时限制了高三酰甘油血症和脂肪肝的发展^[23]。因此,ADAM10 作为 Notch 信号通路的关键调节因子,在 AS 的不同阶段可能所发挥的作用不同,其对血管 ECs 可能既有保护作用,也有促进 AS 发展的作用。

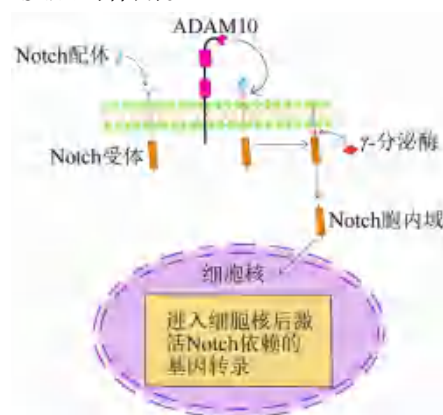


图 1 ADAM10 在 Notch 信号通路中的作用机制图

Fig 1 Mechanism diagram of ADAM10 in the Notch signaling pathway

4.2 ADAM10 与 fractalkine/CX3CR1 信号通路

Fractalkine (FKN, CX3CL1),也称为 CX3C 趋化因子配体 1,属于 CX3C 趋化因子家族的唯一成员,是一种跨膜趋化因子,而 ADAM10 是一种调

节单核细胞黏附和迁移的膜蛋白酶, Jiang 等^[24]研究发现 *ADAM10* 的敲低会降低基质金属蛋白酶 12 (MMP-12)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、TNF- α 和 FKN 的活性, 而 *ADAM10* 过表达则产生相反的效果, 并发现 *ADAM10* 被脂多糖 (LPS) 激活, 并通过在炎症过程中正向调节 MMP-12, 积极参与 LPS 刺激的巨噬细胞炎症反应。可见 *ADAM10* 可调节 FKN 的活性。另外, *ADAM10* 还可介导 FKN 的组成性切割^[25], 将膜结合型 FKN 切割成可溶性 FKN (sFKN), 而这种 sFKN 结构上只含有趋化蛋白功能区和一部分黏蛋白样结构区, 对单核细胞、NK 细胞和 T 细胞有较强趋化活性。由于内皮组织是白细胞渗出的第一道屏障, 因此内皮细胞上 FKN 的性质和功能, 决定了它在炎症部位控制炎性渗出上发挥关键作用。当血管 ECs 受损时, 其可使白细胞 (包括单核细胞等) 向炎症部位 (即受损的血管 ECs) 迁移, 进而促进 AS 的进展^[26] (如图 2 所示)。由此可见, *ADAM10* 能够通过 fractalkine/CX3CR1 信号轴来影响 AS 的发展。

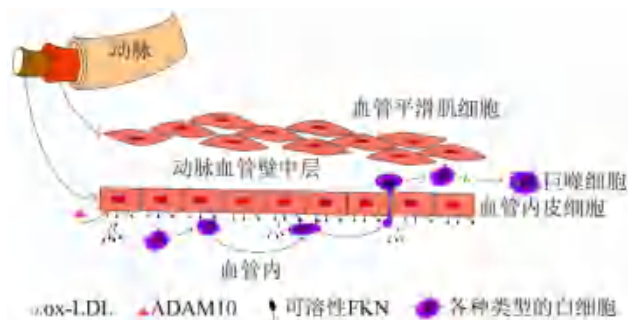


图 2 *ADAM10* 通过 fractalkine/CX3CR1 信号通路抗 AS 的作用机制图

Fig 2 Mechanism of anti-atherosclerosis effect of *ADAM10* via the fractalkine/CX3CR1 signaling pathway

4.3 *ADAM10* 与血管内皮生长因子 (VEGF) 信号通路

AS 发生、发展的首要条件便是血管 ECs 的损伤, 白细胞向血管外组织的迁移和平滑肌细胞 (SMCs) 的迁移都是 AS 的关键步骤。内皮是白细胞的第一道屏障。而在 ECs 损伤方面, 血管内皮钙黏蛋白 (VE-cad) 是血管内皮所特有的, 专一性的表达在血管 ECs 的表面, 其在保持 ECs 的完整性、维持 ECs 的生理功能、血管发生和形成、稳定血管内环境等多方面均起着重要作用, 可溶性 VE-cad 水平升高与冠状动脉粥样硬化等疾病有关。VEGF 家族是血管生成、淋巴管生成、脂质代谢和炎症的关键调节因子, 参与 AS 和心血管疾病的发展。VEGF 受体 (VEGFR) 有 3 种, VEGFR1 和 VEGFR2 主要表达于血管 ECs 中, VEGFR3 主要表达于淋巴 ECs

中^[27-28]。其中, Donners 等^[4]的研究发现 *ADAM10* 是 VEGFR2 的一个新型结合伙伴, 首次在人类 AS 病变中展示了 *ADAM10* 的表达与斑块进展和新生血管形成有关, 并发现 VEGFR 可通过各种通路来诱导 ECs 中 *ADAM10* 的活性, 从而介导 VE-cad 的裂解, 使可溶性 VE-cad 增加, 增加血管通透性并促进 ECs 迁移; Kabacik 等^[29]的研究也表明当 *ADAM10* 被激活时, 可裂解血管 ECs 表面的 VE-cad, 从而削弱细胞连接并增加血管内皮通透性 (如图 3 所示)。这些都会促进 AS 的发生及发展。由此可见, VEGF 以 *ADAM10* 依赖的方式增加血管通透性, 通过抑制 *ADAM10* 可以降低 ECs 迁移和趋化性, 进而抑制 AS 的进展。

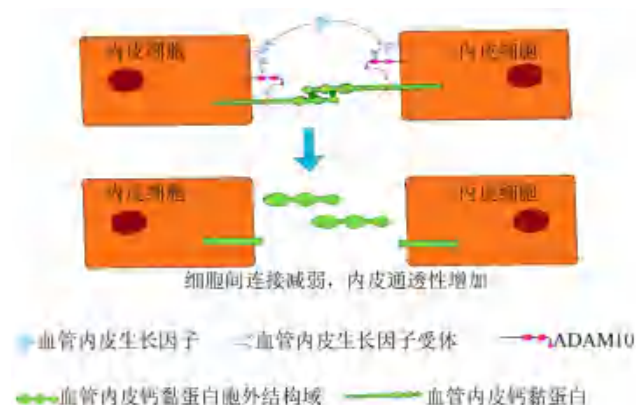


图 3 *ADAM10* 通过血管内皮生长因子信号通路抗 AS 的作用机制图

Fig 3 Mechanism diagram of anti-atherosclerosis effect of *ADAM10* through the VEGF signaling pathway

4.4 *ADAM10* 与 CXCL16/CXCR6 信号通路

CXCL16, 也称为 SR-PSOX (结合磷脂酰丝氨酸和氧化脂蛋白的清道夫受体), 是一种涉及多种炎症性疾病、AS 和肿瘤的多功能蛋白。CXCL16 主要在巨噬细胞、B 细胞、树突状细胞、角质形成细胞以及 ECs 中表达^[30]。CXCL16 对 AS 具有双重作用, 作为清道夫受体家族成员, CXCL16 能够适当地将有害物质从血管壁清除, 起到抗 AS 的作用; 但巨噬细胞同样能够借助 ECs 表面的 CXCL16, 不断摄取 ox-LDL, 导致泡沫细胞的形成以及 AS 早期病变。CXCL16 的唯一受体是 CXCR6, 该信号通路的激活具有趋化因子、黏附分子以及清道夫受体的功能, 能够调节炎症、组织损伤和纤维化^[31]。CXCL16 具有两种形态, 即膜结合型 CXCL16 (TM-CXCL16)、可溶性 CXCL16 (sCXCL16)。相关研究发现, TM-CXCL16 转变成 sCXCL16 的过程主要是由 *ADAM10* 调控^[32], 而 sCXCL16 是一种趋化因子, 介导炎症反应。同时, Hattermann 等^[33]研究中发现 sCXCL16 也可与细胞表面表达的 TM-CXCL16 结合, 并在受刺激的细胞中诱导信号传导和不同的生物学效应, 使

得跨膜配体本身充当其可溶性对应物的受体。相关研究发现, CXCL16 高表达存在于 AS 病变内膜的巨噬细胞中, 而不存在于正常主动脉中, CXCL16 可能参与体内巨噬细胞中的 α x-LDL 摄取和随后的泡沫细胞转化, 因此可能在 AS 病变形成中起重要作用 (如图 4 所示)。由此可见, ADAM10 可通过调控 CXCL16 来影响 CXCL16/CXCR6 信号通路, 进而对 AS 的发生发展发挥作用。

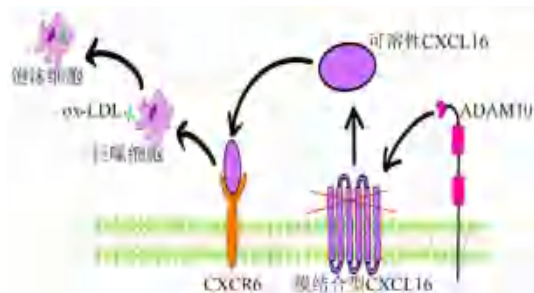


图 4 ADAM10 通过 CXCL16/CXCR6 信号通路抗 AS 的作用机制图
Fig 4 Mechanism diagram of anti-atherosclerosis effect of ADAM10 through the CXCL16/CXCR6 signaling pathway

5 研制靶向 ADAM10 抑制剂或激活剂的难点及挑战

综上, ADAM10 对 AS 的发生发展的调节作用是多方面的, 甚至是相反的, 这可能与不同的研究模型中激活的通路并不相同有关。另外, ADAM10 在多种生物过程中均发挥着关键作用, 涉及蛋白质剪切、细胞黏附、信号传导和免疫调节等, 其不止在 AS 中发挥作用, 有关研究表明, 在 AD 中, ADAM10 在减少 β 淀粉样蛋白 ($A\beta$) 肽的产生中起关键作用, 并可能对 AD 起到保护作用^[34]; 另外, ADAM10 也对炎症性疾病、肿瘤等疾病发挥着作用。由于 ADAM10 在不同疾病病理过程中可能发挥截然相反的作用, 某些功能甚至对于人体是有益的, 考虑到这一点, 在靶向 ADAM10 治疗 AS 时应研究如何使其具备高度选择性, 而要解决这个问题需要同时考虑到细胞特异性及底物特异性方面等多种因素, 以尽量减少对其他器官和系统的不良影响, 这些都是研制 ADAM10 分子靶标所存在的难点及挑战。

5.1 ADAM10 结构组成活性的调节

ADAM10 最初以无活性形式存在, 新合成的 ADAM10 可能在经过内质网-高尔基分泌途径运输至质膜的过程中通过蛋白水解发挥催化活性。ADAM10 蛋白酶的胞质部分包含两个显著的脯氨酸富集区 (PRR), 由氨基酸 708 ~ 717 (PKLPPPKPLP) 和 722 ~ 728 (RRRPPQP) 组成^[35]。已证明它们可直接与 Src 同源性 3 (SH3) 结构域相互作用蛋白 [包括衔接蛋白、棕榈酰转移

酶 (ZDHHC6) 和非受体蛋白酪氨酸激酶 (SRC、Yes、Fyn、Fgr、Lck、Hck、Blk、Lyn 和 Frk)^[36] 相互作用。这些 SH3 结构域蛋白发挥运输、定位和 / 或调节 ADAM10 活性的特征功能^[35] (见表 1)。

5.2 基于 ADAM10 蛋白结构的特异性调控剂

离开内质网和高尔基网络后, 在没有底物的情况下, 成熟的 ADAM10 蛋白优先在细胞膜上以二聚体而不是单体的形式表达。一个相邻蛋白质的 C 末端占据了其伴侣的锌配位催化位点, 模拟了肽底物, 其作用像“锁”一样阻止底物进入酶口袋, 并发挥自身抑制功能, 为催化位点提供除前结构域之外的额外保护^[37]。对 ADAM10 胞外结构域的研究开发了单克隆抗体, 例如高特异性的抗 ADAM10 mAb (8C7)。8C7 重链可以作为“钥匙”生成, 以适应与 ADAM10 的 C 结构域位点的“锁”结合。X 射线结构显示, 在体外与 C 结构域竞争结合时, 8C7 重链取代 MP 结构域, 导致 ADAM10 具有独特的活性形式。此外, 大多数合成的 ADAM10 阻断剂通过 Zn^{2+} 结合竞争机制抑制 ADAM10^[38]。LT4 可选择性抑制 ADAM10 的口袋, 比 ADAM17 具有更高的特异性和有效性^[39]。CID3117694 是一种非 Zn^{2+} 结合剂, 通过糖基化与 ADAM10 连接的底物竞争非活性位点, 表现出底物选择性; 它可抑制 S80 糖基化的 TNF- α , 但不抑制非糖基化的底物, 这与没有差异抑制的 Zn^{2+} 结合物不同^[40]。CID3117694 抑制 CXCL16 脱落的作用与 GI254023X 相似, 可抑制趋化因子诱导的外周血单个核细胞和中性粒细胞的迁移^[40] (见表 1)。

5.3 细胞膜上 ADAM10 的激活和抑制调节剂

组织金属蛋白酶抑制因子 (TIMPs) 是基质金属蛋白酶 (MMPs) 的抑制剂, 是研究最多的 ADAM10 表达的内源性下调因子。TIMP1 对 ADAMs 的抑制谱较窄, 可特异性抑制 ADAM10, 但不抑制 ADAM17, 而 TIMP3 可抑制 ADAM10、12、15、17、28 和 33^[41]。TIMP1 是一种很有前途的 ADAM10 抑制调节剂, 在以蛋白水解增强为特征的疾病 (如 AS) 中, 可通过干扰 ADAM10 介导的蛋白水解活动以起到治疗 AS 的作用。具有 Kazal 基序的逆转诱导半胱氨酸富集蛋白 (RECK) 是一种糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 锚定的膜系蛋白, 是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂样分子, 被确定为 ADAM10 抑制性调节剂, 在血管平滑肌细胞或心脏成纤维细胞迁移和增殖发挥重要作用, 提示 RECK 通过抑制 ADAM10 在 AS 中发挥保护作用^[42] (见表 1)。

6 总结与展望

随着生活条件的改善, AS 所导致的心血管疾病越来越多见, 其所引起的后果也十分严重。目前

表 1 ADAM10 的各种激活 / 抑制调节剂分类

Tab 1 Classification of various activation/inhibition regulators for ADAM10

ADAM10 激活和抑制调节剂分类	原理	相关抑制剂 / 激活剂	作用
作用于 ADAM10 胞质部分	ADAM10 两个显著的 PRR 可与 SH3 结构域相互作用蛋白相互作用	衔接蛋白、棕榈酰转移酶 (ZDHHC6) 和非受体蛋白酪氨酸激酶 (SRC、Yes、Fyn、Fgr、Lck、Hck、Blk、Lyn 和 Frk)	运输、定位和 / 或调节 ADAM10 活性
作用于 ADAM10 胞外结构域部分	ADAM10 的 C 结构域位点的“锁”与抑制剂结合	单克隆抗体: 高特异性的抗 ADAM10 mAb (8C7) Zn ²⁺ 结合剂: LT4 非 Zn ²⁺ 结合剂: CID3117694	阻止底物进入酶口袋, 并发挥自身抑制功能
作用于细胞膜上的 ADAM10 部分	下调 ADAAM10 的表达	TIMP1、TIMP3、RECK	干扰 ADAM10 介导的蛋白水解活动

关于 AS 的治疗主要集中在控制血脂方面, 降脂药物虽然种类繁多, 包括他汀类、胆固醇吸收抑制剂、PCSK9 抑制剂、普罗布考及其他降脂药等, 但 AS 的发生率仍然在上升, 且冠心病的发病率及死亡率仍呈现上升趋势^[43], 可见控制 AS、延缓 AS 进展任重道远。而 ADAM10 作为多通路调控分子, 在 AS 的发生发展中发挥着重要作用。ADAM10 的表达水平与 AS 发生发展显著相关, 这提示 ADAM10 可能成为评估疾病严重程度和干预治疗的潜在靶点, 但这一应用仍受诸多因素制约, 需进一步深入研究。另外, 目前关于 ADAM10 在人体试验的研究仍然相对较少, 因此需要更多的数据来证明 ADAM10 作为治疗靶标的可用性, 以期 AS 治疗策略提供新的研究方向。

参考文献

- [1] Libby P. The changing landscape of atherosclerosis [J]. Nature, 2021, 592 (7855): 524-533.
- [2] Prinzen C, Müller U, Endres K, et al. Genomic structure and functional characterization of the human ADAM10 promoter [J]. FASEB J, 2005, 19 (11): 1522-1524.
- [3] Zhu YH, Xian XM, Wang ZZ, et al. Research progress on the relationship between atherosclerosis and inflammation [J]. Biomolecules, 2018, 8 (3): 80.
- [4] Donners MMPC, Wolfs IMJ, Olieslagers S, et al. A disintegrin and metalloprotease 10 is a novel mediator of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell function in angiogenesis and is associated with atherosclerosis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30 (11): 2188-2195.
- [5] van der Vorst EPC, Maas SL, Theodorou K, et al. Endothelial ADAM10 controls cellular response to oxLDL and its deficiency exacerbates atherosclerosis with intraplaque hemorrhage and neovascularization in mice [J]. Front Cardiovasc Med, 2023, 10: 974918.
- [6] 李丽莉, 薛云松, 李奕平, 等. 血清 Hcy、ADAM10、Gal-3 与 2 型糖尿病患者颈动脉粥样硬化的相关性 [J]. 分子诊断与治疗杂志, 2023, 15 (7): 1199-1202, 1211.
- [7] 赵茜, 高宇, 杜思成, 等. 2 型糖尿病患者颈动脉粥样硬化程度与血清 ADAM10 水平的相关性 [J]. 中国临床研究, 2021, 34 (3): 289-293.
- [8] Li HC, Han S, Sun QF, et al. Long non-coding RNA CDKN2B-AS1 reduces inflammatory response and promotes cholesterol efflux in atherosclerosis by inhibiting ADAM10 expression [J]. Aging (Albany NY), 2019, 11 (6): 1695-1715.
- [9] Tang XQ, Yin RH, Shi HF, et al. LncRNA ZFAS1 confers inflammatory responses and reduces cholesterol efflux in atherosclerosis through regulating miR-654-3p-ADAM10/RAB22A axis [J]. Int J Cardiol, 2020, 315: 72-80.
- [10] Zhou BH, Lin WL, Long YL, et al. Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics [J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7 (1): 95.
- [11] Alabi RO, Glomski K, Haxaire C, et al. ADAM10-dependent signaling through Notch1 and Notch4 controls development of organ-specific vascular beds [J]. Circ Res, 2016, 119 (4): 519-531.
- [12] Alabi RO, Lora J, Celen AB, et al. Analysis of the conditions that affect the selective processing of endogenous Notch1 by ADAM10 and ADAM17 [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22 (4): 1846.
- [13] Groot AJ, Habets R, Yahyanejad S, et al. Regulated proteolysis of NOTCH2 and NOTCH3 receptors by ADAM10 and presenilins [J]. Mol Cell Biol, 2014, 34 (15): 2822-2832.
- [14] Quillard T, Charreau B. Impact of Notch signaling on inflammatory responses in cardiovascular disorders [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14 (4): 6863-6888.
- [15] Nus M, Martínez-Poveda B, MacGrogan D, et al. Endothelial Jag1-RBPJ signalling promotes inflammatory leucocyte recruitment and atherosclerosis [J]. Cardiovasc Res, 2016, 112 (2): 568-580.
- [16] Mack JJ, Iruela-Arispe ML. NOTCH regulation of the endothelial cell phenotype [J]. Curr Opin Hematol, 2018, 25 (3): 212-218.
- [17] Fortini F, Vieceli Dalla Sega F, Caliceti C, et al. Estrogen receptor β -dependent Notch1 activation protects vascular endothelium against tumor necrosis factor α (TNF- α)-induced apoptosis [J]. J Biol Chem, 2017, 292 (44):

- 18178-18191.
- [18] Fortini F, Viecei Dalla Sega F, Caliceti C, et al. Estrogen-mediated protection against coronary heart disease: the role of the Notch pathway [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2019, 189: 87-100.
- [19] Polacheck WJ, Kutys ML, Yang JL, et al. A non-canonical Notch complex regulates adherens junctions and vascular barrier function [J]. *Nature*, 2017, 552 (7684): 258-262.
- [20] Fortini F, Viecei Dalla Sega F, Marracino L, et al. Well-known and novel players in endothelial dysfunction: updates on a Notch (ed) landscape [J]. *Biomedicines*, 2021, 9 (8): 997.
- [21] Viecei Dalla Sega F, Fortini F, Aquila G, et al. Notch signaling regulates immune responses in atherosclerosis [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1130.
- [22] Aoyama T, Takeshita K, Kikuchi R, et al. Gamma-secretase inhibitor reduces diet-induced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 383 (2): 216-221.
- [23] Hao YF, Wang XL, Zhang FL, et al. Inhibition of Notch enhances the anti-atherosclerotic effects of LXR agonists while reducing fatty liver development in ApoE-deficient mice [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020, 406: 115211.
- [24] Jiang Y, Gong QM, Huang JM, et al. ADAM-10 regulates MMP-12 during lipopolysaccharide-induced inflammatory response in macrophages [J]. *J Immunol Res*, 2022, 2022: 3012218.
- [25] Gunner G, Cheadle L, Johnson KM, et al. Sensory lesioning induces microglial synapse elimination via ADAM10 and fractalkine signaling [J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22 (7): 1075-1088.
- [26] Loh SX, Ekinici Y, Spray L, et al. Fractalkine signalling (CX3CL1/CX3CR1 Axis) as an emerging target in coronary artery disease [J]. *J Clin Med*, 2023, 12 (14): 4821.
- [27] Corlan AS, Cimpean AM, Jitariu AA, et al. Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 in cancer development and tumor angiogenesis [J]. *Int J Endocrinol*, 2017, 2017: 3232905.
- [28] Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) -key factor in normal and pathological angiogenesis [J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2018, 59 (2): 455-467.
- [29] Kabacik S, Raj K. Ionising radiation increases permeability of endothelium through ADAM10-mediated cleavage of VE-cadherin [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (47): 82049-82063.
- [30] Xu FF, He D, Liu JB, et al. Genetic diversification of chemokine CXCL16 and its receptor CXCR6 in primates [J]. *Dev Comp Immunol*, 2018, 85: 86-94.
- [31] Izquierdo MC, Martin-Cleary C, Fernandez-Fernandez B, et al. CXCL16 in kidney and cardiovascular injury [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2014, 25 (3): 317-325.
- [32] Han J, Fu RJ, Chen C, et al. CXCL16 promotes gastric cancer tumorigenesis via ADAM10-dependent CXCL16/CXCR6 axis and activates Akt and MAPK signaling pathways [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17 (11): 2841-2852.
- [33] Hattermann K, Bartsch K, Gebhardt HH, et al. "Inverse signaling" of the transmembrane chemokine CXCL16 contributes to proliferative and anti-apoptotic effects in cultured human meningioma cells [J]. *Cell Commun Signal*, 2016, 14 (1): 26.
- [34] Yuan XZ, Sun S, Tan CC, et al. The Role of ADAM10 in Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2017, 58 (2): 303-322.
- [35] Ebsen H, Lettau M, Kabelitz D, et al. Identification of SH3 domain proteins interacting with the cytoplasmic tail of the α 5 β 1 integrin and metalloprotease 10 (ADAM10) [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (7): e102899.
- [36] Kleino I, Jarviluoma A, Hepojoki J, et al. Preferred SH3 domain partners of ADAM metalloproteases include shared and ADAM-specific SH3 interactions [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (3): e0121301.
- [37] Seegar TCM, Killingsworth LB, Saha N, et al. Structural basis for regulated proteolysis by the α -secretase ADAM10 [J]. *Cell*, 2017, 171 (7): 1638-1648.
- [38] Saha N, Robev D, Himanen JP, et al. ADAM proteases: emerging role and targeting of the non-catalytic domains [J]. *Cancer Lett*, 2019, 467: 50-57.
- [39] Zocchi MR, Camodeca C, Nuti E, et al. ADAM10 new selective inhibitors reduce NKG2D ligand release sensitizing Hodgkin lymphoma cells to NKG2D-mediated killing [J]. *Oncoimmunology*, 2015, 5 (5): e1123367.
- [40] Madoux F, Dreymuller D, Pettitoud JP, et al. Discovery of an enzyme and substrate selective inhibitor of ADAM10 using an exosite-binding glycosylated substrate [J]. *Sci Rep*, 2016, 6 (1): 11.
- [41] Carreca AP, Pravata VM, D' Apolito D, et al. Quantitative proteomics reveals changes induced by TIMP-3 on cell membrane composition and novel metalloprotease substrates [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (5): 2392.
- [42] Russell JJ, Grisanti LA, Brown SM, et al. Reversion inducing cysteine rich protein with Kazal motifs and cardiovascular diseases: the recklessness of adverse remodeling [J]. *Cell Signal*, 2021, 83: 109993.
- [43] 国家心血管病中心, 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告 2023 概要 [J]. *中国循环杂志*, 2024, 39 (7): 625-660.

(收稿日期: 2024-10-29; 修回日期: 2025-01-14)

中药通过 AMPK 信号通路防治高脂血症研究进展

张依娜¹, 赵锋², 唐瑜¹, 刘思雨¹, 陈婕妤¹, 陈金品¹, 李敏¹, 卫培峰¹, 高峰^{1*} (1. 陕西中医药大学药学院临床中药学教研室, 陕西 咸阳 712046; 2. 西安市中医医院, 西安 710000)

摘要: 高脂血症是一种临床上常见的全身性疾病, 伴随着血清胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、低密度脂蛋白胆固醇水平 (LDL-C) 升高以及高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 水平降低, 是其他心血管疾病发生的主要危险因素, 有“万病之首”之称。腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 介导的 AMPK 通路被称为人体细胞的能量调节器, 当细胞内能量失衡时, AMPK 通路被激活进而影响其下游介导糖脂代谢、炎症反应、氧化应激、细胞自噬以及线粒体功能等相关蛋白的表达, 在抗高脂血症方面具有极大潜力。因此本文总结了近几年的相关文献, 从 AMPK 结构、激活方式、与脂质代谢相关性以及中药如何调控 AMPK 信号通路干预高脂血症等方面进行了综述, 以期中药应用于高脂血症的治疗提供参考依据, 为 AMPK 靶向中药单体的开发与合理应用提供思路。

关键词: 高脂血症; 腺苷酸活化蛋白激酶; 脂质代谢; 中药

中图分类号: R286

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)05-1369-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.029

Research progress in traditional Chinese medicine for hyperlipidemia via AMPK signaling pathway

ZHANG Yi-na¹, ZHAO Feng², TANG Yu¹, LIU Si-yu¹, CHEN Jie-yu¹, CHEN Jin-pin¹, LI Min¹, WEI Pei-feng¹, GAO Feng^{1*} (1. *Teaching and Research Section of Clinical Chinese Pharmacy, College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712046*; 2. *Xi'an Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710000*)

Abstract: Hyperlipidemia is a common systemic disease, accompanied by elevated serum cholesterol, triglyceride, low-density lipoprotein cholesterol, and lowered high-density lipoprotein cholesterol, and is a major risk factor for the development of other cardiovascular diseases. It is a major risk factor for the development of other cardiovascular diseases, known as “the evil of all diseases”. The pathway mediated by adenylyate-activated protein kinase (AMPK) is known as the energy regulator of human cells. When there is an imbalance in intracellular energy, the AMPK pathway is activated, which in turn affects the downstream expression of proteins related to glucose and lipid metabolism, inflammation, oxidative stress, cellular autophagy, and mitochondrial function, with great potential to fight against hyperlipidemia. This paper summarized relevant literatures in the past five years and reviewed the structure of AMPK, its activation mode, its relevance to lipid metabolism, and how traditional Chinese medicine modulated the AMPK signaling pathway to intervene hyperlipidemia. We hope to provide reference for further application of traditional Chinese medicine in hyperlipidemia and the development and application of AMPK-targeting traditional Chinese medicine monomers.

Key words: hyperlipidemia; adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase; lipid metabolism; traditional Chinese medicine

基金项目: 咸阳市科技局项目 (No.2021ZDYF-SF-0044); 陕西省教育厅产业化项目 (No.20JC011); 陕西省科技厅重点产业链项目 (No.2021ZDLSF04-11)。

作者简介: 张依娜, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药降脂机制研究, email: 827098418@qq.com * 通信作者: 高峰, 女, 教授, 主要从事中药药性理论研究, email: 7204612@qq.com

现代医学将高脂血症定义为一种由脂肪摄入过多或者脂质代谢障碍等因素所引起的血浆中一种或数种脂质超出正常范围的脂质失衡性疾病^[1]。长期血脂升高会直接加速动脉粥样硬化,诱发冠心病、脑卒中、脑梗死等一系列心脑血管疾病,大大提高了死亡风险,已成为当代威胁人类生命健康的重要因素之一^[2]。查阅中医典籍,发现并未有“高脂血症”病名的记载,但其相关症状属于中医中“痰浊”“湿热”“血瘀”等范畴。中医认为高脂血症的发病有内、外两种因素。外因在于饮食不节、情志抑郁等导致脏腑功能失调,形成了“痰浊”“瘀血”“痰凝”等一系列影响水液正常代谢的病理产物而致病,内因在于肝、脾、肾三脏的功能失调^[3]。目前他汀类、贝特类等西药在临床上已被广泛应用于高脂血症的治疗,但长期服用会引发肝损伤等一系列不良反应,具有一定的局限性^[2-3]。而中药在治疗上以“养”为主,标本兼治,毒副作用小,并且资源丰富易得,在治疗高脂血症这类慢性疾病上具有较大的优势^[4]。随着对中药治疗高脂血症机制的深入研究,发现腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)介导的AMPK信号通路与高脂血症关系密切,在高脂血症的发生发展中发挥着不容忽视的作用。基于此,本文通过阅读整理近五年来国内外相关文献,就中药通过AMPK信号通路发挥降脂作用进行综述,为中药应用于高脂血症的治疗提供参考依据。

1 AMPK 信号通路概述

AMPK 是一种由 α 、 β 、 γ 三种不同亚基组成的异三聚体复合物,每个亚基包括不同亚型(α_1 、 α_2 、 β_1 、 β_2 、 γ_1 、 γ_2 、 γ_3)。其中, α 亚基决定了AMPK蛋白激酶的活性,属于催化亚基, β 亚基和 γ 亚基在维持三聚体稳定性和作用底物特异性起重要作用,属于调节亚基^[5]。AMPK信号通路属于细胞内与细胞能量代谢密切相关的通路之一,其激活方式较为复杂。在人体中AMPK的激活主要有经典途径与非经典途径两种方式。当机体细胞处于能量缺乏状态,即单磷酸腺苷/三磷酸腺苷(AMP/ATP)比值升高时,AMP会与AMPK的 γ 亚基结合导致AMPK的变构激活,这是AMPK激活的经典通路^[6]。AMPK上游激酶肝激酶B1(LKB1)、钙调素依赖性蛋白激酶(CaMKK β)、转化生长因子 β 激活激酶1(Tak1)能磷酸化AMPK α 亚基末端的一个保守的苏氨酸(Thr172)位点从而激活AMPK,属于非经典途径^[7]。AMPK被激活后会抑制胆固醇合成、蛋白质合成等消耗ATP的代谢过程,促进脂肪酸氧化、脂肪分解等合成ATP的代谢过程来维持能量稳态,从而调控人体内的多种生理功能^[8]。

2 AMPK 信号通路与高脂血症的关系

2.1 AMPK 信号通路调节脂质代谢

高脂血症从源头上是由脂质代谢紊乱而引起的一种代谢性疾病。脂质代谢紊乱是脂质合成、转运、分解等过程发生异常导致脂质或其代谢物在血液或其他器官中发生质变或量变的一种现象^[9]。AMPK信号通路中许多效应蛋白都与脂质代谢过程密切相关:胆固醇调节元件结合蛋白-1(SREBP-1)是一种调控脂肪酸合成的关键转录因子,包括SREBP-1a和SREBP-1c两个亚型,SREBP-1能促进脂肪酸合成酶(FAS)、硬脂酰辅酶A去饱和酶1(SCD1)、乙酰辅酶A羧化酶(ACC)等的转录,AMPK通过抑制SREBP-1的表达,从而抑制脂肪酸的合成^[10]。同时AMPK也能直接下调ACC的表达,乙酰辅酶A是脂肪酸合成的前体原料之一,ACC能将乙酰辅酶A羧化形成丙二酰辅酶A,这一步是脂肪酸合成的关键步骤。同时,生成的丙二酰辅酶A能抑制脂肪酸氧化的限速酶肉碱酯酰转移酶1(CPT-1)的活性,因此ACC活性降低既能直接抑制脂肪酸的合成,又能间接促进脂肪酸的氧化^[11]。3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶(HMGR)是一种胆固醇合成的关键酶,AMPK通路激活后HMGR活性降低从而抑制胆固醇的合成。过氧化物酶体增殖物激活受体(PPARs)是一种脂质激活的转录因子,包括三种亚型(PPAR- α 、PPAR- β 和PPAR- γ),其中PPAR- α 能调节脂质代谢基因的表达,PPAR- β 参与脂质氧化和细胞增殖,PPAR- γ 能促进脂肪细胞分化,AMPK激活后能调节PPARs的表达影响PPARs介导的脂质代谢、脂肪形成等生理过程^[12]。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)是一种非典型的丝氨酸/苏氨酸激酶,能通过干预SREBP-1和PPAR- γ 的表达来调节脂肪酸的合成,AMPK能与mTOR的上游相关蛋白结合从而抑制mTOR的表达,间接调控脂肪酸合成^[13],同时mTOR还能通过调节其下游胆固醇合成关键限速酶(HMGCR)以及胆固醇外排关键分子(ABCG5/G8)等的表达干预机体胆固醇代谢过程^[14]。

2.2 AMPK 信号通路调节氧化应激,降低炎症损伤

氧化应激与炎症反应是高脂血症形成的重要因素。氧化应激是机体体内氧化作用过强而抗氧化系统难以抵抗,导致大量活性氧化物蓄积的一种病理状态。氧化应激会影响机体正常的脂质代谢进而导致高脂血症等脂质代谢性疾病^[15]。同时,高脂血症的整个过程都伴随着炎症反应,而炎症因子又能增快血脂的上升速度^[16]。沉默信息调节因子1(SIRT1)是一种依赖NAD⁺的去乙酰化酶,肝脏、胰腺和大脑中SIRT1的缺失会显著增加活性氧(ROS)水平,导致氧化应激,同时又能影响炎症反应中至关重要的转录因子核因子 κ B(NF- κ B)等的表达而产生炎症反应,AMPK被激活后能促进SIRT1表达,改善氧化应激及炎症损伤^[17]。

2.3 AMPK 信号通路改善线粒体功能、调节细胞自噬

线粒体是细胞中产生能量的关键细胞器，细胞中线粒体数量异常消耗或功能的紊乱会导致 ROS 的过量产生，进而诱发心血管疾病、高脂血症等慢性疾病。过氧化物酶体增殖物激活受体 γ -共激活因子 1- α (PGC-1 α) 是调控线粒体生物合成的主要参与者，AMPK 磷酸化激活的 PGC-1 α 能增强 NF-E2 相关因子 2 (Nrf2) 等抗氧化蛋白的活性改善线粒体功能，进而发挥对高脂血症的防治作用^[18]。细胞自噬是机体细胞为了维持细胞稳态而自我降解的过程，自噬系统的紊乱会导致诸多肝脏代谢性疾病的发生，与高脂血症有着密切的关联^[19]。AMPK 与自噬的不同阶段都有关，UNC-51 样激酶 1 (ULK1) 是细胞自噬的核心蛋白，mTOR 能与 ULK1 第 757 位丝氨酸结合导致 ULK1 的失活，抑制自噬，AMPK 分子能抑制 mTOR 的表达，间接促进细胞自噬从而改善高脂血症^[20]。

2.4 AMPK 信号通路调节肠道菌群

肠道是人体重要的消化和吸收器官，有超过 100 亿个微生物在此“定居”。这些微生物在人类代谢调节中起着重要作用，肠道菌群失衡会导致人体糖脂代谢紊乱，从而引起高脂血症、糖尿病等多种代谢性疾病^[21]。哺乳动物的棕色脂肪通过产热用于调节能量平衡，研究发现敲除 AMPK α 的小鼠在高脂饮食下棕色脂肪的产热功能受损，造成能量失衡。这是因为肠道 AMPK α 缺失使肠道菌群组成发生变化，导致肠道发酵产物甲基乙二醛升高，抑制了棕色脂肪中负责产热的线粒体内膜转运蛋白 UCP1 的表达，从而促进了高脂血症等一些代谢性疾病的发生^[22]。因此，AMPK 信号通路能通过调节肠道菌群干涉高脂血症的发生发展。

2.5 AMPK 信号通路调节内质网应激 (ERS)

蛋白质折叠是蛋白质从无规则的卷曲状折叠成特定的三维结构从而获得功能性结构和构象的一种物理学过程，内质网是真核细胞中的一种细胞器，是蛋白质、脂类和糖类合成的重要基地。当内质网中出现蛋白质折叠问题时，就会引发 ERS。ERS 与高脂血症、糖尿病等脂质代谢紊乱相关性疾病有着密切的联系^[23]。有研究发现，AMPK 可以诱导 ERS 的标志蛋白 150 kDa 氧调节蛋白 (ORP150) 的表达来抑制 ERS 从而改善肝脂肪变性，证明 AMPK 通路同样可以调节 ERS 发挥降脂疗效^[24]。

总之，AMPK 信号通路是个复杂的网络，能通过调节脂质代谢、促进细胞自噬、改善线粒体功能、减轻炎症反应、降低氧化应激损伤等多种途径减缓高脂血症的发生与发展，是治疗高脂血症的重要方法之一，具体通路见图 1。

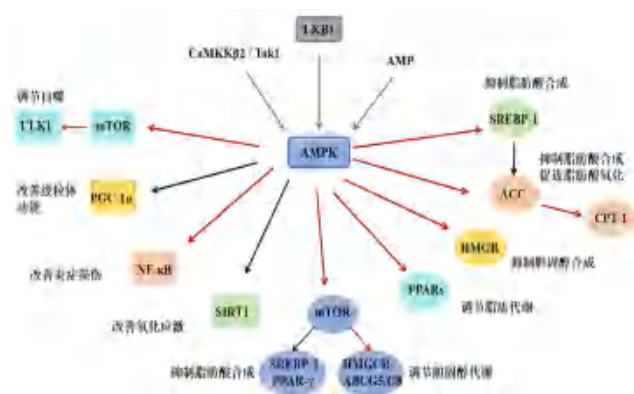


图 1 与高脂血症有关的 AMPK 信号通路图

Fig 1 AMPK signaling pathway associated with hyperlipidemia

注：红线代表抑制作用，黑线代表促进作用。

Note: The red line represents the inhibition effect, and the black line represents the promotion effect.

3 中药通过调控 AMPK 信号通路改善高脂血症

3.1 单味中药 (见表 1)

3.1.1 果实类 大果榆辛、苦、温，具有祛痰、利尿、杀虫等功效。Han 等^[25]发现大果榆水提物能呈剂量依赖性地减轻 HepG2 细胞的脂质蓄积，明显降低高脂血症大鼠血清脂质水平、降低动脉粥样硬化指数、缓解肝损伤。机制研究发现大果榆处理增加了脂质沉积 HepG2 细胞以及高脂血症大鼠肝组织中 p-AMPK 和 p-ACC 的表达水平，降低了 SREBP-1 和 HMGCR 的表达水平，这种作用能被 AMPK 抑制剂逆转，提示大果榆能通过激活 AMPK 通路和调节脂质代谢来预防体内高脂血症。山楂酸、甘、微温，具有强心、抗氧化、降血脂等药理作用。体外实验发现，山楂能通过激活 AMPK 通路，下调 SREBP-1/2 的表达来抑制肝脏脂肪酸的合成，上调 PPAR α 的表达来促进脂肪酸氧化，减少脂肪蓄积及减轻肝脏损伤发挥对高脂血症的治疗作用。从大鼠中分离出的肝细胞进行的体外实验，也表现出与体内实验一致的结果，且这种作用能被 AMPK 抑制剂逆转，进一步验证了山楂依赖 AMPK 的降脂活性^[26]。

3.1.2 叶类 辣木叶是原产于印度的落叶乔木辣木树的树叶。在高脂饮食诱导的高脂血症金黄地鼠模型中，辣木叶水提物的干预能显著降低其血清胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 水平，减轻肝脏的脂质沉积。网络药理学预测发现，辣木叶水溶性潜在活性成分可能是通过调节 AMPK 信号通路调节脂质代谢，对抗高脂血症^[27]。2012 年，乌药叶被列入新食品原料，引起了广大学者的研究热潮。研究发现，乌药叶中富含黄酮、挥发油等活性成分，具有降血脂、保肝、抗氧化等药理作用。孙嫣等^[28]发现乌药叶提取物能显著降低高脂血症大鼠血清 TC、TG、LDL-C 水

平,减轻肝脏脂质沉积,其可能是通过激活 AMPK 通路从而调节脂质代谢,发挥降脂疗效。

3.1.3 花类 泡桐树是原产于中国大陆的一种观赏性乔木,中医用其治疗高血压、支气管炎等疾病。泡桐花提取物中含有木犀草素、芹菜素等黄酮类化合物,对脂质代谢紊乱性疾病有一定的预防作用。Liu 等^[29]发现泡桐花提取物可显著减轻高脂血症引起的小鼠体重增加及肝脏损伤,激活 AMPK 通路,抑制 SREBP-1 与 HMGR 的表达,促进 CPT1 表达。表明泡桐树花提取物能通过 AMPK 通路抑制脂肪酸合成,促进脂肪酸氧化来改善高脂血症。

3.1.4 全草类 鱼腥草辛,性寒凉,具有抗炎、抗病毒、降血糖等功效。鱼腥草水提物能改善高脂血症模型小鼠血脂水平,降低肝脏脂质沉积,促进心脏重塑,提高与改善氧化应激有关的因子 Nrf2、

HO-1 以及与恢复线粒体功能相关因子 PGC-1 α 的表达,表明鱼腥草提取物能通过 AMPK/PGC-1 α /Nrf2 的级联反应降低氧化损伤,恢复线粒体功能障碍,从而改善高脂血症^[30]。

3.1.5 其他 栀子苦、寒,杜仲叶气微味微苦。两者都具有一定的保肝、调血脂、降血糖活性。研究发现栀子和杜仲叶合用能有效改善高脂血症小鼠血脂水平,进一步体外研究发现两者合用可上调油酸处理的 HepG2 细胞中 AMPK 与 PPAR α 的表达,减轻高脂模型 HepG2 细胞的脂质积累,并且提高经典的抗氧化应激通路 Nrf2-Keap-1-HO-1 中 Nrf2 和血红素加氧酶 -1 (HO-1) 的表达,减弱 Kelch 样 ECH 关联蛋白 1 (Keap-1) 的表达,表明两者合用是通过 AMPK-PPAR α 以及 Nrf2-Keap-1-HO-1 途径改善脂质代谢,降低氧化应激水平,从而对抗高脂血症^[31]。

表 1 基于 AMPK 通路改善高脂血症的单味中药
Tab 1 Single Chinese medicine based on AMPK pathway to improve hyperlipidemia

分类	来源	实验对象	作用机制	文献
大果榆	榆科	HepG2 细胞、大鼠	通过 AMPK 通路调节脂质代谢	[25]
山楂	蔷薇科	Wistar 大鼠	通过 AMPK 通路抑制脂肪酸的合成,促进脂肪酸氧化,减少脂肪蓄积	[26]
辣木叶	辣木科	金黄地鼠	通过调节 AMPK 信号通路调节脂质代谢	[27]
乌药叶	樟科	SD 大鼠	通过 AMPK 通路调节脂质代谢	[28]
泡桐树	玄参科	ICR 小鼠	通过 AMPK 通路抑制脂肪酸合成,促进脂肪酸氧化	[29]
鱼腥草	三白草科	C57BL/6J 小鼠	通过 AMPK/PGC-1 α /Nrf2 的通路降低氧化损伤,恢复线粒体功能障碍	[30]
栀子/杜仲 叶合用	茜草科/杜仲科	C57BL/6J 小鼠、 HepG2 细胞	通过 AMPK-PPAR α 以及 Nrf2-Keap-1-HO-1 通路改善脂质代谢,降低氧化应激 水平	[31]

3.2 中药单体 (见表 2)

3.2.1 三萜类化合物 泽泻醇 B 是从泽泻中提取分离出的一种三萜类化合物,具有抗炎、抗肿瘤、改善非酒精性脂肪性肝炎等药理作用。Gao 等^[32]用油酸诱导建立 HepG2 与 HL7702 细胞脂质沉积模型以及高脂饮食诱导建立高脂血症小鼠模型发现,泽泻醇 B 能通过特异性靶向线粒体外膜中重要的通道蛋白 (VDAC1),促进 ATP、二磷酸腺苷 (ADP) 等物质在细胞质和线粒体之间的运输,导致 ATP 水平降低,进而激活 AMPK 信号通路,降低 mTOR、SREBP-1 表达,从而抑制脂肪酸与胆固醇的合成,降低细胞内 TC、TG 水平,改善小鼠肝脏脂肪积累与变性,缓解高脂血症。

3.2.2 黄酮类化合物 山楂原花青素是来源于中药山楂的一种低聚体多酚化合物,能降低高脂血症模型大鼠各项血脂指标,激活 AMPK 通路并降低 SREBP-1、ACC 的表达,抑制脂肪酸合成,升高 CPT1 表达,加快脂肪氧化分解,表明山楂原花青素可通过激活 AMPK/SREBP-1/CPT1 信号通路发挥降脂疗效^[33]。山楂叶总黄酮中包括黄酮苷、槲皮素等多种物质,在心脑血管、糖尿病等方面具有良好的药理作用。体内研究表明,山楂叶总黄酮能通过激活 AMPK/ACC 信号通路促进脂肪酸氧

化,降低胆固醇合成来抑制脂质堆积,体现了其在高脂血症治疗方面的潜力^[34]。

3.2.3 酚类化合物 丹皮酚是中药牡丹皮或徐长卿的活性成分之一,具有抗炎、抗氧化、降血脂等药理作用。Shen 等^[35]发现丹皮酚对泰洛沙泊诱导的 C57BL/6J 小鼠肝脏和油酸-棕榈酸诱导的 AML12 细胞脂质积累均具有改善作用,通过上调 p-AMPK/AMPK、p-ACC/ACC 比值,激活 AMPK/ACC 通路,干扰细胞内能量代谢,抑制脂肪酸合成,减少脂质积累,发挥改善高脂血症的作用。

3.2.4 多糖类化合物 沙棘多糖是中药沙棘果实的主要功能性成分之一,具有降脂、抗氧化、抗炎等药理活性。沙棘多糖可减轻高脂血症模型小鼠肝脏脂质积累和血脂水平,提高 p-AMPK 和 PPAR α 蛋白的表达,刺激 ACC1 的磷酸化,抑制小鼠肝脏中 FAS、PPAR γ 和脂肪酸转运蛋白 (CD36) 的表达,此外还能显著提高肝脏中 CPT-1 α 、CPT-2、SIRT1、脂肪甘油三酯脂肪酶 (ATGL) 和激素敏感性脂肪酶 (HSL) 的表达,抑制 PGC-1 α 的表达,通过激活 AMPK 通路调节脂质代谢相关蛋白,进而抑制脂肪酸的合成改善高脂血症^[36]。

3.2.5 有机酸类 阿魏酸存在于当归、川芎、酸枣仁等多种中草药中,具有抗氧化、抗菌、抗病毒等作

用。采用高脂饲料建立高脂模型小鼠进行体外研究,结果表明阿魏酸能通过增加能量消耗激活 AMPK α /SREBP1/ACC1 信号通路来调节脂质代谢、抑制脂肪酸合成,体现了其在高脂血症治疗方面的潜力^[37]。迷迭香酸主要存在于唇形科、葫芦科、伞形科等多种植物中, Nyandwi 等^[38]对高脂饮食诱导的高脂血症 C57BL/6J 小鼠体内实验研究表明,迷迭香酸能显著上调 AMPK 表达,增加 CPT1 蛋白的表达,通过激活 AMPK/CPT1 通路增强脂肪酸氧化,减少脂质积累。

3.2.6 醌类化合物 大黄酸是存在于大黄、番泻叶、何首乌等中药中的蒽醌类活性成分,具有一定的降脂活性。He 等^[39]研究结果显示,经大黄酸干预后,能显著降低高脂斑马鱼模型的死亡率和体质量指数,改善 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 水平,同时能有效降低血管和肝脏中的脂质积累,减轻肝损伤。实时定量聚合酶链反应 (RT-qPCR) 实验发现大黄酸能上调 AMPK α 的表达,下调 SREBP-2 和 HMGCR 的表达,表明其能通过激活 AMPK 通路,抑制胆固醇与脂肪酸的合成发挥降脂作用。

3.2.7 苯丙素类化合物 绿原酸是一种由咖啡酸和奎宁酸组成的酚酸,存在于金银花、杜仲等中药材中,具有抗氧化、抗菌、保心等生物活性。研究发现绿原酸通过 AMPK/SREBP2 的直接通路以及 AMPK/SREBP2/HSP90/PXR 这一间接途径,降低 SREBP2 磷酸化后与热休克蛋白 90 (HSP90) 的结合能力,减少 SREBP2 积累,从而下调胆固醇吸收的关键蛋白 NPC1L1 和 HMGCR 的表达,同时促进 HSP90 与孕烷 X 受体 (PXR) 的结合,减少 PXR 的核易位,最终协同下调胆固醇稳态相关基因的表达,从而呈剂量依赖性地抑制血清中 TC、TG、LDL-C、谷丙转氨酶 (ALT) 和谷草转氨酶 (AST) 的升高,促进粪便中 TC、TG 和总胆汁酸 (TBA) 的排泄,降低肝脏中 TC、TG 和 LDL-C 的积累,这与体外细胞实验结果一致^[40]。

3.2.8 挥发油类化合物 沙棘果油是从沙棘果实中分离得到的一种天然油脂,在心脑血管以及免疫系统方面具有显著功效。有研究表明,沙棘果油提取物能影响 AMPK 和 Akt 通路关键蛋白 (HMGCR、CPT-1、AMPK 和 GS、GSK3 β 、Akt) 的表达,促进 AMPK 和 Akt 蛋白的磷酸化,影响 AMPK 及 Akt 通路改善血脂紊乱,缓解氧化应激与肝脏损伤等来改善高脂血症^[41]。

3.2.9 其他类化合物 黄芪总皂苷、荷叶总生物碱分别是中药黄芪及荷叶中重要的活性成分。研究表明,黄芪总皂苷与荷叶总生物碱合用能显著降低高脂饮食喂养的大鼠血清 TG、TC、游离脂肪酸 (FFA)、LDL-C 水平,升高 HDL-C 水平,且能明显改善高脂模型大鼠肝脏损伤与脂质积累。此外 AMPK、CPT-1 表达明显升高, SREBP-1c、ACC 水

平下降,表明黄芪总皂苷与荷叶总生物碱可能通过调节 AMPK/SREBP-1c/ACC 信号通路,从而抑制脂肪酸合成以及促进脂肪酸氧化分解来发挥作用^[42]。原儿茶醛是中药丹参和天麻中的一种酚酸类化合物。羟基红花黄色素 A 是从中药红花中分离出的黄酮类物质。Lin 等^[43]探讨了原儿茶醛和羟基红花黄色素 A 对高脂血症斑马鱼脂质沉积和肝脏损害的影响及其抗高脂血症的作用机制。发现两者单独使用或联合使用均可改善斑马鱼模型的脂质沉积、血流异常和肝组织损伤,且联合使用更有效。实时荧光定量 PCR 实验测定了一些与胆固醇代谢相关基因的表达,发现两者合用可以调节斑马鱼肝脏中与 PPAR- γ 、SREBP2、SREBP1、HMGCR、前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (PCSK9)、mTOR、CCAAT/增强子结合蛋白 β (C/EBP β)、低密度脂蛋白受体 (LDLR)、AMPK、肝细胞核因子 1 α (HNF-1 α) 和叉形头转录因子的 O 亚型 (FoxO3a) 的表达水平,证明两者合用能通过 AMPK/SREBP2/PCSK9/LDLR 信号通路减少胆固醇合成,发挥降脂疗效。豆甾醇和天麻素是半夏白术天麻汤中半夏及天麻的主要活性物质。半夏白术天麻汤是治疗高血压,尤其是痰湿型高血压的常用药,其主药半夏及天麻是治疗高血压伴随高血脂的关键因素。研究发现豆甾醇和天麻素联合使用可有效降低高脂 HepG2 细胞脂质积累,调节 AMPK/SREBP-1C 信号通路抑制脂肪酸合成,干预高脂血症^[44]。

3.3 中药复方 (见表 3)

清胆调脂汤由柴胡、竹茹、茯苓等 10 种中药组成。叶寒露等^[45]研究发现清胆调脂汤同样具有降脂效果,能有效升高小肠组织中脂质代谢调节因子血管生成素样蛋白 (FIAF) AMP 的表达,降低 HMGCR 和尼曼-匹克 C1 型类似蛋白 1 (NPC1L1) 的表达,通过 FIAF/AMPK/HMGCR/NPC1L1 信号通路调控肠道脂质代谢相关基因,进而发挥降脂作用。

化痰祛瘀方是以脾胃论治的学术思想研制而成,由绞股蓝、黄芪、党参等 9 味中药共奏益气健脾、活血化瘀之功效。有研究以高脂血症大鼠为模型,发现此方能通过调节体内脂质代谢重要途径之一的细胞色素 P450 表氧化酶 2J/氧二十碳三烯酸 (CYP2J3/EETs) 途径激活 AMPK 信号通路,升高 AMPK 和 ACC 磷酸化水平,促进 CPT-1 表达,进而调节脂肪酸代谢,最终改善高脂血症^[46]。

益气养阴方是由黄芪、山药、西洋参等 9 味药食同源药物共同组成,有益气养阴、清热生津的功效。任蓁等^[47]发现益气养阴方能调节 AMPK/SREBP-1 通路相关蛋白 (AMPK、SREBP-1、nSREBP-1c、ACC、FAS、HMGR) 的表达,从而抑制脂肪酸以及胆固醇合成,促进脂肪酸氧化,减轻肝脏损伤,发挥抗高脂血症的作用。

表 2 基于 AMPK 通路改善高脂血症的中药单体

Tab 2 Traditional Chinese medicine monomer based on AMPK pathway to improve hyperlipidemia				
分类	来源	实验对象	作用机制	文献
泽泻醇 B	泽泻	HepG2 细胞、HL7702 细胞	通过 AMPK 信号通路抑制脂肪酸与胆固醇的合成	[32]
山楂原花青素	山楂	SD 大鼠	通过 AMPK/SREBP1/CPT1 抑制脂肪酸合成, 加快脂肪氧化分解	[33]
山楂叶总黄酮	山楂叶	SD 大鼠	通过 AMPK/ACC 信号通路促进脂肪酸氧化, 降低胆固醇合成来抑制脂质堆积	[34]
丹皮酚	牡丹皮或徐长卿	C57BL/6J 小鼠、AML12 细胞	通过 AMPK/ACC 通路, 干扰细胞内能量代谢, 抑制脂肪酸合成, 减少脂质积累	[35]
沙棘多糖	沙棘果	C57BL/6J 小鼠	通过 AMPK 通路抑制脂肪酸的合成, 调节脂质代谢	[36]
阿魏酸	当归、川芎、酸枣仁等	ApoE 小鼠	通过 AMPK/SREBP1/ACC1 信号通路调节脂质代谢、抑制脂肪酸合成	[37]
迷迭香酸	迷迭香等	C57BL/6J 小鼠	通过激活 AMPK/CPT1 通路增强脂肪酸氧化, 减少脂质积累	[38]
大黄酸	大黄、番泻叶、何首乌等	斑马鱼	通过 AMPK 通路抑制胆固醇与脂肪酸的合成	[39]
绿原酸	金银花、杜仲等	C57BL/6J 小鼠、HepG2、Caco2 细胞	通过 AMPK/SREBP2 通路和 AMPK/SREBP2/HSP90/PXR 通路下调 NPC1L1 和 HMGCR 的表达, 维持胆固醇稳态	[40]
沙棘果油	沙棘果	仓鼠	通过 AMPK 及 Akt 通路改善血脂紊乱, 缓解氧化应激与肝脏损伤	[41]
黄芪总皂苷、荷叶总生物碱	黄芪及荷叶	SD 大鼠	通过调节 AMPK/SREBP-1c/ACC 信号通路来抑制脂肪酸合成、促进脂肪酸氧化分解	[42]
原儿茶醛/羟基红花黄色素 A	丹参、天麻、红花	斑马鱼	通过 AMPK/SREBP2/PCSK9/LDLR 信号通路减少胆固醇合成	[43]
豆甾醇/天麻素	半夏及天麻	HepG2 细胞	调节 AMPK/SERBP-1C 信号通路抑制脂肪酸合成	[44]

丹红注射液是由中药丹参和红花为原料制成的中药复方制剂, 已在临床上被用于降低血脂的治疗。研究发现高脂血症大鼠经丹红注射液治疗后, 其肝脏组织中 AMPK- α 以及 PPAR- γ mRNA 表达升高, 证明丹红注射液可能会通过 AMPK/PPAR 信号通路促进脂肪酸分解代谢, 发挥降脂疗效^[48]。

复方丹参片是由丹参、三七以及冰片组成的一种复方制剂, 有活血化瘀、理气的功效。张明昊等^[49]发现复方丹参片能通过激活 LKB1-AMPK 通路, 上调 p-AMPK 水平, 下调 HMGCR 水平, 进而抑制胆固醇合成, 发挥对高脂血症的治疗作用。

藏药珊瑚七十味丸出自《四部医典》, 具有镇心、调血等功效。春花等^[50]建立大鼠高脂血症模型并利用免疫组化法和 Western blot 法监测了给药

后大鼠 LKB1/AMPK 通路相关蛋白的表达, 发现藏药珊瑚七十味丸能升高肝组织中 AMPK 磷酸化水平以及 LKB1 蛋白表达水平, 降低 HMGCR 蛋白表达, 通过 AMPK 信号通路改善高脂血症大鼠血脂水平。

香砂六君子汤由木香、砂仁、党参等组成, 具有益气健脾、行气化痰的功效。基于此方的治疗特点, 孟嘉伟^[51]以脾虚高脂血症大鼠为模型, 发现香砂六君子汤能有效激活 AMPK, 降低广泛参与脂质代谢的蛋白胰岛素诱导基因 1 (Insig-1) 的降解, 随即阻断 SREBP2 的活化, 通过 AMPK/Insig-1/SREBP2 信号通路抑制胆固醇合成; 在 HepG2 细胞脂质沉积模型中发现香砂六君子汤能阻断 AMPK 信号通路, 进一步证实了这一结论。

表 3 基于 AMPK 通路改善高脂血症的中药复方

Tab 3 Traditional Chinese medicine compound based on AMPK pathway to improve hyperlipidemia				
分类	来源	实验对象	作用机制	文献
清胆调脂汤	柴胡、竹茹、茯苓等 10 种中药	C57BL/6 小鼠	通过 AMPK 信号通路调节脂质代谢	[45]
化痰祛瘀方	绞股蓝、黄芪、党参等 9 味中药	SD 大鼠	通过 AMPK/ACC/CPT1 途径调节脂肪酸代谢	[46]
益气养阴方	黄芪、山药、西洋参等 9 味中药	ICR 小鼠	调控 AMPK/SREBP1 信号通路, 调节脂质代谢紊乱, 改善肝脏损伤	[47]
丹红注射液	丹参、红花	SD 大鼠	通过 AMPK/PPAR 信号通路促进脂肪酸分解代谢	[48]
复方丹参片	丹参、三七、冰片	SD 大鼠	激活 LKB1-AMPK 通路, 抑制胆固醇合成	[49]
珊瑚七十味丸	珊瑚、珍珠、玛瑙等 70 味藏药	SD 大鼠	通过 LKB1/AMPK/HMGCR 通路改善血脂水平	[50]
香砂六君子汤	木香、砂仁、党参等 8 味中药	SD 大鼠、HepG2 细胞	通过 AMPK/Insig-1/SREBP2 信号通路纠正脂质紊乱	[51]

4 讨论

综上所述, 近年来中药及其活性成分主要聚焦于通过激活 AMPK 通路, 抑制脂肪酸合成, 促

进脂肪酸氧化、降低胆固醇分解、改善炎症与氧化应激、促进自噬、改善线粒体功能等路径发挥对高脂血症的治疗作用, 但还存在以下问题:

① AMPK 信号通路具体如何实现对肠道菌群失衡、ERS 等病理现象的干预, 还需进一步探索。② 高脂血症具有不同的分型: 目前《中药新药临床研究指导原则》(2002 版) 总结的四种证型被各中医学家普遍认为具有一定参考价值, 包括痰浊遏阻证、肝肾阴虚证、脾肾阳虚证和气滞络瘀证, 各医家针对不同证型实施不同治法, 法随证变。现代医学又将高脂血症分为高胆固醇血症、高三酰甘油血症、混合性高脂血症以及低高密度脂蛋白胆固醇血症四类, 各类型有不同的临床特征^[52]。现有研究仍缺乏对不同类型或证型高脂血症的针对性探索, 且主要集中于动物模型, 缺乏临床考察。③ 目前 AMPK 已成为治疗代谢性疾病的一个有吸引力的靶点, 越来越多的天然药物被发现对 AMPK 有激活作用^[53], 但还未有中药单体成为靶向 AMPK 激活剂治疗高脂血症, 这可能是因为中药单体结构复杂, 难以分离纯化, 限制了其进一步研发。

因此, 未来我们应加深对高脂血症不同的辨证分型研究, 将对高脂血症的机制研究与中医的辨证论治理论相结合, 以促进中医药的现代化发展。此外, 还应进一步深入探索中药尤其是中药单体激活 AMPK 通路的具体机制, 以及 AMPK 上游、下游众多靶点之间、AMPK 与其他信号通路之间的交互作用, 同时开展更多的临床试验, 长期跟踪研究中药尤其是中药单体靶向激活 AMPK 通路的安全性, 为将来临床开发更多中药单体靶向药物提供参考。

参考文献

- [1] Yang L, Li Z, Song YQ, et al. Study on urine metabolic profiling and pathogenesis of hyperlipidemia [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2019, 495: 365-373.
- [2] 戴欣雅, 王树根, 王颖, 等. 知母山楂饮对高脂血症大鼠血脂代谢的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2024, 44 (15): 3749-3754.
- [3] 柏帆, 唐露霖, 尚文斌. 高脂血症的中医分类治疗探讨 [J]. *中医药学报*, 2022, 50 (2): 10-13.
- [4] 韩文杰, 张赤道, 李兰馨, 等. 中医药防治高脂血症临床研究的证据图分析 [J]. *中药新药与临床药理*, 2024, 35 (10): 1611-1620.
- [5] Willows R, Navaratnam N, Lima A, et al. Effect of different γ -subunit isoforms on the regulation of AMPK [J]. *Biochem J*, 2017, 474 (10): 1741-1754.
- [6] Hawley SA, Russell FM, Hardie DG. AMP-activated protein kinase can be allosterically activated by ADP but AMP remains the key activating ligand [J]. *Biochem*, 2024, 481 (8): 587-599.
- [7] Li J, Li SY, Wang FZ, et al. Structural and biochemical insights into the allosteric activation mechanism of AMP-activated protein kinase [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2017, 89

- (5): 663-669.
- [8] Jeon SM. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases [J]. *Exp Mol Med*, 2016, 48 (7): e245.
- [9] Zhang JJ, Ma XX, Fan DD. Ginsenoside CK ameliorates hepatic lipid accumulation via activating the LKB1/AMPK pathway in vitro and in vivo [J]. *Food Funct*, 2022, 13 (3): 1153-1167.
- [10] Jung EJ, Kwon SW, Jung BH, et al. Role of the AMPK/SREBP-1 pathway in the development of orotic acid-induced fatty liver [J]. *J Lipid Res*, 2011, 52 (9): 1617-1625.
- [11] Yuan ED, Duan XF, Xiang LM, et al. Aged oolong tea reduces high-fat diet-induced fat accumulation and dyslipidemia by regulating the AMPK/ACC signaling pathway [J]. *Nutrients*, 2018, 10 (2): 187.
- [12] Bak EJ, Kim J, Choi YH, et al. Wogonin ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia via PPAR α activation in db/db mice [J]. *Clin Nutr*, 2014, 33 (1): 156-163.
- [13] Shimobayashi M, Hall MN. Multiple amino acid sensing inputs to mTORC1 [J]. *Cell Re*, 2016, 26 (1): 7-20.
- [14] 金舒文, 刘嘉宝, 李丹, 等. 基于 AMPK/mTOR 通路探讨电针“丰隆”穴对高脂血症大鼠肝脏胆固醇代谢的影响 [J]. *中国针灸*, 2024, 44 (10): 1155-1164.
- [15] Zhao XJ, Yu HW, Yang YZ, et al. Polydatin prevents fructose-induced liver inflammation and lipid deposition through increasing miR-200a to regulate Keap1/Nrf2 pathway [J]. *Redox Biol*, 2018, 18: 124-137.
- [16] 王文佳, 柯尊丽, 赵梦涵, 等. 虎杖苷对高脂血症小鼠氧化应激和炎症的干预作用及机制 [J]. *时珍国医国药*, 2024, 35 (1): 44-48.
- [17] Singh V, Ubaid S. Role of silent information regulator 1 (SIRT1) in regulating oxidative stress and inflammation [J]. *Inflammation*, 2020, 43 (5): 1589-1598.
- [18] Cheng Dy, Zhang M, Zheng YZ, et al. α -Ketoglutarate prevents hyperlipidemia-induced fatty liver mitochondrial dysfunction and oxidative stress by activating the AMPK-pgc-1 α /Nrf2 pathway [J]. *Redox Biol*, 2024, 74: 103230.
- [19] 王蓉芝, 王琳雳, 焦靖雯, 等. 自噬途径降解肝脏脂滴的研究进展 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2024, 40 (9): 1916-1923.
- [20] Kim J, Kundu M, Viollet B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1 [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13 (2): 132-141.
- [21] Boulangé CL, Neves AL, Chilloux J, et al. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease [J]. *Genome Med*, 2016, 8 (1): 42.
- [22] Zhang EY, Jin LH, Wang YM, et al. Intestinal AMPK modulation of microbiota mediates crosstalk with brown fat to control thermogenesis [J]. *Nat Commun*, 2022, 13 (1): 1135.
- [23] Ma KL, Zhang YJ, Zhao JY, et al. Endoplasmic reticulum stress: bridging inflammation and obesity-associated adipose tissue [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1381227.
- [24] Jung TW, Kyung EJ, Kim HC, et al. Protectin DX ameliorates hepatic steatosis by suppression of endoplasmic reticulum stress via AMPK-induced ORP150 expression [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2018, 365 (3): 485-493.

- [25] Han HJ, Song X, Yadav D, et al. *Ulmus macrocarpa* Hance modulates lipid metabolism in hyperlipidemia via activation of AMPK pathway [J]. *PLoS One*, 2019, 14 (5): e0217112.
- [26] Shatoor AS, Al Humayed S, Almohiy HM. *Crataegus aronia* prevents high-fat diet-induced hepatic steatosis in rats by activating AMPK-induced suppression of SREBP1 and activation of PPAR α [J]. *Food Biochem*, 2021, 45 (11): e13945.
- [27] 沙子珺, 黎彩凤, 唐仕欢, 等. 新资源药材辣木叶抗高脂血症的药效与作用机制探析 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46 (14): 3465-3477.
- [28] 孙嫣, 黄晶晶, 业康, 等. 乌药叶提取物对高脂血症模型大鼠降脂作用以及肝脏 LKB1-AMPK 通路的影响 [J]. *中国现代应用药学*, 2020, 37 (7): 821-825.
- [29] Liu CM, Ma JQ, Sun JM, et al. Flavonoid-rich extract of *Paulownia fortunei* flowers attenuates diet-induced hyperlipidemia, hepatic steatosis and insulin resistance in obesity mice by AMPK pathway [J]. *Nutrients*, 2017, 9 (9): 959.
- [30] Cao K, Lv WQ, Liu XY, et al. *Herba houttuyniae* extract benefits hyperlipidemic mice via activation of the AMPK/PGC-1 α /Nrf2 cascade [J]. *Nutrients*, 2020, 12 (1): 164.
- [31] Su XT, Hao S, Li WN, et al. Gardenia fruit and *Eucommia* leaves combination improves hyperlipidemia and hyperglycemia via pancreatic lipase and AMPK-PPAR α and Keap-1-Nrf2-HO-1 regulation [J]. *J Funct*, 2023, 100: 105394.
- [32] Gao G, Zhao J, Ding J, et al. Alisol B regulates AMPK/mTOR/SREBPs via directly targeting VDAC1 to alleviate hyperlipidemia [J]. *Phytomedicine*, 2024, 128: 155313.
- [33] 宓伟, 于敏, 李宁, 等. 基于 AMPK/SREBP-1c 分子通路的山楂原花青素调控脂质代谢机制 [J]. *食品科学*, 2023, 44 (15): 129-136.
- [34] 刁婷婷, 张雨晨, 陈创, 等. 山楂叶总黄酮对高脂血症大鼠血脂的影响及其机制 [J]. *医药导报*, 2020, 39 (6): 757-762.
- [35] Shen BY, Wen YQ, Li SX, et al. Paeonol ameliorates hyperlipidemia and autophagy in mice by regulating Nrf2 and AMPK/mTOR pathways [J]. *Phytomedicine*, 2024, 132: 155839.
- [36] Lan Y, Sun QY, Ma ZY, et al. Seabuckthorn polysaccharide ameliorates high-fat diet-induced obesity by gut microbiota-SCFAs-liver axis [J]. *Food Funct*, 2022, 13 (5): 2925-2937.
- [37] Gu YY, Zhang YX, Li M, et al. Ferulic acid ameliorates atherosclerotic injury by modulating gut microbiota and lipid metabolism [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 62133.
- [38] Nyandwi JB, Ko YS, Jin H, et al. Rosmarinic acid exhibits a lipid-lowering effect by modulating the expression of reverse cholesterol transporters and lipid metabolism in high-fat diet-fed mice [J]. *Biomolecules*, 2021, 11 (10): 1470.
- [39] He LF, Wang C, Zhang YF, et al. Effect of emodin on hyperlipidemia and hepatic lipid metabolism in zebrafish larvae fed a high-cholesterol diet [J]. *Chem Biodivers*, 2022, 19 (2): e202100675.
- [40] Meng C, Zhou LY, Huang L, et al. Chlorogenic acid regulates the expression of NPC1L1 and HMGCR through PXR and SREBP2 signaling pathways and their interactions with HSP90 to maintain cholesterol homeostasis [J]. *Phytomedicine*, 2024, 123: 155271.
- [41] Gao S, Hu GS, Li D, et al. Anti-hyperlipidemia effect of sea buckthorn fruit oil extract through the AMPK and Akt signaling pathway in hamsters [J]. *J Funct*, 2020, 66: 103837.
- [42] 陈健, 高晶森, 顾亚茹, 等. 黄芪总皂苷配伍荷叶总生物碱对高脂血症大鼠肝脏 AMPK/SREBP-1c/ACC 通路的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2023, 34 (1): 25-34.
- [43] Lin BY, Wan H, Yang JH, et al. Lipid regulation of protocatechualdehyde and hydroxysafflor yellow A via AMPK/SREBP2/PCSK9/LDLR signaling pathway in hyperlipidemic zebrafish [J]. *Heliyon*, 2024, 10 (3): e24908.
- [44] Zhang HH, Sun YT, Zou YQ, et al. Stigmasterol and gastrodin, two major components of banxia-baizhu-tianma decoction, alleviated the excessive phlegm-dampness hypertension by reducing lipid accumulation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 319 (2): 117193.
- [45] 叶寒露, 王柯. 清胆调脂汤合并阿托伐他汀钙对高脂血症小鼠肠道功能的影响及机制 [J]. *中国老年学杂志*, 2024, 44 (13): 3288-3292.
- [46] 赵娜, 隋国媛, 王杰, 等. 化痰祛痰方对高脂血症大鼠肝脏 CYP2J3/EETs 介导脂肪酸代谢的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2024, 42 (2): 93-97, 277.
- [47] 任蓁, 刘思莹, 代培方, 等. 益气养阴方对高脂血症模型小鼠 AMPK/SREBP-1c 通路相关基因及蛋白的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2023, 34 (10): 2342-2346.
- [48] 杜海霞, 周惠芬, 何昱, 等. 基于脂质代谢紊乱探讨丹红注射液对高脂血症大鼠的降脂作用及机制 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45 (13): 3203-3210.
- [49] 张明昊, 张童, 郭申, 等. 复方丹参片通过 LKB1-AMPK 通路干预高脂血症大鼠的作用机制研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2022, 33 (2): 158-164.
- [50] 春花, 魏丹丹, 朱星昊, 等. 藏药珊瑚七十味丸对高脂血症模型大鼠的降脂作用及机制研究 [J]. *中国药房*, 2022, 33 (1): 46-50.
- [51] 孟嘉伟. 香砂六君子汤通过 AMPK/Insig-1/SREBP2 通路调控胆固醇合成防治血脂异常的机制研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2023.
- [52] 王增武, 刘静, 李建军, 等. 中国血脂管理指南 (2023 年) [J]. *中国循环杂志*, 2023, 38 (3): 237-271.
- [53] 赵力挥, 王璐, 刘文丽, 等. 天然产物中的 AMPK 激活剂研究进展 [J]. *中草药*, 2017, 48 (18): 3885-3896.

(收稿日期: 2024-09-19; 修回日期: 2024-11-11)

双黄连注射剂的质量控制研究进展

黄楠楠^{1, 2}, 笔雪艳^{1, 2*}, 谭秀尧^{1, 2}, 王立运², 杨炳友² (1. 黑龙江省药品检验研究院, 国家药品监督管理局中药质量研究与评价重点实验室, 黑龙江省中药质量研究与评价重点实验室, 哈尔滨 150088; 2. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

摘要: 双黄连注射剂是在中医理论指导下研发的中药新剂型, 具有吸收快、药效迅速等特性, 伴随着双黄连注射剂使用量的增加, 不良反应情况也多有报道, 其安全可控性受到广泛关注。本研究以质量控制为切入点, 通过检索, 分析和整合相关资料, 整理出双黄连注射剂 3 种剂型质量标准的异同, 进而对双黄连注射剂质量标准研究方法进行探究, 从含量测定、药物代谢研究、特征图谱、安全性研究四个方面进行研究论述, 为提升双黄连注射剂质量的安全性和稳定性提供思路, 为其质量标准研究提供参考。

关键词: 双黄连注射剂; 质量控制; 含量测定; 安全性

中图分类号: R284.1, R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)05-1377-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.030

Research progress in quality control of Shuanghuanglian injection

HUANG Nan-nan^{1, 2}, BI Xue-yan^{1, 2*}, TAN Xiu-yao^{1, 2}, WANG Li-yun², YANG Bing-you² (1. Heilongjiang Institute for Drug Control, National Medical Products Administration Bureau, Key Laboratory of Quality Research and Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang Key Laboratory of Quality Research and Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150088; 2. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040)

Abstract: Shuanghuanglian injection is a new dosage forms of traditional Chinese medicines (TCM) currently developed under the guidance of TCM theory. It is rapidly absorbed and effective. However, with the rise in usage, more adverse reactions are reported. As a result, safety control has gained much attention. This study focused on quality control as the breakthrough point by searching, analyzing, and integrating relevant data to sort out the similarities and differences of quality standards for three dosage forms of Shuanghuanglian injection. The methods for establishing quality standards for Shuanghuanglian injection from content determination, drug metabolism, characteristic mapping, and safety. The aim is to improve the safety and stability of Shuanghuanglian injection.

Key words: Shuanghuanglian injection; quality control; content determination; safety

《中国药典》2020 年版收录了双黄连注射剂, 该药品归属于成方制剂和单味制剂项下^[1], 由连翘、金银花和黄芩三味药制成。双黄连注射剂中的主要有效成分包括绿原酸、黄酮苷、黄芩苷、连翘苷等, 临床上常用于治疗外感风热引起的发热、咳嗽、咽痛以及上呼吸道感染、轻型肺炎等症状^[2-3]。2003 年, 在中华中医药学会发布的《传染性非典型肺炎 (SARS) 中医诊疗指南》中, 双黄连注射剂为治疗 SARS 早期或进展期的疫毒犯肺、疫毒壅肺以及肺闭喘憋证等的推荐药剂^[4]。相较于抗菌药物, 在某些疾病中, 双黄连注射剂能够更好地缩短患者

的恢复时间, 治疗效果也更为显著, 因此在小儿肺炎的治疗中被广泛使用^[5-6]。

双黄连注射剂包括双黄连注射液、注射用双黄连 (冻干) 和双黄连粉针剂 3 种剂型, 其中注射用双黄连 (冻干) 和双黄连粉针剂是双黄连注射液的改良型品种, 经指纹图谱验证冻干剂与粉针剂仅存在工艺上的差别, 基本不存在成分种类上的差别。在 3 种剂型的处方中, 黄芩、金银花和连翘的比例均为 1:1:2, 采用现代制剂工艺进行制备, 均具有清热解毒、疏风解表的作用, 但其特征成分含量与现行质量标准差异较大。目前, 双黄连注射液的标准为国家药品标准

基金项目: 黑龙江省博士后资助项目 (No.LBH-Z23267)。

作者简介: 黄楠楠, 女, 讲师, 主要从事中药质量控制研究, email: nannandeyx@163.com * **通信作者:** 笔雪艳, 女, 主任药师, 主要从事中药质量评价与控制研究, email: 65554629@qq.com

WS₃-B-2104-96-2010, 注射用双黄连(冻干)的标准为《中国药典》2020 年版, 双黄连粉针剂的标准为新药转正标准第 18 册^[7]。本研究对比了 3 种剂型的质量标准, 并整理了近年来双黄连注射剂的研究文献, 以期为进一步完善其质量标准提供参考。

1 双黄连注射剂 3 种剂型质量标准对比分析

对比分析 3 种剂型现行质量标准, 发现三者在

鉴别、检查和含量测定三方面均存在较大差异: 鉴别项下薄层色谱法中连翘的展开剂不同; 检查项下的 pH 值, 溶液的澄清度与颜色, 不溶性微粒, 树脂, 草酸盐, 砷盐项的质量标准存在差异; 受剂型影响, 部分检测需取样溶解稀释后进行检验; 同一形态的剂型质量标准相似, 不同剂型对活性物质含量的要求各不相同。具体对比情况见表 1。

表 1 3 种剂型双黄连注射剂的质量标准对比

Tab 1 Quality standards of three dosage forms of Shuanghuanglian injection

指标	项目	双黄连注射液	注射用双黄连(冻干)	双黄连粉针剂
性状		棕红色的澄清溶液	黄棕色的无定形粉末或疏松固体状物; 有引湿性	黄棕色无定形粉末或疏松固体状物, 有引湿性; 味苦、涩
鉴别		黄芩苷, 绿原酸: 85% 乙醇溶解, 照薄层色谱法实验, 聚酰胺薄膜, 醋酸展开, 365 nm 下检视; 连翘: 照薄层色谱法, 三氯甲烷-甲醇(8:1)展开, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 105℃加热, 色谱相应位置相同斑点	黄芩苷, 绿原酸: 75% 甲醇溶解, 照薄层色谱法, 聚酰胺薄膜, 醋酸展开, 365 nm 下检视; 连翘: 照薄层色谱法, 三氯甲烷-甲醇(5:1)展开, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 100℃加热, 色谱相应位置相同斑点	黄芩苷, 绿原酸: 75% 甲醇溶解, 照薄层色谱法实验, 聚酰胺薄膜, 醋酸展开, 365 nm 下检视; 连翘: 照薄层色谱法, 三氯甲烷-甲醇(10:2)展开, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 100℃加热, 色谱相应位置相同斑点
检查	pH 值	应为 5.0~7.0	按比例溶解稀释后应为 5.7~6.7	按比例溶解稀释后应为 5.7~6.7
	溶液的澄清度与颜色	稀释, 取样置纳氏比色管中, 与黄色 7 号标准比色液比较, 不得更深	无此项	加热或静置溶解, 无肉眼可见微粒
	不溶性微粒	每个供试品容器(份)中含 10 μm 及 10 μm 以上的微粒数不得过 6000 粒, 含 25 μm 及 25 μm 以上的微粒数不得过 600 粒	每个供试品容器(份)中含 10 μm 及以上的微粒数不得过 6000 粒, 含 25 μm 及以上的微粒数不得过 600 粒	80 mL 纯净水溶解本品后, 每 1 mL 中含 10 μm 以上的微粒不得过 20 粒, 含 25 μm 以上的微粒不得过 2 粒
	水分	无此项	不得过 5.0%	不得过 5.0%
	热原	取本品, 家兔每 1 kg 注射 1 mL	取本品, 按比例溶解, 家兔每 1 kg 注射 3 mL	取本品, 按比例溶解, 家兔每 1 kg 注射 3 mL
	蛋白质鞣质	加鞣酸试液 1~3 滴, 不得产生混浊; 取 1 mL 加新鲜配制的含 1% 鸡蛋清的生理盐水 5 mL, 放置 10 min, 不得出现混浊或沉淀	加鞣酸试液 1~3 滴, 不得产生混浊; 取本品 0.6 g, 加水 10 mL 使溶解, 取 1 mL 加新鲜配制的含 1% 鸡蛋清的生理盐水 5 mL, 放置 10 min, 不得出现浑浊或沉淀	加鞣酸试液 1~3 滴, 不得产生混浊; 取本品 0.6 g, 加水 10 mL 使溶解, 取 1 mL 加新鲜配制的含 1% 鸡蛋清的生理盐水 5 mL, 放置 10 min, 不得出现浑浊或沉淀
	树脂	取本品 5 mL, 加盐酸 1 滴, 放置 30 min, 不得出现沉淀	三氯甲烷 10 mL 萃取后蒸干, 残渣加冰醋酸, 置具塞试管中, 加水混匀, 放置 30 min, 不得出现沉淀	三氯甲烷 10 mL 萃取后蒸干, 残渣加冰醋酸, 置具塞试管中, 加水混匀, 放置 30 min, 不得出现沉淀
	草酸盐	调节 pH 值之后加 3% 氯化钙溶液, 放置 10 min, 不得出现混浊或沉淀	调节 pH 值之后加 3% 氯化钙溶液, 放置 10 min, 不得出现浑浊或沉淀	调节 pH 值之后加 3% 氯化钙溶液, 放置 10 min, 不得出现浑浊或沉淀
	炽灼残渣	不得过 1.5%	无此项	无此项
	重金属	铅不得过 12 μg; 镉不得过 3 μg; 汞不得过 2 μg	不得过 10 mg·kg ⁻¹	不得过百万分之十
	砷盐	日最大使用量中砷不得过 6 μg	含砷不得过 2 mg·kg ⁻¹	不得过百万分之五
	钾离子	目测比浊, 钾离子不得过 10 μg	目测比浊度	目测比浊度
	溶血与凝聚	4 h 无溶血凝血现象	2 h 无溶血凝血现象	4 h 无溶血凝血现象
	总固体	遗留残渣应为 2.1%~2.9% (g·mL ⁻¹)	无此项	无此项
	无菌	直接接种法; 薄膜过滤法	薄膜过滤法	直接接种法; 薄膜过滤法
	异常毒性	5 只小鼠给药 48 h 内不得有死亡	无此项	无此项
	过敏试验	豚鼠静脉注射供试品 30 min 后不得出现过敏反应	无此项	无此项
	其他	注射剂项下有关的各项规定	注射剂项下有关的各项规定	注射剂项下有关粉针剂的各项规定
含量测定		绿原酸(C ₁₆ H ₁₈ O ₉)和咖啡酸(C ₉ H ₈ O ₄)的总量应为 0.21~0.32 mg·mL ⁻¹ ; 黄芩以黄芩苷(C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁)计, 应为 6.5~8.7 mg·mL ⁻¹ ; 连翘以连翘苷(C ₂₇ H ₃₄ O ₁₁)计, 应为 0.12~0.18 mg·mL ⁻¹	金银花以绿原酸(C ₁₆ H ₁₈ O ₉)计, 应为 8.5~11.5 mg; 黄芩以黄芩苷(C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁)计, 应为 128~173 mg; 连翘以连翘苷(C ₂₇ H ₃₄ O ₁₁)计, 应为 1.4~2.1 mg	金银花以绿原酸(C ₁₆ H ₁₈ O ₉)计, 应为 8.5~11.5 mg; 黄芩以黄芩苷(C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁)计, 应为 127.5~175.5 mg
规格		每支 20 mL	每支装 600 mg	每支 600 mg (黄芩苷 150 mg, 绿原酸 10 mg)
贮藏		密封, 避光, 置阴凉处	遮光, 密闭, 置阴凉处	密封, 避光, 置阴凉干燥处

2 双黄连注射剂的质量控制研究方法

双黄连注射剂与传统剂型相比起效更快,生物利用度更高,为相关疾病的治疗提供了更多选择^[8]。近年来人们对药品的安全性和有效性有了更多的认知,双黄连注射剂虽因部分药理作用不明确而使发展受到制约,但其具有明确的清热解毒临床药效,仍具有较高研究改进价值。为使双黄连注射剂能够被更广泛和安全地应用,本文主要从含量测定、药物代谢研究、特征图谱和安全性研究四个方面进行简要综述。

2.1 含量测定

含量测定是指采用药品标准中规定的实验方法,对药品中的有效成分和含量进行测定,旨在对药品的成分和质量进行量化分析,是质量控制中的重要一项。双黄连注射剂作为复方制剂,其成分较为复杂,微量组分较多,对于测定方法的灵敏度和分辨率要求较高,近期研究集中在色谱联用分析法和光谱技术等方面。

2.1.1 色谱联用分析法 高效液相色谱法(HPLC)现用于复杂化合物的分离和分析,该方法具有速度快、灵敏度高、分辨率高、重复性好的特点。双黄连注射剂化学成分呈现复杂性和多样性,近年来大量研究将液相色谱与其他方法联用,对其进行了系统含量测定的探索。Yin等^[9]采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间-质谱联用和超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱-质谱联用对双黄连粉针剂中主要成分的含量进行测定,通过超高效液相色谱平行反应监测模型成功定量了新绿原酸、绿原酸、苦参苷、连翘酯苷A等10种具有代表性的生物活性成分,平行反应监测法与常规液质联用技术中选择性响应监测方法获得的分析结果相比,具有更高的特异性和更低的干扰,促进了痕量物质的响应。Xue等^[10]通过超高效液相色谱串联高分辨率质谱(UPLC/Q-Orbitrap-MS)方法对双黄连注射剂中的31个化合物进行了鉴定,在定性分析的基础上,建立了超高效液相色谱二极管阵列检测器(UPLC-PDA)多波长切换法结合比例稀释法对20批双黄连注射剂中的22个具有代表性的化合物进行定量分析。

二极管阵列检测与高效液相色谱法结合也是研究的重要领域,Sun等^[11]采用高效液相色谱-二极管阵列检测器-电喷雾电离-离子阱-时间飞行-质谱方法,对双黄连粉针剂中各成分进行结构鉴定,并对得到的125种成分进行明确鉴定或初步表征,对各类化合物的断裂途径进行了详细的解释和总结,研究发现均方位移中的高碰撞能量导致了葡萄糖环的不同裂解,这一策略对酚酸、

苯乙醇类糖苷、醌类糖苷和烷基苯糖苷均有效,说明适当增加碰撞能量有利于在定性分析复杂中药配方时产生足够多的组分片段。Luan等^[12]则将重点放在了注射剂中的有机酸和黄酮类化合物的同时分析上,该团队建立了一种具有二极管阵列检测功能的高效液相色谱法,并对多家制药企业不同批次的双黄连注射液进行检测,结果显示不同样品中35种生物活性化合物的组成存在显著差异,8种化合物的含量有差异,这种相对含量的差异会引起药效的差异,该研究表明,明确主要生物活性物质的含量范围对于进一步完善质量控制标准具有重要意义。Chen等^[13]建立了一种三通道等容洗脱高效液相色谱-电化学检测系统(3CE-EDC),用于同时测定双黄连注射剂中各种生物活性成分,包括咖啡酸、奎宁酸、类黄酮苷和糖苷等。与LC-UV/DAD、LC-ELSD、LC-MS/MS等方法相比,3CE-EDC方法对酚酸和黄酮类化合物等具有较高的选择性,这些化合物同时是多种中草药的主要活性成分;与单通道等压LC-ECD相比,3CE-EDC方法分析时间显著缩短,与梯度LC-ECD相比灵敏度显著提高,该方法成功地同时测定各种疏水性差异显著的氧化还原化合物提供了一种更为便捷高效的分析方法。

2.1.2 光谱技术和TOPSIS法联用 光谱技术较为常用,其本身具有特征性强、试样用量小、操作快捷简便等优势,但同时也存在分析灵敏度低,误差较大的缺陷。TOPSIS法即逼近理想解排序方法,该方法通过检测评价对象与最优解、最劣解的距离进行排序和优劣比较,是多目标决策分析中一种常用的有效方法,也可以较好地弥补光谱技术的劣势,近年来有部分研究人员尝试将两种方法结合起来,取长补短,获得更加准确的数据结果。据茨^[14]采用了光谱技术与化学计量学相结合的方法对双黄连注射液进行一致性质量评价,结合TOPSIS评价法,消除了主观因素的干扰,此项研究论述的是双黄连注射液的质量控制,为中药制剂的快速质量分析提供新思路。Ju等^[15]采用衰减全反射红外(ATR-IR)光谱和近红外(NIR)光谱结合化学计量学对双黄连注射液活性成分进行快速检测和质量评价,结果表明两种光谱技术结合偏最小二乘回归方法都能准确预测双黄连注射剂中黄芩苷、连翘苷和绿原酸的含量,且衰减全反射红外光谱的结果更优。基于光谱技术和化学计量学,为药物或食品的快速定量分析和质量评价提供了很好的思路,且两项研究对双黄连注射剂进行一致性评价时都采用了熵加权TOPSIS法,将一致性评价结果与TOPSIS法相结合可以尽量消除主观因素的干扰,增加分析的准确度。

2.2 药物代谢研究

通过对药物入血成分的定性、定量及动力学的研究,可明确药物在体内产生治疗作用的过程,为新药的研究和开发提供参照。双黄连注射剂成分较为复杂,提取代谢产物和研究代谢途径的难度也较大,因此对双黄连注射剂检测样品的制备、入血成分及代谢产物、代谢途径三方面的研究具有重要意义。

2.2.1 样品的制备 进行代谢物分析前需要进行有效的样品制备策略,不同的样品处理办法对样品的纯度具有较大的影响。Yin 等^[16]以基质效应、萃取回收率、变异系数为标准,分析比较了 21 种血浆样品处理办法的优劣,其中液液萃取的 LLE-3 组(戊醇-四氢呋喃-水=1:4:35)综合评分最高,为最佳的预处理方法,研究中新发现了 13 种代谢物,提出了“中药多组分代谢平台的特征离子提取”策略(FMM 策略),为双黄连注射剂药理学和药代动力学研究提供了必要数据,FMM 策略可以作为一种有效的方法促进生物样品中代谢物的筛选和表征。

2.2.2 入血成分及代谢产物 入血成分及其代谢产物是双黄注射剂的体内药效物质基础,同一处方的不同剂型会对药物活性成分的吸收速度和生物利用度等产生一定影响。汪祺等^[17]比较了大鼠灌胃给药前后血药成分的变化,发现连翘的几个主要成分没有明显的入血吸收,而绿原酸、黄芩苷、黄芩素和与黄芩苷结构相似的两个代谢物入血吸收的现象较为明显。绿原酸入血较少,灌胃的生物利用度较低,而其代谢产物咖啡酸、奎尼酸等入血较多;灌胃时黄芩苷的降解速度大于黄芩提取物。Chen 等^[18]以绿原酸、连翘酯苷 A 和黄芩苷为标志物比较了双黄连注射液气管内给药和静脉给药的血药浓度,结果显示经气管内给药后,3 种物质从肺循环到体循环的解离度大大降低,浓度差异值超过 100 倍。这些研究通过对比不同给药形式分析药物入血的成分和含量,有助于进一步查找双黄连注射剂不良反应的原因,也为双黄连注射剂质量标准的优化提供了数据支持。Wang 等^[19]采用核磁共振技术对双黄连注射剂进行化学分析,鉴定出 17 种主要代谢物,在网络药理学方法的指导下,对除甲酸外 7 种初步代谢物的抗炎、抗氧化等潜在活性进行了简要预测,重点研究的主要代谢物采用质子核磁共振方法进行定量,主要代谢物的平均总含量为 $6.85 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,占双黄连注射剂总体的 24.84%。Guo 等^[20]基于代谢组学技术,采用 UPLC-Q-TOF-MS 结合多因素统计分析,快速灵敏地鉴定了双黄连注射剂的 23 个原形组分和 12 个代谢物,发现双黄连注射剂在人体

内主要引起甲基化、葡萄糖醛酸化等Ⅱ期代谢产物反应和其他复杂的共轭反应,这种化合物的鉴定和结构解析避免了预测可能代谢物的复杂过程,更为快速高效,为双黄连注射剂的进一步药理学和药代动力学研究提供重要数据。

2.2.3 代谢途径 代谢途径的研究可以为实现药物最佳疗效,剔除不良化合物,控制药品质量提供重要支撑。双黄连注射剂通过多种途径纠正紊乱的代谢,达到治疗疾病的目的,Gao 等^[21]通过给大鼠注入酵母水悬浮液建立大鼠发热模型,比较正常大鼠,发热大鼠和发热给药大鼠的血浆,分析双黄连注射液治疗发热的途径,发现给药后代谢谱的改变涉及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成,甘油磷酸酯代谢,酮体合成和降解,胆汁酸生物合成,核黄素代谢 5 种代谢途径。Gu 等^[22]用尿液作为样本进行研究,将生物标志物与代谢途径相联系,发现双黄连注射剂在引起过敏反应中涉及的代谢途径包括亚麻酸、苯丙氨酸、2-戊酮酸、嘌呤等。Yan 等^[23]研究了不同剂量的双黄连注射剂对比格犬的膜损伤和溶血作用,认为血清胆碱、磷酸胆碱、乳酸和牛磺酸可能是双黄连注射剂致溶血性贫血的毒理学生物标志。Zhang 等^[24]通过动物实验和 LC-MS 代谢组学分析评价过敏反应,鉴定出包括脱氧胆酸、组胺和 5-羟色氨酸等 23 种不同的代谢物,经代谢分析平台分析后获得代谢途径包括类固醇激素生物合成、色氨酸代谢、组氨酸代谢、花生四烯酸代谢、烟酸和烟酰胺代谢、初级胆汁酸生物合成、氨酰 tRNA 生物合成共 7 个方面,且药物剂量与代谢途径紊乱程度成正相关。虽然该方法对代谢途径的研究较为完善,但未考虑到外源性污染和辅料等因素,后续可进一步探究代谢途径具体过程,用于预测双黄连注射剂治疗的一些可能目标,实现药物最佳疗效。经上述研究发现,双黄连注射剂对代谢途径及过敏反应存在影响,部分联系情况如图 1 所示。

2.3 特征图谱

免疫指纹图谱法特异性较强,较为便捷,在中药注射剂研究领域发挥越来越重要的作用,在药典中已被用于双黄连注射剂的鉴别和检查,对免疫指纹图谱法的深入研究可以完善对双黄连注射剂致敏成分的认识。文雯等^[25]通过酶联免疫吸附法(ELISA 法)结合 HPLC 的实验证实了免疫指纹图谱法与传统的中药注射剂致敏原筛查方法相比,灵敏度更高,操作更便捷。刘润南等^[26]利用免疫指纹图谱法进一步论证了绿原酸为双黄连注射剂中的致敏性成分。冯宇飞等^[27]通过 UPLC 指纹图谱与偏最小二乘回归法相结合,分析得出致类过敏作用与其提取成分有关,部分致敏成分可在制剂中减少或清除,为研究中药注射剂中的

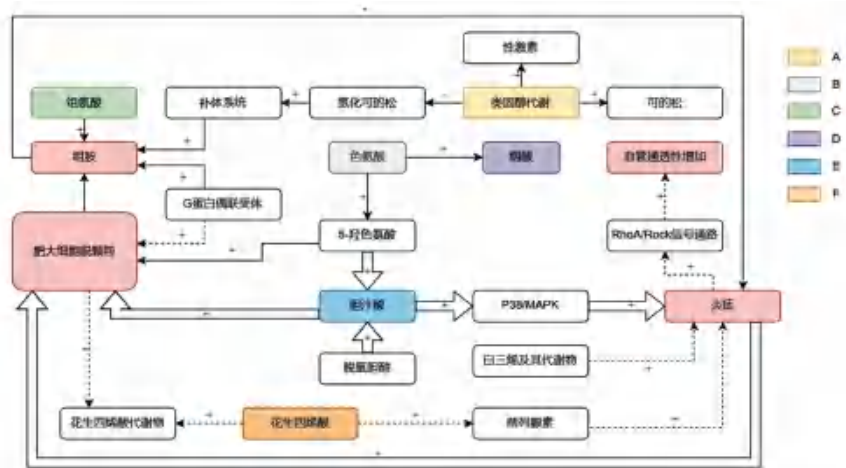


图 1 使用双黄连注射剂后代谢组分变化及其与过敏反应的部分联系

Fig 1 Modifications of metabolic components after Shuanghuanglian injection and its partial association with anaphylaxis

A. 类固醇激素生物合成 (steroid hormone biosynthesis); B. 色氨酸代谢 (tryptophan metabolism); C. 组氨酸代谢 (histidine metabolism); D. 烟酸的合成与代谢 (synthesis and metabolism of niacin); E. 初级胆汁酸生物合成 (primary bile acid biosynthesis); F. 花生四烯酸代谢 (arachidonic acid metabolism); +. 使箭头指向物质含量增加或者促进反应正向进行 (point the arrow towards an increase in substance content or promote a positive reaction); -. 使箭头指向物质含量降低或者抑制反应正向进行 (point the arrow towards a decrease in substance content or inhibit the forward reaction)

过敏性物质提供方法学基础。

除了将指纹图谱与过敏反应相结合的研究外,也有进行双黄连注射剂质量一致性的研究。穆琦瑄等^[28]针对双黄连注射剂指纹图谱中未鉴定的指纹峰,通过大孔吸附树脂、制备液相色谱等分离方法得到化合物,并对其采用核磁共振法鉴定,确定了 13 个色谱峰的归属,验证了双黄连注射剂质量的稳定性,药材、中间体、成品之间存在良好的相关性。赵丹等^[29]将 HPLC 与聚类分析方法相结合,实现了快速、高效的双黄连冻干粉的质量检测,与冯五文等^[30]研究的结果一致,该方法为不同批次的注射用双黄连冻干粉质量鉴定提供了科学依据。此外有研究通过细胞响应谱对双黄连注射剂进行质量控制研究,发现基于肥大细胞脱颗粒效应的细胞响应谱方法具有简便高效的特点,具有发展前景,可为双黄连注射剂质量控制和临床安全用药提供参考^[31-32]。

2.4 安全性研究

在明确药物的剂量和疗效的同时也需要注意药物的安全性,本文将从双黄连注射剂的过敏反应和类过敏反应、实验用动物模型、毒性研究 3 个方面进行梳理。

2.4.1 过敏反应和类过敏反应 药物超敏反应包括过敏性超敏反应和非过敏性超敏反应。过敏性超敏反应是由免疫机制诱导的超敏反应,即通常所说的过敏反应,可分为速发型、细胞毒型、免疫复合物型、迟发型或细胞介导型^[33]。类过敏性超敏反应是指不由免疫机制介导产生的不良反应^[34]。临床中速发型过敏反应与类过敏反应两者症状相似,难以区分。双黄连注射剂成分复杂,

且制剂难度相对较高,制剂过程中可能留有鞣质、树脂、蛋白质等未除尽的组分,这些成分可能作为抗原、半抗原或刺激肥大细胞和嗜碱性粒细胞脱颗粒引起机体的过敏反应或类过敏反应。

① 过敏反应:过敏反应可能与现有测定树脂方法的灵敏度不高有关,基于此,刘清成等^[35]发现了提高树脂检查灵敏度的新方法,将双黄连注射液用分子筛 10 倍富集大分子物质后,取大分子富集液 5 mL 参照《中国药典》树脂项下的规定进行检测。该研究可以更好地控制双黄连注射剂中的树脂成分含量,减少过敏反应。过敏反应还可能与药剂本身有效成分有关,例如双黄连注射剂中金银花的有效成分之一绿原酸,通过刘润南等^[26]对多种致敏机制的研究和实验验证,推测其具有致敏性,有较高引发变态反应的可能。该研究通过 ELISA 法与免疫指纹图谱法验证了上述实验结果,此研究方法对快速进行中药注射剂中致敏性成分检测具有实用价值。邓颖颖等^[36]采用 ELISA 法检测血清的抗体效价和含量,间接竞争 ELISA 法测定血清特异性并绘制抑制曲线,实验结果显示异绿原酸 C 的抗体效价是阴性对照组的 2 倍,还采用间接竞争 ELISA 法确定了黄芩苷对家兔的致敏性。对双黄连注射剂中有效成分导致过敏反应这一方面的研究,可以聚焦致敏途径,同时对双黄连注射剂的多种有效成分的致敏性和有效成分含量比例对致敏性的影响进行深度剖析,让更多的科研成果助力中药注射剂的推广与高质量发展。

② 类过敏反应:大量研究聚焦于双黄连注射剂含量与类过敏反应的关系。基于双黄连注射

剂中有效成分既是起效的物质基础,也是致敏的物质基础这一观点,有研究比较了不同生产企业间和不同剂型之间的差异性,发现尽管与现行质量标准测定方法比对结果一致,但不同企业生产的产品中绿原酸和咖啡酸两种成分的比例存在差异^[37-38]。连翘酯苷 A 和连翘苷均存在于冻干剂和粉针剂中,但其在粉针剂中的含量与冻干剂中的含量相差接近 2 倍,并且不同批次间的有效成分含量存在较大的差异。除连翘苷含量相近外,黄芩苷、绿原酸等成分在 3 种剂型中的含量差异也较大。不同成分的比例会影响药效和过敏反应的程度,研究显示连翘苷类是双黄连注射液的主要致类过敏反应物质,其中致类过敏活性成分连翘酯苷 A 的含量最高,而现行质量标准中双黄连粉针剂对连翘苷的含量并无限制,建议质量标准完善时细化含量测定项下的门类,将含量较高的活性成分纳入此项并进行范围控制,在保证药效的同时减少类过敏反应的发生^[39]。陈莉等^[40]以 MrgprX2 为靶点,应用分子对接软件筛选双黄连注射剂中 13 种单体成分的潜在类过敏作用,按照对接结果中的结合能排序,从低到高排名前三位化合物分别为连翘酯苷 A、黄芩苷和野黄芩苷,除连翘酯苷 A 进行了明确的无类过敏反应的最高剂量测定外,其余 12 种单体未进行剂量测定,后续可进行相关方面的研究明确各种单体的无过敏反应最高剂量,设定剂量范围标准应用于生产企业产品的质量控制,并且建立单体化合物与成品注射剂之间的内在关联性,使其可溯源性加强^[41]。有研究显示,绿原酸、黄芩苷等成分可能为过敏原,推测致敏机制是其与载体蛋白结合或自身聚合成超分子,作为抗原引起免疫应答从而引起免疫毒性反应^[42]。不同成分的含量和比例可能通过影响血药浓度或给药速度、剂量,对药效和过敏反应等产生影响^[43],而代谢研究中提到血药浓度最大剂量,代谢途径紊乱程度也会对过敏反应强弱产生一定影响,两者基本成正相关。综上所述,完善双黄连注射剂中有效成分的含量范围限定,可为企业的药品质量标准制订提供合理依据,并有助于国家的药品质量标准统一。

另有研究表明类过敏反应与物质种类有关联,张伟龙等^[44]以大鼠作为实验动物,静脉注射给药后对含药血浆进行 HPLC 色谱的测定,认为 C6 (32.85 ~ 34.55 min) 最可能为类过敏的反应原,但并未进一步明确该成分群的组成。另一观点是双黄连注射剂引发的类过敏反应是注射剂中的大分子杂质造成的,万绪莲等^[45]的研究设置了含有大分子杂质的注射液和不含大分子杂质的注射液两组,从被动皮肤过敏实验 (PCA) 和肺灌注实

验可以看出含有大分子杂质的注射液造成的类过敏反应更加严重,造成血管通透性增加,该实验与 Li 等^[46]的研究结果一致。也有学者认为双黄连注射剂通过过敏毒素 C5a,不通过免疫球蛋白 E (IgE) 诱发超敏反应^[47],有关双黄连注射剂的过敏机制有待于更深入的探索。

2.4.2 实验用动物模型 新药产业免疫毒理学评估指南指出,在药物过敏实验时动物出现过敏样反应症状后,可进行进一步实验区分该过敏样症状出现的原因,建议采取肥大细胞检测组胺释放,或采用小型猪检测补体激活潜力,两项实验操作中前者难以保证稳定性和重复性,后者成本较高,故在中药注射剂实验中不予采纳^[39]。小鼠和大鼠模型利用类过敏反应使血管通透性增大的原理,通过检测类过敏反应发生后伊文思蓝渗出量来评价类过敏反应强弱,上述两种模型具有敏感、稳定、成分低廉和重复性好等特点,应用范围较广^[48-49]。小鼠行为与类过敏反应程度也表现出强烈的相关性,为了使研究结果更加准确完善,也有学者同时采用两种方式评价类过敏反应强度,即检测类过敏反应发生后伊文思蓝渗出量和观察记录实验中的小鼠行为^[24]。小鼠行为与类过敏反应程度对照图见图 2。

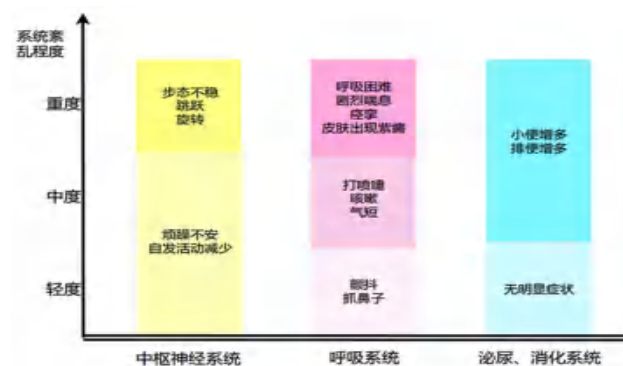


图 2 小鼠行为与类过敏反应程度相关性

Fig 2 Correlation between mouse behaviors and degree of anaphylaxis

2.4.3 毒性研究 双黄连注射剂造成的不良反应涉及皮肤、中枢神经、消化、呼吸、循环等系统,可能产生皮疹、发热、头痛、呕吐、腹泻、心律不齐、呼吸困难、休克等症状^[50]。Shen 等^[51]建立了一种双重体外线粒体毒性方法,通过分子对接和体外细胞实验确定了黄芩素、芦丁、连翘苷和黄芩苷可能是中药注射液中潜在的线粒体毒性成分,双重体外方法值得应用于更多中药产品的安全性评价,在研究双黄连注射剂的线粒体毒性和成分中值得更多关注。

宋殿荣等^[52]建立了人胎盘屏障体外模型,对模型中含药上清液的药物浓度进行分析,结果显示药物透过胎盘屏障后无明显毒性作用,该研究选择的孕中期胎盘组织屏障功能较强,为研究更加全

面,可以补充孕早期与孕晚期的研究,且实验中使用干细胞向心肌细胞分化技术费用较高,生物统计公式较为烦琐,建议后续研究可以建立快捷高效的胚胎毒性筛选模型。双黄连注射剂临床多有与头孢类药物联合用药的情况,多项研究结果显示两者联用产生的肝肾毒性作用大于单一药物的肝肾毒性作用,但是其机制还有待进一步研究^[53-55]。

3 结语

双黄连注射剂具备清热解毒之功,适用于临床治疗各类感染性疾病。本研究系统地调查了近 15 年来双黄连注射剂的发展情况,对含量测定、药物代谢研究、特征图谱和安全性研究 4 个方面进行了论述,旨在为双黄连注射剂的质量标准研究提供参考。现阶段研究可考虑将双黄连注射剂的多种含量测定方法进行对比分析,选择成本低、效率高的方法纳入质量控制标准中,进一步划定药物中主要生物活性成分的范围,实现更精准的质量控制;进一步明确药物的入血成分、代谢产物和代谢途径,建立相对完善评价代谢紊乱程度的标准;建立更具代表性的动物模型和更为完善的动物行为学标准,为实验数据的准确性提供更多保证。此外,不同双黄连注射剂厂家的产品质量存在差异,该现象可能与不同制剂企业使用的原料药、生产设备和工艺、生产成本等因素有关。基于此,制剂企业可在控制成本和确保有效成分含量的同时确保原料来源稳定,在此基础上改良制剂工艺,并严格控制影响产品质量的各个因素,以提升产品质量的稳定性,为双黄连注射剂临床用药的有效性和安全性打下坚实的基础。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版.一部[S]. 2020: 1194.
- [2] 卞婷婷,安益强,汤道权,等. HPLC 法同时测定双黄连冻干粉中 11 个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(1): 52-56.
- [3] 陈秋竹. 双黄连注射剂化学成分与药理作用研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2013, 22(16): 110-111.
- [4] 中华中医药学会. 传染性非典型肺炎(SARS)中医诊疗指南[J]. 中国医药学报, 2003, 18(10): 579-586.
- [5] 郝文清. 双黄连注射剂与抗生素治疗小儿肺炎的临床效果比较[J]. 内蒙古中医药, 2017, 36(12): 47.
- [6] 许上荣. 双黄连注射剂与抗生素治疗小儿肺炎的疗效比较[J]. 临床合理用药杂志, 2017, 10(2): 73-74.
- [7] 孙慧珠,王晓蕾,李冬梅,等. UPLC-波长切换法同时测定双黄连注射剂中 5 种成分含量及差异性分析[J]. 药物评价研究, 2023, 46(4): 821-828.
- [8] 孙悦,范巾杰,闫佩娟,等. 中药注射剂的非临床安全性再评价研究进展[J]. 药物评价研究, 2024, 47(6): 1400-1412.
- [9] Yin JX, Li C, Zhang J, et al. Comprehensive multicomponent characterization and quality assessment of Shuang-Huang-Lian powder injection using ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight-mass spectrometry and ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap-mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2023, 37(7): e9479.
- [10] Xue G, Zhu MJ, Meng N, et al. Integrating study on qualitative and quantitative characterization of the major constituents in Shuanghuanglian injection with UHPLC/Q-Orbitrap-MS and UPLC-PDA [J]. J Anal Methods Chem, 2021, 2021: 9991363.
- [11] Sun HY, Liu MX, Lin ZT, et al. Comprehensive identification of 125 multifarious constituents in Shuang-huang-lian powder injection by HPLC-DAD-ESI-IT-TOF-MS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2015, 115: 86-106.
- [12] Luan L, Wang GL, Lin RC. HPLC and chemometrics for the quality consistency evaluation of Shuanghuanglian injection [J]. J Chromatogr Sci, 2014, 52(7): 707-712.
- [13] Chen LM, Hakamata H, Kusu F, et al. Simultaneous determination of various bioactive redox components in Shuang-Huang-Lian preparations using a novel three-channel isocratic elution liquid chromatography with electrochemical detection system [J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 95: 93-101.
- [14] 据荧. 基于光谱技术与化学计量学相结合的中药质量分析与评价研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2023.
- [15] Ju Y, Yin CL, Zhang Y, et al. Rapid detection and quality evaluation of Shuang-Huang-Lian injection by ATR-IR and NIR spectroscopy combined with chemometrics [J]. Spectrochim Acta, 2023, 286: 122008.
- [16] Yin JX, Guo W, Li XJ, et al. Extensive evaluation of plasma metabolic sample preparation process based on liquid chromatography-mass spectrometry and its application in the in vivo metabolism of Shuang-Huang-Lian powder injection [J]. J Chromatogr B, 2023, 1228: 123808.
- [17] 汪祺,张玉杰,姜昊,等. 双黄连制剂及其组分动物体内化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(10): 1158-1161.
- [18] Chen WY, Yang FF, Li C, et al. Comparison of plasma and pulmonary availability of chlorogenic acid, forsythiaside A and baicalin after intratracheal and intravenous administration of Shuang-Huang-Lian injection [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 274: 114082.
- [19] Wang ZY, Wang ZY, Jiang MM, et al. Qualitative and quantitative evaluation of chemical constituents from Shuanghuanglian injection using nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. J Anal Methods Chem, 2022, 2022: 7763207.
- [20] Guo MX, Zhao BS, Liu HY, et al. A metabolomic strategy to screen the prototype components and metabolites of Shuang-Huang-Lian injection in human serum by ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. J Anal Methods Chem, 2014, 2014: 241505.
- [21] Gao XY, Guo MX, Li Q, et al. Plasma metabolomic profiling to reveal antipyretic mechanism of Shuang-Huang-Lian injection on yeast-induced pyrexia rats [J]. PLoS One, 2014, 9(6): e100017.
- [22] Gu YY, Shi L, Zhang DD, et al. Metabonomics delineates allergic reactions induced by Shuang-Huang-Lian injection in

- rats using ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Chin J Nat Med*, 2018, 16 (8): 628-640.
- [23] Yan GY, Zhao YL, Deng PC, et al. Investigation of toxicological effects of Shuanghuanglian injection in Beagle dogs by metabonomic and traditional approaches [J]. *Exp Biol Med*, 2010, 235 (11): 1356-1364.
- [24] Zhang C, Ouyang LQ, Zhang XL, et al. Anaphylactoid reactions induced by Shuanghuanglian injection and Shenmai injection and metabolomics analysis [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1200199.
- [25] 文雯, 贺福元, 刘文龙, 等. 基于免疫指纹图谱法筛查双黄连注射剂的致敏成分 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44 (8): 1588-1595.
- [26] 刘润南, 包小燕, 曾姣丽, 等. 免疫指纹图谱法研究双黄连注射剂中绿原酸的致敏性 [J]. *中南药学*, 2019, 17 (3): 352-355.
- [27] 冯宇飞, 常书源, 张宁宁, 等. 注射用双黄连致类过敏作用的谱效关系分析 [J]. *药物分析杂志*, 2020, 40 (9): 1589-1598.
- [28] 穆琦瑄, 高胜美, 朱美娟, 等. 双黄连注射液指纹峰归属及制剂-中间体-药材相关性研究 [J]. *中成药*, 2022, 44 (11): 3644-3647.
- [29] 赵丹, 朱乃亮, 孙桂波, 等. 基于聚类分析的不同批次注射用双黄连冻干粉 HPLC 指纹图谱研究 [J]. *中国药师*, 2019, 22 (7): 1193-1196.
- [30] 冯五文, 王晶, 张世洋, 等. 注射用双黄连 (冻干) 的 UPLC 指纹图谱研究及质量评价 [J]. *中药与临床*, 2018, 9 (6): 31-33, 8.
- [31] 戴卉卿, 高进, 曹智铭, 等. 双黄连注射液不良反应样品筛查方法研究 [J]. *广东化工*, 2023, 50 (22): 145-147, 129.
- [32] 马丽娜, 顾媛媛, 何婷, 等. 基于细胞响应谱的注射用双黄连 (冻干) 质量评控研究 [J]. *中草药*, 2023, 54 (24): 8127-8134.
- [33] 韩佳寅, 易艳, 梁爱华, 等. 药物过敏和类过敏的临床前评价要求概述 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40 (14): 2685-2689.
- [34] Wang H, Wang HS, Liu ZP. Agents that induce pseudo-allergic reaction [J]. *Drug Discov Ther*, 2011, 5 (5): 211-219.
- [35] 刘清成, 殷华, 侯肖霖, 等. 中药注射剂树脂检查方法的改进 [J]. *中成药*, 2016, 38 (8): 1872-1874.
- [36] 邓颖颖, 徐丽婷, 赵晓佳, 等. 双黄连注射剂中异绿原酸 C 致敏抗体效价测定 [J]. *宁夏医科大学学报*, 2022, 44 (8): 854-857.
- [37] 袁强, 王莉, 成岚, 等. 国家基本药物目录 (2004 年版) 33 种中药注射剂不良反应 / 不良事件文献分析 [J]. *中国循证医学杂志*, 2010, 10 (2): 132-139.
- [38] 刘兆华, 程芳, 周庚寅, 等. C57BL/6J 小鼠腮腺淋巴结试验评价注射用双黄连的致敏性研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2010, 30 (1): 64-67.
- [39] 梁爱华, 易艳. 中药注射剂超敏反应评价和风险控制相关问题的思考 [J]. *药学进展*, 2020, 44 (10): 752-758.
- [40] 陈莉, 季文君, 戴国英, 等. 基于 MrgrpX2 的双黄连注射剂中潜在成分虚拟筛选 [J]. *世界中医药*, 2021, 16 (3): 504-508.
- [41] 易艳, 张宇实, 李春英, 等. 双黄连注射液致类过敏物质筛选研究 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40 (14): 2727-2731.
- [42] 邓颖颖, 胡宗苗, 周园里, 等. 双黄连注射剂中黄芩苷致敏家兔后血清中特异性抗体的测定 [J]. *河北中医*, 2017, 39 (6): 880-883.
- [43] 祝桂欣. 双黄连注射剂不良反应的原因及分析 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2018, 18 (40): 124.
- [44] 张伟龙, 贺红, 譙茹, 等. 双黄连注射剂成分与类过敏靶点的网络关联性分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30 (19): 190-197.
- [45] 万绪莲, 夏恒, 韩依伦, 等. 大分子杂质是双黄连注射剂导致类过敏反应的重要原因 [J]. *云南中医学院学报*, 2022, 45 (3): 41-52.
- [46] Li Y, Duan JL, Xia H, et al. Macromolecular substances as a dangerous factor in traditional Chinese medicine injections were determined by size-exclusive chromatography [J]. *Toxicol Res*, 2020, 9 (3): 323-330.
- [47] Gao Y, Hou R, Han YX, et al. Shuang-Huang-Lian injection induces an immediate hypersensitivity reaction via C5a but not IgE [J]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1): 3572.
- [48] 梁爱华, 李春英, 易艳, 等. 药物类过敏反应的临床前评价方法研究 (I)——小鼠类过敏反应评价方法的建立和验证 [J]. *中国中药杂志*, 2012, 37 (13): 1865-1870.
- [49] 梁爱华, 赵雍, 李春英, 等. 药物类过敏反应的临床前评价方法研究 (II)——大鼠皮肤类过敏试验 [J]. *中国中药杂志*, 2012, 37 (13): 1871-1874.
- [50] 刘爽, 乔艳, 刘高峰. 中药注射剂不良反应与不合理用药问题分析 [J]. *中南药学*, 2016, 14 (11): 1177-1182.
- [51] Shen YF, Guo KQ, Ma AJ, et al. Mitochondrial toxicity evaluation of traditional Chinese medicine injections with a dual in vitro approach [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1039235.
- [52] 宋殿荣, 张崴, 赵丽颖, 等. 基于人胎盘屏障体外模型评价双黄连的胚胎毒性 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2017, 31 (6): 649-654.
- [53] 陈浩, 温静, 赵威, 等. 注射用双黄连与头孢拉定联用对大鼠的肾毒性研究 [J]. *中药药理与临床*, 2014, 30 (4): 95-98.
- [54] 陈浩. 双黄连粉针剂联用注射用盐酸头孢吡肟的肾毒性 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2013.
- [55] 张荣, 徐大志, 刘启德, 等. 双黄连注射剂及其与头孢拉定合用对人正常肝细胞的毒性作用研究 [J]. *新中医*, 2012, 44 (8): 163-165.

(收稿日期: 2024-08-20; 修回日期: 2024-09-17)

口崩片制备工艺与质量评价研究进展

吴春芝¹, 刘红在², 谷福根^{1*} (1. 内蒙古医科大学附属医院, 呼和浩特 010050; 2. 内蒙古第三医院, 呼和浩特 010010)

摘要: 口崩片 (ODT) 是一种新型口服速释固体制剂, 具有崩解溶出快、吸收起效快、生物利用度高、使用方便、安全性高等特点。近年来, 随着国内外对 ODT 研究的不断深入, 出现了功能性新辅料和冷冻干燥法、3D 打印法、CO₂ 辅助成型法制备新工艺及掩味技术、肠溶/缓释技术、增溶促溶技术、微型片制备等新技术。本课题组也对 ODT 的崩解时限、溶出度、体内崩解时间、口感、润湿时间、吸水比、吸湿性、孔隙率等质量指标进行了研究和探讨。本文总结近年来 ODT 在辅料、制备工艺与技术及质量评价等方面的最新进展, 以期为 ODT 的研究开发和质量标准完善提供参考。

关键词: 口崩片; 功能性辅料; 制备工艺; 质量评价; 掩味; 崩解; 溶出

中图分类号: R944 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)05-1385-08
doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.031

Research progress in preparation process and quality evaluation of orally disintegrating tablets

WU Chun-zhi¹, LIU Hong-zai², GU Fu-gen^{1*} (1. The Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050; 2. Third Hospital of Inner Mongolia, Hohhot 010010)

Abstract: Orally disintegrating tablets (ODT) are a new type of oral immediate-release solid preparation with rapid disintegration and dissolution, fast absorption and onset of action, high bioavailability, convenient administration and fair safety. In recent years, along with more intensive research on ODT, new functional excipients, and new ODT preparation processes such as freeze-drying method, 3D printing method, CO₂ assisted formation method and novel technologies such as taste masking technique, enteric coated/sustained release technique, solubilizing and dissolution-enhancing technique and mini ODT preparing technique have all appeared at home and abroad. Additionally, the quality indexes of ODT such as disintegration time limit, in vitro dissolution, in vivo disintegration time, taste, wetting time, water absorption ratio, hygroscopicity and porosity have also been studied. This paper reviewed the progress in the excipients of ODT, its preparing processes, technologies and quality evaluation to provide reference for ODT study and their quality standards.

Key words: orally disintegrating tablet; functional excipient; preparing process; quality evaluation; taste masking; disintegration; dissolution

口崩片 (orally disintegrating tablets, ODT) 系指在口腔内不需用水即能迅速崩解或溶解的片剂。国外也称之为口内分散片、快速崩解片、快速溶解片等^[1]。它具有崩解溶出快、吸收起效快、生物利用度高、使用方便、用药依从性好、安全性高等显著特点, 非常适合于婴幼儿、老年人及其他吞咽困难的患者使用^[2]。但是, ODT 也有局限

性, 如机械强度小、易碎、稳定性较差、易吸湿及生产成本较高等^[3]。自 1993 年第一个 ODT——法莫替丁口崩片在瑞典问世以来, 现已有 400 多个 ODT 上市, 成为国外患者的首选制剂。近年来, 随着辅料和制备工艺与技术的不断进步, 国内外对 ODT 的研究非常活跃并取得许多新的重要进展, 其在临床治疗中的地位和重要性日益提升。

作者简介: 吴春芝, 女, 主任药师, 主要从事医院药学及临床药学研究, email: fgczh@sina.com * **通信作者:** 谷福根, 男, 主任药师, 主要从事药物新剂型研究, email: gfg1968@163.com

本文将就 ODT 的辅料、制备工艺与技术及质量评价等方面的最新研究成果进行综述,旨在为今后 ODT 的研发和质量标准完善提供重要参考。

1 辅料

与普通口服片相比,ODT 对崩解时间与口感要求更高。与湿法制粒压片比较,粉末直接压片法的制备工艺步骤减少,节省了时间和生产成本,是目前规模化生产 ODT 常用方法。但粉末直接压片法要求药物与辅料的混合粉末具有良好的流动性与可压性。ODT 处方中常包含填充剂、崩解剂、黏合剂、芳香/甜味剂、润滑与助流剂等辅料,这些辅料的简单混合物,其流动性与可压性往往较差。为了解决上述问题,近年来,国内外市场上出现了多种预混功能性辅料或共处理辅料被用于粉末直接压片法来制备 ODT^[4-6],如基于甘露醇、聚乙烯醇、交联聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)开发的复合型直压辅料——Ludiflash,由甘露醇与交联羧甲基纤维素钠(CCNa)(95:5)采用特殊工艺制成的直压预混辅料——Pardeck ODT,由甘露醇、乳糖、葡萄糖及 PVPP 经特殊工艺制成的复合辅料——Disintequick ODT,由微晶纤维素(MCC)、甘露醇、果糖、PVPP 及胶态二氧化硅研发的高功能性辅料——Prosolv ODT G2,由甘露醇、MCC、木糖醇、PVPP、无水磷酸氢钙/硅酸铝镁研发的功能性辅料——F-Melt C/M,由甘露醇、山梨醇、PVPP、胶态二氧化硅研发的功能性辅料——Pharmaburst 500 等。这些功能性辅料,常由 2~5 种不同辅料组成,多数含有崩解剂、填充剂、黏合剂等成分,在 ODT 粉末直接压片制备工艺中展现出了良好的流动性、可压性和崩解分散性,也常具有较好的口感。基于上述原因,这些新辅料在 ODT 制备中的应用研究较多。

氯唑沙宗是一种中枢性肌肉松弛剂,其水溶性差,上市制剂有片剂、胶囊等。Moqbel 等^[7]分别以 Pharmaburst 500、Prosolv ODT G2 以及 F-Melt 为直接压片辅料,以一定比例与氯唑沙宗混匀,再加适量润滑剂与甜味剂后,压成药物的 ODT。结果发现,当处方中药物与辅料的比例相同时,以 Pharmaburst 500 为辅料所制药物 ODT 的崩解时间最短,药物溶出最快,以 F-Melt 为辅料时,药物 ODT 崩解时间较短,药物溶出较快,而以 Prosolv ODT G2 为辅料时,崩解时间最长,药物溶出最慢。动物体内药动学研究发现,以 Pharmaburst 500 为直接压片辅料所制备的氯唑沙宗 ODT,与市售胶囊剂相比,其体内吸收速度明显加快,生物利用度显著提高。与此类似,巴氯

芬为水溶性肌松药,美洛昔康为水难溶性非甾体抗炎药,将两者组成复方制剂对骨关节炎具有良好的疗效。Abdelmonem 等^[8]将上述两种药物各 10 mg 分别与功能性辅料 Prosolv ODT G2、F-melt C 或 Pharmaburst 500 (各 50 mg)混匀后,采用直接压片法制备了复方巴氯芬-美洛昔康 ODT。结果所制复方 ODT 的片重为 70 mg,直径为 6 mm,采用 3 种不同功能性辅料所制药物的 ODT,在硬度、脆碎度、药物含量等质量指标方面均相似,但采用 Pharmaburst 500、F-melt C 所制 ODT 的润湿时间、体外崩解时间显著小于 Prosolv ODT G2,此外,以 Pharmaburst 500 所制 ODT 中两种药物的体外溶出度均较优。可见,上述 3 种不同功能性辅料组成不同,对同一药物所制备 ODT 的质量指标如崩解、溶出的影响有明显差异,因而需在 ODT 处方研究中进行筛选。

2 制备工艺

2.1 冷冻干燥法

采用传统的压片法所制 ODT 产品,通常硬度大,在口腔中崩解时间长,药物溶出慢,故在制备过程中常需对压片力进行优化^[9-11]。为克服传统压片法的缺点和不足,近年来冷冻干燥法被应用于 ODT 的制备。冷冻干燥法具体制备工艺:先将药物溶解或分散在含有载体材料的水溶液中,然后分装到泡罩包装中,在-20℃迅速冷冻,在一定压力和温度(44 Pa, -55℃)下完成冷冻干燥过程,即得冻干 ODT 产品,见图 1。该法适用于对热敏感及小剂量水不溶性药物,因水溶性药物在冻干过程中易与水形成低共熔混合物,导致冷冻干燥效率降低^[12],另外,水不溶性药物对味蕾有更好的适口性。该法在冻干前需以单剂量形式分装在泡罩包装中,故剂量准确;其次,该法所制 ODT 质轻,呈多孔状,在口中崩解与溶出快,体内生物利用度高^[13]。冻干法 ODT 处方中一般需使用抗泡沫剂如二甲基硅油,防止药液在冻干前起泡,影响制剂的外观,另需加骨架形成辅料如明胶、海藻酸钠等,以利于成形。

硫酸特布他林为平喘药,上市制剂有片剂、注射剂等,片剂起效缓慢,注射剂使用不便。为克服上述制剂的缺陷,Gulsun 等^[14]采用冷冻干燥法制备了硫酸特布他林的 ODT,其处方中含有药物、明胶、海藻酸钠、甘露醇、聚乙二醇 4000(PEG4000)、泊洛沙姆 188(F68)、羟丙基甲基纤维素(HPMC)以及二甲基硅油等。体外研究发现,该制剂崩解时间仅为 11 s,5 min 内药物几乎完全溶出,而其市售普通片剂在 20 min 仅溶出 80%,表明采用冷冻干燥法所制 ODT 具有崩解溶出快的特点。同样,盐酸

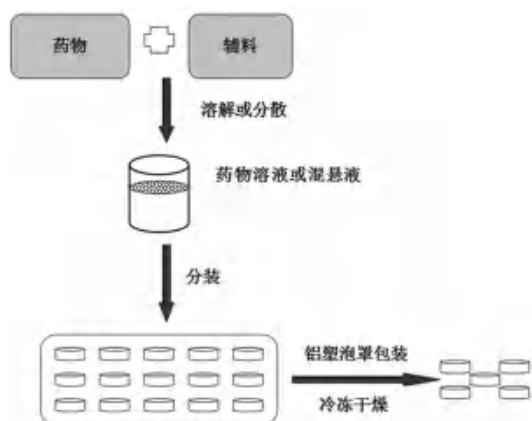


图1 冷冻干燥法制备 ODT 示意图

Fig 1 Schematic diagram of ODT preparation by freeze-drying

左西替利嗪为第二代抗组胺药，其上市有片剂、胶囊剂等，儿童服用时，会出现吞咽困难或剂量不准等问题，且该药味苦涩，会出现拒绝服药现象，影响用药依从性。为解决现有制剂的上述缺陷，邱旸等^[15]首先制备药物与 β -CD的包合物，以掩盖药物的不良味道，在此基础上，采用正交试验设计得到 ODT 最优处方组成：每片含包合物 11.25 mg、甘氨酸 10 mg、普鲁兰多糖 8 mg、三氯蔗糖 0.5 mg、白桃香精 1.5 μ L；制备工艺：取 β -CD，加水，于 60 $^{\circ}$ C 下搅拌使溶解，按照药物和 β -CD 质量比为 1:8，加入盐酸左西替利嗪，继续搅拌 1 h 后，将包合液冷冻干燥，得含药包合物；取包合物及甘氨酸、普鲁兰多糖等辅料，加水适量，使用高剪切乳化机剪切，混匀；将混匀的药液分装于泡罩中并置于一 60 $^{\circ}$ C 下预冻 30 min 以上，再进行冷冻干燥，即得；结果所制得药物 ODT 外观美、崩解迅速、口味良好，30 min 累积溶出率大于 80%，提示该制备工艺结合了环糊精包合技术的掩味与增溶和冷冻干燥工艺的崩解溶出快的特点，显著改善了盐酸左西替利嗪口感、溶出和用药方便性。

2.2 3D 打印技术

3D 打印技术是近年兴起的一种制剂新技术，其突出优点是可实现给药剂量的个性化和定制化，剂量可灵活调节^[16]。目前，该技术也被用于 ODT 的制备，其制备方法主要有半固体挤出（SSE）打印技术和粉液黏结（DPB）打印技术，见图 2。

氯雷他定为第二代抗组胺药，其水溶性差，对热不稳定，上市的有片剂、胶囊等，且规格少，老人、儿童服用会出现吞咽困难。为方便用药和剂量定制化，Yi 等^[17]采用 SSE 打印技术制备了氯雷他定的 ODT，该技术的特点是无需高温，适合对热敏感的药物。打印工艺：将药物、乙基纤维素（EC）、羧甲基淀粉钠（CMS-Na）、甘露醇、6%PVP

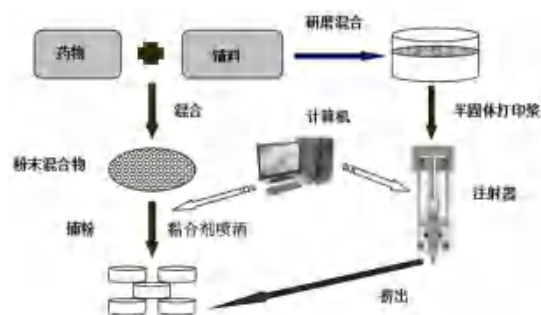


图2 3D 打印法制备 ODT 示意图

Fig 2 Schematic diagram of ODT preparation by 3D printing

K30 经研磨后制成半固体打印浆，装入注射器中，按预设打印程序，通过步进电机对活塞施加压力，将打印浆通过注射针挤出，制备该药物 ODT。结果制备了该药物 3 种不同规格的 ODT，药物含量分别为 6、9、12 mg，内部均呈多孔结构，崩解时间小于 60 s，脆碎度小于 1%，2 min 累积溶出率超 60%，10 min 完全溶出。可见，采用 3D 打印技术可制备出崩解溶出快，规格多的 ODT，以满足个性化剂量需求，尤其便于老年、儿童用药。

李跃中等^[18]采用 DPB 打印技术制备了丹参酮 II A 磺酸钠 ODT，制备工艺：将药物与乳糖、PVP K30、甘露醇、阿斯巴甜、微粉硅胶等共同作为铺层粉末，2.5%PVP K30 醇水溶液为黏结剂，采用 3D 打印机逐层打印，并黏结成 3D 药片，结果所制药物 ODT 表面平整、色泽均匀、边缘整齐，呈疏松多孔隙结构，直径为 10 mm，厚度约为 3 mm，片重为 160 mg，硬度为 1.84 kg，崩解时间为 25.2 s，口内崩解时间为 26.5 s，溶出迅速，2 min 内可溶出 90% 以上，5 min 完全溶出，且口感良好，无明显砂砾感。

穿心莲内酯具有强疏水性，上市有片剂、软胶囊等，口服吸收缓慢，生物利用度差。为克服上述缺陷和不足，黄思玉等^[19]同样采用 DPB 打印技术制备该药的 ODT，其最优处方组成：穿心莲内酯 40%，蔗糖与甘露醇的质量比例为 1.7%，PVP K30 15.13%，MCC 3.32%，阿斯巴甜 1%；打印工艺：将穿心莲内酯、蔗糖、甘露醇等辅料充分混匀后，装入打印机粉末装置，另在墨盒中注入 30% 乙醇溶液为黏结剂，预设 ODT 的半径为 5 mm，厚度为 4 mm，共打印 20 层，每片含药物 100 mg。结果显示，将片重控制在 250 ~ 260 mg，硬度达到 20 N 以上，崩解时间在 35 s 以内，所制得的 ODT 性能最佳。可见，采用 3D 打印技术制备中药单体有效成分的 ODT，方法简单，切实可行，为后续中药 ODT 的进一步开发奠定了基础。

2.3 CO₂ 辅助成型法

传统压片法所制 ODT 硬度较大,影响崩解和溶出,而冷冻干燥法所制 ODT 脆碎度大,运输和使用易碎。Kobayashi 等^[20]将预混辅料(F-melt)、水溶性黏合剂 PVP Kollidon、硬脂酸镁等混匀,采用旋转式压片机,设置 1.0 kN 的压力,制成直径为 8 mm,片重为 180 mg 的片剂,然后在温度 45℃、压力 ≤ 8 MPa 以及加压时间 ≤ 30 min 的条件下,采用高压 CO₂ 进行处理,见图 3。结果所制 ODT 的崩解时间在 30 s 以内,硬度在 40 N 以上,完全符合 ODT 有关质量要求。其原因在于高压 CO₂ 降低了处方中 PVP 等辅料的玻璃化温度(T_g),使其黏度变小,进而使片剂中各成分间形成更多桥接,导致硬度增大。可见,该工艺避免使用湿法制粒压片法所需要的高温、高湿条件,适合于对高温、高湿敏感药物 ODT 的制备。

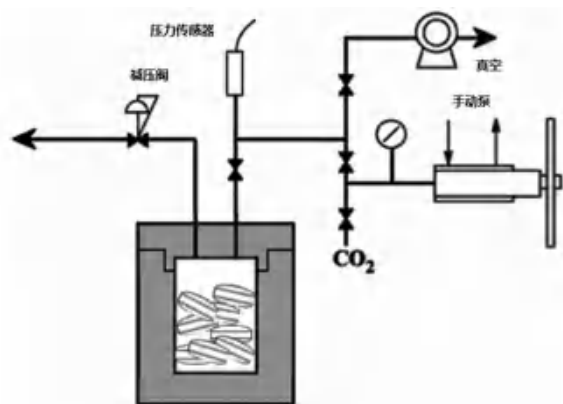


图 3 高压 CO₂ 辅助制备 ODT 示意图

Fig 3 Schematic diagram of high-pressure CO₂ assisting ODT preparation

3 制备技术

3.1 掩味技术

多数药物具有不良味道,ODT 在唾液中快速崩解,药物直接与味蕾接触,在吞咽前不良味道很易被感觉到,因此,掩味是制备苦味药物 ODT 的必要步骤,否则影响用药依从性,尤其是在儿科用药^[21]。

盐酸屈他维林(DTV)是罂粟碱衍生物,具有解痉作用,但其水溶性差且味苦,上市制剂有片剂,服用时可产生严重苦味,导致用药依从性差。为克服上述缺陷,Kuralla 等^[22]首先将 DTV 与适宜比例山嵛酸甘油酯或甘油二硬脂酸酯热熔混匀,冷却过筛,制成掩味颗粒,再加入 CCNa、甘露醇、阿斯巴甜、硬脂酸镁,混匀后,压片,制得药物 ODT,结果发现,分别采用两种掩味剂所制药物 ODT,其崩解时间均小于 1 min,体外溶出也均优于市售制剂;此外,该制剂在外观、硬度、脆碎度、片重差异、含量均匀度、润湿时间及口感等指标均达到了预期目标。

盐酸小檗碱临床上以口服方式给药,因味极

苦,儿童用药依从性差。朱笑颜等^[23]首先以弱阳离子交换树脂 kyron-T114 为载体,制备了盐酸小檗碱-树脂复合物,其载药量约为 43.0%,然后再加甘露醇、HPMC 等辅料制成混悬液后,分装到特制模具中,采用冷冻干燥技术,制得药物-树脂复合物 ODT,结果所制该药物 ODT 呈淡黄色疏松饼状,其崩解时限、含量均匀度等均符合相关规定;通过人工唾液中溶出考察、感官和电子舌评价,证实该药物-树脂复合物冻干 ODT 具有良好的掩味效果;体外溶出显示,该 ODT 在人工胃液中溶出快,预期可改善体内生物利用度,也为中药掩味提供了新思路。

3.2 增溶促溶技术

ODT 在口中快速崩解并吞服后,需经历唾液-胃液-肠液的介质变化。对于属于生物药剂学分类(BCS)Ⅱ类的药物来说,由于溶解度小,溶出缓慢,导致体内起效慢、生物利用度差等问题,因此,增溶促溶技术是难溶性药物 ODT 制备中常用的手段。

富马酸酮替芬为水难溶性抗组胺药,上市制剂为片剂,体外溶出度、生物利用度差。Salman 等^[24]以泊洛沙姆 407 为载体,按照药物:载体质量比为 1:6,采用熔融法制备了该药物的固体分散体,然后加入 15%PVPP、51%甘露醇、20%MCC、3%糖精钠及 3%硬脂酸镁和 1%滑石粉,采用直接压片法制备了该药物的 ODT,结果发现,该制剂崩解时间仅为 17 s,2 min 药物溶出可达 90%,可见,固体分散技术可用于水难溶性药物 ODT 制备。

托伐普坦是一种精氨酸加压素 V₂ 受体拮抗剂,属于 BCS Ⅳ类药物,其溶解性小,生物膜渗透性差,导致体内吸收差。杨晨^[25]首先以低取代度羟丙基纤维素(HPC-SL)为稳定剂,泊洛沙姆 407 为表面活性剂,采用反溶剂沉淀-高压均质法制备了托伐普坦纳米晶,再以甘露醇为载体,采用喷雾干燥法将药物纳米晶制成纳米晶颗粒(粒径约 242 nm),最后再与甘露醇、PVPP、三氯蔗糖、硬脂酸镁混匀后,压片,结果所制药物 ODT,其崩解时间约 30 s,10 min 药物完全溶出,而该药市售口崩片 45 min 时才溶出 90%。可见,纳米晶技术同样可显著解决难溶性药物的溶出度问题,制得崩解溶出快的 ODT。

卡马西平为一线广谱抗癫痫药,但其水溶性差,上市制剂有片剂、胶囊,溶出起效慢,体内生物利用度差,且吞咽难,可能出现窒息和不配合用药情况。Conceição 等^[26]以 HP- β -CD 为增溶剂,采用研磨法制备了 1:1 的卡马西平环糊精包合物,再加共处理辅料 F-Melt C、硬脂富马酸

钠,混匀后,采用直接压片法制备药物的 ODT,结果所制该药物 ODT 表面光洁,片重为 500 mg,硬度为 100 N,崩解时间为 50 s,2.5 min 药物溶出率达 97%,而以卡马西平原药所制备 ODT 在 40 min 溶出率才达 90%,表明采用环糊精包合技术可显著改善水难溶性药物的溶出度。此外,还可部分掩盖药物不良味道,改善制剂口感,提高用药依从性。

3.3 肠溶与缓释技术

质子泵抑制剂是抗消化性溃疡药,通常水溶性差,且在酸性条件下易分解,在制备其 ODT 之前,需将药物采用肠溶制剂工艺进行处理。兰索拉唑为第二代新型质子泵抑制剂,上市制剂有肠溶片、胶囊和注射剂等,缪宇梅等^[27]以兰索拉唑肠溶包衣微丸(含药量 16.67%)为原料,通过正交试验得到该药物肠溶 ODT 的最佳处方:30% 肠溶药物微丸,59% 微晶纤维素(MMC),5% CCNa,5.5% 甘露醇,0.5% 硬脂富马酸钠,采用粉末直接压片法,制得该药物的 ODT,结果所制 ODT 片重为 0.6 g,崩解时间约为 21 s,符合《中国药典》(简称 ChP)中有关规定。可见,肠溶技术是制备胃酸下不稳定类药物 ODT 的有效手段。

现上市 ODT 多数属于速释制剂。但目前,已有少数缓释 ODT 产品被美国食品药品监督管理局(FDA)批准上市。根据 ODT 处方组成及特点,可将药物先制成包衣微粒或含药离子交换树脂,然后分散在可快速崩解的骨架中。如国外上市的 ODT 产品 Adzenys XR-ODT 与 Cotempla XR ODT 是同时含速释与缓释成分的 ODT 产品,两者均由崩解、缓释、掩味等成分组成,采用离子交换树脂载药后,再采用功能性辅料包衣,包衣后的微粒与填充剂等混合后压片即得。Adzenys XR-ODT 是安非他明 ODT,其中,50% 药物在吞咽后立即释放,而剩余 50% 为缓释部分,是药物与树脂复合物,采用肠溶材料包衣,仅在肠道释放药物。

3.4 微型口崩片(ODMT)制备技术

ODT 的体积通常较普通片剂大,近年来,国外出现了一种小剂量、小体积及口感良好的 ODT——ODMT,专供儿科患者使用。它结合了 ODT 的特点与微型片体积小的双重优势,很好地解决了儿科患者吞咽困难及发生窒息风险,并提供灵活且准确的给药剂量,具有良好的稳定性和适口性^[28-29]。ODMT 直径通常不超过 3 mm。

粉末直接压片法是 ODMT 的常用制备工艺。卡维地洛是水难溶性非选择性 β -受体阻断药,用于高血压和心力衰竭的治疗,目前上市制剂为片剂。为便于儿童使用,Khan 等^[30]采用直接压片法,成功制备了 0.5 mg、2 mg 两种规格的该药物

ODMT,其最优处方组成:1%或4%卡维地洛、15% MCC、83.25%或80.25%甘露醇、0.25%胶态二氧化硅、0.5%硬脂酸镁,片重为 50 mg,结果所制 ODMT,其硬度大于 20 N,崩解时间约 11 s,此外,脆碎度和含量均匀度均符合有关质量要求,体外溶出与市售参比制剂相当。此外,西地那非是一种选择性磷酸二酯酶-5 抑制剂,可用于儿童肺动脉高压治疗,但上市制剂为成人用片剂、ODT。为便于使用和剂量调节,Alalaiwe 等^[31]以预胶化淀粉为黏合剂与崩解剂、MCC PH105、甘露醇为填充剂,糖精钠等为甜味剂,首先将药物与上述辅料混匀后,采用流化床法制粒,最后加入硬脂富马酸钠混匀后,压成直径为 3 mm,片重为 15 mg,规格为 5 mg 的西地那非 ODMT。结果所制 ODMT 其崩解时间约为 39 s,30 min 累积溶出率 86.2%,此外,硬度、脆碎度、片重差异、含量均匀度等指标也符合有关要求。

此外,采用 3D 打印技术同样也可制备 ODMT。Hu 等^[32]研究采用 SSE 打印技术制备卡马西平的小规格 ODMT。处方组成及打印工艺:4.76% (w/w) 卡马西平、47.6% 乳糖、38.1% CMS-Na、4.76% PVP K30、4.76% 三氯蔗糖,混匀后,加适量水,制成半固体打印液,以压缩空气为动力,挤出压力为 110 kPa,喷嘴直径为 0.41 mm。结果所制得该药物 ODMT 直径为 2.5 mm,厚度为 2.5 mm,重为 10.7 mg,规格为 0.5 mg,硬度为 18.5 N,崩解时间为 84 s,体外药物溶出也符合有关要求,也便于给药剂量的调整。

4 质量控制与评价

ODT 质量控制类似于普通片剂,如硬度、脆碎度、片重差异、含量均匀度等质量指标要符合有关要求。但鉴于 ODT 的剂型特点,对其质量指标也有一些特殊要求,如崩解时限、溶出度、体内崩解时间、口感等,另外还有一些新的质量评价指标。

4.1 崩解时限

崩解时间是 ODT 的关键质量指标。对于 ODT,欧洲药典(EP)中规定在 3 min 内崩解,2020 年版 ChP(四部)要求在 60 s 内崩解,而 FDA 有关指南中要求在 30 s 内崩解。可见,对于 ODT 的崩解时限目前尚未形成一致意见。此外,对于采用冷冻干燥法制备的 ODT,由于质轻,内部呈多孔结构,2020 年版 ChP(四部)中规定,无需进行崩解时限的检查。

ODT 崩解时限法定的测定方法国外有 EP 法、美国药典(USP)溶出试验 II 法等,而 2020 年版 ChP(四部)“通则 0921 崩解时限检查法”中也规定了用于 ODT 崩解时间检查的专门装置。其中,

EP 法与 ChP 法所用测定装置较类似,其主要结构均含有一个能升降的支架和下端镶有筛网(筛孔内径 $710\ \mu\text{m}$)的不锈钢管或塑料管,测定温度均为 $37\ ^\circ\text{C}$,以 $900\ \text{mL}$ 蒸馏水为分散介质,支架往返升降频率为 $30\ \text{次}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

为了更好地模拟口腔环境,包括温度($37\ ^\circ\text{C}$)、湿度(RH 93%)及小体积崩解介质,Koner 等^[33]研究了一种体内外相关性更好的 ODT 崩解时间测定法——Aston 法。测定时,采用管壁上布满直径为 $4\ \text{mm}$ 小孔的扁平形硅胶管为 ODT 的崩解床,管内以 $10\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度流经水或人工唾液,部分水经管壁小孔流出并在硅胶管外表面形成液体薄膜,而置于硅胶管外表面的 ODT 与水相互作用,导致其在模拟体内环境下崩解,崩解过程采用质构分析仪进行检测,最后通过距离-时间图计算 ODT 的崩解时间。该法可区分不同处方的 ODT 以及 ODT 与普通片之间崩解时间的细小差别。研究证实,与 USP 中 ODT 崩解试验法比,Aston 法测得的 ODT 体外崩解时间与体内崩解时间的相关性更好,因此,被认为是一种灵敏、准确、精密、相关性高、耐用的 ODT 崩解时限测定方法。

4.2 溶出度

溶出度决定了药物起效快慢和体内生物利用度大小。根据 2020 年版 ChP(四部)中规定,对于难溶性原料药制成的 ODT 应进行溶出度的测定,对于肠溶性 ODT 还应进行释放度的考察。USP 中规定的溶出装置 1(篮法)与溶出装置 2(桨法)均可用来测定 ODT 的溶出度。其中,篮法测定过程中,处方中成分可能会堵塞转篮的筛网,从而引起溶出曲线较大偏差。故常采用桨法来测定 ODT 的溶出度,以 $900\ \text{mL}$ 的 pH 6.8 磷酸缓冲液(人工唾液 pH)为溶出介质,测定温度为 $37\ ^\circ\text{C}$,转速一般设为 $50\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,但对于掩味 ODT,转速可选为 $100\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,通常较低转速具有更好溶出度区分能力。根据 FDA 有关规定,ODT 中药物在 $30\ \text{min}$ 内累积溶出率应不小于 85%。

2020 年版 ChP(二部)中收录了利培酮 ODT 与阿立哌唑 ODT 的溶出测定法^[34],前者规定用“溶出度与释放度测定法第二法”即桨法,以 $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 $500\ \text{mL}$ 为溶出介质,转速为 $50\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,溶出限度规定为 $15\ \text{min}$ 药物累积溶出率不小于 80%;后者采用“第三法”即桨法/小杯法测定,以含 1%SDS 的 $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 $250\ \text{mL}$ 为溶出介质,转速为 $100\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,溶出限度规定为 $30\ \text{min}$ 药物累积溶出率不小于 70%。可见,ChP 中对 ODT 溶出度测定方法和溶出限度的要求,因药物品种不同而异,也与 FDA

中对 ODT 溶出限度的规定不同。

4.3 体内崩解时间与口感评价

体内崩解时间与口感试验也是评价 ODT 内在质量的重要参数。ODT 体内崩解时间测定方法:试验前,所有志愿者用水洗口腔,然后将 ODT 置于舌上,立即用秒表计时,直到感觉不到有颗粒或碎片存在时即为完全崩解,记录体内崩解时间。口感试验测定方法:选取 6 名或 12 名健康志愿者,试验中将 ODT 置于舌上并使其在上颚轻翻或左右移动。在将 ODT 置于口腔 $3\sim 4\ \text{min}$ 内,由志愿者进行自我语言判断,评价其味道和口感。味道和口感可分为 $1\sim 5$ 级,在味觉评价中,1 级被认为无苦味,而 5 级被认为是苦味极大,同样在口感评价中,1 级被认为无砂砾感,而 5 级被认为有明显砂砾感。

但上述采用人感官来评定 ODT 口感的方法,受环境及人为因素影响较大,结果重复性差及客观性较低。近年来,一种可用于评价药物或制剂味道的新型分析检测仪器——电子舌兴起,受到医药界的关注。它由具有高度交叉敏感特性的传感器阵列组成,可获得待测样本味道的定性定量信息,具有测量迅速、重复性好及操作简单等优点。何朝星等^[35]采用电子舌技术并结合志愿受试者感官评价来考察孟鲁司特钠 ODT 的掩味效果,为其处方筛选提供依据,结果取得了比较理想的效果。

4.4 润湿时间与吸水比

要求 ODT 能快速吸水、膨胀及崩解,故润湿时间与吸水比可作为评价其崩解性能的重要指标。一般润湿时间短,崩解速度就快。润湿时间测定方法:取一张大小适宜的圆形滤纸或卫生纸置于培养皿中,加入适量体积染料如曙红或甲基蓝溶液,然后将已称重的片剂(W_a)置于滤纸上,立即开始计时,直到观察到染料溶液到达片剂的上表面所需时间,即为 ODT 的润湿时间^[36]。一般认为,ODT 的润湿时间不宜超过 $180\ \text{s}$ 。将润湿后的片剂称重(W_b),采用公式:吸水比($\%$)= $(W_b - W_a)/W_a \times 100\%$,计算吸水比^[37]。

Swarnalatha 等^[38]首先以 $1:2$ 质量比制备了药物与聚丙烯酸树脂 Eudragit EPO 的混合颗粒,再加入 CCNa、甘露醇、阿斯巴甜、硬脂酸镁等,制备了法莫替丁掩味 ODT。研究发现,该制剂的润湿时间为 $25.98\ \text{s}$ 、吸水比为 88.2%,崩解时间为 $22.6\ \text{s}$, $10\ \text{min}$ 药物可完全溶出。采用类似方法,测得 CBZ-HP- β -CD 包合物 ODT 的润湿时间约为 $30\ \text{s}$,吸水比为 77.5%,其崩解时间为 $50\ \text{s}$ ^[26]。

4.5 其他

吸湿性可用来评价 ODT 产品的吸湿稳定性。测

定方法：取 ODT 制剂 10 片，置于放有五氧化二磷的干燥器中，在 40℃ 下放置 24 h 后称重，然后在 40℃、RH 75% 环境下暴露 3 周后，再次称重，片剂增加的重量即可用来评价其吸湿性^[13]。

孔隙率 (P) 是指 ODT 中气孔体积与药片在自然状态下的总体积之比。 P 值的大小会影响片剂的硬度、崩解和药物溶出。因此，也是评价 ODT 的重要质量参数。一般采用公式： $P(\%) = (1 - \text{松密度} / \text{真密度}) \times 100\%$ ，进行计算^[20]。其中，松密度可采用松密度仪测定，而真密度采用比重计测量，以氢气为测量气体。通常冷冻干燥法所制 ODT，由于结构较为疏松，孔隙率高，故体外崩解与药物溶出快^[39]。

5 结语与展望

ODT 具有崩解溶出快、起效迅速、生物利用度高、使用方便、用药依从性好等特点，特别适用于老人、儿童等吞咽困难者。近年来，国内对 ODT 的研发和应用也取得长足进步，目前国内上市 ODT 品种有 30 多个。另外，近年国内已积极开展对中药 ODT 的研究，已有颠茄 ODT 上市。

在 ODT 的快速发展过程中，也面临一些问题和挑战：

首先，在制备工艺方面，目前 ODT 的规模化生产仍以粉末直接压片法为主，但对辅料和生产设备有较高要求，近年国外开发的一些功能性辅料为此提供了有利条件。冷冻干燥法耗时、生产效率低、成本和价格高，另外对包装、运输和使用等有较高要求。3D 打印法可个性化、定制化生产 ODT，但对处方组成、设备有特殊要求，还需专门的打印程序。CO₂ 辅助成型是一种 ODT 硬度增强技术，需加压设备和专门气体，操作过程复杂。综上，冷冻干燥法、3D 打印法及 CO₂ 辅助成型等 ODT 制备工艺均存在不足，距实际应用仍有很长的路要走。

其次，崩解溶出快、口感好是 ODT 最重要的质量属性，而多数药物溶解性与味道差，故增溶促溶和掩味是 ODT 制备中最常使用的两种技术。固体分散、纳米结晶、环糊精包合等技术是解决难溶性药物溶出差的主要手段，但改善药物溶出的同时，往往导致口感变差，因此，增溶促溶和掩味是相互制约的，需在两者间达到平衡。此外，通过掩味技术可改善口感，但也会导致制剂体积增大，载药量减小，溶出减慢，成本增加，因而研究更好的掩味技术也是 ODT 未来发展中亟待解决的难题。与普通 ODT 相比，肠溶或缓释 ODT 的制备工艺更为复杂，质量要求更高，是今后 ODT 新产品研发中极具挑战性的领域之一。专门为儿童设计生产的

ODMT，由于体积和片重均较小，对其处方组成和生产设备有更高要求。目前，ODMT 在我国尚处于空白，市场需求大，有巨大发展空间和广阔应用前景。

最后，作为一种新型口服固体剂型，目前 ODT 还处在不断发展之中，其质量评价方法与质量标准尚不完善，一定程度上制约了 ODT 的快速发展。为了更好地控制 ODT 质量，除了崩解时限、溶出度等关键质量指标外，是否还应纳入体内崩解时间、口感、润湿时间等指标，也有待深入探讨。因此，药监部门、药品研发机构、生产企业及药学领域专家今后要加强沟通与协作，努力制订出一套科学合理的 ODT 质量标准与评价方法。

参考文献

- [1] Malaak FA, Zeid KA, Fouad SA, et al. Orodispersible tablets: novel strategies and future challenges in drug delivery [J]. Res J Pharm Technol, 2019, 12 (11): 5575-5582.
- [2] Yee KM, Mohamad N, Kee PE, et al. Recent advances in orally disintegrating tablet: properties, formulation and production [J]. Drug Deliv Lett, 2024, 14 (3): 211-225.
- [3] Patoliya N, Joshi B, Upadhyay U. Future prospect of oral disintegration drug delivery system: a review [J]. Res J Pharm Dosage Forms Tech, 2021, 13 (1): 66-71.
- [4] Ghourichay MP, Kiaie SH, Nokhodchi A, et al. Formulation and quality control of orally disintegrating tablets (ODTs): recent advances and perspectives [J]. Biomed Res Int, 2021, 2021 (1): 6618934.
- [5] Thulluru A, Madhavi C, Nandini K, et al. Co-processed excipients: new era in pharmaceuticals [J]. Asian J Res Pharm Sci, 2019, 9 (1): 1-5.
- [6] Loke YH, Chew YL, Janakiraman AK, et al. Development of a novel direct compressible co-processed excipient and its application for formulation of Mirtazapine orally disintegrating tablets [J]. Drug Dev Ind Pharm, 2024, 50 (1): 36-44.
- [7] Moqbel HA, ElMeshad AN, El-Nabarawi MA. A pharmaceutical study on chlorzoxazone orodispersible tablets: formulation, in-vitro and in-vivo evaluation [J]. Drug Deliv, 2016, 23 (8): 2998-3007.
- [8] Abdelmonem R, Abdellatif MM, Al-Samadi IEI, et al. Formulation and evaluation of baclofen-meloxicam orally disintegrating tablets (ODTs) using co-processed excipients and improvement of ODTs performance using six sigma method [J]. Drug Des Devel Ther, 2021, 15: 4383-4402.
- [9] Akadag Y, Gulsun T, Izat N, et al. Evaluation of preparation methods for orally disintegrating tablets [J]. Med Sci, 2020, 9 (1): 259-263.
- [10] Zhang YY, Li ZW, Tang H, et al. Development and optimization of levodopa and benzylhydrazine orally disintegrating tablets by direct compression and response surface methodology [J]. Drug Dev Ind Pharm, 2020, 46 (1): 42-49.

- [11] Soni R, Sisodiya R, Bairagee D, et al. Formulation and evaluation of oro-dispersible tablets of ondansetron hydrochloride by direct compression method [J]. *Int J Pharm Life Sci*, 2020, 11 (9): 7006-7013.
- [12] Sharma S, Singh K. Oral disintegrating tablets-an updated patent perspective [J]. *Recent Pat Drug Deliv Formul*, 2020, 14 (3): 166-190.
- [13] Vanbillemont B, Everaert H, Beer TD. New advances in the characterization of lyophilised orally disintegrating tablets [J]. *Int J Pharm*, 2020, 579: 119153.
- [14] Gulsun T, Cayli YA, Izat N, et al. Development and evaluation of terbutaline sulfate orally disintegrating tablets by direct compression and freeze drying methods [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2018, 46: 251-258.
- [15] 邱蔚, 吴雪纯, 孙常胜, 等. 盐酸左西替利嗪冻干口崩片的制备 [J]. *儿科药理学杂志*, 2024, 30 (3): 23-27.
- [16] Infanger S, Haemmerli A, Iliev S, et al. Powder bed 3D-printing of highly loaded drug delivery devices with hydroxypropyl cellulose as solid binder [J]. *Int J Pharm*, 2019, 555: 198-206.
- [17] Yi SL, Xie JW, Chen LL, et al. Preparation of loratadine orally disintegrating tablets by semi-solid extrusion 3D printing [J]. *Curr Drug Deliv*, 2023, 20 (6): 818-829.
- [18] 李跃中, 唐靓, 杨亚冬, 等. 采用 3D 打印技术制备丹参酮 II A 磺酸钠口腔崩解片及其溶出度测定 [J]. *现代医药卫生*, 2019, 35 (23): 3587-3589.
- [19] 黄思玉, 叶星辰, 吕竹芬, 等. 3D 打印技术制备穿心莲内酯口崩片的处方优化研究 [J]. *海峡药学*, 2020, 32 (9): 13-17.
- [20] Kobayashi M, Shinozuka D, Kondo H, et al. Novel orally disintegrating tablets produced using a high-pressure carbon dioxides process [J]. *Chem Pharm Bull*, 2018, 66 (10): 932-938.
- [21] Yildiz S, Aytekin E, Yavuz B, et al. Development and evaluation of orally disintegrating tablets comprising taste-masked mirtazapine granules [J]. *Pharm Dev Technol*, 2018, 23 (5): 488-495.
- [22] Kuralla H, Saripilli R, Kolapalli VRM. Preparation and evaluation of drotaverine hydrochloride orally disintegrating tablets using melt granulation [J]. *J Appl Pharm Sci*, 2018, 8 (10): 39-46.
- [23] 朱笑颜, 戴俊东, 郭鹏川, 等. 盐酸小檗碱树脂复合物冻干口崩片的制备及质量评价 [J]. *中国药理学杂志*, 2024, 59 (8): 724-731.
- [24] Salman ZD. Optimization and evaluation of orodispersible solid dispersion tablet of ketotifen fumarate [J]. *Res J Pharm Tech*, 2021, 14 (7): 3610-3616.
- [25] 杨晨. 托伐普坦纳米晶口崩片的制备与质量评价 [J]. *西北药*
- 学杂志, 2023, 38 (3): 116-120.
- [26] Conceição J, Adeoye O, Cabral-Marques H, et al. Orodispersible carbamazepine/hydroxypropyl- β -cyclodextrin tablets obtained by direct compression with five-in-one co-processed excipients [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2020, 21 (2): 39.
- [27] 缪宇梅, 杨鑫, 杜宇坤, 等. 兰索拉唑微丸口崩片的制备及崩解时间测定方法考察 [J]. *中国医院药学杂志*, 2018, 38 (20): 2115-2118, 2127.
- [28] Comoglu T, Ozyilmaz ED. Orally disintegrating tablets and orally disintegrating mini tablets-novel dosage forms for pediatric use [J]. *Pharm Dev Technol*, 2019, 24 (7): 902-914.
- [29] Sarashetti S, Jain V, Gowda DV, et al. Recent developments in orally disintegrating mini tablets [J]. *Int J Res Pharm Sci*, 2020, 11 (3): 3606-3612.
- [30] Khan D, Kirby D, Bryson S, et al. Development of an age-appropriate mini orally disintegrating carvedilol tablet with paediatric biopharmaceutical considerations [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13 (6): 831.
- [31] Alalaiwe A, Alsenaidy MA, Almalki ZS, et al. Development and optimization of sildenafil orodispersible mini-tablets (ODMTs) for treatment of pediatric pulmonary hypertension using response surface methodology [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15 (3): 923.
- [32] Hu J, Fitaihi R, Abukhamees S, et al. Formulation and characterisation of carbamazepine orodispersible 3D-printed mini-tablets for paediatric use [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15 (1): 250.
- [33] Koner JS, Rajabi-Siahboomi AR, Missaghi S, et al. Conceptualisation, development, fabrication and in vivo validation of a novel disintegration tester for orally disintegrating tablets [J]. *Sci Rep-UK*, 2019, 9 (1): 1-9.
- [34] 中国药典 2020 年版. 二部 [S]. 2020: 607, 664.
- [35] 何朝星, 杜宇坤, 杨鑫, 等. 应用电子舌和感官评定方法考察孟鲁司特钠口崩片的掩味效果 [J]. *中国药理学杂志*, 2020, 55 (16): 1354-1357.
- [36] Gulsun T, Ozturk N, Kaynak M, et al. Preparation and evaluation of furosemide containing orally disintegrating tablets by direct compression [J]. *Pharmazie*, 2017, 72 (7): 389-394.
- [37] Thulluru A, Kumar KM, Priya EC, et al. Formulation and evaluation of tadalafil oral disintegrating tablets with enhanced dissolution rate by complexation [J]. *Int J Res Dev Pharm*, 2017, 6 (3): 2631-2640.
- [38] Swarnalatha N, Maruvajala V, Kumar K. Formulation, in vitro and in vivo evaluation of taste masked oral disintegrating tablets of famotidine [J]. *Int J Pharm Res*, 2019, 11 (2): 370-382.
- [39] 李思潼, 薛婉莹, 李红鑫, 等. 冻干口崩片的质量评价研究 [J]. *中南药学*, 2022, 20 (6): 1274-1279.

(收稿日期: 2024-09-02; 修回日期: 2024-10-20)

细菌溶解产物防治过敏性疾病的相关免疫学机制研究进展

胡俊, 张洪瑜, 黄琳, 孔令莎, 肖旭平* (湖南师范大学附属第一医院/湖南省人民医院, 长沙 410005)

摘要: 过敏性疾病 (ARDs) 的发生率呈逐年增长的趋势, 给患者带来疾病负担, 给社会带来较大的经济负担, 是医学研究领域的一大难题。细菌溶解产物是一种免疫调节剂, 由多种与呼吸道感染有关的细菌灭活提取物组成, 临床多用于预防呼吸道的反复感染及慢性支气管炎急性发作。作为急性呼吸道感染治疗的合并用药, 细菌溶解产物能增强固有免疫应答, 提高机体抗感染能力, 预防病原体感染; 参与适应性免疫应答, 促进 T 细胞转化, 促进 Th1/Th2 平衡, 防止过敏性疾病发生。本文主要对细菌溶解产物在过敏性疾病的作用机制及其研究现状进行综述, 以期过敏性疾病的防治提供依据。

关键词: 细菌溶解产物; 过敏性疾病; 免疫机制

中图分类号: R378, R593.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)05-1393-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.032

Research progress in immunological mechanism of bacterial lysates in the prevention and treatment of allergic diseases

HU Jun, ZHANG Hong-yu, HUANG Lin, KONG Ling-sha, XIAO Xu-ping* (*The First Affiliated Hospital of Hunan Normal University/Hunan Provincial People's Hospital, Changsha 410005*)

Abstract: The incidence of allergic diseases is increasing year by year, bringing disease burden to patients and greater economic burden to the society, which is a major issue in the medical field. Bacterial lysates are immunomodulators consisting of many bacterial inactivated extracts associated with respiratory infections. It is mainly used to prevent repeated respiratory tract infections and acute attack of chronic bronchitis as a drug combination for acute respiratory infections. Bacterial lysates can enhance the innate immune responses, and improve the anti-infection ability of the body to prevent pathogen infection. They are also involved in adaptive immune responses, promoting T cell transformation and Th1/Th2 balance, and reducing the occurrence of allergic diseases. This article mainly reviewed the mechanism of bacterial lysates in allergic diseases.

Key words: bacterial lysate; allergic disease; immune mechanism

过敏性疾病 (ARDs) 主要包括过敏性鼻炎、哮喘、特应性皮炎^[1-2]。过敏性疾病是一类免疫相关疾病, 通常与接触过敏原后机体过量产生免疫球蛋白 (Ig) E 相关, 其中 Th2 型炎症是其核心, 同时也与饮食、空气污染、病原体暴露、工业化和气候等因素相互关联^[3-5]。细菌溶解产物作为一种免疫调节剂, 主要用于预防或治疗反复呼吸道感染, 具有较好的安全性和有效性^[6-7]。随着全球城市化进程的不断推进, 环境、经济和社会发展发生了巨大变化, 过敏性疾病的患病率增加, 尤

其是儿童^[8]。同时细菌溶解产物在过敏性疾病的应用也备受关注。本文就细菌溶解产物防治过敏性疾病的相关免疫学机制研究进展进行综述, 以期过敏性疾病的防治提供新思路。

1 细菌溶解产物在过敏性疾病中的作用机制

细菌溶解产物源自呼吸道病原体的灭活抗原组成的免疫调节剂, 是由物理分离或化学酶解等方式获得的灭活细菌提取物组成。通常选择导致呼吸道炎症的几种常见细菌, 包括金黄色葡萄球菌、化脓性链球菌、绿色链球菌、肺炎链球菌、肺炎克雷

基金项目: 湖南省自然科学基金青年基金项目资助项目 (No.2023JJ40386)。

作者简介: 胡俊, 男, 硕士研究生, 主要从事过敏性疾病的相关研究, email: 2640253555@qq.com *通信作者: 肖旭平, 男, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事咽喉头颈的相关疾病研究, email: 469784129@qq.com

伯菌、大肠克雷伯菌、流感嗜血杆菌、肺炎双球菌和卡他奈瑟氏菌等^[9-10]。细菌溶解产物(BLs)可根据获得的方式分为多价化学细菌裂解物(PCBLs)和多价机械细菌裂解物(PMBLs)两种类型。PCBLs菌种由于pH值在11.5~12.5内,细菌细胞膜易被分解,可由碱性裂解得来;PMBLs通过超声或高压匀浆进行细菌裂解得来。BLs在制备过程中,其细菌抗原的结构不被破坏,从而保证了免疫原性,能刺激机体免疫系统产生的免疫应答^[11-12]。

BLs的作用机制基于病原相关分子模式(PAMPs)与宿主免疫细胞上的病原相关模式识别受体即Toll样受体(TLRs)结合,从而激活抗原递呈细胞(APC),主要是树突状细胞(DCs),DCs是先天性免疫(又称固有免疫)和适应性免疫反应的桥梁^[13]。DCs的成熟导致促炎细胞因子被释放,实现效应细胞动员^[14]。BLs的免疫调节作用不仅影响细胞免疫,还影响体液免疫^[15]。BLs进入机体后能加速抗病毒细胞因子的生成,增强巨噬细胞和自然杀伤(NK)细胞的活性,有助于减轻嗜酸性粒细胞的过度依赖。BLs激发机体固有免疫同时也促进T细胞及B细胞活化,调整Th1/Th2平衡^[10]。激活B细胞,调控免疫球蛋白的转化,降低IgM向IgE的转化,促进其向IgA、IgG1的转化,研究发现BLs能通过上调卵清蛋白(OVA)诱导的哮喘小鼠模型中盲肠和血液醋酸盐水平来预防过敏性炎症^[16]。

1.1 BLs与先天性免疫

先天性免疫由物理屏障、化学屏障、固有免疫细胞及免疫分子等组成,涵盖人体的所有组织,涉及造血细胞和非造血细胞。固有免疫细胞包括DCs、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、巨噬细胞、肥大细胞和NK细胞等。这些细胞能表达识别病原体的模式识别受体TLRs,并通过TLRs结合病原体相关模式识别分子(PAMP)激活机体的免疫应答,是机体抵御病原体的重要防线^[7]。

1.1.1 TLRs激活 TLRs是在DCs和单核细胞上表达的二聚体蛋白,它们能识别各种微生物表位,激活免疫应答^[17]。BLs作为过敏性疾病的免疫调节剂,通过与APC表面的TLR4、TLR2的结合激活APC。激活的APC将抗原加工为抗原肽并提呈给B细胞,B细胞进一步成熟转化为浆细胞,进而分泌抗体及细胞因子。BLs进入机体后与TLR2/6和TLR9结合并将其激活,能降低肺部炎症反应,提高对感染的抵抗力,为炎症和过敏性疾病提供新的治疗方法^[17]。

1.1.2 DCs活化和成熟 BLs与宿主细胞TLRs相

互作用激活DCs,使该细胞中主要组织相容性复合体II(MHC II)、CD40和CD86的表达呈剂量依赖性增加^[18]。通过丝裂原相关蛋白激酶型号和核因子- κ B(NF- κ B)的易位和反式激活和促进DCs的成熟,作为APC的迁移^[19]。成熟的DCs产生抗病毒细胞因子影响固有免疫应答,如通过NF- κ B与MAPK信号通路促使DCs释放干扰素(IFN)- α 、IFN- β 及白细胞介素(IL)-8等抗病毒细胞因子^[18]。BLs通过与DCs膜上的TLRs结合,以MyD88/Trif依赖性方式产生IFN- β ,并迅速上调IFN- γ 水平,IFN- γ 作为Th1细胞的标志性产物,能够通过促进吞噬细胞来对抗胞内病原微生物。此外,IFN- γ 还能够增进APC上MHC II类分子的表达,加强单核细胞到巨噬细胞转化,提升NK细胞的细胞毒作用,并且抑制IL-4、IL-5及IL-13等细胞因子的生成,间接减少IgE的合成与嗜酸性粒细胞的活化,提高机体的免疫应答能力,保持Th1/Th2的平衡,以预防过敏性疾病的发生^[20-22]。BLs处理后表达MyD88/Trif的DCs能够诱导免疫耐^[23]。动物实验结果显示,BLs能上调哮喘小鼠气道炎症和气道高反应性模型小鼠DCs的PD-L1表达,抑制Notch4诱导Treg细胞增殖活化发挥免疫耐受功能,抑制Th2、Th17免疫反应;同时通过TLR4信号调控cDCs中干扰素调节因子(IRF)8、IRF4转录因子,诱导cDC1比例升高,抑制cDC2,从而抑制Th2免疫,纠正Th1/Th2失衡,减轻哮喘小鼠气道炎症和气道高反应性^[24]。

1.1.3 巨噬细胞活化 巨噬细胞可分为两种亚型:IFN- γ 诱导的M1型巨噬细胞及IL-4和IL-13促进的M2型巨噬细胞^[25]。研究报道BLs通过IFN- γ 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-1 β 和IL-6对小鼠巨噬细胞活性产生积极影响,促进巨噬细胞向M1型极化^[25]。BLs不仅促进了由巨噬细胞释放的一氧化氮水平上升,还促成了NF- κ B向细胞核的转移,从而增强巨噬细胞的吞噬功能^[7]。亚硝酸盐是呼吸爆发的重要产物,水平越高,巨噬细胞吞噬活性越强。巨噬细胞作为免疫系统中最充沛的一类细胞,在哮喘及过敏性鼻炎的气道炎症反应中扮演着核心角色。研究中观察到给予BLs后血清IL-10浓度显著升高,巨噬细胞表面MHC II类分子的表达升高,促进B细胞反应和上皮细胞增殖。IL-10还抑制NF- κ B通路,激活JAK-STAT3信号传导,IL-10可直接作用于Th2细胞介导的过敏性气道炎症的严重程度^[26]。

1.1.4 NK细胞活化 接受BLs舌下含服治疗的

哮喘儿童外周血 NK 细胞增加^[27]。BLs 刺激 DCs 会释放趋化因子 (CCL2)、CCL3, 它们是单核细胞和 NK 细胞重要的趋化因子^[18], 使 NK 细胞迁移到炎症组织对于消除被病毒感染的细胞发挥重要作用。NK 细胞是淋巴细胞群体中的一个特殊分支, 在固有免疫应答中通过释放 IFN 以及自然杀伤作用, 发挥抗病原体、抗感染作用。BLs 通过促进 IL-12 和 IL-18 的表达来刺激 NK1 极化, 增强 IFN- γ 分泌和抑制 B 细胞产生 IgE, 从而预防过敏性疾病, 减轻过敏性疾病临床症状^[28]。

1.2 适应性免疫反应

与先天性免疫相比, 适应性免疫反应有特异性、记忆性、应答更广泛、精细等特点。它涉及 APC 与 T 细胞及 B 细胞之间的独特激活机制, 进而激发了针对特定病原体的有效免疫应答途径。对宿主免疫稳态和免疫记忆有巨大影响。

1.2.1 调节 Th1/Th2 平衡, 增强免疫应答 BLs 被 APC 摄取加工为 MHC I (II) - 抗原肽刺激幼稚 T 细胞, 分化、成熟为 Th1 与 Th2 两大亚群, 参与适应性免疫应答^[29]。BLs 能刺激 DCs、NK 细胞等释放 IFN- γ 和 IL-12, 增强幼稚 T 细胞, 分化、成熟 Th1 细胞, 纠正过敏性疾病患者机体 Th1/Th2 失衡, 缓解疾病的临床症状, 且能起到预防作用^[29]。Th1 型免疫应答涉及机体抗病毒、胞内病原菌的防御机制以及迟发性过敏反应, 增强 Th1 型免疫反应能有效保持 Th1/Th2 的平衡, 预防过敏性疾病发生^[30]。

研究证明, BLs 可抑制 Th2 型细胞释放 IL-4 防止过敏性疾病的发生, 改善其临床症状^[20, 31]。BLs 还能降低哮喘小鼠肺泡灌洗液中 IL-13、IL-5 浓度, 抑制 Th2 型免疫反应, 使 Th1 细胞发生漂移, 从而保持 Th1/Th2 的平衡, 增强适应性免疫应答^[20]。Th2 型细胞产生 IL-3、IL-4、IL-5、IL-9 和 IL-13 细胞因子, 激活 2 型免疫反应, 使得患者机体抗体滴度明显升高, 嗜酸性粒细胞增多, 这也是过敏性疾病的特征性表现^[32]。

1.2.2 Treg 细胞激活 肠道 Treg 细胞和其他器官 Treg 细胞一样, 具有对抗原有特异性的 T 细胞受体 (TCR), 这些细胞在抑制无害膳食抗原和共生微生物的免疫应答中起关键作用。有研究表明, BLs 能诱导哮喘小鼠机体 Treg 细胞比例显著增加^[33]。Treg 细胞在调控免疫应答和保持免疫系统的稳定中发挥着至关重要的作用, 对过敏性疾病、自身免疫性疾病的发生及肿瘤的发展有着显著影响, 是重要的治疗靶点。具有免疫原性的 BLs 进入机体后激活 APC, 通过上述细胞分泌

IL-12 上调其在血液中的水平促进 Th1 细胞分化并分泌 IFN- γ ; 通过增加 IL-23 分泌来增强 Th17 在应答中的效应; 同时通过增加 IL-27 和 IL-35 分泌, 增加 Treg 细胞和 Tr1 细胞的数量, 发挥其免疫调节与免疫抑制功能对过敏性疾病起到预防及治疗作用^[34]。激活的 Treg 能抑制 Th2 细胞的增殖和成熟, 从而保持 Th1/Th2 的平衡。调节性 T 细胞作为 CD4⁺ T 细胞的一个分支, 扮演着调控免疫应答、维系对自身抗原的耐受状态及阻止自身免疫性疾病发生的关键角色。因此, 激活 Treg 可有效治疗过敏性疾病。

1.2.3 B 细胞活化 BLs 的免疫调节作用不仅影响细胞免疫, 还影响体液免疫。BLs 能使哮喘患儿 IgE 降低^[35]。IgA 是黏膜防御系统的主要成分, 能阻止病原微生物通过黏膜屏障, 减轻过敏性炎症。研究显示, BLs 处理能够提高机体 IgA 及 IgG 水平, 减轻过敏性疾病^[36-37]。赵昕等^[38]在对 200 例反复呼吸道感染儿童加用 BLs 治疗后同样发现 IgA 水平明显高于治疗前。B 细胞承担着机体的体液免疫, 受到抗原肽 -MHC II 类作用后激活, 会成熟为分泌抗体的浆细胞。虽然 IgM 是 B 细胞最先产生的免疫球蛋白 (由浆细胞初期分泌), 但当 B 细胞在淋巴组织生发中心受到抗原刺激和滤泡辅助 T 细胞 (Tfh) 作用时, 会发生抗体类别转换 (CSR), 进而产生 IgG、IgA 和 IgE。在正常情况下, 血清中 IgE 的含量是所有免疫球蛋白中最低的, 但受到抗原刺激后其水平会显著升高。高 IgE 水平不仅是过敏性疾病的重要特征之一, 其动态变化还可作为评估过敏性疾病恶化或改善的生物标志物^[39]。临床研究报道, 哮喘儿童给予 BLs 胶囊口服后患儿 IgA、IgM 血清浓度显著升高, IgE 水平降低, 说明 BLs 治疗后患儿体液免疫功能得到明显改善^[40]。

1.3 对醋酸盐水平的影响

醋酸盐是一些肠道细菌产生的主要代谢物, 与调节其他肠道细菌有关。研究报道口服 BLs 后, 小肠内的调节性 T 细胞数量增多, 盲肠和血液中的醋酸盐水平增高。盲肠和血清中的醋酸盐水平与 OVA 诱导小鼠的气道高反应性以及小鼠肺泡灌洗液中的嗜酸性粒细胞数量成负相关, BLs 刺激肠道产生的醋酸盐可以提高 IgA, 改变肠道中 IgA 的平衡^[16]。这一过程还归因于它们对嗜酸性粒细胞和中性粒细胞活性的抑制作用, 以及 Treg 细胞和 DCs 的刺激, 从而抑制 Th2 型免疫反应, 预防过敏性疾病。

2 总结与展望

过敏性疾病是临床常见病, 目前认为主要的发病机制是 Th2 介导的炎症, 与 Th1/Th2 调节失衡相关^[2]。BLs 作为一种免疫调节物, 在过敏性疾病中的应用日益广泛, 并取得了一定的疗效。BLs 耐受性良好, 临床不良反应表现为皮疹及呕吐、恶心、腹痛和腹泻等消化道症状, 目前尚未观察到 BLs 给药和不良症状发展之间的直接相关性, 未观察到严重的危及生命的不良反应^[41-42]。目前 BLs 治疗过敏性疾病确切机制仍未完全阐明。研究认为 BLs 主要通过激活 TLR 受体促进 DCs 的成熟与活化, 刺激效应细胞释放多种细胞因子有效抑制 Th2 型细胞因子 (如 IL-4、IL-5、IL-13) 的表达, 提升 Th1 型细胞因子 (IL-12、IFN- γ) 水平, 以此纠正 Th1/Th2 间的失衡状态。BLs 促进巨噬细胞和 NK 细胞发育、Th1 和 Treg 淋巴细胞分化诱导 B 细胞活化以及 IgA 和 IgG 分泌可减轻过敏症状, 通过影响肠道微生物菌群达到免疫调节的作用。但 BLs 如何影响肠道微生物菌群在过敏性疾病中发挥作用, 有待进一步研究。BLs 由多种呼吸道病原体的灭活抗原组成, 其不同病原体灭活抗原, 在过敏性疾病免疫机制尚待进一步挖掘, 这可能为过敏性疾病患者提供精准治疗提供新策略。

参考文献

- [1] 宋昕怡, 刘函晔, 王丹丹, 等. 性激素和过敏性疾病研究进展 [J]. 中国免疫学杂志, 2025, 41 (1): 220-225.
- [2] 卢淦, 邓玉琴, 陶泽璋. 过敏性疾病与糖尿病的相关性及潜在关联机制 [J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2023, 37 (5): 215-222.
- [3] Stamatopoulou E, Stamatopoulou A, Papageorgiou E, et al. The asthma epidemic and its socioeconomic impact on primary health care management "The relationship between public health and public policy" [J]. Arch Hell Med, 2024, 41 (2): 190-201.
- [4] Ozdemir C, Kucuksezer UC, Ogulur I, et al. Lifestyle changes and industrialization in the development of allergic diseases [J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2024, 24 (7): 331-345.
- [5] Lu MY, Shobnam N, Livinski AA, et al. Examining allergy related diseases in Africa: a scoping review protocol [J]. PLoS One, 2024, 19 (2): e0297949.
- [6] 李玉, 阚璇. 细菌溶解产物在儿童呼吸道过敏性疾病应用的研究进展 [J]. 中国儿童保健杂志, 2022, 30 (12): 1336-1340.
- [7] 何龙希, 肖洒, 张琪, 等. 细菌溶解产物泛福舒作用机制及防治呼吸系统疾病应用进展 [J]. 中国药业, 2023, 32 (11): 122-128.
- [8] Yang L, Fu JR, Zhou YF. Research progress in atopic march [J]. Front Immunol, 2020, 11: 1907.
- [9] de Boer GM, Żółkiewicz J, Strzelec KP, et al. Bacterial lysate therapy for the prevention of wheezing episodes and asthma exacerbations: a systematic review and meta-analysis [J]. Eur Respir Rev, 2020, 29 (158): 190175.
- [10] Janeczko K, Emeryk A, Rachel M, et al. Polyvalent mechanical bacterial lysate administration improves the clinical course of grass pollen-induced allergic rhinitis in children: a randomized controlled trial [J]. J Allergy Clin Immunol Pract, 2021, 9 (1): 453-462.
- [11] 李思彤, 姜雯雯, 徐勇胜. 细菌溶解产物在儿童变应性疾病中的应用 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2024, 39 (9): 707-711.
- [12] 李欣, 吕芸, 张玥钰, 等. 细菌溶解产物治疗气道变应性疾病的研究进展 [J]. 国际免疫学杂志, 2024, 47 (1): 88-93.
- [13] Sun YT, Zhou LY, Chen WK, et al. Immune metabolism: a bridge of dendritic cells function [J]. Int Rev Immunol, 2022, 41 (3): 313-325.
- [14] Suárez N, Ferrara F, Rial A, et al. Bacterial lysates as immunotherapies for respiratory infections: methods of preparation [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2020, 8: 545.
- [15] de Boer GM, Żółkiewicz J, Strzelec KP, et al. Bacterial lysate therapy for the prevention of wheezing episodes and asthma exacerbations: a systematic review and meta-analysis [J]. Eur Respir Rev, 2020, 29 (158): 190175.
- [16] Lee SH, Kim H, Lee SY, et al. Broncho-Vaxom bacterial lysate prevents asthma via acetate enhancement in mouse model [J]. Pediatr Allerg Imm, 2023, 34 (9): 14018.
- [17] Vidya MK, Kumar VG, Sejian V, et al. Toll-like receptors: significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals [J]. Int Rev Immunol, 2018, 37 (1): 20-36.
- [18] Cardinale F, Lombardi E, Rossi O, et al. Epithelial dysfunction, respiratory infections and asthma: the importance of immunomodulation. a focus on OM-85 [J]. Expert Rev Respir Med, 2020, 14 (10): 1019-1026.
- [19] Marseglia GL, Benazzo M, Biasci P, et al. OM-85 in the prevention of respiratory infections: state-of-the-art and future perspectives in clinical practice [J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2021, 35 (3): 847-863.
- [20] Meng Q, Li P, Li Y, et al. Broncho-vaxom alleviates persistent allergic rhinitis in patients by improving Th1/Th2 cytokine balance of nasal mucosa [J]. Rhinology, 2019, 57 (6): 451-459.
- [21] 林木土, 王巧红, 许宝花. 细菌溶解产物胶囊联合常规药物治疗小儿支气管哮喘急性发作的临床效果 [J]. 医学理论与实践, 2023, 36 (5): 827-829.
- [22] Wang H, Tao F, Li CY, et al. Short-term administration of Qipian, a mixed bacterial lysate, inhibits airway inflammation in ovalbumin-induced mouse asthma by modu-

- lating cellular, humoral and neurogenic immune responses [J]. *Life Sci*, 2024, 336: 122310.
- [23] Pivniouk V, Gimenes-Junior JA, Ezech P, et al. Airway administration of OM-85, a bacterial lysate, blocks experimental asthma by targeting dendritic cells and the epithelium/IL-33/ILC2 axis [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2022, 149 (3): 943-956.
- [24] 孙起翔. 雾化吸入细菌裂解物防治小鼠支气管哮喘的机制研究 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2022.
- [25] Luan H, Zhang Q, Wang L, et al. OM85-BV induced the productions of IL-1 β , IL-6, and TNF- α via TLR4-and TLR2-mediated ERK1/2/NF- κ B pathway in RAW264.7 cells [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2014, 34 (7): 526-536.
- [26] Kaczynska A, Klosinska M, Janeczek K, et al. Promising immunomodulatory effects of bacterial lysates in allergic diseases [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 907149.
- [27] Bartkowiak-Emeryk M, Emeryk A, Roliński J, et al. Impact of polyvalent mechanical bacterial lysate on lymphocyte number and activity in asthmatic children: a randomized controlled trial [J]. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 2021, 17 (1): 10.
- [28] Braido F, Melioli G, Nicolini G, et al. Sublingually administered bacterial lysates: rationale, mechanisms of action and clinical outcomes [J]. *Drugs Context*, 2024, 13: 2024-1-5.
- [29] Butcher MJ, Zhu J. Recent advances in understanding the Th1/Th2 effector choice [J]. *Fac Rev*, 2021, 10: 30.
- [30] Boonpiyathad T, Sözüner ZC, Akdis M, et al. The role of Treg cell subsets in allergic disease [J]. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 2020, 38 (3): 139-149.
- [31] Janeczek K, Emeryk A, Rachel M, et al. Polyvalent mechanical bacterial lysate administration improves the clinical course of grass pollen-induced allergic rhinitis in children: a randomized controlled trial [J]. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2021, 9 (1): 453-462.
- [32] Silverberg JI, Kantor R. The role of interleukins 4 and/or 13 in the pathophysiology and treatment of atopic dermatitis [J]. *Dermatol Clin*, 2017, 35 (3): 327-334.
- [33] Li YL, Tu CL, Chen MZ, et al. Establishing a high microbial load maternal-offspring asthma model in adult mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 83: 106453.
- [34] Guo YF, Cao W, Zhu Y. Immunoregulatory functions of the IL-12 family of cytokines in antiviral systems [J]. *Viruses*, 2019, 11 (9): 772.
- [35] Yao SY, Qin RD, Song XN, et al. Bacterial lysate add-on therapy in adult and childhood asthma: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Thorac Dis*, 2023, 15 (6): 3143-3157.
- [36] 吕民英, 付晓梅, 齐莎莎. 细菌溶解产物胶囊联合布地奈德雾化吸入治疗对咳嗽变异性哮喘患儿的效果 [J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2024, 45 (4): 336-339.
- [37] McKendry RT, Kwok M, Hemmings O, et al. Allergen-specific IgG show distinct patterns in persistent and transient food allergy [J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2021, 32 (7): 1508-1518.
- [38] 赵昕, 何周康, 唐莲, 等. 细菌溶解产物治疗儿童反复呼吸道感染的疗效及对免疫功能影响的考察 [J]. *中南药学*, 2009, 7 (12): 946-948.
- [39] Lambrecht BN, Hammad H, Fahy JV. The cytokines of asthma [J]. *Immunity*, 2019, 50 (4): 975-991.
- [40] 黎鸣桃, 黄淑芹, 张可妃, 等. 细菌溶解产物胶囊联合布地奈德雾化吸入治疗对咳嗽变异性哮喘患儿免疫功能、气道功能的影响 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2023, 22 (2): 175-179.
- [41] Li CM, Zhou H, Zhang W, et al. Bacterial lysate treatment in allergic disease: a systematic review and meta-analysis [J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2021, 32 (8): 1813-1823.
- [42] Zhu LL, Wang YH, Feng JH, et al. Oral bacterial lysate OM-85: advances in pharmacology and therapeutics [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2024, 18: 4387-4399.

(收稿日期: 2024-09-22; 修回日期: 2024-12-22)

靶向整合素 $\alpha_v\beta_3$ 和免疫检查点 NRP-1 的双靶点分子影像探针研究进展

周雨萱^{1,2}, 葛曼宣^{1,2}, 蔡舒玥^{1,2}, 谢隼^{1,2}, 孙森², 林建国^{1,2}, 邱玲^{1,2*} (1. 南京医科大学药学院, 南京 211166; 2. 江苏省原子医学研究所, 国家卫生健康委员会核医学重点实验室, 江苏 无锡 214063)

摘要: 整合素 $\alpha_v\beta_3$ 和免疫检查点分子神经纤毛蛋白-1 (NRP-1) 在肿瘤细胞中过表达, 而在正常细胞中表达较低, 已成为重要的肿瘤标志物。因此, 靶向整合素 $\alpha_v\beta_3$ 和 NRP-1 开发双靶点分子影像探针具有广泛的应用前景。与单靶点分子影像探针相比, 双靶点分子影像探针通过同时靶向两个肿瘤标志物, 能够显著提高亲和力、灵敏度和特异性, 进而提高肿瘤早期诊断的准确率。本文对近年来靶向整合素 $\alpha_v\beta_3$ 和免疫检查点 NRP-1 的双靶点分子影像探针的研究进展进行综述, 并探讨其在肿瘤精准诊断中的潜在应用, 以期后续构建靶向特异性和灵敏度更高的双靶点分子影像探针提供参考。

关键词: 整合素 $\alpha_v\beta_3$; 免疫检查点; 神经纤毛蛋白-1; 双靶点分子影像探针; 肿瘤诊断

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)05-1398-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.033

Research progress in dual-targeted molecular imaging probes targeting integrin $\alpha_v\beta_3$ and immune checkpoint NRP-1

ZHOU Yu-xuan^{1,2}, GE Man-xuan^{1,2}, CAI Shu-yue^{1,2}, XIE Quan^{1,2}, SUN Miao², LIN Jian-guo^{1,2}, QIU Ling^{1,2*} (1. School of Pharmacy, Nanjing Medical University, Nanjing 211166; 2. NHC Key Laboratory of Nuclear Medicine, Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Wuxi Jiangsu 214063)

Abstract: Integrin $\alpha_v\beta_3$ and immune checkpoint neuropilin-1 (NRP-1) which are over-expressed in tumor cells and under-expressed in normal cells, which have become important tumor biomarkers. Therefore, development of dual-targeted molecular imaging probes targeting integrin $\alpha_v\beta_3$ and NRP-1 holds great promise for clinical applications. Compared with single-targeted molecular imaging probes, dual-targeted molecular imaging probes significantly enhance their affinity, sensitivity, and specificity by simultaneously targeting two tumor biomarkers, thus improving the accuracy of tumor early diagnosis. This review summarized research progress in the development of dual-targeted molecular imaging probes targeting integrin $\alpha_v\beta_3$ and immune checkpoint NRP-1 to explore their potential in precise tumor diagnosis, providing reference for more efficient and targeting specific and sensitive molecular imaging probes.

Key words: integrin $\alpha_v\beta_3$; immune checkpoint; neuropilin-1; dual-targeted molecular imaging probe; tumor diagnosis

分子影像学技术在肿瘤的早期诊断、分期及预后评价等方面发挥了重要作用, 如正电子发射型计算机断层显像 (PET)、单光子发射型计算机断层显像 (SPECT)、磁共振成像 (MRI) 以及荧光成

像 (FI) 等^[1-2]。分子影像探针是实现分子影像学检查的关键, 利用放射性核素、顺磁性物质或荧光基团等与靶向配体分子结合, 可对肿瘤微环境中特定的生物标志物进行无创、实时、动态、定量检测,

基金项目: 江苏省卫生健康委科研项目 (No. ZD2022036)。

作者简介: 周雨萱, 女, 硕士研究生, 主要从事肿瘤靶向诊治药物的设计合成及应用研究, email: zhouyuxuan19990731@163.com

*通信作者: 邱玲, 女, 博士, 研究员, 主要从事肿瘤靶向诊治药物的设计合成及应用研究, email: qiuling@jnsim.org

已广泛用于临床前与临床研究^[3-5]。相较于单靶点分子探针,双靶点分子探针在肿瘤组织中具有更好的特异性摄取,与两个不同靶标的特定相互作用使其表现出更强的亲和力和更高的灵敏度,从而提高肿瘤诊断的灵敏度和准确度^[6-9]。

鉴于整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在肿瘤新生血管和实体瘤细胞表面高表达,而在正常血管和组织中基本无表达,同时免疫检查点分子神经纤毛蛋白-1 (NRP-1) 在多种肿瘤细胞表面高表达,故针对 $\alpha_v\beta_3$ 和 NRP-1 设计开发双靶点分子探针具有广泛的应用价值,可以灵敏特异地检测整合素 $\alpha_v\beta_3$ 和免疫检查点 NRP-1 高表达的肿瘤或其中任何一个受体高表达肿瘤,为肿瘤的早期诊断、疗效监测及预后评估提供强有力的工具。本文就近年来靶向整合素 $\alpha_v\beta_3$ 和免疫检查点 NRP-1 双靶点分子影像探针研究现状作综述,以期后续分子探针的设计提供参考。

1 $\alpha_v\beta_3$ 和 NRP-1 的结构及功能

1.1 $\alpha_v\beta_3$ 的结构及功能

肿瘤新生血管生成是肿瘤进展的关键环节,整合素在这一过程中发挥了重要作用。整合素 $\alpha_v\beta_3$ 作为一种由 α 和 β 亚单位组成的膜锚定受体,通过与细胞外基质 (ECM) 中的配体结合,促进细胞的黏附^[9]。 $\alpha_v\beta_3$ 不仅在肿瘤新生血管的内皮细胞中高表达,也在多种肿瘤细胞中过表达,包括神经胶质瘤、乳腺癌和肺癌等^[10-11]。通过准确评估肿瘤组织中 $\alpha_v\beta_3$ 的表达水平,可以有效反映肿瘤的生长状态和侵袭性,故 $\alpha_v\beta_3$ 被视为理想的肿瘤成像和治疗靶点^[12]。

1.2 NRP-1 的结构及功能

NRP-1 是一种 I 型跨膜糖蛋白,包含外部结构域、跨膜区和胞内尾部,是血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 的共受体,在神经胶质瘤、乳腺癌等多种肿瘤细胞中过表达^[13]。NRP-1 通过促进血管内皮细胞生长因子受体-2 (VEGFR-2) 介导的 VEGF 信号通路,激活内皮细胞,从而促进肿瘤细胞增殖、迁移及血管生成等^[14]。准确监测 NRP-1 的表达水平不仅有助于肿瘤的早期诊断,还能评估肿瘤的侵袭性和转移性^[15]。因此, NRP-1 被认为是一个具有潜力的肿瘤诊断及治疗靶点。

1.3 $\alpha_v\beta_3$ 与 NRP-1 的协同作用机制

$\alpha_v\beta_3$ 和 NRP-1 在肿瘤新生血管的内皮细胞中高表达,并通过不同的信号通路协同作用于肿瘤血管生成过程。 $\alpha_v\beta_3$ 通过介导细胞与 ECM 的信号传导,增强内皮细胞的迁移和增殖;而 NRP-1 则通过与 VEGF 及其受体的相互作用,促进血管生成^[9, 14]。有研究表明, $\alpha_v\beta_3$ 能够与 NRP-1 结合,从而限制 VEGF 诱导的内皮细胞中 NRP-1 与

VEGFR-2 之间的相互作用,负向调节 VEGF 介导的血管生成;此外,联合抑制 $\alpha_v\beta_3$ 和 NRP-1 比单独抑制 VEGFR-2 更能显著降低 VEGF 介导的血管生成反应^[16]。 $\alpha_v\beta_3$ 和 NRP-1 通过共同促进肿瘤微环境中的血管生成和肿瘤细胞侵袭,进一步推动肿瘤的进展。

2 靶向 $\alpha_v\beta_3$ 和 NRP-1 的双靶点分子影像探针

研究表明,双靶点分子影像探针在肿瘤组织中表现出比单靶点探针更高的特异性摄取,且通过与两个不同靶点的相互作用,双靶点探针展现出更强的亲和力和更高的灵敏度,从而显著提高肿瘤诊断的准确性^[17]。由于 $\alpha_v\beta_3$ 和 NRP-1 在肿瘤新生血管及多种肿瘤细胞中高度表达,不仅参与肿瘤血管生成,还与肿瘤细胞的侵袭和转移密切相关,因此它们在肿瘤发生和发展中均发挥着重要作用。基于 $\alpha_v\beta_3$ 和 NRP-1 设计开发的双靶点分子影像探针能够灵敏特异地检测 $\alpha_v\beta_3$ 和 NRP-1 高表达的肿瘤或其中任一靶点高表达的肿瘤,不仅能同时评估肿瘤的血管生长和肿瘤细胞的侵袭,还为肿瘤的早期诊断提供了强有力的工具。与其他双靶点探针相比,靶向 $\alpha_v\beta_3$ 和 NRP-1 的双靶点分子影像探针通过同时靶向肿瘤微环境中这两个关键的生物标志物,能够全面反映血管生成过程及肿瘤的侵袭性,具有更高的靶向特异性。近年来,靶向 $\alpha_v\beta_3$ 和 NRP-1 双靶点分子影像探针取得了显著进展,如双靶点 PET 探针 ^{18}F -FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR、双靶点 MRI 探针 P1-Gd-LP 和双靶点 FI 探针 RGD-ATWLPPR-Cy5.5 等。实验证实它们相比单靶点探针具有更好的肿瘤靶向性,显著提高了肿瘤诊断的准确性和灵敏度,更有利于临床转化^[18-20]。

3 靶向 $\alpha_v\beta_3$ 和 NRP-1 的双靶点分子影像探针研究进展

3.1 靶向 $\alpha_v\beta_3$ 和 NRP-1 的双靶点 PET 探针

PET 成像具有灵敏度高、特异性好、组织穿透力强等优势,广泛用于疾病早期诊断及疗效评价^[21]。利用 PET 成像可以准确地定量评估患者体内整合素和免疫检查点的表达水平,为筛选潜在获益患者和确定治疗方案提供重要信息^[22]。目前已有研究采用 ^{18}F 、 ^{68}Ga 等放射性核素标记分子探针,同时靶向 $\alpha_v\beta_3$ 和 NRP-1, PET 成像显示其具有良好的肿瘤靶向效果,且肿瘤摄取显著提高。

^{18}F 具有良好的理化性质,半衰期为 109.8 min,在组织中湮灭距离短 (约 2.4 mm),可产生高分辨率图像,因而得到了广泛的研究与应用^[23]。Wu 等^[18]设计开发了 $\alpha_v\beta_3$ 和 NRP-1 双靶点分子探针 ^{18}F -FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR,并比较了该探针与单靶点探针 ^{18}F -FAI-NOTA-c (RGDyK)、 ^{18}F -FAI-

NOTA-ATWLPPR 对肿瘤的靶向特异性。这些探针均采用氟化铝 (Al^{18}F) 标记法制备, 首先利用放射性 $^{18}\text{F}^-$ 与 AlCl_3 反应生成 $^{18}\text{F}\text{-FAI}^{2+}$, 再与前体化合物中金属螯合基团 NOTA (1, 4, 7-三氮杂环壬烷-1, 4, 7-三乙酸) 上的 N 原子和 O 原子连接, 形成稳定的 Al^{18}F 标记六配位络合物^[24]。这篇文献细胞实验证明, 双靶点探针可同时结合人神经胶质瘤 U87MG 细胞中的 $\alpha_v\beta_3$ 和 NRP-1, 在 U87MG 细胞中的摄取明显高于单靶点探针, U87MG 荷瘤鼠 PET 显像和生物分布实验进一步证明双靶点探针在肿瘤中具有更高的摄取和更长的滞留时间, 并且在肌肉、肠道和肝脏等正常组织和器官中的摄取较低, 靶本比得到了提高, 展现出更好的显像效果。此外, 当使用单靶向肽 c (RGDyK) 或 ATWLPPR 进行阻断时, U87MG 肿瘤对双靶点探针 $^{18}\text{F}\text{-FAI}\text{-NOTA}\text{-RGD}\text{-ATWLPPR}$ 的摄取仅受到部分抑制, 肿瘤/肌肉比从 5.27 ± 0.56 分别降至 2.31 ± 0.13 和 3.18 ± 0.25 , 肿瘤摄取分别减少 58% 和 43%; 若同时使用 c (RGDyK) 和 ATWLPPR 进行阻断, 肿瘤摄取几乎被完全抑制, 肿瘤/肌肉比从 5.27 ± 0.56 降至 1.14 ± 0.17 , 肿瘤摄取减少 80%, 进一步证明了该探针对 $\alpha_v\beta_3$ 和 NRP-1 具有双重靶向特异性。上述实验结果表明, 双靶点探针 $^{18}\text{F}\text{-FAI}\text{-NOTA}\text{-RGD}\text{-ATWLPPR}$ 在靶向性和肿瘤定位能力方面显著优于单靶点探针 $^{18}\text{F}\text{-FAI}\text{-NOTA}\text{-c (RGDyK)}$ 和 $^{18}\text{F}\text{-FAI}\text{-NOTA}\text{-ATWLPPR}$ 。然而, PET 显像和生物分布数据也显示该双靶点探针会被骨骼吸收, 在体内可能发生脱氟现象。因此, 需要进一步修饰探针结构以提高其体内稳定性, 例如调整两个靶向配体的连接子长度和刚性, 探索特定的连接子或基团修饰如聚乙二醇化等, 以改善探针性能。

赵龙等^[25]进一步研究双靶点探针 $^{18}\text{F}\text{-FAI}\text{-NOTA}\text{-RGD}\text{-ATWLPPR}$ 的潜在应用价值, 证实其确实较单靶点探针 $^{18}\text{F}\text{-FAI}\text{-NOTA}\text{-c (RGDyK)}$ 和 $^{18}\text{F}\text{-FAI}\text{-NOTA}\text{-ATWLPPR}$ 具有更好的肿瘤靶向性和诊断灵敏度: 通过比较竞争结合常数, 发现该探针能有效地结合 $\alpha_v\beta_3$ 和 NRP-1 受体, 结合亲和力达纳摩尔级别, 并且在 U87MG 肿瘤细胞中的摄取高于单靶点探针; U87MG 荷瘤鼠 PET 显像也显示该双靶点探针的肿瘤摄取 (4.86 ± 0.48) %ID $\cdot \text{g}^{-1}$ 明显高于单靶点探针 $^{18}\text{F}\text{-FAI}\text{-NOTA}\text{-c (RGDyK)}$ (3.33 ± 0.15) %ID $\cdot \text{g}^{-1}$ 和 $^{18}\text{F}\text{-FAI}\text{-NOTA}\text{-ATWLPPR}$ (2.28 ± 0.41) %ID $\cdot \text{g}^{-1}$; 阻断实验进一步证明了该双靶点探针的肿瘤摄取是 $\alpha_v\beta_3$ 和 NRP-1 受体共同介导的特异性结合, 使用双靶点探针前体 NOTA-RGD-ATWLPPR 作为阻断剂的阻断效果更明显。双靶点探针 $^{18}\text{F}\text{-FAI}\text{-NOTA}\text{-RGD}\text{-ATWLPPR}$ 较单靶点探针表现

出更好的显像效果和更高的肿瘤摄取, 但其对 $\alpha_v\beta_3$ 及 NRP-1 受体的亲和力仍需提高。此外, 该双靶点探针在肝脏中摄取较高, 需通过引入药代动力学修饰基团如聚甘氨酸 (glycine-glycine-glycine, Gly₃) 等, 进一步增强探针的靶向亲和力, 降低探针在肝脏中的蓄积, 从而优化探针的药代动力学性质。

^{68}Ga 作为 PET 显像中一种常用的核素, 来源易得, 由 $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ 发生器淋洗即可获得, 半衰期为 67.7 min, 与多肽相对较快的代谢性质相匹配, 注射后 1 h 内即可获得高质量的 PET 图像, 在肿瘤诊断方面起到了重要作用^[26]。Yao 等^[27]设计合成了同时靶向 $\alpha_v\beta_3$ 和 NRP-1 的双靶点探针 $^{68}\text{Ga}\text{-DOTA}\text{-RGD}\text{-ATWLPPR}$, 与 Al^{18}F 标记类似, 该探针的制备主要是通过放射性 $^{68}\text{Ga}^{3+}$ 与前体化合物中金属螯合基团 DOTA (1, 4, 7, 10-四氮杂环十二烷-1, 4, 7, 10-四乙酸) 上的 N 原子和 O 原子连接, 形成稳定的 ^{68}Ga 标记七配位络合物^[28]; 体外细胞摄取及阻断实验显示, 该探针能同时靶向三阴性乳腺癌 MCF-7 细胞中的 $\alpha_v\beta_3$ 和 NRP-1, 具有良好的靶向特异性; Micro-PET/CT 显像结果表明, 该双靶点探针可精准定位肿瘤, 在 MCF-7 细胞中摄取显著高于单靶点探针 $^{68}\text{Ga}\text{-DOTA}\text{-RGD}$ 和 $^{68}\text{Ga}\text{-DOTA}\text{-ATWLPPR}$, 具有更好的肿瘤靶向能力和更久的滞留时间, 肿瘤/肌肉比更高; 阻断实验进一步验证了该双靶点探针在体内对 $\alpha_v\beta_3$ 和 NRP-1 的靶向特异性, 使用双靶向肽 RGD-ATWLPPR 进行阻断时, 探针在肿瘤中的摄取显著降低, 肿瘤/肌肉比从 5.03 ± 0.21 降至 1.69 ± 0.18 , 较单独使用单靶向肽 RGD 阻断 (肿瘤/肌肉比降至 2.18 ± 0.09) 或 ATWLPPR 阻断 (肿瘤/肌肉比降至 2.11 ± 0.13) 的效果更明显。与该团队之前报道的双靶点探针 $^{18}\text{F}\text{-FAI}\text{-NOTA}\text{-RGD}\text{-ATWLPPR}$ 相比, 该探针在骨和肝脏中没有明显摄取^[18, 25]。由此可见, 该探针可成功定位癌性病变, 相较于单靶点探针, 显著提高了结合亲和力、靶向效率和在肿瘤中的滞留时间, 具有作为乳腺癌早期诊断探针的潜力。

3.2 靶向 $\alpha_v\beta_3$ 和 NRP-1 的双靶点 MRI 探针

MRI 具有多方位、多参数、多序列成像的特点, 软组织分辨率高, 无电离辐射损伤, 已被运用于临床常规诊疗中, 是当前分子影像学检查的重要工具之一。通过特定的靶向载体有效地将造影剂递送至肿瘤部位, 可提高 MRI 成像的特异性, 具有良好的临床应用价值^[29]。Song 等^[19]设计合成了 $\alpha_v\beta_3$ 和 NRP-1 双靶向 MRI 探针 P1-Gd-LP, 该探针能够将造影剂 Gd-DTPA 靶向递送至肿瘤部位, 从而改善 MRI 造影剂在早期肿瘤成像的效果。与非靶向探针 Gd-DTPA 或单靶向探针 P2-Gd-

LP、P3-Gd-LP 相比, 双靶点探针 P1-Gd-LP 在人脐静脉内皮细胞 HUVECs 和人非小细胞肺癌细胞 A549 中的摄取更高, 结合亲和力更强, 说明该双靶点探针具有更好的肿瘤靶向能力; 此外, A549 荷瘤鼠体内成像结果表明, 双靶点探针 P1-Gd-LP 的信号增强率 (SER) 较非靶向探针 Gd-DTPA 和 PEG-Gd-LP 增加了约 3 倍, 且在肿瘤组织中的滞留时间较长, 说明该双靶点探针 P1-Gd-LP 可以促进造影剂在肿瘤中的靶向递送和蓄积。与之前报道的双靶点放射性探针 ^{18}F -FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR 相比^[18], 该双靶点 MRI 探针 P1-Gd-LP 由于负载能力更强, 能更有效地将造影剂靶向输送到肿瘤部位, 有望用于多种肿瘤的早期检测。

3.3 靶向 $\alpha_v\beta_3$ 和 NRP-1 的双靶点 FI 探针

FI 由于具有成本低、易操作、响应速度快和时空分辨率高等优点, 近年来已被广泛用于多种疾病生物标志物的检测^[30]。利用靶向特异性荧光探针可以在微观和宏观水平上实现目标靶分子的体内可视化, 从而用于在体成像、术中导航以及光学成像引导的治疗。Ciccione 等^[31]通过调节靶向 $\alpha_v\beta_3$ 和 NRP-1 的多肽序列 c[RGDfK] 和 ATWLPPR 的比例, 设计开发了多个双靶点纳米荧光探针 $\text{NP}^{10}_{75/25}$ (c[RGDfK]/ATWLPPR = 75/25)、 $\text{NP}^{10}_{50/50}$ (c[RGDfK]/ATWLPPR = 50/50) 和 $\text{NP}^{10}_{25/75}$ (c[RGDfK]/ATWLPPR = 25/75), 发现它们比单靶点荧光探针 $\text{NP}^{10}_{100/0}$ (c[RGDfK]/ATWLPPR = 100/0) 和 $\text{NP}^{10}_{0/100}$ (c[RGDfK]/ATWLPPR = 0/100) 的肿瘤靶向特异性更强, 在 HUVECs 细胞、人非小细胞肺癌细胞 H358 和三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB231 中摄取更高。该研究提供了一种简单高效的方法, 能够精确调控纳米颗粒表面靶向配体的组成和比例, 从而实现两个不同靶点的同时靶向。合成的双靶点纳米荧光探针相比单靶点探针展现出更强的肿瘤靶向性, 能够促进荧光探针精准递送至肿瘤部位, 有望为肿瘤诊断提供一种新的技术手段。

为了进一步探索 $\alpha_v\beta_3$ 和 NRP-1 双靶点探针的作用机制, Jia 等^[32]对双靶点探针 RGD/ATW-NPs 在 HUVECs 细胞中的亲和力、特异性和生物活性进行研究, 该研究通过流式细胞术检验探针的结合效率, 发现与单靶点探针 RGD-NPs、ATW-NPs 相比, 双靶点探针 RGD/ATW-NPs 的荧光信号更强, 说明该双靶点探针与 HUVECs 细胞的结合效率更高; 在缺乏血清的情况下, 单靶点探针 RGD-NPs 和 ATW-NPs 诱导的蛋白激酶 B (PKB) 磷酸化较为短暂, 与 HUVECs 细胞共孵育 24 h 后显示出明显的细胞毒性作用, 不足以保护 HUVECs

细胞在缺乏血清条件下免于死亡, 而双靶点探针 RGD/ATW-NPs 能够诱导持久的 PKB 磷酸化, 消除二氧化硅纳米粒子对血清饥饿 HUVECs 细胞的内在毒性, 有助于 HUVECs 细胞抵抗血清饥饿诱导的细胞死亡。RGD/ATW-NPs 探针通过同时靶向 $\alpha_v\beta_3$ 和 NRP-1 有效激活 PKB 信号通路, 促进细胞存活, 从而显著减轻了二氧化硅纳米颗粒的毒性, 为肿瘤靶向药物的设计及优化提供了理论依据。

Thoreau 等^[33]证明了含 RGD 四聚体的探针在肿瘤成像特别是荧光引导手术中的应用潜力。为了改善该探针的成像效果, 该团队设计了一种同时靶向 $\alpha_v\beta_3$ 和 NRP-1 的双靶点荧光探针 RGD-A7R-Cy5.5。U87MG 荷瘤鼠成像结果显示, 双靶点荧光探针 RGD-A7R-Cy5.5 在肿瘤中的特异性摄取比单靶点荧光探针 RGD-Cy5.5 更高, 注射 24 h 后的肿瘤/皮肤比保持较高水平; 体内外实验结果均证明, 双靶点荧光探针 RGD-A7R-Cy5.5 对 $\alpha_v\beta_3$ 和 NRP-1 的双重靶向与其在肿瘤细胞和组织上的结合增加、靶向性和滞留性提高有关, 从而肿瘤/背景比得到了改善^[20]。因此, 双靶点荧光探针可精确地定位肿瘤病灶, 提高诊断的准确性和灵敏度, 有望拓宽肿瘤的检测范围, 从而更好地用于肿瘤成像并引导手术治疗。

目前已开发出来的探针的结构详见图 1, 研究成果见表 1。

4 总结与展望

肿瘤的高度异质性使作用于单一靶点的单靶向药物无法覆盖所有病变区域, 这一局限性推动了双靶点协同策略的发展。该策略通过识别并作用于两个不同的靶点, 能够有效应对肿瘤的异质性。在此基础上, 双靶点成像探针的开发显著提升了对肿瘤的靶向特异性和检测灵敏度, 同时双靶点治疗探针利用协同靶向作用递送放射性治疗核素, 能够有效降低脱靶效应和非特异性摄取, 突破单靶向药物的疗效瓶颈。针对整合素和免疫检查点设计开发的双靶点分子探针可同时评估肿瘤的血管生长和细胞侵袭, 提高肿瘤诊断灵敏度和准确率, 具有较大的临床应用潜力。然而, 近年来针对整合素和免疫检查点的双靶点探针研究较少, 主要集中在对 $\alpha_v\beta_3$ 和 NRP-1 两个靶点的临床前研究。因此, 进一步开发整合素和免疫检查点相关的双靶点诊疗探针不仅能更精准地定位肿瘤, 最大限度地减少对正常组织的损伤, 还可以提高放射性核素在肿瘤部位的聚集, 降低肿瘤对单一靶点治疗的耐药性, 为肿瘤诊断及治疗提供更多的选择。

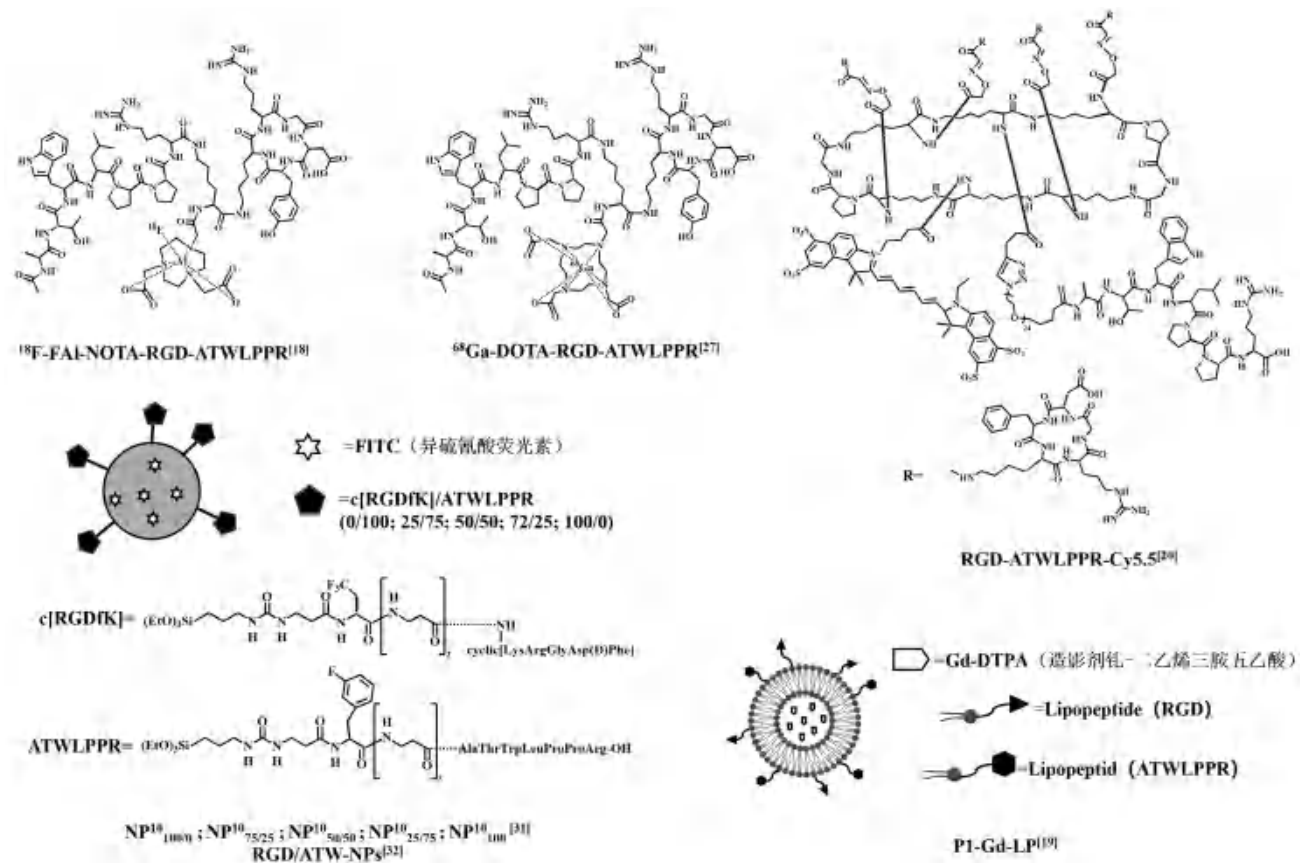


图 1 靶向 $\alpha_v\beta_3$ 和 NRP-1 的双靶点分子影像探针结构
Fig 1 Structure of dual-targeted molecular imaging probes for $\alpha_v\beta_3$ and NRP-1

表 1 靶向 $\alpha_v\beta_3$ 和 NRP-1 的双靶点分子影像探针
Tab 1 Dual-targeted molecular imaging probes for $\alpha_v\beta_3$ and NRP-1

探针名称	探针属性	成像方式	应用疾病	重要成果
^{18}F -FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR ^[18]	多肽	PET	神经胶质瘤	在肿瘤中具有更高的摄取和更长的滞留时间
P1-Gd-LP ^[19]	脂质体	MRI	非小细胞肺癌	更有效地促进造影剂在肿瘤中的靶向递送和蓄积
RGD-ATWLPPR-Cy5.5 ^[20]	多肽	FI	神经胶质瘤	更精确地定位肿瘤病灶, 提高诊断的准确性和灵敏度
^{18}F -FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR ^[25]	多肽	PET	神经胶质瘤	具有更好的肿瘤靶向性和诊断灵敏度
^{68}Ga -DOTA-RGD-ATWLPPR ^[27]	多肽	PET	三阴性乳腺癌	提高了结合亲和力、靶向效率及在肿瘤中的滞留时间
NP ¹⁰ _{75/25} 、NP ¹⁰ _{50/50} 、NP ¹⁰ _{25/75} ^[31]	纳米	FI	非小细胞肺癌、三阴性乳腺癌	在肿瘤细胞中具有更高的摄取
RGD/ATW-NPs ^[32]	纳米	FI	/	促进细胞存活, 显著减轻二氧化硅纳米颗粒的毒性

参考文献

[1] Junn JC, Soderlund KA, Glastonbury CM. Imaging of head and neck cancer with CT, MRI, and US [J]. Semin Nucl Med, 2021, 51 (1): 3-12.

[2] Chen LL, Lyu YF, Zhang X, et al. Molecular imaging: design mechanism and bioapplications [J]. Sci China Chem, 2023, 66 (5): 1336-1383.

[3] Vera P, Thureau S, Le Tinier F, et al. Adaptive radiotherapy (up to 74 Gy) or standard radiotherapy (66 Gy) for patients with stage III non-small-cell lung cancer, according to [^{18}F]FDG-PET tumour residual uptake at 42 Gy (RTEP7-IF-CT-1402): a multicentre, randomised, controlled phase 2 trial [J]. Lancet Oncol, 2024, 2 (9): 1176-1187.

[4] Yue RY, Li Z, Liu HY, et al. Imaging-guided companion diagnostics in radiotherapy by monitoring APE1 activity with afterglow and MRI imaging [J]. Nat Commun, 2024, 15 (1): 6349.

[5] 刘睿婷, 李涛, 陈梓欣, 等. 近红外荧光造影剂的临床应用与药代动力学研究进展 [J]. 中南药学, 2024, 22 (8): 2077-2083.

[6] Liu ZF, Wang F. Dual-targeted molecular probes for cancer imaging [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2010, 11 (6): 610-619.

[7] Ehlerding EB, Sun LY, Lan XL, et al. Dual-targeted molecular imaging of cancer [J]. J Nucl Med, 2018, 59 (3): 390-395.

[8] Zhao L, Pang YZ, Fang JY, et al. Design, preclinical evaluation, and clinical translation of ^{68}Ga -FAPI-LM3, a heterobivalent molecule for PET imaging of nasopharyngeal carcinoma [J]. J Nucl Med, 2024, 65 (3): 394-401.

[9] Liu KH, Jiang T, Rao WQ, et al. Peptidic heterodimer-based radiotracer targeting fibroblast activation protein and integrin $\alpha_v\beta_3$ [J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2024, 51 (6):

- 1544-1557.
- [10] Brooks PC, Montgomery AMP, Rosenfeld M, et al. Integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels [J]. *Cell*, 1994, 79 (7): 1157-1164.
 - [11] Yan QS, Zhong JW, Liu Y, et al. Synthesis and preclinical evaluation of a heterodimeric radioligand targeting fibroblast activation protein and integrin- $\alpha_v\beta_3$ [J]. *Eur J Med Chem*, 2023, 251: 115279.
 - [12] Carlsen EA, Loft M, Loft A, et al. Prospective phase II trial of [^{68}Ga]Ga-NODAGA-E[c (RGDyK)]₂ PET/CT imaging of integrin $\alpha_v\beta_3$ for prognostication in patients with neuroendocrine neoplasms [J]. *J Nucl Med*, 2023, 64 (2): 252-259.
 - [13] Dumond A, Pages G. Neuropilins, as relevant oncology target: their role in the tumoral microenvironment [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 662.
 - [14] Liu SD, Zhong LP, He J, et al. Targeting neuropilin-1 interactions is a promising anti-tumor strategy [J]. *Chin Med J*, 2021, 134 (5): 508-517.
 - [15] Liu QZ, Cai SY, Ye JC, et al. Preclinical evaluation of ^{68}Ga -labeled peptide CK2 for PET imaging of NRP-1 expression in vivo [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2024, 51 (7): 1826-1840.
 - [16] Robinson SD, Reynolds LE, Kostourou V, et al. Alphav beta3 integrin limits the contribution of neuropilin-1 to vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284 (49): 33966-33981.
 - [17] Wang P, Wang SL, Liu FT, et al. Preclinical evaluation of a fibroblast activation protein and a prostate-specific membrane antigen dual-targeted probe for noninvasive prostate cancer imaging [J]. *Mol Pharm*, 2023, 20 (2): 1415-1425.
 - [18] Wu H, Chen HJ, Pan DF, et al. Imaging integrin $\alpha_v\beta_3$ and NRP-1 positive gliomas with a novel fluorine-18 labeled RGD-ATWLPPR heterodimeric peptide probe [J]. *Mol Imaging Biol*, 2014, 16 (6): 781-792.
 - [19] Song Y, Li W, Meng SY, et al. Dual integrin $\alpha_v\beta_3$ and NRP-1-targeting paramagnetic liposome for tumor early detection in magnetic resonance imaging [J]. *Nanoscale Res Lett*, 2018, 13 (1): 380.
 - [20] Thoreau F, Vanwonderghem L, Henry M, et al. Design of RGD-ATWLPPR peptide conjugates for the dual targeting of $\alpha_v\beta_3$ integrin and neuropilin-1 [J]. *Org Biomol Chem*, 2018, 16 (22): 4101-4107.
 - [21] Schwenck J, Sonanini D, Cotton JM, et al. Advances in PET imaging of cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2023, 23 (7): 474-490.
 - [22] Mishra A, Gupta K, Kumar D, et al. Non-invasive PD-L1 quantification using [^{18}F]DK222-PET imaging in cancer immunotherapy [J]. *J Immunother Cancer*, 2023, 11 (10): e007535.
 - [23] 江艳君, 李晓阳, 洪浩. 核素药物在肿瘤细胞治疗中的应用研究进展 [J]. *药学进展*, 2023, 47 (1): 16-34.
 - [24] Bernard-Gauthier V, Lepage ML, Waengler B, et al. Recent advances in ^{18}F radiochemistry: a focus on B- ^{18}F , Si- ^{18}F , Al- ^{18}F , and C- ^{18}F radiofluorination via spirocyclic iodonium ylides [J]. *J Nucl Med*, 2018, 59 (4): 568-572.
 - [25] 赵龙, 罗作明, 孙龙, 等. 新型 $\alpha_v\beta_3$ 和 Neuropilin-1 双靶点正电子成像探针 ^{18}F -FAI-NOTA-RGD-ATWLPPR 用于脑胶质瘤的 PET 显像研究 [J]. *国际放射医学核医学杂志*, 2017, 41 (4): 233-240.
 - [26] Wang XW, Liu W, Li K, et al. PET imaging of PARP expression using ^{68}Ga -labelled inhibitors [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2023, 50 (9): 2606-2620.
 - [27] Yao LL, Li YS, Chen HJ, et al. Dual targeting of integrin $\alpha_v\beta_3$ and neuropilin-1 receptors improves micropositron emission tomography imaging of breast cancer [J]. *Mol Pharm*, 2022, 19 (5): 1458-1467.
 - [28] Chen YM, Zhang XJ, Ni M, et al. Synthesis, preclinical evaluation, and first-in-human PET study of [^{68}Ga]-labeled biphenyl-containing PSMA tracers [J]. *J Med Chem*, 2023, 66 (18): 13332-13345.
 - [29] Lin HY, Tang XX, Li A, et al. Activatable ^{19}F MRI nanoprobes for visualization of biological targets in living subjects [J]. *Adv Mater*, 2021, 33 (50): e2005657.
 - [30] 唐嘉, 周莉莉. 透明质酸修饰血清白蛋白纳米粒在肿瘤诊疗中的研究进展 [J]. *中南药学*, 2024, 22 (8): 2131-2138.
 - [31] Ciccione J, Jia T, Coll JL, et al. Unambiguous and controlled one-pot synthesis of multifunctional silica nanoparticles [J]. *Chem Mater*, 2016, 28 (3): 885-889.
 - [32] Jia T, Choi J, Ciccione J, et al. Heteromultivalent targeting of integrin $\alpha_v\beta_3$ and neuropilin 1 promotes cell survival via the activation of the IGF-1/insulin receptors [J]. *Biomaterials*, 2018, 155: 64-79.
 - [33] Wenk CHF, Ponce F, Guillermet S, et al. Near-infrared optical guided surgery of highly infiltrative fibrosarcomas in cats using an anti- $\alpha_v\beta_3$ integrin molecular probe [J]. *Cancer Lett*, 2013, 334 (2): 188-195.

(收稿日期: 2024-11-04; 修回日期: 2025-03-12)

药物分析与检验

药用辅料聚山梨酯 80 (II) 质量评价及质量研究

张悦¹, 李昌亮¹, 蒋赞¹, 赵勇¹, 周颖¹, 刘杨¹, 梁晟¹, 刘雁鸣¹, 谢莹莹^{2*} (1.湖南省药品检验检测研究院 国家药品监督管理局药用辅料工程技术研究重点实验室, 长沙 410001; 2.湖南省药品审核查验中心, 长沙 410001)

摘要: **目的** 评价聚山梨酯 80 (II) 的质量现状及存在的问题, 分析各厂家聚山梨酯 80 (II) 产品的质量差距。**方法** 按现行质量标准, 对 5 个厂家 40 批次样品进行全项检验, 围绕安全、有效等方面开展探索性研究, 全面分析其质量差异。**结果** 按现行标准检验, 40 批次样品合格率为 95%, 按探索性研究检验, 合格率为 87.5%, 不合格项目为过氧化值、脂肪酸组成、甲醛和乙醛等检查项。**结论** 聚山梨酯 80 (II) 整体质量状况一般, 现行质量标准有待完善。

关键词: 聚山梨酯 80 (II); 质量评价; 质量标准; 过氧化值

中图分类号: R917, R927 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)05-1404-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.034

Quality evaluation and polysorbate 80 (II) as a medicinal excipient

ZHANG Yue¹, LI Chang-liang¹, JIANG Yun¹, ZHAO Yong¹, ZHOU Ying¹, LIU Yang¹, LIANG Sheng¹, LIU Yan-ming¹, XIE Ying-ying^{2*} (1. *Hunan Institute for Drug Control NMPA Key Laboratory for Pharmaceutical Excipients Engineering Technology Research, Changsha 410001*; 2. *Hunan Drug Inspection Center, Changsha 410001*)

Abstract: Objective To determine the quality status and existing problems of different sources of polysorbide 80 (II), and analyze the quality gap of polysorbide 80 (II) products from various manufacturers. **Methods** According to the current quality standards, we fully inspected 40 batches of samples from 5 manufacturers and determined their safety, effectiveness, and other aspects to comprehensively analyze their quality differences. **Results** The pass rate of 40 batches of samples was 95% by current standards, while that was 87.5% by exploratory research. The unqualified inspection items include peroxide value, fatty acid composition, formaldehyde, and acetaldehyde. **Conclusion** The overall quality of polysorbate 80 (II) is acceptable, and the current quality standards need to be improved.

Key words: polysorbate 80 (II); quality evaluation; quality standard; peroxide value

聚山梨酯 80 系油酸、山梨醇和环氧乙烷聚合而成的聚氧乙烯 20 油酸山梨坦, 作为增溶剂、乳化剂和蛋白稳定剂广泛应用于制药行业中^[1]。由于聚山梨酯 80 质量差异较大, 在临床应用中不良反应发生率较多^[2], 2020 年版《中国药典》对其进行分级管理, 分为聚山梨酯 80 和聚山梨酯 80 (II), 其中聚山梨酯 80 (II) 按供注射药用辅

料管理, 对含量、杂质控制提出了较高要求^[3]。目前, 市场上聚山梨酯 80 (II) 的价格差异较大, 进口产品的价格往往是国产产品的 3 倍以上, 这可能是由于进口产品在质量控制和生产工艺上更为严格。因此, 对于生化药物生产企业来说, 更倾向于购买进口产品以确保产品质量和安全性。

国家药品监督管理局将聚山梨酯 80 (II) 列入

基金项目: 湖南省自然科学基金科药联合基金项目 (No.2024JJ8238)。

作者简介: 张悦, 女, 主管药师, 主要从事药用辅料检验检测方面的研究, email: 873813723@qq.com * **通信作者:** 谢莹莹, 女, 高级工程师, 主要从事药品检查方面的研究, email: 276468687@qq.com

2023 年度国家药品抽检计划, 湖南省药品检验检测研究院对抽检和自筹的 40 批次样品, 进行标准检验和探索性研究, 分析影响产品质量的关键因素, 为提升国产辅料聚山梨酯 80 (II) 的竞争力提供思路。

1 材料

1.1 仪器

LUMOS 显微红外光谱仪 (德国布鲁克公司), Agilent 1260 Infinity II 液相色谱仪 (安捷伦科技有限公司), Thermo ICS-5000 离子色谱仪、iCAPQc 电感耦合等离子体质谱分析仪 (美国赛默飞公司), Agilent 8890-7010B GC-MS/MS 色谱仪 (安捷伦科技有限公司), MS105DU 电子分析天平 (精度: 0.01 mg, 瑞士 Mettler-Toledo 公司), GL Sciences Inertsil ODS-3 色谱柱 (250 mm×4.6 mm×5 μm, 日本岛津公司), Alltima-C8 (4.6 mm×250 mm×5 μm, 美国格雷斯公司), DB-5 MS 色谱柱 (30 m×0.25 μm×0.25 μm, 美国安捷伦公司)。

1.2 试药

聚山梨酯 80 (II) 对照品 (批号: R072G0, 纯度: 99.7%, USP), 甲醛-2, 4-DNPH 对照品 (批号: 2254874, 纯度: 98%)、乙醛-2, 4-DNPH 对

照品 (批号: 2256231, 纯度: 98%)(上海安谱瑞世标准技术服务有限公司), 草酸对照品 (批号: 101097-201702, 纯度: 100.0%)、柠檬酸对照品 (批号: 111679-201602, 纯度: 97.0%)(中国食品药品检定研究院), 冰乙酸对照品 (批号: 20221118, 纯度: 99.9%)、酒石酸对照品 (批号: 20180923, 纯度: 100.0%)、过氧化氢对照品 (批号: 20181023, 纯度: 100.0%)(国药集团化学试剂有限公司), 甲酸对照品 (批号: Q/12KM 4049-2017, 纯度: 100.0%, 天津科密欧有限公司), 乳酸对照品 (批号: K53288666116, 纯度: 93.3%, Merck), 过氧化氢标准物质 (批号: 20220323, 质量浓度: 100 μg·mL⁻¹)、水中氯成分分析标准物质 (批号: 20220323, 质量浓度: 1000 μg·mL⁻¹)、硫酸盐溶液标准物质 (批号: 20220418, 质量浓度: 1000 μg·mL⁻¹)、磷酸根溶液标准物质 (批号: 20220407, 质量浓度: 1000 μg·mL⁻¹)、26 种金属元素混合标准溶液 (批号: 20210726, 质量浓度: 1000 μg·mL⁻¹)(北京北方伟业计量技术研究院), 17 种塑化剂成分 (批号: G457861, 德国 Dr 标准品公司)。40 批次聚山梨酯 80 (II) 样品, 样品来源详见表 1。

表 1 样品信息及结果

Tab 1 Sample information

企业	批次	酸碱度 /pH 值	过氧化物 /%	甲醛 /%	乙醛 /%	甲酸根 /%	钠 /%	镁 /%	钾 /%	总元素 /%
国内 A	3	6.33	0.0026	0.0003	0.0006	0.0237	0.0003	0.00003	0.0009	0.002
国内 B	30	6.23	0.0042	0.0015	0.0029	0.0142	0.0114	0.00002	0.0002	0.012
国内 C	3	5.63	0.0123	0.0035	0.0046	0.0268	0.0138	0.00002	0.0006	0.015
国内 D	1	5.50	0.0132	0.0032	0.0050	0.0466	0.0131	0.00003	0.0007	0.016
外企 E	3	6.63	0.0025	0.0011	0.0001	0.0210	0.0064	0.00113	0.0001	0.009

2 方法与结果

2.1 标准检验

40 批次样品按《中国药典》2020 年版四部 (ChP2020) 聚山梨酯 80 (II) 标准检验, 有 2 批次不合格, 不合格率为 5.0%, 不合格项目为过氧化值 (1 批 D 企业样品)、脂肪酸组成 (1 批 A 企业样品)。ChP2020 脂肪酸组成采用气相色谱法, 限度为“含油酸应不低于 98.0%”, 1 批 A 企业样品脂肪酸组成不符合规定 (油酸含量 96.0%), 推测原因可能为生产中采用低纯油酸投料或纯化不够。聚山梨酯 80 (II) 标准检验中酸碱度采用 pH 计测定, 限度为 5.0 ~ 7.5, 后期建立离子色谱法对样品中具体的有机酸类型进行考察。

2.2 探索性研究

2.2.1 红外鉴别 现行标准中仅有化学鉴别, 为提高鉴别检验的专属性, 进行红外鉴别考察。结

果 40 批次样品的红外光谱图与聚山梨酯 80 (II) 对照品具有一致的峰形, 见图 1。

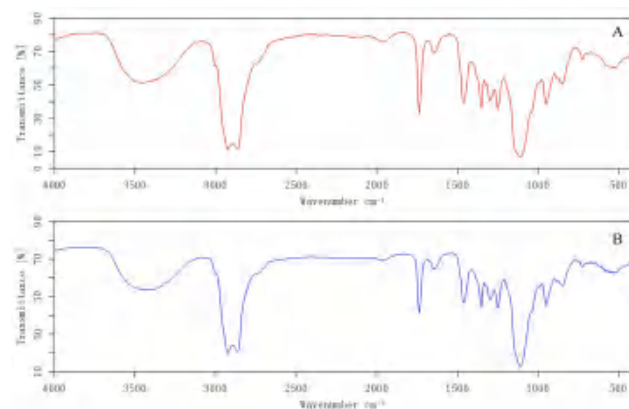


图 1 聚山梨酯 80 (II) 对照品 (A) 及样品 (B) 红外典型图谱

Fig 1 Typical infrared spectra of reference substance (A) and sample (B) of polysorbate 80

2.2.2 过氧化物 样品放置过程会降解产生过氧化

物^[4-5]。容量分析法区分为有限，ChP2020 过氧化值采用容量分析法，限度为“不得过 3”。参考相关文献，建立柱前衍生化 LC-UV 法测定聚山梨酯 80 (II) 中过氧化物含量^[6-7]，结果见表 1。结果 40 批次样品中过氧化物含量在 0.0015% ~ 0.0132%，国内 C、D 两家企业样品过氧化物含量较大，其中 D 企业样品过氧化物含量最高，且在标准检验中过氧化值不符合规定；国外 E 企业样品过氧化物含量最低。

2.2.3 甲醛、乙醛 本品由氧乙烯基组成的链状结构，自氧化过程会发生不同程度的断裂，产生甲醛和乙醛等小分子杂质^[8-9]。现行标准中未对醛类进行控制，参考相关文献，建立柱前衍生 LC-UV 法对聚山梨酯 80 (II) 中甲醛、乙醛进行测定^[10-11]。结果见表 1，40 批次样品甲醛测定结果为 0.0001% ~ 0.0035%，乙醛测定结果为 0% ~ 0.0695%，国内 C、D 两家企业样品甲醛、乙醛含量较大，国外 E 企业含量最低。参照含聚氧乙烯链的同系列品种拟定甲醛限度不得过 0.003%，甲醛和乙醛的总量不得过 0.02%。40 批次样品中，C 企业的 3 批样品甲醛项均不符合规定。

2.2.4 有机酸和无机阴离子 为明确聚山梨酯 80 (II) 中可能含有的有机酸及无机盐类型，参考相关文献，建立了离子色谱法测定聚山梨酯 80 (II) 中 9 种有机酸及无机盐含量^[12-13]，典型色谱图见图 2。结果见表 1，40 批次样品中主要检出甲酸根，B 企业样品甲酸根离子含量最低，D 企业样品甲酸根含量最高。推测样品中甲酸根离子可能为工艺中添加作为中和碱催化剂，各企业工艺控制水平不同，样品甲酸根残留量有差异。

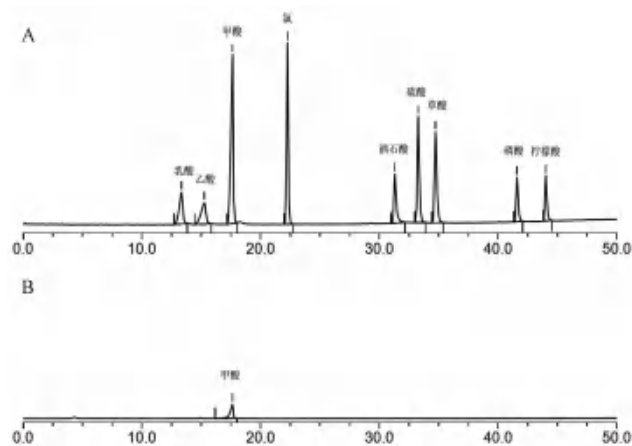


图 2 聚山梨酯对照品 (A) 及样品 (B) 离子色谱典型图

Fig 2 Typical ion chromatogram of reference substance (A) and sample (B) of polysorbate 80

2.2.5 元素杂质 参照《ICH Q3D (R2): 元素杂质指导原则》^[14]，对风险评价的第 1 类元素砷、镉、

汞、铅，第 2A 类元素钴、镍、钒和其他元素钠、钾、镁等 10 种金属元素杂质进行考察。参考相关文献，建立了 ICP-MS 法测定砷等 10 种元素杂质^[15-16]，结果见表 1，国内 B、C、D 企业样品钠残留较高，A 企业样品钾残留较高，国外 E 企业样品镁残留较高，其他元素均远低于限度要求。

2.2.6 邻苯二甲酸酯类塑化剂 国内本品包装均以注射用卤化丁基橡胶塞为内塞，该类材料添加了塑化剂成分，存在塑化剂迁移风险。本研究参照中华人民共和国国家标准 GB 31604.30—2016^[17]，建立了 GC-MS 法测定聚山梨酯 80 (II) 中 17 种邻苯二甲酸酯类成分的含量。结果国内 4 家企业 37 批次样品中均不同程度检出塑化剂成分，主要为邻苯二甲酸二异丁酯 (DIBP)、邻苯二甲酸二正丁酯 (DBP)、邻苯二甲酸二 (2-乙基) 己酯 (DEHP)、邻苯二甲酸二壬酯 (DNP)，其中 34 批 DBP 含量超过 GB9685—2016 限度 ($\leq 0.000\ 03\%$)，国外 E 企业样品未检测出塑化剂成分。

2.2.7 影响因素试验 选各生产企业 1 批样品，参照 ChP2020 四部通则 9001 进行影响因素试验，分别置高温 50℃、高湿 (75±1)% 及强光 (4500±500) lx 下 30 d，于第 0、5、10、30 日取样，以性状、酸碱度 (pH)、甲酸根离子、环氧乙烷和二氧六环、过氧化物、甲醛和乙醛、乙二醇、二甘醇和三甘醇作为评价指标，采用现行质量标准方法和探索性研究中建立的方法进行测定。结果表明，在高温、高湿和强光条件下，部分指标与第 0 日比较发生明显改变，pH 值呈下降趋势，过氧化物、甲酸根、乙二醇、二甘醇、三甘醇、甲醛、乙醛含量呈上升趋势，部分样品检出二氧六环。

3 讨论

3.1 工艺控制

对“2.1”项下的酸碱度 (pH 值)、“2.2”项下的过氧化物、甲醛和乙醛及酸根甲酸根离子含量的相关性进行 SPSS 分析。结果显示酸碱度 (pH 值) 与过氧化物、甲醛含量成显著负相关 ($P < 0.05$)，甲酸根离子与过氧化物含量成显著正相关 ($P < 0.05$)。对“2.2.7”项下甲酸根离子含量与酸碱度 (pH 值) 的相关性进行 SPSS 分析。结果高温和加速样品甲酸根离子含量随放置天数的增加而明显升高，与酸碱度 (pH 值) 显著负相关 ($P < 0.05$)。由此推断，甲酸根离子来源有工艺添加和自身降解两种途径，工艺添加形成甲酸盐，对 pH 值的相关性产生干扰，而降解产生的甲酸与 pH 值存在显著相关性。

1 批 D 企业样品过氧化值不符合规定，3 批

C 企业样品甲醛含量大于拟定限度, 推测原因可能为生产过程及贮藏条件控制不当, 导致本品氧化降解产生甲醛、乙醛及过氧化物等。

3.2 物料添加

B、C、D 企业样品钠含量较高, 根据 B 企业提供的生产工艺可知合成过程中使用了氢氧化钠作为催化剂。A 企业样品钾含量较高, 该企业提供的生产工艺与 B 企业不同, 推测其工艺中可能使用了氢氧化钾作为催化剂。外企 E 样品镁含量较高, 也可能与工艺中使用的催化剂相关。

聚山梨酯 80、聚山梨酯 80 (II) 合成起始原料均为山梨醇、油酸与环氧乙烷, 其中聚山梨酯 80 要求含油酸应不低于 58.0%, 聚山梨酯 80 (II) 要求含油酸应不低于 98.0%。1 批 A 企业样品脂肪酸组成不符合规定 (油酸含量 96.0%), 建议生产企业应重视物料等质量管理。

3.3 包装材料

从邻苯二甲酸酯类塑化剂的筛查结果来看, 国内企业样品中均检出了邻苯二甲酸酯类塑化剂, 其中 34 批次样品 DBP (限度 $\leq 0.00003\%$) 含量已经严重超过了标准中关于这种成分在食品中迁移量的规定, 该类物质具有生殖、发育毒性, 甚至致癌性, 且该类物质可能与某些原料药发生相容性问题。建议生产企业应关注包装材料。

3.4 质量状况的评价

B 企业样品市场占有率高, 抽检及自筹的样品占 75%, 按现行质量标准检验及拟订质量标准检验均合格。国产 A、C、D 企业样品市场占有率低, 均存在不合格项目, 提示相关企业需加大研发投入, 提高产品质量, 确保符合国家和行业的质量标准, 逐步缩小与进口产品的价格差距, 为制药企业提供更多选择。

3.5 现行质量标准的评价

从 40 批次样品检验结果分析, 本品现行质量标准基本可行, 能起到质量控制作用, 但仍需进一步完善, 建议增订红外鉴别、甲醛和乙醛检查项, 并将贮藏修订为“遮光, 密封, 在阴凉干燥处保存”。按拟订质量标准检验, 本次抽检不合格率为 12.5%。从研究结果来看温度对本品稳定性影响较大, 应关注生产工艺过程及贮藏时对温度的控制, 胶塞可引起塑化剂迁移, 应关注本品内包装材料, 同时优化工艺, 减少元素杂质的残留。

参考文献

- [1] 张祎, 李月, 段金莲, 等. 分子筛技术精制聚山梨酯 80 对其增溶能力影响的初步研究 [J]. 时珍国医国药, 2020, 31 (8): 1849-1851.
- [2] 伊宸辰, 沙瑞霖, 陈沁颖, 等. 药用辅料聚山梨酯 80 的质量研究 [J]. 中国药科大学学报, 2020, 51 (2): 168-174.
- [3] 中国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 809-810.
- [4] 黄婧, 吴宏伟. 依诺沙星滴眼液辅料及药包材相容性研究 [J]. 中国现代应用药学, 2021, 38 (22): 2802-2806.
- [5] 王珏, 江颖, 孙春萌, 等. 蛋白药物中聚山梨酯的降解及潜在风险研究进展 [J]. 药物分析杂志, 2022, 42 (9): 1483-1492.
- [6] 毕继辉, 祁辉玉, 鲁邦俊, 等. 聚醚多元醇中过氧化物测定方法对比研究 [J]. 聚氨酯工业, 2023, 38 (3): 47-50.
- [7] 徐青艳, 陆超, 赵玲, 等. HPLC 法测定塞来昔布原料药中塞来昔布甲基过氧化物杂质 [J]. 山东化工, 2023, 52 (5): 167-169.
- [8] 蔡如琳, 胡伟, 胡冬芳, 等. 不同相对分子质量聚乙二醇的热氧降解行为 [J]. 高分子材料科学与工程, 2017, 33 (3): 107-110, 115.
- [9] 郑金凤, 谢莹莹, 张悦, 等. 药用辅料聚乙二醇 6000 质量评价及质量研究 [J]. 中南药学, 2023, 21 (8): 2185-2190.
- [10] 顾晓风, 杨袁, 郝刚, 等. 柱前衍生高效液相色谱法测定尼莫地平注射液中的甲醛和乙醛 [J]. 化学分析计量, 2022, 31 (1): 41-44.
- [11] 张敏, 丁洪流, 代菲. 柱前衍生-高效液相色谱法测定牙膏中甲醛的方法研究 [J]. 中国标准化, 2019 (24): 233-234.
- [12] 何成, 张颖, 熊中强, 等. 离子色谱法同时测定化学抛光液中的 4 种有机酸 [J]. 电镀与涂饰, 2021, 40 (17): 1384-1387.
- [13] 袁力, 梅芊, 刘英. 离子色谱法测定硫酸阿米卡星注射剂中抗氧化剂和硫酸盐的含量 [J]. 中南药学, 2021, 19 (8): 1643-1647.
- [14] Guideline ICH. Guideline for elemental impurities Q3D (R2) [S]. 2022.
- [15] 朱俐, 赵瑜, 肖超强, 等. 电感耦合等离子质谱法测定盐酸头孢卡品酯颗粒中 9 种元素杂质的含量 [J]. 理化检验 (化学分册), 2022, 58 (5): 512-516.
- [16] 朱俐, 赵瑜, 尹利辉, 等. 电感耦合等离子体原子发射光谱法和电感耦合等离子质谱法检测元素杂质的研究进展 [J]. 理化检验 (化学分册), 2022, 58 (3): 361-372.
- [17] 国家卫生和计划生育委员会. GB9685—2016. 食品安全国家标准食品接触材料及制品用添加剂使用标准 [S]. 2016.

(收稿日期: 2025-01-02; 修回日期: 2025-01-20)

HPLC 法测定蝉蜕不同煎煮时间下 4 种成分含量变化

陈美汝¹, 孙锋^{2*}, 高松², 郭彩霞², 王瑞娜² (1.河南中医药大学, 郑州 450003; 2.仲景宛西制药股份有限公司, 郑州 450000)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法测定蝉蜕水煎液中 4 种成分的含量, 探究不同煎煮时间下蝉蜕水煎液中 4 种成分的含量变化。**方法** 采用 CORTECS UPLC T3 (2.1 mm×150 mm, 1.6 μm) 色谱柱, 以乙腈 (A)-0.1% 磷酸水溶液 (B) 为流动相进行梯度洗脱, 流速 0.3 mL·min⁻¹, 检测波长 280 nm, 柱温 35℃, 进样量 2 μL。**结果** 4 种化学成分在各自范围内峰面积与浓度呈良好的线性关系 ($R^2 \geq 0.9998$), 平均加样回收率在 96.42%~104.01%; 精密度、稳定性、重复性、中间精密度试验的 RSD 均小于 5%, 且具有良好的耐用性。随着煎煮时间的延长, 原儿茶酸、原儿茶醛、乙酰多巴胺的含量增加; 乙酰多巴胺二聚体的含量呈现出先增后降的趋势。**结论** 建立的方法稳定可靠, 不同煎煮时间下蝉蜕 4 种成分含量发生变化, 可为蝉蜕的临床应用及含蝉蜕经典名方复方制剂研究提供参考。

关键词: 蝉蜕; 煎煮时间; 乙酰多巴胺; 乙酰多巴胺二聚体; 原儿茶酸; 原儿茶醛

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)05-1408-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.035

HPLC determination of content changes of the 4 components in cicada slough at different decoction time

CHEN Mei-ru¹, SUN Feng^{2*}, GAO Song², GUO Cai-xia², WANG Rui-na² (1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003; 2. Zhongjing Wanxi Pharmaceutical Co., Ltd., Zhengzhou 450000)

Abstract: Objective To determine the content of 4 components in cicada slough decoction by high performance liquid chromatography, and their content changes of the contents in cicada slough decoction at different decoction time. **Methods** An CORTECS UPLC T3 (2.1 mm×150 mm, 1.6 μm) column was used with gradient elution. The acetonitrile (A)-0.1% phosphoric acid in water (B) was used as the mobile phase, with a flow rate of 0.3 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 280 nm, the column temperature was 35℃, and the injection volume was 2 μL. **Results** There was a good linearity between the peak area and concentration of the 4 components in their respective ranges ($R^2 \geq 0.9998$), with the average recovery at 96.42%~104.01%. The RSDs of precision, stability, repeatability, and intermediate precision were all less than 5%. With the extension of decoction time, the content of protocatechuic acid, protocatechualdehyde and acetyldopamine increased. The content of acetyldopamine dimer increased first and then decreased with the increase of decoction time. **Conclusion** The method is stable and reliable, and the content of the 4 components in cicada slough changes with different decoction time, which can provide a reference for the clinical application of cicada slough compound preparations.

Key words: cicada slough; decoction time; acetyldopamine; acetyldopamine dimer; protocatechuic acid; protocatechinaldehyde

蝉蜕为蝉科昆虫黑蚱 (*Cryptotym pana pustulata* Fabricius) 的若虫羽化时脱落的皮壳, 性寒, 味甘, 归肺、肝经, 具有疏散风热、利咽、透疹、明目退翳、解痉等功效^[1]。现代研究表明, 蝉蜕

基金项目: 道地宛药全产业链关键技术研发及应用 (No.221100310400)。

作者简介: 陈美汝, 女, 硕士, 主要从事中药分析与质量评价研究, email: yu1586105@163.com * **通信作者:** 孙锋, 男, 硕士研究生导师, 主要从事中药分析与质量评价研究, email: gs858@163.com

的活性成分主要有乙酰多巴胺聚体和酚类、甲壳质、氨基酸等^[2],具有抗惊厥、解热镇痛、止咳平喘、抗炎、抗氧化等作用。蝉蜕常用于风热感冒,咽痛,音哑,麻疹不透,风疹瘙痒,目赤翳障,惊风抽搐,破伤风等的治疗。

蝉蜕在古代多用于温热病、儿科、眼科、皮肤科等一切风热之证,在诸多方剂中多有应用,如宋代《博济方》的“蝉蜕散”,《太平惠民和剂局方》的“蝉花散”“乌犀圆”“反魂丹”“大通真圆”,明代《普济方》的“蝉朱散”“蝉砂丸”等。2020 年版《中国药典》记载含蝉蜕的成方制剂更是多达 31 首,如儿科用药小儿至宝丸、眼科用药拨云退翳丸、皮肤科用药金蝉止痒胶囊、喉科用药金果饮等^[3]。历版《中国药典》及临床应用中蝉蜕均为水煎入药^[4],而中药的作用机制复杂,可能是多成分协同作用发挥药效,在煎煮过程中会发生复杂的化学反应,显著影响中药的安全性、有效性及质量可控性^[5-6],因此阐明蝉蜕煎煮过程的质量变化尤为重要。目前对蝉蜕的研究主要集中在真伪鉴别、临床应用和作用机制等方面,对于蝉蜕的质量标准尚有欠缺,2020 年版《中国药典》只对其性状进行了规定,缺乏其他定量指标。因此本试验采用高效液相色谱法,建立同时测定蝉蜕中 4 种主要活性成分原儿茶酸、原儿茶醛、乙酰多巴胺、乙酰多巴胺二聚体含量的方法,并测定不同煎煮时间蝉蜕水煎液中 4 种成分的含量变化,以为蝉蜕质量评价及临床应用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Acquity-H-Class 超高效液相色谱仪(美国沃特世公司);MS105 电子天平(上海梅特勒·托利多有限公司,十万分之一);BT457A10 电子天平(深圳市博途电子科技有限公司,精度:0.01 g);DZKW-4 电热恒温水浴锅(北京市光明医疗仪器有限公司);KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

乙腈(色谱纯,默克股份两合公司);磷酸(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);水为实验室自制超纯水。乙酰多巴胺对照品(批号:M17HT1850573,上海源叶生物科技有限公司,纯度 $\geq 97\%$),乙酰多巴胺二聚体对照品(批号:RS231129,成都普恩生物科技股份有限公司,纯度 $\geq 98\%$),原儿茶酸对照品(批号:110809-202207,纯度:97.5%),原儿茶醛对照品(批号:110810-202210,纯度:99.9%)(中国食品药品检定研究院);蝉蜕饮片 8 批,经河南中医药大学陈随清教授鉴定为蝉科昆虫黑蚱(*Cryptotym pana*

pustulata Fabricius)的若虫羽化时脱落的皮壳,均符合 2020 年版《中国药典》要求,信息见表 1。

表 1 蝉蜕样品信息

Tab 1 Sample information of cicada slough

产地	批号	编号
河南西峡	20230901	XX1
河南西峡	20230902	XX2
山东平邑	20230801	PY1
山东平邑	20230802	PY2
山西晋城	20240601	JC1
山西晋城	20240602	JC2
河南开封	20240401	KF1
河南开封	20240402	KF2

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 CORTECS UPLC T3 (2.1 mm $\times$ 150 mm, 1.6 μ m);流动相为乙腈(A)-0.1% 磷酸溶液(B);洗脱梯度(0~5 min, 6%A; 5~25 min, 6%~25%A; 25~26 min, 25%~6%A; 26~32 min, 6%A);检测波长 280 nm;柱温 30 $^{\circ}$ C;流速 0.3 mL $\cdot$ min⁻¹;进样量 2 μ L。

2.2 溶液制备

2.2.1 不同煎煮时间蝉蜕水煎液供试品溶液

称取 45 g 蝉蜕饮片于砂锅中,加 20 倍水浸泡 30 min,武火加热至沸腾,文火保持微沸,煎煮 0~180 min,每隔 20 min 取样 2 mL 用 0.22 μ m 微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别称取各对照品适量,精密称定,加 50% 甲醇制成每 1 mL 含原儿茶酸 10.6 μ g、原儿茶醛 10.0 μ g、乙酰多巴胺 61.2 μ g 和乙酰多巴胺二聚体 56.6 μ g 的混合对照品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性考察 精密吸取“2.2”项下供试品溶液、混合对照品溶液、空白溶剂(水),按“2.1”项下色谱条件进样测定,结果见图 1。各成分分离度良好,空白溶液无干扰,表明方法专属性良好。

2.3.2 线性关系考察 分别取各对照品适量,精密称定,加 50% 甲醇制成每 1 mL 含原儿茶酸 105.7 μ g、原儿茶醛 100.5 μ g、乙酰多巴胺 414.4 μ g 和乙酰多巴胺二聚体 296.5 μ g 的混合对照品储备液。精密吸取混合对照品储备液,分别稀释成浓度为混合对照品储备液 1%、2%、5%、10%、20%、50%、100% 的原儿茶酸、原儿茶醛、乙酰多巴胺、乙酰多巴胺二聚体对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析。以指标成分峰面积(Y)对对照品溶液浓度(X)作标准曲线,得回归方程,结果见表 2。

2.3.3 精密度试验 取“2.2.2”项下混合对照品溶液,重复进样 6 针,记录峰面积,计算得原儿茶酸、原儿茶醛、乙酰多巴胺、乙酰多巴胺二聚体

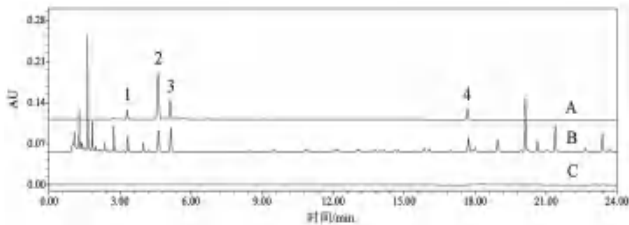


图 1 混合对照品 (A)、蝉蜕水煎液 (B) 及空白溶剂 (水)(C) HPLC 图谱

Fig 1 HPLC profile of mixed control (A), cicada slough decoction (B) and blank solvent (purified water)(C)

1. 原儿茶酸 (protocatechuic acid); 2. 乙酰多巴胺 (protocatechin-dehyde); 3. 原儿茶醛 (acetyldopamine); 4. 乙酰多巴胺二聚体 (acetyldopamine dimer)

表 2 线性关系考察结果

Tab 2 Linear relationship

成分	回归方程	R ² 值	线性范围 / (μg · mL ⁻¹)
原儿茶酸	$Y = 1.0345 \times 10^4 X + 4.2468 \times 10^3$	0.9998	1.057 ~ 105.7
原儿茶醛	$Y = 2.8836 \times 10^4 X + 5.2644 \times 10^3$	1.000	1.005 ~ 100.5
乙酰多巴胺	$Y = 5.6137 \times 10^3 X - 1.2104 \times 10^2$	1.000	4.144 ~ 414.4
乙酰多巴胺二聚体	$Y = 6.3241 \times 10^3 X - 2.2546 \times 10^3$	1.000	2.965 ~ 296.5

酸、原儿茶醛、乙酰多巴胺、乙酰多巴胺二聚体的含量的 *RSD* 分别为 1.3%、1.8%、2.9%、1.2%，表明方法重复性良好。

2.3.6 加样回收试验 按照“2.2.1”项下方法制备一份供试品溶液，精密移取 9 份，每份 10 mL，置 20 mL 量瓶中，分别精密加入供试品溶液中对成分 50%、100%、150% 量的对照品溶液各 3 份，加水定容至刻度，进样测定，计算加样回收率。结果显示，原儿茶酸、原儿茶醛、乙酰多巴胺、乙酰多巴胺二聚体对照品加入量为 50%、100%、150% 的回收率分别为 101.63%、97.16%、98.78%，96.93%、98.51%、100.35%，96.78%、99.83%、98.54%，104.01%、102.35%、96.42%，*RSD* 值均小于 4%，表明该方法回收率良好。

2.4 蝉蜕水煎液 4 种成分含量测定

取蝉蜕饮片适量，按照“2.2.1”项下方法，平行制备 3 份，进样测定，记录峰面积，按外标法计算 8 批样品煎煮过程蝉蜕水煎液 4 种成分含量，结果见图 2。

3 讨论

3.1 耐用性考察

试验前期考察了不同流速 (0.25、0.30、0.35 mL · min⁻¹)，不同柱温 (32、35、38 °C)，不同浓度磷酸 (0.09%、0.10%、0.11%) 及不同色谱柱情况下的耐用性，结果 4 种成分含量的 *RSD* 值均小于 2%，说明该方法耐用性较好。

3.2 检测成分的选择

研究发现蝉蜕水煎液具有止咳、降低血液黏稠度、降低三酰甘油及总胆固醇水平、改善妊娠

峰面积的 *RSD* 值分别为 1.2%、1.4%、1.8%、2.0%，表明仪器精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 取编号为 XX1 的蝉蜕饮片适量，采用“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，于 0、2、4、8、12、16、20 h 分别进样，记录峰面积，计算得原儿茶酸、原儿茶醛、乙酰多巴胺、乙酰多巴胺二聚体 4 种成分的含量的 *RSD* 分别 4.5%、3.6%、1.8%、1.7%。结果表明蝉蜕水煎液供试品溶液在 20 h 内稳定性良好。

2.3.5 重复性试验 取编号为 XX1 的蝉蜕饮片适量，按照“2.2.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，进样测定，记录峰面积，计算得原儿茶

晚期大鼠子宫运动节律、上调子宫组织 PGE2 及 COX-2 表达水平等作用^[7-10]。其中蝉蜕水煎液含有的乙酰多巴胺单体、二聚体具有较强的抗炎和抗氧化等生物活性^[11-12]，可能是蝉蜕抗惊厥、平喘、抗炎、抗变态反应和改善血液流变学等药理作用的主要活性成分^[13]，研究还发现乙酰多巴胺单体具有免疫调节、抗肿瘤、改善睡眠等作用^[14-16]。原儿茶酸和原儿茶醛除了具有抗炎、抗氧化、抗菌等作用外^[17-18]，原儿茶醛还有抗动脉粥样硬化、抗血栓形成、保护心肌细胞等功效^[19]，原儿茶酸还具有抗衰老等药理活性^[20]。故检测以上 4 种成分，综合评价煎煮时间对蝉蜕药效的影响。

3.3 煎煮时间考察

蝉蜕应用广泛，在很多传统方剂中都有应用，然而大部分方剂只笼统记载采用水煎服，并未阐明具体的煎煮时间。2020 年版《中国药典》中蝉蜕相关的成方制剂的煎煮时间各不相同，煎煮时间最长的 3 h，最短的仅 0.5 h。清代名医徐灵胎曾说：“煎药之法，最宜深讲，药之效不效，全在乎此。……方虽中病，而煎法失度，药必无效”^[6]。煎煮时间对于中药质量、疗效有着重要的影响。若煎煮时间不够，中药的有效成分不能完全溶出；若煎煮时间过长，药液中的有效成分易受热分解或挥发，因此选择合适的煎煮时间对于蝉蜕的临床应用有重要的意义。本研究结果显示，随着煎煮时间的延长，原儿茶酸、原儿茶醛的含量逐渐增加，原因可能为这两种成分水溶性较好，随着煎煮时间延长不断溶出；乙酰多巴胺的含量逐渐增加，在 120 min 时趋向平稳，含量不再明显增加；乙酰多巴胺

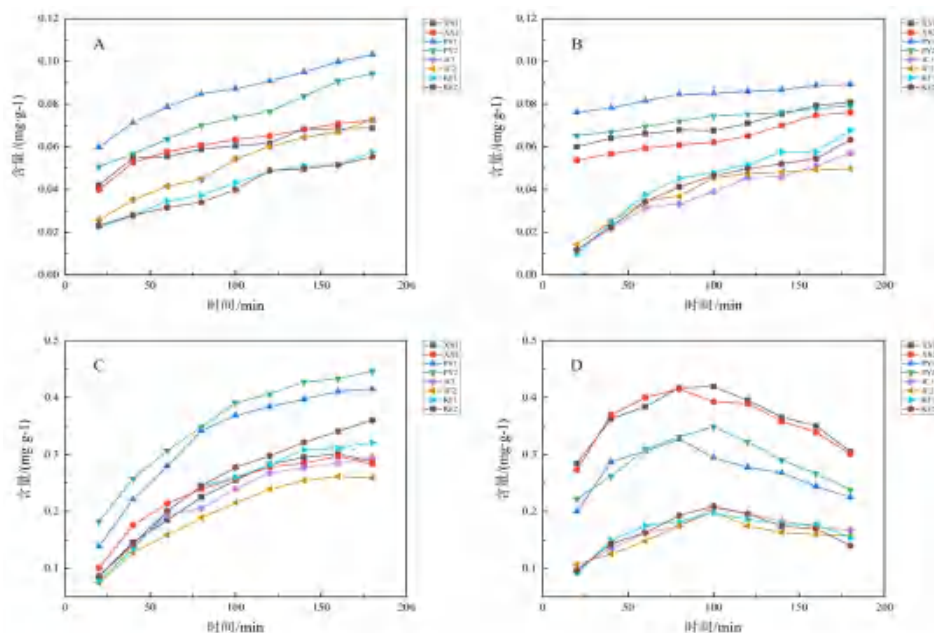


图 2 煎煮过程蝉蜕中 4 种成分含量的变化

Fig 2 Changes in the content of the 4 components of cicada slough during the decoction process

A. 原儿茶酸 (protocatechuic acid); B. 原儿茶醛 (acetyldopamine); C. 乙酰多巴胺 (protocatechindehyde); D. 乙酰多巴胺二聚体 (acetyldopamine dimer)

二聚体的含量随煎煮时间的增加显示出先增后降的趋势, 拐点在 80 ~ 100 min 附近, 在 180 min 时含量与煎煮 20 min 时基本持平。在煎煮过程中, 原儿茶酸、原儿茶醛虽然含量一直增加, 但增加幅度不大。因此从蝉蜕 4 种有效成分含量出发考虑蝉蜕最佳的煎煮时间应为 80 ~ 100 min。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 385-386.
- [2] 李洁, 邵蒙苏, 王盈蕴, 等. 蝉蜕的临床应用及其用量探究[J]. 长春中医药大学学报, 2021, 37 (3): 508-511.
- [3] 冯林敏, 杨树谊, 潘激扬, 等. 经典方中蝉蜕的本草考证[J/OL]. 中国实验方剂学杂志, doi: 10.13422/j. cnki. syfjx. 20250269.
- [4] 李涛. 蝉蜕质量标准提升研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2018.
- [5] 赖长江生, 陈泽炎, 邱子栋, 等. 中药煎煮的化学反应机制研究现状[J]. 中国中药杂志, 2023, 48 (4): 890-899.
- [6] 龙小妹, 张艳娇, 黄宽, 等. HPLC 法测定不同煎煮时间疏调气机汤中芍药苷和淫羊藿苷的含量[J]. 云南中医中药杂志, 2022, 43 (4): 60-64.
- [7] 江泓, 杨煊, 陈胡兰, 等. 蝉蜕止咳祛痰平喘有效部位筛选[J]. 中国现代中药, 2017, 19 (1): 56-59.
- [8] 刘善庭, 李建美, 王立赞, 等. 蝉蜕对大鼠血液流变学影响的试验研究[J]. 中医学报, 2004, 30 (3): 56-58, 84.
- [9] 安磊. 蝉蜕的抗惊厥作用[J]. 中国医药导报, 2008, 5 (15): 35-36.
- [10] 王锋, 徐静, 童婷婷, 等. 蝉蜕水煎剂对妊娠晚期大鼠子宫运动节律及 PGE₂、COX-2 水平的影响[J]. 中医药信息, 2021, 38 (11): 27-32.

- [11] Xu MZ, Lee WS, Han JM, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *N*-acetyldopamine dimers from *Periostracum Cicadae* [J]. Bioorg Med Chem, 2006, 14 (23): 7826-7834.
- [12] Oxenkrug GF, Requentina PJ. *N*-acetyldopamine inhibits rat brain lipid peroxidation induced by lipopolysaccharide [J]. Ann N Y Acad Sci, 2005, 1053 (1): 394-399.
- [13] 曹馨慈, 徐金娣, 孔铭, 等. 蝉蜕 HPLC 定量分析方法的建立和质量评价研究[J]. 中草药, 2020, 51 (7): 1909-1913.
- [14] Thapa P, Gu Y, Kil Y, et al. *N*-acetyldopamine derivatives from periostracum cicadae and their regulatory activities on Th1 and Th17 cell differentiation [J]. Bioorg Chem, 2020, 102 (9): 104095.
- [15] Perianayagam MC, Oxenkrug GF, Jaber BL. Immune-modulating effects of melatonin, *N*-acetylserotonin, and *N*-acetyldopamine [J]. Ann N Y Acad Sci, 2005, 1053 (1): 386-393.
- [16] Wang D, Wu T, Jin J, et al. Periostracum cicadae extract and *N*-acetyldopamine regulate the sleep-related neurotransmitters in PCPA-Induced insomnia rats [J]. Molecules, 2024, 29 (15): 3638-3638.
- [17] 李佳. 原儿茶酸改善高脂诱导肝脏炎症及作用机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2021.
- [18] 李田洋, 杨婷婷, 张琪, 等. 高效液相色谱法同时测定骨炎消方中 8 种有效成分的含量[J]. 中南药学, 2021, 19 (8): 1666-1669.
- [19] 杨世瑜, 肖雨, 安春娜, 等. 原儿茶醛的神经保护作用机制研究进展[J]. 中草药, 2024, 55 (7): 2463-2471.
- [20] 胡燕珍, 黄斌, 张媛媛, 等. HPLC-DAD 双波长法同时测定乌蕨中原儿茶酸、原儿茶醛、牡荆苷的含量[J]. 现代中药研究与实践, 2021, 35 (4): 51-55.

(收稿日期: 2024-11-01; 修回日期: 2025-01-02)

蒙药材牛心的 PCR 鉴别及质量标准提升

马玲¹, 唐辉^{1*}, 刘乐乐¹, 朝鲁², 张虹², 齐嘉旭¹, 夏宗昊¹ (1. 石河子大学药学院/新疆植物药资源利用教育部重点实验室, 新疆 石河子 832000; 2. 博尔塔拉蒙古自治州蒙医医院药剂科, 新疆 博乐 833400)

摘要: **目的** 提升蒙药材牛心的质量标准。**方法** 对 10 个产地 21 批牛心药材采用性状、薄层色谱 (TLC)、聚合酶链式反应 (PCR) 进行定性鉴别, 采用凯氏定氮法测定蛋白质含量, 采用《中国药典》2020 年版四部通则方法检测其水分、总灰分、酸不溶灰分、浸出物含量。**结果** TLC 中亮氨酸、缬氨酸、谷氨酸、赖氨酸 4 种氨基酸成分的斑点清晰; 基于牛科动物牛的细胞色素 C 氧化酶亚基 I (COI) 序列的鉴别位点, 设计出特异性引物, 可通过 PCR 扩增获得 125 bp 的牛心特异片段, 混淆品及阴性对照无条带; 根据结果拟订蛋白质含量不得低于 25 g/100 g; 水分不得超过 16.0%; 浸出物含量测定不得低于 18%, 以上测定结果均以干燥品牛心样品进行实验。**结论** 该方法简便准确, 完善了牛心药材的质量检测方法, 为药材的质量控制及地方标准的修改提供了科学依据。

关键词: 动物类药材; 牛心; 蛋白质; 聚合酶链式反应; 质量标准

中图分类号: R291.2, R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)05-1412-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.036

PCR identification of Mongolian medicine bovine hearts and its quality standard improvement

MA Ling¹, TANG Hui^{1*}, LIU Le-le¹, CHAO Lu², ZHANG Hong², QI Jia-xu¹, XIA Zong-hao¹ (1. School of Pharmacy, Shihezi University/Key Laboratory of Ministry of Education for the Utilisation of Xinjiang Botanical Drug Resources, Shihezi Xinjiang 832000; 2. Department of Pharmacy, Mongolian Hospital of Bortala Mongolian Autonomous Prefecture, Bole Xinjiang 833400)

Abstract: **Objective** To improve the quality standard of Mongolian medicine bovine heart. **Methods** Twenty-one batches of bovine heart medicinal materials from 10 origins were qualitatively identified by traits, thin layer chromatography (TLC) and polymerase chain reaction, the protein content was determined by Kjeldahl method, while moisture content, total ash, acid-insoluble ash, and leachable substances were analyzed according to the general chapters of the *Chinese Pharmacopoeia* (2020 Edition, Volume IV). **Results** In TLC, the spots of the four amino acids: leucine, valine, glutamic acid, and lysine were clearly distinguishable. Based on the diagnostic sites of the cytochrome oxidase subunit I (COI) sequence of the cattle, specific primers were designed to amplify a 125 bp fragment specific to the bovine heart tissue. No amplification bands were observed in the control samples or other non-bovine heart samples. Based on the results, the protein content should not be lower than 25 g/100 g; the moisture content should not exceed 16.0%; and the extractable substance content should not be lower than 18%. All the above measurements were conducted on dried bovine heart samples. **Conclusion** The method is simple and accurate, which improves the quality detection of bovine hearts, and provides a scientific basis for the quality control of medicinal materials and modification of local standards.

Key words: animal medicinal material; bovine heart; protein; polymerase chain reaction; quality standard

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.82160739)。

作者简介: 马玲, 女, 硕士, 主要从事药物制备及质量控制, email: 1739620364@qq.com * **通信作者:** 唐辉, 女, 教授, 主要从事民族药质量标准研究, email: tanghuishz@qq.com

牛心, 来源于牛科动物牛 (*Bos taurus domesticus* Gmelin) 的干燥心脏, 是蒙医药中清心“赫依”和补心的关键原药材^[1-4]。在蒙医治疗心悸、心刺痛等症的方剂中, 常用干燥的牛心粉末入药^[5-7]。然而, 目前牛心在药品检测中尚无完善的检测方法, 现有方法仅涉及牛心的性状鉴别、检查项和浸出物, 而对其原药材含量测定及真伪鉴别尚无明确标准^[8]。

动物类药材在蒙医临床用药中应用广泛, 但由于动物类内脏药材形态相似, 市场上混伪现象严重^[9-10]。分子生物学技术已成为当前生物鉴定的必备工具, 能够快速准确地鉴别物种, 不受药材本身性状完整与否的影响, 从而客观有效地鉴别药材的真伪^[11-12]。聚合酶链式反应 (PCR) 技术已广泛应用于多种动植物中药材的物种鉴别, 如真龙虱^[13]、九香虫^[14]、土鳖虫^[15]、煅牡蛎^[16]、鹿鞭^[17]、金龟子^[18]、茯苓^[19]、紫草^[20]等, 均通过特定基因序列设计特异性引物来快速鉴别药材及其伪品。细胞色素 C 氧化酶亚基 I (cytochrome oxidase subunit I, *COI*) 序列是动物源性药材鉴别的核心条形码。本研究基于牛科动物牛的 *COI* 序列, 设计出基于扩增小片段基因的引物对, 在同一 PCR 反应体系中能够快速、有效地鉴别牛心及其可能的混淆品 (如猪心、羊心、兔心等)。

牛心中富含蛋白质, 本研究采用凯氏定氮法对其蛋白质含量进行测定, 旨在为牛心药材的标准化和品质提供保障, 进而推动蒙医药的健康发展。

1 材料

1.1 仪器

TM3730XL 型 Applied Biosystems 测序仪 (Thermo Fisher); 孵育箱 (Thermo Mixerc); 超微量核酸蛋白测定仪 Q5000 (Quawell Technology Inc.); YOKO-ZS 型薄层色谱成像仪 (武汉药科新技术开发有限公司); JY-SPCT 型电泳槽、PS300-B 型电泳仪 (北京君意东方电泳设备有限公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); KDM 型电热套 (山东鄄城永兴仪器厂); DZKW-0-2 型电热恒温水浴锅、SX-5-12-T 型箱式电阻炉、FW-80 型高速万能粉碎机、202-ES 型电热恒温干燥箱 (北京市永光明医疗仪器厂)。

1.2 试药

亮氨酸 (批号: 140687-202206, 纯度: 99.9%)、缬氨酸 (批号: 140681-202204, 纯度: 99.8%)、谷氨酸 (批号: 140690-202305, 纯度: 99.9%) (中国食品药品检定研究所); 赖氨酸 (批号: 329C023, 纯度 $\geq 99.8\%$, 北京索莱宝科技有限公司); 硫酸铜、硫酸钾、甲基红、溴甲酚绿、硼酸、硫酸铵、氢氧

化钠、冰乙酸、正丁醇 (分析纯, 上海麦克林生化科技股份有限公司); 硫酸、盐酸 (天津市富裕化工); 2×EasyPure Food and Fodder Security Genomic DNA 提取试剂盒、2×EasyTaq PCR SuperMix 试剂盒、GelRed 核酸凝胶染色剂、TransDNA Marker II 100 ~ 1500 (北京全式金生物技术有限公司)。

21 批牛心药材来源见表 1。均经石河子大学药学院楚生辉教授鉴定为牛品种的干燥心脏, 符合要求。

表 1 21 批牛心药材来源信息

Tab 1 Source information for 21 batches of bovine heart samples

样品	批号	产地	样品	批号	产地
S1	YL20230401	内蒙通辽	S12	YL20220904	西藏
S2	YL20230402	青海西宁	S13	YL20220905	西藏
S3	YL20230403	甘肃兰州	S14	YL20220906	西藏
S4	YL20230404	新疆博州	S15	YL20220907	西藏
S5	YL20230405	安徽亳州	S16	YL20220908	西藏
S6	YL20230406	山东枣庄	S17	YL20220909	西藏
S7	YL20230407	云南大理	S18	YL20220910	西藏
S8	YL20230408	吉林白城	S19	YL20220911	西藏
S9	YL20220901	西藏	S20	YL20220912	西藏
S10	YL20220902	西藏	S21	XJ20220829	新疆
S11	YL20220903	西藏			

2 方法与结果

2.1 性状鉴别

本品完整者呈心形, 大小不等, 长 10 ~ 15 cm, 宽 6 ~ 10 cm, 外表棕褐色至紫红褐色, 表面皱缩不平, 有空腔。体重质坚, 断面棕褐色。多纵切成四片, 呈椭圆形或圆锥形或切成条状。气腥, 味甘 (见图 1)。

2.2 薄层鉴别

称取 1 g 牛心样品研细后, 准确称取 0.5 g。加入 5 mL 70% 乙醇溶液, 超声处理 15 min, 过滤后取续滤液作为供试品溶液。另取亮氨酸、缬氨酸、谷氨酸及赖氨酸对照品适量, 加水制成每 1 mL 各含 0.1 mg 的混合对照品溶液, 作为对照溶液。参考薄层色谱法 (《中国药典》2020 年版四部通则 0502)^[21] 试验, 吸取上述溶液各 1.5 μ L, 以正丁醇: 冰乙酸: 水 (4 : 2 : 1) 为展开剂, 进行展开, 晾干后喷洒 0.2% 茚三酮溶液, 并在 105 $^{\circ}$ C 下加热至斑点显色清晰, 置于日光下观察。结果显示, 21 批供试品在亮氨酸、缬氨酸、谷氨酸、赖氨酸对照品色谱相应位置上显现相同颜色的斑点 (见图 2)。

2.3 特异性 PCR 鉴别

2.3.1 模板 DNA 提取 样品需进行紫外杀菌处理并充分研磨粉碎, 按照 2×EasyPure Food and Fodder Security Genomic DNA Kit 提取试剂盒提取样品总



图 1 牛心样品性状

Fig 1 Characteristics of bovine heart

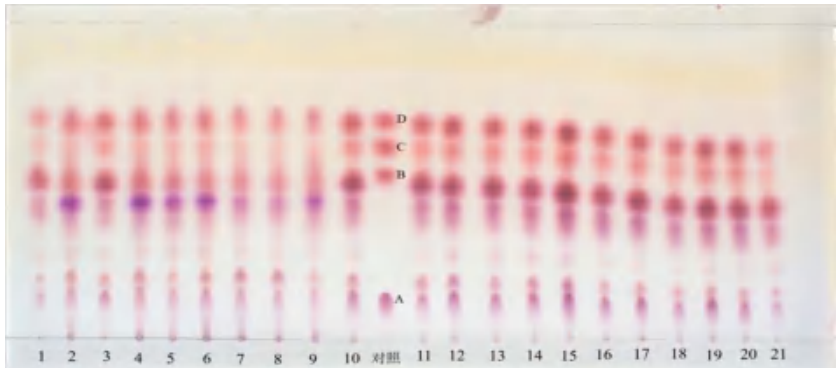


图 2 牛心薄层色谱图

Fig 2 TLC of bovine heart samples

注 (Note): 1 ~ 21 为牛心样品 (1 ~ 21 are bovine heart samples); 对照. 对照品 (control); A. 赖氨酸 (lysine); B. 谷氨酸 (glutamic acid); C. 亮氨酸 (leucine); D. 缬氨酸 (valine)。

退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。扩增完成后, 由上海生工生物工程股份有限公司进行 DNA 双向测序。所得序列在 GenBank 进行同源序列搜索分析 (见图 3)。

2.3.3 特异性引物设计 测序成功的牛心 *COI* 基因序列, 利用 NCBI Primer-BLAST 在线软件设计特异性引物 (见表 2), 并由上海生工生物工程股份有限公司合成。

2.3.4 特异性引物的筛选 采用“2.3.1”项下方法提取牛心、牦牛心、兔心、羊心及猪心的模板 DNA, 按“2.3.2”项下 PCR 反应体系进行目的基因扩增。扩增产物使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。电泳结束后在凝胶成像仪下观察并拍照记录结果。结果见图 4。

结果显示, 设计的引物 1 具有最佳的特异性扩展结果, 条带明亮且单一, 能够有效地区分牛心与牦牛心、兔心、羊心、猪心。相比之下, 引物 2 和引物 3 无法区分牛心和牦牛心。因此, 最终确定引物 1 作为牛心的特异性引物。

2.3.5 特异性 PCR 鉴别方法的准确性验证 采用

DNA。使用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和完整性, 并用微量紫外分光光度计定量检测 DNA 的浓度, 然后将 DNA 样本存放于 -20 °C 备用。

2.3.2 PCR 扩增及测序 采用 2×EasyTaq PCR SuperMix 试剂盒进行扩增。*COI* 基因扩增的通用引物及序列^[22-23]: 正向引物 LCO1490 为 5'-GGTCAA-CAAATCATAAAGATATTGG-3', 反向引物 HCO2198 为 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'。PCR 反应体系 (总体积 25 μL): DNA 模板 2 μL, 特异性引物 (50 ng · μL⁻¹) 前引物和后引物各 0.5 μL, 2×PCR Mix 12.5 μL, 无菌双蒸水 9.5 μL。反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 54 °C

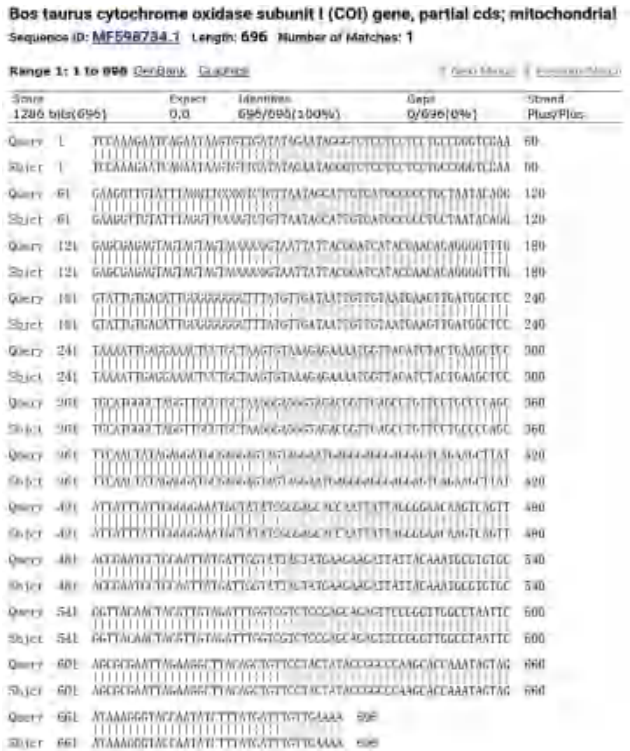


图 3 目的基因测序与 BLAST 比对结果

Fig 3 Sequencing results of target gene and BLAST alignment of target gene

表 2 设计的牛心 *COI* 特异性引物序列
Tab 2 Designed *COI*-specific primer sequences for bovine heart

引物序列号	Primer 名称	引物大小 /bp	序列
引物 1	N-1F	125	5'-TTAAACTTTCCAGGTGACCAAAAA-3'
	N-1R		5'-AGCCGGCATCACAATGCTAT-3'
引物 2	N-2F	215	5'-TTAAACTTTCCAGGTGACCAAAAA-3'
	N-2R		5'-CCCCGCAATGTCACAATACC-3'
引物 3	N-3F	134	5'-TTTAAACTTTCCAGGTGACCAAAAA-3'
	N-3R		5'-TGTATTAGCAGCCGGCATCA-3'

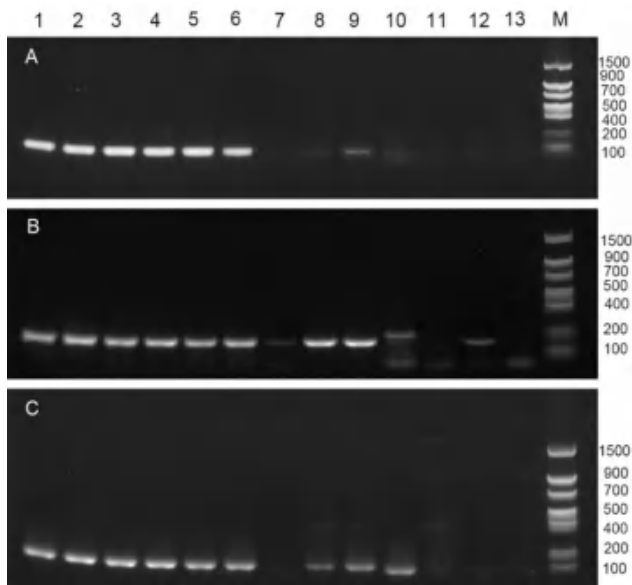


图 4 特异性引物凝胶电泳图

Fig 4 Gel electrophoresis image of specific primer

注 (Note): A. 引物 1 (primer 1); B. 引物 2 (primer 2); C. 引物 3 (primer 3); 1~7 分别为牛心 S1~S7 (1~7 are bovine hearts S1~S7); 8~12 分别为牦牛心 1、牦牛心 2、兔心、羊心、猪心 (浓度均为 $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) [8~12 are yak hearts 1, yak heart 2, rabbit heart, sheep heart, and pig heart (all with a concentration of $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)]; 13. 空白 (blank); M. Trans DNA Maker II 100~1500 (Trans DNA Maker II 100~1500)。

特异性引物 1 对 21 份不同产地的牛心原药材及其混伪品进行特异性 PCR 扩增, 结果见图 5, 以检验上述结果的准确性 (重复 3 次结果一致)。结果表明, 21 批牛心样品在 125 bp 处均扩增出特异性条带, 准确性达到 100%, 其混伪品以及空白在相同的位置均无条带出现, 由此可见, 特异性引物 1 可以作为鉴别牛心及其混伪品的特异性引物。

2.4 蛋白质含量测定

依据《中国药典》2020 年版四部氮测定法 (通则 0704) 中第三法定氮仪法, 使用凯氏定氮仪对牛心样品进行蛋白质含量测定^[21, 24-25]。

2.4.1 测定方法

① 样品的处理: 将干燥的牛心样品粉碎, 过 80 目筛。

② 消化: 精密称取 0.4 g 牛心样品, 置于消化管中, 加入硫酸钾 0.8 g、硫酸 7 mL、硫酸铜溶液 14 滴, 使用石墨消解仪按以下程序消解: 150°C 保持 5 min, 350°C 保持 5 min, 然后升温至 400°C 并保持至消化管内溶液呈澄清透明的绿色, 再保持 400°C 消化 10 min。消化完成后, 冷却并用全自动凯氏定氮仪测定。同时设置 3 组空白样品参与消化、蒸馏和滴定。

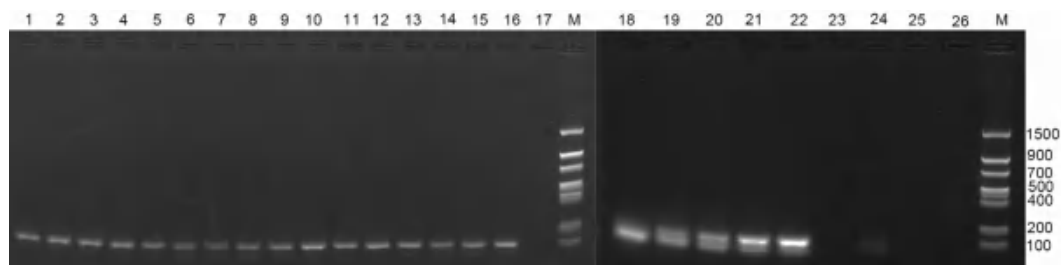


图 5 特异性引物 1 凝胶电泳图

Fig 5 Gel electrophoresis image of specific primer 1

注 (Note): 1~16、18~22 分别为牛心 S1~S21, 17、26 为空白, 23 为兔心, 24 为羊心, 25 为猪心, M 为 Trans DNA Maker II 100~1500 (1~16, 18~22 are bovine hearts S1~S21, 17 and 26 are blanks, 23 is rabbit heart, 24 is sheep heart, 25 is pig heart, M is Trans DNA maker II 100~1500)。

③ 蒸馏: 将消化管冷却后, 连接纯水、40% 氢氧化钠溶液和 2% 硼酸吸收液 (滴加 3 滴混合指示剂) 至蒸馏仪。设置参数为 12 mL 纯水、30

mL 氢氧化钠溶液和 30 mL 硼酸吸收液。运行前, 进行 2~3 次洗涤程序。首先蒸馏空白组, 并记录滴定结果。蒸馏后, 启动洗涤程序清洗系统,

然后进行下一组蒸馏。

2.4.2 线性关系考察 精密称取本品粉末 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 g，按照“2.4.1”项下方法测定。以样品量为横坐标 (X)，消耗滴定体积为纵坐标 (Y) 进行回归，得线性方程 $Y = 73.964X - 3.4597$ ($r = 0.9992$)，说明牛心样品在 0.1 ~ 0.7 g 与消耗滴定体积呈良好的线性关系。由于本实验控制滴定体积在 25 mL 以下，故确定取样量为 0.4 g。

2.4.3 重复性考察 精密称取牛心样品 0.4 g (S12)，平行 6 份，按照“2.4.1”项下方法进行测定。根据滴定酸溶液的体积计算蛋白质含量。结果样品中蛋白质含量的 RSD 为 0.84% ($n = 6$)，表明本方法重现性良好。

2.4.4 消解回收率考察 精密称取牛心样品 0.2 g (S12，蛋白质含量为 29.4 g/100 g)，平行 9 份，分别加入氯化铵标准物质 0.02、0.05、0.1 g (每个加样量平行 3 组)，置于消化管中，按“2.4.1”项下方法测定，计算蛋白质含量回收率。结果氯化铵 3 个水平的平均加样回收率均在 99.3% ~ 101.2%， RSD 均在 0.12% ~ 0.90% ($n = 3$)，表明本方法准确度良好。

2.4.5 蒸馏回收率考察 精密称取牛心样品 0.2 g (S12)，平行 6 份，按“2.4.1”项下方法处理样品，得到消化液。向消化液中加入氯化铵溶液 0.1 g，继续蒸馏操作并测定。计算蛋白质含量回收率为 99.6% ~ 100.1%， RSD 为 0.29% ($n = 3$)，表明本方法准确度良好。

2.4.6 稳定性考察 精密称取牛心样品 7 份 (S12，蛋白质含量为 29.4 g/100 g)，按“2.4.1”项下方法处理样品，蒸馏后放置 0、4、8、12、16、20、24 h 后测定蛋白质含量，其 RSD 为 1.7%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.7 牛心蛋白质含量结果 按照“2.4.1”项下方法对 21 批牛心药材进行蛋白质含量测定，结果见表 3。各批样品蛋白质含量介于 28.6 ~ 34.4 g/100 g，平均值为 30.8 g/100 g。以平均值下浮约 20%，暂定药材蛋白质含量不得低于 25 g/100 g。

2.5 检查

根据《中国药典》2020 年版四部通则 0832 第二法、通则 2302、通则 2201 热浸法对 21 批牛心药材进行水分、灰分、酸不溶灰分及水溶性浸出物测定^[21]，结果见表 4。

根据测定结果，按平均值上浮约 20% 的标准，暂定药材水分含量的上限为 16.0%，总灰分含量的上限为 7.0%，各批样品的酸不溶性灰分平

表 3 21 批牛心样品的蛋白质含量 ($n = 3$)

Tab 3 Content of protein in 21 batches bovine heart ($n = 3$)			
编号	蛋白质 (g/100 g)	编号	蛋白质 (g/100 g)
S1	29.9	S12	30.2
S2	33.1	S13	29.4
S3	34.4	S14	29.4
S4	33.5	S15	29.7
S5	31.5	S16	29.2
S6	33.9	S17	29.4
S7	33.6	S18	29.7
S8	31.5	S19	28.6
S9	31.5	S20	29.4
S10	30.1	S21	28.8
S11	29.8		

表 4 牛心样品水分、总灰分含量、酸不溶性灰分含量和浸出物含量测定结果 ($n = 3$, %)

Tab 4 Content of moisture, ash, acid-insoluble ash, and leachable substances in bovine heart ($n = 3$, %)				
编号	水分	总灰分	酸不溶灰分	浸出物含量
S1	13.35	3.29	0.12	18.27
S2	11.17	3.25	0.05	19.00
S3	9.80	3.56	0.15	18.13
S4	11.95	3.06	0.02	18.97
S5	14.39	3.58	0.02	25.38
S6	9.82	3.39	0.02	22.81
S7	10.18	2.90	0.07	15.15
S8	11.88	3.44	0.07	16.91
S9	15.20	6.19	0.02	26.62
S10	13.02	7.11	0.01	30.26
S11	16.14	6.83	0.08	26.47
S12	14.15	8.62	0.03	24.76
S13	14.16	7.02	0.00	27.41
S14	14.42	6.61	0.06	25.82
S15	15.37	6.52	0.01	24.71
S16	12.21	7.32	0.01	26.53
S17	15.76	6.23	0.02	27.92
S18	13.06	7.71	0.04	24.41
S19	14.84	4.09	0.09	26.92
S20	13.35	6.06	0.06	27.60
S21	11.17	7.61	0.04	14.74
平均值	13.11	5.45	0.05	23.28

均值为 0.05%。鉴于酸不溶性灰分含量较低，决定不将其纳入标准考察范围。基于浸出物含量平均值下浮约 20% 的标准，暂定药材水溶性浸出物含量的下限为 18.0%。

3 讨论

3.1 特异性 PCR 鉴别

本实验通过考察最佳退火温度 (49、52、54、56、58 ℃)、引物的量 (0.2、0.5、1 μL)、模板

DNA 的量 (0.5、1、2、5、10 μL), 最终确定最佳退火温度 54 $^{\circ}\text{C}$, 前、后引物量各 0.5 μL , 模板 DNA 量 2 μL 为最佳 PCR 扩增体系。

3.2 蛋白质含量测定的考察

在采用凯氏定氮法测定蛋白质含量时, 为确定药材消解是否完全, 考察硫酸用量 (4、7、10 mL), 消解时间 (50、70、90 min), 氢氧化钠用量 (25、30、35 mL) 对牛心蛋白质含量的影响, 最终确定加入硫酸 7 mL 时消化成澄清透明的绿色; 当消解时长为 70 min 时已完全消解; 当氢氧化钠用量为 30 mL 时消化液为黑褐色, 说明消化液被完全分解释放出氨。

4 结论

本研究聚焦于蒙药材牛心的质量标准提升, 针对当前牛心质量标准水平较低且市场上存在混伪现象的问题, 引入了 TLC 鉴别、PCR 鉴别以及蛋白质含量测定等新方法。TLC 鉴别结果确定 4 种氨基酸成分, 斑点清晰且分离度良好, 为牛心的初步鉴别提供了依据; 本研究通过牛的 *COI* 序列, 设计出牛心的特异性引物, 建立了一种牛心的 PCR 鉴别方法, 能够快速区分牛心及其混伪品, 鉴别结果与测序结果一致, 说明该方法准确可信; 暂定牛心药材蛋白质含量不得低于 25 g/100 g。此外, 对 21 批牛心药材的重金属含量进行检测, 结果显示其均低于药典标准要求, 故未将其纳入质量标准。本研究的全面质量控制方法为蒙药材牛心的质量标准提升和完善提供了科学依据, 具有重要的指导意义。

参考文献

- [1] 内蒙古自治区食品药品监督管理局.《内蒙古蒙药材炮制规范》(2017 年增补版) [S]. 呼和浩特: 内蒙古科学技术出版社, 2017: 43.
- [2] 内蒙古自治区药品监督管理局.《内蒙古蒙药饮片炮制规范》(2020 年版) [S]. 呼和浩特: 内蒙古科学技术出版社, 2020: 74.
- [3] 占布拉道尔吉. 无误蒙药鉴 [M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 1998: 524.
- [4] 卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准: 蒙药分册 [S]. 呼和浩特: 内蒙古科学技术出版社, 1998: 94.
- [5] 李文妍, 王玉华, 刘小雷, 等. 动物心脏在蒙药八味沉香散中对组方药效学作用的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33 (4): 1331-1336.
- [6] 陈路遥. 蒙药安神补心六味丸组方理论研究及临床应用回顾性分析 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.
- [7] Anand SK, Governale TA, Zhang XY, et al. Amino acid metabolism and atherosclerotic cardiovascular disease [J]. Am J Pathol, 2024, 194 (4): 510-524.
- [8] 李甫泉, 党小菊, 冯国庆, 等. 蒙药材牛心的炮制与质量标准研究 [J]. 中国民族医药杂志, 2017, 23 (7): 55-56.
- [9] 程樱, 费毅琴, 肖凌. 动物类中药材质量评价研究概况及分析 [J]. 中国药事, 2017, 31 (4): 381-388.
- [10] 崔馨元, 王艳双, 李盈诺, 等. 貂心质量标准的研究 [J]. 中成药, 2019, 41 (12): 2858-2862.
- [11] 张茂强, 丁孝坤, 魏加印. 完善动物药质量标准中性状项的思路与方法 [J]. 中国药房, 1999, 10 (1): 46.
- [12] 徐嘉璠, 韩子璇, 陶晓倩, 等. 蒙药材质量标准及质量控制方法的研究进展 [J]. 中南药学, 2024, 22 (2): 279-285.
- [13] 蔡庆群, 谢纯珠, 冯时茵, 等. 中国真龙虱药材及其混伪品的分子鉴定研究 [J]. 中药材, 2023, 46 (12): 2964-2968.
- [14] 高开铭, 向玉林, 李莎, 等. 九香虫药材及其混伪品的 PCR 鉴别 [J]. 中药材, 2022, 45 (7): 1571-1576.
- [15] 刘闪闪, 谭斯尹, 宋叶, 等. 土鳖虫 (地鳖) 配方颗粒的特异性 PCR 鉴别研究 [J]. 药物分析杂志, 2024, 44 (11): 1951-1957.
- [16] 肖智扬, 胡力, 白云俊, 等. 煅牡蛎 (长牡蛎) 及其加工产品分子鉴定方法研究 [J]. 中国中药杂志, 2024, 49 (23): 6264-6271.
- [17] 徐岩, 段思琪, 翟英南, 等. 基于 Cyt b 基因的 PCR 技术对牛鞭药材的鉴定方法研究 [J]. 中国药房, 2019, 30 (24): 3408-3412.
- [18] 孙娜, 郭晓华, 刘广纯. 金龟子部分种类 *COI* 基因序列比较分析 [J]. 沈阳农业大学学报, 2009, 40 (6): 688-692.
- [19] 兰春阳, 李翔, 李佩瑶, 等. 中药材茯苓 PCR 鉴定与特征 [J]. 药物分析杂志, 2023, 43 (3): 414-421.
- [20] 刘杰, 谷海媛, 戴胜云, 等. 基于巢式 PCR 的紫草鉴别引物筛选 [J]. 药物分析杂志, 2024, 44 (5): 756-765.
- [21] 中国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 59, 61, 114, 232, 234-236, 480-483.
- [22] 张欢欢, 徐金娣, 周静, 等. 基于 *COI* 条形码的市售蝉蜕及其混淆品 DNA 分子鉴定研究 [J]. 中草药, 2024, 55 (6): 2057-2065.
- [23] Girish PS, Anjaneyulu AS, Viswas KN, et al. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of mitochondrial 12S rRNA gene: a simple method for identification of poultry meat species [J]. Vet Res Commun, 2007, 31 (4): 447-455.
- [24] Mæhre HK, Dalheim L, Edvinsen GK, et al. Protein determination-method matters [J]. Foods, 2018, 7 (1): 5.
- [25] 杜蒙, 孙允超, 李雯雯, 等. 凯氏定氮法测定花生中蛋白质方法的优化 [J]. 食品安全导刊, 2023 (18): 125-127, 131.

(收稿日期: 2024-11-11; 修回日期: 2025-02-08)

局部给药制剂的非临床评价专题

鼻腔给药制剂非临床安全性评价的一般考虑及挑战

江芝^{1,2}, 刘学武^{2,3}, 姚芙⁴, 王佩², 袁湘中², 张妙红², 王小青², 姜德建², 夏新华^{1*} (1. 湖南中医药大学药学院, 长沙 410208; 2. 湖南普瑞玛药物研究中心有限公司&新药药效与安全性评价湖南省重点实验室, 长沙 410329; 3. 中山大学中山医学院药理教研室, 广州 510080; 4. 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

摘要: 鼻腔给药具有给药方便、吸收迅速和生物利用度高等特点, 适合于胃肠道不稳定或难吸收、给药剂量小、活性较强的化合物的药物开发。鼻腔给药制剂常通过添加吸收促进剂来增加活性成分的吸收及生物利用度, 因此其安全性风险主要来自活性成分和辅料。对鼻腔给药的毒理学研究需结合动物的鼻腔结构和制剂的特性进行综合分析, 需同时考虑制剂完整性、给药方式和给药剂量、鼻腔结构的种属差异等因素, 此外鼻腔给药制剂的毒性反应关注点和安全范围的计算也与其他给药途径存在一定差异。因此, 鼻腔给药制剂虽然是一类具有明显临床特色和优势的特殊制剂, 但其非临床安全性评价具有一定难度。本文对鼻腔给药时的考虑点进行了文献调研和经验总结, 旨在促进鼻腔给药的非临床安全性评价的标准化和规范化。

关键词: 鼻腔; 喷雾; 安全性评价; 法规

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)05-1418-12

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.037

Challenges for non-clinical safety evaluation of nasal drug delivery preparations

JIANG Zhi^{1,2}, LIU Xue-wu^{2,3}, YAO Fu⁴, WANG Pei², YUAN Xiang-zhong², ZHANG Miao-hong², WANG Xiao-qing², JIANG De-jian², XIA Xin-hua^{1*} (1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208; 2. Hunan Prima Drug Research Center Co., Ltd. & Hunan Key Laboratory of Pharmacodynamics and Safety Evaluation of New Drugs, Changsha 410329; 3. Department of Pharmacology, School of Medicine, Sun Yat-Sen University, Zhongshan Guangzhou 510080; 4. School of Pharmaceutics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016)

Abstract: Nasal drug delivery has easy administration, rapid absorption and high bioavailability, suitable for compounds with unstable or difficult absorption in the gastrointestinal tract, small dose or strong activity. Nasal drug delivery formulations frequently utilize absorption enhancers to improve the absorption and bioavailability of active ingredients, so their safety risks come from both the active pharmaceutical ingredients (APIs) and excipients. Toxicological evaluation of nasal drug delivery systems demands an integrated approach combining species-specific nasal anatomical features with formulation properties. Critical considerations also include formulation stability, administration technique, dose calibration, and interspecies variability in nasal physiology. Notably, the toxicological profiling and determination of therapeutic indices for nasal formulations exhibit distinct difference compared with those of alternative delivery routes. Therefore, while nasal drug delivery preparations represent a specialized dosage form with distinct clinical advantages, their nonclinical safety evaluation presents unique challenges. This paper reviewed empirical evidence regarding critical

基金项目: 长沙市“小荷”青年人才创新项目 (No.[2022]056); 湖南省重点研发计划 (No.2023DK2006); 湖南省自然科学基金项目 (No.2024JJ8140)。

作者简介: 江芝, 女, 硕士研究生, 助理研究员, 主要从事中药新制剂的工艺和质量标准研究, email: jiangzhi@hnsc.org *通信作者: 夏新华, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药新制剂、新剂型、新技术及制剂质量标准的研究, email: xiaxinhua001@163.com

parameters evaluation in nasal administration to promote standardization in nonclinical safety assessments.

Key words: nasal cavity; spray; safety evaluation; regulation

鼻腔给药是药物经鼻腔吸收来发挥局部和全身作用的一种特殊给药途径,其特殊性主要源自药物制剂特性和鼻腔解剖结构,其中制剂特性包括以多样的制剂手段改善鼻腔递送和吸收^[1],解剖结构的特殊性则与鼻腔组织的解剖位置和解剖结构的较大种属差异有关^[2]。鼻腔向下连通呼吸道(咽喉、气管、支气管-肺脏),作为接触外界病原微生物的第一屏障^[2],在呼吸系统感染的早期防治方面的地位越来越被重视,同时鼻腔向上连通中枢神经系统,通过鼻腔吸收的药物能绕过血脑屏障直接入脑^[3],通常能发挥更强的中枢神经系统药理作用,因此鼻腔给药越来越多地作为中枢神经系统疾病治疗药物的重要给药方式,其中包括中枢镇痛和镇静催眠、止吐、抗抑郁/焦虑、抗癫痫等^[4]。正是因为鼻腔这种上下连通的解剖学特征,鼻腔给药制剂开发时,呼吸系统和中枢神经系统会因其拟开发的适应证不同,而相应转变为药效作用靶部位或安全性高风险部位。此外,鼻腔还通过咽鼓管连接中耳,通过鼻咽管连接口腔,通过泪管连接眼睛,这些连接途径也为外源性异物(病原体、药物等)提供了到达眼、口腔、中耳和脑部的机会,这导致在进行鼻腔药物的毒理学评价时,需同时考虑鼻腔异常带来的间接反应。同时不同种属动物和人之间的鼻腔生理结构差异等因素则为鼻腔给药的非临床安

全性评价以及进一步的临床外推带来了较大的挑战^[2, 5]。本文对鼻腔解剖结构特点、鼻腔给药非临床安全性评价的给药剂量和检测指标的设置,以及研究结果的评价等方面进行重点和特殊考虑点的分析和阐述,为鼻制剂的开发及评价提供参考。

1 鼻腔的解剖结构特点

人的鼻腔分为鼻前庭、呼吸区和嗅区,鼻前庭是空气流通的第一道屏障,被鳞状和角化的皮脂腺上皮所覆盖,药物难以渗透,通常不作为药物吸收部位。鼻腔壁上覆盖有黏膜,增加了鼻腔的有效吸收面积,其中呼吸区是鼻腔药物吸收的主要部位,嗅区位于鼻腔的顶部,分布着无纤毛的嗅神经上皮细胞,穿过颅底筛板进入颅内^[6],一些药物经鼻腔给药后可通过嗅区绕过血脑屏障进入脑脊液,从而进入中枢神经系统。不同动物的鼻腔生理解剖参数(如鼻腔表面积、上皮细胞类型和数量、代谢酶种类和分布等)均与人存在一定差异(见图1),这些差异也是导致动物对鼻毒物(例如苯并吡^[7]、次氯酸^[5]等)反应性差异的主要原因,了解这些差异对鼻腔药物非临床安全性评价中的实验设计(如动物种属选择、剂量设计、指标设置等)、毒性结果的预测以及鼻腔毒性反应与人临床相关性的外推等均具有重要作用^[8-9]。



图1 人、猴、犬、兔和大鼠的鼻腔示意图

Fig 1 Schematic representation of the nasal cavity of humans, monkeys, dogs, rabbits, and rats

注:颜色代表鼻气道表面上皮类型在鼻内的分布;粉红色、黄色、蓝色和红色分别代表鳞状上皮、移行上皮、呼吸上皮和嗅上皮;it. 下鼻甲;mt. 中鼻甲;st. 上鼻甲;NT. 鼻鼻甲;MT. 上颌鼻甲;ET. 筛鼻甲。

Note: Color represents the distribution of nasal airway surface epithelial types in the nose. Pink, yellow, blue, and red represent squamous, transitional, respiratory, and olfactory epithelium, respectively. it for inferior turbinate; mt for middle turbinate; st for superior turbinate; NT for nasal turbinate; MT for maxillary turbinate; ET for ethmoidal turbinate.

鼻腔表面积、鼻腔体积均直接影响鼻腔给药量,鼻腔纤毛运动速度和纤毛清除效率则通过影响药物在鼻腔中的停留时间而间接影响药物的吸收量^[10]。研究者们通过模型重塑技术^[11]、计算机断层扫描^[7]、声波成像^[12]等方法对不同动物

种属的鼻腔表面积、体积进行了测量,并被用于毒理实验给药剂量的设置和计算。同种属不同年龄和体重的实验动物的鼻腔表面积存在一定的变化,不同种属动物的呼吸区和嗅区占鼻腔面积的百分比也有较大差别,这些面积百分比差别主

要与鼻腔功能差异有关，人和猴的鼻腔主要用于呼吸^[13-15]。犬、兔、大小鼠的鼻腔除了呼吸以外，还需通过嗅觉来维持基本生存（如觅食、防御天敌等），因此具有更复杂的鼻甲结构和更大的嗅觉区域^[2]。鼻甲的结构（包括数量、形状等，如图 1 和表 1 所示）则进一步影响了鼻腔气流模式和特征，是决定鼻腔内颗粒沉积的重要因素之一，并进一步导致鼻部病变部位的种属差异^[16-17]。其他解剖结构差异还包括鼻腔上皮组成

（包括细胞种类和形态、生理生化、分布和敏感性差异）^[5]、扁桃体种类和分布（啮齿类对应为鼻相关淋巴组织）^[5]、鼻腔代谢酶的种类和分布^[18]等，这些差异均在不同程度上影响了鼻腔的毒性反应敏感性，因此了解不同动物的鼻腔解剖结构和生理特点对毒性反应（如嗅上皮炎症、坏死和增生/化生，杯状细胞增生等）的预测和研究结果的临床外推具有重要作用。不同种属动物鼻腔生理参数见表 1。

表 1 不同种属动物鼻腔生理参数比较
Tab 1 Nasal physiological parameters of different animal species

动物种属	体重/kg	鼻甲名称	扁桃体组织	鼻腔表面 积/cm ²	呼吸区 占比/%	嗅区占 比/%	鼻腔体 积/cm ³	鼻腔长 度/cm	给药体积
小鼠 ^[1, 5, 14, 16]	0.02	NT、MT、ET	鼻相关淋巴组织	2.9	46	45 ~ 50	0.033	4.9	5 ~ 10 μL/（只·侧）
大鼠 ^[1, 13, 15]	0.12	NT、MT、ET	鼻相关淋巴组织	8.0	44	52	0.155	9.1	2 ~ 50 μL/（只·侧）
大鼠 ^[1, 5, 13, 16]	0.25	—	—	10.4	47	50	0.4	2.3	10 ~ 50 μL/（只侧）
兔 ^[19-21]	2.5	NT、MT、ET	腭扁桃体	60	42	31	5.85	6.6	100 ~ 300 μL/（只·侧）
犬 ^[22-24]	10	NT、MT、ET	舌扁桃体、鼻咽和腭扁桃体	221	35	30 ~ 70	20	10	100 ~ 200 μL/（只·侧）
猴 ^[22, 25]	2.5	MT、ET	鼻咽扁桃体、双侧咽鼓管扁桃体和腭扁桃体以及双侧舌扁桃体	22	75	5	—	—	12 ~ 30 μL/（kg·侧）
猴 ^[23]	7	—	—	61.6	—	—	8	5.3	50 ~ 200 μL/（只·侧）
人 ^[26-28]	60	MT [*] 、2×ET [▲]	鼻咽扁桃体、双侧咽淋巴带、双侧咽鼓管扁桃体和腭扁桃体以及双侧舌扁桃体	160	84	3	6 ~ 10	5 ~ 8	不大于 0.5 mL/（只·侧）
人 ^[26-28]	70	—	—	181	—	—	16 ~ 19	7 ~ 8	不大于 0.5 mL/（只·侧）

注：NT. 鼻鼻甲；MT. 上颌鼻甲；ET. 筛鼻甲；^{*}. 下鼻甲；[▲]. 中鼻甲和前鼻甲；“—”. 无此信息。
Notes: NT for nasal turbinate; MT for maxillary turbinate; ET for ethmoidal turbinate; ^{*} corresponds to inferior turbinate; [▲] middle turbinate and anterior turbinate; “—” no such information.

2 鼻腔给药非临床安全性评价的影响因素

2.1 受试物

受试物的制备应以临床为核心，始终确保非临床研究所用样品能代表临床药物，确保非临床研究结果能支持临床研究和应用，如受试物的制剂处方组成、给药装置、给药技术及给药方式应与临床一致。

① 制剂处方：鼻腔给药受限于鼻腔黏膜清除功能、酶降解功能以及受试物理化性质[如水溶性活性药物成分（API）、大分子多肽或蛋白质等]，通常会采用多种技术手段来增加活性成分的吸收^[29]，如通过破坏黏膜屏障或延长作用时间来增加吸收，或通过抑制代谢酶活性来减少药物降解等。因此，非临床研究应采用临床试验或上市产品一致的处方进行研究，以真实地反映受试物的制剂特征，并最大程度地增加非临床研究结果到临床外推的可行性。例如舒马曲坦鼻喷剂（偏头痛）^[30]通过新增辅料十二烷基-β-D-麦芽糖苷（DDM）来缩短达峰时间（ t_{max} ），促进吸收（ t_{max} 缩短为原研制剂的 1/5），后续的大鼠和犬重复给药毒性试验均采用与药代动力学研究一致的处方进行给药。

② 给药装置：鼻腔给药制剂属于药械合一的特殊制剂，器械的功能（压缩力、喷雾速度、摩擦力和羽流角等）对实际给药剂量、药物的沉积部位等具有较大的影响（尤其是鼻喷剂）^[31]。药物在鼻甲部位的沉积量随着羽流角的减小而增加^[32]，羽流角越小，药物更容易穿越鼻中庭而较少沉积于鼻腔前部。为了能反映临床试验拟用样品和/或上市样品的质量和安全性，在非临床研究的给药方式应最大程度地接近成品制剂的给药形式（如是否带装置给药）。研究显示，芬太尼鼻喷剂（用于癌痛）利用果胶的特性促进芬太尼的吸收，产品形成的雾化颗粒接触鼻黏膜中的钙离子后，形成凝胶黏附于鼻黏膜来延长药物在鼻腔的停留时间^[33]，在重复给药毒性实验采用 Beagle 犬进行研究时，除了所用受试物配方与临床研究一致，还采用与上市制剂相同的鼻喷装置（0.1 mL/喷）进行给药，以最大程度地模拟临床给药情境，使所获得的研究结果具有临床适用性^[33]。但能否采用鼻喷装置进行给药主要与实验动物的鼻腔体积大小有关，通常实验兔、猪、犬、猴等大型动物能采用装置进行给药，如环索奈德鼻喷剂^[26]、芬太尼鼻喷剂^[33]、胃复安鼻喷剂^[34]、甲

磺酸麦角胺鼻喷剂^[35]、胰高血糖素鼻粉剂^[36]等在进行大鼠重复给药毒性实验时,其给药方式均为鼻内滴注给药,但在采用非啮齿类动物(兔、犬、猴)作为实验动物进行重复给药毒性实验时,均采用带装置的制剂进行给药。

③ 给药方式和给药技术:鼻腔给药方式包括鼻腔喷雾、滴鼻、鼻腔涂抹、雾化吸入、鼻腔灌注等,其中鼻喷剂、吸入制剂等给药方式的疗效/毒副作用与给药技术密切相关^[37]。鼻腔给药的递送效率由药物在鼻腔的沉积量及在鼻黏膜中的吸收效率决定,在很大程度上受到鼻腔生理、药物理化性质、制剂特性和喷雾装置及给药技术等因素的影响^[38],因此非临床研究时,应该模拟临床拟定的给药方式进行给药,减少因给药方式及给药技术差异带来的与临床不相关的药物暴露特征及相应的毒性反应差异。例如鼻腔喷雾制剂产生的雾滴粒径与按压触发力的大小、喷雾距离密切相关,而粒径大小直接影响雾滴颗粒在鼻腔的沉积部位和沉积量^[31]。赵荣军等^[39]的研究显示,喷雾距离和触发力对雾滴粒径均有较大影响,且触发力对雾滴粒径及分布的影响更大。给药时患者的体位同样影响气溶胶的沉积部位,Bacon等^[40]比较了酮咯酸胺丁三醇鼻喷剂以直立和半仰卧方式给药后的组织分布差异,其中半仰卧方式下给药的鼻腔、鼻咽部、食道和胃内的药物沉积量分别为71.3%、2.1%、19.2%,直立方式下给药的鼻腔、鼻咽部、食道和胃内的药物沉积量分别为87.8%、0.4%、7.4%,提示两种给药方式下的沉积特性差异巨大。此外,对于鼻脑递送的药物,传统鼻腔喷雾剂进行给药时,液体大部分只能到达鼻腔腹侧,主要沉积于下鼻腔的前表面,较少有药物沉积于嗅球部位^[8],故需对鼻腔给药方式进行特别考虑,以确保药物能准确递送至动物的嗅区,来获得更客观的中枢暴露。

2.2 实验动物

实验动物的鼻腔解剖结构和生理特征与人差别较大,其中以实验猴的鼻腔结构和组织细胞类型与人更为接近^[5],但非临床研究采用实验猴作为动物种属的品种仍然较少,多数鼻腔药物仍以大鼠、Beagle犬作为实验对象,其主要原因可能与经济因素和动物依从性有关。减毒流感鼻喷疫苗(Fluenz)采用雪貂进行重复给药毒性试验^[41]则主要考虑桥接药效学模型的给药剂量,此外雪貂感染流感病毒后的临床症状与人更为相似,因此能更敏感地反映受试物引起的不良反应。通常鼻腔递送技术作为二次创新的给药途径,用于克服已上市制剂的临床缺陷(如副作用过大、生物利用度过低、起效时间长,患者依从性差等),

因此鼻腔给药制剂通常以改良型新药进行注册申请,对于鼻制剂的改良型新药,参照美国食品药品监督管理局(FDA)发布的《改变剂型和改变给药途径药品非临床安全性评价指导原则》^[42],通常进行两个种属动物(至少一种非啮齿类)的短期研究(2~4周给药)。对于需要长期使用的新剂型制剂,通常采用最合适的动物进行至少6个月的重复给药毒性实验。小型动物鼻腔体积受限,因此鼻喷剂非临床安全性评价对大型动物的依赖程度高于其他给药制剂,通常在最长周期的重复给药毒性实验中,以大型动物(诸如兔、犬、猴)作为最合适的动物种属进行鼻腔给药和毒性考察^[26, 33, 36, 42]。此外,虽然非人灵长类动物的鼻腔与人最接近^[5],但毒理学研究是一个系统性和整体性的评价工作,除了鼻腔之外,其他组织器官的种属差异也应作为种属选择的考量因素之一,同时还应基于适应证、待评价药物的理化性质和动物的生物学特性进行综合考虑,在低等级动物中足以评价受试物的毒性特征及安全性的情况下,不过度使用非人灵长类动物应是动物种属选择的重要原因之一^[43]。

FDA和EMA批准的鼻用制剂的一般毒性研究用动物种属选择汇总表,情况见表2。鼻制剂重复给药毒性试验中的给药方案实例,见表3。

2.3 给药剂量设置以及安全范围的计算

2.3.1 给药剂量 鼻腔给药制剂开发受限的一个主要因素是鼻腔体积过小(动物的鼻腔体积如表1所示),在有限的给药体积下,可通过调整给药频次、药物浓度来获得合适的给药剂量。动物在进行鼻腔给药时,可通过四种组合方式进行给药剂量的调整(见表3),分别为:①固定给药体积,调整制剂浓度;②固定制剂浓度,调整给药体积,适用于不适合进行浓度调整,且暂时因动物因素或装置因素无法采用器械进行的给药;③固定给药浓度及体积,调整给药频次,适用于采用带装置的成品制剂进行研究时的给药;④给药体积和制剂浓度均进行调整,适用于早期的毒性剂量探索或无法通过单一参数调整获得更高剂量的情况。需注意的是,在调整给药体积时,过大的给药体积可能会导致药物流入肺部的概率增加,并引起肺部出现非预期的异常改变,例如Pandemic-Influenza-Vaccine-H₃N₂-Medimmune疫苗通过比较相同滴度的受试物以不同给药体积(250 μL/鼻孔 vs 25 μL/鼻孔)进行给药后的毒性反应差异,采用250 μL/鼻孔给药后,雪貂的肺部的支气管间质出现剂量相关的炎症改变,下调给药体积至25 μL/鼻孔后,炎症反应明显减少(仅少数动物出现异常)^[58]。Eyles等^[59]则进一步

表 2 FDA 和 EMA 批准的鼻用制剂的一般毒性研究用动物种属选择汇总表

Tab 2 Animal species selection for general toxicity studies of FDA- and EMA-approved nasal preparations								
有效成分	给药形式	申请人 / 持有人	适应证	单次给药	2 ~ 4 周 重复给药	3 个月重 复给药	6 个月重复 给药	9 个月重 复给药
醋酸去氨加压素 ^[44]	溶液	Ferring Pharmaceuticals Inc	尿崩症	大鼠	—	大鼠	大鼠	犬
舒马曲坦 ^[45]	定量喷雾	Glaxo Smith Kline	急性和慢性 偏头痛	—	大鼠、犬	犬、猴	—	—
糠酸莫米松 ^[46]	定量喷雾	Merck Sharp and Dohme Corp	变应性鼻炎	小鼠、大 鼠、犬	犬	—	大鼠、犬	犬
甲磺酸二氢麦角胺 ^[35]	定量喷雾	Bausch Health US LLC	偏头痛	—	小鼠、大 鼠	小鼠、大 鼠、猴	—	—
环索奈德 ^[26]	定量喷雾	CovisPharmaBv	变应性鼻炎	大鼠	大鼠、犬	—	犬	—
盐酸奥洛他定 ^[47]	定量喷雾	Novartis Pharmaceuticals Corp	鼻炎	大鼠	大鼠、犬	大鼠	大鼠	犬
柠檬酸芬太尼 ^[33]	定量喷雾	Archimedes Development Ltd	癌症痛	—	—	大鼠	大鼠	犬
二丙酸倍氯米松一水合物 ^[48]	定量喷雾	Teva Branded Pharmaceutical Products R and D Inc	鼻炎	—	—	大鼠（口鼻 吸入）	—	—
布地奈德 ^[49]	定量喷雾	AstraZeneca Pharmaceuticals	鼻炎	—	—	—	大鼠（口鼻 吸入）	—
盐酸羟甲唑啉；盐酸丁卡因 ^[50]	定量喷雾	St Renatus LLC	牙科手术的 局部麻醉	—	犬	—	—	—
咪达唑仑 ^[51]	喷雾	UCB Inc	癫痫急性发 作治疗	大鼠、犬	—	犬	大鼠	—
胰高血糖素 ^[36]	粉末	NeurelisInc	严重低血糖	—	大鼠、犬	—	—	—
地西洋 ^[52]	定量喷雾	NeurelisInc	控制癫痫发 作次数	—	大鼠、犬	—	大鼠	—
甲氧氯普胺 ^[53]	定量喷雾	Evoke PharmaInc	糖尿病胃轻 瘫	—	兔、猴	—	—	—
纳美芬 ^[54]	定量喷雾	Opiant Pharmaceuticals	癌症痛	犬	大鼠、犬	—	—	—
扎夫瑞普 ^[55]	定量喷雾	Pfizer Inc	偏头痛	大鼠	小鼠、大 鼠、猴	大鼠、猴	大鼠	猴
伐伦克林 ^[56]	喷雾	Oyster Point Pharma	干眼症	—	—	—	有色兔	—
Fluenz、Fluenz Tetra、Pandemic- Influenza-Vaccine-H ₃ N ₂ -Medim- mune ^[41, 57-58]	溶液	MedImmune, UK Limited	流感	—	—	雪貂	—	—

注 (Note): “—” 代表未开展此类实验 (No such experiment was performed)。

证实了过大的鼻腔给药体积带来的下呼吸道分布风险,发现小鼠按 50 μL /只经鼻滴注给予钬 -46 标记的苯乙烯 - 二乙烯基苯微球,颗粒大量沉积在支气管和肺部 (约占给药量的 50%), 给药体积降低至 10 μL /只后,颗粒在给药初期沉积于鼻腔,并存在进一步的胃肠道、肝脏、脾脏等全身分布。Kuboyama 等^[14]的研究显示,当给药体积约为鼻腔体积的 30% 时,被认为是大鼠较合适的给药体积,此时药物能较好地分布于鼻腔各个部位 (包括筛鼻骨和下鼻道)。

2.3.2 安全范围的计算 安全范围是药物的最大无毒性反应剂量 (NOAEL) 和最小有效剂量之间的间距,两者的倍数关系越大,药物的安全性越高。鼻腔给药的安全性包括两部分,即全身系统安全性和鼻腔局部安全性,系统安全性通过单位体重的给药量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 等) 进行表示^[60],局部安全性通过单位鼻腔表面积的给药量

(如 $\text{mg} \cdot \text{cm}^{-2}$ 、 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$) 进行表示^[26],其中不同动物种属的鼻腔表面积见表 1。因此计算全身系统的安全范围时,根据公斤剂量或全身药物暴露量 (AUC 等) 进行换算,局部安全范围则根据动物的鼻腔局部 NOAEL 与人鼻腔局部的临床用量进行计算,例如酮咯酸鼻喷剂 (含量为 22.5%, 100 μL /喷) 的大鼠 28 d 重复给药的 NOAEL 分别为 $0.87 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-2}$ (鼻腔局部) 和全身暴露量 $AUC = 44 \text{ } 122 \text{ ng} / (\text{mL} \cdot \text{h})$, 人的临床用量为 1 喷 $\cdot \text{d}^{-1}$ [即局部给药剂量为 $0.7 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-2}$, 全身暴露量 $AUC = 7477.3 \text{ ng} / (\text{mL} \cdot \text{h})$], 计算得局部组织的安全范围为 1.2 倍 (与人的临床局部给药剂量比较), 系统毒性的安全范围为 5.9 倍 (与人的全身暴露量比较)^[61]。伐伦克林鼻喷剂^[56]、扎夫瑞普鼻喷剂^[55]、地西洋鼻喷剂^[52]等多数鼻制剂在非临床安全性评价时,均进行了鼻腔局部给药量及局部安全范围的表征。

表 3 鼻腔制剂重复给药毒性试验中的给药方案实例

Tab 3 Dosing regimens in toxicity trials of repeated administrations of nasal preparations				
给药方式	药物名称	实验类型	给药方案	文献
固定给药体积， 调整制剂浓度	艾司氯胺酮鼻 喷剂	大鼠 26 周重复给药 毒性实验	给药体积为 25 μL/鼻孔（双侧 50 μL/只），调整制剂浓度获得 0.9、3、9 mg/ 只的给药剂量	[60]
		犬 9 个月重复给药毒 性实验	给药体积为 100 μL/鼻孔（双侧 200 μL/只），调整制剂浓度获得 24、48、 72 mg/ 只的给药量	
固定制剂浓度， 调整给药体积	扎夫瑞普鼻 喷剂	大鼠 13 周重复给药 毒性实验	给药体积为 15 ~ 39 μL/鼻孔，获得 18.8、28、37.5 mg • kg ⁻¹ 的给药剂量	[55]
固定给药浓度及 体积，调整给 药频次	芬太尼鼻喷剂	犬 9 个月重复给药毒 性实验	低、中、高剂量均采用 6.28 mg • mL ⁻¹ （相当于 4 mg • mL ⁻¹ 芬太尼游离碱） 喷雾给药，给药喷次分别为 1 喷、3 喷、6 喷，0.1 mL/ 喷，换算成大给 药剂量分别为 0.16、0.48、0.96 mg • kg ⁻¹	[33]
给药体积和制剂 浓度均进行调 整	酮咯酸胺丁 三醇鼻喷剂	大鼠 5 d 重复给药剂 量探索和耐受性实 验	设置了 4 个给药剂量（24、36、54、108 mg • kg ⁻¹ ，制剂浓度分别为 10%、 10%、22.5%、22.5%，给药体积分别 20、30、20、40 μL/ 只，分别为双 侧鼻孔及多次给药，每侧鼻孔 10 μL/ 次	[61]
—	咪达唑仑鼻 喷剂	犬 3 个月重复给药毒 性实验	低、中剂量固定给药体积为 400 μL • d ⁻¹ （2 喷/ 侧），高剂量给药体积为 600 μL • d ⁻¹ （3 喷/ 侧），低、中、高剂量制剂浓度分别为 50、75、75 mg • mL ⁻¹	[51]

注（Note）：“—”表示无此信息（No such information）。

2.4 检测指标

2.4.1 常规指标 重复给药毒性试验中，常规检测指标的选择主要参照《药物重复给药毒性试验指导原则》（2014）及国际人用药品注册技术要求协调会（ICH）M3 及 S6 等指导原则进行设置^[62-64]，评价指标包括以指导原则约定的常规指标，如一般临床观察（活动情况、二便、分泌物、体重、摄食量、眼科检查等）、临床检验（如血生化指标、电解质、凝血、血常规、尿常规）、脏器重量（如脏器绝对重量、脏器系数、脏脑系数）、组织病理学检查。

2.4.2 特殊指标 特殊指标的设置主要基于受试物的特性进行选择，其考虑因素包括解剖结构和药物吸收特点、适应证、作用靶点、理化特性等，主要包括神经功能指标、免疫指标和组织病理检查。

① 神经功能指标：鼻腔给药通常会改变药物在中枢神经系统的暴露特征，尤其是对分子量较大的药物（如多肽、蛋白质、核酸等），鼻腔给药的吸收途径能绕过血脑屏障来获得更高的中枢神经系统暴露^[3]，但同时也伴随着更高的中枢神经系统安全风险^[6]。因此，在毒理学研究中，通常在重复给药毒性实验中伴随进行神经功能的监测，来评估增加的中枢暴露量带来的安全性风险。例如艾司氯胺酮鼻喷剂（抑郁症）^[60]、纳美芬鼻喷剂（阿片类药物过量使用后的解救）^[54]、地西洋鼻喷剂^[52]等中枢神经系统作用药物均在啮齿类动物的重复给药毒性实验中进行了行为学指标的考察，包括行为活动、学习记忆、神经反射等神经功能指标。

② 免疫指标：鼻腔是一个高度脉管化的组织，在固有层下方存在大量的淋巴管，是黏膜免

疫的重要场所之一^[5]。此外，鼻黏膜除了存在由黏液纤毛层形成的一个较弱的机械屏障之外，还包括特异性和非特异性免疫防御系统，其中包括在非啮齿类动物（人、猴、犬）中存在的韦氏环或在啮齿类动物（大鼠、小鼠等）中存在的鼻咽相关淋巴组织（NALT）^[5]，它们是鼻黏膜中的一个综合免疫系统，由淋巴组织、B 细胞、T 细胞和抗原呈递细胞（APC）（如巨噬细胞和树突状细胞）组成，处于鼻咽管入口处，大多数鼻腔分泌物和吸入的空气（可能都含有抗原物质）流过该区域，因此很容易与吸入的鼻腔毒物接触，是形成黏膜免疫的第一场所，外界抗原通过反复接触能产生局部的免疫反应，引起局部组织器官的损伤^[65]。同时，对口鼻通道黏膜免疫系统的抗原刺激除了能诱导特异性的局部免疫反应之外，还能激活临近组织（如肺、眼、口腔、耳道等）黏膜的免疫系统以及全身免疫系统^[66]。此外，鼻腔给药通常会采用多种技术手段（如添加促渗剂、纳米化、添加酶抑制剂等）来增加其吸收^[6]，纳米化是其中比较有特点和前景的特色技术之一。纳米制剂最常见的安全性风险为免疫毒性，其毒性机制可能与补体激活相关^[67]。因此，鼻腔给药途径下，针对药物的理化特性、制剂特性和预期的免疫反应类型，适当增加一定的免疫指标能为鼻控制剂的临床研究和应用提供重要的安全信息。

③ 病理检查：鼻腔给药是一种局部和全身吸收并存的给药途径，吸收途径分别包括经呼吸上皮吸收入血，经口咽流入消化道，经嗅神经和三叉神经吸收入脑，经咽喉进入下呼吸道。因此需针对多个特殊吸收部位进行多水平的病理检查，其中应包括鼻腔、脑、咽喉部的多个切面（其中

不同动物种属的鼻腔组织的病理切片定位见表 4)^[60, 70-71, 35]。例如艾司氯胺酮鼻喷剂^[60]、甲磺酸麦角胺鼻喷剂^[35]等均在重复给药毒性实验中对鼻腔进行了 4 个切面的观察,以确保能观察到鳞状上皮、移行上皮、呼吸上皮和嗅上皮^[69],同时还对喉部进行了 2~3 个切面的病理检查。纳美芬鼻喷剂犬重复给药毒性实验对鼻腔进行了 5 个切面的病理检查,其中第五个切面包括了鼻咽部^[54]。此外,包括艾司氯胺酮鼻喷剂^[60]、芬太尼鼻喷剂^[33]、纳美芬鼻喷剂^[54]、去氨加压素鼻喷剂^[44]还在大鼠重复给药毒性实验中对脑部进行了 4~8 个水平的组织病理观察,确保能充分考察经鼻脑途径吸收的药物对中枢神经系统的安全性风险。除了常规的 HE 染色,还可进行一些特

殊的组织染色来特异性的表征特殊的组织损伤,例如盐酸羟甲唑啉+盐酸丁卡因鼻喷剂(血管收缩剂+神经冲动传导阻滞剂)的 Beagle 犬连续 14 d 鼻腔重复给药毒性实验对鼻腔进行了 HE 染色和神经镀银染色(Bielschowsky's 法)^[50]。鼻喷剂还应重点关注下呼吸道的安全性风险,鼻喷剂给药时产生的细颗粒气溶胶可能进一步沉积于下呼吸道(如气管、支气管和肺泡)而产生毒副作用,通常需控制气溶胶粒径大于 10 μm 来减少药物在下呼吸道的沉积,例如去氨加压素鼻喷剂在考察处方中新辅料环戊内酯(CPD)的鼻腔毒性时,同时考察了犬 39 周重复给药后的鼻腔(上呼吸道)、肺部(下呼吸道)和口腔(消化道)的病理变化^[44]。

表 4 不同动物种属的鼻腔病理切片要求

Tab 4 Nasal pathological section requirements for different animal species

动物种属	鼻腔病理切片部位	文献
大鼠/小鼠	第一个切面在上切牙后;第二个切面切牙乳头;第三个切面沿第二腭嵴;第四个切面与第一上磨牙水平	[60]
兔	第一个切面在上切牙后,切牙乳头上;第二个切面沿第一腭嵴;第三个切面在第一上前磨牙之前;第四个切面在第一上磨牙之前	[70]
犬	第一个切面平行于上切牙的颊面切取;第二个切面在第一前磨牙前;第三个切面在第三前磨牙前;第四个切面在第一磨牙前	[71]
猴	第一个切面在第一前磨牙前;第二个切面在第一、第二前磨牙之间;第三个切面在第一、第二磨牙之间,包括鼻腔旁边的上颌窦;第四个切面在鼻咽部软腭前端和后端的中间位置	[35]

3 毒性反应及结果评估

3.1 主要的毒性反应

鼻制剂的主要的特征性毒性反应包括呼吸道毒性、神经毒性、免疫毒性及其他毒性,辅料或活性成分均可能成为毒性来源,非临床安全性评价需结合鼻制剂的处方组成和动物种属差异进行综合分析和判断,通过对处方中的辅料、活性成分的安全性进行前瞻性分析,能为鼻制剂的处方确定、非临床研究的实验设计和结果评估等提供重要的信息。

3.1.1 呼吸道毒性 鼻制剂最常见的毒性反应为呼吸道毒性(尤其是鼻腔毒性),制剂中多数促进吸收的辅料对生物膜的性状均有影响,这提示非临床安全性评价中设置单独的辅料对照组是有必要的。辅料促进吸收的作用机制分别包括改变细胞的通透性、改变细胞间的紧密连接、延长作用时间、增加溶解度、抑制鼻黏膜酶活性(见表 5),且一种辅料往往同时包含多种促吸收机制,代表性的辅料有环糊精和胆酸盐,其中β环糊精的黏膜毒性大小顺序如下^[72]:磺丁基β环糊精<羟丙基β环糊精<二甲基β环糊精。胆酸盐类的黏膜和纤毛毒性的大小如下^[73]:脱氧胆酸盐>牛磺胆酸盐>甘氨酸胆酸钠。毒性过大的辅料能影响鼻制剂的成药和上市,Novartis 公司的

奥洛他定鼻喷剂曾因处方中聚维酮^[47]的鼻腔毒性(引起大鼠和犬呼吸上皮空泡化和嗅上皮变性,引起人鼻中隔溃疡和穿孔)未被 FDA 批准新药上市申请(New Drug Application, NDA),因此申办方进一步开发出了不含聚维酮的奥洛他定鼻喷剂。除了辅料的毒性外,还应关注活性成分的鼻腔毒性,例如减充血剂(羟甲唑啉、伪麻黄碱等)使用不当(如浓度过高、疗程过长或用药过频)容易导致药物性鼻炎,出现鼻用减充血剂的使用次数越来越多,鼻塞反而越来越严重的现象^[74]。普萘洛尔、抗组胺剂和抗微生物药物反复使用能造成鼻腔纤毛可逆或不可逆的运动抑制^[75],葡萄糖酸锌鼻腔给药则能引起嗅黏膜损伤和嗅觉丢失^[76]。

3.1.2 神经毒性 鼻腔给药的神经毒性风险主要与给药途径能无创地绕过血脑屏障直接入脑有关,例如甲氧氯普胺(多巴胺受体阻断剂)的片剂和鼻喷剂均能引起运动障碍的不良反应,临床对此类药物的使用周期限制为不大于 12 周,但对鼻喷剂给予了更多的中枢神经系统不良反应的担忧,因此减少其推荐的临床使用周期至 2~8 周,并在其临床研究中重点论述了鼻腔给药途径引起中枢神经系统安全风险增加的可能性^[53]。对于全新的分子以及原途径下不能透过血脑屏障的改良型新药,应关注鼻腔给药途径下,中枢神

表 5 常见的鼻腔用辅料种类和作用机制
Tab 5 Types and mechanisms of common nasal adjuvants

作用类型	种类及代表性化合物
改变细胞的通透性，促进渗透和吸收 ^[29, 45, 54]	①β环糊精类：转运和摄取细胞膜中磷脂及胆固醇，引起双层膜失衡，并最终导致生物膜内陷产生细胞间隙。②胆盐类：增加生物膜顶端和基底外侧的流动性，产生颞孔并增强其渗透性；通过聚集形成胶束来提高药物的跨细胞通道能力，或与细胞膜结合，在细胞膜上形成含有水分子的反向胶束，从而增强亲水性药物通过细胞旁途径的转运；破坏半桥粒（上皮细胞与结缔组织之间的结合装置，称为半桥粒）或与紧密连接区域的Ca ²⁺ 结合而增加细胞旁路转运。③表面活性剂：改变细胞膜的流动性。④醇类：降低角质层的脂质屏障。⑤水杨酸类：增加细胞膜流动性
改变细胞间连接 ^[29, 72]	①脂肪酸及其酯类：降低上皮细胞的紧密连接，增加旁细胞途径的通透性；②亚砷类：使蛋白质变性，破坏角质层细胞间的有序排列；③表面活性剂：改变膜电位，破坏上皮细胞间的紧密连接；④整合剂：与细胞膜表面的Ca ²⁺ 、Mg ²⁺ 结合，破坏细胞间的紧密连接；⑤水杨酸类：与细胞膜表面的Ca ²⁺ 、Mg ²⁺ 结合，破坏细胞间的紧密连接；⑥新型辅料（solutol HS15、烷基糖苷类）：瞬时可逆地松开细胞间的紧密连接、改变黏膜的黏度和流动性、抑制纤毛运动频率和药物代谢酶的活性
延长作用时间 ^[29, 47, 78]	①胆酸盐类：降低鼻腔黏膜层的黏度，延缓黏膜清除；②壳聚糖：增加黏膜黏附作用；③果胶类：与细胞膜表面的Ca ²⁺ 、Mg ²⁺ 结合，增加黏附作用
增加溶解度 ^[29, 79]	①胆酸盐类：增加疏水性药物的溶解度；②亚砷类：增加药物溶解度
抑制代谢酶和外排蛋白活性 ^[80]	①胆酸盐类：抑制黏膜肽酶活性；②表面活性剂：抑制膜蛋白（如P-糖蛋白）的外排活性

经系统作为新增的暴露部位所带来的神经毒性 / 不良反应，尤其是针对脑部存在作用靶点的药物，例如催产素全身给药主要以收缩子宫为主，不能透过血脑屏障进一步发挥其他药理作用，经鼻腔给药能作用于脑部具有抗抑郁的药效作用，但其不良反应表现为多动、易怒等^[77]。

3.1.3 其他毒性 鼻腔给药还应关注的毒性反应包括免疫毒性和消化道毒性，大分子药物（如多肽、蛋白质等）反复接触鼻腔黏膜，容易引起固有免疫反应以及由免疫球蛋白 E（IgE）介导的 I 型超敏反应^[65]，还可能激活临近组织（如肺、眼、口腔、耳道等）的黏膜免疫以及全身免疫系统^[66]。例如降钙素鼻喷剂在临床应用时，可见由 IgE 介导的超敏反应，患者表现为反复的鼻炎，而过敏性鼻炎最常见的临床症状还包括临近黏膜组织的异常（如口腔软腭、眼结膜、鼻腔的黏膜水肿和腺体分泌增加）。此外，类固醇类激素经鼻腔局部给药最常见的免疫毒性反应为免疫抑制，例如糠酸莫米松鼻喷剂重复给药能引起 NALT 的萎缩^[47]。鼻腔给药时的消化道毒性风险与过多的药物或被黏膜纤毛清除的药物流入消化道有关^[6]。例如，Kuboyama 等^[14]的研究显示，大鼠以 10 ~ 50 μL/ 侧进行鼻腔滴注给药，均在口腔和食道形成不同程度的药物分布。盐酸奥洛他定鼻喷剂给药后，胃肠道、排泄器官和给药部位是浓度最高的组织器官^[47]。

3.2 毒性结果的评估

鼻腔给药毒性结果的评估需同时考虑安全范围、临床相关性和风险获益情况，并不是出现毒性即不可被接受，当其安全范围足够大、毒性反应与人不相关或药物带来的临床获益大于安全风险时，出现的毒性结果仍是可被接受的。

3.2.1 安全范围 鼻腔给药时，脱离给药剂量谈毒性反应并不可取，当毒性剂量远大于临床用量时，实际临床应用中出现安全性风险的概率极小，例如 DDM 在远大于临床用量的情况下才能引起鼻腔上皮细胞损伤（包括鼻甲黏膜表皮的增生、糜烂和出血，鼻腔移行上皮细胞变性，鳞状细胞增生和嗅上皮细胞萎缩），局部给药的安全剂量相当于人临床用量的 172 ~ 191 倍，提示其临床应用的安全范围足够大，因此 DDM 在多个已上市的鼻制剂（如地西洋、纳美芬、舒马曲坦）中作为辅料使用^[45, 52, 54]。

3.2.2 种属差异和临床相关性 鼻腔给药的毒理学结果到临床的外推受到鼻腔解剖结构和生理的种属差异影响，应对其临床相关性进行仔细甄别，例如曲马舒坦鼻喷剂连续 14 d 重复给药能引起大鼠喉腹软骨溃疡，但因喉腹软骨未在人类解剖结构中被发现，故该现象被认为与人不相关，无临床意义^[45]。与鼻刺激物相关的病变分布模式主要归因于气流模式导致的区域沉积差异^[26]和鼻腔上皮固有的敏感性差异^[2]，因此许多吸入刺激物引起的病变呈头尾梯度变化^[2]，需要谨慎评估单独的嗅觉区病变的临床意义。大鼠属于鼻腔呼吸的动物，没有经口呼吸对颗粒进行分流，颗粒聚集、过度炎症容易导致大鼠鼻部肿瘤的发生，而鼻腔肿瘤在人类中的发生率相对较少^[81]，因此大鼠鼻腔肿瘤的临床相关性应被慎重对待，不应出现过度解读和评估。

3.2.3 风险获益情况 短期或急救用药需更多地考虑风险获益，并不能一味地从毒性反应出发来否定药物的安全性和进一步的成药性，例如胰高血糖素经大鼠鼻腔重复 28 d 给药时（2 mg/ 只），可见鼻黏膜毒性（嗅上皮的轻度 / 中度糜烂

和溃疡,并伴有固有层的炎症浸润,嗅上皮的萎缩变性),但因胰高血糖素鼻粉剂在临床属于单次用药(用于使用胰岛素等引起的严重低血糖时的紧急使用),且出现异常的给药剂量相当于临床用量的 23 ~ 46 倍(基于鼻腔表面积剂量)和 196 ~ 392 倍(基于体重剂量),因此评估在临床实际应用的风险较小。

4 鼻腔给药非临床安全性评价内容的一般考虑

全新分子的鼻腔给药制剂应开展完整的药理毒理研究,包括药效学、药代动力学(ADME)、一般毒性(两个种属)、安全药理学(心血管呼吸系统、中枢神经系统)、局部毒性(刺激性、过敏等)、特殊毒性(遗传毒性、生殖毒性、致癌性),具体开展阶段和时间安排可参照 M3(R2)《支持药物进行临床试验和上市的非临床安全性研究指导原则》^[64]。改良型鼻腔给药制剂(如新剂型/新途径)的非临床研究一般可参考吸入制剂的研究,通常应该包括两个种属动物(至少一种非啮齿类)的短期研究(2 ~ 4 周),需长期使用的药物,可选择最合适的动物进行长周期(如 6 个月或 9 个月)的研究^[42]。新剂型研究应包括溶剂对照和完整制剂组,尤其是当处方中存在促渗作用的辅料。溶剂对照和完整制剂组一般应经鼻内途径给药(如鼻内灌注,对于能使用临床器械的动物种属,动物实验的给药装置建议考虑与临床保持一致),以便最大限度地直接暴露于鼻组织^[42]。

吸入给药和鼻腔给药的安全性结果可进行一定程度的桥接,这能大大减少非必要的毒理学研究的开展,例如二丙酸倍氯米松鼻喷剂(适应证:过敏性鼻炎)是基于该活性成分的吸入气雾剂在气道中的沉积情况进行的安全性评估,此外鼻喷剂所用的气雾罐和吸入气雾剂相同,因此没有单独开展基于鼻喷剂的安全性实验^[48]。布地奈德鼻喷剂同样通过引用大鼠经口鼻吸入给药毒性实验结果来支持鼻腔喷雾给药途径的改良,通过表征吸入给药途径下肺部沉积剂量和鼻腔沉积剂量来评估两个局部给药部位的安全性,其中两个新辅料(吐温 80 和山梨酸钾)的总吸入剂量分别为 498、1446 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,肺沉积剂量分别根据沉积效率 0.12 和 0.13 计算为 210、658 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,鼻腔沉积剂量根据沉积效率 0.2 计算分别约为 100、289 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,根据鼻腔面积计算得鼻腔局部的 NOAEL 约为 7.1 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$,约相当于 6 岁儿童鼻腔给药剂量的 4.5 倍,提示布地奈德鼻喷剂的临床应用安全性较好^[49]。多数鼻腔给药的改良型制剂未进一步开展新途径下的安全药理学研究,对于受试物在鼻腔给药途径下的中枢暴露程度增加,以及中枢神经系统存在受试物的作用靶点,

鼻腔给药可能改变药物的组织分布和药理作用时效特征^[30, 33],则可考虑开展安全药理学研究。此外,原途径下无中枢暴露的药物,通过鼻腔给药后增加了中枢神经系统的暴露程度,应进一步考虑中枢神经系统的安全药理学研究,以评估受试物在新途径下的不良反应^[77]。

鼻腔给药制剂的局部毒性包括黏膜刺激性(包括在体鼻腔黏膜刺激性实验、体外红细胞溶血实验和体外生物物质释放实验)^[65]、纤毛毒性^[75]。其中在体实验主要用于评价黏膜形态变化,通常可伴随在重复给药毒性实验中开展,但伴随刺激性考察是基于高风险评估低风险(制剂浓度、给药次数和给药剂量可能远高于临床),如果存在因此设计带来的黏膜刺激反应,建议单独开展基于临床制剂给药的鼻腔黏膜刺激性实验。同时基于黏膜的免疫特点及可能的迟发过敏反应的特点,黏膜给药途径下的过敏实验也被推荐开展^[65]。此外,鼻腔喷雾剂临床使用时,常误将药物喷入眼睛,因此通常会考察错误给药情况下的眼刺激性,例如奥洛他定鼻喷剂、扎夫瑞普鼻喷剂均基于错误用药的风险进行了眼刺激性实验^[47, 55]。对于改良型鼻腔给药制剂,暂不考虑特殊毒性的风险^[64],但当鼻腔出现鳞状上皮化生的情况下,考察致癌性可能是必要的,如麦角胺鼻喷剂(偏头痛,存在反复间断性用药)在小鼠和大鼠的 4 周和 13 周重复给药毒性实验中发现了鼻腔病变(中性粒细胞浸润、杯状细胞增生及上皮细胞鳞状化生)的进展性改变,被监管部门附条件批准,在上市后必须补充大鼠的致癌性研究结果,以评估鼻腔给药途径的致癌风险,并在最终的 F344 大鼠致癌性研究中未发现致癌性风险^[35]。

5 总结与展望

鼻腔制剂非临床安全性评价内容以及研究结论外推至临床应根据制剂特性、鼻腔解剖结构和生理功能的种属差异等因素进行仔细甄别和综合判断,因此仍需要更多的基础研究来了解鼻腔解剖学和生理学,以及病理机制及其相互影响。目前尚未颁布鼻腔给药制剂的非临床安全性评价的专属的指导原则或研究指南,仅有鼻腔制剂的药学研究标准可供参考[见《吸入和鼻腔用药产品的药品质量指南》(EMA)、《鼻用喷雾和吸入溶液,悬浮液和喷雾药物产品-化学,制造和控制文件》(FDA)],且对鼻腔给药制剂非临床安全性评价的指导作用有限。研究者基于鼻腔给药制剂的吸收分布特征、鼻腔解剖生理特征提出了相应评价建议,例如给药剂量的表示方式应多元化,除常规的以给药量/体重比($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)为单位的表示方式以外,以给药量/

鼻腔表面比 ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ 、 $\text{mg} \cdot \text{cm}^{-2}$ 等) 为单位的剂量表示方式应更多被推荐。但需注意到的是, 现有动物的鼻腔表面积数据来源多样, 且测量方法不统一, 导致鼻腔表面积参数权威性不足, 例如 Boyer 等^[20]发表的兔毒性研究文献以 60 cm^2 作为兔鼻腔表面积, 但 Corley 等^[82]通过磁共振成像获得雌性新西兰兔的鼻腔表面积为 113 cm^2 。此外, 鼻腔体积和面积不属于恒定的生理参数, 随着年龄和体重的增长, 鼻腔表面积等参数变化较大^[27], 且同种动物的不同品系之间也存在较大差异, 这导致长周期实验的首、末次给药的单位剂量差异较大, 例如艾司氯胺酮鼻喷剂即因给药剂量未采用实时的体重进行校准, 导致实际给药剂量可能不准确, 被监管部门质疑其大鼠重复给药毒性实验研究结果的可靠性 (尤其是神经毒性的评估结果)^[60], 因此在表征局部给药剂量时, 应将鼻腔表面积/体积和年龄的关系引入给药剂量的换算, 以更精确地表征鼻腔给药剂量。此外, 动物的鼻腔容积和给药体积的关系尚未得到统一, 因此关于更多动物种属的鼻腔给药体积与组织分布的关系应更多被研究, 来支持鼻腔给药的体积设定。随着药学研究技术的发展, 越来越多的新型鼻制剂被开发出来, 这为鼻腔药物的毒理学评估带来了一定挑战, 在实际执行过程中, 需结合鼻腔的生理解剖特点、药物制剂的作用特点以及药物的药理作用进行综合评估, 以确保鼻腔药物毒理学研究结果外推至临床的最大可行性。

参考文献

- [1] Ulusoy S, Bayar MN, Karpischenko S, et al. Mechanisms and solutions for nasal drug delivery-a narrative review [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2022, 26 (2 Suppl): 72-81.
- [2] Harkema JR, Carey SA, Wagner JG. The nose revisited: a brief review of the comparative structure, function, and toxicologic pathology of the nasal epithelium [J]. Toxicol Pathol, 2006, 34 (3): 252-269.
- [3] Wang Z, Xiong G, Tsang WC, et al. Nose-to-brain delivery [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2019, 370 (3): 593-601.
- [4] Aderibigbe BA. In situ-based gels for nose to brain delivery for the treatment of neurological diseases [J]. Pharmaceutics, 2018, 10 (2): 2-17.
- [5] Chamanza R, Wright JA. A review of the comparative anatomy, histology, physiology and pathology of the nasal cavity of rats, mice, dogs and non-human primates. relevance to inhalation toxicology and human health risk assessment [J]. J Comp Pathol, 2015, 153 (4): 287-314.
- [6] Yashwant VP, Hemant KSY. Nasal drug delivery [M]. Switzerland AG: Springer Nature, 2023: 1-3.
- [7] Thyssen J, Althoff J, Kimmerle G, et al. Inhalation studies with benzo[a]pyrene in syrian golden hamsters [J]. J Natl Cancer Inst, 1981, 66 (3): 575-577.
- [8] Kiaee M, Wachtel H, Noga ML, et al. Regional deposition of nasal sprays in adults: a wide ranging computational study [J]. Int J Numer Method Biomed Eng, 2018, 34 (5): 55-66.
- [9] Keller LA, Merkel O, Popp A. Intranasal drug delivery: opportunities and toxicologic challenges during drug development [J]. Drug Deliv Transl Res, 2022, 12 (4): 735-757.
- [10] Inoue D, Kimura S, Kiriyama A, et al. Quantitative estimation of the effect of nasal mucociliary function on in vivo absorption of norfloxacin after intranasal administration to rats [J]. Mol Pharm, 2018, 15 (10): 4462-4469.
- [11] Grützenmacher S, Robinson DM, Sevecke J, et al. Comparative investigations of anatomy and physiology in mammalian noses (Homo sapiens—Artiodactyla) [J]. Rhinology, 2011, 49 (1): 18-23.
- [12] Senocak D, Senocak M, Bozan S. Sinonasal distribution of topically applied particles: computerized tomographic detection and the effects of topical decongestion [J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2005, 133 (6): 944-948.
- [13] Grützenmacher S, Betrachtungen Z, Anatomie U, et al. Observations on the anatomy and physiology of the mammalian noses [J]. Pneumologie, 2010, 64 (7): 443-444.
- [14] Kuboyama Y, Mori K, Suzuki K, et al. Changes in nasal cavity volume and target area of exposure to nasal drops with age in rats [J]. Exp Anim, 1996, 45 (1): 15-22.
- [15] Straszek SP, Pedersen OF. Nasal cavity dimensions in guinea pig and rat measured by acoustic rhinometry and fluid-displacement method [J]. J Appl Physiol, 2004, 96 (6): 2109-2114.
- [16] Mery S, Gross EA, Joyner DR, et al. Nasal diagrams: a tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice [J]. Toxicol Pathol, 1994, 22: 353-372.
- [17] Kimbell JS. Nasal dosimetry of inhaled gases and particles: where do inhaled agents go in the nose? [J]. Toxicol Pathol, 2006, 34: 270-273.
- [18] Dahl AR, Hadley WM. Nasal cavity enzymes involved in xenobiotic metabolism: effects on the toxicity of inhalants [J]. Crit Rev Toxicol, 1991, 21 (5): 345-372.
- [19] Kepler GM, Richardson RB, Morgan KT, et al. Computer simulation of inspiratory nasal airflow and inhaled gas uptake in a rhesus monkey [J]. Toxicol Appl Pharm, 1998, 150: 1-11.
- [20] Boyer KC, McDonald P, Zoetis T. A novel formulation of ketorolac tromethamine for intranasal administration: preclinical safety evaluation [J]. Int J Toxicol, 2010, 29 (5): 467-478.
- [21] Gizurason S, Bechgaard E, Hjortkjær RK. Two intranasal administration techniques give two different pharmacokinetic results [J]. Scand J Lab Anim Sci, 2006, 33 (1): 35-38.
- [22] Erdő F, Bors LA, Farkas D, et al. Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting [J]. Brain Res Bull, 2018, 143: 155-170.
- [23] Reznik G, Stinson S. Nasal tumors in animals and man vol. iii (1983) experimental nasal carcinogenesis [M]. Florida: CRC Press, 1983: 1-26.
- [24] Adams DR, Hotchkiss DK. The canine nasal mucosa [J]. Anat Histol Embryol, 1983, 12 (2): 109-125.
- [25] Schreider JP. Nasal airway anatomy and inhalation deposition in

- experimental animals and people [J]. CRC-Press, 2017, 3 (2): 1-31.
- [26] Food and Drug Administration. Pharmacology Review [EB/OL]. (2007-10-30) [2025-02-08]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2007/022124s000_PharmR.pdf.
 - [27] Loftus PA, Wise SK, Nieto D, et al. Intranasal volume increases with age: computed tomography volumetric analysis in adults [J]. Laryngoscope, 2016, 126 (10): 2212-2215.
 - [28] Xi JX, Si XH, Zhou Y, et al. Growth of nasal and laryngeal airways in children: implications in breathing and inhaled aerosol dynamics [J]. Respir Care, 2014, 59 (2): 263-273.
 - [29] Zhang T, Li M, Nie GJ, et al. The mechanism of different absorption enhancers and research advances in nasal administration [J]. Chin J Hospit Pharm, 2022, 42 (8): 870-875.
 - [30] Food and Drug Administration. Pharmacology Review [EB/OL]. (2019-01-22) [2025-02-08]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2019/210884Orig1s000PharmR.pdf.
 - [31] Yu D, Sun Y, Shen X, et al. Spray pattern and plume geometry measurement method of nasal spray and its correlation with nasal deposition [J]. Acta Pharm Sin B, 2022, 7: 2032-2040.
 - [32] Moraga E, Daniel W, Zachary M, et al. A modified USP induction port to characterize nasal spray plume geometry and predict turbinate deposition under flow [J]. Int J Pharmaceut, 2018, 548 (1): 305-313.
 - [33] Food and Drug Administration. Pharmacology review [EB/OL]. (2011-06-20) [2025-02-08]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2011/022569Orig1s000PharmR.pdf.
 - [34] Food and Drug Administration. Pharmacology review [EB/OL]. (2019-07-25) [2025-02-08]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2019/209388Orig1s000AdminCorres.pdf.
 - [35] Food and Drug Administration. Pharmacology review [EB/OL]. (1997-01-29) [2025-02-08]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/NDA/97/20148_Migranal_phmr_P1.pdf.
 - [36] Food and Drug Administration. Pharmacology review [EB/OL]. (2018-06-28) [2025-02-08]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2019/210134Orig1s000PharmR.pdf.
 - [37] Tay SY, Chao SS, Mark KT, et al. Comparison of the distribution of intranasal steroid spray using different application techniques [J]. Int Forum Allergy Rhinol, 2016, 6 (11): 1204-1210.
 - [38] 胡筱芸, 岳霄, 吴传斌, 等. 鼻腔药物递送的影响因素和提高递送效率的设计策略 [J]. 浙江大学学报 (医学版), 2023, 52 (3): 328-337.
 - [39] 赵荣军, 陈红叶, 陈祝霞, 等. 鼻喷雾剂雾滴粒径的一致性分析 [J]. 中国医药工业杂志, 2022, 53 (4): 539-542.
 - [40] Bacon R, Newman S, Rankin L, et al. Pulmonary and nasal deposition of ketorolac tromethamine solution (SPRIX) following intranasal administration [J]. Int J Pharm, 2012, 431 (1-2): 39-44.
 - [41] European Medicines Agency. Public-assessment-report (fluenz) [EB/OL]. (2014-12-03) [2025-02-08]. https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/fluenz-epar-public-assessment-report_en.pdf.
 - [42] Salminen WF, Wiles ME, Stevens RE. Streamlining nonclinical drug development using the FDA 505 (b)(2) new drug application regulatory pathway [J]. Drug Discov Today, 2019, 24 (1): 46-56.
 - [43] American Association for Laboratory Animal Science. Association of primate veterinarians lifetime use guidelines for nonhuman primates in biomedical research [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2022, 61 (4): 320-321.
 - [44] Food and Drug Administration. Pharmacology review [EB/OL]. (2017-02-22) [2025-02-08]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2017/201656Orig1s000PharmR.pdf.
 - [45] Food and Drug Administration. Pharmacology review [EB/OL]. (1997-08-26) [2025-02-08]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/97/020626ap-1.pdf.
 - [46] Food and Drug Administration. Pharmacology review [EB/OL]. (2022-03-17) [2025-02-08]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2022/215712Orig1s000IntegratedR.pdf.
 - [47] Food and Drug Administration. Pharmacology review [EB/OL]. (2008-03-06) [2025-02-08]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2008/021861s000PharmR_P1.pdf.
 - [48] Food and Drug Administration. Pharmacology review [EB/OL]. (2012-02-17) [2025-02-08]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2012/202813Orig1s000PharmR.pdf.
 - [49] Food and Drug Administration. Pharmacology review [EB/OL]. (1998-08-14) [2025-02-08]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/99/20746_Rhinocort_pharmr.pdf.
 - [50] Food and Drug Administration. Pharmacology review [EB/OL]. (2016-06-17) [2025-02-08]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2016/208032Orig1s000PharmR.pdf.
 - [51] Food and Drug Administration. Pharmacology review [EB/OL]. (2019-03-28) [2025-02-08]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2019/211321Orig1s000PharmR.pdf.
 - [52] Food and Drug Administration. Pharmacology review [EB/OL]. (2020-02-10) [2025-02-08]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2020/211635Orig1s000PharmR.pdf.
 - [53] Food and Drug Administration. Pharmacology review [EB/OL]. (2020-06-19) [2025-02-08]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2021/209388Orig1s000MultidisciplineR.pdf.
 - [54] Food and Drug Administration. Pharmacology review [EB/OL]. (2023-05-11) [2025-02-08]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2023/217470Orig1s000PharmR.pdf.
 - [55] Food and Drug Administration. Pharmacology review [EB/OL]. (2023-03-08) [2025-02-08]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2023/216386s000lbl.pdf.
 - [56] Food and Drug Administration. Pharmacology review [EB/OL]. (2021-07-22) [2025-02-08]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/213978s000lbl.pdf.
 - [57] European Medicines Agency. Public-assessment-report (fluenz-tetra) [EB/OL]. (2013-12-17) [2025-02-08]. https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/fluenz-tetra-epar-public-assessment-report_en.pdf.
 - [58] European Medicines Agency. Public-assessment-report (pandemic-influenza-vaccine-h5n1-medimmune) [EB/OL]. (2016-06-02) [2025-02-08]. <https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/pandemic-influenza-vac>

- cine-h5n1-mediimmune-epar-public-assessment-report_en.pdf.
- [59] Eyles JE, Spiers ID, Williamson ED, et al. Tissue distribution of radioactivity following intranasal administration of radioactive microspheres [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2001, 53 (5): 601-607.
- [60] Food and Drug Administration. Pharmacology review [EB/OL]. (2019-03-05) [2025-02-08]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2019/211243Orig1s000PharmR.pdf.
- [61] Food and Drug Administration. Pharmacology review [EB/OL]. (2008-12-05) [2025-02-08]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2010/022382Orig1s000PharmR.pdf.
- [62] Center For Drug Evaluation, National Medical Products Administration. Governing principle [EB/OL]. (2014-05-13) [2025-02-08]. <https://www.cde.org.cn/zdyz/downloadAtt?idCODE=699ae7ba0fe117cef8602d6f68017f4c>.
- [63] Center For Drug Evaluation, National Medical Products Administration. Governing principle [EB/OL]. (2011-06-12) [2025-02-08]. <https://www.cde.org.cn/ichWeb/guideIch/downloadAtt/1/6830b4148ba-442d75378ae7c0e160777>.
- [64] Center For Drug Evaluation, National Medical Products Administration. Governing principle [EB/OL]. (2009-06-11) [2025-02-08]. <https://www.cde.org.cn/ichWeb/guideIch/downloadAtt/1/2c8ffc7b2f2ade324bf083f3372b5cc0>.
- [65] Yin MS, Li Z, Wang QL, et al. Discussion on common issues in the safety evaluation of preparations [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2023, 39 (11): 1667-1672.
- [66] Pabst R. Mucosal vaccination by the intranasal route. Nose-associated lymphoid tissue (NALT) —structure, function and species differences [J]. *Vaccine*, 2015, 33 (36): 4406-4413.
- [67] Wolfram J, Zhu M, Yang Y, et al. Safety of nanoparticles in medicine [J]. *Curr Drug Targets*, 2015, 16 (14): 1671-1681.
- [68] Yang YW, Lv JJ, Zhang D, et al. Introduction of toxicological pathology study of the lesions of nasal epithelium of common laboratory animals [J]. *Chin Pharmaceu Affa*, 2013, 27 (11): 1173-1179.
- [69] Organization for Economic Co-operation and Development. Test No. 413: Subchronic Inhalation Toxicity: 90-day Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 [DB/OL]. (2018-06-27) [2025-02-08]. <https://doi.org/10.1787/9789264070806-en>.
- [70] Pereira ME, Macri NP, Creasy DM. Evaluation of the rabbit nasal cavity in inhalation studies and a comparison with other common laboratory species and man [J]. *Toxicol Pathol*, 2011, 39 (5): 893-900.
- [71] Walsh KM, Courtney CL. Nasal toxicity of CI-959, a novel anti-inflammatory drug, in Wistar rats and Beagle dogs [J]. *Toxicol Pathol*, 1998, 26 (6): 717-723.
- [72] Irie T, Uekama K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation [J]. *J Pharm Sci*, 1997, 86 (2): 147-162.
- [73] Tengamnuay P, Mitra AK. Bile salt-fatty acid mixed micelles as nasal absorption promoters of peptides. I. Effects of ionic strength, adjuvant composition, and lipid structure on the nasal absorption of [D-Arg2] kyotorphin [J]. *Pharm Res*, 1990, 7 (2): 127-133.
- [74] Wang HT, Yang QT, An YF, et al. Expert consensus on clinical application of nasal decongestant and management of rhinitis medicamentosa (2022, Beijing) [J]. *Chin J Otorhinolaryngol-sku Base Surg*, 2022, 28 (4): 1-7.
- [75] Jiao J, Zhang L. Influence of intranasal drugs on human nasal mucociliary clearance and ciliary beat frequency [J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2019, 11 (3): 306-319.
- [76] Werner S, Nies E. Olfactory dysfunction revisited: a reappraisal of work-related olfactory dysfunction caused by chemicals [J]. *J Occup Med Toxicol*, 2018, 13 (1): 1-26.
- [77] Einfeld SL, Smith E, McGregor IS, et al. A double-blind randomized controlled trial of oxytocin nasal spray in Prader Willi syndrome [J]. *Am J Med Genet A*, 2014, 164A (9): 2232-2239.
- [78] Food and Drug Administration. Pharmacology review [EB/OL]. (2008-04-15) [2025-02-08]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2008/021861s000Admincorresp.pdf.
- [79] Mukaizawa F, Taniguchi K, Miyake M, et al. Novel oral absorption system containing polyamines and bile salts enhances drug transport via both transcellular and paracellular pathways across Caco-2 cell monolayers [J]. *Int J Pharm*, 2009, 367 (1-2): 103-108.
- [80] Morimoto K, Yamaguchi H, Iwakura Y, et al. Effects of proteolytic enzyme inhibitors on the nasal absorption of vasopressin and an analogue [J]. *Pharm Res An Off J Am Assoc Pharm Sci*, 1991, 8 (9): 1175-1179.
- [81] Feron VJ, Arts JHE, Kuiper CF, et al. Health risks associated with inhaled nasal toxicants [J]. *Crit Rev Toxicol*, 2001, 31: 313-347.
- [82] Corley RA, Minard KR, Kabilan S, et al. Magnetic resonance imaging and computational fluid dynamics (CFD) simulations of rabbit nasal airflows for the development of hybrid CFD/PBPK models [J]. *Inhal Toxicol*, 2009, 21 (6): 512-518.

(收稿日期: 2025-02-27; 修回日期: 2025-04-10)

人类免疫缺陷病毒阴性马尔尼菲篮状菌病患者的 临床特征分析与药物治疗实践

李彭宇, 卢艳风, 陈敬* (南华大学附属长沙中心医院药学部, 长沙 410004)

摘要: 回顾性分析了 11 例人类免疫缺陷病毒阴性马尔尼菲篮状菌病的临床特征及药物治疗过程。该病临床症状缺乏特异性, 且患者多合并基础疾病, 病情及用药复杂多样。临床药师从抗真菌方案制订、治疗疗程评估、基于药品不良反应和相互作用的治疗方案优化等方面提供了药学服务, 提升了患者用药安全性和有效性。

关键词: 马尔尼菲篮状菌; 人类免疫缺陷病毒阴性; 药学监护; 临床药师; 两性霉素 B

中图分类号: R519, R453 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)05-1430-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.038

马尔尼菲篮状菌病 (talaromycosis, TSM) 是由马尔尼菲篮状菌 (*Talaromyces marneffe*, TM) 引起的一种侵袭性真菌病, 主要在东南亚国家和我国华南地区流行^[1]。该病多见于人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 感染患者, 表现为局部或全身播散性感染, 致死率高, 是仅次于结核病和隐球菌病的第三大艾滋病常见感染性疾病^[2]。近年来, 马尔尼菲篮状菌病的流行区域正在不断扩大, 目前在世界 34 个国家、我国 21 个省/直辖市均有相关病例报道^[3]。此外, 随着恶性肿瘤、自身免疫性疾病的增加以及糖皮质激素、免疫抑制剂的大量应用, 马尔尼菲篮状菌病在 HIV 阴性人群中的发病率呈逐年上升趋势^[4]。本研究对临床药师参与会诊及监护的 11 例 HIV 阴性马尔尼菲篮状菌病患者的临床资料进行了回顾性分析, 总结探讨了患者的临床特征、治疗方案以及药学监护要点, 为该病的诊疗提供更多的经验。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集 2021 年 5 月至 2024 年 5 月某院收治的 11 例 HIV 阴性马尔尼菲篮状菌病患者的临床资料。

1.2 病例分析

采用回顾性研究方法, 分析 HIV 阴性马尔尼菲篮状菌病的临床特征, 包括一般人口统计学资料、伴随疾病、临床表现、实验室检查、影像学表现、临床转归, 以及针对 HIV 阴性马尔尼菲篮

状菌病的治疗方案、药学监护等。

2 结果

2.1 一般资料

11 例患者中男性 8 例, 女性 3 例, 年龄 18 ~ 75 岁, 平均年龄 57 岁。除 1 例患者食用过竹鼠 (马尔尼菲篮状菌主要动物宿主) 外, 其余患者均否认有啮齿动物接触史。所有患者 HIV 抗体检测为阴性, 10 例合并细菌或其他真菌感染, 其中 5 例有肺结核病史; 1 例为胃恶性肿瘤切除术后。3 例有自身免疫性疾病, 需长期服用免疫抑制剂。见表 1。

2.2 临床表现

患者发病至确诊时间为 15 d ~ 14 个月。临床表现以呼吸道症状咳嗽、咳痰为主, 11 例患者中有 4 例 (36.4%) 出现不同程度发热; 7 例 (63.6%) 出现气促症状; 3 例 (27.3%) 淋巴结肿大; 3 例 (27.3%) 胸腔积液; 1 例 (9.1%) 出现全身多处骨痛和软组织脓肿。详细信息见表 1。

2.3 实验室检查

患者入院后第一次实验室检查结果见表 2。外周血白细胞计数 (WBC) $(4.38 \sim 19.61) \times 10^9 \cdot L^{-1}$, 6 例 (54.5%) 出现中性粒细胞比率 (NE%) 升高, 9 例 (81.8%) 红细胞沉降率 (ESR) 增快, 8 例 (72.7%) C 反应蛋白 (CRP) 升高, 6 例 [85.7%, 以检测了降钙素原 (PCT) 的 7 例病例为基数] 降钙素原升高, 所有患者用药前肝肾功能正常。

2.4 影像学表现

基金项目: 湖南省自然科学基金青年项目 (No.2025JJ60773); 长沙市中心医院院内重点项目 (No.YNKY202402)。

作者简介: 李彭宇, 女, 博士, 主要从事抗感染药学与循证药学方面的研究, email: lipengyu28@163.com *通信作者: 陈敬, 女, 副主任药师, 主要从事抗感染临床药学研究, email: 282627661@qq.com

表 1 11 例 HIV 阴性马尔尼菲篮状菌病患者的临床特征

病例	性别	年龄 / 接触啮齿动物	病灶部位	伴随疾病	临床表现	诊断方式	确诊时间
P1	女	75 否	肺部	肺隐球菌病、风湿性多肌痛	咳嗽、咳痰、活动后气促、发热、胸腔积液	肺泡灌洗液宏基因组二代测序 (mNGS)	18 d
P2	男	58 否	肺部	肺结核、酒精性肝硬化、2 型糖尿病	咳嗽、咳痰、双侧背部隐痛	肺泡灌洗液 mNGS	15 d
P3	男	63 否	肺部	强直性脊柱炎、乙型病毒性肝炎	咳嗽、咳脓血痰、右侧胸部隐痛、胸闷、恶心、干呕	肺泡灌洗液 mNGS	2 个月
P4	男	55 否	肺部	继发性肺结核稳定期、结核性胸膜炎、肺气肿	咳嗽、咳痰	肺泡灌洗液 mNGS; 肺组织病理	14 个月
P5	女	18 否	肺部、颈、纵隔、腹膜	肺结核、自幼存在头皮、口腔、指甲反复真菌感染史	咳嗽、活动后气促、声嘶、吞咽疼痛、多发淋巴结肿大	肺泡灌洗液、颈部淋巴结 mNGS; 颈部淋巴结病理	5 个月
P6	男	50 否	肺部	肺结核、慢性阻塞性肺疾病伴急性加重、肺曲霉球切除术后、新型冠状病毒感染	咳嗽、咳痰、活动后气促、发热	肺泡灌洗液 tNGS; 真菌培养	1 个月
P7	男	59 否	肺部	慢性阻塞性肺疾病伴急性加重、继发性肾上腺皮质功能减退症	咳嗽、咳痰、活动后气促、胸腔积液、腰背部疼痛	肺泡灌洗液 mNGS; 真菌培养	1 个月
P8	男	73 是	肺部	慢性阻塞性肺疾病伴急性加重、肺曲霉菌病、胃恶性肿瘤切除术后	咳嗽、咳痰、乏力、食欲缺乏、稍感气促	肺泡灌洗液 mNGS	7 个月
P9	女	57 否	肺部	皮炎炎、细菌性肺炎	咳嗽、阵发性干咳为主、活动后气促、发热	肺泡灌洗液 mNGS; 肺组织病理	5 个月
P10	男	69 否	肺部、颈部淋巴结	肺结核、非结核分枝杆菌肺病、2 型糖尿病	咳嗽、咳痰、双侧颈部淋巴结肿大	颈部淋巴结液 mNGS; 颈部淋巴结组织病理	1 个月
P11	男	52 否	多处骨质、颈部淋巴结	细菌性肺炎、多发性肝囊肿、焦虑抑郁状态	气促、胸腔积液、全身骨痛、软组织脓肿、淋巴结肿大、发热	多处淋巴结组织液 mNGS; 颈部淋巴结组织病理; 真菌培养	11 个月

表 2 11 例 HIV 阴性马尔尼菲篮状菌病患者的实验室检查结果、治疗方案、不良反应及疗效

病例	WBC/ ($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	CRP/ ($mg \cdot L^{-1}$)	PCT/ ($ng \cdot mL^{-1}$)	NE/%	ESR/ ($mm \cdot h^{-1}$)	肌酐 (CREA) / ($\mu mol \cdot L^{-1}$)	谷丙转氨酶 (ALT) / ($U \cdot L^{-1}$)	治疗方案	追踪 时间	主要不良反应	治疗 效果
P1	7.44	162↑	0.05	81.5↑	79↑	41↓	16	两性霉素 B + 伏立康唑 14 d → 伊曲康唑 6 个月	6 个月	低钾血症	治愈
P2	5.95	< 3.13	0.21↑	68.8	9	76	26	伏立康唑 6 个月	6 个月	—	治愈
P3	4.65	< 3.34	—	58.6	6	68	42	两性霉素 B 11 d → 伏立康唑 6 个月	10 个月	肝肾功能异常	治愈
P4	4.38	6.9	0.07↑	72.8	29↑	54	12	伏立康唑 3 个月 → 伊曲康唑 12 个月	15 个月	视觉异常	治愈
P5	4.83	16.5↑	—	70.6	30↑	38↓	31	两性霉素 B 24 d → 伊曲康唑 6 个月	12 个月	低钾血症、肾功能异常、食欲缺乏、恶心	治愈
P6	6.23	45.8↑	0.28↑	75.8↑	78↑	49	13	两性霉素 B 14 d → 伊曲康唑 3 个月	3 个月	低钾血症	好转
P7	12.53↑	26.5↑	—	89.3↑	62↑	54	59↑	两性霉素 B 20 d → 伏立康唑 6 个月	7 个月	低钾血症	治愈
P8	7.11	10.2↑	—	75.4↑	34↑	73	11	伏立康唑 6 个月	6 个月	—	治愈
P9	15.36↑	167↑	0.65↑	89.9↑	75↑	40↓	9	两性霉素 B 14 d → 伊曲康唑 6 个月	6 个月	—	治愈
P10	11.74↑	80.4↑	0.19↑	62.7	84↑	88	14	两性霉素 B 14 d → 伊曲康唑 6 个月	6 个月	肾功能异常	治愈
P11	19.61↑	164↑	1.52↑	83.4↑	62↑	69	8↓	两性霉素 B 8 d → 伏立康唑 6 个月	随访中 ^a	低钾血症	好转

注: a. 该例患者尚在治疗中, 截至 2024 年 5 月已用药 6 个月。

CT 结果显示, 11 例患者均累及肺部, 表现为一侧或双侧肺实质性病变, 其中 8 例可见斑点或斑片状阴影, 8 例合并多发空洞形成, 3 例见多发结节, 1 例出现胸椎、双侧肋骨等多处骨质破坏。

2.5 临床转归

11 例患者中共有 10 例治疗时长在 6 个月之上, 其中 9 例治愈, 1 例病情好转尚在巩固治疗中。另有 1 例治疗 3 个月后好转出院。

2.6 临床特征分析

本研究中 HIV 阴性马尔尼菲篮状菌病患者均存在多种基础疾病或合并感染, 临床表现及影像学检查无特异性, 未见肝脾肿大、脐凹样皮疹等 HIV 阳性感染者常见症状, 诊断上难与结核、非结核分枝杆菌或其他真菌感染相鉴别。病原学检测中, 仅 3 例培养阳性, 其余患者多次培养呈阴性结果, 与文献报道的血培养阳性率 < 50%、痰培养阳性率约 34% 相符^[5-6]。因该病在 HIV 阴性人群中较罕见且传统检测敏感性低, 多数患者确诊延迟超 2 个月。患者经验性治疗效果不佳后均通过 mNGS 技术检出马尔尼菲篮状菌。一项纳入 232 名马尔尼菲篮状菌感染患者的研究报道显示, mNGS 对该病诊断敏感性达 100%, 特异性达 98.7%, 可用于复杂感染中病原菌的快速识别^[7]。专家建议对免疫功能低下、疑似混合或罕见真菌感染者, 在进行传统微生物检测的同时留取样本进行 mNGS 检测^[8]。本研究中所有患者经 mNGS 检出致病菌后即进行目标性治疗, 同时追加真菌培养结果, 最终 11 例患者均预后良好。

3 药物治疗策略与药学监护分析

3.1 药物治疗策略

目前国内外尚未建立 HIV 阴性马尔尼菲篮状菌病的标准化治疗方案。针对 HIV 阳性感染者, 中国专家共识^[9]及美国 IDSA 指南^[10]均推荐使用两性霉素 B 进行 2 周诱导治疗, 随后序贯伊曲康唑或伏立康唑巩固治疗 10 周, 当两性霉素 B 不耐受时可选用伏立康唑为替代疗法。作为参考, 本研究中 8 例患者采用以两性霉素 B 为基础的治疗方案并遵循剂量爬坡原则。研究显示, 两性霉素 B 快速剂量爬坡可提高真菌清除率^[11], 8 例患者中有 4 例耐受性良好, 可较快升至推荐剂量, 顺利完成 2 周标准治疗周期, 2 例耐受性较差延长了诱导期疗程, 另有 2 例因药品不良反应或相互作用改用伏立康唑继续治疗。此外, 有 3 例患者初始治疗即选择了伏立康唑, 其中 1 例合并肺曲霉病已用药稳定, 遂延续伏立康唑治疗方案, 2 例则存在两性霉素 B 不耐受史。伊曲康唑与伏立康唑同为三唑类抗真菌药, 体外对酵母形态马尔尼菲

篮状菌有较强抑制作用, 但《国家抗微生物治疗指南第 2 版》^[12]和《热病 (第 50 版)》^[13]仅推荐轻症患者口服伊曲康唑进行治疗, 多中心随机对照试验结果也显示, 伊曲康唑诱导治疗后的 6 个月死亡率显著高于两性霉素 B (21% vs 11%)^[14]。本研究病例虽非 HIV 携带者, 却均为真菌感染高危宿主, 病情复杂, 故未采用伊曲康唑单药治疗。

3.2 药学监护分析

HIV 阴性马尔尼菲篮状菌病患者常有免疫功能缺陷等基础疾病或合并感染, 用药繁杂, 临床药师对患者进行了全面的药学监护以保证合理用药, 改善患者预后。

3.2.1 抗感染治疗疗程评估 《中国艾滋病诊疗指南》^[15]推荐 HIV 阳性合并马尔尼菲篮状菌感染患者接受诱导期和巩固期治疗后继续使用伊曲康唑二级预防直至 CD4⁺T 淋巴细胞计数连续 6 个月 > 100 个·μL⁻¹, 对于 HIV 阴性患者, 暂无统一的疗程标准。参考侵袭性真菌病相关指南^[16], 本研究病例停药时机为患者临床症状与体征改善、影像学示病灶显著吸收并趋于稳定以及微生物学检测阴性, 经统计 11 例患者抗真菌疗程范围在 6 ~ 15 个月。

3.2.2 药品不良反应 两性霉素 B 通过与真菌细胞膜麦角甾醇结合破坏膜通透性发挥杀菌作用, 但同时也可结合哺乳动物细胞胆固醇导致不良反应, 包括顽固性低血钾症 (33.6% ~ 53.0%)、肾毒性 (26.1% ~ 33.8%)、肝毒性 (14%) 等^[17-18]。本研究中 5 例患者出现低钾血症、3 例发生肾功能损伤 (血肌酐升高), 均予以对症处理。典型病例处理方案如下: 病例 5 在两性霉素 B 剂量增至 40 mg qd 后出现剂量相关性不良反应, 加用金水宝片护肾和氯化钾补钾后将剂量由 40 mg qd 减至 30 mg qd 并延长诱导期以保证治疗效果。病例 3 则是在治疗期间出现肝肾功能指标持续升高 [ALT 149 U·L⁻¹, 谷草转氨酶 (AST) 140 U·L⁻¹, CREA 190 μmol·L⁻¹], 判断为药物性损伤后立即停药, 辅以保肝 (谷胱甘肽片、多烯磷脂酰胆碱)、护肾 (金水宝片) 处理, 同时转用伏立康唑序贯治疗。伏立康唑治疗窗窄 (1 ~ 5.5 mg·L⁻¹), 易发生视觉障碍、发热、皮疹、头痛等不良反应。《中国抗真菌管理共识 (2024 版)》^[19]建议在治疗药物监测 (TDM) 的指导下优化三唑类抗真菌药物的使用剂量。本研究中临床药师对患者的伏立康唑血药浓度进行了监测和调整, 治疗期间除病例 4 出现视觉异常改用伊曲康唑外, 其他患者未见该药相关不良反应。

3.2.3 药物相互作用 11 例患者中 5 例合并肺结

核病, 其中 2 例 (病例 5 和病例 10) 为抗结核治疗强化期, 使用利福平等一线抗结核药联合治疗。利福平是强效 CYP450 诱导剂, 可加速 CYP450 底物伏立康唑和伊曲康唑的代谢^[20]。据报道, 伏立康唑 (200 mg, q12h) 和利福平 (600 mg qd) 联用 7 d 后峰浓度和药物浓度-时间曲线下面积分别下降 93% 和 96%^[21]。患者抗结核治疗无法中断, 故建议采用诱导作用较弱的利福布汀联合方案 (CYP 诱导作用: 利福平 > 利福喷丁 > 利福布汀)^[22]。此外, 两性霉素 B 可能存在肾毒性, 应尽量避免合用其他可加重肾功能损害的药物。病例 11 合并耐药菌感染, 因病情进展迅速采用以多黏菌素 B 为基础的抗感染方案, 遂建议停用两性霉素 B 改为伏立康唑抗真菌治疗。本研究中患者用药复杂, 抗菌药物与其他类型药物之间也存在潜在相互作用, 须及时进行干预, 如在病例 7 序贯治疗期将其长期服用的调脂药辛伐他汀改为瑞舒伐他汀, 以避免伏立康唑可能引起的辛伐他汀代谢抑制和不良反应 (横纹肌溶解), 规避用药风险。

4 小结

HIV 阴性马尔尼菲篮状菌病感染途径不明, 临床表现缺乏特异性, 易误诊漏诊。早期及时诊断并选择适当的抗真菌方案是提高感染治愈率的关键。临床药师在循证医学证据的支持下对治疗方案、治疗疗程、药品不良反应和相互作用等方面进行了探讨与分析, 并提供了全面的药学监护, 保障了患者用药的安全性和有效性。

参考文献

- [1] Cao C, Xi L, Chaturvedi V, et al. Talaromycosis (Penicilliosis) due to *Talaromyces* (*Penicillium*) *marneffei*: insights into the clinical trends of a major fungal disease 60 years after the discovery of the pathogen [J]. *Mycopathologia*, 2019, 184 (6): 709-720.
- [2] Ying RS, Le T, Cai WP, et al. Clinical epidemiology and outcome of HIV-associated talaromycosis in Guangdong, China, during 2011—2017 [J]. *HIV Med*, 2020, 21 (11): 729-738.
- [3] Wang F, Han RH, Chen S. An overlooked and underrated endemic mycosis—talaromycosis and the pathogenic fungus *Talaromyces marneffei* [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2023, 36 (1): e0005122.
- [4] 何海洋, 薛潇春, 潘炜华, 等. HIV 阴性马尔尼菲篮状菌病研究进展 [J]. *菌物学报*, 2024, 43 (10): 240094.
- [5] Supparatpinyo K, Khamwan C, Baosoung V, et al. Disseminated *Penicillium marneffei* infection in Southeast Asia [J]. *Lancet*, 1994, 344: 110-113.
- [6] Jiang J, Meng S, Huang S, et al. Effects of *Talaromyces marneffei* infection on mortality of HIV/AIDS patients in Southern China: a retrospective cohort study [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2019, 25 (2): 233-241.
- [7] Liu LP, Sun BJ, Ying WJ, et al. Rapid diagnosis of *Talaromyces marneffei* infection by metagenomic next-generation sequencing technology in a Chinese cohort of inborn errors of immunity [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 987692.
- [8] 全国真菌病监测网侵袭性霉菌感染监测项目组. 侵袭性霉菌感染实验室诊断临床应用专家共识 [J]. *中华检验医学杂志*, 2024, 47 (6): 597-609.
- [9] “十三五”国家科技重大专项艾滋病机会性感染课题组. 艾滋病合并马尔尼菲篮状菌病临床诊疗的专家共识 [J]. *西南大学学报 (自然科学版)*, 2020, 42 (7): 15.
- [10] Modi S. Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America [J]. *MMWR Recomm Rep*, 2009, 58 (RR-4): 1-207.
- [11] Zhou YH, Lu T, Li Y, et al. Severe anemia, severe leukopenia, and severe thrombocytopenia of amphotericin B deoxycholate-based induction therapy in patients with HIV-associated talaromycosis: a subgroup analysis of a prospective multicenter cohort study [J]. *BMC Infect Dis*, 2023, 23 (1): 707.
- [12] 国家卫生计生委医政医管局, 国家卫生计生委合理用药专家委员会. 国家抗微生物治疗指南 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2017.
- [13] 大卫·吉尔伯特, 亨利·钱伯斯, 迈克尔·萨格, 等: 桑福德指南抗微生物治疗 [M]. 范洪伟, 译. 50 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2021.
- [14] Narayanasamy S, Dat VQ, Thanh NT, et al. A global call for talaromycosis to be recognised as a neglected tropical disease [J]. *Lancet Glob Health*, 2021, 9 (11): E1618-E1622.
- [15] 中华医学会感染病学分会艾滋病丙型肝炎学组, 中国疾病预防控制中心, 李太生. 中国艾滋病诊疗指南 (2021 年版) [J]. *中国艾滋病性病*, 2021, 27 (11): 20.
- [16] 中华医学会呼吸病学分会. 慢性阻塞性肺疾病伴肺曲霉病诊治和管理专家共识 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2024, 47 (7): 604-622.
- [17] Tragiannidis A, Gkampeta A, Vouvouki M, et al. Antifungal agents and the kidney: pharmacokinetics, clinical nephrotoxicity, and interactions [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2021, 20 (9): 1061-1074.
- [18] 两性霉素 B 脱氧胆酸盐临床合理应用专家共识编写组. 两性霉素 B 脱氧胆酸盐临床合理应用专家共识 (2022) [J]. *中华医学杂志*, 2023, 103 (16): 1173-1183.
- [19] 抗真菌管理 (AFS) 工作组. 中国抗真菌管理共识 (2024 年版) [J]. *胸腔疾病杂志*, 2024, 16 (6): 4016-4029.
- [20] Lewis R, Niazi-Ali S, McIvor A. Triazole antifungal drug interactions—practical considerations for excellent prescribing [J]. *Pharmaceutics J Antimicrob Chemoth*, 2024, 79 (6): 1203-1217.
- [21] 丁海华, 陈道俊, 王华, 等. 临床药师干预伏立康唑不良潜在药物相互作用实践效果 [J]. *中国药业*, 2024, 33 (8): 9-13.
- [22] Regazzi M, Carvalho AC, Matteelli A, et al. Treatment optimization in patients co-infected with HIV and *Mycobacterium tuberculosis* infections: focus on drug-drug interactions with rifamycins [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2014, 53 (6): 489-507.

(收稿日期: 2025-01-24; 修回日期: 2025-03-08)

口腔黏膜医药联合门诊中药学服务切入点探讨

程海婷¹, 刘洪涛¹, 付洁^{2*} (1. 首都医科大学附属北京口腔医院药学部, 北京 100050; 2. 首都医科大学附属北京口腔医院口腔黏膜科, 北京 100050)

摘要: 口腔黏膜病是为数不多的以药物治疗为主的口腔疾病。药师可选择以口腔黏膜医药联合门诊的方式, 充分发挥专业优势, 协助医师为患者提供安全、有效的诊疗服务。本文基于国内外医药联合门诊开展现状和我院开展经验, 探讨口腔黏膜医药联合门诊的开展思路和药学服务切入点, 并以典型案例从药学问诊、病因分析、治疗方案制订和患者用药教育等方面讨论药师价值, 为其他医院开设口腔黏膜医药联合门诊提供参考。

关键词: 医药联合门诊; 药学服务; 口腔念珠菌病; 药品不良反应; 口腔黏膜病

中图分类号: R969.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)05-1434-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.039

Entry points of pharmaceutical services in oral mucosal physician-pharmacist collaborative clinics

CHENG Hai-ting¹, LIU Hong-tao¹, FU Jie^{2*} (1. Department of Pharmacy, Beijing Stomatological Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050; 2. Department of Oral Medicine, Beijing Stomatological Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050)

Abstract: Oral mucosal disease is an oral disease mainly treated with medications. Pharmacists can fully use their professional advantages via oral mucosal physician-pharmacist collaborative clinics, assist physicians in providing safe and effective services for patients. On the basis of the current data of physician-pharmacist collaborative clinics at home and abroad and the experience in our hospital, we discussed the entry points for pharmaceutical services. By using a typical case, the value of pharmacists was discussed from pharmaceutical consultation, etiology analysis, treatment plan development, and patient medication education, to provide a reference for more oral mucosal physician-pharmacist collaborative clinics.

Key words: physician-pharmacist collaborative clinic; pharmaceutical service; oral candidiasis; adverse drug reaction; oral mucosal disease

药学门诊是指医疗机构药师在门诊为患者提供的用药评估、用药咨询、用药教育、用药方案调整建议等一系列专业化药学服务^[1]。随着我国医院药学服务改革的不断深化, 药学门诊已成为我国医院药学服务的一项重要内容。医药联合门诊具有药师医疗责任风险较低、能真正发挥 1 + 1 > 2 的效果、就诊患者较多、用药问题能够及时解决等特点, 是很多医院开设药学门诊的首选形式^[2]。目前国内外医药联合门诊已初见成效, 主要有抗凝门诊、癌痛管理门诊、呼吸系统疾病门诊和心内科门诊等, 但是未见有口腔医药联合门诊的报道^[2-3]。

口腔黏膜病是口腔疾病中为数不多的以药物治疗为主的疾病, 相比牙周和牙体牙髓等其他口腔疾病, 药师在治疗中可参与的程度更高。因此, 我院设立医药联合门诊时, 药师首先选择了与口腔黏膜科医师合作, 开设口腔黏膜医药联合门诊。本文将结合国内外医药联合门诊开展现状和我院开展经验对口腔黏膜医药联合门诊药学服务的切入点进行探讨, 以期为其他医院开设口腔黏膜医药联合门诊提供参考。

1 国内外医药联合门诊开展现状

国内外医药联合门诊已取得显著成效, 开展

作者简介: 程海婷, 女, 副主任药师, 主要从事临床药学研究, email: chenghaiting@126.com * 通信作者: 付洁, 女, 副主任医师, 主要从事口腔黏膜病研究, email: jj-ic6@qq.com

模式为医师药师共同出诊, 工作流程大多为医师负责问诊、诊断、开具药物和化验单, 药师主要负责询问疾病史和用药史、回顾分析相关检查指标或建议进行相应检查、给出调整药物治疗建议、发现用药依从性问题并干预、发现或规避药物相互作用、发现或规避药品不良反应、提供用药教育等^[4-8]。有研究结果显示, 相比传统的医师门诊, 医药联合门诊可以促进患者各项指标(血糖、血压、血脂、心率等)达标^[7, 9]、减轻癌症患者疼痛^[10]、提高用药依从性^[7]、改善哮喘控制情况^[11]、减少药品不良反应(adverse drug reaction, ADR)发生^[11]、降低潜在不适当药物治疗风险^[8]、降低药品费用^[4]、促进中成药合理使用^[12]等。口腔医院药师可以借鉴国内外医药联合门诊的开展经验, 在口腔黏膜医药联合门诊中承担药学问诊、用药问题评估和用药教育等工作。

2 口腔黏膜医药联合门诊中药学服务切入点

我院在借鉴国内外医药联合门诊服务经验的基础上, 结合医院特色开设了口腔黏膜医药联合门诊。口腔黏膜病常见的有复发性阿弗他溃疡、口腔扁平苔藓、类天疱疮、灼口综合征、口腔念珠菌病等。与口腔黏膜医师共同出诊, 药师可以考虑从以下几点切入: ① 负责询问疾病史和用药史, 通常口腔医师对非口腔疾病的用药不是很熟悉, 药师可以在医师问诊的基础上进行补充询问, 重点关注除口腔疾病之外的慢性病和相关用药, 协助医师完整、准确地获取患者的用药信息; ② 发现潜在的 ADR, 很多口腔黏膜疾病可能是药源性疾病, 比如口干、口腔黏膜炎、天疱疮和口腔苔藓样损害等, 详细询问用药史, 有利于发现潜在的 ADR; ③ 规避不良药物相互作用, 虽然口腔黏膜疾病以局部用药为主, 但是在治疗某些疾病(比如口腔念珠菌病、类天疱疮、口腔扁平苔藓)时可能需要全身用药。这些治疗药物与其他慢性病(比如糖尿病、高血压、冠心病和抑郁症等)用药之间可能存在不良药物相互作用; ④ 协助医师为特殊患者(比如孕妇、哺乳期妇女、儿童、老人等)制订个体化用药方案; ⑤ 提供用药教育, 口腔黏膜疾病的治疗常多种局部用药联合使用, 因此告知患者使用先后顺序、使用方法、注意事项等非常重要; ⑥ 提供生活方式指导, 很多口腔黏膜病通过改善生活方式即可有很大改善, 比如情绪调节有助于改善灼口综合征、饮食管理有助于改善扁平苔藓症状等。

3 口腔黏膜医药联合门诊中的典型案例

3.1 病历资料

患者, 男性, 71 岁, 因“口腔反复疼痛, 伴

口干半年”于 2021 年 7 月 12 日就诊于我院口腔黏膜科。口腔检查发现, 患者舌质红, 舌背丝状乳头增长, 舌苔厚腻, 呈浅棕褐色, 舌背中后部有部分舌苔呈片状剥脱; 软腭黏膜广泛充血, 其上可见斑片状白色假膜, 假膜可擦去; 双颊及上唇内侧黏膜可见点、片状充血, 尤以右颊充血较明显; 口内唾液量较少, 呈泡沫状; 口腔卫生状况不佳。患者口内病损情况详见图 1。就诊当日实验室检查结果显示, 血清中乙肝抗原(HBsAg)、丙肝抗体(HCV-Ab)、艾滋病病毒抗体(HIV-Ab)和梅毒抗体(TP-Ab)均为阴性, 血常规结果未见异常。患者自述每年查肿瘤标志物, 结果未见异常。临床诊断为急性假膜型口腔念珠菌病。



图 1 患者口内病损情况

Fig 1 Intraoral lesions of the patient

A. 腭部 (palate); B. 舌背 (dorsum of the tongue); C. 右颊 (right buccal mucosa)

3.2 主要治疗经过

2021 年 7 月 12 日, 在医师问诊的基础上, 药师进行补充询问, 重点关注除口腔疾病之外的慢性病和相关用药, 发现患者患有糖尿病 30 年, 空腹血糖 $7 \sim 8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ↑, 餐后 2 h 血糖 $10 \sim 12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ↑, 患室性早搏和心力衰竭 2.5 年, 高脂血症 5 年, 失眠 38 年, 便秘 10 年, 帕金森病 2 年, 患者的慢性病和相关用药情况详见表 1。

2021 年 7 月 16 日唾液真菌培养结果显示, 白假丝酵母菌菌落数 $> 200 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。给予患者氟康唑片 (50 mg qd po) 和制霉菌素片 (50 万单位, tid, 口含) 连续治疗 2 周, 之后停药 3 d 复查唾液真菌培养。2021 年 8 月 3 日唾液真菌培养结果为阴性, 患者主诉口腔疼痛明显缓解。给予患者 4% 碳酸氢钠漱口, 预防复发。另外, 建议患者就诊神经内科, 向医师说明口腔念珠菌病可能是由金刚烷胺片引起的, 评估能否调整帕金森病的治疗方案; 每日用软毛牙刷刷牙和舌至少两次, 每晚使用牙线, 每年洁治牙齿两次, 保持口腔清洁。

3.3 药学监护

3.3.1 口腔假丝酵母菌感染的原因 假丝酵母菌是一种机会致病菌, 免疫功能低下者容易感染, 比如获得性免疫缺陷综合征、血液系统恶性肿瘤、

表 1 患者的慢性病和相关用药

Tab 1 Patient's chronic diseases and related medications			
基础疾病	治疗药物	用法用量	服用时长 ^a
高血脂	匹伐他汀钙分散片	2 mg qn	5 年
	室性早搏、心力衰竭	盐酸胺碘酮片	200 mg qd (每周一到周五)
	呋塞米片	20 mg qd	2.5 年
	螺内酯片	20 mg qd	2.5 年
	门冬氨酸钾镁片	140 mg bid	2.5 年
	卡维地洛片	6.25 mg qn	2.5 年
糖尿病	阿司匹林肠溶片	100 mg qd	2.5 年
	恩格列净片	10 mg qd	2 年
	阿卡波糖片	100 mg tid	2 年
	西格列汀二甲双胍片 (II)	1 片 bid	2 年
	格列美脲片	2 mg bid	2 年
	依帕司他片	50 mg tid	2 年
失眠	甲钴胺片	0.5 mg tid	2 年
	盐酸舍曲林片	50 mg qn	2 年
便秘	枸橼酸莫沙必利片	5 mg tid	2 年
帕金森	多巴丝肼片	12.5 mg qid	2 年
	盐酸普拉克索片	0.125 mg qd	2 年
	盐酸金刚烷胺片	100 mg qd	7 个月

注：^a以患者就诊日期 (2021 年 7 月 12 日) 为参照计算。
Note: ^aCalculated based on the patient's visit date (July 12, 2021) as a reference.

移植受者、接受化疗、激素治疗和头颈部放疗的患者等。免疫功能正常的人群，感染的危险因素有佩戴义齿、口干燥症和糖尿病等，另外一些药物的使用也可能诱发感染，比如吸入用糖皮质激素、长期使用广谱抗微生物药物和能引起口干的药物等^[13]。患者传染病四项、血常规检查和肿瘤标志物检查，均未见异常，因此暂不考虑血液

病、肿瘤、自身免疫性疾病和病毒感染。
药师从药物角度分析，患者近两年除增加金刚烷胺外，其余药物治疗方案均未调整。在服用金刚烷胺 1 个月后，患者出现了口腔黏膜疼痛和口干等口腔念珠菌病的临床症状^[14]。故推测口腔假丝酵母菌感染与金刚烷胺有关。查阅金刚烷胺药品说明书，有口腔念珠菌病的不良反应描述^[15]。因此，认为金刚烷胺是引起此次口腔念珠菌病的可疑药物。药师结合病史和用药史，采用我国 ADR 报告因果关系评价^[16]进行分析，金刚烷胺的关联性评价结果为可能：① 患者于 2020 年 12 月开始服用金刚烷胺，2021 年 1 月出现口腔念珠菌病的临床症状，有合理的时间关系；② 查阅说明书，符合金刚烷胺已知的 ADR 类型^[15]；③ 因治疗需要未停用金刚烷胺；④ 查阅资料，患者服用的普拉克索有引起口腔念珠菌病的报道^[17]，但患者出现口腔念珠菌病的临床症状时，已规律服用普拉克索 1.5 年；⑤ 糖尿病常被认为是口腔假丝酵母菌感染的危险因素^[14]，但药师查阅相关文献发现，糖尿病是否是口腔假丝酵母菌感染的危险因素，目前研究结论尚存在争议^[18-19]。该患者糖尿病史 30 年，血糖控制良好。患者在服用金刚烷胺之前从未出现口腔念珠菌病的临床症状，因此，暂不考虑普拉克索和糖尿病是患口腔念珠菌病的直接原因。综合上述分析，关联性评价结果为“可能”。药师进一步根据 Naranjo 评分量表^[20]评估该 ADR，总分为 3 分，关联性评价为“可能”，具体评分结果见表 2。

表 2 金刚烷胺引起口腔念珠菌病的 Naranjo 评分结果
Tab 2 Naranjo score of oral candidiasis caused by amantadine

相关问题	金刚烷胺得分情况			评分理由
	是	否	未知	
1. 该 ADR 先前是否有结论性报告?	+ 1			说明书有类似 ADR 的描述
2. 该 ADR 是否是在使用可疑药物后发生的?	+ 2			ADR 是在使用盐酸金刚烷胺片后发生的
3. 该 ADR 是否在停药或应用拮抗剂后得到缓解?			0	未停药和使用拮抗剂
4. 该 ADR 是否在再次使用可疑药物后重复出现?			0	未停药和使用拮抗剂
5. 是否存在其他原因能单独引起该 ADR?	- 1			普拉克索可引起
6. 该 ADR 是否在应用安慰剂后重复出现?			0	未使用安慰剂
7. 药物在血液或其他液体中是否达到毒性浓度?			0	未监测血药浓度
8. 该 ADR 是否随剂量增加而加重，或随剂量减少而缓解?			0	未调整给药剂量
9. 患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现过类似反应?		0		未出现过类似反应
10. 是否存在任何客观证据证实该反应?	+ 1			患者 ADR 的临床表现和唾液假丝酵母菌培养阳性 (白假丝酵母菌菌落数 > 200 cfu · mL ⁻¹) 可作为口腔念珠菌病的客观证据
总分	3 分			

注:根据总分将 ADR 判定结果分为“可疑”(总分 ≤ 0 分)、“可能”(总分 1 ~ 4 分)、“很可能”(总分 5 ~ 8 分)和“确定”(总分 ≥ 9 分)。
Note: According to the total score, the ADR judgment results were divided as follows: doubtful ≤ 0, possible 1 to 4, probable 5 to 8, definite ≥ 9.

ADR 发生的可能机制：① 金刚烷胺的抗胆碱作用会造成口干^[15, 21]。② 普拉克索也有引起口干的

风险，两药联用金刚烷胺可抑制其经肾小管分泌，增加口干发生风险，进而增加口腔假丝酵母菌病的

发生风险^[21-22]。根据文献报道, 金刚烷胺引起口干的发生率为 16%, 普拉克索为 3% ~ 7%^[22-23], 查阅 Vigibase 数据库^[17]可知, 在已经上报的 ADR 报道中金刚烷胺致口干的发生率为 246/7448、普拉克索为 127/13 605, 金刚烷胺致口腔假丝酵母菌感染发生率为 0/7448、普拉克索为 3/13 605。③ 患者 30 年的糖尿病病史可能是 ADR 发生的危险因素^[14]。

3.3.2 抗真菌治疗 很多口腔念珠菌病没有症状, 该患者临床症状明显, 感染的白假丝酵母菌是假丝酵母菌中致病性最强的, 属于中重度口腔念珠菌病, 指南推荐口服氟康唑治疗^[24-25]。药师发现胺碘酮和氟康唑之间存在潜在的不良相互作用, 联用可能导致 QT 间期延长。其发生机制: ① 这两种药物都有发生 QT 间期延长的风险, 联用风险可能增加; ② 胺碘酮通过 CYP3A4 酶代谢, 而氟康唑对该酶有抑制作用, 联用可能会减少胺碘酮的代谢消除, 进而增加 QT 间期延长的风险^[26]。除氟康唑外, 常用于治疗口腔念珠菌病的唑类药物有伊曲康唑^[14]。氟康唑是 CYP3A4 酶的中效抑制剂, 而伊曲康唑是强效抑制剂, 因此氟康唑与胺碘酮之间的相互作用相对较弱。根据文献报道, 氟康唑在每日剂量大于 200 mg 时, 才会与 CYP3A4 酶底物产生有临床意义的相互作用^[26], 因此氟康唑与胺碘酮应谨慎联用。基于以上分析并结合医师以往的临床用药经验, 决定给予患者氟康唑 (50 mg qd po)^[27]和制霉菌片 (50 万单位, tid, 口含)^[14], 连续治疗 2 周。治疗期间患者未发生 ADR, 2021 年 8 月 3 日复查唾液真菌培养, 结果为阴性。考虑到致病危险因素依旧存在, 给予患者 4% 碳酸氢钠漱口, 预防复发^[14]。

4 讨论

药师可通过口腔黏膜医药联合门诊参与到口腔疾病的药物治疗管理中。药师在口腔黏膜医药联合门诊中不仅是医师开具处方的守门人, 同时也是患者用药疑问的解答者。例如提醒医师避免对蟑螂过敏的口腔溃疡患者开具康复新液; 合并患有黄斑病变的扁平苔藓患者, 避免使用硫酸羟氯喹片; 连续服用 4 d 硫酸羟氯喹片 (100 mg bid) 后发现怀孕 (孕周 < 4 周) 的扁平苔藓患者, 药师告知硫酸羟氯喹片在妊娠期服用风险较低, 经典工具书 *Drugs in Pregnancy and Lactation* 中将羟氯喹划分为妊娠期可能适用, 而且受精卵形成到着床 2 周, 符合“全或无”规律, 从而解除了患者焦虑紧张情绪^[28]。另外, 口腔黏膜医药联合门诊在一定程度上解决了口腔医院药师开设药学门诊面临的一些困难, 比如口腔疾病绝大多数以医师操作治疗为主, 只有少数疾病可能需要服用

药物治疗, 药师参与到治疗中的机会较少; 药师发现口腔疾病之外的慢性病用药问题, 由于没有内科医师 (例如心内科、内分泌科等), 患者难以直接与医师沟通解决等。因此, 口腔黏膜医药联合门诊是药师在口腔医院提供药学门诊服务的一种选择。

文中典型案例中, 药师发现患者患有 7 种慢性病, 每日服用 18 种药物, 由此引发了药源性口腔疾病和药物相互作用等相关思考。可见, 获取完整、准确的患者疾病史和用药史非常关键, 是提供其他药学服务的基础。口腔医师在诊疗过程中, 比较关注口腔疾病相关信息, 容易忽视其他疾病和用药情况。药师在口腔黏膜医药联合门诊中, 将慢性病和相关用药情况的问诊作为药学服务切入点, 恰好与口腔医师形成互补, 从而获取到完整的患者疾病史和用药史, 保障接下来的诊断准确、治疗安全有效。另外, 根据文献报道, 分析药物相互作用已在各种场景下证实, 可作为药学服务切入点^[2, 5, 29]。药师关注到患者同时服用多种药物, 当医师为其开具全身用药时, 通过药物相互作用分析, 发现了胺碘酮和氟康唑之间存在潜在的不良相互作用, 并协助医师为患者制订了安全、有效的治疗方案。相比内科医师, 口腔医师使用全身性治疗药物的机会较少, 在全身用药方面的经验相对少一些, 但是口腔黏膜疾病有时需要全身用药。因此, 在口腔黏膜医药联合门诊中, 药师可将规避不良药物相互作用作为药学服务切入点。

糖尿病常被认为是导致口腔念珠菌病的一个危险因素^[14]。但有研究显示, 非糖尿病人群和糖尿病患者患口腔假丝酵母菌病的概率相近^[19]。而且, 糖尿病患者患口腔假丝酵母菌病与糖化血红蛋白水平升高、中性粒细胞功能降低、唾液流量降低、唾液 pH 值降低以及唾液中假丝酵母菌数增加无关。目前尚无高可信度的临床研究支持糖尿病是导致口腔假丝酵母菌病的危险因素, 未来有必要进一步开展大样本临床研究探索 2 型糖尿病与口腔假丝酵母菌病之间的关系^[18]。因此, 在该病例中, 经过从疾病和药物角度综合分析, 医师和药师更倾向于认同与临床症状出现有密切时间关系的金刚烷胺是引起口腔念珠菌病的直接原因。发现药源性口腔疾病是药师在口腔黏膜医药联合门诊中一个重要的药学服务切入点, 药师平时应注意收集整理常见的药源性口腔疾病和相关药物信息, 在医药联合门诊中敏感地捕捉到相关患者, 并充分发挥判断 ADR 的专长, 协助医师诊断药源性口腔疾病。

5 小结

口腔黏膜医药联合门诊中存在诸多药学服务切入点,药师可从药学问诊、病因分析、治疗方案制订和患者用药教育等方面参与到口腔黏膜疾病治疗中,协助医师为患者提供安全、有效的诊疗服务。口腔黏膜医药联合门诊不仅是口腔医院药师发挥自身价值的一种选择,同时也是医院提升诊疗服务水平的一种方式。本文药师与医师密切协作的环节和方式对其他医院开设口腔黏膜医药联合门诊有一定的借鉴意义。

参考文献

- [1] 杨丽娟,甄健存,黄品芳,等.药学门诊标准制订与解析[J].医药导报,2022,41(10):1435-1438.
- [2] 张欢,刘少烽.中国医院药学门诊发展现状研究进展[J].中国处方药,2023,21(5):167-169.
- [3] 马葵芬,陈奕何,姜赛平,等.国外药师门诊的开设及作用评价[J].中国药理学杂志,2018,53(1):76-80.
- [4] Liu KK, Huang HX, Zhang L, et al. Effects of a physician-and pharmacist-managed clinic on pain management in cancer patients in China [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2021, 129(1): 36-43.
- [5] 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.
- [6] 蒋文硕,杨莉.694例癫痫医师药师联合门诊患者药品不良反应分析[J].中国药物警戒,2024,21(1):102-106.
- [7] 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.
- [8] Sweiss K, Calip GS, Wirth S, et al. Polypharmacy and potentially inappropriate medication use is highly prevalent in multiple myeloma patients and is improved by a collaborative physician-pharmacist clinic [J]. J Oncol Pharm Pract, 2020, 26(3): 536-542.
- [9] 杜新,夏立斌,周新卫,等.医师-药师联合门诊对急性冠脉综合征患者出院后随访的实践与分析[J].临床合理用药,2023,16(23):150-153.
- [10] 李亚,张寅斌,张莉,等.医师-药师联合门诊及“三级随访法”对中/重度癌性疼痛患者疗效及安全性的影响[J].医药导报,2024,43(5):809-813.
- [11] 李静,李静婷,姚伟珉,等.新型药学服务模式探索——某院开设医师-药师哮喘慢病管理联合门诊的现状与成效[J].中南药学,2020,18(1):158-162.
- [12] 陈明晖,姚文涛,邱寒骁.医师与中药师联合在呼吸科合理使用中成药管理中的应用[J].中医药管理杂志,2023,31(20):79-81.
- [13] Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis [J]. Postgrad Med J, 2002, 78(922): 455-459.
- [14] 国家卫生健康委员会.口腔念珠菌病诊疗指南(2022年版)[EB/OL].(2022-10-27)[2024-07-28].<http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7659/202210/a19e8d0e0c25475fb-c8958ed670893c8/files/f8e8c79a52e24707a295a21bbe-f7e94e.pdf>.
- [15] 杭州中美华东制药有限公司.盐酸金刚烷胺颗粒说明书[EB/OL].(2015-07-13)[2024-07-28].<https://zy.yaozh.com/instruct/sms20210729/1438654993806.pdf>.
- [16] 杨华,魏晶,王嘉亿,等.药品不良反应/事件报告评价方法研究[J].中国药物警戒,2009,6(10):581-584.
- [17] World Health Organization. Reported potential side effects [EB/OL].(2023-04-06)[2024-07-28].<https://www.vigiaccess.org/>.
- [18] Mussi MCM, Fernandes KS, Gallottini MHC. A call for further research on the relation between type 2 diabetes and oral candidiasis [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2022, 134(2): 206-212.
- [19] Martorano-Fernandes L, Dornelas-Figueira LM, Marcello-Machado RM, et al. Oral candidiasis and denture stomatitis in diabetic patients: systematic review and meta-analysis [J]. Braz Oral Res, 2020, 34: e113.
- [20] 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.
- [21] Babu NA, Anitha N. Hyposalivation and oral candidiasis-A short review [J]. J Oral Maxillofac Pathol, 2022, 26(2): 144-146.
- [22] FDA. Pramipexole dihydrochloride [EB/OL].(2021-07-12)[2024-07-28].https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/020667s0441bl.pdf.
- [23] FDA. Amantadine hydrochloride [EB/OL].(2021-02-01)[2024-07-28].https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/208944s0041bl.pdf.
- [24] Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America [J]. Clin Infect Dis, 2016, 62(4): e1-e50.
- [25] UpToDate®. 成人口咽假丝酵母菌病 [EB/OL].(2024-03-06)[2024-07-28].<https://www.uptodate.cn/contents/zh-Hans/oropharyngeal-candidiasis-in-adults?csi=b2eef02a-4471-4e93-899b-259c2e1e10b7>.
- [26] UpToDate®. 唑类药物的药理学 [EB/OL].(2025-04-07)[2025-04-25].<https://www.uptodate.com/contents/zh-Hans/pharmacology-of-azoles?csi=c58d3227-bdf6-414d-9cb6-b3daf5f4b695>.
- [27] Ok SM, Ho D, Lynd T, et al. *Candida* infection associated with salivary gland-a narrative review [J]. J Clin Med, 2020, 10(1): 97.
- [28] Briggs GG, Freeman RK. Drugs in pregnancy and lactation: a reference guide to fetal and neonatal risk [M]. 10th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2015: 3904.
- [29] 梁兴发,黄怡新,尚翔,等.莫西沙星与非甾体抗炎药潜在药物相互作用致不良反应1例[J].中南药学,2024,22(7):1963-1965.

(收稿日期:2024-08-01;修回日期:2024-10-11)

奈玛特韦在我国重型新型冠状病毒感染患者中的 群体药代动力学及疗效研究

付饶^{1,2}, 陈金兰³, 谭凌³, 李颖^{1,2}, 王峰^{1,2}, 陈燕⁴, 曾慧卉⁴, 张毕奎^{1,2}, 向大雄^{1,2}, 蔡骅琳^{1,2}, 徐萍^{1,2}, 周艳钢^{1,2*} (1. 中南大学湘雅二医院药学部, 长沙 410011; 2. 中南大学临床药理研究所, 长沙 410012; 3. 中南大学湘雅二医院心血管外科, 长沙 410011; 4. 中南大学湘雅二医院呼吸与危重症医学科, 长沙 410011)

摘要: **目的** 描述奈玛特韦在危重症患者中的药代动力学 (PK) 特征, 并评估奈玛特韦/利托那韦治疗重型新型冠状病毒感染患者的疗效和安全性。**方法** 本研究对象是诊断为重型新型冠状病毒感染并接受奈玛特韦/利托那韦治疗的危重症患者, 通过全自动二维液相色谱法分析奈玛特韦的血药浓度, 使用 Phoenix NLME 软件进行群体药代动力学 (PPK) 分析, 结合患者 28 d 的全因死亡率、重型急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 型病毒 (SARS-CoV-2) 的循环阈值 (CT), 以及治疗前后世界卫生组织临床进展量表评分评估奈玛特韦/利托那韦的疗效和安全性。**结果** 共纳入 25 名符合标准的患者, 并基于 102 个奈玛特韦的血药浓度建立了 PPK 模型。奈玛特韦的 PK 特征符合一室模型, 表观清除率 (CL/F)、表观分布容积 (V/F) 和一阶吸收速率常数 (K_a) 分别为 $2.28 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ 、 60.9 L 和 0.55 h^{-1} , 肌酐清除率是影响奈玛特韦清除率的唯一协变量。25 名患者的 28 d 全因死亡率为 72%。奈玛特韦/利托那韦显著降低了 SARS-CoV-2 的病毒载量, 12 名患者在治疗后实现了 SARS-CoV-2 的清除。**结论** 奈玛特韦的清除速率在重型新型冠状病毒感染的危重症患者中偏低, 应基于患者的肾功能进行剂量调整。奈玛特韦/利托那韦可有效降低 SARS-CoV-2 的病毒载量, 但未能降低重型新型冠状病毒感染的危重症患者的死亡率。

关键词: 新型冠状病毒感染; 奈玛特韦; 危重症患者; 群体药代动力学

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)05-1439-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.040

Population pharmacokinetic analysis and efficacy of nirmatrelvir in Chinese critically ill patients with severe COVID-19 infection

FU Rao^{1,2}, CHEN Jin-lan³, TAN Ling³, LI Ying^{1,2}, WANG Feng^{1,2}, CHEN Yan⁴, ZENG Hui-hui⁴, ZHANG Bi-kui^{1,2}, XIANG Da-xiong^{1,2}, CAI Hua-lin^{1,2}, XU Ping^{1,2}, ZHOU Yan-gang^{1,2*} (1. Department of Pharmacy, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011; 2. Institute of Clinical Pharmacology, Central South University, Changsha 410012; 3. Department of Cardiovascular Surgery, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011; 4. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011)

Abstract: Objective To characterize the pharmacokinetic (PK) character of nirmatrelvir in critically ill patients, as well as the efficacy and safety of nirmatrelvir/ritonavir for severe COVID-19 infection.

Methods Critically ill patients who were diagnosed with severe COVID-19 infection and treated with nirmatrelvir/ritonavir were enrolled. Nirmatrelvir plasma concentrations were analyzed by automatic 2-dimensional liquid chromatography. Population PK (PPK) was analyzed with Phoenix NLME software. The efficacy and safety of nirmatrelvir/ritonavir were evaluated based on the 28 day all-cause mortality rate of the patient, the circulating threshold (CT) of severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 (SARS-CoV-2), and the World Health Organization Clinical Progression Scale scores before and after

作者简介: 付饶, 女, 药师, 主要从事药物毒理学研究, email: furao1030@outlook.com *通信作者: 周艳钢, 女, 副主任药师, 主要从事抗菌药物药代动力学和药效学研究, email: zhouyangang@csu.edu.cn

the treatment. **Results** Totally 25 patients who met the criteria were enrolled and the PPK model was developed based on 102 plasma concentrations. The PK characteristic of nirmatrelvir was well described by a one-compartment model with CL/F , V/F , and K_a of $2.28 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, 60.9 L and 0.55 h^{-1} , respectively. Creatinine clearance was identified as a covariate on the clearance of nirmatrelvir. The 28 d all-cause mortality was 72%. Nirmatrelvir/ritonavir obviously reduced the virus load of SARS-CoV-2 and 12 patients achieved SARS-CoV-2 RNA clearance after the treatment. **Conclusion** Dose should be adjusted based on renal function if nirmatrelvir/ritonavir clearance is low in critically ill patients. Nirmatrelvir/ritonavir can effectively reduce SARS-CoV-2 virus load, but fail to reduce the mortality rate.

Key words: COVID-19; nirmatrelvir; critically ill patient; population pharmacokinetics

由重型急性呼吸综合征冠状病毒 2 型 (SARS-CoV-2) 引起的新型冠状病毒感染是 21 世纪对公共卫生的最大威胁之一^[1-3]。截至 2024 年 6 月 23 日, 全球已报告超过 7.75 亿例确诊病例和 700 多万例死亡病例。

世界卫生组织 (WHO) 指南建议将奈玛特韦/利托那韦用于治疗伴有进展为重症高风险的轻至中型新型冠状病毒感染的成人和儿科患者 (≥ 12 岁, 体重至少 40 kg)^[5-6]。奈玛特韦是一种新型 SARS-CoV-2 蛋白酶抑制剂, 靶向抑制 SARS-CoV-2 中的 3CL^{pro} 蛋白酶, 阻断病毒多聚蛋白的加工, 从而阻止病毒的复制。利托那韦则是一种人类免疫缺陷病毒 1 型 (HIV-1) 蛋白酶抑制剂, 与奈玛特韦联合使用时作为细胞色素 P450 3A4 酶的抑制剂, 可以减少奈玛特韦的代谢, 长时间维持有效血药浓度。与利托那韦联用后, 奈玛特韦主要经肾脏清除^[7-9]。

指南推荐奈玛特韦/利托那韦用于治疗轻型至中型的新型冠状病毒感染患者, 但许多重型新型冠状病毒感染患者也同样使用奈玛特韦/利托那韦治疗^[10-12]。然而, 目前仍缺乏奈玛特韦在重型冠肺炎感染患者中的疗效、安全性和药代动力学 (PK) 数据。虽然奈玛特韦的 PK 特征已在健康志愿者和轻度至中度肾损伤患者中得到验证, 但在重度肾损伤或需要血液透析治疗的患者中的 PK 数据非常有限, 因此仍然缺少针对这些患者的剂量推荐。此外, 奈玛特韦的口服生物利用度显示出较大的个体差异^[13-14]。对于危重症患者, 低蛋白血症和肾功能低下是常见的并发症, 且大多数危重症患者无法正常进食并存在胃肠道功能障碍, 这可能导致更大的个体差异^[15], 以及更复杂的 PK 特征。因此, 有必要对重型新型冠状病毒感染的患者进行奈玛特韦的相关研究。

本研究的主要目的是考察奈玛特韦在重型新型冠状病毒感染患者中的群体药代动力学特征 (PPK), 并评估奈玛特韦/利托那韦用于治疗重型新型冠状病毒感染患者的有效性和安全性。

1 材料

二维液相色谱全自动耦合仪器购自湖南德米特科技有限公司; 由日本岛津 LC-20AT CL 色谱泵、SIL-40AC XR 自动采样器装置、CBM-20A CL 控制器、LCMS-2050 检测器、Labsolution ver.592 工作站, 以及湖南德米特科技有限公司 MS-Mate 9500 耦合仪器组成。

内标奈玛特韦标准溶液 (IS) (辉瑞公司); 奈玛特韦/利托那韦 (Paxlovid, 辉瑞)。

使用 Phoenix NLME 软件 (version 8.1. Pharsight, A Certara Company, USA)、SPSS 27.0 (IBM Company) 软件进行分析。

2 方法

2.1 研究设计

这项前瞻性研究纳入了 2022 年 12 月至 2023 年 2 月在中南大学湘雅二医院两个重症监护室 (ICU) 治疗的危重症患者。纳入标准为: ① 年龄 ≥ 18 岁; ② 诊断为重型新型冠状病毒感染; ③ 接受奈玛特韦/利托那韦 (Paxlovid, 辉瑞) 治疗; ④ 收集至少一个血液样本用于检测奈玛特韦浓度。

从电子病历中收集患者信息, 包括年龄、性别、病史、奈玛特韦/利托那韦剂量及疗程 (5 d 内或 5 d 以上)、合并用药、并发症和实验室检查结果。肌酐清除率 ($CrCl$) 根据慢性肾脏病流行病学协作 (CKD-EPI) 公式计算。轻度、中度和重度肾损伤分别定义为 $CrCl$: $60 \sim 90 \text{ mL}/(\text{min} \cdot 1.73 \text{ m}^2)$ 、 $CrCl$: $30 \sim 60 \text{ mL}/(\text{min} \cdot 1.73 \text{ m}^2)$ 和 $CrCl \leq 30 \text{ mL}/(\text{min} \cdot 1.73 \text{ m}^2)$ ^[16]。使用 2019-nCoV 核酸诊断试剂盒 (Sansure Biotech, 中国湖南) 进行基因靶标: 核衣壳 (N) 和开放阅读框 1ab (ORF1ab) PCR 监测, 循环阈值 (CT) < 40 , 判定为新型冠状病毒感染。在治疗结束时进行疗效评估, 并记录从奈玛特韦/利托那韦治疗开始的 28 d 死亡率。本研究已获得中南大学湘雅二医院伦理委员会的批准 (No. LYF2023003), 并获得所有患者或患者法定代理人的知情同意。

2.2 奈玛特韦浓度测定

2.2.1 给药剂量及取样 患者根据肾功能, 分别给予奈玛特韦/利托那韦 300/100 mg q12h、150/100 mg q12h 或 150/100 mg qd。在第三剂奈玛特韦/利托那韦分别给药后 0、3、6 和 9 h 采集 2 mL 血液, $3000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液, 立即放至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

2.2.2 样品处理 将 200 μL 血浆样品加入 200 μL 体积的 MARG-1 中以沉淀蛋白质。涡旋振荡 1 min, 以 $14\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 8 min, 将 500 μL 上清液转移到自动进样瓶中。

2.2.3 测定条件 色谱柱为 ADME 柱 ($3.0\text{ mm}\times 50\text{ mm}$, $3\text{ }\mu\text{m}$, ANAX, 中国); 流动相为 MMA-2A-BMB-2A 的 60:40 (V/V) 溶液; 所选的奈玛特韦的质量转换为 500 m/z ; 流速: $0.7\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 共运行 3 min。线性范围为 $52.08\sim 10\,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。日内和日间精密度 $RSD < 4\%$, 准确度在 $99.1\%\sim 99.8\%$ 。

2.3 群体药代动力学模型

运用 Phoenix NLME 软件采用一阶条件估计扩展最小二乘法 (FOCE-ELS) 建立 PPK 模型。基于目标函数值 (OFV) 对一室和二室模型进行结构模型选择评估。个体间变异性 (残差) 使用加法、比例或混合模型进行描述。本分析采用逐步协变量建模 (SCM) 法对考察协变量对模型的影响, 包括年龄、性别、体重、谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、总胆红素 (TBIL)、直接胆红素 (DBIL)、血清白蛋白 (ALB)、血红蛋白 (HB) 和 $CrCl$ 。SCM 由正向选择步骤 ($\Delta\text{OFV} \geq 3.84$, $P \leq 0.05$) 和反向消除步骤 ($\Delta\text{OBV} \geq 10.83$, $P \leq 0.001$) 组成。此外, 拟合优度图用于评估 PPK 模型的有效性, 预测校正视觉预测检验 (pcVPC) 用于评估最终模型的预测性能。使用非参数自举法 (1000 次重抽样) 评估模型稳定性。根据经验自举分布计算中位数、标准误差 (SE) 和变异系数 (CV%), 并将估算值与最终模型的参数估算值进行比较。

基于经验贝叶斯 (EBEs) 计算个体 PK 参数, 包括药时曲线下面积 (AUC), 稳态峰、谷浓度 ($C_{\max}$ 和 $C_{\min}$), 达峰时间 ($t_{\max}$) 和终末半衰期 ($t_{1/2}$)。

2.4 终点指标

疗效的主要终点指标是从奈玛特韦/利托那韦治疗开始的 28 d 全因死亡率。次要终点指标包括 SARS-CoV-2 RNA 清除、SARS-CoV-2 RNA 清除的持续时间、通过 *N* 和 *ORF1ab* 基因 CT 值估计的病毒载量, 以及治疗前后 WHO 临床进展量表评分的变化 (范围为 0 至 10, 评分越高表示临

床状况越差)^[16]。为了考察患者因素及治疗方案对 SARS-CoV-2 RNA 病毒清除的影响, 对患者病理生理参数及奈玛特韦/利托那韦治疗方案等相关因素进行逻辑回归分析。

2.5 统计分析

采用 SPSS 27.0 软件进行统计分析。连续变量表示为 $\bar{x}\pm s$, 中位数和四分位数间距 (IQR) 表示为异常分布的数据, 分类变量表示为计数和百分比。对所有变量进行单因素回归分析, 以确定疗效的可能预测因素, 将 $P < 0.05$ 的变量纳入进一步多元逻辑回归分析。 $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 人口学特征

本研究符合纳入标准的患者共 25 名, 男女比例约为 7:1, 患者基本人口学信息及临床指标见表 1。5 名患者接受了血液透析治疗, 对于轻度、中度肾损伤的患者, 分别给予标准剂量 (300 mg q12h) 和减半剂量 (150 mg q12h) 的奈玛特韦与 100 mg 的利托那韦。由于现有研究数据的缺乏, 重度肾损伤的患者暂无推荐剂量, 根据前期研究结果采用 150 mg 奈玛特韦以及 100 mg 利托那韦每日一次的给药方案^[17]。由于患者均处于镇静状态, 奈玛特韦/利托那韦以鼻饲的方式进行给药。

3.2 PPK 模型及奈玛特韦浓度

PPK 模型是基于从 25 名患者中获得的 102 个血药浓度数据建立的, 平均每位患者贡献了 4 个临床血液样本。基础模型为一级线性消除的一室模型, $CrCl$ 是唯一显著影响奈玛特韦表观清除率 (CL/F) 的协变量。使用比例残差模型来评估残差变异性, 最终模型中的拟合优度图如图 1 所示, 结果表明, 最终模型的结构没有偏差, 模型可靠。pcVPC 的结果如图 2 所示, 大多数浓度在 90% 置信区间内, 表明最终模型能较好地描述原始数据。在最终模型中, CL/F 和表观分布容积 (V/F) 分别为 $2.28\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ 和 60.9 L。最终 PPK 模型方程如下: $CL/F = 2.28 \times (CrCl/31.49)^{0.57} \times e^{\theta_2} V/F = 60.9 \times e^{\theta_V}$ 。

由于本模型中一阶吸收速率常数 (K_a) 相对标准误差 (RSE) 和收缩率较大 (分别为 89% 和 100%), 因此本研究参考已发表的奈玛特韦 PK 模型, 将 K_a 值固定为 0.55 h^{-1} ^[18]。最终 PPK 模型及非参数自举法的参数估算结果如表 2 所示。

在 25 名患者中, $AUC_{0\sim 12\text{ h}}$ 、 $C_{\max}$ 、 $C_{\min}$ 、 $t_{1/2}$ 的中位数分别为 $107.0\text{ mg}/(\text{h}\cdot\text{L})$ (IQR: 66.1, 135.1 $\text{mg}/(\text{h}\cdot\text{L})$)、 $9.84\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (IQR: 6.40, 13.3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、5.62 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (IQR: 4.42, 9.84 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 17.8 h (IQR: 9.15, 26.5 h)。由于固定了 K_a , $t_{\max}$ 为 2 h 或 4 h。

表 1 25 例患者的人口统计数据
Tab 1 Demographic data for 25 patients

变量	数值 ^a
人口统计学资料	
年龄 / 岁	73.0 (62.0, 85.0)
性别 (男性)	22 (88)
体重 / kg	75.0 (65.0, 75.8)
体质量指数 (BMI) / (kg · m ²)	24.9 (23.3, 27.5)
并发症 [n (%)]	
高血压	5 (20)
心血管疾病	16 (64)
脑梗死	13 (52)
糖尿病	10 (40)
慢性阻塞性肺疾病	5 (20)
肾移植术后	3 (12)
呼吸衰竭	13 (52)
临床指标	
基线白蛋白 / (g · L ⁻¹)	29.3 (27.0, 31.1)
基线血尿素氮 / (mmol · L ⁻¹)	15.9 (10.7, 25.7)
基线肌酐值 / (μmol · L ⁻¹)	186.42 (69.65, 252.4)
基线 CrCl/[mL / (min · 1.73 m ²)]	52.0 (26.0, 103.5)
CrCl ≥ 60	11 (44)
CrCl = 30 ~ 59	5 (20)
CrCl < 30	9 (36)
基线 WHO 临床进展量表评分	8.0 (6.0, 9.0)
机械通气	20 (80)
APACHE II 评分	19.0 (14.0, 22.5)
奈玛特韦 / 利托那韦剂量	
300/100 mg q12 h	15 (60)
150/100 mg q12 h	5 (20)
150/100 mg qd	5 (20)
奈玛特韦 / 利托那韦疗程	
0 ~ 5 d	13 (52)
> 5 d	12 (48)

注：^a分类数据以 n (%)，连续数据以四分位间距中位数表示。

Note: ^aCategorical data are expressed as number (%), continuous data are expressed as median with interquartile range.

根据 CrCl 将患者分为正常 + 轻度肾损伤组 [$CrCl \geq 60 \text{ mL} / (\text{min} \cdot 1.73 \text{ m}^2)$]、中度肾损伤组 [$CrCl = 30 \sim 59 \text{ mL} / (\text{min} \cdot 1.73 \text{ m}^2)$]、重度肾损伤组 [$CrCl \leq 30 \text{ mL} / (\text{min} \cdot 1.73 \text{ m}^2)$]。剂量调整后，不同肾功能组患者中奈玛特韦的 $AUC_{0 \sim 12 \text{ h}}$ [(87.39 ± 38.14) vs (103.30 ± 53.11) vs 129.41 ± 66.53 mg / (h · L)], C_{max} [(8.57 ± 3.52) vs (9.41 ± 4.96) vs (12.21 ± 6.36) mg · L⁻¹], C_{min} [(5.47 ± 3.05) vs (7.39 ± 3.71) vs (8.82 ± 5.00) mg · L⁻¹] 以及 $t_{1/2}$ [(13.59 ± 8.92) vs (30.56 ± 30.77) vs (22.42 ± 9.55) h], 无明显差异 (见图 3)。

3.3 终点指标

在 25 名患者中，28 d 全因死亡率为 72%，经过治疗后 12 名患者的 PCR 检测结果转为阴性，从开始奈玛特韦治疗到 PCR 检测结果转阴的中位时间为 8.50 d (IQR: 7.50, 15.0)。此外，3 名患者

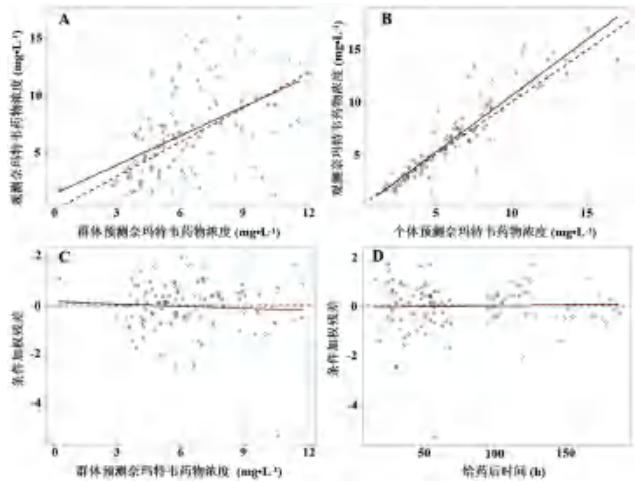


图 1 最终模型的拟合优度图

Fig 1 Goodness-of-fit plots for the final model

A. 观测值和群体预测值 (observed concentrations versus population predicted concentrations); b. 观测值和个体预测值 (observed concentrations versus individual predicted concentrations); c. 条件加权残差与群体预测值 (conditional weighted residuals versus population predicted concentrations); d. 条件加权残差与时间 (conditional weighted residuals versus time)

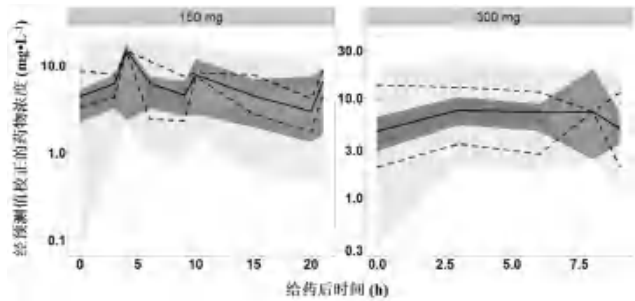


图 2 最终协变量模型在半对数坐标下的可视化预测检验图

Fig 2 Prediction corrected-visual check of the final model

在停止奈玛特韦 / 利托那韦治疗后 4 d 内 PCR 检测结果重新转为阳性。治疗结束后，患者的 SARS-CoV-2 CT 值显著升高 ($P < 0.05$)，表明病毒载量降低 (见图 4A)。治疗结束后 WHO 临床进展量表评分略高于治疗前，但无显著差异 (8.0, IQR: 6.75, 9.0 vs 9.0, IQR: 7.0, 10.0)。此外，治疗期间未观察到不良反应。逻辑回归分析未发现病毒清除失败的显著风险因素 (见表 3)。

4 讨论

在本研究中，笔者采用 25 名重型新型冠状病毒感染危重症患者的 102 个奈玛特韦血药浓度数据建立了 PPK 模型， CL/F 、 V/F 和 K_a 分别为 2.28 L · h⁻¹、60.9 L 和 0.55 h⁻¹。28 d 的全因死亡率为 72%。奈玛特韦 / 利托那韦显著降低了 SARS-CoV-2 病毒载量，25 名患者中的 12 名患者在治疗后实现了 SARS-CoV-2 病毒的清除。

表 2 奈玛特韦最终 PPK 模型的参数估计值及 Bootstrap 法结果

Tab 2 Population PK parameter estimates of nirmatrelvir in the final model and Bootstrap

最终模型			Bootstrap 法		
参数	估算值	RSE/%	参数	估算值	95%CI
固定效应			固定效应		
$CL/F / (L \cdot h^{-1})$	2.28	10	$CL/F / (L \cdot h^{-1})$	2.22	1.69 ~ 2.74
$V/F/L$	60.9	18	$V/F/L$	61	41.7 ~ 93.4
K_a/h^{-1}	0.55 (fix)	—	K_a/h^{-1}	0.55 (fix)	—
$CrCl-CL$	0.571	21	$CrCl-CL$	0.568	0.299 ~ 0.937
随机效应 /%			随机效应 /%		
ω_{CL}	45.3	19	ω_{CL}	40.9	21.5 ~ 61.3
ω_V	80.8	15	ω_V	76.8	34.4 ~ 107
残差 /%			残差 /%		
比例残差	29.3	23	比例残差	28.3	16.4 ~ 42.6

注: $CrCl-CL$, $CrCl$ 对清除率的影响因素; CI , 置信区间; ω , 个体间变异。

Note: $CrCl-CL$, the influence factor of $CrCl$ on clearance; CI , confidence interval; ω , interindividual variation.

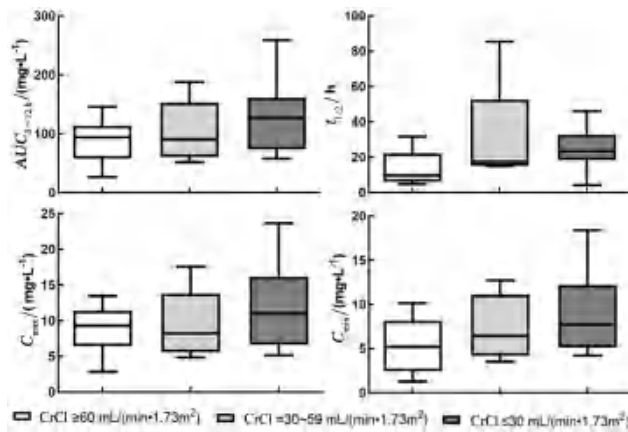


图 3 不同肾功能组的奈玛特韦血药浓度及终末半衰期

Fig 3 Nirmatrelvir concentrations and $t_{1/2}$ in different renal function groups

4.1 奈玛特韦 / 利托那韦在重型新型冠状病毒感染危重患者中的药代动力学

在本研究中, 分别尝试使用一室模型和二室模型对奈玛特韦进行建模, 结果提示, 一室模型拟合效果更好, 这与研究报道的中国老年患者的奈玛特韦 PPK 模型一致^[19], 但在健康志愿者或轻、中型新型冠状病毒感染患者中建立的几个 PPK 模型则是二室模型^[17, 19-22]。这可能是由于我们研究中每位患者的血液样本有限。此外, 研究发现 K_a 存在较大的个体间差异, 可能是由于本研究中的患者均处于镇静状态, 无法自行吞咽, 必须将奈玛特韦溶解在水中, 然后通过鼻胃管给药, 导致药物吸收的个体差异较大^[23-24]。同时,

表 3 影响 SARS-CoV-2 清除率的单因素逻辑回归分析

Tab 3 Univariate logistic regression model for SARS-CoV-2 clearance

变量	病毒清除 ($n = 11$) ^a	病毒未清除 ($n = 14$) ^a	P 值
临床指标			
基线白蛋白 / ($g \cdot L^{-1}$)	31.1 (27.5, 33.6)	27.6 (23.2, 30.6)	0.06
基线肌酐值 / ($\mu mol \cdot L^{-1}$)	141.7 (68.0, 296.0)	156.1 (81.5, 270.0)	0.98
基线肌酐清除率 / [$mL / (min \cdot 1.73 m^2)$]	54.0 (25.0, 128.0)	50.0 (26.0, 101.3)	0.74
机械通气	8 (72.7)	12 (85.7)	0.20
APACHE II 评分	18.0 (14.0, 26.0)	19.0 (13.8, 22.3)	0.91
死亡率	7 (63.6)	11 (78.6)	0.48
基线 WHO 临床进展量表评分	8.0 (6.0, 9.0)	8.0 (6.75, 9.0)	0.78
奈玛特韦 / 利托那韦疗程	6.0 (5.0, 9.0)	5.0 (4.75, 8.25)	0.54
奈玛特韦 / 利托那韦剂量			
300/100 mg q12h	5 (45.5)	10 (71.4)	0.11
150/100 mg q12h	4 (36.4)	3 (21.4)	0.24
150/100 mg qd	2 (18.1)	1 (7.2)	0.44
奈玛特韦血药浓度			
$AUC_{0 \sim 12h}$	93.6 (69.2, 126.6)	112.3 (48.6, 156.2)	0.53
C_{max}	8.24 (6.42, 13.2)	10.0 (5.62, 15.6)	0.32
C_{min}	5.61 (4.62, 9.88)	7.50 (3.12, 10.5)	0.38

注: ^a 分类数据以 n (%), 连续数据以四分位间距中位数表示。

Note: ^a Categorical data are expressed as number (%), continuous data are expressed as median with interquartile range.

危重症患者的病理生理状态也会影响药物的口服生物利用度^[25-26], 使得个体差异更显著。

奈玛特韦在危重症患者中的 CL/F 为 $2.28 L \cdot h^{-1}$, 远低于健康志愿者 ($8.36 L \cdot h^{-1}$)^[17, 20, 22] 或中国老

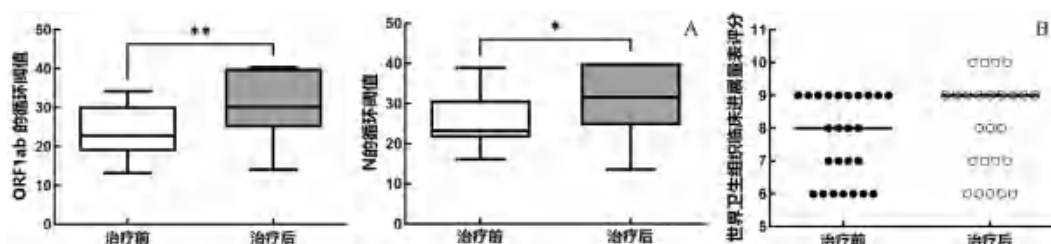


图4 奈玛特韦/利托那韦治疗前后 SARS-CoV-2 CT 值 (A) 及世界卫生组织临床进展量表评分 (B) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig 4 SARS-CoV-2 CT value (A) and World Health Organization (WHO) Clinical Progression Scale scores (B) before and after the nirmatrelvir/ritonavir treatment (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

年患者 ($4.16 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$)^[19], 但与重度肾损伤患者相当 ($2.27 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$)^[17]。不仅如此, 与西方或中国健康志愿者 (分别为 9.91 h 和 5.49 h) 以及其他重度肾损伤患者 (13.37 h) 相比, 危重症患者的 $t_{1/2}$ (17.8 h) 显著延长^[17, 19-21]。相应地, 奈玛特韦的 $AUC_{0 \sim 12 \text{ h}}$ 和 $C_{\max}$ 均明显高于健康志愿者 [$(107.0 \text{ mg}/(\text{h} \cdot \text{L}) \text{ vs } 23 \text{ mg}/(\text{h} \cdot \text{L}) \text{ 和 } 9.84 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ vs } 2.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1})$]^[21]。所有这些结果表明, 危重症患者对奈玛特韦的清除速率减慢, 导致药物暴露增加。可能的原因是: 首先, 奈玛特韦主要通过肾脏清除, $CrCl$ 是 CL/F 的重要协变量^[9]。Toussi 等^[17] 报道显示, 与肾功能正常组相比, 奈玛特韦在轻度、中度和重度肾损伤组的 AUC 分别高出 124%、187% 和 304%。本研究中, 大多数患者的肾功能下降 ($CrCl = 52.0$, IQR: $26.0, 103.5$), 因此可能导致清除速率减慢。其次, 本研究大多数患者是老年人, 白蛋白水平较低 (29.3 , IQR: $27.0, 31.1$)。Qu 等^[19] 发现, 中国老年人的奈玛特韦 AUC 大约是中国和西方年轻志愿者的 3 倍。奈玛特韦具有中等的蛋白质结合率 (69%), 低白蛋白血症可能会增加分布和消除, 从而增加药物的未结合浓度, 未结合浓度的增加可能会对药效学产生不可预测的影响, 并导致 PK 特征的显著变化^[27]。

目前, 由于数据的缺乏, 奈玛特韦/利托那韦在重度肾损伤患者中尚无推荐剂量。一项研究调查了奈玛特韦在肾损伤患者中的 PK 特征, 结果表明, 在健康志愿者中, 奈玛特韦的清除率比重度肾损伤的患者要高出 3 倍^[17]。根据这一结果, 在本研究中, 重度肾损伤患者每日服用 $150 \text{ mg}/100 \text{ mg}$, 与轻度、中度肾损伤组的 $AUC_{0 \sim 12 \text{ h}}$ 没有显著差异, 表明 $150 \text{ mg}/100 \text{ mg}$ 可能是适合重度肾损伤患者的合理剂量, 但仍需要进一步研究。

4.2 奈玛特韦/利托那韦在重型新型冠状病毒感染危重症患者中的疗效

在本研究中, 经过奈玛特韦/利托那韦治疗, 患者的病毒清除率为 40% ($12/25$), 证明该药有效地抑制了病毒复制。然而, 与轻型、中型患者不同的是, 尽管病毒载量显著降低, 但重型

新型冠状病毒感染患者的死亡率高达 72%, 显示出不良的预后^[10]。此外, 尽管没有观察到显著差异, 但在奈玛特韦治疗后 WHO 临床进展量表评分有增长的趋势, 尤其是在没有转阴的患者中趋势更高 (8.0 , IQR: $6.75, 9.0 \text{ vs } 9.0$, IQR: $7.0, 10.0$)。预后不良的可能原因如下: 首先, 奈玛特韦/利托那韦的给药时机不同。为了在早期抑制病毒复制, 应在感染后 5 d 内尽快给予奈玛特韦/利托那韦, 从而避免侵袭性炎症、高细胞介质症、组织损伤和全身衰竭^[28]。然而, 由于药物短缺, 供应不及, 本研究的患者都是在感染 5 d 后才开始接受奈玛特韦/利托那韦治疗。因此, 尽管病毒复制在高峰期后被有效阻断, 但它可能已经扩散到各个器官并诱导了“细胞因子风暴”(即与大量促炎细胞因子以及补体成分、凝血功能障碍和免疫“失调”的释放有关的不受控制的全身炎症反应), 从而导致多器官功能障碍。其次, 在本研究中, 大多数是患有心血管疾病 (64%) 和糖尿病 (40%) 的老年男性患者。研究报告, 年龄较大 (≥ 65 岁)、男性、高血压、心血管疾病、糖尿病和慢性阻塞性肺病与较高的新型冠状病毒感染死亡风险相关^[28]。

这项研究有几个局限性: 首先, 考虑到原始数据集的局限性 (例如样本量小, 吸收阶段的数据点很少), 我们必须固定 K_a 并使用一室模型来描述奈玛特韦的 PK 特征。所建立的模型可能无法很好地描述奈玛特韦在危重症患者中的吸收特征。其次, 由于 PPK 模型不稳定, 无法对剂量方案进行蒙特卡洛模拟, 因此, 没有针对不同程度肾损伤患者的奈玛特韦优化方案, 需要进一步大样本研究以阐明危重症患者的个体化剂量^[29-30]。

综上所述, 本研究考察了奈玛特韦在重型新型冠状病毒感染的危重症患者中的 PK 特征, 肌酐清除率是唯一影响奈玛特韦清除速率的协变量, 因此推荐基于肾功能进行剂量调整。奈玛特韦/利托那韦可安全用于危重症患者, 并有效降低 SARS-CoV-2 病毒载量。然而, 在危重症患者中使用奈玛特韦/利托那韦的益处尚不确定。

参考文献

- [1] Fang E, Liu X, Li M, et al. Advances in COVID-19 mRNA vaccine development [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7 (1): 94.
- [2] Yuan Y, Jiao B, Qu L, et al. The development of COVID-19 treatment [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1125246.
- [3] Kumar M, Al Khodor S. Pathophysiology and treatment strategies for COVID-19 [J]. *J Transl Med*, 2020, 18 (1): 353.
- [4] WHO. COVID-19 epidemiological update. Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-epidemiological-update-edition-169>.
- [5] Moshkovits I, Shepshelovich D. Emergency use authorizations of COVID-19-related medical products [J]. *JAMA Intern Med*, 2022, 182 (2): 228-229.
- [6] FDA. Emergency Use Authorization 105.2021; Available from: <https://www.fda.gov/media/155049/download>.
- [7] Hammond J, Leister-Tebbe H, Gardner A, et al. Oral nirmatrelvir for high-risk, nonhospitalized adults with COVID-19 [J]. *N Engl J Med*, 2022, 386 (15): 1397-1408.
- [8] Najjar-Debbiny R, Gronich N, Weber G, et al. Effectiveness of paxlovid in reducing severe coronavirus disease 2019 and mortality in high-risk patients [J]. *Clin Infect Dis*, 2023, 76 (3): e342-e349.
- [9] Saravolatz LD, Depcinski S, Sharma M. Molnupiravir and nirmatrelvir-ritonavir: oral coronavirus disease 2019 antiviral drugs [J]. *Clin Infect Dis*, 2023, 76 (1): 165-171.
- [10] Liu J, Pan X, Zhang S, et al. Efficacy and safety of Paxlovid in severe adult patients with SARS-CoV-2 infection: a multicenter randomized controlled study [J]. *Lancet Reg Health West Pac*, 2023, 33: 100694.
- [11] Yang MJ, Jiang L, Xu L, et al. Association between paxlovid and mortality rates in critically ill patients with COVID-19 receiving invasive mechanical ventilation: a retrospective cohort study [J]. *Chest*, 2023, 165 (1): 128-131.
- [12] China NHCotPsRo Guidelines on the Diagnosis and treatment of COVID-19 (ninth trial edition) 2022.2022; Available from: <http://www.nhc.gov.cn/ylyjs/pqt/202301/ad34a9b-598654b90a5c8c99440cce21b/files/754297ec20cd40eebb-7fe18828d8ed31.pdf>.
- [13] Kato M, Chiba K, Hisaka A, et al. The intestinal first-pass metabolism of substrates of CYP3A4 and P-glycoprotein-quantitative analysis based on information from the literature [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2003, 18 (6): 365-72.
- [14] Owen DR, Allerton CMN, Anderson AS, et al. An oral SARS-CoV-2 M (pro) inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19 [J]. *Science*, 2021, 374 (6575): 1586-1593.
- [15] Boonpeng A, Jaruratanasirikul S, Jullangkoon M, et al. Population pharmacokinetics/pharmacodynamics and clinical outcomes of meropenem in critically ill patients [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2022, 66 (11): e0084522.
- [16] Cao ZJ, Gao WY, Bao H, et al. VV116 versus Nirmatrelvir-Ritonavir for Oral Treatment of Covid-19 [J]. *N Engl J Med*, 2023, 388 (5): 406-417.
- [17] Toussi SS, Neutel JM, Navarro J, et al. Pharmacokinetics of oral nirmatrelvir/ritonavir, a protease inhibitor for treatment of COVID-19, in subjects with renal impairment [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2022, 112 (4): 892-900.
- [18] Sagawa K, Lin J, Jaini R, et al. Physiologically-based pharmacokinetic modeling of PAXLOVID™ with first-order absorption kinetics [J]. *Pharm Res*, 2023, 40 (8): 1927-1938.
- [19] Qu YC, Su CJ, Xiang Z, et al. Population pharmacokinetic modeling and simulation for nirmatrelvir exposure assessment in Chinese older patients with COVID-19 infection [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2023, 189: 106535.
- [20] Singh RSP, Toussi SS, Hackman F, et al. Innovative randomized phase I study and dosing regimen selection to accelerate and inform pivotal COVID-19 trial of nirmatrelvir [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2022, 112 (1): 101-111.
- [21] Liu CX, Zhu MQ, Cao LY, et al. Simultaneous determination of nirmatrelvir and ritonavir in human plasma using LC-MS/MS and its pharmacokinetic application in healthy Chinese volunteers [J]. *Biomed Chromatogr*, 2022, 36 (11): e5456.
- [22] Chan PLS, Singh RSP, Cox DS, et al. Dosing recommendation of nirmatrelvir/ritonavir using an integrated population pharmacokinetic analysis [J]. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*, 2023, 12 (12): 1897-1910.
- [23] Gimenes FRE, Baysari M, Walter S, et al. Are patients with a nasally placed feeding tube at risk of potential drug-drug interactions? A multicentre cross-sectional study [J]. *PLoS One*, 2019, 14 (7): e0220248.
- [24] Wang MZ, Xu X, Wu S, et al. Risk factors for ventilator-associated pneumonia due to multi-drug resistant organisms after cardiac surgery in adults [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2022, 22 (1): 465.
- [25] Roberts DJ, Hall RI. Drug absorption, distribution, metabolism and excretion considerations in critically ill adults [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2013, 9 (9): 1067-84.
- [26] Southren DL, Nardone AD, Haastrup AA, et al. An examination of gastrointestinal absorption using the acetaminophen absorption test in critically ill patients with COVID-19: a retrospective cohort study [J]. *Nutr Clin Pract*, 2021, 36 (4): 853-862.
- [27] Ulldemolins M, Roberts JA, Rello J, et al. The effects of hypoalbuminaemia on optimizing antibacterial dosing in critically ill patients [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2011, 50 (2): 99-110.
- [28] Trougakos IP, Stamatelopoulou K, Terpos E, et al. Insights to SARS-CoV-2 life cycle, pathophysiology, and rationalized treatments that target COVID-19 clinical complications [J]. *J Biomed Sci*, 2021, 28 (1): 9.
- [29] Parohan M, Yaghoubi S, Seraji A, et al. Risk factors for mortality in patients with Coronavirus disease 2019 (COVID-19) infection: a systematic review and meta-analysis of observational studies [J]. *Aging Male*, 2020, 23 (5): 1416-1424.
- [30] Wunsch H. Mechanical ventilation in COVID-19: interpreting the current epidemiology [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2020, 202 (1): 1-4.

(收稿日期: 2024-08-05; 修回日期: 2024-10-05)

内蒙古乌兰察布市农牧民安全用药现状调查及其影响因素研究

李学粉¹, 杜银环², 张叶叶³, 曹俊彦¹, 韩国庆¹, 康学英¹, 于蕾^{1*} (1. 内蒙古自治区中医医院, 呼和浩特 010020; 2. 武警内蒙古总队医院, 呼和浩特 010000; 3. 乌兰察布市中心医院, 内蒙古 乌兰察布 012000)

摘要: **目的** 了解内蒙古乌兰察布市农牧民用药知识-态度-行为 (knowledge-attitude-practice, KAP) 的现状, 分析农牧民用药风险的影响因素, 为有针对性地开展合理用药科普提供依据。**方法** 采用线上和线下问卷调查法, 于 2022 年 10—12 月对内蒙古乌兰察布市农牧民进行问卷调查, 分析农牧民用药知识-态度-行为, 并探讨影响因素。**结果** 共获得有效问卷 523 份。农牧民用药知识、态度、行为平均得分分别为 (77.24±17.05)、(18.83±2.62)、(58.84±7.87) 分; 达到问卷评价标准中的良好、及格、良好; 多重线性回归结果表明, 年龄和受教育程度是影响农牧民用药知识、态度、行为的显著因素。**结论** 内蒙古乌兰察布市农牧民安全用药常识较缺乏, 用药时存在诸多风险用药行为, 用药教育活动缺乏且不能深入群众, 应加大用药宣教力度, 针对特殊人群尤其是老年人、文化程度低人群的用药教育, 促进合理用药。

关键词: 知识-态度-行为; 用药风险; 安全用药; 影响因素

中图分类号: R95

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)05-1446-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.041

Safe medication and influential factors study among farmers and herdsmen in Ulanqab City of Inner Mongolia

LI Xue-fen¹, DU Yin-huan², ZHANG Ye-ye³, CAO Jun-yan¹, HAN Guo-qing¹, KANG Xue-ying¹, YU Lei^{1*} (1. Inner Mongolia Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hohhot 010020; 2. Armed Police Corps Hospital of Inner Mongolia, Hohhot 010000; 3. Ulanqab Central Hospital, Ulanqab Inner Mongolia 012000)

Abstract: Objective To determine the current status of knowledge, attitude, practice (KAP) of medications among farmers and herdsmen in Ulanqab City of Inner Mongolia, and to analyze potential risk factors for drug use and popularize rational drug use. **Methods** Online and offline questionnaires were used for farmers and herdsmen in Ulanqab City of Inner Mongolia from October to December 2022, to analyze their KAP of drug use, and influence factors. **Results** Totally 523 valid questionnaires were obtained. The average scores of medication knowledge, attitude, practice of farmers and herdsmen were (77.24±17.05), (18.83±2.62) and (58.84±7.87), respectively, corresponding to “good” “pass” and “good” in the evaluation criteria. The multiple linear regression showed that age and education level were important factors for the KAP of farmers and herdsmen on drug use. **Conclusion** Farmers and herdsmen in Ulanqab City of Inner Mongolia lack knowledge of safe drug use. Some dangerous drug use behaviors exist, since drug education is lacking among the masses. Drug education should be strengthened to promote rational drug use for special groups, especially the elderly and people with low education level.

Key words: knowledge-attitude-practice; medication risk; medication safety; influential factor

基金项目: 中国药学会全国医药经济信息网科技传播创新工程项目 (No.CMEI2022KPYJ00147); 国家中医优势专科建设项目 (国中医药政函〔2024〕90 号); 2022 年度内蒙古自治区“草原英才”工程青年创新创业人才; 2024 年度国家中医药管理局全国老药工传承工作室 (No.CZ000341)。

作者简介: 李学粉, 女, 主管药师, 主要从事临床药理学和药理学研究, email: lixuefen0919@163.com *通信作者: 于蕾, 女, 主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事医院药学和药事管理研究, email: yulei3291@163.com

用药安全对于保障公众健康发挥至关重要的作用,如何切实维护居民在用药过程中的安全已成为社会各界广泛关注的热点问题^[1]。现实生活中由于居民用药知识缺乏、安全意识淡薄、用药行为错误、依从性差等原因,导致一系列用药安全问题^[2-3]。用药安全现状不容乐观,针对当前现状,近年来我国加大力度积极推进用药相关科普活动。目前,全国多个省市已经开展了针对居民用药风险的调查工作,然而,对于农牧地区居民用药行为风险的调查研究相对缺乏^[4]。

根据国家统计局发布的中国人口数据,2021年我国的农村人口约 5.1 亿,农村居民的特殊性体现在居住分散且地处偏远,文化层次较低,医疗条件匮乏,自我保护意识淡薄等方面,信息传播相对滞后,因此科普工作在农村地区的推广面临着诸多挑战。地处内蒙古自治区中部的乌兰察布市,地广人稀,经济基础薄弱,医疗资源匮乏;农牧民占比约 50%,地方经济多以农业畜牧业为主。对乌兰察布市农牧地区居民进行用药安全行为风险调查具有代表意义,以期制订我国农牧地区合理用药政策策略,促进合理用药政策的有效实施和可持续发展提供依据。

1 资料与方法

1.1 资料

以 2022 年 10—12 月作为调查时间段,对 19 岁及以上的乌兰察布市农牧民进行调查,调查地区涵盖集宁区、察哈尔右翼前旗、察哈尔右翼中旗、察哈尔右翼后旗、商都县、化德县、凉城县、卓资县、兴和县、丰镇市、四子王旗。本研究运用横断面问卷法开展调研,问卷的发放采取线上和线下两条路径^[5]。线上通过问卷星发放,线下由具有专业背景的工作人员现场发放问卷,对于其中专业词汇进行解释,指导填写,并现场回收问卷。

1.2 方法

1.2.1 问卷来源及内容 本研究调查问卷的设计参照中国药学会科技开发中心开发的《中国居民用药行为风险 KAP 调查问卷》。问卷内容包括四部分:调查对象基本信息 7 题,涵盖性别、年龄、月收入、居住地、医疗保障状况、受教育程度和职业;用药知识 28 题;用药行为 24 题;用药态度 6 题。

1.2.2 问卷结果的评价标准 参照文献^[6]的评分体系,对用药知识、态度及行为分别进行调查,每项问题根据风险程度高低设置 6 个选项。其中涉及用药知识部分共 28 题,将赞同程度通过数字进行

量化处理,极不赞同得 1 分,不赞同得 2 分,一般得 3 分,依此类推,分值越高,表明赞同程度越高,风险越大。若被调查者全选 1 总计 28 分,全选 2 总计 56 分,全选 3 总计 84 分,全选 4 总计 112 分,依次类推,因此设计得分在 28~56 分为优秀,57~84 分为良好,85~112 分为及格,113 分及以上为不及格。涉及态度部分共 6 题,同理设计得分在 6~12 分为优秀,13~18 分为良好,19~24 分为及格,25 分及以上为不及格。涉及行为部分共 24 题,得分在 24~48 分为优秀,49~72 分为良好,73~96 分为及格,97 分及以上为不及格。

1.2.3 问卷调查的质量控制 线上问卷系统被设计为每个 IP 地址仅能完成并提交一份问卷;参与线下调查问卷的农牧民须自愿参与并积极配合,认真填写,确保所填问卷真实可靠。汇总问卷时筛选无效问卷,对于答案选项呈现明显规律及前后逻辑不符的问卷均予以剔除,以保证问卷数据的准确性和有效性。

1.3 统计分析

采用 Excel 2019 和 SPSS 25.0 对数据分别进行整理汇总及统计分析,对于计数资料,采用频数(n)和百分比(%)表示;对于符合正态分布的计量资料,采用 $\bar{x} \pm s$ 表示;组间比较采用 t 检验或方差分析,若方差不齐则采用非参数检验,两个独立样本的比较用 Mann-Whitney U 检验,多个独立样本的比较用 Kruskal-Wallis 检验。运用多元线性回归模型,分析农牧民各因素变量对用药 KAP 的影响程度,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 调查对象概况

此次调查通过线上和线下途径共发放问卷 550 份,收回有效问卷 523 份。其中男性 230 人,女性 293 人;年龄以中老年为主;收入以每月 2000~4000 元人数最多;受教育程度大都具有初中和小学学历,见表 1。

2.2 农牧民用药风险 KAP 得分情况

采用单因素分析方法,探究性别、年龄、月收入、居住地、医疗保障状况、受教育程度、职业对用药知识、行为及态度得分的影响。

2.2.1 农牧民用药知识得分情况 农牧民用药知识平均得分为 (77.24 ± 17.05) 分,根据评分体系,归类为良好范畴。进一步分析揭示,年龄、月收入、居住地、受教育程度和职业对农牧民用药知识得分差异具有统计学意义($P < 0.05$),其中优秀 42 人,占比 8.03%;良好 327 人,占比 62.52%;及格 136 人,

表 1 523 名受访者基本信息
Tab 1 Basic information of 523 respondents

基本信息	n	构成比 /%	基本信息	n	构成比 /%
性别			居住地		
男性	230	43.98	农村	439	83.94
女性	293	56.02	牧区	84	16.06
年龄 / 岁			受教育程度		
19 ~ 34	50	9.56	研究生	7	1.34
35 ~ 49	109	20.84	本科	25	4.78
50 ~ 64	306	58.51	大专	27	5.16
≥ 65	58	11.09	中专或高中	34	6.50
月收入			初中	322	61.57
1000 元以下	49	9.37	小学	108	20.65
1000 ~ 2000 元	105	20.08	职业		
2000 ~ 4000 元	227	43.40	企业工人	30	5.74
4000 ~ 6000 元	99	18.93	医疗机构	4	0.76
6000 元以上	43	8.22	教师	3	0.57
医疗保障状况			企业经营管理	4	0.76
社会基本医疗保险	461	88.15	自由职业	74	14.15
商业保险	21	4.02	学生	21	4.02
其他	41	7.84	其他	387	74.00

占比 26.00%; 不及格 18 人, 占比 3.44% (见表 2)。

2.2.2 农牧民用药态度得分情况及合理用药宣教需求程度 农牧民用药态度平均得分为 (18.83 ± 2.62) 分, 根据评分体系, 归类为及格范畴。性别、年龄、月收入和受教育程度对农牧民用药态度得分差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 其中优秀仅有 2 人, 占比 0.38%; 良好 252 人, 占比 48.18%; 及格 255 人, 占比 48.76%; 不及格 14 人, 占比 2.68% (见表 2)。

农牧民参加用药教育状况及需求见表 3。农牧民获取用药教育的途径主要是阅读由居委会、医院或社区卫生服务中心提供的合理用药宣传材料以及通过网络、微信等阅读合理用药知识的宣传资料, 分别占 54.88% 和 75.14% (排除从不和不清楚两种情况); 选择在居住的区域、医院或社区卫生服务中心听讲社区合理用药知识的讲座最少, 占 37.28%。但对于用药教育的需求, 多数农牧民认为有必要或极有必要, 不管何种形式均体现出较大的渴望。

2.2.3 农牧民用药行为得分情况 农牧民用药行为平均得分为 (58.84 ± 7.87) 分, 根据评分体系, 归类为良好范畴。年龄、居住地和受教育程度对农牧民用药行为得分差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 其中优秀 32 人, 占比 6.12%; 良好 457 人, 占比 87.38%; 及格 34 人, 占比 6.50% (见表 2)。

2.3 农牧民用药风险的影响因素分析

运用多重线性回归模型, 分析性别、年龄、

月收入、居住地、医疗保障状况、受教育程度和职业对农牧民用药知识、态度和行为得分的影响, 结果见表 4、5。

2.3.1 农牧民用药知识的影响因素 性别 ($P = 0.023$)、年龄 ($P < 0.001$)、居住地 ($P < 0.001$)、受教育程度 ($P = 0.004$) 是影响农牧民用药知识得分的显著因素, 其余因素差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 4。参数估计结果表明, 相较于男性, 女性的用药知识得分偏高; 随着年龄的增长, 用药知识得分越高; 居住地在牧区的得分比农村高; 受教育程度越高, 用药知识得分越低, 见表 5。

2.3.2 农牧民用药态度的影响因素 性别 ($P = 0.004$)、年龄 ($P < 0.001$) 是影响农牧民用药态度得分的显著因素, 其余因素差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 4。根据参数估计结果, 相较于男性, 女性的用药态度得分普遍偏低; 随着年龄的增长, 用药态度得分呈现递减的趋势, 见表 5。

2.3.3 农牧民用药行为的影响因素 居住地 ($P < 0.001$)、受教育程度 ($P = 0.001$) 是影响农牧民用药行为得分的重要因素, 其余因素差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 4。参数估计结果表明, 相较于农村地区居民, 牧区居民的用药行为得分更高; 受教育程度越低, 用药行为分数越高, 见表 5。

3 讨论

随着社会经济的发展, 人民生活水平的稳步提升, 农村居民的健康意识逐渐增强, 自我药疗的现象也日益增多^[6], 由于农民自身文化程度不高, 安全用药常识较缺乏, 加之医疗资源配置不平衡, 不合理用药现象广泛存在^[7]。因此, 本研究深入开展内蒙古乌兰察布市农牧民用药 KAP 现状及风险评估, 系统分析影响农牧民用药知识、态度及行为的核心风险因素, 以期对未来制订更加精准的用药教育策略提供坚实的数据支撑和决策参考。

3.1 农牧民用药风险 KAP 得分分析

本次问卷所设计的用药知识部分覆盖注射剂、用药评价、保健品、抗菌药物、购药知识、药品储存、自我药疗等方面。然而, 在调查中发现农牧地区卫生所普遍面临着医务人员、药师配备严重不足的问题, 直接导致当地农牧民合理用药的需求无法得到满足, 而农牧民自身对于用药知识的掌握也相对有限。调查结果表明, 内蒙古乌兰察布市农牧民用药知识平均得分为 (77.24 ± 17.05) 分, 对药品及用药常识部分虽然处于良好区间, 但是整体评分偏高。远远高于 2020 年内蒙古 12 盟市居民药品知识得分 (64.89 ± 23.59) 分, 此项调查中居住地有 472

表 2 农牧民用药风险 KAP 得分 ($\bar{x} \pm s$)
Tab 2 KAP scores of medication risk for farmers and herdsmen ($\bar{x} \pm s$)

基本信息	用药知识 (K)			用药态度 (A)			用药行为 (P)		
	得分	t/F/Z/H 值	P 值	得分	t/F/Z/H 值	P 值	得分	t/F/Z/H 值	P 值
性别		— 1.226	0.220		4.675	0.031		2.906	0.089
男性	76.04±16.01			19.11±2.74			59.50±8.53		
女性	78.18±17.79			18.61±2.51			58.32±7.29		
年龄 / 岁		21.702	< 0.001		13.091	< 0.001		10.846	0.013
19 ~ 34	66.54±13.59			20.26±2.80			58.36±6.34		
35 ~ 49	73.68±15.65			19.56±2.47			57.88±8.33		
50 ~ 64	77.80±16.16			18.29±2.19			58.80±8.08		
≥ 65	90.17±18.53			19.07±3.82			61.28±6.65		
月收入 / 元		10.470	0.033		11.373	0.023		1.514	0.197
≤ 1000	77.96±16.60			19.67±3.76			60.14±7.73		
1000 ~ 2000	81.41±18.90			18.56±2.70			58.69±7.14		
2000 ~ 4000	77.53±17.63			18.58±2.49			59.40±8.62		
4000 ~ 6000	73.54±15.26			19.09±2.34			57.75±7.35		
≥ 6000	73.21±14.57			19.26±1.88			57.33±6.39		
医疗保障状况		2.273	0.321		1.224	0.295		0.179	0.836
社会基本医疗保险	77.05±17.47			18.89±2.67			58.86±7.94		
商业保险	81.48±16.52			18.05±2.20			59.52±7.44		
其他	77.24±11.60			18.59±2.25			58.29±7.47		
居住地		— 5.831	< 0.001		0.038	0.846		15.432	< 0.001
农村	75.06±15.53			18.82±2.61			58.26±7.68		
牧区	88.63±19.96			18.88±2.73			61.89±8.21		
受教育程度		10.303	< 0.001		3.645	0.003		23.628	< 0.001
研究生	64.14±10.59			19.29±2.87			54.86±4.18		
本科	67.08±15.31			20.72±2.35			55.76±3.93		
大专	67.22±12.42			19.59±2.56			56.07±6.28		
中专或高中	66.82±14.87			18.50±2.65			59.88±11.53		
初中	78.46±16.32			18.63±2.53			58.52±7.94		
小学	82.58±18.04			18.85±2.77			61.14±6.87		
职业		6.816	< 0.001		1.192	0.309		1.159	0.327
企业工人	71.27±13.95			19.40±2.67			56.40±6.25		
医疗机构	53.50±8.19			18.25±2.75			55.25±4.57		
教师	57.33±3.21			20.00±2.65			52.33±4.51		
企业经营管理	58.75±14.29			20.50±2.38			57.25±1.89		
自由职业	72.89±15.27			19.09±2.55			58.96±9.71		
学生	68.29±11.00			19.48±3.34			57.86±7.84		
其他	79.61±17.23			18.68±2.59			59.17±7.64		
总计	77.24±17.05			18.83±2.62			58.84±7.87		

名来自于城镇和 56 名来自于农村^[8]。由此观之, 农牧民用药知识平均得分远远高于城市居民, 对药品知识的掌握仍需不断提升。

根据农牧民对参与用药知识讲座或用药教育活动的态度来分析, 女性用药态度得分低于男性, 说明女性更关注用药健康。调查中发现, 有 60.99% 的农牧民表示没有听过合理用药的相关讲座, 这可能与农牧民居住分散, 地区较偏远, 合理用药的相

关讲座没有真正实行到农牧地区有关。但从对用药知识宣教的必要性调查来看, 农牧民对这方面知识的需求极为迫切, 特别是, 高达 82.98% 的农牧民期望从居委会、医院或卫生社区服务中心等获取合理用药的宣传材料, 充分表明他们更倾向于从权威和专业的渠道获取用药知识。随着短视频和微信朋友圈等社交媒体中相关用药知识的科普, 87.77% 的农牧民表明通过网络、微信等阅读合理用药知识

表 3 农牧民参加用药教育的情况及对用药教育的需求情况 [n(%)]

Tab 3 Participation of farmers and herdsmen in medication education and their demand for such education [n(%)]						
用药教育途径	参加					
	从不	偶尔	时常	经常	总是	不清楚
在居住的区域、医院或社区卫生服务中心听讲社区合理用药知识的讲座	319 (60.99)	126 (24.09)	39 (7.46)	24 (4.59)	6 (1.15)	9 (1.72)
阅读居委会、医院或社区卫生服务中心发放的合理用药的宣传材料	229 (43.79)	172 (32.89)	43 (8.22)	65 (12.43)	7 (1.34)	7 (1.34)
在网络、微信等阅读合理用药知识的宣传资料	125 (23.90)	205 (39.20)	66 (12.62)	89 (17.02)	33 (6.31)	5 (0.96)
用药教育途径	需求					
	极无必要	没必要	一般啦	有必要	极有必要	不清楚
居住的区域、医院或社区卫生服务中心举办合理用药知识的讲座	18 (3.44)	69 (13.19)	67 (12.81)	287 (54.88)	66 (12.62)	16 (3.06)
居委会、医院或社区卫生服务中心发放合理用药的宣传材料	4 (0.76)	26 (4.97)	53 (10.13)	311 (59.46)	123 (23.52)	6 (1.15)
通过网络、微信等阅读合理用药知识的宣传资料	3 (0.57)	11 (2.10)	45 (8.60)	305 (58.32)	154 (29.45)	5 (0.96)

表 4 影响农牧民用药风险 KAP 的多元线性回归统计结果

Tab 4 Multiple linear regression of the KAP of drug use risks among farmers and herdsmen						
因素	用药知识 (K)		用药态度 (A)		用药行为 (P)	
	t 值	P 值	t 值	P 值	t 值	P 值
性别	2.286	0.023	- 2.908	0.004	- 1.821	0.069
年龄 / 岁	3.900	< 0.001	- 3.834	< 0.001	- 1.103	0.271
月收入 / 元	- 0.864	0.388	- 0.888	0.375	- 1.421	0.156
医疗保障状况	- 0.022	0.982	- 1.098	0.273	- 0.639	0.523
居住地	6.591	< 0.001	0.538	0.591	3.702	< 0.001
受教育程度	2.894	0.004	- 0.108	0.914	3.290	0.001
职业	0.598	0.550	- 0.069	0.945	0.536	0.592

表 5 多重线性回归模型回归系数的参数估计与标准化估计

Tab 5 Parameter estimation and standardized estimation of regression coefficients of multiple linear regression models									
因素	用药知识 (K)			用药态度 (A)			用药行为 (P)		
	参数估计	标准化估计	P 值	参数估计	标准化估计	P 值	参数估计	标准化估计	P 值
性别	3.143	0.092	0.023	- 0.667	- 0.126	0.004	- 1.248	- 0.079	
年龄 / 岁	4.355	0.201	< 0.001	- 0.714	- 0.214	< 0.001	- 0.614	- 0.061	
月收入 / 元	- 0.596	- 0.037		- 0.102	- 0.041		- 0.488	- 0.065	
医疗保障状况	- 0.027	0.000		- 0.220	- 0.047		- 0.383	- 0.027	
居住地	12.257	0.264	< 0.001	0.167	0.023		3.432	0.160	< 0.001
受教育程度	2.409	0.148	0.004	- 0.015	- 0.006		1.365	0.182	0.001
职业	0.231	0.027		- 0.004	- 0.003		0.103	0.026	

更为方便快捷。尽管农牧民在合理用药活动中参与度不高，但对于合理用药的宣传渴求却异常强烈。因此，卫生医疗机构应紧密结合不同地域和人群的实际状况，深入开展农牧民需求调研，推出更加个性化、高效能的用药教育策略与方案。

本问卷用药行为涵盖药品购买、储存、过期药品处置以及用药依从性多个环节。根据评分结果，低年龄、高收入、高文化程度以及教师、医疗机构

人群的用药行为更为科学合理。内蒙古乌兰察布市农牧民用药行为评分虽然达到良好标准，但在实际用药过程中，仍然存在不容忽视的安全隐患行为。大多数农牧民倾向于依赖个人经验、广告宣传或营业员的推荐购买药物。多数农牧民对家里存放药品的有效期、储存条件、用药禁忌等缺乏关注；随意用牛奶、咖啡、茶水等服用药物；擅自加大或减少药物剂量、更换药物种类等。这些错误的用药行为，

进一步增加了药品不良事件的发生率。

3.2 影响农牧民用药风险的因素

3.2.1 年龄对用药风险的影响 研究表明, 年龄差异对农牧民用药知识、行为和态度具有显著影响。随着年龄的增长, 用药知识缺乏的风险越高, 这与文献^[9-10]报道相符; 随着年龄的增长, 用药行为面临的风险越高, 与文献^[6]报道相一致; 然而用药态度的风险却越低。

老年群体是药物使用的主要人群, 其身体机能逐渐衰退, 易患多种慢性疾病, 病程长, 用药时间长, 联合用药比例较高, 因此, 用药风险相对其他人群更为严峻^[11]。此外, 老年人认知能力下降, 习惯凭经验用药, 导致用药安全隐患增加^[6]。特别是农牧地区的老年人相较于城市老年人, 信息闭塞, 因此, 应加大对农牧地区用药科普的资金投入, 如户户发放通俗易懂、简洁明了的用药科普小册子, 村村举办公益讲座外, 还需加强利用医联体、医师、临床药师等专业力量, 定期下基层进行科普和宣传合理用药。同时, 医院、社区医院也应利用新媒体平台(微信公众号、短视频等), 定期推送用药安全知识文章或短视频, 以更广泛地覆盖老年群体, 提高他们的用药安全意识。

3.2.2 受教育程度对用药风险的影响 本研究亦表明, 影响农牧民用药知识、行为和态度的关键因素是受教育程度。文化程度较低的人群, 其用药知识和行为评分偏高, 用药风险相应增高; 但在用药态度方面, 却展现出较低的风险性; 显示文化程度越低的农牧民对获取合理用药知识的需求更为迫切。欧洲的一项调查表明, 教育程度是影响患者自我药疗的关键因素之一^[12]。农牧民大多文化程度较低, 理解和辨识能力较差, 常根据经验使用药品, 存在较为严重的用药风险, 因此实施多元化的用药科普教育至关重要。

针对不同文化程度的人群, 应设计差异化的科普内容和方式。例如, 对于文化程度较低的农牧民, 除了传统的讲座、小册子等形式外, 还可以采用更加直观、生动的宣传手段, 如用药安全知识的短视频、图片展板等, 以帮助更好地理解 and 掌握合理用药知识。同时, 继续加强医联体、医师、临床药师等专业力量的参与, 定期下基层进行科普宣传, 开展面对面用药指导, 以满足不同文化程度农牧民对合理用药知识的需求, 从而提高农牧地区的合理用药水平。

4 结论

本研究针对内蒙古乌兰察布市农牧民展开调查, 旨在了解对用药知识的掌握、用药行为和用药教育的态度, 显示大多数农牧民在用药方面存在着严重的知识盲区, 用药时存在诸多风险行为, 参加合理用药知识教育活动较少, 但对合理用药宣传的需求大。文化程度和年龄是影响农牧民用药知识、行为和态度的重要因素。国家应加大对农牧地区医疗资源的投入, 重视对农牧民用药知识的普及教育, 关注用药行为, 减少因用药不当而加剧因病返贫的现象。此外, 加大培养基层医护、药师人员队伍, 做到村村配齐医护队伍、基层药店配备药学专业技术人员。真正提高农牧民安全用药意识, 降低用药风险, 积极响应健康中国战略的号召。

参考文献

- [1] 王海桃, 马宝花, 周学锋, 等. 青岛市居民用药风险信息 - 态度 - 行为调查 [J]. 青岛大学学报 (医学版), 2022, 58 (3): 428-431.
- [2] 雷捷, 王胜, 王青, 等. 银川市居民安全用药现状及教育需求调查分析 [J]. 药物流行病学杂志, 2019, 28 (9): 594-599.
- [3] 阮寅正, 甘甜. 药学服务中应用处方分析的价值探讨 [J]. 中医药管理杂志, 2020, 28 (20): 96-97.
- [4] 魏春燕, 林洪, 鲁国洲, 等. 四川少数民族地区居民安全用药现状调查 [J]. 临床药物治疗杂志, 2023, 21 (6): 78-82.
- [5] 李轶凡, 盖迪, 韩朝宏, 等. 北京居民用药风险影响因素调查 [J]. 临床药物治疗杂志, 2019, 17 (3): 59-63.
- [6] 刘丽华, 何丹, 张超, 等. 湖南省部分地区居民用药风险影响因素调查 [J]. 临床药物治疗杂志, 2019, 17 (1): 74-79.
- [7] 周振华, 王文渊, 蒋爱民. 湖南省永州市农村居民用药安全现状的调查分析 [J]. 中国药房, 2017, 28 (27): 3767-3769.
- [8] 姚芳, 黎明, 邓一农, 等. 内蒙古自治区居民用药行为风险 KAP 调查研究 [J]. 内蒙古医科大学学报, 2022, 44 (1): 35-38, 42.
- [9] 李燕菊, 焦敏, 滕威, 等. 新疆多地居民用药风险 KAP 调查及其影响因素研究 [J]. 药物流行病学杂志, 2021, 30 (5): 317-320, 355.
- [10] 王欣, 聂松柳, 叶家宝, 等. 安徽省皖西地区居民用药风险影响因素调查 [J]. 临床药物治疗杂志, 2019, 17 (5): 57-61, 72.
- [11] 刘华, 澹台印军, 邓利群. 高龄老年人不合理用药的影响因素及对策分析 [J]. 北方药学, 2016, 13 (6): 174-175.
- [12] Gracia N, Teresa O, Vicent R. Factors associated with self-medication in Spain: a cross-sectional study in different age groups [J]. Int J Pharm Pract, 2018, 26 (3): 258-266.

(收稿日期: 2024-08-06; 修回日期: 2024-09-09)

基于循证医学证据的门诊儿童用药前置 审核规则库的精细化管理

张慧丽, 徐贞贞, 田京辉*, 应亚宾, 陈静静, 曹凯, 赵亮 (许昌市中心医院药学部, 河南 许昌 461000)

摘要: **目的** 改善处方前置审核系统对儿科处方的审核适用性, 提高儿科处方审核质量和合理用药水平。**方法** 通过处方前置审核系统获取我院 2022 年 11 月—2023 年 1 月门诊儿童不合理用药清单, 结合窗口药师不合理处方干预记录, 基于大量循证医学证据, 依据相关流程制度, 逐步对审核规则进行优化, 形成具有儿科专科特色的精细化审核规则库并对成效进行评价分析。**结果** 经过三个月 (2023 年 2 月—2023 年 4 月) 规则库的持续优化, 与规则库优化前 (2022 年 11 月—2023 年 1 月) 相比较, 规则库优化后 (2023 年 5 月—2023 年 7 月) 的系统审核不合理率从 59.03% 降至 25.76% ($\chi^2 = 4500.262$, $P < 0.001$), 系统拦截率从 4.93% 降至 1.41% ($\chi^2 = 506.493$, $P < 0.001$), 系统审核后医师修改率从 9.35% 上升至 58.15% ($\chi^2 = 4160.071$, $P < 0.001$), 任务合格率从 43.25% 提升至 87.59% ($\chi^2 = 10\,002.602$, $P < 0.001$), 发药窗口儿科不合理处方登记率从 70.45% 下降至 32.93% ($\chi^2 = 28.920$, $P < 0.001$)。**结论** 审核规则的精细化设置能有效弥补现有审核系统对儿科处方审核的不足, 改善审核系统对儿童处方的审核适用性, 显著提高门诊儿科处方质量、药师及医师工作效率, 对保障儿童用药安全性、提升药学服务质量具有重要的意义。

关键词: 处方前置审核系统; 规则库优化; 儿童用药

中图分类号: R95

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)05-1452-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.042

Refined management of pre-screening rules for outpatient children's medication based on evidence-based medicine

ZHANG Hui-li, XU Zhen-zhen, TIAN Jing-hui*, YING Ya-bin, CHEN Jing-jing, CAO Kai, ZHAO Liang (Department of Pharmacy, Xuchang Central Hospital, Xuchang Henan 461000)

Abstract: Objective To improve the suitability of the prescription pre-screening system for pediatric prescriptions and improve the quality of pediatric prescriptions and rational drug use. **Methods** Through the prescription pre-screening system, the hospital's irrational drug use list for outpatient children from November 2022 to January 2023 was obtained. Combined with the window pharmacists' intervention records of unreasonable prescriptions, based on extensive evidence-based medicine and established institutional procedures, the basic review rules were optimized to form a refined rule base with pediatric specialty features and evaluate the effectiveness. **Results** After three months of continuous optimization of the rule base (February to April 2023), compared with before the optimization (November 2022 to January 2023), the irrational rate of screening decreased from 59.03% to 25.76% ($\chi^2 = 4500.262$, $P < 0.001$), and the system interception rate decreased from 4.93% to 1.41% ($\chi^2 = 506.493$, $P < 0.001$) after the optimization (May to July 2023). After system screening, doctors' revision rate increased from 9.35% to 58.15% ($\chi^2 = 4160.071$, $P < 0.001$), and the task qualification rate increased from 43.25% to 87.59% ($\chi^2 = 10\,002.602$, $P < 0.001$). The rate of irrational prescription rate decreased from 70.45% to 32.93% ($\chi^2 = 28.920$, $P < 0.001$), with significant difference. **Conclusion** The refined management

基金项目: 许昌市科学技术局市级重点研发与推广专项 (No. 20230213068)。

作者简介: 张慧丽, 女, 主管药师, 主要从事处方审核工作, email: huili15936398374@163.com * **通信作者:** 田京辉, 男, 副主任药师, 主要从事智慧化药房及信息化技术应用方面的研究, email: tianjinghui65@163.com

can make up the shortcomings of the existing system for pediatric prescription screening, improve the quality of outpatient pediatric prescriptions, the work efficiency of pharmacists and physicians, and ensure the safety of children's medication.

Key words: prescription pre-examination system; rule base optimization; medicine for children

2018 年 6 月, 国家卫健委颁布的《医疗机构处方审核规范》(国卫办医发〔2018〕14 号) 第六条规定“药师是处方审核的第一责任人”, 第八条要求“医疗机构应当积极推行处方审核信息化”, 通过医疗机构审核确认的“信息系统内置处方审核规则”来实现处方审核^[1]。该政策的颁布, 使现行的处方审核摆脱了传统人工审核模式的制约。我院处方前置审核系统于 2022 年 4 月上线, 采取逐科宣讲与沟通的方式, 历经 10 个月实现门诊全覆盖, 门诊整体处方合格率得到显著提升。但在基于商业化的处方前置审核系统的实际运行过程中, 我们发现, 审核系统在提供信息化审核的同时, 也存在诸多问题, 如药品基础信息库欠完善, 审查规则库过于宽泛, 存在审查结果假阳性、假阴性的问题^[2], 且主要服务对象是成人患者^[3]。儿童正处于生长发育阶段, 其生理机能、代谢途径及药物反应与成人存在差异, 这要求儿科用药必须更加精准, 以避免潜在的不良反应和长期影响。然而, 目前儿童专属剂型少, 说明书中儿童用药信息缺失^[4], 缺乏针对儿童的详细用药指南, 超说明书用药现象普遍^[5], 这些导致审核系统基础知识库无法全面覆盖儿童用药信息, 极大地影响和限制了系统对处方审核的准确性, 鉴于儿科用药领域所面临的诸多挑战, 为保障儿童健康权益, 优化儿科用药规则库显得尤为重要。

儿童安全用药是保障儿童健康的重要前提, 值得全社会高度重视和严格监管^[6]。据《2022 中国卫生健康统计年鉴》数据显示, 2021 年我国综合医院儿科门急诊人次达 2.47 亿, 占综合医院门诊总人次的 9.9%^[7]。十三届全国人大三次会议代表提出“关于建立和保障低龄儿童个体化给药体系的建议”议案, 国家卫生健康委员会对此也做出了肯定性答复^[8-9], 还着重强调了儿童个体化用药安全的重要性。为响应国家政策要求, 提高儿科处方审核和处方点评的工作质量, 保障儿童患者用药安全, 我院处方前置审核中心基于相关循证医学证据, 结合医院实际情况, 积极对儿科处方审核规则库进行优化, 构建了一套基于儿科常用药品的儿童合理用药规则库, 并将其嵌入医院现有的处方审核系统开展应用, 取得了较好的效果。

1 资料和方法

1.1 资料来源

分别通过医院处方前置审核系统、处方点评系统以及窗口药师处方干预记录获取 2022 年 11 月—2023 年 7 月儿科不合理处方及处方干预总体情况, 其中 2023 年 2 月儿科被纳入药师监测对象, 2023 年 2 月—2023 年 4 月为精细化审核规则库优化阶段, 2022 年 11 月—2023 年 1 月与 2023 年 5 月—2023 年 7 月分别为精细化审核规则库优化前、后阶段, 并对相关数据进行分析。

1.2 修订规则库的管理制度

规则库修订是指在审方软件内置规则库的基础上, 根据最新循证依据或其他处方评价标准, 利用信息系统修改药品的审核规则, 形成符合临床实际, 系统、全面、规范、实用的审方规则库。开展处方审核系统规则库修订工作应当遵循科学严谨的原则, 严格遵循国内外关于儿童用药的伦理准则、法律法规, 确保所有的规则优化均符合伦理标准, 保护儿童权益不受侵害。

1.3 处方审核问题分类及规则修订流程

医院处方审核系统规则库的修订工作, 应在医院药事管理与药物治疗学委员会的领导下, 由医院药理学部和医务部共同组织实施, 具体工作由药理学部处方前置审方管理小组负责执行。流程见图 1。

1.4 规则库具体的优化步骤

首先, 由审方中心明确需要调整的具体规则, 以及这些规则对患者治疗效果和安全性的的重要性。其次, 广泛收集国内外权威的儿童用药指南、临床路径、临床试验数据、系统评价、Meta 分析等循证医学证据, 重点关注与特定药品相关的适应证、剂量范围、用药疗程等信息, 循证证据的质量分级和推荐等级参考循证医学资源的“6S”模型和 GRADE 证据质量分级评价系统制定, 具体质量分级评定规则见表 1。最后, 根据问题类型、药品类型等情况, 对规则库的修订进行分类分级管理 (见图 1)。特别注意含毒性成分中成药的安全性以及儿童与成人在适应证上的差异, 同时剂量范围需要参考儿童体重、体表面积、肝肾功能等生理特征, 按年龄段进行细分, 确保规则中涵盖不同适应证或不同给药途径下的剂量设置。

1.5 统计学方法

使用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计学分

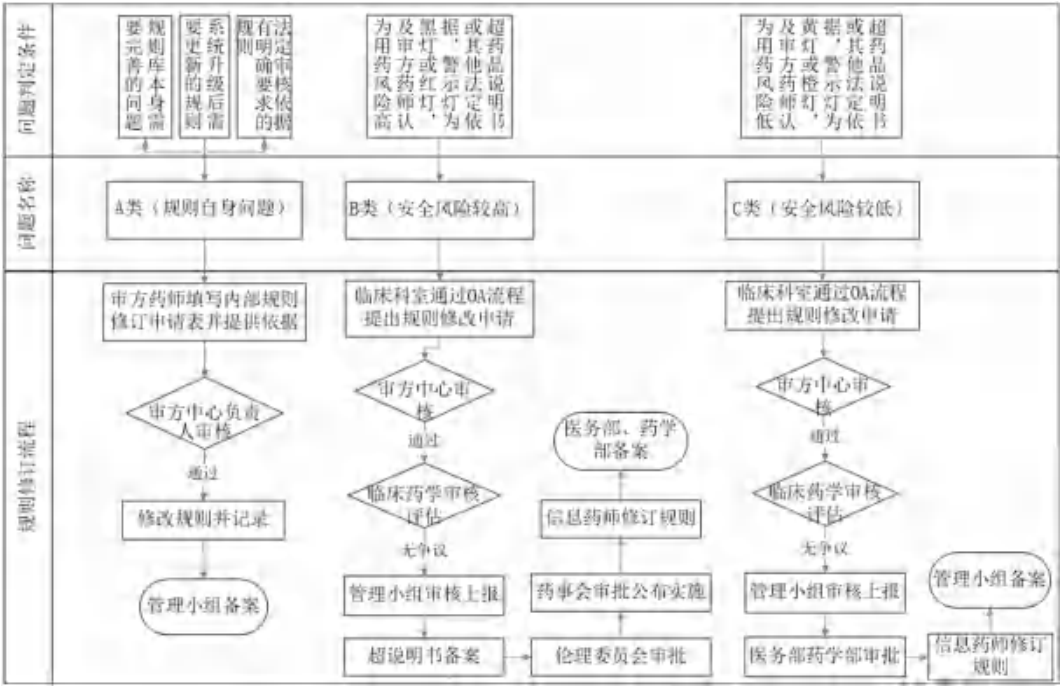


图 1 处方审核问题分类及规则修订流程图
Fig 1 Flow chart of classification of prescription review problems and rule revision

表 1 循证证据质量分级评定规则		
Tab 1 Rules for quality grading of evidence quality		
证据类型	证据质量 分级	推荐 等级
相同化学名称药品原研药品说明书已经注册许可的用法 Micromedex、UpToDate 等循证数据库收录并推荐的用法 相关专业权威专业组织发布的最新版指南、临床规范认可的用法	a. 高质量 证据	强推荐
其他组织或个人发布的证据总结、临床指南等 高质量的系统评价或随机对照试验	b. 中等质 量证据	弱推荐
其他临床研究 (除高质量系统评价或随机对照试验外) 国内外专著记载的用法 发表的专家意见或共识	c. 低质量 证据	弱推荐
没有科研试验验证的仅基于临床经验的用法	d. 极低质 量证据	不推荐

析, 计量资料采用 t 检验, 计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

审核规则库优化前, 全院不合理处方科室前十名的分布中, 儿科占了 3 个, 分别为综合儿科门诊、儿科二门诊、PICU 门诊, 不合理处方比例占全部科室的 8.36%, 不合理问题类型共 11 种, 其中超适应证、超多日用量、剂量范围占比位居前三位, 分别占总问题比例的 60.62%、21.02%、14.49%。

2.1 超适应证问题规则库的优化

医师开具处方时, 系统自动获取患者诊断, 与药品对应的系统适应证进行比对, 若不符, 则警示该药品适应证与患者诊断不符, 超适应证药品分为西药和中成药。

对于西药超适应证规则的设置, 大部分由审方药师将有证据支持的超适应证问题与临床沟通, 由临床填写《规则修订申请表》, 按照 C 类问题进行管理并予以规则维护。如①《急性上呼吸道感染临床路径 (2017 版)》医嘱单中包括减充血剂、抗组胺药、解热镇痛药等, 则判定抗组胺药盐酸西替利嗪口服溶液以及减充血剂盐酸羟甲唑啉喷雾剂用于上呼吸道感染适宜。②中国研究型医院学会儿科学专业委员会明确指出中度锌缺乏临床表现可见腹泻、生长迟缓、厌食症、行为改变等, 则判定赖氨酸锌颗粒可以用于上述疾病。雾化吸入注射用干扰素 α -2b 用于儿童毛细支气管炎、病毒性肺炎、手足口病、疱疹性咽峡炎、呼吸道合胞病毒感染等^[9-11], 涉及超途径和超适应用药问题, 则按 B 类问题进行管理并进行规则修订。对于说明书有明确要求的检查用药, 按照 A 类问题进行管理并予以规则维护, 如水合氯醛说明书适应证用于检查、操作前的镇静、催眠, 通过自定义设置规则: “当检查用药的临床诊断为检查、实验室检查、一般性医学检查等, 判定为适宜”。

对于中成药超适应证规则的设置, 由审方药师通过前置审核系统收集历史处方, 将临床诊断

与药品名称进行匹配,统计出诊断名称出现的频次,例如小儿青翘颗粒:在 1 个月内的历史处方中,诊断名称中出现急性上呼吸道感染 31 次、支气管炎 20 次、口腔炎 9 次等,对收集到的数据进行筛选整理,并查询相关疾病诊疗路径及中医诊疗指南,如《中成药治疗小儿急性上呼吸道感染临床应用指南(2020 年)》^[12]、《急性气管-支气管炎中医诊疗指南》^[13]、《喘息性支气管炎中西医结合治疗专家共识》^[14]等,将查询汇总结果提交前置审方小组(包括中药师和中医科医师)进行诊断合理性判断,将判断为合理的诊断名称自主维护到审核系统规则中,自主维护的规则按照 C 类问题进行管理。

2.2 超多日用量规则库的优化

超多日用量是指无特殊情况下,门急诊儿科处方超过 7 日用量,急诊儿科处方超过 3 日用量。对于超多日用量的审查,基于《处方管理办法》的基础上,参考相关疾病诊治指南、药品说明书、部分权威书籍等的相关描述予以精细化的设置。

首先,按照药品说明书标准的用药疗程设定规则,如神曲消食与健胃消食口服液说明书疗程为 2 周、酪酸梭菌活菌片和凝结芽孢杆菌活菌片用于慢性腹泻或慢性便秘疗程为 14~21 d、细菌溶解产物胶囊预防反复呼吸道感染疗程为 3 个月。其次,查阅相关疾病诊疗指南、书籍等,设置赖氨酸颗粒用于锌缺乏时,必要时补锌治疗疗程为 1~2 周,腹泻补锌疗程为 10~14 d^[15]。感冒为急性病证,一般疗程为 3~7 d^[16-17],连续用药不宜超过 7 d,故将感冒治疗类的中成药(如双黄连、连花清瘟等)疗程超过 7 d,判定为超长处方,但因为年龄和包装规格的原因,存在超 7 d 疗程用药的处方,如门诊处方最小包装单位的药品所显示的用药天数超 7 d,通过“超多日用量”审查模块,将药品最小开出数量设置为 1 盒^[3]。

2.3 剂量范围规则库的优化

2.3.1 药物说明书无儿童用法用量的剂量规则精细化设置

处方前置审核系统的基础规则是根据药品说明书信息设置的,若说明书未标明儿童剂量范围,系统就缺失此项目的审查规则,不会对儿童剂量进行适宜性审查,出现假阴性的问题。如荆防颗粒,说明书仅标注成人用量,当医师为 1 岁患儿开具此药品时,给药剂量为成人剂量,系统也会判断此张处方合理,而实际用量与年龄是不符的,存在很大的用药安全隐患。为了解决此类问题,对该院儿科处方常用药品说明书进行筛查,无儿童用法用量的药品共计 40 种,占儿科常用药品的 70.18% (40/57),其中涉及中成药

24 种,西药 16 种。参考相关证据对无儿童用法用量的中成药和西药剂量规则做如下优化:

针对中成药,首先参考权威指南或共识对剂量范围进行设置,如蒲地蓝口服液:3 岁以内,1 次 3 mL;3~5 岁,1 次 5 mL;6~9 岁,1 次 7.5 mL;10~14 岁,1 次 10 mL,1 日 3 次^[12]。对未查到相关参考资料药性平和的中成药采取年龄换算的方法,折算量参考《中成药临床指导原则》:“一般情况 3 岁以内服 1/4 成人量,3~5 岁的可服 1/3 成人量,5~10 岁的可服 1/2 成人量,10 岁以上与成人量相差不大即可”^[18-19],如鼻渊通窍颗粒说明书推荐成人剂量为一次 1 袋,一日 3 次,对儿童单次用量规则精细化设置如下:“3 岁以下 ≤ 0.25 袋,3~5 岁 ≤ 0.33 袋,5~10 岁 ≤ 0.5 袋,10 岁以上 ≤ 1 袋”,频次按照说明书推荐。

西药的优化原则是建议选择同品种的儿童剂型,其次为避免审方药师不在线时,医师开具药品出现剂量错误,对儿科常用药品的剂量范围做进一步的优化,分为以下几种情况:

① 对于安全指数较大的药物类别,如复方消化酶胶囊,参考《中国国家处方集(化学药品与生物制品卷·儿童版)》有关儿童剂量的折算方法:“1 岁以内剂量 $= 0.01 \times (\text{月龄} + 3) \times \text{成人剂量}$,1 岁以上剂量 $= 0.05 \times (\text{年龄} + 2) \times \text{成人剂量}$ ”^[20],剂量规则做如下优化:“3 岁以下 ≤ 0.25 粒,3~6 岁 ≤ 0.4 粒,6~10 岁 ≤ 0.6 粒,10~18 岁 ≤ 1 粒”。② 有同品种儿童剂型的药品,如盐酸氨溴索片和阿奇霉素胶囊分别依据盐酸氨溴索口服液、阿奇霉素干混悬剂的说明书推荐用法用量调整规则。③ 相关指南或权威参考资料有推荐剂量范围的,依据指南或权威参考资料进行修订,如参考《抗病毒药物在儿童病毒感染性呼吸道疾病中的合理应用指南》设置盐酸阿比多尔片儿童用法用量如下:2~6 岁每次 50 mg,6~12 岁每次 100 mg,>13 岁每次 200 mg,4 次 $\cdot \text{d}^{-1}$,疗程 5 d^[21]。蜡样芽孢杆菌活菌胶囊(0.25 g $\times$ 20 粒)的儿童剂量参考《微生物制剂儿科处方审核建议》设置为每次 1 粒/片(0.25 g),3 次 $\cdot \text{d}^{-1}$ ^[22]。奥美拉唑胶囊的剂量规则参考《质子泵抑制剂审方规则专家共识》设置^[23]。马来酸氯苯那敏设置为 0.3~0.4 mg $\cdot \text{kg}^{-1}$ 、3~4 次 $\cdot \text{d}^{-1}$ ^[24]。④ 对于安全范围窄,毒性大的药物(如二氧丙嗪片),按照成人剂量直接简单折算不够准确,最为合理的是按照体表面积计算,但需要医师在开具处方时填写患儿的身高和体重,合理用药系统会根据预先设置的规则“体重儿童剂量 $= \text{成人剂量} \times \text{儿童体表面积}(\text{m}^2) / 1.73(\text{m}^2)$ ”

(说明书未按体表面积推荐儿童药量, 1.73 为标准体重的成人体表面积)”进行审核^[20]。

2.3.2 合理超说明剂量问题的规则设置 合理超说明书剂量规则的维护均需依据处方审核系统规则修订流程 B 类问题进行审核备案, 如曲普瑞林注射液用于治疗性早熟时, 治疗剂量可以不按体重计算, 均按 3.75 mg 每 4 周注射 1 次^[25]。治疗补锌可减少急性和慢性腹泻患儿的复发, 推荐剂量: 6 个月以下每日 10 mg, 6 个月以上每日 20 mg, 疗程 10 ~ 15 d^[26]。

2.4 其他模块规则库的优化

在儿童用药规则库的优化过程中, 除了超适应证、剂量范围、超多日模块规则库的优化与调整外, 还对中成药重复用药、相互作用以及“儿童用药”专用模块进行了规则优化^[27]。“儿童用药”专用模块的优化过程如下:

首先, 对药品说明书进行筛查, 将不同年龄段儿童禁用、忌用药品, 全部给予相应的系统拦截, 共涉及药品 47 种。此外, 含苯甲醇的注射液禁止儿童肌肉注射, 如地西洋注射液、复方倍他米松注射液、曲安奈德注射液等。

其次, 对儿童不推荐药品, 通过查询《中国国家处方集·化学药物与生物(儿童版)》, 将有推荐儿童适应证和用药用量的药品仅给予医师警示, 如非典型抗精神药物如奥氮平、喹硫平用于儿童青少年双相情感障碍; 美沙拉嗪用于 5 ~ 18 岁儿童溃疡性结肠炎; 多潘立酮用于伴有恶心呕吐的患儿。

最后, 对需重点关注的药品给予医师黄灯警示, 如所有 3 岁以下的儿童患者在暴露于碘对比剂后 3 周内都应评估甲状腺功能。

3 规则库精细化优化成果和应用效果评价

3.1 优化成果

门诊前置审方中心在医务部、临床医师及信息工程师的协作下, 历时 3 个月, 根据儿童群体

的用药特点及疾病特点初步完成儿童用药规则库的优化, 优化药品涉及 112 种, 包含规则 592 条, 其中超适应证 315 条, 剂量范围 128 条, 儿童用药 100 条, 重复用药 29 条, 超多日用量 20 条。

3.2 应用效果评价

3.2.1 有效降低系统审核不合理率和拦截率 系统审核的不合理处方为医师开具完处方, 系统预审的不规范、不适宜、超处方等。系统拦截是药师对系统应用进行的设置, 拦截对象一般为严重的用药问题。优化规则后, 系统审核不合理率从 59.03% 降至 25.76% ($\chi^2 = 4500.262$, $P < 0.001$), 系统拦截率从 4.93% 降至 1.41% ($\chi^2 = 506.493$, $P < 0.001$)(见表 2), 可能与以下因素有关: ① 2022 年 11 月—2023 年 1 月(规则库优化前)受疫情影响, 囤药现象严重, 为保证药品供应, 我们对中成药开具数量做了刚性限制, 故出现不合理或拦截任务数较多。② 优化规则过程中通过与临床的不断沟通, 医师在儿童安全用药方面的认识提高, 开具的不合理处方下降, 且触碰黑灯的频率下降。

3.2.2 大幅度提高医师修改率和任务合格率 通过对规则库的持续的优化, 系统审核后医师修改率从 9.35% 上升至 58.15% ($\chi^2 = 4160.071$, $P < 0.001$), 任务合格率从 43.25% 提升至 87.59% ($\chi^2 = 10\,002.602$, $P < 0.001$)(见表 2), 其中任务合格率 = 合格任务数 / 总任务数, 是衡量医院门诊处方质量的重要指标之一, 来源于门诊前置审核系统的实际运行数据。说明前置审核系统的上线与规则库的调整在提升医师修改率和处方合格率方面起到了相辅相成的作用。系统可以为医师提供更具体、更明确的用药指导, 帮助医师快速理解并修改不合理之处, 规则库的调整使系统能够更准确地识别不合理处方, 减少误报和漏报, 从而增加医师对系统提示的信任度。

表 2 规则优化前后门诊儿童处方审核干预情况比较

Tab 2 Outpatient children's prescription review intervention before and after the optimization

时间	总任务数	审核不合理任务数	审核不合理率 / %	拦截任务数	拦截率 / %	审核后医师修改任务数	审核后医师修改率 / %	合格任务数	不合格任务数	任务合格率 / %
规则库修订前 (2022 年 11 月—2023 年 1 月)	12 086	7134	59.03	596	4.93	667	9.35	5215	6844	43.25
规则库修订中 (2023 年 2 月—2023 年 4 月)	43 888	13 173	30.02	839	1.91	6575	49.91	36 329	7436	83.01
规则库修订后 (2023 年 5 月—2023 年 7 月)	37 117	9562	25.76	525	1.41	5560	58.15	32 417	4595	87.59

注: (1) 2022 年 11 月—2023 年 1 月受疫情影响, 儿科处方总任务数大幅度降低; (2) 当次提交一张或多张处方, 均视为一个任务。该任务在未通过前, 即使医师反复修改, 也算作一个任务。

Note: (1) Affected by the epidemic from November 2022 to January 2023, the total number of pediatric prescriptions decreased significantly; (2) When one or more prescriptions are submitted at a time, they are considered to be one task. If the task is not passed, even if the doctor repeatedly modifies it, it is also counted as a task.

3.2.3 大幅度降低发药窗口不合理处方登记率

如果系统逻辑或审方规则存在问题,经系统预审的合理处方中可能会存在一些不合理处方,待患者缴完费去取药窗口取药时,窗口药师会再次对这些不合理处方进行审核并及时登记。不合理处方干预登记表格在门诊所有药房实现局域网络共享,可以方便实现多台电脑之间、多名药师之间的处方干预记录共享,使得审方药师可以快速、高效获得前置审核系统未覆盖的审核项目,特别对一些假阴性问题,从而对审核系统规则库做进一步的优化。规则库优化前后,发药窗口儿科不合理处方登记率从 70.45% 下降至 32.93% ($\chi^2 = 28.920$, $P < 0.001$),具体见表 3。

表 3 发药窗口儿科不合理处方登记率比较

Tab 3 Irrational prescription registration rates in pediatrics at dispensing window

时间	不合理处方 / 张	儿科不合理处方 / 张	儿科不合理处方占比 / %
规则库修订前 (2022 年 11 月—2023 年 1 月)	132	93	70.45
规则库修订中 (2023 年 2 月—2023 年 4 月)	125	68	54.40
规则库修订后 (2023 年 5 月—2023 年 7 月)	82	27	32.93

4 讨论

4.1 规则优化过程中存在的问题及解决方案

尽管前置审核规则库的优化能够显著提升儿童用药的安全性和有效性,但在实际实施过程中,仍然会面临一些挑战和潜在问题。如新规则的引入需要医师进行学习和适应,这可能会增加医师的工作负担,引起他们的不满,并可能导致在实施初期出现混乱。患儿家属可能对某些新规则不了解或存在疑虑,也可能影响他们对医疗服务的信任和满意度。为避免这些问题,可以将规则库的更新分阶段进行,优先更新关键和紧急的规则,同时为医师提供必要的培训和支持,包括在线课程、研讨会和实操演练,以帮助他们更快地掌握新规则。此外,可以设立专门的热线或咨询平台,供医师在遇到问题时寻求帮助。在药房设立患者咨询窗口,解答患者和家属的疑问和担忧。

此外,剂量规则的优化能有效提升说明书无儿童用法用量药品的使用安全性,暂时弥补了前置审核系统对非儿童专属剂型审核的空白,但优化过程中发现:按照成人剂量折算往往存在一些局限性:①《中国国家处方集(化学药品与生物制品卷·儿童版)》中按体重的计算方式(儿童剂量=成人剂量 $\times$ 儿童剂量/70 kg),对年幼儿童,剂量偏小;对年长儿童,特别是体重过大,剂量

偏大;②按儿童年龄计算的方式,虽然可用于剂量不需要太精确的药品剂量规则设置,但在设置规则时,不能按照年龄直接将计算公式嵌入系统,需要审方药师根据临床实际情况,分年龄段设置剂量范围;③按体表面积计算儿童剂量的方式最为合理,但计算较烦琐,临床使用不便,并且需要医师同时录入患者的身高、体重和年龄,前置审核系统才能实现实时审核。无论哪种折算方式都仅仅是设置规则的一种参考,不能作为计算儿童剂量的金标准,儿童用药最为精确的剂量仍是来源于说明书药代动力学的实验结果,故建议为儿童选择专属药物,对于儿童药品生产企业,统筹布局并合理使用儿童临床试验资源,开拓儿童临床试验数据来源,如真实世界数据和外国人群数据在儿童药研发中的应用,鼓励人工智能在儿童药物研发中的合理应用^[28]。也建议出台更多倾斜政策,如加强资金支持政策力度,科学引入市场资本对研发的投入、给予税收减免或优惠、延长药品专利保护期、缩短审评审批时限、通过集中采购或纳入医保提高市场的可及性等,激励更多企业投身儿童药的研发和生产。

4.2 儿童处方前置审核规则库优化的相关建议

基于该院处方前置审核规则库的优化实践经验,有以下几点建议:

①基于日常审方过程中发现的问题、发药窗口不合理处方记录以及事后处方点评,建议审方中心将规则的梳理与完善作为常态化工作,不断对药学信息整合,反复精简规则,将药学服务融合到处方前置审核系统,为处方前置审核系统提供技术支持,提高系统审核的信息化与智能化,提升药学服务水平,规范医师用药行为,保障患者用药安全。

②有关占比最大的超适应证问题,实际工作中发现,真正超适应证用药的极少,大部分是临床诊断书写不全或规则库不够完善,为解决此类问题,需审方药师加强与临床医师沟通,定时反馈问题。此外,及时查询循证医学证据,完善规则库,并做记录备案。

③系统规则库的超多日用量是统一设置的模块,如果不区分疾病、不区分药品仅依据《处方管理办法》严格设置用量程或者统一延长疗程,都不是最佳的处理方式。严格设置疗程如将门诊处方疗程(非慢性病)设置到 7 d,受药品包装规格和实际疗程的影响,导致超多日用量的警示信息会特别多;统一延长疗程时,会增加临床用药的风险。建议依据《处方管理办法》进行基础设置的同时针对疾病、药品进行精细化疗程设置,避

免疗程过短影响疗效, 疗程过长带来不良反应。

④ 强化知情同意与风险评估。在优化规则过程中, 严格保护儿童患者的个人隐私信息, 同时对儿童用药进行全面的风险评估, 确保用药方案对儿童权益的最小侵害。

5 结论

规则库的优化目的是在保证患者用药安全的基础上规范医师诊疗行为。本研究依据大量医学证据, 通过一些案例展示前置审核系统儿童用药规则库的优化过程, 并以各种指标的变化评价临床实践应用的效果, 其中, 系统审核后医师修改率的增加说明药学干预的有效性得到进一步提高; 任务合格率的提高说明儿科处方审核质量得到进一步改善; 发药窗口不合理处方登记率的下降, 说明规则的优化可以提高系统审核的准确性。同时, 药师在参与规则库的建立和维护中, 提高了处方审核和用药指导能力, 促进药师的职业发展。此外, 优化规则库还能为儿科药物研发提供方向性指导, 鼓励制药企业针对儿童特殊需求开发新药, 填补市场空白。未来, 应继续加强规则库的优化工作, 及时纳入最新的科研成果和临床指南, 确保审核标准的时效性和准确性。

参考文献

- [1] 国卫办医发. 关于印发医疗机构处方审核规范的通知 [EB/OL]. (2018-06-29) [2024-6-20]. http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2018-12/31/content_5435182.htm.
- [2] 李汶睿, 李岷, 赵春景, 等. 我国医疗机构处方前置审核开展的现状分析 [J]. 中国药房, 2021, 32 (5): 524-529.
- [3] 吴国丽, 卢晓林, 王芸. SWOT 分析儿童专科医院门诊处方前置审核规则库建设的应用与成效 [J]. 中南药学, 2023, 21 (12): 3345-3349.
- [4] 蒋志平, 彭骞, 王方杰, 等. 我院儿童合理用药规则库的构建与应用 [J]. 中国药房, 2023, 34 (8): 1005-1009.
- [5] 王雪韵, 苏巍巍, 丁宏, 等. 我国儿童药品在临床使用中存在的问题及对策分析 [J]. 中国药房, 2019, 30 (2): 149-153.
- [6] 罗利雄, 罗伶俐, 刘大平. 前置审方在特殊患者安全用药中的作用研究 [J]. 实用药物与临床, 2023, 26 (3): 280-284.
- [7] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 2022 中国卫生健康统计年鉴 [EB/OL]. (2023-09-20) [2024-6-20]. <http://www.nhc.gov.cn/mohwsbwstjxxzx/tjtjnj/202305/6ef68aac6bd14c1e-b9375e01a0faa1fb/files/b05b3d958fc546d98261d165cea4adba.pdf>.
- [8] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 对十三届全国人大三次会议第 4990 号建议的答复 [EB/OL]. (2021-02-09) [2024-6-20]. <http://www.nhc.gov.cn/wjw/jianyi/202102/b7968c89cb31484c918a47f3423018d5.shtml>.
- [9] 儿童锌缺乏症临床防治专家共识编写专家组, 中国研究型医院学会儿科学专业委员会. 儿童锌缺乏症临床防治专家共识 [J]. 儿科药学杂志, 2020, 26 (3): 46-50.
- [10] 申昆玲, 张国成, 尚云晓, 等. 重组人干扰素 α -2b 在儿科的临床应用专家共识 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2015, 30 (16): 1214-1219.
- [11] 申昆玲, 尚云晓, 张国成, 等. α 干扰素在儿科临床合理应用专家共识 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2018, 33 (17): 1301-1308.
- [12] 《中成药治疗优势病种临床应用指南》标准化项目组. 中成药治疗小儿急性上呼吸道感染临床应用指南 (2020 年) [J]. 中国中西医结合杂志, 2021, 41 (2): 143-149.
- [13] 中华中医药学会肺系病分会, 中国民族医药学会肺病分会. 急性气管-支气管炎中医诊疗指南 [J]. 中国循证医学杂志, 2021, 21 (12): 1365-1372.
- [14] 中国医疗保健国际交流促进会亚健康专业委员会中西医结合治疗学组. 喘息性支气管炎中西医结合治疗专家共识 [J]. 中国中西医结合杂志, 2020, 12 (1): 32-35.
- [15] 中华医学会儿科学分会儿童保健学组. 儿童微量营养素缺乏防治建议 [J]. 中华儿科杂志, 2010, 48 (7): 502-509.
- [16] 金锐, 王宇光, 薛春苗, 等. 中成药处方点评的标准与尺度探索 (八): 疗程与用药时长问题 [J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35 (22): 1979-1985.
- [17] 金锐, 郭红叶, 田佳鑫, 等. 感冒类中成药处方审核技术要点 [J]. 中南药学, 2022, 20 (8): 1720-1726.
- [18] 国家中医药管理局. 中成药临床应用指导原则 [S]. 2010.
- [19] 金锐, 王宇光, 薛春苗, 等. 中成药处方点评的标准与尺度探索 (十): 儿童用药 [J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37 (11): 1003-1008.
- [20] 中国国家处方集编委会. 《中国国家处方集 (化学药品与生物制品卷·儿童版)》[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013.
- [21] 中国医院协会, 国家儿童医学中心 (北京), 国家感染性疾病医疗质量控制中心, 国家呼吸系统疾病临床医学研究中心. 抗病毒药物在儿童病毒性呼吸道感染疾病中的合理应用指南 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2020, 35 (19): 1441-1450.
- [22] 国家儿童医学中心 (北京). 微生态制剂儿科处方审核建议 [J]. 中国实用儿科杂志, 2022, 37 (6): 415-423.
- [23] 重庆市医院协会药事管理专业委员会. 质子泵抑制剂审方规则专家共识 [J]. 中国药房, 2022, 33 (8): 897-909.
- [24] 中华医学会, 中华医学会临床药学会, 中华医学会杂志社, 等. 急性上呼吸道感染基层合理用药指南 [J]. 中华全科医生杂志, 2020, 19 (8): 689-697.
- [25] 中华医学会儿科学分会内分泌遗传代谢学组. 中枢性早熟诊断与治疗专家共识 (2022) [J]. 中华儿科杂志, 2023, 61 (1): 6-21.
- [26] 中国中西医结合学会儿科专业委员会消化学组. 中西医结合防治小儿腹泻专家共识 [J]. 世界中医药, 2022, 17 (21): 2979-2984.
- [27] 张慧丽, 田京辉, 徐贞贞, 等. 中成药重复用药的精细化设置在门诊前置审核中的应用实践 [J]. 中国医院药学杂志, 2024, 44 (11): 1345-1350.
- [28] 丁瑞琳, 白铭钰, 付佳男, 等. 我国儿童药研制的制约因素分析及政策建议 [J]. 中国卫生政策研究, 2024, 17 (2): 60-65.

(收稿日期: 2024-08-12; 修回日期: 2024-11-06)

门诊风湿免疫疾病处方点评与用药指导

胡永恒, 郝顺, 王婧, 朱剑波* (张家界市人民医院药学部, 湖南 张家界 427000)

摘要: **目的** 评估治疗风湿免疫疾病药物临床应用时存在的不合理情况, 建立风湿免疫疾病患者药学服务方案, 促进免疫风湿疾病患者合理用药。**方法** 本研究对张家界市人民医院风湿免疫疾病患者使用免疫抑制剂及其联用药物的处方进行回顾性分析, 总结目前存在的用药问题, 采取药师用药指导培训-窗口用药教育, 药师处方点评-反馈专科医师的模式, 提高处方开具的合格率及用药合理性。**结果** 处方点评合格率由干预前的 84.13% 提高到了干预后的 90.42%。**结论** 对风湿免疫疾病药物超说明书用药情况进行处方点评能够有效规范医师开方, 对于这类需要长期管理的慢性病有着重要意义。

关键词: 风湿免疫疾病; 处方点评; 用药指导

中图分类号: R95, R969.3 **文献标识码:** A

文章编号: 1672-2981(2025)05-1459-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.043

风湿免疫疾病指主要侵犯结缔组织的一类疾病, 包括类风湿关节炎(RA)、系统性红斑狼疮(SLE)、强直性脊柱炎(AS)、原发性干燥综合征等, 狭义的风湿免疫病包括自身免疫性疾病、结缔组织病、自身炎症性疾病等; 广义的风湿免疫疾病包括代谢、遗传、内分泌及感染等多种疾病。风湿免疫疾病属于自身免疫病, 因此这些疾病常应用改善病情抗风湿药(DMARDs)中的免疫抑制剂进行治疗。而在大部分免疫抑制剂的说明书中, 并没有风湿免疫疾病的适应证及用法用量, 因此临床常根据最新指南或专家共识进行超说明书用药(OLDU)。超说明书用药也称“药品未注册用法”, 是指药品使用的适应证、给药方法或剂量不在药品监督管理部门批准的说明书之内的用法^[1]。为规范张家界市人民医院(以下简称“我院”)门诊风湿免疫疾病超说明书用药情况, 完善风湿免疫疾病患者治疗过程, 促进治疗风湿免疫疾病药物合理安全应用, 进行处方点评与用药指导。

1 资料来源

通过我院 HIS 系统, 提取 2023 年 1 月 1 日—2024 年 1 月 1 日我院门诊药房涉及非甾体抗炎药(双氯芬酸、萘丁美酮等)、抗风湿药(甲氨蝶呤、来氟米特、柳氮磺吡啶、羟氯喹、他克莫司、吗替麦考酚酯、环孢素等)、生物制剂(依那西普、阿达木单抗、重组人 II 型肿瘤坏死因子受体-抗体融合蛋白等)、糖皮质激素(泼尼松、甲泼尼龙等)、中成药(雷公藤多苷、白芍总苷等)、核素药物(锝^{99m}TC)亚甲基二膦酸盐等治疗风湿免疫疾病药物的全部

处方, 共抽取 5304 张。处方诊断涵盖的疾病种类包括 RA、SLE、AS。收集患者处方共 5304 份, 其中 RA 病例处方 3476 份, SLE 病例处方 1534 份, AS 病例处方 294 份, 作为处方点评前处方数据。抽取 2024 年 5 月 1 日—2024 年 11 月 1 日处方诊断涵盖 RA、SLE、AS 的全部处方共 3216 张, 作为处方点评后处方数据。

2 方法

2.1 点评标准

参考药品说明书, 将说明书中用法用量, 相互作用等作为判断处方适宜性的主要标准。依据“2.2”项下所提供的参考标准进行超说明书用药评判。处方点评流程如图 1 所示。

2.2 参考标准

根据《处方审核实践系列教程——血液系统疾病、风湿免疫性疾病、泌尿生殖系统疾病分册》^[2]的处方点评要求, 结合处方诊断, 查阅相关临床指南、共识等循证证据^[3-10], 对所抽取风湿免疫疾病患者处方进行点评。

例如, 甲氨蝶呤应用于 RA 属于超适应证用药, 有效性等级 I 级, 推荐级别 II a 级, 证据强度 B 类。根据指南, 口服甲氨蝶呤治疗 RA 常用剂量为 7.5~20 mg/周, 超过该剂量则存在不良反应发生的风险, 因此高于该剂量可判定为不合理。艾拉莫德根据说明书治疗 RA 用法用量应为 25 mg bid, 由于缺乏超说明书用药指导, 故通过查阅临床研究文献确定其用法用量, 在与来氟米特联用治疗

作者简介: 胡永恒, 男, 硕士, 药师, 主要从事临床药学方面的工作, email: 744714096@qq.com *通信作者: 朱剑波, 男, 硕士, 副主任药师, 主要从事医院药事管理和药物临床试验机构管理方面的工作, email: 18074440150@163.com

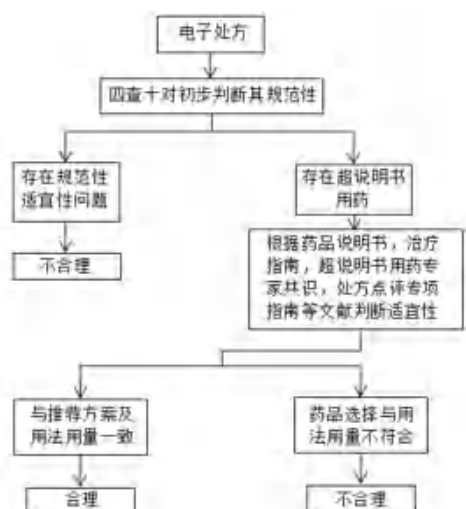


图1 处方点评流程图

RA 中其用法用量为 25 mg qd。白芍总苷用法用量为 0.6 g，一日 2~3 次，或遵医嘱。某些患者可能存在肝功能不全，或是联合用药需要减量，白芍总苷 0.6 g qd 可视为合理。若处方中有治疗风湿免疫疾病并发症而未写诊断，如处方中有质子泵抑制剂（PPI）（短疗程）或升血细胞中成药，视为合理。但高血压、高脂血症等未写临床诊断的则视为临床诊断不全（狼疮性肾炎使用降压药除外）。若处方中存在抗菌药物而仅有风湿免疫疾病诊断的，视为适应证不适宜，结核感染患者则视为临床诊断不全。具体药物的超说明书用药与点评问题见表 1。

2.3 药学服务模式

2.3.1 药师用药指导培训-窗口用药教育 对门诊药房药师进行免疫风湿疾病药物用药指导培训^[1]，培训内容包括熟悉常用风湿免疫疾病药物的说明书内容及注意事项。对 2024 年 2 月 1 日—2024 年 4 月 1 日期间患者进行用药教育和回访，包括是否知道该药用法用量，何时服用最好，有无合并服用其他药物等问题。根据患者回答情况统计用药指导合格率，评估用药教育的情况。

2.3.2 药师处方点评-反馈专科医师 处方点评结果反馈至医师后，对医师进行风湿免疫疾病药物应用的培训，敦促医师进行超说明书用药备案。

3 结果

3.1 处方点评结果

提取 2023 年 1 月 1 日—2024 年 1 月 1 日的 5304 张处方中，有 842 张处方存在不合理情况，处方不合理率为 15.87%。不合理类型主要为开具处方未写临床诊断或临床诊断书写不全；用法、用量不适宜；无特殊情况下，门诊处方超过 7 日用量，急诊处方超过 3 日用量，慢性病、老年病或特殊情况

需要适当延长处方用量未注明理由等，见表 2。

3.2 药师用药指导与干预结果

2024 年 2 月 1 日—2024 年 4 月 1 日有效复诊人数 233 人，对这些患者进行用药教育，内容涵盖了用法用量，用药时机，不良反应，注意事项以及健康教育。复诊时通过窗口询问的方式统计出用药教育有效的患者共 198 人，用药指导合格率 84.98%。说明大部分患者通过用药教育后，能够清楚地认识到如何正确地服用药物，这将有效促进患者用药的合理性与依从性。

通过处方点评对医师进行培训后，不合理处方中超长疗程用药、中成药用法用量、免疫抑制剂相互作用等问题得到医师的高度重视。例如处方中叶酸片 100 粒 qw 超长疗程已改为 4~8 粒 qw，白芍总苷单次剂量 0.3 g 改为单次 0.6 g，抗菌药物在临床诊断中体现用药指征等。其他改善方面如减少 PPI 的长期应用，改为联合应用胃黏膜保护剂；生物制剂按照说明书要求使用合适的溶媒；按照指南或共识及院内备案进行超说明书用药等。从点评结果来看，抽取的 2024 年 5 月 1 日—2024 年 11 月 1 日的 3216 张处方中，仅有 308 张处方存在不合理情况，问题大多为临床诊断不全以及院内新录入药物用法用量的问题。处方合理率为 90.42%。相较于未进行药师干预前处方合格率提高了 6.29%。

4 结论

4.1 处方点评主要问题

收集到的处方中大多存在超说明书用药的情况，例如甲氨蝶呤、他克莫司用于 RA 和 SLE；环孢素、吗替麦考酚酯用于 SLE 等。临床诊断不全是此次处方点评中发现最多的问题，占总不合理处方的 40.02%。这是由于一些免疫风湿疾病患者还存在代谢综合征、结核感染、肾功能不全、消化道溃疡等其他合并疾病，医师为这些患者开具应对上述疾病治疗药物时临床诊断仅仅只有单一的一种免疫风湿疾病，药师需要建议临床医师完善临床诊断。由于处方点评只能通过处方来判断患者该次用药是否合理，完整的临床诊断对于处方合理性的判断有着很重要的意义，例如 RA 患者应用糖皮质激素、非甾体抗炎镇痛药时，医师常应用 PPI 应对风湿免疫疾病或药物对消化道造成的损伤，但由于当前缺乏风湿免疫疾病应用 PPI 的相关指南和评价指标，对于长期使用 PPI 预防风湿免疫疾病或药物导致的消化器官损伤缺乏循证依据。只能根据《质子泵抑制剂处方规则专家共识（2022 版）》^[12]等相关指南或专家共识对该类处方进行合理性判断。因

表 1 我院门诊现有治疗风湿免疫疾病的药物超说明书用药点评问题

药物	适应证			超说明书用药	点评问题
	RA	SLE	AS		
依那西普	a, b	—	a, b	超人群用药	用法用量
阿达木单抗	a, b	—	a, b	超人群用药	用法用量
司库奇尤单抗	—	—	a	—	用法用量
利妥昔单抗	a, b	a, b	—	超适应证用药	用法用量
重组人Ⅱ型肿瘤坏死因子受体-抗体融合蛋白	a, b	—	a, b	超人群用药	用法用量
锝 [⁹⁹ Tc] 亚甲基二膦盐	a, b	—	—	—	用法用量
白芍总苷	a, b	—	c	—	用法用量
雷公藤多苷	a, b	b	c	—	用法用量、相互作用
正清风痛宁	a, b	—	c	—	用法用量、相互作用
汉防己甲素	a	—	—	—	用法用量
甲氨蝶呤	b, c	c	c	超适应证用药	用法用量、相互作用
环磷酰胺	a, b	a, b	—	超适应证用药	适应证
环孢素	a, b	b	—	超适应证用药	用法用量、相互作用
来氟米特	a, b	a, b	—	—	用法用量、相互作用
吗替麦考酚酯	—	c	—	超适应证用药	用法用量、相互作用
他克莫司	—	c	—	超适应证用药	用法用量、相互作用
艾拉莫德	a, b	—	—	—	用法用量
沙利度胺	—	c	c	超适应证用药	用法用量、相互作用
托法替布	a, b	—	—	—	用法用量、相互作用
柳氮磺吡啶	a	—	b	超人群用药	用法用量
羟氯喹	a, b	a, b	—	超人群用药	用法用量、相互作用
双氯芬酸	a	—	a, b	超人群用药	用法用量
艾瑞昔布	—	—	—	超人群用药	用法用量
右酮洛芬	a	—	a	超人群用药	用法用量
氯诺昔康	a	—	—	超人群用药	用法用量
泼尼松	c	a, b	c	超人群用药	用法用量、相互作用
甲泼尼龙	a, b	a, b	a, b	超人群用药	用法用量、相互作用

注：a. 我院药品说明书具有适应证（来源于 MCDEX 数据库）；b. 国内药品说明书具有适应证；c. 国内说明书外具有适应证（需进行依据等级评价评估）。

表 2 842 张风湿免疫疾病患者处方点评不合理情况

不合理类型	RA		SLE		AS	
	处方数 / 张	占不合理处方的比例 / %	处方数 / 张	占不合理处方的比例 / %	处方数 / 张	占不合理处方的比例 / %
开具处方未写临床诊断或临床诊断书写不全	216	42.12	109	40.52	12	20
遴选的药品不适宜	7	1.36	18	6.69	—	—
适应证不适宜	23	4.48	29	10.78	—	—
用法、用量不适宜	137	26.71	89	33.09	48	80
联合用药不适宜	1	0.19	3	1.12	—	—
重复给药	2	0.39	—	—	—	—
处方的前记、正文、后记内容缺项	11	2.14	1	0.37	—	—
无特殊情况下，门诊处方超过 7 日用量，急诊处方超过 3 日用量，慢性病、老年病或特殊情况下需要适当延长处方用量未注明理由	116	22.61	20	7.43	—	—

此，若临床诊断未体现患者存在酸性消化道疾病且预防性使用 PPI 疗程较长，则判定其开具处方未写临床诊断或临床诊断书写不全。

治疗 AS 均采用注射生物制剂为主的方案，

因此无遴选药品不适宜的情况，RA 遴选药品不适宜的情况主要是在镇痛药物与抗菌药物的选择，例如关节炎患者应用加巴喷丁、普瑞巴林等进行镇痛，合并结核感染应用头孢克肟等。而 SLE 则

是在应用替米沙坦、艾拉莫德等方面存在不适宜,例如患者合并高血压时选用替米沙坦降压,同时使用了吗替麦考酚酯(MMF),由于替米沙坦使MMF的活性代谢产物麦考酚酸(MPA)浓度下降约30%,但未观察到有临床意义的药代动力学相互作用结果,考虑患者可应用其他同类药物降血压,因此建议临床医师考虑同类降压药物。艾拉莫德尚无治疗SLE适应证,超说明书用药指南里也未提及,虽有部分文献应用该药取得了较好的疗效,但仍缺乏循证治疗依据。

联合用药不合理的情况,处方中所合用的药物与环孢素等免疫抑制剂存在药物相互作用,可能导致免疫抑制剂的浓度、疗效改变,甚至产生不良反应。在SLE处方中,存在环孢素与阿托伐他汀钙联合用药。环孢素、阿托伐他汀钙均主要经CYP3A4在肝脏内代谢。环孢素与阿托伐他汀钙联合应用时,前者会抑制CYP3A4介导的肝脏代谢,导致阿托伐他汀钙血药浓度增加,易引起横纹肌溶解等不良反应。环孢素治疗窗窄,生物利用度、药代动力学个体差异大,联合应用时,可通过对环孢素进行血药浓度监测,以达到治疗效果,降低不良反应发生的风险。但在病历回顾时发现,所有病例用药后均未及时进行血药浓度监测,对于药物相互作用的问题缺乏关注。

4.2 超说明书用药点评问题

RA处方中用法用量的问题主要出现在甲氨蝶呤、白芍总苷、来氟米特、艾拉莫德、百令片等药物中,包括单次剂量过低或过高,用药频次不符合药代动力学规律等问题。SLE处方中用法用量的问题主要出现在MMF、白芍总苷、来氟米特、环孢素、百令片等药物中,问题与RA处方相同。AS处方用法用量的问题则是和注射剂溶媒有关,包括是否缺失溶媒、溶媒种类的选择、溶媒用量的选择等,此外还有注射方式、注射频次的问题。

4.3 药学服务模型建立的意义

根据点评结果,2023—2024年我院风湿免疫疾病女性患者多于男性,RA患者人数>SLE患者人数>AS患者人数,RA处方不合格率(14.76%)<SLE处方不合格率(17.54%)<AS处方不合格率(20.41%)。通过加强医师对风湿免疫疾病药物应用的培训,规范地制订安全、有效的用药方案,加强对院内处方进行前置审核^[12],及时发现并遏制不合理用药现象,并将信息通过HIS系统反馈给临床,为临床决策提供参考。治疗风湿免疫疾病的药物有许多种,能够正确地应用不代表能够合理

的应用,为患者做好用药指导能够进一步改善当前风湿免疫疾病患者存在的“服药量多,依从性差”的问题。风湿免疫疾病需要进行长期的慢性病管理,持续治疗过程中不仅疗效需要达标还需要关注疾病进展过程中存在的并发症以及联合用药时存在不良反应发生的风险。常见的药学监护包括患者评估、制订并执行监护计划、随访评估等步骤,随访评估则是实现慢性病管理的重要手段,不少风湿免疫性疾病患者存在自行减停药物,用药时间错误等各种问题,造成病情反复甚至恶化^[13-15]。当前医务人员缺乏对患者进行基本医疗知识,用药指导和生活指导的教育,导致患者用药时依从性差,随诊率不高,无法掌握患者治疗全过程的医院情况,最终导致治疗失败。通过对药师进行用药指导培训,在窗口为患者做好用药教育能有效敦促患者合理服用药物,规范患者用药习惯,减少不良反应的发生。

对免疫风湿疾病药物超说明书用药情况进行处方点评,发现医师在为患者开具处方时存在的一些问题,采取用药指导培训-窗口用药教育,药师处方点评-反馈专科医师的模式,能够有效规范医师开方,提高患者合理用药意识。对于这类需要长期管理的慢性病有着重要意义。

参考文献

- [1] 严婷,廖德华,符一岚,等.某肿瘤医院免疫检查点抑制剂超说明书用药分析[J].中南药学,2024,22(5):1358-1364.
- [2] 陈敬,杨瑞,朱运贵.《处方审核实践系列教程——血液系统疾病、风湿免疫性疾病、泌尿生殖系统疾病分册》[M].北京:人民卫生出版社,2023:77-123.
- [3] 广东省药学会风湿免疫用药专家委员会.风湿免疫疾病超药品说明书用药专家共识(之一)——类风湿关节炎[J].中国现代应用药学,2017,34(3):439-443.
- [4] 广东省药学会风湿免疫用药专家委员会.风湿免疫疾病超药品说明书用药专家共识(之二)——系统性红斑狼疮[J].中国现代应用药学,2017,34(3):444-450.
- [5] 广东省药学会风湿免疫用药专家委员会.风湿免疫疾病超药品说明书用药专家共识(之三)——强直性脊柱炎[J].中国现代应用药学,2017,34(3):451-457.
- [6] 梁传鹏,赵丽霞,刘敏,等.肾内及风湿免疫类药物超药品说明书用药专家共识[山东省超药品说明书用药专家共识(2022版)系列][J].中国合理用药探索,2023,20(3):37-43.
- [7] 童荣生.生物制剂治疗类风湿关节炎合理用药中国专家共识[J].中国新药杂志,2022,31(21):2174-2184.
- [8] 《中成药治疗优势病种临床应用指南》标准化项目组.中成药治疗类风湿关节炎临床应用指南(2022年)[J].中国中西医结合杂志,2023,43(3):261-273.
- [9] 广东省药学会.超药品说明书用药目录(2024年版新增

- 用法) [J]. 今日药学, 2024, 34 (7): 481-493.
- [10] Smolen JS, Landewé RB, Bergstra SA, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying anti-rheumatic drugs: 2022 update [J]. Ann Rheum Dis, 2023, 82: 3-18.
- [11] 马慧艳, 赵志刚, 乔春风, 等. 中国城镇老年慢性病患者居家安全用药现状调查与影响因素分析: 一项基于全国多中心的研究 [J]. 中南药学, 2024, 22 (10): 2696-2701.
- [12] 重庆市医院协会药事管理专业委员会. 质子泵抑制剂审方规则专家共识 [J]. 中国药房, 2022, 33 (8): 897-910.
- [13] 邹林珂. 风湿免疫疾病患者的创新药物治疗管理服务模式研究 [D]. 成都: 电子科技大学, 2021.
- [14] 刘剑敏, 林奕凯, 黄鹤归, 等. 以药师为主导的全程化用药管理模式在风湿免疫性疾病中的实践研究 [J]. 中国药房, 2022, 33 (17): 2147-2151.
- [15] 周玉冰, 张爱玲, 张文达, 等. 临床药师参与免疫相关性垂体炎继发性肾上腺皮质功能不全诊治的药学实践 [J]. 中南药学, 2024, 22 (7): 1949-1952.

(收稿日期: 2024-12-14; 修回日期: 2025-02-15)

区域性老年患者用药安全风险量化评价标准指标体系的构建

葛艳慧, 杜书章* (郑州大学第一附属医院, 郑州 450052)

摘要: **目的** 构建老年患者用药安全风险量化评价标准指标体系, 为老年患者的药学服务分级管理提供理论参考。**方法** 采用德尔菲法, 对河南省内 11 家三级甲等医院的 21 名专家进行问卷函询, 建立老年患者用药安全风险评价标准指标体系。采用层次分析法确定各级指标权重, 以指标权重初步量化老年患者用药安全风险评价标准指标体系。**结果** 德尔菲函询结果分析表明, 专家权威系数为 0.748, 权威性较高。各级指标肯德尔协调系数为 0.351 ~ 0.775, 卡方检验 P 值均小于 0.05, 具有显著性, 专家协调程度好。经过两轮专家函询后, 确定了老年患者用药安全风险评价标准指标体系并权重量化各指标, 包括 3 个一级指标, 10 个二级指标, 32 个三级指标。**结论** 构建的老年患者用药安全风险量化评价标准指标体系具有权威性和科学性, 可为老年入院患者的药物重整及住院后的药学服务分级管理提供理论依据。

关键词: 老年患者; 用药安全风险; 评价标准; 指标体系

中图分类号: R95, R969.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)05-1463-05
doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.044

Quantitative evaluation standard index system for regional drug safety risks in elderly patients

GE Yan-hui, DU Shu-zhang* (The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052)

Abstract: **Objective** To establish a quantitative evaluation standard index system for medication safety risks in elderly patients, and to provide theoretical reference for medication grading management. **Methods** With the Delphi method, a questionnaire survey was conducted among 21 experts from 11 tertiary hospitals in Henan Province to establish a standard index system for drug safety risk assessment for elderly patients. The analytic hierarchy process was used to determine the weight of indicators at all levels, and quantify the standard indicator system. **Results** The Delphi inquiry showed that the expert authority coefficient was 0.748, indicating a high level of authority. The Kendall coordination coefficients of indicators at all levels ranged from 0.351 ~ 0.775, and the P -values of the Chi-square test were all less than 0.05, indicating significance. The degree of expert

基金项目: 河南省医学科技攻关计划 (联合共建) 项目 (No.LHGJ20190271)。

作者简介: 葛艳慧, 女, 主管药师, 主要从事药事管理方面的研究, email: geyanhui1219@163.com *通信作者: 杜书章, 男, 主任药师, 主要从事药物经济学等方面的研究, email: dushuzhang911@163.com

coordination was good. After two rounds of expert consultation, the standard indicator system for drug safety risk assessment in elderly patients was determined and each indicator was weighted, including 3 first level indicators, 10 second level indicators, and 32 third level indicators. **Conclusion** The established quantitative evaluation standard index system for medication safety risks in elderly patients is scientific and reliable, providing a theoretical basis for the drug restructuring for elderly hospitalized patients and the grading management of medication after the hospitalization.

Key words: elderly patient; medication safety risk; evaluation standard; index system

老年病患用药不仅要考虑其自身吸收代谢的特点,还要考虑普遍存在的多重用药、潜在不适当用药 (potentially inappropriate medication, PIM) 以及用药依从性低等情况^[1-4]。因此,老年用药安全一直是国内外备受关注的问题。药师是医疗团队中保障患者安全用药的关键,在临床药学服务中,应大力开展治疗药物管理,实现最佳的治疗方案。目前,国内正在积极推行老年人合理用药辅助工具对用药风险进行预警提示,参考标准有《中国老年人潜在不适当用药目录 (2017 版)》、Beers 标准或老年人不适当处方筛查工具 (STOPP) 等^[5]。国家卫生健康委、中医药局 2022 年 7 月发布的《关于进一步加强用药安全管理提升合理用药水平的通知》中指出应强化老年人用药安全管理:建立老年患者用药管理制度,针对不同风险水平的老年患者采取分级管理措施^[6]。国外已有针对特殊疾病的老年患者多重用药分级管理系统,主要是对药品的分级^[5],但未见对药学服务进行分级管理。风险评估策略是通过分析不良事件的风险因素进行评估,将风险程度以客观的可量化指标体现,弥补经验性评估的不足,从而有效预防或减少意外事件的发生^[7]。分级管理是根据老年患者的情况进行分级,按照不同级别制订不同的具有针对性的干预方案,从而提高干预质量^[8]。基于风险评估策略的分级管理在医护领域中已有较高的应用^[7-9]。本研究的目的是探索老年患者用药安全风险因素,建立并量化老年患者用药安全风险评价标准指标体系。

德尔菲法是一种反馈匿名函询法,近年来在医疗领域相关指标体系的建设中应用广泛^[10-12],研究结果权威可靠。因此,本研究运用德尔菲法构建老年患者用药安全风险评价标准指标体系并进一步量化,为老年患者的药学服务分级管理体系的建设提供可能的指标依据。

1 研究方法

1.1 初步建立指标体系

以“老年患者”“用药安全”“风险评价”“指标

体系”等中文主题词和“elderly patients”“medication safety”“risk evaluation”“index system”等英文主题词查阅相关文献^[10-12],拟订老年患者用药安全风险评价标准指标草案。依据草案对我院进行临床药学服务的药师进行访谈,记录建议和意见。整理、归纳、汇总后,最终得到的老年患者用药安全风险评价标准指标体系包含 3 个一级指标、11 个二级指标、33 个三级指标。据此编制第一轮专家函询问卷。

1.2 确定咨询专家

德尔菲法一般要求遴选的专家为相关领域内具有权威性的专业人员,数量以 15~50 名为佳^[10-12]。本研究最终确定了 21 名具有代表性的专家。遴选标准:① 医院药学、临床药学领域工作 7 年及以上;② 具备自身专业本科及以上学历;③ 取得相关专业中级及以上职称;④ 能够积极参与问卷函询。

1.3 专家函询

专家函询表采用 Likert 5 级综合评分的方法对各项指标的重要性及可行性程度进行评分:“非常重要”“比较重要”“一般重要”“不太重要”“不重要”和“非常可行”“比较可行”“一般可行”“不太可行”“不可行”依次赋值 5 分、4 分、3 分、2 分和 1 分。专家判定的依据用“判断以及影响程度量化表”调查;专家的熟悉程度用“指标熟悉程度表”调查,计算权威系数 (C_r) [判断系数 (C_a) 与熟悉系数 (C_s) 的算术平均值]^[10-12]。将专家函询调查表以二维码或短信链接的形式发送给专家并电话告知,1 周后统一回收并由本研究小组对问卷进行整理、数据分析。第一轮专家函询后,舍弃重要性、可行性平均得分 ≤ 3.5 分或变异系数 ≥ 0.25 的指标^[13-15],并将函询专家提出的意见汇总编入第二轮问卷。第二轮函询时征询专家对第一轮的意见是否同意,并对指标的重要性及可行性进行再次评价。

1.4 数据统计分析

利用 Excel 2007 和 SPSS 5.0 软件对函询数据进行统计分析,计算各指标的重要性和可行性评分的

算术平均值、变异系数。函询专家积极系数用问卷回收率代表；专家的权威程度用 C_r 代表；专家意见的协调程度用肯德尔协调系数 (Kendall's W) 代表；层次分析法辅助软件 Yaahp 确定各指标重要性权重值^[16]。

2 结果

2.1 咨询专家一般资料

本研究最终选择了河南省多地区 (郑州、许昌、平顶山、驻马店、洛阳、南阳、信阳、开封) 11 所三级甲等医院的 21 名具有代表性的药学专家。21 名专家平均年龄 (38.4 ± 7.0) 岁, 平均工作年限 (14.0 ± 8.8) 年。咨询专家的一般资料见表 1。

2.2 专家积极程度

本研究共进行了两轮问卷函询。第一轮共发出问卷 30 份, 回收 21 份, 回收率仅 70.0%, 其中 7 名专家对指标体系提出修改意见。第二轮共发出问卷 21 份, 收回 21 份, 回收率达 100%。第一轮和第二轮均参与函询的 21 位专家积极性较高。

2.3 专家权威程度

专家权威系数 $C_r \geq 0.700$ 表示可接受信度^[17]。统计分析 21 位函询专家自评结果, $C_a = 0.862$, $C_s = 0.633$, $C_r = 0.748$ 。数据结果表明, 本研究最终确定的专家权威程度较好。

2.4 专家协调程度

表 1 咨询专家的一般资料

项目	分类	n (%)
性别	男	6 (0.29)
	女	15 (0.71)
年龄 / 岁	31 ~ 35	10 (0.48)
	36 ~ 40	6 (0.28)
	41 ~ 60	5 (0.24)
工作年限 / 年	7 ~ 10	11 (0.52)
	11 ~ 15	5 (0.24)
	≥ 16	5 (0.24)
职称	中级	11 (0.52)
	高级	10 (0.48)
学历	本科	2 (0.10)
	硕士	19 (0.90)

Kendall's W 用来评价函询专家对指标评分的一致性, 其值在 0 ~ 1。其值越接近 1, 代表专家协调程度越好。德尔菲法研究中, Kendall's $W > 0.3$ 则说明专家意见协调程度符合要求^[17]。卡方检验用来评价协调系数结果的一致性: 若 $P < 0.05$, 表明 Kendall's W 的一致性具有显著性, 即专家对指标的评分具有较好的一致性。本研究两轮专家函询评分结果的 Kendall's W 和 χ^2 值如表 2 所示。两轮参与专家 Kendall's W 均在 0.351 ~ 0.775, P 均 < 0.05 , 说明本研究结果可靠。

表 2 两轮专家函询的协调程度

Tab 2 Coordination coefficients of two rounds of expert inquiry

参数		重要性			可行性		
		Kendall's W	χ^2	P	Kendall's W	χ^2	P
第一轮	一级指标	0.646	42.656	0.005	0.775	51.138	< 0.001
	二级指标	0.351	85.034	< 0.001	0.465	112.587	< 0.001
	三级指标	0.372	270.261	< 0.001	0.471	342.218	< 0.001
第二轮	一级指标	0.571	34.25	0.024	0.578	34.689	0.022
	二级指标	0.477	95.376	< 0.001	0.497	99.414	< 0.001
	三级指标	0.515	329.573	< 0.001	0.436	279.351	< 0.001

2.5 函询结果

两轮函询后, 专家同意变更内容: ① 二级指标“既往病史”中加入三级指标“疾病类型”; ② 二级指标“损伤风险药物”中加入三级指标“易出现严重不良反应事件药物”; ③ 二级指标“慎用和禁用药品”和“相互作用”合并为“潜在不适当用药”; ④ 三级指标“心脑血管风险药物”更改为“心血管风险药物”; ⑤ 修改三级指标“相互作用”释义为“多药联用存在相互作用产生的风险”。未同意变更内容: ① 删除三级指标“购买途径”(非正规渠道购买的药品风险较高); ② 一

级指标加入“药品认知风险”(在药品管理风险中已包含药品认知)。最终形成 3 个一级指标、10 个二级指标、32 个三级指标, 详见图 1。

2.6 层次分析结果

建立判断矩阵, 录入 Yaahp 软件, 获得各级指标权重值, 初步量化指标体系。各级权重值一致性指标 CI 接近于 0, 有满意的一致性。老年患者用药安全风险评价标准指标体系为本研究的决策目标层。3 个一级指标为第一个准则层要素; 10 个二级指标为第二个准则要素层, 32 个三级指标为指标层。层次模型及各级指标权重值见图 1。

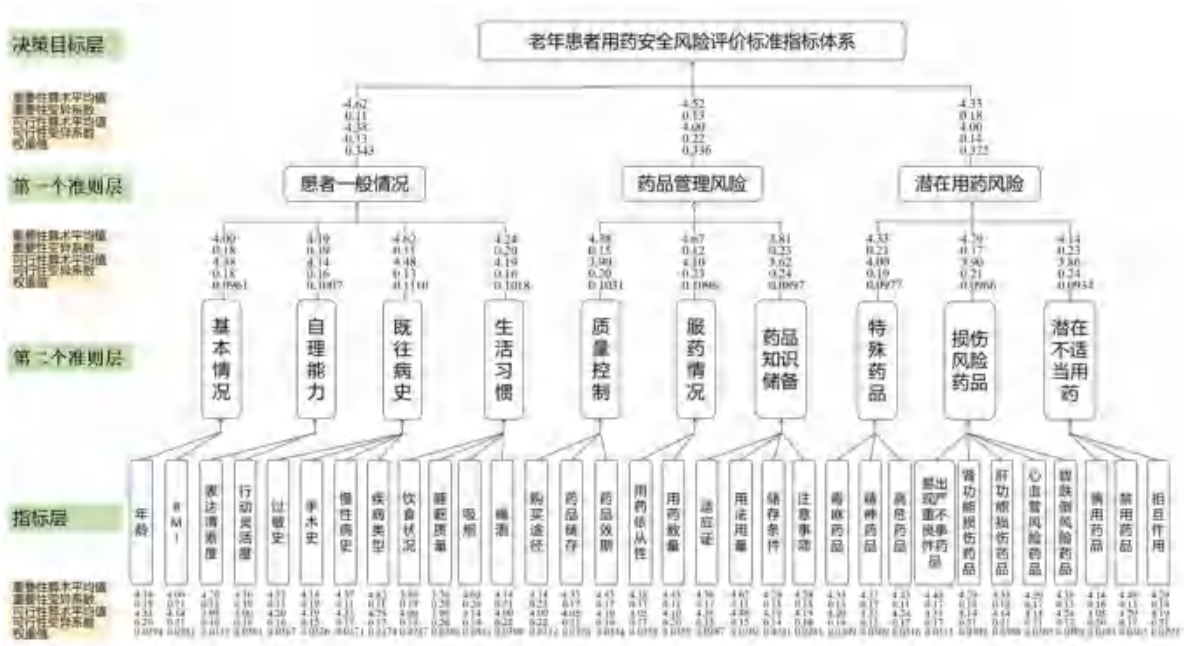


图 1 老年患者用药安全风险评价标准指标体系层次模型及量化评价图

Fig 1 Hierarchical model and quantitative evaluation of quantitative evaluation standard index system for medication safety risks in elderly patients

注 (Note): BMI. 体质质量指数 (Body mass index)。

3 讨论

随着药学服务不断地推进, 药师走进临床、服务临床成为药学人员发展的重点方向。老年人作为特殊人群之一, 更是药师药学服务的密切关注对象。在既往国内外研究中, 关注较多的是老年患者多重用药风险、不合理用药风险及药物危险分级^[1, 3, 18]。而本研究建立的老年患者用药安全风险评价标准指标体系, 则是对老年人多维度用药现状的风险评估展开的一次实践探索。

本研究探索性地构建老年患者用药安全风险评价标准指标体系。为确保研究结果可靠, 研究小组在省内函询了 11 家三甲医院, 按照德尔菲法进行两轮问卷函询, 获得专家职称、工作年限、年龄、学历等信息, 并通过自评数据得到专家权威系数。数据分析结果显示, 第二轮问卷回收率达 100.0%, 说明专家积极性较好, 最终纳入的 21 位专家均参与了两轮函询。纳入专家的 C_r 值为 0.748, 表明专家的权威性较好。专家对各级指标的重要性和可行性评分的变异系数均小于 0.25, 体现了专家对各级指标意见较好的一致性。Kendall's W 为 0.351 ~ 0.775, 卡方检验 P 值均小于 0.05, 专家协调程度好, 体现了专家对指标体系具有较好的一致性认可。在权重体系构建上, 采用层次分析法 (AHP) 确定各指标权重, 进一步确保了结果的科学合理。

研究小组在参考了老年患者虚弱风险评

估、急性冠脉综合征患者安全风险评价指标体系等^[10-12]的经验基础上, 建立了 3 个评价维度: “患者一般情况”“药品管理风险”和“潜在用药风险”。内容分析:

① 一级指标中患者一般情况 (0.343) 最重要, 患者的身体状况及疾病情况与用药多少、用药复杂情况密切相关, 是一切医疗活动的基础, 专家们更关注患者身体状况及生活管理所带来的风险。

② 二级指标中权重值排名前 5 的指标: 既往病史 (0.1110) > 服药情况 (0.1098) > 质量控制 (0.1031) > 生活习惯 (0.1018) > 自理能力 (0.1007)。其中有 3 项为患者一般情况的二级指标, 排名第 1 的既往病史体现了专家对自身疾病所带来的用药风险的高度重视; 另外两项为药品管理项下的二级指标, 体现了专家对老年人用药依从性、多重用药、药品质量管理的担忧。

③ 三级指标中权重值排名前 10 的指标: 疾病类型 (0.0374) > 慢性病史 (0.0371) > 过敏史 (0.0367) > 用药依从性 (0.0359) > 用药数量 (0.0355) > 手术史 (0.0336) > 药品效期 (0.0334) > 药品储存 (0.0326) > 高危药品 (0.0316) > 表达清晰度 (0.0315)。三级指标重要性与一、二级指标相对应, 第 1 名的二级指标下的疾病类型、慢性病史、过敏史、手术史分别为三级指标的第 1、2、3、6 名; 第 2 名的二级指标下的用药依从性、用药数量分别为三级指标的第

4、5 名；第 3 名的二级指标下的药品储存、药品效期分别为三级指标的第 7、8 名；另外，特殊药品的高危药品、自理能力下的表达清晰度分为三级指标的第 9、10 名。这些构成特点一定程度上体现了老年人安全用药风险的来源，也提示了药师在药学服务过程中可能要关注的重点内容。

综上，本研究应用德尔菲法建立了老年患者用药安全风险评价标准指标体系，方法经典，结果可靠，因此该指标可能为老年入院患者的用药安全风险评分提供参考，从而进一步探讨分级管理、分级服务等。本研究也存在一定的局限性和不足。首先，参与专家均为药学或临床药学专业人员，未纳入临床医护专家，这可能会使结果具有一定的局限性。另外，专家仅限于省内且均为三级甲等医院，未纳入其他地区和各级别医院数据，且未在实际中扩大应用来验证指标体系的信效度。因此未来的研究中可以依据该指标体系建立老年患者用药安全风险评分量表，将量表应用于实际的临床药学服务中，进一步验证指标体系的信效度。

参考文献

- [1] 刘葳, 于德华, 金花, 等. 社区老年多病共存患者多重用药情况评价研究[J]. 中国全科医学, 2020, 23 (13): 1592-1598.
- [2] Muhlack DC, Hoppe LK, Weberpals J, et al. The association of potentially inappropriate medication at older age with cardiovascular events and overall mortality: a systematic review and meta-analysis of cohort studies [J]. J Am Med Dir Assoc, 2017, 18 (3): 211-220.
- [3] 吴玉婷, 李智勤. 老年病科门诊患者潜在不适当用药调查及风险因素分析[J]. 药学服务与研究, 2020, 20 (2): 122-126, 131.
- [4] 刘凯捷, 王晨, 罗秀兰, 等. 基于结构方程模型的社区老年人药物治疗依从性的影响因素[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39 (11): 2800-2803.
- [5] 张倩, 李少强, 张镭, 等. 德美日 FORTA 系统用于老年患者多重用药分级管理的比较[J]. 中国药房, 2023, 34 (6): 641-647.
- [6] 中国政府网. 关于进一步加强用药安全管理提升合理用药水平的通知[EB/OL]. (2022-07-27) [2024-08-03]. http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2022-07/30/content_5703604.htm.
- [7] 董淼, 陈淼. 基于风险评估策略的分级管理在高危孕产妇中的应用研究[J]. 中国医药导报, 2024, 21 (6): 111-114.
- [8] 戴梦飞, 李舒悦, 王宝彦, 等. 基于 Triangle 理论的华法林抗凝患者分级管理模式的建立与实践[J]. 中国药学杂志, 2022, 57 (21): 1800-1804.
- [9] 方小会, 郭联斌, 刘鑫. 营养风险评估策略干预对肝硬化患者营养状况及凝血指标的影响[J]. 血栓与止血学, 2022, 28 (1): 140-141.
- [10] 郝洁, 乔丽娟, 黄惠涛, 等. 基于德尔菲法和层次分析法构建医院药师工作满意度量表[J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41 (2): 200-206.
- [11] 谢彦昕, 田靓, 万春, 等. 基于德尔菲法构建综合性医院感染风险评价体系[J]. 中国消毒学杂志, 2023, 40 (9): 676-680.
- [12] 唐艳, 林芳, 陈燕明. 基于德尔菲法与层次分析法构建儿童医院门诊护理管理质量评价指标体系及其应用效果[J]. 全科护理, 2022, 20 (19): 2695-2699.
- [13] Amuah JE, Molodianovitsh K, Carbone S, et al. Development and validation of a hospital frailty risk measure using Canadian clinical administrative data [J]. CMAJ, 2023, 195 (12): E437-E448.
- [14] 赵萍, 邢凤梅. 基于德尔菲法构建 ACS 患者居家安全风险评价指标体系[J]. 西北国防医学杂志, 2021, 42 (7): 700-705.
- [15] 高凯, 邹凯, 蒋知义, 等. 智慧城市信息安全风险评估指标体系构建[J]. 现代情报, 2022, 42 (4): 110-119.
- [16] 余进, 陈维进, 王弘, 等. 层次分析法在确定评估体系指标权重中的应用[J]. 中国医疗设备, 2013, 28 (12): 44-47.
- [17] 尚星辰, 林征, 谢晓峰, 等. 基于柯氏模型的护士规范化培训质量指标体系构建[J]. 护理研究, 2019, 33 (18): 3095-3100.
- [18] Mekonnen AB, Reijnierse EM, Soh CH, et al. Associations between potentially inappropriate prescribing and increased number of medications with postdischarge health outcomes among geriatric rehabilitation inpatients: RESORT study [J]. Br J Clin Pharmacol, 2023, 89 (11): 3375-3388.

(收稿日期: 2024-08-17; 修回日期: 2024-09-25)

药事管理

美国实验室自建检验方法质量监管政策研究及对我国的启示

王珍, 梁毅* (中国药科大学国际医药商学院, 南京 211198)

摘要: 近年来, 随着科学技术的进步和临床需求的增加, 实验室自建检验方法 (LDT) 因其能够满足个性化临床需求的特性受到了越来越多的关注和重视。科学合理的发展 LDT 有助于填补我国国内尚无同品种产品上市的体外诊断试剂的空白, 从而提高医疗服务水平。LDT 已在部分发达国家发展多年, 并形成了相对完善的管理体系, 因此本文通过梳理美国 LDT 监管政策的发展历程, 对其现行监管政策进行详细解读, 以期对我国 LDT 质量监管提出切实建议。

关键词: 实验室自建检验方法; 体外诊断试剂; 质量监管

中图分类号: R197.3, R446 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)05-1468-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.045

Quality supervision policy for laboratory developed tests in America and enlightenment for China

WANG Zhen, LIANG Yi* (*School of International Pharmaceutical Business, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198*)

Abstract: In recent years, with the advancement in science and technology and clinical demands, laboratory developed tests (LDT) have garnered escalating attention due to their capacity to meet individualized clinical requirements. Rationally developed LDT are conducive to filling the void of no equivalent in-vitro diagnostic reagents launched in the domestic market in China, thereby enhancing the medical service level. LDT appeared quite many years ago in some developed nations and has formed a relatively established management system. Thus, by reviewing the development course of the regulatory policies for LDT in America, this paper detailedly interpreted current regulatory policies to propose practical suggestions for the quality supervision of LDT in China.

Key words: laboratory developed test; in vitro diagnostic reagent; quality supervision

2024 年 5 月 6 日, 美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 发布了针对实验室自建检验方法 (laboratory developed tests, LDT) 的最终规则, 其中明确, 根据《联邦食品、药品及化妆品法案》(简称 FD&C 法案) 规定, 包括 LDT 在内的体外诊断产品 (in vitro diagnostic devices, IVD) 均属于医疗器械的范畴。除此之外, FDA 还提出了在四年内逐步取消对大多数 LDT 执法自由裁量权的政策, 仅针对特定种类的 LDT 保留执法自由裁量权^[1]。多年来, FDA 对 LDT 的监管采取执法自由裁

量权, 其监管备受关, 每次针对 LDT 监管所采取的行动都会引起行业内的巨大争议^[2]。但由于现代 LDT 特性的改变, FDA 对其监管的新政策经过长期且系统的论证终于出台, 旨在通过确保 LDT 的安全性和有效性来更好地保护公众健康。

目前我国 LDT 的发展整体上仍处于试点和摸索阶段, 尚未形成规模化和标准化的应用模式。2023 年年初, 国家药监局综合司和国家卫健委联合发布的《关于开展医疗机构自行研制使用体外诊断试剂试点工作的通知》, 意味着我国对 LDT

作者简介: 王珍, 女, 硕士研究生, 主要从事药品国际国内注册和质量监管与认证研究, email: wangzhen184070121@163.com

***通信作者:** 梁毅, 男, 硕士研究生导师, 教授, 主要从事药品国内外注册、药品质量管理 (GMP, GSP, GLP) 与监督、药物警戒研究, email: ly606@sohu.com

行业的监管开始进入实施阶段。本文通过对美国 LDT 的监管历程进行梳理,对最新发布的《LDT 最终规则》以及美国现行 LDT 监管模式进行全面介绍,以便我们能够深入学习借鉴相关经验,为我国 LDT 质量监管政策修订工作提供参考。

1 美国对 LDT 的概念界定

FDA 通过 LDT 最终管理规则的修订明确了 IVD 的定义,声明 IVD 是 FD&C 法案下的医疗器械,包括产品制造商是实验室。LDT 是指用于临床,由单个实验室内自行设计、制造和使用的 IVD,同时该实验室已根据《临床实验室改进修正案》(CLIA' 88) 获得认证,并符合 CLIA' 88 关于进行高复杂性测试的监管要求。IVD 用于采集、处理和分析人体样本,如血液、唾液或组织。LDT 与其

他的 IVD 一样,可用于检测人体内的物质(如蛋白质、葡萄糖、胆固醇或 DNA),为疾病的诊断、监测或治疗决策提供关键信息。在最终规则中将不是在一个实验室中设计、制造和使用的 IVD 称为“以 LDT 形式提供的 IVD”,同样在监管范围之内。

美国 FDA 较早建立了 LDT 监管,最早可追溯到 20 世纪 70 年代,但鉴于当时的传统 LDT 较简单且使用风险小,因此 FDA 豁免了 LDT 上市审查,但保留 LDT 的自由裁量权^[3]。随着基因检测等新技术的层出不穷,尤其是高通量测序技术的快速应用和发展,LDT 项目复杂性增加、预期用途多样,其特性已发生巨大改变,现代 LDT 与传统 LDT(也称 1976 型 LDT)的特性对比如表 1 所示。

表 1 传统 LDT 与现代 LDT 的特性对比

Tab 1 Comparison of traditional LDT and modern LDT characteristics

类别	生产及使用量	操作方式	使用方式	适用范围
1976 型 LDT	由实验室小批量生产,使用量少且范围小,一般仅为当地社区服务	手动操作(不使用自动化)	由生产机构医师解读和使用	通常用于诊断罕见疾病或其他用途,以满足当地患者群体的需求,或通常与特征良好的标准 IVD 相似
现代 LDT	大量制造生产,使用量大且面广,提供范围超出局部地区群体	高度复杂化,常常依赖高科技和复杂的设备和软件,如结果解释自动化、使用非透明算法以及通过复杂软件生成结果	不少按 LDT 提供的产品并非在同一个实验室设计、制造和使用;并且常用于患者医疗环境之外的实验室	广泛用于常见疾病筛查,而非仅限于罕见疾病筛查诊断,且用于指导关键的治疗决策(如预测药物反应)

通过对比可以看出,与传统 LDT 相比,现代 LDT 的安全性风险大大增加,某些 LDT 项目检测结果不准确甚至未进行临床性能验证即进行使用;此外,普遍使用非临床用途的仪器或其他组件进行检测,导致患者未获得有效治疗或进行不必要治疗并造成伤害的风险增加。因此 FDA 颁布《LDT 最终规则》,以加强监管力度,规范 LDT 的生产与使用。

2 美国 LDT 监管政策的演变

1976 年美国《医疗器械修正案》(MDA) 将 IVD 产品纳入 FD&C 法案监管,并建立了全面的医疗器械监管系统。其中对于 LDT 产品,FDA 行使了执法自由裁量权,豁免了 FD&C 法案的相关要求,包括注册和产品列名、医疗器械不良事件报告、现行良好生产规范(cGMPs),以及在患者使用之前 FDA 对 IVD 进行的上市前审查等^[4]。1988 年美国政府对 1967 年颁布的第一部实验室管理法案《临床实验室改进法案》(CLIA' 67) 进行大范围的修订,形成了几乎全新的实验室管理法案,即 CLIA' 88,通过对临床检验实验室进行认证来确保高质量的实验室检测活动,实验室必须获得 CLIA

证书后才能开展相关临床检验项目,具有 CLIA 认证资质的临床实验室可以研发 LDT^[5]。但随着分子诊断、质谱等高新检测技术临床应用的日益普及,LDT 内涵发生了巨大改变。FDA 意识到 LDT 检测结果的错误或不适用的结果解读将导致错误的临床决策,给患者带来巨大的风险。20 世纪 90 年代末,FDA 已开始考虑如何适当地监管 LDT。2010 年 FDA 首次明确表明态度将采取有效行动加强对 LDT 的监管力度。虽然遭到来自相关学术团体、生物科技公司,甚至美国国会等的多方反对意见,FDA 仍于 2014 年 7 月发布了《LDT 监督管理框架指南(草案)》提出了一系列有关 LDT 监管的具体措施,希望根据风险对中高风险 LDT 纳入 FDA 监管^[6]。草案指南文件的发布再次引发业界各方的广泛讨论,遭到了行业协会、学术团体等的激烈反对,FDA 收到了 300 多条相关意见,最终该草案指南文件被撤回。2017 年,FDA 又发布一份 LDT 监管的“讨论文件”,同时表示支持以立法来解决监管问题。2020 年,美国国会尝试通过立法构建一个基于风险的新监管框架,并提出《VALID 法案》草案,明确 FDA 对 IVD 和 LDT 在内的体外临床检测

进行监管,但该法案也未能通过。由于《VALID 法案》在国会未获通过,FDA 转而通过规则制定方式对 LDT 进行监管。2023 年,FDA 宣布了一项提议规则,明确表示对所有 IVD 拥有管辖权,“包括当

制造商是实验室时”,并逐步取消对 LDT 的执法自由裁量方法^[7]。经过近半个世纪的争议与讨论,尽管依旧有很多反对意见,2024 年 5 月 6 日,FDA 宣布最终确定了这一规则制定,其历程见图 1。



图 1 美国对 LDT 的监管历程

Fig 1 Regulatory journey of LDT in America

3 美国现行 LDT 监管政策

3.1 LDT 最终管理规则

LDT 最终管理规则设计了一个为期 4 年的逐步淘汰政策,此后,FDA 将不再对 LDT 采取通用的自由裁量政策,以实现不同制造商 IVD 的执法政策统一^[8]。逐步淘汰政策分为 5 个阶段(起始时间点为新政发布日)。

第一阶段:从 2025 年 5 月 6 日开始,即新规发布 1 年后,要求 LDT 符合医疗器械报告(medical device report, MDR)要求、更正和撤回报告要求,以及关于投诉文件的质量体系(quality system, QS)要求。

第二阶段:从 2026 年 5 月 6 日开始,即新规发布 2 年后,要求 LDT 遵守逐步淘汰政策其他阶段未涵盖的要求,包括注册和列名要求,标签要求和研究使用要求。

第三阶段:从 2027 年 5 月 6 日开始,即新规发布 3 年后,要求 LDT 符合其他 QS 要求[对于 LDT,要求符合设计控制、采购控制(包括供应商控制)、验收活动(接收、在制品和成品验收)、纠正措施和预防措施(corrective action and preventive action, CAPA)和记录要求]。

第四阶段:从 2027 年 11 月 6 日开始,即新规发布 3.5 年后,要求高风险 IVD(可能被分类为Ⅲ类或受公共健康服务法案(PHS Act)第 351 条许可的 IVD)遵守上市前审查要求。FDA 表示,对于在此阶段开始前提交上市前申请的制造商,FDA 将在此申请审查期间行使执法自由裁量权,可继续提供使用。

第五阶段:从 2028 年 5 月 6 日开始,即新规发布 4 年后,要求中风险和低风险 IVD(需要上市前提交的情况)遵守上市前审查要求。与第四阶段相同,FDA 表示,对于在此阶段开始前收到的上

市前申请,FDA 将在此申请审查期间行使执法自由裁量权(大多数低风险 IVD 可免除上市前审查)。

尽管有这 4 年的逐步淘汰政策,但一些 LDT 原本就已经被排除在自由裁量之外,所以不受此次新政策的影响^[9],以下测试将继续符合其适用的要求:①用于献血者筛查或人体细胞、组织以及细胞和基于组织的产品(HCT/P)供体筛查测试的测试:传染病,或用于确定血型,及 Rh 因子测试;②根据 FD&C 法案第 564 条宣布的紧急情况、潜在紧急情况或重大威胁时进行的测试;③直接面向消费者(direct-to-consumer, DTC)的测试,供消费者使用,无需持照医疗保健专业人员的实质参与;④制造和提供的专门用于公共卫生监测的检测试剂盒也不受逐步淘汰政策的影响。

为保障患者可及性,减少政策执行层面的阻力,LDT 新政策视情况不同程度保留了某些种类产品的自由裁量政策。对于下列测试,FDA 将继续沿用自由裁量权:①“1976 型 LDT”,遵循 1976 年提供的 LDT 的共同特征,使用由具有专业知识的实验室人员进行手工操作而非自动化,并使用合法销售的临床用途组件,在满足 CLIA 认证的高复杂性实验室内设计、制造和使用;②某些用于移植的人白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)的测试,在 CLIA 认证的高复杂性实验室内设计、制造和使用,用于器官、干细胞和组织移植的 HLA 等位基因分型、抗体筛选和监测或进行真实和虚拟 HLA 交叉配型;③仅用于法医执法目的的测试;④国防部(DoD)及退伍军人健康管理局(VHA)制造和使用的 LDT。

对于下列 LDT 不做上市前审查和 QS 要求:①用于未满足需求的 LDT,该类 LDT 由医疗机构的实验室制造和执行,以满足在同一医疗机构

内接受诊疗的患者通过已获批产品不能满足的需求；② 已上市的 LDT，包括新政策发布后进行细微修改的已上市产品；③ 某些罕见红细胞抗原的非分子抗血清 LDT。其中，前两种情况是 LDT 产品中典型情况，上市前审查和 QS 要求是监管要求中成本最高的环节，因此该政策可在确保 LDT 安全性和有效性的同时，最大限度地保障患者的可及性，降低实验室的合规成本。

对于下列 LDT 不要求上市前审查：① 由纽约州卫生部临床实验室评估计划（NYS CLEP）批准的 LDT。NYS CLEP 提供了某些缓解措施，如对高风险和中风险的 LDT 进行分析和临床有效性评估，有助于降低不准确、不可靠 LDT 造成的伤害

风险。② 某些已有其他制造商通过 510（k）或 De Novo[即产品风险等级的重新分类，是一种基于风险的分类过程。对于没有合法上市对比产品的新型医疗器械，即使是中低风险，仍无法通过 510（k）申请建立实质等同从而获得上市许可。针对这类产品，FDA 建立了 De Novo 申请途径]申请的修改版本。如果该修改不会显著影响检测的安全性或有效性，不会对预期用途造成重大改变，并且修改后的检测仅在进行修改的实验室中进行，则无需进行上市前审查，但需要遵守逐步淘汰政策的其他要求。

表 2 对 LDT 最终管理规则中所涉及的某些关键类别的 IVD 进行了高度概述，详细描述了各主要类别的 IVD 及相关政策。

表 2 FDA 合规期望
Tab 2 FDA compliance expectations

IVD 类别	第一阶段	第二阶段	第三阶段	第四 & 五阶段
传染病捐献者筛查试验和某些血型试验	符合现行规则	符合现行规则	符合现行规则	符合现行规则
DTC	符合现行规则	符合现行规则	符合现行规则	符合现行规则
公共卫生监测	一般无需合规	一般无需合规	一般无需合规	一般无需合规
“1976 型 LDT”	一般无需合规	一般无需合规	一般无需合规	一般无需合规
用于 HLA 移植	一般无需合规	一般无需合规	一般无需合规	一般无需合规
用于法医执法目的	一般无需合规	一般无需合规	一般无需合规	一般无需合规
DoD 及 VHA 制造和使用的 LDT	一般无需合规	一般无需合规	一般无需合规	一般无需合规
用于未满足需求的 LDT，由医疗机构的实验室制造和执行	2025 年 5 月 6 日开始合规	2026 年 5 月 6 日开始合规	2027 年 5 月 6 日开始符合 21CFR 820.180-820.186；无需满足其他 QS 要求（投诉文件除外）	一般无需合规
在 2024 年 5 月 6 日之前以 LDT 形式上市的 IVD，并且未作重大修改	2025 年 5 月 6 日开始合规	2026 年 5 月 6 日开始合规	2027 年 5 月 6 日开始符合 21CFR 820.180-820.186；无需满足其他 QS 要求（投诉文件除外）	一般无需合规
罕见红细胞抗原的非分子抗血清 LDT	2025 年 5 月 6 日开始合规	2026 年 5 月 6 日开始合规	2027 年 5 月 6 日开始符合 21CFR 820.180-820.186；无需满足其他 QS 要求（投诉文件除外）	一般无需合规
NYS CLEP 批准的 LDT	2025 年 5 月 6 日开始合规	2026 年 5 月 6 日开始合规	2027 年 5 月 6 日开始合规	一般无需合规
已有其他制造商通过 510（k）或 De Novo 申请的修改版本	2025 年 5 月 6 日开始合规	2026 年 5 月 6 日开始合规	2027 年 5 月 6 日开始合规	一般无需合规
在逐步淘汰政策范围内，不属于上述执行自由裁量权的以 LDT 形式提供的 IVD	2025 年 5 月 6 日开始合规	2026 年 5 月 6 日开始合规	2027 年 5 月 6 日开始合规	2027 年 11 月 6 日开始，高风险测试要合规； 2028 年 5 月 6 日开始，中低风险测试要合规

3.2 CLIA 认证

在过去的几十年里，美国通过 CLIA 对 LDT 进行监管，但由于基因检测 LDT 的出现，使得 LDT 的使用风险大大增加，CLIA 不能够确保测试本身对其预期用途的安全性和有效性有适当的保证，才有了最终规则的诞生。CLIA 法规侧重于实验室操作，而 FD&C 法案侧重于测试的设计和制造。LDT 最终管理规则并没有改变对于实验室的

要求，实验室依然需要通过 CLIA 认证。LDT 既要遵守 FD&C 法案，也要遵守 CLIA 的相关要求。

CLIA 认证是由美国医疗保险和医疗补助服务中心（CMS）监管的一项联邦法规，旨在确保医学实验室的检测质量。依据 CLIA 法规，凡是对人源样品进行检测并将检测信息用于对疾病或人体损伤进行诊断、预防或治疗，对人体健康状况进行评估，对人体无机物或有机物进行测定的任

何实体，都被定义为临床实验室。CLIA 将实验室分为 3 个不同的复杂度级别：豁免（waived）、中等复杂度（moderate complexity）和高复杂度（high complexity）^[10]。每个级别都有特定的质量要求和技术标准，实验室必须根据其开展的测试类型和复杂度进行相应的认证。由于 LDT 的多样性和复杂性，它们往往属于高复杂度级别，因此需要遵循最为严格的 CLIA 认证标准。这包括

对实验室人员、设备、试剂、测试方法和质量控制等方面的全面评估和监管。CLIA 认证确保了 LDT 从研发到临床应用的每一个环节都符合最高标准，从而保障了测试的准确性和患者的安全。CLIA 对实验室的运营、检测标准、人员资质等方面进行全面监管，确保检验结果的准确性和可靠性。CLIA 认证的流程见表 3。

表 3 CLIA 认证流程
Tab 3 CLIA certification process

步骤	内容
确认申请的证书类型	实验室根据实际情况选择申请证书的类型
学历对等认证	CLIA 对不同角色的人员有相应的要求，包括学历、专业、工作经验、是否在美国注册执业等
确定能力测试（proficiency testing, PT）	不是实验室的所有进行的检测都需要申报 CLIA 的 PT，仅需要申报实验室计划对美国及其属地的样本所进行的检测项目
初步申请提交	填写申请表 CMS-116 和 CMS-209，按照申请表的要求填写实验室的基本信息，以及如上提到的申请的证书类型、实验室人员及其角色、PT 及其复杂度（豁免检测、中等复杂度还是高复杂度的非豁免检测）、实验室的年度检测量等
初步申请审核	CMS 将审核上述完成的文件，审核完成时通知实验室
发出检查费用支付申请	在进行初步检查前，实验室须支付完成审核的费用（审核人员的旅费、住宿费等）
初审	在 CMS 完成、提交和验证所有文件后，由 CMS 和实验室共同约定日期 发放证书之前，所有预估的调查费用必须在调查前支付
注册证书（COR）的费用	包括证照费和合规费（合规费按年度检测量计算）
发布 COR	在初步调查确定符合规定后，实验室收到 COR 时，具备对检测美国样本的资质
签发合格证书（COC）	支付所有费用（即检查官的旅费、住宿费等），并确定合规后。该证书有效期为 2 年 在证书到期后，经重新认证调查并支付相应费用后，实验室的合规性证书将续期 2 年
发出缴费申请	合规证明到期前 12 个月发出《合规费支付申请单》（合规费是用于重新认证调查的定金，并以年度检测量为基础计算）
复审	在现行证书到期前与 CMS 约定日期
出具合规费支付证明	在调查完成并确定符合规定后，将发出证书费用
发放合规证书	实验室支付 COC 费用后发放合规证书

CLIA 认证在美国 LDT 的发展中发挥了重要作用，通过定期的内部和外部审核，确保 LDT 的准确性和可靠性；通过标准化操作程序和严格的质量控制，最大限度地减少了错误和偏差，保障了患者的安全。虽然 CLIA 认证对 LDT 提出了高标准，但它也鼓励实验室不断改进和开发新的测试方法。这种平衡促进了医疗技术的进步，使患者能够受益于最新的诊疗手段。

4 对我国 LDT 监管政策的启示

4.1 明确 LDT 的定义及监管范围

根据我国现行《医疗器械监督管理条例》(2021 年版) 第 53 条规定，“对国内尚无同品种产品上市的体外诊断试剂，符合条件的医疗机构根据本单位的临床需要，可以自行研制，在执业医师指导下在本单位内使用”。该条款在行政法规层面明确了符合规定的 LDT 业务的合法地位。然而该规

定的定义较为概括性，对于“国内尚无同品种上市”“符合条件的医疗机构”“自行研制”和“在执业医师的指导下”等的定义没有进一步进行说明，导致在实践中出现许多争议与困惑，因此我国应尽快制定 LDT 相关法律法规，明确其定义和范围，为日后的监督管理工作打下良好的基础。

4.2 规范 LDT 准入机制

我国目前并没有明确可使用 LDT 的医疗机构（实验室）所需符合的具体条件，可参照美国的 CLIA 认证模式对拟开展 LDT 的实验室进行资质认证，通过制定相关申请资料、组织现场检查和数据审查、不定期开展能力考核等形式评估实验室能力^[11]，以确保 LDT 的安全性和有效性。在获得资质后实验室可自行研制和使用 LDT。LDT 的临床应用涉及患者的生命健康^[12]，一旦出现质量问题，可能对患者造成不可逆转的伤

害。通过建立规范的 LDT 准入机制,对实验室的环境、设施、人员等进行严格审查,可以有效降低医疗风险,保障患者安全。此外,建立规范的 LDT 准入机制可以提高行业的准入门槛,淘汰不合格的实验室,促进 LDT 行业的规范化发展。

4.3 对 LDT 进行风险分级科学监管

相较于发达国家,我国 LDT 的发展仍处于初级阶段,为鼓励实验室积极开展 LDT 技术研发和应用推广,应为其提供良好的政策环境,促进 LDT 产业创新发展,在发展中进行科学监管。为了确保安全的前提下促进 LDT 的发展,可借鉴 FDA 建立基于风险的分级监管体系,综合考虑 LDT 技术的复杂性、临床应用的风险程度、对患者安全的影响等因素将 LDT 分为高风险、中风险和低风险 3 个级别。对于高风险 LDT,应该采取更为严格的审批程序,包括技术验证、临床试验、数据审查等环节。对于中风险和低风险的 LDT,可以适当简化审批流程,提高监管效率。逐步开放和科学监管 LDT,对推动我国医学检验技术的发展具有重要意义。

5 结语

我国 LDT 监管目前仍处于探索阶段,且起步较晚,而我国 LDT 企业却不少而且发展水平也不低,这要求我们探索出适合国内情况的监管框架。美国在 LDT 监管方面从实施自由裁量权的政策,通过 CLIA 进行实验室监管,到将其纳入 IVD 的监管框架中,逐步取消自由裁量权,以保障 LDT 产品的安全性和有效性。美国的 LDT 监管的历程及新探索极有可能给我们带来一些新的启示。

参考文献

- [1] U. S. Food and Drug Administration. FDA Takes Action Aimed at Helping to Ensure the Safety and Effectiveness of Laboratory Developed Tests [EB/OL]. (2024-04-29) [2024-09-30]. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-takes-action-aimed-helping-ensure-safety-and-effectiveness-laboratory-developed-tests>.
- [2] 周良彬,李伟松,黄颖.国内外医疗机构自制试剂监管政策发展历史与借鉴[J].中国食品药品监管,2022,20(5):84-93.
- [3] 王蓓丽,郭玮,潘柏申.国外医学检验实验室自建检测方法监管现状[J].中华检验医学杂志,2016,39(1):55-59.
- [4] U. S. Food and Drug Administration. A History of Medical Device Regulation & Oversight in the United States[EB/OL]. (2023-08-21) [2024-09-30]. <https://www.fda.gov/medical-devices/overview-device-regulation/history-medical-device-regulation-oversight-united-states>.
- [5] U. S. Centers for Disease Control and Prevention. Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) [EB/OL]. (2024-09-11) [2024-09-30]. <https://www.cdc.gov/clia/php/about/index.html>.
- [6] Federal Register. Framework for Regulatory Oversight of Laboratory Developed Tests; Draft Guidance for Industry, Food and Drug Administration Staff, and Clinical Laboratories; Availability [EB/OL]. (2014-10-03) [2024-09-30]. <https://www.federalregister.gov/documents/2014/10/03/2014-23596/framework-for-regulatory-oversight-of-laboratory-developed-tests-draft-guidance-for-industry-food>.
- [7] U. S. Food and Drug Administration. FDA Proposes Rule Aimed at Helping to Ensure Safety and Effectiveness of Laboratory Developed Tests [EB/OL]. (2023-10-02) [2024-09-30]. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-proposes-rule-aimed-helping-ensure-safety-and-effectiveness-laboratory-developed-tests>.
- [8] U. S. Food and Drug Administration. Laboratory Developed Tests [EB/OL]. (2024-08-14) [2024-09-30]. <https://www.fda.gov/medical-devices/in-vitro-diagnostics/laboratory-developed-tests#ftstar>.
- [9] U. S. Food and Drug Administration. Laboratory Developed Tests; Frequently Asked Questions [EB/OL]. (2024-04-29) [2024-09-30]. <https://www.fda.gov/medical-devices/laboratory-developed-tests/laboratory-developed-tests-frequently-asked-questions#what>.
- [10] 刘东来,石大伟,张春涛.美国对实验室研发诊断试剂的监管之路[J].中国新药杂志,2016,25(3):244-252.
- [11] 中华医学会检验医学分会.我国医学检验部门自建检测方法发展与管理建议[J].中华检验医学杂志,2017,40(3):162-164.
- [12] 燕娟,李颖,陈燕,等.医疗机构实验室自制体外诊断试剂质量评价体系建立的探讨[J].中国药事,2023,37(7):764-771.

(收稿日期:2024-11-20;修回日期:2024-12-02)

药学教育

基于线上线下混合式教学模式建设《药物分析学》
一流课程的思路与实践

袁洁¹, 李玉玲¹, 王瑞珂¹, 姚军^{2*} (1. 新疆第二医学院药学院, 新疆 克拉玛依 834000; 2. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011)

摘要: **目的** 研究线上线下混合式教学模式在《药物分析学》一流本科课程建设中的应用。**方法** 以新疆第二医学院药学专业的学生为研究对象, 教学团队依据办学定位、人才培养目标及课程特点, 建立符合学情的“四库一专题”优质教学资源, 创建“任务导入-精准讲授-讨论展示-巩固拓展-多元评价”“五位一体”混合式教学设计, 并应用到《药物分析学》课程中。同时从学生成绩、能力素质、情感态度等多维度评价混合式教学模式的实施效果。**结果** 线上线下混合式教学模式强化了师生互动、学生互动, 学生成绩有所提升, 与改革前的年级相比, 药学 2020 级期末考试和综合测评及格率分别提升了 1.2% 和 5.0%, 药学 2021 级分别提升了 13.3% 和 10.8%。在综合素质方面, 药学 2020 级和 2021 级能力素质评分分别平均增长了 2.35 分和 2.6 分, 情感态度评分分别平均增长了 1.55 分和 1.8 分。**结论** 线上线下混合式教学模式在《药物分析学》课程中取得了较好的教学效果, 切实提高了课程教学质量和学生综合素质, 为药学专业其他课程的教学改革提供参考。

关键词: 药物分析学; 一流本科课程; “五位一体”混合式教学设计; 教学资源建设

中图分类号: G642

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)05-1474-05

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.046

课程是实现人才培养目标的核心要素, 课程质量将直接影响人才培养质量。为贯彻落实习近平总书记关于教育的重要论述和全国教育大会精神, 2019 年 10 月, 教育部发布了《教育部关于一流本科课程建设的实施意见》, 阐述了一流本科课程建设的总体目标、基本原则、建设内容等^[1]。在此背景下, 各高校迅速掀起了一流本科课程申报与建设的浪潮^[2-6]。

《药物分析学》是高等学校药学专业的核心专业课之一, 是学生能够胜任药物研发、生产、质量控制、流通和全生命周期药学服务等工作的基础^[7-10]。通过学习本课程, 学生应能够掌握常用的鉴别试验、杂质检查和含量测定的基本原理与方法, 树立比较完整的药品质量控制观念, 养成严谨求实的工作作风, 并能综合运用所学的知识, 能够胜任药品质量分析与研究工作。《药物分析学》课程

于 2022 年度被立项为校级线上线下混合式一流本科课程建设项目, 2024 年度被立项为省级线上线下混合式一流本科课程建设项目。笔者结合学校培养应用型人才的办学定位、药学专业的人才培养目标、学生学情及课程教学过程中存在的痛点问题, 从资源建设、教学设计、考核方式、课程思政元素的挖掘与融入等方面进行了《药物分析学》线上线下混合式一流课程建设的探索, 旨在全面提高课程教学效果和学生学习素养, 提升人才培养质量。

1 《药物分析学》课程教学“痛点”问题剖析

《药物分析学》课程开设在大学三年级下学期, 学生已经学习了与本课程紧密联系的《分析化学》《有机化学》《仪器分析》等课程, 学生学习基础较好, 手机、平板、电脑已成为大学生们日常学习和生活的重要工具。在“互联网+”背景下, 部分学生已不满足于课本知识的学习。但

基金项目: 新疆维吾尔自治区第三批一流本科课程(新疆维吾尔自治区教育厅); 新疆维吾尔自治区高校本科教育教学研究和改革项目(No.XJGXPTJG-202292); 新疆第二医学院一流本科课程[新二医[2022]64号]。

作者简介: 袁洁, 女, 副教授, 主要从事药物分析教学研究, email: yuanjiegsddu@163.com *通信作者: 姚军, 男, 教授, 主要从事药物分析和无机化学教学研究, email: xydyaojun@163.com

是《药物分析学》课程共 16 章教学内容,理论内容多、知识分布广,传统教学模式以教师讲授为主,因课时有限,教师重在向学生传授课本上的基本知识,“填鸭式”的教学让学生学得枯燥,课堂气氛沉闷,单一的考核体系也无法形成激励机制。因没有有效参与学习过程中,学生学习积极性不高,更无法形成自主学习能力和科学思维。如何借助信息化技术及线上优质教学资源,通过智慧教学设计既能实现知识传授,又能培养学生后续学业深造和步入社会所需要的能力值得深思。另外,由于药品的特殊性,药品质量问题与人们的生命和健康密切相关。药学专业的毕业生大部分会进入药品相关领域工作,药学从业人员的工作态度、科学精神、职业道德均对药品安全影响重大^[11-13]。《药物分析学》课程作为药学专业的重要组成之一,如何深入挖掘课程中的思政元素并巧妙融入课程之中以达到“润物细无声”的育人效果也至关重要。

2 《药物分析学》线上线下混合式一流课程建设思路与实践

2.1 系统建设“四库一专题”本土化的教学资源

教学资源建设是开展线上线下混合式教学的基础,也是实施混合式教学的重要组成部分和关键环节^[14-16]。教学团队基于我校学生学情系统建设了“四库一专题”本土化的教学资源,“四库”即视频资源库、习题库、案例讨论库、课程思政资源库,“一专题”即专题汇报。具体建设内容如下:

① 优质的视频资源库是学生在线学习的重要支撑。课程主要依托中国大学慕课、学堂在线等课程平台上优质的《药物分析学》慕课资源。由于时长的限制,部分慕课较为概括,通过在线学习学生可能并未完全掌握该知识点,另外在线资源中蕴含的课程思政较少。因此,教学团队针对教学重点,自制了 20 个蕴含课程思政的视频作为线上视频资源的补充。② 习题库是学生课前自测、随堂练习、阶段性测试的重要保证。课程以线上已有的药物分析习题、国家执业药师职业资格考试历年真题以及自编习题等为来源,结合我校学生的学情,建立难度适宜的电子习题集。③ 结合课程实际,以《药物分析学》课程中所涉及的经典药物作为讨论对象,以《中国药典》对其的质量控制为素材,设计讨论题目,并在案例前增设导语部分,如药物来历、科学家故事、新闻报道、药害事件等,嵌入课程思政案例并设计相关思政讨论。目前已形成 20 个案例。例如在《维生素类药物的分析》这一章节中设

计教学案例《维生素 A 的质量分析》,案例导语为“一双眼”;《抗生素类药物的分析》这一章节中设计教学案例《青霉素 V 钾的质量分析》,案例导语为“国产青霉素的诞生”。④ 立足于《药物分析学》课程自身的特点,深入挖掘教学内容中思政元素,收集思政教育素材,进行归纳整理,建立“药物分析与职业素养”“药物分析与哲学智慧”“学药分·倡环保”“走进药分名家”共 4 个主题的课程思政资源库,共 30 余个思政案例,每一个课程思政案例都包含案例详情和思政点睛两个部分。⑤ 由于学生的基础和能力存在差异,教学团队设计了 13 个普通专题和 4 个挑战专题,13 个普通专题所涉及的 13 类药物的分析是课本上必学内容,4 个挑战专题则是课本上的选学内容,学生可按照但又限于专题汇报提纲进行汇报。

2.2 “五位一体”混合式教学设计及实施

依托本土化的教学资源,基于课程目标,教学团队提出了“五位一体”混合式教学设计,即“任务导入-精准讲授-讨论展示-巩固拓展-多元评价”,5 个环节看似独立,实则环环相扣、有机结合,形成了一个整体,贯穿于线上线下、课前-课中-课后全过程,同时全程融入课程思政,总体框架如图 1 所示。下面以《药物分析学》课程第七章《苯乙胺类拟肾上腺素药物的分析》为例进行详细阐述。



图1 “五位一体”混合式教学的设计

2.2.1 任务导入 课前在智慧教学工具雨课堂上发布《苯乙胺类拟肾上腺素药物的分析》章节学习任务单,包括知识目标、中国大学慕课视频 1 个(5 min)、教学团队录制的蕴含课程思政的视频 2 个(18 min)及相关习题检测 17 道、教学案例 1 个《盐酸肾上腺素注射液的质量分析》(案例导语为“过期的盐酸肾上腺素注射液”)、“氨基醇的双缩脲反应”这一知识点中所蕴含的思政素材《麻黄碱之父——陈克恢》,学习任务单内容及教学目标如表 1 所示。

表 1 学习任务单与教学目标

学习任务单内容	教学目标
线上视频的学习及练习题	掌握本类药物的结构和性质、鉴别试验及非水溶液滴定法的原理与特点,熟悉酮体杂质的检查
小组初步完成教学案例讨论《盐酸肾上腺素注射液的	使学生树立完整的药品质量控制观念,增强学生设计药品质量控制方案的能力
质量分析》	
雨课堂讨论区阅读材料《麻黄碱	培养学生坚持不懈的科学精神,激
之父——陈克恢》并完成讨论	发学生对中医药的兴趣

学生根据章节学习任务单,明确课前学习目标,观看线上学习视频,完成练习题检测并在留言区反馈自己的学习难点,本章习题平均正确率为 58%,大多数同学表示本章药物结构复杂,脂肪伯胺的 Rimini 试验、还原性反应等较难理解;课前初步完成教学案例中的 6 道思考题,分别是:① 如何避免该类药害事件的发生;② 过期的盐酸肾上腺素注射液为什么会呈现出淡淡的红色;③ 除 2020 年版《中国药典》上收录的鉴别试验外,该药物还可采用哪些方法进行鉴别;④ 注射液应进行哪些常规的剂型检查及安全性检查;⑤ 对于易氧化的药物,在进行药物分析时有哪些注意事项;⑥ 本案例中的含量测定采用的是哪种方法,还有哪些方法可以用于本药物的含量测定,优点是什么。除此以外,还需阅读课程思政材料并在雨课堂讨论区完成两个讨论,分别是:① 麻黄碱的发现历程对你有什么启示;② 从陈克恢先生身上学习到了哪些精神。

2.2.2 精准讲授 课中,教师依据雨课堂上的预习反馈,了解学生对基础知识的掌握情况,再结合教学大纲,明确课堂上要讲解的重难点,如苯乙胺类拟肾上腺素药物的化学结构与性质、与铁盐的反应、氨基醇的双缩脲反应、脂肪伯胺的 Rimini 试验等,通过化学三维结构动画、自制的实验视频等使抽象的知识形象化,加深学生的记忆和理解。在讲到盐酸麻黄碱可用“氨基醇的双缩脲反应”鉴别时,引入课程思政案例《麻黄碱之父——陈克恢》,因学生课前已阅读过具体材料并进行了两个问题的讨论,课堂上教师重在价值引导,学生分享感悟,使学生之间产生情感共鸣。

2.2.3 讨论展示 以本章典型药物——肾上腺素为素材,设计教学案例《盐酸肾上腺素注射液的质量分析》,以药害事件“过期的盐酸肾上腺素注射液”作为案例导语,在课中进行案例式教学,学生归纳、整理学习任务单中提出的 6 个问题,相互交流,自由讨论,深入分析,表现出了更大的学习积

极性和创造性。以小组为单位形成讨论结果后,教师从每小组随机抽取一位同学分享讨论结果,其他小组和教师进行点评。比如有的小组认为紫外分光光度法测定盐酸肾上腺素注射液含量更优,另有小组认为高效液相色谱法中的外标标准曲线法更好。在组间点评和教师点评的过程中,促进思维碰撞,使学生更全面、深入地思考问题,提高问题分析和解决能力,进一步提升药物分析方法的设计能力。

2.2.4 巩固拓展 课后,学生完成本章测试,通过绘制思维导图梳理知识脉络,进一步完善教学案例中的思考题并形成书面材料,自学课本中的内容——动物组织中盐酸克伦特罗残留的测定,并总结该测定方法的关键步骤。另外教师在雨课堂公告区推送阅读拓展资料——《克伦特罗适配体传感器的构建及应用》^[17],供学有余力的同学进行学习,拓宽药物分析知识,使学生了解新技术、新方法的原理与应用,扩大学生视野,增长见识。

2.2.5 多元评价 课程评价体系是学生学习的“风向标”,从终结性评价向形成性评价的转变将学生学习的重心从只关注分数转变到重视提升自身综合素质上来,同时教师也能及时获取学生学习情况的反馈信息,及时改进教学^[18-21]。笔者对以往“期中 10%+阶段性测试 20%+课堂表现 10%+期末 60%”的考核方式进行改革,重构了课程评价体系,覆盖了课前、课中、课后全过程,具体评定方式为:线上学习 10%+小组汇报 20%+在线测试 10%+期末考试 60%。该评价方式使学生在学习过程中能够得到及时反馈,帮助学生实现自我评价,形成有效的激励机制,充分激发了学生学习的主观能动性。同时,在每学期结束后发放包含能力素质、情感态度、教学模式满意度共 3 个维度的问卷调查,评价学生的综合素质和对教学模式的满意度。

3 《药物分析学》线上线下混合式教学模式实施成效

3.1 成绩对比分析

《药物分析学》线上线下混合式教学模式在药学 2020 级(52 人)和 2021 级(40 人)已完成两期运行,药学 2019 级(53 人)采用轻度翻转课堂教学模式,3 个班级的期末卷面成绩分布如图 2A 所示,综合测评成绩分布如图 2B 所示。由结果可知,线上线下混合式教学模式提升了及格率,与药学 2019 级相比,药学 2020 级期末考试和综合测评及格率分别提升了 1.2% 和 5.0%,药学 2021 级期末考试和综合测评及格率分别提升了 13.3% 和 10.8%;80 分以上学生期末考试成绩增加较明显,

2020 级和 2021 级分别增长了 5.0% 和 30.0%，证明该教学模式有助于提高学生学习的主动性，“五位一体”混合式教学设计取得了较好的效果。

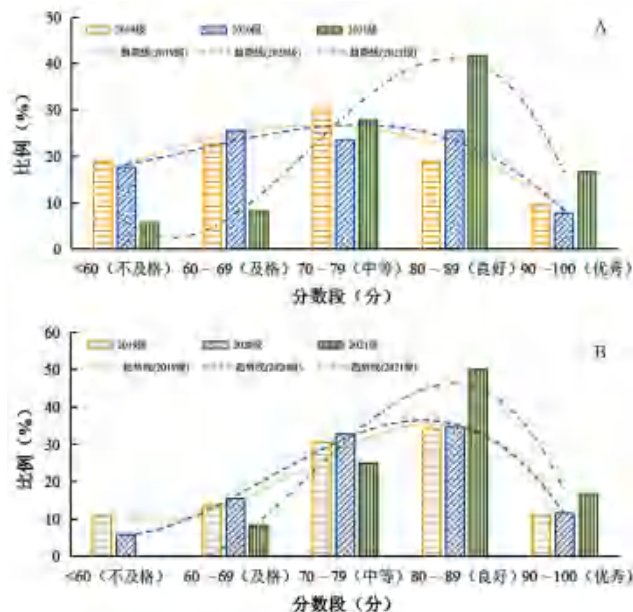


图 2 学生成绩分布
A. 期末考试; B. 综合测评

3.2 学生信息反馈

笔者调查了药学 2019 级、2020 级和 2021 级学生对《药物分析学》课程教学模式的满意度以及在能力素质、情感态度等方面的获得感，评价表采取 10 分制，得分越高，说明学生对该项的获得感越强，满意度越高，统计结果如表 2 所示。由结果可知，学生对线上线下混合式教学模式的满意度较高，该教学模式更有助于培养学生的自主学习能力，提高学生分析问题、解决问题的能力等，与药学 2019 级相比，2020 级和 2021 级能力素质评分分别平均增长了 2.35 分和 2.6 分，情感态度评分分别平均增长了 1.55 分和 1.8 分。另外也有同学在课程座谈会上表示该教学模式带来了较大的学习压力，小组合作学习的难度较大。

4 《药物分析学》线上线下混合式一流课程建设的创新特色

4.1 创建“五位一体”混合式教学设计

基于“四库一专题”的优质教学资源，借助智慧教学工具雨课堂，教学团队创建了“五位一体”混合式教学设计，5 个环节环环相扣、有机

表 2 学生反馈评价表

评价维度	评价内容	评分		
		2019 级	2020 级	2021 级
教学模式满意度	课前学习的方式能满足您的学习需求	6.5	9.1	8.9
	教学模式能提高您上课的注意力	6.3	8.1	7.9
	教学模式能增强您和老师的互动交流	6.4	8.6	8.9
	您对教学模式的整体满意度	6.5	8.9	9.2
能力素质	教学模式能增强您的自学能力	6.2	8.8	9.1
	教学模式能提升您解决问题的能力	7.1	8.7	9.2
	教学模式能增强您的团队协作能力	6.8	9.0	9.3
	教学模式能锻炼您的语言表达能力	6.1	9.1	9.0
情感态度	教学模式能调动您学习的积极性	6.8	8.3	8.6
	教学模式能提升您的职业素养	6.6	8.2	8.4

结合，贯穿于线上线下、课前-课中-课后全过程。通过专题汇报、案例讨论、课程思政的融入及前沿知识的引入提升学生学习的主动性，使学生有效参与进来，拓宽了学生视野，提高了学生的职业素养，增加了课程的高阶性和挑战度，实现了本课程“知识传授、能力培养、价值塑造”三位一体的课程目标。

4.2 课程思政融入恰当，开展形式行之有效

为充分发挥课堂教学在育人中的主渠道作用，教学团队建立了“药物分析与职业素养”“药物分析与哲学智慧”“学药分·倡环保”“走进药分名家”4 个主题的课程思政资源库，以线上讨

论、线下分享的形式使师生之间、学生之间产生情感碰撞，让课程思政内化于心。除此以外，在自制微课、教学案例讨论设计及专题汇报设计中均融入课程思政，开展形式多样，融入方式恰当，提高了学生的职业素养。

5 讨论

随着信息技术的发展，线上线下混合式教学模式已成为了教学新形态，这对教师和学生都是一种挑战，在实践过程中，我们也发现了一些问题。在教师层面，面对网上丰富的教学资源，有时难以取舍，存在“多多益善”的错误观念，没有对教学资源进行合理的优化和整理。在学生层

面,部分学生对混合式教学的认识不充分,认为这种模式增加了自己的学习负担,另外学生对时间的管理能力不够,有时会有存在任务拖延的情况。在后续的教学过程中,教师应根据学生的认知规律和具体学情,有针对性地查找、筛选网络教学资源,通过阅读学术论文、参加研讨交流、共建虚拟教研室等方式进一步提升混合式教学设计的能力,同时要加强混合式教学模式目的和意义的宣传,使学生在学期伊始就能认可这种教学模式。

6 小结

随着医药就业市场竞争日趋激烈,市场对药学专业人才的要求不仅仅是具备丰富的专业知识,而是向着具备解决问题的能力、协作能力、沟通能力、职业道德等多维度拓展,这就需要学校全面提高人才培养质量,而课程是推动学校人才培养质量的核心。线上线下混合式教学模式将教学与信息技术深度融合,让学生成为学习真正的主人,通过问题教学法、案例教学法、游戏教学法等的灵活运用较好地实现了从沉默式课堂、问答式课堂向对话式课堂、思辨式课堂、争辩式课堂转变,强化师生互动、学生互动,通过智慧教学设计提升学生学习的深度和广度,全面提升学生的综合素质。

参考文献

- [1] 中华人民共和国教育部. 教育部关于一流本科课程建设的实施意见 [EB/OL]. (2019-10-24) [2024-08-05]. https://www.gov.cn/gongbao/content/2020/content_5480494.htm.
- [2] 王莉,张丽荣,范勇,等. 线上线下混合式教学模式下的无机化学一流课程建设[J]. 化学教育(中英文), 2022, 43(14): 78-81.
- [3] 孔锦涛,郭蕾,刘俊昌,等. 课程思政在线下一流课程推拿学教学过程中的实施路径[J]. 新疆中医药, 2023, 41(1): 39-41.
- [4] 方志刚,任尚福,马刘峰,等. 植物生理学线上线下混合式一流课程建设探索与实践——以喀什大学为例[J]. 高教学刊, 2024, 10(20): 21-25.
- [5] 陈咏梅,张丽丹,李顺来,等. 基于慕课建设“大学化学实验”国家级一流课程[J]. 大学化学, 2024, 39(7): 8-12.
- [6] 张金菊,孙士国,龚思颖,等. 虚拟仿真实验教学一流课程持续改进[J]. 实验室研究与探索, 2024, 43(1): 125-129.
- [7] 季帅,王一男,汤道权,等. 新医科背景下药物分析课程混合式教学改革的探讨[J]. 中国继续医学教育, 2024, 16(10): 1-5.
- [8] 余欢,陈纭,汤文建,等. 《药物分析》课程教学创新体系的研究与实践[J]. 广州化工, 2022, 50(17): 229-231.
- [9] 马卫兴,秦昆明,苏倩倩,等. “质量强国”背景下《药物分析》课程教学改革的思考与实践[J]. 广东化工, 2024, 51(12): 219-221, 226.
- [10] 赵鸿宾,韩忠耀,魏学军,等. “药物分析”课程中提高学生创新和实践能力的教改研究[J]. 海峡药学, 2023, 35(6): 52-55.
- [11] 于美亚. 医药类高职院校学生药德教育探索[D]. 宁波: 宁波大学, 2014.
- [12] 林美好,廖颖妍,周晋,等. 药物分析课程思政教学设计的探索[J]. 中国当代医药, 2024, 31(13): 110-113.
- [13] 马洁瑶,蔡伟,姚祖福,等. 药物分析课程思政素材挖掘与融合探索[J]. 中国药业, 2024, 33(6): 29-32.
- [14] 姚淳,王莹洁. 医学遗传学课程线上线下教学资源融合教学的实践与探索[J]. 交通医学, 2024, 38(3): 328-330.
- [15] 陈伟,马丽娜,卞玉洁,等. 线上线下混合模式下问题导向式教学资源建设和应用——以“海洋技术导论”课程为例[J]. 军事高等教育研究, 2024, 47(1): 93-97.
- [16] 赵炜华,杨凯茜,余曼,等. 应用型本科混合式教学资源建设问题研究[J]. 西安文理学院学报(自然科学版), 2020, 23(2): 119-123.
- [17] 孙良. 克伦特罗适配体传感器的构建及应用[D]. 包头: 内蒙古科技大学, 2022.
- [18] 郝国祥. 形成性评价在高校药学专业核心课程评价中的应用策略[J]. 药学教育, 2020, 36(3): 79-83.
- [19] 马桂枝,常军民,李改茹,等. 基于金课标准的《药物分析学》形成性评价体系的构建及效果分析[J]. 新疆医科大学学报, 2020, 43(12): 1646-1649.
- [20] 毛丽惠,姚素梅,张秋平,等. 基于线上线下混合式教学模式打造分析化学一流本科课程[J]. 高教学刊, 2024, 10(16): 29-32.
- [21] 肖璨,于建云,孙艳春,等. 医学院校本科生形成性评价实施现状调查研究[J]. 基础医学教育, 2023, 25(9): 833-836.

(收稿日期: 2024-08-07; 修回日期: 2024-08-29)

药品不良反应

基于中国药品不良反应监测自发呈报数据的左氧氟沙星
安全警戒信号挖掘与分析

廖文志, 柳鹏程* (中国药科大学国际医药商学院, 南京 211198)

摘要: **目的** 分析中国药品不良反应监测自发呈报系统中某地级市 2018 年 1 月 1 日—2022 年 12 月 31 日期间所有药品不良反应监测数据中有关左氧氟沙星的不良反应发生情况, 为临床安全用药提供参考。**方法** 利用报告比值比法 (ROR) 法对数据库中左氧氟沙星的不良反应进行信号挖掘, 分析其不良反应上报及发生情况。**结果** 本研究共检测到 45 个信号, 主要涉及全身性疾病及给药部位各种反应、血管与淋巴管类疾病、皮肤及皮下组织类疾病等 8 个系统器官分类 (SOC), 大部分不良反应与制造商说明书中的不良反应基本一致, 其中异常行为、阴囊糜烂、言语障碍、睑缘炎、眼睛瘙痒、干眼症、昏迷、皮肤变色、多汗以及斑丘疹 10 个不良反应未在药品说明书中提及。此外, 性别差异化信号检测共检测到 11 个信号, 主要涉及皮肤及皮下组织类疾病、胃肠系统疾病、全身性疾病及给药部位各种反应等 6 种 SOC, 其中除关节痛在左氧氟沙星的女性使用者具有更高的风险与以往的研究结果一致外, 其他 10 个信号均为新发现的信号。药疹在男性使用者中表现出更高的风险, 而腹痛、唇部肿胀、腹部不适、腹胀、注射部位痛、肿胀、中性粒细胞计数降低、白细胞计数降低、咳嗽、关节痛则在女性使用者中表现出更高的风险。**结论** 本研究发现左氧氟沙星的整体用药安全性良好, 但在临床用药中需要关注左氧氟沙星的神经毒性、光毒性以及眼部毒性, 同时还需关注左氧氟沙星在女性患者中的不良反应情况。

关键词: 药物警戒; 左氧氟沙星; 自发呈报系统; 不良反应; 性别差异

中图分类号: R969.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)05-1479-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.047

Mining and analysis of levofloxacin safety alert signals based on Spontaneous
Reporting data from China Adverse Drug Reaction Monitoring

LIAO Wen-zhi, LIU Peng-cheng* (School of International Business, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198)

Abstract: Objective To analyze the occurrence of adverse reactions concerning levofloxacin in all the adverse drug reaction monitoring data in China's Adverse Drug Reaction Monitoring Spontaneous Reporting System in a city from January 1st, 2018 to December 31st, 2022. **Methods** Reporting odds ratio (ROR) method was used for the signal mining of adverse reactions of levofloxacin in the database and analyze their reporting and occurrence. **Results** Totally 45 signals were detected in this study, mainly related to 8 system organ classes (SOCs) such as general disorders and administration site conditions, vascular disorders, skin and subcutaneous tissue disorders etc. Most of the adverse reactions were basically the same as those in the manufacturer's instructions. Ten of the adverse reactions, including abnormal behaviour, and scrotum erosion, speech disorder, blepharitis, eye pruritus, xerophthalmia, coma, skin discolouration, hyperhidrosis, rash maculo-papular, were not mentioned in the drug insert. In addition, 11 signals were detected in the gender-differentiated signal assays, primarily related to 6 SOC: skin and subcutaneous tissue disorders,

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No.7247041356)。**作者简介:** 廖文志, 男, 硕士, 主要从事药物警戒方面的研究, email: lwz9182022@163.com * **通信作者:** 柳鹏程, 男, 副教授, 博士研究生导师, 主要从事真实世界研究、监管科学、医疗保险方面的研究, email: liupcmail@163.com

gastrointestinal disorders, general disorders and administration site conditions. Apart from arthralgia, which was associated with a higher risk in female users of levofloxacin, the remaining 10 signals were newly identified. Drug eruption showed a higher risk in male users, while abdominal pain, lip swelling, abdominal discomfort, bloating, injection site pain, swelling, lowered neutrophil count, lowered white blood cell count, cough, and arthralgia showed a higher risk in female users. **Conclusion** The overall safety profile of levofloxacin in this study is favorable. However, attention should be given to its neurotoxicity, phototoxicity, and ocular toxicity in clinical use, as well as its adverse reactions in female patients.

Key words: pharmacovigilance; levofloxacin; spontaneous reporting system; adverse reaction; sex difference

左氧氟沙星是第三代喹诺酮类抗菌药物，通过抑制 DNA 旋转酶和拓扑异构酶Ⅳ，抑制细菌 DNA 的合成和复制，从而导致细菌死亡，发挥杀菌抑菌作用^[1-2]。左氧氟沙星具有广谱抗菌作用，对大多数革兰氏阴性杆菌杀菌效果比较好，因此，它被广泛用于治疗胃肠道、呼吸系统、泌尿生殖系统和眼科感染^[3-4]。

适用于敏感细菌引起的呼吸系统、泌尿系统、生殖系统、皮肤软组织以及肠道的中、重度感染，在临床中被应用于杀菌、消炎治疗^[3]。左氧氟沙星作为临床实践中常用的第三代喹诺酮类药物，与前几代相比，抗菌活性显著增强，尤其是对革兰氏阳性菌和厌氧菌^[5]。

在临床试验和上市后监测期间发现，与左氧氟沙星相关的不良反应通常涉及胃肠道、肌肉骨骼系统、中枢神经系统、心血管系统和血液及淋巴系统疾病等系统器官分类^[6-8]。

近年来，随着左氧氟沙星的广泛使用，药品不良反应（ADR）报告逐渐增加，其中包括缺血性中风偏瘫、过敏性休克、肝毒性、癫痫发作、快速进展性认知障碍、急性胰腺炎、中毒性表皮坏死松解症、急性横纹肌溶解症、嗜酸性粒细胞增多和全身症状药疹（DRESS）综合征、Stevens-Johnson 综合征、急性肾衰竭等严重罕见不良反应。因此，尽管左氧氟沙星具有优异的药代动力学特性，并且成人耐受性良好^[9-10]，但其仍存在一定的安全风险。

本研究旨在通过对国家药品不良反应监测自发呈报系统中某地级市 2018 年 1 月 1 日—2022 年 12 月 31 日期间所有药品不良反应监测数据中左氧氟沙星相关的不良反应信号进行挖掘，旨在为临床工作者提供更全面的左氧氟沙星的安全性数据，进而提出合理用药的建议。

1 方法

1.1 数据来源

本研究数据来源国家药品不良反应监测系统^[11]，该系统主要包含报告基本情况、患者基本信息、患者疾病史信息、药品信息、不良反应信息、关联性评价信息、报告质量属性等信息。本研究从

该系统导出某地级市 2018 年 1 月 1 日—2022 年 12 月 31 日期间所有 ADR 监测数据。

1.2 数据处理

本研究将所有通用名称根据《国家药品编码本位码》^[12]进行标准化，然后通过删除字段中包含的剂型、酸根、金属等名词，获取药物活性成分的化学名，从而去除剂型等的影响，合并化学名一致的西药或成分一致的中药/中成药^[13]，同时对药名无效的数据进行人工核对与判断，无法校正的删除。

本研究对不良反应名称按国际人用药品注册技术协调会（ICH）发布的《国际医学用语词典》^[14]（MedDRA）26.0 版中的“首选术语（PT）”进行编码，依据 MedDRA 中的系统器官分类（SOC）对 PT 进行分类整理与统计。

1.3 数据挖掘

1.3.1 信号检测法 本研究联用报告比值比法（ROR）^[15]对左氧氟沙星的不良反应信号进行挖掘（见表 1）， $ROR = AD/BC$ ，当 $A \geq 3$ 且 $95\%CI > 1$ 时。每一个 PT 满足算法的阈值时，才判定为 1 个可疑不良反应信号，且信号数值越大代表目标药物与可疑不良反应信号的关联性越强。

表 1 比值失衡测量法 2×2 四格表

Tab 1 Two-by two contingency table for disproportionality analysis

项目	目标 ADR/ 病例	其他 ADR/ 对照	合计
目标药品 / 暴露	A	B	A + B
其他药品 / 非暴露	C	D	C + D
合计	A + C	B + D	N = A + B + C + D

注：A 为目标药物引起的目标 ADR 数量，B 为目标药物引起的其他 ADR 数量，C 为数据库中其他药物引起的目标 ADR 数量，D 为数据库中其他药物引起的其他 ADR 数量。

Note: A represents the number of target ADRs caused by the target drug, B represents the number of other ADRs caused by the target drug, C represents the number of target ADRs caused by other drugs in the database, D represents the number of other ADRs caused by other drugs in the database.

1.3.2 差异性信号检测法 本研究对药品不良反应发生是否具有性别差异进行了探究，对挖掘出的信号进行了性别差异化信号检测分析。差异性信号检测法^[16]的计算也是基于四格表，算法是在

ROR 法的基础上进行的。

将四格表中各目标药物的“女性 - 目标不良反应报告数”与“女性 - 其他不良反应报告数”的比值 (A/B), 除以“男性 - 目标不良反应报告数”与“男性 - 其他不良反应报告数”的比值 (C/D), 得到 ROR 值, 据此来评估各药物目标不良反应在不同性别的相对风险度。

若满足 $A > 5$ 、 $C > 5$ 、 $A + C > 50$; $\log_2 ROR > 1$ 说明女性患者发生该目标不良反应的风险更大, 并且该值越大代表其发生该不良反应的风险越高; 若满足 $A > 5$ 、 $C > 5$ 、 $A + C > 50$; $\log_2 ROR < -1$ 说明男性患者该发生目标不良反应的风险更大, 并且该值越小代表其发生该不良反应的风险越高。

2 结果

2.1 不良反应事件 (ADE) 上报基本情况

2018 年 1 月 1 日 - 2022 年 12 月 31 日期间的不良反应报告共 109 642 份, 经数据挖掘与初步清洗, 共 98 111 份报告纳入本研究, 筛选到与左氧氟沙星相关的不良反应事件报告共 2661 份, 涉及不良反应 5123 例次 (部分报告同时有 2 个或 2 个以上不良反应)。在性别方面, 女性 (1516 份, 56.97%) 报告占比高于男性 (1145 份, 43.03%); 在年龄方面, 18 ~ 65 岁的患者最多 (83.46%)。新的非预期报告占比 8.00%, 严重报告占比 21.80%; 580 份严重报告中, 每份报告保留最严重分类描述, 导致其他重要医学事件, 如不进行治疗可能出现上述所列情况的报告占比最高, 导致住院或住院时间延长次之 [根据《个例药品不良反应收集和报告指导原则》规定存在以下损害情形之一的不良反应应当被判定为严重药品不良反应: ① 导致死亡; ② 危及生命; ③ 导致住院或住院时间延长; ④ 导致永久或显著的残疾 / 功能丧失; ⑤ 先天性异常 / 出生缺陷; ⑥ 导致其他重要医学事件, 如不进行治疗可能出现上述所列情况的]。

在 2661 份报告中, 共涉及 12 种给药途径, 其中静脉滴注引发的不良反应共 2132 例 (80.12%), 其次是口服共 419 份 (15.75%); 共涉及 19 种药物剂型, 其中注射剂是引发不良反应的主要药物剂型, 共 2134 份 (80.20%), 其次是片剂共 396 份 (14.88%) (见表 2)。

2.2 不良反应基本特征

左氧氟沙星不良反应对原患疾病影响情况方面结果为不明显的报告最多, 共 2447 例, 占比高达 91.96%。结果为病程延长共 175 例 (6.58%)、病情加重共 39 例 (1.47%); 患者不良反应转归情况为好转者共 1845 例 (69.33%)、痊愈者共 748 例 (28.11%)、未好转者共 13 例 (0.49%)、有后遗症者仅有 1 例 (0.04%)、不详共 54 例 (2.03%); 用药至不良反应

表 2 左氧氟沙星不良反应报告的基本情况

Tab 2 Basic information of levofloxacin adverse reaction reports

基本信息	分类	[n (%)]
性别	男	1145 (43.03)
	女	1516 (56.97)
年龄 / 岁	< 18	23 (0.86)
	18 ~ 65	2221 (83.46)
	< 65	417 (15.67)
报告类型 ¹	新的	213 (8.00)
	已知	2448 (92.00)
严重类型	一般	2081 (78.20)
	严重	580 (21.80)
报告严重程度 ²	导致显著的或永久的人体伤残或器官功能的损伤	12 (1.79)
	危及生命	45 (6.72)
	导致其他重要医学事件, 如不进行	447 (66.72)
	治疗可能出现上述所列情况的	
	导致住院或住院时间延长	166 (24.78)
给药途径 ³	静脉滴注	2132 (80.12)
	口服	419 (15.75)
	经眼给药	65 (2.44)
	静脉注射	27 (1.01)
	外用	7 (0.26)
剂型 ³	注射剂	2134 (80.20)
	片剂	396 (14.88)
	滴眼液	69 (2.59)
	胶囊	14 (0.53)
	粉针剂	13 (0.49)

注: 1. 报告类型中新的是指药品说明书中未载明的不良反应。说明书中已有描述, 但不良反应发生的性质、程度、后果或者频率与说明书描述不一致或者更严重的, 按照新的药品不良反应处理。2. 报告严重程度是对报告类型为严重的报告的进一步描述, 一份报告有多个报告严重程度描述。3. 给药途径和剂型为报告数排名前 5 位的剂型。

Note: 1. 'New' in the context of report types refers to adverse drug reactions (ADRs) that are not specified in the drug's instructions. If the nature, severity, consequences, or frequency of an adverse reaction differs from or is more serious than what is described in the instructions, it is treated as a new adverse drug reaction. 2. The report severity is a further description of reports classified as serious. A single report may have multiple descriptions of report severity. 3. The administration routes and dosage forms refer to the top 5 dosage forms in terms of the number of reports.

发生时间的统计分析结果显示, 有 1712 例 (64.34%) 的患者在用药当天即发生不良反应; 815 例 (30.63%) 患者在用药 1 周内发生不良反应; 其余患者用药 1 周后发生不良反应的数量较少, 见表 3。

2.3 药品不良反应风险信号

根据上述药品不良反应信号评判标准, 共提取出以左氧氟沙星为怀疑药物的药品不良反应信号共 45 个, 主要涉及全身性疾病及给药部位各种反应、血管与淋巴管类疾病、皮肤及皮下组织类疾病等 8 个 SOC, 总发生例次为 3170 次。报告例次最多的 SOC 为皮肤及皮下组织类疾病 (2329 例次, 73.47%), 其次为血管

表 3 左氧氟沙星不良反应基本特征

Tab 3 Basic characteristics of levofloxacin adverse reactions		
不良反应情况	分类	报告数 [n (%)]
对原患疾病的影响	病情加重	39 (1.47)
	病程延长	175 (6.58)
	不明显	2447 (91.96)
不良反应结局	好转	1845 (69.33)
	痊愈	748 (28.11)
	未好转	13 (0.49)
	有后遗症	1 (0.04)
	不详	54 (2.03)
用药至不良反应发生时间	≤ 24 h	1712 (64.34)
	1 d ~ 7 d	815 (30.63)
	7 d ~ 14 d	75 (2.82)
	14 d ~ 1 个月	25 (0.94)
	1 个月 ~ 3 个月	24 (0.90)
	3 个月 ~ 1 年	4 (0.15)
	> 1 年	1 (0.04)
	记录错误	5 (0.19)

与淋巴管类疾病 (380 例次, 11.99%), 全身性疾病及给药部位各种反应 (271 例次, 8.55%)。所包含信号数排名靠前的 SOC 分别为全身性疾病及给药部位各种反应 (13 个, 28.89%), 皮肤及皮下组织类疾病 (10 个, 22.22%), 精神类 (6 个, 13.33%)。按照 SOC 项下的报告例次和所包含信号数排序的结果见表 4。

表 4 左氧氟沙星不良反应信号的 SOC 分类结果 [n(%)]

Tab 4 SOC classification results of levofloxacin adverse reaction signals [n(%)]

SOC 分类	报告例次	信号数
皮肤及皮下组织类疾病	2329 (73.47)	10 (22.22)
血管与淋巴管类疾病	380 (11.99)	4 (8.89)
全身性疾病及给药部位各种反应	271 (8.55)	13 (28.89)
精神类	85 (2.68)	6 (13.33)
眼器官疾病	48 (1.51)	5 (11.11)
各类神经系统疾病	45 (1.42)	5 (11.11)
耳及迷路类疾病	9 (0.28)	1 (2.22)
生殖系统及乳腺疾病	3 (0.09)	1 (2.22)

将 45 个不良反应信号按照信号强度 (ROR 值) 进行排序。从表 5 中可见信号强度排前 5 位的 PT 是输液部位皮疹、输液部位瘙痒、输液部位反应、注射部位静脉炎、浅表静脉炎; 报告例次排前 5 位的是瘙痒、皮疹、静脉炎、胸部不适、潮红。

将检测出的 45 个信号与左氧氟沙星的原研说明书^[17]进行对比, 并查阅相关不良反应的基础知识, 以明确信号在说明书中提及与否。其中 10 个不良反应信号在说明书中未明确提及, 分别为异常行为、阴囊糜烂、言语障碍、睑缘炎、眼睛瘙痒、干眼症、昏迷、皮肤变色、多汗以及斑丘疹。

2.4 性别差异信号检测结果

为了评估药品不良反应发生是否具有性别差异, 本研究分别计算了男性与女性对应的 ROR 值与 $\log_2$ ROR 值, 共发现 11 个信号, 其中男性在药疹 (ROR 0.48; $\log_2$ ROR - 1.06) 具有更大的风险; 而

女性在腹痛 (ROR 2.54; $\log_2$ ROR 1.35)、唇部肿胀 (ROR 5.07; $\log_2$ ROR 2.34)、腹部不适 (ROR 6.91; $\log_2$ ROR 2.79)、腹胀 (ROR 2.90; $\log_2$ ROR 1.54)、注射部位痛 (ROR 2.17; $\log_2$ ROR 1.12)、肿胀 (ROR 2.42; $\log_2$ ROR 1.28)、中性粒细胞计数降低 (ROR 2.17; $\log_2$ ROR 1.12)、白细胞计数降低 (ROR 2.07; $\log_2$ ROR 1.05)、咳嗽 (ROR 2.53; $\log_2$ ROR 1.34)、关节痛 (ROR 4.35; $\log_2$ ROR 2.12) 等方面具有更大的风险, 具体见表 6。

3 讨论

3.1 药品不良反应信号分析

左氧氟沙星为喹诺酮类广谱抗菌药物, 具有抑制敏感细菌 DNA 复制、转录、修复和重组所需的拓扑异构酶 IV 及 DNA 旋转酶的作用^[18-20]。长期大量使用广谱抗菌药物会造成患者菌群失调, 导致其他机会致病菌引起感染, 本次研究中, 在不良反应信号阳性中阴囊糜烂为相关不良反应。

在各类神经系统疾病和精神病类方面, 查询左氧氟沙星说明书, 神经系统反应、头晕、失眠、焦虑、激动、意识错乱、抑郁、幻觉、梦魇、睡眠障碍、厌食等是说明书中提到的不良反应, 异常行为、言语障碍、昏迷等是说明书中未提及的不良反应。左氧氟沙星等喹诺酮类药物及其代谢产物可与中枢抑制性神经递质 γ -GABA 竞争性结合 GABA 受体, 从而抑制 GABA 的活性, 使中枢神经的兴奋性增强, 进而导致神经系统症状^[21]。因此, 临床用药应重视药物相互作用所致的大脑神经系统不良反应发生率。既往有中枢神经系统疾病史者以及急性脑血管障碍患者也应慎用左氧氟沙星等喹诺酮类药物, 以免诱发或加重精神系统症状, 一旦发生类似反应, 应立即停药。

在眼器官疾病方面, 本次研究检测到睑缘炎、眼睛瘙痒、干眼症在说明书中未提及, 但是以往的研究表明左氧氟沙星、莫西沙星等喹诺酮类药物具有眼毒性^[22-24]。研究显示, 莫西沙星等喹诺酮类药物可与黑色素形成复合物, 可能导致药物在富含黑色素的组织 (如虹膜) 中积累, 从而引起毒性作用^[22]。此外, 在给药后皮肤光敏性增加的数据显示, 假设该类药物对虹膜色素有直接毒性作用, 这可导致虹膜色素释放并随后引发炎症反应^[25]。这一发现表明, 临床医师在使用左氧氟沙星等喹诺酮类药物时应密切监测患者的眼部健康状况, 并在出现不良反应迹象时立即采取行动。

在皮肤及皮下组织类疾病方面, 本研究检测到皮肤变色、多汗以及斑丘疹未在说明书中提及。这可能与喹诺酮类药物的光敏毒性引起的皮肤过敏反应有关^[26]。但是以往研究表明, 左氧氟沙星相较于依诺沙星、培氟沙星等喹诺酮类药物, 具有非常低的光毒性潜力^[27]。在临床试验中, 接受左氧氟沙星治疗的患者

表 5 左氧氟沙星不良反应信号检测结果
Tab 5 Signal detection of levofloxacin adverse events

PT	SOC	n	ROR (95%CI)
输液部位皮疹	全身性疾病及给药部位各种反应	4	142.96 (15.98 ~ 1279.32)
输液部位瘙痒	全身性疾病及给药部位各种反应	7	83.44 (21.57 ~ 322.78)
输液部位反应	全身性疾病及给药部位各种反应	3	53.6 (8.95 ~ 320.85)
注射部位静脉炎	全身性疾病及给药部位各种反应	12	21.48 (10.49 ~ 43.95)
浅表静脉炎	血管与淋巴管类疾病	10	17.04 (8.02 ~ 36.2)
注射部位瘙痒	全身性疾病及给药部位各种反应	24	14.84 (9.22 ~ 23.9)
静脉炎	血管与淋巴管类疾病	253	14.39 (12.42 ~ 16.68)
注射部位反应	全身性疾病及给药部位各种反应	24	11.48 (7.24 ~ 18.19)
注射部位皮疹	全身性疾病及给药部位各种反应	6	10.73 (4.31 ~ 26.72)
给药部位发炎	全身性疾病及给药部位各种反应	3	10.72 (2.95 ~ 38.96)
血管炎	血管与淋巴管类疾病	4	10.21 (3.36 ~ 31.03)
注射部位红斑	全身性疾病及给药部位各种反应	3	8.93 (2.52 ~ 31.66)
癫痫	各类神经系统疾病	12	7.95 (4.25 ~ 14.87)
异常行为 [*]	精神病类	3	7.66 (2.2 ~ 26.65)
阴囊糜烂 [*]	生殖系统及乳腺疾病	3	7.66 (2.2 ~ 26.65)
言语障碍 [*]	各类神经系统疾病	4	6.5 (2.24 ~ 18.86)
睑缘炎 [*]	眼器官疾病	5	5.58 (2.18 ~ 14.34)
眼睛瘙痒 [*]	眼器官疾病	7	5.56 (2.51 ~ 12.34)
干眼症 [*]	眼器官疾病	3	4.12 (1.25 ~ 13.62)
精神病性障碍	精神病类	3	4.12 (1.25 ~ 13.62)
血管性水肿	皮肤及皮下组织类疾病	15	3.86 (2.27 ~ 6.58)
失眠	精神病类	40	3.59 (2.59 ~ 4.98)
昏迷 [*]	各类神经系统疾病	5	3.57 (1.42 ~ 8.97)
眼痛	眼器官疾病	20	3.55 (2.24 ~ 5.62)
精神损害	各类神经系统疾病	9	3.42 (1.73 ~ 6.79)
注射部位血肿	全身性疾病及给药部位各种反应	7	3.29 (1.52 ~ 7.14)
皮肤变色 [*]	皮肤及皮下组织类疾病	4	3.18 (1.14 ~ 8.83)
眼部疾病	眼器官疾病	13	2.96 (1.68 ~ 5.22)
红斑	皮肤及皮下组织类疾病	75	2.87 (2.27 ~ 3.64)
瘙痒	皮肤及皮下组织类疾病	1196	2.85 (2.67 ~ 3.04)
激越	精神病类	7	2.5 (1.16 ~ 5.39)
幻觉	精神病类	14	2.35 (1.37 ~ 4.04)
潮红	血管与淋巴管类疾病	113	2.23 (1.84 ~ 2.7)
瘙痒性皮疹	皮肤及皮下组织类疾病	11	2.1 (1.14 ~ 3.87)
注射部位痛	全身性疾病及给药部位各种反应	16	2.08 (1.26 ~ 3.45)
皮疹	皮肤及皮下组织类疾病	861	2.08 (1.93 ~ 2.24)
耳鸣	耳及迷路类疾病	9	2.01 (1.03 ~ 3.94)
烦躁不安	精神病类	18	1.9 (1.18 ~ 3.05)
惊厥发作	各类神经系统疾病	15	1.9 (1.13 ~ 3.19)
多汗 [*]	皮肤及皮下组织类疾病	29	1.7 (1.17 ~ 2.46)
皮肤肿胀	皮肤及皮下组织类疾病	29	1.67 (1.15 ~ 2.43)
斑丘疹 [*]	皮肤及皮下组织类疾病	57	1.58 (1.21 ~ 2.07)
胸部不适	全身性疾病及给药部位各种反应	125	1.52 (1.27 ~ 1.82)
疼痛	全身性疾病及给药部位各种反应	37	1.5 (1.08 ~ 2.09)
荨麻疹	皮肤及皮下组织类疾病	52	1.48 (1.12 ~ 1.95)

注 (Note): ^{*}表示说明书中未提及的不良反应 (Indicates the adverse reaction not mentioned in the drug's instructions)。

中只有不到 0.1% 出现光毒性^[26]。虽然很少报道左氧氟沙星的严重光毒性反应,但谨慎地建议,如果在服用左氧氟沙星时应尽量避免长时间暴露在阳光直射下。

3.2 性别差异信号分析

药代动力学 (PK) 的性别差异是导致女性药物毒性较高的主要原因^[28],这些差异源于生理差异 (性激素水平、肝肾功能以及身体成分等)^[29]。Overholser 等^[30]研究发现,在静脉注射左氧氟沙星后,男性和女性的药代动力学参数存在差异,男性的全身清除

率 (CLs)、肾清除率 (CL_r)、中央室分布容积 (V_c) 以及稳态分布体积 (V_{ss}) 均高于女性,而女性的终末消除半衰期 (t_{1/2})、最大血清浓度 (C_{max}) 和药物血药浓度随时间变化的曲线下面积 (AUC) 则较男性更高,因此在男性和女性使用了相同剂量的左氧氟沙星后,女性有更多的药物暴露。因此,与男性相比,女性左氧氟沙星中毒的风险可能更高。

左氧氟沙星是通过干扰细菌体内拓扑异构酶活性而产生杀菌作用^[18-20],而哺乳动物的骨髓干细胞

表 6 具有性别差异化的信号

Tab 6 Disproportionality analysis of signals stratified by case sex

PT	SOC	ROR	log ₂ ROR	风险更高的性别
药疹	皮肤及皮下组织类疾病	0.48	− 1.06	男性
腹痛	胃肠系统疾病	2.54	1.35	女性
唇部肿胀	胃肠系统疾病	5.07	2.34	女性
腹部不适	胃肠系统疾病	6.91	2.79	女性
腹胀	胃肠系统疾病	2.90	1.54	女性
注射部位痛	全身性疾病及给药部位各种反应	2.17	1.12	女性
肿胀	全身性疾病及给药部位各种反应	2.42	1.28	女性
中性粒细胞计数降低	各类检查	2.17	1.12	女性
白细胞计数降低	各类检查	2.07	1.05	女性
咳嗽	呼吸系统、胸及纵隔疾病	2.53	1.34	女性
关节痛	各种肌肉骨骼及结缔组织疾病	4.35	2.12	女性

生成过程中，其 DNA 合成也与类似的拓扑异构酶有关。因此药物可能通过干扰人体骨髓干细胞合成而抑制骨髓生成，进而减少血细胞生成，导致外周血细胞计数下降。女性在用药后体内血药浓度更高，更易造成对人体骨髓干细胞合成的抑制，从而导致女性较男性更易发生中性粒细胞计数降低和白细胞计数降低。同理，女性体内的高血药浓度状态，药物和 / 或其代谢产物更易刺激胃肠黏膜或破坏肠内菌群的自然平衡^[31-32]，从而出现腹胀、腹痛以及腹部不适等胃肠道不良反应。

而注射部位痛、肿胀、唇部肿胀、咳嗽和药疹等 6 个不良反应，其发生机制均与由药物或其代谢产物引发的过敏反应或者直接导致的局部炎症有关。以往研究发现，细胞外三磷酸腺苷（ATP）通过与 ATP 受体的相互作用促进脉管系统的炎症^[33]。嘌呤能信号传导是通过将促炎 ATP 水解为抗炎腺苷来调节炎症，该过程涉及核苷三磷酸二磷酸水解酶（CD39）、CD73、腺苷受体（ADORA）和平衡核苷转运蛋白（ENT）四种关键的调节蛋白，它们在细胞膜上充当腺苷转运通道^[34-35]。研究表明，暴露于雌二醇的缺氧内皮细胞会显著增加 CD39 的表达，同时还可降低 ENT1（一种膜蛋白，属于核苷酸转运体家族的一员，起到调节细胞内外核苷酸的浓度平衡的作用）表达从而导致腺苷能信号传导和体外血管生成的正向调节^[36]，进而抑制或调节炎症反应。而女性在生理周期中的雌激素水平会经历周期性的变化，因此女性每个月雌激素的周期性变化会导致机体炎症调节机制的紊乱，导致促炎性细胞因子的释放，这些细胞因子可能导致机体出现局部炎症，从而引发注射部位痛、肿胀、唇部肿胀、咳嗽和药疹等不良反应。

值得注意的是，本研究发现左氧氟沙星导致的药疹在男性患者中更为显著，但与以往的研究结论不一致。以往研究表明，女性报告的药疹等过敏反应的发生率一般较高^[18-21]，而药代动力学、药效学、免疫学和激素因素的性别差异，以及女性与男性在

用药方面的差异被认为是可能的诱发因素^[22-25]。本研究结果与以往的研究结果不同，可能是由于数据量过小造成的偏移，但相关风险不容忽视，当男性患者使用左氧氟沙星时，应注意患者皮肤状况。

3.3 局限性

本研究存在如下局限性：

一方面受制于自发呈报系统本身的影响，如上报形式、报告质量等影响，未收集到有关目标药品的所有不良反应或用药错误的全部报告；以及数据库中未纳入所有人群的数据，并不能用于计算不良反应发生率等指标。在本研究中存在年龄、转归等指标缺失现象，虽然缺失值较有限且为描述性数据，但仍可能对结果的可靠性造成影响。

另一方面受制于研究本身，本次研究对单药进行了信号检测与初步筛选，未考虑联合用药、具体用药剂量等因素进行信号评价。且检测到的药品不良反应信号，只能表明药物与药品不良反应信号有统计学关联，仅具有提示作用，其因果关系仍需要进一步研究和评估。

4 结论

本研究通过对中国药品不良反应监测自发呈报系统中某地级市 2018 年 1 月 1 日—2022 年 12 月 31 日期间所有药品不良反应监测数据的信号检测，从药物警戒信号角度评价了左氧氟沙星在真实世界中的安全性特征。结果检出左氧氟沙星在全身性疾病及给药部位各种反应、血管与淋巴管类疾病、皮肤及皮下组织类疾病等 SOC 的风险信号，其中大多在说明书中已提及，但是发现异常行为、阴囊糜烂、言语障碍、睑缘炎、眼睛瘙痒、干眼症、昏迷、皮肤变色、多汗以及斑丘疹 10 个不良反应未在药品说明书中提及。此外，在性别差异信号检测结果中发现几个潜在新信号值得关注：左氧氟沙星诱导的药疹，在男性中具有更高的风险；其诱导的腹痛、唇部肿胀、腹部不适、腹胀、注射部位痛、肿胀、中性粒细胞计数降低、白细胞计数降低以及咳嗽、关节痛在女性中具有更高的风险。

参考文献

- [1] Owens RC, Ambrose PG. Antimicrobial safety: focus on fluoroquinolones [J]. Clin Infect Dis, 2005, (41 Suppl 2): S144-157.
- [2] Hawkey PM. Mechanisms of quinolone action and microbial response [J]. J Antimicrob Chemother, 2003, (51 Suppl 1): 29-35.
- [3] Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, et al. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success [J]. Trends Microbiol, 2014, 22 (8): 438-445.
- [4] Jia YS, Zhao LY. The antibacterial activity of fluoroquinolone derivatives: an update (2018—2021) [J]. Eur J Med Chem, 2021, 224: 113741.
- [5] Millanao AR, Mora AY, Villagra NA, et al. Biological effects of quinolones: a family of broad-spectrum antimicrobial agents [J]. Molecules, 2021, 26 (23): 7153.
- [6] Oreagba IA, Oshikoya KA, Ogar C, et al. Adverse reactions to fluoroquinolones in the Nigerian population: an audit of reports submitted to the National Pharmacovigilance Centre from 2004 to 2016 [J]. Pharmacol Res Perspect, 2017, 5 (2): e00297.
- [7] 张政, 甄健存, 詹思延, 等. 左氧氟沙星注射剂不良反应与合理性用药的前瞻性观察 [J]. 中华流行病学杂志, 2001, 22 (6): 405-407.
- [8] Carbon C. Comparison of side effects of levofloxacin versus other fluoroquinolones [J]. Chemotherapy, 2001, 47 (Suppl 3): 9-14.
- [9] Andriole VT. The quinolones: past, present, and future [J]. Clin Infect Dis, 2005, (41 Suppl 2): S113-119.
- [10] Wirth S, Emil SGS, Engelis A, et al. Moxifloxacin in pediatric patients with complicated intra-abdominal infections: results of the MOXIPEDIA randomized controlled study [J]. Pediatr Infect Dis J, 2018, 37 (8): e207-e213.
- [11] 国家药品不良反应监测系统 [EB/OL]. [2024-04-11]. <https://www.adrs.org.cn/>.
- [12] 国家药品编码本位码 (截至 2023 年 12 月 31 日) [EB/OL]. (2024-01-09) [2024-04-11]. <https://www.nmpa.gov.cn/zwfw/zwfwzxfw/zxfwsjxz/20240109145510149.html>.
- [13] 颜明明, 郑晗, 吴舒珊, 等. 基于上海市临床药事质量控制中心数据库的药物心脏毒性不良反应信号挖掘研究 [J]. 药物流行病学杂志, 2022, 31 (5): 309-313.
- [14] MSSO Updates [MedDRA] [EB/OL]. (2023-03-01) [2024-04-11]. <https://www.meddra.org/>.
- [15] van Puijenbroek EP, Bate A, Leufkens HGM, et al. A comparison of measures of disproportionality for signal detection in spontaneous reporting systems for adverse drug reactions [J]. Pharmacoepidemiol Drug Saf, 2002, 11 (1): 3-10.
- [16] Yu Y, Chen J, Li DC, et al. Systematic analysis of adverse event reports for sex differences in adverse drug events [J]. Sci Rep, 2016, 6: 24955.
- [17] FDALabel [EB/OL]. [2025-04-24] <https://inctr-crs.fda.gov/fdala-label/ui/splsummaries/criteria/394486>.
- [18] Correia S, Poeta P, Hébraud M, et al. Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? [J]. J Med Microbiol, 2017, 66 (5): 551-559.
- [19] Hooper DC, Jacoby GA. Topoisomerase inhibitors: fluoroquinolone mechanisms of action and resistance [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2016, 6 (9): a025320.
- [20] Pohlhaus JR, Kreuzer KN. Norfloxacin-induced DNA gyrase cleavage complexes block Escherichia coli replication forks, causing double-stranded breaks in vivo [J]. Mol Microbiol, 2005, 56 (6): 1416-1429.
- [21] 赵飞, 关羽. 喹诺酮类抗菌药的临床应用和不良反应 [J]. 内蒙古中医药, 2014, 33 (10): 69-70.
- [22] Rivera-Valdivia N, Arteaga-Rivera K, Reyes-Guanes J, et al. Severe sequelae in bilateral acute iris transillumination syndrome secondary to the use of oral moxifloxacin: a case report [J]. J Med Case Rep, 2021, 15: 462.
- [23] Hinkle DM, Dacey MS, Mandelcorn E, et al. Bilateral uveitis associated with fluoroquinolone therapy [J]. Cutan Ocul Toxicol, 2012, 31 (2): 111-116.
- [24] Li YW, Wang J, Wang CL, et al. Safety analysis of quinolones use in minors—based on the FAERS database [J]. Front Med (Lausanne), 2024, 11: 1437376.
- [25] Sandhu HS, Brucker AJ, Ma LY, et al. Oral fluoroquinolones and the risk of uveitis: a retrospective cohort study [J]. JAMA Ophthalmol, 2016, 134 (1): 38-43.
- [26] Martin SJ, Jung R, Garvin CG. A risk-benefit assessment of levofloxacin in respiratory, skin and skin structure, and urinary tract infections [J]. Drug Saf, 2001, 24 (3): 199-222.
- [27] Carbon C. Comparison of side effects of levofloxacin versus other fluoroquinolones [J]. Chemotherapy, 2001, (47 Suppl 3): 9-14.
- [28] Beierle I, Meibohm B, Derendorf H. Gender differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics [J]. Int J Clin Pharmacol Ther, 1999, 37 (11): 529-547.
- [29] Courchesne M, Manrique G, Bernier L, et al. Gender differences in pharmacokinetics: a perspective on contrast agents [J]. ACS Pharmacol Transl Sci, 2024, 7 (1): 8-17.
- [30] Overholser BR, Kays MB, Lagvankar S, et al. Pharmacokinetics of intravenously administered levofloxacin in men and women [J]. Pharmacotherapy, 2005, 25 (10): 1310-1318.
- [31] Philpott HL, Nandurkar S, Lubel J, et al. Drug-induced gastrointestinal disorders [J]. Postgrad Med J, 2014, 5 (1): 49-57.
- [32] Edlund C, Nord CE. Effect of quinolones on intestinal ecology [J]. Drugs, 1999, 58 (Suppl 2): 65-70.
- [33] Imai M, Kaczmarek E, Koziak K, et al. Suppression of ATP diphosphohydrolase/CD39 in human vascular endothelial cells [J]. Biochemistry, 1999, 38 (41): 13473-13479.
- [34] Löffler M, Morote-Garcia JC, Eltzschig SA, et al. Physiological roles of vascular nucleoside transporters [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27 (5): 1004-1013.
- [35] Burnstock G. Purinergic signaling in the cardiovascular system [J]. Circ Res, 2017, 120 (1): 207-228.
- [36] Cassavaugh J, Qureshi N, Csizmadia E, et al. Regulation of hypoxic-adenosinergic signaling by estrogen: implications for microvascular injury [J]. Pharmaceuticals (Basel), 2023, 16 (3): 422.

(收稿日期: 2024-12-09; 修回日期: 2025-01-09)

培塞利珠单抗上市后的 ADR 文献分析

李巧玲, 刘茂昌, 刘林慧, 陈丽, 余学钊, 彭静* (华中科技大学同济医学院附属武汉儿童医院药学部, 武汉 430016)

摘要: **目的** 分析培塞利珠单抗 (CZP) 致药品不良反应 (ADR) 的发生规律和临床表现特征, 进而为临床安全用药提供参考。**方法** 检索中国知网、维普、万方、PubMed、Web of Science 和 EMbase 数据库中 CZP 致 ADR 的个案报告, 提取文献资料并进行分析。**结果** 收集个案报告 34 篇, 涉及病例 35 例, 男女比为 1 : 3.38, ADR 主要发生在用药后 6 个月内 (27 例, 77.14%), 所致 ADR 主要累及器官为皮肤及其附件系统、呼吸系统、泌尿系统、血液和淋巴系统、视觉系统、心血管系统、免疫系统。35 例患者中 31 例出现 ADR 后停药和 / 或给予对症治疗, 30 例得到好转或消除, 1 例死亡; 1 例未停药, 给予对症治疗, 得到控制; 3 例结局不详。**结论** 女性、 ≥ 61 岁、联合用药及有基础性疾病是使用 CZP 出现 ADR 的高危因素, 临床在使用 CZP 时应特别关注此类 ADR 发生, 早发现早干预。

关键词: 培塞利珠单抗; 药品不良反应; 个案报道; 文献分析; 安全性

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2025)05-1486-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.048

Literature analysis of adverse drug reactions after the listing of certolizumab pegol

LI Qiao-ling, LIU Mao-chang, LIU Lin-hui, CHEN Li, YU Xue-zhao, PENG Jing* (*Department of Pharmacy, Wuhan Children's Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430016*)

Abstract: Objective To analyze the occurrence and clinical manifestations of adverse drug reactions (ADR) caused by certolizumab pegol (CZP), to provide a reference for safe and rational drug use. **Methods** A systematic search was conducted in the databases including CNKI, VIP, Wanfang, PubMed, Web of Science, and EMbase for case reports of ADRs induced by CZP. The basic patient information, concomitant medications, time of ADR onset, and clinical manifestations were analyzed. **Results** A total of 34 case reports involving 35 patients were collected. The male-to-female ratio was 1 : 3.38. ADRs predominantly occurred within 6 months after CZP administration (27 patients, 77.14%). The primary affected organ systems included the skin and its appendages, respiratory system, urinary system, blood and lymphatic system, as well as the visual, cardiovascular, and immune systems. Among the 35 patients, 31 discontinued CZP and/or received symptomatic treatment upon ADR onset, with 30 patients experiencing improvement or disappearance of ADRs, and 1 death. One patient continued CZP treatment while received symptomatic therapy, and the ADR was controlled. The outcomes of 3 patients remained unknown. **Conclusion** Female sex, age ≥ 61 years, concomitant medication use, and the presence of primary diseases may be high-risk factors for ADRs associated with CZP. Clinicians should pay particular attention to the occurrence of such ADRs during CZP therapy, and early detection and intervention help.

Key words: certolizumab pegol; adverse drug reaction; case report; literature analysis; security

基金项目: 湖北省武汉市卫生健康科研基金资助青年项目 (No.WZ22Q07)。

作者简介: 李巧玲, 女, 硕士, 主管药师, 主要从事临床药学和中药药理学研究, email: liqiaoling@zgwhfe.com * **通信作者:** 彭静, 女, 硕士, 副主任药师, 主要从事临床药学和药理学研究, email: pengjing@zgwhfe.com

培塞利珠单抗 (certolizumab pegol, CZP) 是一种抗肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α) 的聚乙二醇人源化的 Fab 片段, 于 2008 年获得美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准上市, 2019 年 7 月在我国上市, 临床上批准用于治疗类风湿关节炎、克罗恩病、银屑病和脊柱关节炎。随着 CZP 的临床应用日益广泛、适应证逐渐扩大以及联合用药情况日趋增多等, 国内外陆续出现 CZP 治疗相关药品不良反应 (adverse drug reaction, ADR)。其常见的 ADR 主要有细菌感染、病毒感染、败血症、结核病、血液和淋巴系统异常、头疼等。同时, 一些临床研究也报道了 CZP 所致的特殊 ADR, 如口腔扁平苔藓、心力衰竭、双侧恶性青光眼等。由于其在国内上市时间较短, 尚未见国内关于该药 ADR 系统性研究报道。本研究通过查阅国内外个案报道, 对 CZP 上市后的 ADR 文献报道进行系统统计和分析, 进而探讨其 ADR 发生的特点和规律, 旨在为临床安全用药提供参考。

1 资料和方法

1.1 资料来源

以“培塞利珠单抗”“不良反应”“致”“引发”等为中文检索词, 以“certolizumab pegol”“case”“induced”“adverse”等为英文检索词, 分别检索中国知网、万方、维普、PubMed、Web of Science 和 EMBase 数据库, 检索时间为 2008 年 1 月—2023 年 12 月。

1.2 文献纳入标准和排除标准

文献纳入标准包括: ① 国内外公开发表的 CZP 相关 ADR 的临床个案报告; ② 内容包括患者基本信息、原发疾病、用药相关信息、临床表现及治疗转归等信息相对完整。排除标准包括: ① 基本信息不完整, 描述不详细导致无法分析; ② CZP 致 ADR 的文献综述; ③ 动物实验基础研究; ④ 非病例报道类文献; ⑤ 重复报告的文献。由两位研究者按照文献纳入标准和排除标准独立进行文献检索, 初步筛选后, 最终由小组讨论文献是否纳入。

1.3 方法

采用回顾性研究的方法, 对纳入的文献提取病例相关信息, 包括患者性别、年龄、临床诊断、给药方法、给药剂量、给药后 ADR 出现时间、ADR 临床表现、联合用药情况及治疗转归。根据国际通用的诺氏 (Naranjo's) 评估量表进行 ADR 的关联性评价, 总分 ≥ 9 分, 表明该药物与 ADR 的因果关系为肯定; 总分为 5~8 分, 为很

可能有关; 总分为 1~4 分, 为有可能有关; 总分 ≤ 0 分, 为可疑。

2 结果

2.1 患者性别和年龄分布

本研究共检索到 CZP 致 ADR 的临床个案报告 34 篇, 其中国内 1 篇, 国外 33 篇, 纳入病例数为 35 例。其中男性 8 例, 女性 27 例, 男女比例为 1:3.38。年龄为 25~84 岁, 平均年龄 (50.8 ± 17.1) 岁, 其中 61 岁及以上老年人群比例最高。详细如表 1 所示。

表 1 35 例患者性别与年龄分布
Tab 1 Gender and age distribution of 35 patients

年龄 / 岁	男 / 例	女 / 例	构成比 / %
20 ~ 30	1	6	20.00
31 ~ 40	1	3	11.43
41 ~ 50	1	6	20.00
51 ~ 60	3	1	11.43
≥ 61	2	11	37.14
合计	8	27	100.00

2.2 患者临床诊断、合并用药情况及培塞利珠单抗用法用量

35 例患者中, 原患疾病分别为 1 例白塞病、5 例克罗恩病、4 例银屑病、7 例脊柱关节炎、19 例类风湿关节炎, 其中 1 例患者同时患有脊柱关节炎和克罗恩病。具体合并用药情况见表 2。所有患者给药方式均采用皮下注射, 6 例患者每 4 周注射 400 mg, 8 例患者每 2 周注射 200 mg, 2 例患者每 2 周注射 400 mg, 4 例患者第一个月每 2 周注射 400 mg, 第二个月开始每 4 周注射 200 mg, 2 例患者第一个月每 2 周注射 400 mg, 第二个月开始每 2 周注射 200 mg, 13 例患者给药剂量不详。

2.3 ADR 发生时间

CZP 所致 ADR 的发生时间较广泛, 35 例患者中, ADR 发生的最短时间为用药 30 min 出现荨麻疹、恶心呕吐、腹泻、呼吸困难和心动过速等症状, 确诊为过敏反应。最长为用药后 6 年出现全身性结节病, 中位时间为 180 d。3 例 (8.57%) 患者在用药后 1 个月内发生 ADR, 9 例 (25.71%) 患者在用药后 1~3 个月内发生 ADR, 15 例 (42.86%) 患者在用药后 3~6 个月内发生 ADR, 3 例 (8.57%) 患者在用药后 6~12 个月发生 ADR, 2 例 (5.71%) 患者在用药后 12~24 个月发生 ADR, 另外 3 例 (8.57%) 患者分别在用药后 6 年 (1 例) 和 3 年 (2 例) 发生 ADR。

2.4 ADR 累及的系统 / 器官及临床表现

表 2 原发疾病及合并用药情况

Tab 2 Primary disease and concomitant medication use

原发疾病	例数 / 例	构成比 / %	合并用药 / 频次
白塞病	1	2.78	/
克罗恩病	5	13.89	甲氨蝶呤 (1)
银屑病	4	11.11	甲氨蝶呤 (1)
脊椎关节炎	7	19.44	非甾体抗炎药 (1)
类风湿关节炎	19	52.78	甲氨蝶呤 (8)、泼尼松龙 (4)、甲泼尼龙 (2)、氟氢化可的松 (1)、二甲双胍 (1)、琥珀酸美托洛尔 (1)、叶酸 (1)、异烟肼 (2)
合计	36	100.00	/

CZP 致 ADR 累及多个系统 / 器官, 其中主要以皮肤及附件系统 (17 例, 43.59%) 和呼吸系统 (8 例, 20.51%) 最为常见, 其次为泌尿系统 (6 例, 15.38%), 血液及淋巴系统 (4 例, 10.26%), 视觉系统 (2 例, 5.13%), 心血管系统 (1 例, 2.56%), 免疫系统 (1 例, 2.56%), 具体临床表现见表 3。

表 3 CZP 致 ADR 累及的系统 / 器官及临床表现

Tab 3 Systemic/organ and clinical manifestations of ADR induced by CZP

累及器官 / 系统	ADR 主要临床表现	例数 / 例	构成比 / %
皮肤及附件系统	银屑病样皮疹 (5), 脓疱疹、疱性丘疹、毛囊丘疹 (2), 黄斑丘疹, 过敏性紫癜 (1), 脱发 (1), 血管炎性药疹 (1), 红斑皮疹、丘疹 (2), 低补体性荨麻疹血管炎 (1), 地衣样皮疹 (1), 结节性红斑 (1), 瘙痒性皮疹、白细胞碎屑性血管炎 (1), 口腔扁平苔藓 (1)	17	43.59
呼吸系统	社区获得性肺炎 (1)、间质性肺疾病 (4)、组织性肺炎 (1)、结核病 (2)	8	20.51
泌尿系统	进行性肾小球肾炎 (1), 肾功能不全 (1), 肾脏病变 (1), 肾衰竭、肾结节病 (1), 肾病综合征 (2)	6	15.38
血液及淋巴系统	结节性淋巴管炎 (1), 血栓性微血管病 (1), 吞噬细胞性淋巴组织细胞增多症、血小板减少症 (1), 淋巴细胞减少症 (1)	4	10.26
视觉系统	视力下降模糊和头痛、黄斑水肿 (1), 视力模糊双侧恶性青光眼 (1)	2	5.13
心血管系统	心力衰竭 (1)	1	2.56
免疫系统	荨麻疹、恶心、呕吐、腹泻等过敏反应 (1)	1	2.56
合计		39	100

2.5 CZP 致 ADR 的治疗和转归

纳入的 35 例患者中, 其中 31 例 (88.57%) 患者停药后和 / 或给予对症治疗, 30 例 ADR 最终均得到缓解或消失; 1 例患者停用 CZP 并给予对症治疗, 症状未缓解, 不久后死亡。1 例患者使用 CZP 后出现银屑病样皮肤疹, 因患有严重的强直性脊柱炎, 未停用 CZP, 出现 ADR 后给予局部糖皮质激素和全身抗组胺药对症治疗, ADR 最终得到完全控制。另外 3 例患者治疗和转归不详。

2.6 死亡病例的 ADR 情况

1 例 66 岁女性老年患者, 患有类风湿关节炎, 无其他相关病史, 使用 CZP 药物 6 个月后出现间质性肺炎, 停用 CZP 并住院给予对症治疗, 症状未缓解, 不久后死亡。患者同时联合使用了甲氨蝶呤 (每周 20 mg) 和泼尼松龙 ($10\text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$) 药物, 采用诺氏量表评估, CZP 关联性评价为“很可能”。

2.7 CZP 致 ADR 的关联性评价

根据国际通用的诺氏评估量表, 对 35 例 CZP 致 ADR 进行了关联性评价, 其中总分 5 ~ 8 分的为 31 例 (88.57%), 表示为很可能有关; ≥ 9 分的为 4 例 (11.43%), 表示为肯定有关。

3 讨论

3.1 ADR 与患者性别和年龄的关系

本研究纳入的 35 例患者中, 男性 8 例 (22.86%), 女性 27 例 (77.14%), 性别差异明显。基于美国 FAERS 数据库的分析显示, CZP 引起的 ADR 男女比例为 1 : 4.7。流行病学研究显示类风湿关节炎^[1]和银屑病^[2]的发病率均为女性高于男性, 因此认为 ADR 发生的性别差异与原发疾病的发病率女性高于男性有一定关系。且接受 TNF- α 抑制剂治疗的患者中, 女性出现严重皮肤相关 ADR 的风险更高^[3]。此外, 类风湿关节炎、银屑病和脊椎关节炎均为慢性的并随着年龄增长患病率不断升高的疾病, 上述结果也显示 ADR 发生的年龄以 61 岁及以上人群居多 (13 例, 37.14%)。因此, 临床用药过程中, 在女性和老年群体中更应加强药学监护。

3.2 ADR 发生时间

CZP 致 ADR 发生的时间跨度比较大, 大多出现在用药 6 个月内 (27 例, 77.14%)。其中皮肤系统的 ADR 发生的时间跨度比较大, 银屑病样皮肤病多发生在用药后 3 个月内, 脱发发生在用药后 6 个月及以上, 泌尿系统的 ADR 多发生

在用药后 6 个月及以上, 呼吸系统类 ADR 包括肺炎等多发生在用药后 3 ~ 6 个月。因此, 建议临床在使用 CZP 时, 需要密切关注其 6 个月内 ADR 的发生, 加强药学监护。

3.3 皮肤及附件系统 ADR

研究报道约 1/4 的患者在使用 TNF- α 抑制剂后发生皮肤相关的不良事件^[4], 本研究纳入的 35 例患者中有 17 例 (43.59%) 出现了皮肤相关 ADR, 其中 10 例^[5-14] 发生时间是在用药后 3 个月内, 3 例^[15-17] 发生时间是 3 ~ 6 个月, 另外 4 例^[18-20] 分别发生在用药后 7 个月、10 个月、2 年和 3 年, 研究报道 TNF- α 抑制剂使用后皮肤相关 ADR 发生的时间跨度较大, 有 6 个月内, 10 ~ 30 个月, 甚至有长达 43 个月^[21], 大部分发生在用药后的一年内, 本研究纳入相关病例与研究报道^[21] 结果一致。皮肤系统类 ADR 银屑病样皮损是出现最多的, 虽然 TNF- α 抑制剂可治疗银屑病, 但约 2% ~ 5% 患者在用药过程中会出现类似银屑病样皮损, 即矛盾银屑病^[22]。本研究纳入的 1 例^[14] 患者因诊断为强直性脊柱炎和溃疡性结肠炎, 在 CZP 治疗 2 个月后出现全身性银屑病样皮损, 患者因原发性疾病的严重程度未停止 CZP 的治疗, 同时使用局部糖皮质激素和全身抗组胺药治疗, 银屑病样皮损得到完全控制。尽管, 研究结果显示近一半患者中断 TNF- α 抑制剂的治疗可缓解或消除 ADR, 但仍有相当大比例患者的病情持续存在^[23], 且停用 TNF- α 抑制剂可能导致原发性疾病的复发。因此, 对于 ADR 严重的情况, 推荐立即停止 TNF- α 抑制剂的治疗, 其他情况可通过接受对症治疗来缓解或消除 ADR。总之, 是否终止 TNF- α 抑制剂的治疗, 临床医师需综合多种因素去权衡。

3.4 呼吸系统 ADR

本研究纳入 CZP 致 ADR 的 35 例病例中呼吸系统类 ADR 共 8 例, 其中肺炎 6 例^[24-28], 结核病 2 例^[29-30], 7 例 ADR 发生的时间在 6 个月内, 1 例发生时间是用药后 6 年。TNF- α 抑制剂治疗的肺部 ADR 主要有感染性并发症, 如分枝杆菌感染, 以及非感染性并发症包括常见的间质性肺炎、非特异性间质性肺炎、组织性肺炎、淋巴细胞性间质性肺炎和弥漫性肺泡损伤等^[31-32]。大量临床数据^[33] 显示患者在治疗前 6 个月内感染的风险最高, 与本研究结果报道一致。间质性肺疾病是以弥漫性肺实质、肺泡炎症和间质纤维化为特征性疾病, 主要导致老年患者呼吸困难, 类风湿关节炎患者的间质性肺疾病发生率为 20% ~ 30%^[34]。此外, 经证实在使用甲氨蝶呤和生物制剂治疗类风湿关节炎的同时, 可使间质性肺疾病的发生率

增加^[35], 这提示临床医师在使用其他抗风湿药物如来氟米特、柳氮磺吡啶等需警惕间质性肺疾病的发生。Roubille 等^[36] 纳入的 122 例 TNF- α 抑制剂诱导的间质性肺疾病患者中, 死亡率达 29%, TNF- α 抑制剂可促进或者增强甲氨蝶呤的肺毒性, 并触发甲氨蝶呤诱导的间质性肺疾病, 特别是通过刺激浸润性炎症细胞的凋亡, 也有一些患者在服用甲氨蝶呤多年后未出现肺毒性, 在开始 TNF- α 抑制剂治疗不久后出现肺毒性。因此, 关于甲氨蝶呤联合 TNF- α 抑制剂是否会增加肺毒性, 目前还没有确定的结论。本研究纳入的 6 例 CZP 诱发的肺部疾病患者有 4 例均联合了甲氨蝶呤治疗。Huang 等^[35] 强调, 类风湿关节炎相关的间质性肺疾病患者使用 TNF- α 抑制剂可能容易出现更严重的症状, 甚至死亡。因此, 针对 CZP 诱导的肺病, 建议立即停药, 并给予糖皮质激素治疗。提醒医师引入 CZP 治疗前几周应重点关注 ADR 的发生, 尤其是类风湿关节炎的中老年女性患者, 精准、及时地判断 CZP 诱导的肺部 ADR 发生并给予治疗可大大降低死亡率。

3.5 泌尿系统 ADR

肾脏疾病是 TNF- α 抑制剂治疗过程中不常见的一种 ADR, 但在文献中已经报道其是 TNF- α 抑制剂的潜在不良反应, 其发病机制尚不明确^[37], 有研究者怀疑与一种矛盾的、药物诱导的自身免疫过程有关^[38]。Piga 等^[37] 研究报道, TNF- α 抑制剂治疗过程诱发肾脏疾病 ADR 的药物中最相关的是依那西普 (51.7%), 其次分别是阿达木单抗 (31%)、英夫利昔单抗 (10.3%), 托珠单抗和阿巴西普也有报道肾损伤的 ADR。CZP 作为一种新的 TNF- α 抑制剂, 上市时间较短, 相关临床研究报道有限, CZP 引起的肾损伤本研究纳入的病例有 6 例^[39-44], 5 例发生时间为用药后 6 个月, 1 例发生时间为用药后 7 个月, 相关研究显示, 生物制剂相关的自身免疫性疾病平均发病时间为 40 周左右, 本研究纳入的病例与上述报道一致^[45]。6 例 CZP 诱导的肾脏系疾病患者均通过停止 CZP 治疗, 给予糖皮质激素和 / 或免疫抑制剂治疗, ADR 得到改善或消除。基于 TNF- α 抑制剂治疗期间对肾脏的风险, 建议肾脏疾病高危患者, 要谨慎使用 TNF- α 抑制剂, 并且在治疗期间对患者进行肾功能常规监测。当诊断甚至怀疑出现肾脏相关 ADR 时, 需立即停用 TNF- α 抑制剂, 并进行早期治疗^[10]。

3.6 心血管系统 ADR

心力衰竭是 CZP 罕见的 ADR, 发生率为 0.1% ~ 1%^[46], 目前关于其相关报道极少, TNF- α 抑制剂的另外两种生物制剂依那西普和英夫利昔单

抗诱发的心力衰竭病例报道相对较多^[47-48]。一项荟萃分析研究纳入了 163 个随机对照试验, 研究结果显示 CZP 治疗组与常规治疗组相比, 心力衰竭的发生率差异没有统计学意义, 因此 CZP 治疗是否会增加心力衰竭 ADR 是不确定的^[38]。类风湿关节炎本身与心血管并发症的风险增加有关, 吸烟、喝酒也是心血管的危险因素, 本研究纳入的 1 例心力衰竭患者原发疾病为类风湿关节炎, 日常有吸烟、喝酒的习惯, 这些因素可能增加了其心力衰竭的发生率。TNF- α 抑制剂诱发的心力衰竭停止用药后, 绝大部分患者 ADR 会改善。

3.7 其他

本研究纳入的病例中另外四项 ADR 包括血液及淋巴系统^[11, 30, 49-50]、视觉系统^[7, 51]及免疫系统的过敏反应^[52]。1 例为 CZP 诱导的口腔扁平苔藓, 该患者 59 岁, 男性, 因患有克罗恩病使用 CZP 治疗, 治疗 2 年后出现口腔扁平苔藓, 停药后给予局部糖皮质激素治疗, ADR 得到改善^[53]。口腔扁平苔藓是一种口腔黏膜的慢性炎症性疾病, 可表现出多种临床表现。最新的研究报道口腔扁平苔藓发病率女性高于男性, 平均发病年龄为 47.5 岁, 60 ~ 69 岁年龄段的群体发病率更高, 提示临床医师对于这一群体需更加关注 ADR 的发生^[25]。此外, 研究表明约 1% 的口腔扁平苔藓患者会发展为口腔鳞状细胞癌, 因此临床在诊断口腔扁平苔藓时, 应进一步考虑区分其与口腔苔藓样病变, 做到早发现早干预^[23]。Laniosz 等^[53]采用回顾性队列研究发现吸烟史、饮酒史和丙型肝炎史是口腔扁平苔藓的风险因素, 因此建议在 CZP 治疗期间患者需控制吸烟和饮酒, 对于丙型肝炎患者需密切监测其 ADR。局部类固醇是黏膜扁平苔藓的一线治疗, 当诊断甚至怀疑出现此 ADR 时, 考虑尽早给予局部类固醇干预。

3.8 小结

CZP 是有效治疗类风湿关节炎、克罗恩病、银屑病和脊柱关节炎的新型 TNF- α 抑制剂药物。TNF- α 抑制剂类药物所致 ADR 有共同点, 亦有其区别, 因此本文希望通过分析 CZP 所致 ADR 的发生规律和临床特征, 为 CZP 的临床安全使用提供参考。但由于 CZP 在国内上市时间短, 国外相关研究报道也较少, 临床样本数据有限, 本研究只纳入了 35 例 ADR 的个案报道, 相关数据仅代表已报道的这部分 ADR 情况。涉及多个系统/器官, 主要以皮肤及附件系统、呼吸系统、泌尿系统和血液及淋巴系统为主, 其中口腔扁平苔藓、心力衰竭、双侧恶性青光眼以及血栓性微血管病为说明书尚未记载的 ADR, 这些 ADR 在

临床相对少见, 因此临床医师对使用 CZP 的患者, 不仅要询问常见的 ADR, 也要考虑少发的 ADR。绝大多数 ADR 发生轻微, 停药和/或给予对症治疗后 ADR 可改善或消除。建议医务人员在临床使用前严格掌握其适应证, 进行全面的感染调查、筛查以及风险评估, 密切监测速发和迟发 ADR, 尤其是老年、女性群体、联合用药以及存在基础性疾病的特殊患者, 做好 CZP 的用药监护, 做到早发现并进行有效的个体化治疗, 从而避免 ADR 加重及继发其他 ADR, 确保患者用药安全。

参考文献

- [1] Myasoedova E, Davis J, Matteson EL, et al. Is the epidemiology of rheumatoid arthritis changing? results from a population-based incidence study, 1985—2014 [J]. *Ann Rheum Dis*, 2020, 79 (4): 440-444.
- [2] Michalek Im, Loring B, John SM. A systematic review of worldwide epidemiology of psoriasis [J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2017, 31 (2): 205-212.
- [3] Darrigade AS, Milpied B, Truchetet ME, et al. Pattern and severity of psoriasiform eruptions in patients with inflammatory bowel diseases, arthritis or skin inflammatory disorders treated with TNF-alpha inhibitors [J]. *Acta Derm Venereol*, 2017, 97 (6): 731-734.
- [4] Segaert S, Hermans C. Clinical signs, pathophysiology and management of cutaneous side effects of anti-tumor necrosis factor agents [J]. *Am J Clin Dermatol*, 2017, 18 (6): 771-787.
- [5] O'Grady C, Quinn G, Keogh A, et al. Certolizumab-induced facial eruption in a pregnant woman with severe Behcet's disease [J]. *Dermatol Ther*, 2020, 33 (6): e14162.
- [6] Villalobos-Sánchez L, Larena-Grijalba C, Alía-Jiménez A, et al. Certolizumab pegol-induced palmoplantar pustulosis: a case report and review of the literature [J]. *Reumatol Clin (Engl Ed)*, 2019, 15 (6): e163-e165.
- [7] Sakai H, Nomura W, Sugawara M. Certolizumab pegol-induced folliculitis-like lichenoid sarcoidosis in a patient with rheumatoid arthritis [J]. *Case Rep Dermatol*, 2017, 9 (3): 158-163.
- [8] Biedermann L, Kerl K, Rogler G, et al. Drug-induced erythema nodosum after the administration of certolizumab in Crohn's disease [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2013, 19 (1): E4-6.
- [9] Kunadia A, Shulman K, Sami N. Certolizumab-induced lichenoid eruption in a patient with rheumatoid arthritis [J]. *BMJ Case Rep*, 2021, 14 (12): e245875.
- [10] Shelling ML, Vitiello M, Lanuti EL, et al. A case of palmoplantar pustulosis induced by certolizumab pegol: new anti-TNF-alpha demonstrates the same class effect [J]. *J Clin Aesthet Dermatol*, 2012, 5 (8): 40-41.
- [11] Hynnekleiv L, Thrane AS, Krohn J. Simultaneous bilateral aqueous misdirection following certolizumab therapy for rheu-

- matoid arthritis [J]. *BMJ Case Rep*, 2020, 13 (10): e235194.
- [12] Güven G, Güler A, Özyüncü N, et al. Hemophagocytic lymphohistiocytosis after certolizumab treatment in a patient with rheumatoid arthritis [J]. *Eur J Rheumatol*, 2018, 5 (3): 203-205.
- [13] 张容, 张志毅. 培塞利珠单抗诱发强直性脊柱炎患者银屑病样皮疹一例 [J]. *现代医学*, 2022, 50 (8): 1069-1071.
- [14] Babuna Kobaner G, Polat Ekinci A, Yilmaz Z, et al. Psoriasisiform skin eruption in a patient receiving certolizumab-pegol for ankylosing spondylitis: report of a case and review of the literature [J]. *Dermatol Ther*, 2018, 31 (5): e12693.
- [15] Gawdzik A, Ponikowska M, Jankowska-Konsur A, et al. Paradoxical skin reaction to certolizumab, an overlap of pyoderma gangrenosum and psoriasis in a young woman treated for ankylosing spondylitis: case report with literature review [J]. *Dermatol Ther (Heidelb)*, 2020, 10 (4): 869-879.
- [16] Woody M, Warren D, Speck L, et al. Leukocytoclastic vasculitis drug reaction to certolizumab pegol [J]. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*, 2017, 30 (2): 213-214.
- [17] Klein RQ, Spivack J, Choate KA. Psoriatic skin lesions induced by certolizumab pegol [J]. *Arch Dermatol*, 2010, 146 (9): 1055-1056.
- [18] Horai Y, Ishikawa H, Iwanaga N, et al. Development of hypocomplementemic urticarial vasculitis during certolizumab pegol treatment for rheumatoid arthritis: a case report [J]. *J Clin Pharm Ther*, 2020, 45 (5): 1179-1182.
- [19] Lauro W, Picone V, Abategiovanni L, et al. A case of psoriatic alopecia secondary to certolizumab pegol: clinical and trichoscopic evaluation [J]. *Int J Dermatol*. 2023, 62 (2): e70-e72.
- [20] Bostan E, Gulseren D, Yalici-Armagan B, et al. Vasculitis during certolizumab pegol and secukinumab treatment: report of two cases [J]. *Dermatol Ther*, 2021, 34 (4): e15007.
- [21] Harrison MJ, Dixon WG, Watson KD, et al. British Society for Rheumatology Biologics Register Control Centre Consortium. Rates of new-onset psoriasis in patients with rheumatoid arthritis receiving anti-tumour necrosis factor alpha therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register [J]. *Ann Rheum Dis*, 2009, 68 (2): 209-215.
- [22] Nidegger A, Mylonas A, Conrad C. Paradoxical psoriasis induced by anti-TNF- α clinical challenge [J]. *Rev Med Suisse*, 2019, 15 (644): 668-671.
- [23] Brown G, Wang E, Leon A, et al. Tumor necrosis factor- α inhibitor-induced psoriasis: systematic review of clinical features, histopathological findings, and management experience [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2017, 76 (2): 334-341.
- [24] Glaspole IN, Hoy RF, Ryan PF. A case of certolizumab-induced interstitial lung disease in a patient with rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2013, 52 (12): 2302-2304.
- [25] Migita K, Tsuji Y, Hisatomi K, et al. Acute exacerbation of rheumatoid interstitial lung disease during the maintenance therapy with certolizumab pegol [J]. *Mod Rheumatol*, 2017, 27 (6): 1079-1082.
- [26] Lager J, Hilberg O, Løkke A, et al. Severe interstitial lung disease following treatment with certolizumab pegol: a case report [J]. *Eur Respir Rev*, 2013, 22 (129): 414-416.
- [27] Koderia T, Tsutsumi T, Oka Y, et al. Two cases of rheumatoid arthritis complicated by organising pneumonia successfully treated with tofacitinib therapy [J]. *Mod Rheumatol Case Rep*, 2021, 5 (2): 218-225.
- [28] Lazarewicz K, Shaw S, Haque S. Certolizumab pegol-induced heart failure [J]. *J Clin Rheumatol*, 2018, 24 (1): 55-56.
- [29] Koda K, Toyoshima M, Nozue T, et al. Systemic sarcoidosis associated with certolizumab pegol treatment for rheumatoid arthritis: a case report and review of the literature [J]. *Intern Med*, 2020, 59 (16): 2015-2021.
- [30] Hannech E, Boussaid S, Rekik S, et al. Multifocal tuberculosis on certolizumab pegol in a patient followed for rheumatoid arthritis [J]. *Clin Case Rep*, 2021, 9 (6): e04307.
- [31] Perez-Alvarez R, Perez-De-Lis M, Diaz-Lagares C, et al. Interstitial lung disease induced or exacerbated by TNF-targeted therapies: analysis of 122 cases [J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2011, 41 (2): 256-264.
- [32] Khasnis AA, Calabrese DO. Tumour necrosis factor inhibitors and lung disease: a paradox of efficacy and risk [J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2010, 40 (2): 147-163.
- [33] Blanchard E, Truchetet ME, Machelart I, et al. Respiratory infections associated with anti-TNF- α agents [J]. *Medecine et Maladies Infectieuses*, 2017, 47: 375-381.
- [34] Castellino FV, Varga J. Interstitial lung disease in connective tissue diseases: evolving concepts of pathogenesis and management [J]. *Arthritis Res Ther*, 2010, 12 (4): 213.
- [35] Huang Y, Lin WJ, Chen Z, et al. Effect of tumor necrosis factor inhibitors on interstitial lung disease in rheumatoid arthritis: angel or demon? [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 2111-2125.
- [36] Roubille C, Haraoui B. Interstitial lung diseases induced or exacerbated by DMARDs and biologic agents in rheumatoid arthritis: a systematic literature review [J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2014, 43 (5): 613-626.
- [37] Piga M, Chessa E, Ibba V, et al. Biologics-induced autoimmune renal disorders in chronic inflammatory rheumatic diseases: systematic literature review and analysis of a monocentric cohort [J]. *Autoimmun Rev*, 2014, 13 (8): 873-879.
- [38] Perez-Alvarez R, Pérez-De-Lis M, Ramos-Casals M. Biologics-induced autoimmune diseases [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2013, 25 (1): 56-64.
- [39] Funada M, Nawata M, Nawata A, et al. Rapidly progressive glomerulonephritis after introduction of certolizumab pegol: a case report [J]. *Mod Rheumatol Case Rep*, 2021, 5 (1): 11-15.
- [40] Hum RM, Kanigicherla DA, Ho P. Renal sarcoidosis associated with certolizumab pegol treatment for psoriatic arthritis [J]. *Oxf Med Case Reports*, 2022, 2022 (12): omac133.
- [41] Hwang SR, Sawatsky AP. A case of minimal change disease in a patient with rheumatoid arthritis treated with certolizumab [J]. *J Rheumatol*, 2019, 46 (12): 1647.
- [42] Toussirot E, Bernard C, Bossert M. Safety of the use of an-

- ti-IL17A treatment in a patient with certolizumab-induced sarcoidosis [J]. Clin Exp Rheumatol, 2019, 37 (2): 344-345.
- [43] Leong J, Fung-Liu B. A case report of nephrotic syndrome due to intake of certolizumab pegol in a patient with Crohn's disease [J]. Am J Gastroenterol, 2010, 105 (1): 234.
- [44] Butendieck JRRR, Bhattacharya T, Geiger X. Development of nephrotic syndrome in a patient with rheumatoid arthritis treated with certolizumab [J]. J Rheumatol, 2016, 43 (9): 1770-1772.
- [45] Ramos-Casals M, Perez-Alvarez R, Diaz-Lagares C, et al. Autoimmune diseases induced by biological agents: a double-edged sword? [J] Autoimmun Rev, 2010, 9 (3): 188-193.
- [46] Watts R, Clunie D, Hall F, et al. Oxford desk reference rheumatology [M]. Oxford: Oxford University Press, 2009, doi:10.1093/MED/9780199229994.001.0001.
- [47] Zhang Z, Fan W, Yang G, et al. Risk of tuberculosis in patients treated with TNF- α antagonists: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials [J]. BMJ Open, 2017, 7 (3): e012567.
- [48] Singh JA, Wells GA, Christensen R, et al. Adverse effects of biologics: a network meta-analysis and Cochrane overview [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2011, 2011 (2): CD008794.
- [49] Baysal M, Ümit Eg, Saritaş F, et al. Drug induced thrombotic microangiopathy with certolizumab pegol [J]. Balkan Med J, 2018, 35 (5): 398-399.
- [50] Calin R, Caumes E, Reibel F, et al. Severe glandular tularmia in a patient treated with anti-tumour necrosis factor for psoriatic arthritis [J]. Int J Infect Dis, 2017, 60: 1-3.
- [51] Moisseiev E, Shulman S. Certolizumab-induced uveitis: a case report and review of the literature [J]. Case Rep Ophthalmol, 2014, 5 (1): 54-59.
- [52] Napolitano M, Gallo L, Megna M, et al. Hypersensitivity reaction to certolizumab pegol in a patient affected by psoriatic arthritis [J]. Dermatol Ther, 2019, 32 (3): e12900.
- [53] Laniosz V, Torgerson RR, Ramos-Rodriguez AJ, et al. Incidence of squamous cell carcinoma in oral lichen planus: a 25-year population-based study [J]. Int J Dermatol, 2019, 58 (3): 296-301.

(收稿日期: 2024-08-09; 修回日期: 2024-10-02)

复方福尔可定致急性泛发性发疹性脓疱病 1 例

李嫦珍¹, 付志媛¹, 王小兵² (1. 江西省皮肤病专科医院, 南昌 330001; 2. 江西省皮肤病临床医学研究中心, 南昌 330001)

关键词: 复方福尔可定; 急性泛发性发疹性脓疱病; 不良反应

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2025)05-1492-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.05.049

1 病历资料

患者, 女性, 47 岁, 因“全身红斑伴痒 1 周、脓疱 4 d、发热 1 d”于 2023 年 1 月 26 日入院。2023 年 1 月 19 日因咳嗽自行购买复方福尔可定口服溶液 (南昌立健药业, 批号: K1221227, 规格: 每 1 mL 含福尔可定 1.0 mg, 盐酸曲普利啶 0.12 mg, 盐酸伪麻黄碱 3.0 mg, 愈创木酚甘油醚 10.0 mg, 海葱流浸膏 0.001 mL, 远志流浸膏 0.001 mL) 口服, 10 mL, 每日 3 次。2023 年 1 月 21 日患者腹部出现少量红斑, 伴痒, 其后皮疹迅速增多, 累及全身, 部分红斑融合成片。遂停用复方福尔可定口服溶液, 并于当地诊所按皮肤过敏予中药及自制药膏外涂及静脉滴注药物 (具体药物不详) 治疗, 疗效欠佳。2023 年 1

月 25 日, 患者腹部部分红斑表面出现散在针尖大小的脓疱, 其后红斑、脓疱仍不断增多, 自觉瘙痒剧烈, 体温持续升高, 最高温度 39℃ 左右, 遂至我院门诊就诊并收入皮肤内科住院。入院可见颈、腹、背部、腋窝、腹股沟红斑上可见密集分布的针尖至米粒大小的黄白色脓疱, 腹部部分皮疹表面可见少许糜烂面, 四肢广泛分布淡红色或暗红色斑疹、斑片 (见图 1)。门诊实验室检查: 白细胞 $19.85 \times 10^9 \cdot L^{-1} \uparrow$, 中性粒细胞计数 $17.53 \times 10^9 \cdot L^{-1} \uparrow$, 中性粒细胞百分比 88.20% $\uparrow$, 淋巴细胞百分比 7.40% $\downarrow$, C 反应蛋白 $60.15 \text{ mg} \cdot L^{-1} \uparrow$ 。考虑为药物引起的急性泛发性发疹性脓疱病 (acute generalized exanthematous pustulosis, AGEP)。

作者简介: 李嫦珍, 女, 主管药师, 主要从事临床药学方面的工作, email: lichangzhen8899@126.com



图 1 患者腹部红斑及脓疱 (A) 和下肢红斑及脓疱 (B) 图

入院后给予糖皮质激素注射用甲泼尼龙琥珀酸钠抗炎, 注射用硫代硫酸钠非特异性抗炎、抗过敏, 枸地氯雷他定片和苯磺贝他斯汀片抗组胺治疗, 蓝芩口服液清热利咽, 注射用哌拉西林钠他唑巴坦钠抗感染治疗。2023 年 1 月 27 日, 患者体温 37.3°C , 实验室检查: 谷丙转氨酶 $115\text{ U}\cdot\text{L}^{-1}\uparrow$, 谷草转氨酶 $70\text{ U}\cdot\text{L}^{-1}\uparrow$, 总胆红素 $32.3\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\uparrow$, 直接胆红素 $13.5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\uparrow$, 间接胆红素 $18.8\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\uparrow$, γ 谷氨酰转肽酶 $129\text{ U}\cdot\text{L}^{-1}\uparrow$, 总胆汁酸 $34.5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\uparrow$, 视黄醇结合蛋白 $13\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\downarrow$ 。患者肝酶明显升高, 加用双环醇片和多烯磷脂酰胆碱注射液护肝治疗。研究表明^[1-3], AGEP 可能导致肝功能异常以及白细胞和中性粒细胞数量的增加。患者胸部 CT 未见明显异常, 肾功能、心肌酶谱检测未见明显异常。2023 年 1 月 30 日完善病理活检, 组织病理表现 (见图 2): 角质层下及颗粒层见脓疱, 棘层轻度肥厚, 轻度海绵水肿, 真皮乳头部水肿, 浅层血管周围散在淋巴细胞、中性粒细胞浸润, 符合 AGEP。2023 年 1 月 31 日实验室检查: 白细胞 $34.65\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}\uparrow$, 中性粒细胞计数 $31.28\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}\uparrow$, 单核细胞计数 $1.15\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}\uparrow$, 中性粒细胞百分比 $90.30\%\uparrow$, 淋巴细胞百分比 $6.10\%\downarrow$, 嗜酸性粒细胞百分比 $0.30\%\downarrow$, 白细胞 (镜检) $35.00\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}\uparrow$, 中性粒细胞 (镜检) $90.0\%\uparrow$, 淋巴细胞 (镜检) $7.00\%\downarrow$, 嗜酸性粒细胞 (镜检) $0\%\downarrow$ 。白细胞计数报告危急值, 请临床药师会诊, 临床药师认为白细胞和中性粒细胞的升高除与 AGEP 和激素的使用相关外, 白细胞的异常升高很可能为注射用哌拉西林他唑巴坦导致病情加重的表现, 抗菌药物尤其是 β 内酰胺类为 AGEP 的常见诱发因素^[1-3], 建议立即停用注射用哌拉西林他唑巴坦, 医师接受建议并停用该药。2023 年 2 月 5 日患者好转出院, 带药曲安西龙片 28 mg 口服每日 1 次。苯磺贝他斯汀片 10 mg 口服每日 2 次。嘱患者避免使用复方福尔可定口服溶液及其结构类似物, 避免使用 β 内酰胺类抗菌药物如青霉素等。曲安西龙为糖皮质激素, 使用不规范时, 疾病易出现反跳或复发, 不能自行减量或停药, 应在医师或药师的指导下逐渐减量或停药。

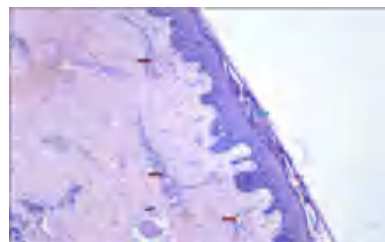


图 2 皮损组织病理图像 (蓝色箭头: 脓疱, 红色箭头: 淋巴细胞和中性粒细胞)

2 复方福尔可定致 AGEP 的关联性分析

根据国家药品不良反应监测中心因果关系评价方法, 对复方福尔可定口服溶液与其不良反应进行关联性评价, 结果为“很可能”, 具体分析如下: ① 瘙痒、脓疱等症状在使用复方福尔可定用药 2 d 之后出现, 显示出用药与不良反应之间存在合理的时间关联性。② 严重皮肤不良反应 (包括 AGEP) 为福尔可定说明书中已知的不良反应。③ 停用复方福尔可定并对症治疗后过敏症状逐渐消失。④ 入院前未服用其他药物, 且不能用其他疾病因素解释 AGEP。根据诺氏 (Naranjo's) 评估量表判断标准^[4], 总分为 6 分, 见表 1, 由此表明复方福尔可定口服溶液致 AGEP 的关联性评价为“很可能”。综合以上两种评价判定结果, 该患者 AGEP 很可能由复方福尔可定口服溶液引起。

表 1 Naranjo's 不良反应量表得分情况

相关问题	结果	分值
1. 该 ADR 先前是否有结论性报告?	否	0
2. 该 ADR 是否是在使用可疑药物后发生的?	是	2
3. 该 ADR 是否在停药或应用拮抗剂后得到缓解?	是	1
4. 该 ADR 是否在再次使用可疑药物后重复出现的?	未知	0
5. 是否存在其他原因能单独引起该 ADR?	否	2
6. 该 ADR 是否在应用安慰剂后重复出现的?	未知	0
7. 药物在血液或其他体液中是否达到毒性浓度?	未知	0
8. 该 ADR 是否随剂量增加而加重, 或随剂量减少	未知	0
9. 患者是否曾暴露于同种药物或同类药物并出现过类似反应?	否	0
10. 是否存在客观证据证实该反应?	是	1
总分		6

注: Naranjo's 评分 ≥ 9 分, 肯定; $5\sim 8$ 分, 很可能; $1\sim 4$ 分, 可能; ≤ 0 分, 可疑。

3 讨论

AGEP 又称为泛发性脓疱型药疹^[5], 是一种严重的皮肤不良反应, 其特征是在红斑基部出现非毛囊性无菌脓包。临床表现以红斑基础上成片出现的针尖大小无菌脓疱及发热等全身症状为特征, 具有自限性, 病程较短, 预后良好。鉴别诊断需排除泛发性脓疱型银屑病 (GPP) 和角质下脓疱病等其他无菌性脓疱病。脓疱型银屑病患者既往常有寻常型银屑病病史, 且伴反复发作, 瘙痒不明显, 组织病理学表现为银屑病样增生伴角

化不全,棘层上部可见 Kogoj 海绵状脓肿。角层下脓疱病则表现为红斑基础上的脓疱,好发于腋下、腹股沟等身体褶皱处,脓疱上清下浊,呈玄月状,吸收或破裂后留下浅表薄痂和叶状鳞屑,组织病理示角层下脓疱。

国外研究揭示,AGEP 发病存在显著性别差异,女性更多见^[6]。药物尤其是抗菌药物,是引发 AGEP 的最常见病因。患者通常在服用致病药物后 48 h 内会出现急性发热和脓疱病,并伴有白细胞增多。严重情况下,可能会出现黏膜和全身器官受累^[7-9]。尽管 AGEP 的发病机制尚不完全清楚,但普遍认为它是一种 T 细胞介导的迟发性超敏反应。当机体暴露于病原体后,抗原呈递细胞会利用组织相容性复合体(MHC)分子呈递同源抗原,从而激活特定的 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞,这些激活的 T 细胞(称为药物特异性 T 细胞)增殖并迁移至真皮和表皮。特异性 CD8⁺T 细胞利用穿孔素/颗粒酶 B 和 Fas 配体途径,诱导表皮内角质形成细胞凋亡、组织破坏和表皮囊泡形成^[10-11]。此外,国外研究还高度提示白细胞介素-36 受体拮抗剂(IL-36RN)基因突变可能参与 AGEP 的发病^[12]。

复方福尔可定口服溶液为含福尔可定、盐酸曲普利啶等成分的阿片类药物镇咳药,目前国内尚未见其引起 AGEP 的报道。但临床诊疗工作中使用该药时应引起警惕,特别是对于已被诊断为 AGEP 或有此病史的患者。一旦确诊为 AGEP,应停用致病药物,并予对症和支持治疗,包括局部类固醇、退热药和抗组胺药等。对于严重或难治性 AGEP 病例,全身使用类固醇或环孢素可能会有所帮助^[13]。此外,医师应密切监控患者病情及实验室指标,避免使用抗菌药物,除非发生脓疱的重复感染^[11]。同时,临床药师与医师应密切协作,共同制订合理用药方案,以减少不必要的药物使用。

参考文献

- [1] 沈敏,陈中建,朱全刚,等. 25 例急性泛发性发疹性脓疱病的临床分析[J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39 (8): 848-850, 856.
- [2] 周娜,高婷婷,周小勇,等. 45 例药物致急性泛发性发疹性脓疱病特征分析[J]. 医药导报, 2023, 42 (2): 268-270.
- [3] 霍佳,张鼎伟,郭坤,等. 急性泛发性发疹性脓疱病 11 例临床回顾性分析[J]. 临床皮肤科杂志, 2019, 48 (9): 569-571.
- [4] 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.
- [5] 赵辩. 中国临床皮肤病学[M]. 2 版. 南京: 江苏科学技术出版社, 2017: 758.
- [6] 王平,谢婷,范瑞强,等. 急性泛发性发疹性脓疱病 1 例[J]. 临床皮肤科杂志, 2020, 49 (9): 549-551.
- [7] Sztatowski J, Schwartz RA. Acute generalized exanthematous pustulosis (AGEP): a review and update [J]. J Am Acad Dermatol, 2015, 73 (5): 843-848.
- [8] 何永萍,汪盛. 急性泛发性发疹性脓疱病研究进展[J]. 中国皮肤性病杂志, 2018, 32 (12): 1464-1468.
- [9] 龚文俊,边原. 独一味胶囊致急性泛发性发疹性脓疱病 1 例[J]. 医药导报, 2023, 42 (5): 762-764.
- [10] Stadler PC, Oschmann A, Kerl-French K, et al. Acute generalized exanthematous pustulosis: clinical characteristics, pathogenesis, and management [J]. Dermatology, 2023, 239 (3): 328-333.
- [11] Parisi R, Shah H, Navarini AA, et al. Acute generalized exanthematous pustulosis: clinical features, differential diagnosis, and management [J]. Am J Clin Dermatol, 2023, 24 (4): 557-575.
- [12] Gabay C, Towne J. Regulation and function of interleukin-36cytokines in homeostasis and pathological conditions [J]. Leukoc Biol, 2015, 97 (4): 645-652.
- [13] Moore MJ, Sathe NC, Ganipiseti VM. Acute generalized exanthematous pustulosis [Z/OL]. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; May 3, 2023.

(收稿日期: 2024-09-10; 修回日期: 2024-11-02)



科技期刊世界影响力指数 (WJCI) 报告 (2024)

收录证书



This is certificate for

中南药学

(ISSN 1672-2981 CN 43-1408/R)

to be indexed in

*World Journal Clout Index(WJCI) Report of
Scientific and Technological
Periodicals(2024)*



项目联合研发单位 Project research units:

中国科学技术信息研究所 Institute of Scientific and Technical Information of China

《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司 Chinese Academic Journal(CD Edition)

Electronic Publishing House Co.Ltd

清华大学图书馆 Library of Tsinghua University

万方数据有限公司 Wanfang Data Co.Ltd

中国高校科技期刊研究会 Society of China University Journals

中国科学技术期刊编辑学会 China Editology Society of Science Periodicals

DMT 7500 二维液相色谱微型质谱仪

血药浓度利器 门诊化床旁化质谱系统

可移动至临床科室

反应速度快，工作曲线长期稳定

极简样品处理

湖南德米特仪器有限公司成立于2014年12月，是一家致力于自动化色谱与质谱生产、二维色谱柱体系研制、生物测定方法提供以及临床药物检测整体化方案设计的高新技术企业。公司历经数年研发，掌握色谱与质谱控制性技术，持续进行尖端临床色谱质谱技术研制。

DMT 7500 拥有高稳定的质谱分析能力，测定种类含括 250 多种药物；并具备仪器、色谱柱、试剂、质控完整的医械与 IVD 资质，符合我国 2018 年颁布的《医疗器械分类目录》中的要求。

DMT 7500 微型化机身对实验室占地更加友好，移动式机身让床旁化快速测定成为可能；DMT 7500 具备 30min 冷开机发放首报告的快速反应能力，是门急诊 TDM 项目开展的首选利器！

- ||| 关键流动相产品标准化
- ||| 质量体系：质控校准品溯源体系标准化
- ||| 高端自动化技术
- ||| 高效能测定能力
- ||| 床旁化测定技术
- ||| 专利核心技术
- ||| 全面合规产品系统



Demeter 德米特®

湘械广审(文)第260202-23163号
官方网站: <https://www.hndemeter.com>
服务热线: 4000-176-898 董经理: 137-8718-7146
电子邮箱: market@anax.com.cn
版本号: 2024.05.06



德米特公众号