



# 中南药 学

## ZHONGNAN YAOXUE

月刊 2003 年 4 月创刊 第 23 卷 第 6 期 (总第 233 期) 2025 年 6 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](mailto: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

- (1495) 蟛蜞菊内酯调控巨噬细胞极化改善脓毒血症小鼠急性肝损伤机制研究 ..... 陈锦仪, 黄少杰, 陈海霞, 等
- (1502) 荧光偏振法探究金匱肾气丸“阴中求阳”理论的科学内涵 ..... 孟晶莹, 贡怡晴, 邬瑞光, 等
- (1508) 桃儿七根茎和果实对二甲苯致小鼠耳肿胀的抗炎作用及机制的比较 ..... 晁文华, 谭翠翠, 张波, 等
- (1517) 新型 EGFR 小分子抑制剂的设计、合成及生物活性评价 ..... 祁宇, 白海云
- (1524) 芹菜素对苯并芘激活的 AhR-CYP 信号通路的影响 ..... 张文娟, 刘婷婷, 吕晓丽, 等
- (1530) 特异性靶向 MUC18 的全人抗体偶联药物的发现和表征 ..... 周雨昕, 黄火英, 尚诚彰, 等
- (1539) 基于深度学习、分子对接及分子动力学模拟的中药 DPP4 抑制剂虚拟筛选 ..... 甘鉴文, 刘嵩, 赵光年
- (1547) 基于计算机辅助水解的薏苡肽类血管紧张素 II 1 型受体拮抗活性预测及功能评价 ..... 郭嵩然, 乔连生, 褚辉程, 等
- (1554) 基于网络药理学及体内实验探讨桂枝附子汤对痛风性关节炎模型大鼠的作用机制 ..... 黄小尧, 刘燕君, 王彦顺, 等
- (1563) 2-氨基-1, 3-二羟基正十八烷的合成工艺研究 ..... 杨静, 张苗, 徐虹, 等
- (1568) 血小板反应蛋白 2 调控骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的研究 ..... 陈文婕, 陈雲, 王娇娇, 等
- (1575) 基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS、网络药理学及实验验证探讨肝纯片治疗非酒精性脂肪性肝病的作用机制 ..... 程小英, 詹扬, 张静文, 等
- (1584) HPLC-Q-Exactive-MS/MS 快速鉴定三子散在体外人工胃液、肠液中代谢转化研究 ..... 夏慧敏, 孙丽君, 何春龙, 等
- (1591) 基于非靶向代谢组学和生物活性对比的铁笛润喉丸提取工艺优化 ..... 王孝清, 王义坤, 陈镇, 等
- (1600) 蜜环菌与天麻伴生过程中病害细菌的分离鉴定 ..... 欧小宏, 徐娇, 袁青松, 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 龙明辉 娄月芬 卢海儒  
鲁 虹 罗 聪 麻兵继 马恩龙  
梅升辉 蒙光义 欧阳波 彭向东  
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

- (1606) 宁夏枸杞内生真菌 *Fusarium acutatum* 中甾醇类化学成分研究  
..... 邓宁, 刘俊梅, 吴佳妮, 等
- (1612) 玉屏风及其拆方对香烟烟雾联合脂多糖诱导的慢性阻塞性肺疾病  
大鼠及 A549 细胞 P1TP $\beta$  表达的影响  
..... 王海玲, 许文雅, 孙艳, 等
- (1621) 雷美替胺舌下喷雾剂的制备及其药代动力学研究  
..... 刘协鸿, 陈善清, 韦先铭, 等
- (1627) 基于 p38 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路探讨陈元膏摩法治疗膝骨性关节炎  
的作用机制  
..... 牙库甫·亚森, 王月媛, 古来撒尔·艾克拜尔, 等
- (1635) 血府逐瘀汤对胃食管反流病气滞血瘀证模型大鼠的干预效应及对  
自主神经功能的影响 ..... 施妙璇, 张海洋, 韩美奕, 等
- (1641) 淫羊藿苷对 BaP 所致 HepG2 细胞脂质代谢紊乱的保护作用  
..... 汪涵, 张梦迪, 白图雅, 等
- (1646) BCL-2 家族抑制剂联合伊布替尼克服弥漫性大 B 细胞淋巴瘤伊布  
替尼获得性耐药的效应及机制研究 ..... 王心悦, 楼洋, 苏明波
- (1653) 羊角棉枝叶的化学成分研究 ..... 秦文秀, 于硕, 李畅, 等
- (1658) 钽基金属有机凝胶的电化学发光及其在中药材铜离子检测中的应  
用研究 ..... 胡晓蝶, 王雅迪, 李慧萧, 等
- (1664) 薏苡附子败酱散对肝癌术后复发模型的影响及机制研究  
..... 李倩薇, 宋亚刚, 王欣, 等
- (1672) 基于 AHP-CRITIC 混合加权法优化芪红浓缩丸成型工艺研究  
..... 李爽, 毛艳, 程江南, 等
- (1678) 热孜亚纳消炎颗粒提取工艺优选及抗前列腺炎药效学研究  
..... 汗佐热木·卡地尔, 何承辉, 帕依曼·亥米提
- (1684) 不同基原黄精乙醇提取物的抑菌活性研究  
..... 王洁, 李道远, 陈乃富, 等
- (1692) 消癥液治疗盆腔炎性疾病后遗症模型大鼠的药效及作用机制研究  
..... 刘震, 马筠程, 王宇禧, 等
- (1698) 复方扶芳藤胶囊高效液相色谱指纹图谱及 5 种成分含量测定研究  
..... 覃明雄, 陈晓艺, 李芳婵, 等
- (1704) 基于转录组学技术探究对羟基苯甲醇对斑马鱼胚胎生长发育的影  
响及作用机制 ..... 朱澳华, 王平, 夏婧, 等
- (1711) 伏硫西汀树脂复合物制备及载药机制研究  
..... 张贤梅, 李聪慧, 王增明, 等

## 综述

- (1719) 巨噬细胞外泌体在器官纤维化中的调控作用及其工程化应用研究  
进展 ..... 鄢钦文, 胡雨瞳, 汤洋, 等
- (1726) 油橄榄叶化学成分和药理作用的研究进展及其质量标志物的预测  
分析 ..... 吴未姣, 葛晶鑫, 杨艳芳, 等

肖轶雯 谢 诚 徐必学 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 章越凡 赵 娣 赵立波  
赵 亮 赵龙山 赵 昕 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 周凌云  
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。

- (1735) 腺相关病毒载体药物非临床生物分布研究的设计要点  
..... 黄芯玉, 汪宁, 杨欢, 等
- (1742) 三维芳香性的碳硼烷在药理作用方面的研究进展  
..... 卓周萍, 周心怡, 姚坤, 等
- (1750) 无定形固体分散体技术在贴剂中的处方工艺探讨与应用  
..... 林嘉宁, 侯志远, 丁劲松
- (1758) 肾可清除纳米载体在肿瘤诊断与治疗中的应用研究进展  
..... 张亚东, 于凌波, 许瑞, 等
- (1765) 真菌组蛋白去乙酰化酶 Set3 及其复合物生物学功能和机制的研究进展  
..... 施乔, 李超陈, 冯茜元, 等
- (1771) 瑞美吉泮在神经性疼痛疾病中的药理作用研究进展  
..... 王珊珊, 章越凡, 范超云, 等
- (1774) 纳米技术在体外膜氧合抗凝管理中的应用  
..... 周培根, 欧好
- (1780) 慢性难愈合创面的药物治疗研究进展  
..... 林书俊, 魏泽泽, 程丽源, 等

## 临床药师在临床

- (1786) 1 例围产期首发精神分裂症患者的用药分析及监护  
..... 杨燕, 龚尧, 刘哲宇, 等

## 中药与临床

- (1790) 周乃玉教授治疗风湿病中“通”药的临床运用探讨  
..... 吴心玥, 张秦

## 医院药学

- (1794) 临床药师干预对 ICU 处方环节用药错误的影响  
..... 陈凡, 胡述立, 刘杨从, 等
- (1798) 基于中国医院药物警戒系统评价甲氨蝶呤治疗类风湿关节炎的安全性  
..... 苏桂玉, 蔡丽萍, 韩一波, 等
- (1805) 干细胞治疗脑卒中首次人体试验的主要风险因素及管理策略  
..... 李丹, 管志美, 杨泽华, 等
- (1812) 欧洲人群阿司匹林与鳞状细胞肺癌的因果关联：一项两样本孟德尔随机化研究  
..... 刘丽艳, 孙传铎, 余克富, 等

[ 本刊基本参数 ] CN43-1408/R\*2003\*m\*A4\*322\*zh\*P\*30.0\*700\*48\*2025-6

本期责任编辑：陆窃窃, 彭金飞, 郭志娟, 李科

英文编辑：周静

# CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 23, Number 6 June 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](mailto: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

- (1495) Effect of macrophage polarization regulated by wedelolactone on acute liver injury in mice with sepsis  
..... CHEN Jin-yi, HUANG Shao-jie, CHEN Hai-xia, et al
- (1502) Mechanism of reinforcing *Yang* from *Yin* theory in Jinkui Shenqi pills and their decomposed recipes by fluorescence polarization  
..... MENG Jing-ying, GONG Yi-qing, WU Rui-guang, et al
- (1508) Anti-inflammatory effect and mechanism of rhizomes and fruits of *Sinopodophyllum hexandrum* on xylene-induced ear edema in mice  
..... CHAO Wen-hua, TAN Cui-cui, ZHANG Bo, et al
- (1517) Design, synthesis, and evaluation of biological activity of novel EGFR inhibitors  
..... QI Yu, BAI Hai-yun
- (1524) Effect of apigenin on benzo[a]pyrene-activated AhR-CYP signaling pathway  
..... ZHANG Wen-juan, LIU Ting-ting, LYU Xiao-li, et al
- (1530) Discovery and characterization of fully humanized antibody-drug conjugate specifically targeting MUC18  
..... ZHOU Yu-xin, HUANG Huo-ying, SHANG Cheng-zhang, et al
- (1539) Virtual screening of DPP4 inhibitors from traditional Chinese medicine based on deep learning, molecular docking, and molecular dynamics simulation  
..... GAN Jian-wen, LIU Song, ZHAO Guang-nian
- (1547) Prediction and function evaluation of AT1R biopeptides antagonists from *Coix lacryma-jobi* based on in silico proteolysis  
..... GUO Song-ran, QIAO Lian-sheng, CHU Hui-cheng, et al
- (1555) Mechanism of Guizhi Fuzi decoction in gouty arthritis model rats based on network pharmacology and in vivo experiments  
..... HUANG Xiao-yao, LIU Yan-jun, WANG Yan-shun, et al
- (1563) Synthesis of 2-aminooctadecane-1, 3-diol  
..... YANG Jing, ZHANG Miao, XU Hong, et al
- (1568) Thrombospondin-2 regulates the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into osteoblasts  
..... CHEN Wen-jie, CHEN Yun, WANG Jiao-jiao, et al
- (1575) Mechanism of action of Ganchun tablets for nonalcoholic fatty liver disease based on UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS, network pharmacology and experiment validation  
..... CHENG Xiao-ying, ZHAN Yang, ZHANG Jing-wen, et al
- (1584) Rapid identification of in vitro metabolic transformation of Sanzi powder in artificial gastric juice and intestinal fluid by HPLC-Q-Exactive-MS/MS  
..... XIA Hui-min, SUN Li-jun, HE Chun-long, 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.

- (1591) Preparation optimization of Tiedi Runhou pills based on non-targeted metabolomics and biological activity  
..... WANG Xiao-qing, WANG Yi-kun, CHEN Zhen, et al
- (1600) Isolation and identification of pathogenic bacteria in *Armillaria gallica* and *Gastrodia elata*..... OU Xiao-hong, XU Jiao, YUAN Qing-song, et al
- (1607) Sterol constituents of the endophytic fungus *Fusarium acutatum* isolated from *Lycium chinense* Miller  
..... DENG Ning, LIU Jun-mei, WU Jia-ni, et al
- (1612) Effect of Yupingfeng and its disassembled formulas on the expression of P1TP $\beta$  in rats and A549 cells with chronic obstructive pulmonary disease induced by cigarette smoke combined with lipopolysaccharide  
..... WANG Hai-ling, XU Wen-ya, SUN Yan, et al
- (1621) Preparation and pharmacokinetics of ramelteon sublingual spray  
..... LIU Xie-hong, CHEN Shan-qing, WEI Xian-ming, et al
- (1627) Mechanism of Chenyuan ointment massage for knee osteoarthritis based on p38 MAPK/NF- $\kappa$ B signalling pathway  
..... Yakufu Yasen, WANG Yue-yuan, Gulaisaer Aikebaier, et al
- (1635) Intervention of Xuefu Zhuyu decoction on rat model of gastroesophageal reflux disease with Qi stagnation and blood stasis and its effect on autonomic function  
..... SHI Miao-xuan, ZHANG Hai-yang, HAN Mei-yi, et al
- (1641) Protective effect of icariin on benzo[a]pyrene-induced lipid metabolism disorders in HepG2 cells  
..... WANG Han, ZHANG Meng-di, BAI Tu-ya, et al
- (1646) Combination of ibrutinib with BCL-2 family inhibitors synergistically overcomes acquired resistance to ibrutinib in diffuse large B-cell lymphoma  
..... WANG Xin-yue, LOU Yang, SU Ming-bo
- (1653) Chemical constituents in the twigs and leaves of *Alstonia mairei* Lévl.  
..... QIN Wen-xiu, YU Shuo, LI Chang, et al
- (1659) Electrochemiluminescence of terbium-based metal-organic gels in the detection of copper ions in traditional Chinese medicine  
..... HU Xiao-die, WANG Ya-di, LI Hui-xiao, et al
- (1664) Effect and mechanism of Yiyi Fuzi Baijiang powder on the postoperative recurrence model of hepatocellular carcinoma  
..... LI Qian-wei, SONG Ya-gang, WANG Xin, et al
- (1672) Optimization of molding of Qihong concentrated pills based on AHP-CRITIC mixed weighting method  
..... LI Shuang, MAO Yan, CHENG Jiang-nan, et al
- (1678) Optimization of extraction of Reziyana anti-inflammatory granules and anti-prostatitis pharmacodynamics  
..... Hanzuoremu Kadier, HE Cheng-hui, Payiman Haimiti
- (1684) Antibacterial activity of ethanol extracts from different sources of *Polygonatum*..... WANG Jie, LI Dao-yuan, CHEN Nai-fu, et al
- (1692) Efficacy and mechanism of Xiaozheng liquid for sequelae of pelvic inflammatory disease in a rat model  
..... LIU Zhen, MA Yun-cheng, WANG Yu-xi, et al
- (1698) HPLC fingerprints of compound Fufangteng capsules and simultaneous determination of 5 components  
..... QIN Ming-xiong, CHEN Xiao-yi, LI Fang-chan, et al

- (1704) Effect and mechanism of *p*-hydroxybenzyl alcohol on the growth and development of zebrafish embryos by transcriptomics  
..... ZHU Ao-hua, WANG Ping, XIA Jing, et al
- (1711) Preparation and drug loading mechanism of vortioxetine-resin complexes  
.....ZHANG Xian-mei, LI Cong-hui, WANG Zeng-ming, et al
- (1719) Regulatory role of macrophage exosomes in organ fibrosis and engineering application .....YAN Qin-wen, HU Yu-tong, TANG Yang, et al
- (1726) Chemical compositions and pharmacological effect of *olea europaea* leaves and prediction of quality markers  
..... WU Mo-jiao, GE Jing-xin, YANG Yan-fang, et al
- (1735) Key considerations for non-clinical biodistribution of adeno-associated virus vector drugs  
..... HUANG Xin-yu, WANG Ning, YANG Huan, et al
- (1742) Progress in pharmacological action of three-dimensional aromatic carbaboranes ..... ZHUO Zhou-ping, ZHOU Xin-yi, YAO Kun, et al
- (1750) Role of amorphous solid dispersion in the preparation of patches  
..... LIN Jia-ning, HOU Zhi-yuan, DING Jin-song
- (1758) Advances of renal clearable nanocarriers in tumour diagnosis and therapy  
..... ZHANG Ya-dong, YU Ling-bo, XU Rui, et al
- (1765) Biological functions and mechanism of fungal histone deacetylase Set3 and its complex ..... SHI Qiao, LI Chao-chen, FENG Qian-yuan, et al
- (1771) Progress in the pharmacological effect of rimegepant on pain disorders  
..... WANG Shan-shan, ZHANG Yue-fan, FAN Chao-yun, et al
- (1774) Nanotechnology in extracorporeal membrane oxygenation anticoagulants  
.....ZHOU Pei-gen, OU Hao
- (1780) Progress in drug therapy for chronic refractory wounds  
.....LIN Shu-jun, WEI Ze-ze, CHENG Li-yuan, et al
- (1794) Effect of pharmacist intervention on medication errors in prescriptions in the intensive care unit  
..... CHEN Fan, HU Shu-li, LIU Yang-cong, et al
- (1798) Safety evaluation of methotrexate in rheumatoid arthritis based on China Hospital Pharmacovigilance System  
..... SU Gui-yu, CAI Li-ping, HAN Yi-bo, et al
- (1805) Risk factors and management strategies in the first human trial of stem cell therapy for stroke  
..... LI Dan, GUAN Zhi-mei, YANG Ze-hua, et al
- (1812) Causal association between aspirin and squamous cell lung cancer: a two-sample Mendelian randomization study in European population  
.....LIU Li-yan, SUN Chuan-duo, YU Ke-fu, et al

## 研究论文

# 螞蟥菊内酯调控巨噬细胞极化改善脓毒血症小鼠急性肝损伤机制研究

陈锦仪<sup>1</sup>, 黄少杰<sup>2</sup>, 陈海霞<sup>1</sup>, 李旺廷<sup>1</sup>, 白敏<sup>1</sup>, 陈悦<sup>1</sup>, 段佳林<sup>2</sup>, 王婧雯<sup>1, 2\*</sup> (1. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 空军军医大学西京医院药剂科, 西安 710032)

**摘要:** **目的** 探讨螞蟥菊内酯通过调控巨噬细胞极化缓解脂多糖 (LPS) 诱导的脓毒血症小鼠急性肝损伤的机制研究。**方法** 将 60 只 BALB/c 小鼠随机分 6 组: 空白组, 模型组, 螞蟥菊内酯低、中、高剂量组 (50、100、200 mg · kg<sup>-1</sup>), 联苯双酯组, 每组 10 只, 灌胃 7 d, 空白组与模型组灌胃等量生理盐水。末次给药 2 h 后, 除空白组外各组均腹腔注射 LPS (10 mg · kg<sup>-1</sup>) 建立脓毒血症模型, 造模 16 h 后处死小鼠获取血液与肝脏组织。生化试剂盒检测血清中谷草转氨酶 (AST) 和谷丙转氨酶 (ALT) 活力, 酶联免疫吸附 (ELISA) 法检测血清中白细胞介素 6 (IL-6)、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 炎症因子水平; HE 染色观察肝组织病变程度; 组织免疫荧光法检测肝巨噬细胞极化标志物分化簇 86 (CD86) 与甘露糖受体 (CD206) 表达情况; Western blot 法检测肝组织中一氧化氮合酶 (iNOS)、精氨酸酶 1 (Arg-1) 以及 PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B 信号通路蛋白表达情况。**结果** 中、高剂量的螞蟥菊内酯可改善 LPS 诱导的小鼠肝细胞坏死, 炎性细胞浸润现象; 有效降低血清转氨酶活力异常, 改善血清中 IL-6、TNF- $\alpha$  炎症因子水平 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ), 抑制 M1 型标志物 CD86、iNOS 蛋白表达 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ), 抑制 PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B 信号通路蛋白表达 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ), 增加 M2 型标志物 CD206, Arg-1 蛋白表达 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )。**结论** 螞蟥菊内酯可能通过抑制 PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B 信号通路诱导肝巨噬细胞 M2 型极化, 减轻炎症反应, 进而对 LPS 诱导的脓毒血症小鼠急性肝损伤起到治疗作用。

**关键词:** 螞蟥菊内酯; 巨噬细胞; 极化; M1/M2; 急性肝损伤

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)06-1495-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.001

## Effect of macrophage polarization regulated by wedelolactone on acute liver injury in mice with sepsis

CHEN Jin-yi<sup>1</sup>, HUANG Shao-jie<sup>2</sup>, CHEN Hai-xia<sup>1</sup>, LI Wang-ting<sup>1</sup>, BAI Min<sup>1</sup>, CHEN Yue<sup>1</sup>, DUAN Jia-lin<sup>2</sup>, WANG Jing-wen<sup>1, 2\*</sup> (1. School of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712046; 2. Department of Pharmacy, Xijing Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032)

**Abstract: Objective** To determine the mechanism of wedelolactone in alleviating acute liver injury induced by lipopolysaccharide (LPS) in mice with sepsis by regulating the polarization of macrophages. **Methods** Totally 60 BALB/c mice were randomly divided into 6 groups: a blank group, a model group, wedelolactone low, medium and high dose groups (50, 100, and 200 mg · kg<sup>-1</sup>), and a bifendate group (10 in each group). The blank group and the model group were intragastrically given the same amount of saline for 7 days. Two hours after the last administration, all groups except the blank group were intraperitoneally injected with LPS

**基金项目:** 国家自然科学基金面上项目 (No. 81774190); 空军军医大学临床医学与药学研究中心项目 (No. LHJJ2024-YX03)。

**作者简介:** 陈锦仪, 男, 硕士研究生, 主要从事中药药效物质基础研究, email: 1016042455@qq.com \* **通信作者:** 王婧雯, 女, 主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事中药药理学与临床药学研究, email: wangjingwen8021@163.com

( $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) to establish the sepsis model. The mice were sacrificed after modeling 16 h to collect the blood and liver tissue. The serum glutamic oxalic aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities were detected by biochemical kit, and the serum levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) inflammatory factors were detected by ELISA. The degree of liver lesion was detected by HE staining. The expression of polarization markers CD86 and CD206 in the liver macrophages was detected by tissue immunofluorescence assay. The expression of nitric oxide synthase (iNOS), arginase-1 (Arg-1) and PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B signaling pathway in the liver tissues was detected by Western blot. **Results** Medium and high dose groups wedelolactone improved LPS-induced hepatocyte necrosis and inflammatory cell infiltration in mice. It effectively reduced the abnormal activity of serum transaminase, improved the levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  inflammatory factors in the serum ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ), inhibited the expression of M1 marker CD86 and iNOS protein ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ), and also inhibited the protein expression of PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B signaling pathway ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ). While the expression of M2 marker CD206 and Arg-1 protein was increased ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ). **Conclusion** Wedelolactone may induce M2 polarization of liver macrophages by inhibiting PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B signaling pathway, to reduce inflammatory response and treat LPS-induced acute liver injury in sepsis mice.

**Key words:** wedelolactone; macrophage; polarization; M1/M2; acute liver injury

脓毒血症 (sepsis) 是由感染引起的全身性炎症反应综合征 (systemic inflammatory response syndrome, SIRS), 是宿主对病原体的异常免疫反应所致, 临床上属于危重症<sup>[1]</sup>。脓毒血症的核心特征包括炎症反应失衡、免疫失调以及代谢重构。其发病快速且隐匿, 早期表现高热、心动过速, 严重者可迅速发展为败血性休克和多器官功能障碍综合征, 发生多器官功能性障碍是其临床表现之一, 其中肝脏是易感靶器官<sup>[2]</sup>, 根据严重程度不同表现为代谢紊乱、凝血功能障碍、黄疸和胆汁淤积等损害。根据世界卫生组织的统计, 每年全球约有超过 3000 万人因脓毒血症而入院治疗, 其中约有 600 万人死于脓毒血症<sup>[3]</sup>。有研究表明, 巨噬细胞极化平衡 (macrophage polarization balance, MPB) 是脓毒血症肝损伤的重要病理机制。MPB 本身是一种动态调控机制, 指巨噬细胞在不同微环境刺激下向 M1 型 (促炎型) 或 M2 型 (抗炎型) 状态转变的过程<sup>[4]</sup>。其核心由多种信号途径偶联调控, 包括 PI3K/AKT、NF- $\kappa$ B、JAK/STAT 和 MAPK 信号通路, 调控下游信号分子介导生理病理活动<sup>[5]</sup>。MPB 影响着免疫系统的稳定, 而 MPB 失衡是多种炎症性、免疫性及纤维化性疾病的重要病理机制, 因此调控 MPB 或将为有效改善免疫类疾病提供治疗新思路。

近年来, 临床上多用抗菌药物治疗, 但存在耐药性增加, 治疗效果限制, 抑制免疫系统易发生二次感染等多种缺点。大量研究发现, 中药天然成分作为一种传统的治疗手段, 对于脓毒血症肝损伤

有良好的改善与防治作用, 尤其在免疫调节、抗炎、抗氧化和促进组织修复方面显示出潜力, 如桔梗多糖、小檗碱、薤白皂苷等<sup>[6-7]</sup>。香豆素类化合物具有多靶点作用, 具备抗炎、抗氧化、免疫调节等药理特性, 能够调节巨噬细胞极化、改善慢性炎症、抗肿瘤, 并在多种疾病治疗中展现出潜在应用价值。蟛蜞菊内酯 (wedelolactone, WED) 是传统中药墨旱莲有效药用成分, 具有较好的抗炎、抗氧化、免疫调节和肝脏保护等药理作用<sup>[8]</sup>, 现代药物研究中发现其对急性肝损伤具有较好的保护作用<sup>[9]</sup>, 但其具体作用机制尚不明确。本研究基于巨噬细胞极化与脓毒血症肝损伤相关的信号通路, 通过脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 诱导小鼠模拟脓毒血症肝损伤进行药效学评价与分子调控机制研究, 探究蟛蜞菊内酯改善脓毒血症肝损伤的免疫调节机制, 为墨旱莲的开发利用提供参考依据。

## 1 材料

### 1.1 动物

雄性 BALB/c 小鼠 [体重 ( $20 \pm 2$ ) g] 60 只, 由中国人民解放军空军军医大学实验动物中心提供 [SCXX (陕) 2024-001]。小鼠在实验前适应性喂养一周, 饲养环境为 SPF 级动物房, 控制温度为 ( $22 \pm 2$ )  $^{\circ}\text{C}$ , 湿度为 55%~75%, 光照 12 h 明/暗循环等条件。所有动物遵循实验动物伦理相关规定, 并经空军军医大学动物实验伦理审查通过。

### 1.2 试剂

蟛蜞菊内酯 (批号: 22031407, 成都普菲德生物科技有限公司), LPS (美国 Sigma 公司, 编号: 297-



473-0), 联苯双酯(北京协和制药厂), 谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号分别为: 20240509, 20230506), 肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 6(IL-6)试剂盒(Proteintech 生物技术有限公司, 批号分别为: 20240608, 20240610), 精氨酸酶 1(Arg-1)、PI3K、AKT、p-AKT、p-NF- $\kappa$ B p65 抗体(Proteintech 生物技术有限公司), 一氧化氮合酶(iNOS)、p-PI3K 抗体(Affinity 生物研究中心有限公司), F4/80、分化簇 86(CD86)与甘露糖受体(CD206)抗体(武汉赛维尔生物科技有限公司), NF- $\kappa$ B p65 抗体(CST 公司), 抗兔免疫球蛋白 G、抗小鼠免疫球蛋白 G(西安壮志生物技术有限公司)。

### 1.3 仪器

MULTISKAN GO 型全自动酶标仪、冰冻切片机(美国 Thermo 公司), 低温高速离心机(德国 EPPENDORF 公司), CHEMIDOC 化学发光成像系统、23758# 电泳系统(美国 Bio-Rad 公司), 病理组织切片机(上海徠卡仪器有限公司), 组织摊片机(浙江金华市科迪仪器设备有限公司), 超纯水机(美国 CASCADA 公司), 制冰机(常熟雪科制冷设备有限公司), 涡旋振荡器(海门其林贝尔仪器制造有限公司), 转移脱色摇床(上海予腾生物科技有限公司), 激光共聚焦显微镜(日本尼康)。

## 2 方法

### 2.1 实验动物分组造模与给药

动物适应性喂养一周后, 将小鼠随机平均分为 6 组, 每组 10 只: 空白组, 模型组, 蟛蜞菊内酯低、中、高剂量组(50、100、200 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ ), 阳性药组[联苯双酯 150 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ ]。用药组分别以不同质量浓度的蟛蜞菊内酯与联苯双酯对小鼠进行灌胃, 空白组与模型组灌胃给予等量生理盐水, 连续 7 d, 每日固定时间 1 次, 在最后一次灌胃后 2 h, 除空白组外, 各组单次腹腔注射 LPS(给药量 10 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ ), 制备脓毒血症肝损伤模型<sup>[10]</sup>, 禁食不禁水。16 h 后麻醉小鼠摘除眼球取血, 3500 r $\cdot$ min $^{-1}$ 离心 15 min 获取血清; 取肝组织进行固定, 石蜡包埋用于组织病理检查, 剩余肝组织做好标记放入-80℃冰箱保存。

### 2.2 血清生化指标测定

取离心后的血清, 严格按照说明书, 采用微孔板法测定小鼠血清中 AST、ALT 水平评估小鼠肝脏功能; 采用酶联免疫分析法测定血清中 IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平。

### 2.3 HE 染色观察肝组织病理变化

取新鲜的肝组织, 用生理盐水洗去表面血液, 剪取 1 cm $\times$ 1 cm 小块组织加入 4% 多聚甲醛固定,

脱水后进行石蜡包埋, 制成 3~5  $\mu$ m 的切片。将切片分割后置于 37℃ 温水中捞片, 烤片 5 h, 用二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化、蒸馏水冲洗后进行 HE 染色, 随后用中性树胶封片, 在显微镜下观察并拍照记录。

### 2.4 肝组织免疫荧光分析肝巨噬细胞极化标志蛋白表达

取“2.3”项下制备好的石蜡切片脱蜡处理, 置于微波炉中进行抗原修复待其自然冷却, 将玻片置于磷酸盐缓冲液(PBS)中在脱色摇床上洗涤, 甩干后滴加牛血清白蛋白(BSA)封闭孵育 30 min, 随后加入兔源 F4/80 抗体 4℃ 孵育过夜。滴加酪酰胺信号放大工作液(TSA), PBS 洗 3 次, 将切片置于抗原修复液中进行修复。加入 F4/80、CD86、CD206(1:500)抗体 4℃ 孵育过夜, 滴加荧光标记的二级抗体, 避光室温孵育 50 min, PBS 洗 3 次, 切片甩干滴加 DAPI 染液, 避光孵育 10 min, 加入抗荧光猝灭剂封片, 封片置于荧光显微镜下观察并采集图像。

### 2.5 蛋白免疫印迹法分析 iNOS、Arg-1、PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B 信号通路蛋白表达

小鼠肝组织加入 10 倍体积 RIPA 裂解混合液, 置于冰上充分裂解, 采用匀浆器破碎肝组织制备组织匀浆, 以 4℃、12 000 r $\cdot$ min $^{-1}$ 离心 10 min, 分离上清液, 一部分按 BCA 蛋白浓度定量试剂盒说明书测定蛋白含量。另一部分按比例加入 5 $\times$  蛋白上样缓冲液(4:1), 在水浴锅 100℃ 煮 10 min, 待蛋白质变性, 恢复室温, 回收至-20℃冰箱备用。各组样品采用 5% 的浓缩胶与 10% 的分离胶进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 先用 80 V 恒压电泳 30 min, 待溴酚蓝指示剂进入分离胶后改用 120 V 恒压电泳。电泳结束后, 置电泳仪于冰水条件下 100 V 转膜 1 h, 将蛋白转至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, PBST 洗脱 3 次后, 与一抗结合, 4℃ 孵育过夜, PBST 洗膜, 加入对应辣根过氧化物酶偶联的二级抗体室温孵育 2 h, 洗膜后滴加 ECL 化学发光液显色, 置于凝胶成像系统显影, 使用 Image J 软件进行灰度分析, 计算 iNOS、Arg-1、PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B 信号通路蛋白表达量。

### 2.6 统计学处理

采用 GraphPad Prism 8.0 统计软件处理, 实验数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 组间比较采用单因素方差分析进行统计学分析, LSD 法进行检验后的多重比较,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 蟛蜞菊内酯对肝组织病理学的影响

如图 1 所示。空白组小鼠肝组织形态正常,

肝细胞排列整齐,肝小叶结构清晰,无明显损伤;模型组小鼠肝细胞多发坏死变形,结构不清晰,出现炎性细胞浸润,大量空泡化现象。给予低、中、高剂量蟾蜍菊内酯干预后,细胞边界清晰明显,空泡化现象与炎性细胞浸润均有不同程度改善。实验结果表明蟾蜍菊内酯预处理对于小鼠 LPS 诱导的急性肝损伤有保护作用。

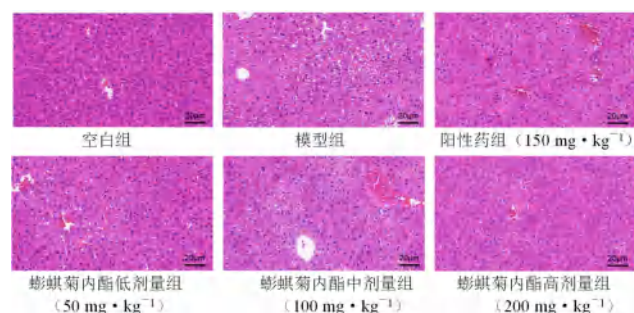


图1 蟾蜍菊内酯对小鼠肝组织病理学影响(HE, ×400)

Fig 1 Effect of the wedelolactone on pathological changes of liver tissue in mice (HE, ×400)

### 3.2 蟾蜍菊内酯对血清中AST、ALT的影响

如图2所示,与空白组相比,模型组小鼠血清中AST、ALT水平显著提高( $P < 0.01$ )。蟾蜍菊内酯干预后,小鼠血清中AST、ALT水平明显下降( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ),提示蟾蜍菊内酯能够改善LPS诱导的急性肝损伤导致的血清转氨酶异常升高现象。

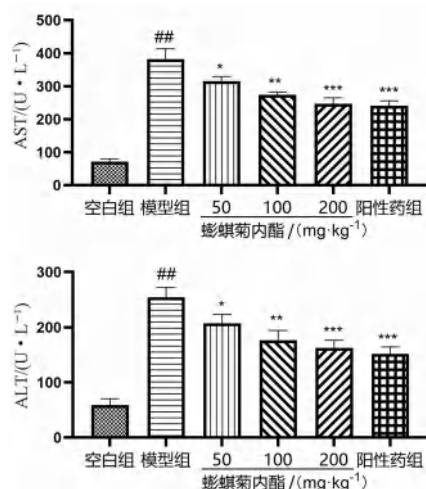


图2 蟾蜍菊内酯对小鼠血清AST、ALT水平的影响( $n = 6$ )

Fig 2 Effect of the wedelolactone on serum AST and ALT levels in mice ( $n = 6$ )

注:与空白组比较,  $^{##}P < 0.01$ ;与模型组比较,  $^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ 。

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

### 3.3 蟾蜍菊内酯对炎症反应的影响

如图3所示,与空白组相比,模型组小鼠血清

中炎症因子IL-6、TNF- $\alpha$ 水平显著升高( $P < 0.01$ );联苯双酯干预后可有效下调上述炎症因子的表达( $P < 0.001$ )。蟾蜍菊内酯各剂量组对IL-6、TNF- $\alpha$ 水平均有不同的抑制作用( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )。其中对IL-6的下调尤为显著,推测蟾蜍菊内酯对LPS诱导的急性肝损伤保护作用机制可能与下调IL-6相关。

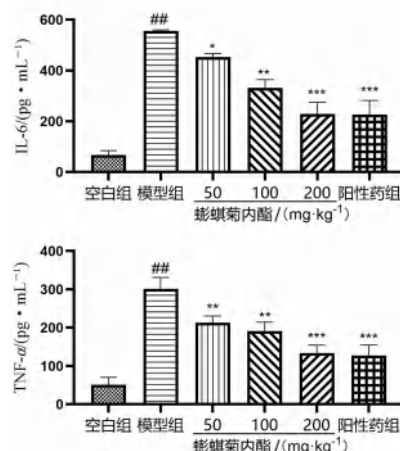


图3 蟾蜍菊内酯对小鼠血清中IL-6、TNF- $\alpha$ 水平的影响( $n = 6$ )

Fig 3 Effect of the wedelolactone on serum IL-6 and TNF- $\alpha$  levels in mice ( $n = 6$ )

注:与空白组比较,  $^{##}P < 0.01$ ;与模型组比较,  $^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ 。

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

### 3.4 蟾蜍菊内酯对肝巨噬细胞极化的影响

对小鼠肝组织进行免疫荧光化学染色,结果如图4所示,与空白组相比,模型组小鼠肝脏中M1型表达标志物CD86<sup>+</sup>细胞数目明显增多,而蟾蜍菊内酯各剂量给药组与阳性药组均能显著降低其荧光强度;M2型表达标志物CD206<sup>+</sup>细胞数目明显减少,而蟾蜍菊内酯各剂量给药组与阳性药组均能显著增加荧光强度。表明蟾蜍菊内酯能够抑制小鼠肝脏中巨噬细胞M1型极化,并促进其M2型极化,推测蟾蜍菊内酯的肝保护作用机制可能与调控巨噬细胞极化方向相关。

### 3.5 蟾蜍菊内酯对肝组织iNOS、Arg-1蛋白表达的影响

结果如图5所示,与空白组相比,模型组小鼠肝脏中M1型极化标志iNOS蛋白表达显著升高( $P < 0.001$ ),M2型极化标志Arg-1蛋白表达显著降低( $P < 0.001$ );而蟾蜍菊内酯中、高剂量干预后能够降低iNOS蛋白表达水平,增加Arg-1蛋白表达水平( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ),且在高剂量( $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )时效果显著。以上结果提示,蟾蜍菊内酯对肝脏巨噬细胞的极化有调节作用。



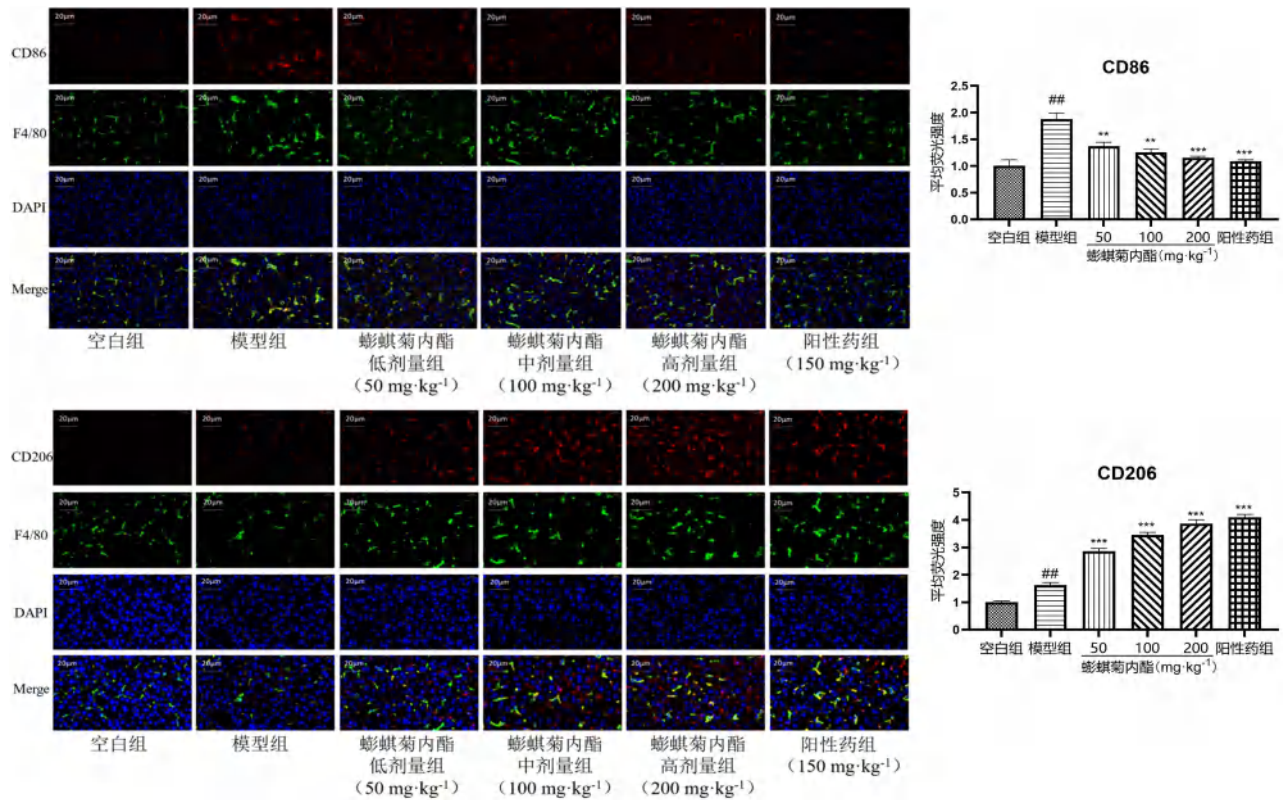


图 4 蟛蜞菊内酯对小鼠肝巨噬细胞极化的影响 (×400)

Fig 4 Effect of wedelolactone on the immunofluorescence of polarization of mice liver macrophages (×400)

注: 与空白组比较, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ 。

Note: Compared to the blank group, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; compared to the model group, <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ .

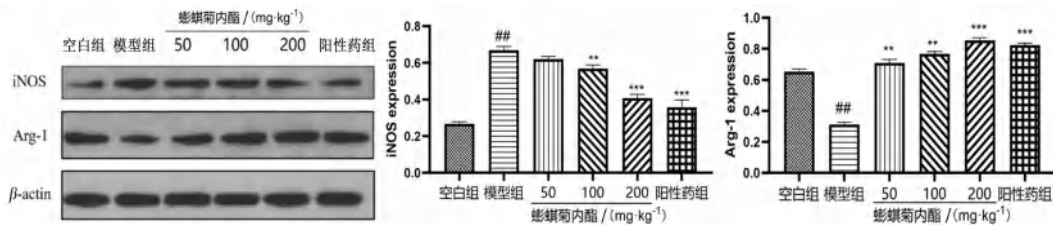


图 5 蟛蜞菊内酯对各组小鼠肝脏组织中的 iNOS 与 Arg-1 蛋白表达水平的影响

Fig 5 Effect of wedelolactone on the expression levels of iNOS and Arg-1 protein in liver tissues of mice in each group

注: 与空白组比较, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the blank group, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; compared with the model group, <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ .

### 3.6 蟛蜞菊内酯对小鼠肝组织 PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B 信号通路蛋白表达的影响。

结果如图 6 所示, 与空白组相比, 模型组小鼠肝脏中蛋白表达水平显著上调 ( $P < 0.001$ )。与模型组相比, 蟛蜞菊内酯低、中剂量组小鼠肝脏中 p-AKT、AKT、p-PI3K、PI3K、p-NF- $\kappa$ B p65、NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达显著减少 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 高剂量组和阳性药组小鼠肝脏中 p-AKT、AKT、p-PI3K、PI3K、p-NF- $\kappa$ B p65、NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达极显著降低 ( $P < 0.001$ )。其中 PI3K/AKT 信号通路是调节巨噬细胞极化的关键蛋白, 能够通过 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 等途径激活 M1 型极化, 引起 M1 型与 M2 型极化之间的失衡, 推测蟛蜞菊内酯缓

解 LPS 诱导的脓毒血症小鼠急性肝损伤可能与调控 PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B 信号通路有关。

### 4 讨论

脓毒血症是一种严重的全身性炎症反应综合征, 其发生机制复杂<sup>[11]</sup>, 临床上常常伴随免疫失调和多脏器衰竭, 脓毒血症的发生往往伴随着感染源不明确、免疫系统失调及凝血功能异常等复杂的病理生理过程, 极大地增加了治疗的难度<sup>[12]</sup>。LPS 是一种可以引起脓毒血症的内毒素, 能够引发强烈的免疫反应, 而急性肝损伤则是脓毒血症最常见的并发症<sup>[13]</sup>。炎症反应和过激的免疫反应引起的功能障碍和损伤可能导致脓毒血症患者疾病的恶化甚至是死亡。当感染脓毒血症时, 单核巨噬细胞及其他

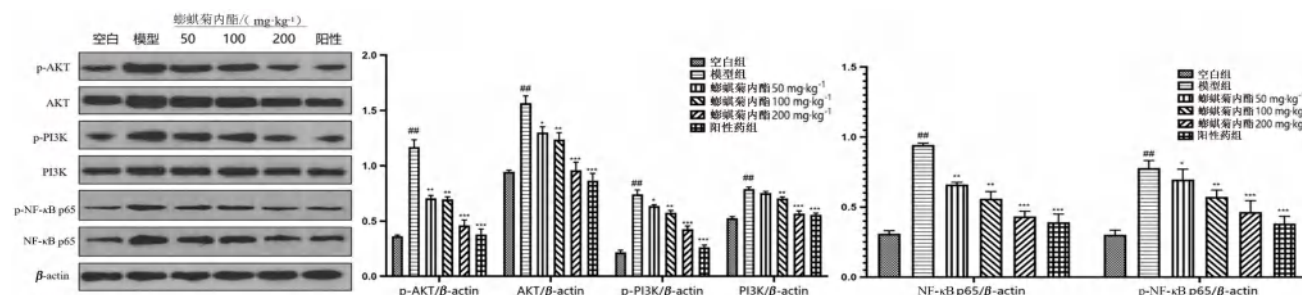


图 6 各组小鼠肝脏组织中的 PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B 信号通路蛋白的表达水平

Fig 6 Expression level of PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B pathway protein in liver tissue of mice in each group

注：与空白组比较， $^{##}P < 0.01$ ；与模型组比较， $^{*}P < 0.05$ ， $^{**}P < 0.01$ ， $^{***}P < 0.001$ 。

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

免疫细胞会被激活放大，导致体内 IL-6、TNF- $\alpha$  炎症因子水平异常升高，最终导致器官功能障碍。

在本研究中，HE 染色结果显示，螞蟥菊内酯干预后肝组织病理损伤显著减轻，表现为肝小叶结构重建、中央静脉周围炎性细胞浸润减少及肝细胞坏死面积缩小，同时减少炎症因子风暴，改善肝细胞功能（AST/ALT 降低）并抑制全身炎症反应（TNF- $\alpha$ /IL-6 下降），抑制肝细胞凋亡与坏死，这一保护效应可能与其通过抑制 PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B 信号通路、驱动肝脏巨噬细胞向 M2 型极化密切相关<sup>[14]</sup>，在研究中阳性药联苯双酯也产生相似的效果，但检索中并未发现该药品关于细胞极化方面的研究。Western blot 及免疫荧光结果表明，螞蟥菊内酯显著下调肝组织中 PI3K、AKT 及 NF- $\kappa$ B p65 蛋白的磷酸化水平，同时伴随 M2 型巨噬细胞标志物 Arg-1 和 CD206 的表达上调，提示其通过阻断 PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B 信号轴的过度激活，重塑 MPB<sup>[15]</sup>，这是因为 PI3K/AKT 通路的抑制阻断了 IKK/NF- $\kappa$ B 信号的核转位，减少 TNF- $\alpha$  等促炎因子的释放，从而降低中性粒细胞和单核细胞的肝内募集，这与 HE 染色中炎症浸润灶的减少一致<sup>[16-17]</sup>。此外，NF- $\kappa$ B 活性的抑制可能通过降低 iNOS 表达，缓解 M1 型巨噬细胞介导的氧化应激损伤，保护肝细胞膜结构完整性。同时 PI3K/AKT 信号抑制可通过降低 Bcl-2 家族促凋亡蛋白（如 Bax）的表达，减少肝细胞凋亡；而 M2 型巨噬细胞释放的肝细胞生长因子（HGF）和表皮生长因子（EGF）可能协同促进肝细胞再生<sup>[18]</sup>。现有研究表明，巨噬细胞极化与多种肝脏疾病相关，因为巨噬细胞，特别是肝脏中的 Kupffer 细胞在肝脏的免疫反应、炎症和纤维化过程中起着关键作用<sup>[19]</sup>。例如在 Fan 等<sup>[20]</sup>的研究中发现抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路能够促进巨噬细胞 M2 型极化，改善脓毒血症小鼠的肝损伤情况，这与本文结果类似。在秦思思等<sup>[21]</sup>的研究中表

明，增加 Arg-1、CD206 蛋白表达，促进巨噬细胞 M2 型极化可以缓解高脂饮食导致的非酒精性脂肪肝损伤。在邓志燕等<sup>[22]</sup>研究中发现大鼠肝纤维化与巨噬细胞 M1 型极化有关，同时 Jian 等<sup>[23]</sup>的研究同样表明在细胞层面促进 M2 型巨噬细胞极化有助于改善肝纤维化。以上研究均表明调控巨噬细胞极化在肝脏疾病中具有重要研究价值。

PI3K/AKT 信号通路是近年来研究较为广泛的信号通路，同时也是巨噬细胞极化的关键通路，由多个蛋白复合物组成。磷脂酰肌醇 3 激酶（PI3K）是一个由两条亚单位（p85 和 p110）构成的异二聚体，p85 亚单位通常与受体结合，感应外部信号，p110 亚单位则催化磷脂酰肌醇-4, 5-二磷酸（PIP2）转化为磷脂酰肌醇-3, 4, 5-三磷酸（PIP3）。AKT 是一个由三种同源体组成的蛋白家族（AKT1、AKT2、AKT3），其激活后通过磷酸化靶点发挥多种生物学功能，参与细胞增殖、凋亡、血管生成和炎症反应等过程<sup>[24]</sup>。本实验中 AKT 通过直接磷酸化 IKK $\beta$  的激活环，激活抑制因子  $\kappa$  激酶（IKK）复合物，进而驱动 I $\kappa$ B $\alpha$  降解和 NF- $\kappa$ B 入核，p-AKT 的减少可能导致 IKK 活性降低，从而减少 I $\kappa$ B $\alpha$  的磷酸化降解，最终抑制 p65 的核转位和磷酸化。LPS 能通过与巨噬细胞表面的 Toll 样受体 4（TLR4）结合，启动 PI3K/AKT 信号通路<sup>[25]</sup>，而 LPS 入侵机体时首先通过 TLR4 激活下游的 MyD88 途径<sup>[26]</sup>，进一步激活 PI3K 导致 PIP2 转化为 PIP3，招募 AKT 至细胞膜并激活<sup>[27]</sup>。在 LPS 刺激下，PI3K/AKT 通路不仅促进了巨噬细胞的生存和增殖，还加剧了 M1 型巨噬细胞的极化。AKT 通过促进 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 等转录因子的激活，增强了 M1 型极化的细胞因子分泌，加剧炎症反应，与此同时，PI3K/AKT 通路的激活抑制了 M2 型巨噬细胞的极化。而螞蟥菊内酯可以通过对 PI3K/AKT 信号通路的抑制，促进 M2 型极化<sup>[28]</sup>，减轻炎症反应，防止免疫系统失衡。



本研究为靶向巨噬细胞极化改善肝损伤提供了新策略,通过对炎症性肝病的精准治疗可能将开发更多的天然药物。例如非酒精性脂肪性肝炎、药物性肝损伤为代表的炎症性肝病,其核心病理特征为巨噬细胞 M1 型/M2 型失衡驱动的持续性炎症,通过靶向干预巨噬细胞,有望开发出更加精准的免疫调整治疗方法。总而言之,蟛蜞菊内酯凭借其独特的“抗炎-促修复”双重机制,有望成为肝病多靶点治疗的代表性天然药物。未来研究应聚焦于剂型优化、适应证分层及联合用药方案探索,同时结合人工智能预测模型(如分子对接筛选协同靶点),加速其从基础研究向临床应用的跨越。

## 参考文献

- [1] Wei Z, Zheng Y, Feng XT, et al. Systemic inflammatory response syndrome in sepsis-3: a retrospective study [J]. BMC Infect Dis, 2019, 19 (1): 139-149.
- [2] Xue JS, Jun RW, Lun L, et al. Transcriptional switch of hepatocytes initiates macrophage recruitment and T cell suppression in endotoxemia [J]. J Hepatol, 2022, 2 (77): 436-452.
- [3] Kristina ER, Sarah CJ, Kareha MA, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990—2017: analysis for the global burden of disease study [J]. Lancet, 2020, 395 (10219): 200-211.
- [4] 曹明中, 张榕明, 吴茹霞, 等. 基于巨噬细胞极化探讨中医药治疗肝纤维化的研究进展 [J]. 中国医药导报, 2024, 21 (22): 74-80.
- [5] 高兵, 田永福, 刘文明, 等. 薤白皂苷通过调控 PI3K/mTOR 信号通路对心肌梗死大鼠心肌微环境及巨噬细胞极化的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2024, 44 (24): 6002-6007.
- [6] 李建功, 孙文熙, 刘家玥, 等. 基于 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号通路研究黄连素对小鼠巨噬细胞极化的干预作用 [J]. 中国药房, 2020, 31 (15): 1804-1809.
- [7] 宋婧, 郝梦奇, 翟晓虎, 等. 桔梗多糖对 CCl<sub>4</sub> 诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用及机制研究 [J]. 中南药学, 2023, 21 (1): 110-115.
- [8] 张代亮, 王杰琼, 马艳妮, 等. 墨旱莲化学成分及药理作用研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25 (8): 140-144.
- [9] Yang L, Hu DM, Ma SB, et al. Protective effect of wedelolactone against CCl<sub>4</sub>-induced acute liver injury in mice [J]. Int Immunopharmacology, 2016, 5 (34): 44-52.
- [10] 赵芮竹, 滑正阳, 王宇航, 等. 黄连解毒汤抑制 NLRP3 炎症小体活化改善脓毒症小鼠急性肝损伤的机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30 (22): 27-34.
- [11] Hai F, Yi DZ, Jian CW, et al. Remimazolam reduces sepsis-associated acute liver injury by activation of peripheral benzodiazepine receptors and p38 inhibition of macrophages [J]. Int Immunopharmacol, 2021, 101 (Part B): 108331-108339.
- [12] Yan TZ, Feng W, Fei T, et al. Deficiency of S100A9 alleviates sepsis-induced acute liver injury through regulating AKT-AMPK-dependent mitochondrial energy metabolism [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24 (3): 2112-2131.
- [13] 张银涛, 杨萍, 臧丹丹, 等. GPR108 缺失对脂多糖诱发脓毒症小鼠的炎症反应 [J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59 (11): 1896-1902.
- [14] Ya ZW, Xi GZ, Jin JW, et al. Inflammatory periodontal ligament stem cells drive M1 macrophage polarization via exosomal miR-143-3p-mediated regulation of PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B signaling [J]. Stem Cells, 2023, 41 (2): 184-199.
- [15] 张殿亮, 孙童, 闫森, 等. 白介素 -6 与肝细胞癌治疗的研究进展 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2024, 31 (21): 1340-1346.
- [16] Peng S, Lin J, Ying JZ, et al. Crosstalk between tumor-associated macrophages and tumor cells promotes chemoresistance via CXCL5/PI3K/AKT/mTOR pathway in gastric cancer [J]. Cancer Cell Int, 2022, 22 (1): 290-307.
- [17] 朱玲玲, 张亚妮, 史婷婷, 等. 肿瘤坏死因子  $\alpha$  在肝细胞癌发生发展中的作用 [J]. 临床肝胆病杂志, 2024, 40 (11): 2320-2325.
- [18] Michael GD, Lain DCF. NF-kappaB signaling in macrophages: dynamics, crosstalk, and signal integration [J]. Front Immunol, 2019, 9 (10): 705-717.
- [19] Cheng W, Cheng M, Li HG, et al. Macrophage polarization and its role in liver disease [J]. Front Immunol, 2021, 14 (12): 37-62.
- [20] Fan Y, Hong HC, Xuan Z, et al. An active marine halophenol derivative attenuates lipopolysaccharide-induced acute liver injury in mice by improving M2 macrophage-mediated therapy [J]. Int Immunopharmacol, 2021, 9 (10): 676-688.
- [21] 秦思思, 秦昌宇, 王永恒, 等. 盐地碱蓬多糖调控巨噬细胞极化缓解高脂饮食诱导非酒精脂肪肝病小鼠肝损伤作用 [J]. 食品工业科技, 2024, 11 (14): 21-35.
- [22] 邓志燕, 万强. 黄芪多糖调控巨噬细胞极化治疗肝纤维化的机制研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2024, 12 (9): 31-36.
- [23] Jian HR, Hao W, Ming N, et al. FSTL1 promotes liver fibrosis by reprogramming macrophage function through modulating the intracellular function of PKM2 [J]. Gut, 2022, 71 (12): 2539-2550.
- [24] Eleni V, Eleftheria L, Konstantina L, et al. Akt signaling pathway in macrophage activation and M1/M2 polarization [J]. J Immunol, 2017, 198 (3): 1006-1014.
- [25] Ricardo LBC, Hyo SH, William JG. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in triple-negative breast cancer: a review [J]. Breast Cancer Res Treat, 2018, 169 (3): 397-406.
- [26] Tian T, Zi TW, Le YC, et al. Photobiomodulation activates undifferentiated macrophages and promotes M1/M2 macrophage polarization via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. Lasers Med Sci, 2023, 38 (1): 86-87.
- [27] Xing L, Xiao YB, Xiu ZW, et al. The protective effect of quercetin on macrophage pyroptosis via TLR2/MyD88/NF-kappaB and ROS/AMPK pathway [J]. Life Sci, 2022, 291 (12): 64-73.
- [28] Xin SX, Li HC, Lan QZ, et al. Saikosaponin d modulates the polarization of tumor-associated macrophages by deactivating the PI3K/AKT/mTOR pathway in murine models of pancreatic cancer [J]. Int Immunopharmacol, 2023, 122 (11): 579-591.

(收稿日期: 2025-01-02; 修回日期: 2025-03-05)

# 荧光偏振法探究金匱肾气丸“阴中求阳”理论的科学内涵

孟晶莹<sup>1</sup>, 贡怡晴<sup>1</sup>, 郭瑞光<sup>1\*</sup>, 张敏<sup>1, 2\*</sup> (1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2. 北京市药品检验研究院, 国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室, 中药成分分析与生物评价北京市重点实验室, 北京 102206)

**摘要:** **目的** 基于细胞膜流动性探究金匱肾气丸“阴中求阳”理论的科学内涵。**方法** 将金匱肾气丸分为补阳 1 组 (附子、桂枝), 补阴 1 组 (熟地黄、山药、山茱萸), 阴阳双补 1 组 (附子、桂枝、熟地黄、山药、山茱萸), 补阳 2 组 (附子、桂枝、茯苓、泽泻、牡丹皮), 补阴 2 组 (熟地黄、山药、山茱萸、茯苓、泽泻、牡丹皮), 阴阳双补 2 组 (附子、桂枝、熟地黄、山药、山茱萸、茯苓、泽泻、牡丹皮)。采用荧光偏振光谱法, 以 16:0 荧光染料 1-棕榈酰-2-NBD-磷脂酰乙醇胺为荧光探针, 按照金匱肾气丸各组药物 (以定量指标成分计): 细胞膜 (以 DPPC 计): 荧光染料 = 1:1999:3 (摩尔比) 混合均匀, 置于 37℃ 水浴锅中温育 30 min 后测定。多功能酶标仪设置激发波长为 485 nm, 发射波长为 535 nm, 对加入金匱肾气丸各组药物前后的细胞膜的流动性进行荧光偏振法测定。**结果** 空白细胞膜的荧光偏振度为 0.267, 微黏度为 2.759, 加入金匱肾气丸各组药物后, 各组细胞膜的荧光偏振度和微黏度均呈现不同程度的降低, 证明金匱肾气丸全方及各拆方都能使细胞膜流动性增强, 对于含有相同浓度的同一定量指标成分的金匱肾气丸各组药物, 阴阳双补组对细胞膜流动性的增强作用强于补阳组或补阴组。**结论** 金匱肾气丸“阴中求阳”理论的科学内涵之一可能是补阴药与补阳药协同作用, 从而进一步促进了各自对细胞膜流动性的增强作用。

**关键词:** 金匱肾气丸; 拆方; 阴中求阳; 荧光偏振法; 细胞膜流动性

中图分类号: R289.1, R286 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)06-1502-06  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.002

## Mechanism of reinforcing *Yang* from *Yin* theory in Jinkui Shenqi pills and their decomposed recipes by fluorescence polarization

MENG Jing-ying<sup>1</sup>, GONG Yi-qing<sup>1</sup>, WU Rui-guang<sup>1\*</sup>, ZHANG Min<sup>1, 2\*</sup> (1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488; 2. Beijing Institute for Drug Control, NMPA Key Laboratory for Quality Evaluation of Traditional Chinese Medicine (Traditional Chinese Patent Medicine), Beijing Key Laboratory of Analysis and Evaluation on Chinese Medicine, Beijing 102206)

**Abstract: Objective** To determine the mechanism of reinforcing *Yang* from *Yin* theory in Jinkui Shenqi pills based on the fluidity of cell membranes. **Methods** Jinkui Shenqi pills were divided into a *Yang* supplementing group 1 (Aconite, and Cassia Twig), a *Yin* supplementing group 1 (*Radix Rehmanniae Praeparata*, *Dioscoreae Rhizoma*, and *Cornus officinalis*), a *Yin-Yang* dual supplementing group 1 (Aconite, Cassia Twig, *Radix Rehmanniae Praeparata*, *Dioscoreae Rhizoma*, and *Cornus officinalis*), *Yang* supplementing group 2 (Aconite, Cassia Twig, *Poria cocos*, *Alisma*, and *Moutan Cortex*), a *Yin* supplementing group 2 (*Radix Rehmanniae Praeparata*, *Dioscoreae Rhizoma*, *Cornus officinalis*, *Poria cocos*, *Alisma*, and *Moutan Cortex*), and *Yin-Yang* dual supplementing group 2 (Aconite, Cassia Twig, *Radix Rehmanniae Praeparata*, *Dioscoreae Rhizoma*, *Cornus officinalis*, *Poria cocos*,

**基金项目:** “国家中医药管理局高水平建设学科”项目 (No. zyyzdxk-2023272); 北京中医药大学科研发展基金项目 (No.2024-ZXFZJJ-005)。

**作者简介:** 孟晶莹, 女, 硕士研究生, 主要从事中药制剂新剂型与新技术研究, email: mjy210524@163.com \*通信作者: 郭瑞光, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药制剂新剂型与新技术研究, email: wurg@bucm.edu.cn; 张敏, 女, 硕士, 主要从事中药制剂新剂型与新技术研究, email: zm980615@163.com

*Alisma*, and *Moutan Cortex*). Fluorescence polarization spectroscopy was used with 16: 0 NBD PE as the fluorescent probe. The mixtures were prepared according to the following molar ratios: Jinkui Shenqi pills (calculated based on quantitative indicator components) : cell membrane (calculated as DPPC) : fluorescent dye = 1 : 1999 : 3. The mixtures were blended and incubated in a water bath at 37 °C for 30 min before the measurement. A multifunctional microplate reader was configured with an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 535 nm for the fluorescence polarization. The fluidity of cell membranes before and after the addition of various drug groups was determined. **Results** The fluorescence polarization of blank cell membranes was 0.267, and the microviscosity was 2.759. After adding various drug groups, both fluorescence polarization and microviscosity of the cell membranes showed varying degrees of decline, which indicated that both the complete formula of Jinkui Shenqi pills and their decomposed recipes enhanced the cell membrane fluidity. Among the drug groups containing the same concentration and quantity of active ingredients, the *Yin-Yang* dual supplementing group enhanced the cell membrane fluidity more than either the *Yang* supplementing group or the *Yin* supplementing group. **Conclusion** One mechanism for the reinforcing *Yang* from *Yin* theory in Jinkui Shenqi pills may be the synergistic effect of *Yin*-tonifying herbs and *Yang*-tonifying herbs, which further enhances their respective effect on the cell membrane fluidity.

**Key words:** Jinkui Shenqi pill; decomposed recipe; reinforcing *Yang* from *Yin*; fluorescence polarization; cell membrane fluidity

“阴中求阳，阳中求阴”之法，源自阴阳学说，是以阴阳互根理论为基础，以阴阳互损为基本病理，用于治疗阴阳虚损证候的中医理论<sup>[1]</sup>。该理论由明代医家张景岳在其著作《景岳全书》中首次正式提出：即“善补阳者，必于阴中求阳，则阳得阴助而生化无穷；善补阴者，必于阳中求阴，则阴得阳升而泉源不竭”<sup>[2]</sup>。“阴中求阳”理论是中医基础理论之一，也是中医重要治则之一。

金匱肾气丸，源自医圣张仲景所著《金匱要略》，是“阴中求阳”理论的代表方剂之一。原方由附子（制）、桂枝、干地黄、山药、山茱萸、茯苓、泽泻、牡丹皮共八味药组成，药物比例为 1 : 1 : 8 : 4 : 4 : 3 : 3 : 3<sup>[3-4]</sup>。其中，干地黄（今多用熟地黄）为君药，滋补肾阴、填精益髓；山茱萸、山药为臣药，健脾补肝益肾而又化生精血，二药与地黄相配，谓补肾填精之“三补”；又加少量附子（制）、桂枝温肾助阳，微微生火，鼓舞肾气；又配伍茯苓、泽泻、牡丹皮（三泻），能使邪气消除，避免滋阴药的腻滞，使补而不滞。目前对该方“阴中求阳”理论的研究大多都是从药物含量及药理<sup>[5-9]</sup>等角度进行的，鲜有从细胞膜流动性角度对该方“阴中求阳”理论进行探究的报道。

药物对细胞的作用必须首先通过细胞膜或作用于细胞膜系统后进入细胞才能进一步发挥作用<sup>[10]</sup>，而细胞膜的流动性是维持其正常生理功能

必需的条件，与膜蛋白的构象、离子通道功能、受体功能、信号传导等都有密切的相关性<sup>[11]</sup>。因此，研究药物对细胞膜流动性的影响，对揭示其药效发挥的原理具有重要意义。有文献报道细胞膜的流动性与肾阳虚证密切相关<sup>[12]</sup>。荧光偏振法（FP）可通过计算得出与膜流动性成负相关的微黏度（ $\eta$ ），以此反映细胞膜的流动性。何家骥等<sup>[13]</sup>利用 FP 技术探究  $\omega$ -3 鱼油脂肪乳对急性一氧化碳中毒后大鼠红细胞流动性的影响，发现  $\omega$ -3 鱼油脂肪乳可明显提高一氧化碳中毒大鼠红细胞膜的流动性，推测鱼油脂肪乳中的  $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸对细胞膜内的不饱和键起到了保护作用，从而维持红细胞膜的正常功能。Bonarska-Kujawa 等<sup>[14]</sup>利用 FP 技术以 1, 6-二苯基-1, 3, 5-己三烯和 *N, N, N*-三甲基-4-(6-苯基-1, 3, 5-己三烯-1-基) 苯基铵对甲苯磺酸盐为荧光探针，研究花青素分别对红细胞膜和脂质体膜流动性的影响，发现花青素对膜的疏水尾部的流动性几乎没有影响，推测其主要结合在膜的亲水部分。

本课题组前期已经用荧光猝灭光谱法研究了金匱肾气丸及其拆方与牛血清白蛋白（BSA）的相互作用，从药物与蛋白相互作用的角度探究了金匱肾气丸“阴中求阳”理论的科学内涵<sup>[15]</sup>。本研究将用 FP 技术研究金匱肾气丸及其拆方对红细胞膜流动性的影响，从细胞膜流动性的角度探



究金匱肾气丸“阴中求阳”理论的科学内涵,进一步为系统地阐明金匱肾气丸“阴中求阳”理论的现代科学内涵提供理论和实验依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

DZF-6010 型真空干燥箱、HH-2 型智能数显恒温水浴锅(巩义市予华仪器有限公司);KQ3200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);LE104E/02 型万分之一分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司);PB-10 型 pH 计(德国 Sartorius 公司);RE-2000B 型旋转蒸发器(郑州科达机械仪器设备有限公司);SpectraMax i3x 型多功能酶标仪(上海美谷分子仪器公司);Sorvall ST8 型高速离心机、UltiMate 3000 型高效液相色谱仪(HPLC)(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);紫砂煎药壶(杭州市润宝实业有限公司)等。

### 1.2 试剂

附子(制)、桂枝、熟地黄、山药、山茱萸、茯苓、泽泻、牡丹皮(北京中医药大学国医堂中医门诊部);荧光染料 1-棕榈酰-2-NBD-磷脂酰乙醇胺(16:0 NBD PE, 美国 Avanti Polar Lipids 公司,纯度>99%);小鼠红细胞(上海源叶生物科技有限公司);纯净水(娃哈哈集团有限公司);桂皮醛(批号:J29GB156028)、马钱苷(批号:B16N10C102990)(纯度均 $\geq 98\%$ ,上海源叶生物科技有限公司);三羟甲基氨基甲烷(Tris,北京拜耳迪生物技术有限公司,纯度 $\geq 99.9\%$ );盐酸(HCl,北京市通广精细化工公司,分析纯);磷酸盐粉末(北京索莱宝科技有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 金匱肾气丸及其拆方药物的制备

参照《金匱要略》原方,金匱肾气丸由附子(制)、桂枝、熟地黄、山药、山茱萸、茯苓、泽泻、牡丹皮共八味药组成,药物比例为 1:1:8:4:4:3:3:3<sup>[3-4]</sup>。依据金匱肾气丸方解及相关文献<sup>[8]</sup>,将其进行拆方研究,具体拆方分组如下:补阳 1 组(附子、桂枝),补阴 1 组(熟地黄、山药、山茱萸),阴阳双补 1 组(附子、桂枝、熟地黄、山药、山茱萸),补阳 2 组(附子、桂枝、茯苓、泽泻、牡丹皮),补阴 2 组(熟地黄、山药、山茱萸、茯苓、泽泻、牡丹皮),阴阳双补 2 组(附子、桂枝、熟地黄、山药、山茱萸、茯苓、泽泻、牡丹皮)。“2”组比相对应的“1”组增加了由“茯苓、泽泻、牡丹皮”组成的“三泻”药物,与相对应的 1 组之间的实验数据对比,有

助于阐明“三泻”药物的作用。按上述分组及用药比例,将中药饮片在纯净水中浸泡 30 min 后在煎药壶中煎煮,一煎时加入 10 倍于中药饮片质量的纯净水煎煮 45 min,二煎时加入 8 倍于中药饮片质量的纯净水煎煮 30 min。其中,附子(制)先煎,桂枝后下。将一煎液和二煎液混合均匀并离心。对水煎液进行甲醇超声提取(功率 100 W,频率 40 kHz)30 min,通过 HPLC 测定各组药物中桂皮醛或马钱苷含量,记录。

### 2.2 缓冲液的配制

**2.2.1 低渗 Tris-HCl 缓冲溶液的制备** 精密称取适量 Tris 固体颗粒,加纯净水溶解稀释得到 0.04 mol·L<sup>-1</sup> Tris 溶液,转移至烧杯中,加入 HCl 溶液调节 pH 值至 7.40 后,转移至 1 L 量瓶中并用纯净水定容,得到 1 L 的 pH 为 7.40 的 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 低渗 Tris-HCl 缓冲溶液,待用。

**2.2.2 PBS 缓冲溶液的制备** 精密称取适量磷酸盐粉末,加适量纯净水使之溶解完全,用 HCl 溶液调节至 pH 为 7.40,将溶液转移到 100 mL 量瓶中并用纯净水定容,得到 100 mL 的 pH 为 7.40 的 0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS,待用。

### 2.3 小鼠红细胞细胞膜的提取

取适量小鼠红细胞悬浮液,4℃、1500 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,得到纯小鼠红细胞。按照 1:40 的比例,在纯小鼠红细胞中加入预冷的低渗 Tris-HCl 缓冲溶液,边加边搅拌,置于 4℃冰箱中 2 h,使之溶血完全后,4℃、9000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min,得到类白色红细胞膜沉淀。用低渗 Tris-HCl 缓冲溶液反复洗涤、离心 3~5 次,最终得到类白色的细胞膜,减重法称重后,将其悬浮于 PBS 中。由于细胞膜成分复杂,参照相关文献<sup>[16-17]</sup>,本实验以细胞膜中的主要成分二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)的分子量作为细胞膜的分子量进行计算。

### 2.4 统计学分析方法

使用 SPSS 25.0 统计分析软件分析数据,符合正态分布,则进行单因素方差分析。若不符合正态分布,则用非参数检验。 $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

### 2.5 HPLC 检测桂皮醛及马钱苷含量

**2.5.1 色谱条件** ①以桂皮醛为定量指标成分的色谱条件:ACE EXCEL 5U-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水(32:68, V/V),流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温为 25℃,检测波长为 290 nm,进样量为 10 μL。②以马钱苷为定量指标

成分的色谱条件: ACE EXCEL 5U-C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水 (11:89, V/V), 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温为 25℃, 检测波长为 240 nm, 进样量为 10 μL。

**2.5.2 对照品溶液的制备** 取桂皮醛、马钱苷对照品, 精密称定, 分别置于 100 mL 量瓶中, 用甲醇溶解完全后定容, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得 0.2080 mg·mL<sup>-1</sup> 桂皮醛对照品溶液和 0.2100 mg·mL<sup>-1</sup> 马钱苷对照品溶液。

**2.5.3 阴性样品溶液的制备** 依照“2.1”项下金匱肾气丸及其拆方药物的制备方法, 采用煎煮法制备金匱肾气丸缺桂枝及缺山茱萸的阴性样品溶液。

**2.5.4 专属性实验** 取桂皮醛对照品溶液、马钱苷对照品溶液、金匱肾气丸全方供试品溶液和金匱肾气丸缺桂枝及金匱肾气丸缺山茱萸的阴性样品溶液, 进样测定。结果如图 1 和图 2 所示, 可见实验所选用的色谱条件可以使桂皮醛及马钱苷出峰, 且分离度良好, 金匱肾气丸中的其他成分对桂皮醛及马钱苷的检测无干扰。

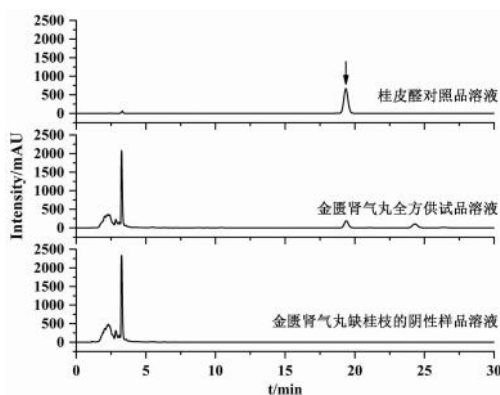


图 1 桂皮醛的 HPLC 图

Fig 1 HPLC chromatograms of cinnamaldehyde

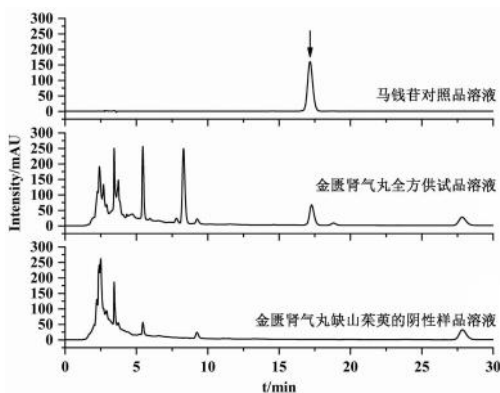


图 2 马钱苷的 HPLC 图

Fig 2 HPLC chromatograms of loganin

**2.5.5 线性关系的考察** 制备 0.2080 mg·mL<sup>-1</sup> 的桂皮醛对照品母液, 分别取 0.5、1.0、2.5、5.0、7.5 mL 桂皮醛对照品母液置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇

定容, 制备成系列浓度对照品溶液, 质量浓度依次为 0.0104、0.0208、0.0520、0.1040、0.1560、0.2080 mg·mL<sup>-1</sup>, 进样, 记录桂皮醛的峰面积。制备 0.2100 mg·mL<sup>-1</sup> 的马钱苷对照品母液, 分别取 0.5、1.0、2.5、5.0、7.5 mL 马钱苷对照品母液置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 制备成系列浓度对照品溶液, 质量浓度依次为 0.0105、0.0210、0.0525、0.1050、0.1575、0.2100 mg·mL<sup>-1</sup>, 进样, 记录马钱苷的峰面积。结果显示, 桂皮醛在 0.0104 ~ 0.2080 mg·mL<sup>-1</sup> 内与峰面积线性关系良好, 线性回归方程为  $Y = 862.64X + 0.5954$  ( $r = 0.9999$ ); 马钱苷在 0.0105 ~ 0.2100 mg·mL<sup>-1</sup> 内与峰面积线性关系良好, 线性回归方程为  $Y = 333.14X - 0.2097$  ( $r = 0.9997$ )。

**2.5.6 精密度实验** 取桂皮醛及马钱苷对照品溶液, 按“2.5.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 分别记录桂皮醛及马钱苷的峰面积。结果显示, 桂皮醛对照品溶液中桂皮醛峰面积的 RSD 为 0.35% ( $n = 6$ ), 马钱苷对照品溶液中马钱苷峰面积的 RSD 为 0.36% ( $n = 6$ ), 表明仪器的精密度良好。

**2.5.7 重复性实验** 取同一次煎煮的金匱肾气丸全方水煎液, 平行制备 6 份金匱肾气丸全方供试品溶液, 按“2.5.1”项下色谱条件进样, 分别记录桂皮醛及马钱苷的峰面积。结果显示, 桂皮醛含量 RSD 为 1.6% ( $n = 6$ ), 马钱苷含量 RSD 为 1.2% ( $n = 6$ ), 表明此方法的重复性良好。

**2.5.8 稳定性实验** 取同一份金匱肾气丸全方供试品溶液, 分别于 0、1、2、4、6、8、10、12、24 h 按“2.5.1”项下色谱条件进样, 分别记录桂皮醛及马钱苷的峰面积。结果显示, 桂皮醛供试品溶液中桂皮醛峰面积的 RSD 为 2.0% ( $n = 6$ ), 马钱苷供试品溶液中马钱苷峰面积的 RSD 为 0.40% ( $n = 6$ ), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.5.9 准确度实验** 精密量取桂皮醛含量已知的金匱肾气丸全方水煎液和马钱苷含量已知的金匱肾气丸全方水煎液各约 0.5 mL, 每类水煎液各 6 份, 各精密加入一定量的桂皮醛对照品溶液和马钱苷对照品溶液, 制备成加样供试品溶液, 按“2.5.1”项下色谱条件进样测定, 分别记录桂皮醛和马钱苷的峰面积, 并计算加样回收率。结果显示, 桂皮醛的平均加样回收率为 101.13%, RSD 为 1.7% ( $n = 6$ ), 马钱苷的平均加样回收率为 100.84%, RSD 为 0.76% ( $n = 6$ ), 表明此方法的准确度符合要求。

## 2.6 荧光偏振实验

避光条件下, 按照金匱肾气丸各组药物 (以定量指标成分计): 细胞膜 (以 DPPC 计): 荧光染



料 16: 0 NBD PE = 1 : 1999 : 3 (摩尔比) 混合均匀, 置于 37 ℃ 水浴锅中温育 30 min 后进行测定。使用多功能酶标仪进行实验。

以 16: 0 NBD PE 为荧光探针, 设置激发波长为 485 nm, 发射波长为 535 nm, 移取 100 μL 的金匱肾气丸各组实验样品至黑色不透光 96 孔板中, 待实验温度稳定后进行测定, 可直接测得荧光偏振度 ( $P$ ) 值。根据 Perrin 方程  $[\eta = 2P / (0.46 - P)]$  计算得微黏度 ( $\eta$ ), 以此可判断生物被膜的流动性大小。荧光偏振度越大, 微黏度越大, 则膜流动性越小, 反之膜流动性越大<sup>[18]</sup>。

实验结果如图 3 ~ 4 所示。与空白细胞膜相比, 加入金匱肾气丸各组药物后, 各组细胞膜的荧光偏振度和微黏度均呈现不同程度的降低, 经单因素方差分析, 差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 说明金匱肾气丸各组药物都能够使得细胞膜流动性升高。

图 3 ~ 4 结果表明, 在含有相同浓度的同一定量指标成分下, 阴阳双补组的荧光偏振度和微黏度均小于相应的补阳组或补阴组, 经单因素方差分析, 阴阳双补组与补阳组之间相比, 阴阳双补组与补阴组之间相比, 荧光偏振度和微黏度的差异性均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 表明在含有相同浓度的同一定量指标成分下, 金匱肾气丸阴阳双补组对细胞膜流动性的增强作用大于补阳组或补阴组。

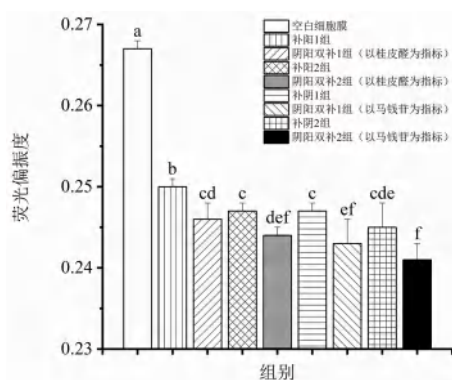


图 3 金匱肾气丸各组方对细胞膜荧光偏振度的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )  
Fig 3 Effect of various formulations of Jinkui Shenqi pills on the fluorescence polarization of cell membranes ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

注: 药物与细胞膜中 DPPC 的摩尔比固定为 1 : 1999。不同字母表示组间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 相同字母表示组间无显著差异。

Note: The molar ratio of drug to DPPC in the cell membrane is fixed at 1 : 1999. Different letters indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ ), while the same letters indicate no significant differences between groups.

### 3 讨论

关于指标成分的选择, 目前文献报道的对金

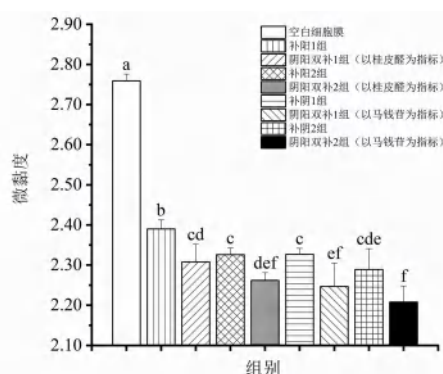


图 4 金匱肾气丸各组方对细胞膜微黏度的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )  
Fig 4 Effect of various formulations of Jinkui Shenqi pillson the microviscosity of cell membranes ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

注: 药物与细胞膜中 DPPC 的摩尔比固定为 1 : 1999。不同字母表示组间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 相同字母表示组间无显著差异。

Note: The molar ratio of drug to DPPC in the cell membrane is fixed at 1 : 1999. Different letters indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ ), while the same letters indicate no significant differences between groups.

匱肾气丸中补阳药和补阴药的有效成分含量测定有附子中的乌头碱、次乌头碱和桂枝中的桂皮醛<sup>[5, 7]</sup>以及山茱萸的马钱苷<sup>[19]</sup>。然而, 补阳药中附子的主要成分为乌头碱类, 成分相对复杂, 本实验前期选择 2020 年版《中国药典》(后文简称药典) 中的定量指标成分之一的苯甲酰新乌头原碱进行含量测定, 发现其含量不高, 存在响应信号不明显等问题, 不宜作为本研究指标成分进行定量; 桂枝的主要成分为桂皮醛<sup>[20]</sup>, 前期测定其含量相对适宜, 因此在补阳药中选用桂皮醛为补阳 - 阴阳双补组的定量指标成分。在药典中, 补阴药中熟地黄含量测定成分为地黄苷 D, 但前期研究显示其含量较低, 因此不宜作为可靠的定量指标成分; 山药在药典中并未指定具体的含量测定成分, 且相关文献中报道的成分含量同样较低; 山茱萸在药典中的含量测定成分为马钱苷、莫诺苷, 且马钱苷也作为右归丸、济生肾气丸等的含量测定成分<sup>[21]</sup>, 有学者利用代谢组学技术发现马钱苷是金匱肾气丸治疗肾阳虚证的显效成分之一<sup>[22-24]</sup>, 前期实验测定结果显示其含量相对适宜, 因此选用马钱苷为补阴 - 阴阳双补定量指标成分。

细胞膜的流动性是维持其正常生理功能必需的条件, 有学者报道用三种药物所造的肾虚证模型中, 小鼠的红细胞流动性均显著降低<sup>[25]</sup>。有学者报道微波辐射导致男性肾阳虚患者精子细胞膜的流动性有所下降, 经补阳药治疗后可以使精子细胞膜的流动性增大到正常值附近<sup>[12]</sup>。可见细胞膜流动性的增强可作为补肾药发挥药效的指标。



“阴中求阳，阳中求阴”，即在对阴阳虚损证遣方用药时，不可简单地“缺阳补阳，缺阴补阴”，需将补阴药与补阳药协同使用，才能更好地发挥疗效。为了探究金匱肾气丸“阴中求阳”理论的现代科学内涵，本研究对金匱肾气丸进行拆方研究，结果表明，与空白细胞膜相比，金匱肾气丸各组药物均可以增加细胞膜的流动性，在含有相同浓度的同一定量指标成分的情况下，与单纯补阳组或者单纯补阴组相比，阴阳双补组对细胞膜流动性的增强作用更大。这一结果表明金匱肾气丸“阴中求阳”理论的现代科学内涵之一可能是补阴药与补阳药协同作用，从而进一步促进了各自对细胞膜流动性的增强作用。

“阴中求阳”理论是非常重要的中医基础理论之一，本研究从细胞膜流动性的角度，通过把金匱肾气丸进行拆方研究，探究了金匱肾气丸“阴中求阳”组方理论的科学内涵，为进一步系统阐明金匱肾气丸“阴中求阳”理论的现代科学内涵提供了一定的研究基础。

## 参考文献

- [1] 邓秀琴, 何冠, 刘军兵, 等. 马有度阴中求阳治疗肾阳虚证经验[J]. 实用中医药杂志, 2023, 39(11): 2269-2270.
- [2] 吴德鸿, 李正富, 杨科朋, 等. “阴中求阳、阳中求阴”新解浅议“治未病”[J]. 中华养生保健, 2023, 41(21): 60-63.
- [3] 李冀, 连建伟. 方剂学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 142-143.
- [4] 范永升. 金匱要略[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 154-155.
- [5] 李政木, 陈炜璇, 卓廉佳, 等. 肾气丸“阴中求阳”配伍对桂皮醛含量的影响[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(11): 2618-2620.
- [6] 王菲, 钟森杰, 李欣春, 等. 基于线粒体能量代谢探讨“阴中求阳”法治疗慢性心力衰竭科学内涵[J]. 中国中医药信息杂志, 2024, 31(1): 6-10.
- [7] 范明威, 陈炜璇, 卓廉佳, 等. 肾气丸“阴中求阳”配伍对方中乌头碱和次乌头碱含量的影响[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(5): 1040-1042.
- [8] 高洁, 李政木, 黎同明, 等. 从拆方肾气丸对肾阳虚模型大鼠 HPA 轴的影响初探“阴中求阳”配伍机理[J]. 四川中医, 2007, 25(7): 15-17.
- [9] 王孙亚, 李望辉, 韩忠, 等. 基于“阴中求阳”理论探讨右归丸及其拆方对肾阳虚证大鼠睾丸组织的影响[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(10): 4357-4360.
- [10] Tan SW, Wu TT, Zhang D, et al. Cell or cell membrane-based drug delivery systems[J]. Theranostics, 2015, 5(8): 863-881.
- [11] 田卓, 胡厚源, 张彦文. 慢性微波辐射对大鼠血小板参数及膜流动性的影响[J]. 重庆医学, 2008, 37(9): 957-958.
- [12] 毕焕洲, 宋倩倩, 张宝文. 金匱肾气丸对微波辐射性生殖功能障碍小鼠生精细胞膜流动性的影响[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(3): 831-833.
- [13] 何家骥, 梁小青, 梁启龙, 等.  $\omega$ -3 鱼油脂肪乳对急性一氧化碳中毒大鼠血液流变学及红细胞膜流动性的影响[J]. 甘肃医药, 2018, 37(10): 865-868, 882.
- [14] Bonarska-Kujawa D, Pruchnik H, Kleszczyńska H. Interaction of selected anthocyanins with erythrocytes and liposome membranes[J]. Cell Mol Biol Lett, 2012, 17(2): 289-308.
- [15] 张敏, 孟晶莹, 王亚楠, 等. 基于荧光猝灭光谱探究金匱肾气丸“阴中求阳”理论的科学内涵[J]. 中南药学, 2024, 22(9): 2363-2368.
- [16] Zhuang H, Zhang XL, Wu SJ, et al. Study transport of hesperidin based on the DPPC lipid model and the BSA transport model[J]. Spectrochim Acta Part A, 2024, 314: 124172.
- [17] Torrano AA, Pereira AS, Oliveira ON, et al. Probing the interaction of oppositely charged gold nanoparticles with DPPG and DPPC langmuir monolayers as cell membrane models[J]. Colloids Surf B, 2013, 108: 120-126.
- [18] Shinitzky M, Barenholz Y. Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization[J]. Biochim Biophys Acta, 1978, 515(4): 367-394.
- [19] 林林, 刘广楨, 尹宁宁. HPLC 法测定金匱肾气丸中马钱苷、芍药苷、毛蕊花糖苷和丹皮酚[J]. 中成药, 2012, 34(11): 2137-2140.
- [20] 王丹. 中药桂枝化学成分研究[D]. 上海: 上海中医药大学, 2021.
- [21] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 29-30, 130, 1399-1400.
- [22] Zhang AH, Zhou XH, Zhao HW, et al. Metabolomics and proteomics technologies to explore the herbal preparation affecting metabolic disorders using high resolution mass spectrometry[J]. Mol Biosyst, 2017, 13(2): 320-329.
- [23] Li WX, Zhang AH, Zhou XH, et al. High-throughput liquid chromatography mass-spectrometry-driven lipidomics discover metabolic biomarkers and pathways as promising targets to reveal the therapeutic effects of the Shenqi pill[J]. RSC Adv, 2020, 10(4): 2347-2358.
- [24] Wang XJ, Zhang AH, Zhou XH, et al. An integrated chinmedomics strategy for discovery of effective constituents from traditional herbal medicine[J]. Sci Rep, 2016, 6: 18997.
- [25] 刘洪尊, 冯端浩, 蔡宇轩, 等. 三种肾虚证小鼠红细胞膜脂流动性变化的实验研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2003, 4(7): 380-382.

(收稿日期: 2024-12-15; 修回日期: 2025-03-21)

# 桃儿七根茎和果实对二甲苯致小鼠耳肿胀的 抗炎作用及机制的比较

晁文华<sup>1,2</sup>, 谭翠翠<sup>1,2</sup>, 张波<sup>3</sup>, 姚铁<sup>2</sup>, 邱峰<sup>1,2</sup>, 曹世杰<sup>2\*</sup>, 王莉宁<sup>1,2\*</sup> (1.天津中医药大学中药学院, 天津 301617; 2.天津中医药大学组分中药国家重点实验室, 天津 301617; 3.天津中医药大学医学技术学院, 天津 301617)

**摘要:** **目的** 探讨桃儿七根茎和果实对二甲苯致小鼠耳肿胀的抗炎效果及其作用机制的区别。**方法** 将小鼠随机分为对照组, 模型组, 地塞米松组 ( $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 桃儿七根茎低、高剂量组 ( $227.5$ 、 $455 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 和果实低、高剂量组 ( $682.5$ 、 $1365 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。建立二甲苯致小鼠耳肿胀模型, 计算肿胀度, HE 染色观察病理变化, RT-qPCR 检测炎症因子的 mRNA 表达, 网络药理学预测抗炎信号通路并通过 Western blot 验证; 建立脂多糖诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 炎症模型, 通过 MTT 法和 Griess 法检测桃儿七根茎和果实的水提取物及主要化学成分 (槲皮素、山柰酚、鬼臼毒素) 对细胞存活率和一氧化氮释放的影响; RT-qPCR 检测细胞中炎症因子的 mRNA 水平。**结果** 与模型组相比, 桃儿七根茎和果实明显降低耳肿胀度, 改善耳组织病理变化, 降低  $IL-6$ 、 $IL-1\beta$ 、 $TNF-\alpha$  和  $iNOS$  的 mRNA 表达。网络药理学结果显示 TLR4/NF- $\kappa$ B 和 MAPK 通路可能是桃儿七根茎和果实发挥抗炎作用的信号通路, Western blot 实验证实根茎和果实可抑制 TLR4、p-I $\kappa$ B/I $\kappa$ B 和 p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B 蛋白表达, 根茎也能抑制 JNK 的磷酸化。体外实验结果表明桃儿七根茎水提物 ( $0.0625 \sim 4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、果实水提物 ( $0.0625 \sim 1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、槲皮素 ( $3.125 \sim 25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和山柰酚 ( $3.125 \sim 25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 对 RAW264.7 细胞存活率无显著影响并抑制细胞 NO 的释放, 鬼臼毒素 ( $0.05 \sim 0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 显著降低 RAW264.7 细胞的存活率。桃儿七根茎和果实水提取物、槲皮素和山柰酚都能降低  $IL-6$ 、 $IL-1\beta$ 、 $COX-2$  和  $iNOS$  的 mRNA 表达。**结论** 桃儿七根茎通过 TLR4/NF- $\kappa$ B 和 MAPK 两个通路, 而果实主要通过 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路缓解二甲苯诱导的小鼠急性耳肿胀和炎症反应。

**关键词:** 桃儿七; 根茎和果实; 耳肿胀; 炎症; TLR4/NF- $\kappa$ B 通路; MAPK 通路

**中图分类号:** R285, R286 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)06-1508-09  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.003

## Anti-inflammatory effect and mechanism of rhizomes and fruits of *Sinopodophyllum hexandrum* on xylene-induced ear edema in mice

CHAO Wen-hua<sup>1,2</sup>, TAN Cui-cui<sup>1,2</sup>, ZHANG Bo<sup>3</sup>, YAO Tie<sup>2</sup>, QIU Feng<sup>1,2</sup>, CAO Shi-jie<sup>2\*</sup>, WANG Li-ning<sup>1,2\*</sup> (1. School of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617; 2. State Key Laboratory of Component-Based Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617; 3. School of Medical Technology, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617)

**Abstract: Objective** To determine the difference in the anti-inflammatory effect and related mechanism of rhizomes and fruits of *Sinopodophyllum hexandrum* on xylene-induced ear edema in mice. **Methods** The mice were randomly divided into 7 groups: a control group, a model group, a dexamethasone group ( $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), low and high dose groups of *Sinopodophyllum hexandrum* rhizomes ( $227.5$  and  $455 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), and low and high dose groups of *Sinopodophyllum hexandrum* fruits ( $682.5$  and  $1365 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). After establishing the xylene-induced mice ear edema model, the degree of ear swelling was measured; HE staining was used

**基金项目:** 国家重点研发计划 (No.2022YFC3502203)。

**作者简介:** 晁文华, 女, 硕士研究生, 主要从事中药抗炎的药理研究, email: chaowenhua2000@163.com \*通信作者: 王莉宁, 男, 副教授, 主要从事中药和天然药物药效物质研究, email: lining.wang@tjutc.edu.cn; 曹世杰, 女, 副研究员, 主要从事中药药效物质基础及作用机制研究, email: shijiecao0421@hotmail.com

to observe pathological changes; RT-qPCR was used to detect the mRNA expression of inflammation factors; network pharmacology to predict the anti-inflammatory signaling pathways, and Western blot to verify related pathways. In addition, a lipopolysaccharide-induced mouse macrophage RAW264.7 inflammation model was established. MTT assay and Griess methods were used to detect the effect of water extracts and major chemical components (quercetin, kaempferol, and podophyllotoxin) of *Sinopodophyllum hexandrum* rhizomes and fruits on the survival rate and nitric oxide (NO) release, respectively. RT-qPCR was used to detect the mRNA level of inflammatory factors in the cells. **Results** Compared with the model group, the rhizomes and fruits of *Sinopodophyllum hexandrum* reduced the ear swelling, improved the pathological changes in the ear tissue, reduced mRNA expressions of *IL-6*, *IL-1 $\beta$* , *TNF- $\alpha$*  and *iNOS*. Network pharmacology showed that TLR4/NF- $\kappa$ B and MAPK pathways played an important role in the anti-inflammatory effect of rhizomes and fruits of *Sinopodophyllum hexandrum*. Western blot showed that the expressions of TLR4, p-I $\kappa$ B/I $\kappa$ B and p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B protein could be inhibited by the rhizomes and fruits, and the activation of JNK was inhibited by the rhizomes. The in vitro experiments showed that the water extract of *Sinopodophyllum hexandrum* rhizomes ( $0.0625 \sim 4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), the water extract of *Sinopodophyllum hexandrum* fruits ( $0.0625 \sim 1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), quercetin ( $3.125 \sim 25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) and kaempferol ( $3.125 \sim 25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) did not affect the survival rate of RAW264.7 cells and inhibited the release of NO. Podophyllotoxin ( $0.05 \sim 0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) significantly reduced the survival rate of RAW264.7 cells. In addition, the mRNA expressions of *IL-6*, *IL-1 $\beta$* , *COX-2* and *iNOS* were reduced by the water extract of rhizomes and fruits, quercetin, and kaempferol. **Conclusion** The rhizomes of *Sinopodophyllum hexandrum* alleviate acute ear swelling and inflammatory responses induced by xylene through the TLR4/NF- $\kappa$ B and MAPK pathways, while the fruits mainly exhibit anti-inflammatory effect through the TLR4/NF- $\kappa$ B pathway.

**Key words:** *Sinopodophyllum hexandrum*; rhizome and fruit; ear swelling; inflammation; TLR4/NF- $\kappa$ B pathway; MAPK pathway

桃儿七 [*Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying] 属于小檗科 (Berberidaceae) 桃儿七属 (*Sinopodophyllum* Ying), 其根及根茎具有祛风湿、活血解毒、祛痰止咳等功效<sup>[1]</sup>, 而成熟果实小叶莲作为藏族传统妇科用药, 在养血调经与活血通经方面应用久远<sup>[2]</sup>。现代研究表明, 桃儿七根茎与果实富含木脂素类和黄酮类成分, 具有抗炎、抗肿瘤等多种生物活性<sup>[3-6]</sup>。然而, 尽管两者同出一源, 但在传统用药中各有侧重, 且目前关于两者抗炎活性比较的研究尚显不足, 两者在抗炎功效及作用机制上的差异亟待深入探究。

网络药理学的兴起与发展, 为药物作用机制的研究提供了新的视角与策略<sup>[7]</sup>。本研究通过构建体内外炎症模型, 综合运用网络药理学、分子对接和分子生物学等方法阐明桃儿七根茎与果实的抗炎分子机制, 挖掘两者在抗炎作用上的特性与差异。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级雄性 KM 小鼠 56 只, 体重  $18 \sim 22 \text{ g}$ , 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 动物合格证号: SCXK (京) 2021-0011。动物饲养于天津中医药大学动物实验中心 SPF 级动物房,

饲养温度  $20 \sim 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 湿度  $40\% \sim 60\%$ , 照明为 12 h/12 h 明暗交替。本动物实验经天津中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批件号 TCM-LAEC2024061h1618)。

### 1.2 细胞

RAW264.7 (小鼠单核巨噬细胞白血病细胞) 源自 Abelson 鼠科白血病病毒诱导的肿瘤 (普诺赛, 批号为 CL-0190)。

### 1.3 试药

桃儿七根茎和果实 (产地西藏, 批号: TEQ-02-20221227-01、TEQ-02-20221227-02), 由西藏奇正藏药有限公司提供, 经西藏奇正藏药股份有限公司陈维武博士鉴定为小檗科植物桃儿七的根茎和果实。药材粉碎后过 80 目筛备用。制备桃儿七根茎水提物 (S-SHR) 和果实水提物 (S-SHF): 桃儿七根茎和果实粉碎, 过 80 目药典筛, 各称取粉末 20 g, 750 mL 纯净水超声提取 3 次, 每次 0.5 h, 过滤, 合并滤液, 旋转蒸干, 得浸膏, 称重。

脂多糖 (LPS)、氢化可的松 (HSS) (上海源叶), 噻唑蓝溴化四唑 (MTT) (HPLC 测得纯度  $\geq 98\%$ , 索莱宝), 一氧化氮 (NO) 检测试剂盒 (碧云天), 二甲苯 (阿拉丁, 批号: 1330-20-7), SYBR Green 实时荧



光定量 PCR 预混液 (MCE, 批号: HY-K0501A)、4% 多聚甲醛 / 通用型组织固定液、磷酸盐缓冲液 (PBS) (Biosharp), 细胞裂解液、蛋白酶抑制剂 Cocktail (碧云天), TransZol UP 强化 RNA 提取试剂盒 (全式金), 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na)、红细胞裂解液、30% 制胶液 (索莱宝), 地塞米松磷酸钠注射液 (山西金馥康, 批号: 041531146), p-p38 MAPK、p38 MAPK、p-NF- $\kappa$ B、NF- $\kappa$ B、p-I $\kappa$ B、I $\kappa$ B、ERK1/2、p-ERK1/2、TLR4、 $\beta$ -actin (武汉三鹰), JNK、p-JNK (Santa Cruz Biotechnology), 槲皮素 (QUE)、山柰酚 (KAE)、鬼臼毒素 (POD) (HPLC 测得纯度  $\geq 98\%$ , 上海源叶, 批号: B20527、B21126、S24887), RAW264.7 细胞专用培养基 (普诺赛, 批号: CM-0190)。

1.4 仪器

PCR 仪器 (赛默飞世尔), 石蜡包埋机、切片刀、脱水机、摊片机 (Leica), 热风循环烘箱 (立德泰勃), 医用冷藏箱 (海尔), 酶标仪 (BioTek), 高速冷冻离心机 (力康), 生物摇床 (上海知楚), 化学发光成像仪 (上海天能)。

2 方法

2.1 动物分组、造模<sup>[8]</sup>和给药

56 只健康 SPF 级雄性 KM 小鼠按体重随机分为空白组 (CON), 模型组 (MOD), 地塞米松组 (DEX), 桃儿七根茎低、高剂量组 (SHR-L、SHR-H), 桃儿七果实低、高剂量组 (SHF-L、SHF-H), 每组 8 只。

桃儿七根茎成人每日最大用量为 6 g, 果实成人每日最大用量为 9 g。根据实验动物与人用药量的换算<sup>[9]</sup>, 小鼠给药剂量 SHR-L、SHR-H 组分别为 227.5、455 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>, SHF-L、SHF-H 组分别为 682.5、1365 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>, DEX 组为 10 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>, CON 组和 MOD 组灌胃等量的 0.5% CMC-Na 溶液, 连续给药 7 d, 每日一次。

2.2 一般情况

实验过程中, 记录小鼠给药第 7 日的体重。末次给药并致炎 30 min 后, 处死小鼠, 沿耳郭剪下双耳, 用 8 mm 打孔器在小鼠左右耳对称位置打耳片, 测量耳片厚度, 称耳片重量, 计算肿胀度和耳肿胀度抑制率<sup>[10]</sup>。取脏器 (心、肝、脾、肺、肾和胸腺) 并称量, 计算脏器指数, 脏器指数 = 脏器质量 / 体重<sup>[11]</sup>。

2.3 HE 染色

取材后, 每组取 3 只右耳用 4% 多聚甲醛固定 24 h 以上, 进行梯度乙醇脱水、包埋、切片。将切片脱蜡至水, 苏木精染细胞核, 伊红染细胞质, 中性树脂封片, 显微镜下观察耳组织病理学变化并采集图像。

2.4 MTT 法检测细胞存活率

取对数生长期的 RAW264.7 细胞按照每孔  $3 \times 10^4$  个细胞铺 96 孔板, 培养 24 h 后进行分组处理, 空白组: 完全培养基; MOD 组 (LPS 组): 含 1  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> LPS 的培养基; 给药组: 含 1  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> LPS 和不同浓度药物的培养基。培养 36 h 后, 弃上清液, 每孔加入 0.5 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 的 MTT 溶液 100  $\mu$ L, 培养 2.5 h, 弃上清液, 每孔加入 150  $\mu$ L 的二甲基亚砷 (DMSO) 溶液, 振荡 10 min, 于 490 nm 下测定其吸光度值 (*A* 值), 计算细胞存活率。细胞存活率 (%) = (*A*<sub>给药组</sub> - *A*<sub>空白组</sub>) / (*A*<sub>MOD组</sub> - *A*<sub>空白组</sub>)  $\times 100\%$ <sup>[13]</sup>。

2.5 Griess 法检测一氧化氮 (NO) 含量

取对数生长期的 RAW264.7 细胞以每孔  $3 \times 10^4$  个细胞铺 96 孔板, 培养 24 h 后进行分组处理, CON 组: 完全培养基; MOD 组 (LPS 组): 含 1  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> LPS 的培养基; 给药组: 含 1  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> LPS 和不同浓度药物的培养基。培养 36 h 后, 收集上清液, 按照 NO 测定试剂盒说明检测 540 nm 下的吸光度值 (*A* 值), 计算 NO 抑制率。NO 抑制率 (%) = (*A*<sub>MOD组</sub> - *A*<sub>给药组</sub>) / (*A*<sub>MOD组</sub> - *A*<sub>CON组</sub>)  $\times 100\%$ <sup>[13]</sup>。

2.6 RT-qPCR 检测炎症因子 mRNA 表达<sup>[14]</sup>

收集细胞和小鼠耳组织, 使用 TRIzol 法提取总 RNA, 检测纯度和浓度, 逆转录成 cDNA, 按照荧光定量试剂盒说明书进行 RT-qPCR 检测。根据标准曲线及荧光曲线的 Ct 值, 采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法进行数据分析。引物由北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列  
Tab 1 Primer sequence

| 基因名称          | 引物序列 (5' ~ 3')            | 扩增产物长度 /bp |
|---------------|---------------------------|------------|
| GAPDH         | F: GGTGAAGGTCGGTGTGAACG   | 233        |
|               | R: CTCGCTCCTGGAAGATGGTG   |            |
| IL-6          | F: TTGGGACTGATGCTGGTGAC   | 93         |
|               | R: GACAGGTCTGTTGGGAGTGG   |            |
| IL-1 $\beta$  | F: GGAGAGTGTGGATCCCAAGC   | 156        |
|               | R: AGGAAGACAGGCTTGTGCTC   |            |
| TNF- $\alpha$ | F: CACCACGCTCTTCTGTCTAC   | 148        |
|               | R: GGCTACAGGCTTGTCACTC    |            |
| iNOS          | F: GGGCAGCCTGTGAGACCTT    | 141        |
|               | R: TGAGGGCTCTGTTGAGGTCTA  |            |
| COX-2         | F: CTGGTGCCTGGTCTGATGAT   | 253        |
|               | R: CAATGCGGTTCTGATACTGGAA |            |

2.7 网络药理学分析与分子对接<sup>[15]</sup>

通过中国知网和 PubMed 数据库检索桃儿七的化学成分, 从中选取桃儿七中含量丰富且具有代表性的化合物作为活性成分 (见表 2), 并通过 SwissTargetPrediction 和 Similarity ensemble approach

数据库检索获取这些化学成分的作用靶点。通过 GeneCards、DisGeNET 和 DrugBank 数据库检索获得炎症相关靶点。取交集后，获得桃儿七抗炎的作用靶点。将作用靶点提交至 STRING 数据库获取靶点蛋白之间的互作关系，随后导入 Cytoscape 3.7.2 软件中构建桃儿七“成分-抗炎靶点”网络，并通过软件中的 Analyze Network 工具对该“成分-靶点-疾病”网络进行拓扑结构分析。通

过 DAVID 6.8 对网络中的作用靶点进行基因本体（gene ontology，GO）功能富集分析和京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）通路分析。通过 PubChem 数据库获取桃儿七化学成分的三维结构，从 RCSB PDB 数据库获取网络中关键靶点蛋白的晶体结构，采用 Discovery Studio 进行分子对接，并运用 Pymol 4.6.0 对结果进行可视化处理。

表 2 桃儿七的化学成分

Tab 2 Chemical components of *Sinopodophylli hexandrum*

| 结构类型                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 化合物名称(编号) |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 脂素 naphtho [2, 3, d]-1, 3-dioxole-6-carboxylic acid (L1)、methyl podophyllotoxinate (L2)、6, 7- 去亚甲基 - 去氧鬼臼毒素 (L3)、6, 7- 去亚甲基鬼臼毒素 (L4)、6, 7- 去亚甲基 -4'- 去甲鬼臼毒素 (L5)、去氧鬼臼毒素 (L6)、4'- 去甲 - 去氧鬼臼毒素 (L7)、4'- 去甲鬼臼毒素 (L8)、鬼臼毒素 (L9)、4'- 去甲异苦鬼臼毒酮 (L10)、 $\alpha$ - 足叶草素 (L11)、去氢鬼臼毒素 (L12)、4'- 去甲 - 去氢鬼臼毒素 (L13)、(一) - 松脂酚 (L14)、4'-demethyl-methylpodophyllotoxone (L15)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |           |
| 黄酮类 柠檬酚 (F1)、sinoflavonoid NB (F2)、nor- $\beta$ -anhydroicaritin (F3)、dysosmaflavone B (F4)、8- 异戊烯基山柰酚 (F5)、山柰酚 (F6)、山柰酚 -3- <i>O</i> - $\beta$ - 吡喃葡萄糖苷 (F7)、8, 2'- 二异戊烯基槲皮素 -3- 甲醚 (F8)、槲皮素 (F9)、芦丁 (F10)、6- 异戊烯基槲皮素 -3- 甲醚 (F11)、8- 异戊烯基槲皮素 -3- 甲醚 (F12)、8- 异戊烯基槲皮素 (F13)、槲皮素 -3- 甲醚 (F14)、podoverine A (F15)、sinoflavonoid P (F16)、sinoflavonoid Q (F17)、槲皮素 -3- <i>O</i> - $\beta$ - 吡喃葡萄糖苷 (F18)、topazolin (F19)、3'- 异戊烯基山柰酚 -3- 甲醚 (F20)、8- (3- 甲基 - 丁烯基) -2', 3'- (2-2- 二甲基吡喃) -5, 7, 4'- 三羟基 -3- 甲氧基黄酮 (F21)、7, 8- (2, 2- 二甲基吡喃) -2'- (3- 甲基 -2- 丁烯基) 5, 3', 4'- 三羟基 -3- 甲基黄酮 (F22)、sinoflavonoid B (F23)、podoverine B (F24)、podoverine C (F25)、5, 6- 二 -2', 3'- (2, 2- 二甲基 - 二羟基吡喃) -7, 4'- 二羟基 -3- 甲氧基 -3- 甲氧基黄酮 (F26)、sinoflavonoid A (F27)、sinoflavonoid NG (F28)、sinoflavonoid C (F29)、sinoflavonoid D (F30)、sinoflavonoid E (F31)、sinoflavonoid F (F32)、sinoflavonoid G (F33)、sinoflavonoid H (F34)、sinoflavonoid I (F35)、sinoflavonoid J (F36)、sinoflavonoid K (F37)、sinoflavonoid L (F38)、sinoflavonoid N (F39)、sinoflavonoid M (F40)、sinoflavonoid O (F41)、sinoflavonoid R (F42)、sinoflavonoid T (F43)、sinoflavonoid S (F44)、sinoflavonoid NF (F45)、sinoflavonoid U (F46)、sinoflavonoid V (F47)、sinoflavonoid W (F48)、sinoflavonoid X (F49)、sinoflavonoid Y (F50)、sinoflavonoid Z (F51)、sinoflavonoid NA (F52)、sinoflavonoid NC (F53)、sinoflavonoid ND (F54)、sinoflavonoid NE (F55)、sinoflavonoid NH (F56)、sinoflavonoid NI (F57)、山柰素 (F58)、鼠李素 (F59)、sinoflavonoidg A (F60)、sinoflavonoidg B (F61)、8, 2'- 二异戊烯基槲皮素 -3- 甲醚 -4- <i>O</i> - $\beta$ - 葡萄糖苷 (F62) |           |

## 2.8 Western blot 检测蛋白的表达

每组随机取 4 只小鼠的耳组织，研磨，离心取上清液，BCA 法测定总蛋白浓度。蛋白样品进行凝胶电泳，转至 PVDF 膜，封闭后加入一抗，4℃孵育过夜。加入二抗，室温孵育 1 h，显影，采用 Image J 软件对条带进行灰度分析。

## 2.9 统计学方法

采用 GraphPad Prism 软件进行分析，服从正态分布及方差齐性，组间比较采用单因素方差分析，不符合正态分布或方差不齐采用非参数检验。结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示， $P < 0.05$  即差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 桃儿七根茎和果实对模型小鼠体重和脏器指数的影响

与 CON 组相比，MOD 组体重和各脏器指数无显著性变化；与 MOD 组相比，DEX 组小鼠脾脏指数和胸腺指数显著降低，SHF-H 组脾脏指数明显升高，其他组体重和各脏器指数均无明显变化（见图 1）。

### 3.2 桃儿七根茎和果实对模型小鼠耳肿胀的影响

与 CON 组相比，MOD 组的右耳厚度和肿胀

度明显增加；与 MOD 组相比，SHR-H 和 SHF-H 组的右耳厚度显著减少；DEX、SHR-H 和 SHF-H 组的肿胀度明显降低。DEX、SHR-L、SHR-H、SHF-L 和 SHF-H 组抑制率分别为 35.65%、9.69%、42.74%、26.79%、36.82%（见表 3），说明 SHR-H 和 SHF-H 均可以明显降低模型小鼠耳肿胀程度。

### 3.3 桃儿七根茎和果实对模型小鼠耳组织病理学变化的影响

HE 染色结果显示，CON 组小鼠耳朵正反两面的皮肤表皮层和真皮层结构完好，未见异常，软骨细胞排列平整，皮下结缔组织排列紧密，组织中未见明显的炎症细胞浸润。MOD 组耳部皮肤增厚明显，结缔组织排列疏松，组织间隙增大，可见炎性细胞浸润。SHR-L 和 SHF-L 组耳组织表皮厚度减小不明显，结缔组织较为疏松。而 DEX、SHR-H 和 SHF-H 组小鼠耳组织表皮厚度明显降低，炎性细胞浸润变少，皮下结缔组织较为紧密（见图 2）。以上结果表明各治疗组均可不同程度改善二甲苯致小鼠耳组织病理损伤情况，以 SHR-H 和 SHF-H 组效果最佳。

### 3.4 桃儿七根茎和果实对模型小鼠耳组织炎症因子 mRNA 表达的影响

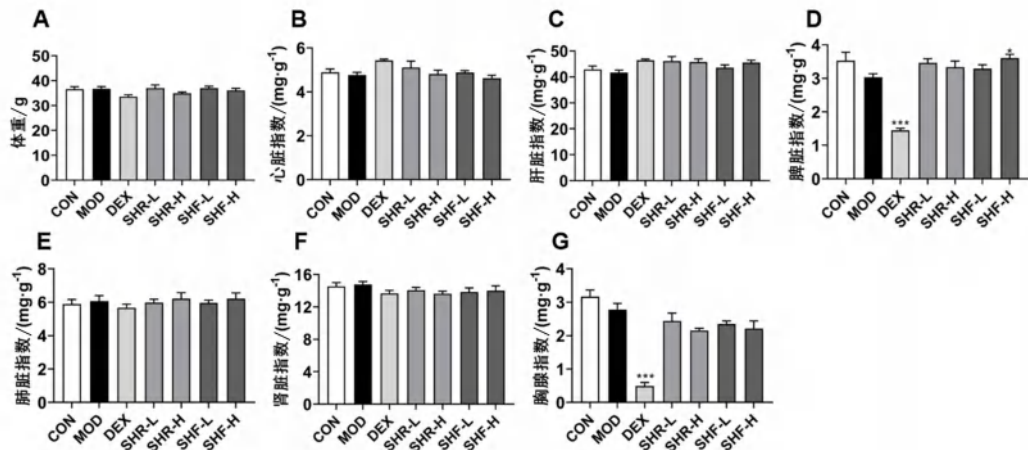


图 1 SHR 和 SHF 对小鼠体重和脏器指数的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

Fig 1 Effect of SHR and SHF on body weight and organ index of mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

注: 与 MOD 组比较, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the model group, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

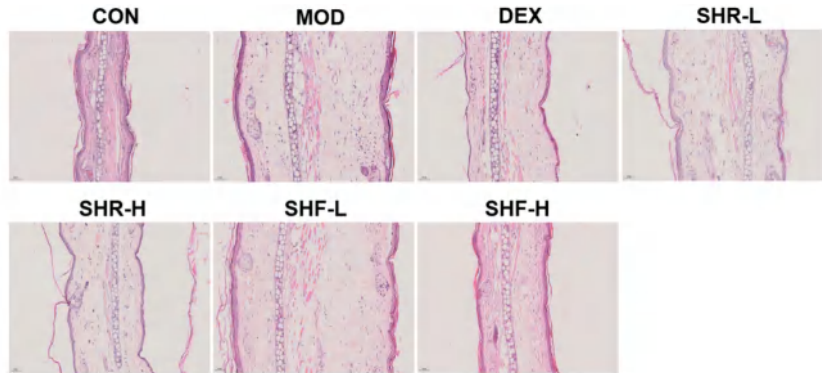


图 2 SHR 和 SHF 对小鼠耳组织病理学变化的影响 (HE,  $\times 200$ )

Fig 2 Effect of SHR and SHF on ear histopathology in mice (HE,  $\times 200$ )

表 3 SHR 和 SHF 对小鼠右耳厚度、肿胀度和抑制率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6 \sim 8$ )

Tab 3 Effect of SHR and SHF on right ear thickness, swelling degree, and inhibition rate of mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6 \sim 8$ )

| 组别      | 右耳厚度/mm               | 耳肿胀度/mg                | 抑制率/% |
|---------|-----------------------|------------------------|-------|
| CON 组   | $0.28 \pm 0.04$       | $0.33 \pm 1.32$        | —     |
| MOD 组   | $0.53 \pm 0.10^{***}$ | $19.97 \pm 4.12^{***}$ | —     |
| DEX 组   | $0.45 \pm 0.06$       | $12.85 \pm 2.72^*$     | 35.65 |
| SHR-L 组 | $0.50 \pm 0.07$       | $18.03 \pm 1.35$       | 9.69  |
| SHR-H 组 | $0.41 \pm 0.06^{**}$  | $11.43 \pm 3.45^{**}$  | 42.74 |
| SHF-L 组 | $0.46 \pm 0.08$       | $14.62 \pm 2.80$       | 26.79 |
| SHF-H 组 | $0.38 \pm 0.03^{***}$ | $12.62 \pm 4.66^*$     | 36.82 |

注: 与 CON 组比较, \*\*\* $P < 0.001$ ; 与 MOD 组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the control group, \*\*\* $P < 0.001$ ; compared with the model group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

与 CON 组相比, MOD 组小鼠耳组织中 *IL-6*、*IL-1 $\beta$* 、*TNF- $\alpha$*  和 *iNOS* mRNA 表达均明显升高; 与 MOD 组相比, SHR-H、SHF-L 和 SHF-H 组 *IL-6* mRNA 表达显著降低, SHF-H 组 *IL-1 $\beta$*  mRNA 表达明显降低, DEX、SHR-H 和 SHF-H 组 *TNF- $\alpha$*  mRNA 表达显著降低, SHF-L 和 SHF-H 组 *iNOS* mRNA 表

达显著降低 (见图 3)。以上结果说明, 与 SHR 相比, SHF 降低 *IL-6*、*IL-1 $\beta$*  和 *iNOS* mRNA 表达效果更强。

3.5 桃儿七根茎和果实水提取物对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞模型的影响

3.5.1 对 RAW264.7 细胞存活率和 NO 水平的影响

与 LPS 组相比,  $0.0625 \sim 4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  S-SHR、 $0.0625 \sim 1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  S-SHF、 $6.25 \sim 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  阳性药氢化可的松 (HSS) 对细胞存活率无明显影响, 说明该浓度下的待测提取物或化合物对 RAW264.7 细胞无毒性。NO 含量检测结果显示,  $0.0625 \sim 4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  S-SHR 和 S-SHF 可明显抑制细胞 NO 的释放。综合考虑细胞毒性和 NO 抑制率, 选取  $0.5$  和  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  S-SHR 和 S-SHF 进行深入研究 (见图 4)。

3.5.2 对 RAW264.7 细胞炎症因子 mRNA 表达的影响

与 CON 组相比, LPS 组中 *IL-6*、*IL-1 $\beta$* 、*TNF- $\alpha$* 、*COX-2* 和 *iNOS* mRNA 表达水平升高; 与 LPS 组相比, HSS、S-SHR ( $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 和 S-SHF ( $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 组中 *IL-6* mRNA 表达水平显著降低, HSS、S-SHR ( $0.5$  和  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 和 S-SHF ( $0.5$  和  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 组中 *IL-1 $\beta$* 、*COX-2* 和 *iNOS* mRNA 表达水平明显降



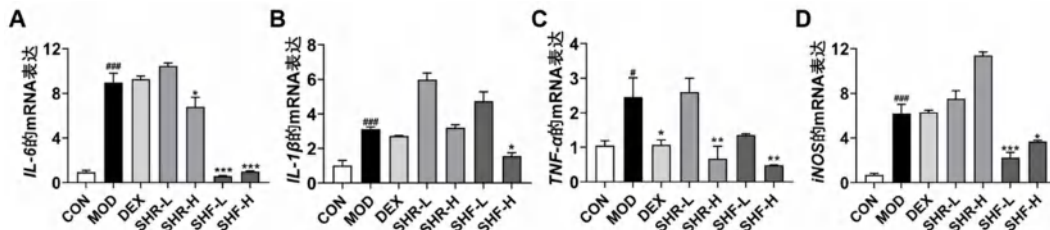


图 3 SHR 和 SHF 对小鼠耳组织中炎症因子 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ )

Fig 3 Effect of SHR and SHF on mRNA expression of inflammatory factors in ear tissue of mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ )

注: 与 CON 组比较,  $^*P < 0.05$ ,  $^{###}P < 0.001$ ; 与 MOD 组比较,  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ 。

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

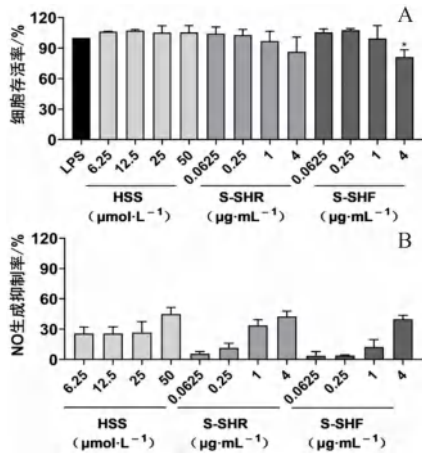


图 4 S-SHR 和 S-SHF 对 RAW264.7 细胞存活率和 NO 生成抑制率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig 4 Effect of S-SHR and S-SHF on survival rate and inhibition rate of NO production of RAW264.7 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

注: 与 LPS 组比较,  $^*P < 0.05$ 。

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

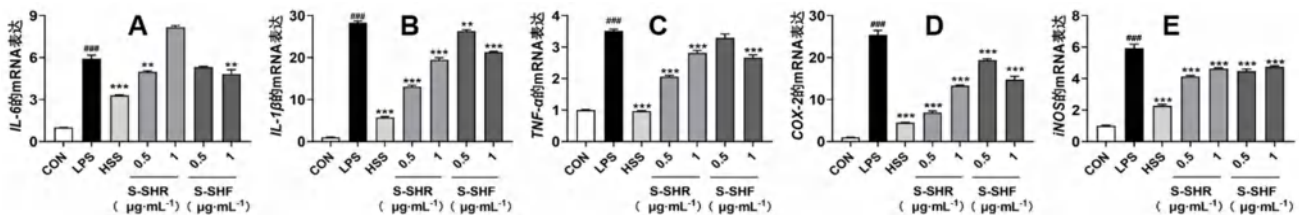


图 5 S-SHR 和 S-SHF 对 RAW264.7 细胞炎症因子 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig 5 Effect of S-SHR and S-SHF on mRNA expression of inflammatory factors in RAW264.7 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

注: 与 CON 组比较,  $^{###}P < 0.001$ ; 与 LPS 组比较,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ 。

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

著上调; 与 MOD 组相比, SHR-H 和 SHF-H 组耳组织中 TLR4、p-I $\kappa$ B/I $\kappa$ B 和 p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B 的表达水平显著降低 (见图 7)。

与 CON 组相比, MOD 组可显著上调 p-JNK/JNK 的表达水平; 与 MOD 组相比, SHR-H 组和 SHF-H 组 p-p38/p38 和 p-ERK/pERK 的表达无显著性变化, 而 SHR-H 组 p-JNK/JNK 表达水平显著下调, SHF-H 不影响 p-JNK/JNK 的表达 (见图 8)。以上结果说明, SHR 和 SHF 均可以抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路激活, 同时 SHR 也可以通过抑制

低, HSS、S-SHR (0.5 和  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 和 S-SHF ( $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 组中 TNF- $\alpha$  mRNA 表达水平显著降低 (见图 5)。以上结果说明, S-SHR 和 S-SHF 均可以明显降低 RAW264.7 细胞炎症因子的 mRNA 表达。

### 3.6 网络药理学和分子对接预测桃儿七的抗炎作用机制

网络药理学结果显示, 桃儿七的活性成分主要包括木脂素类和黄酮类, 如鬼臼毒素、山柰酚和槲皮素等, 可调节 ALOX5、CYP2C8、RELA、NF $\kappa$ B1、TNF- $\alpha$  和 IL-6 等核心靶点, 调控 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 等信号通路。分子对接结果显示, 桃儿七中部分黄酮类成分可以与 NF- $\kappa$ B p65 (RELA)、ALOX5 等炎症相关蛋白结合 (见图 6)。

### 3.7 Western blot 验证桃儿七根茎和果实对 TLR4/NF- $\kappa$ B 和 MAPK 信号通路中蛋白表达的影响

与 CON 组相比, MOD 组小鼠耳组织中 TLR4、p-I $\kappa$ B/I $\kappa$ B 和 p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B 的表达水平显

JNK 的活化发挥抗炎作用。

### 3.8 桃儿七根茎和果实主要成分 QUE、KAE 和 POD 对 RAW264.7 细胞的影响

#### 3.8.1 对 RAW264.7 细胞存活率和 NO 水平的影响

与 LPS 组相比,  $3.125 \sim 25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  QUE 和 KAE 对细胞存活率无明显影响, 说明该浓度下的待测化合物对 RAW264.7 细胞无毒性。NO 含量检测结果显示 QUE、KAE 和 POD 可明显抑制细胞 NO 的释放,  $IC_{50}$  值分别是 ( $8.01 \pm 2.79$ )、( $9.45 \pm 0.39$ ) 和 ( $0.15 \pm 0.01$ )  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。综合考虑细胞毒性和 NO

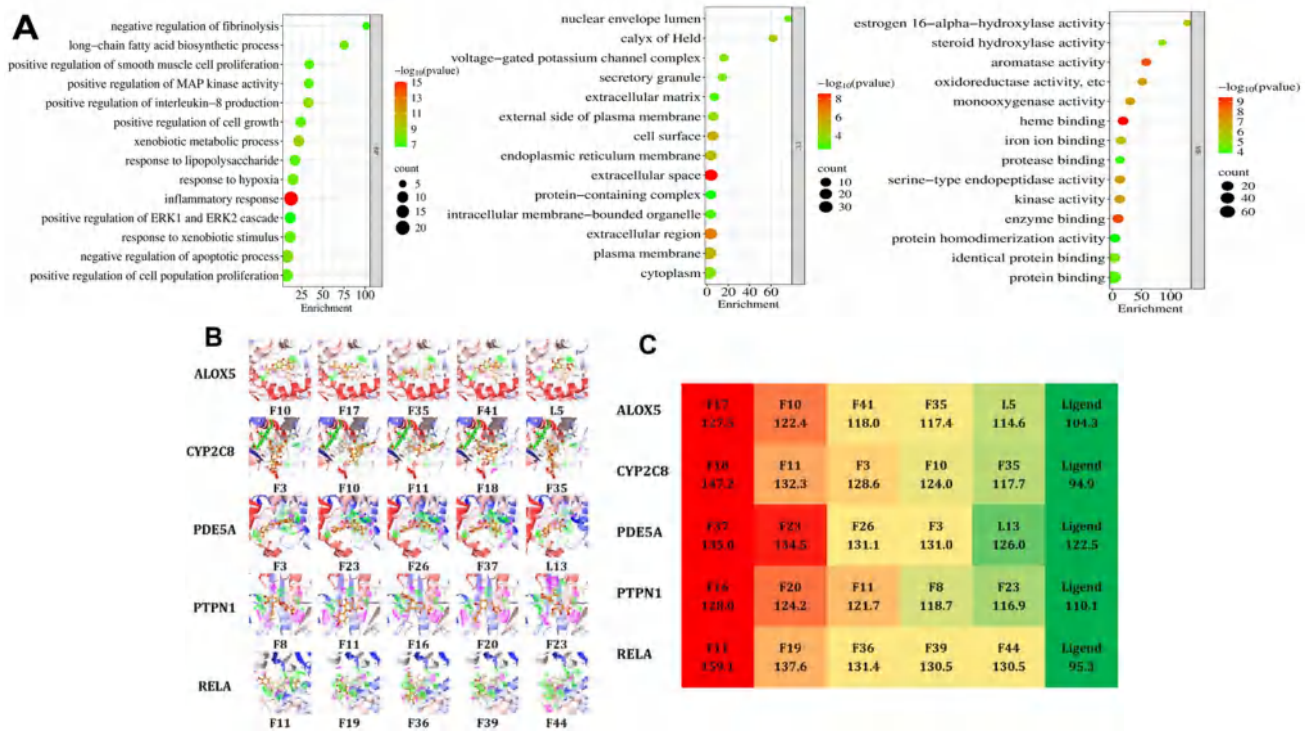


图 6 网络药理学和分子对接预测桃儿七发挥抗炎作用的靶点和信号通路

Fig 6 Prediction of targets and signaling pathways for the anti-inflammatory effect of Podophyllum hexandrum by using network pharmacology and molecular docking

注：(A) GO 生物功能富集结果，(B) 活性成分与核心靶点蛋白对接图，(C) 活性成分与核心靶点蛋白对接的热图。

Note: (A) Biological function enrichment results of GO, (B) Docking map of active ingredients and core target proteins, (C) Heat map of the docking of the active ingredient with the core target protein.

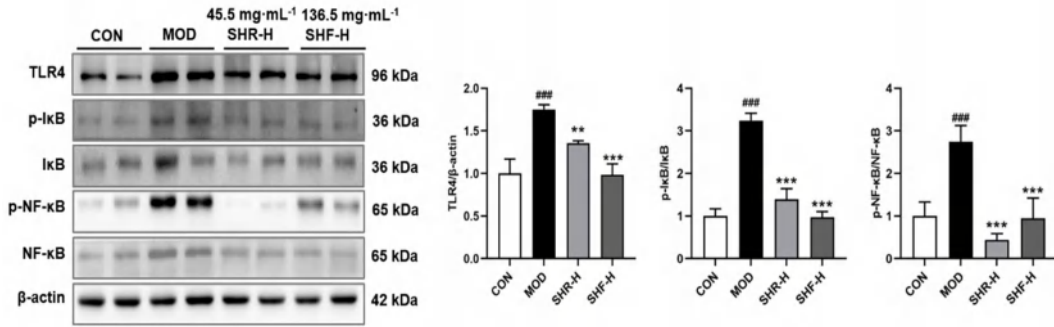


图 7 SHR 和 SHF 对小鼠耳组织 TLR4/NF-κB 信号通路相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ )

Fig 7 Effect of SHR and SHF on expression of TLR4/NF-κB signaling pathway-related protein in ear tissue of mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ )

注：与 CON 组比较， $^{###}P < 0.001$ ；与 MOD 组比较， $^{**}P < 0.01$ ， $^{***}P < 0.001$ 。

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

抑制率，选取 QUE 和 KAE ( $5, 10$  和  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 进行后续研究 (见图 9)。

**3.8.2 对 RAW264.7 细胞炎症因子 mRNA 水平的影响** 与 CON 组相比，LPS 组中 *IL-6*、*IL-1β*、*COX-2* 和 *iNOS* mRNA 表达水平升高；与 LPS 组相比，HSS、QUE ( $5, 10$  和  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和 KAE 组 ( $5, 10$  和  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的 *IL-6*、*IL-1β*、*COX-2* 和 *iNOS* mRNA 表达水平均降低 (见图 10)。结果表明，QUE 和 KAE 均可降低炎症因子的 mRNA 表达。

#### 4 讨论

炎症是机体对于刺激的一种防御反应<sup>[16]</sup>，表现为红、肿、热、痛和功能障碍。二甲苯诱导小鼠耳肿胀模型是典型的急性炎症模型<sup>[17]</sup>，此模型能有效模拟急性炎症过程，其炎症特征与人类急性皮肤炎症相似，虽存在局限性，但可为初步探究提供有力支撑，目前已经成为抗炎药物筛选的经典动物模型，广泛应用于中药成分的活性评价<sup>[18-20]</sup>。

本研究利用二甲苯诱导小鼠耳肿胀模型，深入研究了桃儿七根茎与果实的抗炎特性，实验结果揭示了多方面关键信息，具有重要的学术与应用价

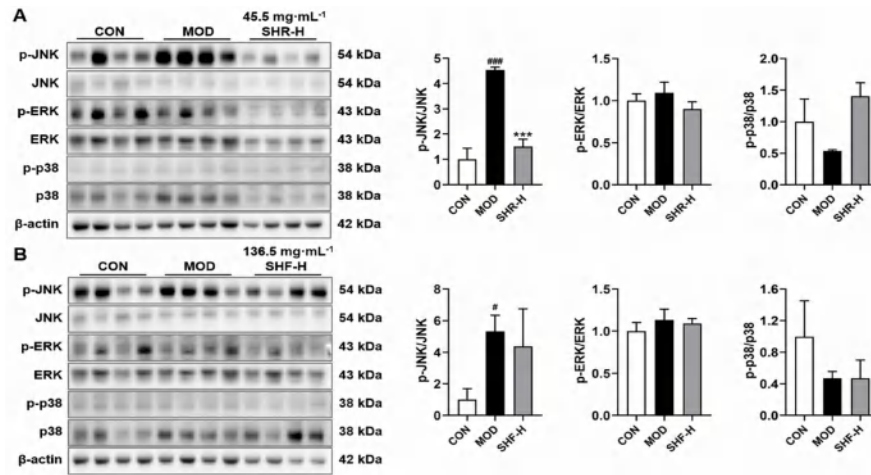


图 8 SHR 和 SHF 对小鼠耳组织 MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ )

Fig 8 Effect of SHR and SHF on expression of MAPK signaling pathway-related protein in ear tissue of mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ )

注: 与 CON 组比较,  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{###}P < 0.001$ ; 与 MOD 组比较,  $^{***}P < 0.001$ 。

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

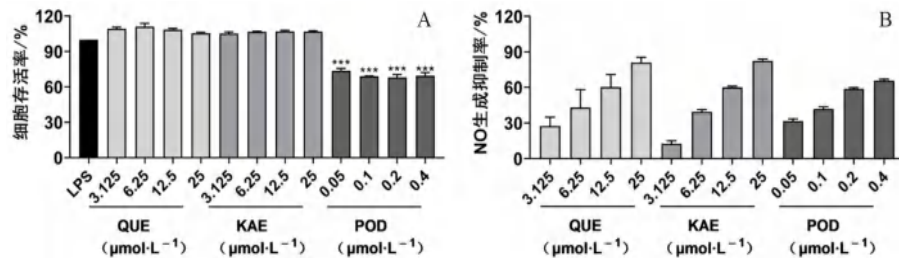


图 9 QUE、KAE 和 POD 对 RAW264.7 细胞存活率和 NO 抑制率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig 9 Effect of QUE, KAE and POD on survival rate and NO inhibition rate of RAW264.7 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

注: 与 LPS 组比较,  $^{***}P < 0.001$ 。

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

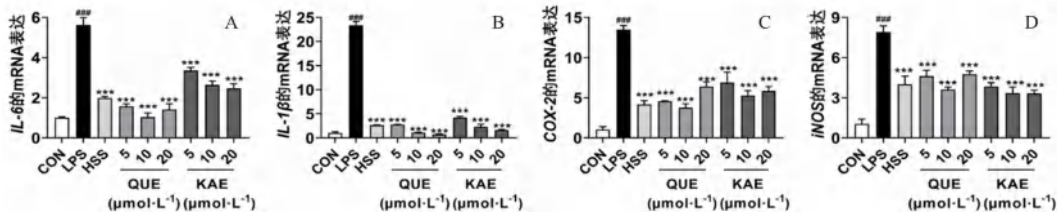


图 10 QUE、KAE 和 POD 对 RAW264.7 细胞炎症因子 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig 10 Effect of QUE, KAE and POD on mRNA expression of inflammatory factors in RAW264.7 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

注: 与 CON 组比较,  $^{###}P < 0.001$ ; 与 LPS 组比较,  $^{***}P < 0.001$ 。

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

值。首先,在抗炎作用表现上,体内实验中桃儿七根茎和果实高剂量组对二甲苯诱导的小鼠耳肿胀均有抑制作用,这一作用与对炎症因子 mRNA 表达的调控密切相关。然而,两者在特定炎症因子 ( $IL-1\beta$ 、 $IL-6$  和  $iNOS$ ) 抑制上存在差异,表明其体内抗炎作用机制存在不同。体外实验中,根茎和果实水提取物在合适浓度下均可抑制 LPS 诱导的 NO 释放和促炎因子表达,但在细胞存活率和 NO 释放方面呈现不同特征,体现了两者在细胞水平抗炎作用的独特性,这可能源于化学成分的差异<sup>[21-22]</sup>。

其次,在信号通路调控层面,网络药理学和

分子对接实验结果提示桃儿七活性成分通过调控 TLR4/NF- $\kappa$ B 和 MAPK 通路发挥抗炎作用。TLR4/NF- $\kappa$ B 和 MAPK 是常见的炎症通路,与多种中药的抗炎作用有密切关系<sup>[23-24]</sup>。多种黄酮类和木脂素类成分可通过 TLR4/NF- $\kappa$ B 和 MAPK 通路发挥抗炎作用<sup>[25-26]</sup>。本研究 Western blot 实验结果表明桃儿七根茎和果实均可抑制 TLR4、p-I $\kappa$ B/I $\kappa$ B 和 p-NF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B 的表达,同时根茎可以抑制 p-JNK/JNK 的表达,提示根茎和果实对 TLR4/NF- $\kappa$ B 和 MAPK 信号通路的干预存在差异。

最后,本文虽已研究了桃儿七部分主要成



分,但鉴于其复杂性,仍有未知成分的抗炎作用有待深入挖掘。此外,炎症信号网络复杂,除本文已研究的信号通路外,可进一步利用蛋白质组学、转录组学等方法探究作用靶点与分子机制,以全面揭示其抗炎分子调控网络,从而为桃儿七的药用开发与临床应用开辟更广阔的前景。

## 参考文献

- [1] 宋小妹,刘海静.太白七药研究与应用[M].北京:人民卫生出版社,2011:239-240.
- [2] 中国药典 2020 年版.一部[S].2020:48.
- [3] 熊文勇.濒危植物桃儿七化学成分及其资源研究[D].西安:西北大学,2010.
- [4] 尚明英,孔越,肖军军,等.小叶莲提取物及其用途:200910092769 X[P].2011-08-31.
- [5] 措吉,马抓西.小叶莲灌洗治疗阴道炎的临床疗效[J].世界临床药物,2014,35(11):689.
- [6] 孙彦君,孙印石,王俊敏,等.小叶莲中两个具有降血脂活性的新异戊烯基化黄酮类化合物的制备方法:201410117238.2[P].2015-06-10.
- [7] 严王惠.丹参复方降血压的网络药理学探讨及实验验证[D].合肥:合肥工业大学,2019.
- [8] 盘涌,柳贤福,李本杰,等.壮药白苞蒿抗炎活性部位筛选及机制研究[J/OL].中药药理与临床,1-16.[2025-06-03].<https://doi.org/10.13412/j.cnki.zyyl.20241115.008>.
- [9] 熊远珍.实验动物与人用药量的新换算[J].江西医学院学报,1997,(4):41.
- [10] 肖文喜,扶丽君,朱红霖,等.清热消炎宁对急性咽炎大鼠模型的抗炎作用[J].中南药学,2024,22(11):2899-2904.
- [11] 潘景芝,金莎,刘雅婧,等.刺五加多糖镇痛抗炎作用及其免疫调节机制的研究[J].上海中医药杂志,2019,53(10):74-82.
- [12] 许仕景,薛瑞,李长伟,等.金桂花中化学成分及其抗神经炎活性研究[J].中草药,2025,56(8):2764-2772.
- [13] 宗明月.芫花根中倍半萜类成分的抗炎活性及机制研究[D].烟台:烟台大学,2021.
- [14] 李新宇,郭羽晨,李铁军.cGAMP通过激活PI3K-AKT通路减轻小鼠脑缺血恢复期的损伤[J].中南药学,2024,22(5):1207-1212.
- [15] 陶瑾,姜民,陈露莹,等.基于中药性味理论和网络药理学方法的治疗消渴方药作用机制研究[J].药学报,2017,52(2):236-244.
- [16] 赵静涵,朱正望,王琳琳,等.药食同源保肝中药的抗炎抗氧化作用[J].中国实验方剂学杂志,2025,31(7):293-301.
- [17] 谷捷,李鑫,余黄合,等.二甲苯致小鼠耳肿胀急性炎症模型的建立[J].湖南中医药大学学报,2016,36(5):32-35.
- [18] He XR, Yang Y, Yuan XF, et al. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of the ethyl acetate extract of *Belamcanda chinensis* (L.) Redouté in Raw 264.7 cells in vitro and mouse model in vivo[J]. J Pain Res, 2022, 15: 1221-1232.
- [19] Zhang ZW, Jiang SQ, Tian HQ, et al. Ethyl acetate fraction from *Nymphaea hybrida* Peck modulates inflammatory responses in LPS-stimulated RAW 264.7 cells and acute inflammation murine models[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 269: 113698.
- [20] Tian MY, Xie D, Hong Y, et al. Anti-inflammatory Effect and related mechanisms in vitro and in vivo of *Hedychium coccineum* rhizome essential oil[J]. J Ethnopharmacol, 2024, 328: 118103.
- [21] 尚明英,李军,蔡少青,等.藏药小叶莲的化学成分研究[J].中草药,2000,31(8):569-571.
- [22] 王嵩华,刘广学,徐风,等.小叶莲化学指纹图谱研究[J].中国中药杂志,2013,38(20):3528-3533.
- [23] 杜羽佳,任娅迪,庄严,等.基于NF- $\kappa$ B/NLRP3炎症小体信号通路探讨胃癌前病变的发病机制及胃复春胶囊的作用机制[J].中国中药杂志,2025,50(5):1236-1246.
- [24] 朱德伟,余群,周利红,等.MAPKs通路在炎性肠病-结直肠癌中的作用及中药干预研究进展[J].中成药,2022,44(11):3572-3578.
- [25] 徐崇,何敬愉,梁爽成.基于网络药理学和分子对接分析甘草黄酮类成分的美白抗炎作用机制[J].香料香精化妆品,2024,(3):52-61.
- [26] 何嘉郡,秦晨,贺廉清,等.黄芪黄酮类成分及其药理作用研究[J].辽宁中医药大学学报,2024,26(1):112-119.

(收稿日期:2024-12-10;修回日期:2025-03-15)

# 新型 EGFR 小分子抑制剂的设计、合成及生物活性评价

祁宇<sup>1, 2</sup>, 白海云<sup>2, 3\*</sup> (1. 安徽中医药大学 药学院, 合肥 230012; 2. 长三角药物高等研究院, 江苏 南通 226100; 3. 南通弘烨医药科技有限公司, 江苏 南通 226133)

**摘要:** **目的** 通过结构优化和药物设计策略开发具有新型作用机制的高效表皮生长因子受体 (EGFR) 小分子抑制剂。**方法** 以专利 CN116249690A 中实施例 40 (BGB-40) 为先导化合物, 通过大环化技术设计并合成了一系列 EGFR 小分子抑制剂, 并进行酶活性评价及细胞抗增殖活性评价。**结果** 本研究共设计并合成 6 个新型 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂 (TKIs), 通过 <sup>1</sup>H NMR 和 LC-MS 对化合物 I 至 VI 的结构进行了表征与验证。药理实验结果显示化合物 IV 抑制活性较佳, 酶活性半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 值分别为  $0.18 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $1.04 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 细胞抗增殖活性半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 值分别为  $6.26 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $4.96 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。**结论** 以化合物 BGB-40 为先导化合物, 借鉴化合物 A29 的大环化策略, 设计并合成了 6 种大环 EGFR 抑制剂。其中化合物 IV 和 VI 展现了较为优异的酶活性和细胞增殖抑制能力。本研究为未来开发新型 EGFR 突变抑制剂提供参考依据。**关键词:** 新型 EGFR 抑制剂; 有机合成; 抗肿瘤活性; 表皮生长因子受体

中图分类号: R914.5, R965.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)06-1517-07  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.004

## Design, synthesis, and evaluation of biological activity of novel EGFR inhibitors

QI Yu<sup>1, 2</sup>, BAI Hai-yun<sup>2, 3\*</sup> (1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute, Nantong Jiangsu 226100; 3. Nantong Hongye Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Nantong Jiangsu 226133)

**Abstract: Objective** To address the clinical challenge of epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeted drug resistance in the treatment of non-small cell lung cancer, and to design highly efficient EGFR small molecule inhibitors via structure optimization and drug design strategies. **Methods** The compound described in example 40 (BGB-40) of patent CN116249690A was selected as the leading compound. Macrocyclization technology was used to design and synthesize a series of small molecule EGFR inhibitors, and their pharmacological activities were evaluated. **Results** Six novel EGFR small molecule inhibitors were successfully synthesized, and their structures were rigorously confirmed with <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and LC-MS. **Conclusion** Based on the compound BGB-40 as the lead compound and inspired by the macrocyclization strategy of compound A29, six macrocyclic EGFR inhibitors were designed and synthesized. Among these compounds, IV and VI exhibited relatively superior enzymatic activity and cell proliferation inhibitory capacity. This study offers a valuable reference for the future development of novel EGFR mutant inhibitors.

**Key words:** novel EGFR inhibitor; organic synthesis; antitumor activity; epidermal growth factor receptor

表皮生长因子受体 (EGFR) 是上皮生长因子 (EGF) 细胞增殖和信号传导的受体, 是跨膜受体 ErbB 家族成员之一<sup>[1]</sup>。EGFR 与配体结合后, EGFR 二聚化而被激活, 随后引起酪氨酸残基的

自磷酸化, 激活下游信号传导, 引起细胞增殖、生长和分化<sup>[2]</sup>。通常 EGFR 过表达或突变会导致非小细胞肺癌 (NSCLC) 的发生。其中 EGFR<sup>del19</sup> 和 EGFR<sup>L858R</sup> 这两种突变占据 EGFR 突变的 85%

作者简介: 祁宇, 女, 硕士研究生, 主要从事药物化学研究, email: qy207498@163.com \*通信作者: 白海云, 男, 硕士研究生导师, 主要从事小分子新药的设计和研发, email: hybai@bio-polar.com

以上<sup>[3]</sup>, 是 NSCLC 的常见致病因素<sup>[4-6]</sup>。EGFR 酪氨酸激酶抑制剂 (TKIs) 通过胞内占据 ATP 结合位点, 从而阻断 EGFR 信号通路的转导, 已经成为抑制 NSCLC 发展的有效途径。

目前, 已经上市的第一代 EGFR TKIs 如吉非替尼、埃克替尼等和第二代抑制剂阿法替尼、达克替尼等, 主要针对 L858R 突变和 *del19* 缺失的患者<sup>[7]</sup>, 但 T790M 突变降低一二代抑制剂的治疗效果<sup>[8]</sup>。第三代抑制剂的奥希替尼主要针对 T790M 突变的患者, 有效地延长了患者的无进展生存期; 但第三代抑制剂的长期使用也带来了新的耐药问题, EGFR 激酶中关键位点 Cys797 突变为 Ser797, 导致第三代抑制剂无法与其共价结合, 进而产生耐药性<sup>[3, 9-10]</sup>。为了克服这一耐药机制, 目前在积极探索新型 EGFR TKIs 的研发。目前大部分的第四代 EGFR 抑制剂是基于 Brigatinib 的结构优化改造而得, 为了进一步了解 Brigatinib 与突变型 EGFR (L858R/T790M/C797S) 蛋白 (PDB: 6LUD) 之间的结合关系, 本课题组前期对其进行了分子对接模拟, 见图 1。对接结果显示 Brigatinib 与蛋白的结合呈现出典型的 U 型模式, 可尝试在二甲氧基化膦所在苯环和甲氧基所在苯环之间引入大环, 大环策略可锁定活性构象 (U 型模式) 降低结合自由能, 而且在此区域引入大环, 环链可以更好地占据疏水口袋空间, 提高化合物的活性。

中国专利 CN116249690A 中披露了一种创新的 EGFR 抑制剂系列, 其中化合物 A (实施例 40, BGB-40) 展现了对 EGFR 多重突变体 (EGFR<sup>del19/T790M/C797S</sup> 和 EGFR<sup>L858R/T790M/C797S</sup>) 的高选择性和增殖抑制活性, 其半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 值分别为  $5.69 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$

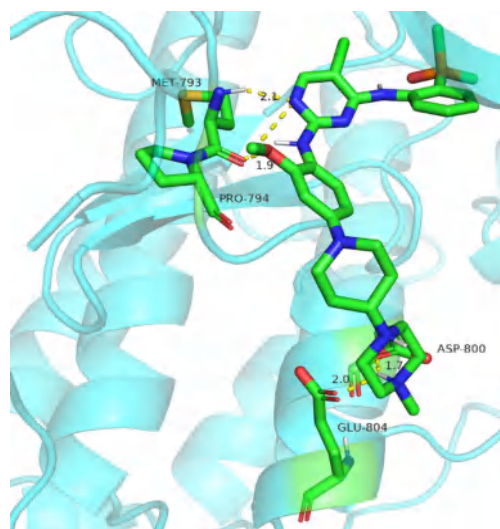


图 1 Brigatinib 与 EGFR<sup>L858R/T790M/C797S</sup> 对接示意图

Fig 1 Schematic representation of the interaction between Brigatinib and EGFR<sup>L858R/T790M/C797S</sup> mutations

和  $13.03 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[11-12]</sup>, 这些数据表明, 化合物 A (BGB-40) 在克服耐药性问题上具有巨大潜力。另一项专利 WO2021216440 中采用大环化策略设计一系列 EGFR 小分子抑制剂, 其中 A29 分子对 EGFR<sup>L858R/T790M/C797S</sup> 的抑制活性尤为突出, 其  $IC_{50}$  值为  $0.50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[13]</sup>。这一发现不仅验证了大环策略在提高 EGFR 抑制剂选择性和活性方面的有效性, 也为后续药物设计提供了新的思路。基于上述研究成果, 本研究以化合物 A (BGB-40) 为先导化合物, 设计并合成了 6 个新型的大环 EGFR 小分子抑制剂 (结构见图 2), 主要针对 EGFR 多重突变体 (EGFR<sup>del19/T790M/C797S</sup> 和 EGFR<sup>L858R/T790M/C797S</sup>)。经过对其进行生物活性评价, 其中化合物 IV 抑制活性较佳,  $IC_{50}$  值分别为  $0.18 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $1.04 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

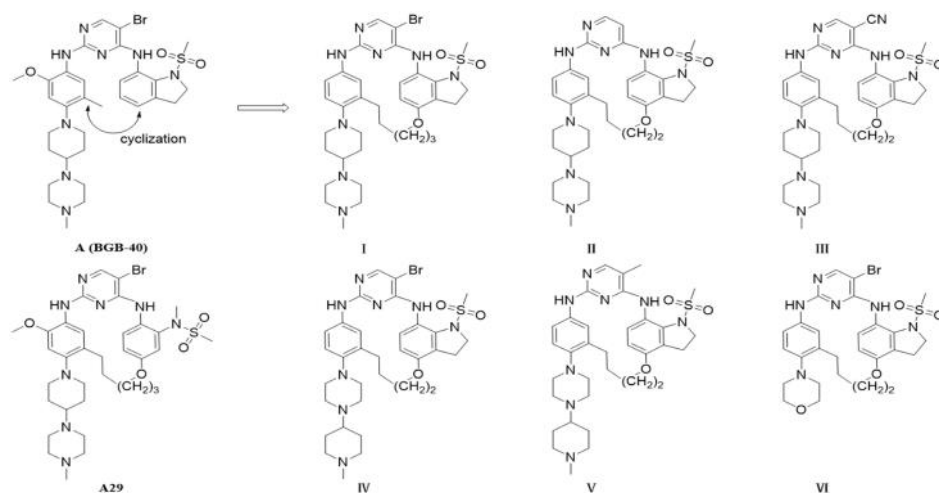


图 2 化合物 A、A29 以及 I ~ VI 的结构

Fig 2 Structures of compounds A and A29 and I ~ VI

## 1 材料

FA1204C-SCS 型电子天平 (上海精科天美科学仪

器有限公司); 85-2A 型磁力搅拌器 (上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司); 400 MHz 型核磁共振波谱仪 [二



甲基亚砜 (DMSO)- $d_6$  或氘代氯仿 (chloroform- $d$ ) 为溶剂, 四甲基硅烷 (TMS) 为内标, Bruker 公司], 1260 型液相-质谱联用仪 (美国安捷伦公司); 快速制备色谱仪 [拜泰齐贸易 (上海) 有限公司], 柱色谱硅胶 (75 ~ 150  $\mu\text{m}$ ) 和薄层层析硅胶板 (青岛海浪硅胶干燥剂有限公司), 暗箱紫外分析仪 (杭州齐威仪器有限公司)。所用试剂均为分析纯或化学纯。生物

活性测试部分所有试剂均购自 HTRF KinEASE STK Discovery kit (Cisbio), 包括 XL665 标记物、TK-s 底物、特异性抗体及其他相关缓冲液。Ba/F3 细胞美国细胞培养物收藏中心 (ATCC)。

## 2 方法与结果

### 2.1 合成方法

化合物 I 的合成路线见图 3。

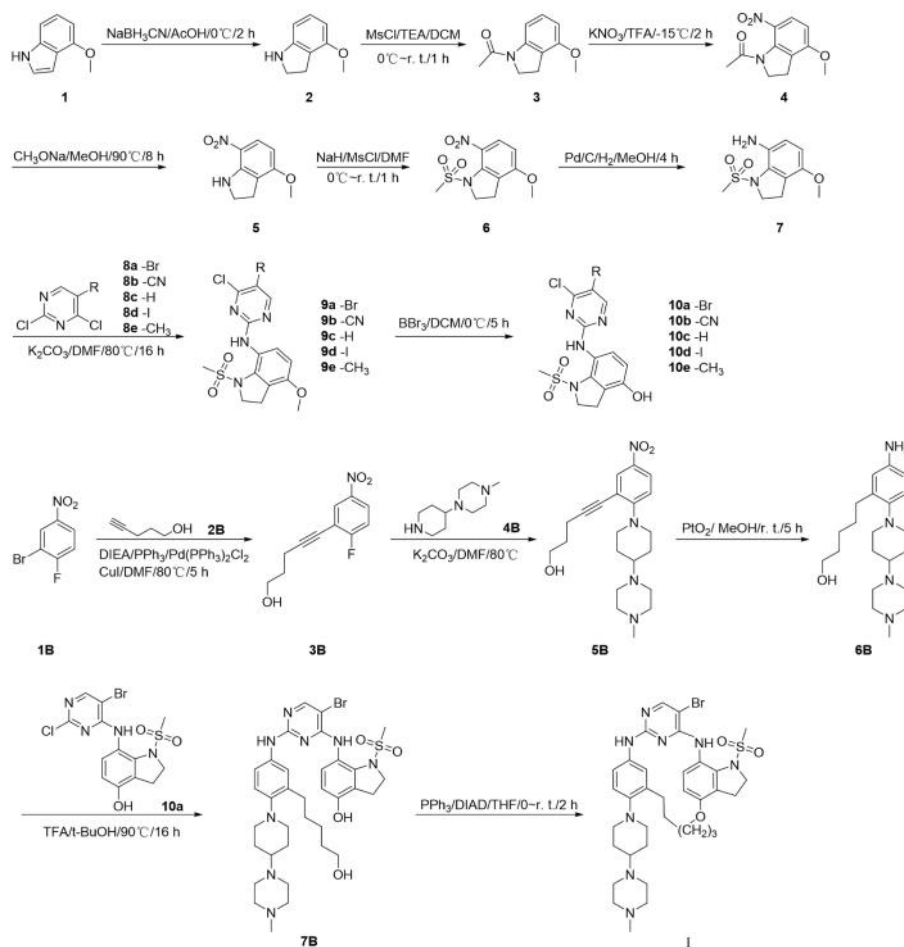


图 3 化合物 I 的合成路线

Fig 3 Synthetic pathway of compound I

**2.1.1 化合物 2 的制备与鉴定** 将化合物 1 (10.00 g, 67.99 mmol) 置于 50 mL 茄形瓶中, 加入 20 mL 冰乙酸 (AcOH) 作为反应溶剂, 在冰水浴中搅拌 5 min, 随后分批次加入氰基硼氢化钠 ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ , 12.81 g, 20.40 mmol), 加入完毕后撤去冰浴, 反应 2 h, 薄层色谱 (TLC) 监测反应结束。向反应液中少量多次加水, 淬灭  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ , 用水、二氯甲烷 (DCM) 萃取 (20 mL $\times$ 2), 无水硫酸钠 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 干燥有机相, 浓缩去除溶剂; 将粗品用 DCM 溶解, 在冰浴下用 5 mol  $\cdot$  L $^{-1}$  的氢氧化钠 (NaOH) 溶液调 pH 至弱碱性, 用水、DCM 萃取 (20 mL $\times$ 2), 无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥有机相, 浓缩去除溶剂。得到 9.00 g 粗品化合物 2, 收率 88.79%, 粗品直接用于下一步。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, chloroform- $d$ )  $\delta$ : 7.03 (t,  $J$  =

7.9 Hz, 1H), 6.35 (dd,  $J$  = 13.9, 8.0 Hz, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.60 (t,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 3.02 (t,  $J$  = 8.4 Hz, 2H)。

**2.1.2 化合物 3 的制备与鉴定** 将化合物 2 (9.00 g, 60.37 mmol) 置于 50 mL 的茄形瓶中, 加入 20 mL DCM, 冰水浴条件下缓慢滴加三乙胺 (18.33 g, 181.11 mmol)、乙酰氯 (7.11 g, 90.56 mmol), 在室温条件下反应 1 h, TLC 监测反应结束。在冰水浴条件下少量多次加水, 淬灭乙酰氯, 用水、DCM 萃取 (20 mL $\times$ 2), 无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥有机相, 浓缩去除溶剂。所得粗品经柱层析纯化共得到 9.50 g 化合物 3, 收率 82.35%。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, chloroform- $d$ )  $\delta$ : 7.85 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 7.18 (t,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 6.59 (d,  $J$  = 8.3 Hz,

1H), 4.07 (t,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.12 (t,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 2.23 (s, 3H)。

**2.1.3 化合物 4 的制备与鉴定** 将化合物 3 (9.50 g, 49.71 mmol) 置于 100 mL 双口圆底烧瓶中, 用翻口橡胶塞插入低温温度计, 加入 50 mL 三氟乙酸 (TFA) 作为溶剂, 待反应体系温度稳定至  $-15^{\circ}\text{C}$  后, 缓慢滴加硝酸钾 ( $\text{KNO}_3$ , 5.00 g, 49.71 mmol), 在恒温  $-15^{\circ}\text{C}$  条件下反应 2 h, TLC 监测反应结束。减压浓缩除去 TFA, 随后冰水浴下用  $5\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaOH 溶液调 pH 至弱碱性, 用水、乙酸乙酯 (EA) 萃取 ( $20\text{ mL} \times 2$ ), 无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥有机相, 浓缩去除溶剂。所得粗品经柱层析纯化得到 4.00 g 黄色固体化合物 4, 收率 34.08%。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, chloroform- $d$ )  $\delta$ : 7.78 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H), 6.66 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H), 4.26 (t,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.11 (t,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 2.27 (s, 3H)。

**2.1.4 化合物 5 的制备与鉴定** 将化合物 4 (4.00 g, 16.94 mmol) 置于 50 mL 茄形瓶中, 加入 50 mL 甲醇 (MeOH) 作为反应溶剂, 将甲醇钠 ( $\text{CH}_3\text{ONa}$ , 4.58 g, 84.71 mmol) 加入茄形瓶中, 加热至  $90^{\circ}\text{C}$  反应 8 h, TLC 监测反应结束。在冰水浴条件下少量多次加水, 淬灭甲醇钠, 用水、DCM 萃取 ( $20\text{ mL} \times 2$ ), 无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥有机相, 浓缩去除溶剂。所得粗品经柱层析纯化得到 2.80 g 黄色固体化合物 5, 收率 85.71%。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, chloroform- $d$ )  $\delta$ : 7.88 (d,  $J = 9.4$  Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 6.29 (d,  $J = 9.4$  Hz, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.89 (t,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 3.09 (t,  $J = 8.8$  Hz, 2H)。

**2.1.5 化合物 6 的制备与鉴定** 将化合物 5 (2.80 g, 14.43 mmol) 置于 50 mL 三口烧瓶中, 置换  $\text{N}_2$ , 用注射器注入 15 mL 无水  $N,N$ -二甲基甲酰胺 (DMF) 作为反应溶剂, 在冰水浴条件下搅拌至  $0^{\circ}\text{C}$ , 在搅拌 5 min, 在  $\text{N}_2$  下, 少量多次的加入氢化钠 (NaH, 含量 60%) (1.04 g, 43.28 mmol) 至反应体系中, 搅拌 10 min, 将甲磺酰氯 ( $\text{MsCl}$ , 2.48 g, 21.64 mmol) 与 5 mL 无水 DMF 充分溶解后用注射器在  $0^{\circ}\text{C}$  条件下缓慢注射到反应体系中, 室温下反应 1 h, TLC 监测反应结束。反应结束后在  $0^{\circ}\text{C}$  条件下少量多次加水, 淬灭 NaH, 用水、EA 萃取 ( $20\text{ mL} \times 2$ ), 将有机相合并, 再用饱和氯化铵溶液洗涤 ( $20\text{ mL} \times 3$ ), 无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥有机相, 浓缩去除溶剂。所得粗品经柱层析纯化得到 2.54 g 黄色固体化合物 6, 收率 64.71%。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, chloroform- $d$ )  $\delta$ : 7.93 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H), 6.71 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H), 4.28 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.27 (s, 3H),

3.12 ~ 3.05 (m, 2H)。

**2.1.6 化合物 7 的制备与鉴定** 将化合物 6 (2.54 g, 9.34 mmol) 置于 50 mL 茄形瓶中, 加入 50 mL MeOH 作为溶剂, 置换  $\text{N}_2$ , 加入无水钯碳 ( $\text{Pd/C}$ , 0.25 g), 置换成  $\text{N}_2$  后再次置换  $\text{H}_2$ , 室温反应 5 h, LC-MS 监测反应结束。在布氏漏斗中加入硅藻土, 将反应液中钯碳过滤, 保持硅藻土湿润且用甲醇洗涤, 将滤液减压浓缩, 得到 1.96 g 棕色油状化合物 7, 收率 86.72%, 该粗品直接用于下一步。ESI-MS:  $m/z$  243.1  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ,  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, chloroform- $d$ )  $\delta$ : 6.62 (s, 2H), 4.11 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 3.80 (s, 3H), 2.98 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.88 (s, 3H)。

**2.1.7 化合物 9a 的制备与鉴定** 将化合物 7 (1.00 g, 4.13 mmol) 置于 50 mL 茄形瓶中, 加入 10 mL 的 DMF 作为反应溶剂, 再将化合物 8a (0.93 mg, 4.13 mmol), 碳酸铯 ( $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ , 4.03 g, 12.40 mmol) 加入反应体系中, 加热至  $90^{\circ}\text{C}$  反应 16 h, LC-MS 监测反应结束。将反应液用水、DCM 萃取 ( $20\text{ mL} \times 3$ ), 将有机相合并用水洗涤 ( $20\text{ mL} \times 3$ ) 去除残留的 DMF, 将有机相用无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥, 减压浓缩去除溶剂。通过 TLC 法 (DCM: MeOH = 10:1 加氨水) 纯化, 洗脱得到 1.53 g 淡黄色化合物 9a, 收率 85.74%。ESI-MS:  $m/z$  432.98  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ,  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, chloroform- $d$ )  $\delta$ : 9.08 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 7.79 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 6.85 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 4.13 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.04 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 2.89 (s, 3H)。

**2.1.8 化合物 10a 的制备与鉴定** 将化合物 9a (1.53 g, 3.54 mmol) 置于 50 mL 三口烧瓶中, 插入温度计, 置换  $\text{N}_2$ , 用注射器注入 10 mL 无水 DCM 作为反应溶剂, 在冰水浴条件下降温至  $0^{\circ}\text{C}$ , 将三溴化硼  $1.0\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DCM 溶液 (10.64 mL, 10.63 mmol) 缓慢注入反应体系中, 反应液在  $0^{\circ}\text{C}$  ~ 室温下反应 5 h, LC-MS 监测反应结束, 像反应体系中用注射器缓慢滴加水, 淬灭三溴化硼, 用水、DCM 萃取 ( $10\text{ mL} \times 2$ ), 无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥有机相, 减压浓缩去除溶剂, 得到 1.35 g 化合物 10a, 收率 91.20%, 直接用于下一步。ESI-MS:  $m/z$  419.97  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ,  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 9.87 (s, 1H), 9.03 (d,  $J = 4.8$  Hz, 1H), 8.43 (s, 1H), 7.37 (dd,  $J = 8.8, 2.3$  Hz, 1H), 6.74 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 4.04 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 3.03 (s, 3H), 2.98 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H)。

**2.1.9 化合物 3B 的制备与鉴定** 将化合物 1B (1.50 g, 6.85 mmol)、三苯基膦 (0.36 g, 1.37 mmol)、

二氯二三苯基膦钯 (0.48 g, 0.68 mmol) 和碘化亚铜 (0.26 g, 1.37 mmol) 置于 100 mL 的三口烧瓶中, 置换  $N_2$ , 向体系中注入 20 mL DMF 作为反应溶剂, 注射器分别缓慢注入化合物 **2B** (0.52 g, 6.17 mmol) 和 *N,N*-二异丙基乙胺 (3.98 g, 30.83 mmol), 加热至 80 °C 反应 5 h, TLC 监测反应, 原料反应完毕, 反应液不做纯化直接进行下一步实验。 $^1H$  NMR (400 MHz, chloroform-*d*)  $\delta$ : 8.30 (dd,  $J = 6.1, 2.9$  Hz, 1H), 8.19 ~ 8.12 (m, 1H), 7.23 ~ 7.16 (m, 1H), 3.84 (t,  $J = 6.1$  Hz, 2H), 2.62 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 1.95 ~ 1.86 (m, 2H)。

**2.1.10 化合物 5B 的制备与鉴定** 将化合物 **4B** (1.51 g, 8.22 mmol) 和碳酸钾 (2.84 g, 20.55 mmol) 直接加入上一步反应液中, 加热至 80 °C 下反应 16 h, TLC 监测反应结束, LC-MS 监测反应结束。反应液加水、DCM-异丙醇 = 10 : 1 萃取 (20 mL  $\times$  3), 再用水洗涤有机相 (20 mL  $\times$  2), 无水  $Na_2SO_4$  干燥有机相, 浓缩去除溶剂, 所得粗品经柱层析纯化得到 1.61 g 黄色油状化合物 **5B**, 收率 60.84%。ESI-MS:  $m/z$  387.54  $[M + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400 MHz, chloroform-*d*)  $\delta$ : 8.22 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 8.04 (dd,  $J = 9.1, 2.8$  Hz, 1H), 6.86 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H), 5.35 (s, 1H), 3.98 (d,  $J = 12.4$  Hz, 2H), 3.82 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H), 2.86 ~ 2.79 (m, 4H), 2.62 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 2.46 (s, 3H), 2.22 (s, 1H), 2.01 (d,  $J = 6.2$  Hz, 2H), 1.88 (dd,  $J = 13.1, 6.6$  Hz, 3H), 1.27 (d,  $J = 11.9$  Hz, 8H)。

**2.1.11 化合物 6B 的制备与鉴定** 将化合物 **5B** (1.61 g, 4.17 mmol) 置于 50 mL 茄形瓶中, 加入 30 mL 甲醇作为反应溶剂, 置换  $N_2$ , 加入二氧化铂 (0.16 g), 置换  $H_2$ , 室温反应 5 h, LC-MS 显示原料反应完毕。在布氏漏斗中加入硅藻土, 将反应液中二氧化铂过滤, 保持硅藻土湿润且用甲醇洗涤, 将滤液减压浓缩, 得到 1.47 g 棕色油状化合物 **6B**, 收率 97.88%, 该粗品直接用于下一步。ESI-MS:  $m/z$  361.32  $[M + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400 MHz, chloroform-*d*)  $\delta$ : 6.90 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 6.54 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 6.49 (dd,  $J = 8.3, 2.7$  Hz, 1H), 3.65 (dd,  $J = 9.4, 4.1$  Hz, 3H), 3.48 (s, 3H), 3.08 (d,  $J = 15.4$  Hz, 1H), 3.01 ~ 2.94 (m, 2H), 2.58 (dd,  $J = 18.4, 10.7$  Hz, 8H), 2.34 (s, 6H), 1.73 ~ 1.56 (m, 8H)。

**2.1.12 化合物 7B 的制备与鉴定** 将化合物 **6B** (0.4 g, 1.11 mmol)、化合物 **10a** (0.57 g, 1.33 mmol) 和三氟乙酸 (0.38 g, 3.33 mmol) 置于 50 mL 茄形瓶中, 加入 10 mL 叔丁醇作为反应溶剂, 加热至 90 °C 下搅拌 16 h, LC-MS 监测反应结束。减压浓

缩反应液, TLC (DCM : MeOH = 10 : 1, 加少量氨水) 纯化, 洗脱得到浅棕色粗品化合物 **7B**。将此粗品再次使用快速制备型色谱仪反相纯化, 冻干得 0.42 g 白色固体化合物 **7B**, 收率 50.97%。ESI-MS:  $m/z$  743.26  $[M + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 9.74 (s, 1H), 9.06 (s, 1H), 8.57 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.51 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 7.35 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.29 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 6.87 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 6.73 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 5.32 (t,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 4.31 (t,  $J = 5.1$  Hz, 2H), 3.37 (dd,  $J = 11.7, 6.5$  Hz, 3H), 3.32 (s, 3H), 2.97 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 2.91 (d,  $J = 11.0$  Hz, 2H), 2.67 (s, 1H), 2.33 (s, 2H), 2.16 (s, 3H), 2.00 (dd,  $J = 14.2, 6.7$  Hz, 2H), 1.83 (d,  $J = 12.5$  Hz, 2H), 1.52 (d,  $J = 8.4$  Hz, 3H), 1.45 ~ 1.38 (m, 4H), 1.25 (d,  $J = 14.3$  Hz, 8H)。

**2.1.13 化合物 I 的制备与鉴定** 将三苯基膦 (0.74 g, 2.83 mmol) 置于三口烧瓶中, 置换  $N_2$ , 使用注射器注入无水四氢呋喃 (5 mL), 充分溶解后在冰浴下搅拌 5 min, 将偶氮二甲酸二异丙酯 (0.57 g, 2.83 mmol) 与无水四氢呋喃 (5 mL) 充分溶解后用注射器在冰浴条件下缓慢滴加进三口瓶中, 搅拌 5 min, 再将化合物 **7B** (0.42 g, 0.56 mmol) 与无水四氢呋喃 (5 mL) 充分溶解后用注射器在冰浴条件下缓慢滴加进三口瓶中, 室温下反应 2 h, LC-MS 监测反应结束。减压浓缩去除溶剂, 加入 5 mL 甲醇打浆纯化, 体系析出白色固体, 过滤将滤饼冻干后得 0.12 g 白色固体化合物 **I**, 收率 40.98%, 纯度 94.91%。ESI-MS:  $m/z$  727.60  $[M + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 9.22 (s, 2H), 8.60 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.63 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.40 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 7.12 (d,  $J = 9.3$  Hz, 1H), 6.96 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.89 ~ 6.85 (m, 1H), 4.37 ~ 4.37 (m, 2H), 4.11 ~ 4.07 (m, 2H), 3.05 (s, 3H), 2.85 ~ 2.78 (m, 2H), 2.68 ~ 2.67 (m, 2H), 2.33 ~ 2.32 (m, 3H), 2.16 ~ 2.14 (m, 2H), 2.10 ~ 2.06 (m, 2H), 1.91 (s, 3H), 1.89 ~ 1.80 (m, 2H), 1.73 ~ 1.70 (m, 2H), 1.38 ~ 1.37 (m, 4H), 1.24 (s, 8H)。

化合物 **II** ~ **VI** 的合成参照化合物 **I** 的合成路线进行合成。

**2.1.14 化合物 II 的鉴定** 收率: 28.8%, 纯度: 98.67%, ESI-MS:  $m/z$  633.70  $[M + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$ : 8.88 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.90 (d,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 7.56 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.36 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 7.24 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.91 (d,  $J = 8.6$  Hz,



1H), 6.83 (dd,  $J = 8.5, 2.5$  Hz, 1H), 6.13 (d,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 4.75 (t,  $J = 12.2$  Hz, 2H), 4.21 ~ 4.11 (m, 2H), 3.97 ~ 3.80 (m, 2H), 3.19 ~ 3.06 (m, 2H), 2.97 (s, 3H), 2.85 ~ 2.74 (m, 2H), 2.69 ~ 2.53 (m, 4H), 2.45 ~ 2.40 (m, 2H), 2.37 ~ 2.28 (m, 3H), 2.16 (s, 3H), 2.02 ~ 1.98 (m, 2H), 1.82 ~ 1.79 (m, 2H), 1.75 ~ 1.62 (m, 2H), 1.50 ~ 1.41 (m, 4H)。

**2.1.15 化合物Ⅲ的鉴定** 收率: 15.2%, 纯度: 98.87%, ESI-MS:  $m/z$  658.70  $[M + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$ : 9.78 (s, 1H), 8.77 (s, 1H), 8.45 (s, 1H), 7.51 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 7.44 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 7.34 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 6.95 (dt,  $J = 8.7, 5.5$  Hz, 2H), 4.79 (t,  $J = 12.1$  Hz, 2H), 4.23 ~ 4.13 (m, 2H), 4.04 ~ 3.81 (m, 2H), 3.25 ~ 3.08 (m, 2H), 2.99 (s, 3H), 2.99 ~ 2.76 (m, 4H), 2.69 ~ 2.56 (m, 2H), 2.46 ~ 2.39 (m, 2H), 2.34 ~ 2.33 (m, 3H), 2.16 (s, 3H), 2.04 ~ 1.96 (m, 2H), 1.83 ~ 1.80 (m, 2H), 1.69 ~ 1.63 (m, 2H), 1.48 ~ 1.44 (m, 4H)。

**2.1.16 化合物Ⅳ的鉴定** 收率: 49.8%, 纯度: 98.90%, ESI-MS:  $m/z$  713.50  $[M + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 9.18 (s, 1H), 8.45 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.49 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 7.46 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 7.35 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 6.94 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 6.87 (dd,  $J = 8.6, 2.5$  Hz, 1H), 4.81 (t,  $J = 12.1$  Hz, 2H), 4.24 ~ 4.16 (m, 3H), 3.94 ~ 3.86 (m, 2H), 3.25 ~ 3.14 (m, 2H), 3.02 (s, 3H), 2.91 ~ 2.81 (m, 3H), 2.77 ~ 2.74 (m, 2H), 2.63 ~ 2.50 (m, 4H), 2.37 ~ 2.28 (m, 4H), 2.15 (s, 3H), 2.08 ~ 2.02 (m, 2H), 1.89 ~ 1.78 (m, 2H), 1.52 ~ 1.43 (m, 4H)。

**2.1.17 化合物Ⅴ的鉴定** 收率: 22.7%, 纯度: 96.46%, ESI-MS:  $m/z$  647.90  $[M + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400 MHz, chloroform- $d$ )  $\delta$ : 8.10 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.70 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 7.50 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 7.22 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 6.97 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 6.60 (dd,  $J = 8.5, 2.6$  Hz, 1H), 4.77 (t,  $J = 12.1$  Hz, 2H), 4.33 ~ 4.23 (m, 2H), 4.05 ~ 3.96 (m, 2H), 3.26 ~ 3.14 (m, 2H), 3.02 ~ 3.98 (m, 3H), 2.96 ~ 2.88 (m, 2H), 2.86 (s, 3H), 2.75 ~ 2.56 (m, 8H), 2.46 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.07 ~ 1.98 (m, 2H), 1.80 ~ 1.67 (m, 4H), 1.30 ~ 1.22 (m, 2H)。

**2.1.18 化合物Ⅵ的鉴定** 收率: 20.9%, 纯度: 98.20%, ESI-MS:  $m/z$  617.40  $[M + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400 MHz, chloroform- $d$ )  $\delta$ : 9.22 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.51 (d,  $J = 2.5$  Hz,

1H), 7.46 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 7.36 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.00 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 6.91 (dd,  $J = 8.6, 2.5$  Hz, 1H), 4.81 (t,  $J = 12.1$  Hz, 1H), 3.24 ~ 4.20 (m, 2H), 3.92 ~ 3.90 (m, 1H), 3.67 (t,  $J = 4.3$  Hz, 4H), 3.29 ~ 3.14 (m, 1H), 3.02 (s, 3H), 2.90 ~ 2.84 (m, 1H), 2.75 ~ 2.62 (m, 4H), 2.59 ~ 2.55 (m, 2H), 2.02 ~ 2.00 (m, 1H), 1.75 ~ 1.62 (m, 1H), 1.51 ~ 1.40 (m, 2H)。

## 2.2 生物活性测试

**2.2.1 EGFR 激酶活性抑制评价** 在本研究中, 使用了不同浓度 (从  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  到  $0.01 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 依次递减 10 倍) 的测试化合物, 与纯化的 EGFR<sup>del19/T790M/C797S</sup> 和 EGFR<sup>L858R/T790M/C797S</sup> 蛋白共同孵育。反应体系设置在 384 孔板 (ProxiPlate-384 Plus, PerkinElmer) 中。首先, 在室温下孵育 30 min 以确保充分结合; 随后加入底物缓冲液启动酶促反应, 并继续孵育 60 min。接着, 向每个孔中添加 XL665 标记物和特异性抗体, 再孵育 1 h 完成信号放大。最后, 利用 Envision 仪器测量 665 nm 和 620 nm 波长下的荧光强度比值, 以评估化合物活性。实验过程中设置了多个对照组: 空白对照组 (不添加酶)、溶剂对照组 (用 DMSO 替代化合物) 以及阳性对照组 (使用 **BGB-40**, 从  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  到  $0.01 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 依次递减 10 倍)。整个反应体系总体积设定为  $10 \mu\text{L}$ , 具体成分包括: 2% DMSO、终浓度为  $0.04 \text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  的 EGFR 蛋白、 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TK-s 底物、 $1 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ATP (适用于两种突变型 EGFR)、 $5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ 、 $1 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  DTT 及  $1 \times$  激酶缓冲液。实验结果显示 (见表 1), 与 **A29** 类似的 18 元大环化合物 **I**, 抑制 EGFR<sup>del19/T790M/C797S</sup> 和 EGFR<sup>L858R/T790M/C797S</sup> 的活性与 **BGB-40** 相当, 证明大环化策略保持了先导化合物 **A** (**BGB-40**) 的良好活性, 当大环链缩减一碳原子后得到 17 元大环化合物 **Ⅳ**, 化合物 **Ⅳ** 抑制 EGFR<sup>del19/T790M/C797S</sup> 和 EGFR<sup>L858R/T790M/C797S</sup> 的活性进一步提高, 其  $IC_{50}$  分别达到  $0.18 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $1.04 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 为继续探索嘧啶环上不同取代对活性的影响, 得到了化合物 **Ⅱ**、**Ⅲ**、**Ⅴ**, 缩减一个溶剂暴露区环状取代基后得到化合物 **Ⅵ**; 这 4 个化合物对 EGFR 突变蛋白均表现出类似化合物 **Ⅳ** 的良好抑制活性。其中化合物 **Ⅴ** 抑制 EGFR<sup>del19/T790M/C797S</sup> 和 EGFR<sup>L858R/T790M/C797S</sup> 的激酶活性更优。

**2.2.2 肿瘤细胞增殖抑制活性研究** 通过 MTS 法检测化合物对肿瘤细胞增殖抑制活性的影响。实验选用 Ba/F3-EGFR<sup>del19/T790M/C797S</sup> 细胞和 Ba/F3-EGFR<sup>L858R/T790M/C797S</sup> 细胞, 经计数后以 1800 个/孔的密度接种于 96 孔板中。加入不同浓度的化合物后, 在二氧化碳恒温培养箱中孵育 72 h, 所有化合物的

表 1 目标化合物激酶活性抑制实验结果

Tab 1 Kinase activity inhibition assay for the target compound

| 化合物    | $IC_{50} / (\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1})$ |                                   |
|--------|-----------------------------------------------|-----------------------------------|
|        | EGFR <sup>del19/T790M/C797S</sup>             | EGFR <sup>L858R/T790M/C797S</sup> |
| BGB-40 | 5.69                                          | 13.03                             |
| I      | 7.03                                          | 7.63                              |
| II     | 1.06                                          | 0.88                              |
| III    | 0.52                                          | 0.87                              |
| IV     | 0.18                                          | 1.04                              |
| V      | 0.12                                          | 0.86                              |
| VI     | 0.28                                          | 1.15                              |

最终作用浓度均为  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $200 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $40 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $8 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.6 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.32 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $0.064 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。设置含 0.2% DMSO 的孔作为溶剂对照组。每孔加入 20  $\mu\text{L}$  MTS 试剂 (Promega, Cat. G3581), 继续孵育 2 h 后混匀, 并在酶标仪中测定各孔在 490 nm 和 690 nm 处的光密度值 ( $OD$ )。计算背景校正后的光密度值  $OD_{490-690}$ , 即 490 nm 处的光密度值减去 690 nm 处的光密度值。细胞存活率 (%) 按照以下公式计算: 细胞存活率 (%) = (化合物处理孔  $OD_{490-690}$  - 纯培养基孔  $OD_{490-690}$ ) / (DMSO 对照孔  $OD_{490-690}$  - 纯培养基孔  $OD_{490-690}$ )  $\times 100\%$ 。随后采用四参数逻辑回归模型计算  $IC_{50}$ 。实验结果 (见表 2) 表明, 这 6 种化合物对携带 EGFR<sup>del19/T790M/C797S</sup> 和 EGFR<sup>L858R/T790M/C797S</sup> 突变的 Ba/F3 细胞均表现出显著的增殖抑制活性。其中化合物激酶活性更好的化合物 IV~VI 的细胞抑制效果更为优异。从本课题组实验结果发现, 虽然具有相近的激酶活性, 但 18 元大环化合物 I 的细胞活性明显弱于 BGB-40, 缩减一个碳后变成更为刚性和紧缩的 17 元大环化合物 IV, 其细胞活性与 BGB-40 相当, 提示本课题组大环化合物的刚性会影响细胞活性。同样的, 对比化合物 IV 和化合物 V, 两者结构上差别在于嘧啶环上的取代基不同, 从取代基伸展程度上比较, 化合物 V 的甲基略大于化合物 IV 的溴原子, 虽然化合物 V 激酶活性略微优于化合物 IV, 但细胞活性上化合物 IV 略优。

表 2 目标化合物细胞增殖抑制实验结果

Tab 2 Cell proliferation inhibition assay for the target compound

| 化合物    | $IC_{50} / (\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1})$ |                                         |
|--------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------|
|        | Ba/F3-EGFR <sup>del19/T790M/C797S</sup>       | Ba/F3-EGFR <sup>L858R/T790M/C797S</sup> |
| BGB-40 | 3.58                                          | 11.23                                   |
| I      | 59.47                                         | 127.70                                  |
| II     | 29.10                                         | 81.95                                   |
| III    | 13.23                                         | 99.10                                   |
| IV     | 6.26                                          | 4.96                                    |
| V      | 12.99                                         | 11.67                                   |
| VI     | 4.39                                          | 7.06                                    |

### 3 结论

以化合物 A 为先导化合物, 借鉴化合物 A29 的大环化策略, 设计并合成了 6 种大环 EGFR 抑制剂。通过  $^1\text{H}$  NMR 和 LC-MS 技术对化合物 I~VI 的结构进行表征与验证。体外实验评估了这些化合物对携带 EGFR 多重突变 (EGFR<sup>del19/T790M/C797S</sup> 及 EGFR<sup>L858R/T790M/C797S</sup>) 的 Ba/F3 细胞增殖抑制效果, 结果显示所有目标化合物均表现出显著的抗增殖活性。特别是化合物 IV 和 VI 展现了较为优异的细胞增殖抑制能力。本研究为未来开发新型 EGFR 突变抑制剂提供参考依据。

### 参考文献

- [1] Roskoski RJ. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer [J]. Pharmacol Res, 2014, 79: 34-74.
- [2] Passaro A, Jänne PA, Mok T, et al. Overcoming therapy resistance in EGFR-mutant lung cancer [J]. Nat Cancer, 2021, 2 (4): 377-391.
- [3] 薛舒婷, 董晓勇, 张明娟, 等. 抗非小细胞肺癌新型表皮生长因子受体抑制剂的研究进展 [J]. 中国药物化学杂志, 2021, 31 (12): 1010-1019.
- [4] 宋启斌, 胡胜. EGFR 突变与非小细胞肺癌 [J]. 中国肿瘤, 2007 (11): 910-914.
- [5] Le X, Puri S, Negrao MV, et al. Landscape of EGFR-dependent and-independent resistance mechanisms to osimertinib and continuation therapy beyond progression in EGFR-mutant NSCLC [J]. Clin Cancer Res, 2018, 24 (24): 6195-6203.
- [6] Yang Z, Yang N, Ou QX, et al. Investigating novel resistance mechanisms to third-generation EGFR tyrosine kinase inhibitor osimertinib in non-small cell lung cancer patients [J]. Clin Cancer Res, 2018, 24 (13): 3097-3107.
- [7] Pao W, Chmielecki J. Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2010, 10 (11): 760-774.
- [8] Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib [J]. N Engl J Med, 2005, 352 (8): 786-792.
- [9] Leonetti A, Sharma S, Minari R, et al. Resistance mechanisms to osimertinib in EGFR-mutated non-small cell lung cancer [J]. Br J Cancer, 2019, 121 (9): 725-737.
- [10] 李萍, 王丽, 贾乐川. 第 3 代表皮生长因子受体抑制剂——奥西替尼研究状况 [J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 33 (14): 1371-1373.
- [11] 潘方霞, 胡涛, 白海云, 等. 基于 PROTAC 技术的 EGFR 降解剂的合成 [J]. 山东化工, 2024, 53 (10): 17-20.
- [12] 白海云, 祁宇. 新型大环 EGFR 抑制剂的合成 [J]. 山东化工, 2024, 53 (20): 48-51.
- [13] Guo JC, Cheng B, Chen HY, et al. Novel protein kinase inhibitors. US A61P35/00 WO2021216440 [P]. 2021-10-28.

(收稿日期: 2024-12-12; 修回日期: 2025-03-18)

# 芹菜素对苯并芘激活的 AhR-CYP 信号通路的影响

张文娟<sup>1</sup>, 刘婷婷<sup>2</sup>, 吕晓丽<sup>2, 3</sup>, 白图雅<sup>2, 3</sup>, 胡玉霞<sup>2, 3</sup>, 李君<sup>2, 3</sup>, 王朝杰<sup>2</sup>, 汪涵<sup>2</sup>, 王雪<sup>2</sup>, 杜雨露<sup>2</sup>, 常福厚<sup>2, 3</sup>, 张梦迪<sup>2, 3\*</sup> (1. 乌兰察布医学高等专科学校, 内蒙古 乌兰察布 012000; 2. 内蒙古医科大学药学院, 呼和浩特 010110; 3. 内蒙古新药筛选工程研究中心, 呼和浩特 010110)

**摘要:** **目的** 研究芹菜素对苯并芘激活的 AhR-CYP 信号通路的影响, 明确芹菜素影响苯并芘作用的机制。**方法** 采用 qPCR、Western blot 法分别在 HepG2 细胞中检测不同浓度的苯并芘 (0.1、1、10 和 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 对 AhR 及下游 CYP1A1、CYP1A2 和 CYP1B1 靶基因/蛋白的 mRNA 和蛋白表达作用。同时检测低、中、高浓度 (25、50、100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的芹菜素拮抗苯并芘 (1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 对 AhR 及下游 CYP1A1、CYP1A2 和 CYP1B1 靶基因/蛋白的 mRNA 和蛋白表达的影响。采用免疫荧光法检测低、中、高浓度的芹菜素拮抗苯并芘对 HepG2 细胞中 CYP1A1 蛋白表达的影响。**结果** 不同浓度苯并芘可以激活 AhR 信号通路, 且 AhR 及下游 CYP1A1、CYP1A2 和 CYP1B1 靶基因/蛋白的表达在一定范围内呈剂量依赖性升高。不同浓度的芹菜素对苯并芘导致的 AhR 及下游 CYP1A1、CYP1A2 和 CYP1B1 靶基因/蛋白的表达具有拮抗作用。免疫荧光法显示不同浓度的芹菜素对苯并芘导致的 CYP1A1 的蛋白表达具有拮抗作用, 且呈浓度依赖性。**结论** 苯并芘可以通过 AhR 激活 AhR-CYP 信号通路, 苯并芘为 AhR 的激动剂, 芹菜素可以通过 AhR-CYP 信号通路拮抗苯并芘的作用。

**关键词:** 苯并芘; 芹菜素; AhR 信号通路; 细胞色素 P450; 芳香烃受体

**中图分类号:** R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)06-1524-06  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.005

## Effect of apigenin on benzo[a]pyrene-activated AhR-CYP signaling pathway

ZHANG Wen-juan<sup>1</sup>, LIU Ting-ting<sup>2</sup>, LYU Xiao-li<sup>2, 3</sup>, BAI Tu-ya<sup>2, 3</sup>, HU Yu-xia<sup>2, 3</sup>, LI Jun<sup>2, 3</sup>, WANG Chao-jie<sup>2</sup>, WANG Han<sup>2</sup>, WANG Xue<sup>2</sup>, DU Yu-lu<sup>2</sup>, CHANG Fu-hou<sup>2, 3</sup>, ZHANG Meng-di<sup>2, 3\*</sup> (1. Ulanqab Medical College, Jining District, Ulanqab Inner Mongolia 012000; 2. College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110; 3. New Drug Screening Engineering Research Center, Hohhot 010110)

**Abstract: Objective** To determine the effect of apigenin on benzo[a]pyrene (BaP)-activated AhR-CYP signaling pathway, and to clarify the mechanism of apigenin affecting BaP. **Methods** The effects of various concentrations of BaP (0.1, 1, 10, and 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) on the mRNA and protein expression of AhR and its downstream genes/protein (CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1) were analyzed with qPCR and Western blot in HepG2 cells. The antagonistic effects of low, medium, and high concentrations (25, 50, 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) of apigenin on BaP (1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )-induced expression of AhR and its downstream genes/protein (CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1) were examined with the same techniques. Immunofluorescence was used to assess the effects of different concentrations of apigenin on BaP-induced CYP1A1 protein expression in HepG2 cells. **Results** BaP at different concentrations activated the AhR signaling pathway, and the expression of AhR and its downstream genes/proteins CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 dose-dependently increased. Apigenin at varying

**基金项目:** 国家自然科学基金 (No. 82260733); 内蒙古自治区自然科学基金 (No.2023QN08016); 内蒙古自治区教育科学研究“十四五”规划课题 (No.NZJGH2023107); 内蒙古医科大学面上项目 (No.YKD2025MS049)。

**作者简介:** 张文娟, 女, 讲师, 主要从事生化与分子药理学方面的研究, email: jyszh123@163.com \*通信作者: 张梦迪, 女, 在读博士研究生, 主要从事生化与分子药理学方面的研究, email: zhangmengdi1108@163.com



concentrations exhibited antagonistic effects on BaP-induced mRNA and protein expression of AhR and its downstream genes/proteins CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1. Immunofluorescence analysis demonstrated that apigenin at different concentrations antagonized BaP-induced CYP1A1 expression in a dose-dependent manner. **Conclusion** BaP activates the AhR-CYP signaling pathway as an AhR agonist. Apigenin exerts an antagonistic effect on BaP via the AhR-CYP signaling pathway.

**Key words:** benzo[a]pyrene; apigenin; AhR signaling pathway; cytochrome P450; aryl hydrocarbon receptor

苯并芘 [benzo[a]pyrene, BaP] 属于多环芳烃类 (PAHs) 化合物, 它不仅存在于烟草烟雾中, 而且是化石燃料、木材烟雾、汽车尾气、炭烤食品和工业废物烟雾中的环境污染物。PAHs 化合物具有广泛的致癌、免疫抑制和促炎症作用, 由于脂溶性高, 经胃肠道吸收, 在肝脏中代谢并且极易在肝脏中累积, 并通过细胞色素 P450 酶 (CYP) 转化为各种代谢物<sup>[1-2]</sup>。由于 BaP 具有广泛的毒性, 所以预防和控制其对人类带来的危害刻不容缓<sup>[3-4]</sup>。BaP 主要是通过芳香烃受体 (aryl hydrocarbon receptor, AhR) 来发挥其毒性作用, AhR 属于配体激活转录因子, 它有一个碱性螺旋-环-螺旋结构域 (bHLH), AhR 结构上属于 Per-Arnt-Sim 家族。一些 PAHs 包括 2, 3, 7, 8-四氯二苯并二噁英 (TCDD) 是经典的 AhR 外源性配体, 它们可以通过依赖 AhR-XRE 通路的方式诱导 CYP1A1 的表达。在没有配体存在的情况下, AhR 在细胞质中和热休克蛋白 90 (HSP90)、乙肝病毒 X 蛋白 (XAP) 及 p23 形成无活性的复合物。当配体和 AhR 结合后, AhR 和复合物分离并转移到细胞核内。在细胞核内, AhR 和芳香烃受体核转运蛋白 (ARNT) 结合并磷酸化, 然后 AhR/ARNT 异二聚体再和二噁英/外源物反应元件 (DRE/XRE) 结合, 启动下游基因的表达<sup>[5-6]</sup>。AhR 的下游基因主要有 CYP1A1、CYP1A2 和 CYP1B1 等, 它们可以把 BaP 代谢为 BaP-7, 8-二氢二醇-9, 10-环氧化物 (BPDE)。BPDE 是 BaP 的主要代谢物, 可以和细胞的 DNA 形成 BPDE-DNA 加合物, 从而引起细胞 DNA 损伤, 进一步引起细胞发生癌变等。所以, 能够阻断 AhR 就能在一定程度上阻断 BaP 的毒性作用<sup>[7-8]</sup>。

芹菜素 (apigenin, Api) 属于天然黄酮类化合物, 黄酮类化合物对肿瘤细胞的生长和繁殖具有显著的抑制作用, 其作用机制主要是促进抑癌基因的表达、促进正常细胞的繁殖、抑制促癌基因的表达, 同时黄酮类化合物具有抗氧化、抗自由基作用<sup>[9]</sup>。研究发现黄酮类化合物有益于健康, 它们不仅可

以影响肠道菌群, 而且还能通过与 AhR 相互作用预防肠道炎症性疾病<sup>[10]</sup>。黄酮类化合物为 AhR 的配体, 表现为拮抗剂或激动剂的活性, 取决于化合物的结构及在不同的细胞系发挥作用不同, 存在于蒙药、中草药、水果和蔬菜中的黄酮化合物也可以与 AhR 结合, 如存在于芹菜和紫苏中的木犀草素、存在于茶叶中的儿茶酸在低剂量时是 AhR 的拮抗剂<sup>[11-12]</sup>。芹菜素具有黄酮类化合物的这些特性, 纳米封装可以增强芹菜素对 BaP 诱导小鼠皮肤肿瘤的抗肿瘤效果<sup>[13]</sup>, 芹菜素可以通过 Nrf2 等信号通路产生抗肿瘤、抗氧化和抗炎等活性, 同时对耳蜗毛细胞具有保护作用<sup>[14-15]</sup>。但有关芹菜素对于 AhR 的作用文献报道较少, 本文将探讨芹菜素拮抗 BaP 对 AhR-CYP 信号通路的作用, 明确芹菜素是否可以通过 AhR-CYP 信号通路产生药理作用, 为抗烟毒方面的研究提供一定的实验基础。

## 1 材料

### 1.1 试剂与细胞

人肝癌细胞株 (HepG2) (北京协和医科大学基础医学研究所), BaP (批号: B1760, 美国 Sigma 公司), 芹菜素对照品 (批号: S31423, 上海源叶有限公司, 含量  $\geq 98\%$ ), 总 RNA 提取试剂盒 (批号: DP419, 北京天根生化科技有限公司), BCA 蛋白定量分析试剂盒 (批号: 23227)、反转录试剂盒 (批号: K1622) (美国 Thermo 公司), 荧光定量检测 (SYBR Green) 试剂盒 (批号: QPK-201, 日本 TOYOBO 公司), AhR (批号: ab190797)、CYP1A1 (批号: ab235185)、CYP1A2 (批号: ab151728)、CYP1B1 (批号: ab185954)、 $\beta$ -actin (批号: ab8226) (英国 Abcam 公司), Qiagen 基因组 DNA 小提试剂盒 (批号: 51304, 德国 QIAGEN 公司)。

### 1.2 仪器

倒置显微镜 [德国 Leica 公司 (DM2700M)], BIO-RAD 基础电泳仪 [伯乐生命医学产品 (上海) 有限公司 (1645050)], Odyssey 红外激光成像系统 [美国 LI-COP 公司 (CLX-0493)], 高内涵细胞

成像系统 (Operetta) [美国 PE 公司 (OPRT1539)]。

2 方法

2.1 细胞培养

HepG2 细胞在含有  $100\text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  青霉素、 $100\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  链霉素和 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基于 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中 37℃ 培养。当细胞达到 80% ~ 90% 融合时, 经胰蛋白酶 (0.25%) 消化后进行传代培养并进行后续实验。

2.2 细胞分组

为了观察 BaP 对 AhR 信号通路的作用, 将细胞分为 5 组, 每组 BaP 的浓度为: 0 (Control)、0.1、1、10、100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 为了观察芹菜素对 BaP 的影响, 将细胞分为空白对照组、模型组 (1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  BaP)、芹菜素低剂量组 (25  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Api + 1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  BaP 组)、芹菜素中剂量组 (50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Api + 1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  BaP 组)、芹菜素高剂量组 (100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Api + 1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  BaP 组)。每组细胞均先在 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h 后, 加入所需要的药物浓度, 继续培养 24 h 后进行下一步实验, 每个浓度设 3 个复孔, 每个实验重复 3 次<sup>[16-18]</sup>。

2.3 实时荧光定量 PCR (qPCR) 法

HepG2 细胞按“2.2”项下方法处理 24 h 后收集细胞, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 3 次, 每孔加入 1 mL 裂解液 TRIzol, 进行 RNA 的提取, 检测 RNA 样本的纯度及含量, 反转录的 cDNA 于 -20℃ 保存待用。将 2  $\mu\text{L}$  cDNA, 0.8  $\mu\text{L}$  上、下游引物, 10  $\mu\text{L}$  SYBR Green PCR Master Mix, 6.4  $\mu\text{L}$  RNase Free Water 混合均匀配成 20  $\mu\text{L}$  反应体系。设定 qPCR 仪程序为: 95℃, 30 s, 40 个循环 (95℃、5 s, 60℃、10 s, 72℃、15 s); 采集数据; 熔解曲线 55 ~ 95℃; 采集数据, 20℃, 10 s。根据反应得到的熔解曲线, 分析 qPCR 产物的特异性。目的基因相对表达量分析方法基于 2<sup>- $\Delta\Delta\text{CT}$</sup>  原理进行。以稳定表达的基因  $\beta\text{-actin}$  作为内参对照, 引物序列见表 1。

2.4 Western blot 法

HepG2 细胞按照“2.2”项下方法处理细胞 24 h 后收集细胞, 用 PBS 清洗 3 次, 每孔加入 150  $\mu\text{L}$  裂解液, 离心后取上清液即为蛋白样品, -80℃ 保存。蛋白变性后, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。将 PVDF 膜在电流 200 mA 转膜 2 h。条带在封闭液中封闭 30 min, 用 TBST 洗膜 3 次, 4℃ 孵育一抗过夜, TBST 洗膜 3 次, 放入二抗中室温避光孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, TBS 洗膜 1 次, 洗膜完毕后置于红外荧光扫描成像系统进行扫描拍照,

表 1 引物序列

Tab 1 Primer sequence

| 基因                   | 物种    | 引物序列 (5'—3')                     |
|----------------------|-------|----------------------------------|
| <i>AhR</i>           | Human | F 5'-CCGAGAGGACGCAGGTGGAG-3'     |
|                      |       | R 5'-ACATCTTGTGGGAAAGGCAGCAG-3'  |
| <i>CYP1A1</i>        | Human | F 5'-CAAGCGGAAGTGTATCGGTGAGAC-3' |
|                      |       | R 5'-CAGAGGCAAGTCCAGGGTAGGG-3'   |
| <i>CYP1A2</i>        | Human | F 5'-GACCTCTACACCTCCACCTCATC-3'  |
|                      |       | R 5'-CCACTGACACCACCACCTGATTG-3'  |
| <i>CYP1B1</i>        | Human | F 5'-CCGCAAGCCCTGTCATCTGTG-3'    |
|                      |       | R 5'-TCTTCCTCAGCCTCATACCAGTCC-3' |
| $\beta\text{-actin}$ | Human | F 5'-CTGGCACCCAGCACAATG-3'       |
|                      |       | R 5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3'     |

Image J 软件分析目标条带的灰度值。

2.5 免疫荧光法检测不同浓度芹菜素拮抗 BaP 对 CYP1A1 的作用

HepG2 细胞按照“2.2”项下方法处理细胞 24 h 后, 用新鲜配制的固定液 (30% 丙酮 + 70% 甲醇) 固定细胞 10 min, PBS 洗 3 遍, 每次 5 min; 2% 二抗同源血清封闭 30 ~ 60 min, PBS 冲洗 2 次; 加入一抗, 4℃ 孵育 18 h, PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 加入 PBS 配制的二抗, 室温孵育 30 ~ 45 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 加入 0.5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  DAPI (PBS 配制) 染色 10 min。用 PBS 洗一次 5 min, 置于高内涵细胞成像系统在波长为 488 nm 处采集照片。

2.6 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9.0 进行统计学分析, 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间资料比较采用单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不同浓度 BaP 对 AhR 信号通路及下游基因 mRNA 和蛋白表达的作用

不同浓度 BaP (0.1、1、10、100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 处理 HepG2 细胞 24 h 后, 检测 *CYP1A1*、*CYP1A2*、*CYP1B1* mRNA 的表达水平。与 Control 组相比, 1 和 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  BaP 处理 HepG2 细胞的 *AhR* 及下游基因 *CYP1A1*、*CYP1A2*、*CYP1B1* 的 mRNA 表达均升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) (见图 1A); *AhR*、*CYP1A1*、*CYP1A2*、*CYP1B1* 的蛋白表达也均升高, 基本趋势与 mRNA 水平一致 (见图 1B)。但 0.1 和 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度的 BaP 作用不明显, 说明在一定的浓度范围内的 BaP 可以促进 *AhR* 以及下游 *CYP1A1*、*CYP1A2*、*CYP1B1* 靶基因 / 蛋白的表达。

3.2 不同浓度的芹菜素对 BaP 导致的 AhR 及下游基因 mRNA 和蛋白表达的拮抗作用

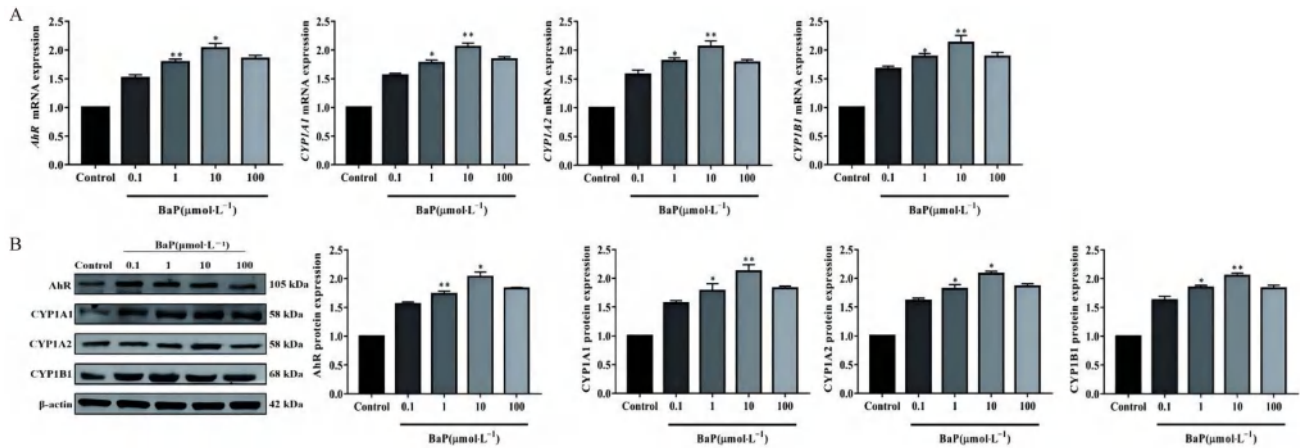


图1 不同浓度 BaP 对 AhR 及下游 CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1 靶基因 (A) /蛋白 (B) 的影响 ( $n = 3$ )  
Fig 1 Effect of different concentrations of BaP on target gene (A) /protein (B) of AhR, CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 ( $n = 3$ )

注: 与 Control 组比较,  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ 。  
Note: Compared with the Control group,  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ .

与模型组比, 芹菜素低、中、高剂量组的 CYP1A1, CYP1A2 的 mRNA 和蛋白表达均降低 ( $P < 0.05$ ), 芹菜素中、高剂量组对 AhR 和 CYP1B1 的 mRNA 和蛋白表达均降低 ( $P < 0.05$ ,

$P < 0.01$ )。说明芹菜素在一定浓度范围内对 AhR 有拮抗作用, 对 CYP1A1、CYP1A2 和 CYP1B1 的作用也有差异 (见图 2)。

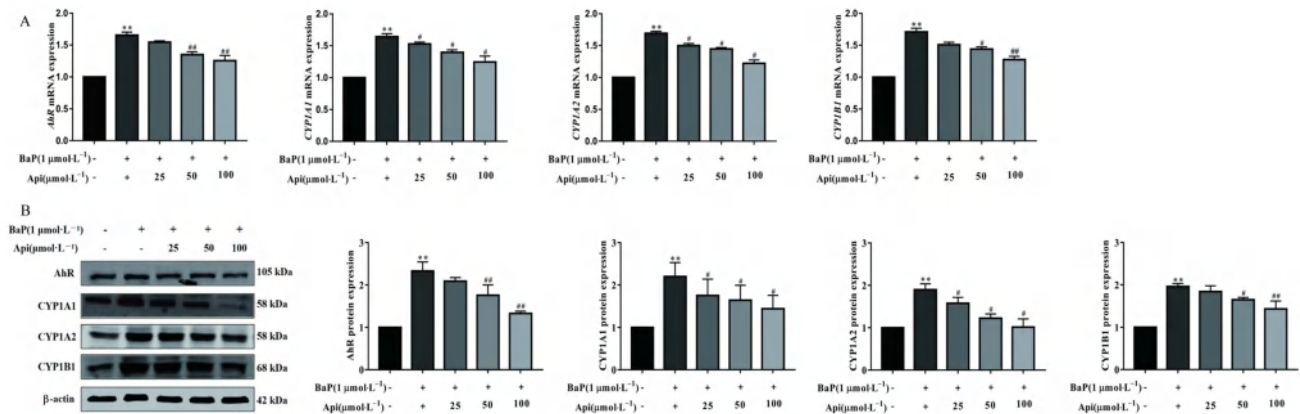


图2 不同浓度的 Api 拮抗 BaP 对 AhR 及下游 CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1 靶基因 (A) /蛋白 (B) 的影响 ( $n = 3$ )  
Fig 2 Effect of different concentrations of apigenin antagonized BaP to target gene (A) /protein (B) of AhR, CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 ( $n = 3$ )

注: 与空白对照组比较,  $^{**}P < 0.01$ ; 与模型组比较,  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{\#\#}P < 0.01$ 。  
Note: Compared with the blank control group,  $^{**}P < 0.01$ ; compared with the model group,  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{\#\#}P < 0.01$ .

### 3.3 免疫荧光检测芹菜素对 BaP 的拮抗作用

采用免疫荧光法检测芹菜素对 BaP 的拮抗作用, 用 CYP1A1 作为观察 AhR 的下游蛋白表达的指标, 观察低、中和高剂量芹菜素对 BaP 的拮抗作用, 如图 3 所示, 芹菜素低、中、高剂量组均使 CYP1A1 的蛋白荧光强度减弱, 表明 CYP1A1 的表达降低, 并呈现浓度依赖性。

## 4 讨论

AhR 是一种配体依赖性转录因子, 在调节 CYP1A1 和 CYP1A2 的表达中起着关键作用。CYPs 已被确认参与许多致癌原的代谢活化, 包括 PAHs、

芳香胺和杂环芳香胺<sup>[19]</sup>。因此, CYP1A 酶的上调可能是化学诱导致癌的一个风险因素。大部分黄酮类化合物属于 PAHs 的拮抗剂<sup>[20]</sup>, 本实验观察到芹菜素对 AhR-CYP 信号通路具有抑制作用, 而且随着芹菜素浓度的增加, 抑制作用增强, 说明芹菜素对 BaP 具有一定的拮抗作用。PAHs 是一种在环境中随处可见的污染物, 机体通过空气、土壤、水、饮食等途径接触, PAHs 暴露对健康的影响包括胚胎毒性、畸形、心脏毒性、DNA 损伤、DNA 甲基化、氧化应激、内分泌中断和生殖受损等<sup>[21]</sup>, 所以寻找和开发具有抗 PAHs 的药物具有非常重要的意义。



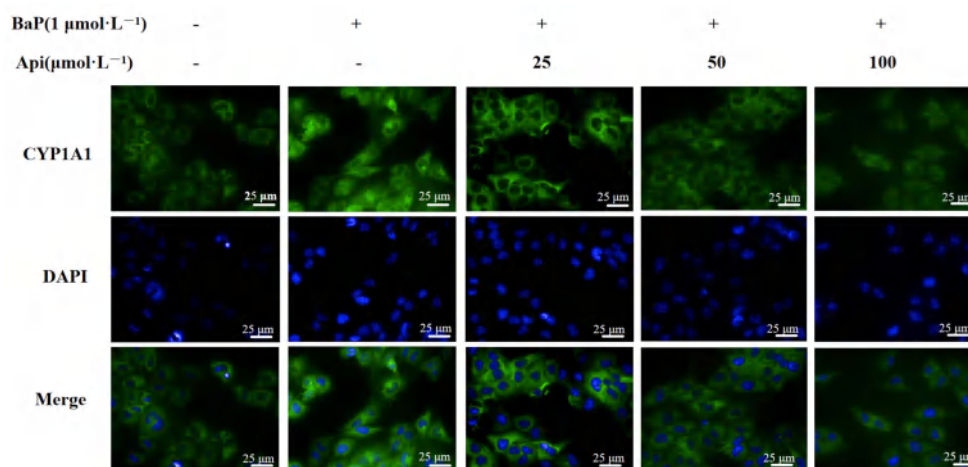


图 3 不同浓度 Api 拮抗 BaP 对 CYP1A1 蛋白表达的影响 (标尺: 25  $\mu\text{m}$ ,  $n = 3$ )

Fig 3 Effect of different concentrations of apigenin antagonized BaP on the expression of CYP1A1 proteins (Bar: 25  $\mu\text{m}$ ,  $n = 3$ )

芹菜素是一种广泛存在于水果和蔬菜中的常见膳食类黄酮,也是苦苣菜中的主要有效成分之一<sup>[22]</sup>。研究表明,芹菜素具有多样的生物活性,包括抗炎<sup>[23]</sup>、抗氧化<sup>[24]</sup>、抗病毒<sup>[25]</sup>和抗肿瘤<sup>[26]</sup>等能力,因此被认为具有预防和治疗癌症的潜力<sup>[27]</sup>。在分子水平上,可抑制多种肿瘤细胞系的增殖和诱导肿瘤细胞凋亡,具有抑制血管生成的能力。研究表明芹菜素对人类肝细胞癌 HepG2 细胞有抑制作用,抑制细胞周期和周期蛋白依赖性激酶 4 (Cyclin dependent kinase 4, CDK4) 表达,且诱导 *p53* 和 *p21* 基因表达,从而降低 HepG2 细胞生存能力,诱导 HepG2 细胞凋亡<sup>[28]</sup>,所以,芹菜素的作用比较广泛,其具体的药理作用和作用机制尚需进行大量的研究。

AhR 信号通路通常是指 AhR-ARNT-CYP 这条通路,AhR 配体如 BaP 或 TCDD 激活 AhR,AhR 为胞质受体,这些外源性配体如 BaP 或 TCDD 和其结合后,促使 BaP-AhR 与 ARNT 结合成复合物进入细胞核,结合到 XRE 上诱导 CYP1A1、CYP1A2 及 CYP1B1 的表达。AhR-CYP 信号通路与 BaP 的毒性反应具有非常直接的关系<sup>[29]</sup>。本研究选择 HepG2 细胞为研究对象是因为 HepG2 细胞保留了肝细胞的抗氧化等功能,而 BaP 也主要是通过 CYP 进行代谢<sup>[30]</sup>,实验采用  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  BaP 造模是依据参考文献资料及本实验室实验验证确定的<sup>[16-18]</sup>。本研究观察到不同浓度的 BaP 可以激活 HepG2 细胞中的 AhR-CYP 信号通路,同时使 AhR 及下游 CYP1A1、CYP1A2 及 CYP1B1 靶基因/蛋白的增加。实验还观察到不同浓度的芹菜素对 BaP 导致的 AhR 及下游基因/蛋白的表达具有拮抗作用,且这种作用随浓度的增加而增强。免疫荧光法也得到相似的结果,

芹菜素对 BaP 诱导的 CYP1A1 的蛋白表达呈抑制作用。说明芹菜素可以通过 AhR-CYP 信号通路来抑制 BaP 的作用,从而对烟毒和环境污染导致的机体的损害发挥一定的保护作用。

本实验主要研究芹菜素对 BaP 激活的 AhR-CYP 信号通路的影响,BaP 的作用比较广泛,芹菜素对 BaP 的作用也比较多,芹菜素对 BaP 导致的细胞增殖及迁移也具有一定的抑制作用(文章待发表),实验观察到芹菜素可以抑制 BaP 激活的 AhR-CYP 信号通路,抑制 AhR 及下游靶基因/蛋白 CYP1A1、CYP1A2 和 CYP1B1 的表达,说明芹菜素对 AhR-CYP 信号通路具有一定的抑制作用,这与文献<sup>[19]</sup>报道的相似。但具体机制尚需采用多方面的实验方法进行验证,这将是本课题组下一步的研究内容。

## 参考文献

- [1] Shen JM, Wang L, Zhang W, et al. Effects of naphtho[2, 1-a]pyrene exposure on CYP1A1 expression: an in vivo and in vitro mechanistic study exploring the role of m<sup>6</sup>a posttranscriptional modification [J]. Environ Health Perspect, 2024, 132 (8): 87003.
- [2] 林楠, 张秀慧, 张梦迪, 等. 髓过氧化物酶基因多态性与肺癌易感性的研究 [J]. 中南药学, 2019, 17 (2): 161-165.
- [3] 王冬雪, 胡玉霞, 白图雅, 等. 被动吸烟对小鼠肺组织中 CYP1A1、CYP1B1、VEGF 和 CAIX 表达的影响 [J]. 中南药学, 2019, 17 (2): 173-178.
- [4] 乌日汗, 常福厚. 基因多态性与吸烟交互作用致肺癌易感性的研究进展 [J]. 中南药学, 2015, 13 (3): 284-287, 306.
- [5] Sondermann NC, Faßbender S, Hartung F, et al. Functions of the aryl hydrocarbon receptor (AHR) beyond the canonical AHR/ARNT signaling pathway [J]. Biochem Pharmacol, 2023, 208: 115371.

- [6] 陈琪, 刘婷婷, 白图雅, 等. 槲皮素通过调节 AhR 和 Nrf2 通路对 HepG2 细胞中药物代谢酶 GSTP1 的影响[J]. 中南药学, 2022, 20 (1): 8-13.
- [7] Li MD, Chen LH, Xiang HX, et al. Benzo [a] pyrene evokes epithelial-mesenchymal transition and pulmonary fibrosis through AhR-mediated Nrf2-p62 signaling [J]. J Hazard Mater, 2024, 473: 134560.
- [8] 姜玮, 张秀慧, 奥敦托娅, 等. CYP1B1、NQO1 基因多态性与肺癌易感性关系的研究[J]. 中南药学, 2019, 17 (12): 2027-2033.
- [9] Yu H, Huang X, Zhu HH, et al. Apigenin ameliorates non-eosinophilic inflammation, dysregulated immune homeostasis and mitochondria-mediated airway epithelial cell apoptosis in chronic obese asthma via the ROS-ASK1-MAPK pathway [J]. Phytomedicine, 2023, 111: 154646.
- [10] Yeh TS, Yuan CZ, Ascherio A, et al. Long-term dietary flavonoid intake and subjective cognitive decline in US men and women [J]. Neurology, 2021, 97 (10): e1041-e1056.
- [11] Fukuda I, Nishiumi S, Mukai R, et al. Catechins in tea suppress the activity of cytochrome P450 1A1 through the aryl hydrocarbon receptor activation pathway in rat livers [J]. Int J Food Sci Nutr, 2015, 66 (3): 300-307.
- [12] Nakai R, Fukuda S, Kawase M, et al. Curcumin and its derivatives inhibit 2, 3, 7, 8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin-induced expression of drug metabolizing enzymes through aryl hydrocarbon receptor-mediated pathway [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2018, 82 (4): 616-628.
- [13] Das S, Das J, Samadder A, et al. Efficacy of PLGA-loaded apigenin nanoparticles in Benzo [a] pyrene and ultraviolet-B induced skin cancer of mice: mitochondria mediated apoptotic signalling cascades [J]. Food Chem Toxicol, 2013, 62: 670-680.
- [14] Li HJ, Zhang HM, Zhao H. Apigenin attenuates inflammatory response in allergic rhinitis mice by inhibiting the TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. Environ Toxicol, 2023, 38 (2): 253-265.
- [15] Jia GG, Mao HY, Zhang YP, et al. Apigenin alleviates neomycin-induced oxidative damage via the Nrf2 signaling pathway in cochlear hair cells [J]. Front Med, 2022, 16 (4): 637-650.
- [16] 苏敏, 张梦迪, 白图雅, 等. 苯并芘通过 AhR 影响肝脏脂质合成的分子机制研究[J]. 中南药学, 2023, 21 (1): 21-27.
- [17] 王朝杰, 张梦迪, 白图雅, 等. 苯并芘通过芳香烃受体促进肝糖异生相关分子表达[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2023, 37 (8): 601-608.
- [18] Lou W, Zhang MD, Chen Q, et al. Molecular mechanism of benzo [a] pyrene regulating lipid metabolism via aryl hydrocarbon receptor [J]. Lipids Health Dis, 2022, 21 (1): 13-25.
- [19] 盛孝敏, 常福厚, 白图雅. CYP2E1 基因多态性与肿瘤易感性关系的研究进展[J]. 中南药学, 2013, 11 (6): 444-446.
- [20] Haque MW, Pattanayak SP. Taxifolin inhibits 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-induced breast carcinogenesis by regulating AhR/CYP1A1 signaling pathway [J]. Pharmacogn Mag, 2018, 13 (Suppl 4): S749-S755.
- [21] Singh RK, Chang HW, Yan D, et al. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health [J]. J Transl Med, 2017, 15 (1): 73.
- [22] 霍碧珊, 秦民坚. 苦苣菜属植物化学成分与药理作用[J]. 国外医药 (植物药分册), 2008, 23 (5): 203-208.
- [23] Xue ZH, Li D, Yu WC, et al. Mechanisms and therapeutic prospects of polyphenols as modulators of the aryl hydrocarbon receptor [J]. Food Funct, 2017, 8: 1414-1437.
- [24] Ashida H, Fukuda I, Yamashita T, et al. Flavones and flavonols at dietary levels inhibit a transformation of aryl hydrocarbon receptor induced by dioxin [J]. FEBS Lett, 2000, 476 (3): 213-217.
- [25] Mukai R, Shirai Y, Saito N, et al. Suppression mechanisms of flavonoids on aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction [J]. Arch Biochem Biophys, 2010, 501 (1): 134-141.
- [26] Wallace SJ, de Solla SR, Head JA, et al. Polycyclic aromatic compounds (PACs) in the Canadian environment: exposure and effects on wildlife [J]. Environ Pollut, 2020, 265 (Pt B): 114863.
- [27] Stejskalova L, Dvorak Z, Pavek P. Endogenous and exogenous ligands of aryl hydrocarbon receptor: current state of art [J]. Curr Drug Metab, 2011, 12 (2): 198-212.
- [28] Sánchez M, Romero M, Gómez-Guzmán M, et al. Cardiovascular effects of flavonoids [J]. Curr Med Chem, 2019, 26 (39): 6991-7034.
- [29] Zhou YY, Zhao YN, Xu RY, et al. Study on the AhR signaling pathway and phase II detoxification metabolic enzymes isoforms in scallop *Chlamys farreri* exposed to single and mixtures of PAHs [J]. Environ Res, 2020, 190: 109980.
- [30] Kim GN, Jang HD. Protective mechanism of quercetin and rutin using glutathione metabolism on HO-induced oxidative stress in HepG2 cells [J]. Ann NY Acad Sci, 2009, 1171: 530-537.

(收稿日期: 2025-01-02; 修回日期: 2025-03-05)

# 特异性靶向 MUC18 的全人抗体偶联药物的发现和表征

周雨昕<sup>1, 2, 3</sup>, 黄火英<sup>1, 2, 3</sup>, 尚诚彰<sup>2</sup>, 吴家文<sup>1</sup>, 沈月雷<sup>2, 3\*</sup> (1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230000; 2. 百奥赛图(北京)医药科技股份有限公司抗体新药研究院, 北京 102609; 3. 长三角药物高等研究院联合研究生院, 江苏 南通 226133)

**摘要:** **目的** 开发抗体偶联药物治疗对现有疗法无效或耐药的黑色素瘤患者。**方法** 通过使用重组 MUC18 蛋白免疫 MUC18 基因敲除小鼠, 筛选用于抗体偶联药物开发的靶向 MUC18 的全人源化抗体 M13, 并对其进行结合特异性和活性分析; 通过偶联 vcMMAE 获得 M13-vcMMAE, 并对其进行了体外活性、成药性分析及体内抗肿瘤活性研究。**结果** M13 不与其他 MUC 家族蛋白结合, 与目前处于临床 I / II 期阶段的对照抗体偶联药物 AMT-253 所使用的抗体 pAb253 相比, 特异性更强, 亲和力更高。M13-vcMMAE 对黑色素瘤细胞具有显著的体外细胞杀伤活性, 并在肿瘤异种移植模型中显示出良好的抗肿瘤活性。**结论** M13 特异性靶向 MUC18 并具有很好的亲和力和内吞活性; M13-vcMMAE 展现了对 MUC18 阳性肿瘤细胞系和小鼠肿瘤模型的有效杀伤。因此, 以 M13 为基础开发靶向 MUC18 的抗体偶联药物, 有望提高对黑色素瘤患者的治疗效果。**关键词:** 细胞表面糖蛋白; 抗体偶联药物; 抗肿瘤活性; MUC18

中图分类号: R944, R73 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)06-1530-09  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.006

## Discovery and characterization of fully humanized antibody-drug conjugate specifically targeting MUC18

ZHOU Yu-xin<sup>1, 2, 3</sup>, HUANG Huo-ying<sup>1, 2, 3</sup>, SHANG Cheng-zhang<sup>2</sup>, WU Jia-wen<sup>1</sup>, SHEN Yue-lei<sup>2, 3\*</sup> (1. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230000; 2. Institute of Innovative Medicine, Biocytogen Pharmaceuticals (Beijing) Co., Ltd., Beijing 102609; 3. Joint Graduate School, Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute, Nantong Jiangsu 226133)

**Abstract: Objective** To develop antibody-drug conjugate (ADC) therapy for melanoma patients with refractoriness or resistance to current therapeutic regimens. **Methods** A fully humanized MUC18-targeting antibody, designated as M13, was screened through immunization of MUC18-knockout mice with recombinant MUC18 protein. The binding specificity and functional activity of M13 were systematically characterized. Subsequently, the antibody-drug conjugate M13-vcMMAE was synthesized via site-specific conjugation. The in vitro cytotoxicity assays, TAP analyses, and in vivo antitumor efficacy studies were evaluated to validate the therapeutic potential of M13. **Results** M13 demonstrated high-affinity binding to MUC18 without cross-reactivity to other MUC family members, in contrast to the clinical-phase I / II control ADC AMT-253 derived from benchmark antibody pAb253. The M13-vcMMAE conjugate exhibited dose-dependent cytotoxicity against melanoma cells in vitro and greatly suppressed tumor growth in xenograft models. **Conclusion** M13 specifically targets MUC18 with high affinity and demonstrates effective endocytosis activity. The M13-vcMMAE conjugate exhibits potent cytotoxic effect against MUC18-positive tumor cell lines and mouse tumor models. Development of M13-based antibody-drug conjugates targeting MUC18 holds promise for enhancing therapeutic efficacy in patients with melanoma.

**Key words:** cell surface glycoprotein; antibody-drug conjugate; antitumor activity; MUC18

基金项目: 安徽省高等学校科学研究项目 (No.2022AH050474)。

作者简介: 周雨昕, 女, 硕士研究生, 主要从事抗体药物发现、体外实验筛选等研究, email: 13152017098@163.com \* 通信作者: 沈月雷, 男, 正高级工程师, 主要从事抗体药物研发, email: yueleishen@bbctg.com.cn



抗体偶联药物是一种将单克隆抗体 (monoclonal antibody, mAb) 与小分子毒素通过化学连接子结合在一起的靶向疗法, 能够实现对肿瘤细胞的精确靶向和强效杀伤。首先, 靶点对抗体偶联药物设计至关重要, 理想的靶点应具有高效的内吞功能, 在肿瘤组织中高表达的同时在正常组织中有限表达<sup>[1-2]</sup>。许多靶点都不符合这些标准, 因此, 发现合适的靶点是抗体偶联药物开发的关键。抗体偶联药物结构复杂, 涉及大分子和小分子之间的有效组合。抗体偶联药物的抗体部分能精准靶向肿瘤抗原, 通过内吞作用递送小分子毒素到肿瘤细胞, 人源免疫球蛋白 G1 亚型 (hIgG1) 是目前最常用的抗体亚型; 小分子毒素是抗体偶联药物的核心杀伤部分, 通常为强效细胞毒性分子, 常见小分子毒素类型有微管蛋白抑制剂 (如 MMAE、DM1/DM4), DNA 损伤剂 (如 PBD、Dxd)<sup>[3]</sup>。连接子是连接抗体与毒素的关键桥梁部分, 其设计直接影响抗体偶联药物的稳定性、毒素释放效率和安全性; 理想的连接子应该在肿瘤微环境或肿瘤细胞内特定条件 (如低 pH、酶、还原环境) 下断裂, 释放活性毒素。连接子类型分为可裂解连接子和不可裂解连接子<sup>[4-5]</sup>。

过去十年, 随着靶向疗法和免疫疗法的发展, 转移性黑色素瘤的治疗有了重大进步。然而, 仍有 50% ~ 65% 的晚期黑色素瘤患者死于该病, 主要原因是对现有疗法产生了抗药性<sup>[6-8]</sup>。另外, 免疫疗法主要在紫外线暴露的白色人种皮肤黑色素瘤患者中起效。肢端黑色素瘤、黏膜黑色素瘤和葡萄膜黑色素瘤等“罕见黑色素瘤”对免疫疗法的应答率较低, 仅为 20% ~ 30%<sup>[9-11]</sup>。目前迫切需要更有效的治疗方法提高黑色素瘤的治疗效果。

以往针对糖蛋白 NMB 和内皮素 B 受体的黑色素瘤靶向抗体偶联药物显示出有限的疗效和剂量限制性毒性<sup>[12-16]</sup>。因此, 有必要改进抗体偶联药物的设计并确定更有效的黑色素瘤靶点, 以开发出具有临床转化潜力的新型抗体偶联药物。黑色素瘤细胞表面糖蛋白 (MUC18, 又称 CD146) 是一种高度 N-糖基化的膜糖蛋白<sup>[17]</sup>。MUC18 首次在黑色素瘤中被发现<sup>[18]</sup>, 在多种肿瘤如胰腺癌、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、肾癌、骨肉瘤和血管肉瘤表达<sup>[19-23]</sup>。MUC18 过表达于主要黑色素瘤亚型的肿瘤细胞和肿瘤浸润血管中, 因此是潜在的黑色素瘤治疗靶标。由抗体 pAb253 和有效载荷 T moiety-exatecan 组成的靶向 MUC18 的抗体偶联药物 AMT-253, 已被报道在黑色素瘤中显示出良好的治疗活性, 目前处于临床 I / II 期阶段<sup>[24]</sup>。

细胞黏附分子 (cell adhesion molecules, CAM) 拥有多个同家族靶点, 包括 ALCAM、BCAM 和 MCAM。在抗体免疫过程中, 家族成员间的同源性

可能会导致产生能与该家族其他成员交叉结合的抗体, 从而产生脱靶毒性。此外, 人类和小鼠抗原序列的高度同源性还会限制抗体表位多样性的产生。为了解决在抗体产生过程中因序列相似性引发的种间反应和多重反应问题, 本课题组利用全人抗体 RenLite 小鼠获得 MUC18 基因敲除 (knockout, KO) 小鼠, 以得到靶向 MUC18 的特异性抗体。通过筛选, 开发出了全人的靶向 MUC18 的抗体 M13。M13 展现出良好的特异性、抗原亲和力以及内吞活性。随后, 将 M13 偶联 vcMMAE 生成了 M13-vcMMAE。M13-vcMMAE 在体外显示出有效的细胞毒性作用, 并在肿瘤异种移植模型 (patient-derived xenograft, PDX) 中展示出很强的抗肿瘤活性。

## 1 材料

### 1.1 肿瘤细胞

本研究使用的肿瘤细胞系包括人皮肤黑色素瘤细胞 A375、A2058、SK-MEL-5, 人表皮癌细胞 A431, 人宫颈癌细胞 HeLa, 人肺癌细胞 NCI-H460、NCI-H292, 人骨髓瘤细胞 NCI-H929, 均来源于 ATCC, 在 37℃、5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。A431、A375 和 A2058 细胞用添加 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养基培养, SK-MEL-5 和 HT-1080 细胞用添加 10%FBS 的 MEM 培养基培养。HeLa 细胞在含 10%FBS 的 EMEM 培养基中培养, NCI-H460、NCI-H292 和 NCI-H929 细胞在含 10%FBS 的 RPMI-1640 培养基中培养。MDA-MB-468 细胞在 37℃, 无 CO<sub>2</sub> 环境中培养, 培养基为 L-15 培养基, 添加 10%FBS。此外, CHO-S-hMUC18、CHO-S-fMUC18、CHO-S-mMUC18、MUC1、MUC13、MUC16、CD166 和 BCAM 过表达细胞系来自本实验室自制。PDX 模型肿瘤组织来自中国医学科学院。

### 1.2 仪器

SBC-1300IIA2 生物安全柜 (上海博迅医用生物仪器有限公司); Thermo 311 细胞培养箱 (美国赛默飞公司); CL1000 细胞计数器 (上海睿宇生物科技有限公司); Biacore T200 (美国 Cytiva 公司); Que 3-BR 型流式细胞仪、Incucyte 全自动细胞成像系统、Fortebio (德国赛多利斯公司); 1260 型和 1290 型液相色谱仪 (美国安捷伦公司); Akoya Polaris 仪器 (美国 Akoya 公司); RoboSep™-S 全自动细胞分离器 (加拿大 Stemcell Technologies 公司); Beacon 单 B 细胞分选平台 (美国 Bruker 公司)。

### 1.3 试剂

EasySep 小鼠 CD138 阳性选择试剂盒 (STEM-CELL Technologies, 货号 Cat# 18957RF); 人 MUC18 抗原 [hMUC18 (24-559)-His, KACTUS, 货号 MUC-HM118]; 猴 MUC18 抗原 [fMUC18 (24-559)-His, ACRO, 货号 MCM-C52H3]; ExpiFectamineCHO 转染

试剂盒(货号 A29133, ThermoFisher Scientific); Alexa Fluor 647 AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> 片段山羊抗人 IgG 抗体(Jackson, 货号 109-606-170); 1×HBS-EP(实验室自制); pHAb-Fab(一种用 pH 敏感染料标记的抗人的 Fab)(实验室自制); vc-MMAE(货号 HY-15575, MCE); 三(2-羧乙基)磷盐酸盐(TCEP)(MCE, 货号 51805-45-9); MCAM XP Rabbit mAb(CST, 货号 81701S, 克隆号 E3F3E); 免疫显色试剂(CST, 货号 DS9800), CHO-S-hMUC18(实验室自制)。

## 1.4 实验动物

SPF 级 8 周龄雌性 B-NDG 小鼠(用于考察药物体内抗肿瘤活性)、MUC18 基因敲除 Renlite 小鼠(用于筛选靶向 MUC18 的全人源化抗体)[百奥赛图(北京)基因生物技术有限公司]。本研究中的动物实验均符合中国实验动物护理和使用标准,并获得了百奥赛图(北京)基因生物技术有限公司实验动物伦理委员会的批准(批件号:PS-01-2408111、PS-01-2408041)。

## 2 方法

### 2.1 抗体免疫和发现

将人 MUC18 抗原蛋白与完全或不完全弗罗因德佐剂(Sigma)按 1:1 的比例乳化混合作为乳化抗原,在生物安全柜中无菌操作下皮下注射给小鼠。每个免疫部位注射 50 μL 乳化抗原,每隔一周对小鼠进行一次人和小鼠蛋白免疫。免疫 3 次后从眼睑处采集血清,测定小鼠血清的抗体滴度。免疫结束前一周,腹腔注射人 MUC18 抗原,尾静脉注射 CHO-S-hMUC18。

免疫结束后,解剖小鼠淋巴结和脾脏并在磷酸盐缓冲液(PBS)缓冲液中研磨,过滤去除组织残留物。将细胞悬浮液调整到适当的密度,放入全自动细胞分离器中进行 IgM 反向筛选和 CD138 阳性筛选,以分拣出浆细胞并将其调整到适当的细胞密度。使用单 B 细胞分选平台筛选与抗原蛋白结合的浆细胞,对阳性浆细胞进行裂解并克隆抗体基因,进行抗体发现和筛选。

### 2.2 抗体制备

将等量的重链和轻链表达质粒混合,并按照转染试剂盒说明书加入适量的 OptiPRO SFM3 和 ExpiFectamine CHO 试剂。然后将混合物转移到 ExpiCHO-S 细胞中,细胞密度为  $6 \times 10^6$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ ,总体积为 200 mL。转染后 24 h 和第 7 日,按照说明添加增强剂和补充剂。转染 14 d 后收集上清液。使用 Protein A 柱进行纯化,通过超滤将抗体溶液替换为 1×PBS 溶液。用尺寸排阻色谱(SEC),直立单层色谱(SMAC)和交叉相互作用色谱(CIC)检测抗体的纯度。热稳定性分析检测蛋白构象稳定性。

### 2.3 亲和力检测及表位分析

使用 Biacore T200 测定 M13 与人和猴 MUC18 抗原的亲和力。M13 用磷酸盐缓冲液(PBS)稀释至  $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,抗原稀释至  $200 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。使用 Protein A 芯片以  $10 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  的流速捕获抗体 50 s,再以  $30 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  的流速使抗体与抗原结合 180 s,然后解离 600 s,得到结合解离曲线。用 Biacore Insight 分析软件分析数据,并用 1:1 结合模型拟合结合和解离曲线,得到亲和力动力学数据。

使用 Fortebio 对 M13 和对照 pAb253-analog 进行表位分选。使用 1×HBS-EP(10×HBS-EP 母液:精确称量 80 g NaCl、2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、29 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O、2 g KCl,溶于 800 mL 超纯水。加入 5 mL Tween 20 后,定容至 1 L,调节 pH 至 7.4。随后取 100 mL 10×HBS-EP 母液稀释至 1 L, pH 校准至 7.4)作为稀释剂,将抗体稀释至  $200 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,抗原稀释至  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。以 Anti-Penta-HIS(HIS1K)探针为配体,捕获稀释后的抗原 150 s。随后,将稀释后的抗体依次用作分析物 1 和分析物 2,两者的结合时间均为 200 s。用 Octet Analysis Studio(12.2.2.26 版)分析程序进行数据分析。

### 2.4 结合与内吞

将 M13、pAb253-analog 和 Isotype 稀释至  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  并置于 4℃ 冰箱中备用。选择处于对数生长期的 A375、A2058、SK-MEL-5、HeLa 和 NCI-H460 肿瘤细胞,按每孔  $1 \times 10^5$  个细胞的密度铺板。将上述稀释后的样品加入不同的肿瘤细胞中混匀,加入细胞与样品的体积比为 1:1,在 4℃ 冰箱中孵育 30 min,然后向每个孔中加入 150 μL 1×PBS,在  $1200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 3 min,弃上清液。在每个孔中加入 50 μL Alexa Fluor 647 AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Human IgG antibody,质量浓度为  $0.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,孵育 15 min。加入 50 μL 1×PBS 重悬细胞并用流式细胞仪检测。

在抗体多浓度结合试验中,将初始浓度为  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的抗体按 3 倍比例倍比稀释,在 SK-MEL-5、A375、HeLa 和 NCI-H460 肿瘤细胞上进行结合试验。使用 Flowjo V10 软件进行数据分析。

在抗体与细胞的内吞实验中,将  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的待测抗体与 pHAb-Fab 各 25 μL 混合,室温下在黑暗中孵育 30 min。将 A375、SK-MEL-5 和 NCI-H460 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔接种到 96 孔板中,分别在 37℃ 下培养 2、4 和 6 h。孵育时间结束后,用 1×PBS 冲洗细胞两次。最后,用 50 μL 1×PBS 重新悬浮细胞,并用流式细胞仪检测。

### 2.5 抗体偶联药物的制备

抗体与小分子毒素偶联方法采用传统的半胱氨酸偶联策略。将抗体蛋白质量浓度调节至  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,然后加入适量 TCEP,在 25℃ 下还原



2 h; 加入  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  vc-MMAE 溶液 (与抗体蛋白的摩尔比为 6:1), 在  $25^\circ\text{C}$  下反应 1 h。加入  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  半胱氨酸 (与 vc-MMAE 的摩尔比为 4:1) 终止反应。残留的小分子通过超滤去除。通过疏水相互作用高效液相色谱 (HIC) 和 SEC 用于检测抗体偶联药物的药物抗体比 (DAR) 和纯度。

## 2.6 细胞毒性实验

将处于对数生长期的肿瘤细胞 A375、A2058 和 SK-MEL-5 接种到 96 孔板中, 每孔加入  $100 \mu\text{L}$  细胞悬液。肿瘤细胞附着后, 加入等体积的梯度稀释的 M13-vcMMAE、pAb253-vcMMAE、Isotype-vc-MMAE。将 96 孔板放入全自动细胞成像系统中, 在  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  条件下每 4 h 采集一次图像, 持续 3 d。在实验结束时, 对各处理组的细胞汇合度进行分析, 以该指标表征细胞存活率, 并基于此数据计算半数抑制浓度 ( $IC_{50}$  值)。

## 2.7 体内抗肿瘤活性实验

将 8 周大的雌性 B-NDG 小鼠饲养在无菌笼中, 并在规定的无病原体条件下进行饲养。将 PDX 肿瘤组织皮下植入小鼠体内, 当肿瘤平均体积达到  $200 \text{ mm}^3$  时, 将小鼠随机分组。采用尾静脉注射于分组后第 0 d 和第 7 d 给予药物, 给药剂量为  $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。实验周期内系统监测荷瘤小鼠的体质量波动及肿瘤生长动力学参数, 每周采集两次数据。终末时间点完成体质量与瘤径测量后, 对实验动物实施符合伦理规范的安乐死处置。

## 2.8 免疫组织化学染色

经过脱蜡、水化以及甲醛固定后, 石蜡包埋切片, 在抗原修复缓冲液中处理 20 min, 随后与

MCAM (E3F3E) XP Rabbit mAb 孵育 1 h。将样本组织浸没在滴有 3% 过氧化氢的溶液中, 并在室温下振荡封闭 10 min。清洗切片并用辣根过氧化物酶标记的二抗 (bond polymer refine detection) 孵育 30 min, 使用二氨基联苯胺染色缓冲液和苏木精检测目标抗原表达。使用组织化学评分系统 (H-score) 评估靶点表达的强度。表达等级分为 0 (H-score 0 ~ 9)、+ (H-score 10 ~ 99)、++ (H-score 100 ~ 199) 和 +++ (H-score 200 ~ 300)。

## 2.9 数据分析

使用 GraphPad Prism 8 软件进行统计分析。采用单、双因素方差分析确定差异的显著性。实验数据以  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  表示,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 免疫和 M13 抗体的发现

为了获得高质量的全人 MUC18 抗体, 本研究用重组人 MUC18 蛋白免疫 RenLite KO 小鼠。3 次免疫后, 第 35 日采集小鼠眼眶血。通过流式细胞术分析, 有免疫反应的小鼠能够达到  $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$  的滴度。

第 42 日将血清抗体滴度为  $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$  的小鼠处死, 采集免疫器官和组织, 使用 EasySep™ 小鼠 CD138 阳性选择试剂盒分离浆细胞, 并使用 Beacon 平台进行了抗体发现并获得了抗体序列。然后, 进行初步筛选 (利用瞬时转染 CHO-S 细胞获得的质粒上清) 和二次筛选 (纯化蛋白)。通过评估抗体的亲和力、结合活性、内吞活性和抗肿瘤药效, 本研究从 300 个抗体最终选定了候选抗体 M13。免疫和抗体筛选过程如图 1 所示。

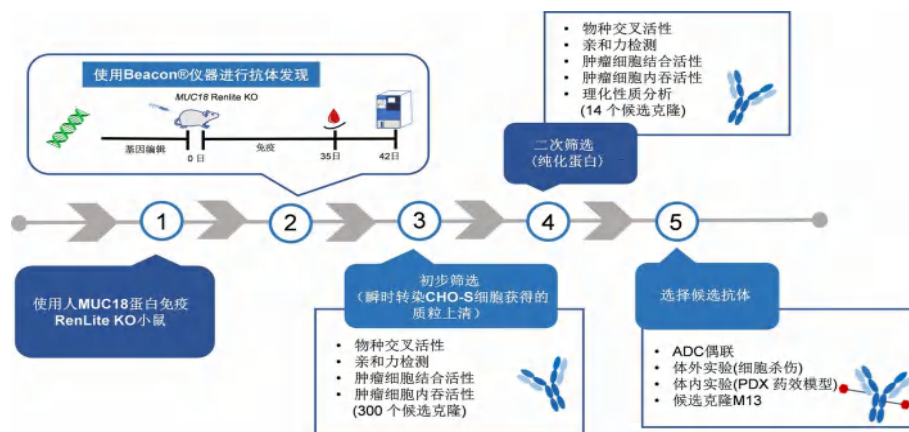


图 1 免疫过程及 M13 抗体发现流程

Fig 1 Immunization process and M13 antibody discovery process

### 3.2 M13 的表征

本研究采用治疗性抗体分析工具 Therapeutic Antibody Profiler (TAP) [25] 对其成药性特征进行预测。该算法基于 242 个已进入临床试验的抗体药物数据库, 通过机器构建多参数评估模型, 可量化预

测候选抗体的免疫原性风险、理化稳定性及生产工艺可行性等关键开发指标。分析结果显示, M13 表现出了良好的五项抗体可开发性特征, 其理化性质与临床成功抗体的统计分布特征高度吻合, 大幅降低了后期工艺开发与规模化生产的风险 (见表 1)。



表 1 M13 抗体成药性预测结果

| Tab 1 Developability prediction results of the antibody M13 |         |
|-------------------------------------------------------------|---------|
| 指标                                                          | 数值      |
| 总 CDR 长度                                                    | 49      |
| CDR 邻近区 PSH 评分                                              | 143.671 |
| CDR 邻近区 PPC 评分                                              | 0       |
| CDR 邻近区 PNC 评分                                              | 0.5951  |
| SFvCSP 评分                                                   | 2       |

SEC 结果表明, M13 的纯度为 98.35% (见图 2A)。直立单层色谱 (SMAC) 中 M13 保留时间小于 12.8 min, 表明该抗体具有良好的胶体稳定性 (见图 2B)。此外, 交叉作用色谱 (CIC) 中 M13 保留时间小于 10.1 min, 表明该抗体与人血清多克隆抗体没有相互作用<sup>[26]</sup> (见图 2C)。

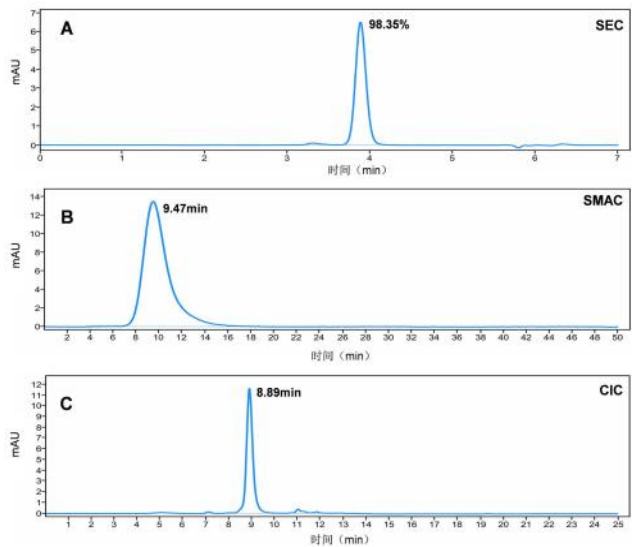


图 2 M13 的理化分析

Fig 2 Physical and chemical analysis of M13

A. SEC 检测抗体纯度 (SEC for antibody purity assessment); B. SMAC 检测抗体的胶体稳定性 (SMAC for evaluating antibody colloidal stability); C. CIC 检测抗体与人血清多克隆抗体的交叉作用 (CIC for detecting antibody cross-reactivity with human serum polyclonal antibodies)。

表位分选结果表明, 与 pAb253-analog 相比, M13 识别不同的表位 (见图 3A)。M13 与人、猴 MUC18 的亲和力值相当, 与人 MUC18、猴 MUC18 的解离平衡常数 ( $K_D$ ) 分别为 10.6、15.4 nmol·L<sup>-1</sup>。相比之下, pAb253-analog 与人 MUC18、猴 MUC18 的  $K_D$  分别为 74、141 nmol·L<sup>-1</sup>。很明显, pAb253-analog 与人和猴的抗原很快解离, 而 M13 与猴 MUC18 的亲和力高于 pAb253-analog (见图 3B)。这些数据表明, M13 具有良好的理化特性和可开发性, 同时还具有很强的抗原亲和力。

最后, 本研究还检测了 M13, pAb253-analog 与人、猴、鼠 MUC18 的过表达细胞系及 CHO-S 基底细胞的结合, 结果表明 M13 和 pAb253-analog

与人、猴 MUC18 过表达细胞系有强烈的结合, 而与鼠 MUC18 过表达细胞系不结合。pAb253-analog 与 CHO-S 细胞有较弱的结合 (见图 4), 这表明 pAb253-analog 可能缺乏特异性。

### 3.3 M13 的特异性结合

据报道, MUC18 在肿瘤中广泛表达<sup>[19-22]</sup>。本研究确认了 M13 与黑色素瘤、肺癌和宫颈癌细胞株的结合亲和力。图 5A 描述了 M13 与各种肿瘤细胞系的结合效果, 细胞系信息见表 2。结果表明 M13 与不同的 MUC18 阳性肿瘤细胞系 (A375、A2058、SK-MEL-5、MDA-MB-231、HeLa、HT-1080、NCI-H460 和 NCI-H292) 具有很强的结合活性, 与 MUC18 阴性肿瘤细胞系 (A431 和 NCI-H929) 没有相互作用。

表 2 细胞系信息

| Tab 2 Information of cell line |            |        |      |
|--------------------------------|------------|--------|------|
| 癌症类型                           | 细胞系        | 相对 MFI | 表达水平 |
| 黑色素瘤                           | A2058      | 270.2  | +++  |
|                                | SK-MEL-5   | 168.3  | +++  |
|                                | A375       | 44.2   | +    |
| 宫颈癌                            | HT-1080    | 268.97 | +++  |
|                                | HeLa       | 45.6   | +    |
| 肺癌                             | NCI-H460   | 59.8   | ++   |
|                                | NCI-H292   | 18.58  | +    |
| 骨髓瘤                            | NCI-H929   | 0.93   | -    |
| 乳腺癌                            | MDA-MB-231 | 61.78  | ++   |
| 表皮瘤                            | A431       | 1.07   | -    |

注: 相对 MFI > 150, +++; 相对 MFI = 50 ~ 150, ++; 相对 MFI < 50, +; 相对 MFI < 2, -。

Note: rMFI > 150, + + +; rMFI = 50 ~ 150, + +; rMFI < 50, +; rMFI < 2, -。

各种 CAM 之间存在明显的同源性。本研究对 MUC 家族蛋白质序列的分析表明 (序列比对数据来自 Uniport 数据库), 其同源性水平在 6.67% ~ 30% (见图 5B)。通过外源过表达同源基因, 本研究检测了 M13 的结合特异性。结果显示, M13 特异性结合 MUC18, 不与其他同家族蛋白结合。而 pAb253-analog 非特异性结合 MUC18 同家族成员 MUC13, BCAM (见图 5C)。

此外, 在表达不同水平 MUC18 的 A375、HeLa、NCI-H460 和 SK-MEL-5 细胞中, M13 的结合活性比 pAb253-analog 更强 (见图 5D)。在 A375 细胞中, M13 的半数效应浓度 ( $EC_{50}$ ) 值为 0.90 nmol·L<sup>-1</sup>, 而 pAb253-analog 的  $EC_{50}$  值为 1.84 nmol·L<sup>-1</sup>。M13 和 pAb253-analog 的  $EC_{50}$  值相差近 2 倍, 这一趋势在其余 3 种细胞系中也是一致的, 凸显出 M13 强大的结合活性。以上这些结果表明通过 RenLite KO 小鼠获得的 M13 抗体具有特异性和良好的亲和力。

### 3.4 M13 的内吞活性

抗体偶联药物能够通过抗体与肿瘤细胞表面抗原特异性结合, 进而诱导细胞的内吞, 随后抗体偶

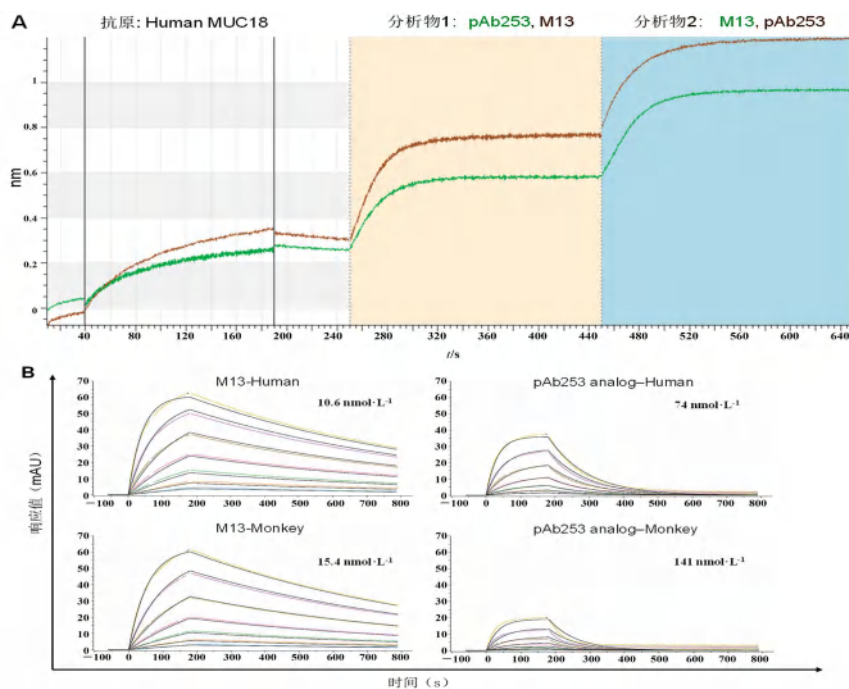


图 3 M13 的表位分选 (A) 及结合亲和力 (B)

Fig 3 Epitope binning analyzed (A) and affinity determination (B) of M13

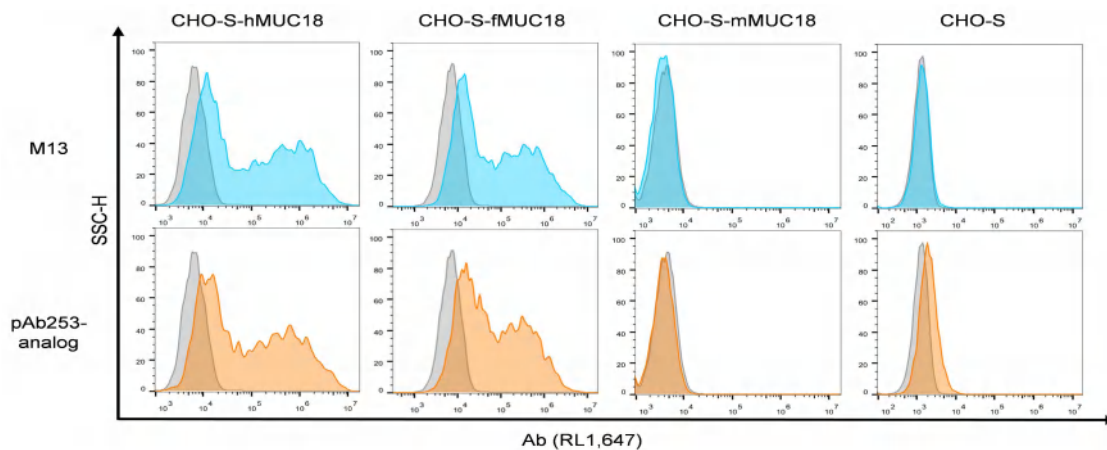


图 4 MUC18 的人、猴、鼠过表达细胞系及 CHO-S 与 M13 和 pAb253-analog 的结合

Fig 4 Binding profiles of M13 and pAb253-analog to human, monkey, and mouse MUC18-overexpressing cell lines and CHO-S

注 (Note): 灰色直方图代表 Isotype, 蓝色直方图代表 M13, 橙色直方图代表 pAb253-analog (The gray histogram represents Isotype; the blue histogram represents M13; the orange histogram represents pAb253-analog)。

联药物中的抗体或连接子会被细胞内的酶类或其他物质裂解, 从而释放出小分子毒素。因此内吞是影响抗体偶联药物疗效的一个重要因素。为了确定 M13 能否有效促进内吞并释放毒素, 本研究使用流式细胞术量化了 M13 抗体在表达 MUC18 的不同表达水平肿瘤细胞中的内吞效率 (见图 5E), 虽然 M13 的内吞速率没有 pAb253-analog 那么强, 但 M13 和 Isotype 的内吞速率差异有统计学意义, 表明 M13 也具有良好的内吞活性。

### 3.5 M13-vcMMAE 体外细胞毒性研究

在这项研究中, 通过半胱氨酸位点实现抗体与小分子毒素的偶联。HIC 结果显示 M13-vcMMAE 的 DAR 值为 4.10 (见图 6A)。SEC 分析结果显示抗体偶

联药物纯度为 98.67%, 纯度极高 (见图 6B)。这些结果表明本研究成功合成了 DAR 为 4.10 的高纯度 M13-vcMMAE, 并同法制备了对照抗体偶联药物 Isotype-vcMMAE 和 pAb253-vcMMAE。随后利用 Incucyte 仪器检测抗体偶联药物的体外细胞毒性<sup>[27]</sup>。检测结果表明, M13-vcMMAE 对 A2058、SK-MEL-5 和 A375 细胞的细胞毒性效果与阳性对照 pAb253-vcMMAE 相当 (见图 6C、6D)。此外, 还观察到 M13-vcMMAE 与 Isotype-vcMMAE 的细胞毒性存在明显差异。在阴性细胞 A431 中, M13-vcMMAE 和 pAb253-vcMMAE 与 Isotype-vcMMAE 差异没有统计学意义, 说明 M13-vcMMAE 的杀伤能力呈现靶点依赖性。

### 3.6 M13-vcMMAE 的体内抗肿瘤活性

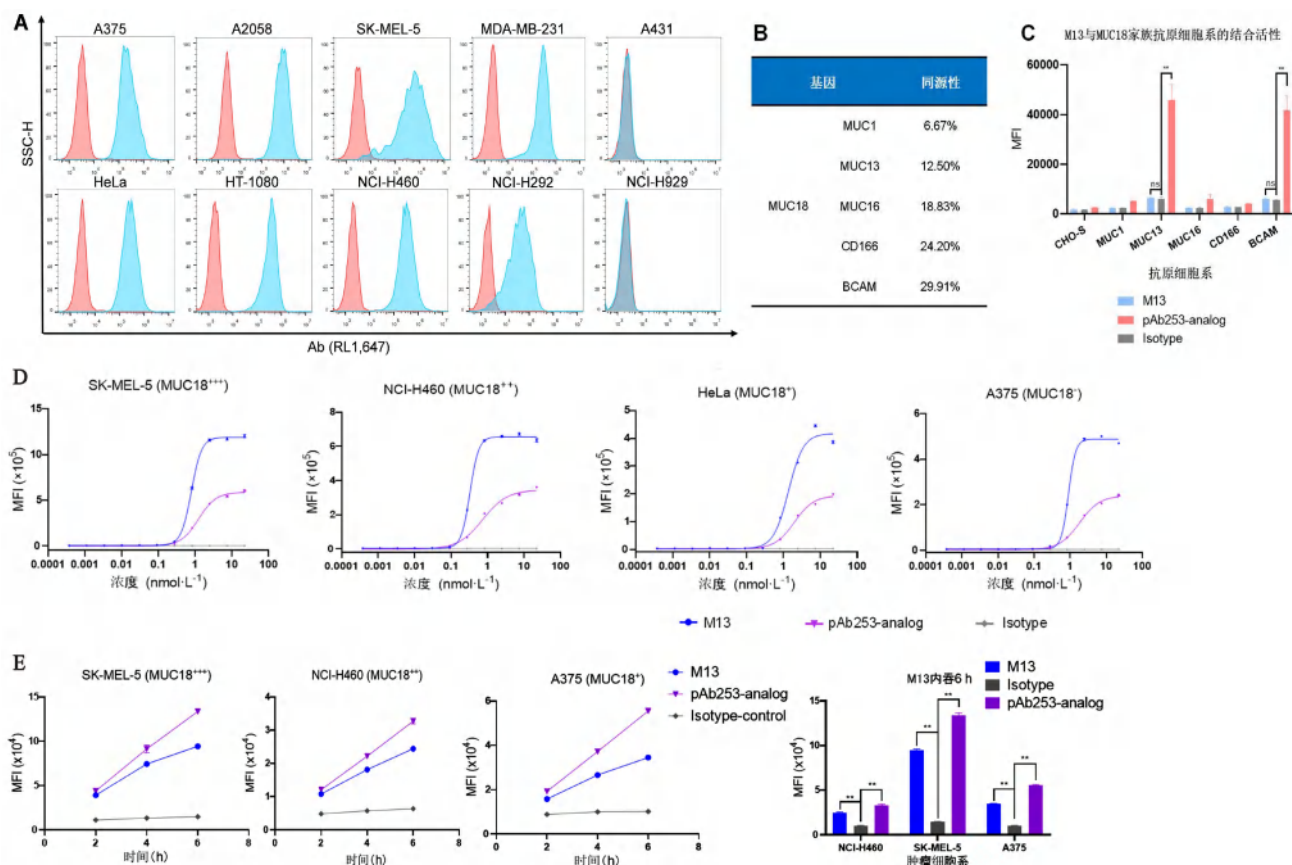


图5 M13与不同细胞的结合亲和力和内吞活性

Fig 5 Binding affinity and internalization of M13 to different cells

A. M13与多种肿瘤细胞系结合：蓝色直方图代表M13，红色直方图代表Isotype；B. 人MUC18与同家族基因之间的同源性；C. M13和pAb253-analog与MUC18同家族抗原细胞系的结合分析；D. M13、pAb253-analog和Isotype在A375、SK-MEL-5、NCI-H460和HeLa细胞中的 $EC_{50}$ 值；E. M13的内吞。

A. Binding profiles of M13 to multiple tumor cell lines: The blue histogram represents M13; the red histogram represents Isotype; B. Homology analysis between human MUC18 and its homologous genes; C. Binding analysis of M13 and pAb253-analog to MUC18 homologous antigen cell lines; D.  $EC_{50}$  values of M13, pAb253-analog, and A375, SK-MEL-5, NCI-H460, and HeLa cell lines; E. Internalization of M13.

在雌性B-NDG小鼠中建立乳腺癌PDX模型BP0818和肺癌PDX模型BP0508。免疫组化染色显示BP0818与BP0508均为MUC18高表达的肿瘤模型。M13-vcMMAE可显著抑制两种PDX模型中肿瘤细胞的生长(见图7A、7C)。在BP0818模型中，观察到空白组与M13-vcMMAE组之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )，而pAb253-vcMMAE组与空白组之间差异没有统计学意义，表明M13-vcMMAE组比pAb253-vcMMAE组具有更强的抗肿瘤活性(见图7A)，M13-vcMMAE组的抑瘤率(TGI)为38%，而pAb253-vcMMAE组的TGI为10%。在BP0508模型中，pAb253-vcMMAE组与空白组和Isotype-vcMMAE组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。此外，M13-vcMMAE组与pAb253-vcMMAE组之间差异没有统计学意义，表明M13-vcMMAE组与pAb253-vcMMAE组在体内的抗肿瘤活性相当(见图7C)。M13-vcMMAE组的TGI为42%，pAb253-vcMMAE组的TGI为58%。此外，各治疗组的体重

差异也没有统计学意义(见图7B)。这些研究结果表明，M13-vcMMAE能显著抑制MUC18阳性异种移植肿瘤的增殖。

#### 4 讨论

抗体偶联药物是一个复杂的系统，包括三个基本要素：抗体、连接子和小分子毒素。成功的抗体偶联药物取决于这三个要素的组合，而靶点选择则是其基础。理想的抗体偶联药物靶点需要在肿瘤中特异性表达，同时应具有良好的内吞特性，以实现有效载荷的高效递送。

MUC18最初被确定为与促进黑色素瘤进展有关的黑色素瘤抗原<sup>[18, 28-29]</sup>，并且具有多种同家族成员，因此MUC18抗体的特异性至关重要。本研究利用RenLite KO小鼠，并通过高通量的Beacon抗体发现平台，从数百种抗体中发现了兼具特异性和有效性的M13。

作为阳性对照的pAb253是通过使用PETAL(proteome-scale mAb array platform)抗体发现平台，



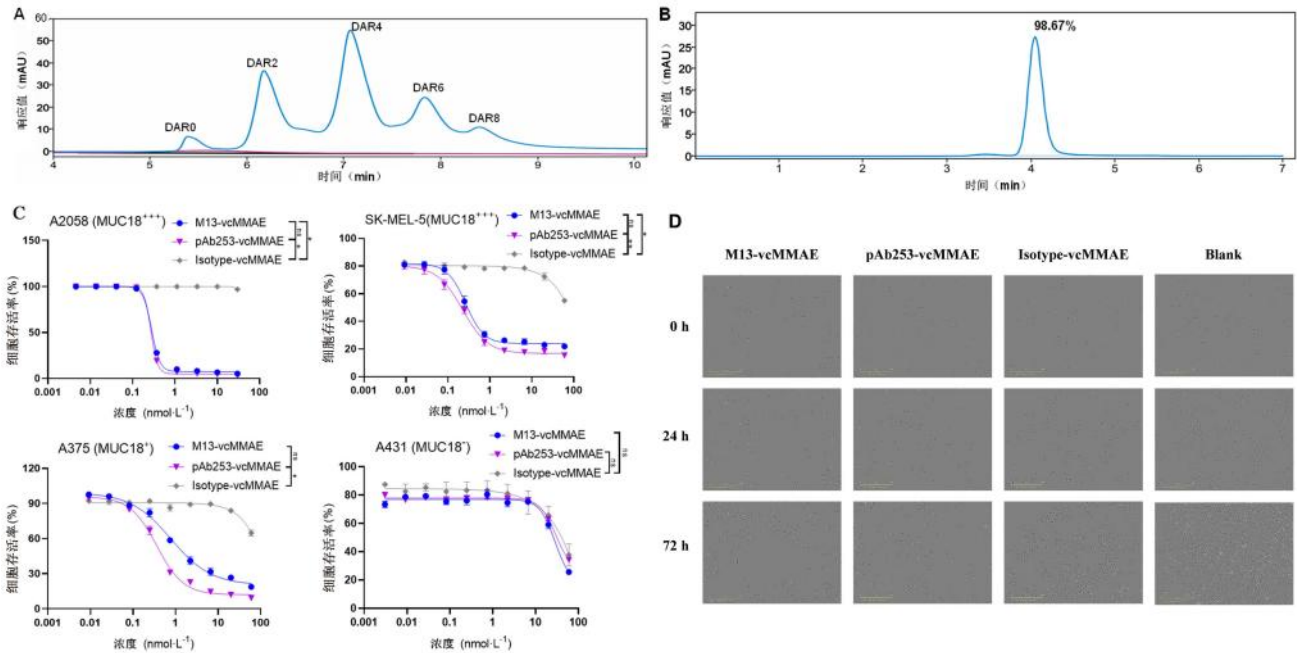


图 6 M13-vcMMAE 的制备和表征以及其体外细胞毒性实验

Fig 6 Preparation and characterization of M13-vcMMAE and its in vitro cytotoxicity experiments

A ~ B. 纯化的 M13-vcMMAE 的 HIC 和 SEC 分析 (HIC and SEC analysis of purified M13-MMAE); C. 不同抗体偶联药物对 A2058、A375、SK-MEL-5、A431 肿瘤细胞的细胞毒性 (cytotoxicity of different antibody-drug conjugates to A2058, A375, SK-MEL-5 and A431 tumor cells); D. 不同抗体偶联药物对 A375 肿瘤细胞的细胞毒性 (cytotoxicity of different antibody-drug conjugates to A375 tumor cells)

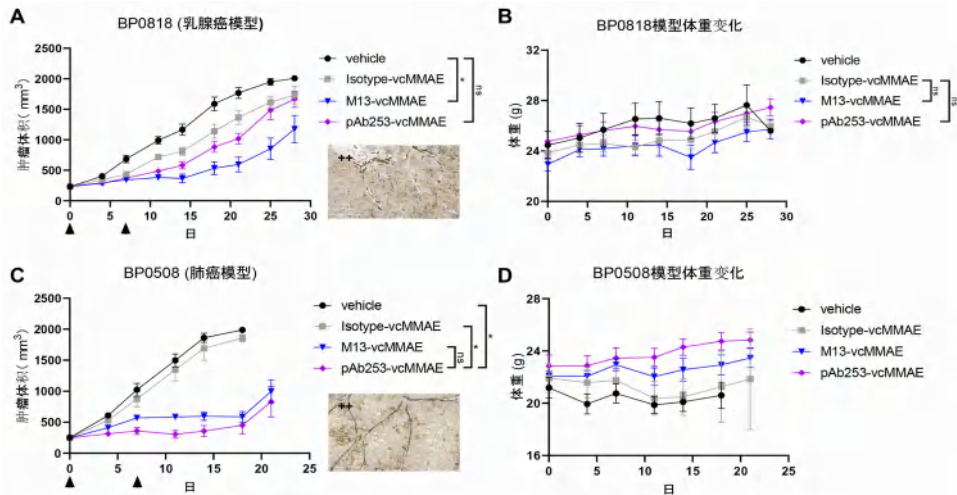


图 7 M13-vcMMAE 对 MUC18 阳性肿瘤生长的抑制效应 (\* $P < 0.05$ )

Fig 7 Inhibitory effect of M13-vcMMAE on MUC18-positive tumor growth (\* $P < 0.05$ )

筛选得到针对黑色素瘤细胞表面靶标的 MUC18 抗体。实验表明, pAb253-analog 与 CHO-S 和 MUC13、BCAM 同家族过表达细胞系存在非特异性结合。而本研究使用了 RenLite KO 小鼠免疫得到的 M13 则展示了靶向特异性, 不与 MUC13、BCAM 过表达细胞系结合, 且在亲和力、MUC18 阳性细胞结合活性方面均优于 pAb253-analog。虽然在肿瘤细胞系中 M13 内吞强度弱于 pAb253-analog, 且其体外杀伤活性相似或弱于 pAb253-analog, 但在两项体内药效试验中, M13-vcMMAE 的药效甚至优于阳性对照。这表明 M13 不仅能够特异性靶向 MUC18, 而且还具

有良好的抗肿瘤活性。同时也提示, 鉴于抗体偶联药物的复杂性, 其抗体亲和力、靶向特异性都可能影响最终的体内抗肿瘤药效, 单一的体外活性表征并不能完全反映其体内抗肿瘤活性。

与 pAb253-analog 相比, M13 表现出更高的亲和力并能识别不同的表位, 这进一步证明了通过采用 KO 小鼠策略, 可获得高质量的特异性抗体。M13 与细胞毒性有效载荷结合后能够杀死多种表达 MUC18 的肿瘤。因此, M13 有可能被开发成治疗 MUC18 阳性肿瘤的候选药物, 包括黑色素瘤、胰腺癌、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌和肺癌。

M13-vcMMAE 是针对 MUC18 的抗体偶联药物的概念验证的产物。未来,课题组计划将 M13 与拓扑异构酶抑制剂有效载荷偶联,这有助于降低抗体偶联药物的毒性并提高药物疗效。

总之,本研究利用 RenLite KO 小鼠发现靶向 MUC18 的抗体,最终开发出了具有良好靶向性和有效性的抗体 M13,该抗体具有针对治疗黑色素瘤和其他实体瘤的潜力。

## 参考文献

- [1] Jin Y, Schladetsch MA, Huang X, et al. Stepping forward in antibody-drug conjugate development [J]. *Pharmacol Ther*, 2022, 229: 107917.
- [2] Teicher BA. Antibody drug conjugates [J]. *Curr Opin Oncol*, 2014, 26 (5): 476-483.
- [3] Fu ZW, Li SJ, Han SF, et al. Antibody drug conjugate: the “biological missile” for targeted cancer therapy [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 77 (1): 93.
- [4] Oflazoglu E, Stone IJ, Gordon K, et al. Potent anticarcinoma activity of the humanized anti-CD70 antibody h1F6 conjugated to the tubulin inhibitor auristatin via an uncleavable linker [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14 (19): 6171-6180.
- [5] Bargh JD, Isidro-Llobet A, Parker JS, et al. Cleavable linkers in antibody—drug conjugates [J]. *Chem Soc Rev*, 2019, 48 (16): 4361-4374.
- [6] Hamid O, Robert C, Daud A, et al. Five-year survival outcomes for patients with advanced melanoma treated with pembrolizumab in KEYNOTE-001 [J]. *Ann Oncol*, 2019, 30 (4): 582-588.
- [7] Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Five-year survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381 (16): 1535-1546.
- [8] Robert C, Grob JJ, Stroyakovskiy D, et al. Five-year outcomes with dabrafenib plus trametinib in metastatic melanoma [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381 (7): 626-636.
- [9] Fang Y, Yong QZ, Yin L, et al. Clinical characteristics, survival analysis and influencing factors of distant metastasis in patients with acromelanomas: a retrospective study [J]. *Medicine*, 2024, 103 (23): e38230.
- [10] Rantala ES, Hernberg MM, Piperno-Neumann S, et al. Metastatic uveal melanoma: the final frontier [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2022, 90: 101041.
- [11] Yde SS, Sjoegren P, Heje M, et al. Mucosal melanoma: a literature review [J]. *Curr Oncol Rep*, 2018, 20 (3): 28.
- [12] Ott PA, Pavlick AC, Johnson DB, et al. A phase 2 study of glembatumumab vedotin, an antibody-drug conjugate targeting glycoprotein NMB, in patients with advanced melanoma [J]. *Cancer*, 2019, 125 (7): 1113-1123.
- [13] Sandhu S, McNeil CM, LoRusso P, et al. Phase I study of the anti-endothelin B receptor antibody-drug conjugate DEDN6526A in patients with metastatic or unresectable cutaneous, mucosal, or uveal melanoma [J]. *Invest New Drugs*, 2019, 38 (3): 844-854.
- [14] Asundi J, Reed C, Arca J, et al. An antibody-drug conjugate targeting the endothelin B receptor for the treatment of melanoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17 (5): 965-975.
- [15] Deliu E, Brailoiu GC, Mallilankaraman K, et al. Intracellular endothelin type B receptor-driven  $Ca^{2+}$  signal elicits nitric oxide production in endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287 (49): 41023-41031.
- [16] Rose AAN, Annis MG, Frederick DT, et al. MAPK pathway inhibitors sensitize BRAF-mutant melanoma to an antibody-drug conjugate targeting GPNMB [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22 (24): 6088-6098.
- [17] Schön M, Kähne T, Gollnick H, et al. Expression of gp130 in tumors and inflammatory disorders of the skin: formal proof of its identity as CD146 (MUC18, Mel-CAM) [J]. *J Invest Dermatol*, 2005, 125 (2): 353-363.
- [18] Rapanotti MC, Campione E, Spallone G, et al. Minimal residual disease in melanoma: circulating melanoma cells and predictive role of MCAM/MUC18/MelCAM/CD146 [J]. *Cell Death Discov*, 2017, 3 (1): 17005.
- [19] Stalin J, Nollet M, Garigue P, et al. Targeting soluble CD146 with a neutralizing antibody inhibits vascularization, growth and survival of CD146-positive tumors [J]. *Oncogene*, 2016, 35 (42): 5489-5500.
- [20] Brechbuhl HM, Barrett AS, Kopin E, et al. Fibroblast subtypes define a metastatic matrixome in breast cancer [J]. *JCI Insight*, 2020, 5 (4): e130751.
- [21] Wu JC, Chuang YH, Wei YC, et al. Validating METCAM/MUC18 as a novel biomarker to predict the malignant potential of prostate cancer at an early stage by using a modified gold nanoparticles-based lateral flow immunoassay [J]. *Diagnostics*, 2021, 11 (3): 443.
- [22] Wu GJ. METCAM/MUC18 decreases the malignant propensity of human ovarian carcinoma cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19 (10): 2976.
- [23] Bai Q, Liu L, Long QL, et al. Decreased expression of mucin 18 is associated with unfavorable postoperative prognosis in patients with clear cell renal cell carcinoma [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8 (9): 11005-11014.
- [24] Shi J, Jiao T, Guo Q, et al. A cell surface-binding antibody atlas nominates a MUC18-directed antibody-drug conjugate for targeting melanoma [J]. *Cancer Res*, 2023, 83 (22): 3783-3795.
- [25] Raybould MIJ, Marks C, Krawczyk K, et al. Five computational developability guidelines for therapeutic antibody profiling [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116 (10): 4025-4030.
- [26] Jain T, Sun TW, Durand S, et al. Biophysical properties of the clinical-stage antibody landscape [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114 (5): 944-949.
- [27] McKertish CM, Kayser V. A novel dual-payload ADC for the treatment of HER2<sup>+</sup> breast and colon cancer [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15 (8): 2020.
- [28] Chen XH, Yan HW, Liu D, et al. Structure basis for AA98 inhibition on the activation of endothelial cells mediated by CD146 [J]. *iScience*, 2021, 24 (5): 102417.
- [29] Rapanotti MC, Cugini E, Nuccetelli M, et al. MCAM/MUC18/CD146 as a multifaceted warning marker of melanoma progression in liquid biopsy [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (22): 12416.

(收稿日期: 2025-01-20; 修回日期: 2025-03-10)

# 基于深度学习、分子对接及分子动力学模拟的 中药 DPP4 抑制剂虚拟筛选

甘鉴文<sup>1</sup>, 刘嵩<sup>1\*</sup>, 赵光年<sup>2\*</sup> (1. 武汉科技大学 医学院 湖北省职业危害识别与控制重点实验室, 武汉 430065; 2. 华中科技大学 同济医学院 附属同济医院, 武汉 430030)

**摘要:** **目的** 基于计算机虚拟筛选技术, 从中药大数据库中寻找潜在的新型二肽基肽酶-4 (DPP4) 抑制剂。**方法** 整合基于深度学习的活性及安全性筛选模型, 吸收、分布、代谢和排泄 (ADME) 性质预测, 分子对接及分子动力学模拟实验构建 DPP4 抑制活性筛选系统, 对 TCMSP 数据库进行筛选。**结果** DPP4 抑制剂及临床毒性深度学习预测模型分别在 5 min 内完成了 13 413 种中药化合物的活性及安全性评价, 并结合 ADME 性质预测和分子对接筛选出了黄连碱、利卡灵 B 和三白草酮三种与阳性对照药物依格列汀相较 DPP4 抑制活性相近、毒性更低、ADME 特性更优的化合物。分子动力学模拟结果显示它们均可与 DPP4 蛋白形成稳定复合物。**结论** 黄连碱、利卡灵 B 和三白草酮可能是优良的潜在中药 DPP4 抑制剂。基于计算机辅助虚拟筛选系统可准确高效地发现天然产物潜在活性成分, 为中药成分大规模筛选提供了新途径。

**关键词:** 2 型糖尿病; 二肽基肽酶-4; 深度学习; 分子对接; 分子动力学模拟; ADME

**中图分类号:** R285

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-2981(2025)06-1539-08

**doi:** 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.007

## Virtual screening of DPP4 inhibitors from traditional Chinese medicine based on deep learning, molecular docking, and molecular dynamics simulation

GAN Jian-wen<sup>1</sup>, LIU Song<sup>1\*</sup>, ZHAO Guang-nian<sup>2\*</sup> (1. Hubei Key Laboratory of Occupational Hazard Identification and Control, School of Medicine, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065; 2. Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030)

**Abstract: Objective** To identify potential novel dipeptidyl peptidase-4 (DPP4) inhibitors from a large database of traditional Chinese medicines based on computerized virtual screening techniques. **Methods** We integrated deep learning-based activity and safety screening models, absorption, distribution, metabolism, excretion (ADME) property predictions, molecular docking, and molecular dynamics simulations to establish a screening system for DPP4 inhibitory activity, and potential DPP4 inhibitors were screened from the TCMSP database. **Results** The trained DPP4 inhibitors and clinical toxicity deep learning prediction models completed activity and safety evaluations of 13 413 traditional Chinese medicine compounds within 5 minutes, respectively. Then the ADME properties and molecular docking were combined to screen out 3 compounds, coptisine, licarin B, and sauchinone, which had similar DPP4 inhibitory activity, lower toxicity and better ADME properties than the positive control evogliptin. The molecular dynamics simulations also showed that the three compounds could stably bound to the DPP4 protein and formed complexes. **Conclusion** Coptisine, licarin B, and sauchinone may be ideal DPP4

**基金项目:** 湖北省自然科学基金面上项目 (No.2022CFB249, No.2023AFB670)。

**作者简介:** 甘鉴文, 男, 硕士, 主要从事天然药物化学和计算机虚拟筛选研究, email: ganjianwen2022@163.com \* **通信作者:** 刘嵩, 男, 副教授, 主要从事天然药物化学和计算机虚拟筛选研究, email: liusong@wust.edu.cn; 赵光年, 男, 副研究员, 主要从事肿瘤和代谢性疾病研究, email: zhaogn@tjh.tjmu.edu.cn



inhibitors from traditional Chinese medicine. In silico screening systems can efficiently and accurately discover the active ingredients in natural products, and help large-scale screening of traditional Chinese medicine components.

**Key words:** type 2 diabetes mellitus; dipeptidyl peptidase-4 inhibitor; deep learning; molecular docking; molecular dynamics simulation; absorption, distribution, metabolism and excretion

2 型糖尿病 (T2DM) 是一种慢性代谢疾病, 其全球发病率正以惊人的速度增长。根据国际糖尿病联合会 (IDF) 的统计, 目前全球约有 4.15 亿 2 型糖尿病成年患者, 预计到 2030 年这一数字将激增至 5.78 亿<sup>[1]</sup>。2 型糖尿病与  $\beta$  细胞的损伤密切相关, 主要表现为胰岛素分泌受损和外周胰岛素抵抗<sup>[2-3]</sup>。二肽基肽酶 -4 (DPP4) 是一种广泛分布于人体多种组织的整合膜蛋白, 包括肠道、肾脏、血管内皮、肝脏、胰腺以及免疫系统细胞<sup>[4-5]</sup>。DPP4 的主要功能是降解胰高血糖素样肽 -1 (GLP-1) 和葡萄糖依赖性促胰岛素多肽 (GIP) 等肠促胰岛素激素<sup>[6]</sup>。而 GLP-1 和 GIP 在促进  $\beta$  细胞存活、提高  $\beta$  细胞质量以及促进胰岛素分泌方面发挥着重要作用<sup>[7]</sup>。因此 DPP4 抑制剂被视为重要的糖尿病治疗药物。自 2006 年首个 DPP4 抑制剂获批上市以来, 截至 2024 年, 全球至少有 13 种 DPP4 抑制剂被批准用于治疗 T2DM, 还有超过 14 种抑制剂正处于不同的临床研发阶段<sup>[8-9]</sup>。已上市的 DPP4 抑制剂, 诸如沙格列汀和利格列汀等伴随着皮疹等不良反应, 显著影响了患者的用药依从性<sup>[10-11]</sup>。鉴于此, 研发新型 DPP4 抑制剂在抗糖尿病药物的研发中显得尤为重要。

中药在治疗复杂疾病方面表现出显著的疗效, 然而由于成分过于复杂, 药效及作用机制不明确, 极大地限制了中药的药物发现研究<sup>[12-14]</sup>。深度学习是一种基于神经网络的人工智能方法, 不仅可以收集到的相关数据快速预测目标化合物的潜在靶点活性, 还能有效地对其进行安全性评估, 从而显著加快药物发现过程<sup>[15]</sup>。近年来, 随着人工智能技术的快速发展, 深度学习以其处理大型复杂数据的能力, 迅速成为药物活性及毒性筛选的重要工具<sup>[16-17]</sup>。在中药药物发现过程中, 中药化学成分吸收、分布、代谢和排泄 (ADME) 性质的缺陷也是导致其研发失败的重要原因之一。因此在早期阶段全面评估药物的 ADME 性质同样至关重要。基于受体结构的分子对接和分子动力学模拟, 可以深入研究药物和靶

点蛋白间的结合模式和亲和力, 评估相互作用模式及可能引发的构象变化, 已成为针对大规模药物分子进行虚拟筛选的重要手段<sup>[18]</sup>。这些计算机虚拟筛选技术在中药的药物发现领域均展现出了巨大的潜力。通过整合深度学习、ADME 筛选、分子对接和分子动力学模拟技术构建中药活性成分筛选系统, 不仅突破了传统方法在处理中药复杂成分时的局限性, 更全面地评估了中药成分开发成药物的潜力, 显著提高了药物发现的效率与准确性。

本研究基于深度学习活性及毒性筛选、化合物 ADME 性质预测、分子对接和分子动力学模拟技术构建中药 DPP4 抑制剂筛选体系, 系统性地从包含 13 413 种小分子的 TCMSP 中药大数据库中筛选出潜在的活性高、安全性好和 ADME 性质佳的 DPP4 抑制剂, 为糖尿病治疗和中药筛选提供了新的思路和方法。

## 1 方法

首先, 利用基于深度学习的 DPP4 抑制活性筛选模型和 Clintox 毒性筛选模型对中药系统药理学数据库 TCMSP (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>) 的化合物分别进行抑制活性筛选和毒性筛选, 筛选出 TCMSP 数据库中抑制活性预测指数高于 0.9 且毒性预测指数低于 0.2 的化合物。随后, 利用药物吸收分布代谢排泄预测平台评估候选化合物的 ADME 特性。通过 ADME 筛选的化合物与 DPP4 蛋白对接筛选, 以评估其与 DPP4 蛋白的结合能力, 并利用分子动力学模拟评估其结合的动态稳定性。

### 1.1 深度学习

**1.1.1 DPP4 抑制活性筛选模型** Chemprop 是一种基于定向消息传递神经网络 (DMPNN) 的深度学习模型。该模型将分子 SMILES (简化分子线性输入规范) 转换为分子图, 其中原子作为节点, 化学键作为边。自 Chemprop 问世以来, 多篇基于 Chemprop 虚拟筛选的研究性论文陆续发表, 充分证明了该模型的可靠性和有效性<sup>[19-21]</sup>。本研究基于 Chemprop 构建 DPP4 抑制剂的二元分类模型。

为了构建 DPP4 抑制活性分类模型, 从 ChEMBL 数据库 ([www.ebi.ac.uk/chembl/](http://www.ebi.ac.uk/chembl/)) 中收集了 DPP4 相关化合物数据 (ChEMBL284), 并提取了具有确切半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 值的数据。其中  $IC_{50}$  值小于  $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的化合物被分类为抑制剂 (标记为 1),  $IC_{50}$  值大于  $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的化合物被分类为非抑制剂 (标记为 0)。将数据集按照 8:1:1 的比例随机拆分为训练集、验证集和测试集, 其中训练集用于模型训练, 验证集用于调整模型的超参数, 测试集用于模型性能评价。采用贝叶斯超参数优化法对模型进行 20 次优化迭代以改进模型的超参数, 根据测试集计算模型的 ROC 曲线下面积 (AUC)、准确度、精确率、F1 分数和 Matthews 相关系数 (MCC) 评估模型的性能。

**1.1.2 Clintox 毒性筛选模型** 毒性筛选模型源于先前的研究<sup>[22]</sup>, 由 Clintox 数据集训练而成。数据集包含 1484 种具有已知结构的化合物, 其中 112 种化合物具有临床毒性, 标记为 1; 1372 个为无毒化合物, 标记为 0。模型训练方法与 DPP4 抑制活性分类模型一致。

**1.1.3 TCMSP 数据库虚拟筛选** TCMSP 中的原始化合物结构均为 mol2 格式, 通过基于 Rdkit 的脚本将其全部转换为 Smiles 格式, 最终获得 13 413 个小分子。分别使用 DPP4 抑制活性筛选模型和 Clintox 毒性筛选模型对 TCMSP 全库进行筛选, 抑制活性预测指数高于 0.9 的且毒性预测指数低于 0.2 的高活性、低毒性化合物将被保留进行下一步的筛选。为规避过拟合对预测结果的影响, 从目前上市的 DPP4 抑制剂中选择未纳入训练集的依格列汀 (Evogliptin) 作为本研究的阳性对照药物。

## 1.2 ADME 筛选

使用 ADMET lab 3.0 (<https://admetlab3.scbdd.com/>) 平台对候选化合物进行 ADME 性质的筛选, ADMET lab 3.0 能够高效计算和预测化合物的 21 种理化性质、19 种药物化学性质和 34 种 ADME 属性<sup>[23]</sup>。利用其中的 Lipinski 规则、Golden Triangle 规则、GSK 规则和 Veber 规则对上述结果的候选化合物进行进一步筛选, 以评估其胃肠道渗透性、生物利用度等关键类药参数。

## 1.3 分子对接

DPP4 (PDB ID: 5KBY) 的晶体结构从 RCSB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载。使用 Auto Dock Tools 1.5.7 对蛋白质结构进行处理。小分子结构从 TCMSP 数据库下载, 依格列汀结构从 Pubchem 数据库下载, 使用 Openbabel 3.1.1 将其全

部转化为 pdbqt 格式并进行能量最小化。蛋白和小分子对接通过 Autodock Vina 1.1.2 完成, 并根据对接结合能评估结合强度。选择最佳结合构象导入 Discovery Studio 2020 Client 和 PyMOL 2.5.4 中进行进一步分析。

## 1.4 分子动力学模拟

使用 GROMACS 2023.2 软件分别对空蛋白和蛋白配体复合物进行 100 ns 的分子动力学模拟。小分子的最佳构象通过 ATB 平台 (<https://atb.uq.edu.au/>) 生成相应的拓扑文件。使用 GROMOS 54A7 力场构建初始模型, 使用最陡下降法进行 5000 步能量最小化, 避免体系中原子任何不合理的接触。在 310 K 下, 进行 500 ps 的恒定原子数、体积、温度 (NVT) 与恒定原子数、压力、温度 (NPT) 系综平衡模拟。最后进行 100 ns 分子动力学模拟, 模拟积分步长设置为 2 fs。模拟结束后消除模型自身的平动与转动, 并计算模拟期间的均方根偏差 (RMSD)、均方根波动 (RMSF)、回旋半径 (Rg) 和氢键 (H-bond) 变化。从 100 ns 的模拟轨迹文件中抽取最后 5 ns 用于评估结合强度和能量贡献。能量贡献通过 gmxtool 的 `gmx_mmpbsa.bsh` (Jicun Li) 脚本计算<sup>[24]</sup>。最终结果使用 GraphPad Prism 8 和 PyMOL 2.5.4 进行可视化分析。

## 2 结果

### 2.1 深度学习建模结果分析

去除数据集中的重复项后, 最终数据集包含 2134 种抑制剂和 1522 种非抑制剂。为了验证该数据集的化学空间多样性, 以拓扑极性表面积 (TPSA)、可旋转键数 (nRotB)、氢键供体数 (HBA)、氢键受体数 (HBD)、脂水分配系数 (LogP) 和分子量 (MolWt) 为输入, 对数据集进行主成分分析 (PCA)。如图 1A 所示, 训练集、验证集与测试集的化学空间分布平均, 并且三者的化学空间相互重叠。这一结果表明, 数据集的随机划分是合理且可行的。

该模型的 AUC 值为 0.899, ROC 曲线如图 1B 所示。在阈值为 0.9 时, 模型的准确度、精确率、F1 分数和 Matthews 相关系数分别为 0.77、0.89、0.76 和 0.57。这些结果表明, 该分类模型具有出色的预测性能, 能够有效区分抑制活性和非抑制活性化合物。

Clintox 毒性筛选模型 AUC 为 0.878, 模型的整体准确度为 0.966, 同样表明该模型性能良好, 分类效果出色。

### 2.2 虚拟筛选结果分析



首先,从 TCMSP 天然产物数据库的 13 413 种小分子中,基于 DPP4 抑制活性筛选模型和 Clintox 毒性模型筛选,得到 258 个高抑制活性和低毒性的化合物。随后,基于四个类药规则进一步进行筛选,以确保潜在 DPP4 抑制剂具有高生物利用度。

通过深度学习和 ADME 筛选,去除其中因无 CAS 号而无法溯源的小分子后获得 41 个潜在 DPP4 抑制剂。对筛选出的 DPP4 抑制剂进行化学结构与药材来源分类分析,结果如图 2A 与 2B 所示。这些化合物以萜类和生物碱为主,分别占比 39.02% 和 26.83%。黄药子是潜在 DPP4 抑制剂的主要来源,其次为黄连、蓼大青叶、白屈菜、黄柏、穿心莲、佛手和肉豆蔻。黄药子、黄连、蓼大青叶、白屈菜、黄柏、穿心莲、佛手和肉豆蔻这些药材均与糖尿病的治疗密切相关<sup>[25-32]</sup>。

将 41 个潜在的 DPP4 抑制剂与 DPP4 蛋白进行分子对接,最终筛选出结合能低于  $-35\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  且易获取的化合物:黄连碱、利卡灵 B、三白草酮。

黄连碱、利卡灵 B、三白草酮和阳性对照依格列汀的 DPP4 抑制指数、Clintox 临床毒性指数、ADME 指数与对接得分如表 1 所示,黄连碱、利卡灵 B 和三白草酮的 DPP4 抑制指数分别为 0.98、0.95 和 0.92,表明 3 个化合物在抑制 DPP4 酶活性方面展现出较高的潜力;阳性对照药依格列汀的 DPP4 抑制指数为 0.99,证明 DPP4 抑制剂筛选模型的可靠性。在毒性预测方面,黄连碱、利卡灵 B 和三白草酮的 Clintox 临床毒性指数分别为 0.05、0.13 和 0.08,均低于依格列汀的 0.29,表明 3 个候选化合物相较于依格列汀具有更好的安全性。在 ADME 指数方面,3 个候选化合物相较于依格列汀多满足一项类药规则条件,说明 3 个候选化合物可能有更好的生物利用度。将筛选出的 3 个化合物和依格列汀分别进行分子对接分析和分子动力学模拟,并计算其结合自由能,以进一步评估它们与 DPP4 蛋白的结合稳定性。

表 1 候选化合物的 DPP4 抑制指数、Clintox 临床毒性指数、ADME 指数与对接得分

| Tab 1 DPP4 inhibition index, Clintox clinical toxicity index, ADMET index and docking score of candidate compounds |           |                |          |                 |      |       |                                            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|----------------|----------|-----------------|------|-------|--------------------------------------------|
| 化合物                                                                                                                | DPP4 抑制指数 | Clintox 临床毒性指数 | Lipinski | Golden Triangle | GSK  | Veber | 对接得分 / ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) |
| 黄连碱                                                                                                                | 0.98      | 0.05           | 完全符合     | 完全符合            | 完全符合 | 完全符合  | - 41.42                                    |
| 利卡灵 B                                                                                                              | 0.95      | 0.13           | 完全符合     | 完全符合            | 完全符合 | 完全符合  | - 36.40                                    |
| 三白草酮                                                                                                               | 0.92      | 0.08           | 完全符合     | 完全符合            | 完全符合 | 完全符合  | - 35.98                                    |
| 依格列汀                                                                                                               | 0.99      | 0.29           | 完全符合     | 完全符合            | 基本符合 | 完全符合  | - 35.56                                    |

2.3 分子对接结果分析

黄连碱、利卡灵 B、三白草酮和依格列汀与 DPP4 的对接结果如图 3 所示。黄连碱与 DPP4 的残基 Tyr662、Tpr629 和 Lys554 共形成 3 个氢键,并与残基 Tyr666 形成 2 个  $\pi-\pi$  堆积,增强了亲和力,使形成的复合物结构更加稳定,结合能达到了  $-41.42\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,在所有小分子中排名最高;利卡灵 B 也与 DPP4 的残基 Tyr545 形成 2 个氢键,并与残基 Phe357 形成 1 个  $\pi-\pi$  堆积,结合能为  $-36.40\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ;三白草酮分别与 DPP4 的残基 Tyr631 和 Tyr662 形成 2 个氢键,同时又与残基 Tyr666 形成  $\pi-\pi$  堆积作用,最终结合能为  $-35.98\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ;阳性对照药物依格列汀与 DPP4 的残基 His126、Glu206 和 Ser209 共形成 3 个氢键,并同时与 Tyr662、Tyr666 形成 2 个  $\pi-\pi$  相互作用,与 Phe357 形成 1 个  $\pi-\sigma$  相互作用,最终结合能为  $-35.56\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。黄连碱、利卡灵 B、三白草酮的结合能均优于阳性药结果,表明 3 个候选化合物可能具备更强的结合能力。分子对接结果表明 3 种化合物均可以与 DPP4 蛋白稳定结合,具备成为 DPP4 抑制剂的潜力。

2.4 分子动力学模拟结果

3 个候选化合物和依格列汀与 DPP4 蛋白在总时长 100 ns 的动态模拟过程中,均始终保持了稳定结合的状态。模拟体系的 RMSD 结果如图 4A 所示,RMSD 值描述了模拟过程中某一时刻结构与初始构象之间的偏离程度,是评估体系在模拟期间稳定性的核心指标。黄连碱、利卡灵 B、三白草酮和依格列汀模拟体系在经过 30 ns 的模拟后均逐渐趋于稳定并逐渐达到平衡。黄连碱、利卡灵 B、三白草酮和依格列汀模拟体系 RMSD 迁移率分别为  $(0.26\pm0.025)\text{ nm}$ 、 $(0.30\pm0.048)\text{ nm}$ 、 $(0.29\pm0.020)\text{ nm}$  和  $(0.31\pm0.048)\text{ nm}$ ,DPP4 空蛋白模拟体系为  $(0.34\pm0.052)\text{ nm}$ 。4 个化合物与 DPP4 构成的复合物的整体 RMSD 迁移率较 DPP4 蛋白空白整体 RMSD 迁移率更低,提示 4 个化合物的加入均使蛋白结构更趋于稳定。3 个候选化合物中黄连碱的整体 RMSD 迁移率最低,表明在相同模拟条件下,黄连碱与 DPP4 蛋白的结合最稳定。

模拟体系的 RMSF 结果如图 4B 所示。RMSF



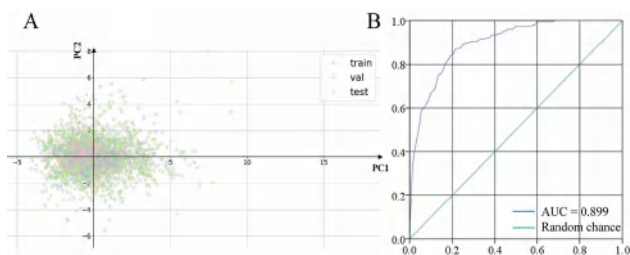


图 1 DPP4 抑制剂数据集主成分分析 (A) 和模型 ROC 分析 (B)  
Fig 1 Principal component analysis plots of the collected DPP4 inhibitor datasets (A) and the ROC plots of the model (B)

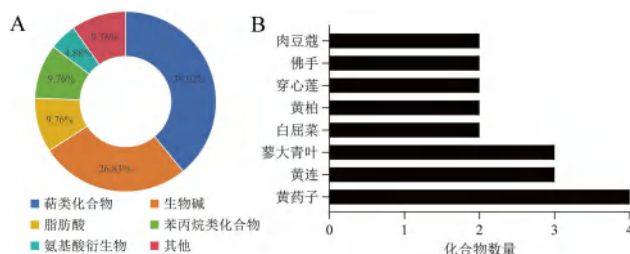


图 2 41 个潜在的 DPP4 抑制剂的化学结构和药材来源分类  
Fig 2 Classification of the chemical structures and medicinal plant sources of 41 potential DPP4 inhibitors

A. 化合物结构分类 (classification of the chemical structures); B. 药材来源分类 (classification of medicinal plant sources of 41 potential)

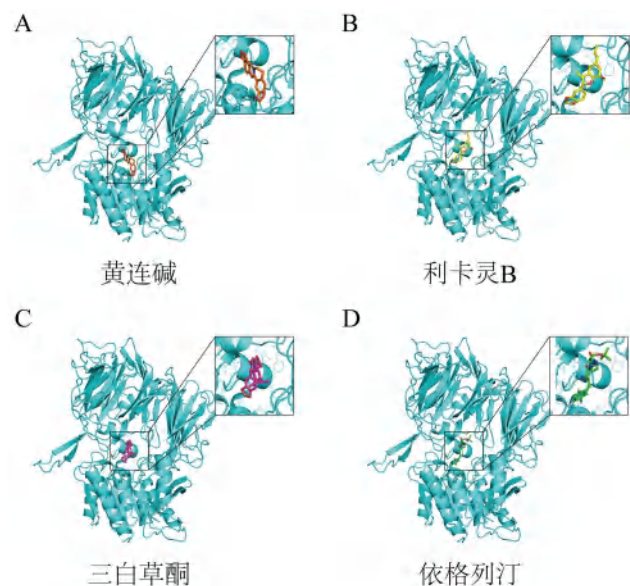


图 3 黄连碱 (A)、利卡灵 B (B)、三白草酮 (C) 和依格列汀 (D) 与 DPP4 蛋白对接结果

Fig 3 Molecular docking of coptisine (A), licarin B (B), sauchinone (C), and evogliptin (D) with DPP4

是衡量蛋白质残基在模拟过程中波动程度的关键指标。3 个候选化合物的模拟体系中，黄连碱、利卡灵 B 和三白草酮模拟体系相比于 DPP4 空蛋白模拟均在 Phe240 ~ Gly260 区域和 Leu680 ~ Ser690 区域出现较大的单峰波动，依格列汀在 Phe240 ~ Gly260 区域和 Tyr330 ~ Asn338 区域出现最大波动，但这些波动区域并不包含候

选化合物与 DPP4 结合的关键残基，对接口袋附近关键残基如 Phe357、Lys554、Tpr629、Tyr662、Tyr631 和 Tyr666 等的 RMSF 值始终处于一个较低水平，并未观察到较大波动。表明 3 个候选化合物和依格列汀与 DPP4 蛋白在对接口袋处形成了稳定的相互作用。3 个候选化合物中黄连碱的整体 RMSD 迁移率最低，表明在相同模拟条件下，黄连碱与 DPP4 蛋白的结合最稳定。

图 4C 揭示了模拟体系的 Rg 变化。Rg 是衡量蛋白质分子紧凑程度的常用指标，Rg 值越小表明结构越紧凑。黄连碱、利卡灵 B、三白草酮和依格列汀 Rg 值分别为  $(2.73 \pm 0.017)$  nm、 $(2.72 \pm 0.022)$  nm、 $(2.70 \pm 0.035)$  nm 和  $(2.70 \pm 0.026)$  nm。DPP4 空蛋白模拟的 Rg 值为  $(2.69 \pm 0.020)$  nm。4 个化合物体系和空蛋白模拟体系的 Rg 值在模拟过程中均保持稳定，表明蛋白在模拟过程中始终处于相对紧凑和稳定的构象状态。

4 个模拟体系氢键变化如图 4D 所示。在整个模拟过程中，4 个化合物始终与 DPP4 蛋白保持了连续的氢键作用，黄连碱与 DPP4 蛋白最高形成了 5 个氢键；利卡灵 B 与 DPP4 蛋白最高形成了 5 个氢键；三白草酮与 DPP4 蛋白最高达到了 4 个氢键；依格列汀与 DPP4 蛋白最高达到了 7 个氢键。

图 4E 揭示了 4 个模拟体系中的关键能量贡献残基。4 个候选化合物的模拟体系的关键能量贡献残基中大部分为对接口袋周围残基。针对能量贡献最高的前 3 个残基的分析中，黄连碱模拟体系的主要能量贡献残基 Glu205 和 Glu206 在对接过程中与黄连碱形成碳氢键；利卡灵 B 模拟体系的主要能量贡献残基 Tyr631 和 Tyr662 在对接过程中与利卡灵 B 形成范德华力相互作用，残基 Tyr666 与利卡灵 B 形成  $\pi$ -烷基相互作用；三白草酮模拟体系的主要能量贡献残基 Tyr631 在对接过程中与三白草酮形成氢键；依格列汀模拟体系的主要能量贡献残基 Tyr631 在对接过程中与依格列汀形成范德华力相互作用。

4 个模拟体系的 MMPBSA 能量分解如图 4F 所示，其中  $\Delta G_{\text{bind}}$  表示结合自由能、 $\Delta G_{\text{vdw}}$  表示范德华作用能、 $\Delta G_{\text{ele}}$  表示静电能、 $\Delta G_{\text{polar}}$  和  $\Delta G_{\text{nonpolar}}$  分别为极性和非极性溶剂化自由能，根据 MMPBSA 计算公式， $\Delta G_{\text{bind}}$  等于  $\Delta G_{\text{vdw}}$ 、 $\Delta G_{\text{ele}}$ 、 $\Delta G_{\text{polar}}$  和  $\Delta G_{\text{nonpolar}}$  之和<sup>[33]</sup>。3 个候选化合物模拟体系均由范德华力贡献了主要的结合能，其次静电能和非极性溶剂化自由能有助于蛋白配体相互结合。黄连碱、利卡灵 B、三白草酮和依格列

汀与 DPP4 蛋白的结合自由能分别为  $-132.58$ 、 $-111.86$ 、 $-121.13$ 、 $-163.20 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。3 个候选化合物中黄连碱与 DPP4 间的结合自由能最低, 表明在分子动力学模拟过程中黄连碱与 DPP4 结合

最稳定。3 个候选化合物和依格列汀与 DPP4 的结合自由能均达到了较高的水平, 在热力学上均表现出了较强的结合倾向, 这一结果从能量的角度进一步验证了小分子与蛋白结合的稳定性。

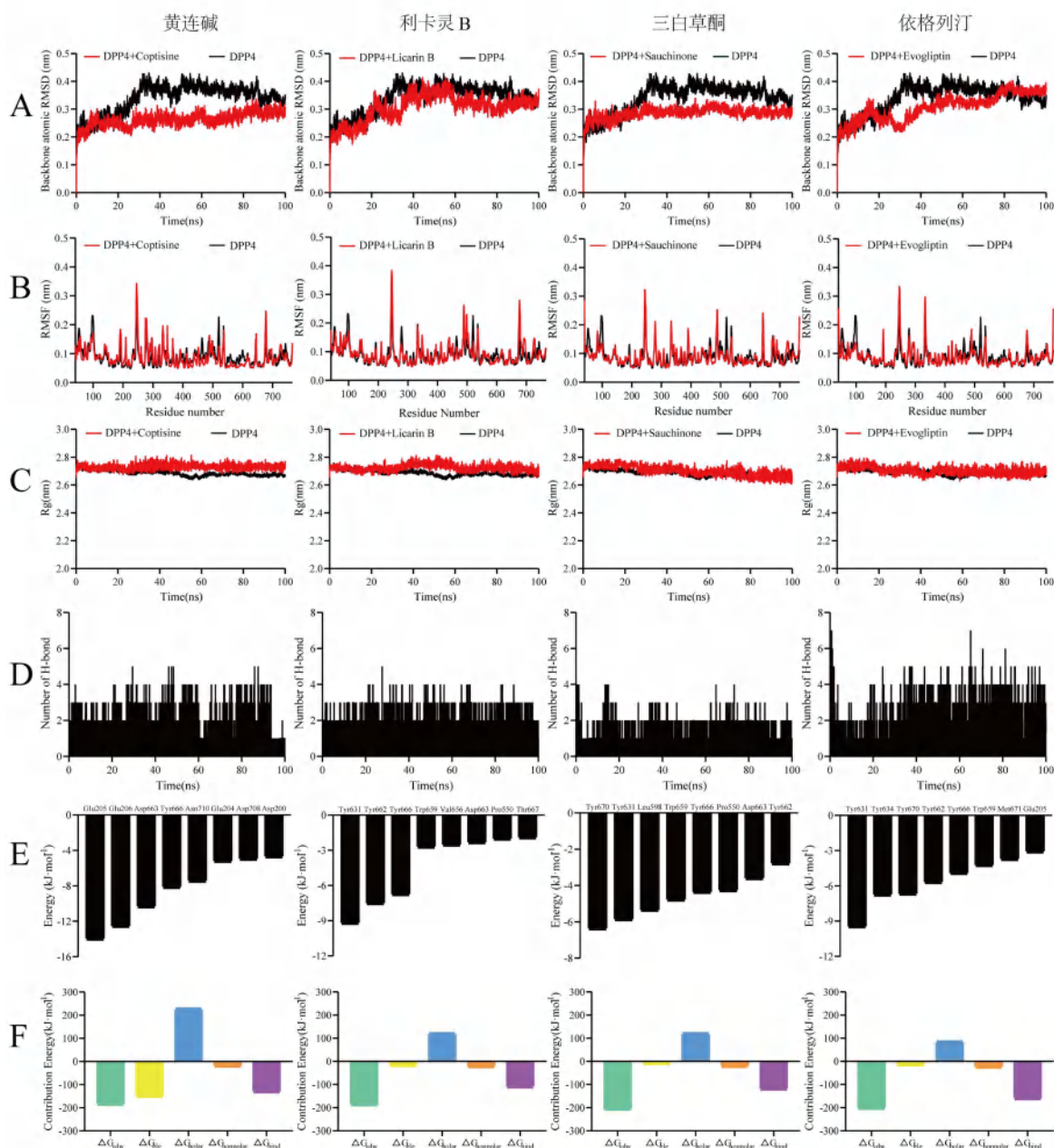


图4 黄连碱、利卡灵 B、三白草酮和依格列汀与 DPP4 蛋白分子动力学模拟结果

Fig 4 Molecular dynamics simulation results of coptisine, licarin B, sauchinone, and evogliptin with DPP4

A. 模拟体系 RMSD 分析 (RMSD analysis of simulation systems); B. 模拟体系 RMSF 分析 (RMSF analysis of simulation systems); C. 模拟体系 Rg 分析 (Rg analysis of simulation systems); D. 模拟体系氢键分析 (hydrogen bond analysis of simulation systems); E. 模拟体系关键能量贡献残基分析 (energy contribution analysis of key residues in simulation systems); F. 模拟体系结合自由能分解 (binding free energy decomposition of simulation systems)

### 3 讨论

2 型糖尿病患者的快速增长已成为一个严峻的全球性健康问题, 给社会带来了沉重的经济负担, 使得抗糖尿病药物的研发显得尤为迫切。

DPP4 已被广泛证实为 2 型糖尿病药物研发领域中的一个关键靶点, DPP4 抑制剂可有效控制血糖水平, 还能通过多种机制缓解糖尿病相关并发症。因此, 针对新型 DPP4 抑制剂的药物发现对



于抗糖尿病药物研发至关重要。中药天然产物因其成分多样且生物活性独特,被视为一个极其珍贵的药物研发资源宝库。然而,中药成分结构复杂且数量庞大,传统药物筛选方法往往难以胜任对其进行大规模筛选的研究工作。同时中药成分的安全性问题和 ADME 问题也不容忽视,进一步增加了大规模筛选的难度。

深度学习等计算机技术能够大幅度减少药物研发周期并提升药物筛选的效率,为中药大规模虚拟筛选提供了可能。通过结合深度学习、ADME 筛选、分子对接和分子动力学模拟等多个计算机技术可以构建一套药物筛选体系,该体系可以综合考虑药物的各个方面,快速筛选活性成分,并且能够在早期阶段规避一些由于安全性和 ADME 问题而导致的药物研发失败。本研究基于深度学习构建了 DPP4 抑制活性筛选模型和安全性筛选模型,采用 ADME 的多个筛选指标,从多个类药性角度对候选化合物进行综合性评价,并结合分子对接和分子动力学模拟进一步优化筛选,构建了较为完整的 DPP4 抑制剂筛选体系。该体系有助于研究者快速、精确地锁定中药成分化合物数据库中高活性、低毒性和良好 ADME 特性的潜在 DPP4 抑制剂。最终,通过 DPP4 抑制剂筛选体系系统性地筛选获得黄连碱、利卡灵 B 和三白草酮 3 个高生物利用度和安全性良好的潜在 DPP4 抑制剂。3 个中药化合物与阳性对照药物依格列汀相比具有相似的 DPP4 抑制活性,但预测毒性更低,ADME 属性更优秀,分子对接结果表明 3 个候选化合物均能与 DPP4 稳定结合,且结合自由能优于阳性对照,表现出更强的结合力。分子动力学模拟的结果进一步证实,这些化合物与 DPP4 能够形成稳定的复合物,并在模拟过程中显示出良好的结构稳定性。

综上所述,本研究构建了一套针对 DPP4 靶点的中药筛选系统,并成功从 TCMSp 数据库中筛选得到黄连碱、利卡灵 B 和三白草酮 3 个潜在的 DPP4 抑制剂。证明了基于计算机辅助虚拟筛选系统可以快速准确地发现中药活性成分,为中药抗 2 型糖尿病药物发现和研发提供了新的思路和途径。

## 参考文献

[1] Fadzil MAM, Abu Seman N, Abd Rashed A. The potential therapeutic use of agarwood for diabetes: a scoping review [J]. *Pharmaceuticals*, 2024, 17 (11): 1548.

[2] Muñoz F, Fex M, Moritz T, et al. Unique features of  $\beta$ -cell metabolism are lost in type 2 diabetes [J]. *Acta Physiol*, 2024, 240 (6): e14148.

[3] Cui DX, Feng XR, Lei SM, et al. Pancreatic  $\beta$ -cell failure, clinical implications, and therapeutic strategies in type 2 diabetes [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2024, 137 (7): 791-805.

[4] Qian XK, Zhang J, Li XD, et al. Research progress on dipeptidyl peptidase family: structure, function and xenobiotic metabolism [J]. *Curr Med Chem*, 2022, 29 (12): 2167-2188.

[5] Pechmann LM, Pinheiro FI, Andrade VFC, et al. The multiple actions of dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) and its pharmacological inhibition on bone metabolism: a review [J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2024, 16 (1): 175.

[6] Panda SP. Role of DPP4 and DPP4i in glucose homeostasis and cardiorenal syndrome [J]. *Endocr Metab Immune*, 2023, 23 (2): 179-187.

[7] Ma ZJ, Jin KQ, Yue MM, et al. Research progress on the GIP/GLP-1 receptor coagonist tirzepatide, a rising star in type 2 diabetes [J]. *J Diabetes Res*, 2023, 2023 (1): 5891532.

[8] Saini K, Sharma S, Khan Y. DPP-4 inhibitors for treating T2DM-hype or hope? an analysis based on the current literature [J]. *Front Mol Biosci*, 2023, 10: 1130625.

[9] Singhal S, Patil VM, Verma S, et al. Recent advances and structure-activity relationship studies of DPP-4 inhibitors as anti-diabetic agents [J]. *Bioorg Chem*, 2024, 146: 107277.

[10] Kowalska J, Wrześniok D. Skin-related adverse reactions induced by oral antidiabetic drugs-a review of literature and case reports [J]. *Pharmaceuticals*, 2024, 17 (7): 847.

[11] Yang WJ, Cai XL, Zhang SM, et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor treatment and the risk of bullous pemphigoid and skin-related adverse events: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Diabetes-metab Res*, 2021, 37 (3): e3391.

[12] Zhou E, Shen Q, Hou Y. Integrating artificial intelligence into the modernization of traditional Chinese medicine industry: a review [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1181183.

[13] Fan MY, Ru J, Wang S. Research progress of traditional Chinese medicine in the treatment of endocrine metabolic diseases in 2023 [J]. *Tradit Med Res*, 2024, 9 (12): 72.

[14] Li SJ, Liu P, Feng X, et al. Mechanism of Tao Hong Decoction in the treatment of atherosclerosis based on network pharmacology and experimental validation [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2023, 10: 1111475.

[15] Li HJ, Zou L, Kowah JAH, et al. A compact review of progress and prospects of deep learning in drug discovery [J]. *J Mol Model*, 2023, 29 (4): 117.

[16] Askr H, Elgeldawi E, Aboul EH, et al. Deep learning in drug discovery: an integrative review and future challeng-



- es [J]. *Artif Intell Rev*, 2023, 56 (7): 5975-6037.
- [17] Sinha K, Ghosh N, Sil PC. A review on the recent applications of deep learning in predictive drug toxicological studies [J]. *Chem Res Toxicol*, 2023, 36 (8): 1174-1205.
- [18] 石欢, 王宇红, 孟盼, 等. 基于分子对接与分子动力学模拟的 NorA 抑制剂虚拟筛选 [J]. *中南药学*, 2024, 22 (12): 3229-3234.
- [19] Stokes JM, Yang K, Swanson K, et al. A deep learning approach to antibiotic discovery [J]. *Cell*, 2020, 180 (4): 688-702.
- [20] Wong F, Zheng EJ, Valeri JA, et al. Discovery of a structural class of antibiotics with explainable deep learning [J]. *Nature*, 2024, 626 (7997): 177-185.
- [21] Boiko DA, Arkhipova DM, Ananikov VP. Recognition of molecular structure of phosphonium salts from the visual appearance of material with deep learning can reveal subtle homologs [J]. *Small*, 2024, 20 (48): 2403423.
- [22] Liu S, Qin HH, Ji XR, et al. Virtual screening of Nrf2 dietary-derived agonists and safety by a new deep-learning model and verified in vitro and in vivo [J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71 (21): 8038-8049.
- [23] Fu L, Shi SH, Yi JC, et al. ADMETlab 3.0: an updated comprehensive online ADMET prediction platform enhanced with broader coverage, improved performance, API functionality and decision support [J]. *Nucleic Acids Res*, 2024, 52 (W1): W422-W431.
- [24] Xiao XY, Lai MY, Rao ZC, et al. In silico screening of potential inhibitors against dPLA2 from named Chinese herbs for identification of compounds with antivenom effects due to *deinagkistrodon acutus* snake bites [J]. *Am J Resp Cell Mol*, 2024, 14 (3): 107-125.
- [25] Rayamajhi A, Karki D, Phunyal A, et al. Phytochemical profiling from *Dioscorea bulbifera* L. bulbils using LC-MS, proximate analysis and antidiabetic activity: in vitro and in silico approaches [J]. *Int J Food Prop*, 2024, 27 (1): 1396-1414.
- [26] Zhang Q, Liang XC. Progress in study of antioxidant effects of *Coptis chinensis* and its major contributions to diabetes treatment/therapy [J]. *China J Chin Mater Med*, 2015, 40 (12): 2285-2288.
- [27] Muluye RA, Bian Y, Alemu PN. Anti-inflammatory and antimicrobial effects of heat-clearing Chinese herbs: a current review [J]. *J Tradit Complementary Med*, 2014, 4 (2): 93-98.
- [28] Patil AD, Aphale PS, Sharma DB, et al. Can homeopathic medicine *Chelidonium majus* serve a dual role of an anti-obesity and anti-diabetic agent? [J]. *Med Hypotheses*, 2022, 159: 110749.
- [29] Kim HJ, Kong MK, Kim YC. Beneficial effects of *Phellodendri Cortex* extract on hyperglycemia and diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *BMB Rep*, 2008, 41 (10): 710-715.
- [30] Zhang XF, Tan BKH. Antihyperglycaemic and anti-oxidant properties of *andrographis paniculata* in normal and diabetic rats [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2000, 27 (5): 358-363.
- [31] Peng CH, Ker YB, Weng CF, et al. Insulin secretagogue bioactivity of finger citron fruit (*Citrus medica* L. var. *Sarcodactylis* Hort, Rutaceae) [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57 (19): 8812-8819.
- [32] Chen X, Xue B, Wahab S, et al. Structure-based molecular docking and molecular dynamics simulations study for the identification of dipeptidyl peptidase 4 inhibitors in type 2 diabetes [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2025, 43 (3): 1445-1458.
- [33] Sharma A, Vora J, Patel D, et al. Identification of natural inhibitors against prime targets of SARS-CoV-2 using molecular docking, molecular dynamics simulation and MM-PBSA approaches [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2022, 40 (7): 3296-3311.

(收稿日期: 2025-01-15; 修回日期: 2025-03-15)

# 基于计算机辅助水解的薏苡肽类血管紧张素 II 1 型受体拮抗活性预测及功能评价

郭嵩然<sup>1</sup>, 乔连生<sup>2</sup>, 褚辉程<sup>1</sup>, 张文静<sup>1</sup>, 陈海英<sup>1</sup>, 陈祖君<sup>3</sup>, 王灵芝<sup>1\*</sup> (1. 北京中医药大学生命科学院, 北京 102400; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 3. 中国医学科学院阜外医院, 北京 100037)

**摘要:** **目的** 采用计算机辅助水解和虚拟筛选技术, 利用薏苡蛋白数据库, 系统发现潜在的薏苡肽类血管紧张素 II 1 型受体 (AT1R) 拮抗剂, 并进行功能评价, 为高血压治疗提供思路。**方法** 从薏苡蛋白数据库中选取四类储藏蛋白共计 158 条, 利用计算机辅助水解技术, 模拟胃肠道水解, 获得蛋白水解后寡肽序列, 建立薏苡生物肽数据库。进一步利用 Hypogen 方法构建 AT1R 拮抗剂药效团模型; 利用 CDOCKER 分子对接算法, 建立 AT1R 分子对接模型, 通过联合药效团和分子对接的虚拟筛选, 从薏苡生物肽数据库中筛选具有 AT1R 拮抗活性的生物活性肽。随后, 建立血管紧张素 II (Ang II) 损伤血管内皮细胞模型, 检测目标肽 BCUM\_G001 对活性氧 (ROS) 和一氧化氮 (NO) 分泌水平的影响; 实时荧光定量 PCR 法检测 NADPH 氧化酶 1 (NOX1) 和内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 基因表达的变化。**结果** 本研究构建包含 3015 条序列的薏苡生物肽数据库。通过分子对接模型和药效团模型联合筛选, 共预测 183 条具有潜在拮抗活性的生物肽分子, 选择序列 BCUM\_G001 进行功能评价, 该肽可显著降低 Ang II 损伤血管内皮细胞 ROS 含量, 显著升高 NO 分泌量。同时, 下调 NOX1 基因表达, 上调 eNOS 基因表达。**结论** 计算机辅助水解结合分子模拟模型可有效发现薏苡中潜在 AT1R 拮抗肽, 其中 BCUM\_G001 具有显著血管内皮细胞保护作用。本研究为薏苡药效物质解析提供了进一步的科学依据。**关键词:** 薏苡; 生物肽; 血管紧张素 II 1 型受体; 计算机辅助水解; 药效团; 分子对接  
**中图分类号:** R284.1, R914.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)06-1547-08  
**doi:**10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.008

## Prediction and function evaluation of AT1R biopeptides antagonists from *Coix lacryma-jobi* based on in silico proteolysis

GUO Song-ran<sup>1</sup>, QIAO Lian-sheng<sup>2</sup>, CHU Hui-cheng<sup>1</sup>, ZHANG Wen-jing<sup>1</sup>, CHEN Hai-ying<sup>1</sup>, CHEN Zu-jun<sup>3</sup>, WANG Ling-zhi<sup>1\*</sup> (1. School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102400; 2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102; 3. Fuwai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100037)

**Abstract: Objective** To determine angiotensin II type 1 receptor (AT1R) peptide antagonists from *Coix lacryma-jobi* protein database by in silico proteolysis and virtual screening and assess their functional attributes to provide novel ideas for hypertension treatment. **Methods** Totally 158 storage proteins were selected from the *Coix* protein database and subjected to in silico gastrointestinal digestion to establish a *Coix* oligopeptides database. Hypogen was used to establish a pharmacophore of AT1R antagonists. CDOCKER algorithm was employed to establish the molecular docking model of AT1R. Peptides were screened for AT1R antagonists by these two methods. Subsequently, the angiotensin II (Ang II)-injured endothelial cell injury model was developed to evaluate the impact of the candidate peptide on the reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) secretion. Meanwhile the expressions of gene NADPH oxidase 1 (NOX1) and endothelial nitric oxide synthase

**基金项目:** 国家自然科学基金面上项目 (No.82474111); 北京中医药大学纵向发展基金 (No.2023-ZXFZJJ-064)。

**作者简介:** 郭嵩然, 男, 硕士, 主要从事中药活性蛋白与多肽研究, email: 2606183830@qq.com \* **通信作者:** 王灵芝, 女, 教授, 主要从事中药活性蛋白与多肽研究, email: wanglz@bucm.edu.cn

(eNOS) were evaluated by quantitative real-time PCR. **Results** A comprehensive peptide database containing 3015 sequences was established. Totally 183 biopeptide molecules were predicted as potential AT1R antagonists by virtual screening based on the pharmacophore and molecular docking model. Later, sequence BCUM\_G001 was selected for further functional evaluation. The data demonstrated an obvious reduction in ROS content and a notable increase in NO secretion in the peptide treatment group. Concurrently, the peptide greatly downregulated the expression of NOX1 and upregulated the expression of eNOS at mRNA level. **Conclusion** In silico proteolysis combining with virtual screening effectively predicts potential AT1R antagonistic peptides from *Coix*. Among the candidates, BCUM\_G001 demonstrated clear protective effects on the vascular endothelial cells, providing scientific evidence for elucidating the pharmacodynamic material basis of *Coix*.

**Key words:** *Coix lacryma-jobi*; biological peptide; angiotensin II type 1 receptor; in silico proteolysis; pharmacophore; molecular docking

高血压是最常见的慢性病，常导致脑卒中、冠心病、心力衰竭、肾功能损伤等，严重威胁人类健康<sup>[1-2]</sup>。据统计，全球约有 13 亿高血压患者，每年因高血压死亡人数高达 1000 万<sup>[3]</sup>。我国成人高血压的患病率为 27.5%；高血压患者的知晓率、治疗率和控制率分别为 51.6%、45.8% 和 16.8%<sup>[4]</sup>，防治高血压是我国重要的公共卫生问题。

血管紧张素受体拮抗剂（angiotensin receptor blockers, ARBs）是临床常用一线降压药物，它通过竞争性抑制血管紧张素 II（Ang II）与血管紧张素 II 1 型受体（AT1R）的结合，有效阻断 Ang II 的血管收缩作用，进而发挥降低血压的作用<sup>[5]</sup>。此外，ARBs 还具有保护和改善内皮功能等作用<sup>[6-7]</sup>。首先，AT1R 可促进下游 NADPH 氧化酶（NOX）的表达和催化活性，产生大量活性氧（ROS），导致机体氧化应激反应；同时，Ang II-AT1R 结合抑制内皮型一氧化氮合酶（eNOS）的表达与活性，使血管舒张因子一氧化氮（NO）含量进一步降低，推动高血压等系列心血管疾病的发展<sup>[8-10]</sup>。然而，ARBs 药物仍存在一系列不良反应，如功能性肾衰竭<sup>[5]</sup>、高钾血症<sup>[11]</sup>、癫痫病<sup>[12]</sup>等。因而开发新型 ARBs 类药物具有重要的临床应用价值。

生物肽是一类对人体健康产生积极影响的小分子氨基酸片段，通常包含 2 至 20 个氨基酸残基<sup>[13-14]</sup>。与传统药物相比，生物肽具有安全、生物利用度高的优势<sup>[15]</sup>。薏苡仁 [*Coix lacryma-jobi* L. var. *ma-yuen* (Roman.) Stapf] 是中医临床常用利水渗湿药，其性凉、味甘淡，归脾、胃、肺经，具有利水渗湿、健脾止泻、清热排脓的功效<sup>[16]</sup>。薏苡仁中蛋白质含量高达 20%<sup>[17]</sup>。课题组前期从该药材中获得了高活性的血管紧张素转化酶（ACE）抑制肽，如 GAAGGAF<sup>[18]</sup>、VDMF<sup>[19]</sup> 和 NPATY<sup>[20]</sup> 等，且具有显著体内降压活性，但薏苡中是否存在 AT1R 拮抗肽尚未见报道。

本研究拟基于前期建立的薏苡蛋白数据库<sup>[21]</sup>，利用计算机辅助水解技术，对其中储藏蛋白进行模拟消化水解，并结合药效团和分子对接虚拟筛选策略，预测潜在的 AT1R 拮抗剂。并应用 Ang II 损伤血管内皮细胞模型对目标肽进行功能验证，为该药作用机制和药效物质解析提供进一步的理论支撑。

## 1 材料

人脐静脉血管内皮细胞（HUVEC）由新生儿脐带分离获得（经北京大学人民医院伦理委员会批准和产妇知情同意）；薏苡蛋白数据库包含 46 083 条蛋白序列，基于前期薏苡转录组测序所构建；胰酶、ROS 试剂盒（北京兰博利德有限公司）；NO 测定试剂盒（南京建成生物工程研究所）；奥美沙坦（上海源叶生物科技有限公司）；生物肽 BUCM\_G001 由北京中科亚光生物科技有限公司合成（纯度 > 98%）；M199 培养基（Gibco 公司）；胎牛血清（美国 Hyclone 公司）；RN03-RNAPure 超纯总 RNA 快速提取试剂盒（北京艾德莱生物科技有限公司）；NovoScript Plus All-in-one 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒、NovoStart SYBR qPCR SuperMix Plus（上海近岸科技有限公司）；Ang II（美国 MedChemwxxpress 生物科技）；其余试剂均为分析纯。

Bluepard CO<sub>2</sub> 细胞培养箱（中国一恒科学仪器有限公司）；HR1200-II A2-E 生物安全柜（中国 Haier 公司）；Cyto FLEX 流式细胞仪（美国 Beckman Coulter 公司）；I3x 多功能酶标仪（美国 Molecular Devices 公司）。

## 2 方法

### 2.1 薏苡寡肽数据库的构建

从薏苡蛋白数据库中选取 128 条醇溶蛋白、10 条谷蛋白、19 条球蛋白和 1 条清蛋白作为研究对象<sup>[21]</sup>。利用 Peptide Cutter 平台（<https://>



web.expasy.org/peptide\_cutter/) 提供的胃蛋白酶 ( $\text{pH} > 1.3$ )、胰蛋白酶和糜蛋白酶,对葱苡蛋白序列进行模拟水解。随后,采用 Discovery Studio 4.0 软件,生成寡肽的三维结构,通过 Minimize ligands 进行能量最小化分析,在 CHARMM 力场下加载 Momany-Rone 电荷,采用最陡下降法和共轭梯度法相结合的能量优化算法,获得寡肽的最低能量构象<sup>[22]</sup>,最终构建了葱苡寡肽数据库。

## 2.2 AT1R 拮抗剂药效团的构建及筛选

从 Binding Database (<https://www.bindingdb.org/>) 中获得 727 个 AT1R 拮抗剂,其  $IC_{50}$  在  $0.1 \sim 10\,000 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。其中,根据活性值范围和结构特点选择 19 个化合物作为训练集。训练集化合物通过 BEST 模式生成 255 个构象用于建模。利用 HypoGen 算法,以化合物的  $IC_{50}$  值作为活性值构建定量药效团模型。根据训练集的特征,识别出氢键受体 (A)、氢键供体 (D)、疏水基团 (H)、负电基团 (N) 和芳环基团 (R) 特征进行建模。选取 95% 置信水平进行 Fisher 验证。为了验证药效团型的准确性,采用多个指标对药效团筛选结果进行评价,包括训练集的相关系数和 cost 函数。从 DrugBank 数据库 (<http://www.drugbank.ca/>) 中选择 14 种批准上市的 AT1R 拮抗剂作为阳性药集。然后,从 727 个 AT1R 拮抗剂中选择 100 种化合物作为阳性测试集,并选择 300 种非活性化合物作为阴性测试集。利用测试集评价药效团模型,通过活性化合物命中率 (HRA)、识别有效指数 (IEI)、综合评价指数 (CAI) 和相关系数 ( $\text{Corr}_{\text{test}}$ )<sup>[23-24]</sup> 进一步评价药效团对化合物的预测能力, HRA、IEI、CAI、 $\text{Corr}_{\text{test}}$  的最优截断值分别为 80%、3、2 和 0.6,选取能达到 3 个及以上截断标准的药效团模型作为最优的药效团模型<sup>[22]</sup>。利用最优的药效团筛选寡肽数据库,以  $\text{fit value} = 0.8$  为截断值,初步获得具有潜在 AT1R 拮抗活性肽。

## 2.3 分子对接模型的构建及筛选

选取了 PDB 数据库中的 AT1R 和 ZD7155 复合物模型 (编号 4YAY) (<https://www.rcsb.org/structure/4YAY>),并基于该复合物构建了分子对接模型。模型活性口袋基于原配体位置定义。通过计算原配体对接前后构象的均方根偏差 (RMSD),评价模型可靠性,  $\text{RMSD} < 2.00 \text{ \AA}$  表明对接算法可用于筛选 AT1R 潜在拮抗剂<sup>[20]</sup>。-CDOCKER 结合能 ( $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) 是 CDOCKER 算法的打分函数,用于衡量化合物跟受体结合的潜力<sup>[25]</sup>。本研究以原配体 ZD7155 及 14 种上市药物分别与分子对接模型对接,选择最高打分值作为截断值,筛选葱苡寡肽。筛选获得的寡肽由北京中科亚光生物科技有限公司合成,纯度大于 98%。

## 2.4 HUVEC 细胞复苏、传代

将冻存细胞于  $37^\circ\text{C}$  水浴复融,迅速转移至含有完全培养基的离心管中,于室温下  $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 2 min,吸弃上清液,使用培养基重悬细胞,然后转移到细胞培养皿中继续培养。

## 2.5 Ang II 损伤 HUVEC 细胞模型的建立

取对数生长期细胞,按照  $1 \times 10^5$  个/孔铺入 6 孔细胞培养板中,待细胞融合至 80% 时加入无血清培养基进行饥饿处理 12 h,弃去上清液进行药物处理。细胞分为 6 组:对照组 (M199 完全培养基, control 组);模型组 ( $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Ang II, Ang II 组);阳性药组 ( $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Ang II +  $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  奥美沙坦, Ang II + Olmesartan 组);生物肽高剂量组 ( $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Ang II +  $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  BUCM\_G001, Ang II +  $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  BUCM\_G001 组)、生物肽中剂量组 ( $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Ang II +  $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  BUCM\_G001, Ang II +  $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  BUCM\_G001 组)和生物肽低剂量组 ( $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Ang II +  $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  BUCM\_G001, Ang II +  $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  BUCM\_G001 组),每孔终体积为 1 mL。

## 2.6 细胞 ROS 含量的测定

采用流式细胞术测定 HUVEC 中 ROS 含量<sup>[26]</sup>。给药 6 h 后,吸弃细胞培养液,用磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 2 次,加入荧光探针 H2DCFH-DA ( $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),  $37^\circ\text{C}$  孵育 30 min, PBS 洗去未结合的探针。 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  胰酶消化 HUVEC 为单细胞状态,转移细胞于流式管中,于 488 nm 激发波长下检测样品荧光强度。

## 2.7 细胞上清液中 NO 含量的测定

细胞分组给药 6 h 后,吸取细胞培养液,  $4^\circ\text{C}$ 、 $1000 \text{ g}$  离心 15 min,采用硝酸还原酶法,于 540 nm 下检测样品吸光度。

## 2.8 qPCR 检测 eNOS 和 NOX1 基因相对表达量

药物处理细胞 6 h 后,使用 Trizol 试剂提取总 RNA 并进行反转录。qPCR 反应体系为  $10 \mu\text{L}$ : NovoScript Plus All-in-one 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix  $5 \mu\text{L}$ 、上下游引物各  $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、cDNA  $5 \text{ ng}$ ,加  $\text{ddH}_2\text{O}$  补足  $10 \mu\text{L}$ 。扩增条件为:  $95^\circ\text{C}$  预变性 1 min,  $95^\circ\text{C}$  变性 20 s,  $60^\circ\text{C}$  延伸 1 min,共 43 个循环。各基因引物序列见表 1。以  $\beta\text{-actin}$  为内参,采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法进行基因相对表达量的计算。

## 2.9 统计学方法

采用 SPSS 26.0 统计软件对数据进行单因素方差分析,结果以平均值  $\pm$  标准差表示,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义,采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件作图。

表 1 基因引物序列

Tab 1 Gene primer sequences

| 目标基因           |   | 序列 (5' to 3')           | 长度 /bp |
|----------------|---|-------------------------|--------|
| <i>β-actin</i> | F | ATGGATGATGATATCGCCG     | 19     |
|                | R | ATGCCTCTCTTGCTCTGGG     | 19     |
| <i>eNOS</i>    | F | GAGCACTGAGATCGGCACGAGG  | 22     |
|                | R | CGTTGATTCCACTGCTGCCTTGT | 24     |
| <i>NOX1</i>    | F | CTCCAGCCTATCTCATCCTGAG  | 22     |
|                | R | AGTGGCAATCACTCCAGTAAGGC | 23     |

3 结果

3.1 AT1 拮抗剂药效团模型的构建

本研究构建的 AT1R 拮抗剂药效团模型训练集包含 19 个化合物 (见图 1), 利用 Hypogen 算法, 生成了 10 个候选的 AT1R 拮抗剂药效团模型。药效团模型的 Fixed cost 值为 69.10, Null cost 值为 530.08。10 个药效团模型的  $\Delta cost$  ( $\Delta cost = \text{Null cost} - \text{Total cost}$ ) 均大于 60, 说明模型显著优于随机模型; 药效团的  $\text{Corr}_{\text{train}}$  均大于 0.8, 说明药效团模型能较好地预测化合物的活性值 (见表 2)。经过综合评估, 最终选定 Pharma1 药效团模型进行后续研究。该药效团模型由 2 个氢键受体、1 个

疏水基团以及 1 个芳香环特征构成 (见图 2A)。经过 Fisher 交叉验证检验, Pharma1 的 cost 值小于所有随机药效团模型 (见图 2B), 表明所构建的药效团模型具有较高的可靠性 [27]。此外, 阳性药与此药效团模型匹配的 fit value 均大于 0.7 (见图 2C), 这一结果说明选药效团模型在结构上与已知活性化合物一致, 可用于进一步的虚拟筛选。

表 2 AT1R 拮抗剂药效团模型评价

Tab 2 Evaluation of the AT1R antagonist pharmacophore model

| 药效团      | 活性化合物总数 |      | HRA/<br>命中 % | IEI  | CAI  | $\text{Corr}_{\text{train}}$ | Total<br>cost | $\Delta cost$ |
|----------|---------|------|--------------|------|------|------------------------------|---------------|---------------|
|          | 命中的     | 测试集中 |              |      |      |                              |               |               |
| Pharma1  | 90      | 121  | 90           | 2.98 | 2.68 | 0.95                         | 120.46        | 409.62        |
| Pharma2  | 89      | 119  | 89           | 2.99 | 2.66 | 0.91                         | 158.05        | 372.03        |
| Pharma3  | 77      | 95   | 77           | 3.24 | 2.50 | 0.90                         | 164.38        | 365.70        |
| Pharma4  | 80      | 107  | 80           | 2.99 | 2.39 | 0.88                         | 182.60        | 347.48        |
| Pharma5  | 80      | 102  | 80           | 3.14 | 2.51 | 0.87                         | 189.38        | 340.70        |
| Pharma6  | 90      | 122  | 90           | 2.95 | 2.66 | 0.87                         | 192.12        | 337.96        |
| Pharma7  | 85      | 110  | 85           | 3.09 | 2.63 | 0.86                         | 198.17        | 331.91        |
| Pharma8  | 90      | 122  | 90           | 2.95 | 2.66 | 0.86                         | 198.22        | 331.87        |
| Pharma9  | 85      | 115  | 85           | 2.96 | 2.51 | 0.86                         | 199.56        | 330.53        |
| Pharma10 | 78      | 107  | 78           | 2.92 | 2.27 | 0.86                         | 200.32        | 329.76        |

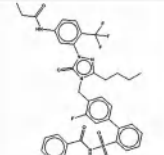
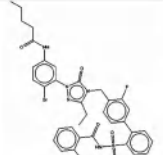
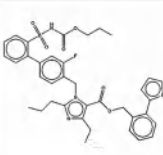
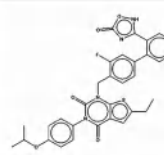
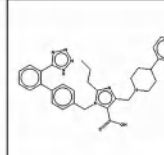
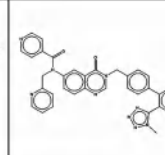
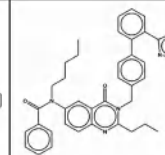
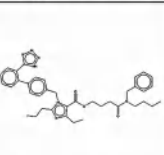
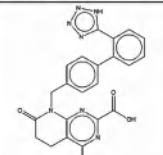
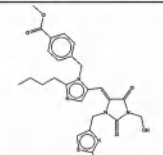
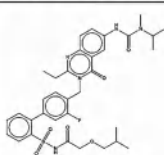
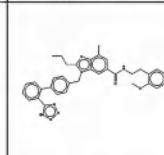
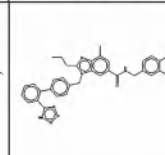
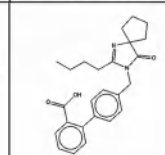
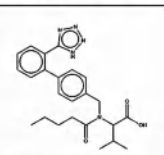
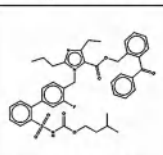
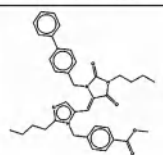
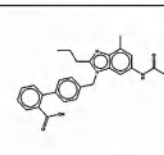
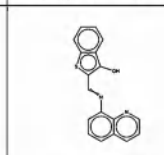
|                                                                                     |                                                                                     |                                                                                     |                                                                                     |                                                                                      |                                                                                       |                                                                                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  |  |  |  |  |  |
| BDBM50046553                                                                        | BDBM50046485                                                                        | BDBM50469137                                                                        | BDBM216976                                                                          | BDBM50469051                                                                         | BDBM50472064                                                                          | BDBM50469390                                                                          |
| $IC_{50}=0.14 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$                                       | $IC_{50}=0.22 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$                                       | $IC_{50}=0.5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$                                        | $IC_{50}=1.6 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$                                        | $IC_{50}=2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$                                           | $IC_{50}=4.4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$                                          | $IC_{50}=7 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$                                            |
|  |  |  |  |  |  |  |
| BDBM50469179                                                                        | BDBM50209437                                                                        | BDBM51186058                                                                        | BDBM50469339                                                                        | BDBM50947181                                                                         | BDBM50947176                                                                          | BDBM51428819                                                                          |
| $IC_{50}=10 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$                                         | $IC_{50}=23 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$                                         | $IC_{50}=36 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$                                         | $IC_{50}=65 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$                                         | $IC_{50}=78 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$                                          | $IC_{50}=96.8 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$                                         | $IC_{50}=190 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$                                          |
|  |  |  |  |  |                                                                                       |                                                                                       |
| BDBM50467543                                                                        | BDBM50779354                                                                        | BDBM51186018                                                                        | BDBM51199729                                                                        | BDBM136403                                                                           |                                                                                       |                                                                                       |
| $IC_{50}=300 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$                                        | $IC_{50}=570 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$                                        | $IC_{50}=884 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$                                        | $IC_{50}=1430 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$                                       | $IC_{50}=2779 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$                                        |                                                                                       |                                                                                       |

图 1 19 个训练集化合物的结构和  $IC_{50}$  值

Fig 1 Structures and  $IC_{50}$  values of the nineteen training set compounds

3.2 AT1R 分子对接模型的构建与关键氨基酸分析

选择 PDB 数据库中 4YAY 复合物, 利用原配体 ZD7155 定义活性口袋, ZD7155 重新对接后 RMSD = 0.66 Å, 对接口袋半径为 8.82 Å (见图 3A)。在 4YAY 结构中, 原配体 ZD7155 及 14 个阳性药物均显示出与 ILE288 和 VAL108 的疏水相互作用, 以及与 ARG167

的静电相互作用。且除 Valsartan 和 Telmisartan 外的上市药物和原配体均与 ARG167 形成氢键作用。基于此, 本研究将 ILE288、VAL108 和 ARG167 认定为关键氨基酸残基。

3.3 薏苡寡肽数据库虚拟筛选

综合药效团筛选截断值 fit value = 0.8, 及分



子对接筛选截断值 -CDOCKER 结合能 = 169.91  $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ , -CDOCKER INTERACTION 结合能 = 240.96  $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ , 对薏苡寡肽数据库进行筛选。同时, 候选分子应尽量多地与关键氨基酸建立相互作用。综合上述标准, 最终筛选出 22 条寡肽作为潜在的候选分子 (见表 3)。选择其中 BUCM\_G001 作为候选肽进行后续研究, BUCM\_G001 与 Pharma1 匹配结果如图 4A 所示, 该肽 C 端组氨酸中咪唑与药效团

Pharma1 的芳香环基团匹配。与奥美沙坦和 Pharma1 的疏水基团和芳环基团特征匹配结果较为相似 (见图 4B)。BUCM\_G001 与分子对接模型匹配结果及相互作用如图 5 所示, 其 C 端组氨酸中咪唑分别与 ILE288 和 VAL108 形成疏水作用, 与药效团结果中的芳香环基团一致。BUCM\_G001 中脯氨酸羰基氧原子与 ARG167 形成氢键作用, 与药效团模型中氢键受体特征一致。

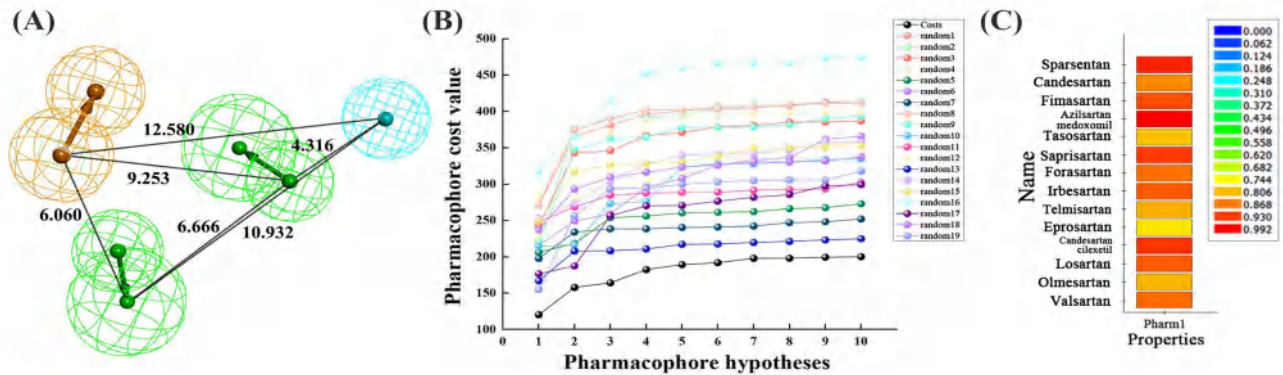


图 2 Pharma1 药效团模型 (A)、备选药效团与随机药效团的 cost 对比 (95% 置信度) (B) 及阳性药与备选药效团模型的匹配结果 (C)  
Fig 2 Pharmacophore model (Pharma1) (A), cost of alternative pharmacophores with random pharmacophores at 95% confidence level (B), and matching of positive drugs with alternative pharmacophore models (C)

注: A 图绿色代表氢键受体、黄色代表芳香环特征、蓝色代表疏水基团。

Note: Green represents hydrogen bond acceptors, yellow represents ring aromatic, and blue represents hydrophobic region in figure A.

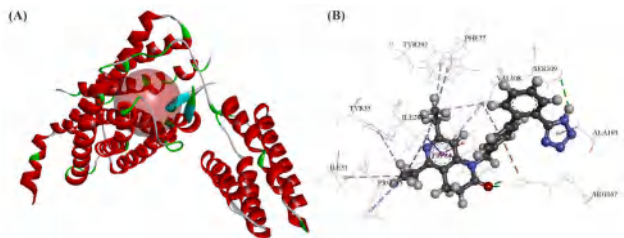


图 3 AT1R 分子对接模型 (A) 及 ZD7155 与 AT1R 分子对接模型匹配结果 (B)

Fig 3 AT1R docking model (A), and matching between ZD7155 and AT1R docking model (B)

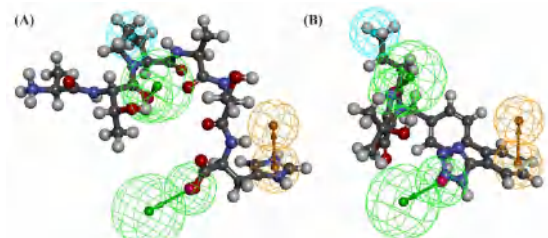


图 4 BUCM\_G001 和 Pharma1 匹配结果 (A) 及奥美沙坦和 Pharma1 匹配结果 (B)

Fig 4 Matching results of BUCM\_G001 with Pharma1 (A), and matching of olmesartan with Pharma1 (B)

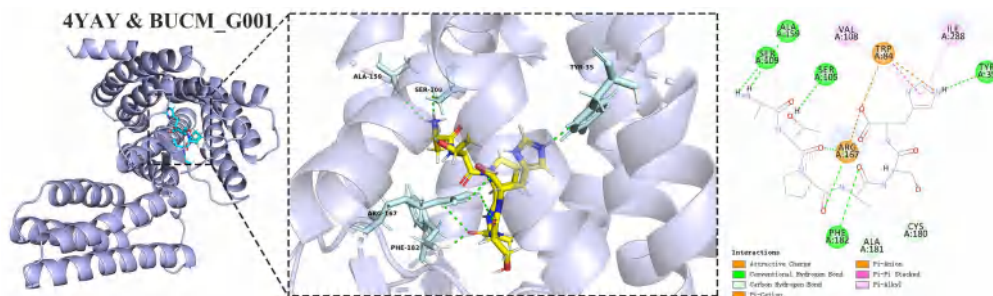


图 5 BUCM\_G001 与 AT1R 的分子相互作用 (PDB: 4YAY)

Fig 5 Molecular interaction between BUCM\_G001 and AT1R (PDB: 4YAY)

注: 绿色虚线代表氢键作用。

Note: Green dashed lines represent hydrogen bonding interactions.

### 3.4 生物肽 BUCM\_G001 对 Ang II 损伤 HUVEC 细胞 ROS 分泌的影响

如图 6A 所示, Ang II 使 HUVEC 细胞的 ROS 分泌量显著升高 ( $P < 0.05$ ), 生物肽 BUCM\_G001 及



表 3 筛选获得潜在的 AT1R 拮抗生物肽得分

| Tab 3 Scores of potential AT1R antagonist bioactive peptides obtained from the screening process |           |                                    |                                                |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|------------------------------------|------------------------------------------------|
| 序列                                                                                               | fit value | -CDOCKER                           | -CDOCKER                                       |
|                                                                                                  |           | 结合能 /<br>(kJ · mol <sup>-1</sup> ) | INTERACTION<br>结合能 / (kJ · mol <sup>-1</sup> ) |
| BUCM_G001                                                                                        | 0.99      | 368.17                             | 316.79                                         |
| BUCM_G002                                                                                        | 0.97      | 407.43                             | 377.72                                         |
| BUCM_G003                                                                                        | 0.99      | 405.81                             | 294.70                                         |
| ...                                                                                              | ...       | ...                                | ...                                            |
| BUCM_G022                                                                                        | 0.92      | 292.61                             | 230.46                                         |

阳性药奥美沙坦显著降低 ROS 分泌 ( $P < 0.05$ )。与模型组相比,生物肽高剂量组 ROS 降低了 32.75%,而中剂量和低剂量组分别降低了 30.71% 和 19.79%。

3.5 生物肽 BUCM\_G001 对 Ang II 损伤 HUVEC 细胞 NO 分泌的影响

如图 6B 所示, Ang II 可显著降低 HUVEC 细胞 NO 分泌 ( $P < 0.05$ ),生物肽高、中、低剂量组细胞培养液中 NO 含量分别是模型组的 3.84、3.75 和 3.61 倍。

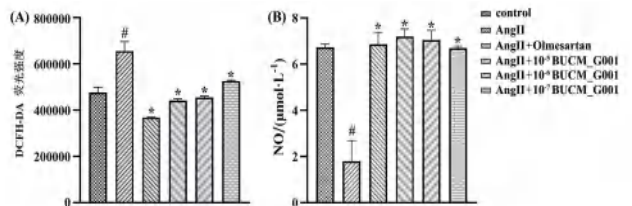


图 6 生物肽 BUCM\_G001 对 Ang II 损伤 HUVEC 细胞 ROS 产生 (A) 及 NO 分泌量 (B) 的影响

Fig 6 Effect of bioactive peptide BUCM\_G001 on ROS production (A) and NO secretion (B) in Ang II-injured HUVECs

注:与对照组比,  $^{\#}P < 0.05$ ;与 Ang II 模型组相比,  $^{*}P < 0.05$ 。  
Note: Compared with the control group,  $^{\#}P < 0.05$ ; compared with the model group,  $^{*}P < 0.05$ .

3.6 生物肽 BUCM\_G001 对 Ang II 损伤 HUVEC 细胞 NOX1、eNOS 基因表达量的影响

如图 7 所示, Ang II 损伤使 HUVEC 细胞 NOX1 表达量显著升高,为对照组的 2.28 倍,生物肽 BUCM\_G001 中、高剂量组显著下调 NOX1 的表达,分别降低了 52% 和 81% ( $P < 0.05$ )。Ang II 损伤使 eNOS 表达量降低了 50.26%, BUCM\_G001 低剂量组使 eNOS 表达量上升了 12%,中、高剂量组 eNOS 的表达量分别增加了 43% 和 48% ( $P < 0.05$ )。

4 讨论

AT1R 作为肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (RAAS) 中的重要成员,是一种典型的 G 蛋白偶联受体 (GPCR) [28-29]。AT1R 具有典型的 7 次跨膜结构域,这些跨膜结构域通过形成相互作用网络参与受体激活过程 [30]。Ang II 的 Asp1 与 AT1R 跨膜结构域 2 (TMD2) 中的 His183 和 Arg2 之间存在

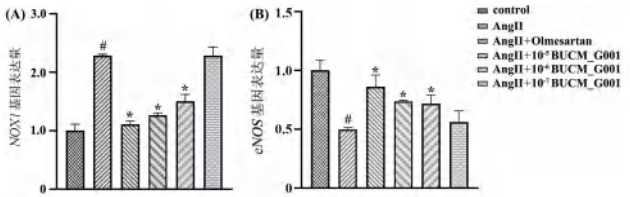


图 7 生物肽 BUCM\_G001 对 Ang II 损伤 HUVEC 细胞 NOX1 基因 (A) 及 HUVEC eNOS 基因 (B) 表达的影响

Fig 7 Effect of bioactive peptide BUCM\_G001 on NOX1 (A) and eNOS (B) expression of Ang II-injured HUVECs

注:与对照组比,  $^{\#}P < 0.05$ ;与 Ang II 模型组相比,  $^{*}P < 0.05$ 。  
Note: Compared with the control group,  $^{\#}P < 0.05$ ; compared with the model group,  $^{*}P < 0.05$ .

相互作用, Ang II 的 Phe8 也与 TMD5 中的 Lys199 形成相互作用 [31]。上市药物奥美沙坦和拮抗剂 ZD7155 主要与 AT1R 的 Tyr35、Trp84 和 Arg167 相互作用 [32]。构效关系表明,多数苯并咪唑类衍生物具有 AT1R 拮抗活性,本研究获得的 BUCM\_G001 亦含有咪唑基团,与文献报道一致 [33]。本研究采用了 Hypogen 方法构建 AT1R 配体药效团模型,与乔连生 [22] 的研究相比,本研究构建的药效团模型增加了一个氢键受体特征,同时减少了一个亲脂性疏水基团特征。Pal 等 [34] 同样用 Hypogen 方法构建药效团,相比之下,本研究构建的药效团模型增加了一个氢键受体特征,同时减少了一个亲脂性疏水基团特征。采用了 4YAY 晶体模型构建了分子对接模型,该模型分辨率为 2.90 Å,且模型中拮抗剂 ZD7155 的存在,为对接口袋位置及半径的确定提供了依据。Zhang 等 [35] 在 4YAY 晶体模型的解析中表明 ARG167 可能在 AT1R 与配体结合的亲和力和选择性方面发挥关键作用。Huo 等 [36] 研究中使用 4YAY 晶体结构,通过分析原配体、缬沙坦与 AT1R 的相互作用,将 ARG167、VAL108 和 TRP84 列为 AT1R 模型的关键氨基酸。Yan 等 [30] 通过半胱氨酸扫描突变法得出 Arg167 在配体结合和受体激活中可能发挥重要作用。本研究通过分析 AT1R 晶体模型与原配体和批准上市药物的相互作用,确定了 ILE288、VAL108 和 ARG167 3 个关键氨基酸,与报道的文献一致。

从中药寻找新型 AT1R 拮抗剂是现代医药研发的重要策略。Huo 等 [36] 从石花中发现石耳酸具有 AT1R 和 NEP 双靶点拮抗特性。Liu 等 [37] 研究表明生姜中 6-gingerol 具有 AT1R 拮抗作用,其  $IC_{50}$  为  $8.173 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。吴琼等 [38] 研究表明毛蕊异黄酮和益母草碱可以与 AT1R 的关键氨基酸形成氢键作用,而发挥拮抗作用。本研究共获得 22 条具有潜在 AT1R 拮抗活性的生物肽分子,其中生物肽 BUCM\_G001 能够降低 Ang II 损伤 HUVEC ROS 水

平, 并提高 NO 分泌量; 同时下调 *NOX1* 基因表达, 上调 *eNOS* 基因表达, 具有良好的血管内皮细胞保护作用, 与沙坦类药物改善氧化应激作用相一致, 为新型 ARBs 类药物研发提供新思路<sup>[39]</sup>。

## 参考文献

- [1] Forouzanfar MH, Liu P, Roth GA, et al. Global burden of hypertension and systolic blood pressure of at least 110 to 115 mm Hg, 1990—2015 [J]. JAMA, 2017, 317 (2): 165-182.
- [2] Global burden of 87 risk factors in 204 countries and territories, 1990—2019: a systematic analysis for the global burden of disease study 2019 [J]. Lancet, 2020, 396 (10258): 1204-1222.
- [3] World Health Organization. Global report on hypertension: the race against a silent killer [M]. Geneva: World Health Organization, 2023.
- [4] 中国高血压防治指南修订委员会, 高血压联盟, 中国医疗保健国际交流促进会高血压病学分会, 等. 中国高血压防治指南 (2024 年修订版) [J]. 中华高血压杂志 (中英文), 2024, 32 (7): 603-700.
- [5] Laurent S. Antihypertensive drugs [J]. Pharmacol Res, 2017, 124: 116-125.
- [6] Garg N, Krishan P, Syngle A. Angiotensin-receptor blockade improves inflammation and endothelial dysfunction in ankylosing spondylitis: ARB-AS study [J]. Int J Angiol, 2021, 30 (4): 262-270.
- [7] Saavedra JM. Angiotensin receptor blockers are not just for hypertension anymore [J]. Physiology (Bethesda), 2021, 36 (3): 160-173.
- [8] Lassègue B, Griendling KK. NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30 (4): 653-661.
- [9] Siti HN, Jalil J, Asmadi AY, et al. *Parkia speciosa* Hassk. Empty pod extract alleviates angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy in H9c2 cells by modulating the Ang II/ROS/NO axis and MAPK pathway [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 741623.
- [10] Shao MF, Zhao W, Shen K, et al. Peptides from harpadon nehereus bone ameliorate angiotensin II-induced HUVEC injury and dysfunction through activation of the AKT/eNOS and Nrf2 pathway [J]. ACS Omega, 2023, 8 (44): 41655-41663.
- [11] 温绍君, 刘洁琳, 刘雅, 等. 降血压药物的潜在不良反应及其预防 [J]. 药物不良反应杂志, 2007, 9 (3): 172-176.
- [12] Wen XR, Otoo MN, Tang J, et al. Angiotensin receptor blockers for hypertension and risk of epilepsy [J]. JAMA Neurol, 2024, 81 (8): 866-874.
- [13] Du ZJ, Li YH. Review and perspective on bioactive peptides: a roadmap for research, development, and future opportunities [J]. J Agric Food Res, 2022, 9: 100353.
- [14] Chakrabarti S, Guha S, Majumder K. Food-derived bioactive peptides in human health: challenges and opportunities [J]. Nutrients, 2018, 10 (11): 1738.
- [15] Purohit K, Reddy N, Sunna A. Exploring the potential of bioactive peptides: from natural sources to therapeutics [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25 (3): 1391.
- [16] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 393-394.
- [17] 李晓凯, 顾坤, 梁慕文, 等. 薏苡仁化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51 (21): 5645-57.
- [18] Li B, Qiao LS, Li LL, et al. A novel antihypertensive derived from Adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) glutelin [J]. Molecules, 2017, 22 (4): 534.
- [19] Chen PY, Li LL, Huo XQ, et al. New angiotensin-converting enzyme inhibitory peptide from Coix prolamin and its influence on the gene expression of renin-angiotensin system in vein endothelial cells [J]. J Cereal Sci, 2020, 96: 103099.
- [20] Qiao LS, Li B, Chen YK, et al. Discovery of anti-hypertensive oligopeptides from Adlay based on in silico proteolysis and virtual screening [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17 (12): 2099.
- [21] 欧阳雨晴, 李玲玲, 石好宇, 等. 薏苡转录组测序及基因功能注释 [J]. 中南药学, 2021, 19 (7): 1286-1293.
- [22] 乔连生. 基于计算机辅助水解的降压调脂中药寡肽的发现研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [23] Qiao LS, Zhang XB, Jiang LD, et al. Identification of potential ACAT-2 selective inhibitors using pharmacophore, SVM and SVR from Chinese herbs [J]. Mol Divers, 2016, 20 (4): 933-944.
- [24] Wang X, Zhang YX, Yang Y, et al. Identification of berberine as a direct thrombin inhibitor from traditional Chinese medicine through structural, functional and binding studies [J]. Sci Rep, 2017, 7: 44040.
- [25] Duan YT, Yao YF, Huang W, et al. Synthesis, biological evaluation, and molecular docking studies of novel 2-styryl-5-nitroimidazole derivatives containing 1, 4-benzodioxan moiety as FAK inhibitors with anticancer activity [J]. Bioorg Med Chem, 2014, 22 (11): 2947-2954.
- [26] Magenta A, Cencioni C, Fasanaro P, et al. miR-200c is up-regulated by oxidative stress and induces endothelial cell apoptosis and senescence via ZEB1 inhibition [J]. Cell Death Differ, 2011, 18 (10): 1628-1639.
- [27] 杨晔. 抗病毒相关药效团的构建及评价方法研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2010.
- [28] Tóth AD, Turu G, Hunyady L, et al. Novel mechanisms of G-protein-coupled receptors functions: AT1 angiotensin receptor acts as a signaling hub and focal point of receptor cross-talk [J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2018, 32 (2): 69-82.
- [29] Singh KD, Karnik SS. Angiotensin receptors: structure, function, signaling and clinical applications [J]. J Cell Signal (Los Angel), 2016, 1 (2): 111.
- [30] Yan LP, Holleran BJ, Lavigne P, et al. Analysis of transmembrane domains 1 and 4 of the human angiotensin II AT1 receptor by cysteine-scanning mutagenesis [J]. J Biol Chem, 2010, 285 (4): 2284-2293.
- [31] Guo DF, Sun YL, Hamet P, et al. The angiotensin II type 1 receptor and receptor-associated proteins [J]. Cell Res, 2001, 11 (3): 165-180.
- [32] Zhang HT, Unal H, Desnoyer R, et al. Structural basis for ligand recognition and functional selectivity at angiotensin receptor [J]. J Biol Chem, 2015, 290 (49): 29127-29139.
- [33] Singh PK, Silakari O. Chapter 2-benzimidazole: journey from single targeting to multitargeting molecule [M]/Key heterocycle cores for designing multitargeting molecules. 2018: 31-52.
- [34] Pal M, Paliwal S. In silico identification of novel lead com-

- pounds with AT1 receptor antagonist activity: successful application of chemical database screening protocol [J]. *Org Med Chem Lett*, 2012, 2 (1): 7.
- [35] Zhang HT, Unal H, Gati C, et al. Structure of the angiotensin receptor revealed by serial femtosecond crystallography [J]. *Cell*, 2015, 161 (4): 833-844.
- [36] Huo XQ, Qiao LS, Chen YK, et al. Discovery of novel multi-target inhibitor of angiotensin type 1 receptor and nephrin inhibitors from traditional Chinese medicine [J]. *Sci Rep*, 2019, 9 (1): 16205.
- [37] Liu Q, Liu JJ, Guo HL, et al. 6-Gingerol: a novel AT1 antagonist for the treatment of cardiovascular disease [J]. *Planta Medica*, 2013, 79 (5): 322-326.
- [38] 吴琼, 康宏, 王欢欢, 等. AT<sub>1</sub> 受体的中药活性成分筛选模型及其作用机理研究 [J]. *化学学报*, 2012, 70 (6): 796-802.
- [39] Ding J, Yu M, Jiang JC, et al. Angiotensin II decreases endothelial nitric oxide synthase phosphorylation via AT1R Nox/ROS/PP2A pathway [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 566410.

(收稿日期: 2024-12-05; 修回日期: 2025-02-27)

## 基于网络药理学及体内实验探讨桂枝附子汤对痛风性关节炎模型大鼠的作用机制

黄小尧<sup>1</sup>, 刘燕君<sup>2</sup>, 王彦顺<sup>1</sup>, 江佳蓉<sup>1</sup>, 刘新<sup>1\*</sup>, 陈阳<sup>1\*</sup> (1.新疆医科大学中医学院, 乌鲁木齐 830011; 2.新疆医科大学第四临床医学院, 乌鲁木齐 830000)

**摘要:** **目的** 基于网络药理学结合体内实验, 探究桂枝附子汤 (Guizhi Fuzi decoction, GFD) 对痛风性关节炎 (GA) 模型大鼠的抗炎作用, 并分析其潜在机制。 **方法** 采用网络药理学对 GFD 治疗 GA 的核心靶点进行筛选, 通过 Metascape 数据库对其核心靶点进行基因本体 (GO) 和基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 利用分子对接来模拟 GFD 中主要活性成分作用于靶点蛋白的结合情况; 建立尿酸钠 (MSU) 诱导的 GA 大鼠模型, 观察 GFD 对 GA 大鼠的治疗作用, 通过足趾容积测量仪测量大鼠踝关节肿胀变化, 苏木精-伊红染色 (HE) 观察大鼠踝关节滑膜形态学变化, 免疫组化检测踝关节滑膜中 Toll 样受体 4 (TLR4) 和核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 阳性表达情况, 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测血清中炎症因子肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 水平。 **结果** 经网络药理学分析, 得出 GFD 活性成分与 GA 疾病共 57 个交集靶点, 主要涉及的生物过程有参与炎症反应的调节、对外源性刺激的反应、细胞群增殖的负调控、对激素的反应、细胞对脂质的反应, GFD 治疗 GA 与糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、Toll 样受体信号通路、肿瘤坏死因子信号通路等有关; 分子对接结果显示, GFD 主要活性成分槲皮素、山柰酚、7-甲氧基-2-甲氧基异黄酮、 $\beta$ -谷甾醇、柚皮素与 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 对接结合能均小于  $-20.96 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ , 提示其作用机制可能与 Toll 样受体信号通路有关。踝关节肿胀度结果显示, 与空白组相比较, 模型组大鼠踝关节红肿明显, 造模 6、12、24、48 h 后踝关节肿胀度均显著升高, 踝关节滑膜组织增生明显, 踝关节滑膜中 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 阳性表达升高, 血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组相比较, 秋水仙碱组和 GFD 低、中、高剂量组大鼠踝关节肿胀明显消退, GFD 低、中剂量组及秋水仙碱组各时间点大鼠踝关节肿胀度均降低, GFD 低、中、高剂量组及秋水仙碱组大鼠踝关节滑膜中 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 表达, 以及血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 表达均降低 ( $P < 0.05$ )。 **结论** GFD 可抑制尿酸钠诱导的 GA 模型大鼠的踝关节炎症反应, 其作用机制可能与 TLR4/NF- $\kappa$ B/TNF- $\alpha$  信号通路有关。

**关键词:** 桂枝附子汤; 痛风性关节炎; 炎症; 痹病; 网络药理学; 分子对接

**中图分类号:** R286

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-2981(2025)06-1554-09

**doi:** 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.009

**基金项目:** 新疆维吾尔自治区自然科学基金 (No.2021D01C264); 国家自然科学基金 (No.81860834)。

**作者简介:** 黄小尧, 男, 硕士研究生, 主要从事中医方剂学研究, email: 343170183@qq.com; \*通信作者: 刘新, 男, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事经方配伍与临床应用研究, email: 297194830@qq.com; 陈阳, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事中西医结合基础与临床研究, email: 646926565@qq.com



## Mechanism of Guizhi Fuzi decoction in gouty arthritis model rats based on network pharmacology and in vivo experiments

HUANG Xiao-yao<sup>1</sup>, LIU Yan-jun<sup>2</sup>, WANG Yan-shun<sup>1</sup>, JIANG Jia-rong<sup>1</sup>, LIU Xin<sup>1\*</sup>, CHEN Yang<sup>1\*</sup>  
(1. College of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011; 2. The Fourth Clinical Medical College of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000)

**Abstract: Objective** To determine the anti-inflammatory effect of Guizhi Fuzi decoction (GFD) on gouty arthritis (GA) model rats based on network pharmacology and in vivo experiments, and the underlying mechanism. **Methods** The key targets of GFD for GA were screened with network pharmacology. The key targets were enriched by GO and KEGG pathway analysis through the Metascape database, and then molecular docking was performed to simulate the binding of the main active ingredients in GFD to the target proteins. Monosodium urate (MSU)-induced GA rat model was established to observe the therapeutic effect of GFD on GA rats. Changes in ankle joint swelling were measured by toe volumetry, morphological changes in the synovium of the ankle joints were observed by Hematoxylin Eosin (HE) staining, positive expression of Toll-like receptor 4 (TLR4) and Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) in the synovium of the ankle joints was detected by immunohistochemistry, and the levels of inflammatory factors tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), and interleukin-6 (IL-6), were detected by enzyme-linked immunosorbent assay in the serum. **Results** After network pharmacological analysis, 57 intersecting targets were found in GFD treatment of GA, and the main biological processes involved the regulation of inflammatory response, response to exogenous stimuli, negative regulation of cell population proliferation, response to hormones, and cellular response to lipids. The GFD treatment of GA was related to AGE-RAGE signalling pathway, Toll-like receptor signalling pathway, tumour necrosis factor signalling pathway, etc. The main active components of GFD, quercetin, kaempferol, 7-methoxy-2-methylisoflavone, beta-sitosterol, and naringenin, had docking binding energies of less than  $-20.96 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  with TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6, suggesting that the mechanism of action might be via the Toll-like receptor signalling pathway. In the ankle swelling data, compared with the blank group, the ankle joints of rats in the model group were obviously red and swollen, and the swelling of the ankle joints was markedly increased after 6 h, 12 h, 24 h, and 48 h of modelling, with obvious proliferation of the synovial tissue in the ankle joints, elevated positive expressions of TLR4 and NF- $\kappa$ B in the synovial membranes of the ankle joints, and elevated levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 in the serum ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the ankle joint swelling of rats in the colchicine group and GFD low group and GFD medium group obviously subsided; the ankle joint swelling of rats in the GFD low group, GFD medium group and the colchicine group was relieved at all time points; and the expression of TLR4 and NF- $\kappa$ B in the synovium of the ankle joints of rats in GFD low group, GFD medium group and GFD high group and the colchicine group, and the serum expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 were all reduced ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** GFD can inhibit the inflammatory responses of ankle joint in sodium urate-induced gouty arthritis model rats, the mechanism may be related to the TLR4/NF- $\kappa$ B/TNF- $\alpha$  signalling pathway.

**Key words:** Guizhi Fuzi decoction; gouty arthritis; inflammation; Bi syndrome; network pharmacology; molecular docking

痛风性关节炎 (gouty arthritis, GA) 是一种代谢性疾病, 是因尿酸代谢异常导致尿酸蓄积于血液中, 长时间的高尿酸血症导致尿酸盐结晶沉积于关节中, 从而诱发免疫炎症, 造成对关节

的损伤, 出现关节剧痛、肿胀等症状, 严重者导致关节结构损伤甚至残疾<sup>[1-2]</sup>。目前全球不同地区 GA 的患病率在 1% ~ 6.8%, 且呈逐年上升趋势<sup>[3]</sup>。目前, 临床上现代医学对 GA 急性发

作时采取控制疼痛和抑制炎症的治疗策略,使用秋水仙碱、糖皮质激素、非甾体抗炎药等药物,在 GA 非急性发作期主要以降低和控制血尿酸水平为主,使用别嘌醇、非布司他等药,部分药物对胃肠道、皮肤、心血管存在一定程度上的不良反应<sup>[4]</sup>。中医药运用历史悠久,临床疗效佳,对人体产生的不良反应小,因此研究中医药对 GA 的治疗具有重要的意义。

中医将 GA 归属于“痹证”,汉代·张仲景《伤寒杂病论》:“伤寒八九日,风湿相搏,身体疼烦,不能自转侧,不呕、不渴,脉浮虚而涩者,桂枝附子汤(Guizhi Fuzi decoction, GFD)主之”认为痹证是由风寒湿三邪侵袭关节,导致骨节疼痛,提出“温阳祛湿,通络止痛”的治法,拟用 GFD 治疗寒湿痹阻型痹病<sup>[5]</sup>,经临床研究证实 GFD 能有效改善 GA 的临床症状,患者症状好转明显、疗程缩短、疗效突出<sup>[6-7]</sup>,但其作用机制并不明确,因此本研究以 GA 模型大鼠为对象,基于网络药理学,进行相关靶点预测,结合动物实验足趾肿胀度、病理、生化检测探究 GFD 在治疗 GA 中的作用机制。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级健康 SD 雄性大鼠 36 只,8 周龄,体重(180±10)g[新疆医科大学动物实验中心,动物许可证号:SYXK(新)2021-0003]。饲养于新疆医科大学动物实验中心,饲养环境光暗周期 12 h,温度 23~25℃,湿度 45%~55%,自由进食饮水,本实验方案已通过新疆医科大学实验动物伦理委员会审批(批件号:IACUC-20230321-10)。

### 1.2 试药

《伤寒杂病论》中的 GFD:桂枝(去皮)四两,附子(炮,去皮)三枚,生姜(切)二两,大枣(擘)十二枚、甘草(炙)二两,再依据文献考据、实测数据及国家计量总局出土文物进行推算,明确了汉代度量衡<sup>[8]</sup>,推算出临床有效剂量为:桂枝 62.5 g,附子(炮)45 g,生姜 31.25 g,大枣 30 g、炙甘草 31.25 g(以上中药饮片均购自四川国强中药饮片有限公司,经新疆医科大学中医学院刘新教授鉴定,符合 2020 年版《中国药典》相关规定),将 GFD 设置为低、中、高剂量,临床有效剂量设置为中剂量,依据人和大鼠体表系数换算,将桂枝附子水煎液浓缩成质量浓度为 0.9、1.8、3.6 g·mL<sup>-1</sup>;秋水仙碱(西双版纳版纳药业有限责任公司,批号:220708),用纯净水配制质量浓度为 0.0135 mg·mL<sup>-1</sup>混悬液。

尿酸钠(MSU,上海源叶生物科技有限公司,批号:JS261820),异氟烷(瑞沃德生命科

技有限公司,批号:20230529),多聚甲醛(纯度:95.0%,天津市致远化学试剂有限公司,批号:20230601730),甲酸(纯度:88.0%,天津市鑫铂特化工有限公司,批号:EZ6582ED09),无水乙醇(纯度:99.7%,天津市致远化学试剂有限公司,批号:20230301),石蜡(徕卡),苏木精-伊红染色(HE)染液试剂盒(白鲨生物科技有限公司,批号:BL700B),磷酸盐缓冲液(PBS)(武汉赛维尔),柠檬酸修复液(傲锐东源生物科技有限公司,批号:ZLI-9065),TLR4 Rb pAb、NF-κB Rb pAb(万类生物),山羊血清(碧云天),兔二步法试剂、DAB 显色试剂盒(中杉金桥),大鼠肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-1β(IL-1β)、白细胞介素-6(IL-6)ELISA 试剂盒(上海优选生物科技公司)。

## 1.3 仪器

足趾容积测量仪、PV-200 组织容积测量仪(成都泰盟科技有限公司),ME204E 型电子天平(梅特勒公司),石蜡包埋机、切片机(徕卡),Multiskan GO 酶标仪(赛默飞仪器有限公司),显微镜(NIKON, ECLIPSE Ci-E 310088)。

## 2 方法

### 2.1 GFD 方各种药物活性成分筛选

利用 TCMSP 数据库,获取 GFD 5 味药的活性成分;将生物利用度(OB)≥30%,类药性(DL)≥0.18 设定为筛选条件,用 Uniprot 数据库获取靶点的标准名称。

### 2.2 GA 疾病靶点获取

以“gouty arthritis”为基础搜索词条,在 GeneCards、OMIM、TTD、PharmGkb、DrugBank 数据库中寻找 GA 靶点。将 GFD 方中各药物活性成分靶点和 GA 靶点进行交集,通过 Venny2.1.0 分析,获取 GFD 方中药物活性成分治疗 GA 的潜在靶点。

### 2.3 蛋白质相互作用(PPI)网络分析与核心靶点获取

利用 STRING 数据库对所得到的交集靶点构建 PPI 网络,再把构建的网络结果导入 Cytoscape 3.7.2 软件中,采用 Analyze Network 工具,挑出度值在前 10 位的靶点,以此作为待选的核心靶点。

### 2.4 基因本体(GO)和基因组百科全书(KEGG)通路富集分析

用 Metascape 平台对得到的核心靶点进行 GO 和 KEGG 通路富集分析,并利用微生信平台进行图片制作。

### 2.5 分子对接

根据生信分析结果,在待选核心靶点中选择炎症相关通路靶点作为核心靶点与核心成分进行分子对接。从 TCMSP 数据库获得核心成分的

mol2 文件, 从 RCSB-PDB 数据库中获得靶点的 pdb 文件, 利用 AutoDock Tool 软件进行对接模拟, 验证对应关系。最后通过 PyMOL 软件分析观察对接结果。

## 2.6 分组、造模及给药

36 只 SD 大鼠随机分为 6 组, 分别为空白组, 模型组, GFD 低、中、高剂量组及秋水仙碱组, 每组 6 只, 在 SPF 环境中适应性喂养 7 d。GFD 低、中、高剂量组和秋水仙碱组给予对应剂量药液 10 mL/(kg·d) 灌胃; 空白组和模型组大鼠给予生理盐水 10 mL/(kg·d) 灌胃, 每日 1 次, 连续 7 d。第 5 日灌胃 1 h 后, 除空白组, 其余各组大鼠通过 4% 异氟烷吸入麻醉后, 用碘伏对大鼠后肢右踝关节进行消毒, 使用胰岛素针从后肢右侧踝关节外后方进针, 向大鼠踝关节腔内注射 0.1 mL MSU 混悬液 ( $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 建立 GA 模型<sup>[9]</sup>; 空白组大鼠在踝关节相同位置注入 0.1 mL 无菌生理盐水, 通过足趾容积测量仪测量各组大鼠踝关节体积, 计算关节肿胀度, 对模型进行评价, 模型组对比空白组大鼠踝关节明显肿胀, 且踝关节肿胀度差异有统计学意义即判定为模型建立成功。

## 2.7 大鼠踝关节肿胀度

在大鼠踝关节注射 MSU 后的 6、12、24、48 h, 使用大鼠足趾容积测量仪对各组大鼠右后肢踝关节排水体积进行测量, 计算出大鼠踝关节肿胀度。踝关节肿胀度 (%) = (造模后踝关节排水体积 - 造模前踝关节排水体积) / 造模前踝关节排水体积  $\times 100\%$ <sup>[10]</sup>。

## 2.8 HE 观察大鼠踝关节滑膜病理学形态变化

第 7 日灌胃 2 h 后, 采用 4% 异氟烷吸入法麻醉大鼠, 用采血针和促凝管在大鼠腹主动脉采集动脉血,  $4^\circ\text{C}$ 、 $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min, 分装并收集血清后冻存于  $-80^\circ\text{C}$  冰箱储存备用。取每只大鼠右侧后肢踝关节, 剪去多余的皮毛、韧带、肌肉后, 将大鼠踝关节置于 pH 值为 7.2~7.4 的 4% 多聚甲醛中固定 7 d。将固定完成的踝关节置于 10% 甲酸脱钙液中 7 d 进行脱钙处理, 直至针灸针刺入骨组织无阻力感<sup>[11]</sup>, 常规脱水石蜡包埋、切片、 $60^\circ\text{C}$  烤片 4 h、HE 染色、透明、封片, 200 倍显微镜下观察大鼠踝关节滑膜病理学形态变化并采集图片。

## 2.9 免疫组化法检测踝关节滑膜中 TLR4、NF- $\kappa$ B 阳性表达

随机在每组中选取 3 个大鼠踝关节石蜡切片,  $60^\circ\text{C}$  烤片 4 h, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化, 柠檬酸钠抗原修, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 浸

洗, 内源性过氧化物酶阻断, PBS 浸洗, 山羊血清封闭, PBS 浸洗, 滴加 TLR4 抗体 (稀释比例为 1:200) 或 NF- $\kappa$ B 抗体 (稀释比例为 1:200),  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜, PBS 浸洗; 滴加二抗,  $37^\circ\text{C}$  孵育, PBS 清洗后滴加 DAB 显色液显微镜下观察显色, 苏木精染色使细胞核染为蓝紫色便于观察, 梯度浓度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 于显微镜下观察大鼠踝关节滑膜组织中 TLR4、NF- $\kappa$ B 阳性表达。通过显微镜 200 倍放大采集图像, 通过 Image Pro Plus 6.0 软件定量分析 TLR4、NF- $\kappa$ B 阳性表达。

## 2.10 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测各组大鼠血清中炎症因子释放水平

每组选取 6 只大鼠血清, 室温解冻后, 涡旋仪上涡旋使血清混匀, 按照 ELISA 试剂盒说明书严格操作, 测定大鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  炎症因子释放水平。

## 2.11 数据处理与分析

实验数据使用 SPSS 26 或 GraphPad Prism9 软件进行统计分析, 所有数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较, 若数据符合正态分布及方差齐性检验, 则采用单因素方差分析 Tukey 检验; 若不符合, 则采用非参数检验。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。作图使用 GraphPad Prism9、Adobe Illustrator 2023、Image-Pro Plus 等图像处理软件进行编辑。

## 3 结果

### 3.1 GFD 中各味药物活性成分

对 GFD 所含 5 味药通过 TCMSP 数据检索, 共获得主要活性成分 123 种, 桂枝 6 种、附子 6 种、甘草 88 种、生姜 4 种、大枣 19 种, 删除 14 个重复项后剩余 109 种成分。以口服生物利用度降序排序前 5 的活性成分见表 1。

### 3.2 GFD 治疗 GA 潜在靶点预测结果

如图 1 所示, 在 TCMSP 数据库中检索到 GFD 中活性成分靶点共 247 个, 在 GeneCards、OMIM、TTD、PharmGkb、DrugBank 数据库中检索 “gouty arthritis”, 得到 GA 的疾病相关靶点, 去重后共有 823 个。通过 Venny2.1.0 分析共获得 GFD 活性成分与 GA 疾病的交集靶点 57 个。将获得的 GFD 中药物有效成分和 GA 疾病靶点, 用数据库 STRING 分析, 置信度设置为 0.400, GFD 治疗 GA 的 PPI 网络中共涉及有 57 个节点以及 652 条边, 平均度值 (degree) 为 22.9。见图 1。用 Cytoscape 3.7.2 软件分析 PPI 网络; 核心靶点筛选条件设置为 degree 大于 35, 共筛选出 10 个核心靶点, 见图 2。



表 1 GFD 的活性成分

Tab 1 Some active ingredients of Guizhi Fuzi decoction

| 中药 | 活性成分                                           | 口服生物<br>利用度 /% | 类药性   |
|----|------------------------------------------------|----------------|-------|
| 桂枝 | (-)-二氢槲皮素                                      | 60.506         | 0.273 |
|    | 二氢槲皮素                                          | 57.842         | 0.273 |
|    | (+)-儿茶素                                        | 54.826         | 0.242 |
|    | (+)-表儿茶素                                       | 48.960         | 0.242 |
|    | 过氧麦角甾醇                                         | 44.392         | 0.820 |
| 附子 | ignavine                                       | 84.079         | 0.248 |
|    | (R)-去甲乌药碱                                      | 82.543         | 0.209 |
|    | 水黄皮次素                                          | 69.557         | 0.336 |
|    | delphin                                        | 57.762         | 0.279 |
|    | 去氧穿心莲内酯                                        | 56.304         | 0.315 |
| 生姜 | 6-methylgingediacetate2                        | 48.735         | 0.322 |
|    | 二氢辣椒素                                          | 47.071         | 0.193 |
|    | 豆甾醇                                            | 43.830         | 0.757 |
|    | $\beta$ -谷甾醇                                   | 36.914         | 0.751 |
|    | 多孔甾-5-烯-3 $\beta$ -醇                           | 36.914         | 0.750 |
| 大枣 | spiradine A                                    | 113.525        | 0.607 |
|    | mauridine D                                    | 89.125         | 0.453 |
|    | N-反式阿魏酰酪胺                                      | 86.712         | 0.265 |
|    | 美洲茶酸                                           | 73.522         | 0.766 |
|    | ziziphin                                       | 66.945         | 0.619 |
| 甘草 | 新甘草酚                                           | 90.776         | 0.668 |
|    | 7, 2', 4'-trihydroxy-5-methoxy-3-aryl coumarin | 83.714         | 0.271 |
|    | 甘草吡喃香豆素                                        | 80.360         | 0.654 |
|    | shinpterocarpin                                | 80.295         | 0.727 |
|    | phaseol                                        | 78.766         | 0.579 |

3.3 GO 及 KEGG 通路富集分析

利用 Metascape 平台实施 GO 富集分析, 在分析过程中, 以  $P < 0.01$  作为筛选标准来判定富集情况, 经过分析发现, 共富集到 1081 个相关条目, 其中生物过程类 (BP) 富集有 984 个, 细胞成分类 (CC) 富集有 20 个、分子功能类 (MF) 富集有 77 个。依据  $P$  值进行排序, 选出排在前 10 位的条目, 生成柱状图 (见图 3)。

生物过程分析关键靶点基因参与炎症反应的调节、对外源性刺激的反应、细胞群增殖的负调控、对激素的反应、细胞对脂质的反应; 对细胞成分分析结果提示其与内质网腔、富含 Ficolin-1 的颗粒腔、细胞外基质、细胞质的核周区域、核包膜; 分子功能的相关条目主要包括氧化还原酶活性、细胞因子活性、DNA 结合转录因子结合、磷酸酶结合、单羧酸结合。

利用 Metascape 平台, 对 GFD 药物 -GA 共同作用的 247 个靶点基因进行 KEGG 通路富集分析, 以  $P < 0.01$  为筛选标准进行筛选, 得到 148 条通路, 选取显著性较高的前 20 条信号通路, 绘制 KEGG 通路富集分析图 (见图 3)。结果主

要涉及糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、Toll 样受体信号通路、TNF 信号通路、IL-17 信号通路等; 结合文献调研及 KEGG 结果分析, 选择 Toll 样受体信号通路中的 TLR-4/NF- $\kappa$ B/TNF- $\alpha$  信号通路进行后续研究。

3.4 分子对接

研究通过 PDB 数据库获得 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 蛋白结构, 与 GFD 中活性成分槲皮素、山柰酚、7-甲氧基-2-甲基异黄酮、 $\beta$ -谷甾醇、柚皮素进行分子对接, 结果显示, GFD 活性成分槲皮素、山柰酚、7-甲氧基-2-甲基异黄酮、 $\beta$ -谷甾醇、柚皮素与 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 对接结合能均小于 -20.96 kJ  $\cdot$  mol<sup>-1</sup>, 提示其作用机制可能与 Toll 样受体信号通路有关。分子对接结果见图 4、表 2。

3.5 GFD 对 GA 模型大鼠踝关节肿胀度影响

图 5 显示, 与空白组相比较, 造模后 4 个时间段模型组大鼠踝关节肿胀度均升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与模型组相比较, 造模 6 h 后除 GFD 高剂量组外, 秋水仙碱组和 GFD 低、中剂量组大鼠踝关节肿胀度降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 造模 12、24、48 h 后秋水仙碱组和 GFD 低、中、高剂量组大鼠踝关节肿胀度均显著降低 ( $P < 0.01$ ), 说明 GFD 和秋水仙碱对 GA 模型大鼠踝关节具有消肿作用。与 GFD 中剂量组相比较, 仅在造模后 48 h 时, GFD 低、高剂量组大鼠踝关节肿胀度降低不及 GFD 中剂量组 ( $P < 0.01$ )。

3.6 GFD 对 GA 模型大鼠踝关节滑膜组织病理学形态影响

如图 6 所示, 空白组大鼠踝关节滑膜组织间距疏松, 无炎性增生等现象。与空白组相比较, 模型组大鼠踝关节滑膜出现炎性增生, 滑膜组织中细胞层数明显增多且排列紊乱。与模型组相比较, GFD 中剂量组和秋水仙碱组相似, 滑膜组织炎性增生较模型组明显改善。与模型组相比较, GFD 低、高剂量组大鼠踝关节滑膜炎性增生亦有改善, 但不及 GFD 中剂量组和秋水仙碱组改善明显。

3.7 GFD 对 GA 模型大鼠踝关节滑膜组织中 TLR4、NF- $\kappa$ B 阳性表达的影响

如图 7 所示, 与空白组相比较, 在 MSU 诱导 GA 模型组大鼠滑膜组织中, TLR4 和 NF- $\kappa$ B 阳性表达均显著升高 ( $P < 0.01$ ), 与模型组相比较, 秋水仙碱组和 GFD 低、中、高剂量组踝关节滑膜组织中 TLR4、NF- $\kappa$ B 阳性表达出现了明显降低 ( $P < 0.01$ )。与 GFD 中剂量组相比较, GFD 低、高剂量组大鼠踝关节滑膜组织中 TLR4、NF- $\kappa$ B 阳性表达降低水平不及 GFD 中剂量组 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

Fig 1 Drug-active ingredients-target network of Guizhi Fuzi decoction

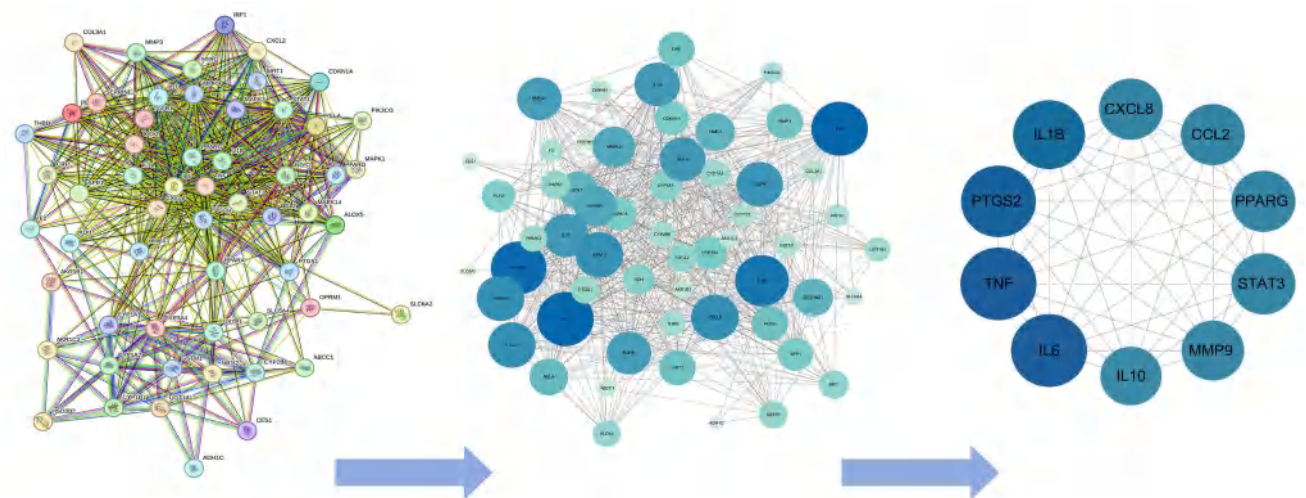


Fig 2 PPI network diagram of Guizhi Fuzi decoction in the treatment of gout arthritis

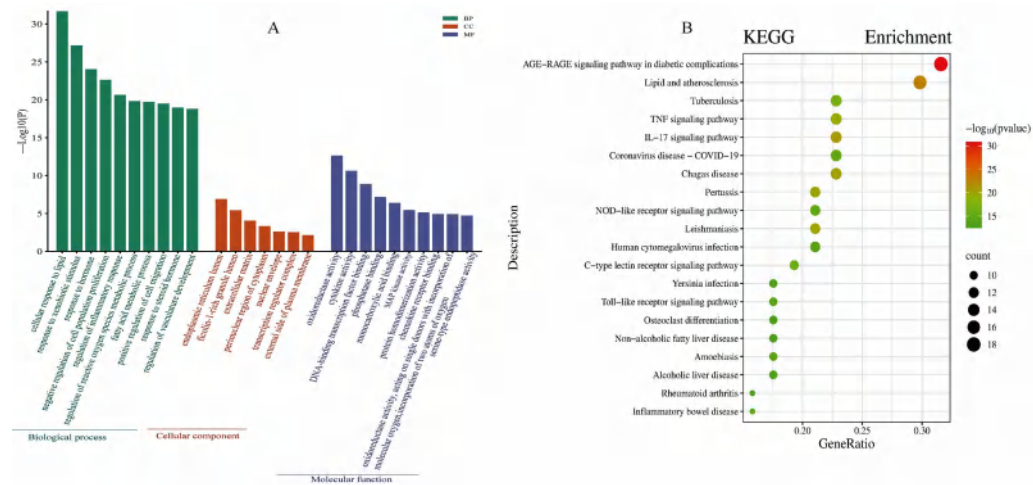


Fig 3 Histogram of GO enrichment analysis ( A ) and KEGG pathway bubble diagram ( B )



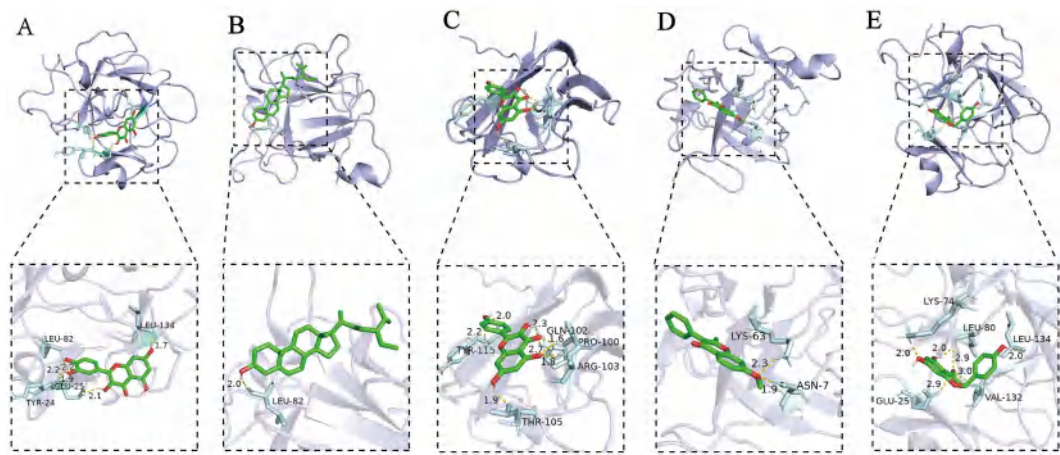


图 4 分子对接 3D 可视化图

Fig 4 3D visualization of molecular docking

A. 槲皮素对接 IL-1 $\beta$  ( quercetin docking IL-1 $\beta$ ); B. 山柰酚对接 IL-1 $\beta$  ( kaempferol docking IL-1 $\beta$ ); C. 7- 甲氧基 -2- 甲基异黄酮对接 TNF- $\alpha$  ( 7-methoxy-2-methyl isoflavone docking TNF- $\alpha$  ); D.  $\beta$ - 谷甾醇对接 IL-1 $\beta$  ( beta-sitosterol docking IL-1 $\beta$  ); E. 柚皮素对接 IL-1 $\beta$  ( naringenin docking IL-1 $\beta$  )

表 2 GFD 关键活性成分与疾病关键靶点对接结合能

| Tab 2 Binding energy of key active ingredients of Guizhi Fuzi decoction and key targets |                                                |        |               |                                 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|--------|---------------|---------------------------------|
| 活性成分                                                                                    | 化学式                                            | 相对分子质量 | 靶点            | 结合能 / (kJ · mol <sup>-1</sup> ) |
| 槲皮素                                                                                     | C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub> | 338.43 | TNF- $\alpha$ | - 23.43                         |
|                                                                                         |                                                |        | IL-1 $\beta$  | - 31.71                         |
|                                                                                         |                                                |        | IL-6          | - 23.68                         |
| 山柰酚                                                                                     | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub> | 286.23 | TNF- $\alpha$ | - 31.71                         |
|                                                                                         |                                                |        | IL-1 $\beta$  | - 35.15                         |
|                                                                                         |                                                |        | IL-6          | - 33.85                         |
| 7- 甲氧基 -2- 甲基异黄酮                                                                        | C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub> | 266.29 | TNF- $\alpha$ | - 31.71                         |
|                                                                                         |                                                |        | IL-1 $\beta$  | - 31.63                         |
|                                                                                         |                                                |        | IL-6          | - 25.82                         |
| $\beta$ - 谷甾醇                                                                           | C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O              | 414.7  | TNF- $\alpha$ | - 24.56                         |
|                                                                                         |                                                |        | IL-1 $\beta$  | - 30.59                         |
|                                                                                         |                                                |        | IL-6          | - 24.43                         |
| 柚皮素                                                                                     | C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub> | 272.25 | TNF- $\alpha$ | - 24.23                         |
|                                                                                         |                                                |        | IL-1 $\beta$  | - 28.03                         |
|                                                                                         |                                                |        | IL-6          | - 26.44                         |

3.8 GFD 对 GA 模型大鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  炎症因子水平的影响

如图 8 所示，与空白组相比较，在 MSU 诱导 GA 模型组的大鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  水平显著升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比较，秋水仙碱组和 GFD 低、中、高剂量组大鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平显著降低 ( $P < 0.01$ )，说明秋水仙碱和 GFD 对 GA 模型大鼠具有抗炎的作用。与 GFD 中剂量组相比较，GFD 低剂量组大鼠血清中 TNF- $\alpha$  降低水平不及 GFD 中剂量组 ( $P < 0.05$ )；GFD 低、高剂量组大鼠血清中 IL-1 $\beta$  降低水平与 GFD 中剂量组差异无统计学意义；GFD 低、高剂量组大鼠血清中

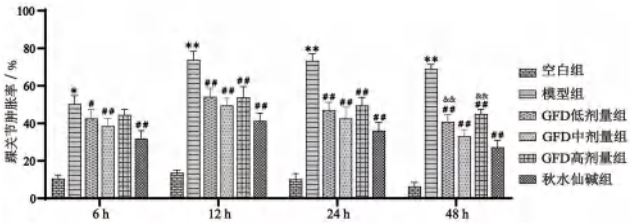


图 5 不同时间点各组大鼠踝关节肿胀率比较

Fig 5 Ankle joint swelling rate of rats in different groups at different time points

注：与空白组相比较，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ ；与模型组相比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ；与 GFD 中剂量组相比较，& $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the blank group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; compared with the model group, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ ; compared with the GFD medium group, & $P < 0.01$ .

IL-6 降低水平不及 GFD 中剂量组 ( $P < 0.01$ )。

4 讨论

中医将 GA 归属于“痹病”的范畴，历代医家认为 GA 多因脾虚不运以致湿浊内阻、喜食肥甘厚味，或虚劳伤正，湿浊久滞不祛，流注关节阻遏气血畅行而发为痹病，多采用祛湿通络、清热解毒、化瘀通络等治法<sup>[12]</sup>。汉代医家张仲景认为风寒兼湿内侵搏结于经络是痹病的发病关键，故以温阳祛湿、通络止痛为治法拟 GFD 治疗寒湿痹阻型痹病。桂枝辛香，善入关节络脉除寒湿以开痹止痛<sup>[13]</sup>，现代药理研究显示桂枝中含有的桂皮醛具有镇痛作用<sup>[14]</sup>。附子辛甘大热、气雄彪悍，全身上下大经小络无所不入，辛温去络中寒湿以止疼痛<sup>[15]</sup>，现代药理学研究发现附子含有乌头碱等成分具有显著的镇痛效果<sup>[16]</sup>。生姜辛温开散寒湿，合桂枝、附子温热扶阳以消寒湿荫翳，寒湿



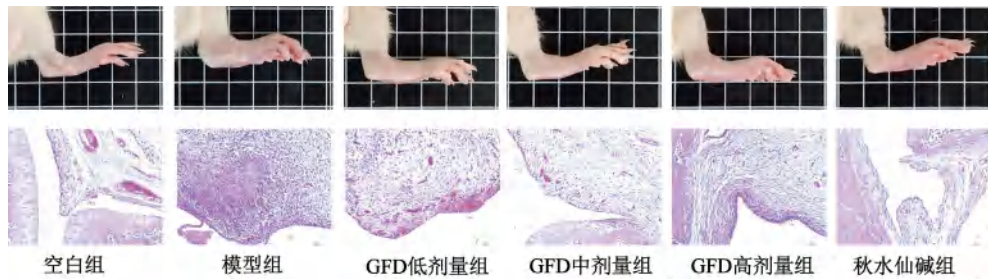


图 6 各组大鼠踝关节照片及踝关节滑膜组织病理学形态 (HE 染色, ×200)

Fig 6 Photographs of ankle joints and histopathologic morphology of the synovium of the ankle joints in each group of rats (HE staining, ×200)

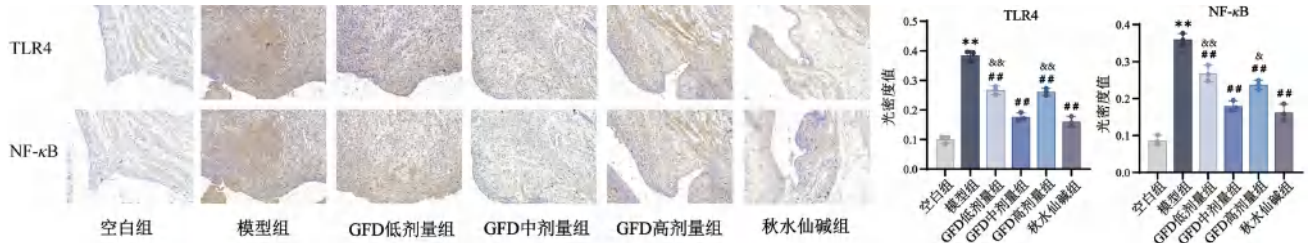


图 7 各组大鼠踝关节滑膜组织 TLR4、NF-κB 阳性表达比较 (免疫组化, ×200)

Fig 7 TLR4 and NF-κB positive expression in synovial tissues of rats in each group (IHC, ×200)

注: 与空白组相比较,  $^{**}P < 0.01$ ; 与模型组相比较,  $^{##}P < 0.01$ ; 与 GFD 中剂量组相比较,  $^{\&}P < 0.05$ ,  $^{\&\&}P < 0.01$ 。

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

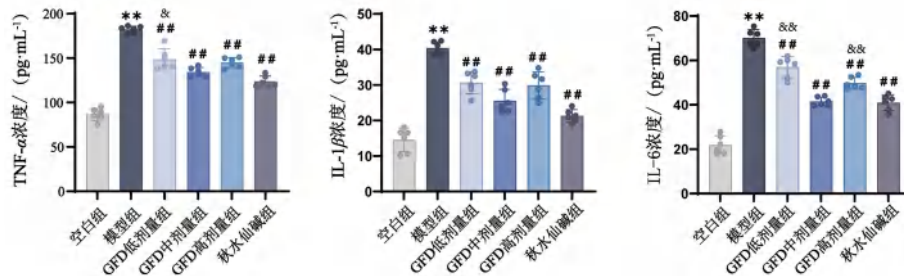


图 8 各组大鼠血清中 TNF-α、IL-6、IL-1β 炎症因子含量

Fig 8 Serum levels of TNF-α, IL-6 and IL-1β inflammatory factors in rats of each group

注: 与空白组相比较,  $^{**}P < 0.01$ ; 与模型组相比较,  $^{##}P < 0.01$ ; 与 GFD 中剂量组相比较,  $^{\&}P < 0.05$ ,  $^{\&\&}P < 0.01$ 。

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

消则络脉自通。甘草味甘性缓亦有缓急止痛之功效, 合大枣缓附子刚猛之性。全方共奏温阳祛湿、络通止痛之效。

本研究基于网络药理学通过筛选 GFD 中主要的活性成分, 并对 GFD 中活性成分作用靶点和 GA 疾病靶点取交集, 在 GO 富集分析中发现 GFD 治疗 GA 主要通过炎症反应的调节发挥作用; 在 KEGG 通路富集分析中, GFD 对 GA 的作用主要发生在糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、Toll 样受体信号通路、TNF 信号通路等。分子对接结果显示, GFD 活性成分槲皮素、山柰酚、7-甲氧基-2-甲基异黄酮、β-谷甾醇、柚皮素与 TNF-α、IL-1β、IL-6 对接结合能均小于  $-20.96 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ , 提示其作用机制可能与 Toll 样受体信号通路有

关。再根据文献调研选择 Toll 样受体信号通路中的 TLR-4/NF-κB/TNF-α 通路进行验证<sup>[17]</sup>。

GA 主要表现为关节红肿, 对组大鼠踝关节拍照记录及足趾肿容积进行测量, 结果显示 GFD 可缓解 MSU 引起的关节红肿。GA 在病理上表现为滑膜的炎性增生, 通过 HE 染色观察各组大鼠踝关节滑膜炎性增生情况, 结果显示 GFD 可抑制 MSU 引起的滑膜炎性增生。TLR4 是 NF-κB 的上游受体, 可特异性识别病原体相关分子, NF-κB 是一种关键的核转录因子, 在调节促炎因子的产生中起着至关重要的作用, MUS 刺激 TLR4 过表达后介导 NF-κB 过表达, 从而诱发炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 等释放诱发炎症<sup>[17-18]</sup>。本研究通过免疫组化和 ELISA 实验发现, GFD 可抑制 GA 大鼠踝关节滑膜

中 TLR-4、NF- $\kappa$ B 的阳性表达, 并降低 GA 大鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  炎症因子的含量, 从而缓解了 GA 的炎症反应。

综上所述, GFD 可抑制 MSU 诱导的 GA 模型大鼠的关节炎症反应, 其作用机制可能与 TLR-4/NF- $\kappa$ B/TNF- $\alpha$  通路有关, 通过各种指标对比发现 GFD 中剂量疗效相对 GFD 低、高剂量组疗效更好。本研究为 GFD 的临床应用提供了实验基础, 但限于目前对 GFD 中有效成分的研究并不完全, 且介导 GA 炎症的信号通路繁多, 本实验初步揭示了部分作用机制, 还需进一步研究。

## 参考文献

- [1] 刘维. 痛风及高尿酸血症中西医结合诊疗指南[J]. 中医杂志, 2023, 64(1): 98-106.
- [2] Dalbeth N, Gosling AL, Gaffo A, et al. Gout[J]. Lancet, 2021, 397(10287): 1843-1855.
- [3] Dehlin M, Jacobsson L, Roddy E. Global epidemiology of gout: prevalence, incidence, treatment patterns and risk factors[J]. Nat Rev Rheumatol, 2020, 16(7): 380-390.
- [4] Shi C, Zhou Z, Chi XW, et al. Recent advances in gout drugs[J]. Eur J Med Chem, 2023, 245(Pt1): 114890.
- [5] 姜玉华, 张冰晗, 雷晶晶. 桂枝附子汤的临床应用和作用机制研究[J]. 世界中医药, 2024, 19(13): 1974-1978.
- [6] 谢志忠, 洪伟男, 刘爱维. 加味桂枝附子汤对急性痛风性关节炎寒湿痹阻型患者的临床疗效[J]. 中国医学创新, 2023, 20(28): 88-91.
- [7] 吴咏妍, 邱联群. 桂枝附子汤加味配合外用药治疗寒湿痹阻型痛风性关节炎疗效观察[J]. 广州中医药大学学报, 2019, 36(6): 796-800.
- [8] 黄英杰.《伤寒论》用药剂量及其相关问题的研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2007.
- [9] Wang XQ, Sheng YJ, Guan JQ, et al. Sanmiao wan alleviates inflammation and exhibits hypouricemic effect in an acute gouty arthritis rat model[J]. J Ethnopharmacol, 2024, 324: 117764.
- [10] 邓雍钲, 孟庆良, 马俊福. 痛风汤对急性痛风性关节炎模型大鼠踝关节滑膜组织中 NLRP3 炎症小体及 NETs 的影响[J]. 中医杂志, 2024, 65(17): 1816-1824.
- [11] Miquelstorena-standley E, Jourdan ML, Collin C, et al. Effect of decalcification protocols on immunohistochemistry and molecular analyses of bone samples[J]. Mod Pathol, 2020, 33(8): 1505-1517.
- [12] 朱婉华, 张爱红, 顾冬梅. 痛风性关节炎中医证候分布规律探讨[J]. 中医杂志, 2012, 53(19): 1667-1670.
- [13] 黄元御. 长沙药解(本草 44)[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 87.
- [14] 李雪, 赵婧含, 吴文轩. 桂枝的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中医药学报, 2023, 51(5): 111-114.
- [15] 林才渊, 夏天卫, 沈计荣. 附子治疗痹证的古今中医认识[J]. 中医药通报, 2024, 23(2): 56-59.
- [16] He GN, Wang XX, Liu WR, et al. Chemical constituents, pharmacological effects, toxicology, processing and compatibility of Fuzi (lateral root of *Aconitum carmichaelii* Debx): a review[J]. J Ethnopharmacol, 2023, 307: 116160.
- [17] Yi GL, Zhang RM, Li M, et al. Atractylenolide-III attenuates osteoarthritis by repolarizing macrophages through inactivating TLR4/NF- $\kappa$ B signaling[J]. Int Immunopharmacol, 2024, 129: 111629.
- [18] Chen BF, Li HM, Ou GC, et al. Curcumin attenuates MSU crystal-induced inflammation by inhibiting the degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  and blocking mitochondrial damage[J]. Arthritis Res Ther, 2019, 21(1): 193.

(收稿日期: 2025-01-12; 修回日期: 2025-02-25)

## 2-氨基-1, 3-二羟基正十八烷的合成工艺研究

杨静<sup>1, 2</sup>, 张苗<sup>1, 2</sup>, 徐虹<sup>1, 2</sup>, 张东东<sup>1, 2</sup>, 李玉泽<sup>1, 2</sup>, 黄文丽<sup>1, 2</sup>, 张化为<sup>1, 2</sup>, 邓翀<sup>1, 2</sup>, 宋小妹<sup>1, 2</sup>, 姜祎<sup>1, 2\*</sup> (1. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西省中药基础与新药研究重点实验室, 陕西 咸阳 712046)

**摘要:** **目的** 以正十六醛和 2-硝基乙醇为原料, 经亨利反应和还原反应合成鞘氨醇类似物 2-氨基-1, 3-二羟基正十八烷。**方法** 考察催化剂用量及种类、反应时间、投料顺序、温度及溶剂 5 个因素对亨利反应的影响, 探索不同还原方法对还原产物收率的影响, 优化 2-氨基-1, 3-二羟基正十八烷的合成工艺。利用核磁共振法 (NMR) 及气相色谱-质谱联用 (GC-MS)、傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) 鉴定化合物结构。**结果** 最佳合成工艺: 亨利反应中, 温度降至 10℃, 以三乙胺为催化剂、四氢呋喃为溶剂, 投料摩尔比为  $n$  (正十六醛):  $n$  (2-硝基乙醇):  $n$  (三乙胺) = 1: 1.1: 0.7, 正十六醛与 2-硝基乙醇置于三口烧瓶中, 滴加三乙胺, 收率达 80%; 还原反应中, 以锡-盐酸为还原剂, 常温下反应 8 h, 收率达 53%。**结论** 该工艺条件温和, 收率较高, 成本较低且操作简单, 本研究为鞘氨醇类似物的研究提供依据。

**关键词:** 鞘氨醇类似物; 亨利反应; 合成; 硝基还原; 优化

中图分类号: R914, TQ460.6 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)06-1563-05  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.010

### Synthesis of 2-aminooctadecane-1, 3-diol

YANG Jing<sup>1, 2</sup>, ZHANG Miao<sup>1, 2</sup>, XU Hong<sup>1, 2</sup>, ZHANG Dong-dong<sup>1, 2</sup>, LI Yu-ze<sup>1, 2</sup>, HUANG Wen-li<sup>1, 2</sup>, ZHANG Hua-wei<sup>1, 2</sup>, DENG Chong<sup>1, 2</sup>, SONG Xiao-mei<sup>1, 2</sup>, JIANG Yi<sup>1, 2\*</sup> (1. School of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712046; 2. Shaanxi Key Laboratory of Basic Chinese Medicine and New Drug Research, Xianyang Shaanxi 712046)

**Abstract: Objective** To synthesize 2-aminooctadecane-1, 3-diol by using hexadecanal and 2-nitroethanol as the starting materials after two reactions, namely the Henry reaction and the reduction. **Methods** The effect of various reaction parameters on the Henry reaction were systematically determined, including catalyst dosage and type, reaction time, feeding sequence, temperature, and solvent type. Additionally, the influence of different reduction methods on the reaction yield was also examined to ultimately optimize the synthesis of sphingosine analog 2-aminooctadecane-1, 3-diol. Structure of the compounds characterized with nuclear magnetic resonance (NMR), gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), and infrared spectroscopy (IR). **Results** The best synthesis process was as follows: in the Henry reaction, triethylamine was used as the catalyst and tetrahydrofuran as the solvent, and the molar ratio of starting materials was  $n$  ( $n$ -hexadecanal):  $n$  (2-nitroethanol):  $n$  (triethylamine) = 1: 1.1: 0.7;  $n$ -hexadecanal was placed in the triple-necked flask with 2-nitroethanol, then the temperature was lowered to 10℃, the triethylamine was added dropwise, and the yield reached 80%. While in the reaction, tin and hydrochloric acid were used as the reducing agents, the reaction was conducted at room temperature for 8 h, and the yield reached 53%. **Conclusion** The process conditions are simple and easy with high yield, cheap raw materials and easy operation, which provides support for the research of sphingosine analogs.

**Key words:** sphingosine analog; Henry reaction; synthesis; nitro-reduction; optimization

**基金项目:** 国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目 (编号: 304-174010324025); 陕西中医药大学校级项目 (编号: 604200002/303)。

**作者简介:** 杨静, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药提取分离分析技术与应用研究, email: 2405181221@qq.com \*通信作者: 姜祎, 男, 教授, 主要从事中药药效物质基础及小分子凝胶研究, email: 966812@qq.com



鞘氨醇及其衍生物统称鞘脂(见图1),其中神经酰胺、鞘氨醇和鞘氨醇-1-磷酸(sphingosine-1 phosphate, SIP)等鞘氨醇家族的代谢物参与细胞存活、细胞迁移、炎症等过程,具有重要的生物活性<sup>[1-2]</sup>,在癌症、动脉粥样硬化、糖尿病、血脂异常、免疫系统疾病等方面具有特异性抑制作用<sup>[3-5]</sup>。另外,人工半合成的神经酰胺类似物C2神经酰胺在治疗神经炎性疾病<sup>[6]</sup>、黑色素瘤<sup>[7]</sup>、宫颈癌及神经退行性疾病等疾病具有一定的潜力<sup>[8-9]</sup>。

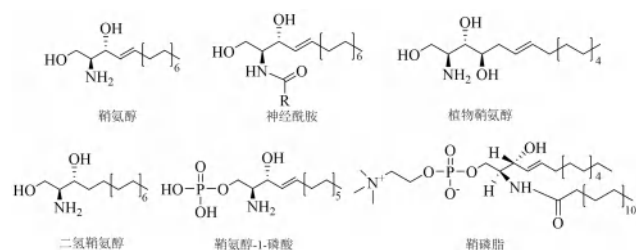


图1 鞘氨醇及其类似物的结构式

Fig 1 Structures of sphingosine and its analogs

鞘氨醇类化合物含量低、分离困难、价格高昂,这也促进了其合成方法的研究。例如,以酚类或硫醇类化合物为原料合成鞘氨醇类似物需要多步反应,在碱性条件下与甲苯磺酸酯3经缩合反应得到衍生物后进行脱保护反应得到氨基醇中间体,经磷酸化反应后对磷酸酯中间体进行去保护反应最终得到目标产物;从D-葡萄糖合成不对称取代的鞘氨醇也需要10步反应,涉及保护基团的引入、还原、氧化和酯化、Ferrier重排等,合成路线长,总收率低<sup>[10-11]</sup>;鞘氨醇类似物2-氨基-1,3-二羟基正十八烷的现有研究较少,主要关注手性问题<sup>[12-14]</sup>,筛选不同金属配合物的手性催化效果,然而其亨利反应(Henry reaction,又称硝基醇反应)条件较为严苛,需在-40℃反应6.8 d,时间较长。C2神经酰胺是人工半合成的神经酰胺类似物<sup>[15]</sup>,生物合成方法也用于该类化合物的合成<sup>[16-17]</sup>,但存在成本高、产率低的缺点。因此优化鞘氨醇类似物的合成工艺,降低成本有助于促进该类化合物的系统研究。

亨利反应是硝基烷烃和羰基的偶联反应,其产物具有β-硝基醇结构单元,结合还原反应将硝基还原成氨基可用于鞘氨醇类化合物的合成<sup>[18]</sup>。自亨利反应提出以来<sup>[19-21]</sup>,其催化剂方面的研究包括金属配体催化剂、有机碱、无机碱或季铵盐对反应的催化效果,但金属配体催化剂价格高,故本次实验主要筛选常见的有机碱和无机碱用于亨利反应。

本研究以价格低廉易得的正十六醛与硝基乙醇为原料,经亨利反应和还原反应,合成鞘氨醇类似物2-氨基-1,3-二羟基正十八烷。考察催化剂用量及种类、反应时间、投料顺序、温度及溶剂因素对反应的影响,以优化亨利反应条件;探索水合肼、硼氢化钠、钨/碳-硼氢化钠、硼氢化钠-碘、硫化钠、吡啶硼烷、氯化亚锡、锌-甲酸、锌-盐酸、锡-甲酸及锡-盐酸等11种还原方法,筛选还原剂,建立高效便捷、易于操作的鞘氨醇类化合物合成工艺条件,并探讨还原反应机制。目标化合物合成路线见图2。

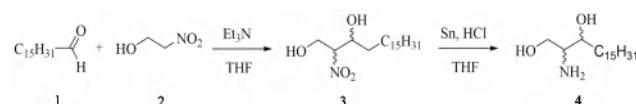


图2 2-氨基-1,3-二羟基十八烷的合成路线

Fig 2 Synthesis of 2-amino-1,3-dihydroxyoctadecane-1,3-diol

## 1 仪器与试剂

Bruker AV 400 instrument 核磁共振波谱仪(CDCl<sub>3</sub>为溶剂,TMS为内标)、FT-IR t-27 傅里叶变换红外光谱仪(KBr压片)(布鲁克仪器公司);Agilent 5977B GC/MS 气质联用仪(美国安捷伦公司)。

正十六醛、正壬醛、四甲基乙二胺、四甲基胍(AR,安徽泽生科技股份有限公司);2-硝基乙醇(AR,上海泰坦科技股份有限公司);乙醇钠、三乙胺、二氯甲烷(DCM)、甲醇、石油醚(60~90℃)、乙酸乙酯、四氢呋喃(THF)、无水硫酸镁(AR,天津天力化学试剂有限公司);柱层析硅胶(100~200目,青岛鑫昶来硅胶有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 化合物3的合成

氮气保护下,将正十六醛(5.00 g, 20.83 mmol)、2-硝基乙醇(2.09 g, 22.92 mmol),四氢呋喃(15 mL),加入三口烧瓶中,降至10℃缓慢滴加三乙胺(1.47 g, 14.58 mmol)的THF溶液(5 mL),待滴完后在室温下继续反应4 d,薄层色谱法(TLC)监测反应,反应结束后常温减压除去溶剂,水洗后进行硅胶柱层析分离, $V_{\text{石油醚}}:V_{\text{乙酸乙酯}}=4:1$ 洗脱,得到化合物3,收率80%。

### 2.2 目标化合物4的合成

氮气保护,室温条件,将化合物3(1.00 g, 3.021 mmol)、锡(2.14 g, 18.13 mmol)加入三口烧瓶,加入 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{盐酸}}=2:1$ 的溶液10 mL,TLC监测反应,反应8 h左右,反应结束后加入碳酸钠溶液将体系pH调至12,过滤后回收溶剂,

经硅胶柱色谱分离,  $V_{\text{二氯甲烷}}:V_{\text{甲醇}}=10:1$  洗脱, 得到化合物 **4**, 收率 53%。

### 2.3 化合物的表征

化合物 **3**: 淡黄色固体,  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 4.62 ~ 4.49 (m, 1H), 4.33 ~ 4.02 (m, 3H), 2.45 ~ 1.90 (m, 1H), 1.66 ~ 1.56 (m, 1H), 1.24 (s, 26H), 0.86 (t,  $J=6.7$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 92.33, 90.91, 71.62, 70.41, 61.85, 60.40, 33.95, 33.66, 32.00, 29.75, 29.57, 29.35, 25.67, 25.37, 22.77, 14.23; FT-IR ( $\text{cm}^{-1}$ , KBr) 3404, 2921, 2847, 1716, 1552。

化合物 **4**: 白色固体,  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.73 ~ 3.64 (m, 2H), 3.63 ~ 3.43 (m, 2H), 2.85 ~ 2.71 (m, 1H), 1.56 ~ 1.41 (m, 4H), 1.37 ~ 1.29 (m, 7H), 1.28 (s, 18H), 0.95 ~ 0.85 (t,  $J=6.6$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 74.96, 72.64, 65.68, 63.87, 55.73, 34.53, 33.86, 32.01, 29.78, 29.70, 29.45, 22.77, 14.20; FT-IR ( $\text{cm}^{-1}$ , KBr) 3359, 3148, 3047, 2915, 2847。

## 3 结果与讨论

### 3.1 化合物 **3** 结构的表征

化合物 **3** 和化合物 **4** 的化学结构经 NMR、MS 及 IR 鉴定, 化合物 **3** 和 **4** 的结构中有 3 个碳原子与氧原子、氮原子相连, 其化学位移在 50 ~ 95, 化合物 **3** 的  $^{13}\text{C}$  NMR 中在此范围出现 3 对共 6 个碳信号峰, 化合物 **4** 在此范围出现 5 个碳信号峰, 多出的碳信号峰与结构中的 2、3 位的手性碳原子有关, 由于手性的原因导致不同手性结构的碳原子信号具有不同的化学位移。化合物 **3** 的 MS 中未出现分子离子峰, 其最大的  $m/z$  为 240.3, 其裂解途径可能为热脱水脱去 3 位羟基, 经硝基重排后, 裂解得  $m/z$  240 的碎片; 其基峰为 82, 裂解途径可能为先热脱水脱去 1、3 位羟基, 再经硝基重排后经二次裂解得到  $m/z$  82、96、110、124、138、152、166、194、222 等离子碎片 (见图 3)。

### 3.2 化合物 **3** 的合成工艺优化

合成工艺中考察了催化剂用量及种类、投料顺序、温度及溶剂 5 个因素对化合物 **3** 收率的影响。首先考察三乙胺的用量对收率的影响, 结果见图 4A, 反应时间为 4 d 时, 三乙胺投料比为 0.7 时收率达 80%; 以正壬醛为原料时, 三乙胺投料比为 0.4、反应时间 4 d 时反应收率达到

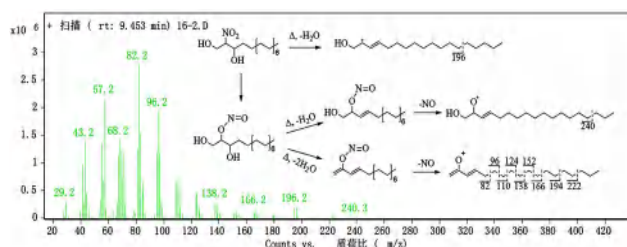


图 3 化合物 **3** 的质谱图

Fig 3 Mass spectra of compound **3**

78%, 相同情况下, 正十六醛参与的反应收率仅为 40% (见图 4B), 因此可见脂肪醛中的烷基链越长, 三乙胺用量越大。三乙胺为催化剂收率可达 80%, 而氢氧化钠、乙醇钠、四甲基乙二胺、四甲基胍作为催化剂时最高收率仅为 62% (见图 4C), 另外实验中发现催化剂碱性较强时反应副产物增多, 因此并未探索如二环醚 (DBU) 等此类有机强碱的催化效果。投料顺序也影响反应的时间和收率, 正十六醛与 2-硝基乙醇置于三口烧瓶中, 滴加三乙胺时, 反应收率高。实验中探索 10℃、室温、30℃、40℃ 对亨利反应的影响, 结果表明: 10℃ 加入三乙胺, 自然升温继续反应, 收率高、副产物少。溶剂对反应收率也有重要影响, THF、乙醇 (EtOH)、DCM 常作为亨利反应的溶剂, 本研究发现溶剂为 THF 时收率最高, 为 80%, 结果见图 4D。

综上, 亨利反应最佳条件: 氮气保护, 正十六醛、2-硝基乙醇、三乙胺的投料摩尔比为 1:1.1:0.7, 正十六醛与 2-硝基乙醇溶于 THF 中, 降温至 10℃ 后, 滴加三乙胺, 自然升温继续反应 4 d。

### 3.3 化合物 **4** 的合成工艺优化

化合物 **4** 的合成中, 筛选钨/碳-水合肼、硼氢化钠、钨/碳-硼氢化钠、硼氢化钠-碘、硫化钠、吡啶硼烷、氯化亚锡、锌-甲酸、锌-盐酸、锡-甲酸及锡-盐酸等 11 种还原剂还原硝基<sup>[22-25]</sup>。结果如图 5 所示, 以水合肼、硼氢化钠、硫化钠及吡啶硼烷为还原剂, 转化率较低, 收率均不足 40%; 在硼氢化钠还原法的基础上分别联合钨/碳、碘进行实验, 转化率未显著提升; 氯化亚锡作为还原剂时, 65℃ 条件反应 6 h, 收率为 47%; 锌-盐酸作为常用的还原剂, 合成化合物 **4** 的收率为 52%; 尝试锡-盐酸作为还原剂发现此法反应 8 h, 收率为 53%, 与锌-盐酸相当, 因锡的成本更低, 最终选择还原剂为锡-盐酸。

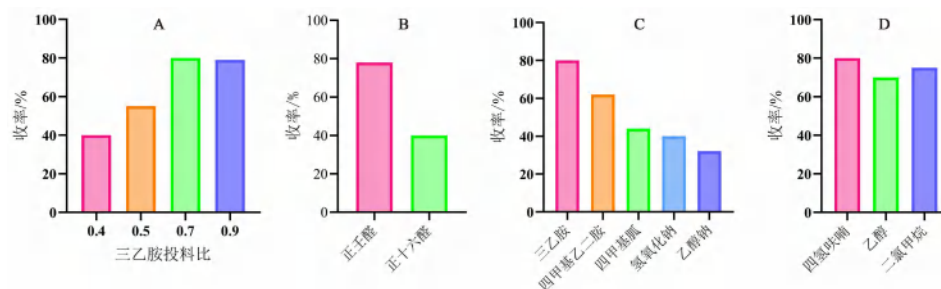


图4 Henry反应中催化剂用量(A)及种类(C)、烷基链长度(B)、溶剂(D)对化合物3收率的影响

Fig 4 Effect of catalyst dosage (A) and type (C), alkyl chain length (B) and solvent (D) on compound 3 yield in Henry reaction

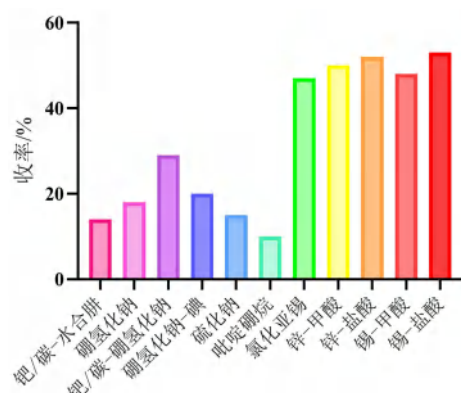


图5 还原反应中还原剂对化合物4收率的影响

Fig 5 Effect of reducing agents on compound 4 yield in reduction reaction

锡-盐酸体系应用较少,但在化合物3的合成中,锡-盐酸的还原效果更好,由于目前锡-盐

酸还原硝基化合物的相关研究较少,因此推断锡-盐酸还原硝基的潜在反应机制,如图6所示。

硝基加氢后形成中间体1,为验证此反应机制,利用GC-MS测试反应液,结果显示,中间体1可能的裂解途径包括:①3位脱水后,脱去硝基经二次裂解得  $m/z$  152、196、224的碎片,②1、3位脱水,脱去羟基经二次裂解得到  $m/z$  83、97、111、125的碎片(见图7)。

#### 4 结论

本研究优化亨利反应和硝基还原条件,合成鞘氨醇类似物2-氨基-1,3-二羟基正十八烷,化合物总收率达42.4%,该工艺反应条件温和、操作简单、原料价廉、收率高,后续将探索其手性拆分方法,为进一步研究提供依据。

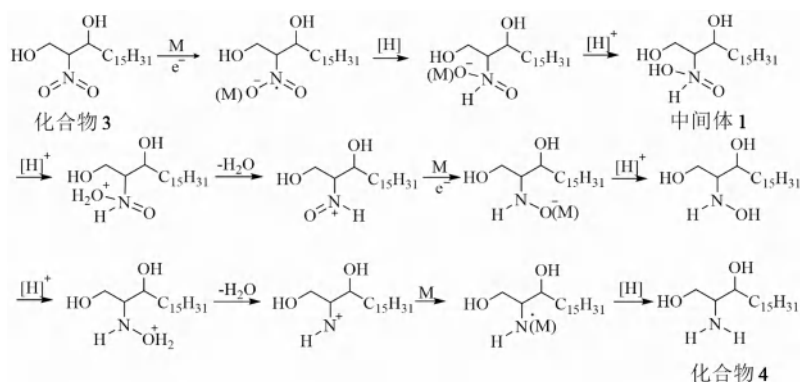


图6 化合物3~4还原反应机制推断

Fig 6 Synthetic reduction reaction mechanism deduced for compounds 3 ~ 4

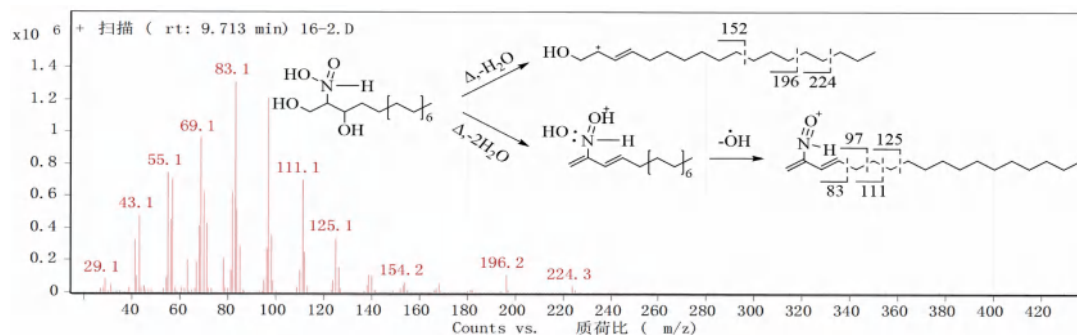


图7 中间体1的质谱图

Fig 7 Mass spectra of the intermediate product 1



## 参考文献

- [1] Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9 (2): 139-150.
- [2] Jamil M, Cowart LA. Sphingolipids in mitochondria-from function to disease [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 11: 1302472.
- [3] Hannun YA, Bell RM. Lysosphingolipids inhibit protein kinase C: implications for the sphingolipidoses [J]. *Science*, 1987, 235 (4789): 670-674.
- [4] Newton AC. Protein kinase C: perfectly balanced [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2018, 53 (2): 208-230.
- [5] Meeusen JW, Donato LJ, Bryant SC, et al. Plasma ceramides: a novel predictor of major adverse cardiovascular events after coronary angiography [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38 (8): 1933-1939.
- [6] Jung JS, Shin KO, Lee YM, et al. Anti-inflammatory mechanism of exogenous C2 ceramide in lipopolysaccharide-stimulated microglia [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1831 (6): 1016-1026.
- [7] Ghosh S, Juin SK, Nandi P, et al. PKC $\zeta$  mediated anti-proliferative effect of C2 ceramide on neutralization of the tumor microenvironment and melanoma regression [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2020, 69 (4): 611-627.
- [8] Vogelsang T, Kast V, Bagnjuk K, et al. RIPK1 and RIPK3 are positive prognosticators for cervical cancer patients and C2 ceramide can inhibit tumor cell proliferation in vitro [J]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1110939.
- [9] Jung J, Choi M, Ko H, et al. Short-chain C2 ceramide induces heme oxygenase-1 expression by upregulating AMPK and MAPK signaling pathways in rat primary astrocytes [J]. *Neurochem Int*, 2016, 94: 39-47.
- [10] Grijalvo S, Llebaria A, Delgado A. Straightforward access to simplified sphingosine-1-phosphate analogues [J]. *Synthetic commun*, 2007, 37 (16): 2737-2751.
- [11] Rodriguez J, Walczak MA. Synthesis of asymmetrically substituted scyllo-inositol [J]. *Tetrahedron Lett*, 2016, 57 (30): 3281-3283.
- [12] Sasai H, Tokunaga T, Watanabe S, et al. Efficient diastereoselective and enantioselective nitroaldol reactions from prochiral starting materials: utilization of La-Li-6, 6'-Disubstituted BINOL complexes as asymmetric catalysts [J]. *J Org Chem*, 1995, 60 (23): 7388-7389.
- [13] Qin DD, Yu W, Zhou JD, et al. Syn- and enantioselective Henry reactions of aliphatic aldehydes and application to the synthesis of Safingol [J]. *Chem Eur J*, 2013, 19 (49): 16541-16544.
- [14] Zhang LH, Oniciu DC, Pop E, et al. A practical synthesis of L-threo-dihydrosphingosine (safingol), an antineoplastic and antipsoriatic agent [J]. *ARKIVOC*, 2005, 2005 (10): 285-291.
- [15] Huber T, Manzenrieder F, Kuttruff CA, et al. Prolonged stability by cyclization: macrocyclic phosphino dipeptide isostere inhibitors of  $\beta$ -secretase (BACE1) [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19 (15): 4427-4431.
- [16] Kol M, Williams B, Toombs-Ruane H, et al. Optical manipulation of sphingolipid biosynthesis using photoswitchable ceramides [J]. *eLife*, 2019, 8: e43230.
- [17] Sribney M. Enzymatic synthesis of ceramide [J]. *BBA-Lipid Lipid Met*, 1966, 125 (3): 542-547.
- [18] Zhang S, Li Y, Xu Y, et al. Recent progress in copper catalyzed asymmetric Henry reaction [J]. *Chin Chem Lett*, 2018, 29 (6): 873-883.
- [19] Singh N, Pandey J. Advances in Henry reaction: a versatile method in organic synthesis [Z]. 2020: 17, 297-308.
- [20] Kumpulainen T, Qian J, Brouwer AM. Spectroscopic study of a cinchona alkaloid-catalyzed Henry reaction [J]. *ACS Omega*, 2018, 3 (2): 1871-1880.
- [21] 程小燕. 羧酸类过渡金属配合物的合成、结构及催化性能研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2023.
- [22] Orlandi M, Brenna D, Harms R, et al. Recent developments in the reduction of aromatic and aliphatic nitro compounds to amines [J]. *Org Process Res Dev*, 2018, 22 (4): 430-445.
- [23] 何威威, 金宁人, 陈汉庚, 等. 4, 5-二氨基-2-羟基苯甲酸的合成工艺 [J]. *化工进展*, 2017, 36 (3): 1059-1066.
- [24] 熊需海, 刘东辉, 任荣, 等. 含氰基和 Cardo 侧基马来酰亚胺封端聚醚酰亚胺的合成与性能 [J]. *高分子材料科学与工程*, 2023, 39 (11): 34-43.
- [25] 项晓青, 朱兆璋, 刘旦初. 钨碳催化剂在硝基还原和碳碳双键加氢反应中的应用 [J]. *复旦学报 (自然科学版)*, 1997, 36 (1): 8-14.

(收稿日期: 2024-12-26; 修回日期: 2025-03-06)

# 血小板反应蛋白 2 调控骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的研究

陈文婕<sup>1</sup>, 陈雲<sup>1</sup>, 王娇娇<sup>1</sup>, 郑绮玥<sup>1</sup>, 陈雅君<sup>1, 2</sup>, 周钊凯<sup>1, 3</sup>, 贺洁宇<sup>4</sup>, 鲁琼<sup>1\*</sup> (1. 中南大学湘雅二医院药学部, 长沙 410011; 2. 广州中医药大学中药学院, 广州 510006; 3. 郑州大学第一附属医院泌尿外科, 郑州 450052; 4. 中南大学湘雅二医院老年医学科, 长沙 410011)

**摘要:** **目的** 探究血小板反应蛋白 2 (THBS2) 调控骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 向成骨细胞或脂肪细胞分化的机制。**方法** 采用不同质量浓度 THBS2 (0、25、50、100 ng · mL<sup>-1</sup>) 干预 BMSCs 并观察其向成骨细胞或脂肪细胞分化的情况。通过茜素红染色和油红 O 染色观察 THBS2 对 BMSCs 向成骨细胞或脂肪细胞分化的影响。通过 RT-qPCR 检测 BMSCs 中成脂、成骨基因 mRNA 的表达情况。通过生物信息学分析筛选 THBS2 蛋白作用的下游靶标。**结果** THBS2 干预 BMSCs 成骨诱导后, 与 0 ng · mL<sup>-1</sup> THBS2 组相比, 25、50、100 ng · mL<sup>-1</sup> THBS2 组茜素红染色钙化结节明显增加; 25、50、100 ng · mL<sup>-1</sup> THBS2 组的成骨相关基因 *RUNX2*、*ALP*、*Osterix*、*BSP* 的 mRNA 的表达明显上调; THBS2 干预 BMSCs 成脂诱导后, 与 0 ng · mL<sup>-1</sup> 组相比, 100 ng · mL<sup>-1</sup> THBS2 组油红 O 染色显示脂滴明显减少, 成脂相关基因 *PPARγ*、*C/EBPα* 和 *LPL* 的 mRNA 表达明显下调; 通过生物信息学分析确定了 THBS2 成骨抑脂的作用可能与蛋白 CD36 相关, 并验证了 THBS2 干预成脂诱导的 BMSCs 中 *CD36* 的 mRNA 表达量下调。**结论** THBS2 可以促进 BMSCs 向成骨细胞分化, 抑制其向脂肪细胞分化, THBS2 对于 BMSCs 分化的调控可能与 CD36 等相关。

**关键词:** 骨髓间充质干细胞; 血管成骨耦合; 骨质疏松症; 血小板反应蛋白 2

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)06-1568-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.011

## Thrombospondin-2 regulates the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into osteoblasts

CHEN Wen-jie<sup>1</sup>, CHEN Yun<sup>1</sup>, WANG Jiao-jiao<sup>1</sup>, ZHENG Qi-yue<sup>1</sup>, CHEN Ya-jun<sup>1, 2</sup>, ZHOU Zhao-kai<sup>1, 3</sup>, HE Jie-yu<sup>4</sup>, LU Qiong<sup>1\*</sup> (1. Department of Pharmacy, The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011; 2. College of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006; 3. Department of Urology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052; 4. Department of Geriatrics, The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011)

**Abstract: Objective** To determine the mechanism of thrombospondin 2 (THBS2) in the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) into osteoblasts or adipocytes. **Methods** BMSCs were treated with different concentrations of THBS2 (0, 25, 50, and 100 ng · mL<sup>-1</sup>), and the effect of THBS2 on the differentiation of BMSCs was observed. Alizarin red staining and oil red O staining were used to observe the impact of THBS2 on the differentiation of BMSCs into osteoblasts or adipocytes. RT-qPCR was used to detect the mRNA expression of adipogenic and osteogenic genes in BMSCs. Bioinformatics analysis was used to screen the downstream targets of the THBS2 protein. **Results** After

**基金项目:** 湖南省自然科学基金面上项目 (No.2024JJ5494); 长沙市自然科学基金面上项目 (No.Kq2403094); 湖南省财政厅科研项目 (No.2022-151, No.2021-139)。

**作者简介:** 陈文婕, 女, 在读硕士研究生, 主要从事临床药学、代谢性疾病药理学研究, email: chenwenjie0002022@163.com

**\*通信作者:** 鲁琼, 女, 硕士研究生导师, 主要从事临床药学、衰老相关代谢性疾病机制及药理学研究, email: christy\_luq@csu.edu.cn

osteogenic induction of BMSCs with THBS2 intervention, Alizarin red staining showed that the number of calcified nodules in the 25, 50, 100 ng · mL<sup>-1</sup> THBS2 groups significantly increased compared with that in the 0 ng · mL<sup>-1</sup> THBS2 group. The mRNA expression of osteoblast-related genes *RUNX2*, *ALP*, *Osterix* and *BSP* was significantly up-regulated in the 25, 50, 100 ng · mL<sup>-1</sup> THBS2 groups. Compared with the 0 ng · mL<sup>-1</sup> THBS2 group, the lipid droplets of the 100 ng · mL<sup>-1</sup> THBS2 group were significantly reduced and down-regulated the mRNA expressions of adipogenic genes *PPARγ*, *C/EBPα*, and *LPL* after adipogenic induction of BMSCs with THBS2 intervention. Bioinformatics analysis confirmed that the effect of THBS2 on the differentiation of BMSCs into osteoblasts or adipocytes may be related to CD36. RT-qPCR confirmed that the mRNA expression of *CD36* in BMSCs treated with THBS2 was down-regulated. **Conclusion** THBS2 can promote the differentiation of BMSCs into osteoblasts but inhibit the differentiation of BMSCs into adipocytes. The regulation of THBS2 on the differentiation of BMSCs may be related to CD36.

**Key words:** bone marrow mesenchymal stem cells; vascular osteogenesis coupling; osteoporosis; thrombospondin 2

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是一种全身性骨骼疾病, 其特征是骨量低和骨组织微结构恶化, 进而导致骨脆性增加, 骨折风险增大<sup>[1]</sup>。随着年龄的增加老年人骨质流失逐渐加快, 骨质疏松症的发病率逐年增高<sup>[2]</sup>, 其医疗卫生成本也在逐年增加<sup>[3]</sup>。研究表明, 随着年龄的增长, 骨髓中的脂肪生成增多, 并且这些变化与骨小梁体积成负相关<sup>[4]</sup>。骨髓成骨细胞和骨髓脂肪细胞都是由骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 分化而来, 衰老、雌激素缺乏等都可以导致 BMSCs 向骨髓脂肪细胞分化数量增加, 向成骨细胞分化数量减少, 从而加速骨质疏松的发生和骨丢失<sup>[5]</sup>, 因此促进 BMSCs 向成骨细胞分化, 抑制其向脂肪细胞分化成为骨质疏松症治疗的新策略<sup>[6]</sup>。

骨是一种高度血管化的组织, 骨血管可以为骨骼的生长发育提供营养物质与氧气<sup>[7]</sup>。血管内皮细胞 (VECs) 与成骨细胞可以通过一系列复杂的信号相互作用, 成骨细胞分泌血管生成因子以促进血管生长, 而内皮细胞释放血管分泌信号以调节骨骼重塑和修复<sup>[8]</sup>, 但 BMSCs 与 VECs 相互作用的具体机制尚不清楚, 外泌体的引入为揭示两者之间关系的研究提供了新的视角。

本课题组此前成功分离了人微血管内皮细胞 (HMEC-1) 来源的外泌体 EC-EXOs, 并证明了该外泌体具有促进 BMSCs 向成骨细胞分化, 并抑制其向脂肪细胞分化的作用, 通过体内实验进一步验证了 EC-EXOs 改善骨质疏松的功能<sup>[9]</sup>。在此基础上, 我们将 HMEC-1 的样本和 HMEC-1 的培养上清液进行蛋白质组学测序与生物信息学分析, 筛选 EC-EXOs 与 HMEC-1 之间的差异蛋白, 发现在 EC-

EXOs 中血小板反应蛋白 3 (THBS3) 的表达量明显上调, 可能是 EC-EXOs 促进 BMSCs 向成骨细胞分化, 抑制 BMSCs 向脂肪细胞分化作用的关键蛋白<sup>[9]</sup>。

血小板反应蛋白 (thrombospondin, THBS) 家族是一组在进化上高度保守的钙结合糖蛋白, 通过多种途径与其他细胞外基质成分相互作用<sup>[10]</sup>, 参与细胞间相互作用、细胞外基质组织、血管生成、突触形成、组织重塑以及肌肉骨骼和心血管功能的调控<sup>[11]</sup>, 而血小板反应蛋白 2 (THBS2) 作为 THBS3 的同源蛋白, 已有相关临床研究表明其与人类椎间盘退变相关<sup>[12]</sup>, 但目前对于 THBS2 在调控 BMSCs 成骨成脂分化中的作用及其机制尚未见报道。

因此, 本研究主要目的为探究 THBS2 对于 BMSCs 成骨成脂分化的影响, 并通过生物信息学分析 THBS2 作用于 BMSCs 的潜在靶点。

## 1 材料

### 1.1 细胞

小鼠骨髓间充质干细胞 BMSCs, 提取于 21 ~ 28 d 的 C57BL/6 小鼠 [河南斯克贝斯生物科技股份有限公司, 生产许可证: SCXK (湘) 2022-0012]。本研究已通过中南大学湘雅二医院实验动物福利伦理审查, 批件号为 20230780。

### 1.2 试剂

胎牛血清 (FBS, 赛澳美细胞技术有限公司), 青霉素链霉素溶液 (苏州海星生物技术有限公司), 抗坏血酸、地塞米松、吡哆美辛、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX)、β-甘油磷酸 (BGP) (Sigma-Aldrich), α-MEM 培养基、重组人胰岛素溶液、0.25% EDTA 胰蛋白酶溶液、磷酸盐缓冲液 (PBS)



(武汉普诺赛生命科技有限公司), 油红 O 染液、茜素红染液 (苏州海星生物技术有限公司), Trizol 试剂 (杭州新景生物试剂开发有限公司), 逆转录试剂盒 (诺唯赞生物科技股份有限公司), 异丙醇 (安徽金粤冠新材料科技有限公司), DEPC 水、4% 多聚甲醛溶液 (Biosharp)。

1.3 仪器

生物安全柜、CO<sub>2</sub> 细胞培养箱、PCR 扩增仪、实时荧光定量 PCR 仪 (Thermo Fisher Scientific), 倒置显微镜 (Olympus)。

2 方法

2.1 细胞培养

取 7.5 mL 的胎牛血清、500 μL 的青霉素链霉素溶液、42 mL 的 α-MEM 培养基, 制备 BMSCs 完全培养基。取 4 只 21 ~ 28 d 的 C57BL/6 小鼠脱颈处死, 剥离股骨和胫骨, 浸泡在 α-MEM 中移入生物安全柜, 剪去股骨胫骨两端, 用 α-MEM 冲洗骨髓腔, 收集细胞悬液, 1000 r · min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 弃上清液, 获得 BMSCs 细胞沉淀。用 BMSCs 完全培养基将细胞沉淀重悬, 分别种入 4 个直径 6 cm 的细胞培养皿中, 放置在 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中, 连续 3 d 每日换液, 待细胞传代至第 3 代后进行冻存和后续实验。

2.2 BMSCs 成骨诱导

在 50 mL 的 BMSCs 完全培养基中依次加入 50 μL 抗坏血酸溶液 (0.05 mmol · L<sup>-1</sup>)、5 μL 地塞米松溶液 (1 μmol · L<sup>-1</sup>)、500 μL β-甘油磷酸 (10 mmol · L<sup>-1</sup>), 制备 BMSCs 成骨诱导培养基。

将生长状态良好的 BMSCs 均匀接种在六孔板中, 每孔加入 2 mL 完全培养基待细胞密度达到 50% 左右时, 弃去完全培养基, 每孔加入 2 mL 成骨诱导培养基和不同质量浓度的 (0、25、50、100 ng · mL<sup>-1</sup>) THBS2, 每隔 2 d 换液。诱导 7 d 以上时, 提取细胞 RNA 用于 RT-qPCR 实验; 诱导 21 d 以上, 显微镜下观察可见明显的矿化结节时, 使用 2% 茜素红染料染色。

2.3 BMSCs 成脂诱导

在 50 mL 的 BMSCs 完全培养基中依次加入 50 μL 抗坏血酸溶液 (0.05 mmol · L<sup>-1</sup>)、50 μL 地塞米松溶液 (1 μmol · L<sup>-1</sup>)、10 μL 吡哆美辛 (50 μmol · L<sup>-1</sup>)、125 μL 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (0.5 mmol · L<sup>-1</sup>)、62.5 μL 胰岛素溶液 (5 μg · mL<sup>-1</sup>), 制备 BMSCs 成脂诱导培养基。

将生长状态良好的 BMSCs 均匀接种在六孔板中, 每孔加入 2 mL 完全培养基待细胞密度达到

90% ~ 100% 时, 弃去完全培养基, 每孔加入 2 mL 的成脂诱导培养基和 100 ng · mL<sup>-1</sup> THBS2, 每隔 3 d 换液。诱导 7 d 以上, 提取细胞 RNA 用于 RT-qPCR 实验; 诱导 14 d 以上, 显微镜下观察可见明显的脂滴时, 使用油红 O 染料染色并拍照。

2.4 RT-qPCR 检测相关基因 mRNA 的表达

弃去六孔板中培养基, 用 PBS 冲洗两次, 每孔加入 1 mL 的 Trizol 试剂裂解, 将裂解后的液体吸入 EP 管中静置 5 min, 在每个管中加入 200 μL 的氯仿上下颠倒, 静置 5 min, 4 °C、12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 取 400 μL 的上清液与 500 μL 的异丙醇混合沉淀 RNA, 室温静置 10 min, 4 °C、12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 弃上清液, 加入 1 mL 75% 乙醇洗涤沉淀, 4 °C、7500 r · min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 弃上清液, 倒置晾干, 加入适量的 DEPC 水, 根据逆转录试剂盒的要求合成 cDNA, 使用 SYBR Green 染料法进行 RT-qPCR 分析, 使用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算 ALP、RUNX2、Osterix、BSP、PPARγ、C/EBPα、LPL 和 CD36 的 mRNA 的相对表达量。具体引物序列见表 1。

表 1 相关基因引物序列

| Tab 1 Sequence of related gene primers |                               |
|----------------------------------------|-------------------------------|
| 基因                                     | 引物序列 (5' to 3')               |
| β-actin                                | F: GGCTGTATTCCTCCATCG         |
|                                        | R: CCAGTTGGTAACAATGCCATGT     |
| RUNX2                                  | F: ATGCTTCATTCGCCTCACAAA      |
|                                        | R: GCACTCACTGACTCGGTTGG       |
| ALP                                    | F: CCCCATGTGATGGCGTAT         |
|                                        | R: CGGTAGGGAGAGCACAGC         |
| Osterix                                | F: CTACCCATCTGACTTTTGCTC      |
|                                        | R: CACTATTTCCCACTGCCTT        |
| BSP                                    | F: AATGGAGACGGCGATAGTTCCG     |
|                                        | R: GGAAAGTGTGGAGTTCTCTGCC     |
| CD36                                   | F: CGATTAACATAAGTAAAGTTGCCATA |
|                                        | R: CGCAGTGACTTTCCCAATAGGAC    |
| LPL                                    | F: AAGAAGCAGCAAAATGTACCTGAAG  |
|                                        | R: CCTGATTGGTATGGGTTTCACTC    |
| PPARγ                                  | F: ATGGTTGACACAGAGATGC        |
|                                        | R: GAATGCGAGTGGTCTTCC         |
| C/EBPα                                 | F: TGGACAAGAACAGCAACGAG       |
|                                        | R: TCACTGGTCAACTCCAGCAC       |

2.5 油红 O 染色

BMSCs 成脂诱导 14 d 后进行油红 O 染色, 具体操作如下: 吸走细胞培养基, 用 PBS 冲洗 1 ~ 2 次, 每孔加入 2 mL 的 4% 多聚甲醛溶液固定 30 min, 油红 O 储存液和蒸馏水 3 : 2 混合, 混匀后用中性滤纸过滤即得, 吸走六孔板内 4% 多聚甲醛溶液, 用 PBS 洗两次, 每孔加入 1 mL

的油红 O 染液，避光静置 30 min，吸走油红 O 染液，用 PBS 洗两次，每孔加入 2 mL 的含青霉素链霉素溶液的 PBS，于显微镜下拍照。

## 2.6 茜素红染色

BMSCs 成骨诱导 21 d 后进行茜素红染色，具体操作如下：吸走细胞培养基，用 PBS 冲洗 1~2 次，每孔加入 2 mL 的 4% 多聚甲醛溶液固定 30 min，吸走六孔板内 4% 多聚甲醛溶液，用 PBS 洗两次，每孔加入 1 mL 的茜素红染液，静置 3~5 min，吸走茜素红染液，用 PBS 洗两次，每孔加入 2 mL 的含青霉素链霉素溶液的 PBS，于显微镜下拍照。

## 2.7 生物信息学分析方法

使用 STRING 数据库构建蛋白质相互作用 (PPI) 网络，确定交互蛋白。基因本体 (GO) 分析蛋白的分子功能、细胞组分以及生物过程，筛选前 10 个最相关量均上调 (见图 1B)。

相关的分子功能、细胞组分以及生物过程进行可视化展示结果，使用 KEGG 通路富集分析，筛选与蛋白相关性最高的前 10 条通路进行可视化展示结果。

## 2.8 统计分析

采用 GraphPad Prism 8.0 完成统计分析并作图，两独立样本采用 *t* 检验， $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 THBS2 促进 BMSCs 向成骨细胞分化

茜素红染色结果显示，与  $0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  THBS2 组相比，25、50、100  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  THBS2 处理的 BMSCs 细胞在成骨诱导 21 d 后产生的矿化结节明显增多 (见图 1A)。RT-qPCR 的结果表明，成骨诱导 7 d 的 25、50、100  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  THBS2 处理的 BMSCs 中，成骨相关基因 *ALP*、*RUNX2*、*Osterix* 与 *BSP* 的 mRNA 表

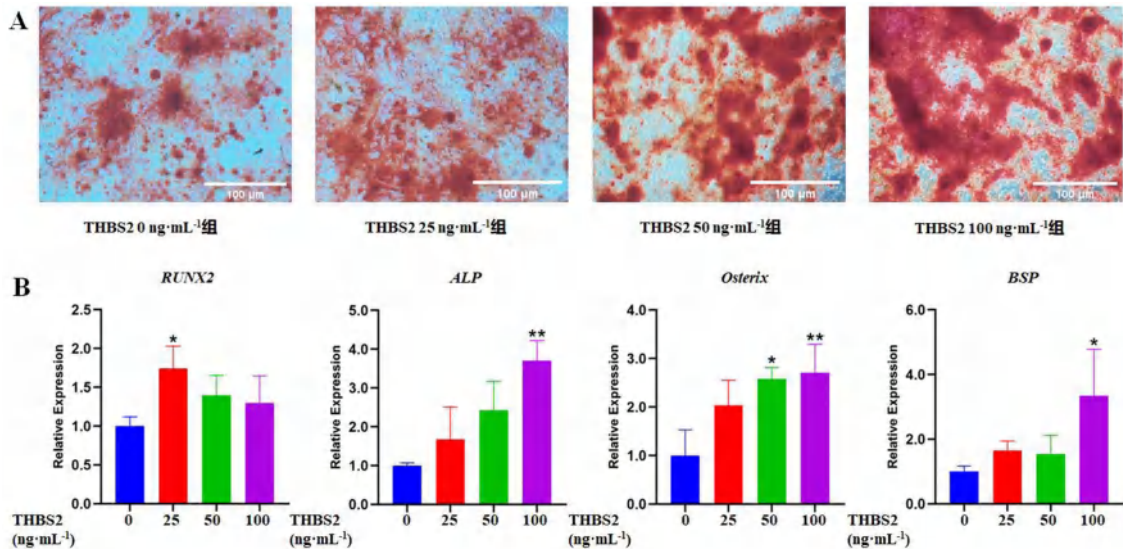


图 1 THBS2 对 BMSCs 成骨分化的影响

Fig 1 Effect of THBS2 on the osteogenic differentiation of BMSCs

A. 茜素红染色检测 THBS2 对 BMSCs 成骨分化的影响 (the effect of THBS2 on osteogenic differentiation of BMSCs was detected by Alizarin red staining); B. RT-qPCR 检测 THBS2 对 BMSCs 成骨相关基因 *ALP*、*RUNX2*、*Osterix* 与 *BSP* 的 mRNA 表达水平的影响 (RT-qPCR was used to detect the effect of THBS2 on the mRNA expression of *RUNX2*, *ALP*, *Osterix*, and *BSP* in BMSCs) ( $n = 3$ )

注：与  $0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  THBS2 组相比，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the  $0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  THBS2 group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

### 3.2 THBS2 抑制 BMSCs 向脂肪细胞分化

根据 THBS2 干预对 BMSCs 成骨分化影响的实验结果，100  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  THBS2 对 BMSCs 成骨分化的促进作用最显著，因此选择 100  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 THBS2 浓度研究 THBS2 对 BMSCs 成脂分化的影响。油红 O 染色结果显示，与  $0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  THBS2 组相比，100  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  THBS2 处理的 BMSCs 在成脂诱

导 14 d 后产生的脂滴减少 (见图 2A)；RT-qPCR 的结果显示，成脂诱导 7 d 的 100  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  THBS2 处理的 BMSCs 中，成脂相关基因 *PPAR $\gamma$* 、*C/EBP $\alpha$*  和 *LPL* 的 mRNA 表达下调 (见图 2B)。

### 3.3 THBS2 调控 BMSCs 分化的潜在靶点并验证

生物信息学分析的结果显示，与 THBS2 蛋白存在交互作用的相关蛋白有 CD36、CD47、MMP9、SCARB2、SDC4、SCARB1、ITGAV、ITGB3、ITGA3、ITGB1 (见图 3)。对 THBS2 及其交互蛋白进行 GO 分析，结果显示在生物过程方面主要涉及



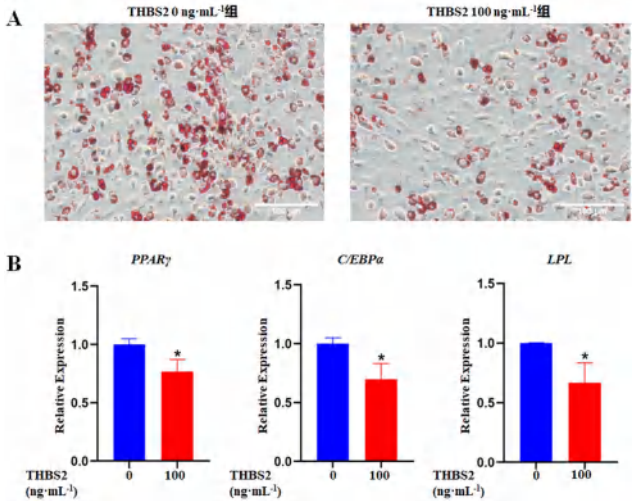


图2 THBS2对BMSCs向脂肪细胞分化的影响  
Fig 2 Effect of THBS2 on the adipocytes differentiation of BMSCs  
A. 油红O染色检测THBS2对BMSCs成脂分化的影响 (oil red O staining was used to detect the effect of THBS2 on the adipogenic differentiation of BMSCs); B. RT-qPCR检测THBS2对BMSCs成脂相关基因 *PPARγ*、*C/EBPα* 和 *LPL* 的表达水平的影响 (the effect of THBS2 on the expression of adipogenic genes *PPARγ*, *C/EBPα*, and *LPL* in BMSCs was detected by RT-qPCR) ( $n = 3$ )

注: 与  $0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  THBS2 组相比,  $^*P < 0.05$ 。  
Note: Compared with the  $0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  THBS2 group,  $^*P < 0.05$ .

核糖核蛋白的合成、共价染色质的修饰、mRNA的修饰和加工等;在细胞组分方面主要涉及黏着斑、细胞基质连结和线粒体基质等;在分子功能方面主要涉及解旋酶的调控、钙结合蛋白的绑定和RNA解旋酶的调控等(见图4)。而对于KEGG通路则主要富集在mRNA监测通路、三羧酸循环、核糖体和线粒体自噬等(见图5),这些分析结果可能揭示了THBS2调控BMSCs成骨分化的潜在机制。

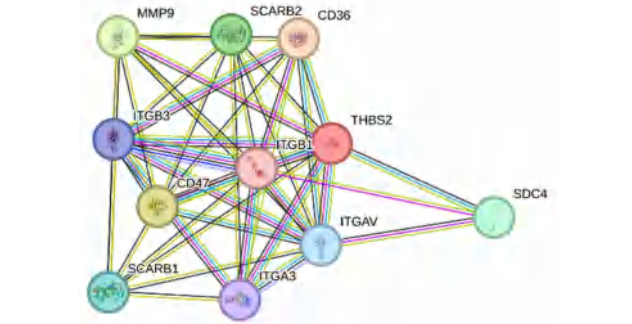


图3 THBS2交互蛋白的PPI可视化网络图  
Fig 3 PPI visualization network of THBS2 interacting proteins

在生物信息学分析的基础上,本课题组对可能与THBS2调控BMSCs成骨-成脂分化作用相关的蛋白CD36进行了验证,RT-qPCR的结果显示,成脂诱导7d后,  $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  THBS2处理的BMSCs中, *CD36*的mRNA表达显著下调(见图6)。

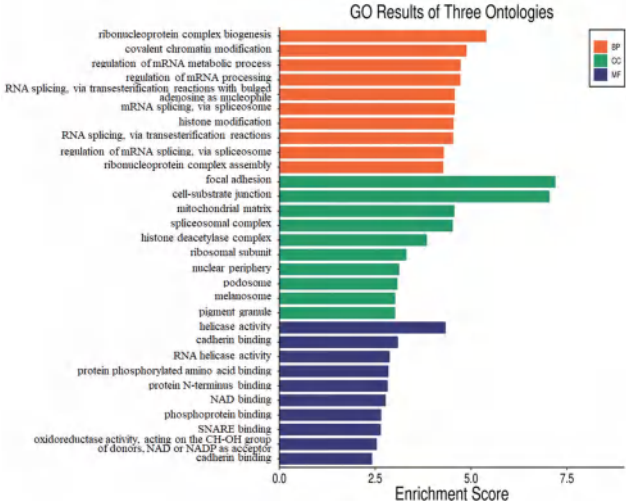


图4 THBS2相关下游靶基因的GO分析  
Fig 4 GO analysis of THBS2-related downstream target genes

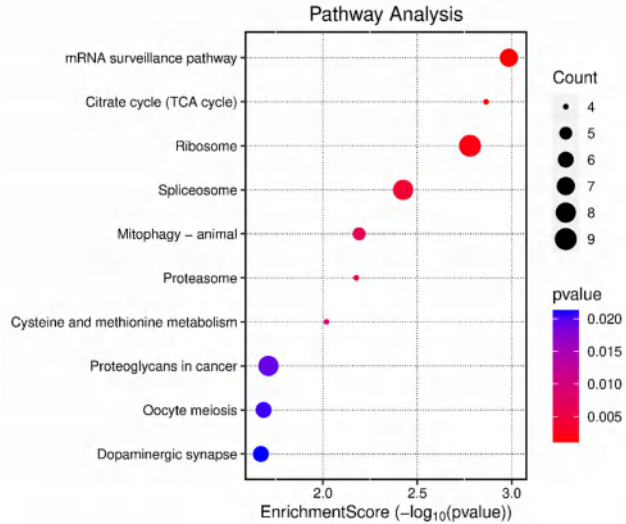


图5 THBS2相关下游靶基因的KEGG富集分析  
Fig 5 KEGG enrichment analysis of THBS2-related downstream target genes

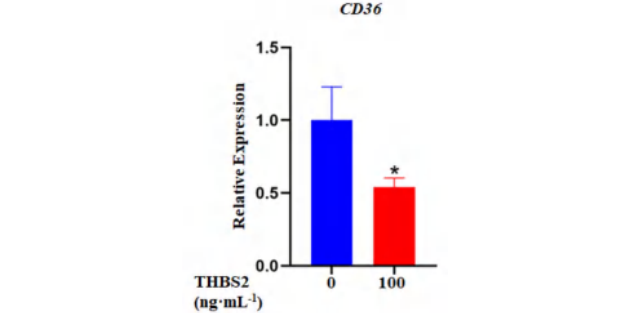


图6 THBS2对BMSC成脂相关基因*CD36*的mRNA表达水平的影响  
Fig 6 Effect of THBS2 on the mRNA expression of *CD36* in BMSCs  
注: 与  $0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  THBS2 组相比,  $^*P < 0.05$ 。  
Note: Compared with the  $0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  THBS2 group,  $^*P < 0.05$ .

#### 4 讨论

临床针对骨质疏松的治疗药物主要作用机制为抑制骨吸收和促进骨形成,但现有的治疗药物都具



有不同程度的不良反应而无法长期使用,如双膦酸盐类药物使用过久会导致药物相关的下颌骨坏死等<sup>[13]</sup>,因此寻找新的骨质疏松治疗药物亟待解决。骨血管为骨环境中的不同细胞类型提供氧气和营养,也是激素、生长因子以及钙和磷酸盐的来源。研究表明 H 型血管内皮细胞可以维持骨祖细胞的功能,促进成骨细胞的形成<sup>[14]</sup>,这些都证明了血管-成骨之间存在紧密关联,但对于血管-成骨之间相互作用的确切机制仍然需要进一步探究。

Zhao 等<sup>[15]</sup>的研究表明,来源于 BMSCs 的外泌体具有促进 BMSCs 成骨分化的作用,来源于脂肪间充质干细胞的外泌体可以缓解骨关节炎和软骨损伤<sup>[16]</sup>,由此可见外泌体在骨代谢相关疾病的治疗中具有非常大的潜力。本课题组已成功分离出了血管内皮细胞的外泌体并证实了其具有促进 BMSCs 向成骨细胞分化的作用,并确定了 *miR-5p-72106\_14* 是 EC-EXOs 促成骨作用的关键因子<sup>[9]</sup>。在蛋白质组学测序和差异蛋白热图分析中,EC-EXOs 中 THBS3 的表达水平显著升高,可能是 EC-EXOs 促成骨作用的关键蛋白。

THBS 家族是高度保守的钙结合糖蛋白,属于基质细胞蛋白家族,是一类功能性 ECM 蛋白,通过影响细胞与局部细胞外环境的相互作用参与多种细胞生物过程<sup>[17]</sup>,包括 THBS1、THBS2、THBS3、THBS4 和 THBS5 (COMP)。THBS 家族对于血管生成的影响已经得到了充分的证实<sup>[18]</sup>,THBS1 与 THBS2 通过直接影响内皮细胞迁移、增殖、存活和凋亡以及拮抗 VEGF 的活性来抑制血管生成,是有效的血管生成内源性抑制剂<sup>[19]</sup>。THBS 家族中 THBS2 和 THBS3 在哺乳动物的骨和骨骼肌中均有分布,其中 THBS2 长期以来被认为是一种癌症相关蛋白与关键调节因子<sup>[20]</sup>,近期有多项研究表明 THBS2 参与多种骨代谢疾病的发生和发展。多项研究表明 *THBS2* 基因多态性是椎间盘退化的危险因素,虽然 *THBS2* 基因与椎间盘退化的严重程度无关,但 *THBS2* 中的多个单核苷酸多态性,例如 *rs6422747*、*rs6422748* 和 *rs9406328* 与椎间盘退化的易感性相关<sup>[12, 21-22]</sup>;Zheng 等<sup>[23]</sup>和 Han 等<sup>[24]</sup>通过生物信息学分析表明 *THBS2* 基因可以作为骨关节炎的新型生物标志物。目前关于 THBS2 对 BMSCs 的调控和骨质疏松的影响仍然存在争议,因此本研究使用 THBS2 处理 BMSCs 后,在成骨诱导条件下,THBS2 蛋白处理组 BMSCs 中矿化结节和钙盐形成增加,成骨分化相关基因 *RUNX2*、*ALP*、*Osterix* 和 *BSP* 的 mRNA 表达上调,在成脂诱导条件下,THBS2 蛋白处理组 BMSCs 中脂滴形成减少,

RT-qPCR 实验表明,THBS2 蛋白处理后可以降低成脂分化相关基因 *PPAR $\gamma$* 、*C/EBP $\alpha$* 、*LPL* 的 mRNA 表达。本研究表明 THBS2 可以促进 BMSCs 向成骨细胞分化,并且抑制 BMSCs 向脂肪细胞分化。这与 Alford 等<sup>[25]</sup>的研究结果一致,THBS2 可以促进 BMSCs 和 MC3T3-E1 前成骨细胞系的成骨分化。骨骼是一个复杂的整体,探讨 THBS2 对于骨质疏松的影响不仅要考虑 THBS2 对 BMSCs 数量的影响,还应考虑 THBS2 对于 BMSCs 成骨成脂分化的影响,以及 THBS2 对于骨微环境、免疫和骨骼血管的影响等,因此 THBS2 对于骨质疏松的作用与机制仍然需要更加深入地研究。

为进一步探究本课题组进行了生物信息学分析,结果显示多个代谢相关蛋白如 CD36 等可能与 THBS2 调节 BMSCs 成骨成脂分化相关。细胞膜上的 CD36 蛋白可以通过调控长链脂肪酸的转运和脂肪感知来维持脂肪稳态<sup>[26]</sup>,本研究通过 RT-qPCR 证实了在 THBS2 的干预下,BMSCs 成脂分化过程中 *CD36* 基因的 mRNA 表达量下调。此外,生信分析结果中与 THBS2 有相互作用的 ITGAV、ITGB3、ITGA3 等蛋白均与 PI3K-AKT 信号通路相关。该信号通路在 BMSCs 分化的调节中发挥重要作用,有研究表明,*Fgf9* 通过激活 PI3K-AKT 信号通路促进 BMSCs 的成脂分化<sup>[27]</sup>。Microcystin-RR 可以上调 CD36 并激活 PI3K-AKT-mTOR 通路从而促进 HepG2 细胞中的脂质积累<sup>[28]</sup>。因此笔者推测 THBS2 可能通过 CD36 调节 PI3K-AKT 信号通路抑制 BMSCs 的成脂分化,从而促进其向成骨细胞的分化。

综上所述,本研究认为 THBS2 可以调控 BMSCs 的成骨成脂分化,促进 BMSCs 向成骨细胞分化,而调控作用的下游靶点可能为 CD36,这一发现进一步揭示 THBS 家族与骨质疏松症之间可能的关系,为骨质疏松症的治疗提供新的思路。

## 参考文献

- [1] Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis [J]. Am J Med, 1993, 94 (6): 646-650.
- [2] NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy [J]. JAMA, 2001, 285 (6): 785-795.
- [3] Clynes MA, Harvey NC, Curtis EM, et al. The epidemiology of osteoporosis [J]. Br Med Bull, 2020, 133 (1): 105-117.
- [4] Justesen J, Stenderup K, Ebbesen EN, et al. Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis [J]. Biogerontology, 2001, 2 (3):

- 165-171.
- [5] Nishikawa K, Nakashima T, Takeda S, et al. Maf promotes osteoblast differentiation in mice by mediating the age-related switch in mesenchymal cell differentiation [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120 (10): 3455-3465.
- [6] Chen T, Yang T, Zhang WW, et al. The therapeutic potential of mesenchymal stem cells in treating osteoporosis [J]. *Biol Res*, 2021, 54 (1): 42.
- [7] Stegen S, Carmeliet G. The skeletal vascular system-breathing life into bone tissue [J]. *Bone*, 2017, 115: 50-58.
- [8] Maggio ND, Banfi A. The osteo-angiogenic signaling cross-talk for bone regeneration: harmony out of complexity [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2022, 76: 102750.
- [9] Li H, Wang JJ, Xie XY, et al. Exosome-derived miR-5p-72106\_14 in vascular endothelial cells regulates fate determination of BMSCs [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2024, 482: 116793.
- [10] Adams JC, Lawler J. The thrombospondins [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011, 3 (10): a009712.
- [11] Tucker RP, Adams JC. Molecular evolution of the thrombospondin superfamily [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2024, 155 ( Pt B ): 12-21.
- [12] Deguchi T, Hashizume H, Nakajima M, et al. A population-based study identifies an association of THBS2 with intervertebral disc degeneration [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2019, 27 (10): 1501-1507.
- [13] Reid IR, Billington EO. Drug therapy for osteoporosis in older adults [J]. *Lancet*, 2022, 399 (10329): 1080-1092.
- [14] Kusumbe AP, Ramasamy SK, Adams RH. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone [J]. *Nature*, 2014, 507 (7492): 323-328.
- [15] Zhao P, Xiao L, Peng J, et al. Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells improve osteoporosis through promoting osteoblast proliferation via MAPK pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22 ( 12 ): 3962-3970.
- [16] Li F, Xu ZM, Xie Z, et al. Adipose mesenchymal stem cells-derived exosomes alleviate osteoarthritis by transporting microRNA-376c-3p and targeting the WNT-beta-catenin signaling axis [J]. *Apoptosis*, 2023, 28 (3-4): 362-378.
- [17] Bornstein P, Sage EH. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2002, 14 (5): 608-616.
- [18] Muppala S, Frolova E, Xiao R, et al. Proangiogenic properties of thrombospondin-4 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35 (9): 1975-1986.
- [19] Lawler PR, Lawler J. Molecular basis for the regulation of angiogenesis by thrombospondin-1 and-2 [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2 (5): a006627.
- [20] Hoshino A, Kim HS, Bojmar L, et al. Extracellular vesicle and particle biomarkers define multiple human cancers [J]. *Cell*, 2020, 182 (4): 1044-1061.
- [21] Yuan BS, Ji W, Fan B, et al. Association analysis between thrombospondin-2 gene polymorphisms and intervertebral disc degeneration in a Chinese Han population [J]. *Medicine*, 2018, 97 (2): e9586.
- [22] Deguchi T, Hashizume H, Terao C, et al. A longitudinal population-based study identifies THBS2 as a susceptibility gene for intervertebral disc degeneration [J]. *Eur Spine J*, 2024, 15 (5): 851-862.
- [23] Zheng LL, Chen WS, Xian GY, et al. Identification of abnormally methylated-differentially expressed genes and pathways in osteoarthritis: a comprehensive bioinformatic study [J]. *Clin Rheumatol*, 2021, 40 (8): 3247-3256.
- [24] Han J, Deng H, Lyu YZ, et al. Identification of *N*-glycoproteins of knee cartilage from adult osteoarthritis and kashin-beck disease based on quantitative glycoproteomics, compared with normal control [J]. *Cells*, 2022, 11 (16): 2513.
- [25] Alford AI, Terkhorn SP, Reddy AB, et al. Thrombospondin-2 regulates matrix mineralization in MC3T3-E1 pre-osteoblasts [J]. *Bone*, 2010, 46 (2): 464-471.
- [26] Li YX, Huang XG, Yang G, et al. CD36 favours fat sensing and transport to govern lipid metabolism [J]. *Prog Lipid Res*, 2022, 88: 101193.
- [27] Chen MM, Liang H, Wu M, et al. *Fgf9* regulates bone marrow mesenchymal stem cell fate and bone-fat balance in osteoporosis by PI3K/AKT/Hippo and MEK/ERK signaling [J]. *Int J Biol Sci*, 2024, 20 (9): 3461-3479.
- [28] Jia WJ, Zhong L, Ren QM, et al. Microcystin-RR promote lipid accumulation through CD36 mediated signal pathway and fatty acid uptake in HepG2 cells [J]. *Environ Res*, 2024, 249: 118402.

(收稿日期: 2024-08-29; 修回日期: 2024-11-07)

# 基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS、网络药理学及实验验证探讨肝纯片治疗非酒精性脂肪性肝病的作用机制

程小英<sup>1, 2</sup>, 詹扬<sup>1, 2</sup>, 张静文<sup>1, 2</sup>, 孙登龙<sup>1, 2</sup>, 李颖萌<sup>1, 2\*</sup> (1. 经典名方现代中药创制全国重点实验室, 南昌 330096; 2. 江中药业股份有限公司, 南昌 330103)

**摘要:** **目的** 探讨肝纯片在治疗非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 中的活性成分和作用机制。**方法** 采用超高效液相色谱-四极杆静电场轨道阱质谱 (UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS) 技术鉴定肝纯片中的活性成分, 并结合网络药理学和分子对接技术深入分析其抗 NAFLD 的作用机制。同时, 构建高脂饮食诱导的金黄地鼠 NAFLD 模型, 以进一步验证肝纯片对 NAFLD 的治疗效果。**结果** 共鉴定出 69 种黄酮类化合物, 获得活性成分靶点 390 个, 疾病靶点 1918 个。KEGG 富集分析显示共有 133 条信号通路, 其中包括胰岛素抵抗、AMPK 信号通路、PI3K-AKT 信号通路等关键途径; 分子对接结果表明二氢杨梅素、柳穿鱼黄素、白杨素和高良姜素 3-甲醚等活性成分与关键靶点 PI3K、AKT1 和 mTOR 均具有较好的结合能力。动物实验表明, 肝纯片显著抑制了 NAFLD 金黄地鼠体重、肝重和肝脏指数的上升; 同时, 降低了血清中谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT)、总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、葡萄糖和胰岛素水平; 此外, 肝纯片还升高了肝脏组织中 PI3K、AKT、mTOR 的 mRNA 水平, 并显著改善了肝脏的异常病理状态。**结论** 肝纯片具有抗 NAFLD 的作用, 其作用机制可能与改善胰岛素抵抗及调节 PI3K/AKT/mTOR 信号通路有关。

**关键词:** 肝纯片; 网络药理学; 非酒精性脂肪性肝病; 高脂饮食; 金黄地鼠

**中图分类号:** R284, R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)06-1575-09  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.012

## Mechanism of action of Ganchun tablets for nonalcoholic fatty liver disease based on UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS, network pharmacology and experiment validation

CHENG Xiao-ying<sup>1, 2</sup>, ZHAN Yang<sup>1, 2</sup>, ZHANG Jing-wen<sup>1, 2</sup>, SUN Deng-long<sup>1, 2</sup>, LI Ying-meng<sup>1, 2\*</sup> (1. State Key Laboratory for the Modernization of Classical and Famous Prescriptions of Chinese Medicine, Nanchang 330096; 2. Jiangzhong Pharmaceutical Co., Ltd., Nanchang 330103)

**Abstract:** **Objective** To determine the active ingredients and mechanism of Ganchun tablets for nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods** UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS technique was used to identify the active components of Ganchun tablets. Network pharmacology and molecular docking were used to analyze the anti-NAFLD mechanism. Additionally, an NAFLD model was induced in golden hamsters via a high-fat diet to further verify the therapeutic efficacy of Ganchun tablets. **Results** Totally 69 flavonoids were identified, and 390 constituent targets and 1918 disease-related targets were obtained. KEGG enrichment analysis discovered 133 signaling pathways, including insulin resistance, the AMPK signaling pathway, and the PI3K-AKT signaling pathway and so on. Molecular docking indicated that dihydromyricetin, pectolarigenin, chrysin, and galangin 3-methyl ether exhibited strong binding affinity to key targets such as PI3K, AKT1, and mTOR. Golden hamster experiments demonstrated that Ganchun tablets obviously mitigated increases in body weight, liver weight, and liver index in NAFLD golden hamsters. Furthermore, it decreased the

**基金项目:** 江西省技术创新引导类计划项目 (No.20232BBH80009)。

**作者简介:** 程小英, 女, 主要从事药理学研究, email: chengxiaoying@crjz.com \* **通信作者:** 李颖萌, 女, 工程师, 主要从事中药及乳制品循证评价研究, email: liym@crjz.com



serum levels of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, total cholesterol, triglyceride, low-density lipoprotein cholesterol, glucose, and insulin. Ganchun tablets also increased mRNA levels of *PI3K*, *AKT*, and *mTOR* in the liver tissue and notably improved the pathological liver conditions.

**Conclusion** Ganchun tablets exert anti-NAFLD effects, potentially by the ameliorating insulin resistance and modulating the *PI3K/AKT/mTOR* signaling pathway.

**Key words:** Ganchun tablet; network pharmacology; nonalcoholic fatty liver disease; high-fat diet; golden hamster

非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是最普遍的慢性肝病之一, 其特征是非酒精因素引起的肝脏脂质过度蓄积。据统计, NAFLD 的全球患病率约为 25%, 且因其与肥胖、2 型糖尿病和心血管疾病密切相关, 患病率呈上升趋势<sup>[1]</sup>。NAFLD 的发展归因于多种因素之间的复杂相互作用, 包括胰岛素抵抗、氧化应激、肠道菌群、表观遗传、肝细胞内代谢途径以及脂肪组织等<sup>[2]</sup>。依据 NAFLD 防治指南, 改变不良生活方式是预防 NAFLD 的重要步骤<sup>[3]</sup>。除了加强锻炼和健康饮食外, 膳食补充剂也可能有助于改善健康状况。近年来, 许多动物研究和临床试验表明, 黄酮类化合物在降脂保肝方面具有有益作用<sup>[4-6]</sup>。

肝纯片的原料为显齿蛇葡萄 [*Ampelopsis grosedentata* (Hand.-Mazz.) W. T. Wang, 又称藤茶] 提取物, 是一种对化学性肝损伤有辅助保护作用的保健食品。研究表明, 显齿蛇葡萄的主要活性成分是以二氢杨梅素和杨梅素为主的黄酮类化合物, 具有抗炎、抗氧化、降脂、降压、保肝护肝、提高人体免疫力等多种药理学活性<sup>[7]</sup>。临床研究证实, 补充二氢杨梅素可以改善 NAFLD 患者的糖脂代谢和各种生化参数, 其治疗效果可能是通过改善胰岛素抵抗、降低血清中的肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、细胞角蛋白-18 和成纤维细胞生长因子-21 等途径实现的<sup>[5]</sup>。前期研究表明, 藤茶提取物可调节葡萄糖和脂质代谢, 并减少高脂饮食大鼠的肝脏脂质蓄积<sup>[8]</sup>。然而, 目前尚不清楚肝纯片治疗 NAFLD 的药效物质基础和作用机制。

网络药理学由系统生物学和网络信息学组成, 它可以在系统水平上分析多组分药物对机体的影响, 探究药物的有效成分的治疗靶点<sup>[9]</sup>。分子对接是一种计算机模拟技术, 可以在原子水平上模拟分子与蛋白质之间的相互作用, 用于验证网络分析的可靠性<sup>[10]</sup>。近年来, 金黄地鼠因其表现出与人类相似的脂质谱特征, 能够更好地复制人类脂蛋白代谢, 已被作为动物模型研究 NAFLD<sup>[11]</sup>。因此, 本研究采用超高效液相色谱-四极杆静电场轨道阱质谱技术 (UHPLC-Q-

Exactive Orbitrap MS) 分析鉴定肝纯片的化学成分, 并利用网络药理学和分子对接相结合的方法, 分析肝纯片治疗 NAFLD 的有效成分、潜在靶点和分子机制, 并通过高脂饮食诱导金黄地鼠构建 NAFLD 模型, 对其治疗作用进行初步验证, 为肝纯片防治 NAFLD 提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

SPF 级雄性金黄地鼠, 体重 100 ~ 120 g [北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物生产许可证号: SCXK (京) 2021-0011]。所有动物护理及实验程序均获得江中药业股份有限公司实验动物伦理委员会批准 (批件号: 20231024)。

### 1.2 试药

甲醇、乙腈、甲酸 (质谱级或色谱级, Thermo Fisher Scientific 公司); 肝纯片 (规格: 0.5 g/片, 江中药业股份有限公司); 高脂饲料 (16.5% 猪油、15% 蔗糖、10% 酪蛋白、1% 胆固醇、0.5% 胆盐、0.2% 硫氧嘧啶、2% 预混料、54.8% 基础饲料) (苏州双狮实验动物饲料科技有限公司); 谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT)、总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、葡萄糖测定试剂盒 (深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司); 仓鼠胰岛素 ELISA 试剂盒 (江苏酶免实业有限公司); RNAeasy 动物 RNA 抽提试剂盒 (离心柱式) (碧云天生物技术公司); 逆转录试剂盒、SYBR qPCR Master Mix 试剂盒 (南京诺唯赞生物科技公司)。

### 1.3 仪器

Vanquish UHPLC 超高效液相色谱仪和 Q-Exactive Orbitrap 四极杆-静电场轨道阱质谱仪 (Thermo Fisher Scientific 公司); BS-240VET 动物生化分析仪 (深圳 Mindray 公司); DM3000 正置荧光显微镜 [莱卡显微系统 (上海) 贸易有限公司]; ST1R Plus 台式冷冻离心机 (Thermo Fisher Scientific 公司); VICTOR NIVO 多功能酶标仪 (珀金埃尔默仪器有限公司); C1000 Touch 型 PCR 仪 (美国伯乐公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 样品制备

称取 0.5 g 肝纯片粉末至离心管中, 加入 5 mL 80% 的甲醇, 在 40 °C 下超声提取 30 min, 13 000 g、4 °C 下离心 15 min, 将上清液经 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 供后续检测。

### 2.2 色谱条件

采用 Waters ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相 A 为含有 0.1% 甲酸的水溶液, 流动相 B 为含 0.1% 甲酸的乙腈溶液, 梯度洗脱 (0 ~ 2.0 min, 5%B; 2.0 ~ 12.0 min, 5% ~ 95%B; 12.0 ~ 14.0 min, 95%B; 14.0 ~ 14.1 min, 95% ~ 5%B; 14.1 ~ 16.0 min, 5%B), 流速 0.5 mL·min<sup>-1</sup>, 进样体积 3 μL。

### 2.3 质谱条件

样品经电喷雾电离, 分别采用正、负离子模式进行检测, 正离子毛细管电压 3.5 kV, 负离子毛细管电压 3.0 kV, 质量数扫描范围 *m/z* 70 ~ 1050, 鞘气流速 50 arb, 辅助气流速 13 arb, 加热温度 450 °C, 毛细管温度 320 °C, MS 分辨率 70 000, MS/MS 分辨率 17 500。

### 2.4 化学成分分析

通过 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 正、负离子模式下系统获得总离子色谱图, 见图 1。经分析后共得到 69 个黄酮类化合物, 其鉴定结果见表 1。

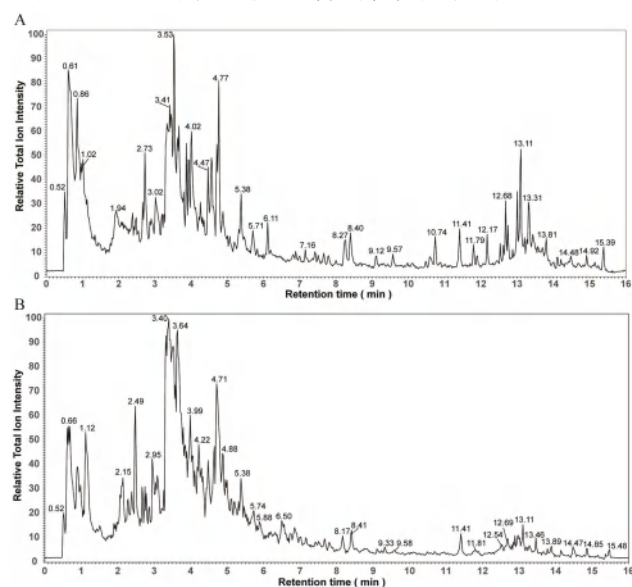


图 1 正离子模式 (A) 和负离子模式 (B) 下肝纯片的总离子流图  
Fig 1 Total ion chromatograms of Ganchun tablets in positive (A) and negative (B) mode

### 2.5 网络药理学

**2.5.1 活性成分潜在靶点和 NAFLD 靶点获取** 将鉴定出的 69 个黄酮类化合物的 SMILES 号依次上传至 Swiss TargetPrediction (<http://www.swisstargetpredic->

[tion.ch/](http://www.swisstargetpredic-tion.ch/)), 以 Probability > 0 为筛选标准, 得到 390 个活性成分靶点基因。在 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 和 OMIM 数据库 (<http://www.omim.org/>) 中输入 “Nonalcoholic fatty liver disease” 进行检索。整理检索数据并去重后, 共获取了 1918 个与 NAFLD 相关的潜在作用靶点。

**2.5.2 构建活性成分与 NAFLD 交集靶点的相互作用网络** 将化合物靶点和 NAFLD 潜在靶点导入 <http://www.ehbio.com/test/venn/> 网站绘制韦恩图, 共获得 107 个共同作用靶点。随后, 将共同作用靶点导入 STRING 平台 (<https://www.stringdb.org/>), 选择物种为 “Homo Spaiens”, 筛选条件设定为最低要求互动分数高于 0.7, 并隐藏网络中没有相互作用联系的节点。导出数据后, 利用 Cytoscape 3.9.1 软件进行可视化分析, 通过分析网络拓扑结构来识别关键靶点, 构建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络。PPI 网络包含 99 个节点和 393 条边, 平均节点度为 7.94。其中度值前 15 的关键靶点基因分别为 *HSP90AA1*、*AKT1*、*EGFR*、*TNF*、*HSP90AB1*、*BCL2*、*HIF1A*、*ESR1*、*MTOR*、*MMP9*、*STAT1*、*PTGS2*、*APP*、*PPARG*、*CCND1*。

**2.5.3 GO 和 KEGG 富集分析** 将 “2.5.2” 项下获得的共同作用靶点导入 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 进行 GO 分析和 KEGG 富集分析。以 *P* < 0.05 作为筛选标准, 从 GO 分析中选取排名前 10 的结果, 从 KEGG 富集分析中选取排名前 20 的结果, 并将它们分别导入微生信平台 (<https://bioinformatics.com.cn/>) 绘制柱状图 and 气泡图, 见图 2。

**2.5.4 构建成分-靶点-通路网络图** 采用 Cytoscape 软件构建肝纯片的成分-靶点-通路网络图, 其中 “圆形” 表示活性成分, “方形” 表示 NAFLD 靶点, “六边形” 表示通路, 成分-靶点-通路网络包括 197 个节点、1484 条边, 平均介数值为 15.448, 见图 3。结合成分-靶点-通路网络中各成分的度值和肝纯片中活性成分的相关研究, 文献中研究较多的二氢杨梅素 (GC69) 和杨梅素 (GC1) 与度值排名前 4 的柳穿鱼黄素 (GC55)、白杨素 (GC61)、5, 7, 3'-三羟基-6, 4', 5'-三甲氧基黄酮 (GC64)、高良姜素 3-甲醚 (GC25) 可视为抗 NAFLD 的重要活性成分。

**2.5.5 分子对接** 根据 PPI 和 KEGG 富集分析结果, 选择 PI3K-AKT 信号通路中的 AKT1、mTOR 和 PI3K 作为核心靶点, 并与二氢杨梅素、杨梅素及度值排名前 4 的活性成分进行了分子对接研究。在 RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>) 中下载核心靶点蛋白的 3D 结构, 使用 Pymol 软件中进行预

表 1 肝纯片中 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 分析结果  
Tab 1 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS analysis in Ganchun tablets

| No.  | $t_R$ /min | 离子模式               | 分子式                                             | 分子质量<br>( $m/z$ ) | 碎片离子 ( $m/z$ )                              | 化合物                                   |
|------|------------|--------------------|-------------------------------------------------|-------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------|
| GC1  | 4.02       | [M+H] <sup>+</sup> | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub>  | 319.0438          | 153.0181、245.0440、273.0391                  | 杨梅素                                   |
| GC2  | 4.02       | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub> | 463.0882          | 271.0245、287.0194、317.0294、151.0023         | 杨梅苷                                   |
| GC3  | 4.48       | [M+H] <sup>+</sup> | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>  | 303.0490          | 153.0181、229.0491、137.0232                  | 桑色素                                   |
| GC4  | 5.37       | [M+H] <sup>+</sup> | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>  | 255.0644          | 199.0750、137.0231                           | 大豆苷元                                  |
| GC5  | 4.48       | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub> | 447.0932          | 300.0278、271.0260                           | 栝素                                    |
| GC6  | 3.68       | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>13</sub> | 479.0828          | 316.0221、271.0241、287.0191                  | 杨梅素 3- <i>O</i> - $\beta$ -D- 吡喃葡萄糖苷  |
| GC7  | 8.40       | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>  | 267.0661          | 252.0424、223.0392                           | 芒柄花黄素                                 |
| GC8  | 5.74       | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>  | 301.0352          | 151.0023、107.0122                           | 栝精                                    |
| GC9  | 5.47       | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub> | 435.1294          | 229.0860、273.0767                           | 三叶苷                                   |
| GC10 | 4.89       | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub> | 435.1293          | 273.0766、167.0337、123.0436                  | 根皮苷                                   |
| GC11 | 13.49      | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>  | 343.0820          | 328.0587、83.0122                            | 泽兰林素                                  |
| GC12 | 4.48       | [M+H] <sup>+</sup> | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub> | 449.1066          | 287.0544、303.0495                           | 紫云英苷                                  |
| GC13 | 4.10       | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub> | 441.0826          | 169.0129、125.0229、289.0715                  | 表儿茶素没食子酸酯                             |
| GC14 | 4.87       | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub> | 431.0980          | 285.0400、255.0294、284.0322、227.034          | 山柰酚 -3- 鼠李糖苷                          |
| GC15 | 4.33       | [M+H] <sup>+</sup> | C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub> | 435.0910          | 303.0494、73.0290                            | 扁蓄苷                                   |
| GC16 | 6.74       | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>  | 271.0611          | 119.0486、151.0019、227.0704                  | 短叶松素                                  |
| GC17 | 3.03       | [M+H] <sup>+</sup> | C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>  | 416.1327          | 70.0657、139.0387、191.0335                   | 猫眼草黄素                                 |
| GC18 | 4.06       | [M+H] <sup>+</sup> | C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>  | 273.0749          | 153.0180、147.0438、119.0491                  | 柚皮素查尔酮                                |
| GC19 | 3.43       | [M+H] <sup>+</sup> | C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub> | 447.1271          | 327.0859、297.0753、429.1180                  | 当药黄素                                  |
| GC20 | 4.02       | [M+H] <sup>+</sup> | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub> | 611.1591          | 85.0289、71.0498、319.0444                    | 芦丁                                    |
| GC21 | 4.89       | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>  | 273.0768          | 167.0337、123.0436、81.0329                   | 根皮素                                   |
| GC22 | 3.38       | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub> | 457.0775          | 169.0130、125.0229、305.0666                  | (-)-表没食子儿茶素没食子酸酯                      |
| GC23 | 3.67       | [M+H] <sup>+</sup> | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub> | 449.1064          | 299.0546、329.0651                           | 异荛草素                                  |
| GC24 | 10.49      | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>  | 283.0610          | 268.0376、239.0343                           | 樱黄素                                   |
| GC25 | 10.48      | [M+H] <sup>+</sup> | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>  | 285.0746          | 240.2316、270.0521、242.0570                  | 高良姜素 3- 甲醚                            |
| GC26 | 8.46       | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>30</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub> | 537.0829          | 375.0506、331.0609、417.0614、117.0330         | 穗花杉双黄酮                                |
| GC27 | 5.23       | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>  | 287.0559          | 135.0438、151.0023、107.0122、96.9585          | 圣草酚                                   |
| GC28 | 4.59       | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub> | 417.0826          | 255.0294、284.0322                           | 胡桃苷                                   |
| GC29 | 6.75       | [M+H] <sup>+</sup> | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>  | 271.0592          | 153.0180、215.0697、119.0491、91.0545          | 染料木素                                  |
| GC30 | 3.49       | [M+H] <sup>+</sup> | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>  | 271.0592          | 215.0698、149.0231、243.0646、91.0545          | 4', 6, 7- 三羟基异黄酮                      |
| GC31 | 4.04       | [M+H] <sup>+</sup> | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub> | 433.1115          | 283.0598、313.0702、70.0658、121.0284          | 异牡荆素                                  |
| GC32 | 3.70       | [M+H] <sup>+</sup> | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>  | 417.1165          | 255.0648、199.0750、137.0232、227.0701、70.0658 | 大豆苷                                   |
| GC33 | 11.04      | [M+H] <sup>+</sup> | C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>  | 373.1268          | 343.0807、183.0286                           | 橘皮素                                   |
| GC34 | 12.36      | [M+H] <sup>+</sup> | C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>  | 373.1269          | 343.0807、300.0622                           | 异橙黄酮                                  |
| GC35 | 7.07       | [M+H] <sup>+</sup> | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>  | 301.0696          | 286.0467、258.0518、95.0860                   | 香叶木素                                  |
| GC36 | 5.14       | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub> | 485.0725          | 193.0131、125.0229、301.0349                  | 槲皮素 -7- <i>O</i> - $\beta$ -D- 吡喃葡萄糖苷 |
| GC37 | 6.55       | [M+H] <sup>+</sup> | C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>  | 257.0799          | 239.0700、147.0439、119.0491、91.0546          | 异甘草素                                  |
| GC38 | 3.30       | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>  | 415.1031          | 267.0661、295.0607、133.0280                  | 葛根素                                   |
| GC39 | 6.51       | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub> | 469.0774          | 319.0457、301.0350、193.0133、125.0229         | 白前苷 B                                 |
| GC40 | 12.68      | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>  | 285.0403          | 257.0450、241.0499、185.0596、93.0326          | 木犀草素                                  |
| GC41 | 9.81       | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>  | 283.0611          | 240.0423、184.0517、59.0122                   | 金合欢素                                  |
| GC42 | 10.21      | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>  | 255.0660          | 213.0547、151.0023、107.0123、65.0016          | 松属素                                   |
| GC43 | 10.90      | [M+H] <sup>+</sup> | C <sub>30</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub> | 539.0955          | 286.0471、270.0521、153.0182                  | 扁柏双黄酮                                 |
| GC44 | 7.77       | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>  | 299.0560          | 151.0023、125.0229、63.0225                   | 山柰素                                   |
| GC45 | 5.84       | [M+H] <sup>+</sup> | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>  | 285.0749          | 270.0518、225.0541、137.0232、81.0703          | 毛蕊异黄酮                                 |
| GC46 | 5.61       | [M+H] <sup>+</sup> | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>  | 285.0749          | 270.0517、253.0490、225.0540                  | 汉黄芩素                                  |
| GC47 | 9.42       | [M+H] <sup>+</sup> | C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>  | 357.1682          | 325.1426、307.1325、81.0340、279.1371          | 光甘草定                                  |
| GC48 | 8.30       | [M+H] <sup>+</sup> | C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>  | 239.0694          | 183.0802、165.0695、83.0496                   | 二氢大豆苷元                                |
| GC49 | 9.01       | [M+H] <sup>+</sup> | C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>  | 373.1269          | 343.0808、329.1009                           | 甜橙黄酮                                  |
| GC50 | 5.10       | [M+H] <sup>+</sup> | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub> | 415.1011          | 283.0598、353.0652、313.0703、397.0923         | 牡荆素                                   |
| GC51 | 10.95      | [M+H] <sup>+</sup> | C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>  | 343.1163          | 313.0702、328.0940、267.0645                  | 5, 7, 8, 4'- 四甲氧基黄酮                   |
| GC52 | 12.24      | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>  | 329.0665          | 314.0429、299.0193、271.0245、243.0293         | 苜蓿素                                   |
| GC53 | 7.66       | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>  | 345.0613          | 315.0144、330.0377、287.0195、259.0245         | 粘毛黄芩素Ⅲ                                |
| GC54 | 7.04       | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>  | 299.0560          | 284.0323、256.0373                           | 3'- 甲氧基芹菜素                            |



续表 1

| No.  | $t_R/\text{min}$ | 离子模式               | 分子式                                             | 分子质量<br>( $m/z$ ) | 碎片离子 ( $m/z$ )                      | 化合物                               |
|------|------------------|--------------------|-------------------------------------------------|-------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| GC55 | 8.90             | [M+H] <sup>+</sup> | C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>  | 315.0851          | 254.0569、282.0518、226.0622          | 柳穿鱼黄素                             |
| GC56 | 7.00             | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>  | 329.0666          | 299.0193、314.0429、328.2212、271.0245 | 棕矢车菊素                             |
| GC57 | 13.09            | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>  | 353.1391          | 293.9855、219.0655、133.0643          | 黄腐醇                               |
| GC58 | 9.25             | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>  | 299.0923          | 135.0073、91.0173、153.0180           | 黄芩紫檀烷                             |
| GC59 | 7.26             | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>  | 301.0717          | 151.0023、183.1379、191.0338、175.0025 | 橙皮素                               |
| GC60 | 6.49             | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>  | 361.0562          | 125.0229、151.0025、317.0306          | 异鼠李素                              |
| GC61 | 9.92             | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>  | 253.0504          | 125.0230、63.0225                    | 白杨素                               |
| GC62 | 4.69             | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub> | 465.1037          | 151.0024、303.0507                   | 车前子苷                              |
| GC63 | 7.73             | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>  | 267.0298          | 238.0264、211.0394                   | 漆黄素                               |
| GC64 | 8.02             | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>  | 359.0772          | 344.0531、329.0301                   | 5, 7, 3'-三羟基-6, 4', 5'-三<br>甲氧基黄酮 |
| GC65 | 15.67            | [M+H] <sup>+</sup> | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>  | 269.0795          | 237.0539、139.0024、254.0564          | 柚木柯因                              |
| GC66 | 9.91             | [M+H] <sup>+</sup> | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>  | 255.0643          | 153.0181、93.0701                    | 3, 2'-二羟基黄酮                       |
| GC67 | 5.95             | [M+H] <sup>+</sup> | C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>  | 416.1326          | 70.0658、139.0389、191.0337           | 蔓荆子黄素                             |
| GC68 | 10.69            | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>  | 299.0559          | 256.0373、228.0416                   | 羟基芫花素                             |
| GC69 | 5.72             | [M-H] <sup>-</sup> | C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub>  | 319.0298          | 303.0863、195.1173、153.0316、139.0386 | 二氢杨梅素                             |

处理。在 PubChem 数据库中搜索并下载核心活性成分的 2D 结构。将上述文件分别导入 Autodock Tools 软件中添加全氢，并将两者进行对接。如表 2 所示，肝纯片的关键活性成分与核心靶点的结合能均小于  $-20.92\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ，表明活性成

分与靶点的结合活性较好。其中，二氢杨梅素与 AKT1、mTOR、PI3K，白杨素和高良姜素 3-甲醚与 mTOR 的结合效果最佳，采用 Pymol 软件对其分子对接结果进行可视化，结果见图 4。

表 2 关键活性成分与核心靶点对接结合能 ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )  
Tab 2 Binding energy of key active ingredients and core targets ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )

| 靶点蛋白 | PDB 编号 | 二氢杨梅素  | 杨梅素    | 柳穿鱼黄素  | 白杨素    | 5, 7, 3'-三羟基-6, 4', 5'-三<br>甲氧基黄酮 | 高良姜素 3-甲醚 |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|-----------------------------------|-----------|
| AKT1 | 4EKL   | -36.11 | -24.06 | -27.45 | -28.12 | -29.58                            | -28.53    |
| mTOR | 4O75   | -40.84 | -26.19 | -29.96 | -30.96 | -29.12                            | -32.59    |
| PI3K | 4WWO   | -36.53 | -23.93 | -25.65 | -28.03 | -22.18                            | -27.15    |

## 2.6 动物分组及模型建立

金黄地鼠经适应性饲养一周后，随机分为空白组、模型组及肝纯片低剂量组 ( $140\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、中剂量组 ( $280\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 和高剂量组 ( $560\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )，每组 8 只。除空白组金黄地鼠给予基础饲料外，其余金黄地鼠均给予高脂饲料，各治疗组通过灌胃的方式给予肝纯片，持续 6 周<sup>[12]</sup>。

## 2.7 肝脏指数测定

在实验结束前禁食不禁水 18 h，所有金黄地鼠记

录体重后处死，解剖取出肝脏后，用磷酸盐缓冲液冲洗，滤纸擦干，观察形态并称定肝脏质量，肝脏指数计算公式为：肝脏指数 (%) = 肝脏质量 / 体质量  $\times 100\%$ 。结果如表 3 所示，实验开始前，各组金黄地鼠体重均无显著差异。高脂饲料喂养 6 周后，相比于空白组，模型组的最终体重、肝脏质量和肝脏指数均显著升高；相较于模型组，肝纯片中、高剂量治疗组的最终体重显著降低，各肝纯片治疗组的肝脏质量和肝脏系数均显著降低。

表 3 各组金黄地鼠的体重、肝脏质量及肝脏指数 ( $n = 8$ )  
Tab 3 Body weight, liver weight, and liver weight index of golden hamsters in each group ( $n = 8$ )

| 组别      | 初始体重 /g           | 最终体重 /g             | 肝脏质量 /g            | 肝脏指数 /%            |
|---------|-------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| 空白组     | 117.07 $\pm$ 4.25 | 150.67 $\pm$ 4.92   | 4.75 $\pm$ 0.52    | 3.07 $\pm$ 0.18    |
| 模型组     | 117.30 $\pm$ 3.81 | 169.45 $\pm$ 8.51** | 6.98 $\pm$ 0.63*** | 4.06 $\pm$ 0.18*** |
| 肝纯片低剂量组 | 117.62 $\pm$ 2.68 | 157.67 $\pm$ 7.55   | 5.76 $\pm$ 0.88##  | 3.60 $\pm$ 0.25##  |
| 肝纯片中剂量组 | 117.17 $\pm$ 4.22 | 154.70 $\pm$ 7.90#  | 5.70 $\pm$ 0.49### | 3.69 $\pm$ 0.27#   |
| 肝纯片高剂量组 | 116.93 $\pm$ 3.61 | 153.07 $\pm$ 7.89## | 5.10 $\pm$ 0.41### | 3.41 $\pm$ 0.17### |

注：与空白组比较，\*\* $P < 0.01$ ，\*\*\* $P < 0.001$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ，### $P < 0.001$ 。

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

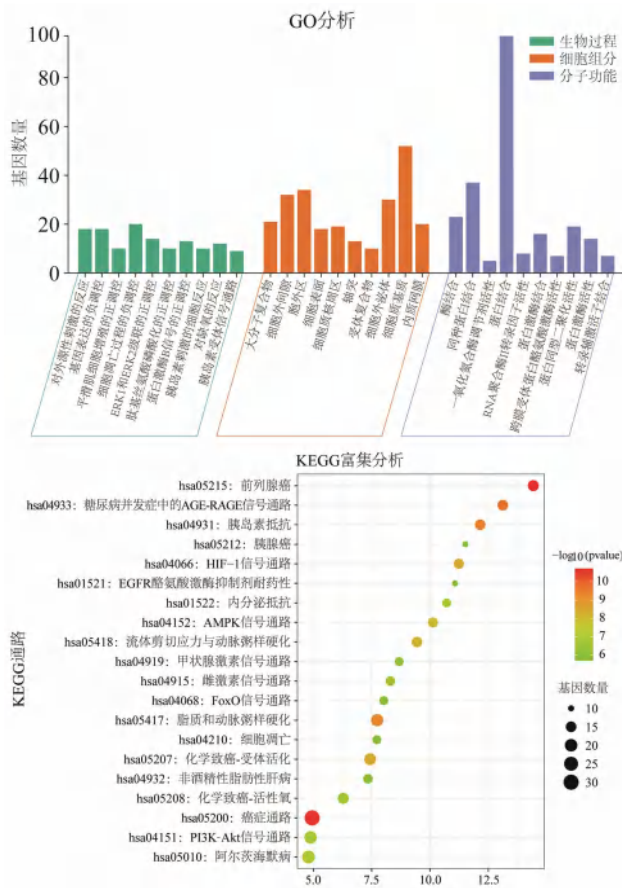


图 2 肝纯片抗 NAFLD 的 GO 功能富集分析和 KEGG 信号通路富集分析

Fig 2 GO functional enrichment analysis and KEGG signaling pathway enrichment analysis of Ganchun tablet for NAFLD

2.8 肝组织病理诊断

分别取各组金黄地鼠肝小叶同一部位的肝组织，4%多聚甲醛固定 48 h，石蜡包埋后，用切片机将组织切为 5 μm 的切片，常规 HE 染料对组织切片进行染色，光镜下观察各组金黄地鼠肝组织的病变情况并采集图像。结果如图 5A 所示，空白组金黄地鼠肝脏表面光滑，呈暗红色；模型组金黄地鼠肝脏表面颜色发白，且肉眼可见灰白色小结节。与模型组相比，肝纯片低、中、高剂

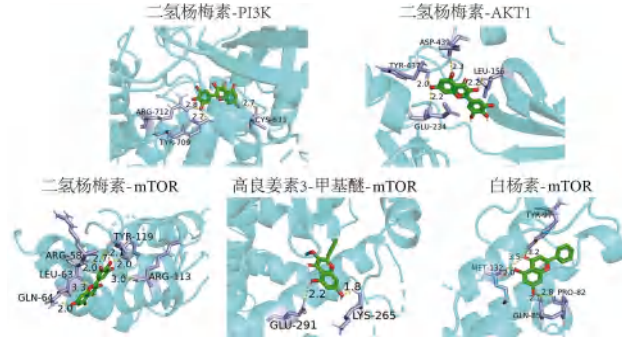


图 4 肝纯片抗 NAFLD 的部分分子对接结果可视化

Fig 4 Visualization of partial molecular docking results of Ganchun tablet for NAFLD

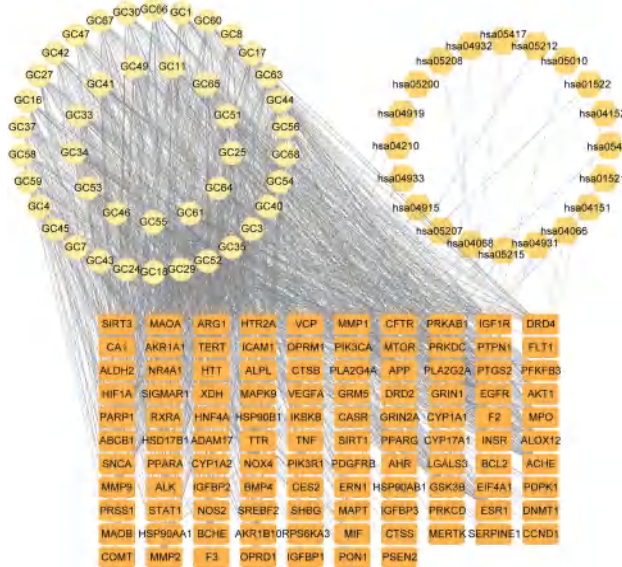


图 3 肝纯片抗 NAFLD 的活性成分-靶点-通路网络

Fig 3 Cytoscape construction of component-targets-pathway network of Ganchun tablet for NAFLD

量干预组金黄地鼠肝脏表面光滑，呈暗红色，灰白色小结节数量减少。HE 染色结果见图 5B，与空白组相比，模型组肝细胞中存在大量脂肪空泡且伴有炎细胞浸润，而肝纯片低、中、高剂量干预组肝细胞中的脂肪空泡明显减少，表明肝纯片可有效改善 NAFLD 金黄地鼠的肝脂肪变性。

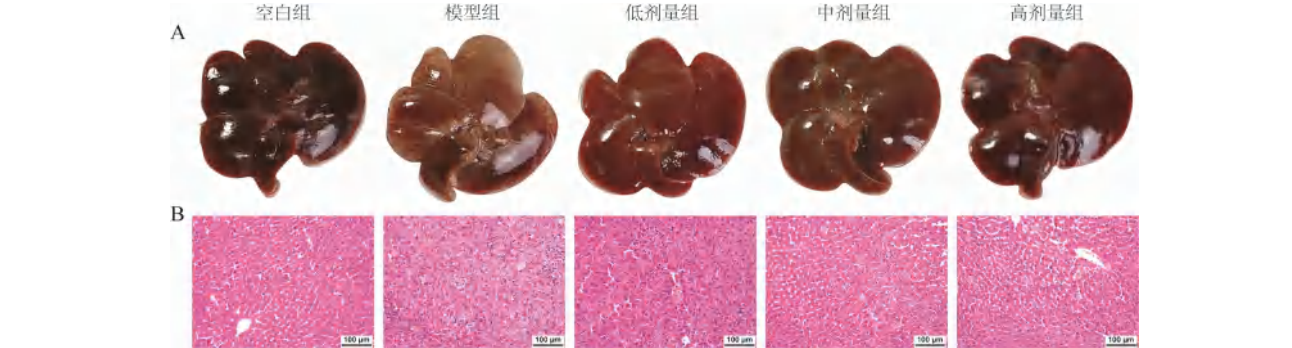


图 5 肝纯片对金黄地鼠肝脏结构的影响

Fig 5 Effect of Ganchun tablets on the liver structure in golden hamsters

A. 各组肝脏形态的代表性图像 (representative images of liver morphology in each group); B. HE 染色 (HE staining) (×200)

## 2.9 血清生化指标检测

金黄地鼠用异氟烷麻醉后,经心脏穿刺抽取血液,3500 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,分离血清,在全自动生物分析仪上对血清 AST、ALT、TG、TC、HDL-C、LDL-C、空腹血糖 (FBG) 进行测定。结果

如图 6 所示,与空白组相比,模型组金黄地鼠血清中的 AST、ALT、TG、TC 和 LDL-C 水平均显著升高;与模型组相比较,肝纯片各剂量组金黄地鼠血清中 AST、ALT、TG、TC 和 LDL-C 水平均显著降低。

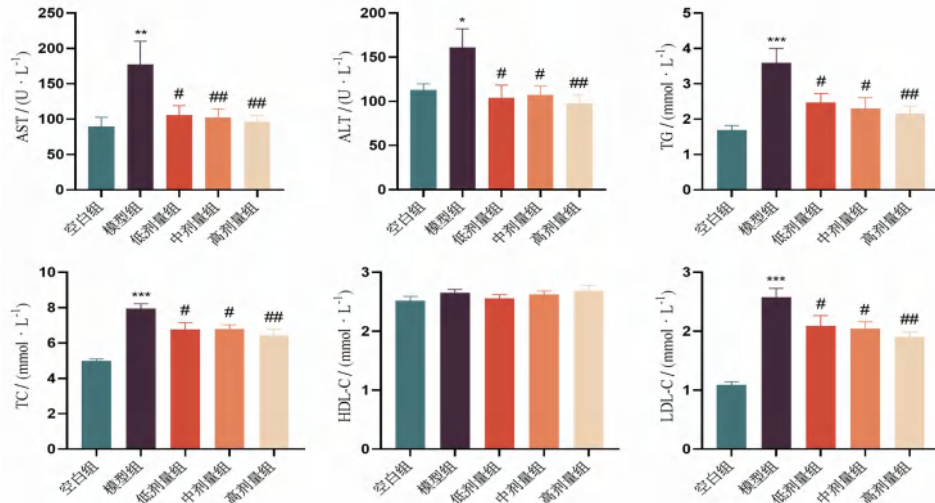


图 6 肝纯片对各组金黄地鼠血清生化指标的影响

Fig 6 Effect of Ganchun tablets on the serum biochemical indexes of golden hamsters in each group

注:与空白组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ;与模型组比较,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$ 。

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

## 2.10 空腹胰岛素水平的检测

根据仓鼠胰岛素 ELISA 试剂盒说明书检测血清胰岛素 (FINS) 水平,计算胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR)<sup>[13]</sup>。结果如图 7 所示,与空白组相比,

模型组的 FBS、FINS 水平和 HOMA-IR 均显著升高;与模型组相比,各治疗组金黄地鼠血清中 FBS 和 HOMA-IR 均显著降低,同时,肝纯片高剂量组的 FINS 水平也显著降低。

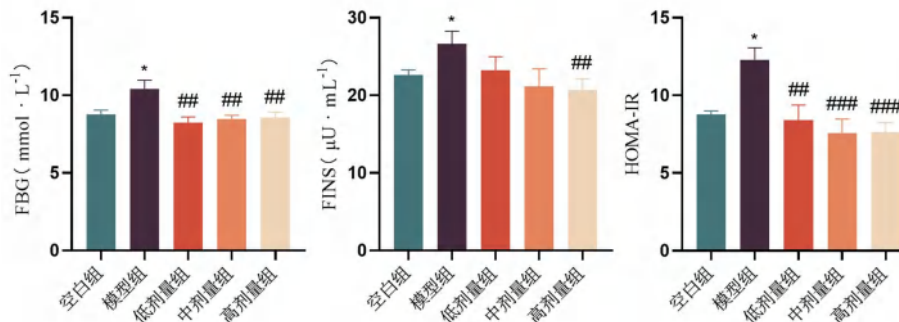


图 7 肝纯片对金黄地鼠胰岛素抵抗指数的影响

Fig 7 Effect of Ganchun tablets on homeostasis model assessment of insulin resistance in golden hamsters

注:与空白组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较,## $P < 0.01$ ,### $P < 0.001$ 。

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

## 2.11 实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测肝组织中 mRNA 表达

采用 RNAeasy 动物 RNA 抽提试剂盒提取肝组织的总 RNA,随后经过逆转录为 cDNA。然后,使用 SYBR Green qPCR Master Mix 试剂盒进行 qPCR。扩增程序为 95℃ 预变性 30 s; 95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火/延伸 30 s, 40 个循环; 95℃ 延伸 10 s。引物序列见表 4。使用  $\beta$ -actin 作为内参基因,并通过

$2^{-\Delta\Delta Ct}$  法来计算目标基因的相对表达量。

结果见图 8,与空白组相比,模型组肝组织中 AKT 和 mTOR 的 mRNA 表达水平均显著降低,PI3K 的表达降低但差异无统计学意义;与模型组相比,肝纯片低剂量组的 PI3K mRNA 表达水平显著升高,中剂量组的 PI3K 和 mTOR 的表达显著升高,高剂量组的 PI3K、AKT 和 mTOR 的表达均显著升高。

## 2.12 数据处理



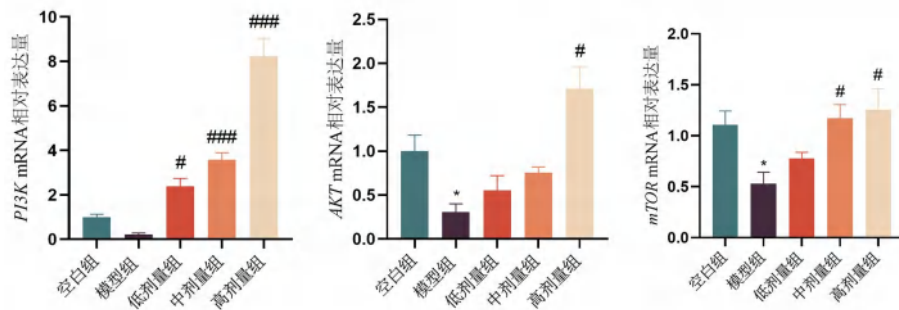


图 8 肝纯片对金黄地鼠 *PI3K/AKT/mTOR* mRNA 表达的影响

Fig 8 Effect of Ganchun tablets on the expression of *PI3K/AKT/mTOR* mRNA in golden hamsters

注：与空白组比较，\* $P < 0.05$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，### $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the blank group, \* $P < 0.05$ ; compared with the model group, # $P < 0.05$ , ### $P < 0.001$ .

表 4 引物序列  
Tab 4 Primer sequence

| 引物             | 序列 (5'-3')                   |
|----------------|------------------------------|
| <i>PI3K</i>    | 上游 CCTCTCCTTATAAAGCTCCTGGAA  |
|                | 下游 GATCACAATCAAGAAGCTGTCGTAA |
| <i>AKT</i>     | 上游 TGGACTACTTGCACTCCGAGAA    |
|                | 下游 TTATCTTGATATGCCCGTCCTT    |
| <i>mTOR</i>    | 上游 CTGGGACTCAAATGTGTGCAGTTC  |
|                | 下游 GAACAATAGGGTGAATGATCCGGG  |
| $\beta$ -actin | 上游 TCACCCACACTGTGCCCATCTA    |
|                | 下游 TTGCTGATCCACATCTGCTGG     |

所有结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示。通过单因素方差分析 (One-way ANOVA) 进行统计学分析, 使用 GraphPad Prism 8.0 进行统计并作图,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

### 3 讨论

显齿蛇葡萄富含黄酮类化合物, 其含量高达 45.5%<sup>[7]</sup>。本研究从肝纯片中共鉴定出 69 个黄酮类化合物, 通过网络药理学方法结合文献研究揭示了二氢杨梅素、柳穿鱼黄素和白杨素等可能是肝纯片抗 NAFLD 的核心化合物。其中, 二氢杨梅素是藤茶中含量最多、生物活性最强的黄酮类化合物之一, 对 NAFLD 有改善作用<sup>[14-15]</sup>。柳穿鱼黄素可通过预防肝细胞铁死亡, 降低氧化应激, 改善对乙酰氨基酚诱导的肝损伤<sup>[16]</sup>。白杨素通过激活 ACE2/Ang (1-7) /Mas 轴, 发挥抗氧化和抗炎作用, 从而减弱果糖诱导的 NAFLD<sup>[17]</sup>。

KEGG 分析显示共同作用靶点主要富集在胰岛素抵抗、AMPK 信号通路、细胞凋亡和 *PI3K-AKT* 信号通路等。胰岛素抵抗在 NAFLD 的发生发展中起着不可或缺的作用。在胰岛素抵抗状态下, 胰岛素无法调节葡萄糖稳态, 但会促进脂质合成, 从而导致脂肪肝和肝细胞损伤<sup>[18]</sup>。*PI3K-AKT* 信号通路在胰岛素信号传导中占据着重要地

位。胰岛素通过与肝细胞表面的胰岛素受体底物结合激活 *PI3K*, 并随后促进 *AKT* 的激活来增加葡萄糖转运蛋白 4 的易位, 从而增强葡萄糖摄取和胰岛素敏感性<sup>[19]</sup>。*mTOR* 作为 *PI3K-AKT* 通路的下游靶点, 存在于 *mTORC1* 和 *mTORC2* 两种复合物中, 能够调节多种细胞信号通路和过程。*AKT* 的募集和激活通过诱导 *TSC1/2* 磷酸化, 进而导致 *mTORC1* 激活, 而 *mTORC1* 通过以 *AKT* 依赖性方式激活胆固醇调节元件结合蛋白来促进脂肪生成<sup>[20-21]</sup>。分子对接结果显示, 二氢杨梅素、杨梅素及柳穿鱼黄素等活性成分与 *AKT1*、*mTOR* 和 *PI3K* 均显示出较强的结合能力, 表明这些靶点可能是肝纯片在治疗 NAFLD 中的潜在作用位点。

为了进一步验证网络药理学结果, 本研究通过高脂饮食诱导金黄地鼠构建 NAFLD 模型。动物实验结果显示模型组的体重、肝脏指数、AST、ALT、TC、TG、LDL-C 等指标均显著升高, 表明 NAFLD 模型构建成功。补充肝纯片不仅逆转了上述指标, 而且降低了 FBS、FINS 水平和 HOMA-IR, 同时将 NAFLD 金黄地鼠的肝脏异常病理状态恢复至相对正常。上述结果表明肝纯片可通过减轻胰岛素抵抗, 调节血脂水平, 发挥治疗 NAFLD 的效果。

文献报道, 高脂饮食诱导可抑制 *PI3K/AKT/mTOR* 通路<sup>[22]</sup>, 本研究结果显示, 模型组金黄地鼠肝组织样本中 *PI3K/AKT/mTOR* 通路受到抑制, 而肝纯片高剂量可显著升高 *PI3K*、*AKT* 和 *mTOR* 的 mRNA 表达水平。然而, 本研究对肝纯片在缓解胰岛素抵抗和 *PI3K/AKT/mTOR* 通路中的具体作用机制尚需进一步深入探究, 这也为后续研究指明了方向。

综上所述, 本研究通过 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 和网络药理学方法发现, 肝纯片的核

心成分包括二氢杨梅素、柳穿鱼黄素、白杨素和高良姜素 3- 甲基醚。动物实验揭示了肝纯片可能通过改善胰岛素抵抗及调节 PI3K/AKT/mTOR 信号通路, 发挥治疗 NAFLD 的作用。本研究不仅为深入理解肝纯片防治 NAFLD 的机制提供了有益的参考视角与探索路径, 也为其未来在临床的广泛应用提供了有力支撑。

## 参考文献

- [1] Liu JY, Wang DM, Xie ZY, et al. Combination of pioglitazone and metformin actions on liver lipid metabolism in obese mice [J]. *Biomolecules*, 2023, 13 (8): 1199.
- [2] Loomba R, Friedman SL, Shulman GI. Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Cell*, 2021, 184 (10): 2537-2564.
- [3] 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组, 中国医师协会脂肪性肝病专家委员会. 非酒精性脂肪性肝病防治指南 (2018 年更新版) [J]. *临床肝胆病杂志*, 2018, 34 (5): 947-957.
- [4] Sun WL, Li XY, Dou HY, et al. Myricetin supplementation decreases hepatic lipid synthesis and inflammation by modulating gut microbiota [J]. *Cell Rep*, 2021, 36 (9): 109641.
- [5] Chen SH, Zhao XL, Wan J, et al. Dihydromyricetin improves glucose and lipid metabolism and exerts anti-inflammatory effects in nonalcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial [J]. *Pharmacol Res*, 2015, 99: 74-81.
- [6] Jiang JP, Yan LY, Shi Z, et al. Hepatoprotective and anti-inflammatory effects of total flavonoids of Qu Zhi Ke (peel of *Citrus changshan-huyou*) on non-alcoholic fatty liver disease in rats via modulation of NF- $\kappa$ B and MAPKs [J]. *Phytomedicine*, 2019, 64: 153082.
- [7] 言剑, 王亮亮, 邱宇, 等. 显齿蛇葡萄中总黄酮的测定 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11 (4): 1225-1230.
- [8] Wan WT, Jiang BP, Sun L, et al. Metabolomics reveals that vine tea (*Ampelopsis grossedentata*) prevents high-fat-diet-induced metabolism disorder by improving glucose homeostasis in rats [J]. *PLoS One*, 2017, 12 (8): e0182830.
- [9] Shang LR, Wang YC, Li JX, et al. Mechanism of Sijunzi decoction in the treatment of colorectal cancer based on network pharmacology and experimental validation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 302 (Pt A): 115876.
- [10] 王文军, 丁一, 窦芳, 等. 分子对接在中药药效物质筛选及作用机制研究中的应用进展 [J]. *中国药师*, 2018, 21 (6): 1020-1023.
- [11] Bhatena J, Kulamarva A, Martoni C, et al. Diet-induced metabolic hamster model of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2011, 4: 195-203.
- [12] Zhao CZ, Jiang L, Li WY, et al. Establishment and metabolomics analysis of nonalcoholic fatty liver disease model in golden hamster [J]. *Z Naturforsch C J Biosci*, 2022, 77 (5-6): 197-206.
- [13] 郝世奇, 李雅菲, 吴晓云, 等. 骆驼乳对非酒精性脂肪肝小鼠糖脂代谢的影响 [J]. *食品工业科技*, 2023, 44 (6): 376-383.
- [14] Zhang QL, Zhao YF, Zhang MY, et al. Recent advances in research on vine tea, a potential and functional herbal tea with dihydromyricetin and myricetin as major bioactive compounds [J]. *J Pharm Anal*, 2021, 11 (5): 555-563.
- [15] Zeng Y, Hua YQ, Wang W, et al. Modulation of SIRT1-mediated signaling cascades in the liver contributes to the amelioration of nonalcoholic steatohepatitis in high fat fed middle-aged LDL receptor knockout mice by dihydromyricetin [J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 175: 113927.
- [16] Zeng YN, Wu R, Wang FZ, et al. Liberation of daidzein by gut microbial  $\beta$ -galactosidase suppresses acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice [J]. *Cell Host Microbe*, 2023, 31 (5): 766-780.
- [17] Attia H, Albekairi N, Albdeirat L, et al. Chrysin attenuates fructose-induced nonalcoholic fatty liver in rats via antioxidant and anti-inflammatory effects: the role of angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin (1-7)/mas receptor axis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 9479456.
- [18] Sakurai Y, Kubota N, Yamauchi T, et al. Role of insulin resistance in MAFLD [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (8): 4156.
- [19] Lv ZW, Ren YY, Li Y, et al. RNA-binding protein GIGYF2 orchestrates hepatic insulin resistance through STAU1/PTEN-mediated disruption of the PI3K/AKT signaling cascade [J]. *Mol Med*, 2024, 30 (1): 124.
- [20] Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, et al. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth [J]. *Cell Metab*, 2008, 8 (3): 224-236.
- [21] Laplante M, Sabatini DM. An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis [J]. *Curr Biol*, 2009, 19 (22): R1046-1052.
- [22] Ferretti RA, Moura EA, Dos Santos VC, et al. High-fat diet suppresses the positive effect of creatine supplementation on skeletal muscle function by reducing protein expression of IGF-PI3K-AKT-mTOR pathway [J]. *PLoS One*, 2013, 13 (10): e0199728.

(收稿日期: 2024-07-05; 修回日期: 2024-09-08)

# HPLC-Q-Exactive-MS/MS 快速鉴定三子散在体外人工胃液、肠液中代谢转化研究

夏慧敏, 孙丽君, 何春龙, 李若凡, 许佳琦, 董馨, 张慧文\*, 王焕芸\* (内蒙古医科大学药学院, 呼和浩特 010110)

**摘要:** **目的** 通过研究三子散在人工胃液、肠液中的代谢转化情况, 推测其在体内的代谢物及代谢转化途径。**方法** 采用高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱(HPLC-Q-Exactive-MS/MS)法, 色谱柱为 SHIMADZU GIST C18 (4.6 mm×150 mm, 5 μm), 柱温为 30℃, 流动相为 0.1% 甲酸水-甲醇溶液(梯度洗脱), 流速为 0.5 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长为 270 nm; 离子源为电喷雾离子源, 质荷比(*m/z*)为 100→1500; 在正、负离子模式下, 对三子散在人工胃液、肠液中的代谢成分进行鉴定分析, 对照三子散中已鉴定出的化学成分并结合文献推测三子散在人工胃液和肠液中的代谢途径。**结果** 三子散经人工胃液代谢后, 共推测出人工胃液中 26 个原形成分, 其中 19 个来自诃子, 6 个来自栀子, 1 个来自川楝子; 人工肠液中 31 个原形成分, 其中 21 个来自诃子, 9 个来自栀子, 1 个来自川楝子; 对比人工胃液、肠液中的代谢物分析结果, 26 个成分在胃液和肠液中均检出, 5 个成分(没食子酸甲酯、Jaminiside B/D/G、咖啡酸、反苯基丙烯酸、6"-*O*-trans-*p*-coumaroylgenipin gentiobioside)仅在肠液中检出。**结论** 本研究初步推测三子散在人工胃液、肠液中多以原形存在, 胃肠道成分代谢有所不同, 可为三子散的体内代谢转化研究提供参考。

**关键词:** 三子散; 代谢; 人工胃液; 人工肠液; HPLC-Q-Exactive-MS/MS 法; 成分分析

中图分类号: R283

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)06-1584-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.013

## Rapid identification of in vitro metabolic transformation of Sanzi powder in artificial gastric juice and intestinal fluid by HPLC-Q-Exactive-MS/MS

XIA Hui-min, SUN Li-jun, HE Chun-long, LI Ruo-fan, XU Jia-qi, DONG Xin, ZHANG Hui-wen\*, WANG Huan-yun\* (School of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110)

**Abstract: Objective** To determine the metabolic transformation of Sanzi powder in artificial gastric and intestinal fluids, and to speculate its metabolites and metabolic transformation pathways in vivo. **Methods** The high-performance liquid chromatography quadrupole/electrostatic field orbital trap high-resolution mass spectrometry (HPLC-Q-Exactive-MS/MS) was used. The chromatographic column was SHIMADZUGIST C18 (4.6 mm×150 mm, 5 μm), the column temperature was 30℃, the mobile phase was 0.1% formic acid water and methanol solution (gradient elution), the flow rate was 0.5 mL·min<sup>-1</sup>, and the detection wavelength was 270 nm. The ion source was an electric spray ion source, and the mass charge ratio (*m/z*) was 100→1500. In both positive and negative ion modes, we identified the metabolic components of Sanzi powder in artificial gastric and intestinal fluids, compared the chemical components in Sanzi powder, and inferred the metabolic pathways of Sanzi powder in artificial gastric and intestinal fluids based on literature. **Results** After being metabolized by artificial gastric juice, 26 prototype components were inferred from Sanzi powder (19 from

**基金项目:** 内蒙古自治区关键技术攻关计划项目 (No.2021GG0176); 内蒙古医科大学青年项目 (No.YKDX2024QN023)。

**作者简介:** 夏慧敏, 女, 研究实习员, 主要从事体内药物分析研究, email: 2943929616@qq.com \*通信作者: 张慧文, 女, 副教授, 主要从事蒙药体内代谢研究, email: bjlemonzhw@126.com; 王焕芸, 女, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事中蒙药体内药物分析研究, email: whuanyun999@163.com



Myrobalan, 6 from Gardenia, and 1 from Toosendan Fructus). There were 31 prototype components in the artificial intestinal fluid (21 from Myrobalan, 9 from Gardenia, and 1 from Toosendan Fructus). Totally 26 components were detected in both gastric and intestinal fluids, while 5 components (methyl gallate, jaminiside B/D/G, caffeic acid, trans phenylpropanoid acid, 6"-O-trans-p-coumaroylgenipin gentiobinoside) were only detected in the intestinal fluid. **Conclusion** Sanzi powder is mainly present as prototype components in the artificial gastric and intestinal fluids. The metabolism of components (methyl gallate, jaminiside B/D/G, caffeic acid, trans phenylpropanoid and 6"-O-trans-p-coumaroylgenipin gentiobinoside) varies in the gastric and intestinal fluids, providing a reference for the in vivo metabolic transformation research of Sanzi powder.

**Key words:** Sanzi powder; metabolism; artificial gastric juice; artificial intestinal fluid; HPLC-Q-Exactive-MS/MS method; component analysis

蒙药复方制剂三子散, 蒙文名为图喜木勒-3, 由诃子、川楝子、梔子 3 味药材等比例组成, 最早收载于《四部医典》<sup>[1]</sup>, 现收载于 2020 年版《中国药典》<sup>[2]</sup>。三子散可以治疗与血、热、湿有关的疾病, 具有清热解毒、凉血、祛湿、止血等多种功效。课题组前期采用 HPLC-Q-Exactive-MS/MS 法对三子散复方中的化学成分进行定性分析, 主要包括酚酸类、鞣质类、有机酸酯类、环烯醚萜类和萜类等成分。

目前, 大多数药物仍采用口服方式给药, 胃、肠是口服给药的重要消化吸收器官, 胃肠中有大量菌群及消化酶, 口服药物通过胃肠吸收后进入体循环, 胃肠在药物的吸收代谢方面发挥重要作用<sup>[3]</sup>。

本实验采用 HPLC-Q-Exactive-MS/MS 法快速鉴定分析三子散在体外人工胃液、肠液中的代谢物, 运用 Xcalibur 3.0 软件结合成分分子式、结构式、保留时间等对质谱数据进行分析, 采用 Compound Discover 软件结合三子散复方相关文献中已鉴定出的化学成分的质谱信息进行对照, 总结体外三子散在人工胃液、肠液中的代谢成分及代谢途径, 阐明三子散发挥药效的物质基础。

## 1 材料

### 1.1 仪器

HPLC-Q-Exactive 高效液相色谱-质谱联用系统: Ultimate 3000 高效液相色谱系统(美国戴安公司), Q-Exactive 高分辨质谱仪(美国赛默飞世尔科技公司); AB135-S 型十万分之一分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); KQ-250DA 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); WH-1 微型涡旋混合仪(上海沪西分析仪器厂); SIGMA 低温高速离心机(德国 CHRIST 公司); SHA-CA 型水浴恒温振荡器(江宁市江南仪器厂)。

### 1.2 试药

诃子 *Terminalia chebula* Retz. (批号: 18042801, 产地: 广西); 梔子 *Gardenia jasminoides* Ellis. (批号: 171001429, 产地: 江西); 川楝子 *Melia toosendan* Sieb.et Zucc. (批号: 170801, 产地: 四川), 经内蒙古医科大学药学院生药教研室张慧文博士鉴定, 均符合 2020 年版《中国药典》一部项下规定的性状。

胃蛋白酶(批号: 900-75-6, Solarbio), 胰蛋白酶(批号: 900-207-7, Coolaber), 氢氧化钠(NaOH)、浓盐酸、磷酸二氢钾均为市售分析纯, 甲醇(色谱纯, Fisher Scientific), 水为超纯水。

## 2 方法

### 2.1 HPLC-Q-Exactive-MS/MS 条件

色谱条件: SHIMADZU GIST C18 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm); 柱温 30℃; 流速 0.5 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量 10 μL, 流动相为 0.1% 甲酸水(A)-甲醇(B), 梯度洗脱(0~10 min, 1%~15%B; 10~30 min, 15%~30%B; 30~45 min, 30%~35%B; 45~75 min, 35%~47%B; 75~85 min, 47%~85%B; 85~95 min, 85%~90%B)。

质谱条件: 离子源为 HESI 源; 正、负离子模式下分别检测, 正离子检测模式下辅助气体体积流量 30 L·min<sup>-1</sup>, 喷雾电压 4.00 kV, 离子传输管温度 300℃, 辅助气温度 100℃, 碰撞能量 45 eV, 检测方式为 Full-MS/dd-MS<sup>2</sup>; 负离子检测模式下辅助气体体积流量 30 L·min<sup>-1</sup>, 喷雾电压 3.5 kV, 离子传输管温度 300℃, 辅助气温度 100℃, 碰撞能量 30 eV, 检测方式为 Full-MS/dd-MS<sup>2</sup>, Full-MS 分辨率 70 000, dd-MS<sup>2</sup> 分辨率 17 500, 扫描范围 *m/z* 100~1500。

### 2.2 供试品溶液的制备

称取适量三子散冻干粉, 加入 50 mL 0.5% 羧

甲基纤维素钠 (CMC-Na) 溶液, 配制成质量浓度为  $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的三子散混悬液。

### 2.3 人工胃液、肠液的制备

**2.3.1 人工胃液的制备** 依据《中国药典》2020 年版<sup>[4]</sup>, 取 2.34 mL 浓盐酸加纯化水定容至 10 mL 量瓶中稀释, 取配制好的稀盐酸 1.64 mL, 加 80 mL 纯化水合胃蛋白酶 1 g, 摇匀, 加纯化水定容至 100 mL 量瓶中, 即得人工胃液。

**2.3.2 人工肠液的制备** 依据《中国药典》2020 年版<sup>[4]</sup>, 称取磷酸二氢钾 0.68 g, 加纯化水 50 mL 使溶解, 用 0.4% NaOH 溶液调节溶液 pH 值为 6.8, 加入胰蛋白酶 1 g, 加纯化水溶解, 加水定容至 100 mL 量瓶中, 即得人工肠液。

### 2.4 体外胃液、肠液孵育三子散样品的制备

**2.4.1 人工胃液孵育三子散样品的制备**<sup>[5]</sup> 取三子散样品混悬液 1 mL 置于 10 mL 的 EP 试管中, 加入人工胃液 5 mL, 平行制备 6 份样品, 混匀后将其放入水浴恒温振荡器中,  $37^\circ\text{C}$ 、 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  振荡 1 h 后, 取 200  $\mu\text{L}$  于 1.5 mL 离心管中, 加入  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH 调节溶液 pH 值至 7, 使胃蛋白酶失活,  $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, 取上清液, 置于进样瓶中, HPLC-Q-Exactive-MS/MS 法检测。

**2.4.2 人工肠液孵育三子散样品的制备**<sup>[5]</sup> 取三子散样品混悬液 1 mL 置于 10 mL 的 EP 试管中, 并加入人工肠液 5 mL, 平行制备 6 份样品, 混匀后将其放入水浴恒温振荡器中,  $37^\circ\text{C}$ 、 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  振荡 1 h 后, 取样 200  $\mu\text{L}$  于 1.5 mL 离心管中, 加入  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH 调节溶液 pH 值至 7, 使胰蛋白酶失活,  $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, 取上清液, 置于进样瓶中, HPLC-Q-Exactive-MS/MS 法检测。

### 2.5 三子散体外胃液、肠液原型及代谢产物的鉴定

查阅 ChemSpider 数据库和三子散成分的相关文献, 收集整理蒙药三子散中化合物的化学式和结构式, 采用 Xcalibur 3.0 软件进行峰提取、峰匹配等质谱数据处理, 质谱偏差范围  $\delta \leq 5 \text{ ppm}$  ( $1 \times 10^{-6}$ ), 二级质谱范围  $3.35 \times 10^{-7} \sim 6.98 \times 10^{-3}$ , 结合三子散相关文献信息及课题组前期三子散中已鉴定出的化学成分<sup>[6]</sup>, 对三子散在人工胃、肠液中的代谢物进行鉴定。

## 3 结果

采用 HPLC-Q-Exactive-MS/MS 技术对孵育后的胃液、肠液进行成分鉴定, 通过对比保留时间、精确质谱信息等, 初步推测出人工胃液中 26 个原形成分, 其中 19 个来自诃子, 6 个来自梔子, 1 个来自川楝子; 人工肠液中 31 个原形成分, 其

中 21 个来自诃子, 9 个来自梔子, 1 个来自川楝子; 其中, 26 个成分在胃液和肠液中均检出, 5 个成分 (没食子酸甲酯、Jaminiside B/D/G、咖啡酸、反苯基丙烯酸、6"-O-trans-p-coumaroylgenipin gentiobioside) 在肠液中检测出, 在胃液中未检测到, 结果见图 1 及表 1 ~ 2<sup>[6-21]</sup>。

## 4 讨论

蒙药是蒙古族在长期与疾病斗争实践中积累的智慧结晶, 是我国民族医药的重要组成部分。蒙药的现代化研究需要采用现代科学技术手段系统地对蒙药复方的药效物质基础进行研究, 只有阐明蒙药中能够发挥药理作用的活性成分, 才能明确蒙药的有效成分群, 提高蒙药新药研制的整体水平。蒙药传统验方有 3000 余种, 其中常用的有 400 种左右, 且绝大多数为复方, 并且以口服给药为主, 因此胃、肠成为蒙药复方吸收的重要场所, 进行蒙药复方在胃液、肠液中的代谢转化研究, 对于阐明蒙药物质基础具有重要意义。

体外实验通过模拟体内胃肠环境<sup>[21]</sup>, 研究药物在胃肠的吸收代谢规律, 此方法可以有效地排除体内的其他干扰因素, 更好地控制某些代谢条件, 具有简单易行的优势, 对于一些药效物质基础尚不明确的药物, 能够简单迅速地掌握其化学成分及其在胃、肠中的代谢产物及代谢途径, 尤其是对于一些初步筛选和机制探讨的研究, 体外实验可能更为经济高效。活生物体在由膜空间组织的环境中, 由至少数万个基因、蛋白质分子、RNA 分子、小有机化合物、无机离子和复合物组成, 是极其复杂的功能系统, 这种复杂性使得人们难以识别各个组分之间的相互作用, 且难以探索它们的基本生物学功能, 体外实验工作简化了复杂的功能系统, 更简单、更方便地达到实验目的, 因此体外实验也成为研究药物在胃、肠内吸收代谢的一种有效方法。

本实验采用 HPLC-Q-Exactive-MS/MS 技术, 对三子散在体外人工胃液、肠液代谢转化成分进行研究, 初步推测出人工胃液中 26 个原形成分, 人工肠液中 31 个原形成分; 其中, 26 个成分在胃液和肠液中均检出, 5 个成分 (没食子酸甲酯、Jaminiside B/D/G、咖啡酸、反苯基丙烯酸、6"-O-trans-p-coumaroylgenipin gentiobioside) 仅在肠液中检测出, 在胃液中未检测到。本实验为深入研究三子散的药效物质基础及新药研发提供依据, 并为其他蒙药复方的有效物质基础研究提供参考方法。

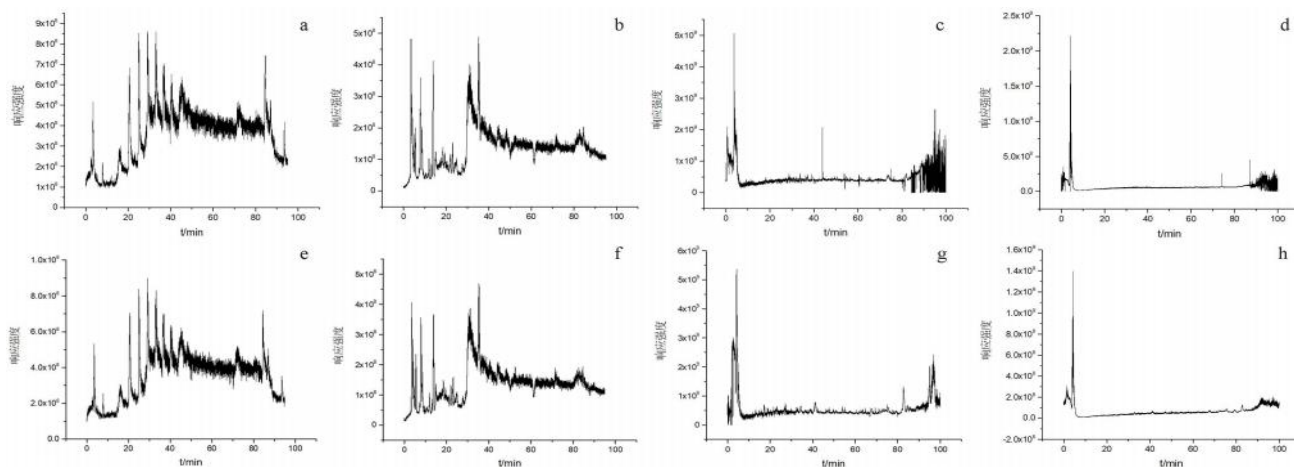


图 1 空白人工胃液、肠液及三子散在人工胃液、肠液中孵育后的正 (A)、负 (B) 总离子流图  
Fig 1 Positive and negative total ion flow of blank artificial gastric and intestinal fluid and Sanzi powder after incubation in artificial gastric and intestinal fluid

a, b. 三子散在人工胃液的总离子流图 (total ion chromatogram of Sanzi powder in the artificial gastric juice); c, d. 空白人工胃液的总离子流图 (total ion chromatogram of blank artificial gastric juice); e, f. 空白人工肠液的总离子流图 (total ion chromatogram of blank artificial intestinal fluid)

表 1 三子散在体外人工胃液代谢的化合物信息  
Tab 1 Compounds metabolized by Sanzi powder in artificial gastric fluid in vitro

| No. | 名称                       | 保留时间 /min | 分子式                  | 理论值      | 实际值      | 离子模式      | 离子碎片                                                                                                                                                               | 误差 / ( $\times 10^{-6}$ ) | 来源 | 分类 | 文献   |
|-----|--------------------------|-----------|----------------------|----------|----------|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|----|----|------|
| 1   | 奎宁酸                      | 4.17      | $C_7H_{12}O_6$       | 191.0550 | 191.0564 | $[M-H]^-$ | 173.0458 $[M-H-H_2O]^-$ ,<br>127.0392 $[M-H-2H_2O-CO]^-$                                                                                                           | 1.356                     | H  | 酚酸 | [12] |
| 2   | 莽草酸                      | 5.56      | $C_7H_{10}O_5$       | 173.0444 | 173.0454 | $[M-H]^-$ | 155.0345 $[M-H-H_2O]^-$ ,<br>137.0240 $[M-H-2H_2O]^-$                                                                                                              | 0.910                     | H  | 酚酸 | [12] |
| 3   | 2, 3, - (S) -HHDP-D- 葡萄糖 | 7.74      | $C_{20}H_{18}O_{14}$ | 481.0628 | 481.0646 | $[M-H]^-$ | 301.0007 $[M-H-glu]^-$                                                                                                                                             | 1.482                     | H  | 鞣质 | [13] |
| 4   | 诃子酸                      | 9.39      | $C_{14}H_{12}O_{11}$ | 355.0296 | 355.0330 | $[M-H]^-$ | 337.0224 $[M-H-H_2O]^-$ ,<br>293.0321 $[M-H-H_2O-CO_2]^-$ ,<br>249.0416 $[M-H-H_2O-2CO_2]^-$ ,<br>205.0512 $[M-H-H_2O-3CO_2]^-$ ,<br>161.0606 $[M-H-H_2O-4CO_2]^-$ | 3.432                     | H  | 酚酸 | [14] |
| 5   | 6-O- 没食子酰葡萄糖             | 10.54     | $C_{13}H_{16}O_{10}$ | 331.0660 | 331.0689 | $[M-H]^-$ | 271.0476, 211.0255 $[M-H-C_4H_8O_4]^-$ ,<br>169.0143 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$ ,<br>125.0242 $[M-H-C_6H_{10}O_5-CO_2]^-$                                              | 2.937                     | H  | 酚酸 | [12] |
| 6   | 2-O- 没食子酰葡萄糖             | 11.86     | $C_{13}H_{16}O_{10}$ | 331.0660 | 331.0690 | $[M-H]^-$ | 211.0255 $[M-H-C_4H_8O_4]^-$ ,<br>169.0140 $[M-H-C_4H_8O_4-C_2H_2O]^-$ ,<br>125.0241 $[M-H-C_4H_8O_4-C_2H_2O-CO_2]^-$                                              | 2.937                     | H  | 酚酸 | [12] |
| 7   | 1-O- 没食子酰葡萄糖             | 13.31     | $C_{13}H_{16}O_{10}$ | 331.0660 | 331.0692 | $[M-H]^-$ | 211.0253 $[M-H-C_4H_8O_4]^-$ ,<br>169.0140 $[M-H-C_4H_8O_4-C_2H_2O]^-$ ,<br>125.0238 $[M-H-C_4H_8O_4-C_2H_2O-CO_2]^-$                                              | 3.267                     | H  | 酚酸 | [12] |
| 8   | 3, 6-二-O- 没食子酰基-β-D- 葡萄糖 | 13.70     | $C_{20}H_{20}O_{14}$ | 483.0769 | 483.0803 | $[M-H]^-$ | 331.0693 $[M-H-galloyl]^-$ ,<br>313.0596 $[M-H-galloyl-H_2O]^-$ ,<br>211.0246 $[M-H-galloyl-C_4H_8O_4]^-$ ,<br>169.0141 $[M-H-galloyl-C_6H_{10}O_5]^-$             | 3.328                     | H  | 酚酸 | [12] |
| 9   | 没食子酸                     | 13.94     | $C_7H_6O_5$          | 169.0131 | 169.0141 | $[M-H]^-$ | 125.0238 $[M-H-CO_2]^-$                                                                                                                                            | 0.920                     | H  | 酚酸 | [17] |
| 10  | 石榴皮鞣素                    | 14.46     | $C_{34}H_{22}O_{22}$ | 781.0519 | 781.0590 | $[M-H]^-$ | 600.9929 $[M-H-glu]^-$                                                                                                                                             | - 3.928                   | H  | 鞣质 | [15] |
| 11  | 诃子酸 / 异构体                | 15.71     | $C_{14}H_{12}O_{11}$ | 355.0296 | 355.0331 | $[M-H]^-$ | 293.0312 $[M-H-H_2O-CO_2]^-$ ,<br>249.0413 $[M-H-H_2O-2CO_2]^-$ ,<br>205.0513 $[M-H-H_2O-3CO_2]^-$ ,<br>160.9757 $[M-H-H_2O-4CO_2]^-$                              | 3.492                     | H  | 酚酸 | [14] |
| 12  | 5- 羟甲基糠醛                 | 15.92     | $C_6H_6O_3$          | 125.0233 | 125.0239 | $[M-H]^-$ | 78.9578 $[M-H-CHO-OH]^-$                                                                                                                                           | 0.529                     | C  | 酚酸 | [16] |



续表 1

| No. | 名称                                                               | 保留时间 /min | 分子式                                             | 理论值      | 实际值      | 离子模式                 | 离子碎片                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 误差 /<br>( $\times 10^{-6}$ ) | 来源 | 分类   | 文献   |
|-----|------------------------------------------------------------------|-----------|-------------------------------------------------|----------|----------|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|----|------|------|
| 13  | 1, 3-二-O-没食子酰基- $\beta$ -D-葡萄糖                                   | 15.94     | C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>14</sub> | 483.0769 | 483.0801 | [M-H] <sup>-</sup>   | 313.0587[M-H-galloyl-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> ,<br>169.0141[M-H-galloyl-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup> ,<br>211.0256[M-H-galloyl-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup> ,<br>169.0141[M-H-galloyl-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup> | 3.118                        | H  | 酚酸   | [12] |
| 14  | 1, 6-二-O-没食子酰基- $\beta$ -D-葡萄糖                                   | 17.95     | C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>14</sub> | 483.0769 | 483.0806 | [M-H] <sup>-</sup>   | 331.0689[M-H-galloyl] <sup>-</sup> ,<br>313.0583[M-H-galloyl-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> ,<br>211.0256[M-H-galloyl-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup> ,<br>169.0141[M-H-galloyl-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>                                                | 3.638                        | H  | 酚酸   | [12] |
| 15  | 1, 4-二-O-没食子酰基- $\beta$ -D-葡萄糖                                   | 18.1      | C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>14</sub> | 483.0769 | 483.0822 | [M-H] <sup>-</sup>   | 331.0690[M-H-galloyl] <sup>-</sup> ,<br>313.0589[M-H-galloyl-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> ,<br>169.0141[M-H-galloyl-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>                                                                                                                                      | - 0.002                      | H  | 酚酸   | [12] |
| 16  | 山梔苷甲酯                                                            | 19.08     | C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>11</sub> | 405.1548 | 405.1587 | [M-H] <sup>-</sup>   | 359.1523[M-H-CO-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> ,<br>197.0980[H-CO-H <sub>2</sub> O-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ]                                                                                                                                                                                      | 3.872                        | Z  | 环烯醚萜 | [8]  |
| 17  | 山梔苷                                                              | 19.65     | C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub> | 391.1263 | 391.1261 | [M-H] <sup>-</sup>   | 229.0724[M-H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup> ,<br>185.0826[M-H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> ,<br>167.0711[M-H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -H <sub>2</sub> O-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>                              | 2.612                        | Z  | 环烯醚萜 | [19] |
| 18  | (-)-莽草酸 4-O-没食子酸盐 /<br>(-)-莽草酸 3-O-没食子酸盐 /<br>(-)-莽草酸 -5-O-没食子酸盐 | 19.75     | C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>  | 325.0554 | 325.0585 | [M-H] <sup>-</sup>   | 169.0141[M-H-C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup> ,<br>125.0238[M-H-C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> -CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>                                                                                                                                                 | 3.092                        | H  | 酚酸   | [12] |
| 19  | (-)-莽草酸 4-O-没食子酸盐 /<br>(-)-莽草酸 3-O-没食子酸盐 /<br>(-)-莽草酸 -5-O-没食子酸盐 | 21.11     | C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>  | 325.0554 | 325.0600 | [M-H] <sup>-</sup>   | 169.0141[M-H-C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup> ,<br>125.0238[M-H-C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> -CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>                                                                                                                                                 | 4.622                        | H  | 酚酸   | [12] |
| 20  | (-)-莽草酸 4-O-没食子酸盐 /<br>(-)-莽草酸 3-O-没食子酸盐 /<br>(-)-莽草酸 -5-O-没食子酸盐 | 21.48     | C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>  | 325.0554 | 325.0580 | [M-H] <sup>-</sup>   | 169.0141[M-H-C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup> ,<br>125.0238[M-H-C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> -CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>                                                                                                                                                 | 2.602                        | H  | 酚酸   | [12] |
| 21  | 原儿茶酸                                                             | 22.01     | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>    | 153.0182 | 153.0191 | [M-H] <sup>-</sup>   | 109.0288[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                             | 0.855                        | Z  | 酚酸   | [10] |
| 22  | 京尼平-1, 10-二-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷                                 | 30.98     | C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub> | 551.1970 | 551.1971 | [M + H] <sup>+</sup> | 209.0810[M-H-C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>                                                                                                                                                                                                | 0.093                        | Z  | 环烯醚萜 | [22] |
| 23  | 京尼平                                                              | 35.68     | C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>  | 227.0914 | 227.0909 | [M + H] <sup>+</sup> | 209.0806[M + H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                           | - 0.470                      | Z  | 环烯醚萜 | [11] |
| 24  | 京尼平苷                                                             | 35.74     | C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub> | 389.1442 | 389.1442 | [M + H] <sup>+</sup> | 226.9196[M + H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup> ,<br>209.0810[M + H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> ,<br>125.0963[M + H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>            | - 0.853                      | Z  | 环烯醚萜 | [12] |
| 25  | 没食子酸乙酯                                                           | 40.39     | C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>   | 197.0444 | 197.0462 | [M-H] <sup>-</sup>   | 169.0507[M-H-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ] <sup>-</sup> ,<br>125.0240[M-H-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>                                                                                                                                                                               | 1.720                        | H  | 酚酸   | [14] |
| 26  | 鞣花酸                                                              | 67.40     | C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>   | 300.9978 | 301.0007 | [M-H] <sup>-</sup>   | 283.0110[M-H-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                             | 2.776                        | H  | 酚酸   | [10] |

注: H 为诃子; Z 为梔子; C 为川楝子。

Note: H represented Myrobalan; Z represented Gardenia; C represented Toosendan Fructus.

表 2 三子散在体外人工肠液代谢的化学物信息  
Tab 2 Compounds metabolized by Sanzi powder in artificial intestinal fluid in vitro

| No. | 名称                  | 保留时间 | 分子式                                             | 理论值      | 实际值      | 离子模式               | 离子碎片                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 误差 /<br>( $\times 10^{-6}$ ) | 来源 | 分类 | 文献   |
|-----|---------------------|------|-------------------------------------------------|----------|----------|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|----|----|------|
| 1   | 奎宁酸                 | 4.99 | C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>   | 191.0550 | 191.0565 | [M-H] <sup>-</sup> | 173.0450[M-H-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> ,<br>127.0396[M-H-2H <sub>2</sub> O-CO] <sup>-</sup>                                                                                                                                                                                                                       | 1.445                        | H  | 酚酸 | [14] |
| 2   | 2, 3-(S)-HHDP-D-葡萄糖 | 5.43 | C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>14</sub> | 481.0613 | 481.0627 | [M-H] <sup>-</sup> | 301.0006[M-H-glu] <sup>-</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 3.358                        | H  | 鞣质 | [15] |
| 3   | 莽草酸                 | 5.56 | C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>   | 173.0444 | 173.0456 | [M-H] <sup>-</sup> | 155.0346[M-H-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> ,<br>137.0240[M-H-2H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>                                                                                                                                                                                                                          | 1.160                        | H  | 酚酸 | [14] |
| 4   | 诃子酸                 | 9.18 | C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>11</sub> | 355.0296 | 355.0330 | [M-H] <sup>-</sup> | 337.0222[M-H-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> ,<br>293.0324[M-H-H <sub>2</sub> O-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> ,<br>249.0416[M-H-H <sub>2</sub> O-2CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> ,<br>205.0512[M-H-H <sub>2</sub> O-3CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> ,<br>161.0606[M-H-H <sub>2</sub> O-4CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> | 3.402                        | H  | 酚酸 | [16] |

续表 2

| No. | 名称                                                                                          | 保留<br>时间 | 分子式                                             | 理论值      | 实际值      | 离子模式                 | 离子碎片                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 误差 /<br>( $\times 10^{-6}$ ) | 来源 分类 文献        |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-------------------------------------------------|----------|----------|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-----------------|
| 5   | 6- <i>O</i> -没食子酰葡萄糖                                                                        | 10.71    | C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub> | 331.0660 | 331.0689 | [M-H] <sup>-</sup>   | 271.0474, 211.0255[M-H-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup> ,<br>169.0141[M-H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup> ,<br>125.0238[M-H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>                                                     | 2.907                        | H 酚酸 [14]       |
| 6   | 2- <i>O</i> -没食子酰葡萄糖                                                                        | 13.25    | C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub> | 331.0660 | 331.0692 | [M-H] <sup>-</sup>   | 211.0255[M-H-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup> ,<br>169.0141[M-H-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> -C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> ,<br>125.0240[M-H-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> -C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> | 3.207                        | H 酚酸 [14]       |
| 7   | 3, 6-二- <i>O</i> -没食子酰基- $\beta$ -D-葡萄糖                                                     | 13.74    | C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>14</sub> | 483.0769 | 483.0822 | [M-H] <sup>-</sup>   | 331.0693[M-H-galloyl] <sup>-</sup> ,<br>313.0586[M-H-galloyl-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> ,<br>211.0261[M-H-galloyl-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup> ,<br>169.0141[M-H-galloyl-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>                                              | - 0.002                      | H 酚酸 [14]       |
| 8   | 没食子酸                                                                                        | 13.94    | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>    | 169.0131 | 169.0141 | [M-H] <sup>-</sup>   | 125.0238[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                           | 0.930                        | H 酚酸 [19]       |
| 9   | 石榴皮鞣素                                                                                       | 14.26    | C <sub>34</sub> H <sub>22</sub> O <sub>22</sub> | 781.0519 | 781.0480 | [M-H] <sup>-</sup>   | 600.9929[M-H-glu] <sup>-</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                        | - 3.928                      | H 鞣质 [17]       |
| 10  | 1- <i>O</i> -没食子酰葡萄糖                                                                        | 14.97    | C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub> | 331.0660 | 331.0693 | [M-H] <sup>-</sup>   | 211.0255[M-H-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup> ,<br>169.0141[M-H-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> -C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> ,<br>125.0242[M-H-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> -C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> | 3.367                        | H 酚酸 [14]       |
| 11  | 1, 4-二- <i>O</i> -没食子酰基- $\beta$ -D-葡萄糖                                                     | 15.12    | C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>14</sub> | 483.0769 | 483.0788 | [M-H] <sup>-</sup>   | 331.0691[M-H-galloyl] <sup>-</sup> ,<br>313.0581[M-H-galloyl-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> ,<br>169.0141[M-H-galloyl-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>                                                                                                                                    | 1.868                        | H 酚酸 [14]       |
| 12  | 5-羟甲基糠醛                                                                                     | 15.21    | C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>    | 125.0233 | 125.0233 | [M-H] <sup>-</sup>   | 78.9581[M-H-CHO-OH] <sup>-</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                      | - 0.301                      | C 酚酸 [18]       |
| 13  | 诃子酸 / 异构体                                                                                   | 15.72    | C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>11</sub> | 355.0296 | 355.0331 | [M-H] <sup>-</sup>   | 293.0327[M-H-H <sub>2</sub> O-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> ,<br>249.0420[M-H-H <sub>2</sub> O-2CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> ,<br>205.0512[M-H-H <sub>2</sub> O-3CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> ,<br>161.0606[M-H-H <sub>2</sub> O-4CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>                                                 | 3.552                        | H 酚酸 [16]       |
| 14  | 1, 3-二- <i>O</i> -没食子酰基- $\beta$ -D-葡萄糖                                                     | 15.94    | C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>14</sub> | 483.0769 | 483.0801 | [M-H] <sup>-</sup>   | 331.0704[M-H-galloyl] <sup>-</sup> ,<br>313.0580[M-H-galloyl-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> ,<br>169.0140[M-H-galloyl-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>                                                                                                                                    | 3.118                        | H 酚酸 [14]       |
| 15  | 1, 6-二- <i>O</i> -没食子酰基- $\beta$ -D-葡萄糖                                                     | 17.95    | C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>14</sub> | 483.0769 | 483.0806 | [M-H] <sup>-</sup>   | 331.0689[M-H-galloyl] <sup>-</sup> ,<br>313.0583[M-H-galloyl-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> ,<br>211.0256[M-H-galloyl-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup> ,<br>169.0141[M-H-galloyl-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>                                              | 3.638                        | H 酚酸 [14]       |
| 16  | 山柰苷                                                                                         | 19.62    | C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub> | 391.1263 | 391.1265 | [M-H] <sup>-</sup>   | 229.0722[M-H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup> ,<br>185.0820[M-H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> ,<br>167.0712[M-H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -H <sub>2</sub> O-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>                            | 3.012                        | Z 环烯 [21]<br>醚萜 |
| 17  | (-)-莽草酸 4- <i>O</i> -没食子酸盐 /<br>(-)-莽草酸 3- <i>O</i> -没食子酸盐 /<br>(-)-莽草酸 -5- <i>O</i> -没食子酸盐 | 19.7     | C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>  | 325.0554 | 325.0584 | [M-H] <sup>-</sup>   | 169.0141[M-H-C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup> ,<br>125.0238[M-H-C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> -CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>                                                                                                                                               | 2.972                        | H 酚酸 [14]       |
| 18  | (-)-莽草酸 4- <i>O</i> -没食子酸盐 /<br>(-)-莽草酸 3- <i>O</i> -没食子酸盐 /<br>(-)-莽草酸 -5- <i>O</i> -没食子酸盐 | 21.08    | C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>  | 325.0554 | 325.0569 | [M-H] <sup>-</sup>   | 169.0141[M-H-C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup> ,<br>125.0238[M-H-C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> -CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>                                                                                                                                               | 1.442                        | H 酚酸 [14]       |
| 19  | (-)-莽草酸 4- <i>O</i> -没食子酸盐 /<br>(-)-莽草酸 3- <i>O</i> -没食子酸盐 /<br>(-)-莽草酸 -5- <i>O</i> -没食子酸盐 | 22.29    | C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>  | 325.0554 | 325.0582 | [M-H] <sup>-</sup>   | 169.0141[M-H-C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup> ,<br>125.0238[M-H-C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> -CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>                                                                                                                                               | 1.662                        | H 酚酸 [14]       |
| 20  | 原儿茶酸                                                                                        | 23.36    | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>    | 153.0182 | 153.0189 | [M-H] <sup>-</sup>   | 109.0287[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                           | 0.705                        | Z 酚酸 [8]        |
| 21  | 山柰苷甲酯                                                                                       | 25.34    | C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>11</sub> | 405.1548 | 405.1587 | [M-H] <sup>-</sup>   | 359.1527[M-H-CO-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> ,<br>197.0990[M-H-CO-H <sub>2</sub> O-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>                                                                                                                                                                     | 3.872                        | Z 环烯 [9]<br>醚萜  |
| 22  | 没食子酸甲酯                                                                                      | 28.05    | C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>    | 183.0288 | 183.0300 | [M-H] <sup>-</sup>   | 168.0060[M-H-CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup> ,<br>124.0157[M-H-CH <sub>3</sub> -CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>                                                                                                                                                                                                         | 1.170                        | H 酚酸 [16]       |
| 23  | Jasminoside B/D/G                                                                           | 28.27    | C <sub>16</sub> H <sub>26</sub> O <sub>8</sub>  | 349.1857 | 349.1826 | [M + H] <sup>+</sup> | 167.1059[M + H-glu] <sup>+</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                      | - 1.644                      | Z 单萜 [11]       |
| 24  | 京尼平-1, 10-二- <i>O</i> - $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷                                                   | 31.17    | C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub> | 551.1970 | 551.1962 | [M + H] <sup>+</sup> | 209.0806, 149.0595                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | - 0.517                      | Z 环烯 [20]<br>醚萜 |
| 25  | 京尼平                                                                                         | 35.87    | C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>  | 227.0914 | 227.0913 | [M + H] <sup>+</sup> | 209.0809[M + H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                         | - 0.080                      | Z 环烯 [9]<br>醚萜  |

续表 2

| No. | 名称                                             | 保留<br>时间 | 分子式                                             | 理论值      | 实际值      | 离子模式                 | 离子碎片                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 误差 /<br>( $\times 10^{-6}$ ) | 来源 分类 文献        |
|-----|------------------------------------------------|----------|-------------------------------------------------|----------|----------|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-----------------|
| 26  | 京尼平苷                                           | 35.93    | C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub> | 389.1442 | 389.1442 | [M + H] <sup>+</sup> | 227.0913[M + H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup> ,<br>209.0809[M + H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> ,<br>125.0390[M + H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup> | - 0.023                      | Z 环烯 [11]<br>醚萜 |
| 27  | 咖啡酸                                            | 37.51    | C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>    | 179.0444 | 179.0461 | [M-H] <sup>-</sup>   | 135.9532[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                  | 1.600                        | Z 酚酸 [8]        |
| 28  | 没食子酸乙酯                                         | 44.16    | C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>   | 197.0444 | 197.0461 | [M-H] <sup>-</sup>   | 169.0139[M-H-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ] <sup>-</sup> ,<br>125.0239[M-H-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>                                                                                                                                                                    | 1.600                        | H 酚酸 [12]       |
| 29  | 反苯基丙烯酸                                         | 44.98    | C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>    | 163.0392 | 163.9297 | [M-H] <sup>-</sup>   | 119.0495[M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> ,<br>116.9870[M-H-CO <sub>2</sub> -2H] <sup>-</sup>                                                                                                                                                                                                              | 3.189                        | H 酚酸 [18]       |
| 30  | 鞣花酸                                            | 67.23    | C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>   | 300.9979 | 301.0006 | [M-H] <sup>-</sup>   | 282.8710[M-H-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                  | 2.806                        | H 酚酸 [9]        |
| 31  | 6"-O-trans-p-coumaroylgenipin<br>gentiobioside | 70.62    | C <sub>32</sub> H <sub>40</sub> O <sub>17</sub> | 695.2182 | 695.2216 | [M-H] <sup>-</sup>   | 225.0625[M-H-C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub> ] <sup>-</sup> ,<br>207.0515[M-H-C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>                                                                                                                                | 3.444                        | Z 环烯 [10]<br>醚萜 |

注：H 为诃子；Z 为栀子；C 为川楝子。

Note: H represented Myrobalan; Z represented Gardenia; C represented Toosendan Fructus.

参考文献

[1] 宇妥·元旦贡布. 四部医典(蒙古文版)[M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 1978: 1005.

[2] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 512.

[3] 李梅, 郝炳金. 浅谈给药方式对药物吸收的影响[J]. 中国医药指南, 2015, 13(4): 3-4.

[4] 中国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020: 130.

[5] 王昕蕾, 刘博男, 张蒙蒙, 等. 肉苁蓉总苷在人工胃、肠液中的代谢转化研究[J]. 中国药房, 2020, 31(1): 53-61.

[6] 夏慧敏, 张慧文, 刘宏, 等. HPLC-Q-Exactive-MS/MS 快速鉴定蒙药三子散化学成分[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(21): 3005-3014.

[7] 高佳雪, 丁晶鑫, 王靖雅, 等. 中药化学成分肠道代谢的研究[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2018, 34(1): 20-23.

[8] Wang XY, Zhang L, Wang TQ, et al. Analysis on chemical constituents of *Gardenia jasminoides* by UHPLC-Q-TOFMS[J]. J Chin Med Mater, 2013, 36(3): 407-410.

[9] Juang LJ, Sheu SJ, Lin TC. Determination of hydrolyzable tannins in the fruit of *Terminalia chebula* Retz. by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis[J]. J Sep Sci, 2004, 27(9): 718-724.

[10] 彭开锋. 栀子化学成分及生物活性研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2012.

[11] Yu Y, Xie ZL, Gao H, et al. Bioactive iridoid glucosides from the fruit of *Gardenia jasminoides* [J]. J Nat Prod, 2009, 72(8): 1459-1464.

[12] 周坤, 简平, 梁文仪, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 分析藏药诃子与毛诃子化学成分[J]. 质谱学报, 2020, 41(3): 254-267.

[13] 丁岗, 刘延泽, 宋毛平, 等. 诃子中的多元酚类成分[J]. 中国药科大学学报, 2001, 32(3): 35-38.

[14] Pfundstein B, Desouky EKS, Hull EW, et al. Polyphenolic compounds in the fruits of Egyptian medicinal plants (*Terminalia bellerica*, *Terminalia chebula* and *Terminalia horrida*): characterization, quantitation and determination of antioxidant capacities [J]. Phytochemistry, 2010, 71(10): 1132-1148.

[15] Lin TC, Nonaka GI, Nishioka I, et al. Tannins and related compounds. CII. Structures of terchebulin, an ellagitannin having a novel tetraphenylcarboxylic acid (terchebulic acid) moiety, and biogenetically related tannins from *Terminalia chebula* Retz [J]. Chem Pharm Bull, 1990, 38(11): 3004-3008.

[16] 孙建. 川楝子化学成分及炮制质量评价研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2009.

[17] 刘妍妍, 张慧文, 白云霞, 等. 蒙药三子散 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别研究[J]. 中国药房, 2022, 33(3): 319-325.

[18] 王建业. 诃子成分的分离鉴定及两种分离方法的比较研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2017.

[19] 蔡财军, 张忠立, 左月明, 等. 栀子环烯醚萜类化学成分研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(2): 342-343.

[20] Chen QC, Zhang WY, Youn U, et al. Iridoid glycosides from *Gavardeniae Fructus* for treatment of ankle sprain [J]. Phytochemistry, 2009, 70(6): 779-784.

[21] 王立萍, 王新春. 黄酮类化合物的代谢研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(11): 226-229.

(收稿日期: 2024-05-10; 修回日期: 2024-12-03)



# 基于非靶向代谢组学和生物活性对比的铁笛润喉丸提取工艺优化

王孝清<sup>1, 2</sup>, 王义坤<sup>2</sup>, 陈镇<sup>1</sup>, 欧阳林旗<sup>1</sup>, 龙红萍<sup>1</sup>, 温静茹<sup>2</sup>, 刘若彤<sup>2</sup>, 李丹丹<sup>1</sup>, 徐康平<sup>1, 2\*</sup>, 邓桂明<sup>1, 3\*</sup> (1. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007; 2. 中南大学湘雅药学院, 长沙 410007; 3. 湖南中医药大学第二附属医院, 长沙 410005)

**摘要:** **目的** 探究成分富集前后铁笛润喉丸化学成分的变化和抗炎效果差异, 并对铁笛润喉丸的提取工艺进行优化。**方法** 采用 HP-20 大孔吸附树脂分段富集有效成分的方法对铁笛润喉丸的提取工艺进行优化, 通过代谢组学和质谱分子网络策略对工艺优化前后的成分进行定性分析和比较, 结合 RAW 264.7 细胞炎症实验验证工艺优化前后抗炎活性变化。**结果** 综合在铁笛润喉丸优化前后色谱, 正离子模式下检测出 1951 个化合物, 负离子模式下检测出 2000 个化合物。基于多变量统计, 分别在正、负离子模式下筛选出 387 个和 340 个差异成分, 对比自建数据库和全球天然产物社会分子网络系统 (GNPS), 鉴定出正离子模式下 39 个差异成分, 负离子模式下 36 个差异成分, 且差异成分多为优化后上调的黄酮类化合物。细胞抗炎实验证明, 优化后铁笛润喉丸抗炎活性增强, 可显著降低 RAW 264.7 细胞的一氧化氮 (NO) 炎症因子生成。**结论** 优化后的铁笛润喉丸富集了具有抗炎活性的黄酮类化合物, 抗炎效果显著改善。

**关键词:** 铁笛润喉丸; 非靶向代谢组学; 分子网络; 差异代谢物; 抗炎活性

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)06-1591-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.014

## Preparation optimization of Tiedi Runhou pills based on non-targeted metabolomics and biological activity

WANG Xiao-qing<sup>1, 2</sup>, WANG Yi-kun<sup>2</sup>, CHEN Zhen<sup>1</sup>, OU YANG Lin-qi<sup>1</sup>, LONG Hong-ping<sup>1</sup>, WEN Jing-ru<sup>2</sup>, LIU Ruo-tong<sup>2</sup>, LI Dan-dan<sup>1</sup>, XU Kang-ping<sup>1, 2\*</sup>, DENG Gui-ming<sup>1, 3\*</sup> (1. *The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007*; 2. *Xiangya School of Pharmacy, Central South University, Changsha 410007*; 3. *The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410005*)

**Abstract: Objective** To optimize the extraction and determine the chemical compositions and anti-inflammatory effect of Tiedi Runhou pills before and after process optimization. **Methods** HP-20 macroporous adsorbent resin was used for active component enrichment. Metabolomics and mass spectrometry molecular network strategy were used for qualitative analysis of the components, while RAW 264.7 cells inflammation experiment to verify the anti-inflammatory activity. **Results** Before and after the optimization, 1951 compounds were detected in the positive ion mode, and 2000 compounds were detected in the negative ion mode. Based on multivariate statistics, 387 and 340 differential components were screened out in the positive ion mode and negative ion mode, respectively. After comparing the self-built database and global natural products social molecular networking (GNPS), we identified 39 differential components in the positive ion mode and 36 differential components in the negative ion mode,

**基金项目:** 长沙市科技计划 - 科技创新平台重点项目 (No.kh2201060); 湖南省自然科学基金药科联合基金 (No.2022JJ80091); 湖南中医药大学校级课题 (No.2024XYLH002); 湖南中医药大学中药学双一流学科。

**作者简介:** 王孝清, 男, 硕士研究生, 主要从事中药化学生物学研究, email: 227212083@csu.edu.cn \* **通信作者:** 徐康平, 男, 副教授, 博士研究生导师, 主要从事中药与天然药物化学生物学研究, email: xukp395@csu.edu.cn; 邓桂明, 女, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事中药药效机制及特色中药制剂研究, email: guimingd1004@163.com

most of which were optimized flavonoids with up-regulated levels. The cell anti-inflammatory experiment showed that the optimized Tiedi Runhou pills enhanced anti-inflammatory activity and markedly reduced the production of nitric oxide (NO) inflammatory factors in RAW 264.7 cells. **Conclusion** The optimized Tiedi Runhou pills are rich in flavonoids with alleviate anti-inflammatory effects.

**Key words:** Tiedi Runhou pill; non-targeted metabolomics; molecular network; differential component; anti-inflammatory activity

随着中药成分分离和鉴定技术的发展,越来越多的中药复方的关键药效物质基础被逐步阐明,中药的有效性和安全性得到了进一步保障。中药复方的优化和二次开发迎来了良好的发展机遇<sup>[1]</sup>。铁笛润喉丸是湖南中医药大学第一附属医院院内制剂的优势品种,是根据中医药理论并结合大量临床实践筛选出来的验方。铁笛润喉丸是由桔梗、木蝴蝶、甘草、茯苓、麦冬、玄参、瓜蒌、诃子、青果、儿茶、薄荷脑等研制而成的白色包糖衣水蜜丸,具润肺利咽、生津止渴之功效,常用于治疗声音嘶哑、慢性咽喉炎等疾病。

铁笛润喉丸在湖南省中医药大学第一附属医院应用多年,临床疗效确切。但铁笛润喉丸由中药原粉包衣而成,存在着服药剂量大、含服口感差、渣滓感强等不足,导致患者含服依从性差,影响其在临床上的广泛应用<sup>[2]</sup>。且铁笛润喉丸发挥抗炎活性的关键药效物质基础研究仍存在较大空白<sup>[3-5]</sup>。因此,本研究基于代谢组学和 RAW 264.7 细胞实验,对工艺优化前后铁笛润喉丸的成分和活性进行比较分析,确证提取工艺优化可提高其抗炎活性。

## 1 材料

### 1.1 仪器

SPE105 分析天平(梅特勒托利多有限公司),HWS24 恒温水浴锅(上海一恒科技有限公司),HERA cell 150i CO<sub>2</sub> 培养箱、Legend Micro 17 离心机(美国赛默飞世尔有限公司),Cytation TM 5 多功能酶标仪(美国伯腾仪器有限公司),Eclipse T5100 倒置生物显微镜(日本尼康株式会社),G6540B 液相色谱-四极杆/飞行时间串联质谱仪(美国 Agilent 科技公司)。

### 1.2 试药

铁笛润喉丸(湖南中医药大学第一附属医院,批号:20230508,规格:80 g/瓶);HP-20 大孔吸附树脂(日本三菱,批号:3A503),96 孔板(Corning,批号:17523021),DMEM 高糖基础培养基、胎牛血清(FBS)(Gibco),二甲基亚砜(DMSO)(麦克林,C14783697)、双抗溶液(100 U · mL<sup>-1</sup> 青霉素、100 μg · mL<sup>-1</sup> 链霉素、4.5

mg · mL<sup>-1</sup> L-谷氨酰胺和 4.5 mg · mL<sup>-1</sup> 葡萄糖,苏州新赛美,批号:20230412),一氧化氮(NO)检测试剂盒(碧云天,批号:112223230528),叫噪美辛(麦克林,批号:C10429693),RAW 264.7 细胞株(ATCC,批号:CL-0190),脂多糖(LPS)(阿拉丁,批号:3230908001)。

## 2 方法

### 2.1 样品制备

原方制备:取 1 倍处方量药材(铁笛润喉丸药材来源于湖南中医药大学第一附属医院,由中南大学湘雅药学院徐康平副教授鉴定符合《中国药典》要求),共计 376.6 g,粉碎成细粉,过筛,混匀。加炼蜜,制成大蜜丸。

原方精制:取 3 倍处方量药材(除薄荷脑),共计 1129.8 g,加 14 倍蒸馏水浸泡 30 min,加热回流提取 2 h,滤过,得提取液,重复提取 3 次;合并 3 次提取液,减压浓缩,得浓缩液 1700 mL。采用 6 倍量 HP-20 大孔吸附树脂进行柱层析分离,水洗 3 倍柱体积,接着用 50% 乙醇洗脱 5 倍柱体积并收集,合并浓缩至相对密度为 1.05 ~ 1.1,得到有效部位浸膏,适量水分散后真空冷冻干燥,得到固体粉末,共计 58.55 g,按 3 倍处方配比加入薄荷脑和炼蜜进行包封,制成大蜜丸。

液质样品制备:分别称取原方和原方精制中的粉末各 3 g,加入 30 mL 的 70% 乙醇超声提取 1 h 后,补足失重,滤纸过滤后收集上清液,并用 0.22 μm 水系滤膜过滤备用。

### 2.2 铁笛润喉丸中药化学成分数据库建立

通过 HIT 数据库(<http://hit2.badd-cao.net/>)、SuperTCM 数据库(<https://bioinf-applied.charite.de/supertcm/>)、TCMSID 数据库([https://tcm.scbdd.com/home/search\\_index/](https://tcm.scbdd.com/home/search_index/))检索,收集桔梗、玄参、木蝴蝶、甘草、茯苓、瓜蒌、诃子、麦冬、儿茶、青果、薄荷脑十一味中药的化学成分,统计其分子式,并通过 Qualitative Navigator B.08.00 软件中分子质量计算器计算分子量。

### 2.3 液相色谱-质谱条件

色谱条件:液相色谱-四极杆/飞行时间串联质谱仪(LC-Q-TOF-MS/MS),色谱柱使用 Agilent

ZORBAX Eclipse Plus C18 柱 (3.0 mm×100 mm, 1.8 μm); 柱温 25℃, 流动相: A 相为水, B 相为乙腈; 流速 0.2 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量 2 μL; 梯度洗脱 (0~10 min, 5%~15%B; 10~20 min, 15%~35%B; 20~30 min, 35%~55%B; 30~40 min, 55%~85%B; 40~50 min, 85%~95%B)。

质谱条件: 质谱分析使用电喷雾电离源, 采用正离子和负离子采集模式。雾化气 50 psi, 辅助加热气 50 psi, 气帘气 20 psi。雾化温度为 350℃, 喷雾电压正离子模式为 4000 V, 负离子模式为 -4000 V, 碰撞能量均为 15 eV, 离子扫描范围  $m/z$  100~1700 Da。

## 2.4 工艺优化前后差异成分统计分析和鉴定

将工艺优化前后的质谱数据输入 Profinder B.06.00, 提取峰面积定量, 得出的结果用 SIMCA 14.1 进行主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA), 筛选铁笛润喉丸优化前后的差异化合物。全球天然产物社会分子网络系统 (Global Natural Products Social Molecular Networking, GNPS, <http://gnps.ucsd.edu>) 收录了大量化合物的 MS/MS 质谱图, 能够对照化合物的质谱数据进行定性鉴定, 并关联结构上具有相似性的分子, 形成一类具有相似化合物的分子簇<sup>[6]</sup>。将液相色谱-质谱得到的原始数据使用 MSconvert 转化为 mz ML 格式, 然后通过 WinSCP 上传到 GNPS 进行数据库比对和分子网络构建, 鉴别出匹配化合物并生成分子网络, 从而进行定性分析。GNPS 设置参数如下:

① 设置基本选项: 母离子误差最大值 (precursor ion mass tolerance): 0.02 Da; 碎片离子误差最大值 (fragment ion mass tolerance): 0.02 Da。② 设置高级网络选项: 最小余弦值 (minimum cosine score): 0.7; 匹配碎片离子最少值 (minimum matched fragment ions): 6; 连接节点最大值 (network TopK): 10; 其余为默认值。

## 2.5 工艺优化前后抗炎活性评价

**2.5.1 细胞活力测定** 为确保实验结果的准确性, 避免药物对 RAW 264.7 细胞产生细胞毒性造成细胞释放 NO 含量降低的现象, 本实验采用 CCK 8 法评价药物对 RAW 264.7 细胞活力的影响。RAW 264.7 细胞使用 DMEM 完全培养基 (含 10%FBS 和 1% 双抗) 于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下培养。对数生长期的细胞以  $1.0 \times 10^4$  个/孔接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后, 吸弃旧培养基, 加入 100 μL 含有梯度浓度样品 (6、12、24、48、96 μg·mL<sup>-1</sup>) 的新完全培养基, 同时设立加完全培养基的空白对照组和

加完全培养基无细胞的背景组。孵育 24 h 后, 弃去 96 孔板中的上清液, 每孔依次添加 100 μL 的 CCK 8 溶液 (完全培养基: CCK 8 = 10:1), 继续孵育 2 h, 然后于 450 nm 测定吸光度, 计算不同浓度样品对细胞活力的影响, 细胞活力 (%) =  $[(A_s - A_b) / (A_c - A_b)] \times 100\%$ , 其中  $A_s$ 、 $A_c$  和  $A_b$  分别代表给药组、空白对照组和背景组的吸光度值。采用 GraphPad Prism 8 统计软件分析数据及作图。

**2.5.2 NO 含量测定** RAW 264.7 细胞使用 DMEM 完全培养基 (含 10%FBS 和 1% 双抗) 于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下培养。取对数生长期的细胞以  $1 \times 10^4$  个/孔接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后, 吸弃旧培养基, 加入 100 μL 完全培养基和含有梯度浓度样品与吡啶美辛 (6、12、24、48、96 μg·mL<sup>-1</sup>) 的新完全培养基 (每组 5 个复孔)。孵育 30 min 后, 除空白组外每孔加入 1 μL 的 LPS 溶液 (100 μg·mL<sup>-1</sup>)。共同孵育 24 h 后, 取 50 μL 上清液, 使用 NO 检测试剂盒测定上清液中 NO 含量, 于 540 nm 处测定吸光度值 ( $A$ )。根据标准曲线计算不同浓度样品下细胞产生 NO 的量, 采用 GraphPad Prism 8 统计软件分析数据及作图。

## 3 结果与分析

### 3.1 基于非靶向代谢组学差异成分分析

用 Profinder B.06.00 提取质谱数据中的峰面积, 在正离子模式下输出得到化合物 1951 个, 负离子模式下输出得到化合物 2000 个。使用 SIMCA 对铁笛润喉丸优化前后的样品进行 PCA。从正离子主成分得分图 (见图 1A) 和负离子主成分得分图 (见图 1D) 中可以看出原方组和精制组轮廓距离较远, 有着较好的分离, 同时组内的轮廓较为相似。由此可知, 铁笛润喉丸经过优化后化学成分产生了差异。进一步在 PCA 模型基础上构建 OPLS-DA 模型, 优化前后样品在正、负离子模式下的 OPLS-DA 模型得分如图 1B 和图 1E 所示。图中显示优化前后的铁笛润喉丸样品分离良好。同时在 OPLS-DA 模型下, 正离子置换检验图中  $R^2 = 0.411$ ,  $Q^2 = -0.494$  (见图 1C), 负离子置换检验图中  $R^2 = 0.74$ ,  $Q^2 = -0.173$  (见图 1F), 表明模型预测效果良好, 未出现过拟合情况。

散点图 (S-plot) 分析中以  $VIP > 1$  且  $P < 0.05$  作为条件, 筛选铁笛润喉丸原方和精制后的差异化合物。正离子模式下筛选出 387 个差异化合物, 负离子模式下筛选出 340 个差异化合物 (见图 2)。这些化合物为铁笛润喉丸优化前后影响临床疗效的潜在关键化合物。经过 GNPS 数据库的匹配, 并对比自建数据库中化合物的分子式和分子量, 最终在正离子模式下匹配得到 39 个化合物 (见表 1), 负离子



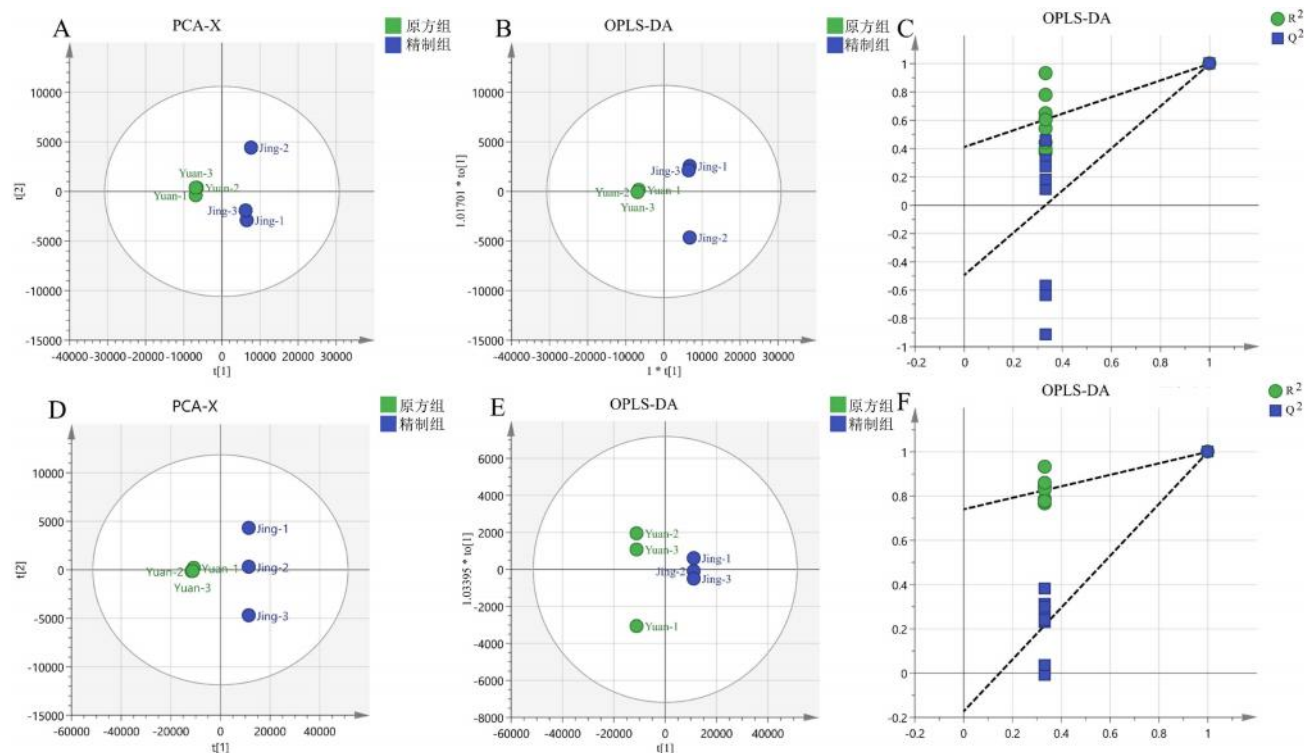


图1 正(A~C)、负(D~E)离子模式下铁笛润喉丸代谢轮廓分析

Fig 1 Metabolic profiling of Tiedi Runhou pills in positive ion mode (A~C) and negative ion mode (D~E)

模式下匹配得到 36 个化合物(见表 2)。同时根据化合物结构和二级质谱的相似性,对可能具有相似性的分子进行分子网络分析。结果表明,黄酮类化合物分子簇为最大一类差异代谢物(见图 3 及图 4)。

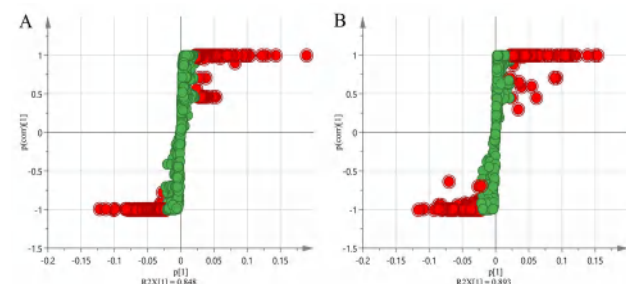


图2 正(A)、负(B)离子模式下铁笛润喉丸差异化合物(红色部分)的 S-plot 载荷图

Fig 2 S-plot loading diagram of differential metabolites (the red part) in Tiedi Runhou pills under positive (A) and negative (B) ion modes

### 3.2 基于细胞炎症模型分析

LPS 能诱导 RAW 264.7 细胞释放 NO、肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )、白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 等多种炎症因子,是经典的细胞炎症模型,其中 NO 含量是疾病过程中判断炎症反应程度的指标<sup>[7]</sup>。细胞活力测定结果如图 5 所示,在选取的 5 个梯度浓度下(6、12、24、48、96  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),细胞活力均达 85% 以上,且原方组和精制组的细胞活力差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),故可选取该浓度梯

度进行后续实验。

LPS 能够刺激 RAW 264.7 细胞中 NO 的释放,图 6 显示,空白组和模型组 NO 的生成量差异具有统计学意义( $P < 0.001$ ),表明炎症细胞模型建模成功。对比模型组,原方组和精制组都能够在 12、24、48、96  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  质量浓度下显著减少 NO 的释放,且抑制效果呈现出剂量依赖性(见图 6A~6E)。此外,在 5 个浓度中,精制组下 NO 的释放量均小于原方组,其中在 48  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的浓度下,精制组对比原方组 NO 生成量差异最大(见图 6D)。这些结果表明铁笛润喉丸能够显著降低炎症细胞 NO 的释放,表现出良好的抗炎效果。同时,经过工艺优化后的铁笛润喉丸在同等剂量的条件下,相比工艺优化前能够更好地降低 NO 的释放,确证了工艺优化后铁笛润喉丸更好的抗炎效果。

### 4 讨论

本研究基于非靶向代谢组学对铁笛润喉丸工艺优化前后的差异代谢物进行分析,在正离子和负离子模式下分别得到 387 个和 340 个差异化合物。通过自建中药化学成分库和 GNPS 在线网站匹配到正离子模式下 39 个,负离子模式下 36 个差异化合物,大部分化合物为优化后上调的黄酮类化合物。现有研究表明,许多黄酮类化合物能调节细胞

表 1 正离子模式下匹配到的 VIP > 1 且 P < 0.05 的差异代谢物  
Tab 1 Differential metabolites with VIP > 1 and P < 0.05 matched in the positive ion mode

| No. | 类别 | 化合物                                                                                                                                                                                                                              | 分子式                                                           | t <sub>R</sub> /min | 理论<br>分子量 | 测量<br>分子量 | 误差 /<br>× 10 <sup>-6</sup> | VIP  |
|-----|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------|-----------|-----------|----------------------------|------|
| 1   | 精制 | histidylproline                                                                                                                                                                                                                  | C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> | 5.22                | 252.1222  | 252.123   | 3.17                       | 1.09 |
| 2   | 精制 | 甘草苷 B                                                                                                                                                                                                                            | C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>               | 9.61                | 432.1268  | 432.127   | 0.46                       | 1.21 |
| 3   | 原粉 | [(1 <i>S</i> , 21 <i>S</i> , 22 <i>R</i> , 23 <i>R</i> )-6, 7, 8, 11, 12, 13, 22, 23-octahydroxy-3, 16-dioxo-2, 17, 20-trioxatetracyclo[17.3.1.04, 9.010, 15]tricos-4, 6, 8, 10, 12, 14-hexaen-21-yl] 3, 4, 5-trihydroxybenzoate | C <sub>27</sub> H <sub>22</sub> O <sub>18</sub>               | 12.82               | 634.0806  | 634.081   | 0.62                       | 1.07 |
| 4   | 精制 | 伞花耳草苷                                                                                                                                                                                                                            | C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>               | 13.43               | 564.1479  | 564.149   | 1.95                       | 1.42 |
| 5   | 精制 | 5, 7-dihydroxy-2-phenyl-6, 8-bis[3, 4, 5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl) oxan-2-yl]chromen-4-one                                                                                                                                    | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>               | 13.88               | 578.1636  | 578.165   | 2.42                       | 1.75 |
| 6   | 精制 | 3-[4, 5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-3-[3, 4, 5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl) oxan-2-yl]oxyoxan-2-yl]oxy-5, 7-dihydroxy-2-(4-hydroxy-phenyl) chromen-4-one                                                                         | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>               | 14.24               | 610.1534  | 610.154   | 1.02                       | 1.49 |
| 7   | 精制 | 紫罗兰素                                                                                                                                                                                                                             | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>               | 14.79               | 578.1636  | 578.165   | 2.42                       | 1.29 |
| 8   | 精制 | 异甘草素                                                                                                                                                                                                                             | C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>                | 14.97               | 256.0736  | 256.074   | 1.56                       | 3.51 |
| 9   | 精制 | 槲皮素                                                                                                                                                                                                                              | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>                | 15.29               | 302.0427  | 302.043   | 1.16                       | 1.06 |
| 10  | 精制 | 车前苷                                                                                                                                                                                                                              | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>               | 15.44               | 448.1006  | 448.101   | 0.89                       | 1.69 |
| 11  | 精制 | 山柰酚                                                                                                                                                                                                                              | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>                | 15.44               | 286.0477  | 286.048   | 0.91                       | 1.20 |
| 12  | 精制 | chrysin 6-C-glucoside 8-C-arabinoside                                                                                                                                                                                            | C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>13</sub>               | 15.80               | 548.1530  | 548.154   | 1.82                       | 2.17 |
| 13  | 精制 | 5, 7-dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-6, 8-bis[3, 4, 5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl) oxan-2-yl]chromen-4-one                                                                                                                         | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>               | 16.63               | 594.1585  | 594.160   | 2.52                       | 8.12 |
| 14  | 精制 | 黄芩素                                                                                                                                                                                                                              | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>                | 16.63               | 270.0528  | 270.053   | 0.74                       | 2.69 |
| 15  | 精制 | 7-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-8-[3, 4, 5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)(2H-3, 4, 5, 6-tetrahydropyran-2-yl)]chromen-4-one                                                                                                          | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>                | 16.69               | 416.1107  | 416.111   | 0.72                       | 1.02 |
| 16  | 精制 | barpisoflavone A                                                                                                                                                                                                                 | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>                | 17.39               | 300.0634  | 300.064   | 2.00                       | 1.28 |
| 17  | 精制 | 芒柄花苷                                                                                                                                                                                                                             | C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>                | 18.35               | 430.1264  | 430.128   | 3.72                       | 2.13 |
| 18  | 原粉 | afroformosin-7- <i>O</i> -glucoside                                                                                                                                                                                              | C <sub>29</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>10</sub>              | 18.47               | 555.2104  | 555.211   | 1.08                       | 2.56 |
| 19  | 精制 | 黄芩苷                                                                                                                                                                                                                              | C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>               | 18.53               | 446.0849  | 446.086   | 2.47                       | 4.33 |
| 20  | 精制 | peonidin-3- <i>O</i> -beta-galactoside                                                                                                                                                                                           | C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>               | 19.09               | 462.1162  | 462.118   | 3.87                       | 3.36 |
| 21  | 精制 | (2 <i>S</i> , 3 <i>S</i> , 4 <i>S</i> , 5 <i>R</i> , 6 <i>S</i> )-3, 4, 5-trihydroxy-6-[5-hydroxy-2-(4-hydroxy-phenyl)-6-methoxy-4-oxochromen-7-yl]oxyoxane-2-carboxylic acid                                                    | C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>               | 19.17               | 476.0955  | 476.097   | 3.15                       | 3.24 |
| 22  | 精制 | chrysin-7- <i>O</i> -beta-D-glucuronide                                                                                                                                                                                          | C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>               | 20.18               | 430.0900  | 430.091   | 2.33                       | 6.13 |
| 23  | 精制 | oroxylin A glucuronide                                                                                                                                                                                                           | C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>               | 20.78               | 460.1006  | 460.101   | 0.87                       | 1.47 |
| 24  | 精制 | 2, 4a, 6a, 6b, 9, 9, 12a-heptamethyl-10, 13-dioxo-1, 3, 4, 5, 6, 6a, 7, 8, 8a, 11, 12, 14b-dodecahydropicene-2-carboxylic acid                                                                                                   | C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> O <sub>4</sub>                | 22.32               | 468.3240  | 468.326   | 4.27                       | 1.83 |
| 25  | 原粉 | 甘草黄酮 A                                                                                                                                                                                                                           | C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>                | 27.44               | 322.1205  | 322.121   | 1.55                       | 1.10 |
| 26  | 原粉 | glyasperin C                                                                                                                                                                                                                     | C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>                | 29.11               | 356.1624  | 356.163   | 1.77                       | 1.52 |
| 27  | 原粉 | gancaonin A                                                                                                                                                                                                                      | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>                | 30.33               | 352.1311  | 352.132   | 2.56                       | 1.80 |
| 28  | 原粉 | ( <i>E</i> )-3-[2, 4-dihydroxy-5-(2-methylbut-3-en-2-yl) phenyl]-1-(4-methoxy-phenyl) prop-2-en-1-one                                                                                                                            | C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>                | 30.73               | 338.1518  | 338.153   | 3.55                       | 1.69 |
| 29  | 原粉 | licochalcone D                                                                                                                                                                                                                   | C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>                | 31.11               | 354.1467  | 354.147   | 0.85                       | 1.01 |
| 30  | 原粉 | (2-hydroxy-3-octadeca-9, 12-dienoyloxypropyl) 2-(trimethylazaniumyl) ethyl phosphate                                                                                                                                             | C <sub>26</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P             | 33.94               | 519.3325  | 519.333   | 0.96                       | 1.84 |
| 31  | 原粉 | erysubin F                                                                                                                                                                                                                       | C <sub>25</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>                | 34.07               | 390.1831  | 390.184   | 2.31                       | 1.32 |
| 32  | 原粉 | 光甘草醇                                                                                                                                                                                                                             | C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>                | 34.16               | 392.1988  | 392.200   | 3.06                       | 3.55 |
| 33  | 原粉 | 1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine                                                                                                                                                                                          | C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P             | 35.56               | 495.3325  | 495.333   | 1.01                       | 2.21 |
| 34  | 原粉 | bolusanthol C                                                                                                                                                                                                                    | C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>                | 35.64               | 408.1937  | 408.195   | 3.18                       | 2.27 |
| 35  | 原粉 | 1-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine                                                                                                                                                                                  | C <sub>26</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>7</sub> P             | 36.54               | 521.3481  | 521.349   | 1.73                       | 1.15 |
| 36  | 原粉 | 甘草次酸                                                                                                                                                                                                                             | C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>                | 37.41               | 470.3396  | 470.340   | 0.85                       | 1.31 |
| 37  | 原粉 | isolupalbigenin                                                                                                                                                                                                                  | C <sub>25</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>                | 37.71               | 406.1780  | 406.182   | 9.85                       | 1.27 |
| 38  | 原粉 | licodione                                                                                                                                                                                                                        | C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>                | 38.07               | 408.1937  | 408.194   | 0.73                       | 1.33 |
| 39  | 原粉 | γ-亚麻酸                                                                                                                                                                                                                            | C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>                | 41.18               | 278.2246  | 278.225   | 1.44                       | 1.02 |

表 2 负离子模式下匹配到的 VIP > 1 且 P < 0.05 的差异代谢物  
Tab 2 Differential metabolites with VIP > 1 and P < 0.05 matched in the negative ion mode

| No. | 类别 | 化合物                                                                                                                                                                                                                | 分子式                                             | t <sub>R</sub> /min | 理论<br>分子量 | 测量<br>分子量 | 误差 /<br>× 10 <sup>-6</sup> | VIP  |
|-----|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------|-----------|-----------|----------------------------|------|
| 1   | 原粉 | quercetin-3-O-xyloside                                                                                                                                                                                             | C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub> | 1.15                | 434.0849  | 434.086   | 2.53                       | 1.51 |
| 2   | 原粉 | baicalein 7-O-glucuronide                                                                                                                                                                                          | C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub> | 1.17                | 446.0849  | 446.087   | 4.71                       | 1.42 |
| 3   | 原粉 | 车前苷                                                                                                                                                                                                                | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub> | 1.20                | 448.1006  | 448.102   | 3.12                       | 3.16 |
| 4   | 原粉 | naringenin-7-O-glucoside                                                                                                                                                                                           | C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub> | 1.31                | 434.1213  | 434.123   | 3.92                       | 1.30 |
| 5   | 原粉 | chrysin-7-O-glucuronide                                                                                                                                                                                            | C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub> | 1.40                | 430.0900  | 430.092   | 4.65                       | 1.28 |
| 6   | 原粉 | 甘草苷                                                                                                                                                                                                                | C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>  | 1.41                | 418.1264  | 418.128   | 3.83                       | 2.35 |
| 7   | 原粉 | daidzein-8-C-glucoside                                                                                                                                                                                             | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>  | 2.87                | 416.1107  | 416.112   | 3.13                       | 1.44 |
| 8   | 精制 | [3, 4, 5-trihydroxy-6- (3, 4, 5-trihydroxybenzoyl) oxyoxan-2-yl]methyl 3, 4, 5-trihydroxybenzoate                                                                                                                  | C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>14</sub> | 7.44                | 484.0853  | 484.087   | 3.49                       | 1.01 |
| 9   | 精制 | 1, 2, 3, 6-tetragalloylglucose                                                                                                                                                                                     | C <sub>34</sub> H <sub>28</sub> O <sub>22</sub> | 7.47                | 788.1072  | 788.111   | 4.82                       | 1.20 |
| 10  | 精制 | [ (1R, 21S, 23R) -6, 7, 8, 11, 12, 13, 22, 23-octahydroxy-3, 16-dioxo-2, 17, 20-trioxatetracyclo[17.3.1.04, 9.010, 15]tricoso-4, 6, 8, 10, 12, 14-hexaen-21-yl] 3, 4, 5-trihydroxybenzoate                         | C <sub>27</sub> H <sub>22</sub> O <sub>18</sub> | 7.66                | 634.0806  | 634.083   | 3.77                       | 1.87 |
| 11  | 精制 | 1, 3, 6-tri-O-galloylglucose                                                                                                                                                                                       | C <sub>27</sub> H <sub>24</sub> O <sub>18</sub> | 8.04                | 636.0963  | 636.099   | 4.25                       | 1.15 |
| 12  | 精制 | 5, 7-dihydroxy-2-phenyl-6, 8-bis[3, 4, 5-trihydroxy-6- (hydroxymethyl) oxan-2-yl]chromen-4-one                                                                                                                     | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub> | 9.44                | 578.1636  | 578.166   | 4.15                       | 2.24 |
| 13  | 精制 | (3R, 4S, 5R) -4-hydroxy-3, 5-bis[ (3, 4, 5-trihydroxybenzoyl) oxy] cyclohexene-1-carboxylic acid                                                                                                                   | C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>13</sub> | 14.42               | 478.0747  | 478.076   | 2.72                       | 1.08 |
| 14  | 精制 | chrysin 6-C-glucoside 8-C-arabinoside                                                                                                                                                                              | C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>13</sub> | 16.66               | 548.1530  | 548.156   | 5.47                       | 1.95 |
| 15  | 原粉 | 黄芩素                                                                                                                                                                                                                | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>  | 16.71               | 270.0528  | 270.058   | 19.19                      | 2.31 |
| 16  | 精制 | 异槲皮苷                                                                                                                                                                                                               | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub> | 17.43               | 464.0955  | 464.097   | 3.23                       | 1.89 |
| 17  | 原粉 | 野黄芩素                                                                                                                                                                                                               | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>  | 17.58               | 286.0477  | 286.049   | 4.41                       | 1.01 |
| 18  | 精制 | 甘草酸                                                                                                                                                                                                                | C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> O <sub>16</sub> | 18.29               | 822.4038  | 822.408   | 5.11                       | 3.22 |
| 19  | 原粉 | 12- 羟基硬脂酸                                                                                                                                                                                                          | C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>3</sub>  | 18.51               | 300.2664  | 300.267   | 2.00                       | 2.46 |
| 20  | 精制 | oroxylin A-7-O-glucuronide                                                                                                                                                                                         | C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub> | 18.52               | 460.1006  | 460.102   | 3.04                       | 4.10 |
| 21  | 原粉 | 刺芒柄花素                                                                                                                                                                                                              | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>  | 18.83               | 268.0736  | 268.074   | 1.49                       | 1.80 |
| 22  | 精制 | 麦角甾苷                                                                                                                                                                                                               | C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub> | 19.64               | 624.2054  | 624.208   | 4.17                       | 1.34 |
| 23  | 原粉 | scutellarein 4'-methyl ether                                                                                                                                                                                       | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>  | 20.19               | 300.0634  | 300.064   | 2.00                       | 2.66 |
| 24  | 精制 | 2- (3, 4-dimethoxyphenyl) ethyl-3-O- (6-deoxy-alpha-L-mannopyranosyl) -4-O- [ (2E) -3- (3, 4-dihydroxyphenyl) -1-oxo-2-propen-1-yl]-6-O- [ (2S, 3R, 4R) -tetrahydro-3, 4-dihydroxy-4- (hydroxymethyl) -2-furanyl]- | C <sub>36</sub> H <sub>48</sub> O <sub>19</sub> | 20.43               | 784.2790  | 784.283   | 5.10                       | 1.22 |
| 25  | 精制 | 1-O-Galloyl-6-O-cinnamoylglucose                                                                                                                                                                                   | C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> | 22.30               | 462.1162  | 462.118   | 3.87                       | 1.00 |
| 26  | 精制 | (2S, 3S, 4S, 5R, 6S) -3, 4, 5-trihydroxy-6-[5-hydroxy-2- (4-hydroxyphenyl) -6-methoxy-4-oxochromen-7-yl]oxyoxane-2-carboxylic acid                                                                                 | C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub> | 23.60               | 476.0955  | 476.098   | 5.25                       | 1.75 |
| 27  | 原粉 | 4- (8-prop-1-en-2-yl-3, 4, 8, 9-tetrahydro-2H-furo[2, 3-h]chromen-3-yl) benzene-1, 3-diol                                                                                                                          | C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>  | 25.80               | 324.1362  | 324.137   | 2.47                       | 3.39 |
| 28  | 原粉 | 白杨素                                                                                                                                                                                                                | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>  | 26.71               | 254.0579  | 254.058   | 0.39                       | 1.03 |
| 29  | 原粉 | 鞣花酸                                                                                                                                                                                                                | C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>   | 29.33               | 302.0063  | 302.007   | 2.32                       | 1.13 |
| 30  | 原粉 | 3-[4-hydroxy-2-methoxy-5- (2-methylbut-3-en-2-yl) phenyl]-1- (4-hydroxyphenyl) -2-propen-1-one                                                                                                                     | C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>  | 29.52               | 338.1518  | 338.152   | 0.59                       | 1.58 |
| 31  | 原粉 | 3, 5, 7-trihydroxy-2- (4-hydroxyphenyl) -6- (3-methylbut-2-en-1-yl) -4H-chromen-4-one                                                                                                                              | C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>  | 32.71               | 354.1103  | 354.111   | 1.98                       | 1.21 |
| 32  | 原粉 | dl-liquiritigenin                                                                                                                                                                                                  | C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>  | 34.51               | 256.0736  | 256.074   | 1.56                       | 1.02 |
| 33  | 原粉 | 邻苯三酚                                                                                                                                                                                                               | C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>    | 34.81               | 126.0317  | 126.032   | 2.38                       | 1.16 |
| 34  | 原粉 | 甘草查尔酮 B                                                                                                                                                                                                            | C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>  | 37.86               | 286.0841  | 286.085   | 3.15                       | 1.22 |
| 35  | 原粉 | 没食子酸                                                                                                                                                                                                               | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>    | 38.21               | 170.0215  | 170.022   | 2.82                       | 1.09 |
| 36  | 原粉 | 9-hydroxy-10, 12-octadecadienoic acid                                                                                                                                                                              | C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>  | 39.90               | 296.2351  | 296.236   | 3.04                       | 2.10 |



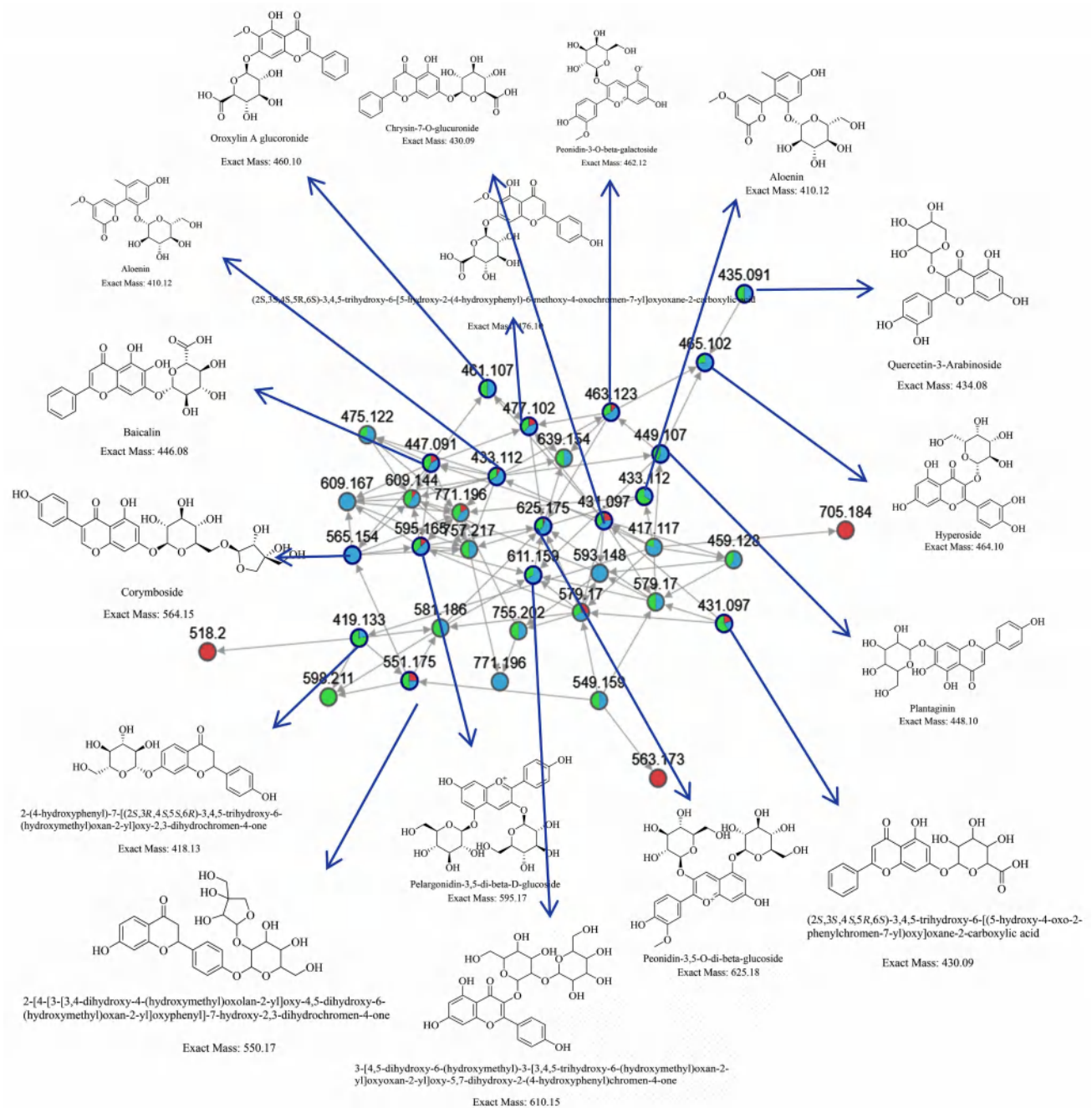


图3 正离子模式下差异代谢物分子网络图(部分)

Fig 3 Molecular network diagram of differential components in the positive ion mode ( partial )

因子的表达和激活,影响细胞因子及其受体,稳定抑炎因子而发挥抗炎作用<sup>[8-9]</sup>。针对临床上由炎症引起的咽喉疼痛、咽干声哑病例,富集黄酮类化合物来优化铁笛润喉丸,能一定程度上提高其临床疗效。本研究通过代谢组学和质谱分子网络策略鉴定出的上调黄酮类化合物有着广泛报道,其中黄芩苷(baicalin)被认为是治疗呼吸道疾病的有效药物,可通过下调转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$ )和细胞外调节蛋白激酶(ERK1/2)的升高水平,促进炎症调节基因A2A腺苷受体(A2AR)的表达发挥抗炎

作用<sup>[10]</sup>，同时也可以降低核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 的活性，抑制炎症细胞因子和趋化因子的表达来发挥抗炎作用<sup>[11]</sup>；山柰酚 (kaempferol) 通过抑制非受体蛋白酪氨酸激酶 (Src) 和下调 NF- $\kappa$ B 通路来抑制 IL-4 和环氧合酶 2 (COX-2) 的表达，从而发挥抗炎作用<sup>[12]</sup>；槲皮素 (quercetin) 能影响 NO 合成酶活性，有效降低 LPS 诱导的炎症性 RAW 264.7 细胞中 NO 的产生<sup>[13]</sup>，可能通过调节磷脂酰肌醇 3-激酶 / 蛋白激酶 B (PI3K/AKT) 和 NF- $\kappa$ B 信号通路对炎症反应产生影响<sup>[14]</sup>。此外，还有黄芩素

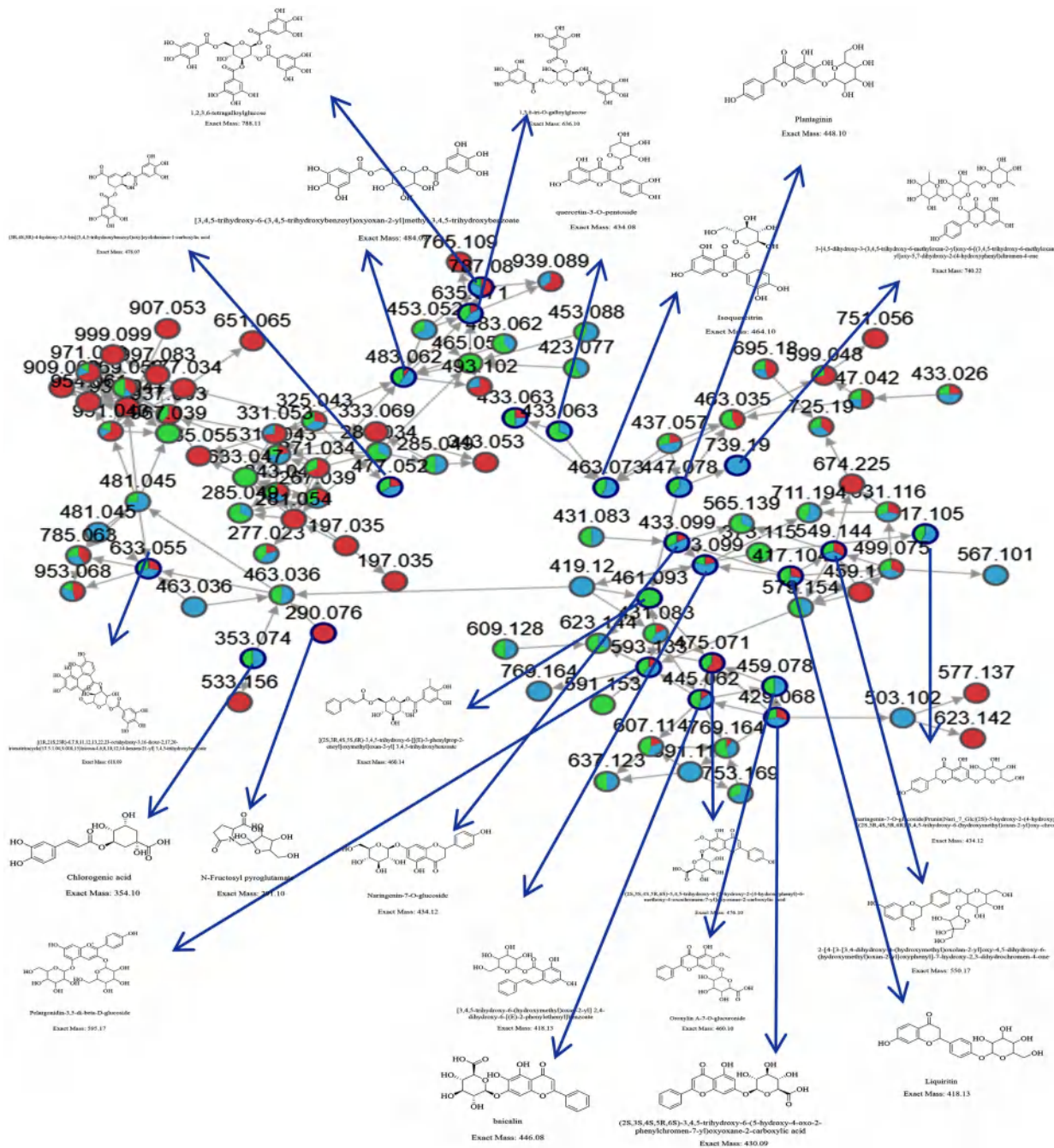


图 4 负离子模式下差异代谢物分子网络图 (部分)

Fig 4 Molecular network of differential components in the negative ion mode (partial)

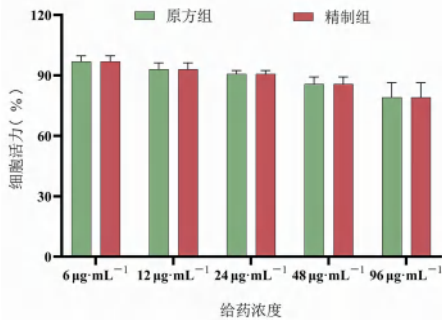


图 5 铁笛润喉丸优化前后对 RAW 264.7 活力的影响

Fig 5 Effect of Tiedie Runhou pills on the activity of RAW 264.7 before and after the optimization

(baicalein)<sup>[15]</sup>、oroxylin A glucuronide<sup>[16]</sup>、紫罗兰素 (violanthin)<sup>[17]</sup>、甘草酸 (glycyrrhizic acid)<sup>[18]</sup>、异槲皮素 (isoquercitrin)<sup>[19]</sup>、麦角甾苷 (acteoside)<sup>[20]</sup> 等具有抗炎的差异代谢物。在 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞炎症模型中, 实验结果与代谢组学分析结果一致, 表明优化后的铁笛润喉丸能够更好地降低 RAW 264.7 模型细胞的 NO 生成量。

本研究结果表明, 铁笛润喉丸可通过大孔吸附树脂对有效成分进行富集, 富集成分中主要为具有抗炎活性的黄酮类化合物。经过 RAW 264.7

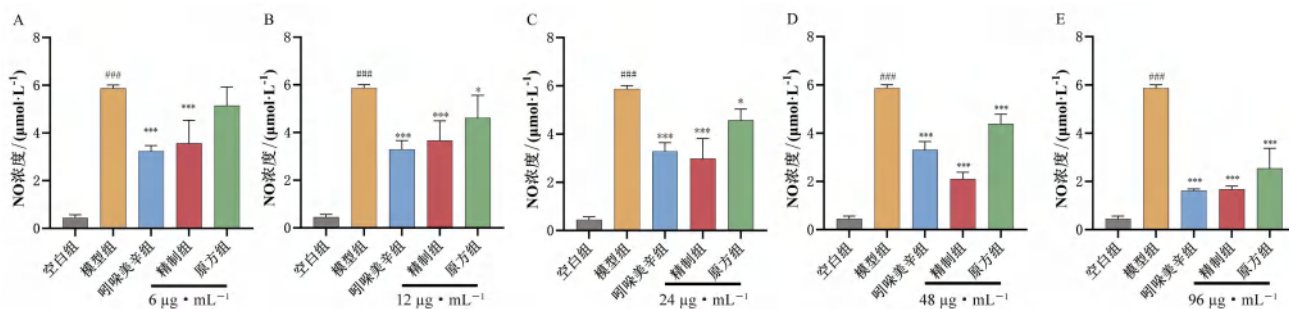


图 6 同浓度下铁笛润喉丸优化前后对 RAW 264.7 产生 NO 含量影响

Fig 6 Effect of Tiedi Runhou pills on NO content produced by RAW 264.7 at the same concentration before and after the optimization

注: 空白组相比,  $^{###}P < 0.001$ ; 与模型组相比,  $^*P < 0.05$ ,  $^{***}P < 0.001$ 。

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

细胞炎症模型的验证, 在同等剂量下, 工艺优化后的铁笛润喉丸能够更好地抑制 NO 生成, 从而提高产品的抗炎活性。本研究结果可为铁笛润喉丸的提取制备工艺优化提供理论和实验依据。

## 参考文献

- [1] 刘建勋, 李艳英, 付志明. 中药新药传承发展与创新之路 [J]. 中国现代中药, 2021, 23 (1): 1-4.
- [2] 刘干. 铁笛丸治疗慢性咽炎 64 例临床观察 [J]. 中医药导报, 2007, 13 (4): 48-54.
- [3] 张来银, 王桂东. HPLC-ELSD 法同时测定铁笛丸中 4 种成分的含量 [J]. 中南药学, 2020, 18 (10): 1692-1695.
- [4] 孟蕾, 曹杰, 张海鸣, 等. HPLC 法测定铁笛丸中甘草酸的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16 (4): 35-36.
- [5] 郝明虹, 杜树山, 姚雪花, 等. HPLC 测定铁笛口服液中甘草酸的含量 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33 (15): 1917-1918.
- [6] Wang M, Carver JJ, Phelan VV, et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with global natural products social molecular networking [J]. Nat Biotechnol, 2016, 34 (8): 828-837.
- [7] Cha SM, Cha JD, Jang EJ, et al. Sophoraflavanone G prevents *Streptococcus mutans* surface antigen I / II-induced production of NO and PGE2 by inhibiting MAPK-mediated pathways in RAW 264.7 macrophages [J]. Arch Oral Biol, 2016, 68: 97-104.
- [8] Al-Khayri JM, Sahana GR, Nagella P, et al. Flavonoids as potential anti-inflammatory molecules: a review [J]. Molecules, 2022, 27 (9): 2901.
- [9] Serafini M, Peluso I, Raguzzini A. Flavonoids as anti-inflammatory agents [J]. Proc Nutr Soc, 2010, 69 (3): 273-278.
- [10] Huang XY, He YC, Chen YF, et al. Baicalin attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via adenosine A2a receptor related TGF- $\beta$ 1-induced ERK1/2 signaling pathway [J]. BMC Pulm Med, 2016, 16: 1-11.
- [11] Dinda B, Dinda S, DasSharma S, et al. Therapeutic potentials of baicalin and its aglycone, baicalein against inflammatory disorders [J]. Eur J Med Chem, 2017, 131: 68-80.
- [12] Shin D, Park SH, Choi YJ, et al. Dietary compound kaempferol inhibits airway thickening induced by allergic reaction in a bovine serum albumin-induced model of asthma [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16 (12): 29980-29995.
- [13] Kang SG, Lee GB, Vinayagam R, et al. Anti-inflammatory, antioxidative, and nitric oxide-scavenging activities of a quercetin nanosuspension with polyethylene glycol in LPS-induced RAW 264.7 macrophages [J]. Molecules, 2022, 27 (21): 7432.
- [14] Jia XL, Gu MD, Dai JQ, et al. Quercetin attenuates *Pseudomonas aeruginosa*-induced acute lung inflammation by inhibiting PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. Inflammopharmacology, 2024, 32 (2): 1-18.
- [15] Patwardhan RS, Sharma D, Thoh M, et al. Baicalein exhibits anti-inflammatory effects via inhibition of NF- $\kappa$ B transactivation [J]. Biochem Pharmacol, 2016, 108: 75-89.
- [16] Sun XH, Chang X, Wang Y, et al. Oroxylin A suppresses the cell proliferation, migration, and EMT via NF- $\kappa$ B signaling pathway in human breast cancer cells [J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 9241769.
- [17] Dung HV, Cuong TD, Chinh NM, et al. Compounds from the aerial parts of *Piper bavinum* and their anti-cholinesterase activity [J]. Arch Pharm Res, 2015, 38: 677-682.
- [18] Zhao X, Zhang H, Gao YX, et al. A simple injectable moldable hydrogel assembled from natural glycyrrhizic acid with inherent antibacterial activity [J]. ACS Applied Bio Materials, 2019, 3 (1): 648-653.
- [19] Jung SH, Kim J, Lee EH, et al. Isoquercitrin is the most effective antioxidant in the plant *Thuja orientalis* and able to counteract oxidative-induced damage to a transformed cell line (RGC-5 cells) [J]. Neurochem Int, 2010, 57 (7): 713-721.
- [20] Li YX, Yu HY, Jin Y, et al. Verbascoside alleviates atopic dermatitis-like symptoms in mice via its potent anti-inflammatory effect [J]. Int Arch Allergy Imm, 2018, 175 (4): 220-230.

(收稿日期: 2024-08-28; 修回日期: 2024-12-26)



# 蜜环菌与天麻伴生过程中病害细菌的分离鉴定

欧小宏, 徐娇, 袁青松, 陈叶飞, 王艳红, 周涛\* (贵州中医药大学 中药民族药资源研究院, 贵阳 550025)

**摘要:** **目的** 分离鉴定天麻种植过程中抑制蜜环菌生长的病害细菌, 为天麻病害防治及天麻高效种植提供理论依据。**方法** 采用不同蜜环菌菌株 (GZ6、GZ1、AH2、SX7) 伴栽天麻, 采用病原菌分离纯化、形态学鉴定、分子鉴定等方法鉴定细菌菌株, 进一步通过蜜环菌-细菌共培养和对扣培养验证其对蜜环菌生长的抑制作用。**结果** 蜜环菌 GZ6 菌株在菌材上能正常形成白色的菌丝、菌索, 而 GZ1、SX7 和 AH2 菌株仅有少许白色菌丝, 大部分呈黑色水渍状; 且 GZ6 的天麻产量显著高于 GZ1、SX7 和 AH2。从 GZ1、SX7 和 AH2 菌株中分离鉴定出 1 株共有细菌, 形态学分析和分子鉴定结果表明该菌为革兰氏阴性菌克雷伯氏产气菌 *Klebsiella aerogenes*。将该细菌与蜜环菌 AH2-1、GZ1-17、SX7-9 进行共培养和对扣培养, 其生物量与对照组比较分别降低了 90.9%、36.5% 和 35.6%, 81.0%、67.7% 和 25.0%。**结论** 克雷伯氏产气菌 *Klebsiella aerogenes* 是抑制蜜环菌生长发育的主要细菌之一, 可能通过分泌气体物质抑制蜜环菌生长, 加剧天麻病害发生, 进而导致天麻减产。因此, 建议生产中加强对该菌的防控措施以促进天麻产量提升。

**关键词:** 蜜环菌; 细菌; 天麻; 分离鉴定; *Klebsiella aerogenes*

中图分类号: S432.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)06-1600-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.015

## Isolation and identification of pathogenic bacteria in *Armillaria gallica* and *Gastrodia elata*

OU Xiao-hong, XU Jiao, YUAN Qing-song, CHEN Ye-fei, WANG Yan-hong, ZHOU Tao\* (Resource Institute of Chinese and Ethnic Materia Medica, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025)

**Abstract: Objective** To isolate and identify the pathogenic bacteria inhibiting the growth of *Armillaria gallica* (*A. gallica*), to provide theoretical basis for bacterial disease preventing and effective cultivation of *Gastrodia elata* (*G. elata*). **Methods** Different *A. gallica* strains were used for *G. elata* cultivation. The pathogenic bacteria were isolated, purified and identified by morphology and molecules, and then inhibitory effects on the growth of *A. gallica* were evaluated by co- and couplet cultivation. **Results** The *A. gallica* strain of GZ6 on the wood normally formed white mycelium, mycelial cord, but the strains of GZ1, SX7 and AH2 formed few white mycelia and most of them were black, water-stained. Meanwhile, the yield of *G. elata* with GZ6 was significantly higher than that with GZ1, SX7 and AH2. Then, a same bacterium strain was isolated from the *A. gallica* of GZ1, SX7 and AH2. Morphological and molecular identification showed the bacterium was gram negative, named *Klebsiella aerogenes* (*K. aerogenes*). The co- and couplet cultivation showed *K. aerogenes* obviously inhibited the mycelium growth of *A. gallica*, as the biomass of *A. gallica* decreased by 90.9%, 36.5% and 35.6% under co-cultivation, and decreased by 81.0%, 67.7% and 25.0% under couplet-cultivation. **Conclusion** *K. aerogenes*, the pathogenic bacteria for *A. gallica*, presumably secrete some gaseous substance to inhibit the growth of *A. gallica*, and aggravate the disease rate of *G. elata* resulting in a yield reduction. Therefore, strengthening the prevention and control of bacteria will improve the yield of *G. elata*.

**Key words:** *Armillaria gallica*; bacterium; *Gastrodia elata*; isolation and identification; *Klebsiella aerogenes*

**基金项目:** 贵州省基础研究 (自然科学) 项目 (黔科合基础 -ZK[2021] 一般 523); 贵州省教育厅高校科研平台 (黔教技 [2022]021 号); 中国中医科学院科技创新工程 (No.CI2021B013); 国家现代农业产业技术体系项目 (No.CARS-21)。

**作者简介:** 欧小宏, 男, 讲师, 主要从事中药栽培技术方面的研究, email: ogh1986@163.com \* **通信作者:** 周涛, 女, 教授, 主要从事中药资源方面的研究, email: taozhou88@163.com

天麻为兰科植物天麻 (*Gastrodia elata*) 的干燥块茎, 是我国传统名贵中药材, 具有息风止痉、平抑肝阳、祛风通络的功能<sup>[1]</sup>。2023 年天麻被正式纳入药食同源物质目录, 其市场需求量越来越大。随着天麻种植的范围和面积不断扩大, 日益加剧的病虫害严重制约了天麻产业的可持续发展。天麻种植过程中, 经常出现“烂窝”“空窝”现象<sup>[2]</sup>, 导致减产甚至绝产。天麻病害的发生与其自身抗性、土壤微生物群落结构变化等有密切关系。已有研究发现乌天麻块茎腐烂病率高于绿天麻、红天麻和杂交天麻<sup>[3]</sup>; 通过高通量测序分析及分离鉴定发现, 土赤壳属真菌是天麻块茎腐烂的病菌之一<sup>[4-6]</sup>; 也有研究发现天麻产量与土壤微生物群落结构差异<sup>[7-9]</sup>、土壤理化性状及代谢物差异有关<sup>[10]</sup>。虽然目前对天麻病害的关注较多, 但大多集中在天麻自身, 而对其种植过程中的伴生菌种蜜环菌的关注较少。

天麻为异养植物, 人工种植需要蜜环菌作为其营养供给的媒介<sup>[11]</sup>, 所以蜜环菌的生长状态同样影响天麻的生长和产量。当蜜环菌生长不良时, 天麻因营养不足而变得细长, 呈长条状, 天麻产量大幅下降, 空窝率明显增加<sup>[12]</sup>。笔者调查发现前期生长良好的蜜环菌经常出现停止生长或死亡的现象, 生产上称之为“回菌”, 在高温高湿的雨季尤为明显。“回菌”导致菌材上白色的菌丝逐渐死亡, 呈现为黑色的水渍状, 天麻块茎因营养供应不足而发育不良或腐烂, 最终导致减产, 甚至绝收。蜜环菌是大型真菌, 其生长速度较慢, 在高温高湿条件下其繁殖速度远低于细菌, 在种间竞争中处于劣势。因此推测“回菌”现象可能与细菌爆发抑制蜜环菌生长有关。

为验证该推测, 本研究选择不同蜜环菌菌种与天麻进行伴生栽种, 对其栽种过程中蜜环菌及天麻的生长情况进行考察, 通过分离鉴定得到抑制蜜环菌生长的细菌菌株, 对其抑制效应进行验证, 旨在为天麻病害防控提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 供试蜜环菌及天麻麻种

供试蜜环菌菌株 GZ6、GZ1、AH2、SX7 由贵州中医药大学中药民族药资源研究院收集, 生长繁殖活力良好, 经分子鉴定均为 *Armillaria gallica* (*A. gallica*), 生产为菌包用于伴栽天麻。供试天麻种子分别为乌天麻和乌红杂交天麻, 大小均匀, 无病虫害, 由贵州省毕节市大方县乌蒙菌业有限公司提供。

### 1.2 试药

Luria-Bertani (LB) 培养基: 胰蛋白胨 10 g、酵母提取物 5 g、氯化钠 10 g、琼脂粉 10 g、水 1000

mL, 121 °C 灭菌 20 min。马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基: 马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、硫酸镁 3 g、磷酸二氢钾 1.5 g、水 1000 mL、琼脂粉 10 g, 121 °C 灭菌 20 min。十六烷基三甲基溴化铵 (国药集团化学试剂有限公司), 胰蛋白胨、酵母提取物 (北京奥博星生物技术有限责任公司), 琼脂粉、葡萄糖、磷酸二氢钾、硫酸镁、氯化钠 (天津市科密欧化学试剂有限公司), PCR 扩增试剂盒 (北京全式金公司), 通用扩增引物由生工生物工程 (上海) 股份有限合成。

### 1.3 仪器

PCR 扩增仪 (ChemiDoc Touch, 美国 Bio-Rad 公司), 自动蒸汽灭菌锅 (ES-315 型, 日本 TOMY KOGYO), GZX400EF 型恒温光照培养箱 (天津市泰斯特有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 伴栽天麻试验

在贵州大方县天麻种植基地 (E 105° 36'55", N 27° 9'5", 海拔 1743 m) 按照当地习惯种植方法进行伴栽天麻试验。以供试蜜环菌菌株 GZ6、GZ1、AH2、SX7 伴栽天麻, 种植穴面积约 0.3 m<sup>2</sup>, 每穴加菌材 12 根, 蜜环菌菌包 2 包, 麻种 15 个, 麻种分别选择乌天麻和乌红杂交天麻, 每个菌种 10 穴, 共计 80 穴。考察发现部分菌材上蜜环菌于移栽 6 个月开始死亡, 在蜜环菌白色菌丝消失时, 取菌材表皮和木质部中间部分的蜜环菌菌丝, 4 °C 保存, 用作细菌分离; 于移栽 10 个月后天麻进行采挖, 测定天麻产量。

### 2.2 细菌的分离

取“2.1”项下蜜环菌菌丝接种到盛有 25 mL 无菌磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 的锥形瓶中, 在 150 r·min<sup>-1</sup>、30 °C 条件下振荡 30 min, 然后分别用 PBS 按 1×10<sup>-2</sup>、1×10<sup>-3</sup>、1×10<sup>-4</sup>、1×10<sup>-5</sup> 梯度稀释, 分别取 200 μL 稀释液涂布于 LB 培养基上, 每个浓度重复 3 次, 于 37 °C 恒温条件下倒置培养 1 d, 挑取不同形态的单菌落接种到新的 LB 培养基进行纯化, 于液体 LB 培养基上摇菌培养 24 h, -80 °C 冰箱保存备用。

### 2.3 细菌基因组 DNA 提取及鉴定

采用十六烷基三甲基溴化铵法 (CTAB) 提取细菌总 DNA, 利用 16S rDNA 可变区 V3-V4 对细菌进行分子鉴定, 扩增通用引物为 341F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWCTAAT-3'); 再利用 16S rDNA 全长测序进一步确定目标细菌的鉴定结果, 扩增通用引物为 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 扩增体系 20 μL, 包括 10×PCR Buffer 2 μL, 10 mmol·L<sup>-1</sup> dNTPs 1 μL, 5 U·μL<sup>-1</sup> Easy Taq 0.2 μL, 引物各 0.5



$\mu\text{L}$ , DNA 模板  $1\ \mu\text{L}$ ,  $\text{ddH}_2\text{O}$  补齐至  $20\ \mu\text{L}$ 。PCR 扩增体系:  $94\ ^\circ\text{C}$  预变性  $3\ \text{min}$ ;  $94\ ^\circ\text{C}$  变性  $30\ \text{s}$ ,  $58\ ^\circ\text{C}$  退火  $30\ \text{s}$ ,  $72\ ^\circ\text{C}$  延伸  $1\ \text{min}$ , 共 30 个循环;  $72\ ^\circ\text{C}$  再延伸  $5\ \text{min}$ 。扩增后的 PCR 产物由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 测序结果在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行 BLAST 比对, 利用 MEGA 6.0 构建系统进化树, 确定菌株分类。

## 2.4 细菌形态学检查

纯化后的细菌进行革兰氏染色, 于显微镜下观察菌体形态和颜色。

## 2.5 蜜环菌与细菌共培养

采用蜜环菌与细菌共培养方式, 以 GZ1 为供试蜜环菌菌株, 将“2.3”项下筛选得的细菌菌株作为供试材料, 即 GZ1-17、SX7-9、AH2-1 细菌菌株, 将蜜环菌和细菌分别活化, 把蜜环菌菌索切成约  $5\ \text{mm}$  小段, 备用。按照图 1 进行蜜环菌与细菌共培养试验, 即将 PDA 培养基划分为两半, 一半涂布  $50\ \mu\text{L}$  活化的细菌, 一半不涂布细菌, 每皿接种蜜环菌菌索 4 段, 以不涂布细菌的 PDA 培养基为空白对照 (CK), 共 4 个处理, 即 CK、GZ1-17、SX7-9、AH2-1, 重复 4 次, 于  $23\ ^\circ\text{C}$  培养  $20\ \text{d}$  后<sup>[13]</sup>, 对细菌和蜜环菌形态进行拍照, 对蜜环菌菌索和菌丝进行称重。

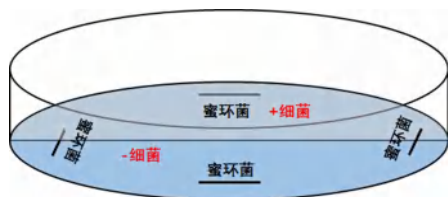


图 1 蜜环菌与细菌共培养示意图

Fig 1 Co-cultivation of *A. gallica* and bacteria

## 2.6 蜜环菌与细菌对扣培养

选用大小相同的培养皿进行对扣培养, 具体操作如图 2 所示, 为防止培养时形成的水滴落入 PDA 培养基影响蜜环菌生长, 所以下层设为 LB 培养基, 上层为 PDA 培养基。PDA 培养基接种一段蜜环菌 GZ1 菌索, LB 培养基不涂布细菌为空白对照 (CK), 其余涂布“2.3”项下筛选得到的细菌  $100\ \mu\text{L}$ , 共 4 个处理, 即 CK、GZ1-17、SX7-9、AH2-1, 重复 4 次, 将培养皿对扣后用封口膜密封, 于  $23\ ^\circ\text{C}$  培养  $20\ \text{d}$ <sup>[13]</sup>, 分别对培养皿中细菌和蜜环菌形态进行拍照, 对蜜环菌菌索和菌丝进行称重。

## 2.7 数据分析

采用 MEGA 6.0 进行序列相似性分析和进化树构建, SPSS 18.0 进行差异显著性分析, Origin 2018 绘图。

## 3 结果与分析

### 3.1 蜜环菌与天麻的生长情况

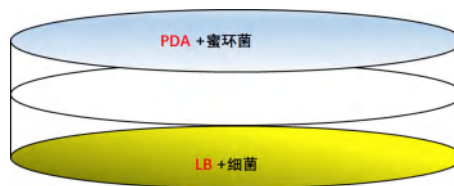


图 2 蜜环菌与细菌对扣培养示意图

Fig 2 Couplet cultivation of *A. gallica* and bacteria

图 3 结果表明, 蜜环菌 GZ6 作为菌种种植乌红杂交天麻和乌天麻时营养供给充足, 天麻能够正常生长, 形成正常的块茎、膨大明显; 而蜜环菌 GZ1、SX7 和 AH2 作为菌种, 出现天麻营养供给不足, 不能正常生长, 呈现块茎细长、膨大不明显等性状。天麻产量测定结果表明, 与蜜环菌 GZ6 作为菌种时相比, GZ1、SX7 和 AH2 作为菌种时产量显著降低, 其中乌红杂交天麻产量降低  $72\% \sim 79\%$ , 乌天麻产量降低  $79\% \sim 97\%$ 。由此推测, 蜜环菌 GZ1、SX7 和 AH2 在天麻种植过程中, 其生长可能受到抑制, 进而导致天麻生长发育所需营养不足。

### 3.2 候选病害细菌的分离鉴定

为明确天麻减产的原因, 在蜜环菌伴栽天麻 4 个月左右, 发现 GZ6 木材与皮层有大量白色菌丝, 表明蜜环菌正常生长; 而 GZ1、SX7 和 AH2 的菌材大部分呈黑色水渍状, 仅可见少许白色菌丝 (见图 4), 表明蜜环菌受到抑制而逐渐死亡, 推测蜜环菌的死亡可能是细菌污染引起的。

为此, 采用 LB 培养基进行梯度稀释法对蜜环菌菌索或菌丝进行细菌分离, 从 GZ6、GZ1、SX7、AH2 中分离得到细菌单克隆分别为 9 个、22 个、21 个、19 个 (见图 4)。根据菌落形态、颜色、边缘平整度等性状, 对单克隆进行分类, 采用 16S rDNA 可变区 V3-V4 序列进行 BLAST 比对, 比对率均超过  $97\%$  (见表 1)。其中, GZ6 鉴定出 2 个细菌菌株, 分别为炭疽芽孢杆菌 *Bacillus anthracis* (GZ6-1、GZ6-15)、威兹曼芽孢杆菌 *Bacillus wiedmannii* (GZ6-14); GZ1 鉴定出 5 个细菌菌株, 分别为饲料类芽孢杆菌 *Paenibacillus pabuli* (GZ1-2、GZ1-14)、河生雷勒特氏菌 *Lelliottia aquatilis* (GZ1-3、GZ1-16)、托拉斯假单胞菌 *Pseudomonas tolaasii* (GZ1-6)、肠集聚型大肠埃希菌 *Paenibacillus agarexedens* (GZ1-13)、克雷伯氏产气菌 (*Klebsiella aerogenes*) (GZ1-17); SX7 鉴定出 5 个细菌菌株, 分别为水生拉恩菌 *Rahnella aquatilis* (SX7-1、SX7-2)、动胶菌样申氏菌 *Shinella zoogloeoides* (SX7-5)、克雷伯氏产气菌 *Klebsiella aerogenes* (SX7-9)、沙雷氏菌 *Serratia marcescens* (SX7-11)、萨拉曼卡假单胞菌 *Pseudomonas helmanticensis* (SX7-12、SX7-13); AH2 鉴定出 3 个细菌菌株, 分别为克雷伯氏产气菌 *Klebsiella aerogenes* (AH2-1)、结肠炎耶尔森杆菌 *Yersinia en-*



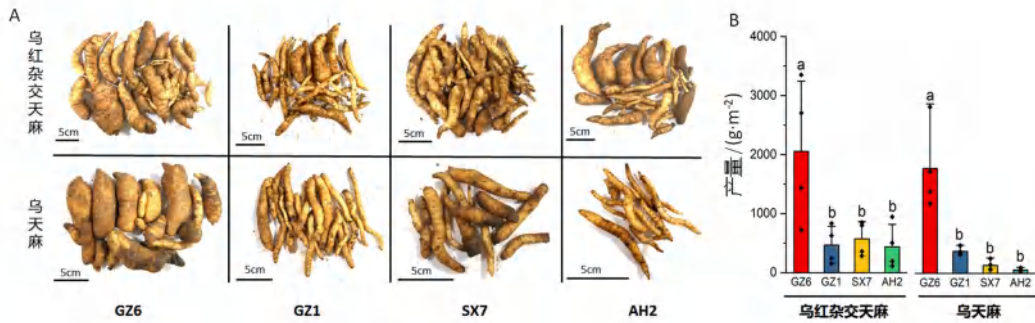


图 3 不同蜜环菌种对天麻产量的影响

Fig 3 Effect of different *A. gallica* strains on the yield of *G. elata*

注：图中小写字母表示差异显著， $P < 0.05$ 。

Note: Lowercase in the column means significant difference,  $P < 0.05$ .

*terocolitica* (AH2-10) 和韩国假单胞菌 *Pseudomonas koreensis* (AH2-12)。鉴定结果表明，克雷伯氏产气菌 *Klebsiella aerogenes* 是 GZ1、SX7、AH2 菌株中分离的共有细菌，而未在 GZ6 中鉴定出，所以推测该菌是抑制蜜环菌生长的关键细菌。

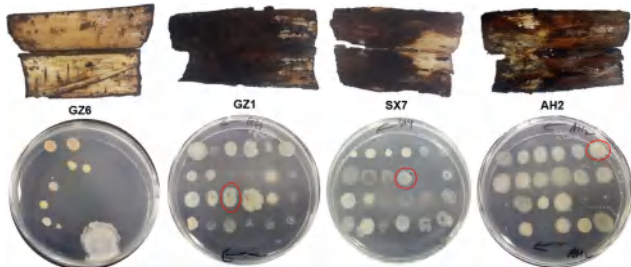


图 4 不同蜜环菌生长及细菌分离情况

Fig 4 Growth of different *A. gallica* strains and bacteria isolation

### 3.3 候选病害细菌的进化分析

为进一步确定对克雷伯氏产气菌 *Klebsiella aerogenes* 的鉴定，分别将 GZ1-17、SX7-9 和 AH2-1 菌株进行 16S rDNA 全长测序。通过 BLAST 比对和进化树构建，进一步确定这 3 个细菌菌株具有高度的同源性，与克雷伯氏产气菌 *Klebsiella aerogenes* 可以聚为一类（见图 5）。通过形态观察结果表明，这 3 个细菌菌株为革兰氏阴性细菌，菌体呈杆状（见图 6）。

### 3.4 病害细菌对蜜环菌生长的影响

为进一步确定克雷伯氏产气菌 *Klebsiella aerogenes* 抑制蜜环菌的生长，分别将细菌菌株 AH2-1、GZ1-17、SX7-9 与蜜环菌进行共培养。发现未涂布克雷伯氏产气菌 *Klebsiella aerogenes* 的对照组（CK）蜜环菌能正常生长，形成菌丝、菌索，而涂布细菌 AH2-1、GZ1-17、SX7-9 的处理组中蜜环菌生长受到显著抑制，不能正常长出菌索。统计结果表明，与 CK 相比，AH2-1、GZ1-17、SX7-9 处理的蜜环菌菌索或菌丝生物量均显著降低，降低 90.9%、36.5% 和 35.6%（见图 7），由此进一步说明克雷伯氏产气菌 *Klebsiella aerogenes* 会抑制蜜环菌菌索的生长。

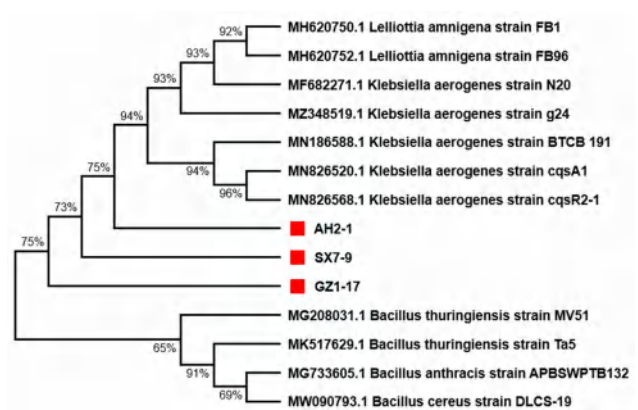


图 5 分离细菌进化分析

Fig 5 Evolution analysis of isolated bacteria

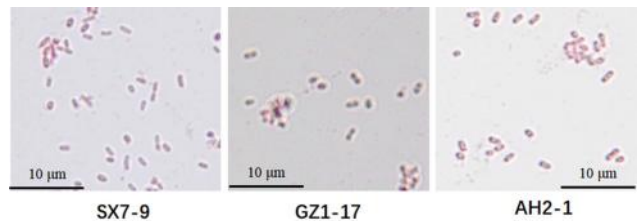


图 6 分离细菌显微结构鉴定

Fig 6 Microstructure identification of isolated bacteria

鉴于克雷伯氏产气菌 *Klebsiella aerogenes* 能够产生酸性气体物质<sup>[14]</sup>，为确定其抑制蜜环菌生长的物质类型，采用对扣培养试验进行研究，发现未涂布细菌的对照组（CK），蜜环菌能够正常生长、形成菌索，而涂布细菌 AH2-1、GZ1-17 和 SX7-9 处理的蜜环菌生长受到显著抑制，不能正常生长形成菌索，仅以菌丝形态生长。统计结果表明，与 CK 相比，AH2-1、GZ1-17 和 SX7-9 处理的蜜环菌菌索或菌丝生物量均显著降低，比 CK 降低了 81.0%、67.7% 和 25.0%（见图 8）。虽然蜜环菌与细菌未直接接触，但其生长仍然受到显著抑制，由此说明克雷伯氏产气菌 *Klebsiella aerogenes* 是通过产生气体物质抑制蜜环菌的生长。

表 1 细菌 16S rDNA 序列比对分析  
Tab 1 Comparative analysis of bacterial 16S rDNA sequence

| 蜜环菌菌种 | 细菌菌株编号 | 相似菌株                                                    | 基因库编号      | 比对率/% |
|-------|--------|---------------------------------------------------------|------------|-------|
| GZ6   | GZ6-1  | <i>Bacillus anthracis</i> strain HCYL02                 | GQ392044.1 | 99.09 |
|       | GZ6-14 | <i>Bacillus wiedmannii</i> strain FSL W8-0169           | KU198626.1 | 97.41 |
|       | GZ6-15 | <i>Bacillus anthracis</i> strain APBSWPTB132            | MG733605.1 | 99.09 |
| GZ1   | GZ1-2  | <i>Paenibacillus pabuli</i>                             | AM260978.1 | 98.83 |
|       | GZ1-3  | <i>Lelliottia aquatilis</i> strain JZY1-2               | MT071355.1 | 99.07 |
|       | GZ1-6  | <i>Pseudomonas tolaasii</i> strain LMG 2342             | MT561438.1 | 99.30 |
|       | GZ1-13 | <i>Paenibacillus agarexedens</i> strain B171            | EU240421.1 | 98.86 |
|       | GZ1-14 | <i>Paenibacillus pabuli</i>                             | AM260978.1 | 98.83 |
|       | GZ1-16 | <i>Lelliottia aquatilis</i> strain JZY1-2               | MT071355.1 | 99.09 |
|       | GZ1-17 | <i>Klebsiella aerogenes</i> strain cqsR2-1              | MN826568.1 | 99.07 |
| SX7   | SX7-1  | <i>Rahnella aquatilis</i> strain AL30                   | MG819522.1 | 99.30 |
|       | SX7-2  | <i>Rahnella aquatilis</i> strain AL30                   | MG819522.1 | 99.30 |
|       | SX7-5  | <i>Shinella zoogloeoides</i> strain PBMS-4              | MN880421.1 | 98.04 |
|       | SX7-9  | <i>Klebsiella aerogenes</i> strain cqsR2-1              | MN826568.1 | 98.61 |
|       | SX7-11 | <i>Serratia marcescens</i> strain BIB 49                | KY490637.1 | 99.54 |
|       | SX7-12 | <i>Pseudomonas helmanticensis</i> strain SRS-127-S-2019 | MT322955.1 | 99.31 |
|       | SX7-13 | <i>Pseudomonas helmanticensis</i> strain SRS-127-S-2019 | MT322955.1 | 99.54 |
| AH2   | AH2-1  | <i>Klebsiella aerogenes</i> strain cqsR2-1              | MN826568.1 | 98.84 |
|       | AH2-10 | <i>Yersinia enterocolitica</i> strain IP37424           | LR745667.1 | 99.30 |
|       | AH2-12 | <i>Pseudomonas koreensis</i> strain KK19B_5_341F        | KY009567.1 | 99.07 |

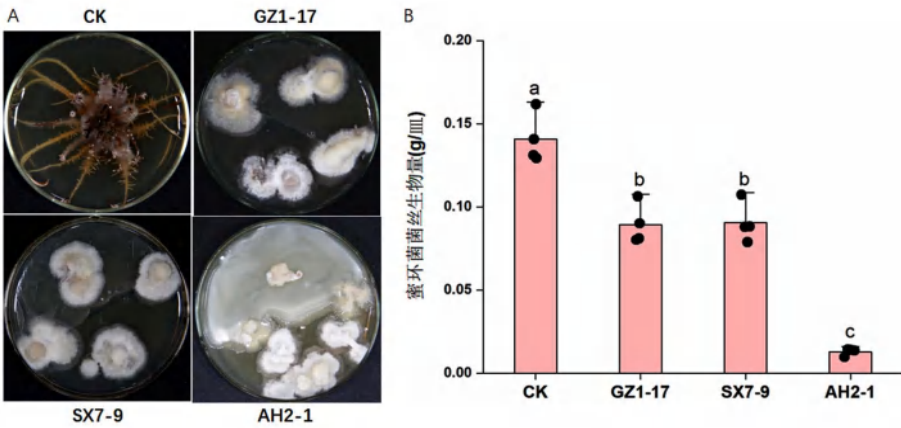


图 7 细菌和蜜环菌共培养 (A) 及数据统计分析 (B)

Fig 7 Bacteria co-culture with *A. gallica* (A) and data analysis (B)

注: 图中小写字母表示差异显著,  $P < 0.05$ 。

Note: Lowercase in the column means significant difference,  $P < 0.05$ .

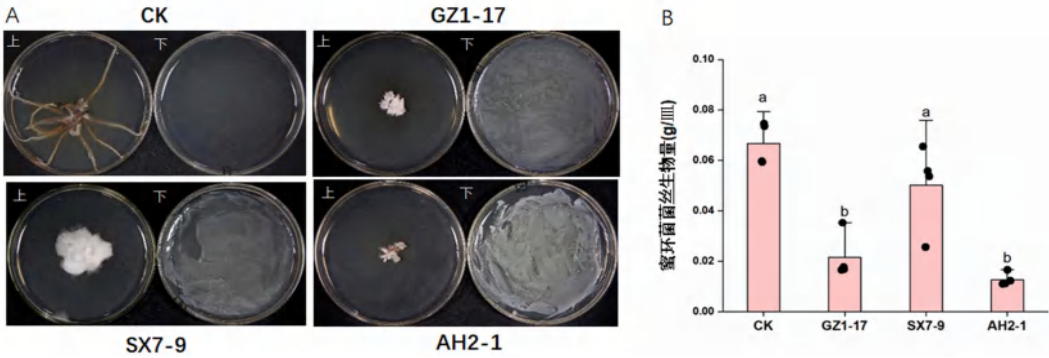


图 8 细菌和蜜环菌对扣培养 (A) 及数据统计分析 (B)

Fig 8 Bacteria couplet-cultured with *A. gallica* (A) and data statistic analysis (B)

注: 图中小写字母表示差异显著,  $P < 0.05$ 。

Note: Lowercase in the column means significant difference,  $P < 0.05$ .

#### 4 讨论

蜜环菌作为一种大型真菌,其生长发育直接关系到天麻的生长与产量。本研究发现,天麻的产量与蜜环菌的生长发育密切相关,菌丝正常生长的蜜环菌 GZ6 的天麻生长及产量均正常,而菌丝非正常生长的蜜环菌 GZ1、SX7 和 AH2 的天麻不能正常生长,产量严重降低。大型真菌在种植过程会受到其他真菌、细菌等微生物的相互作用,对大型真菌营养造成掠夺或者抑制其生长,造成水渍、酸败、湿败、腐烂甚至造成死亡等症状<sup>[15]</sup>。本研究发现,正常生长的蜜环菌菌丝呈白色状,伴有大量菌索生长,而非正常生长的蜜环菌白色菌丝较少且出现死亡的现象。高温高湿条件下,蜜环菌的繁殖速度远低于细菌,所以本研究认为抑制蜜环菌生长的细菌大量繁殖导致蜜环菌死亡,是造成天麻不能正常生长、产量降低的重要原因。

据研究报道,*Klebsiella aerogenes* 广泛存在于自然界,是一种革兰氏阴性菌,最早被划分为产气肠杆菌 *Enterobacter aerogenes*<sup>[16]</sup>,随后基于全基因组测序结果将其重新命名为克雷伯氏产气菌 *Klebsiella aerogenes*,是一种机会致病菌和医源性感染菌。*Klebsiella aerogenes* 因强耐药性<sup>[17]</sup>,可能长期潜伏于环境中,夏季高温高湿气候使其生长暴发,消耗土壤中的氧气,产生大量有害气体。本研究通过对细菌进行分离鉴定,发现在生长受抑制的蜜环菌中鉴定出克雷伯氏产气菌 *Klebsiella aerogenes*,证实该菌通过分泌气体物质抑制蜜环菌的生长发育。因此,天麻种植过程中 *Klebsiella aerogenes* 产生气体物质抑制蜜环菌生长,间接导致天麻生长发育不良而致使其减产。此外,虽然在农业微生物领域 *Klebsiella aerogenes* 对镰刀菌属 *Fusarium* 致病真菌具有一定的生防功能<sup>[16, 18]</sup>,但大部分研究发现其具有致病性,如导致珍珠小米茎基腐烂<sup>[19]</sup>、地黄根腐<sup>[20]</sup>等。所以,*Klebsiella aerogenes* 也可能直接侵染天麻,抑制其生长发育甚至使其块茎腐烂,而导致其产量降低。

另外,本研究还在细菌污染的蜜环菌中都分离鉴定出不同种的假单胞菌。假单胞菌作为一类同时具有致病性和生防功能的细菌<sup>[21-22]</sup>,也可能对 *Klebsiella aerogenes* 产生抑制作用,是蜜环菌生长的潜在生防菌。已有研究发现,拉恩氏菌 *Rahnella* 作为一种益生菌可以促进蜜环菌的生长而提升天麻的产量<sup>[23]</sup>。因此,进一步筛选抑制 *Klebsiella aerogenes* 的生防菌或者筛选抗病蜜环菌菌种,阐明其作用机制,对天麻产业发展具有重要的理论意义。

#### 5 结论

天麻种植过程中,蜜环菌正常生长可以保障天麻生长与产量,而蜜环菌受细菌污染则会导致天麻减产。从受细菌侵染的蜜环菌中分离鉴定得到一种革兰氏阴性菌——克雷伯氏产气菌 *Klebsiella aerogenes*,通过分泌气体物质抑制蜜环菌的生长,造成天麻生长缺乏营养供给而导致天麻减产。因此,加强对克雷伯氏产气菌的防控并筛选抑制克雷伯氏产气菌的生防菌,可以促进蜜环菌生长和提升天麻产量。

#### 参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版.一部[S]. 2020: 59-60.
- [2] 李诚,李锦绍,陈旭君,等. 贵州天麻褐腐病病原菌鉴定[J]. 植物病理学报, 2022, 52(4): 699-701.
- [3] 张进强,袁青松,欧阳臻,等. 不同生态型天麻块茎腐烂病抗性差异分析[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(9): 2281-2287.
- [4] 张进强,唐鑫,郭兰萍,等. 天麻连作障碍与土赤壳属真菌的关联分析及改善措施[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(9): 2296-2303.
- [5] 唐鑫,张进强,滕力庆,等. 天麻褐腐病与土壤微生物菌群结构的关联分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(24): 153-160.
- [6] 唐鑫,张进强,江维克,等. 天麻褐腐病病原菌的分离鉴定及致病性研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(9): 2288-2295.
- [7] 罗影子,黄明进,王大昌,等. 不同产量下天麻根际土壤微生物多样性分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(1): 133-140.
- [8] 蔡丽琼,陈瑞,杨德强,等. 基于高通量测序的天麻连作根际土壤真菌群落多样性分析[J]. 中国麻业科学, 2022, 44(6): 321-330.
- [9] 陈瑞,杨德强,赵长林. 基于高通量测序分析天麻种植土壤的真菌变化[J]. 西南农业学报, 2023, 36(7): 362-372.
- [10] 王佩,孟广云,毛如志,等. 不同环境栽培对天麻土壤理化性质、微生物、代谢物的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(14): 164-174.
- [11] Yuan Y, Jin XH, Liu J, et al. The *Gastrodia elata* genome provides insights into plant adaptation to heterotrophy[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 1615.
- [12] 王绍柏,余昌俊. 论天麻的退化及防治措施[J]. 中国食用菌, 1997, 16(5): 12-13.
- [13] 黄莹,徐娇,周涛,等. 高温胁迫对蜜环菌生长特性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(19): 17-22.
- [14] 李梦娇,彭晟,徐绍忠,等. 克雷伯氏菌在农业与环境治理上的应用[J]. 生物技术进展, 2014, 4(6): 415-420.
- [15] 崔嫚,邵改革,杨诺林,等. 微生物对食用菌生长发育影响的研究进展[J]. 生物技术通报, 2024, 40(5): 13-22.
- [16] 杨森冷,王威,申乃坤,等. 产气克雷伯氏杆菌 *Klebsiella aerogenes* S2 对植物病原真菌的抑菌活性及番茄促



- 生效果[J]. 植物保护, 2022, 48 (5): 91-98.
- [17] Chakkyrath V, Shanmugam A, Natarajan J. Prioritization of potential drug targets and antigenic vaccine candidates against *Klebsiella aerogenes* using the computational subtractive proteome-driven approach [J]. J Proteins Proteom, 2021, 12 (3): 201-211.
- [18] Cheng S, Jiang JW, Tan LT, et al. Plant Growth-promoting ability of *Mycorrhizal fusarium* strain KB-3 enhanced by its IAA producing endohyphal bacterium, *Klebsiella aerogenes* [J]. Front Microbiol, 2022, 13: 855399.
- [19] Malik VK, Sangwan P, Singh M, et al. First report of *Klebsiella aerogenes* inciting stem rot of pearl millet in Haryana, India [J]. Plant Dis, 2021, 106 (2): 754.
- [20] Wang RF, Wang Y, Yang QX, et al. Unraveling the characteristics of the microbial community and potential pathogens in the rhizosphere soil of *Rehmannia glutinosa* with root rot disease [J]. Appl Soil Ecol, 2018, 130: 271-279.
- [21] 赵倩, 任广伟, 王杰, 等. 施用韩国假单胞菌 (*Pseudomonas koreensis*) CLP-7 对连作烟田土壤质量及微生物群落功能多样性的影响 [J]. 生态学报, 2020, 40 (15): 5357-5366.
- [22] 刘国芳, 苏辉昭, 覃思琦. 植物病原细菌应急反应研究进展 [J]. 广西科学, 2023, 30 (2): 219-225.
- [23] Liu TR, Hua ZY, Han PJ, et al. Mycorrhizosphere bacteria, *Rahnella* sp. HPDA25, promotes the growth of *Armillaria gallica* and its parasitic host *Gastrodia elata* [J]. Front Microbiol, 2022, 13: 842893.

(收稿日期: 2024-08-19; 修回日期: 2024-09-08)

## 宁夏枸杞内生真菌 *Fusarium acutatum* 中甾醇类化学成分研究

邓宁<sup>1</sup>, 刘俊梅<sup>2</sup>, 吴佳妮<sup>2</sup>, 柳全霞<sup>3</sup>, 高华<sup>2</sup> (1. 宁夏医科大学总医院药物临床试验机构办公室, 银川 750004; 2. 宁夏医科大学总医院药剂科, 银川 750004; 3. 宁夏医科大学总医院肿瘤内科, 银川 750004)

**摘要:** **目的** 对 1 株来源于宁夏枸杞的内生真菌 *Fusarium acutatum* 发酵物中的甾醇类化合物进行研究。**方法** 使用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱等方法分离纯化 *Fusarium acutatum* 大米固体发酵物中的甾醇类化合物; 采用 NMR 波谱分析方法并结合文献数据, 鉴定化合物的结构; 采用 CCK-8 法对分离得到的降甾醇进行细胞毒活性测试; 采用划痕法进行抑制细胞迁移测试。**结果** 从宁夏枸杞内生真菌 *Fusarium acutatum* 大米固体发酵物中分离得到 5 个甾醇类化合物, 通过波谱数据分析鉴定为 4-羟基-17R-甲基甾醇 (**1**), 7-ketositosterol (**2**), 豆甾-4-烯-6-羟基-3-酮 (**3**), (22E, 24R)-麦角甾-7, 22-二烯-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -三醇 (**4**), 6, 9-epoxy-ergosta-7, 22-dien-3-ol (**5**)。化合物 **1** 对结肠癌细胞 (SW620)、胰腺癌细胞 (BxPC-3) 和人胶质瘤细胞 (U251) 的增殖均具有抑制活性, 半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 值分别为 6.14、20.45 和 9.22  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 具有同时抑制 SW620 细胞和 U251 细胞迁移的活性 ( $P < 0.01$ )。**结论** 化合物 **1** 为首次在 *Fusarium acutatum* 中分离得到, 该化合物对 SW620、BxPC-3 和 U251 细胞株具有细胞毒活性, 同时, 具有抑制 SW620 和 U251 细胞株迁移的活性。

**关键词:** 内生真菌; 降甾醇; 化学成分; 细胞毒活性

中图分类号: R285, R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)06-1606-06  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.016

### Sterol constituents of the endophytic fungus *Fusarium acutatum* isolated from *Lycium chinense* Miller

DENG Ning<sup>1</sup>, LIU Jun-mei<sup>2</sup>, WU Jia-ni<sup>2</sup>, LIU Quan-xia<sup>3</sup>, GAO Hua<sup>2</sup> (1. Office of Drug Clinical Trial Institutions, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004; 2. Department of Pharmacy, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004; 3. Department of Oncology, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004)

**基金项目:** 宁夏自然科学基金项目 (No.2019AAC03239)。

**作者简介:** 邓宁, 女, 硕士, 主要从事肿瘤药理学研究, email: dengning20@126.com

**Abstract: Objective** To determine the sterol constituents of endophytic fungus *Fusarium acutatum* from *Lycium chinense* Miller in Ningxia. **Methods** Column chromatography with silica gel, and Sephadex LH-20 were used to isolate and purify the compounds from solid extract fermented rice of *Fusarium acutatum*. Their structures were elucidated by spectroscopic techniques (NMR) and compared with reported spectral data. CCK-8 method was used to evaluate the cytotoxic activity, and migration assay to test cell migration of compound 1. **Results** Five sterols were isolated and identified as 4-hydroxy-17 $R$ -methylincisterol (1), 7-ketositosterol (2), stigmast-4-en-6 $\beta$ -ol-3-one (3), (22 $E$ , 24 $R$ )-ergosta-7, 22-diene-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol (4), and 6, 9-epoxy-ergosta-7, 22-dien-3-ol (5). Compound 1 exhibited certain cytotoxicity on SW620, BxPC-3 and U251 with an  $IC_{50}$  values of 6.14, 20.45 and 9.22  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , respectively. Compound 1 inhibited the migration of SW620 and U251 cells at 48 h ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Compound 1 has been isolated from this fungus for the first time, which has cytotoxicity against SW620, BxPC-3 and U251 cell lines, and inhibits the migration of SW620 and U251 cell lines.

**Key words:** endophytic fungus; norcholesterol; chemical constituent; cytotoxicity

在长期进化的过程中,植物内生菌在宿主体内达到微生态系统平衡,并与宿主植物形成复杂的生态关系,已成为人们寻找新型药物的重要来源<sup>[1]</sup>。已有研究表明,从植物中分离的内生真菌的次生代谢产物具有抗肿瘤活性<sup>[2]</sup>。宁夏枸杞(*Lycium chinense* L.)为茄科多年生落叶小灌木,果实和根皮均可入药,具有很高的营养价值和药用保健功效,宁夏产枸杞因其品质优良,被《中国药典》收录为道地性中药材<sup>[3]</sup>。枸杞内生菌与枸杞在长期共进化过程中形成了稳定的互利共生关系,次生代谢产物是这种关系的物质基础。目前对于枸杞内生菌的相关研究极少,其代谢产物是否具有潜在的药用价值尚未知。本研究运用硅胶、Sephadex LH-20 等柱色谱进行分离鉴定,得到了 5 个甾醇类化合物(见图 1)。其中,化合物 1 为首次在 *Fusarium acutatum* 中分离得到,以结肠癌细胞(SW620)、胰腺癌细胞(BxPC-3)和人胶质瘤细胞(U251)3 种肿瘤细胞为指示细胞对枸杞内生真菌发酵产物中的化合物 1 进行体外细胞毒活性和抑制细胞迁移活性研究,筛选具有抗肿瘤转移活性的化合物,以期了解枸杞内生菌的生物学特性及其未知的药理学作用,为开发枸杞内生菌资源、获得能够产生药用功能性成分的内生菌代谢产物提供理论基础。

## 1 材料

### 1.1 菌株及细胞

*Fusarium acutatum* 菌株、受试细胞[结肠癌细胞(SW620)、胰腺癌细胞(BxPC-3)和人胶质瘤细胞(U251)](中国科学院上海生命科学院细胞资源中心)。

### 1.2 试剂

石油醚、乙酸乙酯(分析纯,天津市津东天正精细化学试剂厂);甲醇、二氯甲烷(分析纯,天津市恒兴化学试剂制造有限公司);甲醇(色谱级,天津市科密欧化学试剂有限公司);5-氟尿嘧啶(5-Fu)[5 g/瓶,生工生物工程(上海)股份有限公司];薄层层析硅胶板、柱层析硅胶(60~80 目)、柱层析硅胶(200~300 目)(烟台化学工业研究所);Sephadex LH-20 凝胶(瑞典 GE Healthcare 公司);DMEM 培养基、RPMI-1640 (HyClone, Logan);胎牛血清(北京全式金生物技术有限公司);胰蛋白酶、二甲基亚砜(DMSO)、CCK-8 试剂盒(Solarbio 公司)。

### 1.3 仪器

Agilent1260 分析型高效液相色谱仪(Agilent 公司);半制备液相色谱仪(北京奥诺科技有限公司);BrukerAV-600 型超导核磁共振波谱仪(Bruker 公司);BSA224S 电子天平(德国赛多利斯股份公司);BC-J160 CO<sub>2</sub> 培养箱(上海博讯医疗生物仪器股份有限公司);Multiskan 全自动酶标仪(赛默飞世尔科技有限公司);DM13000B 倒置荧光显微镜(莱卡公司);超净工作台(苏州净化有限公司)。

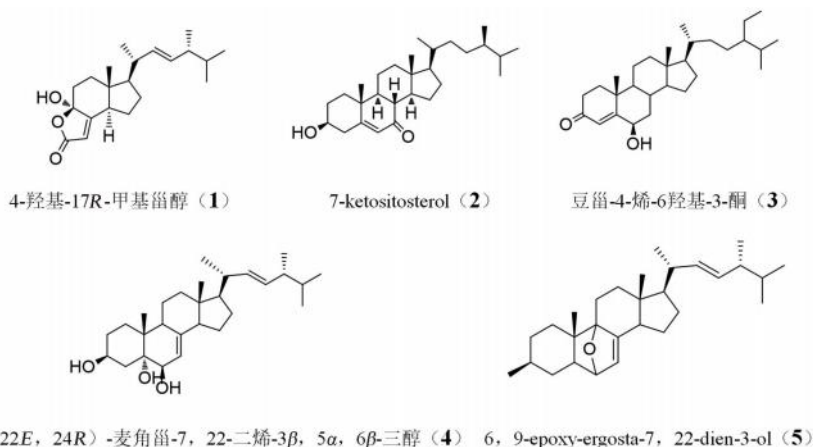
## 2 方法

### 2.1 培养基的配制

PDA 培养基:去皮马铃薯 200 g,葡萄糖粉 20 g,琼脂 18 g,纯净水 1000 mL,121 °C 湿热灭菌 30 min。大米固体培养基:100 g 大米,80 mL 蒸馏水,浸泡 2 h,121 °C 湿热灭菌 30 min。

### 2.2 菌株的发酵

取活化好的 *Fusarium acutatum* 菌株接种到

图1 *Fusarium acutatum* 中分离得到的化合物 1~5 的化学结构Fig 1 Chemical structures of compounds 1~5 obtained from *Fusarium acutatum*

PDA 培养基上, 常温下培养 5 d, 将平板上的菌体切成 5 mm 的菌块, 将菌块加入装有 200 mL PDA 液体培养基的 500 mL 三角瓶中, 每瓶放 3 块菌块, 将三角瓶放在  $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $27^\circ\text{C}$  条件下培养 4 d, 得到真菌种子液。将种子液接入装有已灭菌的大米培养基的三角瓶中, 每瓶种子液接 20 瓶大米培养基, 常温下静置培养 45 d。

### 2.3 发酵产物的提取

将所有发酵好的菌株发酵产物集中在 75 L 的塑料桶内, 加入 2 倍体积的甲醇浸泡 24 h 后, 吸取上层甲醇, 蒸发浓缩后, 再加入相同体积的甲醇, 重复 3 次, 将得到的浸膏合并, 加水混悬, 分别用石油醚、乙酸乙酯萃取, 回收试剂, 得到乙酸乙酯层浸膏 128 g, 备用。

### 2.4 发酵产物的分离

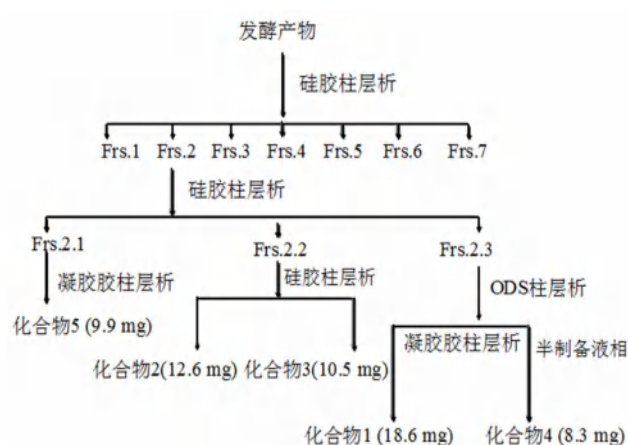
在 128 g 浸膏中加入相同质量的 60~80 目硅胶, 搅拌均匀, 干燥至样品全部吸附到硅胶上为止。将拌好的样品干法装柱, 加入装有 6 倍质量的 200~300 目硅胶的加压柱内。以石油醚: 乙酸乙酯 (30:1、20:1、10:1、5:1、4:1、2:1、1:1、0:1) 为洗脱剂, 待全部比例冲完后, 经 TLC 分析, 相同样品合并, 共得到 7 个大组分 Frs.1~Frs.7。Frs.2 经过反复硅胶、凝胶、ODS 柱层析及半制备液相分离得到单体化合物。*Fusarium acutatum* 的提取分离流程图见图 2。

### 2.5 药物配制

**2.5.1 样品** 用 DMSO 将样品配制成  $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液, 再用 DMSO 等比稀释成 2、1、0.5、0.25、0.125  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液待用。

**2.5.2 阳性药** 用 DMSO 把 5-Fu 配制成  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 再稀释成 0.5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 然后等比稀释成 0.5、0.25、0.125、0.0625、0.031 25  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  系列浓度, 待用。

### 2.6 细胞毒活性检测

图2 *Fusarium acutatum* 的提取分离流程图Fig 2 Extraction and separation flow chart of *Fusarium acutatum*

采用 CCK-8 法测定 4-羟基-17R-甲基甾醇 (化合物 1) 的细胞毒活性。取处于对数生长期而未达到汇合状态时的细胞进行接种, 取  $50 \mu\text{L}$  细胞悬液加入  $200 \mu\text{L}$  EP 管中, 再加入  $150 \mu\text{L}$  台盼蓝溶液, 混匀。倒置显微镜 ( $\times 20$  物镜) 下, 对细胞进行计数。按  $5 \times 10^4$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  接种细胞于 96 孔板内, 每孔  $98 \mu\text{L}$ , 均设 3 个复孔, 设置空白对照组 (培养基)、正常对照组 (培养基+细胞)、DMSO 组、药物处理组 (培养基+细胞+药物)。样品组: 每个孔分别加入不同浓度的药物  $2 \mu\text{L}$ , 使终质量浓度为 40、20、10、5、2.5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 阳性药组: 每个孔加入不同浓度的 5-Fu  $2 \mu\text{L}$ , 使终质量浓度为 10、5、2.5、1.25、0.625  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; DMSO 组: 每孔加入  $2 \mu\text{L}$  0.02% DMSO; 正常对照组: 在加细胞的孔中每孔加入等量培养基; 空白对照组: 在不加细胞的孔中每孔加等量培养基。细胞经药物处理 48 h 后取出置于超净台中, 弃去 96 孔板中的液体, 每孔加入  $100 \mu\text{L}$  的 CCK-8 反应液。将 96 孔板置于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 1.5 h, 用酶标仪在 450 nm 处检测吸光度。



( $OD$ )。计算抑制率[抑制率(%) = ( $OD_{\text{药物处理组}} - OD_{\text{正常对照组}}$ ) / ( $OD_{\text{DMSO组}} - OD_{\text{正常对照组}}$ ) × 100%], 并用寇氏改良法计算半数抑制浓度( $IC_{50}$ )值。

## 2.7 划痕实验

每日观察细胞生长状态, 当细胞汇合度达到 80% ~ 90% 时, 吸弃培养基。加入 3.0 ~ 4.0 mL 不含钙镁的 PBS 润洗, 吸弃, 加入 0.5 mL 0.25% 的胰蛋白酶, 镜下观察细胞, 根据细胞状态消化 2 ~ 6 min, 若细胞间无粘连有少量细胞悬浮后吸去胰蛋白酶并加入 4 ~ 6 mL 完全培养基终止消化。用吸管轻轻吹打使细胞脱壁, 吹打顺序为从上往下, 同时要注意防止泡沫的产生(多吸少吹)。镜下观察, 若细胞已均匀分散且无细胞团, 根据细胞密度保留一传二或一传三, 加入新鲜培养基继续培养。将细胞消化下来后, 培养基混匀, 接种到 6 孔板内, 每个孔 2 mL 培养基。分别设置加药孔、对照孔。待孔内细胞长满后, 用黄枪头在孔的中央划一条直线, 弃去旧的培养基, PBS 清洗悬浮细胞, 再分别用  $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  化合物 1 处理 SW620、BxPC-3 和 U251 细胞。加药后随即拍照(0 h), 记录拍照位置, 48 h 后在同一位置拍照。拍照软件上测量划痕宽度。用 0 h 的划痕宽度减去 48 h 后的划痕宽度, 得出细胞迁移距离。用 GraphPad Prism 对数据进行统计学分析并作图。

## 3 结果

### 3.1 化合物结构鉴定

化合物 1 为无色针状结晶,  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta_{\text{H}}$ : 5.60 (s, 1H), 5.26 (dd,  $J = 15.0, 7.8$  Hz, 1H), 5.17 (dd,  $J = 15.0, 7.8$  Hz, 1H), 2.66 (m, 1H), 2.31 (d,  $J = 13.8$  Hz, 1H), 2.06 (m, 1H), 1.96 (d,  $J = 13.2$  Hz, 1H), 1.72 (m, 1H), 1.81 ~ 1.90 (overlap, 1H × 3), 1.42 ~ 1.54 (overlap, 1H × 3), 1.64 (m, 1H), 1.04 (d,  $J = 6.0$  Hz, 3H), 0.93 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H), 0.84 (d,  $J = 7.8$  Hz, 3H), 0.83 (d,  $J = 7.8$  Hz, 3H), 0.60 (s, 3H);  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 171.7 (s, C-1), 171.0 (s, C-3), 134.7 (d, C-15), 132.8 (d, C-16), 112.1 (d, C-2), 105.3 (s, C-4), 55.3 (d, C-11), 50.4 (d, C-8), 48.8 (s, C-7), 42.8 (d, C-17), 40.1 (d, C-13), 35.2 (t, C-5), 35.1 (t, C-6), 33.1 (d, C-18), 28.9 (t, C-10), 21.4 (t, C-9), 21.0 (q, C-14), 20.0 (q, C-20), 19.6 (q, C-19), 17.6 (q, C-21), 11.8 (q, C-12)。综合  $^1\text{H-NMR}$  和  $^{13}\text{C-NMR}$  分析, 以上 NMR 数据与参考文献<sup>[3-4]</sup>一致, 因此鉴定该化

合物为 4-羟基-17 $\beta$ -甲基甾醇。

化合物 2 为白色晶体,  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 5.69 (1H, br s, H-6), 3.68 (1H, m, H-3), 1.20 (3H, s, H-19), 0.93 (3H, m, H-21), 0.86 ~ 0.81 (9H, m), 0.68 (3H, s, H-18)。  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 202.4 (C-7), 165.1 (C-5), 126.1 (C-6), 70.5 (C-3), 54.7 (C-17), 50.0 (C-14), 49.9 (C-24), 45.8 (C-8), 45.4 (C-9), 43.1 (C-13), 41.8 (C-4), 38.7 (C-10), 38.3 (C-12), 36.4 (C-20), 36.1 (C-22), 33.9 (C-2), 31.2 (C-25), 29.1 (C-23), 28.6 (C-1), 26.3 (C-15), 26.1 (C-16), 23.1 (C-28), 21.2 (C-19), 19.8 (C-11), 19.0 (C-26), 18.9 (C-27), 17.3 (C-18), 12.0 (C-21), 12.0 (C-29)。以上核磁数据与参考文献<sup>[5-6]</sup>一致, 因此鉴定该化合物为 7-ketositosterol。

化合物 3 为白色晶体,  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 5.82 (1H, s, H-4), 4.35 (1H, br s, H-7), 1.38 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-21), 0.81 ~ 0.86 (9H, H-26, 27, 29), 0.87 (3H, s, H-18);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta_{\text{C}}$ : 200.4 (s, C-3), 168.5 (s, C-5), 126.7 (d, C-4), 73.3 (d, C-6), 56.1 (d, C-17), 55.9 (d, C-14), 53.6 (d, C-9), 45.8 (d, C-24), 42.5 (s, C-13), 39.6 (t, C-12), 38.5 (t, C-7), 38.0 (s, C-10), 37.1 (t, C-1), 36.1 (d, C-20), 34.3 (t, C-2), 33.9 (t, C-22), 29.7 (d, C-8), 29.2 (d, C-25), 28.2 (t, C-16), 26.1 (t, C-23), 24.2 (t, C-15), 23.1 (t, C-28), 21.0 (t, C-11), 19.8 (q, C-26), 19.5 (q, C-19), 19.0 (q, C-21), 18.7 (q, C-27), 12.0 (q, C-29), 11.9 (q, C-18)。上述波谱数据与文献报道<sup>[7]</sup>基本一致, 因此鉴定化合物为豆甾-4-烯-6-羟基-3-酮。

化合物 4 为无色晶体,  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 5.51 (1H, m, H-22), 5.25 (1H, m, H-23), 5.08 (1H, dt,  $J = 5.0, 2.2$  Hz, H-7), 4.00 (1H, m, H-3), 3.57 (1H, m, H-6), 2.20 ~ 1.78 (6H, m), 1.73 ~ 1.20 (14H, m), 1.08 (3H, s, H-19), 1.07 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-21), 0.97 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-28), 0.86 ~ 0.89 (6H, H-26, 27), 0.66 (3H, s, H-18);  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 143.9 (d, C-8), 137.0 (d, C-22), 133.3 (d, C-23), 119.1 (d, C-7), 77.0 (s, C-5), 74.3 (d, C-6), 68.4 (d, C-3), 57.4 (d, C-17), 55.9 (d,

C-14), 49.9, 44.7 (s, C-13), 44.4 (d, C-9), 44.4 (d, C-24), 41.8 (d, C-20), 40.7 (t, C-4), 40.5 (t, C-12), 38.2 (s, C-10), 34.4 (d, C-25), 33.9 (t, C-2), 31.8 (t, C-1), 29.2 (t, C-16), 24.0 (t, C-15), 23.1 (t, C-11), 21.7 (q, C-21), 20.5 (q, C-27), 20.1 (q, C-26), 18.9 (q, C-19), 18.2 (q, C-28), 12.8 (q, C-18)。以上 NMR 数据与参考文献<sup>[8]</sup>一致, 因此鉴定该化合物为 (22*E*, 24*R*)-麦角甾-7, 22-二烯-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -三醇。

化合物 **5** 为白色固体, <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{H}}$ : 5.36 (1H, m), 5.23 (1H, dd, *J* = 15.0, 7.8 Hz), 5.16 (1H, dd, *J* = 15.0, 8.4 Hz), 4.08 (1H, m), 3.62 (1H, m), 1.09 (3H, s), 1.02 (3H, d, *J* = 6.6 Hz), 0.91 (2H, d, *J* = 7.2 Hz), 0.84 (3H, d, *J* = 6.5 Hz), 0.82 (3H, d, *J* = 6.5 Hz), 0.60 (3H, s); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{C}}$ : 144.0 (C-8), 135.4 (C-22), 132.2 (C-23), 117.5 (C-7), 76.0 (C-9), 73.7 (C-6), 67.7 (C-3), 56.0 (C-17), 54.8 (C-14), 43.8 (C-13), 43.5 (C-10), 42.8 (C-24), 40.4 (C-20), 39.5 (C-4), 39.2 (C-12), 37.2 (C-5), 33.1 (C-25), 30.9 (C-1), 29.7 (C-2), 27.9 (C-16), 22.9 (C-11), 22.1 (C-15), 21.1 (C-21), 19.9 (C-27), 19.6 (C-26), 18.8 (C-19), 17.6 (C-28), 12.3 (C-18)。由以上数据分析, 并结合文献<sup>[9]</sup>报道, 确定该化合物为 6, 9-epoxy-ergosta-7, 22-dien-3-ol。

3.2 4-羟基-17*R*-甲基甾醇对细胞增殖的影响

采用 CCK-8 法测定 4-羟基-17*R*-甲基甾醇 (化合物 **1**) 对 SW620、BxPC-3 和 U251 细胞增殖的抑制能力, 见表 1。化合物 **1** 对 3 种细胞的抑制活性, 均成量效关系, 即抑制率随样品浓度的升高而增加。

表 1 化合物 1 的细胞增殖抑制率结果

Tab 1 Cell proliferation inhibition rate of compound 1

| 样品           | 质量浓度 /<br>( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | 抑制率 /%           |                  |                  |
|--------------|--------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|
|              |                                                  | SW620            | BxPC-3           | U251             |
| 化合物 <b>1</b> | 2.5                                              | 17.13 $\pm$ 0.04 | 3.73 $\pm$ 0.04  | 4.67 $\pm$ 0.01  |
|              | 5                                                | 47.54 $\pm$ 0.02 | 26.74 $\pm$ 0.02 | 16.32 $\pm$ 0.02 |
|              | 10                                               | 87.20 $\pm$ 0.00 | 47.68 $\pm$ 0.01 | 78.06 $\pm$ 0.01 |
|              | 20                                               | 88.76 $\pm$ 0.00 | 43.87 $\pm$ 0.03 | 81.32 $\pm$ 0.01 |
|              | 40                                               | 89.65 $\pm$ 0.01 | 56.54 $\pm$ 0.01 | 85.56 $\pm$ 0.01 |
| 5-Fu         | 0.625                                            | 42.91 $\pm$ 0.04 | 43.21 $\pm$ 0.04 | 20.79 $\pm$ 0.04 |
|              | 1.25                                             | 47.60 $\pm$ 0.02 | 43.93 $\pm$ 0.04 | 28.40 $\pm$ 0.03 |
|              | 2.5                                              | 58.30 $\pm$ 0.00 | 45.17 $\pm$ 0.03 | 38.91 $\pm$ 0.01 |
|              | 5                                                | 63.24 $\pm$ 0.00 | 47.91 $\pm$ 0.03 | 39.41 $\pm$ 0.02 |
|              | 10                                               | 66.87 $\pm$ 0.01 | 59.53 $\pm$ 0.03 | 49.96 $\pm$ 0.03 |

化合物 **1** 对 SW620、BxPC-3 和 U251 细胞的 *IC*<sub>50</sub> 值分别为 6.14、20.45 和 9.22  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 结果见表 2。化合物 **1** 对结肠癌细胞的 *IC*<sub>50</sub> 值最小, 为 6.14  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (阳性药 5-Fu *IC*<sub>50</sub> 值为 1.36  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。

表 2 化合物 1 的细胞毒活性测试

Tab 2 Cytotoxic activity of compounds 1

| 样品           | <i>IC</i> <sub>50</sub> 值 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) |        |      |
|--------------|--------------------------------------------------------------------|--------|------|
|              | SW620                                                              | BxPC-3 | U251 |
| 化合物 <b>1</b> | 6.14                                                               | 20.45  | 9.22 |
| 5-Fu         | 1.36                                                               | 3.30   | 9.91 |

3.3 降甾醇对肿瘤细胞迁移的影响

化合物 **1** 对肿瘤迁移抑制实验结果显示, 在 48 h 时加入质量浓度为 5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的化合物 **1** 组, 与对照组细胞的迁移率相比, SW620 和 U251 细胞的迁移率差异均有统计学意义 (*P* < 0.01), 说明质量浓度为 5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的化合物 **1** 在 48 h 时对 SW620 和 U251 细胞的迁移具有抑制作用 (见图 3)。

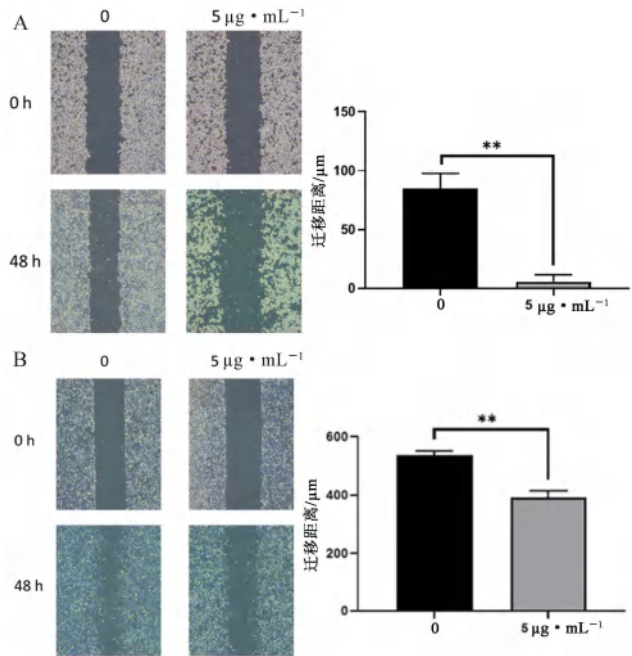


图 3 化合物 1 对 SW620 细胞 (A) 及 U251 细胞 (B) 迁移的抑制效果 (\*\**P* < 0.01)

Fig 3 Inhibition effect of compound 1 on cell migration of SW620 (A) and U251 (B) (\*\**P* < 0.01)

4 讨论

本研究从枸杞内生真菌 *Fusarium acutatum* 中分离得到 5 个甾醇类化合物, 其中 4-羟基-17*R*-甲基甾醇 (化合物 **1**) 为降甾醇类化合物, 甾醇类化合物一般为具有由 4 个烷烃环组成特殊结构甾烷核的萜类化合物<sup>[10]</sup>, 目前用于临床治疗的甾体药物有 150 多种<sup>[11-12]</sup>。降甾醇是一类 A 环由六元环变成五元环的变型甾核化合物<sup>[13]</sup>, 目前降甾醇类化合物结构仅有少量报道<sup>[14-18]</sup>。已有

报道化合物 **1** 对神经胶质瘤细胞 (SF-268 和 SF-268HE)、乳腺癌细胞 (MCF-7)、大细胞肺癌细胞 (NCI-H460) 和结肠癌细胞 (HT-29) 均具有细胞毒活性<sup>[19-21]</sup>。在已有研究对化合物 **1** 抗肿瘤细胞增殖研究的基础上, 本研究选取尚未见文献报道的 SW620、BxPC-3 和 U251 为目标细胞, 结果表明化合物 **1** 对 3 种肿瘤细胞均具有细胞毒活性, 其中化合物 **1** 对 U251 细胞毒活性的  $IC_{50}$  值为  $9.22 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 低于阳性药 5-Fu ( $9.91 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。在对肿瘤细胞增殖的抑制率方面, 当样品浓度均为  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, 化合物 **1** 对 U251 细胞的抑制率为 78.06%, 而 5-Fu 的抑制率仅为 49.96%, 同时化合物 **1** 可显著抑制 U251 细胞迁移的活性, 说明化合物 **1** 可显著抑制 U251 细胞活性, 其抑制肿瘤细胞的作用机制有待进一步深入研究。本文结果丰富了化合物 **1** 的抗肿瘤谱, 并发现化合物 **1** 具有抑制 SW620 和 U251 细胞迁移的活性, 为枸杞内生真菌来源的甾醇类化合物的药物开发利用提供了一定的理论基础, 也为宁夏枸杞非果实部位的研究与开发提供了数据支持。

## 参考文献

- [1] 张昊, 刘苗苗, 刘晓娜, 等. 内生菌影响药用植物产生药理活性化合物的研究进展[J]. 生物技术通报, 2022, 38 (8): 41-51.
- [2] 张国荣, 翟丽霞, 王燕萍, 等. 药用植物内生菌次级代谢产物药理作用研究进展[J]. 中国药房, 2021, 32 (7): 880-884.
- [3] 代金霞, 杜晓宁. 宁夏枸杞内生菌的抗菌和抗肿瘤活性研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42 (11): 2072-2077.
- [4] 周静, 陈敏, 李筠, 等. 一株枝网刺柳珊瑚共附生真菌 *Peniophora* sp. 次级代谢产物研究[J]. 中国海洋药物杂志, 2012, 31 (4): 8-13.
- [5] Chen D, Song YL, Nie CX, et al. Chemical constituents from *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg [J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2012, 21: 88-92.
- [6] Zhang X, Geoffroy P, Miesch M, et al. Gram-scale chromatographic purification of  $\beta$ -sitosterol synthesis and characterization of  $\beta$ -sitosterol oxides [J]. Steroids, 2005, 70: 886-895.
- [7] 薛佳芸, 郭弯, 康云, 等. 粉防己地上部分化学成分及其潜在作用靶点及活性研究[J]. 中成药, 2024, 46 (9): 2980-2986.
- [8] 周洁, 王雨曦, 魏玉莲, 等. 高山猴头菌的化学成分及抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性研究[J]. 中草药, 2024, 55 (16): 5407-5417.
- [9] 陈晓梅, 杨峻山, 郭顺星, 等. 石斛小菇中的甾醇类化合物[J]. 药学学报, 2000, 35 (5): 367-369.
- [10] 赵曼, 孔珂昕, 薛露, 等. 植物甾醇及其衍生物的生物合成途径研究进展[J]. 中草药, 2022, 53 (18): 5884-5898.
- [11] 吴杰群, 徐顺清, 王鸿, 等. 生物转化甾醇制备甾体药物中间体研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2020, 51 (7): 801-814.
- [12] 陈硕, 王崇川, 朱德强, 等. 植物天然甾体化合物研究进展[J]. 齐鲁工业大学学报, 2023, 37 (2): 66-73.
- [13] 曾陇梅, 符雄, 苏镜娉, 等. 中国南海海绵化学成分的研究 (II) [J]. 高等学校化学学报, 1991, 12 (7): 924-926.
- [14] Spinella A, Gavagnin M, Crispino A, et al. 4-acetylapykurodin B and aplykurodinone B, two ichthyotoxic degraded sterols from the Mediterranean mollusk *Aplysia fasciata* [J]. J Nat Prod, 1992, 55 (7): 989-993.
- [15] Mansoor TA, Hong J, Lee CO, et al. Cytotoxic sterol derivatives from a marine sponge *Homaxinella* sp [J]. J Nat Prod, 2005, 68 (3): 331-336.
- [16] Margherita G, Marianna C, Michela N, et al. First chemical study of anaspidean *Syphonota geographica*: structure of degraded sterols aplykurodinone-1 and-2 [J]. Tetrahedron, 2005, 61: 617-621.
- [17] Chianese G, Sepe V, Limongelli V, et al. Limongelliincisterols, highly degraded marine sterols, are a new chemotype of PXR agonists [J]. Steroids, 2014, 83: 80-85.
- [18] Chen ZM, Yang XY, Fan QY, et al. Three novel degraded sterols from cultures of the *Basidiomycete Antrodia albocinnamomea* [J]. Steroids, 2014, 87: 21-25.
- [19] 李浩华, 周燕燕, 陈玉婵, 等. 紫玉盘内生真菌节菱孢中 1 个新的异香豆素类化合物[J]. 中草药, 2016, 47 (3): 369-373.
- [20] 李聆莉, 李红玉, 王帆, 等. 1 株南海红树林底泥来源抗真菌抗生素链霉菌 *Streptomyces antibioticus* No. H41-51 发酵物的化学成分研究[J]. 中国海洋药物, 2016, 35 (4): 23-29.
- [21] 尹国平, 李亚娟, 李博, 等. 黄连内生真菌炭角菌次级代谢产物研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 47 (8): 2165-2169.

(收稿日期: 2024-08-27; 修回日期: 2024-10-24)



# 玉屏风及其拆方对香烟烟雾联合脂多糖诱导的慢性阻塞性肺疾病大鼠及 A549 细胞 PITP $\beta$ 表达的影响

王海玲, 许文雅, 孙艳, 李浩杰, 宋珏\* (安徽医科大学药学院, 合肥 230032)

**摘要:** **目的** 基于网络药理学和分子对接技术, 建立香烟烟雾 (CS) 联合脂多糖 (LPS) 诱导的慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 模型探究玉屏风及其拆方对磷脂酰肌醇转运蛋白  $\beta$  (PITP $\beta$ ) 表达的影响。**方法** 采用网络药理学预测玉屏风治疗 COPD 的主要活性成分, 并结合分子对接技术评估 PITP $\beta$  与玉屏风活性成分的结合情况。建立 CS 联合 LPS 的 COPD 大鼠模型, 并给予玉屏风、黄芪+白术、黄芪进行治疗, 对肺组织进行苏木精-伊红 (HE) 染色。对 A549 细胞进行香烟烟雾提取物 (CSE) 和 LPS 的联合诱导, 给予不同浓度玉屏风, 并设置拆方组进行干预。采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 和蛋白质印迹法检测大鼠及细胞中 PITP $\beta$  和炎症因子白细胞介素 (IL)-6、肿瘤坏死因子 (TNF)- $\alpha$  的表达情况。**结果** 网络药理学结果显示, 玉屏风的活性成分有 38 个, 与 COPD 的交集靶点有 156 个, 根据 Degree 值排名, 玉屏风的主要活性成分可能为槲皮素、汉黄芩素和山柰酚。分子对接结果表明, PITP $\beta$  与玉屏风的主要活性成分均以氢键连接。HE 染色结果表明, 模型组大鼠较对照组肺泡腔扩大且形态异常, 玉屏风及其拆方组肺泡腔虽扩大, 但较模型组有缩小趋势。细胞和动物实验显示, 模型组的 PITP $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  指标因受 CS 和 LPS 刺激均上调。而接受玉屏风治疗后, PITP $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  表达下调。**结论** PITP $\beta$  可能是治疗 COPD 的潜在靶点, 且玉屏风可能通过调控 PITP $\beta$  改善肺部炎症状态。**关键词:** 玉屏风; 慢性阻塞性肺疾病; 磷脂酰肌醇转运蛋白  $\beta$ ; 网络药理学; 分子对接  
**中图分类号:** R285, R286 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)06-1612-09  
**doi:** 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.017

## Effect of Yupingfeng and its disassembled formulas on the expression of PITP $\beta$ in rats and A549 cells with chronic obstructive pulmonary disease induced by cigarette smoke combined with lipopolysaccharide

WANG Hai-ling, XU Wen-ya, SUN Yan, LI Hao-jie, SONG Jue\* (School of Pharmaceutical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract: Objective** To determine the effects of Yupingfeng and its disassembled formulas on the expression of phosphatidylinositol transfer protein  $\beta$  (PITP $\beta$ ) by establish cigarette smoke combined with lipopolysaccharide-induced chronic obstructive pulmonary disease (COPD) via network pharmacology and molecular docking. **Methods** Network pharmacology was used to predict the main active ingredients of Yupingfeng for COPD, and molecular docking was combined to evaluate the binding of PITP $\beta$  to the active ingredients of Yupingfeng. A rat model of COPD induced by cigarette smoke combined with lipopolysaccharide was established, and Yupingfeng, Astragalus membranaceus + Rhizoma Atractylodis Macrocephalae, and Astragalus membranaceus were given. The lung tissues were stained with hematoxylin-eosin. A549 cells were coinduced with cigarette smoke extract (CSE) and lipopolysaccharide. Different concentrations of Yupingfeng were given, and a disassembled formula group was received intervention. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blot were used to detect the expression of PITP $\beta$  and inflammatory factors interleukin-6

**基金项目:** 安徽省高等学校省级自然科学研究计划项目 (No. 2024AH050659)。

**作者简介:** 王海玲, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药防治慢性肺部疾病的药理研究, email: 2207925604@qq.com \*通信作者: 宋珏, 女, 副教授, 主要从事中药复方药物动力学与药效学研究、药物转运体与分子药理学研究, email: tengshe712@126.com

and tumor necrosis factor- $\alpha$  in rats and the cells. **Results** The network pharmacology showed that there were 38 active ingredients in Yupingfeng, and 156 intersection targets with COPD. According to the Degree value ranking, the main active ingredients of Yupingfeng were likely to be quercetin, wogonin, and kaempferol. The molecular docking indicated that PITP $\beta$  was connected to the main active ingredients of Yupingfeng by hydrogen bonds. Hematoxylin-eosin showed that compared with the control group, the alveolar cavities of rats in the model group were enlarged and their morphology was abnormal. Although the alveolar cavities of the Yupingfeng and its disassembled formula groups were enlarged, there was a tendency to shrink compared with that of the model group. The cell and animal experiments showed that the indicators of PITP $\beta$ , interleukin-6, and tumor necrosis factor- $\alpha$  in the model group were up-regulated due to the stimulation of cigarette smoke and lipopolysaccharide. After treatment with Yupingfeng, the expression of PITP $\beta$ , interleukin-6, and tumor necrosis factor- $\alpha$  was down-regulated. **Conclusion** PITP $\beta$  may be a potential target in the treatment of COPD. Yupingfeng may alleviate inflammation of the lungs by regulating PITP $\beta$ .

**Key words:** Yupingfeng; chronic obstructive pulmonary disease; PITP $\beta$ ; network pharmacology; molecular docking

慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 是以持续性气流阻塞为特征, 气道持续异常的一种异质性肺部状态, 伴咳嗽、咳痰、呼吸困难等慢性呼吸道症状<sup>[1]</sup>。该病是由香烟烟雾 (CS) 和空气污染物等可吸入颗粒物以及遗传、发育和社会因素共同引起的<sup>[2]</sup>。COPD 已成为全球第三大死亡原因, 预测 2050 年全球 COPD 患者数接近 6 亿<sup>[3]</sup>。

CS 可对细胞外表面活性物质的代谢过程以及产生表面活性物质的 II 型肺泡细胞造成不良影响<sup>[4]</sup>。肺部表面活性物质由 90% 的脂质和 10% 的蛋白质组成<sup>[5]</sup>, 其主要功能是降低肺泡表面张力以防止肺泡塌陷。在表面活性物质的脂质成分中, 磷脂占主要部分, 其中磷脂酰胆碱 (PC) 和磷脂酰甘油 (PG) 是含量最丰富的磷脂种类。次要磷脂包括磷脂酰肌醇 (PI)、磷脂酰乙醇胺 (PE) 等<sup>[6]</sup>。目前已被确定为可靠的 COPD 脂质组生物标志物的有选择性鞘脂、磷脂等, 未来需要进一步研究如何靶向这些具有生物学价值的脂质种类, 以便将其应用于临床实践<sup>[7]</sup>。磷脂酰肌醇转运蛋白 (PITPs) 属于磷脂转移蛋白家族, 是一种丰富且普遍存在于哺乳动物体内的蛋白质, PITP $\alpha/\beta$  可结合 PI 和 PC 并将其从内质网转移到各种细胞膜, 从而促进这些脂质在不同膜室之间转移<sup>[8-9]</sup>。研究表明, PI 转运体 PITPs 可以将 PI 转运到膜内, 合成代谢产物 p53-多磷酸肌醇 (PIPn)<sup>[10]</sup>, PIPn 与 PI3K/AKT 通路有关<sup>[11-13]</sup>, 该通路可在 COPD 中被激活<sup>[14]</sup>。因此, 研究 PITP 在慢性肺部炎症中的表达变化具有重要意义。

中医药在改善 COPD 症状方面具有疗效显著、安全和可靠的优势<sup>[15]</sup>。玉屏风对肺部疾病治疗效果良好, 例如哮喘和 COPD<sup>[16-17]</sup>。玉屏风散出自宋代

医家张松的《究原方》, 由黄芪、白术、防风三种药材组成<sup>[18]</sup>。黄芪可 effectively 提高机体免疫能力<sup>[19]</sup>; 白术有健脾益气的功能, 助黄芪加强固本之力<sup>[20-22]</sup>; 防风能祛湿止痉<sup>[23]</sup>。中药复方的拆方研究是将中药复方减去一味或几味中药以观察疗效的变化或寻找有效成分的一种研究方法, 使复方配伍组合疗效更加确切<sup>[24]</sup>。在临床实践中, 玉屏风的组方及配伍常以“黄芪+白术”药对为基础, 根据患者的临床表现, 对组方加以调整, 适当地增、减辅助药味, 以达到最佳治疗效果, 以药对为起点进行复方研究, 有利于简化研究难度<sup>[25]</sup>。所以本研究设置黄芪组、黄芪+白术组、玉屏风组以观察疗效的变化。

已有研究发现, 玉屏风颗粒可影响 COPD 大鼠甘油-3-磷酸酯、胆碱、乙酰胆碱和甘油磷酸胆碱的水平, 对甘油磷脂代谢具有一定的调节作用, 可能通过调节这些代谢产物及其相关代谢途径, 对氧化应激和炎症反应产生潜在影响<sup>[26]</sup>。尽管早期的临床实践以及细胞和动物研究证实了玉屏风对 COPD 的治疗效果与脂质代谢有关, 但仍需进行更多的研究来证实其疗效和机制。因此, 本研究通过网络药理学方法筛选出玉屏风治疗 COPD 的主要有效成分与作用靶点, 再进行分子对接验证, 并经过细胞实验和动物实验进一步验证 PITP $\beta$  在慢性肺部炎症中的表达变化与玉屏风及其拆方对 PITP $\beta$  的作用。

## 1 材料

### 1.1 动物

SD 大鼠, 雄性, SPF 级, 体重 (250±10) g [斯贝福 (苏州) 生物技术有限公司, 动物使用许可证号 SCXK (苏) 2022-0006]。该动物实验已获得安徽医科大学动物伦理委员会的批准, 批准编号为

LLSC-20251027, 并按照《安徽医科大学实验动物护理和使用系统伦理指南》进行。实验前, SD 大鼠在恒温 ( $24 \pm 2$ ) °C、恒湿 ( $50 \pm 2$ ) %、12 h 光暗循环的环境中自由进食和饮水, 饲养 7 d 后用于实验。

## 1.2 细胞株

A549 细胞 (肺癌人类肺泡基底上皮细胞) 由安徽医科大学药理学科学学院提供, 采用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素和链霉素的 DMEM 培养基进行培养, 并将细胞置于 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育生长至所需密度, 用于后续的实验研究。

## 1.3 试药

黄芪饮片 (合肥卫元堂中药股份有限公司, 批号: 23120202)、白术饮片 (炒) (批号: 240113) 及防风饮片 (批号: 231205) (江苏华洪药业科技有限公司), 由安徽医科大学药理学科学学院研究员吴婷妮鉴定为正品, 且黄芪鉴定为蒙古黄芪。

黄山牌香烟 (安徽中烟工业有限责任公司, 含 10 mg 焦油、0.9 mg 尼古丁); 水合氯醛 (上海麦克林生化科技股份有限公司); 脂多糖 (LPS, 北京博奥森生物技术有限公司);  $\beta$ -actin、白细胞介素 (IL)-6、肿瘤坏死因子 (TNF)- $\alpha$ 、PITP $\beta$  引物 [通用生物 (安徽) 股份有限公司]; 磷酸盐缓冲液 (PBS) (武汉赛维尔生物科技有限公司); RNA 提取试剂、RT-qPCR 试剂盒 (湖南艾科瑞生物工程有限公司); IL-6 抗体、TNF- $\alpha$  抗体、PITP $\beta$  抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司);  $\beta$ -actin、山羊抗兔和山羊抗鼠二抗 (成都正能生物技术有限公司); DMEM (上海达特希尔生物技术有限公司); 胎牛血清 (南京生航生物技术有限公司); 青霉素和链霉素溶液 (上海碧云天生物技术有限公司)。

## 1.4 仪器

Mini-PROTEAN Tetra 垂直电泳槽、PowerPac 基础电泳仪电源、Image Lab Touch Software、CFX Connect 荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); Multiskan MK3 酶标仪、TE Thermo Cycle 逆转录仪 (美国 Thermo Scientific 公司); ASM100 香烟烟雾发生器 (北京贝兰博科技有限公司)。

# 2 方法与结果

## 2.1 网络药理学与分子对接

**2.1.1 玉屏风的活性成分和目标靶点的筛选** 在中药系统药理学数据库与分析平台 TCMSP (<http://tcmspw.com/tcmsp.php>) 中检索玉屏风组成中药 (黄芪、白术、防风) 的主要化学成分, 筛选条件为口服生物利用度 (OB)  $\geq 30\%$ , 类药性 (DL)  $\geq 0.18$ , 共筛选出 38 个活性成分, 结果如表 1 所示。经预测得到 717 个玉屏风的活性成分靶点, 去重合并后共有 207 个靶点。利用 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 对靶标名称进行统

一, 将其转换为基因名称。

**2.1.2 药物-疾病交集靶点** 在 GEO 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 中输入搜索词 “pulmonary disease, chronic obstructive”, 将搜索物种范围限定为 “Homo sapiens”, 获取 GSE106986 数据集, 其中包括 14 名 COPD 患者和 5 名非吸烟者的样本信息。以  $\text{adj. P.Val} < 0.05$ ,  $\log\text{FC} \geq 1$ ,  $\log\text{FC} \leq -1$  条件筛选出 2511 个差异基因。继续检索 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、OMIM (<https://www.omim.org/>)、TTD (<https://db.idrblab.net/ttd/>)、INTEDE (<http://intede.idrblab.net/>) 和 VARIDT (<http://varidt.idrblab.net/>) 这 5 个数据库, 与 GEO 数据库中获得的差异基因整合并去重, 共获得了 5736 个有效的 COPD 靶点。

将玉屏风成分靶点和 COPD 相关靶点导入 Venny 2.1.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>), 得到 156 个交集靶点, 作为玉屏风治疗 COPD 的潜在作用靶点。

**2.1.3 共同靶点-活性成分网络** 将 156 个交集靶点与玉屏风的活性成分导入 Cytoscape 3.10.2 进行拓扑分析和可视化, 计算网络中玉屏风潜在活性成分的 Degree 值, 其中排名前三的成分分别为槲皮素、山柰酚和汉黄芩素, 结果如图 1 所示。

**2.1.4 分子对接验证主要活性成分与 PITP $\beta$  的结合作用** 根据 Degree 值排名, 选择槲皮素、山柰酚和汉黄芩素为玉屏风的主要活性成分。利用软件 Discovery Studio 2017 R2 (BIOVIA 软件公司) 进行分子对接研究, 并使用 PyMOL 2.6 对 PITP $\beta$  蛋白与活性成分相互作用的对接氨基酸残基进行可视化。结果发现, 不同的活性成分可能与目标靶点 PITP $\beta$  发生相互作用, PITP $\beta$  与槲皮素发生相互作用的氨基酸残基有 GLU-217、GLN-22; 与山柰酚结合的残基为 GLU-217; 与汉黄芩素结合的残基为 GLU-217, 结果如图 2 所示。

## 2.2 体内实验验证

**2.2.1 玉屏风药液和冻干粉末的制备** 参考课题组前期的方法制备<sup>[27]</sup>。将黄芪、白术和防风按 3:1:1 的比例 (60 g:20 g:20 g) 混合, 加入 6 倍体积的超纯水, 加热至沸腾, 文火慢煮 40 min, 趁热过滤。收集残渣, 加入 4 倍体积的超纯水, 用同样的方法再次煎煮。合并两次滤液, 浓缩至质量浓度为 2 g 生药  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 的玉屏风水煎剂药液。按照同样的步骤分别制备黄芪水煎剂 (质量浓度为 1.2 g 生药  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>) 和黄芪+白术水煎剂 (质量浓度为 1.6 g 生药  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>)。采用真空冷冻干燥法去除药液中的水分, 制备成中药冻干粉。

**2.2.2 动物实验分组、造模及给药** 将大鼠随机分为 5 组: 对照组 (Control)、模型组 (Model)、黄芪组 (6 g 生药  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>)、黄芪+白术组 (8 g 生



表 1 玉屏风中所含草药的有效成分  
Tab 1 Active ingredients of each herb contained in Yupingfeng

| MOL-ID    | 化学名                                                                                                                                                                                                                                                                              | OB/%  | DL   | 来源    |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|------|-------|
| MOL000211 | 白桦脂酸 (mairin)                                                                                                                                                                                                                                                                    | 55.38 | 0.78 | 黄芪    |
| MOL000239 | 华良姜素 (jaranol)                                                                                                                                                                                                                                                                   | 50.83 | 0.29 | 黄芪    |
| MOL000296 | 常春藤皂苷元 (hederagenin)                                                                                                                                                                                                                                                             | 36.91 | 0.75 | 黄芪    |
| MOL000033 | (3 <i>S</i> , 8 <i>S</i> , 9 <i>S</i> , 10 <i>R</i> , 13 <i>R</i> , 14 <i>S</i> , 17 <i>R</i> )-10, 13-dimethyl-17-[(2 <i>R</i> , 5 <i>S</i> )-5-propan-2-yl-octan-2-yl]-2, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17-dodecahydro-1 <i>H</i> -cyclopenta[ <i>a</i> ]phenanthren-3-ol | 36.23 | 0.78 | 黄芪、白术 |
| MOL000354 | 异鼠李素 (isorhamnetin)                                                                                                                                                                                                                                                              | 49.60 | 0.31 | 黄芪    |
| MOL000371 | 3, 9-二- <i>O</i> -甲基尼索林 (3, 9-di- <i>O</i> -methylnissoilin)                                                                                                                                                                                                                     | 53.74 | 0.48 | 黄芪    |
| MOL000378 | 7- <i>O</i> -甲基异微凸剑叶莎醇 (7- <i>O</i> -methylisomucronulatol)                                                                                                                                                                                                                      | 74.69 | 0.30 | 黄芪    |
| MOL000379 | 9, 10-dimethoxypterocarpan-3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucoside                                                                                                                                                                                                                   | 36.74 | 0.92 | 黄芪    |
| MOL000380 | (6 <i>aR</i> , 11 <i>aR</i> )-9, 10-dimethoxy-6 <i>a</i> , 11 <i>a</i> -dihydro-6 <i>H</i> -benzofuran[3, 2- <i>c</i> ]chromen-3-ol                                                                                                                                              | 64.26 | 0.42 | 黄芪    |
| MOL000387 | 联苯双酯 (bifendate)                                                                                                                                                                                                                                                                 | 31.10 | 0.67 | 黄芪    |
| MOL000392 | 刺芒柄花素 (formononetin)                                                                                                                                                                                                                                                             | 69.67 | 0.21 | 黄芪    |
| MOL000417 | 毛蕊异黄酮 (calycosin)                                                                                                                                                                                                                                                                | 47.75 | 0.24 | 黄芪    |
| MOL000422 | 山柰酚 (kaempferol)                                                                                                                                                                                                                                                                 | 41.88 | 0.24 | 黄芪    |
| MOL000433 | 阿魏酸 (ferulic acid)                                                                                                                                                                                                                                                               | 68.96 | 0.71 | 黄芪    |
| MOL000439 | isomucronulatol-7, 2'-di- <i>O</i> -glucosiole                                                                                                                                                                                                                                   | 49.28 | 0.62 | 黄芪    |
| MOL000442 | 1, 7-dihydroxy-3, 9-dimethoxy pterocarpene                                                                                                                                                                                                                                       | 39.05 | 0.48 | 黄芪    |
| MOL000098 | 槲皮素 (quercetin)                                                                                                                                                                                                                                                                  | 46.43 | 0.28 | 黄芪    |
| MOL000022 | 14-acetyl-12-senecioid-2 <i>E</i> , 8 <i>Z</i> , 10 <i>E</i> -atractylentriol                                                                                                                                                                                                    | 63.37 | 0.30 | 白术    |
| MOL000049 | 3β-乙酰氧基苍术酮 (3β-acetoxyatractylone)                                                                                                                                                                                                                                               | 54.07 | 0.22 | 白术    |
| MOL000072 | 8β-乙酰氧基苍术内酯Ⅲ (8β-ethoxy atractylenolide Ⅲ)                                                                                                                                                                                                                                       | 35.95 | 0.21 | 白术    |
| MOL000011 | (2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> )-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-5-methoxy-2-methylol-2, 3-dihydropyrano[5, 6- <i>h</i> ][1, 4]benzodioxin-9-one                                                                                                                                        | 68.83 | 0.66 | 防风    |
| MOL011730 | 11-hydroxy-sec-o-beta-d-glucosylhamaudol_qt                                                                                                                                                                                                                                      | 50.24 | 0.27 | 防风    |
| MOL011732 | 白花前胡乙素 (anomalin)                                                                                                                                                                                                                                                                | 59.65 | 0.66 | 防风    |
| MOL011737 | divaricatic acid                                                                                                                                                                                                                                                                 | 87.00 | 0.32 | 防风    |
| MOL011740 | 苦参醇 (divaricatol)                                                                                                                                                                                                                                                                | 31.65 | 0.38 | 防风    |
| MOL001941 | 欧前胡素 (ammidin)                                                                                                                                                                                                                                                                   | 34.55 | 0.22 | 防风    |
| MOL011747 | ledebouriellol                                                                                                                                                                                                                                                                   | 32.05 | 0.51 | 防风    |
| MOL011749 | phelloptorin                                                                                                                                                                                                                                                                     | 43.39 | 0.28 | 防风    |
| MOL011753 | 5- <i>O</i> -甲基维斯阿米醇苷 (5- <i>O</i> -methylvisamminol)                                                                                                                                                                                                                            | 37.99 | 0.25 | 防风    |
| MOL002644 | 珊瑚菜素 (phellopterin)                                                                                                                                                                                                                                                              | 40.19 | 0.28 | 防风    |
| MOL000359 | 谷甾醇 (sitosterol)                                                                                                                                                                                                                                                                 | 36.91 | 0.75 | 防风    |
| MOL000173 | 汉黄芩素 (wogonin)                                                                                                                                                                                                                                                                   | 30.68 | 0.23 | 防风    |
| MOL000358 | β-谷甾醇 (beta-sitosterol)                                                                                                                                                                                                                                                          | 36.91 | 0.75 | 防风    |
| MOL001494 | 甘露醇 (mandenol)                                                                                                                                                                                                                                                                   | 42.00 | 0.19 | 防风    |
| MOL001942 | 异欧前胡素 (isoimperatorin)                                                                                                                                                                                                                                                           | 45.46 | 0.23 | 防风    |
| MOL003588 | 别欧前胡素 (prangenidin)                                                                                                                                                                                                                                                              | 36.31 | 0.22 | 防风    |
| MOL007514 | 二十碳-11, 14-二烯酸甲酯 (methyl icos-11, 14-dienoate)                                                                                                                                                                                                                                   | 39.67 | 0.23 | 防风    |
| MOL013077 | 紫花前胡素 (decursin)                                                                                                                                                                                                                                                                 | 39.27 | 0.38 | 防风    |

药·kg<sup>-1</sup>)和玉屏风组(10 g生药·kg<sup>-1</sup>), 每组6只。除对照组外各组大鼠采用CS、LPS的方法建立大鼠COPD模型<sup>[28]</sup>。在建模的第1日和第14日, 模型组和治疗组大鼠气管滴注200 μL LPS溶液(1 mg·mL<sup>-1</sup>), 对照组气管滴注0.9%氯化钠溶液。大鼠置于熏烟箱内接受CS刺激(20支香烟), 每日一次, 持续3周, 对照组大鼠放置室外, 呼吸新鲜空气。给药组大鼠在烟熏当日开始给予中药, 对照组和模型组给予0.9%氯化钠溶液(10 mL·kg<sup>-1</sup>), 持续3周。在造模结束时, 取部分肺组织样本进行苏木精-伊红(HE)染色, 另外的样本保存在-80℃备用。

**2.2.3** 黄芪、黄芪+白术和玉屏风水煎剂对CS联合LPS诱导的COPD大鼠肺组织病理变化的影响  
肺组织在4%多聚甲醛中固定后经脱水、石蜡包埋制成5 μm厚的切片, 切片脱蜡后进行HE染色, 再次脱水并封片。分析时, 从视野中随机选取6张图片, 在每张图片的中心画一条“十”字交叉线, 然后计算与这条交叉线相交的肺泡间隔数(Ns)以及所划线的总长度(L)。平均肺泡截距(MLI, μm)的计算公式为MLI=L/Ns<sup>[29]</sup>。结果如图3所示, 对照组大鼠肺泡结构基本完整, 形态正常, 而模型组的MLI增加(*P*<0.001), 肺泡腔形态异常。与对照组相比, 黄芪、黄芪+白术和玉屏风组也发现部

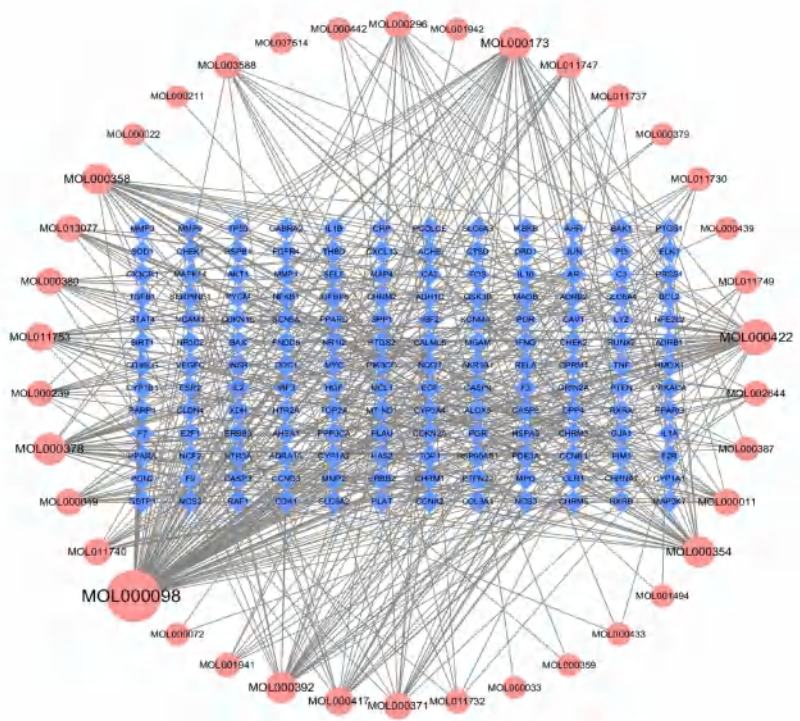


图 1 玉屏风影响 COPD 的共同靶点-活性成分网络图  
Fig 1 Network of common target-active ingredients for the effect of Yupingfeng on COPD

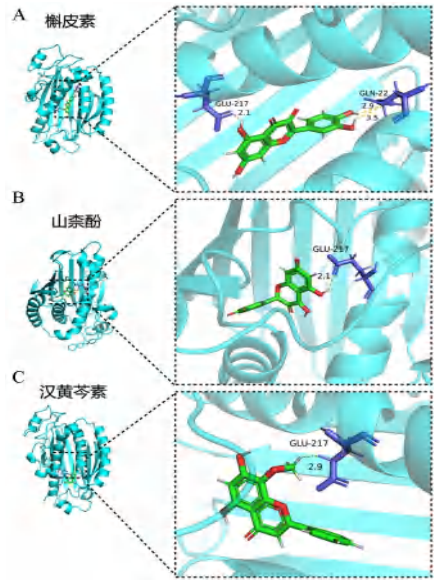


图 2 槲皮素、山柰酚、汉黄芩素与 PTPB 分子对接图  
Fig 2 Docking plots of quercetin, kaempferol, and wogonin with PTPB molecules

分区域 MLI 增加且肺泡腔排列不规则, 但相对模型组 MLI 降低 ( $P < 0.001$ ), 说明黄芪、黄芪+白术和玉屏风组的肺组织病理损伤均相对减轻, 其中玉屏风组的改善最为明显。

**2.2.4 玉屏风及其拆方对 COPD 大鼠肺组织中 PTPB 及炎症因子表达的影响** 本研究分别采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法和蛋白质印迹 (Western blot) 法检测大鼠肺组织中 PTPB 和炎症

因子 mRNA 和蛋白的表达。  
RT-qPCR 法使用 Trizol 试剂提取肺组织的 RNA, 逆转录合成 cDNA 后, 进行 PCR 反应, 扩增, 以  $\beta$ -actin 作为内参基因, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 mRNA 的表达倍数。引物序列见表 2。

Western blot 法使用 RIPA : PMSF (100 : 1) 配成的溶液提取肺组织的蛋白, 用 BCA 检测试剂盒进行定量。使用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE, 10%) 以分离蛋白, 电泳恒压 80 V 30 min、120 V 55 min, 通过转膜液将胶上的蛋白转到用甲醇激活过的 PVDF 膜上, 恒流 400 mA 30 min, 在室温下封闭 15 min 后, 与一抗在 4℃ 下孵育过夜。用 1×TBST 洗膜 3 次后, 用相应二抗室温孵育 1 h, 继续用 1×TBST 清洗 3 次。最后在化学发光成像仪上对条带进行成像, 并用 Image J 对条带进行定量<sup>[30]</sup>。

结果如图 4 所示, 经 CS 和 LPS 处理的模型组 PTPB、TNF- $\alpha$ 、IL-6 mRNA 和蛋白水平均高于对照组 ( $P < 0.001$ )。与模型组相比, 经玉屏风处理的肺组织在转录和蛋白水平上都显示出 PTPB、TNF- $\alpha$ 、IL-6 的表达明显减少 ( $P < 0.001$ ), 这表明玉屏风能缓解炎症程度。黄芪+白术治疗组的 6 组指标也较模型组降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )。在黄芪组的肺组织中, 虽然 TNF- $\alpha$  mRNA 和 IL-6 蛋白表达有所减少, 但变化差异没有统计学意义。



表 2 RT-qPCR 分析中所研究基因的引物序列

Tab 2 Primer sequences of the genes in RT-qPCR analysis

| 基因             | 物种来源  | 正向 (5'-3')             | 反向 (5'-3')             |
|----------------|-------|------------------------|------------------------|
| $\beta$ -actin | Rat   | GAGCGCAAGTACTCTGTGTG   | CCTGCTTGCTGATCCACATC   |
| IL-6           | Rat   | CCAGTTGCCTTCTTGGGACT   | TGCCATTGCACAACCTCTTTTC |
| TNF- $\alpha$  | Rat   | TGGGCTCCCTCTCATCAGTTCC | GCTCCTCCGCTTGGTGGTTTG  |
| PITP $\beta$   | Rat   | TCAAGTTCAAGTGGTGGGGG   | AACCTTCTTACGCATTGTTTCT |
| $\beta$ -actin | Human | GCTATCCAGGCTGTGCTATC   | TGTCACGCACGATTTC       |
| IL-6           | Human | AGCCACCGGGAACGAAA      | CCGAAGGCGCTTGTGGAG     |
| TNF- $\alpha$  | Human | GCCCTGGTATGAGCCCATCT   | AGTAGACCTGCCAGACTCG    |
| PITP $\beta$   | Human | GGGTTCCGGAAGATGGTG     | GCTGCCAACCTGATACTCC    |

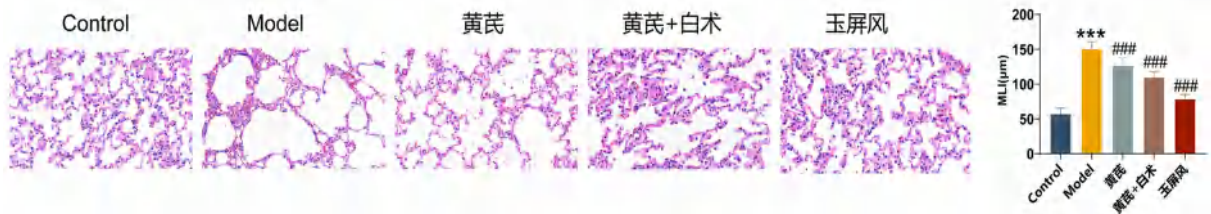


图 3 玉屏风及其拆方对 COPD 大鼠肺组织病理变化的影响 (HE,  $\times 200$ )

Fig 3 Effect of Yupingfeng and its dismantling formula on the histopathological changes in the lungs of rats with COPD (HE,  $\times 200$ )

注: 与对照组比较, \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组比较, ### $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the Control group, \*\*\* $P < 0.001$ ; compared with the Model group, ### $P < 0.001$ .

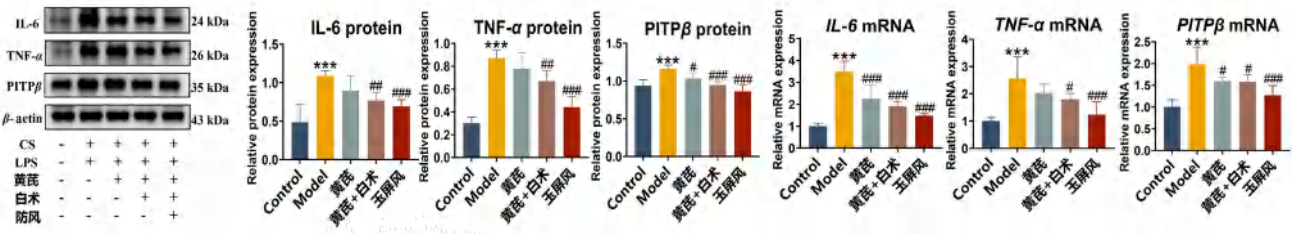


图 4 玉屏风及其拆方对 COPD 大鼠 PITP $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的蛋白和 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Fig 4 Effect of Yupingfeng and its disassembled formulas on the protein and mRNA expression of PITP $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in COPD rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

注: 与对照组比较, \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组比较, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the Control group, \*\*\* $P < 0.001$ ; compared with the Model group, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ .

## 2.3 体外实验验证

**2.3.1 香烟烟雾提取物 (CSE) 的制备** 采用课题组前期的方法<sup>[31]</sup>, 将充分燃尽后的 CS (6 支香烟) 均匀吸入至 20 mL 无血清培养基中, 静置约 15 min 使其充分混合。用 pH 试纸检测其 pH 值, 调节 pH 值为中性 (约 7.3), 最后在无操作台中用 0.22  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤, 除菌过后的溶液定义为 100% 的 CSE。

**2.3.2 CCK8 法检测玉屏风及其拆方对 A549 细胞活力的影响** 在细胞密度 50% ~ 60% 的 96 孔板中分别加入不同浓度的 CSE 和 10  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 LPS, 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  培养箱中孵育 24 h 后加入 10  $\mu\text{L}$  CCK8 试剂, 继续孵育 1 ~ 2 h, 使用酶标仪在 450 nm 波检测吸光度 ( $OD$ ) 值, 分析细胞毒性变化。将“2.2.1”项下的中药冻干粉溶解在培养基中, 经 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤后保存在 -20  $^{\circ}\text{C}$ , 用于细胞实验。同法在 CSE 和 LPS 刺激下, 检测不同浓度玉屏风、黄芪+白术、黄芪对 A549 细胞

存活率的影响, 确定药物的最佳浓度范围。

根据课题组前期探索, 确定 10  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  LPS 浓度为最适浓度<sup>[32]</sup>。如图 5A 所示, 0% ~ 2% 的 CSE 为安全浓度梯度。模型组和给药组的细胞增殖实验浓度选择了 1% CSE 和 10  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  LPS。图 5B、C、D 显示, 用相同浓度 LPS 和 CSE 刺激细胞后, 当玉屏风组和黄芪+白术组的药物浓度低于 30  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 黄芪组浓度低于 20  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, 对细胞毒性较低。

**2.3.3 细胞实验分组、造模及给药** 模型组和给药组细胞加入 1% CSE 和 10  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  LPS, 称取玉屏风冻干粉用培养基溶解并稀释加入给药组, 培养箱中继续孵育 24 h 后按“2.2.4”项下方法分别提取 RNA 和蛋白质。细胞拆方实验可将细胞分为对照组、模型组、黄芪组、黄芪+白术组、玉屏风组, 此时黄芪、黄芪+白术组的给药浓度与玉屏风组一致, 按照“2.2.4”项下方法给药后提取 RNA 和蛋白质。



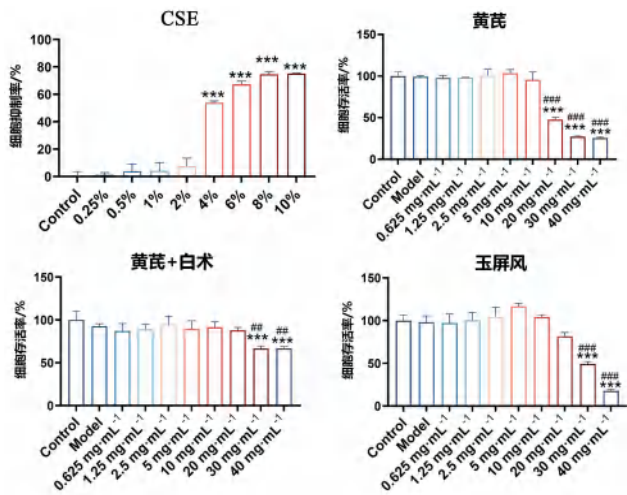


图 5 不同浓度 CSE 和玉屏风及其拆方对 A549 细胞活力的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig 5 Effect of different concentrations of CSE and Yupingfeng and its dismantling formula on the viability of A549 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

注: 与对照组比较,  $***P < 0.001$ ; 与模型组比较,  $###P < 0.01$ ,  $####P < 0.001$ 。

Note: Compared with the Control group,  $***P < 0.001$ ; compared with the Model group,  $###P < 0.01$ ,  $####P < 0.001$ .

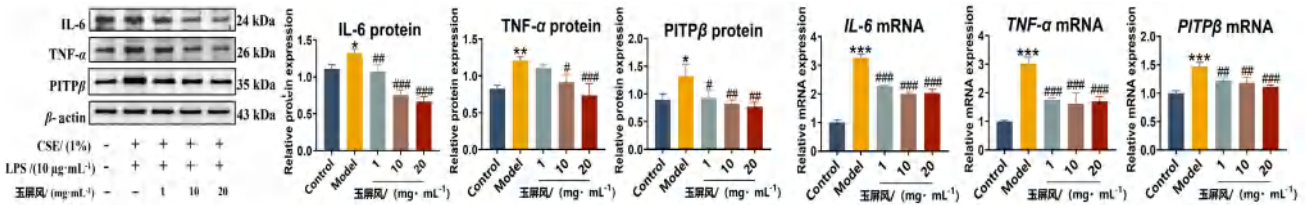


图 6 不同浓度玉屏风对 COPD 细胞模型 P1TPβ、IL-6 和 TNF-α 的蛋白和 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig 6 Effect of different concentrations of Yupingfeng on protein and mRNA expression of P1TPβ, IL-6 and TNF-α in COPD cell models ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

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

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

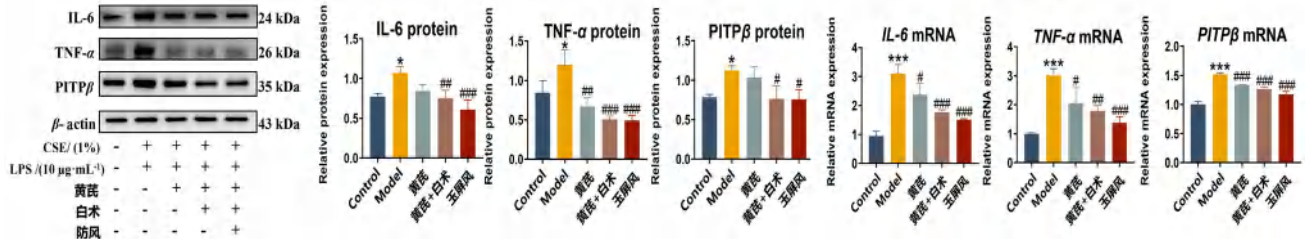


图 7 玉屏风及其拆方对 COPD 细胞模型 P1TPβ、IL-6 和 TNF-α 的蛋白和 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig 7 Effect of Yupingfeng and its dismantling formula on the protein and mRNA expression of P1TPβ, IL-6 and TNF-α in COPD cell models ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

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

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

计图的制作。实验数据均用均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。多组间比较采用 Tukey 多重比较, 当  $P < 0.05$  时差异具有统计学意义。

### 3 讨论

COPD 发病机制复杂, 但与炎症反应息息相关。COPD 患者的近端和远端气道中存在更多的炎

2.3.4 不同浓度玉屏风对体外 P1TPβ 及其炎症因子的影响 根据 CCK8 结果, 将 1、10、20  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  分别定为玉屏风的低、中、高浓度。如图 6 所示, 与模型组相比, 给予中浓度和高浓度的玉屏风可降低 IL-6、TNF-α 和 P1TPβ 蛋白及 mRNA 的表达 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ), 虽然低浓度下 TNF-α 蛋白表达量有所降低, 但变化差异无统计学意义。

2.3.5 相同浓度的玉屏风及其拆方对体外 P1TPβ 及炎症因子的影响 CCK8 结果显示, 给药浓度为 20  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  黄芪的细胞存活率较低, 故选择 10  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  作为黄芪组、黄芪+白术组、玉屏风组的药物浓度。结果如图 7 所示, 与模型组相比, 经 CSE 和 LPS 刺激后的 A549 细胞给予玉屏风或黄芪+白术处理后, P1TPβ、IL-6 和 TNF-α mRNA 和蛋白水平的表达均下降 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )。黄芪组 IL-6 和 P1TPβ 蛋白表达降低, 但差异无统计学意义。

### 2.4 统计分析

使用 GraphPad Prism 9.5 软件进行数据处理及统

症细胞<sup>[33]</sup>, 这是 CS 诱导炎症反应的结果<sup>[34]</sup>。这些患者的远端气道还被发现存在结构异常<sup>[35]</sup>。中药复方治疗 COPD 具有一定优势, 如全真一气汤通过上调 Cav-1 以及 Nrf2 水平减轻 COPD 大鼠肺组织炎症反应<sup>[36]</sup>, 四君子汤合三子养亲汤可下调小鼠肺部炎症因子水平, 减轻肺组织结构的破坏等<sup>[37]</sup>。

网络药理学数据表明玉屏风的主要活性成分

可能是槲皮素、山柰酚和汉黄芩素。槲皮素在 COPD 模型中已被证明可减少炎症和气道上皮重塑<sup>[38]</sup>，且具有很强的抗炎和抗氧化特性<sup>[39]</sup>。山柰酚可通过改变 SphK1/S1P/S1PR1/MLC2 信号通路，减轻败血症引起的急性肺损伤<sup>[40]</sup>。汉黄芩素可通过靶向多种分子通路，如 PI3K/AKT、IL-17 和 TNF- $\alpha$ ，显著减轻肺部炎症和气道阻力<sup>[16]</sup>。以上三种活性成分可能与玉屏风治疗 COPD 有关。分子对接结果显示，这些化合物能与 PITP $\beta$  形成牢固的氢键，但其是否通过调控 PITP $\beta$  缓解肺部炎症还需要更深入的研究。

研究表明，海洋多肽化合物 Microcolin H 能特异性靶向 PITP $\alpha/\beta$ ，凭借抗增殖活性有效诱导肿瘤自噬细胞死亡<sup>[41]</sup>；PITP $\alpha/\beta$  还通过质膜磷脂酰肌醇-4-磷酸影响 Hippo 通路，在肿瘤治疗方面具有一定的潜力<sup>[42]</sup>。然而，其在靶向治疗 COPD 方面的作用及作用机制尚无具体文献报道。

本研究选用 CS 联合 LPS 诱导的 COPD 大鼠模型探究玉屏风对 PITP $\beta$  和炎症因子的影响。HE 染色结果表明，COPD 大鼠表现出较严重的肺部病变，且造模时模型组大鼠喘息声较正常组和给药组沉重。RT-qPCR 和 Western blot 结果显示，模型组 IL-6、TNF- $\alpha$  和 PITP $\beta$  的 mRNA 和蛋白表达均上调。给药玉屏风或黄芪+白术治疗后，大鼠肺气肿得到改善，且 IL-6、TNF- $\alpha$  和 PITP $\beta$  水平下调，炎症反应减轻。体外实验结果与体内一致，给药黄芪+白术比黄芪单味药效果更加明显，而玉屏风组各项指标改善最明显，这意味着黄芪与白术“扶正固本”，确实有协同增效作用，加入防风后抗炎特性更佳。

综上，本研究基于网络药理学方法筛选玉屏风治疗 COPD 的活性成分和相关靶点，利用分子对接技术进行初步验证，并通过细胞动物实验进一步进行验证。结果表明，PITP $\beta$  可能是 COPD 的潜在靶点，且玉屏风可能通过调控 PITP $\beta$  来改善肺部炎症状态。然而，玉屏风对 PITP $\beta$  产生抑制作用的内在机制仍不清楚，且中药复方代谢过程复杂，后续需要进一步探索其作用机制。

## 参考文献

- [1] Celli B, Fabbri L, Criner G, et al. Definition and nomenclature of chronic obstructive pulmonary disease time for its revision [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2022, 206 ( 11 ): 1317-1325.
- [2] Christenson SA, Smith BM, Bafadhel M, et al. Chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Lancet*, 2022, 399 (10342): 2227-2242.
- [3] Boers E, Barret M, Su JG. et al. Global burden of chronic obstructive pulmonary disease through 2050 [J]. *JAMA Netw*

- Open*, 2023, 6 (12): e2346598.
- [4] Griesse M. Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art [J]. *Eur Respir J*, 1999, 13 ( 6 ): 1455-1476.
- [5] Nkadi PO, Merritt TA, Pillers DM. An overview of pulmonary surfactant in the neonate: genetics, metabolism, and the role of surfactant in health and disease [J]. *Mol Genet Metab*, 2009, 97 (2): 95-101.
- [6] Goerke J. Pulmonary surfactant: functions and molecular composition [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1998, 1408 (2-3): 79-89.
- [7] Ekroos K, Lavrynenko O, Titz B, et al. Lipid-based biomarkers for CVD, COPD, and aging-a translational perspective [J]. *Prog Lipid Res*, 2020, 78: 101030.
- [8] Hsuan J, Cockcroft S. The PITP family of phosphatidylinositol transfer proteins [J]. *Genome Biol*, 2001, 2 ( 9 ): REVIEWS3011.
- [9] Liscovitch M, Cantley LC. Signal-transduction and membrane traffic-the pitp/phosphoinositide connection [J]. *Cell*, 1995, 81 (5): 659-662.
- [10] Edwards-Hicks J, Apostolova P, Buescher JM, et al. Phosphoinositide acyl chain saturation drives CD8<sup>+</sup> effector T cell signaling and function [J]. *Nat Immunol*, 2023, 24 ( 3 ): 516.
- [11] Lesko J, Triebel A, Stacher-Priehse E, et al. Phospholipid dynamics in ex vivo lung cancer and normal lung explants [J]. *Exp Mol Med*, 2021, 53 (1): 81-90.
- [12] Yalcin A, Clem B, Makoni S, et al. Selective inhibition of choline kinase simultaneously attenuates MAPK and PI3k/AKT signaling [J]. *Oncogene*, 2010, 29 (1): 139-149.
- [13] Lipp N, Ikhlef S, Milanini J, et al. Lipid exchangers: cellular functions and mechanistic links with phosphoinositide metabolism [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 663.
- [14] Liu YH, Kong HB, Cai HP, et al. Progression of the PI3K/AKT signaling pathway in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1238782.
- [15] Chen RF, Zhan YQ, Lin ZS, et al. Effect of YuPingFeng granules on clinical symptoms of stable COPD: study protocol for a multicenter, double-blind, and randomized controlled trial [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2024, 24 (1): 25.
- [16] Liu XM, Yu Y, Wu YQ, et al. A systematic pharmacology-based in vivo study to reveal the effective mechanism of Yupingfeng in asthma treatment [J]. *Phytomedicine*, 2023, 114: 154783.
- [17] Yin YH, Liu JY, Zhang MY, et al. Mechanism of YuPingFeng in the treatment of COPD based on network pharmacology [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 1630102.
- [18] 李红念, 梅全喜, 戴卫波, 等. 玉屏风散的临床应用与药理作用研究进展 [J]. *广州中医药大学学报*, 2016, 33 (2): 284-287.
- [19] 何艳青, 招志辉, 张俊红, 等. 不同来源黄芪化学成分及其抗疲劳价值分析 [J]. *广州中医药大学学报*, 2023, 40 (5): 1234-1238.

- [20] 姜宇珺, 张北雪, 马善鹏, 等. 4 种不同来源的苍术和白术对偏于实证的脾虚大鼠药效学比较研究[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38 (8): 142-146.
- [21] Bai YX, Wei WL, Yao CL, et al. Advances in the chemical constituents, pharmacological properties and clinical applications of TCM formula yupingfeng san [J]. Fitoterapia, 2023, 164: 105385.
- [22] Du CY, Choi RC, Zheng KY, et al. Yu ping feng san, an ancient Chinese herbal decoction containing astragali radix, atractylodis macrocephalae rhizoma and saposchnikovia radix, regulates the release of cytokines in murine macrophages [J]. PLoS One, 2013, 8 (11): e78622.
- [23] 王萍, 雷钧涛, 陈江辉, 等. 三种不同来源的防风种子活力研究[J]. 中国地方病防治杂志, 2019, 34 (1): 27-30.
- [24] 吴燕升, 郭小平, 魏丽凤, 等. 参芪颗粒及其拆方对足细胞损伤的保护作用[J]. 上海中医药杂志, 2024, 58 (12): 153-162.
- [25] 宋珏. 基于量效关系分析的复方玉屏风抗炎免疫作用及配伍机制研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2011.
- [26] 刘海叶, 骆姗, 贾智玲, 等. 玉屏风颗粒对慢性阻塞性肺疾病模型大鼠肺泡灌洗液代谢组学及肠道菌群的影响[J]. 中医杂志, 2023, 64 (20): 2116-2124.
- [27] Song J, Li J, Zheng SR, et al. Anti-inflammatory and immunoregulatory effects of yupingfeng powder on chronic bronchitis rats [J]. Chin J Integr Med, 2013, 19 (5): 353-359.
- [28] Zhang SY, Lu XW, Fang X, et al. Cigarette smoke extract combined with LPS reduces ABCA3 expression in chronic pulmonary inflammation may be related to PPAR $\gamma$ /p38 MAPK signaling pathway [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2022, 244: 114086.
- [29] Knudsen L, Weibel ER, Gundersen HJ, et al. Assessment of air space size characteristics by intercept (chord) measurement: an accurate and efficient stereological approach [J]. J Appl Physiol, 2010, 108 (2): 412-421.
- [30] 彭琳, 廖彬, 龙慧玲. 基于网络药理学和分子对接探讨苦杏仁苷治疗胃癌的作用机制及实验验证[J]. 中南药学, 2024, 22 (12): 3200-3205.
- [31] Qi CZ, Zhou J, Wang ZH, et al. Cigarette smoke extract combined with lipopolysaccharide reduces OCTN1/2 expression in human alveolar epithelial cells in vitro and rat lung in vivo under inflammatory conditions [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 87: 106812.
- [32] Li DL, Qi CZ, Zhou J, et al. LPS-induced inflammation delays the transportation of ASP<sup>+</sup> due to down-regulation of OCTN1/2 in alveolar epithelial cells [J]. J Drug Target, 2020, 28 (4): 437-447.
- [33] Hogg JC, Timens W. The pathology of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Annu Rev Pathol-Mech, 2009, 4: 435-459.
- [34] Barnes PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. J Allergy Clin Immunol, 2016, 138 (1): 16-27.
- [35] Burgel PR, Bourdin A, Chanez P, et al. Update on the roles of distal airways in COPD. [J]. Eur Respir Rev, 2011, 20 (119): 7-22.
- [36] 郑欣, 黄月云, 张旺生, 等. 真一气汤对慢性阻塞性肺疾病大鼠氧化应激和炎症反应的影响[J]. 福建中医药, 2024, 55 (11): 30-33.
- [37] 李雅兰, 李渊, 马建岭, 等. 四君子汤合三子养亲汤对慢性阻塞性肺疾病小鼠肺功能及肺组织损伤的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2024, 51 (5): 193-196, 225.
- [38] McCluskey ES, Liu N, Pandey A, et al. Quercetin improves epithelial regeneration from airway basal cells of COPD patients [J]. Res Sq, 2023, doi: 10.21203/rs.3.rs-3185241/v1.
- [39] Araújo NPDS, de Matos NA, Oliveira M, et al. Quercetin improves pulmonary function and prevents emphysema caused by exposure to cigarette smoke in male mice [J]. Antioxidants, 2022, 11 (2): 181.
- [40] Gao MJ, Zhu X, Gao XJ, et al. Kaempferol mitigates sepsis-induced acute lung injury by modulating the SphK1/s1p/s1PR1/MLC2 signaling pathway to restore the integrity of the pulmonary endothelial cell barrier [J]. Chem Biol Interact, 2024, 398: 111085.
- [41] Yang HG, Zhang XW, Wang C, et al. Microcolin h, a novel autophagy inducer, exerts potent antitumour activity by targeting PITPa/ $\beta$  [J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8 (1): 428.
- [42] Li FL, Fu V, Liu GB, et al. Hippo pathway regulation by phosphatidylinositol transfer protein and phosphoinositides [J]. Nat Chem Biol, 2022, 18 (10): 1076.

(收稿日期: 2024-12-28; 修回日期: 2025-03-19)



# 雷美替胺舌下喷雾剂的制备及其药代动力学研究

刘协鸿<sup>1</sup>, 陈善清<sup>2</sup>, 韦先铭<sup>2</sup>, 尹小丽<sup>3</sup>, 王磊<sup>4</sup>, 程泽能<sup>1, 2, 4\*</sup> (1. 徐州医科大学药学院, 江苏 徐州 221004; 2. 中南大学湘雅药学院, 长沙 410000; 3. 湖南泰新医药科技有限公司, 长沙 410000; 4. 湖南慧泽生物医药科技有限公司, 长沙 410000)

**摘要:** **目的** 制备雷美替胺舌下喷雾剂并考察其刺激性和体内药代动力学行为。**方法** 采用多元溶剂体系制备雷美替胺舌下喷雾剂。考察雷美替胺在不同辅料中的溶解度; 按照《中国药典》中的规定, 进行每喷喷量、微生物限度检测、稳定性考察、金黄地鼠口腔黏膜刺激性反应; 考察雷美替胺舌下喷雾剂在 SD 大鼠体内的药代动力学行为。**结果** 雷美替胺舌下喷雾剂的每喷喷量、微生物限度检测、稳定性考察、金黄地鼠口腔黏膜刺激性反应均符合《中国药典》的要求。在 SD 大鼠的药代动力学研究中, 其生物利用度约为雷美替胺片剂混悬液的 5.77 倍, 代谢产物 M-II 的生物利用度约为雷美替胺片剂混悬液的 78%, 药效约为雷美替胺片剂混悬液的 5.45 倍。**结论** 本研究制备的雷美替胺舌下喷雾剂处方合理, 质量稳定, 生物利用度高, 可为雷美替胺舌下喷雾剂临床应用提供数据支持。

**关键词:** 雷美替胺; 舌下喷雾剂; 微生物限度; 刺激性反应; 药代动力学

中图分类号: R943, R96 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)06-1621-06  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.018

## Preparation and pharmacokinetics of ramelteon sublingual spray

LIU Xie-hong<sup>1</sup>, CHEN Shan-qing<sup>2</sup>, WEI Xian-ming<sup>2</sup>, YIN Xiao-li<sup>3</sup>, WANG Lei<sup>4</sup>, CHENG Ze-neng<sup>1, 2, 4\*</sup> (1. School of Pharmacy, Xuzhou Medical University, Xuzhou Jiangsu 221004; 2. Xiangya School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410000; 3. Hunan Taixin Drug Research Co., Ltd., Changsha 410000; 4. Hunan Huize Biopharmaceutical Technology Co., Ltd., Changsha 410000)

**Abstract: Objective** To prepare ramelteon sublingual spray and to determine its irritation and pharmacokinetic behaviors in vivo. **Methods** The sublingual spray of ramelteon was prepared using a multi-solvent system. The solubility of ramelteon in different excipients was evaluated. According to the requirements of Chinese Pharmacopoeia, we tested the spray volume per actuation and microbial limits, and assessed the stability, and oral mucosal irritation in golden hamsters. Additionally, the pharmacokinetic behaviors of the ramelteon sublingual spray in SD rats were determined. **Results** The spray volume per actuation, microbial limit, stability, and oral mucosal irritation in golden hamsters all met the standards of the Chinese Pharmacopoeia. Bioavailability of the ramelteon sublingual spray was approximately 5.77 times that of the ramelteon tablet suspension, and the bioavailability of its metabolite M-II was about 78% that of the ramelteon tablet suspension. The efficacy of the ramelteon sublingual spray was approximately 5.45 times that of the ramelteon tablet suspension. **Conclusion** Ramelteon sublingual spray prepared in this study has a rational formulation, stable quality, and high bioavailability.

**Key words:** ramelteon; sublingual spray; microbial limit; irritation response; pharmacokinetics

基金项目: 湖南省自然科学基金部门联合基金项目 (No.2024JJ8143)。

作者简介: 刘协鸿, 男, 硕士研究生, 主要从事创新制剂研究, email: 519133848@qq.com \*通信作者: 程泽能, 男, 教授, 主要从事生物药剂学和药物动力学研究, email: chengzn@csu.edu.cn

失眠是指睡眠质量较差或持续时间不长,睡前难以入睡,半夜或清晨醒来等导致疲劳,精力不足,认知功能困难和情绪障碍等症状,失眠是最常见的睡眠障碍。随着生活节奏的加快和生活压力的增加,失眠的发病率不断上升,失眠人群的生活质量下降(如疲劳、易怒、白天嗜睡、认知功能下降和记忆障碍等症状),工作效率降低和事故风险增加,是影响人们身心健康的重要因素<sup>[1-2]</sup>。目前,针对失眠症状的治疗药物主要有褪黑素受体激动剂、具有催眠效果的抗抑郁药物、作用于 $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)受体的苯二氮草类受体激动剂和非苯二氮草类受体激动剂等<sup>[3]</sup>。

褪黑素具有诸多重要的生理功能,包括调节昼夜节律、促进并巩固睡眠、参与抗氧化防御、调节免疫系统、影响衰老进程、控制生殖活动以及抑制肿瘤生长等,雷美替胺作为其类似物,同样承载着这些关键功能<sup>[4-5]</sup>。雷美替胺是一种高亲和力的MT1和MT2褪黑素受体激动剂,可促进包括人类在内的多种哺乳动物的睡眠,而不会导致学习、记忆或运动功能障碍,对M1的亲合力比M2高8倍,对褪黑素受体的亲合力比褪黑素高3~16倍<sup>[6-7]</sup>。在原发性慢性失眠症患者中,雷美替胺能够显著缩短入睡所需的时间,有效延长总睡眠时长。此外,患者在服用后次日不会出现明显的残留效应,如困倦、头晕等不适感。重要的是,该药物并不与GABA受体复合物等神经递质结合,从而避免了药物的成瘾性和依赖性问题的,极大地减少了对人体的不良反应,为患者提供了一种安全、有效的治疗选择。目前市场上雷美替胺的剂型主要为片剂,肝脏CYP1A2、CYP2C19和CYP3A4酶等和其他代谢的影响导致其首过效应强<sup>[8]</sup>,临床上口服应用时至少有84%的药物被吸收,但其口服生物利用度仅为1.8%<sup>[9]</sup>,同时还有起效慢、患者顺应性差等缺点<sup>[10-11]</sup>。本研究主要通过改变雷美替胺的剂型,制备为舌下喷雾,通过舌下黏膜毛细血管进入血液,同时避开胃肠道酸碱性和酶的影响,进而提高雷美替胺的生物利用度<sup>[12]</sup>,为雷美替胺舌下喷雾剂临床应用提供依据。

## 1 材料

### 1.1 试药

雷美替胺(湖南慧泽生物医药科技有限公司,批号:20230901);雷美替胺片(武田药品工业株式会社,规格:8 mg/片,批号:537025);无水乙醇(湖南湘易康制药有限公司,批号:100220230303);聚乙二醇400(江西益普生药业有限公司);丙二醇

(湖北葛店人福药用辅料有限公司);二乙二醇单乙醚(广州市天润药业有限公司);聚氧乙烯(35)蓖麻油(北京凤礼精求医药股份有限公司);甘油(山东瑞生药用辅料有限公司);十二烷基硫酸钠(巴斯夫股份公司);磷酸氢二铵、磷酸(国药集团化学试剂有限公司);乙腈、甲醇(上海星可高纯溶剂有限公司)。

枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501]、金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、大肠埃希菌[CMCC(B)44102]、黑曲霉[CMCC(F)98003]、铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104](中国医药微生物菌种保藏管理中心)。

### 1.2 仪器

ME204/02 万分之一天平(梅特勒托利多);SOPSECURA225D-1CN 十万分之一天平(赛多利斯);BT-50 超声波分散器(丹东百特仪器有限公司);水浴振荡器(上海博讯医疗生物仪器有限公司);ZNCL-GS 磁力搅拌器(上海贝伦仪器设备有限公司);1260Infinity VWD 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司);PHSJ-4F pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司);AB 5500 型三重四极杆液质联用仪[Sciex 公司,配有电喷雾电离源、Analys (Version1.6.3/Version1.7.2) 数据处理系统及 Sciex ExionLC AD 液相色谱仪];YC-528SL 药品阴凉箱(中科美菱低温科技有限公司)。

### 1.3 实验动物

金黄地鼠,SPF级,雌雄各半,12只,110.1~120.5 g[雄性动物质量合格证编号:110011231112654217,雌性动物质量合格证编号:110011231112654357,伦理审查编号:IACUC-2023(1)200,北京维通利华实验动物技术有限公司];SD大鼠,SPF级,雌雄各半,12只,180~260 g(雄性动物质量合格证编号:110011241101870632,雌性动物质量合格证编号:110011241101870784,伦理审查编号:HNUCM21-2403-28,北京维通利华实验动物技术有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 雷美替胺舌下喷雾剂辅料的选择

雷美替胺在水中的溶解度较低,可在雷美替胺舌下喷雾剂系统中添加潜溶剂提高雷美替胺的溶解度。本实验从常规辅料中选择无水乙醇、聚乙二醇400、丙二醇进行考察,其中无水乙醇和纯化水为溶剂,丙二醇和聚乙二醇400为潜溶剂。

### 2.2 雷美替胺在辅料中的饱和溶解度

取20 mL所选辅料置于50 mL量瓶中,分别

加入雷美替胺适量直至饱和，37℃振摇 24 h，采用 HPLC 法测定雷美替胺含量。

色谱条件：色谱柱（月旭 Ultimate XB-C18，4.6 mm×150 mm，5 μm）；以 pH 3.0 磷酸氢二铵溶液为流动相 A，以乙腈为流动相 B，等度洗脱（流动相 A：B = 65：35）；检测波长为 220 nm；流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>；柱温为 25℃；进样量为 20 μL。

2.3 处方构成及制备工艺

2.3.1 处方构成 雷美替胺 4 g，无水乙醇 85.5 g，丙二醇 10.5 g，聚乙二醇 400 10.5 g，纯化水加至 200 mL。

2.3.2 制备工艺 称取处方量的无水乙醇于烧杯中，加入处方量的雷美替胺，搅拌均匀溶解，再加入处方量的聚乙二醇 400 和丙二醇，搅拌均匀，最后加水至 200 mL，搅拌均匀，药液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤，装瓶，制得雷美替胺舌下喷雾剂。

2.4 雷美替胺舌下喷雾剂的质量评价方法

2.4.1 每喷喷量 根据 2020 年版《中国药典》喷雾剂项下规定，取待试喷雾剂 1 瓶，除去瓶帽，充分振摇，弃去前 3 喷，每次间隔 5 s 并缓缓振摇擦净，再精密称定，分别在喷次前（初始 3 次）、中（第 14、15、16、17 喷次）、后（最后 3 次）精密称定，再重复测试 3 瓶。

2.4.2 微生物限度 参照《中国药典》2020 年版四部的规定，非无菌化学药品制剂的微生物限度应符合要求，采用微生物计数法<sup>[13-14]</sup>测定需氧菌、霉菌、酵母菌总数及采用控制菌检查法进行大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌检查。

2.4.3 刺激性研究<sup>[15]</sup> 金黄地鼠分为阴性对照组和受试物组，每组 6 只动物，受试物组将雷美替胺舌下喷雾剂受试物喷服舌下给药，每次给予 1 喷，50 μL/只，闭合口腔，阴性对照组同法给予空白喷雾剂，连续给药 7 d。

每次给药前和恢复期每日观察受试物组和阴性对照组情况并根据与药物接触的口腔黏膜有无充血、肿胀、糜烂及溃烂等刺激反应情况进行评分，具体评分标准：无红斑（0 分）、轻度红斑（1 分）、中度红斑（2 分）、严重红斑（3 分）、紫红色红斑到轻度焦痂形成（4 分）。

末次给药 24 h 和观察 14 d 后，采用异氟烷麻醉安乐死动物并取口腔黏膜进行组织病理学检查，参照表 1 口腔黏膜组织病理反应评分标准进行评分，根据评分进行分级，分级标准：无反应（0 分）、极轻反应（1～4 分）、轻度反应（5～8 分）、中度反应（9～11 分）、重度反应（12～16 分）。

表 1 口腔黏膜组织病理反应评分标准

Tab 1 Scoring criteria for histopathological reactions in the oral mucosal tissue

| 评分 | 反应       |             |          |    |
|----|----------|-------------|----------|----|
|    | 上皮       | 白细胞浸润       | 血管充血     | 水肿 |
| 0  | 正常       | 无           | 无        | 无  |
| 1  | 细胞变性或变扁平 | 极小≤ 25 个    | 极少       | 极少 |
| 2  | 化生       | 轻度 26～50 个  | 轻度       | 轻度 |
| 3  | 局部糜烂     | 中度 51～100 个 | 中度       | 中度 |
| 4  | 广泛糜烂     | 重度> 100 个   | 重度伴有血管破裂 | 重度 |

2.5 稳定性考察

将 3 批样品贮存于（25±2）℃、相对湿度（60±5）% 的条件下，分别于 0 d、3 个月、6 个月按考察项目取样检测，考察样品的长期稳定性。

2.6 药代动力学研究

2.6.1 雷美替胺片剂混悬液的制备 称取 0.5 g 的羧甲基纤维素钠置于烧杯中，加水至 100 mL，水浴加热，温度为 50～60℃，搅拌均匀，制成 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液。用量筒量取 40 mL 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液，加入放有一片雷美替胺片的烧杯中，搅拌均匀，制成质量浓度为 0.2 mg·mL<sup>-1</sup> 的雷美替胺片剂混悬液。

2.6.2 实验设计 参考《药物非临床药代动力学研究技术指导原则》，采用单次给药、单周期、组间对照实验设计。取 SD 大鼠，雌雄各半，体重 180～260 g，随机分为对照组、受试组，每组 6 只，根据对标制剂临床前资料进行剂量设计，对照组分别禁食 12 h 后灌胃给予 1 mg·kg<sup>-1</sup> 的雷美替胺片剂混悬液（约等于人临床拟用剂量 11 mg），受试组分别禁食 12 h 后舌下给予 0.25 mg·kg<sup>-1</sup> 雷美替胺舌下喷雾（约等于人临床拟用剂量 2.8 mg）。

2.6.3 采血时间点的设置及样品采集 于给药前 0 h 及给药后 0.083、0.17、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0 h 通过颈静脉采集 0.3 mL 全血，采集的静脉血置于带有 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝剂的 EP 管中，摇匀并放置于冰水浴中待离心。

2.6.4 血浆样品处理 取 50 μL 血浆样品，加入 50 μL 内标工作液（雷美替胺甲醇溶液，1.000 ng·mL<sup>-1</sup>），200 μL 乙腈沉淀剂，涡旋混匀 3 min 后，于 4℃、2450 g 离心 10 min，取 5 μL 上清液进样分析。

2.6.5 色谱条件 色谱柱：Phenomenex Kinetex C18 100A LC Column（50 mm×2.1 mm，5 μm）；流动相 A：2 mmol·L<sup>-1</sup> 乙酸铵-0.01% 甲酸水溶液，流动相 B：乙腈；流速：0.45 mL·min<sup>-1</sup>，梯



度洗脱 (0 ~ 0.20 min, 25%B; 0.20 ~ 2.80 min, 65%B; 2.80 ~ 3.00 min, 65%B; 3.00 ~ 3.01 min, 25%B); 柱温: 40 ℃, 进样量: 5 μL。

**2.6.6 质谱条件** 采用电喷雾离子源 (ESI), 正离子 MRM 模式检测; 气帘气 (CUR) 35 psi; 碰撞气 (CAD) 9.00 psi; 雾化温度 550.00 ℃; 雾化气 (Gas1) 65.00 psi; 辅助气 (Gas2) 55.00 psi; 喷雾电压 (IS) 5500.00 V; 驻留时间 (Dwell) 200 ms; 离子反应: 雷美替胺 ( $m/z$  260.2 → 204.1), 去簇电压 60 V, 碎裂电压 20 V; 内标雷美替胺- $d_5$  ( $m/z$  265.2 → 205.1), 去簇电压 65 V, 碎裂电压 22 V; 代谢产物: 雷美替胺-Ⅱ ( $m/z$  276.2 → 159.1), 去簇电压 90 V, 碎裂电压 30 V; 内标代谢产物: 雷美替胺-Ⅱ- $d_3$  ( $m/z$  279.1 → 159.1), 去簇电压 90 V, 碎裂电压 30 V。

**2.6.7 数据处理** 使用非房室模型拟合法, 采用 WinNolin6.4 版本的 NCA 模块计算雷美替胺舌下喷雾剂在 SD 大鼠体内的药动学参数, 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。使用 WinNolin6.4 软件中的 X-YPlots 模块绘制单次舌下给药后血浆中雷美替胺及其代谢产物 M-Ⅱ 的浓度随时间变化的曲线。

3 结果

3.1 雷美替胺在辅料中的饱和溶解度

雷美替胺在无水乙醇中的饱和溶解度为  $187.9194 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 在丙二醇中的饱和溶解度为  $48.4362 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 在聚乙二醇 400 中的饱和溶解度为  $71.9417 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.2 每喷雾量

所有组别的平均喷量和实际喷量数据均在 80% ~ 120%, 即 40 ~ 60 mg 的范围, 均符合《中国药典》的要求。

3.3 微生物限度

雷美替胺舌下喷雾剂样品中的需氧菌总数和霉菌以及酵母菌总数均小于  $10 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 每 1 mL 样品中均未检出金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌, 符合《中国药典》<sup>[16]</sup> 对微生物限度的要求。

3.4 刺激性研究

观察末次给药 24 h 和继续观察 14 d 后解剖的受试物组和阴性对照组金黄地鼠口腔黏膜均未见充血、肿胀、红斑或焦痂形成等局部反应。组织病理学检查结果如图 1 所示, 末次给药 24 h 后和继续观察 14 d 后解剖的动物口腔黏膜组织 (舌下) 未见上皮改变, 水肿, 充血, 炎症细胞浸润等病理变化, 反应级别均为无反应。综合大体观察和

显微镜观察结果, 金黄地鼠舌下喷服雷美替胺舌下喷雾剂, 未见与受试物相关的刺激性反应。

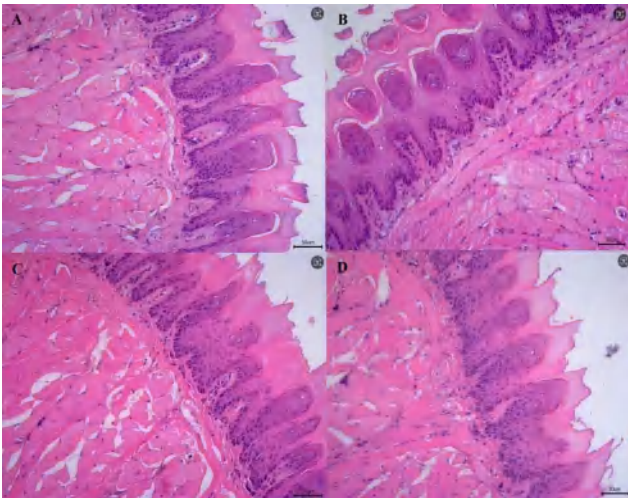


图 1 雷美替胺和舌下喷雾剂对口腔黏膜 (舌下) 组织病理切片的影响 (×200)

Fig 1 Effect of ramelteon and sublingual spray on the histopathological section of the oral mucosa (sublingual) tissue (×200)

A. 受试物组末次给药 24 h (test group 24 h after the last administration); B. 对照组末次给药 24 h (control group 24 h after the last administration); C. 受试物组末次给药 14 d (14 days after the last administration of the test substance); D. 对照组末次给药 14 d (14 days after the last administration in the control group)

3.5 稳定性考察

3 批样品按考察项目取样检测结果如表 2 所示, 最大未知杂质小于 0.5%, 总杂质小于 1%, 含量均在 90% ~ 110%, 符合要求, 表明本品可在 (25 ± 2) ℃、相对湿度 (60 ± 5) % 的条件下贮存 6 个月。

表 2 3 批样品在长期稳定性试验条件下贮存的稳定性 (%)

Tab 2 Stability of 3 batches of samples stored under long-term stability test conditions (%)

| 批次       | 贮存时间 / 月 | 最大未知杂质 | 总杂质  | 雷美替胺含量 |
|----------|----------|--------|------|--------|
| 23121101 | 0        | 0.06   | 0.21 | 98.4   |
|          | 3        | 0.07   | 0.34 | 103.3  |
|          | 6        | 0.07   | 0.40 | 101.3  |
| 23121102 | 0        | 0.06   | 0.21 | 98.5   |
|          | 3        | 0.07   | 0.35 | 105.1  |
|          | 6        | 0.07   | 0.40 | 105.5  |
| 23121103 | 0        | 0.06   | 0.25 | 98.4   |
|          | 3        | 0.07   | 0.36 | 105.7  |
|          | 6        | 0.07   | 0.40 | 105.0  |

3.6 药代动力学研究

本实验对 LC-MS/MS 法测定大鼠血浆中的雷美替胺及其代谢产物 M-Ⅱ 浓度进行了验证, 取用 50 μL EDTA- $K_2$  抗凝的血浆样本, 经乙腈蛋白沉淀后, 取上清液 5 μL 进样, 定量范围为雷美替胺 0.1000 ~ 100.0 ng · mL<sup>-1</sup>, 代谢产物 M-Ⅱ 为

0.1000 ~ 200.0 ng · mL<sup>-1</sup>，定量下限均为 0.1000 ng · mL<sup>-1</sup>，其中批量样品检测过程的残留、精密度和准确度、选择性、干扰、基质效应、回收率、稀释验证、稳定性等的考察结果均符合要求，表明 LC-MS/MS 法可用于测定大鼠血浆中的雷美替胺及其代谢产物 M-Ⅱ。平均血药浓度 - 时间曲线如图 2 所示，主要药代动力学参数见表 3，实验结

果表明，雷美替胺舌下喷雾剂中雷美替胺的平均  $AUC_{0\sim t}$  为 91.97 ng · h · mL<sup>-1</sup>，雷美替胺片剂混悬液中雷美替胺的平均  $AUC_{0\sim t}$  为 63.80 ng · h · mL<sup>-1</sup>，经剂量换算后，雷美替胺舌下喷雾剂的生物利用度约为雷美替胺片剂混悬液的 5.77 倍，表明 SD 大鼠给予雷美替胺舌下喷雾剂，动物体内雷美替胺的暴露量远高于雷美替胺片剂混悬液。

表 3 SD 大鼠单次给药后血浆中雷美替胺及其代谢产物 M-Ⅱ 的主要药动力学参数

| 参数                                              | 雷美替胺          |               | 代谢产物 M-Ⅱ     |            |
|-------------------------------------------------|---------------|---------------|--------------|------------|
|                                                 | 片剂混悬组         | 舌下喷雾组         | 片剂混悬组        | 舌下喷雾组      |
| $t_{max}/h$                                     | 0.14±0.09     | 0.18±0.06     | 0.20±0.04    | 0.50±0.00  |
| $C_{max}/(ng \cdot mL^{-1})$                    | 199.89±164.83 | 260.97±110.63 | 140.82±72.46 | 19.24±4.94 |
| $t_{1/2}/h$                                     | 0.37±0.27     | 0.40±0.29     | 0.68±0.22    | 0.42±0.22  |
| $AUC_{0\sim t}/(ng \cdot h \cdot mL^{-1})$      | 63.80±41.51   | 91.97±30.62   | 87.46±30.71  | 17.07±4.80 |
| $AUC_{0\sim \infty}/(ng \cdot h \cdot mL^{-1})$ | 64.03±41.33   | 92.09±30.6    | 88.62±30.11  | 17.24±4.91 |
| $AUC_{extrap}/\%$                               | 0.82±1.46     | 0.15±0.08     | 1.59±2.78    | 0.96±0.45  |

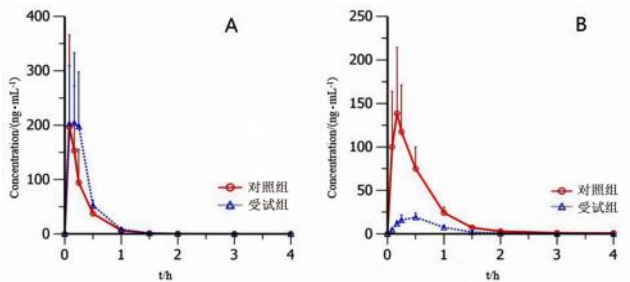


图 2 SD 大鼠单次给药后血浆中雷美替胺 (A) 和代谢产物 M-Ⅱ (B) 的平均血药浓度 - 时间曲线图

Fig 2 Mean plasma concentration-time curves of ramelteon (A) and its metabolite M-Ⅱ (B) in plasma after a single administration in SD rats

雷美替胺舌下喷雾剂的代谢产物 M-Ⅱ 的平均  $AUC_{0\sim t}$  为 17.07 ng · h · mL<sup>-1</sup>；雷美替胺片剂混悬液中的代谢产物 M-Ⅱ 的平均  $AUC_{0\sim t}$  为 87.46 ng · h · mL<sup>-1</sup>，经剂量换算后，雷美替胺舌下喷雾剂代谢产物 M-Ⅱ 的生物利用度约为雷美替胺片剂混悬液的 78%，即 SD 大鼠给予雷美替胺舌下喷雾剂，动物体内代谢产物 M-Ⅱ 的暴露量低于雷美替胺片剂混悬液。

研究发现，雷美替胺代谢产物 M-Ⅱ 的效力仅为雷美替胺的 1/18 到 1/26<sup>[17]</sup>，雷美替胺片剂混悬液的药效系数为 67.30 ~ 68.95，雷美替胺舌下喷雾剂的药效系数为 92.65 ~ 92.97 (计算公式如下所示)，经剂量换算后，雷美替胺舌下喷雾剂的药效约为雷美替胺片剂混悬液药效系数的 5.37 ~ 5.51 倍。

$$E_{片剂} = AUC_{片} \cdot E_{雷美替胺} + AUC_{(片)代谢产物} \cdot E_{代谢产物}$$
$$E_{舌下} = AUC_{舌下} \cdot E_{雷美替胺} + AUC_{(舌下)代谢产物} \cdot E_{代谢产物}$$
$$E_{代谢产物} = 1/20E_{雷美替胺}$$

4 讨论

4.1 辅料、饱和溶解度及稳定性研究

在雷美替胺舌下喷雾剂的研究中，合适的辅料不仅要提高雷美替胺在溶剂中的溶解度，还需要保证喷雾剂的均一稳定性。通过对饱和溶解度的测定以及稳定性考察，雷美替胺在不同辅料中的溶解度差异显著，其中在无水乙醇中的溶解度较高，处方中可适当提高无水乙醇的含量。筛选的处方在稳定性研究中，最大未知杂质、总杂质、含量均符合要求，表明雷美替胺舌下喷雾剂在 6 个月内质量稳定。

4.2 每喷喷量、微生物限度及刺激性研究

在喷量的准确性方面，本研究多次测定了喷雾剂的每喷喷量，所有组别的平均喷量和实际喷量数据均符合 80% ~ 120% 的标准，以确保每次给药剂量的精确性。微生物限度的检测是保证药物安全性的重要指标，本研究采用微生物计数法及控制菌检查法对雷美替胺舌下喷雾剂进行微生物检测，结果符合《中国药典》要求，可确保药品的长期安全性。

在刺激性研究中，雷美替胺舌下喷雾剂直接与口腔黏膜接触，对于含有较高浓度乙醇的处方，部分患者报告了轻微的刺激感或不适感<sup>[18]</sup>。因此需要考察雷美替胺及辅料对口腔黏膜刺激性的影响。本研究制备的雷美替胺舌下喷雾剂经舌下口服给药，末次给药 24 h 后和继续观察 14 d 解剖的动物口腔黏膜组织未见上皮改变、水肿、充血、炎症细胞浸润等病理变化，可认为本研究制备的

雷美替胺舌下喷雾剂不会产生明显的刺激性。

### 4.3 药代动力学研究

在药代动力学研究中,药物的生物利用度较低的原因通常包括吸收不完全、首过效应、代谢和排泄迅速、转运蛋白影响、药物与食物或其他药物的相互作用,以及在胃肠道中的生物降解或不稳定性等,口服雷美替胺的吸收率至少为 84%,但其绝对生物利用度仅为 1.8%。研究发现,雷美替胺经肠系膜吸收进入肝门静脉后输送到肝脏,会被 CYP1A2、CYP2C19 和 CYP3A4 等酶催化代谢<sup>[8]</sup>,降低其生物利用度。为了提高雷美替胺的生物利用度,降低首过效应,选择舌下喷雾给药的方式,舌下黏膜血流丰富,药物通过舌下黏膜吸收到舌下静脉,然后进入上腔静脉,直接进入全身血液循环。在 SD 大鼠的药代动力学研究中,雷美替胺舌下喷雾剂的生物利用度约为雷美替胺片剂混悬液的 5.77 倍,代谢产物 M-Ⅱ的生物利用度约为雷美替胺片剂混悬液的 78%。考虑到代谢产物 M-Ⅱ对治疗失眠也有作用,联合雷美替胺和代谢产物 M-Ⅱ的药效进行比较,经剂量换算后,雷美替胺舌下喷雾剂的药效约为雷美替胺片剂混悬液药效的 5.45 倍,表明雷美替胺舌下喷雾剂与原剂型相比能明显降低首过效应,提高雷美替胺的生物利用度,适用于失眠患者的治疗。

### 参考文献

- [1] Roth T. Insomnia: definition, prevalence, etiology, and consequences [J]. *J Clin Sleep Med*, 2007, 3 (5 Suppl): S7-10.
- [2] Sutton EL. Insomnia [J]. *Ann Intern Med*, 2021, 174 (3): ITC33-ITC48.
- [3] Grandner MA, Perlis ML. Pharmacotherapy for insomnia disorder in older adults [J]. *JAMA Netw Open*, 2019, 2 (12): e1918214.
- [4] Reiter RJ, Tan DX, Fuentes-Broto L, et al. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers [J]. *J Pineal Res*, 2016, 61 (3): 253-278.
- [5] Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP. Melatonin [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006, 38 (3): 313-316.
- [6] Srinivasan V, Spence DW, Pandi-Perumal SR, et al. Melatonergic drugs for therapeutic use in insomnia and sleep disturbances of mood disorders [J]. *CNS Neurol Disord-DR*, 2012, 11 (2): 180-189.
- [7] Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Spence DW, et al. Ramelteon: a review of its therapeutic potential in sleep disorders [J]. *Adv Ther*, 2009, 26 (6): 613-626.
- [8] Obach RS, Ryder TF. Metabolism of ramelteon in human liver microsomes and correlation with the effect of fluvoxamine on ramelteon pharmacokinetics [J]. *Drug Metab Dispos*, 2010, 38 (8): 1381-1391.
- [9] Wurtman R. Ramelteon: a novel treatment for the treatment of insomnia [J]. *Expert Rev Neurother*, 2006, 6 (7): 957-964.
- [10] Greenblatt DJ, Harmatz JS, Karim A. Age and gender effects on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of ramelteon, a hypnotic agent acting via melatonin receptors MT1 and MT2 [J]. *J Clin Pharmacol*, 2007, 47 (4): 485-496.
- [11] Karim A, Tolbert D, Cao C. Disposition kinetics and tolerance of escalating single doses of ramelteon, a high-affinity MT1 and MT2 melatonin receptor agonist indicated for treatment of insomnia [J]. *J Clin Pharmacol*, 2006, 46 (2): 140-148.
- [12] 梁硕, 李超英. 舌下给药研究进展 [J]. *长春中医药大学学报*, 2016, 32 (6): 1309-1311.
- [13] 蒋天逖, 曹聪聪. 三种抗菌药物微生物限度检查方法学验证研究 [J]. *生物化工*, 2023, 9 (5): 131-133, 142.
- [14] 王珍, 陈莉英, 陆雯, 等. 22 种药用辅料微生物计数方法验证 [J]. *临床检验杂志 (电子版)*, 2018, 7 (4): 611-612.
- [15] 薛芳喜, 吕金钢, 姚景春, 等. 牛蒡子苷元舌下片口腔黏膜刺激性研究 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2015, 17 (3): 27-29.
- [16] 中国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 通则 1105, 通则 1106, 通则 1107.
- [17] 美国食品药品监督管理局. Rozerem (ramelteon) 片, NDA 021782 审评报告 [EB/OL]. (2005-07-22) [2024-10-12]. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2005/021782s000\\_RozeremTOC.cfm](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2005/021782s000_RozeremTOC.cfm).
- [18] Aravindhanthan V, Anjali PB, Arun R. Sublingual spray: a new technology oriented formulation with multiple benefits [J]. *IJRPS*, 2019, 10 (4): 2875-2885.

(收稿日期: 2024-11-11; 修回日期: 2025-03-25)



# 基于 p38 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路探讨陈元膏摩法治疗 膝骨性关节炎的作用机制

牙库甫·亚森<sup>1</sup>, 王月媛<sup>1</sup>, 古来撒尔·艾克拜尔<sup>1</sup>, 卢旭昇<sup>2</sup>, 张鑫翔<sup>1</sup>, 刘俊昌<sup>1, 2, 3\*</sup> (1. 新疆医科大学, 乌鲁木齐 830017; 2. 新疆医科大学附属中医医院, 乌鲁木齐 830000; 3. 新疆维吾尔自治区中医药研究院, 乌鲁木齐 830000)

**摘要:** **目的** 探讨陈元膏摩法治疗大鼠膝骨性关节炎(KOA)的作用及机制。**方法** 50只SPF级SD雄性大鼠随机抽取10只为空白组,其余40只大鼠左右膝关节依次注射4%木瓜蛋白酶溶液制备KOA模型,将成模大鼠随机分为模型组、推拿组、陈元膏组、陈元膏摩法组,每组10只。空白组和模型组不予干预,推拿组给予推拿手法,陈元膏组涂抹陈元膏,陈元膏摩法组在涂抹陈元膏基础上给予推拿手法治疗,每日1次,连续4周。干预前1d及干预后14d、28d,检测大鼠膝关节肿胀度,并进行膝关节Lequesne MG评分。干预治疗结束后次日取材,HE染色法观察软骨组织病理学变化;ELISA法检测血清和关节液中肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 、白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、基质金属蛋白酶13(MMP-13)的含量;IHC法及Western blot法分别检测软骨、滑膜组织中p38 MAPK、NF- $\kappa$ B p65蛋白表达水平。**结果** 干预治疗前,与空白组相比,造模各组大鼠膝关节Lequesne MG评分升高( $P < 0.05$ ),膝关节直径增大( $P < 0.05$ );干预治疗后,与空白组相比,模型组软骨组织病理损伤严重,膝关节Lequesne MG评分,膝关节直径,Mankin's评分,血清和关节液中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MMP13含量,软骨组织及滑膜组织中p38 MAPK、NF- $\kappa$ B p65蛋白表达均升高( $P < 0.05$ )。与模型组相比,各干预组软骨组织病理损伤有所好转,膝关节Lequesne MG评分,膝关节直径,Mankin's评分,血清和关节液中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MMP13含量,软骨组织及滑膜组织中p38 MAPK、NF- $\kappa$ B p65蛋白表达降低( $P < 0.05$ ),以陈元膏摩法组作用更为显著( $P < 0.05$ )。**结论** 陈元膏摩法可能是通过抑制p38 MAPK/NF- $\kappa$ B信号通路激活,降低TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MMP13的表达,进而改善KOA大鼠软骨炎性损伤及软骨基质降解。

**关键词:** 陈元膏摩法;膝骨性关节炎;丝裂原活化蛋白激酶;核转录因子- $\kappa$ B

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)06-1627-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.019

## Mechanism of Chenyuan ointment massage for knee osteoarthritis based on p38 MAPK/NF- $\kappa$ B signalling pathway

Yakufu Yassen<sup>1</sup>, WANG Yue-yuan<sup>1</sup>, Gulaisaer Aikebaier<sup>1</sup>, LU Xu-sheng<sup>2</sup>, ZHANG Xin-xiang<sup>1</sup>, LIU Jun-chang<sup>1, 2, 3\*</sup> (1. Xinjiang Medical University, Urumqi 830017; 2. Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000; 3. Institute of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830000)

**Abstract: Objective** To determine the effect and mechanism of Chenyuan ointment massage for knee osteoarthritis (KOA) in rats. **Methods** Ten out of 50 SPF-grade SD male rats were randomly selected as the blank group, and the remaining 40 rats were injected sequentially into the right and left knee joints with 4% papain solution to prepare the KOA model. The model rats were randomly divided into a model group, a massage group, a Chenyuan ointment group and a Chenyuan ointment

**基金项目:** 国家自然科学基金(No. 82360979, No. 81760897); 新疆维吾尔自治区科技创新团队(天山英才团队)项目(No. 2022TSYCTD0008)。

**作者简介:** 牙库甫·亚森,男,硕士,主要从事推拿防治骨关节疾病的基础研究, email: 1458013260@qq.com \*通信作者: 刘俊昌,男,教授,主任医师,博士研究生导师,主要从事针灸推拿防治骨关节疾病的基础与临床研究, email: 625854402@qq.com

massage group (10 rats in each group). The blank group and the model group were not intervened, while the massage group was massaged, the Chenyuan ointment group was given Chenyuan ointment, and the Chenyuan ointment massage group was massaged on the basis of Chenyuan ointment, once daily for four consecutive weeks. The swelling degree of the rat knee joints was detected and the knee joint Lequesne MG score assessed at 1 d pre-intervention, 14 d and 28 d post-intervention. Samples were taken on the next day after the end of intervention, and the pathological changes in the cartilage tissue were observed by hematoxylin and eosin staining; tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$  and matrix metalloproteinase 13 (MMP13) content in the serum and joint fluid were detected by enzyme-linked immunosorbent assay; and the protein expression levels of p38 MAPK and NF- $\kappa$ B p65 were detected in the cartilage and synovial tissues by immunohistochemistry and western blot methods, respectively. **Results** Before the intervention, the rat knee joint Lequesne MG scores in the modeling group were much higher, and the diameter of the knee joints was significantly larger than those of the blank group ( $P < 0.05$ ). After the intervention, the model group showed severe cartilage histopathological damage, with higher knee joint Lequesne MG score, diameter of the knee joints, Mankin's score, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and MMP13 content in the serum and joint fluid, and p38 MAPK and NF- $\kappa$ B p65 protein expression in the cartilage and synovial tissue than those of the blank group ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the cartilage histopathological damage was improved in all the intervention groups, while the knee joint Lequesne MG score, diameter of the knee joints, Mankin's score, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MMP13 content in the serum and joint fluid, and p38 MAPK, NF- $\kappa$ B p65 protein expression in the cartilage and synovial tissues were all reduced ( $P < 0.05$ ). The improvement in the Chenyuan ointment massage group was more significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Chenyuan ointment massage may improve the cartilage inflammatory injury and cartilage matrix degradation in KOA rats by inhibiting the activation of p38 MAPK/NF- $\kappa$ B signalling pathway and decreasing the expressions of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and MMP13.

**Key words:** Chenyuan ointment massage; knee osteoarthritis; p38 MAPK; NF- $\kappa$ B

膝骨性关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是临床常见的致残性关节退行性疾病之一, 其诱因包括膝关节软骨损伤及退变<sup>[1]</sup>。KOA 会破坏膝、髌关节等的软骨、滑膜以及韧带等, 导致膝关节疼痛、肿胀、僵硬、功能障碍甚至畸形<sup>[2-4]</sup>。流调结果显示, 全球约有 2.5 亿人受到 KOA 的影响, 其中我国 KOA 患病率约占 8.1%<sup>[5-7]</sup>。KOA 对患者及其家庭乃至社会都是极其严重的负担<sup>[8]</sup>。现代医学治疗 KOA 的方法主要有药物治疗、物理治疗和手术治疗等<sup>[9]</sup>, 部分西医治疗方法具有一定的局限性且易发生不良反应<sup>[10]</sup>, 因此临床治疗 KOA 需要更好的补充或替代疗法。中医外治法具有显著的临床疗效且不良反应少, 得到了广大患者群体的认可。课题组前期临床研究已证实陈元膏摩法治疗 KOA 疗效显著<sup>[11-14]</sup>, 并已申请专利<sup>[12]</sup>, 本研究基于课题组前期研究, 使用陈元膏等效剂量进行干预治疗来探讨陈元膏摩法跟单一推拿手法和单一陈元膏治疗的疗效差异。陈元膏摩法是把陈元膏和推拿手法相联合的中医外治法, 其最大特点是发挥了“药”与“摩”的综合作用,

在 KOA 治疗过程中达到更好的治疗预期。陈元膏方是由《千金翼方》中记载的古方化裁而来, 组方中有当归、黑附片、细辛、干姜、白芷等活血化瘀、舒筋通络、散寒祛湿的中药材以及维药秋水仙, 维吾尔医学认为, 秋水仙属性为二级干、三级热, 具有祛寒助阳、消炎止痛的功效<sup>[15]</sup>。

研究发现, 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 MAPK) /核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号通路在 KOA 的发生发展过程中起着至关重要的作用<sup>[16-17]</sup>。p38 MAPK 信号通路被认为是细胞信息传递的交汇点, 在关节软骨的破坏过程中起到枢纽作用, 既能够保持和分化关节软骨细胞表型, 又能够使软骨细胞钙化和凋亡。有研究证实, p38 MAPK 信号通路的激活可促进基质金属蛋白酶 13 (MMP13) 以及肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 等促炎因子的合成<sup>[18]</sup>。同时, NF- $\kappa$ B 作为 p38 MAPK 的下游因子, 调控相关炎症因子、基质金属蛋白酶的表达<sup>[19]</sup>。此外, 当 p38 MAPK 信号通路活性受到抑制时, 可阻断下游因子 NF- $\kappa$ B 及其相关炎症因子的表达, 进而减轻软骨炎性损伤、延缓软骨基质降

解<sup>[20]</sup>。相反,当 p38 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路被激活时,可促进 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MMP13 的表达,进一步加重 KOA 病理状态<sup>[21-22]</sup>。因此,本研究拟应用陈元膏摩法治疗 KOA 大鼠,通过检测膝关节软骨组织、滑膜组织、关节液以及血清中 p38 MAPK、NF- $\kappa$ B、MMP13、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的表达水平,探究陈元膏摩法治疗 KOA 的作用机制,以期为临床应用提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 动物

50 只 SPF 级 SD 雄性大鼠,体重 (200 $\pm$ 20) g [新疆医科大学动物中心,动物许可证号:SYXK(新)2023-0001,经新疆医科大学实验动物伦理委员会批准(编号:IACUC-20170222026)]。饲养于新疆医科大学动物实验中心,温度 22~24 $^{\circ}$ C,相对湿度 55%~60%,12 h 光/暗循环,可自由获得食物和水。

### 1.2 试药

陈元膏:由当归 15 g、黑附片 16 g、秋水仙 10 g、干姜 16 g、白芷 10 g、细辛 10 g、羊毛脂和凡士林(1:2)组成,委托新疆名医名方重点实验室制备(规格:5 g/盒),于 4 $^{\circ}$ C 冰箱储存备用。

木瓜蛋白酶(上海源叶生物科技有限公司,批号:M01IS214154,活性:800 U $\cdot$ mg<sup>-1</sup>);乙二胺四乙醇(EDTA)脱钙液(北京雷根生物技术有限公司,批号:1228A23,规格:500 mL);苏木精-伊红(HE)染液(北京兰杰柯科技有限公司,批号:BL700B,规格:1000 mL);大鼠 MMP13、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(上海优选生物科技有限公司);GAPDH 抗体、HRP 标记山羊抗鼠(武汉赛维尔生物技术有限公司);p38 MAPK 抗体、NF- $\kappa$ B p65 抗体(上海亲合力生物医药科技股份有限公司);兔二步法免疫组化试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

### 1.3 仪器

T14899-94 电子数显游标卡尺(上海长滨量具技术有限公司);E310088 显微镜(日本尼康公司);SZB-50 全自动雪花制冰机(常熟市菱科电器有限公司);SPW-6S 电泳仪(武汉赛维尔生物技术有限公司);Azure 600 化学发光成像仪(Azure Biosystems);Porma 88500 低温冰箱、1510-05578 酶标仪(赛默飞世尔仪器有限公司);HH-2 数显恒温水浴锅(常州普天仪器制造有限公司);DHP-9082 电热恒温培养箱、DHG-9055A 电热鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 分组及造模

50 只 SPF 级 SD 雄性大鼠适应性饲养 7 d 后,随机抽取 10 只为空白组,剩余大鼠注射木瓜蛋白酶制备 KOA 大鼠模型<sup>[23]</sup>。分别于第 1、4、7 日向大鼠左右膝关节腔内依次注射生理盐水配制的 4% 木瓜蛋白酶溶液(0.2 mL/次),同时空白组膝关节注射等体积生理盐水。末次注射后第 14 日,运用膝关节 Lequesne MG 评分法验证模型。造模成功后,将成模大鼠随机分为模型组、推拿组、陈元膏组、陈元膏摩法组,每组 10 只。

### 2.2 干预方法

定期剔除四组大鼠双膝关节毛发,充分暴露左右膝关节。空白组和模型组正常抓取,不予特殊治疗;推拿组具体手法操作如下:用拇指和食指在大鼠膝关节周围进行揉法 3~5 min,以推拿部位微微发热为宜,点按内膝眼、犊鼻、鹤顶、血海、梁丘、阳陵泉、足三里,每穴 1 min;陈元膏组在大鼠双膝关节以髌骨为中心区域进行陈元膏涂抹(1 g/只);陈元膏摩法组在涂抹陈元膏(1 g/只)基础上给予推拿手法治疗,操作同推拿组。(为确保操作手法的均一性及有效性,手法操作由经过专业培训的实验员进行),1 次 $\cdot$ d<sup>-1</sup>,连续 4 周。

### 2.3 膝关节肿胀程度及膝关节 Lequesne MG 评分

分别于干预前 1 d 及干预后 14 d、28 d 采用膝关节 Lequesne MG 评分法对各组大鼠进行评分并使用电子数显游标卡尺测量大鼠膝关节直径。

### 2.4 取材

最后一次干预后次日,麻醉各组大鼠,腹主动脉取血,3500 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 离心 10 min,分离血清后取上清液,于-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存;处死各组大鼠并剔除毛发并消毒后用无菌注射器依次向大鼠左右膝关节腔注射 0.2 mL 生理盐水,反复回抽,得到的关节冲洗液离心,取上清液,于-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存;随后取大鼠左右膝关节滑膜组织放入冻存管中,于-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存;最后取大鼠左右膝关节,放入 4% 多聚甲醛中固定后用 EDTA 脱钙液脱钙处理 50 d。

### 2.5 ELISA 法检测大鼠血清和关节液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MMP13 的表达水平

取出血清和关节液,置于冰上解冻,按照 ELISA 试剂盒说明书步骤进行操作,检测样品中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MMP13 的含量。

### 2.6 Western blot 法检测大鼠滑膜组织中 p38 MAPK、NF- $\kappa$ B p65 蛋白的表达水平

取出滑膜组织解冻后加入 RIPA 裂解液、PMSF



和研磨珠用样品快速研磨仪充分研磨后置于冰上 45 min, 4℃、12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 取上清液。按照 BCA 蛋白定量试剂盒说明测量蛋白浓度。所需蛋白上清与 5× 蛋白上样缓冲液混合后置于沸水煮 10 min, 变性后, 于- 20℃ 冰箱保存。制胶, 电泳, 电转, 封闭, 洗膜后加 p38 MAPK (1:1000)、NF-κB p65 (1:1000)、GAPDH (1:4000) 一抗, 4℃ 冰箱孵育过夜, 次日清洗后加二抗 (1:10 000) 孵育, 最后配制 ECL 显色液, 通过化学发光成像仪曝光, 采集图像并用 Image J 进行蛋白条带灰度分析, 计算相对灰度值。

2.7 HE 染色法评估膝关节病理变化

将已脱钙的骨组织依次脱水、浸蜡、包埋、切片、摊片、烘片、烤片、脱蜡、HE 染色、脱水封片, 显微镜观察骨组织病理变化。

2.8 免疫组化法检测大鼠软骨组织中 p38 MAPK、NF-κB p65 的阳性表达

膝关节软骨组织石蜡切片常规脱蜡, 水化, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤, 抗原修复, 分别加 p38 MAPK (1:1000)、NF-κB p65 (1:1000) 一抗, 4℃

过夜, 二抗室温孵育 20 min, PBS 洗涤, DAB 显色, 复染细胞核, 脱水, 封片。通过光学显微镜观察并采集图片, 应用 Image-pro plus 6.0 软件对采集图像进行分析并计算阳性染色的平均吸光度值。

2.9 统计学方法

采用 SPSS 27.0 软件对实验数据进行统计分析。计量资料若符合正态性及方差齐性以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析法, 组间两两比较采用 LSD 法, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠膝关节 Lequesne MG 评分结果

干预前 1 d, 与空白组相比, 模型组、推拿组、陈元膏组和陈元膏摩法组大鼠膝关节 Lequesne MG 评分升高 ( $P < 0.05$ ), 且各组间差异无统计学意义, 提示造模成功; 干预后 14 d、28 d, 与模型组相比, 各干预组大鼠膝关节 Lequesne MG 评分降低 ( $P < 0.05$ ), 与推拿组、陈元膏组相比, 陈元膏摩法组大鼠膝关节 Lequesne MG 评分显著降低 ( $P < 0.05$ ) (见表 1)。

表 1 干预前后各组大鼠膝关节 Lequesne MG 评分比较 ( $n = 10$ , 分)  
Tab 1 Lequesne MG scores of rat knee joints in each group before and after the intervention ( $n = 10$ , points)

| 分组     | 干预前 1 d    |            | 干预后 14 d                 |                          | 干预后 28 d                 |                          |
|--------|------------|------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|        | 左膝         | 右膝         | 左膝                       | 右膝                       | 左膝                       | 右膝                       |
| 空白组    | 0.00±0.00  | 0.00±0.00  | 0.00±0.00                | 0.00±0.00                | 0.00±0.00                | 0.00±0.00                |
| 模型组    | 9.10±1.37* | 8.90±1.57* | 8.30±1.86*               | 8.10±1.75*               | 7.70±0.49*               | 7.60±0.52*               |
| 推拿组    | 8.80±1.63* | 8.60±1.34* | 7.10±1.43 <sup>#</sup>   | 6.80±1.91 <sup>#</sup>   | 4.70±0.33 <sup>#</sup>   | 4.60±0.24 <sup>#</sup>   |
| 陈元膏组   | 8.50±1.90* | 8.70±1.81* | 6.80±1.88 <sup>#</sup>   | 6.60±1.51 <sup>#</sup>   | 4.10±0.20 <sup>#</sup>   | 4.30±0.31 <sup>#</sup>   |
| 陈元膏摩法组 | 8.80±1.54* | 8.40±1.63* | 5.50±1.42 <sup>#▲▼</sup> | 5.80±1.33 <sup>#▲▼</sup> | 2.20±0.13 <sup>#▲▼</sup> | 2.50±0.35 <sup>#▲▼</sup> |

注: 与空白组相比, \* $P < 0.05$ ; 与模型组相比, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与推拿组相比, <sup>▲</sup> $P < 0.05$ ; 与陈元膏组相比, <sup>▼</sup> $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the blank group, \* $P < 0.05$ ; compared with the model group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; compared with the massage group, <sup>▲</sup> $P < 0.05$ ; compared with the Chenyuan ointment group, <sup>▼</sup> $P < 0.05$ .

3.2 各组大鼠膝关节直径比较

干预前 1 d, 与空白组比, 模型组、推拿组、陈元膏组和陈元膏摩法组大鼠膝关节直径增大 ( $P < 0.05$ ); 干预后 14 d、28 d, 与模型组比, 各

干预组大鼠膝关节直径减小 ( $P < 0.05$ )。与推拿组、陈元膏组相比, 陈元膏摩法组大鼠膝关节直径值显著降低 ( $P < 0.05$ ) (见表 2)。

表 2 各组大鼠膝关节直径比较 ( $n = 10$ , mm)  
Tab 2 Knee joint diameters of rats in each group ( $n = 10$ , mm)

| 分组     | 干预前 1 d    |            | 干预后 14 d                 |                          | 干预后 28 d                 |                          |
|--------|------------|------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|        | 左膝         | 右膝         | 左膝                       | 右膝                       | 左膝                       | 右膝                       |
| 空白组    | 7.23±0.05  | 7.25±0.04  | 7.36±0.02                | 7.33±0.03                | 7.51±0.06                | 7.49±0.04                |
| 模型组    | 8.78±0.07* | 8.86±0.05* | 8.81±0.08*               | 8.85±0.04*               | 8.73±0.07*               | 8.82±0.06*               |
| 推拿组    | 8.76±0.05* | 8.89±0.02* | 8.61±0.03 <sup>#</sup>   | 8.71±0.09 <sup>#</sup>   | 8.47±0.04 <sup>#</sup>   | 8.51±0.02 <sup>#</sup>   |
| 陈元膏组   | 8.73±0.06* | 8.71±0.04* | 8.62±0.04 <sup>#</sup>   | 8.65±0.07 <sup>#</sup>   | 8.44±0.03 <sup>#</sup>   | 8.55±0.07 <sup>#</sup>   |
| 陈元膏摩法组 | 8.79±0.06* | 8.81±0.07* | 8.57±0.06 <sup>#▲▼</sup> | 8.58±0.03 <sup>#▲▼</sup> | 8.25±0.05 <sup>#▲▼</sup> | 8.23±0.04 <sup>#▲▼</sup> |

注: 与空白组相比, \* $P < 0.05$ ; 与模型组相比, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与推拿组相比, <sup>▲</sup> $P < 0.05$ ; 与陈元膏组相比, <sup>▼</sup> $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the blank group, \* $P < 0.05$ ; compared with the model group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; compared with the massage group, <sup>▲</sup> $P < 0.05$ ; compared with the Chenyuan ointment group, <sup>▼</sup> $P < 0.05$ .

### 3.3 各组大鼠软骨组织 HE 染色结果比较

空白组大鼠软骨组织表面平滑, 关节腔间隙并无狭窄, 无明显病理改变; 与空白组相比, 模型组大鼠软骨组织表面粗糙且部分糜烂, 软骨组织完整性被严重破坏, 同时可见软骨细胞明显肥大、排列紊乱, 且关节腔间隙变窄, 软骨基质染色严重不均匀, Mankin's 评分升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 各干预组大鼠软骨组织表面轻度破坏、略欠光滑, 关节腔间隙稍有狭窄, 细胞略有肥大, Mankin's 评分降低 ( $P < 0.05$ ); 与推拿组、陈元膏组相比, 陈元膏摩法组大鼠软骨组织改善程度更明显且

Mankin's 评分降低更显著 ( $P < 0.05$ ) (见图 1)。

### 3.4 各组大鼠血清和关节液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MMP13 表达水平比较

与空白组相比, 模型组大鼠血清和关节液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MMP13 表达水平升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 各干预组大鼠血清和关节液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MMP13 表达水平降低 ( $P < 0.05$ ); 与推拿组、陈元膏组相比, 陈元膏摩法组大鼠血清和关节液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MMP13 表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ ) (见表 3)。

表 3 各组大鼠血清及关节液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MMP-13 表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Tab 3 Expression levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and MMP-13 in the serum and joint fluids of rats of each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

| 分组     | 血清                                       |                                         |                                  | 关节液                                      |                                         |                                   |
|--------|------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------|
|        | TNF- $\alpha$ / (pg $\cdot$ mL $^{-1}$ ) | IL-1 $\beta$ / (pg $\cdot$ mL $^{-1}$ ) | MMP-13/ (ng $\cdot$ mL $^{-1}$ ) | TNF- $\alpha$ / (pg $\cdot$ mL $^{-1}$ ) | IL-1 $\beta$ / (pg $\cdot$ mL $^{-1}$ ) | MMP-13/ (ng $\cdot$ mL $^{-1}$ )  |
| 空白组    | 108.80 $\pm$ 38.30                       | 61.70 $\pm$ 12.42                       | 53.47 $\pm$ 16.49                | 88.34 $\pm$ 20.69                        | 44.10 $\pm$ 7.69                        | 71.13 $\pm$ 22.15                 |
| 模型组    | 369.55 $\pm$ 31.92 <sup>*</sup>          | 189.46 $\pm$ 10.22 <sup>*</sup>         | 164.79 $\pm$ 14.95 <sup>*</sup>  | 321.21 $\pm$ 33.52 <sup>*</sup>          | 202.91 $\pm$ 5.83 <sup>*</sup>          | 225.06 $\pm$ 15.28 <sup>*</sup>   |
| 推拿组    | 294.37 $\pm$ 32.46 <sup>#</sup>          | 155.18 $\pm$ 16.82 <sup>#</sup>         | 138.27 $\pm$ 9.65 <sup>#</sup>   | 258.16 $\pm$ 23.96 <sup>#</sup>          | 168.48 $\pm$ 25.36 <sup>#</sup>         | 162.91 $\pm$ 28.55 <sup>#</sup>   |
| 陈元膏组   | 310.63 $\pm$ 26.30 <sup>#</sup>          | 151.72 $\pm$ 14.49 <sup>#</sup>         | 141.30 $\pm$ 8.17 <sup>#</sup>   | 246.53 $\pm$ 24.78 <sup>#</sup>          | 177.69 $\pm$ 11.17 <sup>#</sup>         | 171.13 $\pm$ 35.64 <sup>#</sup>   |
| 陈元膏摩法组 | 240.00 $\pm$ 35.16 <sup>#▲▼</sup>        | 112.95 $\pm$ 12.34 <sup>#▲▼</sup>       | 101.17 $\pm$ 7.55 <sup>#▲▼</sup> | 157.25 $\pm$ 22.02 <sup>#▲▼</sup>        | 106.72 $\pm$ 28.20 <sup>#▲▼</sup>       | 127.91 $\pm$ 26.56 <sup>#▲▼</sup> |

注: 与空白组相比, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组相比, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与推拿组相比, <sup>▲</sup> $P < 0.05$ ; 与陈元膏组相比, <sup>▼</sup> $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the blank group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ; compared with the model group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; compared with the massage group, <sup>▲</sup> $P < 0.05$ ; compared with the Chenyuan ointment group, <sup>▼</sup> $P < 0.05$ 。

### 3.5 各组大鼠软骨组织中 p38 MAPK、NF- $\kappa$ B p65 阳性表达水平比较

与空白组相比, 模型组大鼠软骨组织中 p38 MAPK、NF- $\kappa$ B p65 阳性表达升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 各干预组大鼠软骨组织中 p38 MAPK、NF- $\kappa$ B p65 阳性表达降低 ( $P < 0.05$ ); 与推拿组、陈元膏组相比, 陈元膏摩法组大鼠软骨组织中 p38 MAPK、NF- $\kappa$ B p65 阳性表达显著降低 ( $P < 0.05$ ) (见图 2)。

### 3.6 各组大鼠滑膜组织中 p38 MAPK、NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平比较

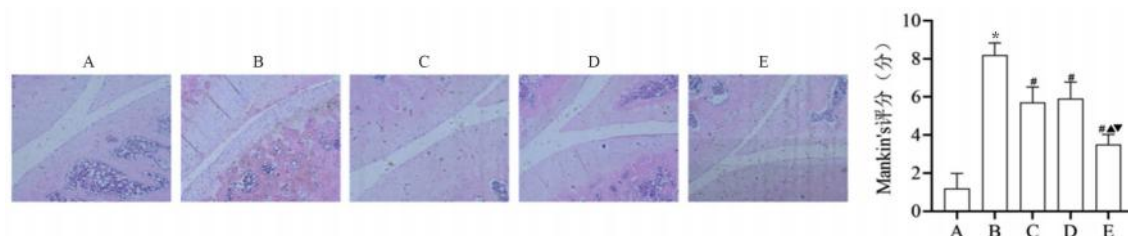
与空白组相比, 模型组大鼠滑膜组织中 p38 MAPK、NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平平均升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 各干预组大鼠滑膜组织中 p38 MAPK、NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平降低 ( $P < 0.05$ ); 与推拿组、陈元膏组相比, 陈元膏摩法组大鼠滑膜组织中 p38 MAPK、NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平降低 ( $P < 0.05$ ) (见图 3)。

## 4 讨论

KOA 作为常见疾病, 临床各种治疗方法均未能完全治愈且其发病机制尚不明确。KOA 在中医中被称为痹症, 主要归属于“骨痹”“痛痹”“痿痹”等范畴。KOA 的发生与多种内外因素有关。

内因包括, 气血亏虚、营卫不和、肝肾亏虚、脾胃虚损等。外因包括, 风寒、湿热、劳损、外伤等。中医治疗方法包括口服中药、针灸、推拿、膏贴等, 旨在调理气血、祛风散寒、活血化瘀、通络止痛, 以缓解患者的不适并提高生活质量<sup>[24]</sup>。陈元膏局部外敷, 能够直接作用于患处, 达到温通经脉、调理气血的目的。而推拿手法作为中医传统疗法, 通过手法刺激局部及特定穴位, 能够促进局部血液循环, 缓解肌肉紧张, 从而改善关节功能。研究发现, 物理刺激内膝眼、犊鼻能够抑制 NF- $\kappa$ B 表达, 减轻炎症反应, 进而改善 KOA 的发生和发展<sup>[25]</sup>; 物理刺激鹤顶穴具有疏通经络的功效, 可以产生显著的止痛效果<sup>[26]</sup>; 物理刺激血海穴能够促进 KOA 大鼠运动功能恢复, 有效改善软骨损伤<sup>[27]</sup>; 《千金要方》记载“梁丘、曲泉、阳关主痉挛, 膝不得屈伸, 不可以行”; 物理刺激阳陵泉穴能够有效抑制炎症反应, 改善 KOA 患者临床症状<sup>[28]</sup>; 物理刺激足三里穴能够减少 TNF- $\alpha$ 、MMP13 含量, 进而改善 KOA 发生和发展<sup>[29]</sup>。故本研究选用内膝眼、鹤顶、犊鼻、血海、梁丘、阳陵泉、足三里来疏通经络气血、促进局部血液循环、减轻关节肿胀并缓解膝关节疼痛和僵硬。

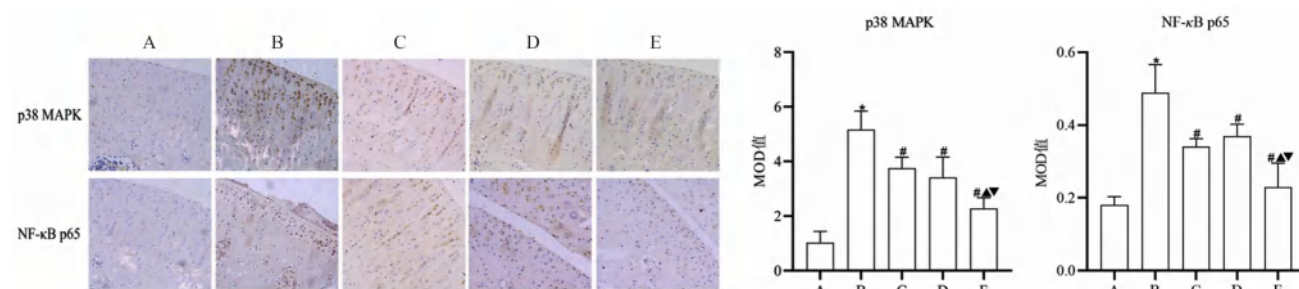
研究表明, KOA 造模大鼠膝关节 Lequesne

图1 各组大鼠软骨组织 HE 染色结果 (HE 染色,  $\times 100$ )Fig 1 HE staining results of rat cartilage tissue in each group (HE staining,  $\times 100$ )

A. 空白组 (blank group); B. 模型组 (model group); C. 推拿组 (massage group); D. 陈元膏组 (Chenyuan ointment group); E. 陈元膏摩法组 (Chenyuan ointment massage group)

注: 与空白组相比,  $^*P < 0.05$ ; 与模型组相比,  $^{\#}P < 0.05$ ; 与推拿组相比,  $^{\Delta}P < 0.05$ ; 与陈元膏组相比,  $^{\nabla}P < 0.05$ 。

Note: Compared with the blank group,  $^*P < 0.05$ ; compared with the model group,  $^{\#}P < 0.05$ ; compared with the massage group,  $^{\Delta}P < 0.05$ ; compared with the Chenyuan ointment group,  $^{\nabla}P < 0.05$ .

图2 各组大鼠软骨组织中 p38 MAPK、NF-κB p65 阳性表达水平 (免疫组化染色,  $\times 200$ )Fig 2 Positive expression levels of p38 MAPK, NF-κB p65 in cartilage tissues of rats in each group (IHC staining,  $\times 200$ )

A. 空白组 (blank group); B. 模型组 (model group); C. 推拿组 (massage group); D. 陈元膏组 (Chenyuan ointment group); E. 陈元膏摩法组 (Chenyuan ointment massage group)

注: 与空白组相比,  $^*P < 0.05$ ; 与模型组相比,  $^{\#}P < 0.05$ ; 与推拿组相比,  $^{\Delta}P < 0.05$ ; 与陈元膏组相比,  $^{\nabla}P < 0.05$ 。

Note: Compared with the blank group,  $^*P < 0.05$ ; compared with the model group,  $^{\#}P < 0.05$ ; compared with the massage group,  $^{\Delta}P < 0.05$ ; compared with the Chenyuan ointment group,  $^{\nabla}P < 0.05$ .

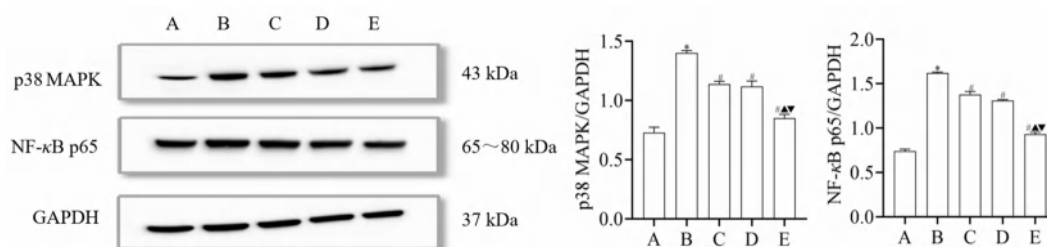


图3 各组大鼠滑膜组织中 p38 MAPK、NF-κB p65 蛋白表达水平

Fig 3 Protein expression levels of p38 MAPK, NF-κB p65 in synovial tissues of rats in each group

A. 空白组 (blank group); B. 模型组 (model group); C. 推拿组 (massage group); D. 陈元膏组 (Chenyuan ointment group); E. 陈元膏摩法组 (Chenyuan ointment massage group)

注: 与空白组相比,  $^*P < 0.05$ ; 与模型组相比,  $^{\#}P < 0.05$ ; 与推拿组相比,  $^{\Delta}P < 0.05$ ; 与陈元膏组相比,  $^{\nabla}P < 0.05$ 。

Note: Compared with the blank group,  $^*P < 0.05$ ; compared with the model group,  $^{\#}P < 0.05$ ; compared with the massage group,  $^{\Delta}P < 0.05$ ; compared with the Chenyuan ointment group,  $^{\nabla}P < 0.05$ .

MG 评分及膝关节直径高于空白组大鼠<sup>[30]</sup>。本实验发现造模后, 大鼠膝关节 Lequesne MG 评分及直径均显著高于空白组, 说明造模成功。干预治疗结束后, 各治疗组大鼠膝关节 Lequesne MG 评分及直径均显著降低、软骨组织表面轻度破坏、略欠光滑, 关节腔间隙稍有狭窄, 细胞略有肥大, Mankin's 评分降低, 且陈元膏摩法作用更

显著, 表明陈元膏摩法能够有效改善膝关节肿胀程度并降低疼痛且其治疗效果优于单一推拿疗法或陈元膏疗法。

已知炎症因子  $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$  以及基质金属蛋白酶 MMP13 与 KOA 的发生发展密切相关。 $\text{TNF-}\alpha$  促进基质金属蛋白酶释放、抑制成骨细胞增殖导致软骨细胞基质降解、关节软骨破坏;



IL-1 $\beta$  可促进基质金属蛋白酶的表达, 并刺激滑膜及软骨细胞产生一氧化氮, 加重炎症反应, 同时 IL-1 $\beta$  能够促进 TNF- $\alpha$  的合成, 进一步加重 KOA 炎性损伤。本研究结果表明, 模型组大鼠血清和关节液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MMP13 表达水平均显著升高, 陈元膏摩法干预后, 各治疗组大鼠血清和关节液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MMP13 表达水平均降低, 其中陈元膏摩法作用更为显著。因此证实陈元膏摩法能够起到一定的抗炎作用, 减轻关节软骨炎性损伤及软骨基质降解, 进而改善 KOA。

目前研究发现, p38 MAPK 信号通路在 KOA 病理过程中可被炎症因子等多种细胞外应激原激活, 进而促进下游因子 NF- $\kappa$ B 以及 MMP13 和相关炎症因子的合成<sup>[31-33]</sup>。在 KOA 病理过程中, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等炎症因子能够使处于失活状态的三聚体复合物分解, 使得 NF- $\kappa$ B 进入细胞核, 导致 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等靶基因的表达<sup>[34-35]</sup>。相关研究已证实被激活的 p38 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路能够促进 MMP13、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的合成导致软骨细胞基质降解、加重炎性损伤。同时 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  也能够激活 p38 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路, 进一步恶化 KOA 病理程度, 形成正反馈循环<sup>[36]</sup>。本研究结果显示, 各治疗组大鼠软骨组织中 p38 MAPK、NF- $\kappa$ B p65 阳性表达均减少, 以陈元膏摩法组作用更为显著; 各治疗组大鼠滑膜组织中 p38 MAPK、NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平均降低, 陈元膏摩法组对目标蛋白抑制效果更为显著, 故推测陈元膏摩法可能通过调控 p38 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路, 有效抑制 p38 MAPK、NF- $\kappa$ B p65 的表达, 进而起到改善 KOA 的作用。

综上所述, 陈元膏摩法可在一定程度上改善软骨组织病理改变, 减轻炎症反应, 延缓软骨基质的降解, 有效阻止 KOA 的发生和发展, 其机制可能与抑制 p38 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路激活, 进而降低 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MMP13 的表达有关。

## 参考文献

- [1] Hall M, van der Esch M, Hinman RS, et al. How does hip osteoarthritis differ from knee osteoarthritis? [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2022, 30 (1): 32-41.
- [2] Zhao XY, Meng FG, Hu S, et al. The synovium attenuates cartilage degeneration in KOA through activation of the Smad2/3-Runx1 cascade and chondrogenesis-related miRNAs [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2020, 10 (22): 832-845.
- [3] Long HB, Liu Q, Yin HY, et al. Prevalence trends of

- site-specific osteoarthritis from 1990 to 2019: findings from the global burden of disease study 2019 [J]. Arthritis Rheumatol, 2022, 74 (7): 1172-1183.
- [4] Lv ZY, Yang YX, Li JW, et al. Molecular classification of knee osteoarthritis [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 27 (9): 725568.
- [5] Wu SY, Lin CH, Chang NJ, et al. Combined effect of laser acupuncture and electroacupuncture in knee osteoarthritis patients: a protocol for a randomized controlled trial [J]. Medicine (Baltimore), 2020, 99 (12): 19541.
- [6] Tang X, Wang SF, Zhan SY, et al. The prevalence of symptomatic knee osteoarthritis in China: results from the China health and retirement longitudinal study [J]. Arthritis Rheumatol, 2016, 68 (3): 648-653.
- [7] Bruyère O, Honvo G, Veronese N, et al. An updated algorithm recommendation for the management of knee osteoarthritis from the European society for clinical and economic aspects of osteoporosis, osteoarthritis and musculoskeletal diseases (ESCEO) [J]. Semin Arthritis Rheum, 2019, 49 (3): 337-350.
- [8] Vitaloni M, Botto-van BA, Sciortino CRM, et al. Global management of patients with knee osteoarthritis begins with quality of life assessment: a systematic review [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2019, 20 (1): 493.
- [9] Kan HS, Chan PK, Chiu KY, et al. Non-surgical treatment of knee osteoarthritis [J]. Hong Kong Med J, 2019, 25 (2): 127-133.
- [10] Cao PH, Li YM, Tang YJ, et al. Pharmacotherapy for knee osteoarthritis: current and emerging therapies [J]. Expert Opin Pharmacother, 2020, 21 (7): 797-809.
- [11] 刘俊昌, 李媛媛, 黄银禧, 等. 陈元膏摩治疗膝骨性关节炎 60 例临床研究 [J]. 吉林中医药, 2013, 33 (6): 623-624.
- [12] 古来撒尔·艾克拜尔, 刘俊昌, 王忆葑, 等. 陈元膏摩法对阳虚寒凝型膝骨性关节炎模型兔关节软骨细胞凋亡、基质金属蛋白酶及血清炎症因子的影响 [J]. 中医杂志, 2022, 63 (22): 2154-2161.
- [13] 刘俊昌, 刘俊瑞, 张超凡, 等. 陈元膏摩对膝骨性关节炎大鼠血清 NO 和 PGE2 及下肢功能的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21 (19): 129-132.
- [14] 马鑫文, 沈明球, 王新军, 等. 陈元膏摩对膝骨性关节炎大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  及软骨基质的影响 [J]. 环球中医药, 2014, 7 (10): 748-751.
- [15] 徐芳, 何江, 陈燕, 等. 维药秋水仙与其误用品新疆贝母的鉴别研究 [J]. 中药材, 2010, 33 (2): 205-207.
- [16] 时超, 谭亮, 孙春生, 等. 基于 p38 MAPK 通路探讨盘龙七片对膝骨关节炎模型大鼠的治疗作用与可能机制 [J]. 中医药信息, 2021, 38 (12): 19-25.
- [17] 陈守中, 郑云生, 王志文, 等. 抗骨增生片对兔膝骨关节炎软骨组织病理形态及 IGF-1, p38 MAPK 表达的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2014, 23 (28): 3093-3095.
- [18] 王春林, 向勇, 田启东, 等. 拔伸松动手法对兔膝关

- 节骨性关节炎早中晚期 p38 MAPK 信号通路及相关因子的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2023, 50 (9): 223-228, 257-260.
- [19] 冯帅华, 吴官保, 文哲, 等. 超微肿痛贴对兔膝关节炎模型的软骨中 JNK/p38 MAPK 信号通路的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42 (1): 31-36.
- [20] 周斌, 时明伟, 周运峰. NF- $\kappa$ B 信号通路在推拿促进膝骨性关节炎软骨修复中的作用 [J]. 光明中医, 2020, 35 (11): 1767-1770.
- [21] Hossain MA, Alam MJ, Kim B, et al. Ginsenoside-Rb1 prevents bone cartilage destruction through down-regulation of p-Akt, p-p38, and p-p65 signaling in rabbit [J]. *Phyto-medicine*, 2022, 100: 154039.
- [22] Hossain MA, Adithan A, Alam MJ, et al. IGF-1 Facilitates cartilage reconstruction by regulating p13K/AKT, MAPK, and NF- $\kappa$ B signaling in rabbit osteoarthritis [J]. *J Inflamm Res*, 2021, 24 (14): 3555-3568.
- [23] Wang KW, Zhang XJ, Li X, et al. Non-weight-bearing exercise attenuates papain-induced knee osteoarthritis in rats via the TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *J Orthop Surg Res*, 2023, 18 (1): 695.
- [24] 黄银僊, 王新军, 刘俊昌. 陈元膏治疗膝骨性关节炎疗效观察 [J]. 国医论坛, 2015, 30 (2): 36-38.
- [25] 章海凤, 潘毅, 陈树涛, 等. 基于 NF- $\kappa$ B 信号通路探讨热敏灸治疗膝骨性关节炎兔模型的效应机制 [J]. 江西中医药, 2017, 48 (12): 48-52.
- [26] 郑佳, 张慧, 刘建武. 不同针灸方法干预鹤顶穴对阳虚寒凝型膝骨关节炎的临床疗效观察 [J]. 中国针灸, 2017, 37 (6): 594-598.
- [27] 朱浩, 颜雪华, 陈帅, 等. 电针调控 miR-335-5p 表达改善膝关节骨关节炎大鼠软骨组织损伤的机制研究 [J]. 针刺研究, 2025, 50 (3): 310-318.
- [28] 王晓涛. 温针灸联合功能训练对膝关节骨性关节炎患者疗效及血清 IL-6 和 IL-18 水平的影响 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2022, 20 (7): 118-120.
- [29] 李明静, 张健强, 郭靖, 等. 艾灸不同腧穴对 KOA 大鼠不同组织 TNF- $\alpha$ 、MMP-13 表达的影响 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2023, 25 (4): 1390-1397.
- [30] 万甜, 肖阳, 石欣悦, 等. 基于 p38 MAPK 信号通路探讨火针治疗膝骨关节炎作用机制 [J]. 中国中医药信息杂志, 2024, 31 (8): 70-75.
- [31] Tu C, Huang XJ, Xiao YF, et al. Schisandrin a inhibits the IL-1 $\beta$ -induced inflammation and cartilage degradation via suppression of MAPK and NF- $\kappa$ B signal pathways in rat chondrocytes [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 29 (1): 41-51.
- [32] Shi GX, Tu JF, Wang TQ, et al. Effect of electroacupuncture (EA) and manual acupuncture (MA) on markers of inflammation in knee osteoarthritis [J]. *J Pain Res*, 2020, 13: 2171-2179.
- [33] Li L, Li ZM, Li YY, et al. Profiling of inflammatory mediators in the synovial fluid related to pain in knee osteoarthritis [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2020, 21 (1): 99.
- [34] Choi MC, Jo J, Park J, et al. NF- $\kappa$ B signaling pathways in osteoarthritic cartilage destruction [J]. *Cells*, 2019, 8 (7): 734.
- [35] Lepetsos P, Papavassiliou KA, Papavassiliou AG. Redox and NF- $\kappa$ B signaling in osteoarthritis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 132 (5): 90-100.
- [36] Svensson CI, Schäfers M, Jones TL, et al. Spinal blockade of TNF blocks spinal nerve ligation-induced increases in spinal p-p38 [J]. *Neurosci Lett*, 2005, 379 (3): 209-213.

(收稿日期: 2025-01-20; 修回日期: 2025-04-10)

# 血府逐瘀汤对胃食管反流病气滞血瘀证模型大鼠的干预效应及对自主神经功能的影响

施妙璇<sup>1</sup>, 张海洋<sup>1</sup>, 韩美奕<sup>1</sup>, 郑薇<sup>1</sup>, 李媛媛<sup>2</sup>, 纪太军<sup>2</sup>, 田明<sup>2\*</sup> (1. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700; 2. 中国中医科学院西苑医院, 北京 100091)

**摘要:** **目的** 观察血府逐瘀汤对胃食管反流病气滞血瘀证大鼠模型的干预效应并探究其可能的机制。**方法** 制备胃食管反流病气滞血瘀证大鼠模型, 应用不同剂量的血府逐瘀汤连续干预 14 d, 观察大鼠一般状态、食管胃连接处 pH 值、食管下段组织病理、气滞血瘀证候宏观表征、血液流变学、凝血四项及反应自主神经功能指标(心率变异性、去甲肾上腺素、胰多肽)。**结果** 与模型组相比, 血府逐瘀汤低、中、高剂量组大鼠的一般状态均有好转, 体重均有增加 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 其中高剂量组食管胃连接处 pH 值升高 ( $P < 0.05$ ), 食管下段组织病理炎症减轻; 血府逐瘀汤低、中、高剂量组气滞血瘀证候宏观表征总积分及纤维蛋白原均降低、凝血酶原时间延长 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 其中高剂量组的全血黏度在低切、中切、高切变率下及血浆黏度均降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 血府逐瘀汤中、高剂量组的低频 (LF) 降低、高频 (HF) 升高, LF/HF 降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 高剂量组去甲肾上腺素水平降低、胰多肽水平升高 ( $P < 0.01$ )。**结论** 血府逐瘀汤可改善胃食管反流病气滞血瘀证大鼠模型的气滞血瘀证候表现, 减少胃食管反流, 缓解食管下段局部炎症, 并可改善其自主神经功能。

**关键词:** 胃食管反流病; 气滞血瘀证; 血府逐瘀汤; 自主神经功能

**中图分类号:** R285

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-2981(2025)06-1635-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.020

## Intervention of Xuefu Zhuyu decoction on rat model of gastroesophageal reflux disease with Qi stagnation and blood stasis and its effect on autonomic function

SHI Miao-xuan<sup>1</sup>, ZHANG Hai-yang<sup>1</sup>, HAN Mei-yi<sup>1</sup>, ZHENG Wei<sup>1</sup>, LI Yuan-yuan<sup>2</sup>, JI Tai-jun<sup>2</sup>, TIAN Ming<sup>2\*</sup> (1. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700; 2. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091)

**Abstract: Objective** To observe the intervention of Xuefu Zhuyu decoction on the rat model of gastroesophageal reflux disease with Qi stagnation and blood stasis and to determine its possible mechanism. **Methods** The rat model of gastroesophageal reflux disease with Qi stagnation and blood stasis was established. Doses of Xuefu Zhuyu decoction were used to continuous intervene for 14 days. The general state of the rats, pH value of the esophagogastric junction, histopathology of the lower esophagus, macroscopic manifestations of Qi stagnation and blood stasis syndrome, hemorheology, coagulation and autonomic nervous function indicators (heart rate variability, noradrenaline, pancreatic polypeptide) were observed. **Results** Compared with the model group, the general state and body weight of rats in Xuefu Zhuyu decoction low, medium and high dose groups were improved ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ); the pH value at the esophagogastric junction in the high dose group was increased ( $P < 0.05$ ); and the histopathologic inflammation of the lower esophagus was reduced. Compared

**基金项目:** 中国中医科学院西苑医院能力提升项目 (No. XYZX0101-20); 陕西省中医药管理局科研课题 (No.2021-ZZ-LC007); 北京市中医药管理局北京中医药“薪火传承 3+3 工程”建设项目 (No.2016-SZ-C-61)。

**作者简介:** 施妙璇, 女, 硕士, 主要从事中西医结合临床诊治普通外科疾病研究, email: 1974731546@qq.com \*通信作者: 田明, 男, 副主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事中西医结合临床诊治普通外科疾病研究, email: tianming\_33@sina.com



with the model group, the total scores of macroscopic manifestation of Qi stagnation and blood stasis syndrome and fibrinogen were decreased and the prothrombin time prolonged in low, medium and high dose Xuefu Zhuyu decoction groups ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The whole blood viscosity and plasma viscosity of the high dose group were decreased under low, medium and high shear rate ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the low-frequency (LF) was decreased, the high-frequency (HF) increased, and LF/HF decreased in the medium and high dose groups of Xuefu Zhuyu decoction ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The noradrenaline level decreased and pancreatic polypeptide level increased in the high dose group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Xuefu Zhuyu decoction can improve the manifestations of Qi stagnation and blood stasis in the rat model of gastroesophageal reflux disease, relieve local inflammation of the lower esophagus, and improve the autonomic nervous function.

**Key words:** gastroesophageal reflux disease; syndrome of Qi stagnation and blood stasis; Xuefu Zhuyu decoction; autonomic nervous function

胃食管反流病 (gastroesophageal reflux disease, GERD) 是指因胃和十二指肠内容物反流至食管导致的一系列症状和/或并发症, 典型症状为反酸和胃灼热等<sup>[1]</sup>。近年来, 我国饮食习惯随着生活水平的提高而不断改变, GERD 的发病率也随之上升, 已高达 12.5%<sup>[2]</sup>。GERD 的发病机制复杂, 目前仍在探索中, 自主神经系统在 GERD 的发病中起到了关键作用。其中, 迷走神经功能障碍会引起食管下括约肌压力降低或松弛<sup>[3]</sup>, 使反流增加。且迷走神经兴奋可加速胃排空, 交感神经抑制可减缓胃排空, 故当交感神经过度兴奋或迷走神经功能降低时反流可能会增加<sup>[4]</sup>。副交感神经功能障碍亦与食管运输延迟相关<sup>[5]</sup>。临床胃食管反流症状与焦虑、抑郁等不良情绪密切相关, 且研究显示, 不良精神心理因素会导致自主神经功能紊乱, 进一步加重 GERD 症状<sup>[6]</sup>。因此, GERD 的病理生理机制与自主神经系统的活动紊乱密切相关。

目前西医诊疗方案以质子泵抑制剂 (PPIs)、促进胃排空药物为主, 长期应用可改善患者症状, 但停药后易复发, 中医药在治疗 GERD、改善症状方面显示出巨大潜力。GERD 的临床表现与中医“吐酸”“吞酸”表现相似, 现代病名为“食管瘿”。其病机总属肝失疏泄、胃气上逆<sup>[7]</sup>。因病情迁延不愈、反复发作, 致情志不畅、肝气郁结, 加之病程较长, 久病成瘀, 属中医辨证中的气滞血瘀证, 治以行气活血、理滞化瘀为法。清代王清任《医林改错》首创血府逐瘀汤, 功在行气活血、祛瘀止痛。血府逐瘀汤在临床治疗 GERD 气滞血瘀证取得较好的临床疗效<sup>[8]</sup>, 但其作用机制尚未完全阐明。

病证结合动物模型是模拟同时具备西医疾病的病理改变与中医证候的临床改变的动物模型, 目前, 国内外主要通过药物刺激和手术制备造模模拟 GERD 动物模型。李雷等<sup>[9]</sup>研究证实采用贲门肌

切开术联合外置幽门缝扎术建立胃酸反流性食管炎成功率最高, 在此基础上加上慢性应急刺激 (包括夹尾刺激、昼夜颠倒、噪声刺激法) 可以成功建立 GERD 气滞血瘀证模型。本研究拟通过建立 GERD 气滞血瘀证大鼠模型, 观察血府逐瘀汤对 GERD 气滞血瘀证大鼠模型的干预效应并探究其可能机制。

## 1 材料

### 1.1 试剂

异氟烷 (批号: R510-22-10, 深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司); 注射用青霉素钠 (160 万单位) (上海源叶生物技术有限公司); 多聚甲醛 (批号: SL1830, Coolaber 公司); 苏木精-伊红 (HE) 试剂盒 (批号: G1120-3, Solarbio 公司); 凝血四项测定试剂盒 (上海太阳生物技术有限公司); 大鼠胰多肽 (PP) ELISA 试剂盒、大鼠甲肾上腺素 (NE) ELISA 试剂盒 (武汉博士德有限公司)。

### 1.2 仪器

酶标仪 (Bio TeK 公司); 台式离心机 (Eppendorf 公司); 光学显微镜 (Germany ZEISS 公司); 恒温组织包埋仪 (德国 LEICA 公司); RM6240E 多道生理信号采集处理系统 E2.6 版、ABS 小动物麻醉机 (上海玉研科学仪器有限公司); 全自动清洗血流变仪 (北京普利生仪器有限公司); 普朗 PUN-208A 血凝分析仪 (普朗医疗); Orion 便携式 pH 检测仪 (荷兰 MMS 公司)。

### 1.3 实验动物

选用 6 周龄雄性 SPF 级 SD 大鼠 35 只, 体重 ( $180 \pm 20$ ) g [北京维通利华实验动物技术有限公司, 生产许可证号: SCXK (京) 2021-0006], 委托北京中医药大学动物实验中心饲养, 饲养条件为自由进食饮水, 室温 ( $25 \pm 2$ ) °C, 相对湿度 ( $50 \pm 5$ ) %, 昼夜循环 12 h/12 h。本研究经北京中医药大学医学伦理委员会批准 (伦理审批号: BUCM-2024-CS0113)。

2 方法

2.1 分组及造模

大鼠适应性喂养 7 d 后,应用随机数字表法随机分为对照组 6 只,手术造模组 29 只。采取贲门括约肌纵向切开+幽门半结扎+14 d 慢性不可预期应激刺激(包括日夜颠倒、夹尾刺激、噪声刺激)的方法制作 GERD 气滞血瘀证大鼠模型。先对手术造模组大鼠进行贲门括约肌纵向切开+幽门半结扎,术中应用 40 万单位青霉素 0.1 mL 及生理盐水浸润腹腔预防感染及组织粘连,术后 7 d 若大鼠存活,且饮食、活动正常,则 GERD 大鼠模型制备完成,再次应用随机数字表法将造模组大鼠随机分组为模型组及血府逐瘀汤低、中、高剂量组,并对 4 组大鼠进行 14 d 慢性不可预期应激刺激(包括日夜颠倒、夹尾刺激、噪声刺激),制备 GERD 气滞血瘀证大鼠模型。对照组(假手术组)仅将胃提出,应用 4-0 的丝线结扎胃左动脉后将胃放回腹腔,不予贲门括约肌纵向切开及幽门半结扎,余手术操作同模型组。

2.2 给药干预

《医林改错》中血府逐瘀汤原方剂量为:桃仁 12 g、红花 9 g、当归 9 g、生地 9 g、牛膝 9 g、枳壳 6 g、赤芍 6 g、桔梗 4.5 g、川芎 4.5 g、柴胡 3 g、甘草 6 g。上述中药饮片换算为中药颗粒剂,并结合大鼠体重计算可知大鼠每日生药用量约为 2.8 g,使用时用蒸馏水配制成相应浓度混悬液。术后 7 d,即从开始进行慢性应激刺激后连续给药 14 d,对照组及模型组每次给予蒸馏水 2 mL 灌胃,每日 2 次;血府逐瘀汤低、中、高剂量组每日分别给予生药量 1.4、2.8、5.6 g 的中药颗粒,均溶于 4 mL 蒸馏水,每次 2 mL,每日 2 次。

2.3 观察指标及评价标准

① 大鼠一般情况:观察药物干预前后大鼠的精神状态(有无倦怠淡漠、精神萎靡)、行为活动(各笼中大鼠有无互相撕咬、攻击)、对外界刺激敏感度、毛发颜色、饮食饮水及生长情况(体重增长情况)。② 大鼠气滞血瘀证候宏观表征变化积分:观察药物干预后大鼠气滞血瘀证候宏观表征变化并进行评分,评分标准见表 1。③ 血液流变学检测:应用全自动清洗血流变仪测定全血黏度(低切  $10\text{ s}^{-1}$ ,中切  $60\text{ s}^{-1}$ ,高切  $150\text{ s}^{-1}$ )及血浆黏度( $120\text{ s}^{-1}$ )。④ 凝血四项检测:应用血凝仪对血浆样本中的凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)、纤维蛋白原(FIB)和活化部分凝血活酶时间(APTT)进行测定。⑤ 食管胃连接处 pH 值监测:应用便携式 pH 检测仪测定食管胃连接处上 1 cm 处 pH 值,稳定后进行记录。⑥ 观察食管下段组织病理学改变:处死大鼠后从贲门上 0.5 cm 处向上截取约 1 cm 长的食管,进行固定、

脱水、包埋、切片和 HE 染色处理,光学显微镜观察食管下段组织病理学改变。⑦ 心率变异性(HRV)检测:在大鼠清醒状态下采集心电图,预先将导线埋入大鼠的右上肢及双下肢皮下部位,从背部引出导线,将大鼠固定后依次按照右前肢红色、左后肢绿色、右后肢黑色的方式连接肢体导联,接入多导生理信号采集处理系统,待心电信号稳定后,记录标准 II 导联心电图并分析 HRV 的频域指标:低频(LF)、高频(HF)和 LF/HF,每只大鼠测量 15 min,每 5 min 分析 1 次,统计平均值。⑧ 外周血去甲肾上腺素(NE)、胰多肽(PP)水平检测:腹主动脉取血,静置 1 h 后以  $3500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心后吸取血清,置于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用,采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测标本中 PP 和 NE 浓度。

表 1 大鼠气滞血瘀证候积分评价量表  
Tab 1 Rat Qistagnation and blood stasis syndrome integral evaluation scale

| 证候项目 | 评分标准                     | 评分 / 分 |
|------|--------------------------|--------|
| 精神状态 | 正常:活动迅速,眼光有神             | 0      |
|      | 轻度异常:精神疲倦、懒动,减少自发活动      | 1      |
|      | 明显异常:逃避,明显减少攻击行为         | 2      |
|      | 无明显变化                    | 0      |
| 呼吸   | 增加                       | 1      |
|      | 减少                       | 2      |
| 眼睛   | 红亮有神                     | 0      |
|      | 黯淡无神                     | 1      |
| 舌    | 正常:舌静脉主干长度不超过 3/4、舌底色微青  | 0      |
|      | 轻度紫暗:舌静脉主干长度超过 3/4、舌底色紫暗 | 1      |
| 耳    | 无瘀点,血管数量适中               | 0      |
|      | 有 1~2 个瘀点,血管数量略有增加       | 1      |
| 毛    | 白色,均匀细密,柔顺               | 0      |
|      | 白中少有黄色,稍乱,干燥             | 1      |
| 粪便   | 正常:大便成形,粪质柔软             | 0      |
|      | 轻度异常:粪便稀溏,部分不成形          | 1      |
|      | 明显异常:粪便稀溏,完全不成形          | 2      |

2.4 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件对实验数据进行统计分析,数据为计量资料且符合正态分布,用均值  $\pm$  标准差( $\bar{x}\pm s$ )描述,多组间比较采用单因素方差分析或重复测量方差分析,各组间两两比较采用 LSD 检验。两组间比较采用独立样本  $t$  检验。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠造模后存活情况及一般状态

造模后模型大鼠死亡 7 只,余大鼠均存活,精神状态可,最终以对照组 6 只,模型组 6 只,血府逐瘀汤低剂量组 5 只、中剂量组 6 只、高剂量组 5 只进行检测统计。

造模前各组大鼠状态均良好,饮食水正常,



大便正常，活泼好动，反应灵敏，毛发色白有光泽。造模及血府逐瘀汤干预结束后，模型组大鼠精神状态差，萎靡不振，饮食水量明显减少，大便稀软不成形，量多，蜷缩少动，反应迟钝，毛发干枯毛躁无光泽；血府逐瘀汤低、中、高剂量组大鼠与模型组大鼠相比，精神状态均有好转，饮食水量增多，大便成形，反应活跃，毛发顺畅。

3.2 大鼠体重及食量变化

观察各组大鼠在不同时间点体重变化情况，结果随着时间的变化，各组大鼠体重逐渐增长。

术后 1 周（慢性应激刺激前），各组大鼠体重差异无统计学意义，具有可比性。与对照组相比，术后 2 周（慢性应激刺激及血府逐瘀汤灌胃 7 d 后）以及术后 3 周（慢性应激刺激及血府逐瘀汤灌胃 14 d 后），模型组大鼠体重均显著降低。与模型组相比，术后 2 周（慢性应激刺激及血府逐瘀汤灌胃 7 d 后），血府逐瘀汤低、中、高剂量组大鼠体重均有升高，但差异无统计学意义；术后 3 周（慢性应激刺激及血府逐瘀汤灌胃 14 d 后），血府逐瘀汤低、中、高剂量组大鼠体重均显著升高（见表 2）。

表 2 不同时间点大鼠体重变化 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Tab 2 Weight changes of rats at different time points ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别        | n | 术后 1 周 /g      | 术后 2 周 /g        | 术后 3 周 /g                    |
|-----------|---|----------------|------------------|------------------------------|
| 对照组       | 6 | 296.17 ± 14.34 | 364.17 ± 12.92   | 429.67 ± 23.73               |
| 模型组       | 6 | 281.33 ± 17.03 | 298.50 ± 13.66** | 312.00 ± 14.30**             |
| 血府逐瘀汤低剂量组 | 5 | 284.60 ± 14.57 | 311.40 ± 24.70   | 343.40 ± 21.20 <sup>△</sup>  |
| 血府逐瘀汤中剂量组 | 6 | 281.33 ± 17.03 | 316.83 ± 15.20   | 358.33 ± 8.91 <sup>△△</sup>  |
| 血府逐瘀汤高剂量组 | 5 | 283.80 ± 13.59 | 318.00 ± 16.66   | 359.40 ± 21.05 <sup>△△</sup> |

注：与对照组相比，\*\* $P < 0.01$ ；与模型组相比，<sup>△</sup> $P < 0.05$ ，<sup>△△</sup> $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, \*\* $P < 0.01$ ; compared with the model group, <sup>△</sup> $P < 0.05$ , <sup>△△</sup> $P < 0.01$ .

3.3 大鼠气滞血瘀证候宏观表征变化积分

与对照组相比，模型组大鼠证候积分显著升高；与模型组相比，血府逐瘀汤低、中、高剂量组大鼠证候积分均显著降低（见表 3）。

表 3 大鼠证候变化总积分 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Tab 3 Total score of syndrome change of rats ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别        | n | 证候积分 / 分                  |
|-----------|---|---------------------------|
| 对照组       | 6 | 0.33 ± 0.52               |
| 模型组       | 6 | 5.67 ± 1.21**             |
| 血府逐瘀汤低剂量组 | 5 | 4.20 ± 1.30 <sup>△</sup>  |
| 血府逐瘀汤中剂量组 | 6 | 3.67 ± 0.82 <sup>△△</sup> |
| 血府逐瘀汤高剂量组 | 5 | 2.80 ± 0.84 <sup>△△</sup> |

注：与对照组相比，\*\* $P < 0.01$ ；与模型组相比，<sup>△</sup> $P < 0.05$ ，<sup>△△</sup> $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, \*\* $P < 0.01$ ; compared with the model group, <sup>△</sup> $P < 0.05$ , <sup>△△</sup> $P < 0.01$ .

3.4 大鼠血液流变学分析

与对照组大鼠相比，模型组大鼠的全血黏度在低切、中切、高切变率下以及血浆黏度显著升高。与模型组大鼠相比，血府逐瘀汤中剂量组大鼠的全血黏度在中切、高切变率下显著降低；血府逐瘀汤高剂量组大鼠的全血黏度在低切、中切、高切变率下及血浆黏度均显著降低（见表 4）。

3.5 大鼠凝血四项分析

与对照组大鼠相比较，模型组大鼠的 FIB 增多、PT 缩短；与模型组大鼠相比，血府逐瘀汤低、中、高剂量组大鼠的 FIB 减少、PT 延长（见表 5）。

3.6 大鼠食管胃连接处 pH 值检测

与对照组大鼠相比，模型组大鼠食管胃连接处 pH 值显著降低；与模型组大鼠相比，血府逐瘀汤高剂量组大鼠食管胃连接处 pH 值升高（见表 6）。

3.7 大鼠食管下段组织病理学改变

对照组大鼠食管组织细胞排列整齐，层次清晰；模型组大鼠乳头延伸明显，棘细胞明显增多，可见大量炎性细胞浸润；血府逐瘀汤低剂量组大鼠食管黏膜基底层稍弯曲，棘细胞减少；血府逐瘀汤中剂量组大鼠食管组织基底层平坦，棘细胞明显减少，可见少量炎性细胞浸润；血府逐瘀汤高剂量组大鼠黏膜仅可见少量散在炎性细胞（见图 1）。

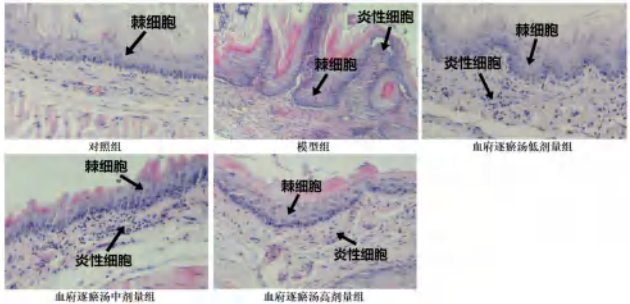


图 1 光镜下食管下段组织病理学改变（HE，×100）

Fig 1 Histopathological changes of lower esophagus under light microscope (HE, ×100)

3.8 大鼠 HRV 分析

与对照组相比，模型组大鼠的 LF、LF/HF 升高，HF 降低；与模型组相比，血府逐瘀汤中、高剂量组大鼠的 LF、LF/HF 降低，HF 升高（见表 7）。

3.9 大鼠外周血 NE、PP 水平检测



表 4 大鼠血液流变学指标变化 ( $\bar{x}\pm s$ )  
Tab 4 Changes of hemorheology indexes in rats ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别        | n | 全血黏度 / ( mPa · s )       |                          |                           | 血浆黏度 (120 s <sup>-1</sup> ) / ( mPa · s ) |
|-----------|---|--------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------------------------|
|           |   | 低切 (10 s <sup>-1</sup> ) | 中切 (60 s <sup>-1</sup> ) | 高切 (150 s <sup>-1</sup> ) |                                           |
| 对照组       | 6 | 8.63±1.45                | 6.04±0.78                | 4.13±1.15                 | 1.41±0.32                                 |
| 模型组       | 6 | 11.27±1.25 <sup>*</sup>  | 8.46±1.24 <sup>**</sup>  | 6.16±1.11 <sup>**</sup>   | 2.33±0.39 <sup>**</sup>                   |
| 血府逐瘀汤低剂量组 | 5 | 10.22±1.09               | 7.41±0.50                | 5.56±0.51                 | 2.16±0.44                                 |
| 血府逐瘀汤中剂量组 | 6 | 9.86±2.24                | 6.29±0.77 <sup>△△</sup>  | 4.60±0.74 <sup>△△</sup>   | 2.00±0.52                                 |
| 血府逐瘀汤高剂量组 | 5 | 9.03±2.40 <sup>△</sup>   | 5.63±0.63 <sup>△△</sup>  | 3.95±1.00 <sup>△△</sup>   | 1.66±0.45 <sup>△</sup>                    |

注：与对照组相比，<sup>\*</sup>*P* < 0.05，<sup>\*\*</sup>*P* < 0.01；与模型组相比，<sup>△</sup>*P* < 0.05，<sup>△△</sup>*P* < 0.01。

Note: Compared with the control group, <sup>\*</sup>*P* < 0.05, <sup>\*\*</sup>*P* < 0.01; compared with the model group, <sup>△</sup>*P* < 0.05, <sup>△△</sup>*P* < 0.01.

表 5 大鼠凝血四项变化 ( $\bar{x}\pm s$ )  
Tab 5 Changes of four blood coagulation in rats ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别        | n | FIB/ ( mg · dL <sup>-1</sup> ) | APTT/s     | TT/s       | PT/s                     |
|-----------|---|--------------------------------|------------|------------|--------------------------|
| 对照组       | 6 | 182.17±16.51                   | 17.66±0.81 | 40.04±1.51 | 16.15±0.96               |
| 模型组       | 6 | 250.49±17.29 <sup>**</sup>     | 17.80±1.02 | 39.10±1.68 | 14.23±0.79 <sup>**</sup> |
| 血府逐瘀汤低剂量组 | 5 | 227.62±16.83 <sup>△</sup>      | 17.77±1.14 | 39.19±1.53 | 15.60±0.74 <sup>△</sup>  |
| 血府逐瘀汤中剂量组 | 6 | 207.30±17.96 <sup>△△</sup>     | 17.51±1.04 | 39.53±1.70 | 15.43±1.03 <sup>△</sup>  |
| 血府逐瘀汤高剂量组 | 5 | 203.78±11.66 <sup>△△</sup>     | 17.44±0.72 | 39.33±3.52 | 15.90±1.24 <sup>△△</sup> |

注：与对照组相比，<sup>\*\*</sup>*P* < 0.01；与模型组相比，<sup>△</sup>*P* < 0.05，<sup>△△</sup>*P* < 0.01。

Note: Compared with the control group, <sup>\*\*</sup>*P* < 0.01; compared with the model group, <sup>△</sup>*P* < 0.05, <sup>△△</sup>*P* < 0.01.

表 6 大鼠食管胃连接处 pH 值变化 ( $\bar{x}\pm s$ )  
Tab 6 pH value at esophagogastric junction in rats ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别        | n | pH 值                    |
|-----------|---|-------------------------|
| 对照组       | 6 | 6.17±0.63               |
| 模型组       | 6 | 3.17±0.61 <sup>**</sup> |
| 血府逐瘀汤低剂量组 | 5 | 3.80±0.57               |
| 血府逐瘀汤中剂量组 | 6 | 3.92±0.38               |
| 血府逐瘀汤高剂量组 | 5 | 4.20±0.91 <sup>△</sup>  |

注：与对照组相比，<sup>\*\*</sup>*P* < 0.01；与模型组相比，<sup>△</sup>*P* < 0.05。

Note: Compared with the control group, <sup>\*\*</sup>*P* < 0.01; compared with the model group, <sup>△</sup>*P* < 0.05.

表 7 大鼠 HRV 变化 ( $\bar{x}\pm s$ )  
Tab 7 Changes of heart rate variability in rats ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别        | n | LF/ms <sup>2</sup>      | HF/ms <sup>2</sup>      | LF/HF                   |
|-----------|---|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 对照组       | 6 | 0.83±0.09               | 0.41±0.17               | 3.08±2.54               |
| 模型组       | 6 | 1.10±0.24 <sup>**</sup> | 0.23±0.06 <sup>**</sup> | 5.36±0.90 <sup>**</sup> |
| 血府逐瘀汤低剂量组 | 5 | 1.04±0.06               | 0.28±0.05               | 4.00±0.83               |
| 血府逐瘀汤中剂量组 | 6 | 0.91±0.10 <sup>△</sup>  | 0.35±0.07 <sup>△</sup>  | 3.01±0.58 <sup>△△</sup> |
| 血府逐瘀汤高剂量组 | 5 | 0.89±0.12 <sup>△</sup>  | 0.37±0.04 <sup>△</sup>  | 3.08±0.73 <sup>△</sup>  |

注：与对照组相比，<sup>\*\*</sup>*P* < 0.01；与模型组相比，<sup>△</sup>*P* < 0.05，<sup>△△</sup>*P* < 0.01。

Note: Compared with the control group, <sup>\*\*</sup>*P* < 0.01; compared with the model group, <sup>△</sup>*P* < 0.05, <sup>△△</sup>*P* < 0.01.

与对照组相比，模型组大鼠的 NE 水平显著升高、PP 水平显著降低；与模型组大鼠比较，血府逐瘀汤中剂量组大鼠的 NE 水平降低，血府逐瘀汤高剂量组大鼠的 NE 水平显著降低、PP 水平显著升高（见表 8）。

表 8 大鼠外周血 NE、PP 水平变化 ( $\bar{x}\pm s$ )

Tab 8 Changes of NE and PP levels in peripheral blood of rats ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别        | n | NE/ ( ng · mL <sup>-1</sup> ) | PP/ ( ng · mL <sup>-1</sup> ) |
|-----------|---|-------------------------------|-------------------------------|
| 对照组       | 6 | 5.67±0.84                     | 1.39±0.14                     |
| 模型组       | 6 | 8.59±1.14 <sup>**</sup>       | 0.81±0.19 <sup>**</sup>       |
| 血府逐瘀汤低剂量组 | 5 | 7.47±0.82                     | 1.04±0.30                     |
| 血府逐瘀汤中剂量组 | 6 | 7.38±1.20 <sup>△</sup>        | 1.00±0.21                     |
| 血府逐瘀汤高剂量组 | 5 | 6.70±0.31 <sup>△△</sup>       | 1.17±0.19 <sup>△△</sup>       |

注：与对照组相比，<sup>\*\*</sup>*P* < 0.01；与模型组相比，<sup>△</sup>*P* < 0.05，<sup>△△</sup>*P* < 0.01。

Note: Compared with the control group, <sup>\*\*</sup>*P* < 0.01; compared with the model group, <sup>△</sup>*P* < 0.05, <sup>△△</sup>*P* < 0.01.

## 4 讨论

临床上缺乏根治 GERD 的方法，多长期应用 PPIs 抑制胃酸分泌或促进胃排空的药物改善临床症状。PPIs 通过抑制胃酸分泌调节食管胃连接处 pH 值，是重度食管炎患者（洛杉矶分级 D 级）的一线药物<sup>[7]</sup>。但长期使用 PPIs 可能会导致骨质疏松、低镁血症、肠道感染、胃黏膜病变等<sup>[10]</sup>，且停药后易复发。中医药在治疗 GERD 及改善临床症状上具有优势。GERD 属中医“吐酸”“吞酸”范畴，其核心病机可归纳为“逆、郁、热”。临床中许多 GERD 的患者病情迁延反复，病久失治，气郁日久致瘀血内结，临床表现常伴胸满不适，情绪焦躁不安等自主神经功能紊乱症状。血府逐瘀汤为治疗气滞血瘀证的代表方，原方本意即治疗胸中血瘀，苏林<sup>[11]</sup>也在研究中发现临床应用血府逐瘀汤治疗以血瘀为特征的难治性 GERD 具有良好疗效。故应用血府逐

瘀汤可治疗 GERD 气滞血瘀证,同时改善气滞血瘀证患者自主神经功能,但其机制暂未明确。

#### 4.1 血府逐瘀汤可改善大鼠气滞血瘀的证候

大鼠的气滞血瘀证候的宏观表征变化积分、血液流变学以及凝血功能可共同反映大鼠气滞血瘀证候表现的变化。本研究显示血府逐瘀汤可有效改善 GERD 气滞血瘀证大鼠模型的气滞血瘀证候表现,且治疗效果具有差异性,其中高剂量组治疗效果最好。

#### 4.2 血府逐瘀汤可改善大鼠 GERD 的症状及表现

GERD 气滞血瘀证模型大鼠的一般状态、食管胃连接处 pH 值、食管下段病理组织炎症表现,共同反映了大鼠 GERD 的症状及表现。本研究表明血府逐瘀汤可在一定程度上提高食管胃连接处 pH,改善食管黏膜组织炎症,使 GERD 的反流减少,炎症及一般症状得到改善,且治疗效果存在剂量依赖关系,其中高剂量组治疗效果最好。

#### 4.3 血府逐瘀汤可改善大鼠自主神经功能

临床中 GERD 患者常伴有焦虑、抑郁等气滞表现,易导致自主神经功能紊乱。有研究提示应用抑酸药物与改善自主神经功能作用的药物联合治疗难治性 GERD,在改善临床症状、促进黏膜愈合方面均优于仅使用抑酸药物<sup>[12]</sup>。一项关于证候对冠心病患者自主神经功能影响的案例探究显示,不同中医证候的冠心病患者的 HRV 表现各不相同<sup>[13-14]</sup>。HRV 反映了胃肠道的交感和副交感神经活动变化<sup>[15]</sup>,其中 HF 水平反映迷走神经的活力,LF 水平反映交感神经和迷走神经共同的活力,LF/HF 水平反映两者的平衡状态。NE、PP 则用以观察自主神经的外周功能,NE 是一种由交感神经节后纤维释放的神经递质,其活性与交感神经的功能紧密相关<sup>[16]</sup>,PP 是一种由迷走神经刺激胰岛细胞分泌的物质,迷走神经的激活可显著增加 PP 的分泌<sup>[17]</sup>。因此 HRV 与 NE、PP 可共同评价血府逐瘀汤对 GERD 气滞血瘀证模型大鼠自主神经功能的治疗作用。本实验结果显示应用血府逐瘀汤通过降低胃食管反流气滞血瘀证模型大鼠的交感神经兴奋性、提高副交感神经兴奋性,改善自主神经功能紊乱,其中血府逐瘀汤高剂量组治疗效果最好。

综上所述,血府逐瘀汤可改善 GERD 气滞血瘀证大鼠模型的一般状态及气滞血瘀证候表现,减少胃食管反流,缓解食管下段局部炎症,并改善自主神经功能,对治疗气滞血瘀型 GERD 有效,其机制可能与自主神经功能相关。

### 参考文献

[1] Li Q, Duan H, Wang Q, et al. Analyzing the correlation

between gastroesophageal reflux disease and anxiety and depression based on ordered logistic regression [J]. *Sci Rep*, 2024, 14 (1): 6594.

[2] 乔刚,赵宏志.反流性食管炎临床研究进展[J].*中国中西医结合外科杂志*,2020,26(4):787-789.

[3] De Giorgi F, Palmiero M, Esposito I, et al. Pathophysiology of gastro-oesophageal reflux disease [J]. *Acta Otorhinolaryngol Ital*, 2006, 26 (5): 241.

[4] Penagini R, Bravi I. The role of delayed gastric emptying and impaired oesophageal body motility [J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2010, 24 (6): 831-845.

[5] Cunningham KM, Horowitz M, Riddell PS, et al. Relations among autonomic nerve dysfunction, oesophageal motility, and gastric emptying in gastro-oesophageal reflux disease [J]. *Gut*, 1991, 32 (12): 1436-1440.

[6] 袁媛,肖茹萍,陈阳,等.胃食管反流病与精神心理、自主神经功能关系的研究进展[J].*世界华人消化杂志*,2015(8):1247-1251.

[7] Kroch DA, Madanick RD. Medical treatment of gastroesophageal reflux disease [J]. *World J Surg*, 2017, 41: 1678-1684.

[8] 陈思鼎,张海洋,侯军辉,等.血府逐瘀汤治疗胃食管反流病气滞血瘀证的临床疗效及其对自主神经功能的影响[J].*中华中医药杂志*,2023,38(11):5621-5624.

[9] 李雷,唐艳萍.大鼠酸相关 RE 气滞血瘀型病证结合模型的建立与中药干预[C]//中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会.第三十届全国中西医结合消化系统疾病学术会议论文集.天津市南开医院消化内科.2018:3.

[10] 李文喆,袁菲,刘桂萍,等.长期使用质子泵抑制剂的安全风险研究进展[J].*医学综述*,2019,25(20):4113-4116,4121.

[11] 苏林.血府逐瘀汤加减治疗难治性反流性食管炎 37 例[J].*光明中医*,2011,26(12):2477.

[12] 李爽,李书,刘倩,等.埃索美拉唑联合氟哌噻吨美利曲辛片治疗难治性胃食管反流病的临床研究[J].*中南药学*,2019,17(6):952-955.

[13] 翟军鹏,张大伟,李方洁.证候与年龄对冠心病患者自主神经功能的影响[J].*世界中医药*,2019,14(8):2213-2216.

[14] 尹承娥,张宁宁,吕芳芳,等.冠心病心绞痛气滞血瘀气虚血瘀患者与心率变异性分析的相关性研究[J].*四川中医*,2003,21(7):15-16.

[15] Taralov ZZ, Terziyski KV, Kostianev SS. Heart rate variability as a method for assessment of the autonomic nervous system and the adaptations to different physiological and pathological conditions [J]. *Folia Med (Plovdiv)*, 2015, 57 (3/4): 173.

[16] 周绪柳,王华,李佳,等.“标本配穴”针灸对腹泻型肠易激综合征大鼠自主神经功能及相关因子的影响[J].*针刺研究*,2023,48(7):635-642.

[17] Huang Z, Li S, Foreman RD, et al. Sacral nerve stimulation with appropriate parameters improves constipation in rats by enhancing colon motility mediated via the autonomic-cholinergic mechanisms [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2019, 317 (5): G609-G617.

(收稿日期:2024-12-31;修回日期:2025-02-15)

# 淫羊藿苷对 BaP 所致 HepG2 细胞脂质代谢紊乱的保护作用

汪涵<sup>1</sup>, 张梦迪<sup>1</sup>, 白图雅<sup>1, 2</sup>, 吕晓丽<sup>1</sup>, 胡玉霞<sup>2</sup>, 常福厚<sup>1, 2</sup>, 包保全<sup>1\*</sup> (1. 内蒙古医科大学药学院, 呼和浩特 010110; 2. 内蒙古自治区新药筛选工程研究中心, 呼和浩特 010110)

**摘要:** **目的** 探讨淫羊藿苷 (ICA) 对苯并芘 (BaP) 诱导的 HepG2 细胞脂质代谢紊乱的保护作用。**方法** 将 HepG2 细胞以  $6 \times 10^4$  个/孔接种于 6 孔板中, 分为 5 组: 空白对照组, 模型组 ( $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  BaP) 及 ICA 低剂量组 ( $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、中剂量组 ( $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和高剂量组 ( $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。试剂盒检测脂质代谢相关生化指标总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、低密度脂蛋白 (LDL) 和高密度脂蛋白 (HDL) 水平; 采用 Western blot 法检测各组细胞中胆固醇合成相关蛋白羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶 (HMGCR)、胆固醇调节元件结合蛋白 2 (SREBP2)、肝 X 受体  $\alpha$  (LXR $\alpha$ ) 的表达以及  $\beta$ -氧化相关蛋白过氧化物酶体增殖物激活受体  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ )、肉碱棕榈酰转移酶 1A (CPT1A)、过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  辅助激活因子 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) 的表达, 并使用油红 O 染色法检测 HepG2 细胞中的脂质堆积程度。**结果** BaP 能够显著升高 HepG2 细胞中 TC、TG 和 LDL 的含量 ( $P < 0.01$ ), 同时降低 HDL 的含量 ( $P < 0.001$ ); 而给予中、高剂量 ICA 后, 细胞中 TC、TG 和 LDL 的含量显著下降 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), HDL 的含量显著升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); Western blot 结果显示, 与空白对照组相比, 模型组 HepG2 细胞中胆固醇合成相关的 HMGCR、SREBP2 和 LXR $\alpha$  蛋白表达显著升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 而  $\beta$ -氧化相关的 PPAR $\alpha$ 、CPT1A 和 PGC-1 $\alpha$  蛋白表达显著降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ); 与模型组相比, ICA 高剂量组中胆固醇合成相关蛋白表达显著降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ), 而  $\beta$ -氧化相关蛋白表达显著升高 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )。油红 O 染色显示, ICA 高剂量组的脂质含量较模型组显著减少 ( $P < 0.01$ )。**结论** ICA 能够改善 BaP 引起的 HepG2 细胞脂质代谢紊乱。**关键词:** 淫羊藿苷; 苯并芘; 胆固醇合成;  $\beta$ -氧化; 脂质代谢紊乱

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)06-1641-05  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.021

## Protective effect of icariin on benzo[a]pyrene-induced lipid metabolism disorders in HepG2 cells

WANG Han<sup>1</sup>, ZHANG Meng-di<sup>1</sup>, BAI Tu-ya<sup>1, 2</sup>, LYU Xiao-li<sup>1</sup>, HU Yu-xia<sup>2</sup>, CHANG Fu-hou<sup>1, 2</sup>, BAO Bao-quan<sup>1\*</sup> (1. College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110; 2. Inner Mongolia Autonomous Region New Drug Screening Engineering Research Centre, Hohhot 010110)

**Abstract: Objective** To determine the protective effects of icariin (ICA) on benzo[a]pyrene-induced lipid metabolism disorders in HepG2 cells. **Methods** HepG2 cells were inoculated in 6-well plates at a density of  $6 \times 10^4$  cells/well, and were divided into a control group, a model group ( $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  BaP), an ICA low-dose group ( $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), an ICA medium-dose group ( $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), and an ICA high-dose group ( $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ). The kit was used to detect the biochemical markers related to lipid metabolism, including total cholesterol (TC), triglycerides (TG), low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL). Western blot was used to detect the protein expression of cholesterol synthesis-related markers, including hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (HMGCR), sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2), and liver X receptor  $\alpha$  (LXR $\alpha$ ), as well as  $\beta$ -oxidation-related markers, including peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ), carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1A),

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (No.82260733); 内蒙古自治区自然科学基金青年基金项目 (No.2023QN08016); 内蒙古医科大学科技百万工程项目 (No.YKD2020KJBWO20); 中央引导地方科技发展资金项目 (No.2022ZY0222)。

**作者简介:** 汪涵, 男, 硕士, 主要从事生化与分子药理学研究, email: wh1083152586@163.com \*通信作者: 包保全, 男, 教授, 主要从事药理学研究, email: 2417776505@qq.com



and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 $\alpha$ ). Additionally, oil red O staining was used to assess the degree of lipid accumulation in HepG2 cells. **Results** BaP elevated the levels of TC, TG and LDL in HepG2 cells ( $P < 0.01$ ), while decreased the HDL level ( $P < 0.001$ ); ICA medium dose and high-dose decreased the levels of TC, TG, and LDL in the cells ( $P < 0.05$ ), and increased the levels of HDL ( $P < 0.01$ ). Western blot showed that compared with the control group, the expression of cholesterol synthesis-related proteins HMGCR, SREBP2 and LXR $\alpha$  was increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), while the expression of  $\beta$ -oxidation-related proteins PPAR $\alpha$ , CPT1A and PGC-1 $\alpha$  was decreased in the model group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ). Compared with the model group, the ICA high-dose group showed reduced expression of cholesterol synthesis-related proteins ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ) and increased expression of  $\beta$ -oxidation-related proteins ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ). Oil red O staining indicated that lipid content was much lower in the ICA high-dose group than in the model group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** ICA can improve BaP-induced lipid metabolism disorders in HepG2 cells.

**Key words:** icariin; benzo[a]pyrene; cholesterol synthesis;  $\beta$ -oxidation; disordered lipid metabolism

肝脏作为人体最大的代谢器官,在脂质代谢中起着关键作用。肝脏主要负责全身胆固醇代谢,它可以将胆固醇转化为胆汁酸,并通过胆汁排泄将游离胆固醇以中性固醇的形式排出体外<sup>[1-2]</sup>。脂质代谢紊乱是许多代谢性疾病的基础,如糖尿病肾病<sup>[3]</sup>、非酒精性脂肪性肝病<sup>[4]</sup>等。导致肝脏脂质代谢紊乱的因素有很多,包括高脂饮食、吸烟、环境污染等,其中主动吸烟是代谢健康非酒精性脂肪性肝病患者的唯一死亡风险<sup>[5]</sup>。吸烟过程中会产生大量多环芳香烃类化合物 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs),如苯并芘 (BaP)。研究表明, BaP 会影响 BEAS-2B 细胞的脂肪酸代谢<sup>[6]</sup>。本课题组前期实验也证明 BaP 会使 HepG2 细胞中脂质聚集<sup>[7]</sup>。

淫羊藿 (*Epimedium brevicornu* Maxim) 也称为仙灵脾,系小檗科淫羊藿属 (*Epimedium* L.) 植物。研究表明,淫羊藿苷 (icariin, ICA) 是淫羊藿中含量最高的一种黄酮类化合物<sup>[8]</sup>,是其主要的生物活性成分之一,可作为中药材淫羊藿的质量评价指标<sup>[9]</sup>。在化学物质诱导的急性肝损伤中,炎症反应加重是导致肝细胞变性和坏死的关键,而淫羊藿苷具有抗炎、抗氧化的药理活性,对急性肝损伤具有保护作用<sup>[10]</sup>。淫羊藿苷还对高脂饮食和来曲唑诱导的多囊卵巢综合征大鼠肝脂肪变性有改善作用,其机制与增强脂肪酸氧化通路和抑制脂肪酸合成通路有关<sup>[11]</sup>。ICA 摄取进入人体后可与雄激素受体 (androgen receptor, AR) 结合,产生雄激素样作用<sup>[12]</sup>,从而调节脂质代谢等多种生理过程,缓解脂质代谢异常引起的各种代谢疾病,如肥胖、糖尿病等<sup>[13-14]</sup>。目前 ICA 对 BaP 诱导脂质代谢异常的影响鲜有报道。因此,本研究拟采用 Western blot 法以及油红 O 染色法探究 ICA 对 BaP 所致脂质代谢紊乱的保护作用。

## 1 材料

人肝癌细胞株 (HepG2, 北京协和医科大学基础医学研究所); BaP 粉末 (美国 Sigma 公司, 批号: B1760); ICA 对照品 (北京索莱宝科技有限公司, 纯度: HPLC  $\geq 98\%$ , 批号: S18010); 改良油红 O 染色试剂 (上海碧云天生物公司, 批号: C0158S); 4% 多聚甲醛固定液 (北京兰杰柯科技有限公司); BCA 蛋白定量分析试剂盒 (美国 Thermo 公司); TEMED (迈新生物开发公司, 批号: 15021392); Tris-HCl (上海碧云天生物公司); 5 $\times$  loading buffer (SDS-PAGE) 蛋白上样缓冲液 (北京普利莱基因技术有限公司); 甘氨酸、Tris-base、十二烷基磺酸钠 (北京索莱宝科技有限公司); 肉碱棕榈酰转移酶 1A (CPT1A) 抗体、 $\beta$ -氧化相关蛋白过氧化物酶体增殖物激活受体  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) 抗体、过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  辅助激活因子 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) 抗体、羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶 (HMGCR) 抗体、胆固醇调节元件结合蛋白 2 (SREBP2) 抗体、肝 X 受体  $\alpha$  (LXR $\alpha$ ) 抗体、 $\beta$ -actin 抗体 (英国 Abcam 公司)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养及处理

HepG2 细胞基础培养基含 10% 胎牛血清 (FBS) 的高糖 DMEM 液体培养基,加青链霉素混合液。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养,1~2 d 换一次液。长满 90% 时进行传代,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中 12 h 后观察。取对数生长期 HepG2 细胞,以密度为  $6 \times 10^4$  个/孔接种于 6 孔板,分为空白对照组 (不做任何处理),模型组 (BaP  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  处理 24 h), ICA 低剂量组 (BaP  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , ICA  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  处理 24 h), ICA 中剂量组 (BaP  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , ICA  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[15]</sup> 处理 24 h), ICA 高剂量组 (BaP  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , ICA

200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  处理 24 h), 重复 3 次。

## 2.2 细胞蛋白提取

取“2.1”项下处理好的细胞, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 3 次, 每个孔中添加 120  $\mu\text{L}$  的含有 PMSF 的 RIPA 裂解液收集至离心管中, 10 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 取上清液置于新的离心管中备用。

## 2.3 试剂盒检测生化指标

取“2.1”项下处理好的细胞, 制备细胞沉淀, PBS 清洗 2 次后加入 100 ~ 200  $\mu\text{L}$  1% TritonX-100, 充分裂解 10 min, 超声振荡 10 min, 制备好的细胞匀浆按照试剂盒说明操作, 设置相应的孔数和样本, 在酶标仪上测定相应的吸光度, 根据说明书测定并计算总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、低密度脂蛋白 (LDL) 和高密度脂蛋白 (HDL) 的含量。

## 2.4 Western blot 法检测蛋白

根据 BCA 标准曲线进行蛋白拌样, 计算每组蛋白上样量; 配制电泳所需的浓缩胶和分离胶, 蛋白上样, 电泳条件: 80 V, 30 min; 130 V, 30 min; 转膜, 取电泳好的聚丙烯酰胺凝胶, 制作转膜“三明治”, 其结构为透明板、转膜海绵、PVDF 膜、聚丙烯酰胺凝胶, 最后为黑色板, 条件为 400 mA, 1.5 h 后停止。TBST 洗膜 1 次, 一抗 4℃ 孵育 16 h。用 TBST 洗 3 次, 每次 10 min; 再进行二抗孵育 1 h, 需室温, 避光; TBST 复洗 3 次, 每次 10 min; 最后 TBS 洗 1 次, 使用 Odyssey 红

外激光成像系统检测所得条带。

## 2.5 油红 O 染色 HepG2 细胞

取“2.1”项下处理好的细胞, 用 1 mL PBS 清洗细胞 3 次, 6 孔板中每孔加入 1 mL 4% 多聚甲醛, 固定 30 min 后倒掉多聚甲醛, PBS 清洗 3 次, 每孔加入 400  $\mu\text{L}$  油红 O 染色液, 染色 20 min, 使用染色洗涤液洗涤 3 次, PBS 清洗 3 次, 每次 1 min, 光学显微镜下拍照观察不同剂量 ICA 对 BaP 所致脂质代谢紊乱的 HepG2 细胞脂质含量的影响, 随后用 HALO 数字病理图像分析软件<sup>[16]</sup>。

## 2.6 统计学处理

ImageJ 分析目的条带灰度值, 采用 GraphPad Prism7.0 统计分析软件作图, 计量资料数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间差异采用单因素方差分析法或非参数秩和检验法进行检验,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 ICA 对 HepG2 细胞中 TC、TG、LDL 和 HDL 含量的影响

如表 1 所示, 与空白对照组相比, 模型组 TC、TG 和 LDL 含量显著升高 ( $P < 0.01$ ), HDL 含量显著降低 ( $P < 0.001$ ); 与模型组相比, ICA 中、高剂量组 TC、TG 和 LDL 含量显著降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), HDL 含量显著升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

表 1 不同剂量 ICA 对 HepG2 细胞中 TC、TG、LDL 和 HDL 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Tab 1 Effect of different doses of ICA on TC, TG, LDL and HDL contents in HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

| 组别       | TG/ ( $\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ) | TC/ ( $\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ) | LDL/ ( $\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ) | HDL/ ( $\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ) |
|----------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|
| 空白对照组    | 0.033 $\pm$ 0.011                         | 0.041 $\pm$ 0.007                         | 0.045 $\pm$ 0.025                          | 0.177 $\pm$ 0.030                          |
| 模型组      | 0.103 $\pm$ 0.021**                       | 0.128 $\pm$ 0.028**                       | 0.130 $\pm$ 0.017**                        | 0.041 $\pm$ 0.014***                       |
| ICA 低剂量组 | 0.079 $\pm$ 0.017                         | 0.097 $\pm$ 0.019                         | 0.107 $\pm$ 0.012                          | 0.094 $\pm$ 0.021                          |
| ICA 中剂量组 | 0.059 $\pm$ 0.021 <sup>#</sup>            | 0.075 $\pm$ 0.021 <sup>#</sup>            | 0.073 $\pm$ 0.012 <sup>#</sup>             | 0.130 $\pm$ 0.031 <sup>#</sup>             |
| ICA 高剂量组 | 0.035 $\pm$ 0.010 <sup>##</sup>           | 0.052 $\pm$ 0.017 <sup>##</sup>           | 0.054 $\pm$ 0.027 <sup>##</sup>            | 0.146 $\pm$ 0.027 <sup>##</sup>            |

注: 与空白对照组相比, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组相比, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the blank control group, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; compared with the model group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$ .

### 3.2 ICA 对胆固醇合成相关蛋白的影响

结果如图 1 所示, 与空白对照组相比, ICA 高剂量组胆固醇合成相关蛋白 HMGCR、SREBP2 和 LXR $\alpha$  表达量显著降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )。

### 3.3 ICA 对 BaP 诱导 HepG2 细胞的胆固醇合成相关蛋白的影响

如图 2 所示, 与空白对照组相比, 模型组中 HMGCR、SREBP2 和 LXR $\alpha$  的蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 与模型组相比, ICA 高剂量组中 HMGCR、SREBP2 和 LXR $\alpha$  蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ )。

### 3.4 ICA 对 BaP 诱导 HepG2 细胞的 $\beta$ -氧化相关蛋白的影响

与空白对照组相比, 模型组中 PPAR $\alpha$ 、CPT1A、PGC-1 $\alpha$  的蛋白表达量显著降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ); 与模型组相比, ICA 高剂量组 PPAR $\alpha$ 、CPT1A、PGC-1 $\alpha$  的蛋白表达量显著升高 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )(见图 3)。

### 3.5 油红 O 染色法观察 HepG2 中脂质含量

通过光学显微镜及 HALO 软件分析可见, 与空白对照组相比, 模型组中脂质含量显著增多 ( $P < 0.01$ ); 与模型组相比, ICA 高剂量组中脂质含量显著减少 ( $P < 0.01$ )(见图 4)。

## 4 讨论

本研究采用 Western blot 法检测 HepG2 细胞中胆固醇合成及  $\beta$ -氧化相关蛋白, 结果显示 BaP 通过下调 PPAR $\alpha$ 、CPT1A、PGC-1 $\alpha$  等蛋白表达来抑

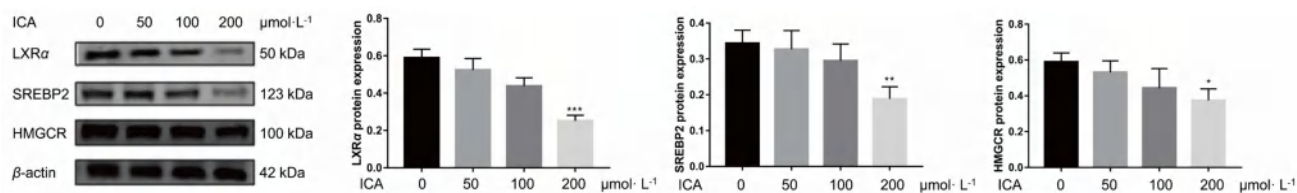
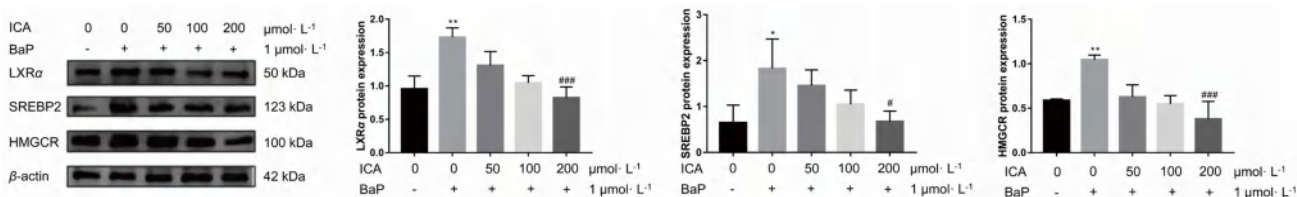
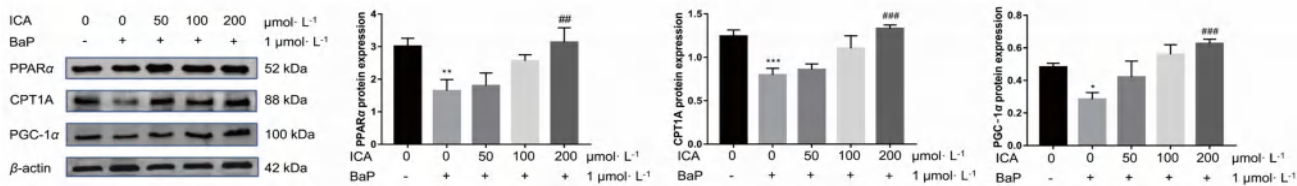
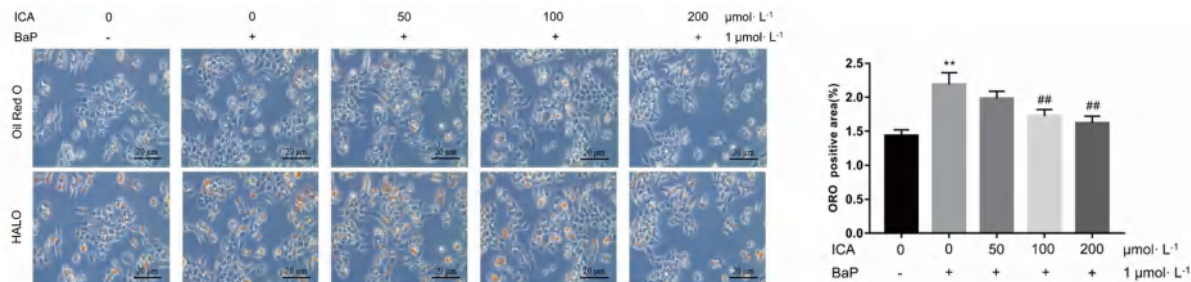
图1 ICA对胆固醇合成相关蛋白表达的影响 ( $n = 3$ )Fig 1 Effect of ICA on the expression of cholesterol synthesis-related proteins ( $n = 3$ )注: 与空白对照组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。Note: Compared with the blank control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .图2 ICA和BaP对胆固醇合成相关蛋白表达的影响 ( $n = 3$ )Fig 2 Effect of ICA and BaP on the expression of cholesterol synthesis-related proteins ( $n = 3$ )注: 与空白对照组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组相比, # $P < 0.05$ , ### $P < 0.001$ 。Note: Compared with the blank control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; compared with the model group, # $P < 0.05$ , ### $P < 0.001$ .图3 ICA和BaP对脂肪酸β-氧化相关蛋白表达的影响 ( $n = 3$ )Fig 3 Effect of ICA and BaP on the expression of fatty acid β-oxidation-related proteins ( $n = 3$ )注: 与空白对照组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组相比, ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ 。Note: Compared with the blank control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; compared with the model group, ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ .

图4 不同剂量ICA处理HepG2细胞后油红O染色结果

Fig 4 Oil Red O staining of HepG2 cells treated with different doses of ICA

注: 与空白对照组相比, \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组相比, ## $P < 0.01$  ( $n = 3$ )。Note: Compared with the blank control group, \*\* $P < 0.01$ ; compared with the model group, ## $P < 0.01$  ( $n = 3$ )

制脂肪酸β-氧化,减少脂肪酸的再利用,导致脂肪堆积,进而影响脂质代谢;BaP同时还会刺激胆固醇合成相关蛋白HMGCR、SREBP2、LXRα的表达,导致胆固醇合成发生紊乱。表明BaP具有干扰脂质代谢的作用,可以影响脂质代谢相关分解和合成因子<sup>[17-18]</sup>,可能通过增加游离脂肪酸(FFA)的吸收、促进肝脏中脂肪酸和三酰甘油的合成来破坏肝脏脂代谢<sup>[19]</sup>。Western blot结果还显示ICA通过上调脂肪酸β-氧化相关蛋白PPARα、CPT1A、PGC-1α,同时抑制了HMGCR、

SREBP2、LXRα蛋白的异常增高。研究发现,淫羊藿苷能提高腺苷酸活化蛋白激酶α(AMPKα)蛋白表达,进而增强其下游因子PGC-1α的活性<sup>[20]</sup>。PGC-1α是一种转录共激活因子,通过上调三羧酸循环和线粒体脂肪酸氧化途径的几个基因的表达来调节脂质代谢和长链脂肪酸氧化,可以与过氧化物酶体增殖物相互作用,激活参与脂质代谢的PPARα<sup>[21-22]</sup>。Lu等<sup>[23]</sup>发现ICA是一种PPARα激动剂,能激活肝脏中脂质代谢蛋白的表达。PPARα是调节脂质代谢的关键因子,参与脂



肪酸 $\beta$ -氧化的调节、脂肪酸转运,并促进肝细胞中的脂肪酸氧化,如线粒体和过氧化物酶体中脂肪酸氧化的增强<sup>[24]</sup>,本研究结果与这些研究一致。

本研究首先通过试剂盒检测了脂质代谢相关 TC、TG、LDL 和 HDL 这些指标可间接反映细胞内脂质代谢水平,本研究结果显示, BaP 处理能够显著升高 HepG2 细胞中 TC、TG 和 LDL 的含量,同时降低 HDL 的含量;而给予 ICA 后,细胞中 TC、TG 和 LDL 的含量显著下降, HDL 的含量显著升高。这表明 BaP 可导致脂质代谢紊乱,而 ICA 具有改善 BaP 引发的代谢紊乱的作用。油红 O 染色结果与上述趋势一致,进一步支持了这一结论。然而,这些结果仅从表观上反映了 ICA 对 BaP 作用的拮抗效果,其具体机制尚不明确。为深入探讨 ICA 拮抗 BaP 的分子机制,本研究采用 Western blot 技术检测了多种脂质代谢关键蛋白的表达,结果表明, ICA 能够促进脂肪酸 $\beta$ -氧化,同时抑制胆固醇异常堆积。综上所述, ICA 能改善 BaP 导致的肝脏脂质代谢紊乱,且可能与调节胆固醇合成及 $\beta$ -氧化相关基因表达有关,其原理可能是 ICA 发挥类雄激素作用,通过竞争性结合 AR,阻止 BaP 干扰脂质代谢,降低胆固醇合成。

## 参考文献

- [1] Wang YF, Ding WX, Li TG. Cholesterol and bile acid-mediated regulation of autophagy in fatty liver diseases and atherosclerosis [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2018, 1863 (7): 726-733.
- [2] Nemes K, Åberg F, Gylling H, et al. Cholesterol metabolism in cholestatic liver disease and liver transplantation: from molecular mechanisms to clinical implications [J]. *World J Hepatol*, 2016, 8 (22): 924-932.
- [3] Han YZ, Du BX, Zhu XY, et al. Lipid metabolism disorder in diabetic kidney disease [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2024, 15: 1336402.
- [4] Maurice J, Manousou P. Non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Clin Med (Lond)*, 2018, 18 (3): 245-250.
- [5] Golabi P, Paik JM, Kumar A, et al. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and associated mortality in individuals with type 2 diabetes, pre-diabetes, metabolically unhealthy, and metabolically healthy individuals in the United States [J]. *Metabolism*, 2023, 146: 155642.
- [6] Ye GZ, Gao H, Zhang X, et al. Aryl hydrocarbon receptor mediates benzo[a]pyrene-induced metabolic reprogramming in human lung epithelial BEAS-2B cells [J]. *Sci Total Environ*, 2021, 756: 144130.
- [7] 杨帆. 苯并芘通过 AhR 影响肝脏脂质代谢和糖异生的分子机制 [D]. 呼和浩特: 内蒙古医科大学, 2021.
- [8] 李盼盼, 裴莉昕, 纪宝玉, 等. 淫羊藿红外光谱特征分析与总黄酮、还原糖及总酚含量测定 [J]. *中国食品添加剂*, 2024, 35 (12): 197-202.
- [9] 中国药典 2020 年版. 二部 [S]. 2020: 340-342.
- [10] 肖冬焱, 何伟, 肖志滢, 等. 淫羊藿苷对四氯化碳诱导小鼠急性肝损伤的保护作用机制 [J]. *中国组织工程研究*, 2024, 28 (23): 3654-3660.
- [11] 海洋. 淫羊藿苷改善多囊卵巢综合征合并非酒精性脂肪肝机制研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2023.
- [12] 李佳珊, 徐盼瑜, 杜寒倩, 等. 基于数据挖掘的具有雄激素样作用中药的规律分析 [J]. *中草药*, 2022, 53 (18): 5786-5798.
- [13] Wang M, Gao HY, Li WH, et al. Icaritin and its metabolites regulate lipid metabolism: from effects to molecular mechanisms [J]. *Biomed Pharm*, 2020, 131: 110675.
- [14] Yao WH, Wang K, Wang XN, et al. Icaritin ameliorates endothelial dysfunction in type 1 diabetic rats by suppressing ER stress via the PPAR $\alpha$ /Sirt1/AMPK $\alpha$  pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236: 1889-1902.
- [15] Zhao H, Tian HY. Icaritin alleviates high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease via up-regulating miR-206 to mediate NF- $\kappa$ B and MAPK pathways [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2024, 38 (1): e23566.
- [16] Farooq M, Hameed H, Dimanche-Boitrel MT, et al. Switching to regular diet partially resolves liver fibrosis induced by high-fat, high-cholesterol diet in mice [J]. *Nutrients*, 2022, 14 (2): 386.
- [17] Xu RY, Pan LQ, Yang YY, et al. Temporal transcriptome analysis in female scallop *Chlamys farreri*: first molecular insights into the disturbing mechanism on lipid metabolism of reproductive-stage dependence under benzo[a]pyrene exposure [J]. *Sci Total Environ*, 2020, 746: 142032.
- [18] Bu KB, Kim M, Shin MK, et al. Regulation of benzo[a]pyrene-induced hepatic lipid accumulation through CYP1B1-induced mTOR-mediated lipophagy [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25 (2): 1324.
- [19] Yang M, Mao KM, Cao X, et al. Integrated network toxicology, transcriptomics and gut microbiomics reveals hepatotoxicity mechanism induced by benzo[a]pyrene exposure in mice [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2024, 491: 117050.
- [20] Zhao M, Xu PL, Shi WJ, et al. Icaritin exerts anti-tumor activity by inducing autophagy via AMPK/mTOR/ULK1 pathway in triple-negative breast cancer [J]. *Cancer Cell Int*, 2024, 24 (1): 74.
- [21] Cheng CF, Ku HC, Lin H. PGC-1 $\alpha$  as a pivotal factor in lipid and metabolic regulation [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19 (11): 3447.
- [22] Chen JD, Chen JX, Fu HR, et al. Hypoxia exacerbates non-alcoholic fatty liver disease via the HIF-2 $\alpha$ /PPAR $\alpha$  pathway [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2019, 317 (4): E710-E722.
- [23] Lu YF, Xu YY, Jin F, et al. Icaritin is a PPAR $\alpha$  activator inducing lipid metabolic gene expression in mice [J]. *Molecules*, 2014, 19 (11): 18179-18191.
- [24] Pawlak M, Lefebvre P, Staels B. Molecular mechanism of PPAR $\alpha$  action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *J Hepatol*, 2015, 62 (3): 720-733.

(收稿日期: 2024-12-23; 修回日期: 2025-01-15)

## BCL-2 家族抑制剂联合伊布替尼克服弥漫性大 B 细胞淋巴瘤伊布替尼获得性耐药的效应及机制研究

王心悦<sup>1, 2, 3</sup>, 楼洋<sup>3</sup>, 苏明波<sup>2, 3\*</sup> (1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2. 长三角药物高等研究院, 江苏 南通 226133; 3. 南通弘烨医药科技有限公司, 江苏 南通 226126)

**摘要:** 目的 研究伊布替尼 (IBR) 与 BCL-2 抑制剂维奈托克 (VEN)、BCL-XL 抑制剂 A1155463 和 MCL-1 抑制剂 S63845 联用抑制 IBR 获得性耐药的弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 TMD8 细胞 (TMD8-IBR) 的增殖作用及相关机制。方法 通过将 TMD8 细胞长期暴露在 IBR 中获得 TMD8-IBR 细胞。基于零相互作用模型 (ZIP) 评估 IBR 与 VEN 联用对 TMD8 及 TMD8-IBR 细胞的作用效果, 通过流式细胞术检测联合用药对细胞凋亡和周期的影响, Western blot 法检测线粒体细胞色素 C 的释放, Caspase-3 的剪切及 BCL-2 家族抗凋亡蛋白的表达情况。结果 长期 IBR 诱导及细胞增殖抑制实验证明, TMD8-IBR 细胞株构建成功, Western blot 结果表明, 对比野生型 TMD8 细胞, TMD8-IBR 细胞中 BCL-2 和 BCL-XL 蛋白表达水平上调而 MCL-1 蛋白表达水平下调; 基于 ZIP 模型的联用评价表明, IBR 与 VEN 协同增加杀伤 TMD8-IBR 细胞能力, IBR 与 A1155463 和 S63845 对 TMD8-IBR 细胞仅有较弱协同或叠加作用; 流式细胞术检测结果显示 IBR 与 VEN 联用可协同诱导细胞凋亡, 而对细胞周期基本没有影响; Western blot 结果显示 IBR 与 VEN 联用引起细胞色素 C 释放到胞质及 Caspase-3 剪切, 且引起不同程度的 BCL-2 家族抗凋亡蛋白表达降低。结论 BCL-2 蛋白表达水平上调是 TMD8-IBR 细胞耐药的重要机制, BCL2 抑制剂 VEN 联合 IBR 可通过线粒体凋亡途径, 达到协同抑制肿瘤细胞生长的作用。

**关键词:** 伊布替尼; 维奈托克; 联合用药; 抗凋亡蛋白; 耐药; 细胞凋亡

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)06-1646-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.022

## Combination of ibrutinib with BCL-2 family inhibitors synergistically overcomes acquired resistance to ibrutinib in diffuse large B-cell lymphoma

WANG Xin-yue<sup>1, 2, 3</sup>, LOU Yang<sup>3</sup>, SU Ming-bo<sup>2, 3\*</sup> (1. School of Pharmacy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Yangtze River Delta Pharmaceutical Advanced Research Institute, Nantong Jiangsu 226133; 3. Nantong Hongye Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Nantong Jiangsu 226126)

**Abstract: Objective** To determine the effect and related mechanism of ibrutinib (IBR) combined with BCL-2 inhibitors venetoclax (VEN), BCL-XL inhibitor A1155463, and MCL-1 inhibitor S63845 on inhibiting the proliferation of diffuse large B-cell lymphoma TMD8 cells (TMD8-IBR) with acquired resistance to IBR. **Methods** TMD8-IBR cells were obtained by long-term exposure of TMD8 cells to IBR. The combined effect of IBR and VEN on TMD8 and TMD8-IBR cells was evaluated with the zero interaction potency (ZIP) model. Flow cytometry was used to detect the effect of IBR combined with VEN on cell apoptosis and cell cycle. Western blot was used to detect the release of mitochondrial cytochrome, the cleavage of Caspase-3 and the expression of BCL-2 family anti-apoptotic proteins. **Results** The TMD8-IBR cell line was successfully established through long-term IBR induction and cell proliferation inhibition experiments. Western blot showed

作者简介: 王心悦, 女, 硕士研究生, 主要从事肿瘤药理学研究, email: xywang12@bio-polar.com \*通信作者: 苏明波, 男, 正高级工程师, 主要从事肿瘤药理学研究, email: mbsu@bio-polar.com

that the expression levels of BCL-2 and BCL-XL proteins in TMD8-IBR were upregulated compared to those in wild-type TMD8 cells, while the expression level of MCL-1 protein was downregulated. The combined evaluation based on the ZIP model showed that IBR and VEN synergistically increased the ability to kill TMD8-IBR cells, while IBR had weak synergistic or additive effect with A1155463 or S63845 on TMD8-IBR cells. The flow cytometry showed that combination of IBR and VEN synergistically induced the cell apoptosis, but had little effect on the cell cycle. The Western blot showed that the combination of IBR and VEN promoted the release of cytochrome C into the cytoplasm and Caspase-3 cleavage, and resulted in varying degrees of decreased expression of BCL-2 family anti-apoptotic proteins. **Conclusion** Upregulation of BCL-2 protein expression level is an important mechanism in the acquired resistance of TMD8 cells to IBR, and the combination of BCL2 inhibitors and IBR can inhibit tumor cell growth via the mitochondrial apoptosis pathway.

**Key words:** ibrutinib; venetoclax; combination therapy; anti apoptotic protein; drug resistance; cell apoptosis

淋巴瘤从细胞分化的角度可分为 T 细胞和 B 细胞两型, B 细胞来源的淋巴瘤占 60% ~ 70%<sup>[1-2]</sup>, 其中 B 细胞非霍奇金淋巴瘤 (B-NHLs) 可发生于不同年龄段, 具有高度异质性且病情发展迅速, 恶性程度较高<sup>[3]</sup>, 常见的有弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL)、小淋巴细胞淋巴瘤 / 慢性淋巴细胞白血病 (CLL/SLL)、套细胞淋巴瘤 (MCL) 等<sup>[4]</sup>。目前针对 B-NHLs 一线治疗方案仍是经典标准 R-CHOP 方案<sup>[5-6]</sup>, 即包括利妥昔单抗、环磷酰胺、多柔比星、长春新碱及泼尼松龙五种药物的联合治疗方案, 鉴于 B-NHLs 的异质性和较高的恶性程度, 部分患者经一线治疗后会出现疾病进展或复发。

B 细胞淋巴瘤的发生, 涉及近端 B 细胞受体 (BCR) 信号通路异常<sup>[7]</sup>, BCR 聚集后激活细胞内下游 Bruton 酪氨酸激酶 (Bruton tyrosine kinase, BTK), BTK 是 B 细胞发育过程中关键的效应分子, 涉及细胞增殖、成熟、分化、凋亡和迁移<sup>[8-9]</sup>, 抑制其活性可产生明显的抗肿瘤效应, BTK 抑制剂 (BTKi) 已被用于治疗 B 细胞淋巴瘤。IBR 是第一代 BTKi, 可通过与 BTK-C481 残基共价结合来阻断 BCR 的下游信号传导<sup>[10-11]</sup>。作为 CLL/SLL 的一线治疗, IBR 已显示出良好的安全性和有效性<sup>[12]</sup>, 然而, 随着 BTKi 的广泛使用, 耐药问题不断出现, 严重影响到 BTKi 的临床应用。

调控细胞凋亡的线粒体途径可以由多种刺激启动<sup>[9]</sup>, 激活后导致线粒体外膜的通透化, 细胞色素 C 从线粒体中释放, 从而激活半胱天冬酶 -3 (Caspase-3) 并导致细胞凋亡<sup>[13]</sup>。而 B 细胞淋巴瘤因子 2 (BCL-2) 家族蛋白功能异常作为众多血液系统恶性肿瘤的特征之一<sup>[14]</sup>; 也是线粒体细胞凋

亡的关键调节因子, 通过家族成员之间的相互作用调控线粒体外膜的通透化最终调控细胞凋亡<sup>[15]</sup>。BCL-2 蛋白家族成员包括了抗凋亡蛋白与促凋亡蛋白, 抗凋亡蛋白 BCL-2、MCL-1 及 BCL-XL 主要通过与促凋亡蛋白 BAX 和 BAK 结合进而抑制细胞凋亡, 延长细胞存活时间。当抗凋亡蛋白异常高表达时, 细胞正常的凋亡调控失效, 导致细胞恶变和肿瘤的形成<sup>[16]</sup>。在伊布替尼 (ibrutinib, IBR) 耐药的 DLBCL 患者中, 发现抗凋亡蛋白 BCL-2 出现不同程度的表达量的增加<sup>[17-18]</sup>, 这提示 BCL-2 可能在 IBR 获得性耐药的 B-NHLs 细胞存活中发挥了重要作用。

目前有多个 BTK 抑制剂联合 BCL-2 抑制剂治疗 DLBCL 的临床研究正在进行<sup>[19-20]</sup>。本文选用 DLBCL 的 TMD8 细胞, 通过与抗凋亡蛋白 BCL-2 家族抑制剂联用, 探索 BCL-2 家族抑制剂维奈托克 (venetoclax, VEN) 联合 IBR 克服 IBR 获得性耐药的可能性, 并研究其潜在机制。

## 1 材料

### 1.1 细胞株

DLBCL 细胞 TMD8 来源于美国细胞培养物收藏中心 (ATCC)。

### 1.2 试剂

IBR (阿拉丁公司, 货号: PCI-32765); VEN (货号: HY-15531)、Navitoclax (NAV) (货号: HY-10087)、A1155463 (货号: Y-19725)、S63845 (货号: HY-100741) (MCE 公司); RPMI-1640 (Cytiva 公司); 胎牛血清 (Sigma 公司); CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay 试剂盒 (MTS 试剂) (上海盛兆生物科技有限公司); BCL-2、BCL-XL、



MCL-1、Caspase-3、Cleaved Caspase-3 (美国 CST 公司);  $\beta$ -actin 抗体 (Santa 公司);  $\alpha$ -tubulin (Proteintech 公司); 细胞色素 C 抗体 (美国 BD 公司); Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒 (上海翌圣生物有限公司); 细胞周期检测试剂盒 (碧云天生物技术有限公司)。

### 1.3 仪器

多功能酶标仪 (Perkinelmer 公司); 细胞培养箱 (Thermo Fisher Scientific 公司); 垂直高压电泳系统 (美国 Bio-Rad 公司); 快速湿转仪 (南京金斯瑞生物公司); 水平脱色摇床 (其林贝尔仪器有限公司); 高速冷冻微型离心机 (美国 Scilogex 公司), 流式细胞仪 (贝克曼公司)。

## 2 方法

### 2.1 药物配制

10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> VEN、IBR、NAV 和 S63845 储备液: 称取一定质量药物粉末, 将粉末溶于对应体积的二甲基亚砜 (DMSO) 中, 0.22  $\mu$ m 无菌滤器过滤除菌, 分装于 EP 管, 储存于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱, 临用前用细胞培养基稀释至所需浓度。

### 2.2 细胞培养

TMD8 细胞用含 10% 的胎牛血清和 1% 青-链霉素混合液 (1  $\times$  10<sup>5</sup> U  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 青霉素和 100 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 链霉素) 的 RPMI-1640 培养基在 37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱中培养, 根据细胞生长情况, 每 2 ~ 3 日传代 1 次, 取对数生长期且状态良好的细胞用于实验。

### 2.3 构建获得性耐药细胞 TMD8-IBR 模型

TMD8 细胞使用接近细胞半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 的 IBR 处理 24 h, 收集细胞并更换不含药物的完全培养基, 恢复生长后测试细胞的  $IC_{50}$  并逐渐增加 IBR 作用浓度, 如此周期循环最终获得耐药细胞株, 传代时加入 1  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> IBR 维持, 即得到 TMD8-IBR 细胞。

### 2.4 MTS 法检测细胞增殖抑制活性

根据细胞生长速率, 将处于对数生长期的肿瘤细胞 (TMD8、TMD8-IBR 细胞), 以 2  $\times$  10<sup>4</sup> 个/孔接种于 96 孔培养板中, 化合物用完全培养基稀释, 终浓度以 10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 起始, 5 倍稀释, 加入铺好细胞的 96 孔板中。细胞在 37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 72 h 后, 每孔加入 20  $\mu$ L MTS 试剂, 放入培养箱中孵育 1.5 h, 酶标仪测定检测波长 490 nm 和参比波长 690 nm 处的光密度 ( $OD$ )。计算细胞存活率 (%) = (加药组  $OD$  - 空白组  $OD$ ) / (对照组  $OD$  - 空白组  $OD$ )  $\times$  100%, 以浓

度的对数值对活性百分数 (%Activity) 作图, 采用非线性回归算出拟合曲线, 利用 GraphPad Prism 8 软件计算  $IC_{50}$  值。

### 2.5 SynergyFinder 工具进行联合用药评价

VEN 终浓度以 3000 nmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 起始, 3 倍梯度稀释; 其余化合物均以 10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 起始, 5 倍梯度稀释。细胞增殖抑制活性评价方法同“2.4”项下。通过 SynergyFinder 网络应用程序 (synergyfinder.fimm.fi), 基于 ZIP 模型分析药物联用效果<sup>[21]</sup>。白色区域表示叠加作用, 红色区域表示协同作用, 药物协同评分大于 10 分表示两个药物存在协同作用, 评分在 0 ~ 10 分表示两个药物存在叠加作用。

### 2.6 流式细胞术检测细胞凋亡率及对细胞周期的影响

**2.6.1 细胞周期检测** TMD8-IBR 细胞接种于 12 孔板中, 每孔接种密度为 4  $\times$  10<sup>5</sup> 个细胞, 经过 10 nmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> VEN, 100 nmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> VEN, 1000 nmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> IBR, 10 nmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> VEN + 1000 nmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> IBR, 100 nmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> VEN + 1000 nmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> IBR 不同组别药物处理后置于培养箱中孵育 24 h。收集细胞后用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 1 次, 加入 1 mL 预冷的 75% 乙醇, 放入 4  $^{\circ}$ C 冰箱固定过夜; 次日离心收集细胞, 用 1 mL PBS 洗涤 1 次, 加入 0.5 mL PI 染色液, 于 37  $^{\circ}$ C 避光水浴 30 min, 用流式细胞仪在激发波长 488 nm 处检测红色荧光, 分别分析 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期、S 期和 G<sub>2</sub>/M 期的细胞占比。

**2.6.2 细胞凋亡率检测** TMD8-IBR 细胞接种于 12 孔板中, 每孔接种密度为 4  $\times$  10<sup>5</sup> 个细胞, 药物处理剂量同“2.6.1”项下, 培养箱中孵育 24 h, 离心, 收集细胞, PBS 洗涤 2 次, 加入 Annexin V-FITC 和 PI 染色液, 室温避光孵育 15 min, 通过流式细胞仪检测细胞凋亡率。

### 2.7 Western blot 检测凋亡相关蛋白及 Caspase-3 剪切水平变化

收集细胞样品, 药物处理剂量同“2.6.1”项下, 加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液处理, 冰上裂解 30 min, 95  $^{\circ}$ C 煮样 15 min。上层 4% 浓缩胶使用 60 V 恒压电泳, 溴酚蓝进入下层 10% 分离胶时使用 90 V 恒压电泳, 待目的蛋白充分分离后停止电泳, 将蛋白转移至硝酸纤维素膜, 使用 5% 脱脂奶粉封闭 1.5 h, 将膜放入一抗稀释液 (BCL-2、BCL-XL 和 MCL-1 抗体稀释比例 1 : 1000) 于 4  $^{\circ}$ C 冰箱中孵育过夜。TBST 清洗 3

遍, 加入二抗 IgG-HRP (稀释比例 1:10 000) 室温孵育 1 h。TBST 清洗 3 遍后, 将膜浸泡在 ECL 化学发光试剂反应 2 min, 于凝胶成像仪曝光并采集图片。

## 2.8 细胞色素 C 释放实验

配制细胞色素 C 实验缓冲液, 缓冲液 A 组成: 20 mmol · L<sup>-1</sup> HEPES, 4 mmol · L<sup>-1</sup> 氯化钾, 5 mmol · L<sup>-1</sup> 氯化镁, 1 mmol · L<sup>-1</sup> 乙二胺四乙酸 (EDTA), 1 mmol · L<sup>-1</sup> 乙二醇双 (2-氨基乙基醚) 四乙酸, 250 mmol · L<sup>-1</sup> 蔗糖, 0.135 mg · mL<sup>-1</sup> 洋地黄皂苷; 缓冲液 B 组成: 20 mmol · L<sup>-1</sup> Tris, 135 mmol · L<sup>-1</sup> 氯化钠, 1.5 mmol · L<sup>-1</sup> 氯化镁, 1 mmol · L<sup>-1</sup> 乙二醇双 (2-氨基乙基醚) 四乙酸, 10% 甘油, 1% Triton X-100。低速离心收集细胞, 药物处理剂量同“2.6”项下, 加入缓冲液 A, 冰上静置 5 min, 离心收集上清液, 即为胞质蛋白, 随后往沉淀中加入缓冲液 B, 离心收集上清液, 即为线粒

体蛋白。

## 2.9 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8 等软件进行数据统计分析。实验重复 3 次, 结果采用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 进行统计学描述, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 TMD8-IBR 细胞株的建立

细胞增殖抑制实验结果显示, IBR 对野生型 TMD8 细胞增殖体现出强效的抑制活性, 其  $IC_{50}$  值为  $(11.80 \pm 0.55)$  nmol · L<sup>-1</sup>; 而对 TMD8-IBR 细胞增殖能力影响微弱, 其  $IC_{50}$  值为  $(6668.33 \pm 515.33)$  nmol · L<sup>-1</sup>, 见图 1A, 耐药指数 (RI) 为 565。Western blot 结果显示, 相较于野生型 TMD8 细胞, TMD8-IBR 细胞抗凋亡蛋白 BCL-2 和 BCL-XL 蛋白表达水平明显上调, MCL-1 的蛋白水平显著下调, 见图 1B。

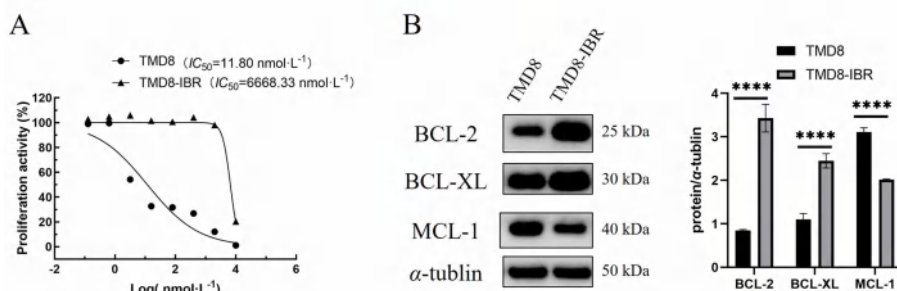


图 1 IBR 作用 72 h 对 TMD8 和 TMD8-IBR 增殖 (A) 及凋亡相关蛋白的表达 (B) 的影响

Fig 1 Effect of IBR on the proliferation (A) and apoptosis-related protein expression (B) of TMD8 and TMD8-IBR treated for 72 h

### 3.2 BCL-2 家族抑制剂与 IBR 的联合用药作用

选择 BCL-2 抑制剂 VEN、BCL-XL 抑制剂 A1155463、MCL-1 抑制剂 S63845, 分别与 IBR 进行联合用药研究, 基于 ZIP 模型分析药物联用效果, 结果显示, 在 TMD8-IBR 细胞中, VEN 与 IBR 协同评分为 23.095, 协同作用明显, 但 A1155463 与 S63845 与 IBR 联用在 TMD8-IBR 中仅有较弱协同作用或叠加作用, 见图 2。

### 3.3 IBR 与 VEN 联用对 TMD8-IBR 凋亡及周期的影响

流式细胞仪检测周期结果显示, 对于 TMD8-IBR 细胞, 与 DMSO 组相比, 10 ~ 100 nmol · L<sup>-1</sup> VEN 与 1000 nmol · L<sup>-1</sup> IBR 联合处理对细胞周期各阶段基本没有阻滞作用, 且 Sub-G<sub>1</sub> 期的比例有所升高, 提示 IBR 与 VEN 联合处理对细胞周期的影响较弱, 而具有一定的凋亡促进作用, 见图 3A。

通过周期中不同组 Sub-G<sub>1</sub> 期的占比结果, 提示其在细胞凋亡方面的诱导作用, 随后在 TMD8-IBR 细胞上开展凋亡研究, 流式细胞仪检测凋亡

结果证明, 对于 TMD8-IBR 细胞, 与 DMSO 组相比, 1000 nmol · L<sup>-1</sup> IBR 几乎不引起细胞凋亡, 而与 10 ~ 100 nmol · L<sup>-1</sup> VEN 联用则引起明显的细胞凋亡, 且呈剂量依赖性, 见图 3B。

### 3.4 VEN 与 IBR 处理对 TMD8-IBR 凋亡相关蛋白表达的影响

利用 Western blot 检测 TMD8-IBR 细胞线粒体细胞色素 C 的释放, 结果显示, 对比空白组, VEN 与 IBR 单药处理组仅在细胞质中检测到少量细胞色素 C, 而 10 ~ 100 nmol · L<sup>-1</sup> VEN 与 1000 nmol · L<sup>-1</sup> IBR 联用可进一步促使细胞色素 C 的释放, 且随着 VEN 浓度升高, 作用更加明显, 见图 4A。

利用 Western blot 检测 TMD8-IBR 细胞凋亡相关信号 Cleaved Caspase-3 水平, 结果发现 10 ~ 100 nmol · L<sup>-1</sup> VEN 与 1000 nmol · L<sup>-1</sup> IBR 联合处理 TMD8-IBR 细胞中 Cleaved Caspase-3 呈现剂量依赖性地增加, 且两者联用引起的 Caspase-3 剪切水平明显优于 VEN 单药的效果, 见图 4B。

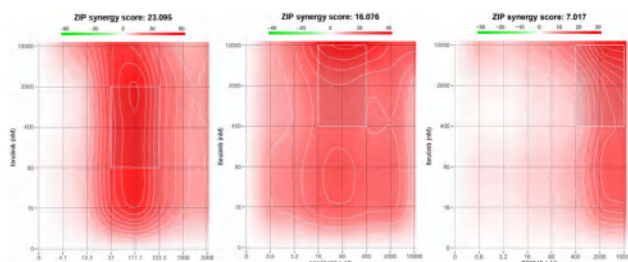


图2 基于ZIP模型评价IBR与VEN、NAV及S63845联用在TMD8-IBR中的作用

Fig 2 Effect of combination of IBR, VEN, NAV, and S63845 on TMD8-IBR based on ZIP model

通过对BCL-2家族抗凋亡蛋白表达水平的检测,发现与 $100\text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  VEN和 $1000\text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  IBR单药处理组比较,两者联用能明显降低BCL-2、BCL-XL及MCL-1的表达水平,见图4C。

## 4 讨论

### 4.1 IBR获得性耐药的机制

近年来,BTK的靶向抑制剂IBR已被FDA批准应用于CLL的一线治疗<sup>[22]</sup>和MCL的二线治疗;同时,针对复发/难治性DLBCL的多个临床试验也在进行中,初步结果令人鼓舞<sup>[23-24]</sup>。但随

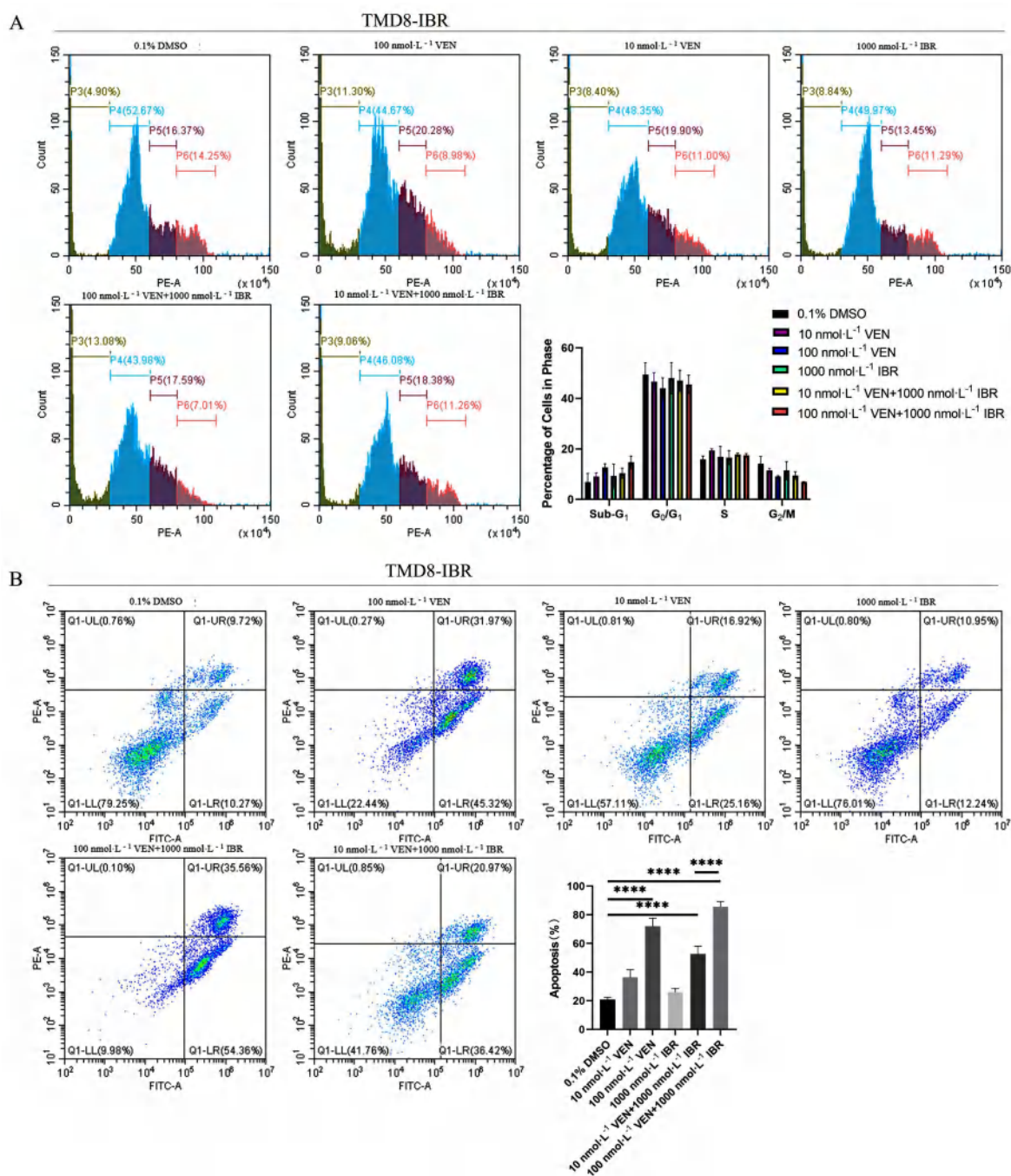


图3 IBR与VEN联用24 h对TMD8-IBR周期(A)及凋亡(B)的影响(\*\*\*\* $P < 0.0001$ )

Fig 3 Effect of IBR combined with VEN for 24 h on the cell cycle (A) and apoptosis (B) of TMD8-IBR (\*\*\*\* $P < 0.0001$ )



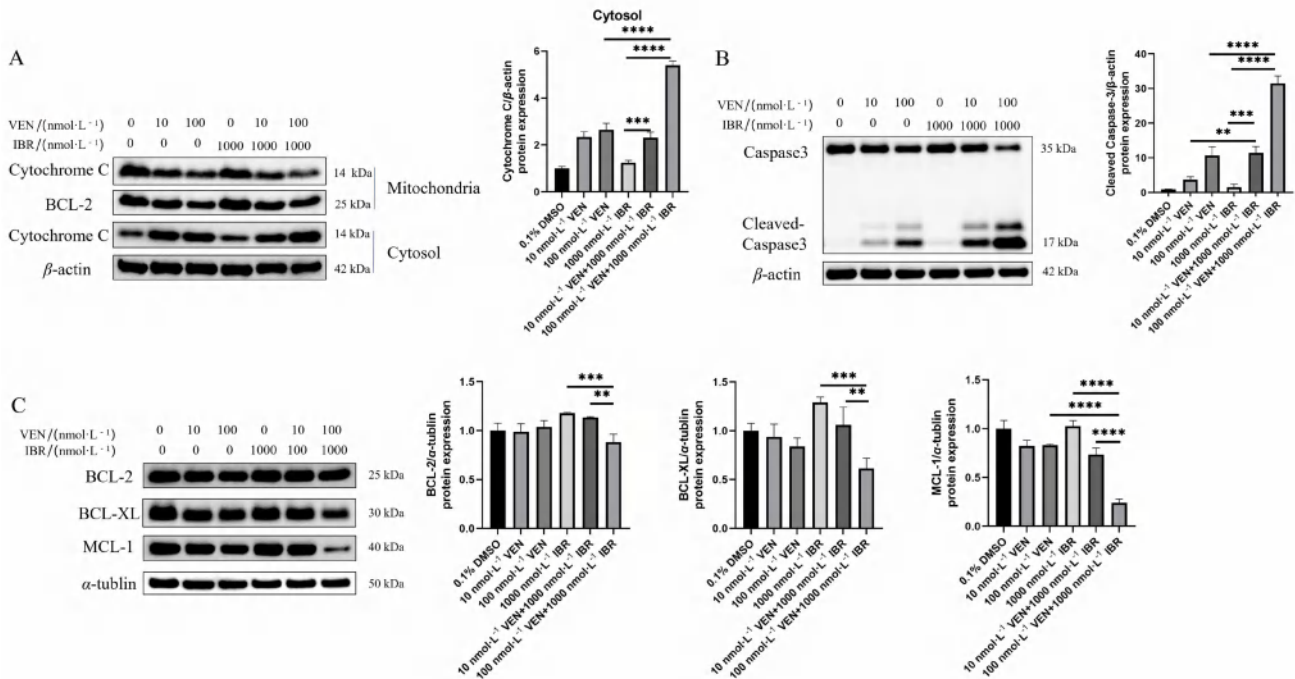


图 4 IBR和 VEN 对 TMD8-IBR 凋亡相关蛋白表达的影响 (\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ )  
 Fig 4 Effect of IBR and VEN on the expression of apoptosis related proteins in TMD8-IBR (\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ )

着 IBR 的长期使用，耐药问题也随之而来，因此，本研究选用 DLBCL 细胞株 TMD8，通过持续暴露于不同浓度的 IBR 建立 TMD8-IBR 细胞株，同时 TMD8-IBR 耐药细胞对比野生型 TMD8 细胞的 BCL-2 和 BCL-XL 蛋白表达上调，MCL-1 的表达下调，说明 IBR 长期使用，可能通过提高抗凋亡蛋白 BCL-2 和 BCL-XL 的表达水平，促进肿瘤细胞的抗凋亡作用，同时也为 BCL-2 家族抑制剂与 IBR 联合用药抗 IBR 获得性耐药提供新的治疗方案。为验证 BCL-2 家族抑制剂与 IBR 联合用药抗 IBR 获得性耐药的可能性，本文开展联合用药后对 TMD8-IBR 细胞色素 C 释放、Caspase-3 剪切及 BCL-2 家族抗凋亡蛋白表达等情况的评价。

#### 4.2 BCL-2 家族抑制剂与 IBR 联合用药抗 IBR 获得性耐药研究

本研究通过耐药细胞株的构建，证明 IBR 耐药后对细胞增殖能力的抑制明显弱于野生型，采用 ZIP 模型评估 IBR 与 BCL-2 家族抑制剂的联用效果，TMD8 和耐药株细胞 BCL-2 家族蛋白表达的差别，证实了不同 BCL-2 家族抑制剂与 IBR 联用效果的不同。两株细胞联用结果均显示 IBR 与 VEN 有明显的协同效果，而 IBR 与 A1155463 和 S63845 仅有微弱的协同作用或只有叠加作用；IBR 与 VEN 联合用药对细胞周期并没有明显的阻滞作用，但能明显诱导细胞凋亡，表明 VEN 可以通过促进细胞凋亡而降低 IBR 的耐药性。

细胞色素 C 的释放和 Caspase-3 的剪切是反映细胞发生线粒体凋亡的关键信号<sup>[25-26]</sup>。本研究通过 Western blot 法检测联合 IBR 和 VEN 处理细胞后细胞色素 C 的释放和 Caspase-3 剪切水平，发现在耐药细胞中 100 nmol · L<sup>-1</sup> 的 VEN 即可引发细胞色素 C 的释放和下游凋亡信号 Caspase-3 的剪切，提示 IBR 与 VEN 联用可能是通过线粒体凋亡途径诱导 TMD8 耐药细胞凋亡，且耐药细胞更依赖于 BCL-2 家族存活。同时通过对 BCL-2 家族抗凋亡蛋白表达水平的检测，发现对比 IBR 与 VEN 单药处理组，两者联用可以进一步降低抗凋亡蛋白的表达，提示联合 VEN 克服 IBR 耐药可能是通过降低同家族抗凋亡蛋白如 BCL-XL 和 MCL-1 的表达从而促使细胞存活更依赖于 BCL-2 而发挥作用的。BCL-2 抗凋亡信号通路在 TMD8 对 IBR 的耐药中可能发挥了关键作用，VEN 联合 IBR 可以在更低水平引发线粒体凋亡，这是其产生协同抗凋亡作用的重要机制。

#### 4.3 总结与展望

本文阐述了 IBR 获得性耐药的 TMD8 细胞中，BCL-2 及 BCL-XL 上调是其耐药的可能机制，并证明 IBR 联合 VEN 不仅可以协同抑制肿瘤细胞生长，还能克服其对 IBR 的耐药。本研究不足的地方是未深入考察 IBR 与 VEN 处理 TMD8-IBR 后 BCL-2、BCL-XL 和 MCL-1 表达变化可能涉及的机制。IBR 与 BCL-2 家族抑制剂的联合治疗 DLBCL 已成为研

究的热点, 进一步探索其作用机制也是今后研究的重点方向之一。

## 参考文献

- [1] Lewis WD, Lilly S, Jones KL. Lymphoma: diagnosis and treatment [J]. *Am Fam Physician*, 2020, 101 (1): 34-41.
- [2] De Leval L, Jaffe ES. Lymphoma classification [J]. *Cancer J*, 2020, 26 (3): 176-185.
- [3] Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms [J]. *Blood*, 2016, 127 (20): 2375-2390.
- [4] Ahn IE, Brown JR. Targeting Bruton's tyrosine kinase in CLL [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 687458.
- [5] Takahara T, Nakamura S, Tsuzuki T, et al. The immunology of DLBCL [J]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15 (3): 835.
- [6] Wang SN, Bai O. The advances of clinical and molecular prognostic factors of diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, 2016, 37 (6): 538-541.
- [7] Nakhoda S, Vistarop A, Wang YL. Resistance to Bruton tyrosine kinase inhibition in chronic lymphocytic leukaemia and non-Hodgkin lymphoma [J]. *Br J Haematol*, 2023, 200 (2): 137-149.
- [8] McDonald C, Xanthopoulos C, Kostareli E. The role of Bruton's tyrosine kinase in the immune system and disease [J]. *Immunology*, 2021, 164 (4): 722-736.
- [9] Cool A, Nong T, Montoya S, et al. BTK inhibitors: past, present, and future [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2024, 45 (8): 691-707.
- [10] Sivina M, Kreitman RJ, Arons E, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) blocks hairy cell leukaemia survival, proliferation and B cell receptor signalling: a new therapeutic approach [J]. *Br J Haematol*, 2014, 166 (2): 177-188.
- [11] Kapoor I, Li Y, Sharma A, et al. Resistance to BTK inhibition by ibrutinib can be overcome by preventing FOXO3a nuclear export and PI3K/AKT activation in B-cell lymphoid malignancies [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10 (12): 924.
- [12] Burger JA, Barr PM, Robak T, et al. Long-term efficacy and safety of first-line ibrutinib treatment for patients with CLL/SLL: 5 years of follow-up from the phase 3 RESONATE-2 study [J]. *Leukemia*, 2020, 34 (3): 787-798.
- [13] Asadi M, Taghizadeh S, Kaviani E, et al. Caspase-3: structure, function, and biotechnological aspects [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2022, 69 (4): 1633-1645.
- [14] Valentin R, Grabow S, Davids MS. The rise of apoptosis: targeting apoptosis in hematologic malignancies [J]. *Blood*, 2018, 132 (12): 1248-1264.
- [15] Czabotar PE, Garcia-Saez AJ. Mechanisms of BCL-2 family proteins in mitochondrial apoptosis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24 (10): 732-748.
- [16] Bertram K, Leary PJ, Boudesco C, et al. Inhibitors of Bcl-2 and Bruton's tyrosine kinase synergize to abrogate diffuse large B-cell lymphoma growth in vitro and in orthotopic xenotransplantation models [J]. *Leukemia*, 2022, 36 (4): 1035-1047.
- [17] Haselager MV, Kielbassa K, Ter Burg J, et al. Changes in Bcl-2 members after ibrutinib or venetoclax uncover functional hierarchy in determining resistance to venetoclax in CLL [J]. *Blood*, 2020, 136 (25): 2918-2926.
- [18] Aumann S, Shaulov A, Haran A, et al. The emerging role of venetoclax-based treatments in acute lymphoblastic leukemia [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (18): 10957.
- [19] Melani C, Lakhota R, Pittaluga S, et al. Combination targeted therapy in relapsed diffuse large B-cell lymphoma [J]. *N Engl J Med*, 2024, 390 (23): 2143-2155.
- [20] Kuo HP, Ezell SA, Schweighofer KJ, et al. Combination of Ibrutinib and ABT-199 in diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma [J]. *Mol Cancer Ther*, 2017, 16 (7): 1246-1256.
- [21] Ianevski A, Giri AK, Aittokallio T. SynergyFinder 3.0: an interactive analysis and consensus interpretation of multi-drug synergies across multiple samples [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50 (W1): W739-W743.
- [22] Timofeeva N, Gandhi V. Ibrutinib combinations in CLL therapy: scientific rationale and clinical results [J]. *Blood Cancer J*, 2021, 11 (4): 79.
- [23] Wu L, Zhang YZ, Xia B, et al. Ibrutinib inhibits mesenchymal stem cells-mediated drug resistance in diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, 2017, 38 (12): 1036-1042.
- [24] Hou KL, Yu ZY, Jia YP, et al. Efficacy and safety of ibrutinib in diffuse large B-cell lymphoma: a single-arm meta-analysis [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2020, 152: 103010.
- [25] Korotkov SM. Mitochondrial oxidative stress is the general reason for apoptosis induced by different-valence heavy metals in cells and mitochondria [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (19): 14459.
- [26] Xue Q, Kang R, Klionsky DJ, et al. Copper metabolism in cell death and autophagy [J]. *Autophagy*, 2023, 19 (8): 2175-2195.

(收稿日期: 2024-12-13; 修回日期: 2025-03-12)

# 羊角棉枝叶的化学成分研究

秦文秀, 于硕, 李畅, 裴月湖, 杨异卉\* (哈尔滨医科大学药学院, 药物化学与天然药物化学教研室, 哈尔滨 150000)

**摘要:** **目的** 研究鸡骨常山属羊角棉 (*Alstonia mairei* Lévl.) 枝叶中的化学成分。**方法** 羊角棉枝叶药材经 95% 乙醇提取得到提取物, 再利用 MCI 凝胶柱进行初步分离, 其中 90% 乙醇洗脱部位再利用各种柱色谱方法如硅胶、ODS、制备型高效液相色谱等进行化学组分的细致分离, 最后通过核磁共振氢谱和碳谱对化合物进行结构鉴定。**结果** 从羊角棉中分离并鉴定了 10 个化合物, 分别为四氢鸭脚木碱(1)、柯楠次碱(2)、拉兹马宁碱(3)、维洛斯明碱(4)、钩藤碱 E(5)、19 (*S*)-epimisiline (6)、antiquorin (7)、3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 20-trihydroxy-15 $\beta$ -cinnamoyloxy-14-oxolathyr-6Z, 12E-diene (8)、橘皮素(9)和丁香脂素(10)。**结论** 化合物 5~9 为首次从鸡骨常山属植物中分离鉴定, 化合物 2~4 以及 10 为首次从羊角棉中分离鉴定, 其中化合物 1~6 为单萜吲哚类生物碱。

**关键词:** 羊角棉; 化学成分; 吲哚类生物碱; 鸡骨常山属

**中图分类号:** R284.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-2981(2025)06-1653-06

**doi:** 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.023

## Chemical constituents in the twigs and leaves of *Alstonia mairei* Lévl.

QIN Wen-xiu, YU Shuo, LI Chang, PEI Yue-hu, YANG Yi-hui\* (Department of Medicinal Chemistry and Natural Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Harbin Medical University, Harbin 150000)

**Abstract: Objective** To determine the chemical constituents in the twigs and leaves of *Alstonia mairei* Lévl. **Methods** The twigs and leaves of *Alstonia mairei* Lévl were extracted with 95% ethanol and then isolated by MCI gel column. The part with 90% ethanol elution was separated by various column chromatography methods, such as silica gel, ODS, preparative high-performance liquid chromatography (HPLC), etc. Finally, the chemical structures of the isolated compounds were identified by the <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR spectra. **Results** Totally 10 compounds were isolated and identified from *Alstonia mairei* Lévl. as tetrahydroalstonine (1), corynanthine (2), 16-*epi*-isositsirikine (3), vellosimine (4), uncarine E (5), 19 (*S*)-epimisiline (6), antiquorin (7), 3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 20-trihydroxy-15 $\beta$ -cinnamoyloxy-14-oxolathyr-6Z, 12E-diene (8), tangeritin (9) and syringaresinol (10). **Conclusion** Compounds 5~9 have been isolated from *Alstonia* for the first time. Compounds 2~4 and 10 have been isolated and identified from *Alstonia mairei* Lévl. for the first time, and compounds 1~6 are monoterpenoid indole alkaloids.

**Key words:** *Alstonia mairei* Lévl.; chemical constituent; indole alkaloid; *Alstonia*

羊角棉 (*Alstonia mairei* Lévl.) 是夹竹桃科鸡骨常山属植物, 主要分布于中国南方海拔 700~1500 m 的山区, 是民间重要的药用植物, 具有止血、解毒的作用<sup>[1]</sup>。鸡骨常山属 (*Alstonia*) 植物属于常绿乔木和灌木, 广泛分布于非洲、美洲中部、亚洲东南部、大洋洲的热带和亚热带地区, 该属植物富含色胺与裂环马钱子苷缩合而成的吲哚类生物碱, 是吲哚类生物碱的丰富来源<sup>[2-4]</sup>。鸡骨常山属植物富含

生物碱, 此外还含有萜类和黄酮类等化学成分。目前关于该属植物化学成分的研究主要集中在鸡骨常山、盆架树、糖胶树等, 而对该属植物羊角棉的研究很少, 仅有 3 篇文献报道了其化学成分, 共从中分离鉴定了 10 个化合物, 均为单萜吲哚类生物碱, 分别为 alstomairines A~G、maireines A、maireines B 和 (14 $\alpha$ , 15 $\alpha$ )-14, 15-epoxyaspidofractinine, 其中 alstomairine B~E 及 alstomairine G 对肿瘤细胞

**作者简介:** 秦文秀, 女, 在读硕士研究生, 主要从事天然产物的提取与分离研究, email: qinwenxiu99@163.com \*通信作者: 杨异卉, 女, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事天然药物化学研究, email: yangyihui19790508@sina.com



有良好的抑制作用<sup>[1, 5]</sup>。吲哚类生物碱在鸡骨常山属植物中广泛存在, 具有多种药理活性, 例如降血糖<sup>[6]</sup>、抗菌<sup>[7]</sup>、抗炎<sup>[8]</sup>、抗肿瘤<sup>[9-10]</sup>等作用。因此, 本课题组对鸡骨常山属羊角棉展开化学成分研究, 对其可能含有吲哚类生物碱的中、低极性部位进行系统的成分分离, 为进一步明确羊角棉的化学组分及其深入开发提供依据。

## 1 材料

核磁共振光谱仪 AV-400/AV-400 (瑞士 Bruker 公司); 高效液相色谱仪 (日本 Shimadzu 公司)。硅胶 (青岛海洋化工有限公司); MCI 凝胶 (日本三菱化学公司); Sephadex LH-20 (美国 Pharmacia 公司); HW-40 填料 (日本 Tosoh 公司); 色谱级甲醇 (河北百灵威超精细材料有限公司); 分析级有机试剂 (天津市富宇精细化工有限公司)。羊角棉 (*Alstonia mairei* Lévl.) 采购于云南, 由昆明植分生物技术有限公司鉴定为羊角棉, 药材标本保存在哈尔滨医科大学药学院 610 室。

## 2 提取与分离

羊角棉枝叶药材 50 kg 以 95% 乙醇加热回流提取 3 次, 提取液浓缩得到羊角棉醇提取物 2638.0 g, 再利用 MCI 凝胶柱对提取物进行分离, 乙醇-水梯

度洗脱, 其中 90% 乙醇洗脱部位共 110.0 g。后续对该部位进行化学成分分离, 采用硅胶柱色谱以及二氯甲烷-甲醇梯度洗脱, 经薄层色谱 (TLC) 检视后合并相同馏分, 得到 Fr.1 ~ Fr.13。Fr.7 (8.2 g) 采用 ODS 柱色谱分离, 甲醇-水梯度洗脱, 得到 Fr.7-1 ~ Fr.7-17。Fr.7-4 (780.6 mg) 先采用硅胶柱色谱分离, 后续通过半制备型液相色谱纯化 (甲醇-水, 65:35), 得到化合物 **8** ( $t_R$  27.5 min, 5.6 mg)。Fr.7-5 (1.3 g) 经硅胶、HW40 和 Sephadex LH-20 柱色谱分离纯化, 得到化合物 **10** (6.8 mg)。Fr.7-11 (232.8 mg) 经硅胶和 Sephadex LH-20 柱色谱分离得到化合物 **6** (2.0 mg) 与化合物 **7** (6.0 mg)。Fr.7-15 (241.7 mg) 经硅胶和 Sephadex LH-20 柱色谱分离后得到化合物 **5** (19.4 mg) 与化合物 **9** (1.0 mg)。Fr.7-17 (1.1 g) 经硅胶柱色谱分离得到化合物 **1** (2.3 mg)。Fr.11 (9.2 g) 采用 ODS 柱色谱分离, 甲醇-水梯度洗脱, 得到 Fr.11-1 ~ Fr.11-10。Fr.11-2 (297.5 mg) 采用硅胶和 Sephadex LH-20 柱色谱分离得到化合物 **3** (2.0 mg)。Fr.11-6 (1.7 g) 多次利用硅胶柱色谱分离以及 Sephadex LH-20 柱色谱纯化, 得到化合物 **2** (2.0 mg) 与化合物 **4** (1.5 mg)。化合物 **1** ~ **10** 的结构见图 1。

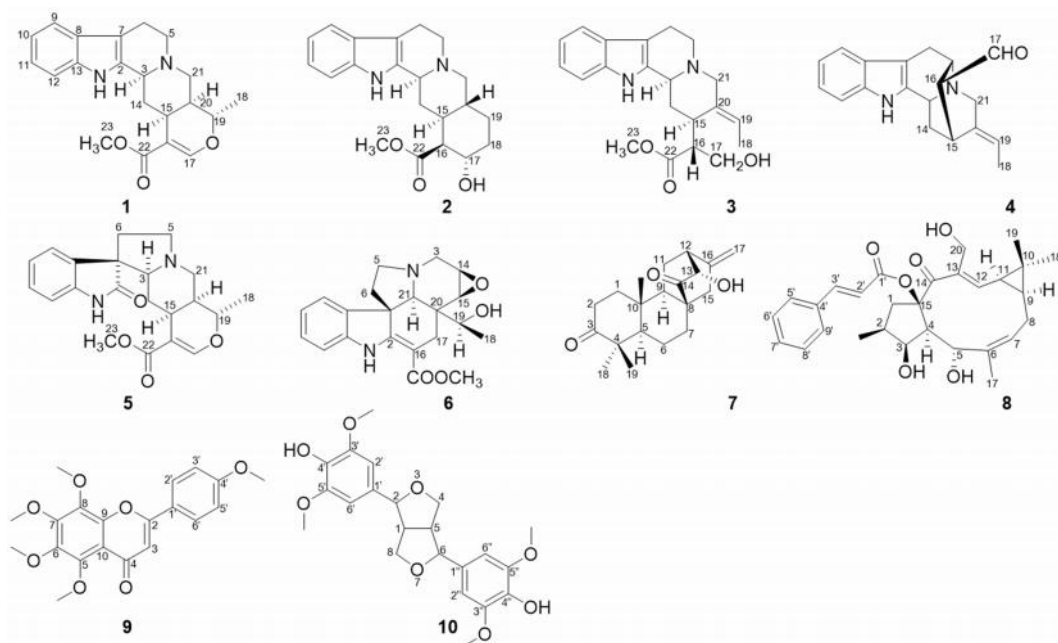


图 1 化合物 **1** ~ **10** 的化学结构

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

## 3 结构鉴定

化合物 **1**, 橙黄色粉末, 易溶于二氯甲烷。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 谱显示有一个连氮质子信号  $\delta$  7.81 (1H, s, -NH), 一组 1, 2-二取代苯环质子信号  $\delta$  7.45 (1H, d,  $J = 7.7$  Hz)、 $\delta$  7.08 (1H, td,  $J = 7.7, 1.1$  Hz)、 $\delta$  7.13 (1H,

td,  $J = 7.7, 1.2$  Hz) 和  $\delta$  7.28 (1H, d,  $J = 7.7$  Hz), 提示存在吲哚环结构。氢谱还显示烯烃质子信号  $\delta$  7.56 (1H, s)、甲基质子信号  $\delta$  1.41 (3H, d,  $J = 6.2$  Hz) 以及甲氧基质子信号  $\delta$  3.75 (3H, s)。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.81 (1H, s, -NH), 3.36 (1H, dd,  $J = 11.6, 2.5$  Hz,

H-3), 3.11 (1H, dd,  $J = 12.3, 2.0$  Hz, H-5a), 2.92 (1H, m, H-5b), 2.70 (1H, m, H-6a), 2.56 (1H, m, H-6b), 7.45 (1H, d,  $J = 7.7$  Hz, H-9), 7.08 (1H, td,  $J = 7.7, 1.1$  Hz, H-10), 7.13 (1H, td,  $J = 7.7, 1.2$  Hz, H-11), 7.28 (1H, d,  $J = 7.7$  Hz, H-12), 1.70 (1H, m, H-14a), 1.60 (1H, m, H-14b), 2.50 (1H, dt,  $J = 13.0, 3.6$  Hz, H-15), 7.56 (1H, s, H-17), 1.41 (3H, d,  $J = 6.2$  Hz, H-18), 4.50 (1H, m, H-19), 1.54 (1H, q,  $J = 12.2$  Hz, H-20), 2.96 (1H, m, H-21a), 2.74 (1H, m, H-21b), 3.75 (3H, s, H-23)。 $^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 134.7 (C-2), 60.0 (C-3), 53.7 (C-5), 34.4 (C-6), 109.7 (C-7), 127.4 (C-8), 121.5 (C-9), 110.9 (C-10), 119.5 (C-11), 118.2 (C-12), 136.1 (C-13), 21.9 (C-14), 31.5 (C-15), 108.3 (C-16), 155.9 (C-17), 18.7 (C-18), 72.6 (C-19), 38.6 (C-20), 56.5 (C-21), 168.1 (C-22), 51.2 (C-23)。以上数据与文献报道<sup>[11]</sup>基本一致, 故鉴定化合物 **1** 为四氢鸭脚木碱。

化合物 **2**, 棕褐色粉末, 易溶于二氯甲烷。 $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.85 (1H, s, -NH), 3.34 (1H, d,  $J = 11.4$  Hz, H-3), 2.66 ~ 2.58 (1H, m, H-5a), 3.11 (1H, dd,  $J = 11.6, 5.8$  Hz, H-5b), 3.07 ~ 3.00 (1H, m, H-6a), 2.78 ~ 2.70 (1H, m, H-6b), 7.46 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-9), 7.09 (1H, t,  $J = 7.4$  Hz, H-10), 7.15 (1H, t,  $J = 7.4$  Hz, H-11), 7.33 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-12), 1.44 ~ 1.38 (1H, m, H-14a), 1.77 ~ 1.70 (1H, m, H-14b), 1.87 (1H, d,  $J = 12.8$  Hz, H-15), 2.66 ~ 2.58 (1H, m, H-16), 4.23 (1H, m, H-17), 1.73 (1H, d,  $J = 13.0$  Hz, H-18a), 2.21 ~ 2.11 (1H, m, H-18b), 1.44 ~ 1.38 (1H, m, H-19), 2.04 (1H, m, H-20), 2.09 (1H, m, H-21a), 2.99 (1H, dd,  $J = 11.4, 4.0$  Hz, H-21b), 3.59 (3H, s, H-23)。 $^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 134.6 (C-2), 60.4 (C-3), 52.9 (C-5), 21.7 (C-6), 108.2 (C-7), 127.5 (C-8), 118.3 (C-9), 119.6 (C-10), 121.6 (C-11), 111.0 (C-12), 136.2 (C-13), 33.9 (C-14), 37.0 (C-15), 51.1 (C-16), 67.4 (C-17), 28.8 (C-18), 23.8 (C-19), 34.9 (C-20), 62.2 (C-21), 172.5 (C-22), 51.1 (C-23)。以上数据与文献报道<sup>[12]</sup>基本一致, 故鉴定化合物 **2** 为柯楠次碱。

化合物 **3**, 黄色粉末, 易溶于甲醇。 $^1\text{H-NMR}$

(600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 4.35 (1H, s, H-3), 3.27 (1H, m, H-5a), 3.22 (1H, m, H-5b), 3.05 (1H, m, H-6a), 2.71 (1H, d,  $J = 15.4$  Hz, H-6b), 7.41 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-9), 7.00 (1H, td,  $J = 8.0, 1.2$  Hz, H-10), 7.08 (1H, td,  $J = 8.0, 1.2$  Hz, H-11), 7.31 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-12), 2.20 (1H, m, H-14a), 2.33 (1H, dt,  $J = 14.9, 5.0$  Hz, H-14b), 3.10 (1H, m, H-15), 2.44 (1H, m, H-16), 3.46 ~ 3.49 (2H, m, H-17), 1.72 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz, H-18), 5.73 (1H, q,  $J = 6.8$  Hz, H-19), 3.63 (1H, d,  $J = 12.0$  Hz, H-21a), 3.16 (1H, d,  $J = 12.0$  Hz, H-21b), 3.76 (3H, s, H-23)。 $^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 134.4 (C-2), 52.2 (C-3), 50.8 (C-5), 18.7 (C-6), 107.1 (C-7), 128.3 (C-8), 118.8 (C-9), 120.0 (C-10), 121.5 (C-11), 112.1 (C-12), 138.0 (C-13), 31.2 (C-14), 34.0 (C-15), 49.1 (C-16), 63.1 (C-17), 13.4 (C-18), 122.5 (C-19), 134.4 (C-20), 54.1 (C-21), 176.3 (C-22), 51.7 (C-23)。以上数据与文献报道<sup>[13]</sup>基本一致, 故鉴定化合物 **3** 为拉兹马宁碱。

化合物 **4**, 白色粉末, 易溶于二氯甲烷。 $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.81 (1H, s, -NH), 4.20 (1H, d,  $J = 10.2$  Hz, H-3), 3.65 ~ 3.58 (1H, m, H-5), 3.14 (1H, dd,  $J = 15.5, 5.2$  Hz, H-6a), 2.60 (1H, d,  $J = 15.5$  Hz, H-6b), 7.47 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-9), 7.10 (1H, t,  $J = 7.8$  Hz, H-10), 7.16 (1H, t,  $J = 7.8$  Hz, H-11), 7.33 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-12), 2.08 (1H, ddd,  $J = 12.5, 10.2, 2.0$  Hz, H-14a), 1.87 (1H, dt,  $J = 12.5, 3.6$  Hz, H-14b), 3.21 (1H, m, H-15), 2.52 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz, H-16), 9.65 (1H, s, H-17), 1.61 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-18), 5.35 (1H, q,  $J = 7.0$  Hz, H-19), 3.64 (1H, d,  $J = 16.9$  Hz, H-21a), 3.59 (1H, m, H-21b)。 $^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 137.9 (C-2), 50.6 (C-3), 50.7 (C-5), 27.4 (C-6), 104.6 (C-7), 127.7 (C-8), 118.4 (C-9), 119.8 (C-10), 121.9 (C-11), 111.0 (C-12), 136.5 (C-13), 33.1 (C-14), 27.0 (C-15), 55.1 (C-16), 203.0 (C-17), 12.8 (C-18), 117.1 (C-19), 134.5 (C-20), 56.1 (C-21)。以上数据与文献报道<sup>[14]</sup>基本一致, 故鉴定化合物 **4** 为维洛斯明碱。

化合物 **5**, 白色粉末, 易溶于二氯甲

烷。 $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.45 (1H, s, -NH), 2.54 (1H, dd,  $J = 11.6, 2.9$  Hz, H-3), 2.46 ~ 2.35 (2H, m, H-5a), 3.21 (1H, td,  $J = 8.5, 2.4$  Hz, H-5b), 1.99 (1H, dt,  $J = 12.8, 8.5$  Hz, H-6a), 2.46 ~ 2.35 (1H, m, H-6b), 7.27 (1H, d,  $J = 7.7$  Hz, H-9), 7.03 (1H, td,  $J = 7.7, 1.0$  Hz, H-10), 7.19 (1H, td,  $J = 7.7, 1.3$  Hz, H-11), 6.84 (1H, d,  $J = 7.7$  Hz, H-12), 1.60 (1H, m, H-14a), 0.85 (1H, m, H-14b), 2.49 (1H, dt,  $J = 11.7, 4.4$  Hz, H-15), 7.41 (1H, s, H-17), 1.41 (3H, d,  $J = 6.2$  Hz, H-18), 4.34 (1H, m, H-19), 1.59 (1H, m, H-20), 2.46 ~ 2.35 (2H, m, H-21a), 3.28 (1H, dd,  $J = 11.9, 2.0$  Hz, H-21b), 3.60 (3H, s, H-23)。 $^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 180.8 (C-2), 71.5 (C-3), 54.3 (C-5), 35.0 (C-6), 56.9 (C-7), 133.9 (C-8), 124.8 (C-9), 122.8 (C-10), 127.8 (C-11), 110.0 (C-12), 140.1 (C-13), 30.3 (C-14), 30.6 (C-15), 109.5 (C-16), 155.1 (C-17), 18.8 (C-18), 72.3 (C-19), 38.0 (C-20), 53.7 (C-21), 167.8 (C-22), 51.1 (C-23)。以上数据与文献报道<sup>[15]</sup>基本一致, 故鉴定化合物 **5** 为钩藤碱 E。

化合物 **6**, 黄色粉末, 易溶于二氯甲烷。 $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.88 (1H, s, -NH), 5.30 (1H, s, -OH), 2.85 ~ 2.91 (1H, m, H-3a), 3.52 (1H, dd,  $J = 12.7, 5.5$  Hz, H-3b), 2.85 ~ 2.91 (1H, m, H-5a), 2.47 (1H, ddd,  $J = 12.6, 8.6, 4.6$  Hz, H-5b), 1.73 (1H, dd,  $J = 11.6, 4.6$  Hz, H-6a), 1.97 (1H, td,  $J = 11.6, 6.4$  Hz, H-6b), 7.15 (1H, d,  $J = 7.5$  Hz, H-9), 6.86 (1H, t,  $J = 7.5$  Hz, H-10), 7.13 (1H, t,  $J = 7.7$  Hz, H-11), 6.80 (1H, d,  $J = 7.7$  Hz, H-12), 3.40 (1H, t,  $J = 4.7$  Hz, H-14), 3.17 (1H, d,  $J = 4.0$  Hz, H-15), 2.62 (1H, d,  $J = 14.9$  Hz, H-17a), 2.80 (1H, d,  $J = 14.9$  Hz, H-17b), 1.12 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-18), 3.59 (1H, q,  $J = 6.6$  Hz, H-19), 2.75 (1H, s, H-21), 3.80 (3H, s, H-23)。 $^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 168.8 (C-2), 50.8 (C-3), 50.1 (C-5), 45.4 (C-6), 55.6 (C-7), 137.2 (C-8), 121.0 (C-9), 121.0 (C-10), 127.9 (C-11), 109.7 (C-12), 143.2 (C-13), 51.2 (C-14), 56.3 (C-15), 90.6 (C-16), 23.6 (C-17), 19.0 (C-18), 63.8 (C-19), 44.9 (C-20), 69.2 (C-21), 168.6 (C-22), 51.4 (C-23)。以上数据与文献报道<sup>[16]</sup>基本一致, 故鉴定化合物 **6** 为 19(S)-

epimisiline。

化合物 **7**, 淡黄色粉末, 易溶于二氯甲烷。 $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.86 (1H, ddd,  $J = 13.4, 6.4, 3.2$  Hz, H-1a), 1.39 (1H, td,  $J = 13.4, 5.5$  Hz, H-1b), 2.55 (1H, ddd,  $J = 15.9, 13.2, 6.4$  Hz, H-2a), 2.34 (1H, ddd,  $J = 15.7, 5.5, 3.2$  Hz, H-2b), 1.31 (1H, m, H-5), 1.54 ~ 1.48 (2H, m, H-6), 2.41 (1H, dt,  $J = 13.5, 3.3$  Hz, H-7a), 0.95 (1H, m, H-7b), 1.66 (1H, dd,  $J = 11.5, 6.2$  Hz, H-9), 2.01 (1H, ddd,  $J = 14.0, 11.5, 3.8$  Hz, H-11a), 1.75 (1H, ddd,  $J = 14.1, 6.2, 2.6$  Hz, H-11b), 2.82 (1H, q,  $J = 3.1$  Hz, H-12), 3.88 (1H, t,  $J = 2.9$  Hz, H-13), 2.32 (2H, m, H-15), 5.02 (1H, d,  $J = 1.2$  Hz, H-17a), 4.86 (1H, d,  $J = 1.2$  Hz, H-17b), 1.00 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-4}\alpha$ ), 1.08 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-4}\beta$ ), 0.84 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-10}$ )。 $^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 36.8 (C-1), 34.2 (C-2), 216.2 (C-3), 47.4 (C-4), 55.3 (C-5), 20.1 (C-6), 30.5 (C-7), 47.6 (C-8), 51.2 (C-9), 37.7 (C-10), 25.5 (C-11), 44.9 (C-12), 75.3 (C-13), 218.2 (C-14), 43.8 (C-15), 142.4 (C-16), 111.3 (C-17), 26.2 ( $\text{CH}_3\text{-4}\alpha$ ), 21.9 ( $\text{CH}_3\text{-4}\beta$ ), 13.7 ( $\text{CH}_3\text{-10}$ )。以上数据与文献报道<sup>[17]</sup>基本一致, 故鉴定化合物 **7** 为 antiquorin。

化合物 **8**, 白色粉末, 易溶于二氯甲烷。 $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.40 (1H, dd,  $J = 13.7, 7.8$  Hz, H-1a), 1.75 (1H, t,  $J = 13.3$  Hz, H-1b), 2.02 ~ 2.13 (1H, m, H-2), 4.42 (1H, t,  $J = 3.5$  Hz, H-3), 2.25 (1H, dd,  $J = 6.7, 3.5$  Hz, H-4), 5.44 (1H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-5), 5.31 (1H, dd,  $J = 12.2, 3.2$  Hz, H-7), 2.36 (1H, m, H-8a), 2.43 (1H, m, H-8b), 1.42 (1H, m, H-9), 1.63 (1H, m, H-11), 6.75 (1H, d,  $J = 11.9$  Hz, H-12), 1.05 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-16), 1.69 (3H, s, H-17), 1.09 (3H, s, H-18), 0.85 (3H, s, H-19), 4.35 (1H, d,  $J = 12.1$  Hz, H-20a), 4.25 (1H, d,  $J = 12.1$  Hz, H-20b), 6.49 (1H, d,  $J = 15.9$  Hz, H-2'), 7.71 (1H, d,  $J = 15.9$  Hz, H-3'), 7.51 (2H, m, H-5', H-9'), 7.40 (3H, m, H-6', H-7', H-8')。 $^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 47.2 (C-1), 37.8 (C-2), 79.7 (C-3), 54.9 (C-4), 65.7 (C-5), 135.9 (C-6), 127.3 (C-7), 23.9 (C-8), 33.5 (C-9), 27.3 (C-10), 28.7 (C-11), 147.3 (C-12), 135.4 (C-13), 199.3 (C-14), 92.6 (C-



15), 13.5 (C-16), 17.9 (C-17), 27.9 (C-18), 16.9 (C-19), 58.0 (C-20), 166.0 (C-1'), 117.7 (C-2'), 146.9 (C-3'), 134.1 (C-4'), 128.4 (C-5', C-9'), 129.2 (C-6', C-8'), 131 (C-7')。以上数据与文献报道<sup>[18]</sup>基本一致,故鉴定化合物 **8** 为  $3\beta$ ,  $5\alpha$ , 20-trihydroxy-15 $\beta$ -cinnamoyloxy-14-oxolathyr-6Z, 12E-diene。

化合物 **9**, 黄色针晶 (氯仿), 易溶于二氯甲烷。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 6.61 (1H, s, H-3), 7.88 (2H, d,  $J$  = 8.8 Hz, H-2', 6'), 7.03 (2H, d,  $J$  = 8.8 Hz, H-3', 5'), 4.10 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 4.02 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.95 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.95 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.89 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>)。<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 161.3 (C-2), 106.9 (C-3), 177.5 (C-4), 148.6 (C-5), 144.2 (C-6), 151.2 (C-7), 139.0 (C-8), 147.9 (C-9), 124.0 (C-1'), 127.9 (C-2', 6'), 114.7 (C-3', 5', 10'), 162.4 (C-4'), 62.4 (-OCH<sub>3</sub>), 62.2 (-OCH<sub>3</sub>), 62.0 (-OCH<sub>3</sub>), 61.8 (-OCH<sub>3</sub>), 55.7 (-OCH<sub>3</sub>)。以上数据与文献报道<sup>[19]</sup>基本一致,故鉴定化合物 **9** 为橘皮素。

化合物 **10**, 浅棕色粉末, 易溶于二氯甲烷。<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 6.58 (4H, s, H-2, 6, 2', 6'), 4.73 (2H, d,  $J$  = 4.2 Hz, H-7, 7'), 3.09 (2H, m, H-8, 8'), 4.28 (2H, dd,  $J$  = 9.2, 6.8 Hz, H-9a, 9a'), 3.91 (2H, m, H-9b, 9b'), 3.90 (12H, s, -OCH<sub>3</sub>-3, 5, 3', 5'), 5.51 (2H, s, -OH-4, 4')。<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 132.3 (C-1, 1'), 102.9 (C-2, 6, 2', 6'), 147.3 (C-3, 5, 3', 5'), 134.5 (C-4, 4'), 86.2 (C-7, 7'), 54.5 (C-8, 8'), 72.0 (C-9a, 9a', 9b, 9b'), 56.5 (-OCH<sub>3</sub>-3, 5, 3', 5')。以上数据与文献报道<sup>[20]</sup>基本一致,故鉴定化合物 **10** 为丁香脂素。

#### 4 结果与讨论

本研究对羊角棉枝叶提取物的中、低极性部位化学成分进行系统性研究,利用多种色谱和光谱技术共分离鉴定了 10 个化合物,包括 6 个单萜吲哚类生物碱、2 个萜类化合物、1 个木脂素类化合物和 1 个黄酮类化合物,其中化合物 **5** ~ **9** 为首次从鸡骨常山属植物中分离鉴定,化合物 **2** ~ **4** 以及 **10** 为首次从羊角棉中分离鉴定。文献报道单萜吲哚类生物碱具有良好的生物活性,如化合物 **1** 和化合物 **5** 均具有神经保护作用,对大鼠皮层原代神经元给予氧糖剥夺/复氧处理后,模拟体外脑缺血再灌注损伤的过程中,化合物 **1** 可以促进神

经元损伤后的恢复,其半数效应浓度 ( $EC_{50}$ ) 值为 ( $1.79 \pm 0.23$ )  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[21]</sup>;化合物 **5** 可以抑制  $\beta$  淀粉样蛋白 ( $A\beta$ ) 聚集,在浓度为 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,抑制率达到了 91%,展现了抗阿尔茨海默病的潜力<sup>[22]</sup>。化合物 **2** 具有抗利什曼原虫活性,其半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 值为 ( $23.4 \pm 5.4$ )  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[12]</sup>。化合物 **4** 对 MIA PaCa-2、MDA-MB-231、HeLa、A549、MCF-7、CT26、HCT 116 和 A375 等多种肿瘤细胞系均展现出细胞毒活性,其  $IC_{50}$  值为 20.2 ~ 32.6  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[23]</sup>。综上所述,本研究从羊角棉枝叶提取物的中、低极性部位分离鉴定的单萜吲哚类生物碱具有多种生物活性,表明该植物可能具有神经保护和抗肿瘤的药理作用,后续可继续追踪该植物中吲哚类生物碱成分,探索构效关系,并进一步挖掘羊角棉的药用价值。

#### 参考文献

- [1] Cai XH, Zeng CX, Feng T, et al. Monoterpenoid indole alkaloids from *Alstonia mairei* [J]. *Helv Chim Acta*, 2010, 93 (10): 2037-2044.
- [2] Ku WF, Tan SJ, Low YY, et al. Angustilobine and dranginine type indole alkaloids and an uleine-secovallesamine bisindole alkaloid from *Alstonia angustiloba* [J]. *Phytochemistry*, 2011, 72 (17): 2212-2218.
- [3] Li YQ, Cai J, Cheng JX, et al. Alstomairines D-G: new monoterpenoid indole alkaloids with cytotoxic activity from *Alstonia mairei* [J]. *J Mol Struct*, 2022, 1253 (5): 132277.
- [4] Pan L, Terrazas C, Acuña UM, et al. Bioactive indole alkaloids isolated from *Alstonia angustifolia* [J]. *Phytochem Lett*, 2014, 10: 54-59.
- [5] Yan TL, Han DX, Hu J, et al. Monoterpenoid indole alkaloids from *Alstonia mairei* and their cytotoxicity [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2017, 19 (6): 550-556.
- [6] Oyebo OA, Erukainure OL, Mopuri R, et al. Butanol fraction of *Alstonia boonei* De Wild. leaves ameliorate oxidative stress and modulate key hypoglycaemic processes in diabetic rats [J]. *Arch Physiol Biochem*, 2023, 129 (5): 1091-1104.
- [7] Zhang L, Hua ZQ, Song Y, et al. Monoterpenoid indole alkaloids from *Alstonia rupestris* with cytotoxic, antibacterial and antifungal activities [J]. *Fitoterapia*, 2014, 97: 142-147.
- [8] Cao P, Liang Y, Gao X, et al. Monoterpenoid indole alkaloids from *Alstonia yunnanensis* and their cytotoxic and anti-inflammatory activities [J]. *Molecules*, 2012, 17 (11): 13631-13641.
- [9] Mohammed AE, Abdul-Hameed ZH, Alotaibi MO, et al. Chemical diversity and bioactivities of monoterpenoid indole alkaloids (MIAs) from six *Apocynaceae* genera [J]. *Molecules*, 2021, 26 (2): 488.
- [10] Yeap JSY, Tan CH, Yong KT, et al. Macroline, talpinine, and sarpagine alkaloids from *Alstonia penangiana*. An NMR-based method for differentiating between *A. pen-*

- angiana* and *A. macrophylla* [J]. *Phytochemistry*, 2020, 176: 112391.
- [11] 杨龄, 肖春贵, 金亚菊, 等. 倒挂金钩茎枝的化学成分研究 [J]. *中草药*, 2018, 49 (10): 2365-2371.
- [12] Stærk D, Lemmich E, Christensen J, et al. Leishmanicidal, antiplasmodial and cytotoxic activity of indole alkaloids from *Corynanthe pachyceras* [J]. *Planta Med*, 2000, 66 (6): 531-536.
- [13] Abdul-Hameed ZH, Alarif WM, Sobhi TR, et al. New cytotoxic indole-type alkaloids obtained from *Rhazya stricta* leaves [J]. *S Afr J Bot*, 2021, 137: 298-302.
- [14] 耿长安, 刘锡葵. 云南萝芙木叶吡啶生物碱 [J]. *高等学校化学学报*, 2010, 31 (4): 731-745.
- [15] Seki H, Takayama H, Aimi N, et al. A nuclear magnetic resonance study on the eleven stereoisomers of heteroyohimbine-type oxindole alkaloids [J]. *Chem Pharm Bull*, 1993, 41 (12): 2077-2086.
- [16] Peraza-Sánchez SR, Gamboa-Angulo MM, Erosa-López C, et al. Production of 19 (*S*)-epimisiline by hairy root cultures of *Catharanthus roseus* [J]. *Nat Prod Lett*, 1998, 11 (3): 217-224.
- [17] Abad A, Agulló C, Cuñat AC, et al. Diastereoselective synthesis of antiquorin and related polyoxygenated atisene-type diterpenes [J]. *Tetrahedron*, 2007, 63 (7): 1664-1679.
- [18] 张本印, 王环, 罗晓东, 等. 阴山大戟根化学成分研究 [J]. *中草药*, 2011, 42 (11): 2193-2196.
- [19] 贺钢民, 彭腾, 李柏群, 等. 风芍六君子汤水煎液化学成分研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19 (2): 73-76.
- [20] Kim MJ, Wang HS, Lee MW. Anti-inflammatory effects of fermented bark of *Acanthopanax sessiliflorus* and its isolated compounds on lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 macrophage cells [J]. *Evid Based Compl Alt*, 2020, 2020 (1): 6749425.
- [21] 于潇, 祝琳琳, 徐畅, 等. 无柄果钩藤中 2 个新的单萜吡啶类生物碱 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47 (17): 4650-4657.
- [22] Tan MA, Ishikawa H. Constituents of *Uncaria lanosa* f. *philippinensis* and their anti-amyloidogenic activity [J]. *Nat Prod Res*, 2023, 15: 1-5.
- [23] Qiu HY, Fei XH, Yang JJ, et al. A Bischler-Napieralski and homo-Mannich sequence enables diversified syntheses of sarpagine alkaloids and analogues [J]. *Nat Commun*, 2023, 14 (1): 5560.

(收稿日期: 2024-11-11; 修回日期: 2024-12-06)

## 钽基金属有机凝胶的电化学发光及其在中药材铜离子检测中的应用研究

胡晓蝶<sup>1</sup>, 王雅迪<sup>1</sup>, 李慧萧<sup>1</sup>, 韩智莉<sup>1, 2\*</sup> (1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2. 安徽省活性天然产物重点实验室, 合肥 230012)

**摘要:** **目的** 合成具有优异电化学发光性质的金属有机凝胶材料, 并开发用于中药材中铜离子的检测方法。**方法** 以 5-硼基苯基-1, 3-二羧酸作为配体, 以  $Tb^{3+}$  作为金属节点合成钽基金属有机凝胶 (Tb-MOGs)。利用透射电子显微镜和 X 射线光电子能谱表征材料是否被成功合成。以过硫酸钾作为共反应试剂, 利用循环伏安法研究其电化学发光性质和机制, 并开发电化学发光均相法检测中药材中的重金属铜离子。**结果** 表征结果表明 Tb-MOGs 被成功合成。Tb-MOGs 修饰的氟掺杂氧化锡 (FTO) 电极在负电位下产生了明显的电化学发光发射, Tb-MOGs 电化学发光信号的产生与其本身及过硫酸钾的电还原有关, 氧气也参与了反应的过程。基于此, 将 Tb-MOGs 修饰的电极作为分析界面, 实现了对铜离子的定量分析, 检测范围为  $10 \sim 1000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 检测限为  $1.920 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。**结论** 本研究合成了一种 Tb-MOGs 材料, 在过硫酸钾作为共反应试剂时, 具有强且稳定的电化学发光信号。所开发的分析方法能够实现铜离子的快速和灵敏检测, 在中药材中铜离子的快速定量分析方面具有重要的实际应用前景。

**关键词:** 金属有机凝胶; 电化学发光; 铜离子检测; 药物分析

**中图分类号:** R284.1, O657.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)06-1658-06  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.024

**基金项目:** 国家自然科学基金青年科学基金项目 (No. 22104003); 安徽省高等学校科学研究优秀青年项目 (No. 2024AH030035)。

**作者简介:** 胡晓蝶, 女, 硕士, 主要从事中药饮片中有毒物质的检测, email: 2579829789@qq.com \***通信作者:** 韩智莉, 女, 副教授, 主要从事新型发光材料的制备及其在药物分析中的应用研究, email: han303@ahtcm.edu.cn

## Electrochemiluminescence of terbium-based metal-organic gels in the detection of copper ions in traditional Chinese medicine

HU Xiao-die<sup>1</sup>, WANG Ya-di<sup>1</sup>, LI Hui-xiao<sup>1</sup>, HAN Zhi-li<sup>1, 2\*</sup> (1. Department of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Anhui Key Laboratory of Bioactive Natural Products, Hefei 230012)

**Abstract: Objective** To synthesize a metal-organic gel material with excellent electrochemiluminescence properties and develop an analytical method to detect copper ions in traditional Chinese medicine. **Methods** A terbium-based metal-organic gel (Tb-MOGs) was synthesized with 5-boronophenyl-1, 3-dicarboxylic acid as the ligand and Tb<sup>3+</sup> as the metal node. The electrochemiluminescence properties and mechanism were studied. The material was characterized using transmission electron microscopy and X-ray photoelectron spectroscopy to confirm if it was successfully synthesized. When potassium persulfate was used as a co-reactant, the electrochemiluminescence properties and mechanism were studied, and an analytical method was developed for detecting copper ions in traditional Chinese medicine. **Results** Tb-MOGs material was successfully synthesized. The FTO electrode modified with Tb-MOGs exhibited significant electrochemiluminescence emission under negative potential. The electrochemiluminescence signal of Tb-MOGs was generated in association with their intrinsic properties and the electroreduction of potassium persulfate. Oxygen also participated in the reaction process. Based on this, the electrode modified with Tb-MOGs was used as an analytical interface to quantitatively analyze copper ions, with a detection range of 10 ~ 1000  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  and a detection limit of 1.920  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  with good selectivity. **Conclusion** This study successfully synthesizes a Tb-MOGs material, which exhibits strong and stable electrochemiluminescence signals when potassium persulfate is used as a co-reactant. The method enables rapid and sensitive detection of copper ions, offering important prospects for the rapid and quantitative analysis of copper ions in traditional Chinese medicine.

**Key words:** metal-organic gel; electrochemiluminescence; copper ion detection; pharmaceutical analysis

近年来,随着中药产业的迅速发展和中药材国际市场需求增加,中药材的标准化与安全性问题引起了广泛关注。中药材在种植、加工及储存过程中,可能会受到外部环境中铜元素的污染。特别是在水土资源受到污染的地区,铜离子的积累更为显著。按照 2020 年版《中国药典》的规定,每千克丹参、甘草、芍药和黄芪等药材中的铜离子不能超过 20 mg,而每千克牡蛎、阿胶、珍珠和蛤壳等动物药材中的铜离子应保持不大于 20 mg。因此,系统、快捷且灵敏地检测中药材中的铜离子含量,是确保其临床应用安全性、提高国际市场竞争力的关键。现今,随着分析化学技术的不断进步,许多现代检测方法如原子吸收光谱法<sup>[1]</sup>、电感耦合等离子体质谱法<sup>[2]</sup>、原子荧光光谱法<sup>[3]</sup>、毛细管电泳分析法<sup>[4]</sup>以及化学发光方法<sup>[5]</sup>等已被应用于铜离子的检测。这些方法虽然已取得一些成就,但是为了更好地满足中药材复杂基质中微量元素分析的需求,有必要开发更为高效、成本

更低、灵敏度更高的方法,以提高中药材质量控制的效率和准确性。

电化学发光分析法作为一种有效的痕量分析技术,具有无需光源、仪器简单、灵敏度高、线性范围宽等优点,一直是分析领域的研究热点<sup>[6-7]</sup>。近年来,电化学发光分析法在药物分析中的应用也日益受到人们的关注<sup>[8-9]</sup>。传统的电化学发光材料主要包括无机材料(如钌和铱的配合物)、有机材料(苝、蒽、鲁米诺及其衍生物)以及纳米材料(量子点和金属纳米簇)<sup>[10]</sup>。然而,许多传统发光材料的制备过程复杂且耗时,而且由于电化学降解或与电极表面作用不佳,导致部分材料脱落,从而造成信号损失。近期,金属有机凝胶作为一类新型的超分子凝胶,通过金属与有机配体间的配位、 $\pi-\pi$ 堆积以及氢键等作用力结合组装而成,兼具超分子凝胶和金属有机框架的优点<sup>[11-13]</sup>。金属有机凝胶具有大的比表面积、多级孔道结构、好的热稳定性等优点,在电化学发光领域展现出广阔的应用前景<sup>[14-16]</sup>。



基于此,本研究合成了以 5-硼基苯基-1, 3-二羧酸(5-bop)作为配体和以  $\text{Tb}^{3+}$  作为金属节点的铽基金属有机凝胶(Tb-MOGs)。将 Tb-MOG 涂覆在氟掺杂氧化锡(fluorine doped tin oxide, FTO)电极表面,在干燥后能牢固附着于电极上。在共反应试剂过硫酸钾存在的条件下,该界面能产生强且稳定的电化学发光信号,其电化学发光信号能被铜离子有效地淬灭,可以在一定浓度范围内实现对中药材中铜离子的定量检测,现报道如下。

## 1 试药与仪器

无水乙醇、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)、过硫酸钾、氯化钙( $\text{CaCl}_2$ )、氯化镉( $\text{CdCl}_2$ )、氯化锰( $\text{MnCl}_2$ )、六水氯化铝( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )、氯化锌( $\text{ZnCl}_2$ )、二水氯化铜( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )、氯化钾(KCl)、氯化钠(NaCl)、一水合二硝酸汞( $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )、六水氯化镁( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )和氯化铅( $\text{PbCl}_2$ ) [国药集团化学试剂有限公司(中国)]。六水硝酸铽( $\text{Tb}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )、5-bop、氢氧化钠(麦克林化学试剂有限公司)。桃仁(产地:河北,批号:20204080902)、三七(产地:云南,批号:20250103)、山楂(产地:山东,批号:20240806)和丹参(产地:山东,批号:20250102)购自京东徽都中药材旗舰店,由安徽中医药大学杨青山副教授鉴定,符合药典要求。所有的试剂均为分析纯级别。实验中所用超纯水(18.2 M $\Omega$ )由 Milli-Q 系统(法国 Millipore)制得。

CL19-1 磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司); CHI-760E 电化学分析仪/工作站(上海辰华仪器有限公司); RFL-1 型超微弱化学发光/生物发光检测仪(西安瑞迈分析仪器有限公司); KQ-100TDE 高频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); F-4600 荧光分光光度计和 HT7700 Exalens 透射电子显微镜(日立高新技术公司); ESCALAB 250 X 射线光电子能谱仪(美国热电 Thermo-VG)。

## 2 方法

### 2.1 Tb-MOGs 的合成及表征

Tb-MOGs 的合成参考文献方法<sup>[17]</sup>。首先,称取 45.3 mg  $\text{Tb}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  和 21.0 mg 5-bop 溶解在 10 mL DMF :  $\text{H}_2\text{O}$  = 7 : 3 的溶液中,并剧烈搅拌 5 min。然后将混合溶液转移至 20 mL 反应釜中,在 120 °C 下加热 12 h。加热结束后,将合成的凝胶材料冷却至室温,并转移到 15 mL 的离心管中,离心 5 min 去除上层清液,用 DMF 洗涤两次。所得到的最终产物在冰箱内密封和避光保存,以备使用。

### 2.2 电化学发光检测

Tb-MOGs 的电化学发光检测是在一套传统的三电极系统进行的,包括 Ag/AgCl 参比电极、铂丝对电极和修饰了 Tb-MOGs 的 FTO 工作电极。FTO 电极预先在丙酮、乙醇、超纯水中分别超声 10 min 以清洁电极表面,将打好孔(直径为 6 mm)的聚酰亚胺胶带贴在 FTO 电极表面,以固定电化学反应面积。随后,将 20  $\mu\text{L}$  一定浓度的 Tb-MOGs 水溶液滴涂于 FTO 电极表面,室温下避光晾干即得 Tb-MOGs 修饰的 FTO 电极,并将其用于电化学发光检测。

将制备的 Tb-MOGs 材料滴加在铜网上,待其干燥后利用透射电子显微镜(HT7700 Exalens, 日本日立)对样品进行形貌表征。将浓缩后的 Tb-MOGs 材料滴加到干净的载玻片上,自然晾干,用 X 射线光电子能谱仪表征材料表面的元素组成,实验选用的光源为铝的  $\text{K}\alpha$  射线。

通过循环伏安法研究 Tb-MOGs 的电化学发光性质,测试条件:工作溶液为含有 0.05 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 过硫酸钾的 0.1 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲溶液(pH 7.4),扫描电位范围为 0 V ~ -1.9 V ~ 0 V,扫描速率为 0.1 V  $\cdot$  s<sup>-1</sup>。

### 2.3 铜离子检测

利用 Tb-MOGs 修饰的 FTO 电极检测  $\text{Cu}^{2+}$  时,将不同浓度的  $\text{Cu}^{2+}$  加入含有 0.05 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 过硫酸钾的 0.1 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)中,记录其电化学发光信号。同样,为检验分析方法的选择性,将  $\text{Cu}^{2+}$  替换为可能的干扰物质(包括  $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Pb}^{2+}$ )进行检测。

### 2.4 桃仁、三七、山楂、丹参中药材的前处理

选取桃仁作为代表性药材开展实际采样与检测工作,按照《中国药典》对中药材中铜检测的相关规定进行药材的前处理。首先,精确称取约 10.0 g 的药材粉末,置于聚四氟乙烯消解罐中,随后加入 5 mL 2% 的硝酸与 2 mL 过氧化氢溶液,密封加盖后,在室温条件下浸泡过夜;次日,按照下述程序进行消解:将消解罐放置在加热板上,第一步,由室温升温至 120 °C,并维持 60 min;第二步,从 120 °C 升温至 150 °C,保持 60 min;第三步,从 150 °C 升温至 180 °C,保持 360 min。消解完毕后,进行蒸馏操作,直至消解液剩余 1 ~ 2 mL 时,取出消解罐,冷却至室温。接着,将消解液转移至 50 mL 的离心管中,并用少量水对消解罐进行 4 次洗涤。最后,将所有洗涤液一并转移至量瓶中,用水定容后充分摇匀,即得到待测样品溶液。

采用相同的方法对三七、山楂和丹参样品进行处理,从而获得相应的待测样品溶液。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 Tb-MOGs 的合成及表征

利用透射电子显微镜 (TEM) 对所合成的 Tb-MOGs 的形貌进行表征,结果如图 1A 所示, Tb-MOGs 由直径约为 20 nm, 长度为微米级的纳米线组成。Tb-MOGs 具有凝胶性质,可能是由于这些纳米线具有良好的柔韧性,相互交织并缠绕在一起,限制了溶剂分子在三维网络结构中的自由流动。再利用 X 射线光电能谱 (XPS) 对 Tb-MOGs 的元素组成及状态进行表征,结果如图 1B 所示, Tb-MOGs 主要含有碳、氧、硼和铽元素。上述结果表明,通过  $\text{Tb}^{3+}$  和 5-bop 之间的配位作用,成功合成了 Tb-MOGs。

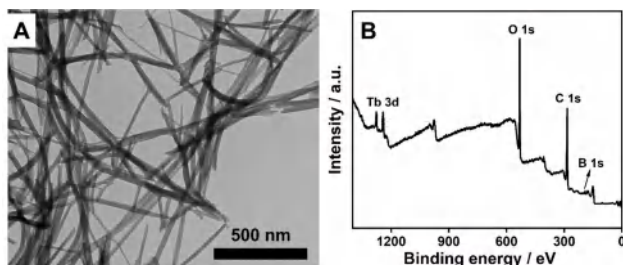


图 1 Tb-MOGs 的 TEM 图 (A) 和 XPS 谱图 (B)

Fig 1 TEM image (A) and XPS spectrum (B) of Tb-MOGs

#### 3.2 Tb-MOGs 的电化学发光性质

在循环伏安条件下,以过硫酸钾作为共反应试剂, Tb-MOGs 修饰的 FTO 电极在负电位下产生了明显的电化学发光发射 (见图 2A)。其起峰电位约为  $-0.5 \text{ V}$ , 并在  $-1.74 \text{ V}$  附近达到最大值。其强的电化学发光发射主要归因于: Tb-MOGs 作为金属有机凝胶具备高比表面积,能提供大的反应界面,促进电化学反应的进行;同时, Tb-MOGs 的多孔结构有助于共反应试剂的高效传输,进一步增强了电化学发光。为了探究该电化学发光峰的来源,对相同条件下的电化学发光光谱进行了采集。Tb-MOGs 位于  $550 \text{ nm}$  附近的发光峰 (见图 2B), 与其位于  $545 \text{ nm}$  荧光发射波长相近 (见图 2C), 表明本体系中的电化学发光体即为 Tb-MOGs。

#### 3.3 Tb-MOGs 的电化学发光机制

为了进一步探究 Tb-MOGs 的电化学发光机制,本研究先对不同条件下获得的循环伏安曲线进行了分析,结果如图 2D 所示。Tb-MOGs 修饰电极在没有过硫酸钾时,在  $-1.3 \text{ V}$  附近有一个弱的还原峰 (黑色曲线), 对应于 Tb-MOGs 的电还原。此外,空白电极 (蓝色曲线) 和 Tb-MOGs (红色曲

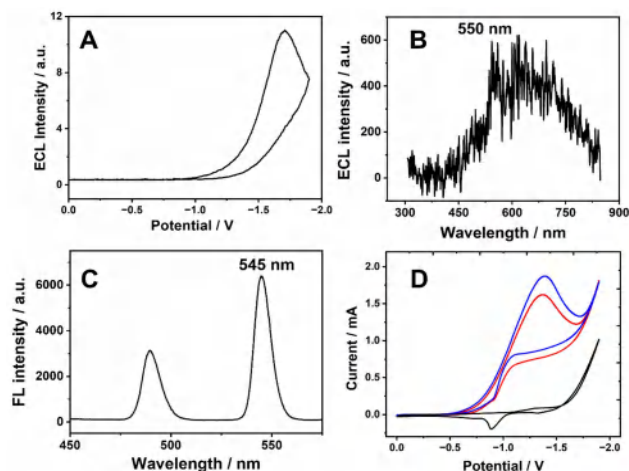


图 2 Tb-MOGs 的电化学发光、荧光和电化学性质

Fig 2 Electrochemiluminescence, fluorescence and electrochemical properties of Tb-MOGs

A. Tb-MOGs 的电化学发光 - 电位曲线 ( $I_{\text{ECL}}-E$  curve of Tb-MOGs); B. Tb-MOGs 的电化学发光光谱 (ECL spectrum of Tb-MOGs); C. Tb-MOGs 的荧光光谱 (激发波长:  $290 \text{ nm}$ ) (fluorescence spectrum of Tb-MOGs, excitation wavelength:  $290 \text{ nm}$ ); D. Tb-MOGs 修饰电极在存在 (红色曲线) 和不存在过硫酸钾时 (黑色曲线) 的循环伏安曲线, 以及空白 FTO 电极在存在过硫酸钾时 (蓝色曲线) 的循环伏安曲线 (cyclic voltammograms of Tb-MOGs modified electrodes in the presence and absence of potassium persulfate, as well as cyclic voltammogram of blank FTO electrode in the presence of potassium persulfate)

线) 修饰电极在  $-1.3 \text{ V}$  附近均展现出一个强的还原峰, 对应于过硫酸钾被电还原生成  $\text{SO}_4^{\cdot -}$ , 这表明 Tb-MOGs 电化学发光信号的产生与其本身及过硫酸钾的电还原有关。然后研究过硫酸钾浓度对 Tb-MOGs 电化学发光的影响, 结果如图 3A 所示, 其电化学发光强度在没有过硫酸钾时消失, 并随着过硫酸钾浓度的增加而增强, 这表明过硫酸钾对于 Tb-MOGs 的电化学发光至关重要。最后, 研究了不同气体氛围对 Tb-MOGs 电化学发光的影响, 结果如图 3B 所示, 其发光信号在氧气饱和条件下增强, 而在氮气饱和条件下降低, 这表明氧气也参与了 Tb-MOGs 的电化学发光过程。

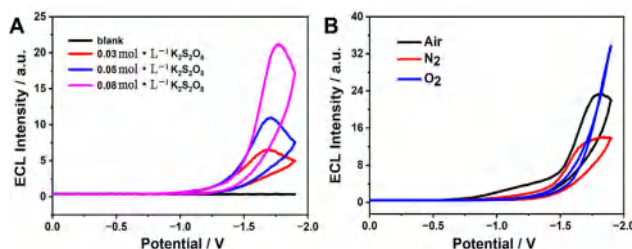


图 3 不同浓度过硫酸钾 (A) 和不同气体氛围下 (B) Tb-MOGs 的电化学发光的发光 - 电位曲线

Fig 3  $I_{\text{ECL}}-E$  curves of Tb-MOGs in different concentrations of potassium persulfate (A) and different gas atmospheres (B)



综上所述,笔者提出了 Tb-MOGs 可能的电化学发光机制:首先溶解氧被电还原生成  $\text{OOH}^-$ , 随后与溶液中的  $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$  作用反应生成  $\text{SO}_4 \cdot^-$ 。其次,  $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$  和 Tb-MOGs 纳米凝胶中的 Tb-MOGs 也可被直接电还原生成  $\text{SO}_4 \cdot^-$  和  $\text{Tb-MOGs} \cdot^-$ 。最后,上述生成的  $\text{SO}_4 \cdot^-$  和  $\text{Tb-MOGs} \cdot^-$  可以反应生成激发态的  $\text{Tb-MOGs}^*$ , 其在返回基态时即伴随着 ECL 发射。

3.4 铜离子检测

基于 Tb-MOGs 修饰电极优异的电化学发光性能,将其作为分析界面,对  $\text{Cu}^{2+}$  进行了定量分析。如图 4A 所示,随着  $\text{Cu}^{2+}$  浓度的增加,电化学发光强度逐渐减弱。在  $10 \sim 1000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的铜离子浓度范围内,电化学发光信号强度 ( $\Delta I = I_0 - I$ ,  $I_0$  和  $I$  分别是在没有铜离子和存在铜离子的情况下记录的电化学发光信号强度)和铜离子

浓度的对数值呈线性关系(见图 4B)。线性回归方程为  $\Delta I = -192.93 + 529.33 \times \log c$  ( $c$  的单位为  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),线性相关系数为 0.999。在信噪比为 3 的情况下,该传感器的检测限为  $1.920 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

为了探究构建的分析界面对于目标物铜离子的选择性,课题组进行了干扰实验。使用 10 种其他金属离子(包括  $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Pb}^{2+}$ ) 作为参照,代替目标物铜离子进行电化学发光实验。这些干扰物的浓度 ( $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 均比铜离子的浓度 ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 高一个数量级。如图 4C 所示,只有存在铜离子时电化学发光强度才会有一个明显的变化,而干扰物对电化学发光强度的影响很小。该结果表明基于 Tb-MOGs 的电化学发光分子界面可以用于选择性检测铜离子。

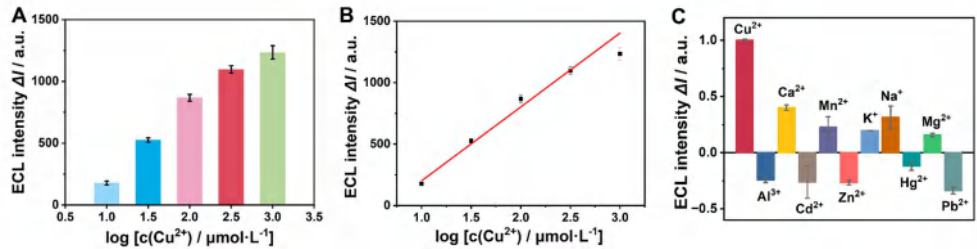


图 4 分析方法检测铜离子的分析性能 ( $n = 3$ )

Fig 4 Analytical performance of the developed analytical method for  $\text{Cu}^{2+}$  detection ( $n = 3$ )

A. 对不同铜离子浓度进行检测时的电化学发光强度 (electrochemiluminescence intensity for detecting different concentrations of copper ions); B. 对应的线性曲线 (the corresponding linear curve); C. 选择性实验 (selectivity experiment)

为了进一步验证分析方法的实用性,选择中药材桃仁作为实际样品,检测其中的铜离子的浓度。测试前用  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸缓冲液 (pH 7.4) 将桃仁储备液稀释 100 000 倍,然后加入浓度分别为  $31.6$ 、 $100$  和  $316 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的铜离子。结果本实验的回收率在  $93.4\% \sim 108.7\%$  内,  $RSD < 5\%$ ,说明实际样品中的基质并不影响所开发的分析方法对铜离子的检测,证明该分析方法具有良好的准确性和实际应用潜力。

最后,为了验证电化学发光分析方法的准确性,选择丹参、三七、山楂三种药材作为实际样品,检测其中的铜离子,并与《中国药典》中电感耦合等离子体质谱法 (ICP-MS) 进行比较。结果如表 1 所示,本研究构建的分析方法检测结果与 ICP-MS 检测结果的  $RSD$  值在  $0.12\% \sim 14.94\%$ ,表明该分析方法具有良好的准确性。此外,该分析方法更为简便、快速且成本更低,在中药材中铜离子的定量分析方面具有重要的实际应用潜力。

表 1 电化学发光分析方法与 ICP-MS 方法对中药材中铜离子的检测结果 ( $n = 3$ )

Tab 1 Compared electrochemiluminescence with ICP-MS method for the detection of  $\text{Cu}^{2+}$  in traditional Chinese medicine ( $n = 3$ )

| 方法       | 中药材中铜离子含量 / ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) |                      |                    |
|----------|-----------------------------------------------------|----------------------|--------------------|
|          | 三七                                                  | 丹参                   | 山楂                 |
| 本研究      | $44.581 \pm 7.476$                                  | $114.395 \pm 18.878$ | $62.545 \pm 4.081$ |
| ICP-MS   | $52.408 \pm 3.385$                                  | $114.262 \pm 4.041$  | $72.360 \pm 1.555$ |
| $RSD/\%$ | 14.94                                               | 0.12                 | 13.56              |

4 结论

本研究合成了一种 Tb-MOGs 材料,将其修饰到 FTO 电极表面,在过硫酸钾作为共反应试剂时,得到了强且稳定的电化学发光信号。经研究提出了相应的电化学发光机制。基于此,将 Tb-MOGs 修饰电极作为分析界面,实现了对铜离子的灵敏检测。该分析方法展现出较宽的线性范围 ( $10 \sim 1000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和较低的检测限 ( $1.920 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),同时具有良好的抗干扰能力。回收率实验结果表明该分析方法具有良好的准确性。



此外, 实际样品检测结果与标准的 ICP-MS 方法接近, 且该分析方法更为简便、快速且成本更低, 表明其在中药材中铜离子定量分析方面具有重要的实际应用潜力。

## 参考文献

- [1] Gamela R, Costa V, Pereira E. Multivariate optimization of ultrasound-assisted extraction procedure for the determination of Ca, Fe, K, Mg, Mn, P, and Zn in pepper samples by ICP OES [J]. Food Anal Methods, 2020, 13: 69-77.
- [2] Cao YP, Deng BY, Yan LZ, et al. An environmentally-friendly, highly efficient, gas pressure-assisted sample introduction system for ICP-MS and its application to detection of cadmium and lead in human plasma [J]. Talanta, 2017, 167: 520-525.
- [3] Gu B, Huang LY, Su W, et al. A benzothiazole-based fluorescent probe for distinguishing and bioimaging of Hg and Cu [J]. Anal Chim Acta, 2017, 954: 97-104.
- [4] Liu YM, Cheng JK. Highly sensitive chemiluminescence detection of copper ( II ) in capillary electrophoresis with field-amplified sample injection [J]. Electrophoresis, 2002, 23: 556-558.
- [5] Niknezhad M, Lakouraj MM, Chaichi MJ, et al. A facile chemiluminescence strategy for copper ( ii ) ion detection utilizing azothiacalix[4]arene-functionalized carboxymethylcellulose polymeric ligand [J]. New J Chem, 2022, 46: 12666-12678.
- [6] Chen FF, Xing YK, Lei MY, et al. Highly sensitive electrochemiluminescence sensing platform based on copper nanoclusters synthesized via a DNA nanoribbon template for the detection of cancer cells [J]. Sens Actuators B, 2024, 420: 136506.
- [7] Pan MC, Lei YM, Chai YQ, et al. In situ controllable generation of copper nanoclusters confined in a poly-L-cysteine porous film with enhanced electrochemiluminescence for alkaline phosphatase detection [J]. Anal Chem, 2020, 92: 13581-13587.
- [8] Ma HD, Yi MJ, Messinger M, Wang GL. Kinetics-based ratiometric electrochemiluminescence analysis for signal specificity: case studies of piperazine drug discrimination with Au nanoclusters [J]. Anal Chem, 2022, 94: 11760-11766.
- [9] Liu YM, Cao JT, Wang H. Capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection for the analysis of quinolone drugs and pharmacokinetics study [J]. Chin Chem Lett, 2008, 19: 962-964.
- [10] Bhaiyya M, Pattnaik PK, Goel S. A brief review on miniaturized electrochemiluminescence devices: from fabrication to applications [J]. Curr Opin Electroche, 2021, 30: 100800.
- [11] Dai WJ, Chen GX, Sun SY, et al. Bifunctional silver-metal organic gels with catalytic and electrochemiluminescence properties applied for ratio detection of I27L gene [J]. Chem Eng J, 2024, 496: 154224.
- [12] Dai WJ, Chen GX, Wang XY, et al. Facile synthesis of dual-ligand europium-metal organic gels for ratiometric electrochemiluminescence detecting I27L gene [J]. Biosens Bioelectron, 2024, 246: 115863.
- [13] Xiong Y, Yang WQ, Huang SX, et al. Competitive substitution in europium metal-organic gel for signal-on electrochemiluminescence detection of dipicolinic acid [J]. Microchim Acta, 2023, 190: 426.
- [14] Wang BB, Liu XJ, Fan DW, et al. Ultrasensitive detection of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein based on porphyrin-based metal-organic gels with highly efficient electrochemiluminescence at low potential [J]. Anal Chem, 2024, 96: 4479-4486.
- [15] Zhang Y, Chen YF, Nie YM, et al. Highly efficient aggregation-induced electrochemiluminescence of Al ( III ) -cbatpy metal-organic gels obtained by ultrarapid self-assembly for a biosensing application [J]. Anal Chem, 2022, 94: 12196-12203.
- [16] Zhang YW, Cao Y, Mao CJ, et al. An iron ( III ) -based metal-organic gel-catalyzed dual electrochemiluminescence system for cytosensing and in situ evaluation of the VEGF subtype [J]. Anal Chem, 2022, 94: 4095-4102.
- [17] Chen F, Wang YM, Guo WW, et al. Color-tunable lanthanide metal-organic framework gels [J]. Chem Sci, 2019, 10: 1644-1650.

( 收稿日期: 2024-12-25; 修回日期: 2025-03-25 )

# 薏苡附子败酱散对肝癌术后复发模型的影响及机制研究

李倩薇<sup>1</sup>, 宋亚刚<sup>2</sup>, 王欣<sup>3</sup>, 周建华<sup>1</sup>, 焦红军<sup>1</sup>, 刘继平<sup>3\*</sup> (1. 郑州大学第二附属医院, 郑州 450014; 2. 河南中医药大学, 郑州 450046; 3. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046)

**摘要:** **目的** 通过体内外实验探讨薏苡附子败酱散对肝癌术后复发模型的影响及机制。**方法** 制备大鼠薏苡附子败酱散含药血清, 采用 MTT 法检测细胞增殖活性, 采用划痕实验和 Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭能力。建立 H22 原位移植瘤术后复发小鼠模型, 观察各组小鼠腹围变化、肝结节数量, 测量瘤块总重量, 检测最大瘤块体积; 酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定血清中甲胎蛋白 (AFP)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 水平; 苏木精-伊红染色 (HE) 观察肝癌复发的病理情况; 免疫荧光检测微血管增生情况及 Wnt/ $\beta$ -catenin 调节通路的变化。**结果** 薏苡附子败酱散含药血清可明显抑制 HepG2 细胞增殖, 增加划痕实验愈合面积, 减少 HepG2 细胞穿孔数量。薏苡附子败酱散可明显改善术后复发模型小鼠表观指标及肝脏组织病理变化; 降低血清 AFP、bFGF 和 VEGF 水平; 降低癌旁组织中 VEGF、CD34 和 CD44v6 的表达; 抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 调节通路中 GSK3 $\beta$ 、Wnt1 和  $\beta$ -catenin 的表达。**结论** 薏苡附子败酱散具有抑制小鼠 H22 原位移植瘤肝癌术后复发的作用, 其机制可能与抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 介导的微血管增生有关。

**关键词:** 薏苡附子败酱散; 肝癌术后复发; 微血管; Wnt/ $\beta$ -catenin 通路

**中图分类号:** R285

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-2981(2025)06-1664-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.025

## Effect and mechanism of Yiyi Fuzi Baijiang powder on the postoperative recurrence model of hepatocellular carcinoma

LI Qian-wei<sup>1</sup>, SONG Ya-gang<sup>2</sup>, WANG Xin<sup>3</sup>, ZHOU Jian-hua<sup>1</sup>, JIAO Hong-jun<sup>1</sup>, LIU Ji-ping<sup>3\*</sup> (1. The Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014; 2. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046; 3. Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712046)

**Abstract: Objective** To determine the effect and mechanism of Yiyi Fuzi Baijiang powder on the postoperative recurrence of liver cancer by in vivo and in vitro experiments. **Methods** The Yiyi Fuzi Baijiang powder-containing serum was prepared. The cell proliferation activity was detected by MTT assay. The cell migration and invasion abilities were detected by wound healing assay and Transwell assay. A postoperative recurrence model of orthotopically transplanted H22 tumors in mice was established to observe the changes in abdominal circumference and the number of hepatic nodules. The total tumor weight and the maximum tumor volume were measured. The levels of alpha-fetoprotein (AFP), basic fibroblast growth factor (bFGF), and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the serum were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Hematoxylin and eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes in the liver tissue. The microvascular proliferation and changes in the Wnt/ $\beta$ -catenin regulatory pathway were detected by immunofluorescence staining. **Results** The Yiyi Fuzi Baijiang powder-containing serum significantly inhibited the proliferation of HepG2 cells, increased the healing area in the wound healing assay, and reduced the number of perforations in HepG2 cells. Yiyi Fuzi Baijiang powder greatly improved apparent indicators and histological changes in the liver tissue of mice in a postoperative recurrence model, decreased the levels of AFP, bFGF, and VEGF in the serum,

**基金项目:** 河南省医学科技攻关计划联合共建项目 (No.LHGJ20210431)。

**作者简介:** 李倩薇, 女, 主管药师, 主要从事药理学研究, email: liqw@zzu.edu.cn \* **通信作者:** 刘继平, 男, 教授, 主要从事中药药理学研究, email: liwenjie780711@163.com

reduced the expression of VEGF, CD34, and CD44v6 in adjacent tissues, and inhibited the expression of GSK3 $\beta$ , Wnt1, and  $\beta$ -catenin in the Wnt/ $\beta$ -catenin regulatory pathway. **Conclusion** Yiyi Fuzi Baijiang powder can inhibit the postoperative recurrence of orthotopically transplanted H22 tumors in mice, its mechanism may be related to the inhibition of Wnt/ $\beta$ -catenin-mediated microvascular proliferation.

**Key words:** Yiyi Fuzi Baijiang powder; postoperative recurrence of liver cancer; microvessel; Wnt/ $\beta$ -catenin regulatory pathway

肝癌是一种常见的恶性肿瘤,全球每年新增超过 100 万例,死亡超过 50 万例<sup>[1]</sup>。目前,肝癌复发的治疗方式主要有再次切除、局部射频消融、经皮肝动脉化疗栓塞、肝移植等,但治疗效果有限<sup>[2]</sup>。因此,寻找一种防治肝癌术后复发、抑制肝癌转移的治疗方式对临床肝癌术后治疗意义重大。

中医认为手术切除癌症乃金刃创伤,易形成气滞、瘀血,形成新的病因,肝癌是由正虚邪实、内外交争引起的,具有寒、湿热、瘀等特点,阳气亏虚、湿热聚毒、气滞血瘀是肝癌的病机<sup>[3-4]</sup>。薏苡附子败酱散出自《金匮要略》,此方由薏苡仁、附子、败酱草 3 味药组成,具有破瘀散结、温补阳气的功效<sup>[5]</sup>。方中薏苡仁味甘淡,性寒凉,可补脾祛湿、清热排脓,为君药;附子大辛大热,可补火升阳、散寒镇痛,为臣药;败酱草味辛、苦,微寒,清热解毒,排脓散瘀止痛,为臣药,三药共达温阳健脾、清热除湿、祛瘀排脓之效,临床上主治肠痈脓已成而未溃<sup>[6]</sup>。

从中医病机角度而言,该方适用病机与肝癌的中医病机认识相一致,且癌症术后病因病机均体现在阳气不足、瘀毒湿热阻盛上,由此,课题组认为可以将薏苡附子败酱散拓展应用于肝癌术后复发的治疗,这与中医的“异病同治”理论相符。前期研究发现,薏苡附子败酱散可显著抑制肝癌 H22 小鼠移植瘤模型的瘤重及瘤体积,且对肿瘤细胞血管增生具有显著的抑制作用。因此,本课题组旨在通过体内外实验考察薏苡附子败酱散是否可通过抑制肝癌微血管增生抑制肝癌术后复发,为该药的临床应用提供可靠的依据。

## 1 材料

### 1.1 试药

本实验采用的薏苡仁、附子、败酱草来源于郑州大学第二附属医院(批号:20221101, 20221001, 20221201),药材经河南中医药大学药教研室张飞教授鉴定为正品饮片。方中薏苡仁、附子、败酱草配比为 30:6:15,加 10 倍量的水浸泡 40 min,附子先煎 40 min 后,再和其他药物同煎 1 h,趁热过滤,滤渣加 8 倍量的水,武火煮沸,文火慢煎 40 min。合并滤液,减压浓缩药液为 2 g·mL<sup>-1</sup>。

替加氟片(齐鲁制药有限公司,批号:H20130121),0.25%胰蛋白酶消化液、胎牛血清、无血清蛋白非程序细胞冻存液(武汉赛维尔生物科技有限公司);结晶紫染色液(0.1%)、噻唑蓝(MTT)(北京索莱宝科技有限公司);Transwell 嵌套(Corning 公司);甲胎蛋白(AFP)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和血管内皮生长因子(VEGF)ELISA 试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号:20230401、20230402、20230403)。

### 1.2 仪器

摩尔超纯水机(重庆摩尔水处理设备有限公司,元素型 1820D),高速冷冻离心机(赛默飞世尔科技公司,型号:MULTIFUGEX3R),酶标仪(美国 BIO-RAD 公司,型号: BIO-RAD680),正置荧光显微镜(日本尼康,型号: Nikon Eclipse C1),全自动快速样品研磨仪(上海净信实业发展有限公司,型号: JXFSTPRP-48)。

### 1.3 实验动物

雄性 KM 小鼠 130 只,体重 18~20 g(济南朋悦实验动物繁育有限公司,动物合格证号:370726231100983763);SPF 级雄性 SD 大鼠 8 只,体重 180~200 g(济南朋悦实验动物繁育有限公司,动物合格证号:370726231100487841);本实验经河南中医药大学实验动物福利伦理委员会批准,伦理批件号:DWLLGZR202202217。

### 1.4 实验细胞

HepG2 细胞系、H22 细胞系(武汉赛维尔生物科技有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 薏苡附子败酱散含药血清对 HepG2 细胞的影响

**2.1.1 大鼠含药血清的制备** 将 SD 雄性大鼠适应性喂养 3 d 后,随机分成空白组、薏苡附子败酱散组,每组 4 只,薏苡附子败酱散组按照人体重 70 kg 换算,给药剂量为 4.4 g·kg<sup>-1</sup>,连续灌胃 7 d 后,戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉取血,3500 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min 取上清液,血清 56℃ 灭活,0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤, -20℃ 冰箱保存备用。

#### 2.1.2 MTT 检测薏苡附子败酱散对 HepG2 增殖的



影响 选对数生长期 HepG2 细胞, 按照  $1 \times 10^5$  个/孔接种于 96 孔板中, 培养 24 h 待细胞充分贴壁后, 含药血清组分别加入 10、20、40、80、160  $\mu\text{L}$  薏苡附子败酱散组大鼠含药血清, 其余加入基础培养基补足, 每孔终体积 200  $\mu\text{L}$ ; 空白组分别加入 10、20、40、80、160  $\mu\text{L}$  大鼠血清, 其余加入基础培养基补足, 每孔终体积 200  $\mu\text{L}$ 。每个浓度 3 个复孔, 培养 48 h 后, 更换新的培养基, 加入 MTT, 继续培养 4 h, 加入二甲亚砜 (DMSO), 混匀测吸光度, 计算抑制率。以磷酸盐缓冲液 (PBS) 调零。药物抑制率 (%) =  $1 - (\text{含药血清组 OD 值} - \text{PBS 组 OD 值}) / (\text{空白血清组 OD 值} - \text{PBS 组 OD 值}) \times 100\%$ , 计算半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ )。

结果显示不同剂量的薏苡附子败酱散含药血清对 HepG2 细胞的增殖均有不同程度的抑制作用, 并且随着药物浓度的增加, 细胞存活率降低, 抑制作

用明显增强, 呈量-效依赖关系, 经函数计算  $IC_{50}$  为  $98.85 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。细胞存活率在  $IC_{50}$  以上表明药物对 HepG2 细胞活性无明显影响, 因此选择含药血清作用于 HepG2 细胞的浓度为 50、100、200  $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**2.1.3 细胞划痕实验** 取对数生长期的 HepG2 细胞, 以  $1 \times 10^5$  个/孔接种于 12 孔板中, 分别设置空白组 (C-G) 和含药血清低 (L-G,  $50 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、中 (M-G,  $100 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、高 (H-G,  $200 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 剂量组, 每组 3 个复孔; 待细胞长满细胞培养皿底部后, 垂直于细胞培养皿中心对称轴划一条痕迹。使用 PBS 洗去划掉的细胞, 分别于 0、12、24 h 显微镜下观察并按组拍照, 记下照片中细胞的划痕位置, 利用 Image J 软件分析 24 h 时未覆盖的区域, 以其面积变化评估愈合效率。结果显示, 与 C-G 组比较, M-G 组和 H-G 组 HepG2 细胞 12、24 h 的细胞迁移面积明显变小 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 结果见图 1。

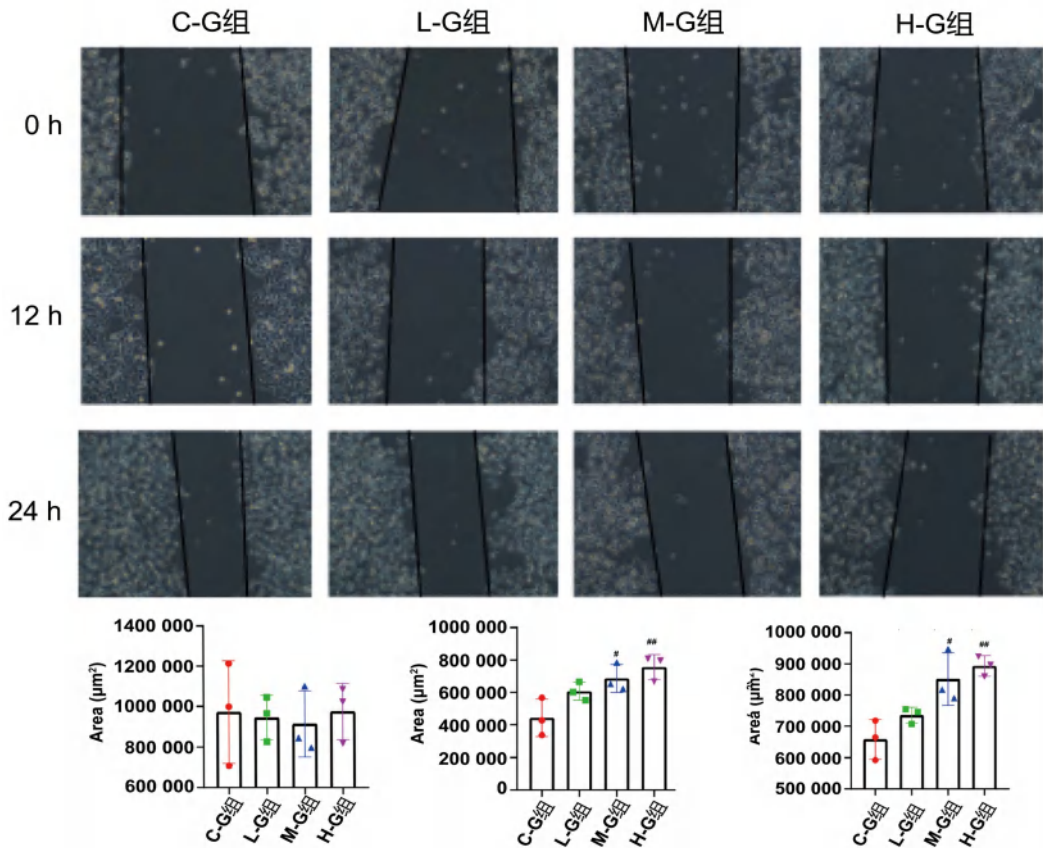


图 1 薏苡附子败酱散含药血清对 HepG2 细胞迁移的影响

Fig 1 Impact of Yiyi Fuzi Baijiang powder-containing serum on the migration of HepG2 cells

注: 与 C-G 组比较,  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{##}P < 0.01$ 。

Note: Compared with the C-G group,  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{##}P < 0.01$ .

**2.1.4 Transwell 侵袭实验** 取对数生长期的 HepG2 细胞, 以  $1 \times 10^5$  个/孔接种于 24 孔板中, 分别设置空白组 (C-G) 和含药血清低 (L-G,  $50 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、中 (M-G,  $100 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、高 (H-G,

$200 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 剂量组。将基质胶与基础培养基混合, 将细胞放置于无血清的培养基中培养 24 h, 制成  $2.5 \times 10^5$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  细胞悬液, 上室加入 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液, 下室加入 500  $\mu\text{L}$  完全培养基,

静置 15 min 后,放入培养箱后培养 24 h。加入 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min, PBS 清洗两次后,用 0.1% 结晶紫染色 10 min, 超纯净水清洗, 显微镜下观察, Image J 软件分析。结果显示, 与 C-G 组比较, M-G 组、H-G 组 HepG2 细胞穿孔数量明显少于 C-G 组 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 结果见图 2。

2.2 薏苡附子败酱散对 H22 原位移植瘤术后复发小鼠模型的影响

2.2.1 模型的建立及分组 常规培养小鼠肝癌 H22 细胞, 分别接种于成年雄性 KM 小鼠肝脏上, 以建立肝原位移植瘤小鼠模型, 手术切除建立肝原位癌术后小鼠模型。随后给予连续外伤刺激以诱导小鼠肝癌术后复发。随机分为模型组 (M-P), 假手术组 (P-G, 只开腹但不手术), 替加氟组 (T-G,  $10\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 按照人体重 70 kg 换算, 薏苡附子败酱散高 (H-G,  $13.2\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、中 (M-G,  $6.6\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、低 (L-G,  $3.3\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 剂量组, 另设空白组 (C-G), 每组 12 只, 除 M-P 组、P-G 组和 C-G 组给予生理盐水外, 各给药组每日灌胃给药 1 次, 连续给药 14 d。

2.2.2 对小鼠生长状态和腹围的影响 给药期间观察小鼠一般情况, 如小鼠体重、毛发整洁度, 饮食饮水等, 活跃程度, 精神状态; 在给药结束后, 观察小鼠腹围, 体重与肝脏重量的变化。结果显示 C-G 组小鼠生长状态良好, 毛发有光泽、活泼, M-P 组小鼠扎堆现象明显、毛发蓬乱, 给药组精神状态良好。与 C-G 组相比, M-P 组的小鼠腹围、肝脏重量和体重显著提高 ( $P < 0.01$ ); 与 M-P 组相比, 各给药组小鼠腹围、肝脏重量和体重明显降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 见图 3A ~ 3C。

2.2.3 对肝脏结节数、总瘤重和最大瘤块体积的影响 在无菌环境下剥瘤块, 统计肝结节数量, 测量瘤块总重量, 检测最大瘤块体积。结果显示, 与 M-P 组相比, 各给药组的最大瘤块体积显著降低 ( $P < 0.01$ ), M-G 组、H-G 组和 T-G 组肝脏结节数和总瘤重明显降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 具体结果见图 3D ~ 3F。

2.2.4 对复发肝组织病理变化的影响 给药结束后, 颈椎脱臼处死小鼠, 摘取肝脏肿瘤及癌旁组织, 对肝脏组织拍照后, 放入多聚甲醛中固定后脱水、包埋、透明、切片、脱蜡, 苏木精-伊红染色 (HE 染色) 后, 使用数字病理切片扫描仪观察病理切片, 参考文献对肝癌复发病理情况的报道<sup>[7-8]</sup>, 按照表 1 对小鼠的病理状态进行分级评价。

表 1 病理结合实体肝的状态综合评分细则

| Tab 1 Pathological combined state scoring criteria for the liver |      |      |      |     |    |
|------------------------------------------------------------------|------|------|------|-----|----|
| 级别                                                               | ++++ | +++  | ++   | +   | -  |
| 肝内复发灶                                                            | 高度   | 明显   | 部分   | 少见  | 无  |
| 瘤细胞异型核                                                           | 高度   | 明显   | 部分   | 少见  | 无  |
| 核分裂象                                                             | 高度   | 明显   | 部分   | 少见  | 无  |
| 肿瘤浸润性生长                                                          | 明显   | 局部   | 较轻   | 无   | 无  |
| 血管侵犯                                                             | 大量   | 明显   | 少量   | 无   | 无  |
| 肝脏实质减少                                                           | 明显   | 部分   | 轻度   | 无   | 无  |
| 肝功能                                                              | 严重受损 | 部分受损 | 轻度受损 | 较正常 | 正常 |

结果显示 C-G 组肝组织正常, 无复发结节形成; 与 C-G 组相比, M-P 组小鼠复发灶明显, 瘤组织中异型核多见, 核分裂现象明显, 瘤细胞呈浸润性生长; 与 M-P 组比较, 各给药组明显改善, 均可改善肝癌术后复发病理情况, 结果见图 4, 分级评价结果见表 2。

表 2 薏苡附子败酱散对肝癌术后复发小鼠肝组织的影响 ( $n = 10$ )  
Tab 2 Effect of Yiyi Fuzi Baijiang powder on the liver tissue of mice with postoperative recurrence of liver cancer ( $n = 10$ )

| 组别    | -  | + | ++ | +++ | ++++ | P 值                  |
|-------|----|---|----|-----|------|----------------------|
| C-G 组 | 10 | 0 | 0  | 0   | 0    | -                    |
| M-P 组 | 0  | 1 | 1  | 7   | 1    | 0.0001 <sup>##</sup> |
| P-G 组 | 0  | 0 | 2  | 7   | 1    | -                    |
| L-G 组 | 2  | 4 | 2  | 1   | 1    | 0.0199 <sup>*</sup>  |
| M-G 组 | 3  | 5 | 1  | 1   | 0    | 0.0015 <sup>**</sup> |
| H-G 组 | 4  | 4 | 1  | 1   | 0    | 0.0014 <sup>**</sup> |
| T-G 组 | 5  | 4 | 1  | 0   | 0    | 0.0003 <sup>**</sup> |

注: 与 C-G 组比较, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与 M-P 组比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the C-G group, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; compared with the M-P group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ .

2.2.5 血清中 AFP、bFGF 和 VEGF 的测定 小鼠于末次给药 2 h 后采血, 于 4 ℃、3000 r · min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 分离血清, 至 -40 ℃ 冰箱保存备用, ELISA 测定血清中 AFP、bFGF 和 VEGF 含量。结果显示, 与 C-G 组相比, M-P 组小鼠血清 AFP、bFGF 和 VEGF 水平显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与 M-P 组相比, 各给药组 bFGF、AFP 水平均明显降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), M-G 组、H-G 组和 T-G 组 VEGF 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ), 具体结果见图 5。

2.2.6 对微血管及其调节通路的影响 从石蜡包埋肝组织样品中制备组织切片, 经脱蜡、水化、修复、封闭、牛血清白蛋白、滴加一抗工作液及相应二抗工作液, 然后用 DAPI 染核, 最后用抗荧光猝灭封片剂封片, 免疫荧光检测 CD34、VEGF、CD44v6 的表达, 随机镜下选取 5 处视野, 使用 Image J 软件, 计算区域内的平均荧光强度。

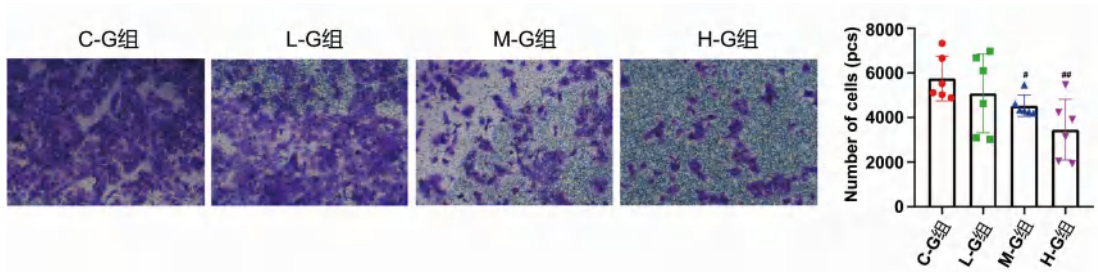


图 2 薏苡附子败酱散含药血清处理后 HepG2 细胞穿孔数量

Fig 2 Number of perforation HepG2 cells following treatment with Yiyi Fuzi Baijiang powder-containing serum

注：与 C-G 组比较，<sup>#</sup> $P < 0.05$ ，<sup>##</sup> $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the C-G group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$ .

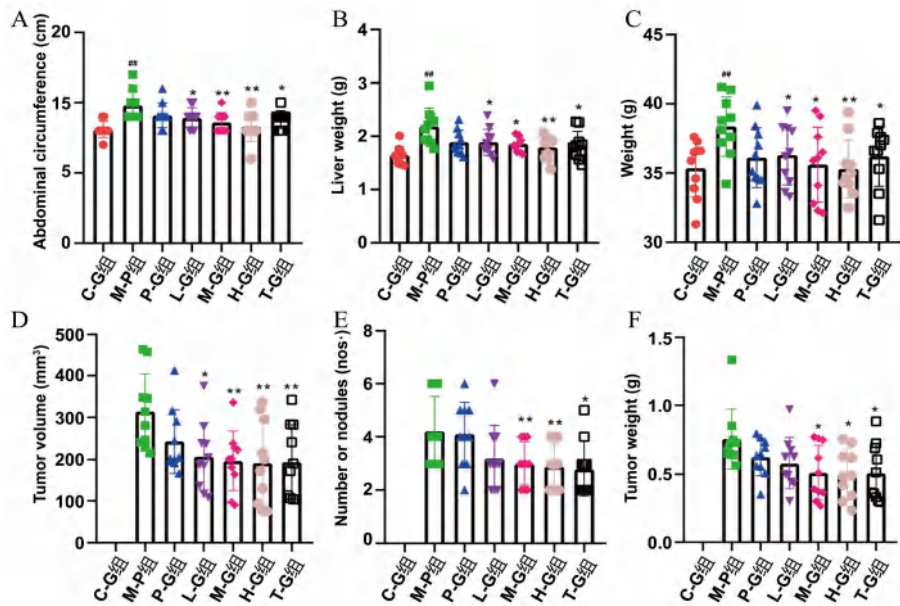


图 3 薏苡附子败酱散对各组小鼠表观指标的影响

Fig 3 Effect of Yiyi Fuzi Baijiang powder on apparent indicators of model mice

注：与 C-G 组比较，<sup>##</sup> $P < 0.01$ ；与 M-P 组比较，<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ，<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the C-G group, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ；compared with the M-P group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ .

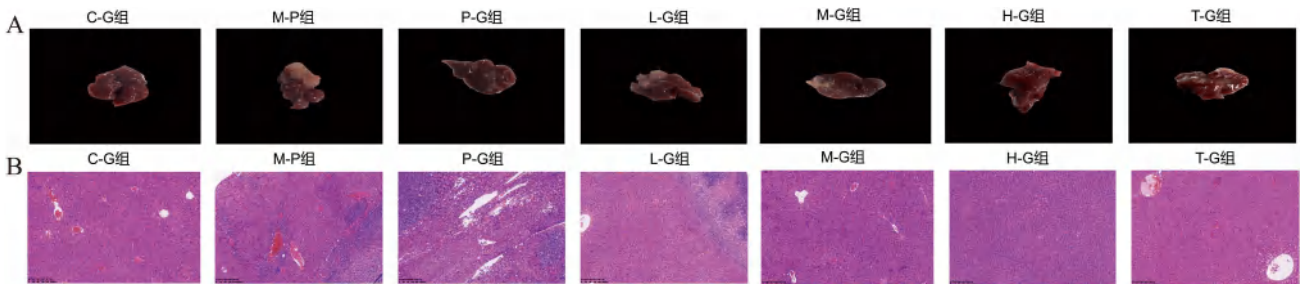


图 4 各组小鼠肝脏组织宏观形态 (A) 及 HE 染色 ( $\times 100$ )(B)

Fig 4 Macroscopic morphology (A) and HE staining ( $\times 100$ )(B) of mouse liver tissues in each group

结果显示，与 C-G 组相比，M-P 组 VEGF、CD34 和 CD44v6 表达显著升高 ( $P < 0.01$ )；与 M-P 组相比，各给药组 VEGF 和 CD44v6 表达明显降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )，L-G 组、M-G 组和 H-G 组 CD34 表达明显降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )；具体结果见图 6。

随后采用免疫荧光法检测 GSK3 $\beta$ 、Wnt1、

$\beta$ -catenin 的表达，并随机镜下选取 5 处视野，使用 Image J 软件，计算区域内的平均荧光强度。结果显示，与 C-G 组相比，M-P 组 GSK3 $\beta$ 、Wnt1 和  $\beta$ -catenin 表达显著升高 ( $P < 0.01$ )；与 M-P 组相比，L-G 组、M-G 组和 H-G 组 GSK3 $\beta$ 、Wnt1 和  $\beta$ -catenin 表达明显降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )，结果见图 7。

### 2.3 统计分析方法



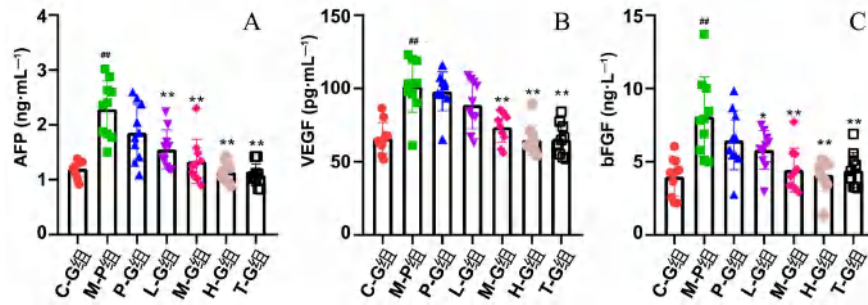


图 5 薏苡附子败酱散对模型小鼠血清中 AFP、bFGF 和 VEGF 水平的影响

Fig 5 Effect of Yiyi Fuzi Baijiang powder on the levels of AFP, bFGF, and VEGF in the serum of model mice

注：与 C-G 组比较，<sup>##</sup> $P < 0.01$ ；与 M-P 组比较，<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ，<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the C-G group, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; compared with the M-P group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ .

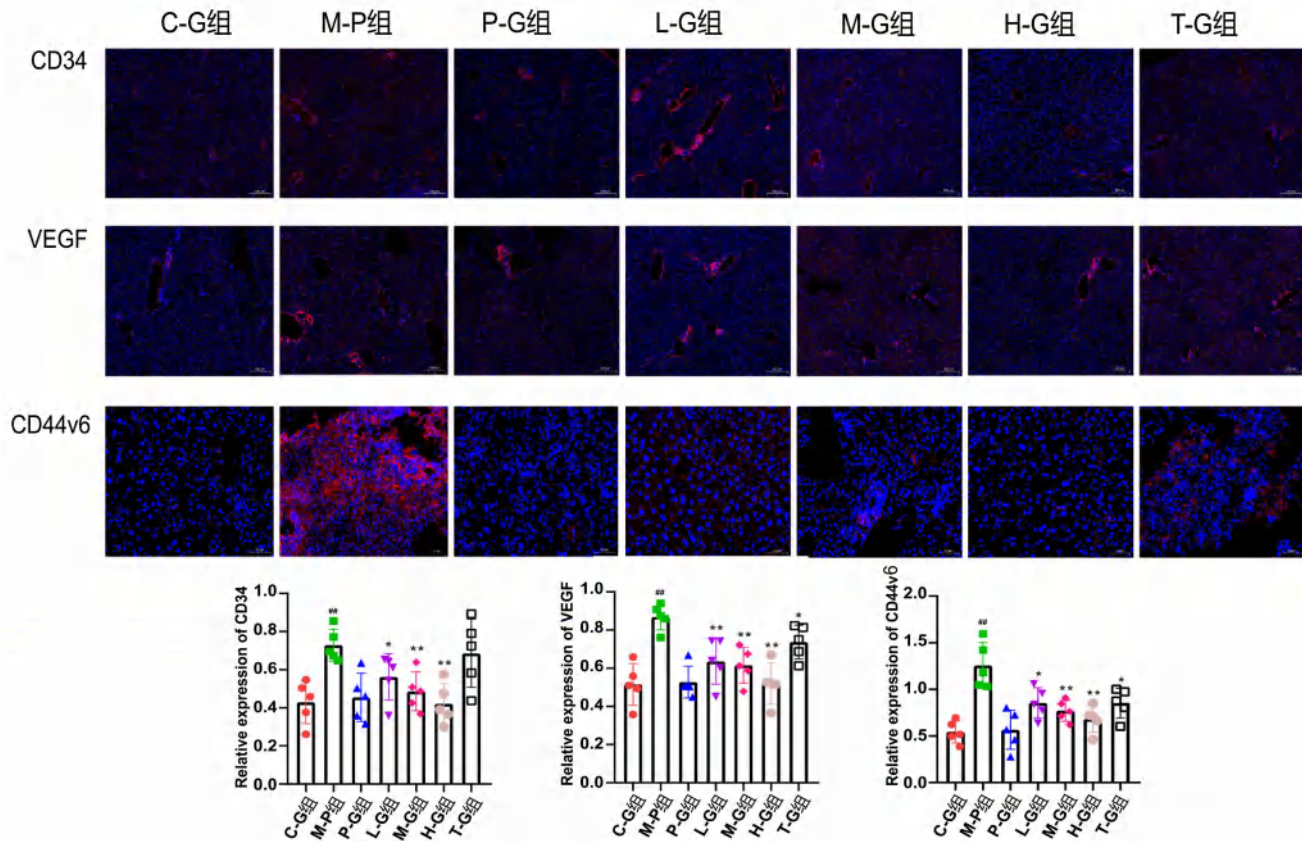


图 6 薏苡附子败酱散对模型小鼠复发癌旁组织中 CD34、VEGF 和 CD44v6 的影响

Fig 6 Effect of Yiyi Fuzi Baijiang powder on the expression of CD34, VEGF, and CD44v6 in the peritumoral tissues of recurrent cancer in model mice

注：与 C-G 组比较，<sup>##</sup> $P < 0.01$ ；与 M-P 组比较，<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ，<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the C-G group, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; compared with the M-P group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ .

用 SPSS 21.0 for windows 对数据加以分析，实验结果以平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 的形式表示，组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)，方差不齐时采用 Dunnett's T3 进行组间比较，方差齐者用 LSD 法，等级资料采用 Ridit 检验，采用 GraphPad Prism v.8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) 进行绘图。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

### 3 讨论

肝细胞癌是肝癌的主要类型，约占中国肝癌

病例的 80%，5 年生存率仅 20% ~ 30%，严重影响患者生命健康<sup>[9]</sup>。研究显示，有效抑制肿瘤细胞增殖、侵袭和转移对降低癌症复发率并提高远期生存率至关重要<sup>[10]</sup>。本研究通过不同剂量薏苡附子败酱散含药血清对肝癌细胞的干预作用发现，薏苡附子败酱散含药血清可显著抑制肝癌细胞增殖和迁徙转移，提示薏苡附子败酱散具有一定的抑制肝癌细胞复发和转移作用。在此基础上，本研究通过肝癌术后复发小鼠模型发现薏苡附子败酱散可显著抑制肝癌复发小鼠瘤重及瘤体积，

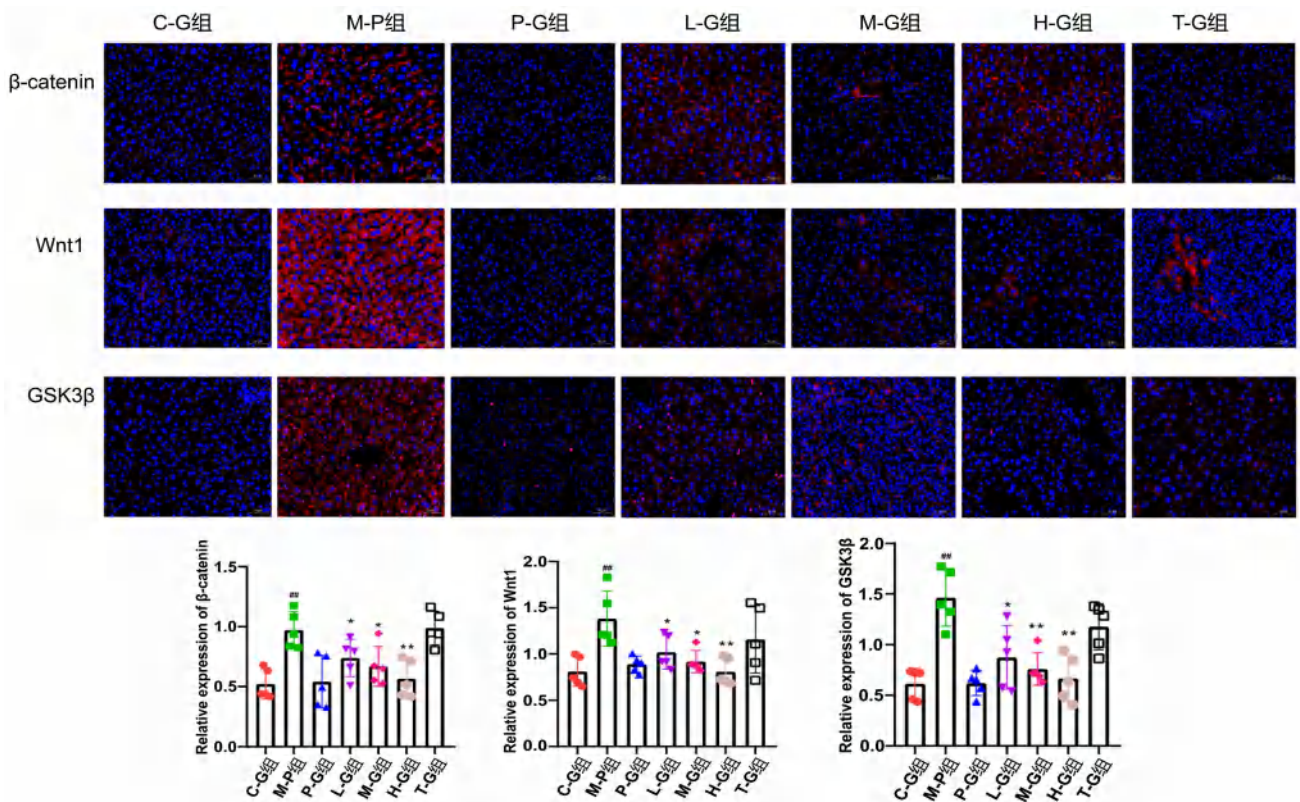


图 7 薏苡附子败酱散对模型小鼠复发癌旁组织中 GSK3 $\beta$ 、Wnt1 和  $\beta$ -catenin 的影响

Fig 7 Effect of Yiyi Fuzi Baijiang powder on the expression of GSK3 $\beta$ , Wnt1 and  $\beta$ -catenin in the peritumoral tissues of recurrent cancer in model mice

注：与 C-G 组比较，<sup>##</sup> $P < 0.01$ ；与 M-P 组比较，<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ，<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the C-G group, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; compared with the M-P group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ .

减少模型小鼠腹围（腹水量）以及肝脏结节数量，并改善肝脏癌旁组织的病理变化情况。这提示薏苡附子败酱散对肝癌复发小鼠的病理变化具有一定的改善作用。

微血管侵犯（MVI）是肝癌术后复发和转移的高危因素，也是肝癌预后预测的关键因子<sup>[11-13]</sup>。研究显示，血清标志物 AFP、VEGF 以及炎症指标（如中性粒细胞、淋巴细胞等）可影响 MVI 的发展<sup>[14-15]</sup>。血清 VEGF、bFGF 水平与癌组织微血管密度关系密切，两者是肝癌介入术后早期复发的危险因素<sup>[16]</sup>。AFP 为肝癌早期诊断的重要标志物之一，是由胚胎期肝脏与卵黄囊合成的糖蛋白，当肝细胞发生癌变，其新生细胞的出现可导致 AFP 分泌功能恢复，致使血清 AFP 水平迅速升高<sup>[17]</sup>。VEGF 是一种血管内皮高度特异性有丝分裂素，在低氧环境下也能促使新生血管形成，同时能够降解胞外基质，增加肿瘤内新生血管通透性<sup>[18]</sup>。本研究发现薏苡附子败酱散可显著降低肝癌术后复发小鼠模型血清中 AFP、VEGF、bFGF 的含量。此外，本文通过免疫荧光的方法检测模型小鼠肝脏癌旁组织中 VEGF、CD34 和 CD44v6 的表达，结果发现薏苡附子败

酱散可明显抑制 VEGF、CD34 和 CD44v6 的表达。综上，笔者认为薏苡附子败酱散防治肝癌术后复发的作用可能与其抑制肿瘤微血管增生相关。

在 MVI 发生过程中，Wnt/ $\beta$ -catenin 相关通路能够启动肿瘤细胞血管生成的信号级联反应<sup>[19]</sup>。Wnt/ $\beta$ -catenin 在肝细胞癌中通常呈高表达，研究表明，20% ~ 35% 的肝癌患者具有 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路关键基因突变和 / 或异常激活<sup>[20]</sup>，GSK3 $\beta$  在 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路中均有重要的参与作用，对磷酸化 / 去磷酸化过程发挥活性调节作用<sup>[21]</sup>。为了进一步阐明薏苡附子败酱散通过抑制肿瘤微血管防治肝癌术后复发的作用机制，本文采用免疫荧光的方法检测了癌旁组织中 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路相关蛋白的表达情况，结果发现薏苡附子败酱散可明显抑制 GSK3 $\beta$ 、Wnt1 和  $\beta$ -catenin 的表达。

综上所述，薏苡附子败酱散对肝癌细胞复发转移有一定的作用，并可通过抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 介导的微血管增生，改善 H22 原位移植瘤术后复发小鼠模型的症状，这些结果提示薏苡附子败酱散发挥防治肝癌术后复发的作用可能与抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路影响肿瘤微血管增生相关，但本



实验仍有一定的局限性,方中相关药物的有效成分对通路的调控机制尚不清楚,仍需进一步研究。

## 参考文献

- [1] Li MJ, Wang ZS, Cao JY, et al. Risk factors and prognosis of patients with recurrent hepatocellular carcinoma who undergo liver re-resections [J]. Eur J Surg Oncol, 2019, 45 (9): 1684-1690.
- [2] 谭佳杰, 向玉玲, 熊远果, 等. 克班宁对肝癌细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 中南药学, 2023, 21 (2): 392-397.
- [3] 程玉佩, 张明香. 中医药治疗原发性肝癌研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20 (1): 167-169.
- [4] 诸佳瑜, 陈闯, 欧杰, 等. 中医辩证治疗原发性肝癌的研究进展 [J]. 当代医药论丛, 2017, 15 (10): 32-34.
- [5] Gao YZ, Yang ZD, Ji T, et al. Anti-papillary thyroid carcinoma effects of *dioscorea bulbifera* L. through ferroptosis and the PI3K/AKT pathway based on network pharmacology and experimental validation [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 326: 117912.
- [6] 方静, 陈江, 金玉. 薏苡附子败酱散的临床应用及研究述评 [J]. 陕西中医, 2018, 39 (3): 383-386.
- [7] 郭才, 郑兰兰, 何燕芳, 等. 基于 AMPK/mTOR/ERR $\alpha$  信号通路探讨慈菇消脂方影响非酒精性脂肪性肝炎小鼠肝细胞自噬作用机制 [J]. 中国中医药信息杂志, 2024, 31 (5): 99-104.
- [8] 王云, 寇昌华, 王聪, 等. 精氨酸诱导自噬减轻肝切除患者术后肝功能损伤 [J]. 中国临床研究, 2023, 36 (9): 1322-1327.
- [9] 王文榜, 冯佳宁, 解辉平, 等. TREM2 在肝细胞癌中的表达与预后、免疫浸润及药物敏感性的分析 [J]. 中南药学, 2024, 22 (4): 857-863.
- [10] 梁宗英, 杨阳, 郑竞雄, 等. 乙酰基转移酶抑制剂对食管癌细胞 KAT5、Survivin 乙酰化水平及细胞增殖和迁移的影响 [J]. 重庆医学, 2023, 52 (2): 167-171.
- [11] Mehta N, Heimbach JL, Harnois DM, et al. Validation of a risk estimation of tumor recurrence after transplant (RE-TREAT) score for hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplant [J]. JAMA Oncol, 2017, 3 (4): 493-500.
- [12] 梁梓明, 叶林森, 唐晖, 等. 合并微血管侵犯的肝癌肝移植受者的预后评价 [J]. 器官移植, 2020, 11 (3): 350-355.
- [13] 何旭昶. 基于生存分析探讨肝癌微血管侵犯在根治性肝切除术早期复发中的临床意义 [D]. 昆明: 昆明医科大学, 2020.
- [14] 何涛, 蒋禹, 李秋, 等. 肝细胞癌微血管侵犯的预测及治疗进展 [J]. 临床肝胆病杂志, 2020, 36 (5): 1185-1189.
- [15] 王恺梯, 巴登才仁·安蕊, 丛赞, 等. 肝细胞癌微血管侵犯术后早期复发的研究进展 [J]. 中国普外基础与临床杂志, 2024, 31 (11): 1399-1450.
- [16] 谢俊, 梁先春, 黄绪兰, 等. 肝癌患者血清 VEGF、bFGF 水平与癌组织微血管密度及介入术后早期复发的相关性 [J]. 新疆医科大学学报, 2023, 46 (8): 1056-1061.
- [17] 刘雨虹. 血清 AFP、CEA 和 CA199 联合检测在丙肝相关肝硬化和肝癌鉴别诊断中的临床价值 [J]. 医学信息, 2024, 37 (17): 139-141.
- [18] Pulkkinen HH, Kiema M, Lappalainen JP, et al. BMP6/TAZ-Hippo signaling modulates angiogenesis and endothelial cell response to VEGF [J]. Angiogenesis, 2021, 24 (1): 129-144.
- [19] 王璋, 吴泉峰. 白藜芦醇调节 VEGF/Wnt/ $\beta$ -catenin 通路对食管癌细胞的抑制作用 [J]. 解剖学研究, 2018, 40 (2): 108-110.
- [20] 武则鑫. TEM8 通过激活 wnt- $\beta$ -catenin 信号通路促进 TECs 增殖、迁移和血管生成的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2020.
- [21] 张希成, 沈金根, 贾正我, 等. miR-183 调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路影响胃癌 SGC-7901 细胞生物学特性的研究 [J]. 世界华人消化杂志, 2019, 27 (13): 798-806.

(收稿日期: 2025-01-02; 修回日期: 2025-03-20)



# 基于 AHP-CRITIC 混合加权法优化芪红浓缩丸成型工艺研究

李爽<sup>1</sup>, 毛艳<sup>2\*</sup>, 程江南<sup>2</sup>, 王晓峰<sup>3</sup>, 贺金华<sup>2\*</sup> (1. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆维吾尔自治区药物研究所 新疆维吾尔药重点实验室, 乌鲁木齐 830010; 3. 新疆维吾尔自治区中医药研究院 新疆医科大学附属中医医院, 乌鲁木齐 830000)

**摘要:** **目的** 明确权重指标, 优选芪红浓缩丸成型工艺。**方法** 以成丸率、水分含量、溶散时限、外观差异、丸条性状为评价指标, 采用层次分析法 (AHP)、基于指标客观性的权重赋权法 (CRITIC) 和 AHP-CRITIC 混合加权法, 计算各指标的相对系数进行权重分配并综合评分, 结合 Box-Behnken 响应面法优化成型工艺, 并加以验证。**结果** 相较于单一赋权法, AHP-CRITIC 混合加权法更具有科学性和合理性, 最终优选出芪红浓缩丸的成型工艺条件: 加水量为 0.1 倍, 干燥时间 32 h, 辅料占比 30%。重复验证试验综合评分均值为 97.28, RSD 为 1.1%。**结论** AHP-CRITIC 法能科学、可靠地确定多指标权重, 经验证试验证实了优选出的成型工艺条件稳定、合理、可行, 为芪红浓缩丸的规范化生产提供参考依据。

**关键词:** 芪红浓缩丸; 成型工艺; 权重分析; AHP-CRITIC 混合加权法; Box-Behnken 响应面  
中图分类号: R283.6, R943 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)06-1672-06  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.026

## Optimization of molding of Qihong concentrated pills based on AHP-CRITIC mixed weighting method

LI Shuang<sup>1</sup>, MAO Yan<sup>2\*</sup>, CHENG Jiang-nan<sup>2</sup>, WANG Xiao-feng<sup>3</sup>, HE Jin-hua<sup>2\*</sup> (1. School of Pharmaceutical Sciences, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011; 2. Xinjiang Institute of Materia Medica, Key Laboratory of Xinjiang Uygur Medicine, Urumqi 830010; 3. Xinjiang Uygur Autonomous Region Academy of Traditional Chinese Medicine, Chinese Medicine Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi 830000)

**Abstract:** **Objective** To clarify the weight index and to optimize the molding process of Qihong concentrated pills. **Methods** Pill formation rate, moisture content, disintegration time, appearance uniformity, and strip plasticity were used as the evaluation indicators. The analytic hierarchy process (AHP) and the criteria importance through intercriteria correlation (CRITIC) method based on the objectivity of indicators, and AHP-CRITIC mixed weighting method were used. The relative coefficients of each index were calculated for weight distribution and comprehensive score, and the molding process was optimized and verified by Box-Behnken response surface test. **Results** Compared with the single weighting method, the AHP-CRITIC mixed weighting method was more reasonable. This method finally optimized the forming conditions of Qihong concentrated pills as follows: 0.1 times of water amount, drying for 32 h, and excipients proportion at 30%. The mean comprehensive score of validation experiment was 97.28, and RSD was 1.1%. **Conclusion** AHP-CRITIC method reliably determines the weight of multiple indicators, and the verification test confirms that the optimized molding process is stable, reasonable and feasible, providing references for the standardized production of Qihong concentrated pills.

**Key words:** Qihong concentrated pill; forming process; weighting analysis; AHP-CRITIC mixed weighting method; Box-Behnken response surface method

**基金项目:** 新疆维吾尔自治区重大科技专项项目 (No.2022A03006)。

**作者简介:** 李爽, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药民族药新药研发方面的研究, email: 2945569128@qq.com \* **通信作者:** 贺金华, 女, 研究员, 硕士研究生导师, 主要从事中药民族药新药研发方面的研究, email: hejh1216@163.com; 毛艳, 女, 研究员, 硕士研究生导师, 主要从事中药药效物质及质量评价方面的研究, email: maoyan7529@163.com

芪红浓缩丸原方为中药汤剂,是医院的院内制剂,临床应用近 10 年来未发现不良事件,适合肾阳虚所致窦房结功能不全引起缓慢性心律失常的患者长期服用。芪红浓缩丸以中医基本理论为原则,以临床辨证施治立法组方,取黄芪为君,臣以红景天、丹参,佐使肉桂、炙淫羊藿。全方药味,温补并用,精血兼顾,以益气助阳、温补心肾治其本,养血通络、宁心安神治其标,诸药配伍,标本兼顾,共奏益气温阳,温补心肾,养血通络之功效。在保留药性的基础上,将其剂型改为浓缩丸,有效解决传统汤剂的储存、运输不便等问题,改善因服用量大造成的患者依从性差等不良现状<sup>[1]</sup>。本试验旨在优化稳定、可控的芪红浓缩丸成型工艺,以期为保证该制剂临床疗效及建立质量标准奠定基础。塑制法常用于大规模生产,指将药物与辅料混合,制成均匀软材,再由制丸机制成均匀的丸片、条,最终切成大小均匀的丸粒。但由于药物的自身性质以及组方的千差万别,多种因素影响丸剂的外观及质量<sup>[2]</sup>。混合加权法由主观、客观赋权法组合,目前广泛应用于各个研究领域,根据每个指标的变化进行分配权重,以提高客观性<sup>[3]</sup>。为此,本研究结合赋权法对塑制法制丸过程中的软材、丸块、丸条、丸粒进行质量控制,对芪红浓缩丸成型过程中的工艺参数进行优化。

## 1 材料

### 1.1 仪器

HK-93A 中药制丸机(广州市旭朗机械设备有限公司),高速万能粉碎机(北京市永光明医疗仪器有限公司),JY5002 电子天平(上海上天精密仪器有限公司, $d = 0.01\text{ g}$ ),DHG-9123A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏试验设备有限公司),BP211D 电子天平(德国 Sartorius 公司, $d = 0.01\text{ mg}$ ),UPT-10T 型优普特试验超纯水机(成都超纯科技有限公司),BJ-II 崩解时限仪(天津市新天光分析仪器技术有限公司),游标卡尺[得力工具(余姚)有限公司]。

### 1.2 材料

芪红浓缩丸浸膏粉(试验室自制,批号:20240602),玉米淀粉(湖北展望药业有限公司,批号:20230201),糊精(辽宁东源药业有限公司,批号:20201111),微晶纤维素 SH-101(安徽山河药用辅料股份有限公司,批号:20200112),蜂蜜(廊坊百花蜂产品有限公司,批号:20240212),乙醇(纯度:95.0%,冠县新瑞实业有限公司,批号:20240401)。

## 2 方法与结果

### 2.1 芪红浓缩丸制备工艺

按浸膏粉和辅料 65:35 的比例,采用五点取

样法混合均匀。加入适量黏合剂制软材、炼制,观察软材、丸块、丸片、丸条及丸粒的性状。照《中国药典》2020 年版四部(通则 0108)对丸剂项下进行检查。

### 2.2 评价指标测定

#### 2.2.1 药粉性质考察

① 休止角:采用固定漏斗法,将三只漏斗串联,漏斗底端距离水平面 2 cm 并固定在铁架台,将粉体从上端缓慢加入,直至三角形高为 2 cm 为止,测量底部直径, $\tan\theta = h/r$ 。休止角大小和粉体的流动性有关,流动性越好,角度越小。

② 松密度:取粉体 15 g,置 50 mL 量筒中,使表面平整,记录体积。松密度=质量/体积。

③ 振实密度:取粉体 15 g,置 50 mL 量筒中,上下振荡至体积稳定,记录体积。振实密度=质量/体积。

④ 豪斯纳比:豪斯纳比=振实密度/松密度。

2.2.2 成丸率 按照制备流程制丸,对丸块及筛成型丸粒进行称重,计算成丸率。成丸率(%)=(成型湿丸重/丸块总重) $\times 100\%$ 。

2.2.3 水分 将浓缩丸粉碎过 1 号筛,称取 2 g,照《中国药典》2020 年版四部(通则 0832)水分测定法测定。

2.2.4 溶散时限 取同批次样品 6 丸,按照《中国药典》2020 年版四部(通则 0921)崩解时限项下检查法进行测定,浓缩水丸应在 2 h 内全部溶散。

2.2.5 外观评价 外观主要考察丸子大小、圆整均匀程度。随机取 10 丸,使用游标卡尺量取丸子最长直径和最短直径的差值平均值,差值越小圆整度越好<sup>[4]</sup>。

2.2.6 丸条性状评价 主要考察丸条拉伸长度和弯曲度。拉伸长度:出条时手动从出条嘴中截取丸条 5 cm 长度,进行拉伸测试;弯曲度:将挤出的丸条弯曲至出现折痕,进行弹性测试。

### 2.3 单因素考察

2.3.1 粉碎粒度 粉碎粒度不仅影响丸剂的色泽外观,过粗会出现裂丸现象,过细会增加粉尘,而且影响加水量及增加时间成本。制丸过程中丸粒外观要求光滑细腻、色泽均匀,通过控制粉末的粒度才能得到色泽均匀的丸粒。本方为浓缩丸,在前期试验中发现,若直接稠膏制丸,黏度大不易成型,因此需要加入适量辅料,如果粉碎粒度和辅料粒度相差太大可能会出现色泽不均匀的问题。为考察粉碎粒度对丸剂质量的影响,本试验将辅料与浸膏粉粉碎过筛后,分别考察 80、100、150、200 目对方药粉流动性及丸剂外观的影响,休止角、豪斯纳比越小代表流动性越好。试验发现,当药粉粒度大于 100 目时,粉体流动性好,丸剂色泽均匀。

**2.3.2 丸块放置时间** 参考车间实际情况,在生产过程中会因设备维修、产品状态不佳等突发事件造成生产中断,得到的工艺中间体需放置一定时间才可恢复生产<sup>[5]</sup>,因此为探究丸块放置时间对丸剂制备及外观的影响,按照制备方法对方药粉制丸,考察丸块放置时间分别为 0、15、30 min 时对方药粉的软材、丸块、丸剂外观及成丸率的影响。试验发现,随着放置时间的增加,丸块表面黏度降低,对后续试验影响不明显,表明放置时间对软材影响较小。

**2.3.3 丸块合坨时间** 药粉和黏合剂混合制丸块的过程称为合坨,也称合药,合坨是为了制成色泽均匀、软硬合适的丸块,防止切条或切丸时出现空心、色泽不均匀等问题。机器或手动合坨时间长都会产生热量,对软材性质产生一定的影响。考察丸块合坨时间分别为 5、15、25 min,对方药粉的软材、丸块、丸剂外观及成丸率的影响。试验发现,丸块合坨时间对芪红浓缩丸的成型工艺影响较小。

**2.3.4 辅料种类** 方中含有大量多糖类成分,浸膏

粉吸湿性较强,对浓缩丸的成型、运输及储存有较大影响。本试验筛选不同辅料(乳糖、微晶纤维素、糊精、淀粉)对芪红浓缩丸成型工艺的影响。试验中发现,乳糖吸湿性较强,但加入润湿剂的范围较窄,不易把控丸块质量,从而影响丸剂的成型效果。微晶纤维素具有一定黏度,但不易溶于水,不易满足崩解需求,因此不适合单独作为辅料使用。糊精的黏合性较强,但流动性及可压性较差,容易造成丸块色泽不均匀及丸剂的外观不佳。相比之下,传统辅料淀粉具有较好的制丸效果和崩解性能,能够较准确地把控丸剂质量,是较为理想的丸剂辅料。

**2.3.5 辅料占比** 加入辅料是为了吸附水分,防止药粉因吸湿而变质,从而得到更好的丸剂质量。原则上应减少辅料用量,分别考察辅料占比(25%、30%、33%、35%、37%、40%)对芪红浓缩丸成型工艺的影响,结果见表 1。观察试验结果发现,辅料占比增加,软材性质变优,成丸率增加,但服药量也相应增加,综合考虑,辅料占比为 25%~35% 较为合适。

表 1 辅料占比对丸剂的影响

Tab 1 Influence of auxiliary material proportion on pills

| 淀粉占比 /% | 休止角   | 豪斯纳比 | 丸条拉伸长度 /cm | 丸条弯曲度 / (°) | 外观                        | 成丸率 /% |
|---------|-------|------|------------|-------------|---------------------------|--------|
| 25      | 43.60 | 1.43 | 3.5        | 120~180     | 丸子圆整度稍差、大小、色泽不均匀,少数存在粘连现象 | 95.68  |
| 30      | 38.29 | 1.41 | 3.5        | 120~180     | 丸子圆整度较好,大小、色泽均匀,无粘连现象     | 97.25  |
| 33      | 33.84 | 1.39 | 4.5        | 120~180     | 丸子圆整度较好,大小均匀、色泽均匀,无粘连现象   | 97.69  |
| 35      | 31.48 | 1.38 | 5.0        | 120~180     | 丸子圆整度较好,大小均匀、色泽均匀,无粘连现象   | 98.39  |
| 37      | 26.38 | 1.34 | 6.0        | 120~180     | 丸子圆整度较好,大小均匀、色泽偏淡,无粘连现象   | 98.72  |
| 40      | 25.38 | 1.33 | 7.5        | 120~180     | 丸子圆整度较好,大小均匀、色泽偏淡,无粘连现象   | 98.95  |

**2.3.6 黏合剂种类** 黏合剂种类直接影响软材的黏性及制丸难易,软材质地过硬或过软都会导致丸剂质量不佳。预试验结果发现,乙醇可改变浸膏粉本身的黏度,但高浓度乙醇导致软材黏合度不足,难以成丸。因此选择考察不同黏合剂(水、稀蜂蜜及低浓度乙醇)对芪红浓缩丸的成型工艺的影响,试验发现,水可充分引发浸膏粉自身黏性,制得的丸粒圆整度好、外观均匀,成丸率较高。

**2.3.7 加水量** 加水量是成型工艺中的关键工艺参数,其大小直接影响合坨、成丸情况以及药效成分的溶出情况<sup>[5]</sup>。根据预试验结果,加水量小于 0.09 倍时丸块过硬甚至难以成团、混匀,影响机器压片,制得的丸条断条严重,难以切丸,大于 0.11 倍时丸块过黏,因此取同一批芪红浓缩浸膏粉,分别考察加水量为 0.095、0.100、0.105 倍,对芪红浓缩丸的成型工艺的影响,结果见表 2。

表 2 加水量对丸剂的影响

Tab 2 Effect of water addition dosage on pills

| 加水量 / 倍 | 软材、丸条性状                            | 丸条拉伸长度 /cm | 丸条弯曲度 /° | 外观                          | 成丸率 /% |
|---------|------------------------------------|------------|----------|-----------------------------|--------|
| 0.095   | 丸片、丸条偏硬,不易变形,不易切丸                  | 2.5        | 120~180  | 丸子圆整度不好,大小、色泽不均匀,无粘连现象      | 94.69  |
| 0.100   | 软材软,丸块表面光滑细腻无花斑,丸片、丸条偏软,韧性好,弹性大不易断 | 3.0        | 120~180  | 丸子圆整度较好,大小、色泽均匀,无粘连现象       | 97.64  |
| 0.105   | 软材、丸块、丸片、丸条偏软,韧性好,弹性大不易断,易发生形变     | 3.4        | 120~180  | 丸子圆整度较好,大小不均匀,色泽均匀,存在一定粘连现象 | 97.76  |

**2.3.8 干燥温度及干燥时间** 丸粒干燥温度对干燥时间及含量有一定影响,据 2020 年版《中国药典》规定,含有挥发性成分或淀粉含量较高者,干燥温度不应超过 60℃。因此,本试验考察的干燥温度为 60℃ 时不

同干燥时间(26、28、30、32、34、36 h)对芪红浓缩丸的外观、溶散时限及水分的影响。由于处方中含有炙淫羊藿,炮制过程为取羊脂油加热熔化,加入淫羊藿丝,用文火炒至均匀有光泽,取出,放凉。浓缩丸



经过干燥后，提取物中的羊脂油使得丸剂外观变得光滑油亮，呈褐色浓缩水丸，外观评价差异较小，因此将受干燥条件影响较大的水分和溶散时限作为考察指标。结果见图 1，不同干燥时间的丸剂在 15 min 内全部溶散，符合药典规定（溶散时限 < 2 h）；干燥 28 h 后，丸粒水分 < 9%，随着干燥时间的增加水分逐渐降低，直至 36 h 丸剂未出现裂纹及炭化现象。然而干燥时间过长会导致丸剂表面硬化从而影响口感，综合考虑，干燥时间为 28 ~ 36 h 较为合适。

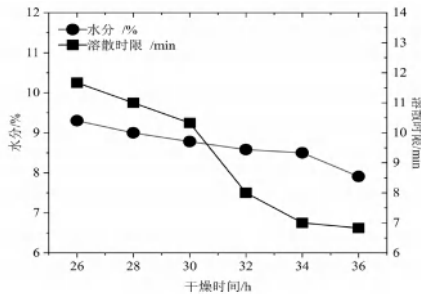


图 1 干燥时间对成型工艺的影响

Fig 1 Effect of drying time on the molding process

注：圆点代表水分值，对应左侧坐标轴；方块代表溶散时间，对应右侧坐标轴。

Note: The dot represents the moisture value, corresponding to the left coordinate axis; the square represents the dissolution time, corresponding to the coordinate axis on the right.

2.4 指标权重系数分配评分

2.4.1 AHP 法 AHP 法是一种主观赋权法，根据梯阶层次结构对应的重要程度进行定性判断并予以量化。由于浓缩丸的指标性成分含量稳定，因此以成丸率及成型工艺相关检查为主要指标，以成丸率、水分含量、溶散时限、外观、丸条性状作为权重指标，影响重要顺序为：成丸率 = 水分含量 > 溶散时限 > 外观差异 > 丸条性状（拉伸长度），采用 1 ~ 4 标度法评判两两指标之间的优先性并赋予评分值，建立判断矩阵，结果见表 3。通过 SPSS PRO 平台 (<https://www.spsspro.com/>) 对矩阵的最大特征根值进行计算，得到一致性指标  $CI = 0.01$ 、 $CR = 0.009 < 0.100$ ，即表明建立的判断矩阵及指标层次排序具有一致性，可行。因此确定成丸率权重为 0.3211，水分含量权重为 0.3211，溶散时限权重为 0.1711，外观差异权重为 0.1117，丸条性状权重为 0.0750。

2.4.2 CRITIC 法 CRITIC 法是依照评价指标的对比强度和指标之间的冲突性来综合衡量指标的客观权重。将指标进行无量纲化处理 = (最大指标值 - 指标值) / (最大指标值 - 最小指标值)<sup>[6]</sup>，再通过 SPSS PRO 平台计算相应的指标变异性、冲突性、信息量。最终得到成丸率权重为 0.1880，水分含量权重为 0.1890，溶散时限权重为 0.1682，外观差异权重为 0.1919，丸条性状权重为 0.2629，结果见表 4。

表 3 指标成对比较的判断优先矩阵

Tab 3 Judgment priority matrix for pairwise comparison of indicators

| 指标   | 成丸率 | 水分含量 | 溶散时限 | 外观差异 | 丸条性状 |
|------|-----|------|------|------|------|
| 成丸率  | 1   | 1    | 2    | 3    | 4    |
| 水分含量 | 1   | 1    | 2    | 3    | 4    |
| 溶散时限 | 1/2 | 1/2  | 1    | 2    | 2    |
| 外观差异 | 1/3 | 1/3  | 1/2  | 1    | 2    |
| 丸条性状 | 1/4 | 1/4  | 1/2  | 1/2  | 1    |

表 4 CRITIC 法权重计算结果

Tab 4 Weight calculation of CRITIC method

| 指标   | 指标变异性  | 指标冲突性 | 信息量     | 权重 /%  |
|------|--------|-------|---------|--------|
| 成丸率  | 32.208 | 4.154 | 133.786 | 18.804 |
| 水分含量 | 30.084 | 4.470 | 134.474 | 18.900 |
| 溶散时限 | 29.728 | 4.026 | 119.691 | 16.823 |
| 外观差异 | 29.262 | 4.665 | 136.499 | 19.185 |
| 丸条性状 | 41.596 | 4.497 | 187.042 | 26.289 |

2.4.3 AHP-CRITIC 综合评分法 根据 AHP-CRITIC 综合评分公式  $\omega_{\text{综合}ij} = \omega_{\text{AHP}ij} \omega_{\text{CRITIC}ij} / \sum \omega_{\text{AHP}ij} \omega_{\text{CRITIC}ij}$ ，最终得到成丸率综合权重为 0.3161，水分含量综合权重为 0.3177，溶散时限综合权重为 0.1507，外观差异综合权重为 0.1122、丸条性状综合权重为 0.1032。

2.5 指标权重系数分配评分 Box-Behnken 响应面设计及结果

2.5.1 Box-Behnken 响应面试验设计 根据单因素试验结果发现丸剂的成型影响因素较为复杂，单因素试验难以对丸剂成型工艺进行全面综合考察，因此以丸剂质量影响较大的加水量 (A)、干燥时间 (B)、辅料占比 (C) 为自变量，按照单因素优选出的水平进行编码，运用 Design Expert 13.0 软件进行响应面试验设计，记录试验结果，见表 5、表 6。

2.5.2 综合评分结果比较 将 3 种计算权重分配方法得到的权重系数分别进行综合评分，综合评分 = (成丸率实测值 / 最大值 × 权重系数 + 水分含量最小值 / 实测值 × 权重系数 + 溶散时限最小值 / 实测值 × 权重系数 + 外观最小值 / 实测值 × 权重系数 + 丸条性状实测值 / 最大值 × 权重系数) × 100<sup>[7]</sup>，结果见表 7。通过 SPSS PRO 平台对 AHP、CRITIC 法得到的权重值进行斯皮尔曼相关系数分析，相关系数为 -0.41，表明两种赋权法存在较大差异。对表 7 中 AHP 法、CRITIC 法及 AHP-CRITIC 法综合评分进行斯皮尔曼相关性分析，AHP 法与 CRITIC 法、AHP 法与 AHP-CRITIC 法、CRITIC 法与 AHP-CRITIC 法相关系数分别为 0.929 ( $P < 0.01$ )、0.995 ( $P < 0.01$ )、0.949 ( $P < 0.01$ )，表明 3 种赋权法的评分结果具有一致性，综合评分结果可靠。

表 5 响应面试验设计因素水平表

| Tab 5 Factor and level of response surface method |           |           |           |
|---------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| 水平                                                | 因素        |           |           |
|                                                   | A 加水量 / 倍 | B 干燥时间 /h | C 辅料占比 /% |
| — 1                                               | 0.095     | 28        | 25        |
| 0                                                 | 0.100     | 32        | 30        |
| 1                                                 | 0.105     | 36        | 35        |

表 6 响应面试验方案及结果

| Tab 6 Design and results of response surface method |       |    |    |        |       |           |          |          |
|-----------------------------------------------------|-------|----|----|--------|-------|-----------|----------|----------|
| 序号                                                  | A     | B  | C  | 成丸率 /% | 水分 /% | 溶散时限 /min | 外观差异 /mm | 拉伸长度 /cm |
| 1                                                   | 0.095 | 28 | 30 | 94.02  | 8.97  | 10.33     | 0.62     | 2.5      |
| 2                                                   | 0.105 | 28 | 30 | 93.94  | 9.21  | 11.00     | 0.57     | 4.0      |
| 3                                                   | 0.095 | 36 | 30 | 95.76  | 8.77  | 9.17      | 1.99     | 3.0      |
| 4                                                   | 0.105 | 36 | 30 | 96.23  | 8.73  | 9.00      | 1.05     | 4.2      |
| 5                                                   | 0.095 | 32 | 25 | 92.66  | 8.84  | 7.67      | 1.68     | 2.5      |
| 6                                                   | 0.105 | 32 | 25 | 93.56  | 9.57  | 8.33      | 1.15     | 3.0      |
| 7                                                   | 0.095 | 32 | 35 | 95.02  | 9.23  | 7.83      | 1.03     | 2.6      |
| 8                                                   | 0.105 | 32 | 35 | 96.27  | 9.20  | 8.17      | 1.28     | 5.0      |
| 9                                                   | 0.100 | 28 | 25 | 90.96  | 9.37  | 7.67      | 1.67     | 2.0      |
| 10                                                  | 0.100 | 36 | 25 | 91.09  | 8.89  | 7.17      | 1.13     | 2.0      |
| 11                                                  | 0.100 | 28 | 35 | 92.86  | 9.33  | 7.50      | 1.10     | 2.0      |
| 12                                                  | 0.100 | 36 | 35 | 94.84  | 8.89  | 7.00      | 0.79     | 5.0      |
| 13                                                  | 0.100 | 32 | 30 | 96.71  | 8.85  | 6.83      | 0.69     | 5.0      |
| 14                                                  | 0.100 | 32 | 30 | 96.51  | 8.90  | 7.00      | 0.44     | 5.0      |
| 15                                                  | 0.100 | 32 | 30 | 96.94  | 8.89  | 6.83      | 0.52     | 4.8      |
| 16                                                  | 0.100 | 32 | 30 | 96.70  | 8.74  | 7.17      | 0.42     | 4.9      |
| 17                                                  | 0.100 | 32 | 30 | 96.62  | 8.85  | 7.00      | 0.32     | 4.9      |

**2.5.3 响应面结果分析** 按照 AHP-CRITIC 混合加权法赋权试验组进行综合评分计算, 将结果导入 Design-Expert13.0 软件进行二次多元回归拟合处理, 得到具有 3 个自变量的回归模型方程, 综合评分 =  $95.87 + 1.24A + 1.93B + 2.22C + 0.5916AB - 1.31AC + 1.68BC - 5.91A^2 - 5.77B^2 - 6.3C^2$ ,  $R^2 = 0.9392 > 0.9$ , 说明最佳工艺条件下试验值与模型预测值拟合较好。对试验模型进行方差分析, 结果见表 8。二次多项式模型  $P < 0.05$ , 说明该试验拟合的模型具有显著性。同时失拟项  $P = 0.2716 > 0.05$ , 即失拟不显著, 说明其他因素对试验结果的干扰较小, 模型拟合度较好。通过拟合方程的一次项系数可知因素辅料占比 C 呈显著影响 ( $P < 0.05$ ), 在二次项中,  $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$  具有显著影响 ( $P < 0.05$ ), 该试验具有统计学意义。根据 AHP-CRITIC 综合评分结果, 运用软件绘制不同因素的交互作用对成型工艺影响的 3D 曲面图及等高线图, 结果见图 2。响应面图的陡峭程度与研究因素对试验结果的影响程度成正相关, 响应面曲面图表明辅料占比对综合评分的影响显著; 等高线图通过呈现椭圆程度表示两两因素相互作用的显著性, 越接近椭圆则表示因素之间相互作用越显著<sup>[8]</sup>, 如图 2 所示, 相对 AB 和 AC、BC 间的交互作用更加明显, 与方差分

表 7 响应面试验评分结果

| Tab 7 Score of response surface test |         |         |         |       |          |              |
|--------------------------------------|---------|---------|---------|-------|----------|--------------|
| 序号                                   | 加水量 / 倍 | 干燥时间 /h | 辅料占比 /% | 综合评分  |          |              |
|                                      |         |         |         | AHP 法 | CRITIC 法 | AHP-CRITIC 法 |
| 1                                    | 0.095   | 28      | 30      | 83.20 | 71.07    | 82.73        |
| 2                                    | 0.105   | 28      | 30      | 84.49 | 78.55    | 84.86        |
| 3                                    | 0.095   | 36      | 30      | 82.74 | 69.04    | 82.33        |
| 4                                    | 0.105   | 36      | 30      | 86.69 | 78.36    | 86.83        |
| 5                                    | 0.095   | 32      | 25      | 83.55 | 68.73    | 82.56        |
| 6                                    | 0.105   | 32      | 25      | 81.93 | 70.55    | 81.42        |
| 7                                    | 0.095   | 32      | 35      | 84.14 | 70.92    | 83.29        |
| 8                                    | 0.105   | 32      | 35      | 86.96 | 81.73    | 87.37        |
| 9                                    | 0.100   | 28      | 25      | 80.43 | 64.79    | 79.23        |
| 10                                   | 0.100   | 36      | 25      | 84.19 | 68.57    | 82.81        |
| 11                                   | 0.100   | 28      | 35      | 82.66 | 67.51    | 81.42        |
| 12                                   | 0.100   | 36      | 35      | 91.67 | 87.39    | 91.73        |
| 13                                   | 0.100   | 32      | 30      | 93.50 | 89.38    | 93.52        |
| 14                                   | 0.100   | 32      | 30      | 95.79 | 93.91    | 95.86        |
| 15                                   | 0.100   | 32      | 30      | 94.82 | 91.24    | 94.74        |
| 16                                   | 0.100   | 32      | 30      | 96.29 | 94.06    | 96.34        |
| 17                                   | 0.100   | 32      | 30      | 98.89 | 98.77    | 98.91        |

表 8 方差分析结果

| Tab 8 Analysis of variance |        |     |        |       |        |
|----------------------------|--------|-----|--------|-------|--------|
| 方差来源                       | 平方和    | 自由度 | 均方     | F     | P      |
| 模型                         | 608.57 | 9   | 67.62  | 12.01 | 0.0017 |
| A                          | 11.43  | 1   | 11.43  | 2.03  | 0.1971 |
| B                          | 29.87  | 1   | 29.87  | 5.31  | 0.0547 |
| C                          | 39.59  | 1   | 39.59  | 7.03  | 0.0328 |
| AB                         | 1.40   | 1   | 1.40   | 0.25  | 0.6332 |
| AC                         | 6.83   | 1   | 6.83   | 1.21  | 0.3072 |
| BC                         | 11.30  | 1   | 11.30  | 2.01  | 0.1993 |
| A <sup>2</sup>             | 147.18 | 1   | 147.18 | 26.15 | 0.0014 |
| B <sup>2</sup>             | 140.27 | 1   | 140.27 | 24.92 | 0.0016 |
| C <sup>2</sup>             | 167.29 | 1   | 167.29 | 29.73 | 0.0010 |
| 残差                         | 39.40  | 7   | 5.63   |       |        |
| 失拟项                        | 23.13  | 3   | 7.71   | 1.90  | 0.2716 |
| 纯误差                        | 16.27  | 4   | 4.07   |       |        |
| 总差                         | 647.96 | 16  |        |       |        |

析结果一致。综合模型拟合结果和实际操作, 最终确定芪红浓缩丸成型工艺为干燥时间 32 h、加水量 0.1 倍、辅料占比 30%, 此时综合评分为 95.87。

**2.6 验证试验**

按“2.5.3”项下优化的成型工艺制备 3 批芪红浓缩丸, 进行验证试验, 结果见表 9。3 批浓缩丸的平均综合评分为 97.28 ( $RSD < 2.0\%$ ), 证明该工艺稳定合理, 操作性强。

表 9 验证试验结果

| Tab 9 Validation test |        |       |           |          |          |       |       |       |
|-----------------------|--------|-------|-----------|----------|----------|-------|-------|-------|
| 批次                    | 成丸率 /% | 水分 /% | 溶散时限 /min | 外观差异 /mm | 丸条性状 /cm | 综合评分  | 平均分   | RSD/% |
| 1                     | 96.75  | 8.90  | 6.83      | 0.32     | 5.00     | 98.39 | 97.28 | 1.1   |
| 2                     | 96.71  | 8.70  | 7.17      | 0.40     | 5.50     | 97.06 |       |       |
| 3                     | 96.47  | 8.87  | 7.00      | 0.39     | 5.20     | 96.38 |       |       |

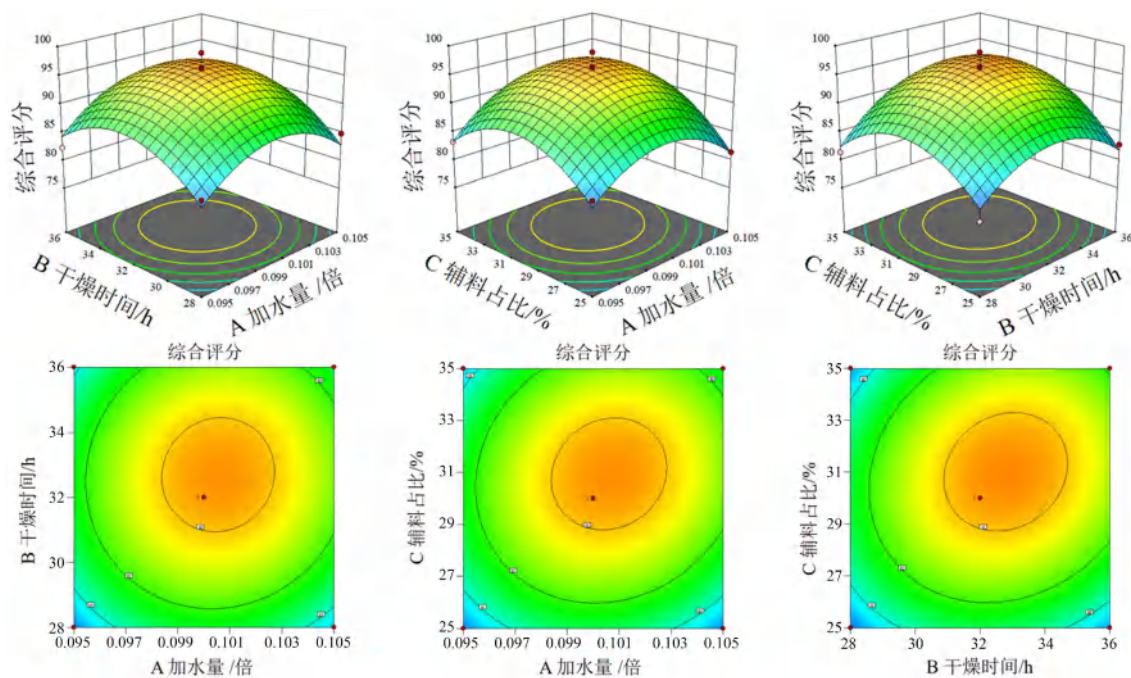


图 2 各因素的三维响应面图和等高线图

Fig 2 Three dimensional response surface and contour maps of various factors

### 3 讨论

浓缩丸作为一种传统剂型，制备方法简单、载药量大，且具备释药缓慢及延长药效的作用，属于理想的中药剂型。而丸剂的质量好坏由药粉、软材、丸块、丸条及黏合剂种类、用量等多因素共同决定，成型工艺由多指标及因素相互作用，混合加权法在提供理论依据的基础上增加客观性从而确定了各指标更加合理的权重。AHP 法确定的权重系数是由专家的判断进行评分，存在一定的个人经验不足等主观判断影响<sup>[9]</sup>。CRITIC 法根据数据原本的客观属性进行科学评价，可消除个人经验等干扰，但会造成各指标间重要性差异关系的极大弱化。分别通过对 AHP 法、CRITIC 法得到的权重系数进行相关性分析，证实了两种方法反映的信息的叠加性并不显著。传统的正交试验虽然能在一定程度上优化条件，但忽略了多个因素之间的复杂关系，Box-Behnken 响应面试验不仅大大节省了时间成本而且减少了试验次数。为避免单一赋权法造成的结果偏差，最终确定采用 AHP-CRITIC 混合加权法对 Box-Behnken 响应面试验结果进行权重系数计算，为芪红浓缩丸的成型工艺和后续的综合利用提供了科学依据<sup>[10]</sup>。试验结果表明，辅料占比对成型工艺具有统计学意义，最终筛选出的最佳工艺参数为：辅料占比 30%、加水量 0.1 倍、干燥时间为 32 h，制备的芪红浓缩丸外观圆整、大小均匀，水分及溶散时限均合格，且成丸率较高。经验证试验证实，优化

后的成型工艺稳定可靠、重复性好，为该复方成型制剂工艺提供了科学依据。

### 参考文献

- [1] 王艳宏, 张利那, 邢希旺, 等. 中药浓缩丸的研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2021, 38 (17): 2180-2184.
- [2] 岳国超, 王兵娥, 焦玉. 塑制法制备中药丸剂中物料因素与丸剂成型性的关系 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30 (5): 1125-1127.
- [3] 雷卉艳, 牛晓静, 吴延娆, 等. 熵权法在中药制剂研究中的应用概况 [J]. 中成药, 2024, 46 (10): 3348-3351.
- [4] 张颖, 张梦娇, 宋兆普, 等. 补心通络丸制备工艺的优化 [J]. 中成药, 2021, 43 (7): 1863-1865.
- [5] 赵舒婷, 赵万顺, 齐敏超, 等. 养血清脑丸丸条制备工艺优化 [J]. 中成药, 2023, 45 (12): 4096-4101.
- [6] 高丽霞, 闫治攀, 李喜香, 等. 基于指纹图谱结合 AHP-CRITIC 综合评分法优选紫连生肌凝胶剂提取工艺 [J]. 中国中医药信息杂志, 2023, 30 (8): 136-141.
- [7] 杨春红, 李姝, 赵琪, 等. 基于 AHP-CRITIC 赋权法优化明目益睛丸成型工艺 [J]. 中国现代应用药学, 2024, 41 (5): 672-677.
- [8] 熊丹, 蒋翠平, 牛江进, 等. G1-熵权法结合 Box-Behnken 响应面法优化银星养脑方醇提工艺 [J]. 中南药学, 2024, 22 (7): 1742-1747.
- [9] 石金敏, 周灿, 余绪明, 等. CRITIC-AHP 法结合 Box-Behnken 响应面法优选三金排石合剂提取工艺 [J]. 中南药学, 2022, 20 (6): 1333-1337.
- [10] 雷芳, 伍丹情, 费清松, 等. AHP-CRITIC 法结合正交设计优选复方丹参方中丹参与三七的水提工艺 [J]. 中南药学, 2022, 20 (3): 551-556.

(收稿日期: 2024-11-01; 修回日期: 2025-01-17)



# 热孜亚纳消炎颗粒提取工艺优选及抗前列腺炎药效学研究

汗佐热木·卡地尔<sup>1,2</sup>, 何承辉<sup>2\*</sup>, 帕依曼·亥米提<sup>2</sup> (1. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830054; 2. 新疆维吾尔自治区药物研究院, 乌鲁木齐 830034)

**摘要:** **目的** 优化热孜亚纳消炎颗粒的提取工艺条件, 并对其进行初步抗前列腺炎药效学评价, 为该制剂的开发提供依据。**方法** 以金丝桃苷、田蓟苷、总黄酮的含量以及干膏得率的综合评分为考察指标, 采用单因素实验和正交实验, 优选热孜亚纳消炎颗粒的提取工艺。将 60 只 SD 大鼠随机分为空白对照组, 慢性非细菌性前列腺炎 (CNP) 模型组, 热孜亚纳消炎颗粒低、中、高剂量组以及三金片组, 每组 10 只。除空白对照组外, 其余各组大鼠前列腺左右腹侧叶注射 3% 角叉菜胶建立 CNP 模型, 造模后各给药组给药干预 21 d, 观察大鼠体重变化, 检测各组大鼠前列腺组织病理学和炎症因子水平。**结果** 热孜亚纳消炎颗粒的最佳水提工艺为加 12 倍量水, 提取 3 次, 每次 1 h; 与 CNP 组比较, 低、中、高剂量组的热孜亚纳消炎颗粒干预后前列腺组织结构逐渐恢复正常, 炎性细胞浸润减少, 炎症因子前列腺素 E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)、白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 含量明显降低。**结论** 优选的提取工艺稳定可行, 热孜亚纳消炎颗粒对 CNP 有一定的改善作用。

**关键词:** 正交设计; 提取工艺; 热孜亚纳消炎颗粒; 药效学; 炎症

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)06-1678-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.027

## Optimization of extraction of Reziyana anti-inflammatory granules and anti-prostatitis pharmacodynamics

Hanzuoremu Kadier<sup>1,2</sup>, HE Cheng-hui<sup>2\*</sup>, Payiman Haimiti<sup>2</sup> (1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054; 2. Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830034)

**Abstract: Objective** To optimize the extraction of Reziyana anti-inflammatory granules and evaluate the pharmacodynamics of its anti-prostatitis effect, to provide reference for formulation development. **Methods** The comprehensive scores of hyperoside, tilianin, total flavonoid content, and dry extract yield were used as the evaluation indicators. Single-factor and orthogonal experiments were used to optimize the extraction of the granules. Sixty SD rats were randomly divided into a blank control group, a chronic nonbacterial prostatitis (CNP) model group, low-, medium-, and high-dose Reziyana groups, and a Sanjin tablet group (10 rats in each group). Except for the blank control group, CNP models were established in the remaining groups by injecting 3% carrageenan into the left and right ventral lobes of the prostate. After the modeling, each treatment group was correspondingly intervened for 21 days. Changes in the rat body weight were observed, and the histopathology of the prostate tissues and levels of inflammatory factors were measured. **Results** The optimal water extraction for Reziyana anti-inflammatory granules included 3 extractions each for 1 hour with 12 times of water. Compared with the CNP group, the prostate tissue structure in the low-, medium-, and high-dose Reziyana groups gradually returned to normal, with reduced inflammatory cell infiltration and obviously decreased inflammatory factors, including prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). **Conclusion** The optimized extraction is stable and feasible. Reziyana anti-

**基金项目:** 新疆维吾尔自治区重大科技专项 (No.2022A03017-1)。

**作者简介:** 汗佐热木·卡地尔, 女, 硕士研究生, 主要从事中药新药研究, email: h16699195253@163.com \*通信作者: 何承辉, 女, 博士, 主要从事中药新药研究与开发, email: 1369467054@qq.com

inflammatory granules exhibit a certain ameliorative effect on CNP.

**Key words:** orthogonal design; extraction process; Reziyana anti-inflammatory granule; pharmacodynamics; inflammation

慢性前列腺炎 (chronic prostatitis, CP) 是中青年男性常见的生殖系统疾病, 其中慢性非细菌性前列腺炎 (chronic nonbacterial prostatitis, CNP) 被美国国立卫生研究院重新分类定义为Ⅲ型前列腺炎, 占前列腺炎的 90% 以上, 具有较高的发病率<sup>[1]</sup>。CNP 主要症状表现为下腹部、会阴部疼痛或盆腔不适, 伴随尿频、尿急、尿痛、下尿路阻塞、性功能障碍、抑郁等症状, 根据 CNP 的临床表现, 我国中医学将其归类为“淋浊”“淋证”等范畴<sup>[2-3]</sup>。CNP 的治疗原则是根据患者的症状个体化, 旨在缓解临床症状, 如疼痛、排尿困难和精神或心理障碍<sup>[4]</sup>。然而, 临床上对 CNP 的总体治疗效果并不令人满意, 通常伴随着较高的复发率<sup>[5]</sup>。因此, 迫切需要探索新的治疗方法, 为 CNP 的临床治疗提供应用前景。

热孜亚纳消炎颗粒处方是集多年临床经验所献之方, 经新疆维吾尔自治区药品监督管理局批准备案的院内制剂。处方由维药茴香根皮、刺山柑根皮、菟丝子、菊苣子、黄瓜子、甜瓜子、牛舌草、香青兰、洋茴香、小茴香、菟丝草等 11 味药组成, 其中茴香根皮通阳止痛、通经利尿<sup>[6]</sup>; 刺山柑根皮具有抗菌、抗炎、抗过敏等生物活性<sup>[7]</sup>; 牛舌草具有抗炎、抗菌作用<sup>[8]</sup>。该方中金丝桃苷具有广泛的药理作用, 包括抗炎<sup>[9]</sup>和抗氧化<sup>[10]</sup>。田蓟苷属于黄酮类化合物, 可以在炎症反应中起到抗炎和抗氧化作用。全方热孜亚纳消炎颗粒具有消炎作用, 适用于前列腺炎、子宫内膜炎、阴道炎等疾病的治疗, 原方组成明确, 但提取工艺还未建立, 为发挥民族药疗效优势, 本研究对热孜亚纳消炎颗粒的提取工艺进行优化, 并在此基础上进行初步药效学评价, 为其新药开发提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

LC-2030 Plus 型高效液相色谱仪 (HPLC)、UV-2600 型紫外分光光度计 (日本岛津公司); BS110S 型分析天平 (北京赛多利斯天平有限公司); AB135-S 型分析天平 (梅特勒-托利多公司); JXFSTPRP-CL 全自动样品冷冻研磨仪 (上海净信实业发展有限公司); Cytation3 多功能酶

标仪 (美国伯腾公司)。

### 1.2 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 (180 ~ 220 g) [北京华阜康生物科技股份有限公司, 动物合格证号: SCXK (京) 2024-0003]。在湿度 30% ~ 50%, 温控 20 ~ 26 °C, 12 h/12 h 明暗交替照明, 清洁干燥环境中饲养。

### 1.3 试药

处方中药材均购自新疆麦迪森药业有限公司饮片分公司, 由新疆药物研究所何江研究员鉴定为正品; 芦丁 (批号: 100080-202012, 纯度: 92.2%)、金丝桃苷 (批号: 111521-202310, 纯度: 94.3%) (中国食品药品检定研究院), 田蓟苷 (批号: GSB11-3790-2020, 纯度 > 98%, 中国科学院新疆理化技术研究所); 角叉菜胶 (货号: S30559-25 g, 上海源叶生物科技有限公司); 三金片 (规格: 每片重 0.32 g, 批号: 230801, 桂林三金药业股份有限公司); 大鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、大鼠白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、大鼠白细胞介素-6 (IL-6)、前列腺素 E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) ELISA 试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 提取工艺研究

**2.1.1 高效液相色谱法** (《中国药典》2020 年版一部附录 VI D) 测定提取液中金丝桃苷和田蓟苷含量

① 色谱条件与系统适用性实验: 色谱柱为 COSMOSIL packed column 5C18-MS-II (4.6 mm); 检测波长: 金丝桃苷 360 nm, 田蓟苷 330 nm; 流动相: 乙腈 (A) -0.1% 磷酸 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 35 min, 17%A; 35.01 ~ 65 min, 30%A; 65 ~ 70 min, 30% ~ 17%A); 流速: 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 进样量: 10  $\mu$ L; 柱温: 35 °C; 理论塔板数按金丝桃苷、田蓟苷峰计算应不低于 2000。

② 混合对照品溶液的制备: 精密称取金丝桃苷、田蓟苷对照品适量, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得金丝桃苷对照品约 4.48  $\mu$ g · mL<sup>-1</sup>, 田蓟苷对照品约 10.14  $\mu$ g · mL<sup>-1</sup> 的溶液。

③ 供试品溶液的制备: 称取处方 11 味药材总 39.75 g, 加 10 倍量水, 回流提取 3 次, 每次 1 h, 用水定容至 2000 mL 量瓶中, 摇匀, 用微孔

滤膜（0.45 μm）过滤，弃去初滤液，取续滤液作为供试品溶液。

④ 测定方法：精密吸取对照品溶液与供试品溶液 10 μL，注入液相色谱仪，记录色谱图，结果显示，混合对照品图谱与供试品图谱中金丝桃苷、田蓟苷相应的保留时间相对应，表明方法专属性良好，见图 1。

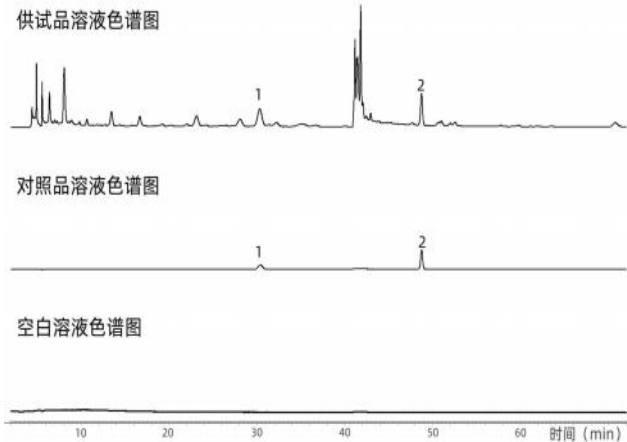


图 1 热孜亚纳消炎颗粒高效液相色谱图

Fig 1 High performance liquid chromatography of Reziyana anti-inflammatory granule

1. 金丝桃苷 (hyperoside); 2. 田蓟苷 (tilianin)

**2.1.2 紫外-可见分光光度法**《中国药典》2020 年版一部附录 VB) 测定提取液中总黄酮含量 精确称取芦丁对照品 20.57 mg，置于 50 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，制成储备液，从储备液中精密量取 20 mL，置于 50 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀得  $0.164\ 56\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的芦丁对照品溶液。分别精密吸取上述对照品溶液 ( $0.164\ 56\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 0.0、2.0、4.0、6.0、8.0 mL，分别置于 25 mL 量瓶内，加水至 8 mL，摇匀，加 5% 亚硝酸钠，放置 6 min，加 10% 硝酸铝 1 mL，放置 6 min，加  $1\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠 10 mL，加水稀释至刻度，摇匀，放置 15 min，以第一份为空白对照液，在 200 ~ 700 nm 波长内进行光谱扫描，得最大吸收波长为 508 nm。按分光光度法实验，在 508 nm 处测定各样品吸光度，并以吸光度为纵坐标，质量浓度为横坐标绘制标准曲线 ( $y = 12.237x + 0.0004$ ,  $R^2 = 0.9992$ )。

精密吸取药材提取液 3 mL 置于 25 mL 量瓶内，加水至 8 mL，摇匀，加 5% 亚硝酸钠 1 mL，放置 6 min，加 10% 硝酸铝 1 mL，放置 6 min，加  $1\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的氢氧化钠 10 mL，加水稀释至刻度，摇匀，放置 15 min，作为供试品溶液。按规定在波长 508 nm 处测定吸光度，依标准曲线计算总黄酮含量。

**2.1.3 出膏率的测定** 精密量取药材提取液 50 mL，置于已干燥至恒质量的蒸发皿中，水浴蒸干后，于 105 °C 干燥 3 h，取出，迅速置于干燥器中冷却至室温，称重，计算出膏率。

**2.1.4 单因素考察** 采用单因素实验法，以金丝桃苷、田蓟苷、总黄酮的含量及全方出膏率为综合评价指标，金丝桃苷含量的加权系数确定为 0.3、田蓟苷含量的加权系数为 0.3、总黄酮的含量加权系数为 0.3 和全方出膏率加权系数为 0.1，进行单因素实验，将每次实验各指标成分的评分值乘以相应的加权系数后求和，综合评分 = (金丝桃苷含量 / 金丝桃苷最大含量 × 30% + 田蓟苷含量 / 田蓟苷最大含量 × 30% + 总黄酮含量 / 总黄酮最大含量 × 30% + 浸膏得率 / 浸膏得率最大含量 × 10%) × 100%<sup>[1]</sup>，以综合评分值计算单因素实验结果，分别对影响提取的加水倍量、提取时间、提取次数进行优选。

首先，将固定加水倍量为 36 倍、提取时间为 3 h，分别考察提取次数 1、2、3、4 次；然后，将其余两项固定，考察 8、10、12、14 倍的水；最后，根据上述实验结果固定提取次数和加水倍量，考察提取时间为 1、2、3、4 h。结果见图 2，根据综合评价指标综合评分以及考虑时间成本，确定最佳提取条件为：提取次数 2 次、加水倍量 14 倍、提取时间 2 h。

**2.1.5 正交实验** 根据单因素实验结果，选取提取次数 (A)、加水倍量 (B)、提取时间 (C) 为考察因素，以金丝桃苷、田蓟苷、总黄酮的含量及全方出膏率为评价指标，用  $L_9(3^4)$  安排实验，将各指标成分的总量分别转换为评分值，以综合评分值计算正交实验结果，并进行方差分析，因素水平见表 1，正交实验直观分析结果见表 2，方差分析结果见表 3。

表 1 正交实验因素水平表

Tab 1 Factor and level of orthogonal test

| 水平 | 因素          |             |             |
|----|-------------|-------------|-------------|
|    | A. 提取次数 / 次 | B. 加水倍量 / 倍 | C. 提取时间 / h |
| 1  | 1           | 10          | 1           |
| 2  | 2           | 12          | 2           |
| 3  | 3           | 14          | 3           |

由表 2 和表 3 可知，各因素对综合评分结果影响大小依次为  $A > B > C$ 。根据综合直观分析与方差分析结果，为节省时间，操作简便，最终确定提取工艺为  $A_3B_2C_1$ ，即以提取次数为 3 次，加水倍量为 12 倍，提取时间为 1 h。



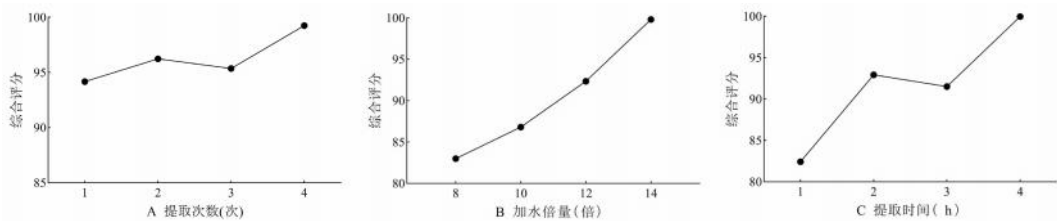


图2 提取次数、加水倍量、提取时间的单因素考察结果  
Fig 2 Single-factor test of extraction times, solvent volume, and extraction time

| 表 2 正交实验设计及评分结果                              |             |             |             |       |
|----------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| Tab 2 Orthogonal design and results of score |             |             |             |       |
| 序号                                           | A. 提取次数 / 次 | B. 加水倍量 / 倍 | C. 提取时间 / h | 综合评分  |
| 1                                            | 1           | 1           | 1           | 49.36 |
| 2                                            | 1           | 2           | 2           | 57.44 |
| 3                                            | 1           | 3           | 3           | 59.92 |
| 4                                            | 2           | 1           | 2           | 80.79 |
| 5                                            | 2           | 2           | 3           | 90.11 |
| 6                                            | 2           | 3           | 1           | 87.03 |
| 7                                            | 3           | 1           | 3           | 92.42 |
| 8                                            | 3           | 2           | 1           | 97.06 |
| 9                                            | 3           | 3           | 2           | 95.27 |
| $K_1$                                        | 166.72      | 222.57      | 233.45      |       |
| $K_2$                                        | 257.93      | 244.62      | 233.50      |       |
| $K_3$                                        | 284.76      | 242.22      | 242.46      |       |
| $R$                                          | 118.03      | 22.04       | 9.01        |       |

| 表 3 方差分析结果              |               |            |           |           |        |          |
|-------------------------|---------------|------------|-----------|-----------|--------|----------|
| Tab 3 Variance analysis |               |            |           |           |        |          |
| 因素                      | 自由度 ( $d_f$ ) | 离差平方和 (SS) | 方差 (MS)   | $F$       | $P$    | 显著性      |
| A                       | 2             | 2552.3492  | 1276.1746 | 1556.6820 | 0.0006 | < 0.0001 |
| B                       | 2             | 97.4967    | 48.7483   | 59.4634   | 0.0165 | < 0.05   |
| C                       | 2             | 17.9301    | 8.9651    | 10.9356   | 0.0838 | > 0.05   |

2.1.6 提取工艺验证实验 按处方 1/10 倍量，平行称取 3 份药材，按照优化提取工艺，测定金丝桃苷、田蓟苷、总黄酮的含量及全方出膏率，结果见表 4，说明正交实验优选的工艺条件合理、稳定可行。

| 表 4 热孜亚纳消炎颗粒提取工艺验证实验结果 ( $n = 3$ )                                                          |                                              |                                             |                                             |         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|---------|
| Tab 4 Verification for extraction process of Reziyana anti-inflammatory granule ( $n = 3$ ) |                                              |                                             |                                             |         |
| 次数                                                                                          | 金丝桃苷含量 / ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) | 田蓟苷含量 / ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) | 总黄酮含量 / ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) | 出膏率 / % |
| 1                                                                                           | 0.23                                         | 0.14                                        | 0.45                                        | 20.98   |
| 2                                                                                           | 0.23                                         | 0.16                                        | 0.46                                        | 21.75   |
| 3                                                                                           | 0.22                                         | 0.15                                        | 0.47                                        | 21.69   |
| 平均值                                                                                         | 0.23                                         | 0.15                                        | 0.46                                        | 21.47   |
| RSD/%                                                                                       | 2.6                                          | 7.5                                         | 2.0                                         | 2.0     |

2.2 药效学研究

2.2.1 动物分组及给药方法 取 60 只雄性 SD 大

鼠，适应性喂养一周后，随机分为空白对照组（Control）、CNP 模型组（CNP）、阳性药三金片组（SJP）、热孜亚纳消炎颗粒低剂量组（RZYN-L）、热孜亚纳消炎颗粒中剂量组（RZYN-M）、热孜亚纳消炎颗粒高剂量组（RZYN-H），每组 10 只。除空白对照组外，其余组麻醉后，打开腹腔充分暴露前列腺左右腹侧叶，各注射 50  $\mu\text{L}$  3% 角叉菜胶，注射完毕后将脏器归位。造模完成后，CNP 模型组与空白对照组灌胃给予蒸馏水，阳性药组灌胃给予三金片 0.27  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，热孜亚纳消炎颗粒低、中、高剂量组分别灌胃给予受试药 0.5、1、2  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，1 次  $\cdot \text{d}^{-1}$ ，连续 21 d。每日观察大鼠状态及进食量，末次给药 4 h 后，称重，麻醉大鼠，腹主动脉取血，将全血室温平衡 2 h，12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  低温离心 15 min，取血清，ELISA 试剂盒测定大鼠血清中 PEG<sub>2</sub> 含量；取部分前列腺组织 HE 染色观察病理学改变，其余制成 10% 组织匀浆，12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  低温离心 15 min，取上清液，ELISA 试剂盒测定 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的含量。

2.2.2 给药前后大鼠体重变化 结果显示，与空白对照组相比，造模后其余 5 组大鼠体重均降低；各给药组与 CNP 模型组相比，体重逐渐增加（见图 3）。

2.2.3 HE 染色 与空白对照组相比，CNP 模型大鼠前列腺腺体间质可见散在炎性细胞浸润，腺管上皮细胞可见增生；三金片干预后，与模型组相比，此现象明显减少，给予不同剂量的热孜亚纳消炎颗粒浸膏粉干预后前列腺组织炎性细胞浸润减少，结构逐渐恢复正常，腺腔内可见嗜酸性分泌物（见图 4）。

2.2.4 各组大鼠血清 PGE<sub>2</sub> 及前列腺 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 含量比较 与空白对照组比较，模型组大鼠血清中 PGE<sub>2</sub> 含量及前列腺组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 含量均显著升高（ $P < 0.05$ 、0.01 或 0.001）。与模型组比较，三金片组及热孜亚纳消炎颗粒高剂量组大鼠 PGE<sub>2</sub>、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及 IL-6 含量显著降低（ $P < 0.05$ 、0.01 或  $P < 0.001$ ）；中剂量组 TNF- $\alpha$  和 IL-6 含量显著降低（ $P < 0.05$ ）（见图 5）。

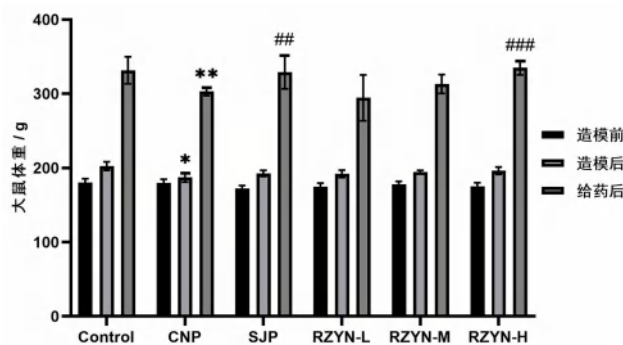


图3 热孜亚纳消炎颗粒对大鼠体重的影响 ( $n = 10$ )

Fig 3 Effect of Reziyana anti-inflammatory granules on the body weight of rats ( $n = 10$ )

注: 与空白对照组比较,  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ; 与 CNP 模型组相比,  $^{##}P < 0.01$ ,  $^{###}P < 0.001$ 。

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

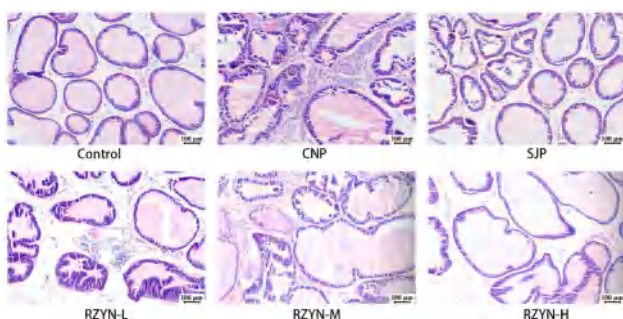


图4 热孜亚纳消炎颗粒对大鼠前列腺病理组织的影响 (HE 染色)

Fig 4 Effect of Reziyana anti-inflammatory granules on the pathological tissue of prostate in rats (HE stain)

### 3 讨论

中药复方制剂成分复杂, 需要选择合理、客观、科学的指标反映复方制剂提取工艺的优劣, 一般以有效成分及出膏率作为提取工艺评价指标<sup>[12]</sup>。本研究选水提法作为提取方法, 主要基于中药水提物更能体现传统中医药特色, 且能保障制剂的安全性和有效性。本研究中, 首先通过单因素实验考察了提取次数、加水倍量、提取时间对金丝桃苷、田蓟苷、总黄酮含量及浸膏得率的影响。综合考虑成本、有效成分提取效率以及时间成本后, 选择提取次数为 2 次, 加水量为 14 倍, 最佳提取时间为 2 h。基于单因素实验结果, 正交实验选择提取次数为 1、2、3 次, 提取时间为 1、2、3 h, 加水倍量为 10、12、14 倍。通过  $L_9(3^4)$  正交实验设计, 以选取提取次数、加水倍量、提取时间为考察因素, 以金丝桃苷、田蓟苷、总黄酮的含量及全方出膏率的综合评分为评价指标, 优化参数, 得到最优工艺 (提取 3 次、加 12 倍量水、每次提取 1 h), 并通过 3 次平行验证实验, 证明

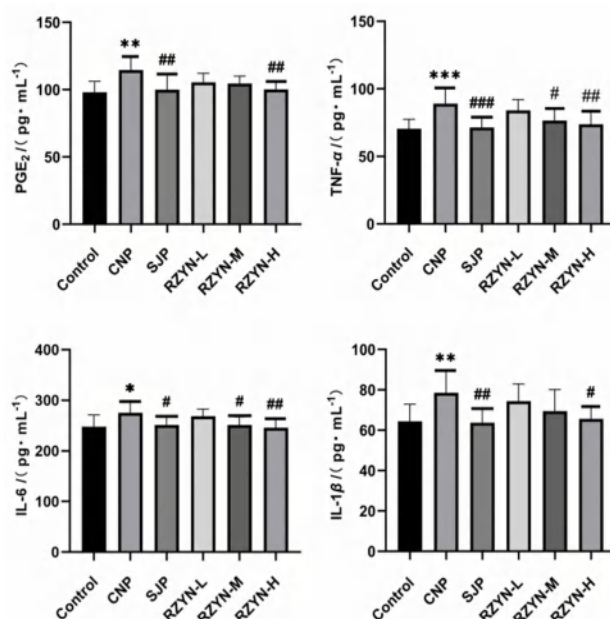


图5 热孜亚纳消炎颗粒对大鼠血清 PGE2 及前列腺 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 含量的影响 ( $n = 10$ )

Fig 5 Effect of Reziyana anti-inflammatory granules on serum PGE2 and prostate TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 levels in rats ( $n = 10$ )

注: 与空白对照组比较,  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ ; 与 CNP 模型组相比,  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{##}P < 0.01$ ,  $^{###}P < 0.001$ 。

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

工艺稳定性良好, 提取效率显著, 可作为本处方的有效提取方法。

本中药处方中大部分药材富含黄酮类成分, 如刺山柑根皮、菟丝子、菊苣子、牛舌草、香青兰等。有研究表明, 黄酮类作为菟丝子主要活性成分, 含量较高, 并且炮制可以增加菟丝子药材的总黄酮成分浸出量<sup>[13]</sup>。菟丝子的主要活性成分金丝桃苷通过靶向 RNF8 抑制其 K63 多聚泛素化催化活性, 导致  $\beta$ -catenin 的核移位受到破坏, 进而减少下游蛋白 PD-L1 的表达和激活免疫细胞, 发挥抗前列腺癌的功能<sup>[14]</sup>。本中药处方中菟丝子药材占比较高, 并且金丝桃苷为 2020 年版《中国药典》菟丝子药材含量测定的指标。已有研究表明, 香青兰黄酮类成分中田蓟苷的含量最高<sup>[15]</sup>。因此本研究以金丝桃苷、田蓟苷和总黄酮的含量作为提取工艺的评价指标, 基于黄酮类成分的药效关联性, 进一步通过动物实验验证了提取工艺优化后制剂的抗炎活性。

有研究表明, CNP 可由自身免疫异常而激活, 白细胞介素、肿瘤坏死因子、免疫球蛋白参与其免疫应答过程<sup>[16-17]</sup>。TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 主

要是由巨噬细胞、T 细胞、B 细胞等多种细胞产生，作为多向性的促炎因子及免疫应答中重要的细胞因子，可激活炎症反应的发生，还可诱导细胞毒性 T 细胞活化，从而参与局部炎症的免疫反应<sup>[18]</sup>。金丝桃苷具有抗炎作用，可通过调节卵清蛋白（OVA）诱导的哮喘小鼠模型中 IL-9、IL-17A、IL-10 和 TGF- $\beta_1$  等细胞因子的分泌和活性，起到抗炎、调节免疫紊乱、减轻哮喘症状的作用<sup>[19]</sup>。本研究观察了热孜亚纳消炎颗粒对 CNP 大鼠模型血清和前列腺组织中炎症因子的影响，结果显示，大鼠前列腺 HE 染色可见散在炎症细胞浸润，腺管上皮细胞可见增生，ELISA 实验表明其血清 PGE<sub>2</sub> 及前列腺 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平相比空白对照组显著升高。盛涛等<sup>[20]</sup>发现土茯苓总黄酮能降低自身免疫性前列腺炎模型大鼠前列腺组织 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  表达水平，改善前列腺病理形态，减轻前列腺组织炎症反应。本研究中给予低、中、高剂量热孜亚纳消炎颗粒干预后大鼠前列腺组织结构逐渐恢复正常，各给药组大鼠体重较 CNP 模型组显著升高，高剂量组大鼠前列腺炎性细胞浸润减少，血清 PGE<sub>2</sub> 及前列腺 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 含量明显降低，表明热孜亚纳消炎颗粒作用可能与抑制炎症介质的释放有关。上述提取工艺优选和药效学研究结果为热孜亚纳消炎颗粒的新药开发奠定了一定基础。

## 参考文献

- [1] 李斌, 黄德亮, 郑慧澜, 等. 泌尿清丸对慢性非细菌性前列腺炎模型大鼠的影响及作用机制探讨 [J]. 广西中医药, 2022, 45 (3): 58-63.
- [2] 陈辑, 聂卫星, 赵永伟, 等. 慢性前列腺炎的症状学与病原学的初步研究 [J]. 临床泌尿外科杂志, 2007 (11): 836, 837-840.
- [3] 金玄, 谢泳. 慢性非细菌型前列腺炎的综合治疗 [J]. 医学信息, 2019, 32 (4): 60-62.
- [4] Liu JS, Liu L, Zhang GW, et al. Poria cocos polysaccharides attenuate chronic nonbacterial prostatitis by targeting the gut microbiota: comparative study of Poria cocos polysaccharides and finasteride in treating chronic prostatitis [J]. Int J Biol Macromol, 2021, 189: 346-355.
- [5] Chen Y, Wu XH, Liu J, et al. Effects of a 6-month course of tamsulosin for chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: a multicenter, randomized trial [J]. World J Urol, 2011, 29 (3): 381-385.
- [6] 努尔古丽·麦合木提, 热汗古丽·木沙. 小茴香在维医药中的临床应用 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16 (61): 288-288.
- [7] 任远. 维药刺山柑果实化学成分及其生物活性的研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2010.
- [8] 陈长春, 庞战, 徐文文. 维药牛舌草成分及药理活性研究 [J]. 西部中医药, 2018, 31 (11): 140-145.
- [9] Ku SK, Zhou W, Lee WH, et al. Anti-inflammatory effects of hyperoside in human endothelial cells and in mice [J]. Inflammation, 2015, 38 (2): 784-799.
- [10] Nirumand MC, Hajialyani M, Rahimi R, et al. Dietary plants for the prevention and management of kidney stones: preclinical and clinical evidence and molecular mechanisms [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19 (3): 765-765.
- [11] 王晖, 陈丽, 陈昱, 等. 多指标综合评价方法及权重系数的选择 [J]. 广东药学院学报, 2007, 12 (5): 583-589.
- [12] 徐启华, 贺蓉, 彭博, 等. 999 感冒灵主要药效学及其作用机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41 (8): 1388-1396.
- [13] 赵唯年, 潘新波, 赵丽娟, 等. 不同炮制方法对菟丝子醇提物中总黄酮、总多糖及 7 种成分的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2022, 29 (11): 97-103.
- [14] 陈洁. 金丝桃苷通过抑制 RNF8 调节的 K63 多聚泛素化增强细胞免疫发挥抗前列腺癌作用 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2024.
- [15] 杨亚琼, 王素巍, 王晓琴. 香青兰的质量标准研究 [J]. 华西药学杂志, 2025, 40 (1): 65-69.
- [16] 陈晶, 王建忠, 梁朝朝. 慢性前列腺炎相关免疫指标的变化及意义 [J]. 安徽医学, 2018, 39 (2): 241-244.
- [17] 张珉, 王金. 前列腺液免疫球蛋白、细胞因子及 MIP-1 $\alpha$ 、MCP-1 表达水平在慢性前列腺炎的临床意义 [J]. 热带医学杂志, 2021, 21 (8): 1035-1038.
- [18] 李欢. 迎春花总黄酮对慢性非细菌性前列腺炎模型大、小鼠的药效机制研究 [D]. 郑州: 河南中医药大学, 2018.
- [19] 谢晓飞, 宋用福, 王永吉. 金丝桃苷对过敏性哮喘小鼠 Th9、Th17、Treg 细胞分化及气道炎症的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2024, 41 (12): 3283-3292.
- [20] 盛涛, 马天红, 严礼剑, 等. 土茯苓总黄酮治疗自身免疫性前列腺炎模型大鼠作用机制研究 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2022, 32 (10): 903-906.

(收稿日期: 2025-01-15; 修回日期: 2025-03-20)



# 不同基原黄精乙醇提取物的抑菌活性研究

王洁<sup>1, 2, 3, 4</sup>, 李道远<sup>2, 3, 4</sup>, 陈乃富<sup>1, 2, 3, 4\*</sup>, 陈乃东<sup>1, 2, 3, 4\*</sup> (1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2. 中药质量评价与品质提升安徽省重点实验室, 安徽 六安 237012; 3. 皖西学院生物与制药工程学院, 安徽 六安 237012; 4. 中药质量评价与品质提升六安市实验室, 安徽 六安 237012)

**摘要:** **目的** 探究不同基原黄精(黄精、多花黄精、滇黄精)乙醇提取物对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和枯草芽孢杆菌的抑菌活性。**方法** 采用乙醇超声提取法制备三种黄精乙醇提取物, 并对其皂苷、黄酮、多酚类化学成分进行含量测定。检测了三种黄精乙醇提取物对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和枯草芽孢杆菌的最小抑菌浓度(MIC)、最小杀菌浓度(MBC)、细菌 24 h 生长曲线、扫描电镜下菌体形态变化以及核酸渗漏量。**结果** 结果表明, 滇黄精乙醇提取物中皂苷含量最高( $3.64 \pm 0.38$ )  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 黄精乙醇提取物多酚含量最高( $1.07 \pm 0.25$ )  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 而多花黄精乙醇提取物中黄酮含量最高( $0.71 \pm 0.12$ )  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。在抑菌活性方面, 滇黄精乙醇提取物对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌抑制效果优于黄精及多花黄精乙醇提取物。滇黄精乙醇提取物对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌的 MIC 分别为 10、20  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , MBC 分别为 33.3、53.3  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。与对照组相比, 经三种黄精乙醇提取物处理后受试菌生长受到抑制, 细菌形态结构损坏, 核酸外泄量增加, 且随着黄精乙醇提取物浓度增加, 对受试菌的抑制作用越显著。**结论** 不同基原的黄精乙醇提取物对同一受试菌抑菌效果存在差异, 滇黄精乙醇提取物表现出更优的抑菌活性。

**关键词:** 黄精乙醇提取物; 抑菌活性; 金黄色葡萄球菌; 大肠埃希菌; 枯草芽孢杆菌

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)06-1684-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.028

## Antibacterial activity of ethanol extracts from different sources of *Polygonatum*

WANG Jie<sup>1, 2, 3, 4</sup>, LI Dao-yuan<sup>2, 3, 4</sup>, CHEN Nai-fu<sup>1, 2, 3, 4\*</sup>, CHEN Nai-dong<sup>1, 2, 3, 4\*</sup> (1. College of Pharmacy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Anhui Key Lab of Quality Evaluation and Improvement of Traditional Chinese Medicine, Lu'an Anhui 237012; 3. College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, West Anhui University, Lu'an Anhui 237012; 4. Laboratory of Quality Evaluation and Improvement of Chinese Medicine in Lu'an, Lu'an Anhui 237012)

**Abstract: Objective** To determine the antibacterial activity of ethanol extracts from different sources of *Polygonatum* (*Polygonatum sibiricum*, *Polygonatum cyrtoneura*, and *Polygonatum kingianum*) against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Bacillus subtilis*. **Methods** Ethanol ultrasonic extraction was used to prepare three ethanol extracts of *Polygonatum*. The contents of saponins, flavonoids, and polyphenols were measured. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the extracts were determined, along with bacterial growth curves over 24 hours, morphological changes observed under scanning electron microscopy (SEM), and nucleic acid leakage. **Results** *Polygonatum kingianum* ethanol extract had the highest

**基金项目:** 安徽省中药质量评价与品质提升科研创新团队 (No.2022AH010090); 安徽省高校协同创新中心项目 (No.GXXT-2022-079); 安徽省高校自然科学研究重点项目 (No.KJ2021A0956); 皖西学院高层次人才科研启动项目 (No.WGKQ2021021); 皖西学院博士后项目 (No.WXBSH2021001)。

**作者简介:** 王洁, 女, 硕士研究生, 主要从事中药分子生物学及中药抗菌研究, email: 3568146858@qq.com \*通信作者: 陈乃富, 男, 教授, 主要从事中药生物技术研究、中药资源与质量研究, email: cnf505@126.com; 陈乃东, 男, 教授, 主要从事中药质量评价与品质提升研究, email: 2004cnd@163.com

saponin content ( $3.64 \pm 0.38$ )  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , *Polygonatum sibiricum* extract had the highest polyphenol content ( $1.07 \pm 0.25$ )  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , and *Polygonatum cyrtonema* extract had the highest flavonoid content ( $0.71 \pm 0.12$ )  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ . Regarding antibacterial activity, the ethanol extract of *Polygonatum kingianum* demonstrated better inhibitory effect against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* than that from *Polygonatum sibiricum* and *Polygonatum cyrtonema*. The MIC of the *Polygonatum kingianum* ethanol extract against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* was 10 and 20  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , while the MBC was 33.3 and 53.3  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , respectively. After treatment with the three ethanol extracts of *Polygonatum*, the growth curves of the test bacteria were inhibited compared with those of the control group. The bacterial morphological structures were damaged, and the amount of nucleic acid leakage increased. As the concentration of the *Polygonatum* ethanol extracts increased, the inhibitory effect on the test bacteria became more pronounced. **Conclusion** Ethanol extracts from different sources of *Polygonatum* exhibit varying antibacterial effects against the same test bacteria. *Polygonatum kingianum* ethanol extract shows better antibacterial activity than others.

**Key words:** *Polygonatum* ethanol extract; antibacterial; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*; *Bacillus subtilis*

黄精为百合科黄精属植物,是我国传统的补虚中药之一。中药黄精为典型的多基原中药,《中国药典》收录了滇黄精(*Polygonatum kingianum* Coll.et Hemsl., *P. kingianum*)、黄精(*Polygonatum sibiricum* Red., *P. sibiricum*)、多花黄精(*Polygonatum cyrtonema* Hua, *P. cyrtonema*)作为临床治疗用药<sup>[1]</sup>。黄精主要含有多糖、甾体皂苷、多酚、生物碱、木脂素、蒽醌类化合物、维生素以及多种对人体有益的氨基酸等化学成分<sup>[2-4]</sup>,具有抗菌消炎、免疫调节、抗衰老、抗氧化、降血糖、降血脂以及抗肿瘤等活性<sup>[5-8]</sup>。

多项研究证实,黄精提取物具有抑菌和抗菌活性。张建萍等<sup>[9]</sup>研究表明,生、熟黄精提取物能有效抑制细菌、霉菌生长,且生黄精的抑菌效果更佳。李志涛等<sup>[10]</sup>对黄精多糖的抑菌活性进行了探讨,结果表明其对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和藤黄球菌具有显著的抑制作用。黄精多酚提取液被证实对大肠埃希菌和枯草芽孢杆菌具有抑菌活性<sup>[11]</sup>。翟玉凤<sup>[12]</sup>的研究揭示了黄精中皂苷类成分的抑菌活性。目前,关于黄精抑菌活性的研究多集中在单一黄精上,而对不同基原黄精抑菌活性的比较分析较少。

本文以三种不同基原的黄精为研究对象,对其乙醇提取物的成分进行差异分析,并以金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和枯草芽孢杆菌为受试菌株,通过测定最小抑菌浓度(MIC)、最小杀菌浓度(MBC),绘制 24 h 生长曲线,并用扫描电镜(SEM)观察细菌形态变化以及核酸渗漏变化揭示三种黄精乙醇提取物的抑菌活性差异。以期为黄精抑菌产品的开发提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 药材与菌株

黄精、多花黄精、滇黄精药材(安徽大别山中药饮片有限公司),经皖西学院陈乃富教授鉴定为百合科植物黄精(*Polygonatum sibiricum* Red.)、多花黄精(*Polygonatum cyrtonema* Hua)和滇黄精(*Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl.)的根茎。金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, *B. subtilis*)由皖西学院生物与制药工程学院微生物实验室提供。

### 1.2 试药

琼脂粉、蛋白胨、酵母浸粉(北京奥博星生物技术有限责任公司);人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 对照品(纯度:99.8%,批号:20171201,云南植物药业有限公司);福林酚(合肥巴斯夫生物科技有限公司);氨苄西林钠(阿拉丁生化科技股份有限公司);芦丁、没食子酸对照品(纯度均 $\geq 98\%$ ,批号分别为 G1812077、G131992,阿拉丁生化科技股份有限公司)。

### 1.3 仪器

UV-5200 型紫外可见分光光度计(上海元析仪器有限公司);SW-CJ-1DSU 型超净工作台(上海昕仪仪器仪表有限公司);HT-120B 型恒温培养箱(江苏新春兰科学仪器有限公司);SU8010 型扫描电镜(广州仪德精密科学仪器股份有限公司);EnSight 型多功能酶标仪(珀金埃尔默股份有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 黄精乙醇提取物的制备

将三种新鲜的黄精洗净切片,于 50℃烘箱内烘干。待烘干完成后,利用打粉机将药材粉碎成

粉末。称取三种黄精粉末各 300 g, 按照料液比 1:15 的比例加入 80% 乙醇<sup>[13]</sup>, 50℃ 超声提取 90 min, 收集滤液并浓缩至浸膏状态, 即得乙醇提取物, 并计算利率。黄精乙醇提取物得率 (%) = 黄精乙醇提取物质量 / 黄精干粉质量 × 100%。

## 2.2 黄精乙醇提取物成分含量测定

总皂苷含量采用香草醛-高氯酸法<sup>[14]</sup>测定, 在 560 nm 处测定样品吸光度, 得人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 的标准曲线方程:  $Y = 9.8871X + 0.0146$  ( $R^2 = 0.9957$ ), 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 在 0.04 ~ 0.2 mg · mL<sup>-1</sup> 与吸光度呈良好的线性关系。

总多酚含量采用福林酚法<sup>[15]</sup>检测, 在 766 nm 处测定吸光度, 得没食子酸的标准曲线方程:  $Y = 0.22X + 0.0013$  ( $R^2 = 0.9952$ ), 没食子酸在 1 ~ 5 μg · mL<sup>-1</sup> 与吸光度呈良好的线性关系。

三种黄精提取物中总黄酮的含量采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠显色法<sup>[16]</sup>测定, 在 510 nm 处测定样品吸光度, 以芦丁为对照品, 得标准曲线方程:  $Y = 10.954X - 0.0197$  ( $R^2 = 0.9979$ ), 芦丁在 0.02 ~ 0.1 mg · mL<sup>-1</sup> 与吸光度呈良好的线性关系。

## 2.3 黄精乙醇提取物母液及菌悬液的制备

将黄精、多花黄精、滇黄精的乙醇提取物与 LB 培养基混合, 配制成 80 mg · mL<sup>-1</sup> 的母液。将对数生长期的金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和枯草芽孢杆菌菌悬液浓度调整为  $1 \times 10^6$  CFU · mL<sup>-1</sup>。

## 2.4 最小抑菌及最小杀菌浓度的测定

采用微量肉汤二倍稀释法<sup>[17]</sup>测定 MIC。将质量浓度为 80 mg · mL<sup>-1</sup> 的三种醇提取物母液通过二倍稀释法依次稀释至 1.25 mg · mL<sup>-1</sup>。在 96 孔板中, 每孔加入 100 μL 菌悬液与等体积不同质量浓度 (80 ~ 1.25 mg · mL<sup>-1</sup>) 的黄精乙醇提取物样品, 设空白对照组 (不加黄精乙醇提取物) 与阳性对照组 (氨苄西林钠), 每组进行 3 次平行实验, 37℃ 培养 18 ~ 24 h。以培养液澄清、没有菌体沉淀产生的最小浓度为 MIC。从孔板中吸取浓度 ≥ MIC 值的溶液各 50 μL 涂平板, 37℃ 培养 24 h, 以无菌落生成所对应的最低乙醇提取物浓度为 MBC<sup>[18]</sup>。

## 2.5 黄精乙醇提取物对受试菌生长曲线的影响

在 96 孔板中分别加入 100 μL 对数生长期 ( $OD_{600} = 0.5$ ) 的金黄色葡萄球菌菌悬液与同体积 20、40 mg · mL<sup>-1</sup> 的黄精乙醇提取物样品, 100 μL 大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌菌悬液与同体积 40、80 mg · mL<sup>-1</sup> 的黄精乙醇提取物, 设不加黄精乙醇提取物为空白对照组, 每组进行 3 次平行实验。使用酶标仪, 将待测样品在 600 nm

处每隔 1 h 记录一次吸光度, 比较三种黄精乙醇提取物对细菌生长的影响。

## 2.6 扫描电镜 (SEM) 观察受试菌形态

采用 SEM 观察菌体形态变化, 取受试菌菌悬液, 分别加入 20、40、80 mg · mL<sup>-1</sup> 的黄精乙醇提取物样品, 以不加黄精乙醇提取物的受试菌为空白对照组, 37℃、150 r · min<sup>-1</sup> 恒温摇床培养箱内培养 8 h, 4℃、12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 5 min 收集菌体, 分别加入 2.5% 的戊二醛溶液暗室中固定处理 2 h。用 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 3 次, 用梯度乙醇 (30%、50%、70%、80%、90%、100%) 逐级脱水, 离心收集菌体冷冻干燥, 固定喷金进行 SEM 观察。

## 2.7 核酸渗漏量检测

分别测定不同浓度 (0、20、40、80 mg · mL<sup>-1</sup>) 的三种黄精乙醇提取物在 260 nm 处的吸光度, 记为  $A_y$ 。取对数生长期的菌悬液 ( $OD_{600} = 0.5$ ), 依次加入 0、20、40、80 mg · mL<sup>-1</sup> 黄精乙醇提取物继续在 37℃、150 r · min<sup>-1</sup> 培养箱中培养, 分别在 0、6、12、18、24 h 取培养物 1 mL, 4℃、12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 收集上清液在 260 nm 处测定吸光度值, 记为  $A_x$ 。核酸渗漏量 =  $A_x - A_y$ 。

## 2.8 数据处理

利用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析, 实验数据以平均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用单因素方差分析进行差异性检测, 并进行多重校正,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义, 图表绘制采用 Origin 2019 软件完成。

## 3 结果与分析

### 3.1 黄精乙醇提取物成分含量测定结果

采用乙醇超声提取法分别获得黄精、多花黄精、滇黄精的乙醇提取物, 质量分别为 32.49 g、28.65 g 和 25.77 g, 得率依次为 10.83%、9.55%、8.59%。如表 1 所示, 在黄精乙醇提取物三类与抑菌活性最相关的化学成分<sup>[11, 19-20]</sup>中, 总皂苷含量最高, 其次是总多酚, 而总黄酮的含量最低。三种黄精乙醇提取物中, 皂苷含量方面, 滇黄精 ( $3.64 \pm 0.38$ ) mg · g<sup>-1</sup> 高于黄精 ( $3.54 \pm 0.17$ ) mg · g<sup>-1</sup>, 多花黄精最低 ( $2.94 \pm 0.18$ ) mg · g<sup>-1</sup>, 以黄精乙醇提取物作为对照, 多花黄精乙醇提取物中皂苷含量显著低于黄精乙醇提取物皂苷含量; 总黄酮含量方面, 多花黄精 ( $0.71 \pm 0.12$ ) mg · g<sup>-1</sup> 略高于黄精 ( $0.68 \pm 0.15$ ) mg · g<sup>-1</sup> 及滇黄精 ( $0.65 \pm 0.21$ ) mg · g<sup>-1</sup>; 总多酚含量方面, 黄精含量最高 ( $1.07 \pm 0.25$ ) mg · g<sup>-1</sup>, 滇黄精含量最低 ( $0.85 \pm 0.21$ ) mg · g<sup>-1</sup>。



表 1 三种黄精乙醇提取物中化学成分含量测定结果 (mg · g<sup>-1</sup>)

Tab 1 Chemical composition content in three ethanol extracts of *Polygonatum* (mg · g<sup>-1</sup>)

| 样品   | 总皂苷                    | 总黄酮       | 总多酚                    |
|------|------------------------|-----------|------------------------|
| 黄精   | 3.54±0.17              | 0.68±0.15 | 1.07±0.25              |
| 多花黄精 | 2.94±0.18 <sup>*</sup> | 0.71±0.12 | 0.99±0.06              |
| 滇黄精  | 3.64±0.38              | 0.65±0.21 | 0.85±0.21 <sup>*</sup> |

注：与黄精乙醇提取物相比，<sup>\*</sup>*P* < 0.05。

Note: Compared with the ethanol extract of *Polygonatum sibiricum*, <sup>\*</sup>*P* < 0.05.

表 2 三种黄精乙醇提取物对受试菌的 MIC、MBC 测定结果

Tab 2 MIC and MBC of three ethanol extracts of *Polygonatum* against test bacteria

| 样品    | MIC/ (mg · mL <sup>-1</sup> ) |            |             | MBC/ (mg · mL <sup>-1</sup> ) |           |             |
|-------|-------------------------------|------------|-------------|-------------------------------|-----------|-------------|
|       | 金黄色葡萄球菌                       | 大肠埃希菌      | 枯草芽孢杆菌      | 金黄色葡萄球菌                       | 大肠埃希菌     | 枯草芽孢杆菌      |
| 黄精    | 16.6±0.19                     | 33.3±0.57  | 38±0.28     | 40±0.09                       | 80±0.09   | 80±0.07     |
| 多花黄精  | 13.3±0.17                     | 26.6±0.23  | 26.6±0.37   | 37.6±0.62                     | 66.6±0.20 | 66.6±0.27   |
| 滇黄精   | 10.0±0.02                     | 20.0±0.06  | 33.3±0.56   | 33.3±0.57                     | 53.3±0.62 | 74.6±0.30   |
| 氮苄西林钠 | 0.001 56±0.03                 | 0.025±0.02 | 0.0312±0.09 | 0.001 56±0.03                 | 0.05±0.08 | 0.0625±0.07 |

### 3.3 黄精乙醇提取物对细菌生长状态的测定结果

测定不同浓度提取物对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和枯草芽孢杆菌生长曲线的影响，结果如图 1 所示，处理组的 *OD*<sub>600</sub> 值均低于空白对照组，且抑制作用随浓度增加而增强。滇黄精乙醇提取物对金黄色葡萄球菌的抑制效果最佳，黄精乙醇提取物最弱（见图 1A ~ 1B）。滇黄精乙醇提取物对大肠埃希菌的抑制效果最强，导致其生长速率显著减慢（见图 1C ~ 1D）。在 40 mg · mL<sup>-1</sup> 和 80 mg · mL<sup>-1</sup> 浓度下，多花黄精乙醇提取物对枯草芽孢杆菌表现出最好的抑菌效果，其次是滇黄精乙醇提取物，黄精乙醇提取物最弱（见图 1E ~ 1F）。该结果与 MIC 和 MBC 测定结果一致，进一步证实了三种黄精乙醇提取物的抑菌活性存在差异。

### 3.4 SEM 分析

如图 2 所示，空白对照组的金黄色葡萄球菌结构完整、外形圆整、边缘清晰；在 20 mg · mL<sup>-1</sup> 的黄精、多花黄精、滇黄精醇提物处理下，细菌表面变得粗糙，菌体出现破溃；当处理质量浓度增加到 40 mg · mL<sup>-1</sup> 后，菌体破坏程度进一步加深，表明抑菌活性与乙醇提取物质量浓度成正比关系。其中，20 mg · mL<sup>-1</sup> 滇黄精处理组、40 mg · mL<sup>-1</sup> 多花黄精处理组和 40 mg · mL<sup>-1</sup> 滇黄精处理组，对菌体破坏作用最明显。

如图 3 所示，在 40 mg · mL<sup>-1</sup> 的黄精、多花黄精及滇黄精乙醇提取物处理下，大肠埃希菌菌体出现破损、皱缩及粘连现象；当质量浓度增

### 3.2 三种黄精乙醇提取物对受试菌的 MIC、MBC 测定结果

抑菌实验结果显示，滇黄精乙醇提取物对金黄色葡萄球菌的抑制效果最佳。相比之下，黄精乙醇提取物对大肠埃希菌的抑制效果最差。在枯草芽孢杆菌的 MIC 与 MBC 测定中，多花黄精乙醇提取物表现出最好的抑菌效果（见表 2）。上述结果表明，三种黄精乙醇提取物对三种菌均有抑制作用，其中滇黄精乙醇提取物效果最好。

至 80 mg · mL<sup>-1</sup> 时，多花黄精处理组和滇黄精处理组菌体边界不清晰，膜结构消失，几乎完全破坏。综合比较，40 mg · mL<sup>-1</sup> 滇黄精处理组、80 mg · mL<sup>-1</sup> 多花黄精处理组和 80 mg · mL<sup>-1</sup> 滇黄精处理组具有更强的抑菌活性。

如图 4 所示，80 mg · mL<sup>-1</sup> 黄精乙醇提取物处理组对枯草芽孢杆菌的破坏程度大于 40 mg · mL<sup>-1</sup> 处理组，表明其抑菌活性与乙醇提取物浓度成正比相关。其中 40 mg · mL<sup>-1</sup> 多花黄精处理组、80 mg · mL<sup>-1</sup> 多花黄精处理组及 80 mg · mL<sup>-1</sup> 滇黄精处理组表现出更高的抑菌活性，细菌完整的细胞数量减少，结构破坏严重，甚至出现碎片状物质，SEM 结果进一步证实三种黄精乙醇提取物可破坏细菌细胞形态对细菌起抑制作用。

### 3.5 黄精乙醇提取物对细菌核酸渗漏量的影响

核酸在 260 nm 处具有特征吸收峰，*OD*<sub>260 nm</sub> 可以反映培养液中核酸的含量<sup>[21]</sup>。如图 5 所示，三种黄精乙醇提取物处理组金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌以及枯草芽孢杆菌的核酸渗漏量均高于空白对照组，且随着浓度的增加以及处理时间的延长核酸渗漏量增加。其中三种黄精乙醇提取物对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌核酸渗漏影响以滇黄精组最佳，多花黄精对枯草芽孢杆菌核酸渗漏影响最明显。结果表明黄精乙醇提取物可破坏受试菌的细胞结构，导致核酸渗漏。

## 4 讨论与结论

近年来，开发和利用天然抑菌剂逐渐成为研究热点。研究表明，中药提取物不仅能够抑制细菌生长，还表现出显著的抑菌活性<sup>[22-23]</sup>。作为抗

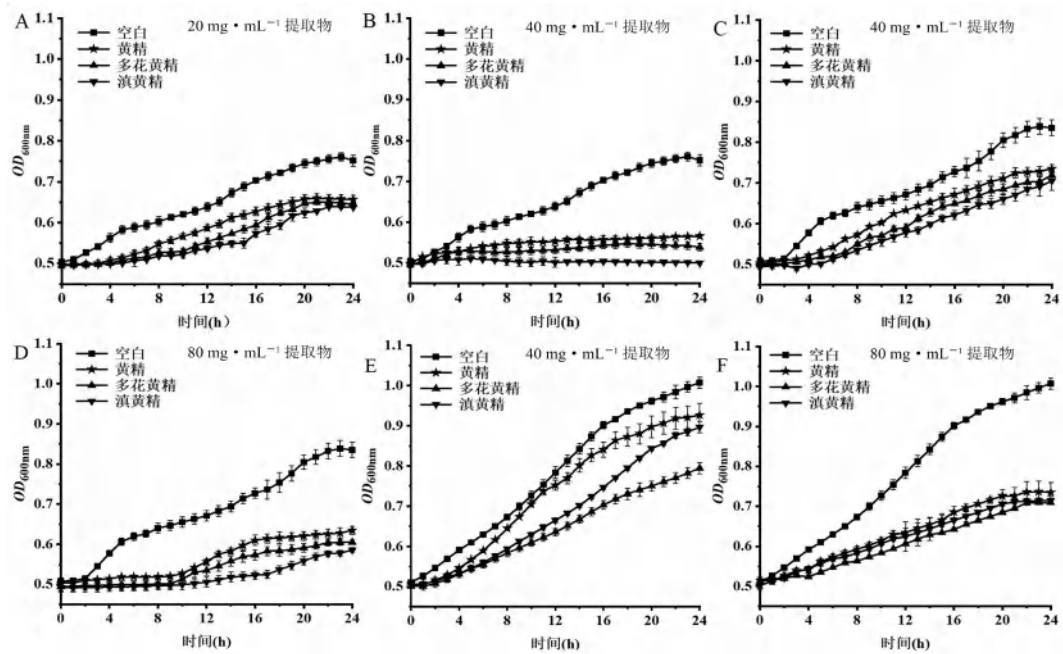


图 1 三种黄精乙醇提取物对受试菌生长曲线影响图  
Fig 1 Effect of three ethanol extracts of *Polygonatum* on the growth curve of probiotic bacteria  
A、B. 金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) ; C、D. 大肠埃希菌 (*E. coli*) ; E、F. 枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)

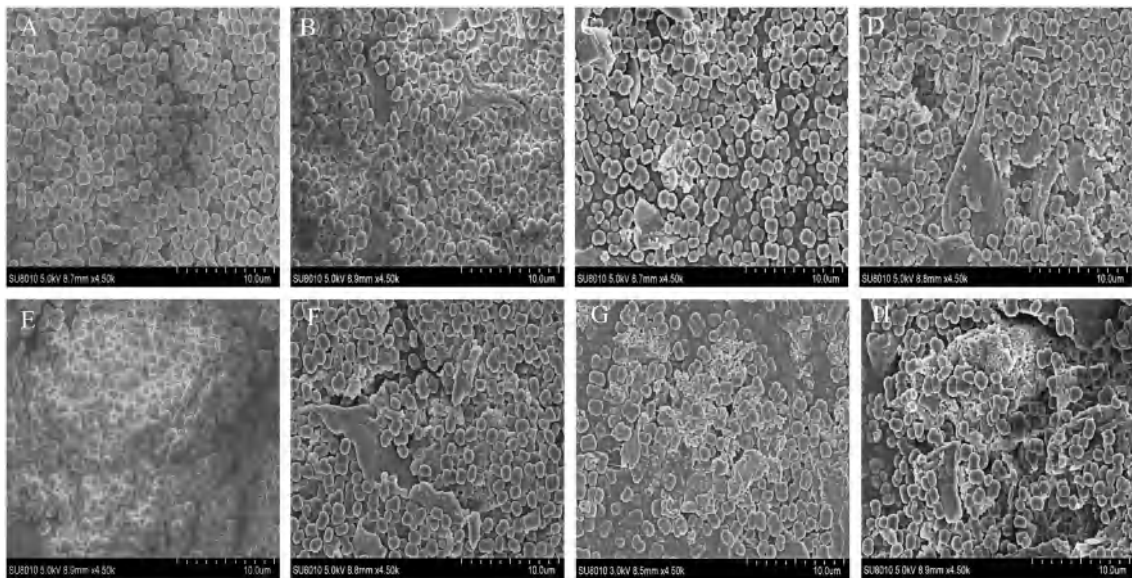


图 2 三种黄精乙醇提取物对金黄色葡萄球菌的 SME 图  
Fig 2 Scanning electron microscopy of three ethanol extracts of *Polygonatum* on *S. aureus*  
A、E. 金黄色葡萄球菌空白对照组 (*S. aureus* blank control group) ; B. 20 mg·mL<sup>-1</sup> 黄精处理组 (20 mg·mL<sup>-1</sup> *P. sibiricum* treatment group) ; C. 20 mg·mL<sup>-1</sup> 多花黄精处理组 (20 mg·mL<sup>-1</sup> *P. cyrtoneura* treatment group) ; D. 20 mg·mL<sup>-1</sup> 滇黄精处理组 (20 mg·mL<sup>-1</sup> *P. kingianum* treatment group) ; F. 40 mg·mL<sup>-1</sup> 黄精处理组 (40 mg·mL<sup>-1</sup> *P. sibiricum* treatment group) ; G. 40 mg·mL<sup>-1</sup> 多花黄精处理组 (40 mg·mL<sup>-1</sup> *P. cyrtoneura* treatment group) ; H. 40 mg·mL<sup>-1</sup> 滇黄精处理组 (40 mg·mL<sup>-1</sup> *P. kingianum* treatment group)

菌药物的替代疗法，中药提取物的抑菌效果备受期待，寻找安全有效的天然抑菌剂具有广泛的应用前景。然而，目前，中药提取物抑菌研究约 78% 集中于清热类药材（据 CNKI 近 5 年文献计量分析），如黄连、黄芩、金银花、连翘等。为进一步拓展天然抑菌剂研究体系，本研究以补益

类中药黄精为研究对象，系统地对滇黄精、黄精和多花黄精的乙醇提取物进行抑菌活性研究，拓宽了黄精属植物在抑菌领域的研究范围，可为天然抑菌剂的开发提供新的研究方向。  
研究表明，黄精所含的多糖<sup>[24-25]</sup>、皂苷<sup>[12, 19]</sup>、多酚<sup>[11]</sup>及黄酮<sup>[20]</sup>类成分具有不同程度的抑菌活



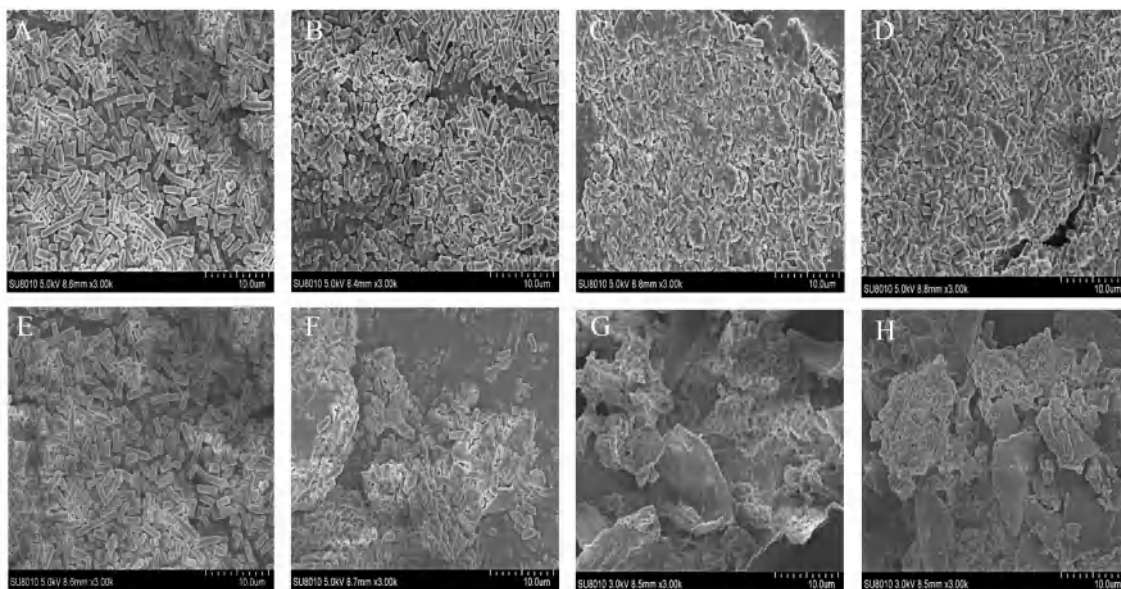


图 3 三种黄精乙醇提取物对大肠埃希菌的 SME 图

Fig 3 Scanning electron microscopy of three ethanol extracts of *polygonatum* on *E. coli*

A、E. 大肠埃希菌空白对照组 (*E. coli* blank control group); B. 40 mg · mL<sup>-1</sup> 黄精处理组 (40 mg · mL<sup>-1</sup> *P. sibiricum* treatment group); C. 40 mg · mL<sup>-1</sup> 多花黄精处理组 (40 mg · mL<sup>-1</sup> *P. cyrtonema* treatment group); D. 40 mg · mL<sup>-1</sup> 滇黄精处理组 (40 mg · mL<sup>-1</sup> *P. kingianum* treatment group); F. 80 mg · mL<sup>-1</sup> 黄精处理组 (80 mg · mL<sup>-1</sup> *P. sibiricum* treatment group); G. 80 mg · mL<sup>-1</sup> 多花黄精处理组 (80 mg · mL<sup>-1</sup> *P. cyrtonema* treatment group); H. 80 mg · mL<sup>-1</sup> 滇黄精处理组 (80 mg · mL<sup>-1</sup> *P. kingianum* treatment group)

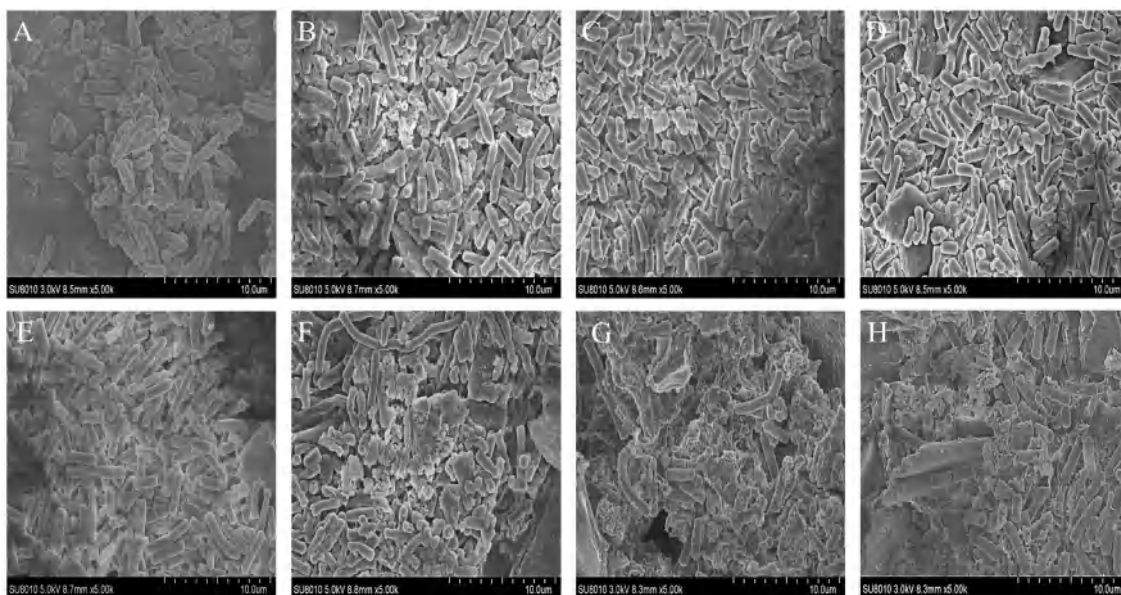


图 4 三种黄精乙醇提取物对枯草芽孢杆菌的 SME 图

Fig 4 Scanning electron microscopy of three ethanol extracts of *polygonatum* on *B. subtilis*

A、E. 枯草芽孢杆菌空白对照组 (*B. subtilis* blank control group); B. 40 mg · mL<sup>-1</sup> 黄精处理组 (40 mg · mL<sup>-1</sup> *P. sibiricum* treatment group); C. 40 mg · mL<sup>-1</sup> 多花黄精处理组 (40 mg · mL<sup>-1</sup> *P. cyrtonema* treatment group); D. 40 mg · mL<sup>-1</sup> 滇黄精处理组 (40 mg · mL<sup>-1</sup> *P. kingianum* treatment group); F. 80 mg · mL<sup>-1</sup> 黄精处理组 (80 mg · mL<sup>-1</sup> *P. sibiricum* treatment group); G. 80 mg · mL<sup>-1</sup> 多花黄精处理组 (80 mg · mL<sup>-1</sup> *P. cyrtonema* treatment group); H. 80 mg · mL<sup>-1</sup> 滇黄精处理组 (80 mg · mL<sup>-1</sup> *P. kingianum* treatment group)

性。然而，不同基原的黄精在化学成分含量上存在显著差异。杨兴鑫等<sup>[26]</sup>利用超高效液相色谱技术分析发现，黄精、多花黄精及滇黄精的化学成分存在显著差异。钱华丽等<sup>[27]</sup>研究也表明不同产地和品种的黄精总皂苷含量差异显著。本实验对

三种基原黄精乙醇提取物中具有抑菌活性的化学成分（总黄酮、总皂苷、总多酚）进行含量测定，结果表明三种提取物中均含有此类成分，但其含量存在相似性和差异性，推测其抑菌活性可能与化学成分含量相关。虽已有文献表明中药提取物



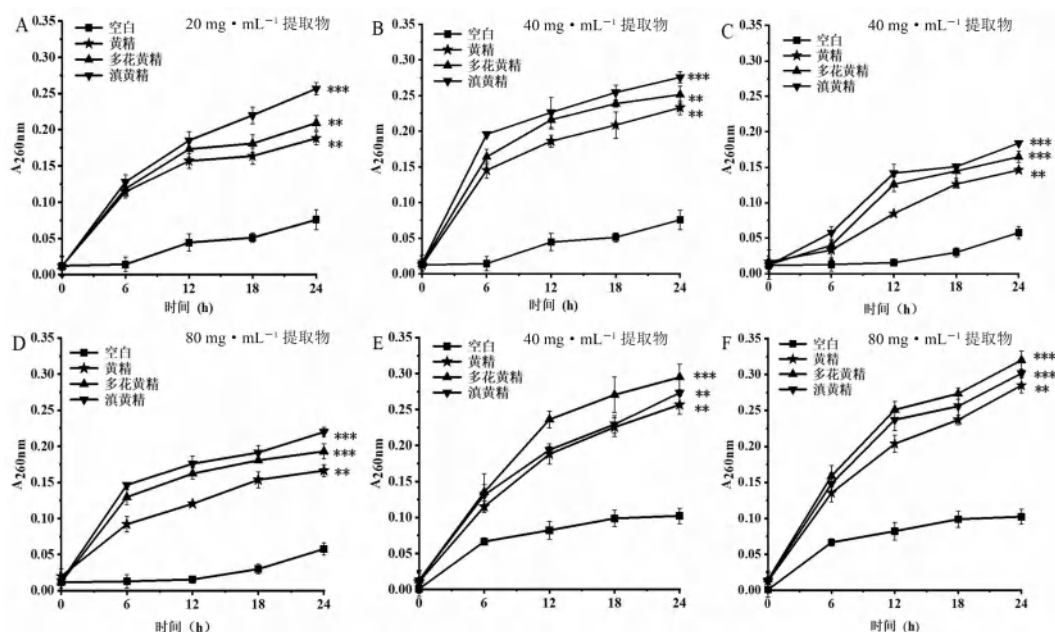


图5 三种黄精乙醇提取物对受试菌核酸渗漏影响

Fig 5 Effect of three ethanol extracts of *Polygonatum* on the nucleic acid leak of probiotic bacteria

A、B. 金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) ; C、D. 大肠埃希菌 (*E. coli*) ; E、F. 枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)

注: 与空白组相比, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the blank group, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

的抑菌作用与其有效成分的含量具有相关性<sup>[28]</sup>, 但黄精乙醇提取物中化学成分含量与抑菌活性差异之间的确切关系仍需进一步深入研究。

细菌 24 h 生长曲线能够全面反映细菌生长动态, 已被广泛应用于抑菌活性研究。王小敏等<sup>[29]</sup>通过该方法证实, 连翘果和叶的乙醇提取物对金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌具有显著抑制作用。此外, 该检测方法在五味子乙醇提取物对金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌进行的抑菌活性研究中, 证实其抑菌活性与浓度成正相关<sup>[30]</sup>。本研究应用三种黄精乙醇提取物检测受试菌的 24 h 生长曲线, 发现滇黄精乙醇提取物对金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌的抑制作用更为显著, 且抑菌活性与提取物浓度成正相关。SEM 观察可直观展示细菌形态的变化。通过三种黄精乙醇提取物处理受试菌, 发现细菌的细胞微观形貌发生显著改变, 细胞褶皱加深, 随着乙醇提取物浓度增加, 大部分细胞破裂, 细胞结构严重受损。因此, 黄精乙醇提取物可能通过破坏细菌细胞结构发挥抑菌作用。细菌细胞膜作为渗透性屏障, 对多种细胞功能至关重要<sup>[31]</sup>。细胞内含有 DNA 等小分子物质<sup>[32]</sup>, 细胞结构遭到破坏时, 核酸等物质会外渗, 因此, 可通过检测细胞内 DNA 等物质评估细胞膜的完整性。本实验通过对受试菌核酸渗漏量的检测, 进一步证实黄精乙醇提取物能够破坏

受试菌的细胞结构。目前, 黄精抑菌活性研究多局限于测定抑菌圈大小或 MIC, 本研究在 MIC 测定的基础上, 结合细菌生长曲线、SEM 观察菌体形态变化以及核酸渗漏量检测, 深入探究黄精提取物对细菌的抑制机制。

本文以金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌以及枯草芽孢杆菌作为受试菌, 对比研究了三种黄精乙醇提取物的抑菌效果。实验结果表明, 三种黄精乙醇提取物对三种受试菌均具有抑制作用, 且不同基原的黄精乙醇提取物对同一受试菌的抑菌效果存在差异。总体而言, 滇黄精乙醇提取物的抑菌活性优于另外两种黄精乙醇提取物。中药提取物的抑菌机制复杂多样, 黄精乙醇提取物的抑菌机制可能涉及多种途径。关于不同基原黄精具体的抑菌分子机制仍需更深入的探讨和研究。

## 参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 319-320.
- [2] Luo L, Qiu YX, Gong LM, et al. A review of *Polygonatum mill.* genus: its taxonomy, chemical constituents, and pharmacological effect due to processing changes [J]. Molecules, 2022, 27 (15): 4281.
- [3] 宋添力, 张钰, 肖强, 等. 黄精化学成分以及药用价值的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2024, 42 (11): 119-126.
- [4] 汪成, 叶菊, 何旭光, 等. 黄精化学成分、药理作用研究进展及质量标志物 (Q-Marker) 预测分析 [J]. 天然产物研究与开发, 2024, 36 (5): 881-889, 855.

- [5] Chen ZB, Liu JJ, Kong X, et al. Characterization and immunological activities of polysaccharides from *Polygonatum sibiricum* [J]. Biol Pharm Bull, 2020, 43 (6): 959-967.
- [6] Liu Z, Fayyaz S, Zhao D, et al. *Polygonatum sibiricum* polysaccharides improve cognitive function in D-galactose-induced aging mice by regulating the microbiota-gut-brain axis [J]. J Funct Foods, 2023, 103: 105476.
- [7] Luo JY, Chai YY, Zhao M, et al. Hypoglycemic effects and modulation of gut microbiota of diabetic mice by saponin from *Polygonatum sibiricum* [J]. Food Funct, 2020, 11 (5): 4327-4338.
- [8] Wang SQ, Li G, Zhang XF, et al. Structural characterization and antioxidant activity of *Polygonatum sibiricum* polysaccharides [J]. Carbohydr Polym, 2022, 291: 119524.
- [9] 张建萍, 巫永华, 师聪, 等. 黄精提取物的抗菌活性研究 [J]. 食品科技, 2019, 44 (7): 273-276.
- [10] 李志涛, 孙金旭, 朱会霞, 等. 黄精多糖的提取及其抑菌性研究 [J]. 食品研究与开发, 2017, 38 (15): 36-38.
- [11] 陈克克, 强毅. 响应面法优化超声波辅助黄精多酚的提取及其抗菌活性 [J]. 陕西师范大学学报 (自然科学版), 2018, 46 (1): 91-96.
- [12] 翟玉凤. 黄精皂苷的提取分离以及其生物学活性研究 [D]. 杭州: 浙江理工大学, 2023.
- [13] 郝蓓琼. 多花黄精皂苷对人卵巢癌细胞 A2780 的抑制作用及机制研究 [D]. 杭州: 浙江农林大学, 2024.
- [14] 戴万生, 毕露露, 邱斌, 等. 黄精总皂苷的提取和含量测定方法研究 [J]. 云南中医中药杂志, 2023, 44 (2): 73-76.
- [15] 张国强, 郭晓东, 薛文华, 等. 西藏野生卷叶黄精多酚的提取及其抗氧化活性分析 [J]. 食品科学, 2017, 38 (6): 236-241.
- [16] 曹镭. 土壤肥力对多花黄精产量和品质的影响 [D]. 长沙: 中南林业大学, 2023.
- [17] Nuraskin CA, Faisal TI, Reca R, et al. Evaluation of minimum inhibitory concentration of methanol extract of cacao seeds on growth of *Streptococcus mutans* bacteria by microdilution method [J]. Int J Basic Clin Pharmacol, 2023, 12 (3): 340-344.
- [18] Swebosci T. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) assays using broth microdilution method [J]. 2023, doi: dx.doi.org/10.17504/protocols.io.5qpvo3x6dv4o/v1.
- [19] Khan H, Saeed M, Muhammad N, et al. Phytochemical analysis, antibacterial, and antifungal assessment of aerial parts of *Polygonatum verticillatum* [J]. Toxicol Ind Health, 2016, 32 (5): 841-847.
- [20] Khan H, Saeed M, Muhammad N, et al. Antimicrobial activities of rhizomes of *Polygonatum verticillatum*: attributed to its total flavonoidal and phenolic contents [J]. Pak J Pharm Sci, 2012, 25 (2): 463-467.
- [21] 杨丁招, 帅良, 汤穗枝, 等. 采后百香果病原菌的分离鉴定及其抑菌剂的抑菌活性初步研究 [J]. 食品与发酵工业, doi: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.040144.
- [22] 王凤玲, 杨扬, 韩方琴, 等. 中药提取物在临床抑菌中的研究进展 [J]. 工业微生物, 2024, 54 (1): 67-70.
- [23] Su T, Qiu Y, Hua XS, et al. Novel opportunity to reverse antibiotic resistance: to explore traditional Chinese medicine with potential activity against antibiotics-resistance bacteria [J]. Front Microbiol, 2020, 11: 610070.
- [24] 龙杰凤, 胡秀虹, 范成念, 等. 黔产生黄精多糖的抑菌活性研究 [J]. 贵州科学, 2022, 40 (1): 5-9.
- [25] 于伟凯, 孔维楷, 郝斯璐, 等. 泰山黄精多糖提取工艺改进及抑菌作用 [J]. 泰山医学院学报, 2020, 41 (11): 830-833.
- [26] 杨兴鑫, 董金材, 胡海波, 等. 基于多元统计分析的 3 种法定基原黄精化学成分比较研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25 (5): 71-76.
- [27] 钱华丽, 赵琪, 徐哲, 等. 不同产地黄精的皂苷和多糖含量 [J]. 贵州农业科学, 2022, 50 (3): 96-102.
- [28] Wang ZJ, Zhou Y, Shi XL, et al. Comparison of chemical constituents in diverse zanthoxylum herbs, and evaluation of their relative antibacterial and nematocidal activity [J]. Food Biosci, 2021, 42: 101206.
- [29] 王小敏, 陈乔, 郭丽丽, 等. 连翘果、连翘叶乙醇提取物的抑菌活性及成分分析 [J]. 食品工业科技, 2019, 40 (6): 89-94.
- [30] 张媛媛, 冯亚净, 李书国. 五味子乙醇提取物的抑菌稳定性及抑菌机理研究 [J]. 粮油食品科技, 2016, 24 (1): 55-60.
- [31] Chen Y, Zhao JD, Liu CY, et al. In-vitro antibacterial activity and mechanism of *Monarda didyma* essential oils against Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* [J]. BMC Microbiol, 2023, 23: 263.
- [32] 咎春兰, 汤海青, 欧昌荣, 等. 桉叶精油对水产品中 4 种微生物的抑菌效果及抑菌机理 [J]. 食品工业科技, 2018, 39 (19): 20-26.

(收稿日期: 2025-01-11; 修回日期: 2025-02-28)

# 消癥液治疗盆腔炎症性疾病后遗症模型大鼠的药效及作用机制研究

刘震<sup>1</sup>, 马筠程<sup>2</sup>, 王宇僖<sup>2</sup>, 田源<sup>1</sup>, 李倩<sup>1</sup>, 王筱竺<sup>1</sup>, 刘逍遥<sup>1</sup>, 徐文慧<sup>3</sup>, 高健<sup>3</sup>, 王伟玲<sup>3\*</sup>, 王停<sup>1, 3\*</sup>

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 北京中医药大学生命科学院, 北京 102488; 3. 北京中医药大学中医药研究院, 北京 100029)

**摘要:** **目的** 基于盆腔炎症性疾病后遗症 (SPID) 大鼠模型探讨消癥液治疗 SPID 的作用及潜在机制。 **方法** 将 70 只 SD 大鼠随机分为假手术组, 模型组, 左氧氟沙星组 ( $90.00 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 红虎灌肠液组 ( $4.50 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 消癥液低、中、高剂量组 ( $2.25$ 、 $4.50$ 、 $9.00 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。利用混合菌液联合机械损伤法制备 SPID 大鼠模型。连续给药 2 周后, 比较各组大鼠子宫形态、子宫系数、组织病理情况及血常规指标, 检测子宫组织中肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素- $1\beta$  (IL- $1\beta$ )、白细胞介素-6 (IL-6) 表达, 以及 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白表达。 **结果** 结果显示, 消癥液治疗 2 周后, 与模型组相比, 消癥液治疗组, 尤其是中剂量组, 子宫系数降低, 病理变化改善, 白细胞水平下降, TLR4、MyD88、p-I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-IKK $\beta$ /IKK $\beta$ 、p-p65/p65 蛋白表达量降低。 **结论** 消癥液能够通过抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路, 改善机体炎症状态, 降低炎症因子的表达水平, 有效治疗 SPID。

**关键词:** 盆腔炎症性疾病后遗症; 消癥液; 炎症因子; Toll 样受体; NF- $\kappa$ B 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)06-1692-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.029

## Efficacy and mechanism of Xiaozheng liquid for sequelae of pelvic inflammatory disease in a rat model

LIU Zhen<sup>1</sup>, MA Yun-cheng<sup>2</sup>, WANG Yu-xi<sup>2</sup>, TIAN Yuan<sup>1</sup>, LI Qian<sup>1</sup>, WANG Xiao-zhu<sup>1</sup>, LIU Xiao-yao<sup>1</sup>, XU Wen-hui<sup>3</sup>, GAO Jian<sup>3</sup>, WANG Wei-ling<sup>3\*</sup>, WANG Ting<sup>1, 3\*</sup> (1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102; 2. School of Life Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488; 3. Beijing Research Institute of Traditional Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029)

**Abstract:** **Objective** To establish a rat model of sequelae of pelvic inflammatory disease (SPID) and determine the therapeutic effect and mechanism of Xiaozheng liquid on SPID. **Methods** Totally 70 female SD rats were randomly divided into a sham group, a model group, a levofloxacin group ( $90.00 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), a Honghu enema solution group ( $4.50 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) and Xiaozheng liquid low, medium and high-dose groups ( $2.25$ ,  $4.50$ , and  $9.00 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). After 2-week of continuous administration, samples were collected. The morphology of uterus and calculate uterine index were observed. Hematoxylin eosin staining (HE) was used to observe uterus tissue pathological morphology. The routine blood test was done. **Results** After 2-week treatment, Xiaozheng liquid groups, especially the medium dose group, showed a decrease in uterine index, improvement in pathological state, and a decrease in white blood cell levels. The expression levels of TLR4, MyD88, p-I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$ , p-IKK $\beta$ /IKK $\beta$ , and p-p65/p65 proteins were decreased. **Conclusion** Xiaozheng liquid is effective for the

**基金项目:** 北京中医药大学基本科研项目 (No.2021-JYB-XJSJJ-035); 北京中医药大学新药研发课题 (No.BUCM-2022-JS-FW-069)。

**作者简介:** 刘震, 女, 在读硕士研究生, 主要从事消癥液治疗盆腔炎症性疾病后遗症的药效及机制方面的研究, zhenliu0224@163.com

**\*通信作者:** 王停, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事新药研发和名老中医传承方面的研究, email: wangting1973@sina.com; 王伟玲, 女, 副研究员, 硕士研究生导师, 主要从事新药研发和药效物质基础研究, email: wangwl\_1014@163.com



sequelae of pelvic inflammatory diseases by relieving the inflammatory state, reducing the expression of inflammatory factors, and inhibiting TLR4-NF- $\kappa$ B signaling pathway.

**Key words:** sequelae of pelvic inflammatory disease; Xiaozheng liquid; inflammatory factor; Toll-like receptor; NF- $\kappa$ B signaling pathway

盆腔炎性疾病后遗症 (sequelae of pelvic inflammation disease, SPID) 是盆腔炎性疾病 (pelvic inflammatory disease, PID) 的遗留病变, 多由于 PID 未能得到及时有效的治疗, 迁延日久而来<sup>[1]</sup>。盆腔炎病程反复、缠绵难愈, 可造成盆腔组织破坏、粘连及瘢痕形成, 导致输卵管狭窄、输卵管卵巢囊肿、慢性盆腔痛, 临床表现为下腹及腰骶痛、白带增多、不孕、异位妊娠等<sup>[2]</sup>。目前西医常用抗菌药物来控制病情的发作, 其疗效确切, 但存在复发率高的问题, 并且抗菌药物长期干预导致菌群失调、菌群耐药性增强等不良反应<sup>[3]</sup>。探索一种安全有效的 SPID 治疗方法, 成为目前临床急需解决的问题。

中医将盆腔炎归为“带下病”“月经不调”“妇人腹痛”等范畴, 湿热瘀结是其最常见的证型, 湿热邪毒入侵盆腔, 损伤胞宫冲任, 湿热蕴结下焦, 致气血壅遏、瘀血阻滞, 导致该病发生。消癥液是全国名老中医秦月好主任医师的临床自拟经验方, 由干鱼腥草、大血藤、醋三棱、莪术、醋延胡索、鸡内金、茯苓、川牛膝、郁金、乌药共十味中药组成, 具有清热利湿、活血化瘀、理气止痛、软坚散结的功效<sup>[4]</sup>。临床研究表明, 消癥液对于湿热瘀阻型 SPID 的治疗总有效率可达 93.23%, 疗效显著<sup>[5]</sup>。

本研究拟通过建立 SPID 大鼠模型, 对消癥液治疗 SPID 的药效进行验证, 并初步探索其作用机制, 为消癥液治疗 SPID 提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 70 只, 体重 180 ~ 220 g, 雌性 [北京维通利华实验动物技术有限公司, 生产许可证号: SYXK (京) 2023-0011]。实验期间室温 20 ~ 25 °C, 相对湿度 40% ~ 60%, 光照和黑暗各 12 h, 自由摄食及饮水。本研究已获得北京中医药大学学术委员会实验动物伦理委员会批准, 伦理审查证明编号为 BUCM-2023091203-3153。

### 1.2 菌种

乙型溶血性链球菌 (明舟生物, 批号: B8118)、大肠埃希菌 (北纳生物, 批号: BNCC269342)、金黄色葡萄球菌 (明舟生物, 批号: ATCC25923)。

### 1.3 试药

干鱼腥草 (批号: 2201042)、大血藤 (批号: 2210061)、醋三棱 (批号: 2201019)、莪术 (批号: 2112087)、醋延胡索 (批号: 2209068)、鸡内金 (批号: 2301008)、茯苓 (批号: 2212002)、川牛膝 (批号: 2211014)、郁金 (批号: 2212047)、乌药 (批号: 2302022) (北京市双桥燕京中药饮片厂), 饮片经北京中医药大学中药学院李向日教授鉴定均为正品。左氧氟沙星片 [第一三共制药 (北京) 有限公司, 批号: BY001AC]; 红虎灌肠液 (安徽天洋, 批号: 211106); 醋酸地塞米松 (浙江仙琚, 批号: LB23123), 阿司匹林肠溶片 (德国拜耳, 批号: BJ712387), 冰乙酸 (天津致远, 批号: 20220801512)。

肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6 (IL-6) ELISA 试剂盒 (美国博士德生物科技股份有限公司, 货号: EK0526、EK0393、EKO412); Toll 样受体 4 (TLR4)、NF- $\kappa$ B 抑制蛋白  $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ )、Anti-I $\kappa$ B $\alpha$  (phosphor S36) 抗体 (Abcam, 货号: ab217274、ab32518、ab133462); 髓样分化因子 88 (MyD88)、核转录因子  $\kappa$ B p65 (NF- $\kappa$ B p65)、Phospho-NF- $\kappa$ B p65 (Ser536)、核因子  $\kappa$ B 抑制物激酶  $\beta$  (IKK $\beta$ )、Phospho-IKK $\alpha$ / $\beta$  (Ser176/180) (CST, 货号: 4283S、8242S、3033s、8943S、2697S)。

### 1.4 仪器

电子天平 (上海舜宇科学仪器有限公司); 离心机、显微镜 (美国 Thermo Fisher 公司); 组织研磨仪 (德国 Restch 公司); 曝光机 (广州博鹭腾生物科技有限公司); 全自动血细胞分析仪 (日本 Nihon Kohden 公司)。

## 2 方法

### 2.1 药物制备

消癥液 10 味药材各 100 g, 加入 12 L 蒸馏水浸泡 30 min, 先用武火煮沸, 再改用文火煮 1.5 h, 滤出药渣; 向药渣中重复加入 10 L 蒸馏水, 再同法煎煮两次。将滤液合并, 继续用文火浓缩, 至药物体积为 750 mL, 药物质量浓度为 1.3 g·mL<sup>-1</sup>, 置于一 80 °C 冰箱保存备用。

## 2.2 动物分组及模型制备

动物适应性饲养 7 d 后, 随机分为假手术组、模型组、左氧氟沙星组 ( $90.00 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 阳性对照)、红虎灌肠液组 ( $4.50 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 阳性对照), 以及消癥液低 ( $2.25 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、中 ( $4.50 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、高 ( $9.00 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 剂量组, 每组 10 只。采用细菌感染联合机械损伤<sup>[6]</sup>的方法复制 SPID 大鼠模型: 采用注射器针头机械损伤子宫内壁, 并在双侧子宫角进针各推注  $0.10 \text{ mL}$  混合菌液 (浓度  $1 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 大肠埃希菌: 金黄色葡萄球菌: 乙型溶血性链球菌 = 2 : 1 : 1)。大鼠子宫组织 HE 染色出现淋巴细胞浸润并可见腺体增生, 纤维结缔组织增生, 提示 SPID 造模成功<sup>[6]</sup>。造模 2 周后开始给药, 红虎灌肠液及消癥液 (低、中、高剂量) 均灌肠给药, 左氧氟沙星灌胃给药, 连续给药 2 周。假手术组使用等体积无菌水灌肠。

## 2.3 指标观察

① 子宫系数计算: 取血后将大鼠子宫取下, 称重, 并计算大鼠子宫系数。子宫系数 (%) = 子宫重量 / 体重  $\times 100\%$ 。

② 血常规指标: 腹主动脉取血, 置于 EDTA 抗凝管中, 采用全自动血细胞分析仪检测。

③ 组织病理观察: 将称重后的子宫浸入组织固定液中固定, 取出后经脱水、石蜡包埋、切片、常规 HE 染色、封片等步骤, 于光学显微镜下观察各组大鼠子宫病变情况。

④ 组织中  $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 $\text{IL-6}$  水平测定: 取子宫组织匀浆, 按试剂盒说明书, 根据 ELISA 法检测组织匀浆上清  $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 $\text{IL-6}$  含量。

⑤ 组织 Western blot 检测: 从  $-80^\circ\text{C}$  冰箱中取出冻存的子宫组织, 裂解后取上清液抽提蛋白, 将处理后的样品进行 SDS-PAGE 电泳后转移到 NC 膜上, 经 5% 脱脂奶粉封闭、一抗孵育 12 h、二抗孵育 1 h 后, ECL 显影, 使用 Quantity One 4.0 统计条带灰度值, 内参为  $\beta\text{-actin}$ 。

## 2.4 统计学分析

采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 符合正态分布时, 多组间比较使用单因素方差分析; 不符合正态分布时, 用非参数检验, 符合正态但方差分布不齐时用 Welch's ANOVA 检验; 等级资料使用 SPSS 20.0 进行秩和检验,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 消癥液对 SPID 大鼠子宫系数的影响

与假手术组相比, 模型组大鼠子宫系数存在

显著差异 ( $P < 0.01$ ); 给药治疗 2 周后, 与模型组相比, 消癥液低、中剂量组大鼠子宫系数均显著下降 ( $P < 0.01$ ), 消癥液高剂量组大鼠子宫系数下降但差异无统计学意义。结果见图 1。

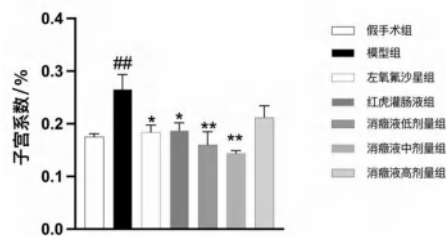


图 1 消癥液治疗对 SPID 大鼠子宫系数的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

Fig 1 Effect of Xiaozheng liquid on the uterine index in SPID rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

注: 与假手术组比较,  $^{##}P < 0.01$ ; 与模型组比较,  $^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ 。

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

### 3.2 消癥液对 SPID 大鼠子宫形态影响

假手术组大鼠的子宫颜色红润、毛细血管分布均匀, 管腔无扩张, 无水肿、粘连; 模型组大鼠的子宫毛细血管充血、子宫或卵巢组织与周围组织粘连成块、质硬, 子宫水肿; 消癥液低剂量组大鼠子宫存在水肿、无粘连; 消癥液中、高剂量组无水肿、粘连。与模型组相比, 左氧氟沙星组、红虎灌肠液组和消癥液低、中、高剂量组大鼠的子宫形态有明显改善。结果见图 2。

### 3.3 消癥液对 SPID 大鼠子宫病理组织的影响

HE 染色结果可见假手术组子宫壁分层清楚, 黏膜层间质细胞分布均匀, 内膜腺体规整, 肌纤维纹理清晰, 子宫黏膜上皮细胞呈单层柱状排列; 模型组部分大鼠子宫组织上皮增生或变薄, 腺体萎缩、脱落, 或被纤维结缔组织填充, 肌层紊乱, 炎性细胞大面积浸润。左氧氟沙星组大鼠子宫壁分层清晰, 腺体萎缩或脱落情况减少, 炎性细胞浸润减少。红虎灌肠液组大鼠子宫壁分层清晰, 腺体萎缩或脱落情况减少, 炎性细胞浸润减少。消癥液低剂量组大鼠子宫肌层紊乱减轻, 存在腺体萎缩脱落现象, 炎性细胞浸润面积减少。消癥液中、高剂量组大鼠子宫肌层紊乱显著改善, 大部分腺体结构正常, 炎性细胞浸润明显减少, 少量散在分布。与模型组相比, 左氧氟沙星组、红虎灌肠液组和消癥液低、中、高剂量组大鼠子宫上述病变有明显改善。结果见图 3。

### 3.4 消癥液对 SPID 大鼠血常规指标的影响

与假手术组相比, 模型组大鼠白细胞 (WBC)、



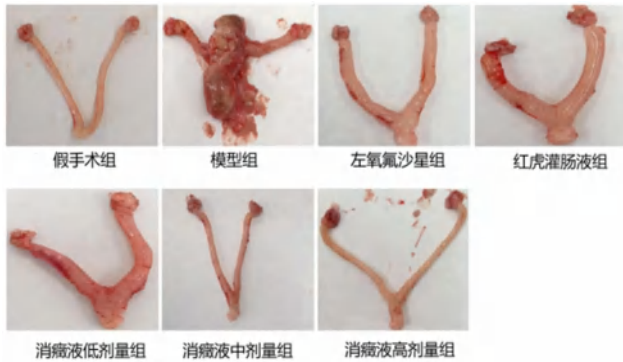


图 2 消癥液治疗对 SPID 大鼠子宫形态的影响

Fig 2 Effect of Xiaozheng liquid on the uterine morphology in SPID rats

中性粒细胞 (NE)、淋巴细胞 (LY)、嗜酸性粒细胞 (EO)、嗜碱性粒细胞 (BA) 和单核细胞 (MO) 水平显著上升 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 各给药组大鼠 WBC、NE、BA 水平显著下降 ( $P < 0.01$ ); 除消癥液高剂量组外, 其余各组大鼠 LY 水平均显著降低 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ); 除消癥液低、高剂量组外, 其余各给药组大鼠 MO、EO 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。结果见表 1。

**3.5 消癥液对 SPID 大鼠子宫组织中  $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$  水平的影响**

与假手术组相比, 模型组大鼠子宫组织中  $IL-1\beta$ 、 $TNF-\alpha$  表达显著升高 ( $P < 0.01$ ),  $IL-6$  表

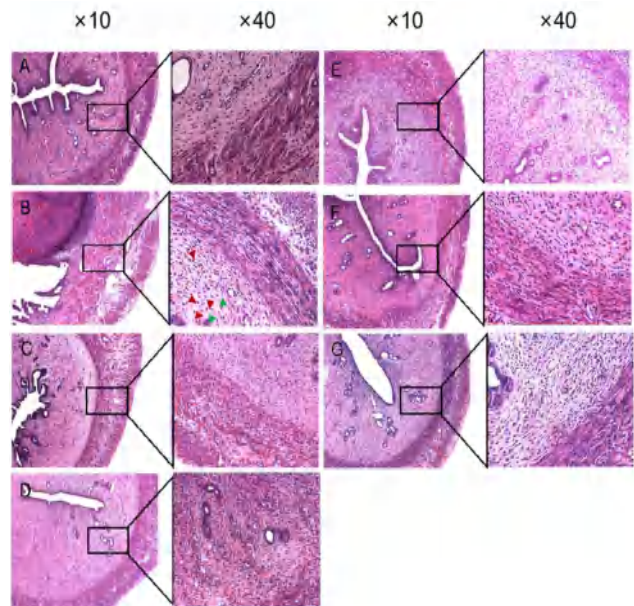


图 3 消癥液治疗对 SPID 大鼠子宫病理的影响 (HE)

Fig 3 Effect of Xiaozheng liquid on uterine pathology in SPID rats (HE)

A. 假手术组 (sham group); B. 模型组 (model group); C. 左氧氟沙星组 (levofloxacin group); D. 红虎灌肠液组 (Honghu enema solution group); E. 消癥液低剂量组 (low-dose Xiaozheng liquid group); F. 消癥液中剂量组 (medium-dose Xiaozheng liquid group); G. 消癥液高剂量组 (high-dose Xiaozheng liquid group)。

注 (Note): 红色箭头为炎细胞浸润, 绿色箭头为固有层纤维增生 (Red arrows indicate inflammatory cell infiltration, and green arrows indicate fibroplasia of the lamina propria)。

表 1 消癥液治疗对 SPID 大鼠血常规的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

Tab 1 Effect of Xiaozheng liquid on routine blood test in SPID rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

| 组别      | WBC/( $\times 10^3 \cdot \mu L^{-1}$ ) | NE/%                  | LY/%                 | MO/%                 | EO/%                 | BA/%                 |
|---------|----------------------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 假手术组    | $5.08 \pm 3.12$                        | $1.94 \pm 0.96$       | $2.76 \pm 1.96$      | $0.01 \pm 0.04$      | $0.11 \pm 0.06$      | $0.15 \pm 0.12$      |
| 模型组     | $10.58 \pm 5.05^{###}$                 | $4.76 \pm 2.34^{###}$ | $5.21 \pm 3.35^{\#}$ | $0.08 \pm 0.07^{\#}$ | $0.21 \pm 0.11^{\#}$ | $0.34 \pm 0.25^{\#}$ |
| 左氧氟沙星组  | $2.01 \pm 0.87^{**}$                   | $1.05 \pm 0.39^{**}$  | $0.72 \pm 0.23^{**}$ | $0.00 \pm 0.00^{**}$ | $0.09 \pm 0.04^{**}$ | $0.03 \pm 0.05^{**}$ |
| 红虎灌肠液组  | $3.28 \pm 1.53^{**}$                   | $1.53 \pm 0.29^{**}$  | $2.19 \pm 1.36^{**}$ | $0.00 \pm 0.00^{**}$ | $0.11 \pm 0.04^*$    | $0.09 \pm 0.06^{**}$ |
| 消癥液低剂量组 | $3.63 \pm 2.07^{**}$                   | $1.90 \pm 0.54^{**}$  | $2.56 \pm 1.22^*$    | $0.03 \pm 0.05$      | $0.17 \pm 0.08$      | $0.07 \pm 0.08^{**}$ |
| 消癥液中剂量组 | $2.96 \pm 1.30^{**}$                   | $1.29 \pm 0.55^{**}$  | $1.53 \pm 0.76^{**}$ | $0.00 \pm 0.00^{**}$ | $0.11 \pm 0.04^*$    | $0.05 \pm 0.05^{**}$ |
| 消癥液高剂量组 | $5.46 \pm 2.26^{**}$                   | $1.83 \pm 0.65^{**}$  | $3.20 \pm 1.79$      | $0.06 \pm 0.05$      | $0.20 \pm 0.09$      | $0.13 \pm 0.07^{**}$ |

注: 与假手术组比较,  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{###}P < 0.01$ ; 与模型组比较,  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ 。

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

达有上升趋势但是差异无统计学意义; 与模型组相比, 各给药组大鼠子宫组织中  $IL-1\beta$ 、 $TNF-\alpha$  表达均显著降低 ( $P < 0.01$ ),  $IL-6$  表达有下降趋势但差异无统计学意义。结果见表 2。

### 3.6 消癥液对 TLR4-NF- $\kappa B$ 信号通路的影响

Western blot 结果显示, 与假手术组相比, 模型组大鼠 TLR4、MyD88、 $p-I\kappa B\alpha/I\kappa B\alpha$ 、 $p-IKK\beta/IKK\beta$ 、 $p-p65/p65$  蛋白表达量升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 抑炎复合体  $I\kappa B\alpha$  显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 左氧氟沙星组以及消癥液中、高剂量组大鼠 TLR4 蛋白表达量显著降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );

除左氧氟沙星组, 其余各组大鼠 MyD88 蛋白表达量均显著降低 ( $P < 0.01$ ); 红虎灌肠液组以及消癥液低、中剂量组大鼠  $I\kappa B\alpha$  蛋白表达量显著上升 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 各给药组大鼠  $p-I\kappa B\alpha/I\kappa B\alpha$ 、 $p-IKK\beta/IKK\beta$  均显著下降 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 除左氧氟沙星组, 其余各组大鼠  $p-p65/p65$  均显著下降 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结果见图 4。

## 4 讨论

当前研究普遍认为 SPID 的发病机制为上生殖道细菌感染, 导致机体局部炎症产生, 未能得到及时有效的治疗, 机体长时间处于炎症状



表 2 消癥液治疗对 SPID 大鼠炎症因子水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )  
Tab 2 Effect of Xiaozheng liquid on the inflammatory factors in SPID rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

| 组别      | IL-1 $\beta$ / (pg $\cdot$ mg <sup>-1</sup> ) | IL-6/ (pg $\cdot$ mg <sup>-1</sup> ) | TNF- $\alpha$ / (pg $\cdot$ mg <sup>-1</sup> ) |
|---------|-----------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------|
| 假手术组    | 41.19 $\pm$ 17.79                             | 56.57 $\pm$ 23.36                    | 108.8 $\pm$ 35.64                              |
| 模型组     | 116.7 $\pm$ 32.23 <sup>##</sup>               | 85.11 $\pm$ 45.96                    | 294.10 $\pm$ 88.89 <sup>##</sup>               |
| 左氧氟沙星组  | 52.76 $\pm$ 19.23 <sup>**</sup>               | 46.11 $\pm$ 32.31                    | 99.50 $\pm$ 32.71 <sup>**</sup>                |
| 红虎灌肠液组  | 46.72 $\pm$ 15.45 <sup>**</sup>               | 61.37 $\pm$ 20.58                    | 85.41 $\pm$ 35.88 <sup>**</sup>                |
| 消癥液低剂量组 | 53.32 $\pm$ 19.71 <sup>**</sup>               | 44.82 $\pm$ 20.28                    | 122.90 $\pm$ 46.69 <sup>**</sup>               |
| 消癥液中剂量组 | 30.40 $\pm$ 17.65 <sup>**</sup>               | 43.24 $\pm$ 30.57                    | 78.08 $\pm$ 15.07 <sup>**</sup>                |
| 消癥液高剂量组 | 60.65 $\pm$ 29.51 <sup>**</sup>               | 74.83 $\pm$ 40.19                    | 106.50 $\pm$ 36.41 <sup>**</sup>               |

注：与假手术组比较，<sup>#</sup> $P < 0.05$ ，<sup>##</sup> $P < 0.01$ ；与模型组比较，<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ，<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。  
Note: Compared with the sham group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ，<sup>##</sup> $P < 0.01$ ；compared with the model group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ，<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

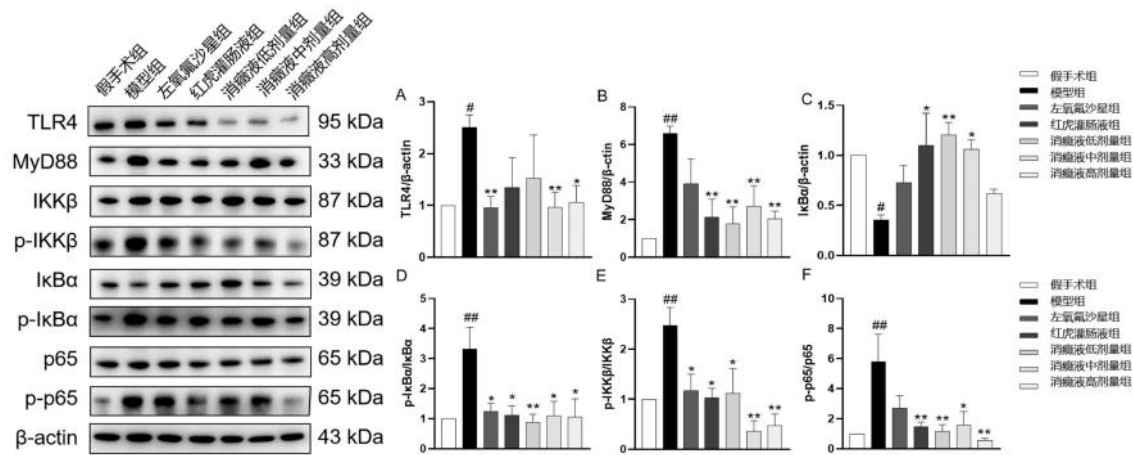


图 4 各组大鼠子宫组织中 TLR4、MyD88、p-IKK $\beta$ 、I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-p65 蛋白表达水平 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ )  
Fig 4 Levels of TLR4, MyD88, p-IKK $\beta$ , I $\kappa$ B $\alpha$ , p-I $\kappa$ B $\alpha$ , and p-p65 in rat uterus of each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ )

注：与假手术组比较，<sup>#</sup> $P < 0.05$ ，<sup>##</sup> $P < 0.01$ ；与模型组比较，<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ，<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。  
Note: Compared with the sham group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ，<sup>##</sup> $P < 0.01$ ；compared with the model group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ，<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

态<sup>[7]</sup>。目前盆腔炎性疾病后遗症治疗多以抗炎为主，抗菌药物对控制盆腔炎急性期敏感细菌感染较为有效；但对组织粘连、局部循环障碍甚至疼痛效果较差，故单纯用抗菌药物治疗慢性盆腔炎，临床疗效不尽如人意。中药在改善慢性盆腔炎临床症状的同时，同时也能调节机体自身免疫功能，提高人体抵抗能力，对于慢性盆腔炎治疗具有独特优势<sup>[8]</sup>。

来源于名老中医经验方的消癥液，其组方包括干鱼腥草、大血藤<sup>[9]</sup>、醋三棱、醋莪术、醋延胡索、鸡内金、茯苓、川牛膝、郁金、乌药等药材。方中鱼腥草辛、微寒，能够清热解毒，利湿排脓；红藤性味苦、平，归肝经，能清热解毒，活血化瘀止痛，针对病机治疗主证，两者共为君药。夏枯草苦以泄热、辛以散结，清热解毒、散结消肿；三棱、莪术破血行气，消癥止痛，三者共为臣药。延胡索理气止痛，鸡内金涩精化瘀止带，茯苓利水祛湿，以上诸药共为佐药，既可佐助君臣药清热解毒、活血化瘀，又可排脓消癥，尽显佐助之

功。川牛膝除活血通经佐助以外，尚能引药下行，故为使药<sup>[5]</sup>。

本研究采用大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和乙型溶血性链球菌三种细菌进行造模，覆盖革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌、需氧菌和厌氧菌，同时使用注射器针头对子宫内壁造成机械损伤，模拟 SPID 的临床发病过程<sup>[10]</sup>。白细胞数量变化在细菌感染类疾病中具有重要的诊断价值<sup>[11]</sup>。临床上，SPID 患者白细胞水平一般呈现上升趋势<sup>[12]</sup>。而本实验发现，SPID 模型大鼠手术 4 周后白细胞、中性粒细胞水平显著上升，并且大鼠子宫出现水肿、毛细血管充血、粘连等盆腔形态改变。盆腔炎在后遗症阶段，机体需通过长期的免疫反应来持续对抗感染。考虑感染发生时，中性粒细胞迅速迁移至感染部位杀灭细菌，骨髓增加中性粒细胞的产生，以补偿其消耗，这可能是白细胞增加的最主要原因<sup>[13]</sup>。淋巴细胞在感染中被免疫系统激活，进而自身增殖活化并趋化至炎症部位，分泌多种炎症因子调节和增强免疫反应。嗜

酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞由于数量占比较低,仅在如急性细菌感染等少数疾病中受到关注,嗜酸性粒细胞数量出现下降<sup>[14-15]</sup>。盆腔炎性疾病后遗症中,推测嗜酸性粒细胞升高可能是通过促进记忆性 CD8<sup>+</sup> T 细胞形成而促进免疫应答,维持低炎症状态。消癥液治疗显著降低模型大鼠白细胞及中性粒细胞等水平,缓解组织粘连及炎症细胞浸润情况,改善机体炎症状态。

通过微生物感染造模后,子宫组织上皮细胞固有免疫模式识别受体 (PRRs) 通过识别病原体相关分子模式 (PAMP) 驱动细胞因子的产生,如 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  等<sup>[16]</sup>。同时细菌产生脂多糖 (LPS) 能够被模式识别受体 TLR4 识别,可启动机体炎症链式反应,通过与接头蛋白 MyD88 结合,进一步激活 NF- $\kappa$ B 信号通路<sup>[17-18]</sup>。NF- $\kappa$ B 作为一种 Rel 家族蛋白同源或异源二聚体化产生的物质,其主要形式由 p50 和 p65 两个亚基构成,其活性主要受到抑制因子  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) 影响。上游刺激因子通过激活 I $\kappa$ B 激酶 IKK,引起核转录因子的抑制蛋白 I $\kappa$ B 磷酸化,胞质中 I $\kappa$ B $\alpha$  含量降低,NF- $\kappa$ B 被激活,转位到核内,从而促进 TNF- $\alpha$ 、IL-6 等多种炎症因子的表达。在本研究中,模型大鼠子宫组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$  均有不同程度的升高,同时模型 TLR4、MyD88、p-I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-IKK $\beta$ /IKK $\beta$ 、p-p65 等蛋白表达量升高,抑炎复合体 I $\kappa$ B $\alpha$  表达量显著降低,推测 SPID 模型大鼠的发病机制与 TLR4 介导的 MyD88 依赖性 NF- $\kappa$ B 信号通路激活有关。消癥液治疗抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路,降低 IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$  等炎症因子水平,从而达到抑制炎症的效果<sup>[19]</sup>。

综上所述,消癥液治疗 SPID 模型大鼠的疗效确切,其机制可能与抑制 TLR4 介导的 MyD88 依赖性的 NF- $\kappa$ B 信号通路激活有关,本研究为消癥液临床应用提供了实验数据支持。

## 参考文献

- [1] 中华中医药学会. 中医妇科临床诊疗指南[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2019: 12.
- [2] 左瑾楠, 张兵, 于潇, 等. 逍遥舒坤颗粒对大鼠盆腔炎性疾病后遗症的治疗作用及其机制[J]. 山东医药, 2023, 63 (26): 40-43.
- [3] 邵美华, 蒋珊珊, 张敏. 自拟清热逐秽饮保留灌肠联合抗菌药物治疗盆腔炎性疾病后遗症疗效研究[J]. 辽宁中医杂志, 2024, 51 (1): 133-136.
- [4] 王停. 秦氏妇科经验辑要[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2010: 12.
- [5] 陈何红. 秦氏消症液保留灌肠法治疗湿热瘀阻型慢性盆腔炎 340 例[J]. 河南中医学院学报, 2007, 22 (1): 69-70.
- [6] 黄丽, 孙培文, 罗隽, 等. 慢性盆腔炎模型的建立与评价[J]. 中南药学, 2010, 8 (6): 469-472.
- [7] Zhang L, Zhu JY, Sun MY, et al. Anti-inflammatory effect of Ma-Pen-Fang, a Chinese herbal compound, on chronic pelvic inflammation in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2017, 208: 57-65.
- [8] 姚春娣, 朱澄漪, 温玲, 等. 膈下逐瘀汤对慢性盆腔炎大鼠 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号的影响[J]. 中成药, 2020, 42 (11): 2896-2902.
- [9] 邢人鑫. 金刚藤口服液基于免疫调节对大鼠慢性盆腔炎的治疗作用研究[J]. 药学与临床研究, 2014, 22 (5): 405-408.
- [10] 郭星瑶, 刘卉, 冯智敏, 等. 大血藤在治疗盆腔炎性疾病中的应用[J]. 亚太传统医药, 2019, 15 (2): 205-207.
- [11] Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway[J]. Cytokine, 2008, 42 (2): 145-151.
- [12] Honda T, Takayuki T, Matsumoto G, et al. Neutrophil left shift and white blood cell count as markers of bacterial infection[J]. Clin Chim Acta, 2016, 457: 46-53.
- [13] Kratoofil RM, Shim HB, Shim R, et al. A monocyte-leptin-angiogenesis pathway critical for repair post-infection[J]. Nature, 2022, 609 (7925): 166-173.
- [14] Chen LJ, Liao D, Jiang JN, et al. The VCS parameters of lymphocytes may improve discrimination between bacterial infection and viral infection[J]. Clin Lab, 2021, 67 (11): 1077-1081.
- [15] Mésinèle L, Pujol T, Brunetti N, et al. Association between low eosinophil count and acute bacterial infection, a prospective study in hospitalized older adults[J]. BMC Geriatr, 2023, 23 (1): 852.
- [16] Shroff S. Infectious vaginitis, cervicitis, and pelvic inflammatory disease[J]. Med Clin North Am, 2023, 107 (2): 299-315.
- [17] Stevens JS, Criss AK. Pathogenesis of *Neisseria gonorrhoeae* in the female reproductive tract: neutrophilic host response, sustained infection, and clinical sequelae[J]. Curr Opin Hematol, 2018, 25 (1): 13-21.
- [18] Zhang MN, Wang LL, Zhou CY, et al. *E. coli* LPS/TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway regulates Th17/Treg balance mediating inflammatory responses in oral lichen planus[J]. Inflammation, 2023, 46 (3): 1077-1090.
- [19] Yang Y, Liu SS, Liu JX, et al. Inhibition of TLR2/TLR4 alleviates the *Neisseria gonorrhoeae* infection damage in human endometrial epithelial cells via Nrf2 and NF- $\kappa$ B signaling[J]. J Reprod Immunol, 2020, 142: 103192.

(收稿日期: 2025-01-02; 修回日期: 2025-03-09)

# 复方扶芳藤胶囊高效液相色谱指纹图谱 及 5 种成分含量测定研究

覃明雄<sup>1</sup>, 陈晓艺<sup>1</sup>, 李芳婵<sup>2</sup>, 潘秋丽<sup>1</sup>, 胡晨<sup>1</sup>, 韦雯怡<sup>1</sup>, 庞晓云<sup>1\*</sup>, 谭安蕾<sup>1\*</sup> (1.广西中医药大学百年乐制药有限公司, 南宁 530023; 2.广西中医药大学, 南宁 530200)

**摘要:** **目的** 建立复方扶芳藤胶囊高效液相色谱 (HPLC) 指纹图谱, 并测定其中原儿茶酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、刺芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素 5 种成分的含量。**方法** 采用 Acclaim 120-C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.2% 磷酸溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温为 30 ℃, 检测波长为 254 nm。采用中药指纹图谱软件 (2012A 版) 对 15 批样品进行相似度分析。对其原儿茶酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、刺芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素等 5 种主要成分进行含量测定。**结果** 建立复方扶芳藤胶囊 HPLC 指纹图谱, 确定了 20 个共有峰, 15 批样品相似度均大于 0.90。15 批样品中 5 种成分在相应浓度范围内与峰面积的线性关系良好, 平均回收率分别为 98.69%、99.83%、99.90%、98.64%、100.92%, RSD 分别为 0.99%、2.2%、1.8%、2.8%、2.6%。**结论** 本研究建立了复方扶芳藤胶囊 HPLC 指纹图谱及同时测定 5 种成分含量的方法, 操作简单, 重复性好, 稳定可靠, 可为复方扶芳藤胶囊的质量控制提供更加全面的依据。

**关键词:** 复方扶芳藤胶囊; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 含量测定

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)06-1698-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.030

## HPLC fingerprints of compound Fufangteng capsules and simultaneous determination of 5 components

QIN Ming-xiong<sup>1</sup>, CHEN Xiao-yi<sup>1</sup>, LI Fang-chan<sup>2</sup>, PAN Qiu-li<sup>1</sup>, HU Chen<sup>1</sup>, WEI Wen-yi<sup>1</sup>, PANG Xiao-yun<sup>1\*</sup>, TAN An-qiang<sup>1\*</sup> (1. Guangxi University of Chinese Medicine Bainianle Pharmaceutical Co., Ltd., Nanning 530023; 2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200)

**Abstract: Objective** To establish an HPLC fingerprints of compound Fufangteng capsules and simultaneously determine the content of 5 components (protocatechuic acid, calycosin-7-*O*-β-D-glucoside, ononin, calycosin and formononetin). **Methods** Acclaim 120-C<sub>18</sub> column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used. The mobile phase was acetonitrile-0.2% phosphoric acid solution with gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The column temperature was 30 ℃ and the detection wavelength was 254 nm. Similarity of 15 batches of samples was analyzed by traditional Chinese medicine fingerprint software (2012A edition). The content of the 5 main components, namely protocatechuic acid, calycosin-7-*O*-β-D-glucoside, ononin, calycosin and formononetin, was determined. **Results** The HPLC fingerprints of compound Fufangteng capsules was established, and 20 common peaks were identified. The similarity of 15 batches of samples was all greater than 0.90. The 5 components in the 15 batches of samples showed good linearity with the peak area within corresponding concentration ranges. The average recoveries were 98.69%, 99.83%, 99.90%,

**基金项目:** 广西科技重大专项 (No. 桂科 AA23023035); 广西自然科学基金项目 (No.2023GXNSFAA026217); 广西中医药管理局自筹经费项目 (No.GXZYA20230119); 广西壮族自治区中医药管理局自筹项目 (No.GXZYA20230152)。

**作者简介:** 覃明雄, 男, 工程师, 主要从事壮瑶药的研究与应用, email: 377251336@qq.com \***通信作者:** 谭安蕾, 男, 高级工程师, 主要从事壮药与保健食品新产品开发工作, email: 164647373@qq.com; 庞晓云, 女, 工程师, 主要从事壮药与保健食品新产品开发工作, email: 1749515818@qq.com



98.64%, and 100.92%, respectively, with *RSDs* of 0.99%, 2.2%, 1.8%, 2.8%, and 2.6%. **Conclusion** The HPLC fingerprint and the determination method of the 5 components in compound Fufangteng capsules are simple, repeatable and stable, and provide a comprehensive basis for the quality control of Fufangteng capsules.

**Key words:** compound Fufangteng capsule; HPLC method; fingerprint; content determination

复方扶芳藤胶囊由扶芳藤、黄芪和人参组成, 具有益气补血、健脾养心的功效, 常用于气血不足者, 是以壮药扶芳藤为主药的气血双补复方中药(壮药)制剂、非处方药(OTC)药物、高新技术产品, 是广西特色、优势壮成药。近年来, 广大科技工作者在国家“大品种二次开发”及国家药品标准提高行动计划的指引下, 通过采用生产工艺优化、质量标准提升、上市后再评价(增加临床适应证)、中药改良型新药研制等手段, 加快广西名优壮成药产品复方扶芳藤胶囊的二次开发研究<sup>[1]</sup>。在现行质量标准中除有薄层色谱(TLC)鉴别外, 只有一个TLC扫描的含量测定项目, 用于测定制剂中黄芪甲苷的含量。

指纹图谱具有整体性特点, 可在整体上表征中药化学成分, 是目前中药制剂质量控制的有效手段之一, 但现行标准以对单一成分定量分析为主, 难以全面控制中药制剂的质量<sup>[2-4]</sup>。指纹图谱和多指标成分含量测定方法相结合, 能有效地解决中药多成分定性定量问题, 确保产品质量和批次间的一致性<sup>[5]</sup>。根据相关报道<sup>[6-11]</sup>, 复方扶芳藤胶囊中的原儿茶酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、刺芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素可能是其发挥抗炎镇痛、止血活血、脑保护和抗氧化等作用的活性成分。为优化该制剂质量, 本研究选择这5种有效活性成分为质量评价指标, 建立复方扶芳藤胶囊HPLC指纹图谱及含量测定方法, 以便为复方扶芳藤胶囊的质量评价提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), SG250HE 超声清洗器(上海冠特超声仪器有限公司), ME104E 万分之一电子天平、MS205U 十万分之一电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

### 1.2 试药

原儿茶酸(纯度: 97.7%, 批号: 110809-202207)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(纯度: 96.8%, 批号: 111920-202308)(中国食品药品检定研究院),

刺芒柄花苷(纯度: 98.0%, 批号: JB247303)、毛蕊异黄酮(纯度: 98.0%, 批号: S29IB227691)、芒柄花黄素(纯度: 98.0%, 批号: N08IB231271)(上海源叶生物科技有限公司)。乙腈、甲醇均为色谱纯(Fisher), 磷酸(色谱纯, 西陇科学股份有限公司), 纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司), 复方扶芳藤胶囊(批号: 20240601、20240602、20240603、20240604、20240701、20240702、20240703、20240704、20240705、20240801、20240802、20240803、20240901、20240902、20240903, 分别编号 S1 ~ S15; 广西中医药大学百年乐制药有限公司自制, 规格: 0.37 g/粒)。

## 2 方法与结果

### 2.1 供试品溶液制备

取复方扶芳藤胶囊样品 10 粒, 除去囊壳, 研细, 精密称取粉末 1.0 g, 置于 50 mL 锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称重, 超声提取 30 min, 放冷, 再称重, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 滤液过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

### 2.2 对照品溶液制备

精密称取原儿茶酸、刺芒柄花苷、毛蕊异黄酮对照品 23.96、17.57、19.12 mg 分别置于 10 mL 量瓶中, 精密称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花黄素对照品 17.94、19.12 mg 分别置于 20 mL 量瓶中, 加入甲醇溶解并定容, 得各单一对照品储备液。精密吸取适量上述储备液置于同一个 20 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 制成原儿茶酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、刺芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素质量浓度分别 18.0、20.2、8.8、18.3、9.6 μg · mL<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液。

分别精密吸取对照品储备液适量, 逐级稀释, 配制成 6 个不同浓度的标准系列工作溶液。

### 2.3 色谱条件

色谱柱为 Acclaim 120 C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈(A) - 0.2% 磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0 ~ 20 min, 5%A; 20 ~ 25 min, 5% → 12%A; 25 ~ 36 min, 12%A; 36 ~ 40 min, 12% → 17%A; 40 ~ 56 min, 17%A; 56 ~ 60

min, 17% → 21%A; 60 ~ 78 min, 21%A; 78 ~ 82 min, 21% → 29%A; 82 ~ 90 min, 29%A; 90 ~ 93 min, 29% → 36%A; 93 ~ 110 min, 36%A; 110 ~ 115 min, 36% → 5%A; 115 ~ 120 min, 5%A), 检测波长为 254 nm, 进样量为 10  $\mu$ L, 流速为 1.0 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 柱温 30  $^{\circ}$ C。

## 2.4 方法学考察

**2.4.1 精密度试验** 精密称取复方扶芳藤胶囊 (S1), 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 连续进样 6 次, 以原儿茶酸为参照峰, 计算得各共有峰相对保留时间 *RSD* 值在 0.090% ~ 0.28%, 相对峰面积 *RSD* 值在 0.20% ~ 0.85%, 说明仪器精密度良好。

**2.4.2 稳定性考察** 精密称取复方扶芳藤胶囊 (S1), 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 时进样测定, 以原儿茶酸为参照峰, 计算得各共有峰相对保留时间 *RSD* 值在 0.12% ~ 0.60%, 相对峰面积 *RSD* 值在 0.56% ~ 1.7%, 说明在 24 h 内供试品溶液具有良好的稳定性。

**2.4.3 重复性考察** 精密称取同一批次复方扶芳藤胶囊 (S1) 共 6 份, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 以原儿茶酸为参照峰, 计算得各共有峰相对保留时间 *RSD* 值在 0.12% ~ 0.60%, 相对峰面积 *RSD* 值在 0.56% ~ 1.7%, 说明该方法具有良好的重复性。

## 2.5 HPLC 指纹图谱的建立

取 15 批复方扶芳藤胶囊样品, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 记录色谱图。将 15 批样品图谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012A 版)》, 将 S1 设为参照图谱, 经多点校正和 Mark 峰匹配, 构建 15 批复方扶芳藤胶囊指纹图谱及共有模式 (R), 指纹图谱有 20 个共有峰, 通过与对照品比对, 指认了原儿茶酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、刺芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素 5 种成分, 见图 1、图 2。15 批样品的相对保留时间和相对峰面积见表 1、表 2。

## 2.6 相似度评价

采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)》计算 15 批复方扶芳藤胶囊 HPLC 图谱的相似度。结果显示, 与对照指纹图谱相比, 各批复方扶芳藤胶囊样品图谱的相似度均大于 0.9, 表明不同批次的复方扶芳藤胶囊样品图谱相似度良好 (见表 3)。

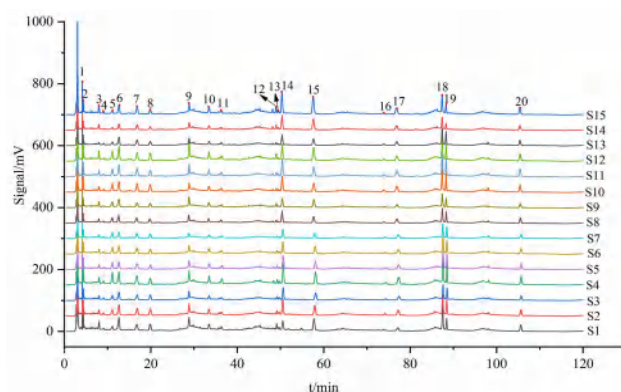


图 1 15 批复方扶芳藤胶囊样品 HPLC 叠加图

Fig 1 HPLC overlay diagram of 15 batches of Fufangteng capsules

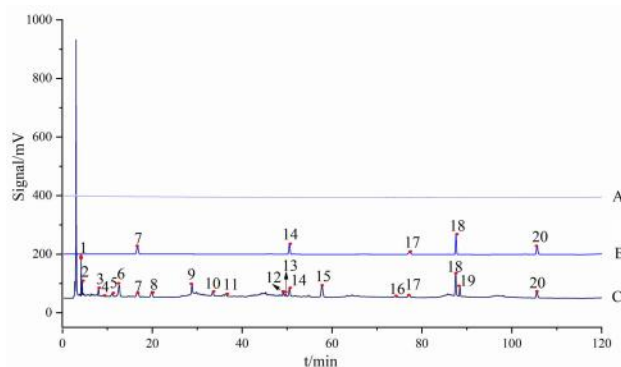


图 2 空白对照 (A)、混合对照品 HPLC 图 (B) 及复方扶芳藤胶囊 HPLC 对照指纹图谱 (C)

Fig 2 HPLC control fingerprint of blank control (A), mixed reference substance (B), and compound Fufangteng capsule (C)

注 (Note): 7. 原儿茶酸 (protocatechuic acid); 14. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (calycosin-7-O- $\beta$ -D-glucoside); 17. 刺芒柄花苷 (ononin); 18. 毛蕊异黄酮 (calycosin); 20. 芒柄花黄素 (formononetin)。

## 2.7 HPLC 测定 5 种成分的含量

**2.7.1 溶液的制备** 供试品溶液和对照品溶液的制备同“2.1”“2.2”项下方法。

**2.7.2 色谱条件** 色谱柱为 Acclaim 120 C<sub>18</sub> 柱 (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m), 流动相: 乙腈 (A) -0.2% 磷酸溶液 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 22 min, 5%A; 22 ~ 28 min, 5% → 16%A; 28 ~ 50 min, 16%A; 50 ~ 56 min, 16% → 21%A; 56 ~ 75 min, 21%A; 75 ~ 82 min, 21% → 33%A; 82 ~ 90 min, 33%A; 90 ~ 93 min, 33% → 36%A; 93 ~ 110 min, 36%A; 110 ~ 115 min, 36% → 5%A; 115 ~ 120 min, 5%A); 检测波长为 254 nm, 进样量为 10  $\mu$ L, 流速为 1.0 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 柱温为 30  $^{\circ}$ C, 混合对照及样品色谱图见图 3。

**2.7.3 线性关系考察** 取“2.2”项下的标准系列工作溶液, 按“2.7.2”项下色谱条件测定, 以各对照品溶液质量浓度为横坐标, 相应峰面积为纵坐标, 进行线性回归, 得 5 种成分的回归方程及

表 1 15 批复方扶芳藤胶囊样品的相对保留时间

Tab 1 Retention time of 15 batches of Fufangteng capsules

| 序号      | S1     | S2     | S3     | S4     | S5     | S6     | S7     | S8     | S9     | S10    | S11    | S12    | S13    | S14    | S15    | RSD/% |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|
| 峰 1     | 0.2487 | 0.2473 | 0.2478 | 0.2484 | 0.2481 | 0.2482 | 0.2477 | 0.2477 | 0.2477 | 0.2475 | 0.2486 | 0.2471 | 0.2472 | 0.2470 | 0.2470 | 0.23  |
| 峰 2     | 0.2630 | 0.2615 | 0.2618 | 0.2628 | 0.2622 | 0.2622 | 0.2616 | 0.2618 | 0.2618 | 0.2623 | 0.2621 | 0.2619 | 0.2617 | 0.2617 | 0.2617 | 0.17  |
| 峰 3     | 0.4788 | 0.4758 | 0.4770 | 0.4786 | 0.4776 | 0.4775 | 0.4764 | 0.4764 | 0.4764 | 0.4771 | 0.4759 | 0.4755 | 0.4757 | 0.4756 | 0.4748 | 0.24  |
| 峰 4     | 0.5400 | 0.5376 | 0.5386 | 0.5403 | 0.5396 | 0.5395 | 0.5379 | 0.5380 | 0.5380 | 0.5403 | 0.5363 | 0.5381 | 0.5386 | 0.5385 | 0.5372 | 0.22  |
| 峰 5     | 0.6642 | 0.6615 | 0.6623 | 0.6640 | 0.6631 | 0.6631 | 0.6614 | 0.6614 | 0.6612 | 0.6624 | 0.6609 | 0.6612 | 0.6613 | 0.6611 | 0.6606 | 0.17  |
| 峰 6     | 0.7532 | 0.7513 | 0.7516 | 0.7529 | 0.7523 | 0.7522 | 0.7512 | 0.7512 | 0.7508 | 0.7524 | 0.7502 | 0.7510 | 0.7517 | 0.7514 | 0.7508 | 0.11  |
| 峰 7 (S) | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.00  |
| 峰 8     | 1.1839 | 1.1810 | 1.1812 | 1.1841 | 1.1828 | 1.1819 | 1.1814 | 1.1814 | 1.1809 | 1.1800 | 1.1833 | 1.1804 | 1.1802 | 1.1800 | 1.1805 | 0.12  |
| 峰 9     | 1.7185 | 1.7122 | 1.7135 | 1.7191 | 1.7157 | 1.7164 | 1.7127 | 1.7127 | 1.7129 | 1.7113 | 1.7240 | 1.7155 | 1.7154 | 1.7147 | 1.7153 | 0.19  |
| 峰 10    | 1.9944 | 1.9853 | 1.9892 | 1.9952 | 1.9911 | 1.9913 | 1.9870 | 1.9870 | 1.9874 | 1.9848 | 1.9953 | 1.9868 | 1.9863 | 1.9845 | 1.9858 | 0.19  |
| 峰 11    | 2.1669 | 2.1583 | 2.1634 | 2.1706 | 2.1663 | 2.1653 | 2.1614 | 2.1614 | 2.1608 | 2.1579 | 2.1652 | 2.1583 | 2.1573 | 2.1551 | 2.1556 | 0.21  |
| 峰 12    | 2.9288 | 2.9178 | 2.9260 | 2.9345 | 2.9277 | 2.9571 | 2.9206 | 2.9206 | 2.9186 | 2.9143 | 2.9392 | 2.9132 | 2.9115 | 2.9072 | 2.9091 | 0.53  |
| 峰 13    | 2.9594 | 2.9486 | 2.9574 | 2.9664 | 2.9592 | 2.9571 | 2.9516 | 2.9519 | 2.9497 | 2.9452 | 2.9701 | 2.9437 | 2.9419 | 2.9378 | 2.9395 | 0.33  |
| 峰 14    | 3.0119 | 2.9991 | 3.0076 | 3.0167 | 3.0096 | 3.0079 | 3.0020 | 3.0020 | 2.9999 | 2.9957 | 3.0081 | 2.9941 | 2.9919 | 2.9881 | 2.9899 | 0.28  |
| 峰 15    | 3.4427 | 3.4378 | 3.4536 | 3.4616 | 3.4526 | 3.4505 | 3.4413 | 3.4413 | 3.4370 | 3.4308 | 3.4338 | 3.4253 | 3.4225 | 3.4173 | 3.4188 | 0.39  |
| 峰 16    | 4.4132 | 4.4019 | 4.4183 | 4.4251 | 4.4148 | 4.4143 | 4.4089 | 4.4038 | 4.4039 | 4.3930 | 4.4169 | 4.3949 | 4.3925 | 4.3867 | 4.3889 | 0.27  |
| 峰 17    | 4.5974 | 4.5830 | 4.6001 | 4.6086 | 4.5973 | 4.5958 | 4.5842 | 4.5842 | 4.5826 | 4.5742 | 4.5936 | 4.5678 | 4.5680 | 4.5614 | 4.5614 | 0.32  |
| 峰 18    | 5.2163 | 5.1952 | 5.2061 | 5.2194 | 5.2074 | 5.2090 | 5.1980 | 5.1980 | 5.1970 | 5.1892 | 5.2319 | 5.1924 | 5.1915 | 5.1854 | 5.1880 | 0.25  |
| 峰 19    | 5.2717 | 5.2503 | 5.2605 | 5.2741 | 5.2617 | 5.2640 | 5.2529 | 5.2529 | 5.2517 | 5.2448 | 5.2865 | 5.2462 | 5.2450 | 5.2387 | 5.2413 | 0.26  |
| 峰 20    | 6.2940 | 6.2689 | 6.2787 | 6.2962 | 6.2820 | 6.2845 | 6.2726 | 6.2726 | 6.2702 | 6.2624 | 6.3083 | 6.2616 | 6.2594 | 6.2521 | 6.2556 | 0.26  |

表 2 15 批复方扶芳藤胶囊样品的相对峰面积

Tab 2 Peak area of 15 batches of Fufangteng capsules

| 序号      | S1     | S2     | S3     | S4     | S5     | S6     | S7     | S8     | S9     | S10    | S11    | S12    | S13    | S14    | S15    | RSD/% |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|
| 峰 1     | 0.7871 | 0.5429 | 0.6000 | 0.3874 | 0.3977 | 0.4384 | 0.4439 | 0.4028 | 0.4548 | 0.4370 | 0.4479 | 0.4703 | 0.4734 | 0.4043 | 0.5568 | 21.6  |
| 峰 2     | 0.6433 | 0.5231 | 0.5483 | 0.4749 | 0.4667 | 0.4769 | 0.4749 | 0.4375 | 0.4959 | 0.4747 | 0.4984 | 0.5067 | 0.4716 | 0.4146 | 0.4476 | 11.0  |
| 峰 3     | 0.5722 | 0.3386 | 0.3450 | 0.2996 | 0.3378 | 0.3508 | 0.3460 | 0.4112 | 0.7363 | 0.3514 | 0.2952 | 0.5650 | 0.2073 | 0.2248 | 0.4799 | 36.4  |
| 峰 4     | 0.0968 | 0.1742 | 0.1827 | 0.1714 | 0.1740 | 0.1626 | 0.1740 | 0.1760 | 0.1006 | 0.1830 | 0.2943 | 0.1750 | 0.2474 | 0.1265 | 0.2432 | 29.2  |
| 峰 5     | 0.4774 | 0.6852 | 0.7080 | 1.0064 | 0.9920 | 0.8340 | 0.9740 | 0.8420 | 1.1983 | 0.9607 | 0.8821 | 1.0859 | 0.5067 | 0.5607 | 0.3696 | 30.4  |
| 峰 6     | 1.7081 | 1.3147 | 1.3811 | 1.1083 | 1.1174 | 1.1610 | 1.1120 | 1.2218 | 1.6187 | 1.1410 | 1.1370 | 1.5875 | 1.3615 | 1.2415 | 1.0956 | 15.9  |
| 峰 7 (S) | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.0   |
| 峰 8     | 0.9381 | 0.9367 | 0.9464 | 0.6479 | 0.6325 | 0.7742 | 0.9048 | 0.7294 | 0.9209 | 0.8868 | 0.8663 | 0.9574 | 0.7241 | 0.7946 | 0.5864 | 15.6  |
| 峰 9     | 0.7984 | 0.7746 | 0.7862 | 0.7436 | 0.7400 | 0.7754 | 0.5493 | 0.8173 | 1.2349 | 0.5430 | 0.5455 | 1.2367 | 0.6078 | 0.6206 | 0.6591 | 28.3  |
| 峰 10    | 0.5474 | 0.5229 | 0.5375 | 0.5400 | 0.5525 | 0.5267 | 0.4454 | 0.5299 | 0.6840 | 0.4368 | 0.4428 | 0.6855 | 0.4461 | 0.4530 | 0.5108 | 14.9  |
| 峰 11    | 0.3724 | 0.3123 | 0.3208 | 0.4186 | 0.4232 | 0.3648 | 0.2772 | 0.3295 | 0.4153 | 0.3279 | 0.0932 | 0.4289 | 0.3125 | 0.3681 | 0.2687 | 25.3  |
| 峰 12    | 0.4712 | 0.2967 | 0.2824 | 0.2247 | 0.2396 | 0.2383 | 0.1806 | 0.2392 | 0.3697 | 0.1836 | 0.2504 | 0.4227 | 0.2082 | 0.1782 | 0.5255 | 38.2  |
| 峰 13    | 0.2096 | 0.2016 | 0.2071 | 0.1185 | 0.1243 | 0.1496 | 0.1052 | 0.1034 | 0.0982 | 0.1058 | 0.1726 | 0.1010 | 0.1600 | 0.0752 | 0.1401 | 31.5  |
| 峰 14    | 1.0221 | 1.6634 | 1.7719 | 1.5700 | 1.6382 | 1.6081 | 1.4344 | 1.7012 | 1.3919 | 1.3984 | 1.5168 | 1.4337 | 1.3932 | 1.2277 | 2.1985 | 17.4  |
| 峰 15    | 1.7918 | 1.4249 | 1.5007 | 1.2973 | 1.4662 | 1.4237 | 1.1808 | 1.3398 | 1.7635 | 1.1523 | 1.1849 | 1.7867 | 1.3094 | 1.1454 | 2.4386 | 23.4  |
| 峰 16    | 0.2003 | 0.2280 | 0.2470 | 0.2439 | 0.2568 | 0.2336 | 0.2714 | 0.2121 | 0.1916 | 0.2614 | 0.3205 | 0.1532 | 0.2328 | 0.1567 | 0.3016 | 20.1  |
| 峰 17    | 0.5143 | 0.9157 | 0.9713 | 0.9580 | 1.0207 | 0.9519 | 0.9760 | 1.0030 | 0.7661 | 0.9394 | 1.0022 | 0.7736 | 0.9108 | 0.8040 | 1.1052 | 15.8  |
| 峰 18    | 2.2333 | 1.6439 | 1.6958 | 1.5820 | 1.6713 | 1.6338 | 1.8141 | 1.6772 | 1.6045 | 1.5789 | 1.7486 | 1.5693 | 1.6447 | 1.5147 | 1.4308 | 10.9  |
| 峰 19    | 0.8015 | 1.0171 | 1.0810 | 1.0949 | 1.1786 | 1.0794 | 1.2100 | 1.1083 | 0.9266 | 1.1602 | 1.2359 | 0.9324 | 1.2289 | 1.0811 | 0.6121 | 16.4  |
| 峰 20    | 0.8510 | 0.7526 | 0.7588 | 0.8010 | 0.8620 | 0.7959 | 0.8063 | 0.9310 | 0.8421 | 0.7893 | 0.8058 | 0.8175 | 0.8613 | 0.8813 | 0.9145 | 6.3   |

线性范围, 结果见表 4。

**2.7.4 精密度考察** 取混合对照品溶液, 用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 连续进样 6 次, 测定各成分的峰面积。结果原儿茶酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、刺芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素峰面积的 RSD 分别为 1.1%、1.4%、0.78%、0.85%、0.95%, 表明仪器精密度良好。

**2.7.5 稳定性考察** 取同一供试品溶液 (S1), 按

“2.7.2” 项下色谱条件, 于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定, 结果原儿茶酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、刺芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素峰面积的 RSD 依次为 1.5%、1.4%、2.3%、1.6%、2.0%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.7.6 重复性考察** 精密称取同一批样品 (S1) 6 份, 按 “2.1” 项下方法平行制备供试品溶液, 再按 “2.7.2” 项下色谱条件测定, 测得原儿茶酸、毛蕊



表 3 15 批复方扶芳藤胶囊 HPLC 图谱的相似度  
Tab 3 Similarity of HPLC chromatograms of 15 batches of Fufangteng capsules

|        | S1    | S2    | S3    | S4    | S5    | S6    | S7    | S8    | S9    | S10   | S11   | S12   | S13   | S14   | S15   | 对照指<br>纹图谱 |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------|
| S1     | 1.000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |            |
| S2     | 0.960 | 1.000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |            |
| S3     | 0.958 | 0.986 | 1.000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |            |
| S4     | 0.937 | 0.990 | 0.990 | 1.000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |            |
| S5     | 0.939 | 0.989 | 0.989 | 0.999 | 1.000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |            |
| S6     | 0.951 | 0.997 | 0.996 | 0.997 | 0.998 | 1.000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |            |
| S7     | 0.944 | 0.987 | 0.986 | 0.992 | 0.991 | 0.992 | 1.000 |       |       |       |       |       |       |       |       |            |
| S8     | 0.945 | 0.994 | 0.994 | 0.997 | 0.997 | 0.998 | 0.991 | 1.000 |       |       |       |       |       |       |       |            |
| S9     | 0.960 | 0.975 | 0.973 | 0.973 | 0.972 | 0.977 | 0.961 | 0.974 | 1.000 |       |       |       |       |       |       |            |
| S10    | 0.942 | 0.990 | 0.989 | 0.994 | 0.992 | 0.994 | 0.998 | 0.992 | 0.967 | 1.000 |       |       |       |       |       |            |
| S11    | 0.944 | 0.990 | 0.990 | 0.994 | 0.992 | 0.994 | 0.999 | 0.993 | 0.962 | 0.999 | 1.000 |       |       |       |       |            |
| S12    | 0.944 | 0.993 | 0.992 | 0.995 | 0.995 | 0.997 | 0.989 | 0.999 | 0.970 | 0.991 | 0.992 | 1.000 |       |       |       |            |
| S13    | 0.962 | 0.981 | 0.979 | 0.976 | 0.974 | 0.981 | 0.962 | 0.977 | 0.999 | 0.969 | 0.965 | 0.974 | 1.000 |       |       |            |
| S14    | 0.953 | 0.991 | 0.991 | 0.985 | 0.986 | 0.990 | 0.987 | 0.990 | 0.959 | 0.987 | 0.990 | 0.990 | 0.965 | 1.000 |       |            |
| S15    | 0.960 | 0.991 | 0.990 | 0.987 | 0.986 | 0.991 | 0.989 | 0.991 | 0.966 | 0.991 | 0.992 | 0.993 | 0.971 | 0.997 | 1.000 |            |
| 对照指纹图谱 | 0.962 | 0.997 | 0.996 | 0.995 | 0.995 | 0.999 | 0.993 | 0.997 | 0.981 | 0.995 | 0.995 | 0.996 | 0.984 | 0.993 | 0.995 | 1.000      |

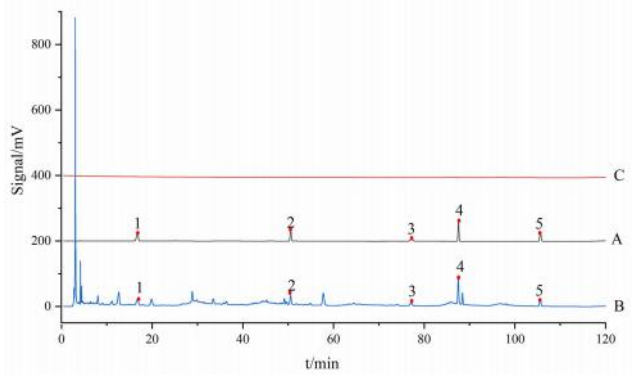


图 3 混合对照品溶液 (A)、复方扶芳藤胶囊样品溶液 (B) 及空白对照溶液 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms of mixed reference solution (A), compound Fufangteng capsule solution (B) and blank control (C)

1. 原儿茶酸 (protocatechuic acid); 2. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (calycosin-7-glucoside); 3. 刺芒柄花苷 (ononin); 4. 毛蕊异黄酮 (calycosin); 5. 芒柄花黄素 (formononetin)

表 4 复方扶芳藤胶囊中 5 个主要成分线性关系考察结果  
Tab 4 Linearity of 5 main components in compound Fufangteng capsules

| 成分            | 回归方程                                 | $R^2$  | 线性范围 /<br>( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) |
|---------------|--------------------------------------|--------|------------------------------------------------|
| 原儿茶酸          | $Y = 4.1149 \times 10^4 X - 2.3870$  | 0.9992 | 0.0072 ~ 0.0359                                |
| 毛蕊异黄酮<br>葡萄糖苷 | $Y = 2.7134 \times 10^4 X - 0.5781$  | 0.9994 | 0.0027 ~ 0.0449                                |
| 刺芒柄花苷         | $Y = 2.9605 \times 10^4 X + 14.0030$ | 0.9996 | 0.0035 ~ 0.0281                                |
| 毛蕊异黄酮         | $Y = 5.1970 \times 10^4 X - 25.7380$ | 0.9991 | 0.0037 ~ 0.0402                                |
| 芒柄花黄素         | $Y = 6.1726 \times 10^4 X + 7.1802$  | 0.9991 | 0.0019 ~ 0.0296                                |

异黄酮葡萄糖苷、刺芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素峰面积的  $RSD$  依次为 1.1%、1.8%、1.6%、1.6%、1.6%，表明该方法的重复性良好。

2.7.7 加样回收试验 取含量已知的复方扶芳藤

胶囊 (S1) 样品，精密称取 1.0 g，共 9 份，分别置于 50 mL 具塞锥形瓶中，按照样品已知含量 80%、100%、120% 的水平加入单一对照品储备液 (各 3 份)，按照“2.1”项下方法制备供试品溶液，再按“2.7.2”项下色谱条件测定，计算回收率，结果复方扶芳藤胶囊中原儿茶酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、刺芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素的回收率分别在 97.00% ~ 99.92%、97.11% ~ 102.74%、97.45% ~ 102.58%、95.91% ~ 103.84%、96.16% ~ 103.47%， $RSD$  分别为 0.99%、2.2%、1.8%、2.8%、2.6%，表明该方法的准确性良好。

2.7.8 样品含量测定 取复方扶芳藤胶囊样品 15 批，每批次平行称取 2 份，分别按照“2.1”项下方法制备供试品溶液，再按“2.7.2”项下色谱条件测定，分别代入标准曲线计算其含量 (见表 5)。

### 3 讨论与结论

#### 3.1 提取条件选择

超声提取方法操作简单快速<sup>[12-13]</sup>，试验供试品溶液的制备采用超声提取技术，考察了超声提取时间 (15、30、45 min) 对 HPLC 指纹图谱及含量测定的影响<sup>[14-15]</sup>，结果显示，超声提取 30 min 和 45 min 指纹图谱无明显差异，为节省时间，选择超声 30 min。相关处方药材指纹图谱研究中，处方中药材提取常用溶剂包括甲醇、甲醇-水和乙醇等<sup>[16-19]</sup>，本试验考察了不同浓度甲醇 (50%、85% 和 100%) 和乙醇 (50%、85% 和 100%) 对复方扶芳藤胶囊样品提取的影响，结果显示，使用 100% 甲醇提取的色谱峰出峰数最多，故提取溶剂选定 100% 甲醇。此外本试验考察了提取次

表 5 15 批复方扶芳藤胶囊 5 个成分含量 ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )

Tab 5 Contents of 5 components in 15 batches of Fufangteng capsules ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )

| 批次  | 原儿   | 毛蕊异黄酮 | 刺芒柄  | 毛蕊异  | 芒柄   |
|-----|------|-------|------|------|------|
|     | 茶酸   | 葡萄糖苷  | 花苷   | 黄酮   | 花素   |
| S1  | 0.28 | 0.17  | 0.11 | 0.37 | 0.11 |
| S2  | 0.36 | 0.39  | 0.18 | 0.57 | 0.18 |
| S3  | 0.38 | 0.70  | 0.35 | 0.44 | 0.17 |
| S4  | 0.24 | 0.47  | 0.23 | 0.26 | 0.11 |
| S5  | 0.44 | 0.76  | 0.42 | 0.46 | 0.22 |
| S6  | 0.28 | 0.50  | 0.27 | 0.32 | 0.14 |
| S7  | 0.27 | 0.46  | 0.27 | 0.29 | 0.13 |
| S8  | 0.26 | 0.52  | 0.28 | 0.29 | 0.15 |
| S9  | 0.23 | 0.37  | 0.18 | 0.27 | 0.12 |
| S10 | 0.41 | 0.68  | 0.39 | 0.50 | 0.19 |
| S11 | 0.41 | 0.79  | 0.40 | 0.48 | 0.23 |
| S12 | 0.38 | 0.62  | 0.29 | 0.45 | 0.19 |
| S13 | 0.24 | 0.37  | 0.24 | 0.30 | 0.13 |
| S14 | 0.39 | 0.55  | 0.32 | 0.45 | 0.21 |
| S15 | 0.24 | 0.62  | 0.27 | 0.24 | 0.13 |

数 (1、2、3 次) 及提取溶剂加入量 (15、25、35 mL) 对复方扶芳藤胶囊样品提取率的影响, 结果显示, 提取 1 次和提取 3 次, 加入 25 mL 和 35 mL 的甲醇, 对样品提取率无明显差异, 因此选择 25 mL 甲醇提取 1 次。

### 3.2 流动相系统选择

本试验考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.2% 冰乙酸、甲醇-0.2% 冰乙酸、甲醇-0.2% 磷酸、乙腈-0.2% 磷酸, 发现乙腈的洗脱力优于甲醇, 将乙腈作为流动相, 能够得到丰富的色谱峰数据并提高峰面积, 且具有缩短色谱峰出峰时间的效果, 通过调节流动相的酸度, 有效避免拖尾现象<sup>[20-21]</sup>, 结果显示乙腈-0.2% 磷酸进行梯度洗脱, 所得谱图基线平稳, 各成分与相邻色谱峰完全分离, 峰形、对称因子最佳, 故以其为流动相。

### 3.3 小结

综上, 本研究建立的复方扶芳藤胶囊 HPLC 指纹图谱及同时测定 5 种成分含量的方法, 操作简单, 重复性好, 稳定可靠, 可为复方扶芳藤胶囊的质量控制提供参考。

## 参考文献

[1] 何天富, 陈洪涛, 陈晓艺, 等. 壮药复方扶芳藤合剂技术提升及再评价研究进展[J]. 中国当代医药, 2021, 28 (18): 30-35.  
 [2] 郭国栋, 郭叶, 李刚, 等. 一测多评法同时测定蒙药古日古木-13 丸中 6 种成分[J]. 中草药, 2020, 51 (6): 1542-1547.  
 [3] 王欣, 覃瑶, 王德江, 等. 一测多评法在中药质量控制中的应用进展[J]. 中成药, 2016, 38 (2): 395-402.  
 [4] 高喜梅, 池玉梅, 张雯, 等. 指纹图谱结合一测多评法

评价酸橙枳实质量的研究[J]. 中草药, 2020, 51 (9): 2548-2556.  
 [5] 王京辉, 于密密, 陈晶, 等. 七叶神安滴丸 UPLC 指纹图谱和一测多评含量测定方法研究[J]. 药物分析杂志, 2024, 44 (3): 386-394.  
 [6] 甄丹丹, 黄耀斌, 卢显兴, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 和网络药理学探讨丝穗金粟兰水提物抗炎镇痛药效物质及作用机制[J]. 中草药, 2023, 54 (12): 3903-3910.  
 [7] Jian J, Sun LJ, Cheng X, et al. Calycosin-7-*O*- $\beta$ -d-glucopyranoside stimulates osteoblast differentiation through regulating the BMP/WNT signaling pathways[J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2015, 5 (5): 454-460.  
 [8] Chen X, Zhang M, Ahmed M, et al. Neuroprotective effects of ononin against the aluminium chloride-induced Alzheimer's disease in rats[J]. Saudi J Biol Sci, 28 (8): 4232-4239.  
 [9] Gong GW, Zheng YZ, Kong XP, et al. Anti-angiogenesis function of ononin via suppressing the MEK/Erk signaling pathway[J]. J Nat Prod, 84 (6): 1755-1762.  
 [10] 聂佳, 郭勇英, 于向艳, 等. 毛蕊异黄酮调节 SIRT3/SOD2 信号通路对小鼠气道上皮细胞损伤的改善作用[J]. 天津医药, 2024, 52 (11): 1171-1176.  
 [11] Musa I, Wang ZZ, Yang N, et al. Formononetin inhibits IgE by huPlasma/PBMCs and mast cells/basophil activation via JAK/STAT/PI3-Akt pathways[J]. Front Immunol, 2024, 15: 1427563.  
 [12] 梁石芳, 邵智燊, 黄宝珠, 等. 清肺止咳散 HPLC 指纹图谱和多成分含量的测定[J]. 中国兽医杂志, 2024, 60 (10): 127-135.  
 [13] 王磊, 吴越, 田冬. 超声提取-高效液相色谱法测定化妆品中 5 种苯并三唑类紫外线吸收剂[J]. 日用化学工业, 2023, 53 (1): 109-114.  
 [14] 胡怀明, 杨洋, 黄良永. 麻黄宣肺止咳糖浆指纹图谱研究[J]. 中国药师, 2017, 20 (12): 2127-2130.  
 [15] 倪文琳, 汤瑜晨, 韩玉涛, 等. 基于液相指纹图谱结合多成分含量测定的小儿肺热咳嗽颗粒质量评价[J]. 中南药学, 2023, 21 (1): 203-207.  
 [16] 宋兴发, 周军, 郭守城. 杏仁止咳合剂 HPLC 指纹图谱及 7 种成分的含量测定[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37 (1): 50-56.  
 [17] 包小红, 杨超, 刘繁红, 等. HPLC 指纹图谱评价复方桔梗止咳片的质量[J]. 华西药学杂志, 2019, 34 (4): 401-404.  
 [18] 仲锡铜, 耿晖, 曹艳花. 杏苏止咳颗粒 HPLC 指纹图谱及 7 种成分含量的研究[J]. 中国药师, 2020, 23 (10): 1935-1940.  
 [19] 唐冰雯. 小儿清肺止咳片的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 海峡药学, 2021, 33 (11): 66-68.  
 [20] 罗佳, 黄圆圆, 周欣, 等. 乙型肝炎颗粒高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31 (9): 1104-1109.  
 [21] 郑利伟. 双波长 HPLC 法同时测定小儿清肺止咳片中梔子苷和黄芩苷的含量[J]. 中国医药导刊, 2019, 21 (6): 365-368.

(收稿日期: 2024-12-02; 修回日期: 2025-01-04)

# 基于转录组学技术探究对羟基苯甲醇对斑马鱼胚胎生长发育的影响及作用机制

朱澳华<sup>1</sup>, 王平<sup>2, 4</sup>, 夏婧<sup>2, 4</sup>, 刘勇杰<sup>1</sup>, 咎俊峰<sup>1</sup>, 刘军锋<sup>1, 3, 4\*</sup> (1. 湖北中医药大学药学院, 武汉 430065; 2. 湖北中医药大学老年医学研究所, 武汉 430065; 3. 湖北中医药大学中药资源与中药复方教育部重点实验室, 武汉 430065; 4. 湖北时珍实验室, 武汉 430065)

**摘要:** **目的** 利用转录组学探究对羟基苯甲醇对斑马鱼胚胎生长发育的影响及潜在作用机制。**方法** 将 6 hpf 的斑马鱼胚胎在不同质量浓度的对羟基苯甲醇 ( $0 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 中暴露 120 h, 分别记录胚胎的死亡率、孵化率、畸形率 (包括心包水肿和卵黄囊水肿)、体长和心率; 用吖啶橙染色观察仔鱼细胞凋亡情况; 油红 O 染色观察斑马鱼仔鱼脂质积累情况; 进一步利用转录组学技术测序, 筛选差异表达基因并进行信号通路富集分析。**结果** 与对照组比较, 对羟基苯甲醇导致胚胎死亡率增加, 心率下降, 孵化率下降 ( $P$  均  $< 0.05$ ); 畸形率 (心包水肿率、卵黄囊水肿率) 增加, 体长有明显缩短的趋势且呈浓度依赖性 ( $P$  均  $< 0.05$ ); 对羟基苯甲醇诱导仔鱼心脏细胞凋亡, 增加斑马鱼卵黄中的脂质积累, 使血管间隙中染色颜色较浅, 造成了脂质代谢异常; 转录组学结果表明, 对羟基苯甲醇暴露导致的差异表达基因有 5434 个, KEGG 显著富集到的信号通路包括嘌呤代谢、FOXO 信号通路、嘧啶代谢、光传导、核苷酸代谢、范科尼贫血途径、药物代谢-其他酶等。**结论** 对羟基苯甲醇暴露会引起斑马鱼胚胎生长发育异常, 并且可能与抑制光传导和代谢相关通路, 以及抑制 *ugt1b5*、*ugt5b4*、*ugt5b2*、*ugt1a1*、*opn1mw1*、*opn1mw2*、*gnbla*、*gnat1* 基因的表达有关。

**关键词:** 对羟基苯甲醇; 斑马鱼胚胎; 生长发育; 转录组学

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)06-1704-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.031

## Effect and mechanism of *p*-hydroxybenzyl alcohol on the growth and development of zebrafish embryos by transcriptomics

ZHU Ao-hua<sup>1</sup>, WANG Ping<sup>2, 4</sup>, XIA Jing<sup>2, 4</sup>, LIU Yong-jie<sup>1</sup>, ZAN Jun-feng<sup>1</sup>, LIU Jun-feng<sup>1, 3, 4\*</sup> (1. School of Pharmacy, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430065; 2. Institute of Gerontology, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065; 3. Key Laboratory of TCM Resources and Compounds of Education Commission, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065; 4. Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430065)

**Abstract:** **Objective** To determine the effect of *p*-hydroxybenzyl alcohol on the embryonic development in zebrafish and its underlying mechanism by transcriptomics. **Methods** Zebrafish embryos at 6 hpf were exposed to varying concentrations of *p*-hydroxybenzyl alcohol ( $0 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) for 120 h. The embryo mortality, hatching rate, malformation rates (including pericardial edema and yolk sac edema), body length, and heart rate were recorded. Acridine orange staining was used to observe the larval apoptosis, while oil red O staining assessed the lipid accumulation; transcriptomic sequencing was conducted to identify differentially expressed genes for signaling pathway enrichment analysis. **Results** *p*-hydroxybenzyl alcohol increased the embryo mortality and the heart rate decreased, the hatching rate, with significant difference (all  $P < 0.05$ ). The rates of pericardial edema and yolk sac edema increased

**基金项目:** 湖北省自然科学基金-中医药创新发展联合基金资助项目 (No.2024AFD285)。

**作者简介:** 朱澳华, 女, 硕士研究生, 主要从事中药资源与开发方面的研究, email: 2930793667@qq.com \* **通信作者:** 刘军锋, 男, 副教授, 主要从事中药物质基础及作用机制方面的研究, email: 1105787683@qq.com



markedly, and a notable decrease in body length was found in a concentration-dependent manner (all  $P < 0.05$ ). More over, *p*-hydroxybenzyl alcohol induced apoptosis in larval heart cells; increased lipid accumulation in zebrafish yolk, and lighter vascular space staining, indicated disrupted lipid metabolism; transcriptomic analysis revealed 5434 differentially expressed genes after *p*-hydroxybenzyl alcohol exposure, and the most significantly differentially expressed pathways included normal substance metabolism-related pathways led by nucleic acid metabolism and phototransduction pathway.

**Conclusion** *p*-hydroxybenzyl alcohol exposure may induce developmental abnormalities in zebrafish embryos, which is potentially associated with the inhibition of phototransduction/metabolic pathways and suppression of *ugt1b5*, *ugt5b4*, *ugt5b2*, *ugt1a1*, *opn1mw1*, *opn1mw2*, *gnb1a*, and *gnat1l*.

**Key words:** *p*-hydroxybenzyl alcohol; zebrafish embryo; development and growth; transcriptomics

对羟基苯甲醇是一种重要的有机化合物,广泛存在于各类环境介质中,其作为合成香料、医药中间体以及防腐剂等关键原料,使用量逐年递增<sup>[1]</sup>。部分农药及植物生长调节剂的合成也离不开对羟基苯甲醇,在化妆品、食品添加剂等日常生活用品中,也能发现它的踪迹<sup>[2]</sup>。文献研究表明,对羟基苯甲醇等酚类物质通过降低黑色素含量和抑制黑色素生成相关蛋白的表达减少了 B16F10 黑色素瘤细胞和斑马鱼黑色素的合成,从而影响斑马鱼的正常生长发育<sup>[3]</sup>。目前,其对生态毒性尤其是对生物胚胎生长发育影响的研究相对匮乏。斑马鱼已成为药物研究领域非常突出的脊椎动物模型,82% 的人类致病蛋白在斑马鱼中具有明显的同源性。斑马鱼繁殖快,生命周期短,胚胎全身透明,可在显微镜下观察其体内各器官的生长发育情况。研究发现斑马鱼的肝毒性、肾毒性、心脏毒性、神经毒性以及生殖毒性都与人类高度相似<sup>[4-6]</sup>。这些特点使得斑马鱼模型在药物毒理学研究中展现出独特的优势<sup>[7]</sup>。本研究旨在利用斑马鱼胚胎模型,通过观察胚胎在不同浓度对羟基苯甲醇暴露下的死亡率、畸形率等指标,评价对羟基苯甲醇对斑马鱼胚胎生长发育的影响,并利用转录组学分析其机制,以期为其安全性评价和环境风险评估提供科学支撑。

## 1 材料

### 1.1 动物

实验用斑马鱼为野生型 AB 品系,成鱼购自国家斑马鱼资源中心(湖北武汉)。选择 6~12 月龄的健康成熟斑马鱼,按照雌雄比例 2:1 置于栅格内胆的透明孵化盒中,在孵化盒中部用透明隔板将雌鱼与雄鱼隔开,将孵化盒放入恒温培养箱,使斑马鱼处于黑暗环境中。第 2 日上午 8 时撤掉隔板,使斑马鱼完成受精,收集并清洗受精

胚胎,置于培养箱中,温度为  $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,光/暗周期为 14 h/10 h。

### 1.2 试药

对羟基苯甲醇[纯度:98%,安耐吉(上海)医药化学有限公司,批号:623-05-2];无水乙醇、羧甲基纤维素钠(国药集团化学试剂有限公司);三卡因麻醉剂(北京迈瑞达科技有限公司,批号:M040903);异丙醇(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:I112011);4%多聚甲醛(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号:G1101);磷酸盐缓冲液(PBS)[柯尔柏医药科技(上海)有限公司,批号:PM5090];油红 O(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:0104972);吖啶橙[AO,博世(中国)投资有限公司,批号:Y0306];倒置荧光显微镜(IX51,日本 Olympus);十万级电子天平(AB135-S,瑞士梅特勒托利多仪器公司);桂光体视显微镜(XTL-400,深圳市润兴光学仪器有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 斑马鱼胚胎毒性实验

随机挑选 6 hpf 发育正常、大小相近的胚胎进行暴露实验,选择对羟基苯甲醇的暴露质量浓度为 0、0.06、0.12、0.18、0.24、0.30、0.36、0.5  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。根据《鱼类胚胎急性毒性测试(OECD TG236)》方法进行暴露实验,暴露 120 h。每孔放入 15 枚胚胎,每个浓度平行 3 份,暴露液每 24 h 更换一次,及时挑出死亡个体以防止对其他胚胎造成污染。胚胎暴露至 48 h 开始陆续孵化,分别于 96、120 h 观察并统计仔鱼孵化率、心率;120 h 观察并统计畸形情况;24、48、72、96、120 h 观察并记录胚胎的死亡数量<sup>[8]</sup>。畸形主要指心包水肿、卵黄囊水肿,胚胎出膜并能游动视为已孵化,肉眼观察胚胎变白或者显微镜下观察胚胎絮状凝结、心脏不跳动即判定死亡。将给药后仔鱼用胚胎水清洗 3 次,加入 0.05% 三卡

因溶液后转移至含有 3% 羧甲基纤维素钠水溶液的培养皿中, 在体视显微镜下拍照, 用 Image J 软件分析仔鱼的发育体长<sup>[9]</sup>, 以 mm 为单位。

死亡率 (%) = 死亡胚胎数 / 总胚胎数 × 100%;  
孵化率 (%) = 已孵化胚胎数 / 总胚胎数 × 100%;  
畸形率 (%) = 畸形胚胎数 / 存活胚胎数 × 100%。

## 2.2 AO 染色检测对羟基苯甲醇对斑马鱼细胞凋亡的影响

AO 是一种常用荧光染料<sup>[10]</sup>, 可透过细胞膜与核酸结合, 检测凋亡细胞, 使其显示绿色荧光。胚胎培养 120 h 后, 每个浓度组随机挑选 6 条仔鱼, 用 PBS 缓冲液清洗 3 遍。向每孔中加入 AO 溶液, 使其终质量浓度为  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 在  $28^\circ\text{C}$  避光孵育 30 min 后, 于倒置荧光显微镜下选择激发光波长拍照, 观察并统计绿色荧光细胞数目, 分析细胞凋亡情况。

## 2.3 油红 O 染色检测对羟基苯甲醇对斑马鱼脂沉积的影响

暴露 120 h 后, 每个浓度组随机挑选 6 条仔鱼, 三卡因麻醉后, 用 4% 组织固定液固定过夜。用 PBS 缓冲液清洗, 60% 异丙醇溶液中脱水 30 min。用 0.3% 油红 O 染液避光染色 3 h, 再次脱水、清洗。在显微镜下采集区域图像, 使用 Image J 软件对染色斑马鱼进行光密度计算<sup>[11]</sup>。

## 2.4 RNA-seq 法检测对羟基苯甲醇对斑马鱼发育相关通路 mRNA 表达情况的影响

取 6 hpf 野生型仔鱼, 置于含有  $0.18 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的对羟基苯甲醇药液中, 给药 120 h 后收集各组仔鱼。总 RNA 提取、样品质量检测、RNA-seq 测序和分析均由上海吉凯基因医学科技股份有限公司完成。差异基因 (DEGs) 显著性差异定义为  $\text{foldchange} \geq 1$ 。KEGG 富集分析的显著性阈值为  $P < 0.05$ 。

## 2.5 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差 (One-way ANOVA) 统计分析, 实验均独立重复 3 次及以上, 数据用平均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 呈现。使用 GraphPad Prism 绘制图表。

## 3 结果

### 3.1 对羟基苯甲醇暴露对斑马鱼死亡率及孵化率的影响

在 24 ~ 72 hpf,  $0 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  质量浓度组斑马鱼胚胎死亡率无明显变化。与对照组相比, 在暴露至 96 hpf,  $0.36 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  质量浓度组斑马鱼胚胎死亡率分别升高至 17.78%、20.00%; 在暴露至 120 hpf 时,  $0.36 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  质量浓度组斑马鱼胚胎死亡率分

别升高至 20.00% 和 86.67% (见图 1)。由图 2 可知, 随着药物浓度的增大, 斑马鱼孵化率降低,  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  质量浓度组斑马鱼孵化率在暴露至 96 hpf 时降低至 64.44%, 在暴露至 120 hpf 时降低至 73.33% (见图 2)。可见对羟基苯甲醇造成了斑马鱼胚胎孵化延迟及胚胎死亡率增加的情况。

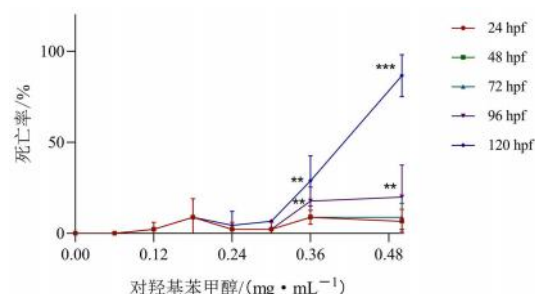


图 1 对羟基苯甲醇暴露对斑马鱼死亡率的影响 ( $n = 3$ )

Fig 1 Effect of *p*-hydroxybenzyl alcohol exposure on the mortality of zebrafish ( $n = 3$ )

注: 与对照组 ( $0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 相比,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ 。

Note: Compared with the control group ( $0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ .

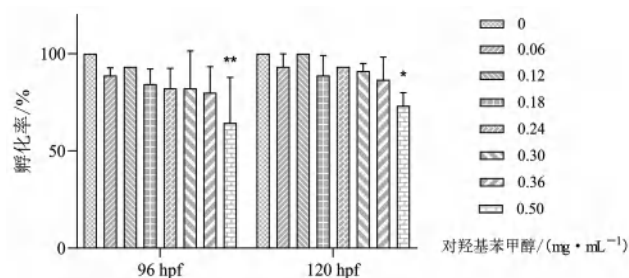


图 2 对羟基苯甲醇暴露对斑马鱼孵化率的影响 ( $n = 3$ )

Fig 2 Effect of *p*-hydroxybenzyl alcohol exposure on the hatchability of zebrafish ( $n = 3$ )

注: 与对照组 ( $0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 相比,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group ( $0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ .

### 3.2 对羟基苯甲醇暴露对斑马鱼卵黄囊水肿、心包水肿及心率的影响

暴露 120 h 时, 不同质量浓度对羟基苯甲醇暴露下仔鱼的形态变化见图 3。与对照组相比, 随着暴露浓度增大, 仔鱼卵黄囊水肿率显著增加、心包水肿率显著增加; 96 hpf 和 120 hpf 时, 随着对羟基苯甲醇浓度的增加, 仔鱼心率显著降低 (见图 4)。结果表明对羟基苯甲醇导致了斑马鱼畸形、使其心率下降, 引起斑马鱼发育异常。

### 3.3 对羟基苯甲醇暴露对斑马鱼体长的影响

暴露 120 h 时, 暴露在不同质量浓度对羟基苯甲醇仔鱼体长有明显缩短趋势, 且具有浓度依赖性 (见图 5)。推测对羟基苯甲醇抑制了斑马鱼的正常生长。

### 3.4 AO 染色



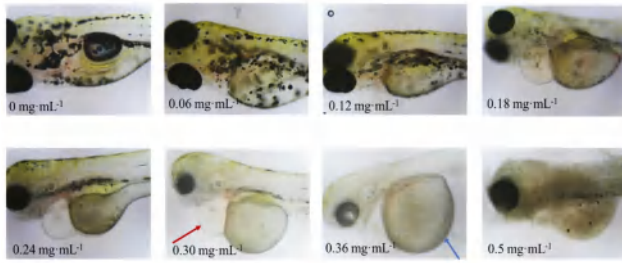


图 3 对羟基苯甲醇暴露对斑马鱼发育形态的影响  
Fig 3 Effect of *p*-hydroxybenzyl alcohol exposure on the development and morphology of zebrafish

注：红色箭头代表心包水肿，蓝色箭头代表卵黄囊水肿。

Note: The red arrow indicates pericardial edema, while the blue arrow denotes yolk sac edema.

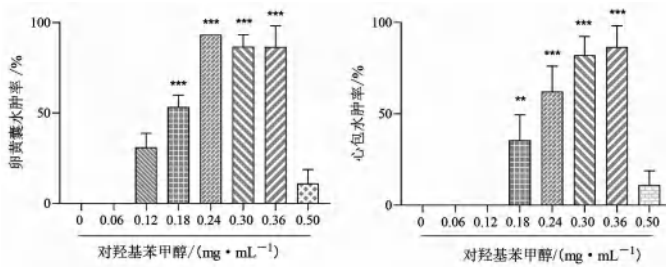


图 4 对羟基苯甲醇对斑马鱼生长发育的影响  
Fig 4 Effect of *p*-hydroxybenzyl alcohol exposure on the growth and development of zebrafish

注：与对照组 ( $0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 相比， $*P < 0.05$ ， $**P < 0.01$ ， $***P < 0.001$ 。

Note: Compared with the control group ( $0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ .

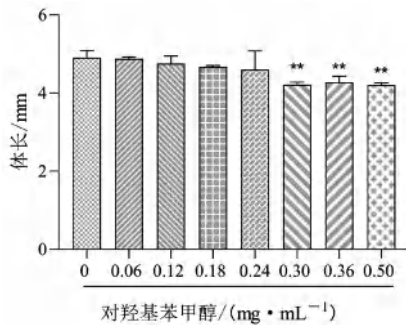


图 5 对羟基苯甲醇暴露对斑马鱼体长的影响 ( $n = 3$ )  
Fig 5 Effect of *p*-hydroxybenzyl alcohol exposure on the body length of zebrafish ( $n = 3$ )

注：与对照组 ( $0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 相比， $**P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group ( $0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),  $**P < 0.01$ .

### 3.6 DEGs 分析

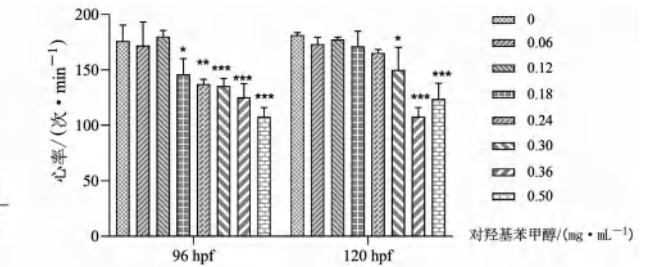
与对照组相比，对羟基苯甲醇浓度组中的 DEGs 数量见图 8，共发现 5434 个 DEGs，其中有 2248 个上调基因，3186 个下调基因，说明对羟基苯甲醇对斑马鱼的转录有显著影响，并提示对羟基苯甲醇可能通过影响基因表达而降低生物体内的代谢活动及其所需的生物分子从而发挥毒性效应。

### 3.7 DEGs 的 GO 富集分析

对照组仔鱼心脏区域未出现黄绿色亮点，而不同浓度对羟基苯甲醇的仔鱼心脏区域均可见致密的黄绿色亮点。随着暴露浓度增大，荧光强度有显著增强的趋势 (见图 6)，可见对羟基苯甲醇诱发了斑马鱼心脏细胞凋亡。

### 3.5 油红 O 染色

与对照组相比，不同浓度对羟基苯甲醇的仔鱼卵黄囊区域染色较深且在头部、间隙血管中表现出的染色颜色较浅，染色密度出现显著增强的趋势 (见图 7)。提示对羟基苯甲醇增加了斑马鱼卵黄中的脂质沉积，减少了躯干中脂质沉积，造成了脂质代谢异常。



将 DEGs 进行 GO 数据库功能注释和富集分析，DEGs 被注释到生物过程 (BP)、细胞组分 (CC) 和分子功能 (MF) 3 个条目中。富集前 30 条通路及显著性见图 9，在前 20 条显著富集的 GO 条目中，BP 富集到的通路主要是光刺激的感官知觉、视觉感知、神经系统过程等，而 CC 富集到的通路主要是细胞质核糖体、细胞质部分、细胞质小核糖体亚基等。MF 共富集到 10 条，这些通路主要参与核糖体的结构成分、眼球晶状体的结构成分、配体门控离子通道活性等，提示对羟基苯甲醇对斑马鱼细胞组成、视觉感知和神经系统过程方面均产生了严重的影响。

### 3.8 DEGs 的 KEGG 富集分析

在基因表达量差异最显著的前 15 条通路中 (见图 10)。有 5 条与代谢有关，主要包括核苷酸代谢、嘧啶代谢、硫代谢、嘌呤代谢、药物代谢 - 其他酶；1 条有机系统相关通路则是光传导；遗传信息处理相关通路包括核糖体、DNA 复制、范科尼贫血途径、同源重组、基底切除修复 5 种；2 条环境信息处理有关通路包括 FOXO 信号通路、ECM 受体相互作用；细胞过程有关通路包括细胞周期、铁死亡 2 种。富集到药物代谢 - 其他酶和光传导通路上的基因显著下调且包括 *ugt1b5*、



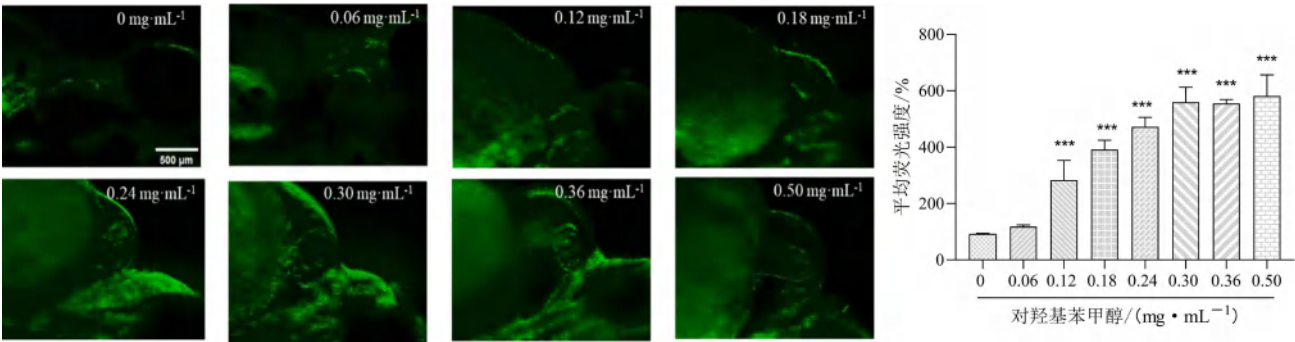


图 6 对羟基苯甲醇暴露对斑马鱼心脏部位荧光强度的影响 ( $n = 3$ )  
Fig 6 Effect of *p*-hydroxybenzyl alcohol exposure on the fluorescence intensity of zebrafish hearts ( $n = 3$ )

注：与对照组 ( $0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 相比， $***P < 0.001$ 。  
Note: Compared with the control group ( $0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),  $***P < 0.001$ .

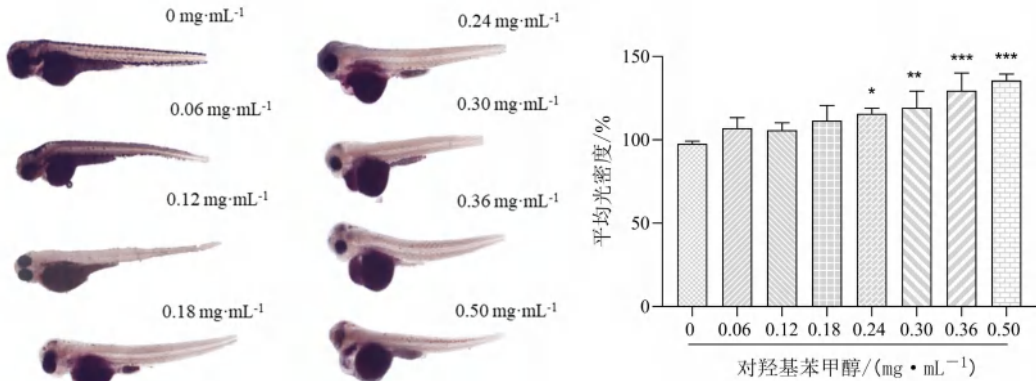


图 7 对羟基苯甲醇暴露对斑马鱼体内脂质沉积的影响 ( $n = 3$ )  
Fig 7 Effect of *p*-hydroxybenzyl alcohol exposure on the lipid deposition in zebrafish oil ( $n = 3$ )

注：与对照组 ( $0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 相比， $*P < 0.05$ ， $**P < 0.01$ ， $***P < 0.001$ 。  
Note: Compared with the control group ( $0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),  $*P < 0.05$ ， $**P < 0.01$ ， $***P < 0.001$ .

*ugt5b4*、*ugt5b2*、*ugt1a1*、*opn1mw1*、*opn1mw2*、*gnbla*、*gnat1* 等，具体的表达量信息见表 1。提示对羟基苯甲醇可能通过影响斑马鱼代谢功能、干扰眼睛的发育而引起生长异常。

表 1 对羟基苯甲醇对斑马鱼代谢、眼睛发育相关基因表达量的变化的影响 ( $n = 3$ )  
Tab 1 Effect of *p*-hydroxybenzyl alcohol on the expression of genes related to metabolism and eye development ( $n = 3$ )

| 基因名            | Log <sub>2</sub> foldchange | P 值                    |
|----------------|-----------------------------|------------------------|
| <i>ugt1b5</i>  | -2.90                       | $2.88 \times 10^{-9}$  |
| <i>ugt5b4</i>  | -1.67                       | $2.28 \times 10^{-5}$  |
| <i>ugt5b2</i>  | -2.44                       | 0.0003                 |
| <i>ugt1a1</i>  | -1.25                       | 0.0011                 |
| <i>opn1mw1</i> | -2.30                       | $1.71 \times 10^{-10}$ |
| <i>opn1mw2</i> | -2.11                       | $4.37 \times 10^{-11}$ |
| <i>gnbla</i>   | -1.72                       | $3.63 \times 10^{-13}$ |
| <i>gnat1</i>   | -2.20                       | $1.79 \times 10^{-11}$ |

4 讨论

在鱼类早期胚胎发育过程中，体内的组织器官正在逐步形成和完善，因而对水环境的变化通

常比成鱼阶段更加敏感<sup>[12-13]</sup>。孵化率是评估化学物质对鱼类影响的一个重要毒理学终点<sup>[14]</sup>。本实验中，高质量浓度 ( $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的对羟基苯甲醇会导致斑马鱼胚胎发育期孵化率延迟，而其他质量浓度组对胚胎的孵化率无明显变化。这可能是因为胚胎孵化前，胚胎膜能够限制低质量浓度药物通过，对胚胎具有屏障和保护作用。各质量浓度组斑马鱼的死亡数明显增多，这可能是因为斑马鱼缺少外部胚胎膜保护，各种解毒器官还未发育完全，防御外界干扰能力弱，更容易遭受外界污染物的影响<sup>[15]</sup>。斑马鱼胚胎发育过程中，心脏是第一个发育并发挥功能的器官<sup>[16]</sup>，心率是衡量心脏功能的重要指标之一，也可以在一定程度上反映鱼类心脏在外源物质胁迫下的发育情况<sup>[17]</sup>。在本研究中，药物暴露使斑马鱼心率降低，证明对羟基苯甲醇干扰了仔鱼心脏的正常发育，与 Manjunatha 等<sup>[18]</sup>用苯甲醇 (BnOH) 暴露导致斑马鱼胚胎发育器官缺陷、死亡、孵化延迟、心率降低和细胞凋亡的结果类似。本研究还发

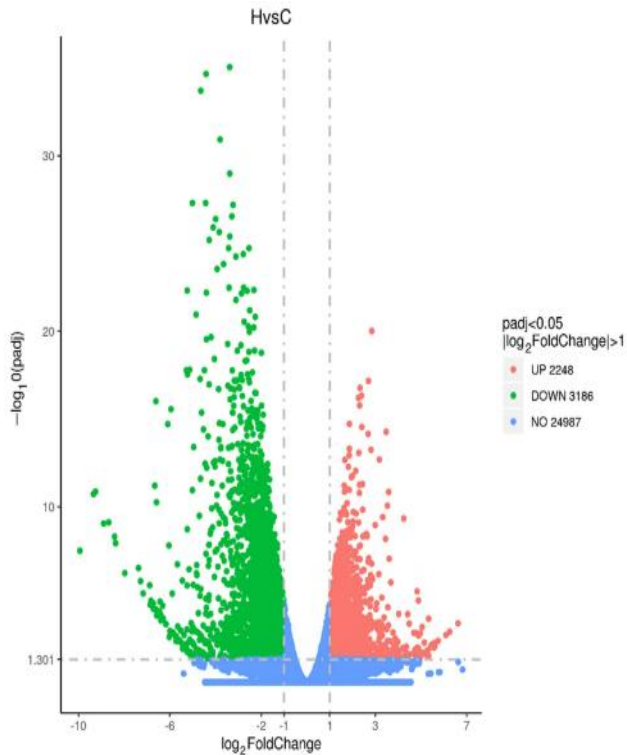


图 8 对羟基苯甲醇暴露 120 h 后斑马鱼 DEGs 火山图  
Fig 8 Volcano plot illustrating the differentially expressed genes in zebrafish exposed to *p*-hydroxybenzyl alcohol over 120 hours  
注：蓝色的虚线表示差异基因筛选标准的阈值线。

Note: The dashed blue line indicates the threshold for differential gene screening criteria.

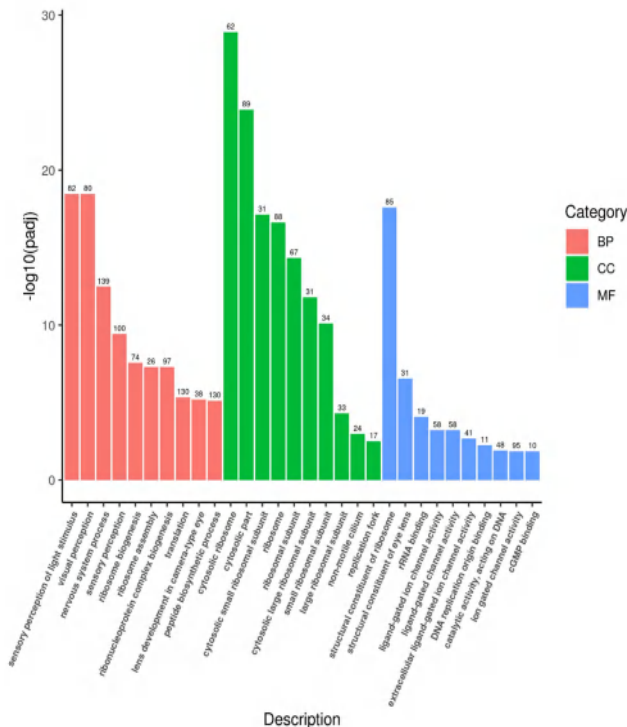


图 9 对羟基苯甲醇暴露 120 h 后斑马鱼 GO 富集分析柱状图  
Fig 9 Column diagram illustrating the GO enrichment analysis in zebrafish exposed to *p*-hydroxybenzyl alcohol over 120 hours

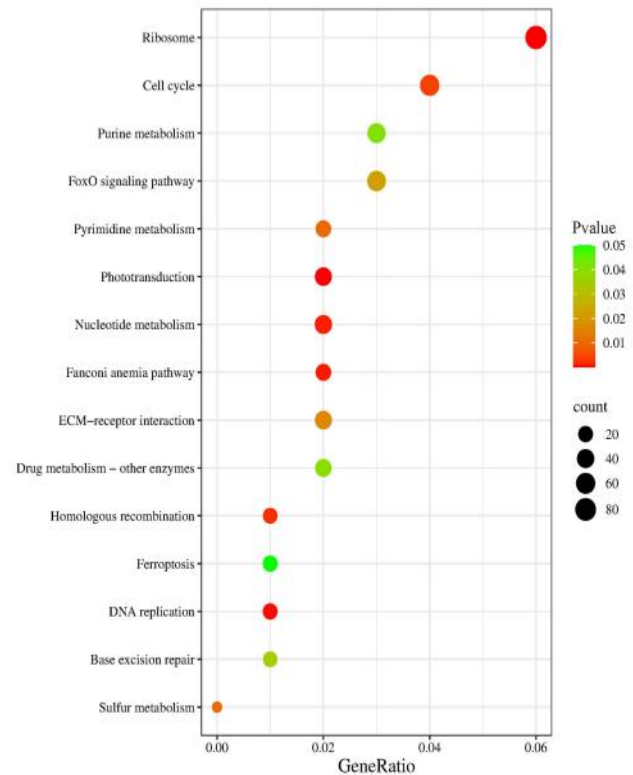


图 10 对羟基苯甲醇暴露 120 h 后斑马鱼 KEGG 富集气泡图  
Fig 10 Bubble map illustrating the KEGG enrichment in zebrafish exposed to *p*-hydroxybenzyl alcohol over 120 hours

现，高质量浓度的对羟基苯甲醇（ $0.30$ 、 $0.36$ 、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）对斑马鱼的体长有明显的抑制作用。这种体长的抑制效应可能与斑马鱼的心率有关，因为心率的下降会造成营养物质缺失，导致生长缓慢<sup>[19]</sup>。药物暴露使斑马鱼的卵黄囊中存在脂质沉积且间隙血管处颜色较浅甚至没有颜色。提示对羟基苯甲醇可诱导斑马鱼脂质代谢异常或紊乱。这与了哥王提取物可通过诱导肝细胞凋亡、促进肝脏脂质沉积而诱发肝脏损伤研究结果类似<sup>[20]</sup>。

光传导是视觉信号传导的关键部分<sup>[21]</sup>，可能直接决定斑马鱼视力的形成<sup>[22]</sup>。本研究发现，参与视网膜视觉色素的合成和再生的基因，如编码视紫红质蛋白的 *opn1mw2* 和绿色敏感视蛋白-1 的 *opn1mw1* 以及编码鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 G 亚基的 *gnat1* 和 *gnb1a* 基因均出现显著下调。严重影响光传导通路的进程，从而干扰了眼睛的发育和视觉功能。葡糖醛酸化作用早已被证明是鱼类中有机污染物的重要解毒途径。*ugt1a2*、*ugt1a5*、*ugt2a4* 和 *ugt5g2* 分别在肠、鳃、肝脏和眼睛中特异性表达。此外，一些 *ugt* 基因（*ugt1b5*、*ugt1a7*、*ugt2b3*、*ugt5a3* 和 *ugt5b3*）仅在两到三个器官中表达<sup>[23]</sup>，因此在器官特异性毒性中起重要作用。药物的暴露使 *ugt5b4*、*ugt1b5*、*ugt5b2*、*ugt1a1* 基因

的表达量降低,可见对羟基苯甲醇会影响斑马鱼自身的解毒途径,从而使斑马鱼的生长发育异常。

综上,对羟基苯甲醇可能影响斑马鱼视觉发育相关通路(光传导)和正常物质代谢通路(药物代谢-其他酶)中的重要生物分子,使得代谢通路异常,最终产生毒性效应致使斑马鱼死亡或产生异常表型。在今后的工作中还需要对对羟基苯甲醇诱发斑马鱼生长发育异常的信号通路进行验证,以证实其潜在的毒性。

## 参考文献

- [1] Zhang X, Wang P, Xu DD, et al. Aroma patterns of Beijing rice vinegar and their potential biomarker for traditional Chinese cereal vinegars [J]. Food Res Int, 2019, 119: 398-410.
- [2] 李肖爽, 卢金清, 戴艺, 等. 香荚兰豆的 TLC 鉴别及香兰素、对羟基苯甲醛的含量测定 [J]. 食品研究与开发, 2014, 35 (23): 97-101.
- [3] Vo TT, Yoo YM, Choi KC, et al. Potential estrogenic effect (s) of parabens at the prepubertal stage of a postnatal female rat model [J]. Reprod Toxicol, 2010, 29 (3): 306-316.
- [4] D' Amora M, Giordani S. The utility of zebrafish as a model for screening developmental neurotoxicity [J]. Front Neurosci, 2018, 12: 976
- [5] Santos D, Luzio A, Matos C, et al. Microplastics alone or co-exposed with copper induce neurotoxicity and behavioral alterations on zebrafish larvae after a subchronic exposure [J]. Aquat Toxicol, 2021, 235: 105814.
- [6] 石亚楠, 姚磊, 王佑华, 等. 氯化钡对斑马鱼心脏毒性的初步研究 [J]. 中国药理学通报, 2019, 35 (1): 145-146.
- [7] Smith C. The potential of zebrafish as a drug discovery research tool in immune-mediated inflammatory disease [J]. Inflammopharmacology, 2024, 32 (4): 2219-2233.
- [8] 赵浩丞, 刘尚书, 李佳欣, 等. 磺胺甲恶唑对斑马鱼早期生命阶段的发育毒性研究 [J]. 生态毒理学报, 2023, 18 (1): 114-123
- [9] 胡浩泽, 王卢燕, 李焯青, 等. 醚菌酯对斑马鱼早期生命阶段的慢性毒性效应 [J]. 生态毒理学报, 2024, 19 (1): 275-285.
- [10] 刘佳莉, 夏玉苹, 陈柳燕, 等. 不同寄主植物桑寄生水提物对斑马鱼胚胎心脏发育毒性及机制研究 [J]. 中草药, 2023, 54 (1): 160-171.
- [11] 李茂云, 肖月, 钟凯, 等. 遵义红茶品质特征及对高脂模型斑马鱼的降脂活性 [J]. 中国食品学报, 2023, 23 (7): 217-228.
- [12] 段必成. 丁香酚对斑马鱼胚胎发育的影响及其作用机制研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2020.
- [13] Le Bihanic F, Morin B, Cousin X, et al. Developmental toxicity of PAH mixtures in fish early life stages. Part I: adverse effects in rainbow trout [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2014, 21 (24): 13720-13731.
- [14] 吴玉琼, 陈莹, 胡永乐, 等. 四种新型农药对斑马鱼胚胎发育的毒性效应 [J]. 生物技术通报, 2017, 33 (6): 155-161.
- [15] 李祥英, 李志鸿, 张宏涛, 等. 吡啶醚菌酯对不同阶段斑马鱼的毒性效应评价 [J]. 生态毒理学报, 2017, 12 (4): 234-241.
- [16] Cen J, Jia ZL, Zhu CY, et al. Particulate matter (PM<sub>10</sub>) induces cardiovascular developmental toxicity in zebrafish embryos and larvae via the ERS, Nrf2 and Wnt pathways [J]. Chemosphere, 2020, 250: 126288.
- [17] 何俊霖, 于思, 曹治兴, 等. 异甘草素对斑马鱼胚胎发育、血管生成和心脏的影响 [J]. 四川动物, 2018, 37 (6): 672-677.
- [18] Manjunatha B, Sreevidya B, Lee SJ. Developmental toxicity triggered by benzyl alcohol in the early stage of zebrafish embryos: cardiovascular defects with inhibited liver formation and degenerated neurogenesis [J]. Sci Total Environ, 2021, 752: 141631.
- [19] 宋唯一, 刘景, 白琼琼, 等. 有机磷阻燃剂 TDMPP 对斑马鱼早期器官发育毒性的研究 [J]. 中国实用医药, 2020, 15 (36): 202-206.
- [20] 何正艳, 冯果, 郑传奇, 等. 苗药了哥王提取物对斑马鱼的毒性作用 [J]. 中国药房, 2022, 33 (20): 2443-2447.
- [21] Rosa JGS, Lopes-Ferreira M, Lima C. An overview towards zebrafish larvae as a model for ocular diseases [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24 (6): 5387.
- [22] Wang YY, Liang XF, Lu K. Knockout of SWS2 in zebrafish (*Danio rerio*) reveals its roles in feeding and phototactic behaviors [J]. Gene, 2024, 897: 148059.
- [23] Wang YM, Huang HY, Wu Q. Characterization of the zebrafish Ugt repertoire reveals a new class of drug-metabolizing UDP glucuronosyltransferases [J]. Mol Pharmacol, 2014, 86 (1): 62-75.

(收稿日期: 2025-01-23; 修回日期: 2025-02-36)



# 伏硫西汀树脂复合物制备及载药机制研究

张贤梅<sup>1, 2</sup>, 李聪慧<sup>2</sup>, 王增明<sup>2</sup>, 郑爱萍<sup>2\*</sup> (1. 华北理工大学药学院, 河北 唐山 063210; 2. 军事科学院军事医学研究院毒物药物研究所, 北京 100850)

**摘要:** **目的** 通过离子交换树脂 (IER) 作为掩味载体, 制备伏硫西汀树脂复合物 (VRCs), 以解决氢溴酸伏硫西汀 (VOH) 因苦味和辛辣味对口腔黏膜的刺激而影响患者口服顺应性的问题。 **方法** 通过单因素对 VRCs 的制备工艺进行考察, 从动力学和热力学层面、晶体层面、分子层面对树脂的载药机制进行研究, 并对 VRCs 的掩味和释药行为进行确认。 **结果** 最优制备参数为反应温度 50 °C, 药物与树脂质量比 1 : 1, 药物初始浓度 4 mg · mL<sup>-1</sup>; 树脂载药为自发、熵增和吸热的一级动力学过程, VOH 在树脂中的扩散为限速步骤, 且 VOH 与树脂以离子键结合。 VRCs 在口腔中几乎不释放, 进入胃后可快速释药, 从而实现有效掩味。 **结论** 本研究为 VOH 的掩味提供了新思路, 扩大了其临床应用潜力。

**关键词:** 氢溴酸伏硫西汀; 载药动力学; 载药热力学; 掩味; 离子交换树脂

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)06-1711-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.032

## Preparation and drug loading mechanism of vortioxetine-resin complexes

ZHANG Xian-mei<sup>1, 2</sup>, LI Cong-hui<sup>2</sup>, WANG Zeng-ming<sup>2</sup>, ZHENG Ai-ping<sup>2\*</sup> (1. School of Pharmacy, North China University of Science and Technology, Tangshan Hebei 063210; 2. State Key Laboratory of Toxicology and Medical Countermeasures, Beijing 100850)

**Abstract: Objective** To address poor patient compliance due to bitter and spicy taste of vortioxetine hydrobromide (VOH), which irritates the oral mucosa, and to prepare vortioxetine-resin complexes (VRCs) using ion exchange resins (IER) as a taste-masking carrier. **Methods** The preparation process of VRCs was investigated through single-factor experiments. The drug-loading mechanism of the resin was studied from the kinetic, thermodynamic, crystalline, and molecular levels. Additionally, the taste-masking and drug-release behaviors of VRCs were confirmed. **Results** The optimal preparation parameters included a reaction temperature of 50 °C, a drug-to-resin mass ratio of 1 : 1, and an initial drug concentration of 4 mg · mL<sup>-1</sup>. The drug loading was characterized as a spontaneous, entropic, and endothermic first-order kinetic process, with the diffusion of VOH within the resin identified as the rate-limiting step. VOH interacted with the resin through ionic bonding. Notably, VRCs exhibited negligible release in the oral cavity but allowed for rapid release upon reaching the stomach, effectively masking the taste. **Conclusion** A novel approach for taste masking of VOH has been established to enhance its potential in clinical application.

**Key words:** vortioxetine hydrobromide; drug loading kinetics; drug loading thermodynamics; taste masking; ion exchange resin

氢溴酸伏硫西汀 (VOH) 是由丹麦灵北制药和日本武田制药联合开发的新一代抗抑郁药, 于 2013 年获得美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准用于治疗成人重度抑郁症, VOH 通过受体活性调节和再摄取抑制双重机制联合发挥作用, 全面改善患者

的认知、躯体和情绪等抑郁症状, 临床效果显著且不良反应少<sup>[1-3]</sup>。VOH 对口腔黏膜有强烈的刺激性和苦味<sup>[4]</sup>。口服后可能会给使用者带来不适, 特别是在舌面上。这种刺激可持续半天或更长时间, 甚至在漱口后也是如此。这影响了抑郁症患者的用药

作者简介: 张贤梅, 女, 硕士研究生, 主要从事离子交换树脂载药技术的相关研究, email: 405053650@qq.com \*通信作者: 郑爱萍, 女, 博士研究生导师, 主要从事纳米技术药物、仿生智能递药系统的相关研究, email: apzheng@163.com

依从性，并限制其在口服制剂中的临床应用。

掩味方法如添加矫味剂、薄膜包衣、微囊化和热熔挤出技术等虽可改善制剂口感，但存在局限性。矫味剂对极苦药物效果不佳，且部分组分可能存在安全性问题；薄膜包衣和微囊化工艺复杂，且可能影响药物溶出；包衣片属于“整体型药片”，抑郁症患者可能会藏药和吐药，不能及时确认是否服药；而热熔挤出技术设备昂贵，制备过程中产生的高温可能会导致药物降解，不适用于热敏感药物，设备产生的高剪切力也可能造成聚合物辅料的机械降解等。离子交换树脂（IER）在掩味技术方面具有广阔的应用前景，尤其在以掩味为重点的特殊患者（如精神病、阿尔茨海默病、癫痫及卧床不起患者等）、老人和儿童的口服制剂中<sup>[5-6]</sup>。

离子交换树脂是一种交联的不溶性高分子聚合物，具有网状结构和固定的可解离的酸性或碱性官能团，可通过其活性结构基团的离子与溶液中的药物离子交换形成药物树脂复合物<sup>[7-9]</sup>，改变药物形态，使其在口腔环境中不释放，只在胃肠道发生离子交换释放药物，可完全掩盖药物的不良味道。此外，离子交换树脂的立体三维网络结构有利于药物分子的负载和缓释，具有惰性、载药量高、不良反应少和便于灭菌的优点，在药物制剂中有诸多应用<sup>[3, 10-14]</sup>。

本研究使用 Amberlite IRP88（IRP88）树脂与 VOH 制备药物树脂复合物以掩盖 VOH 的苦味和口腔黏膜刺激性，两者的结构式见图 1。通过动力学层面、热力学层面、晶体层面和分子层面的研究，探讨树脂的载药机制。再模拟消化道不同生理环境的溶出介质，评估 VRCs 的释药行为，并与市售普通片剂进行比较，验证其掩味效果和释药能力。通过揭示药物-树脂发生离子交换的本质，以期为离子交换树脂在给药系统中的应用提供理论支持，推动其作为药用辅料在药物制剂领域的发展。

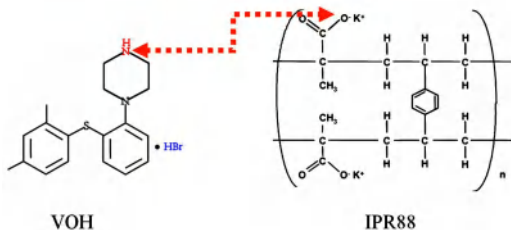


图 1 VOH 和 IRP88 化学结构图

Fig 1 Chemical structures of vortioxetine hydrobromide and IRP88

1 材料

1.1 试药

VOH（四川仁安药业有限公司，批号：VH17010002），氢溴酸伏地西汀片（丹麦灵北和日本

武田制药，批号：12477，规格：10 mg），Amberlite IRP88（法国陶氏）。所用的化学品和试剂均是分析级或色谱级的，所有的实验用水均是去离子水。

1.2 仪器

傅里叶变换红外光谱仪（美国 Thermo Fisher Scientific）；差示扫描量热仪（日本 JEOL）；X-射线粉末衍射仪（荷兰 PANalytical B.V）；扫描电子显微镜（美国 TA 仪器）；全自动溶出仪（天大天发）；高效液相色谱仪（美国 Thermo）；恒温磁力搅拌器（常州金坛）。

2 方法

2.1 药物树脂复合物的制备

批式法常用于药物树脂的制备<sup>[15-17]</sup>。将 IRP88 加入 VOH 溶液中，并在恒温水浴中以  $700\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  的速度搅拌混合物即得伏硫西汀树脂复合物（VRCs）。物理混合物（PM）制备按处方质量比称取 VOH 原料药、离子交换树脂混合均匀即得。

在固定的时间点取样用高效液相色谱（HPLC）法测量样品的浓度。考察药物-树脂质量比、反应温度、药物浓度和树脂粒径对药物树脂复合物的影响。处方工艺和相应的变量如表 1 所示。

表 1 交换过程的影响因素研究

Tab 1 Study of factors influencing the exchange process

| 序号 | 药物-树脂<br>质量比 | 反应<br>温度 / $^{\circ}\text{C}$ | 药物浓度 /<br>( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) | 树脂粒<br>径 / $\mu\text{m}$ |
|----|--------------|-------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------|
| 1  | 0.5 : 1      | 30                            | 1                                            | 未筛分                      |
| 2  | 1 : 1        | 30                            | 1                                            | 未筛分                      |
| 3  | 1.5 : 1      | 30                            | 1                                            | 未筛分                      |
| 4  | 2 : 1        | 30                            | 1                                            | 未筛分                      |
| 5  | 4 : 1        | 30                            | 1                                            | 未筛分                      |
| 6  | 1 : 1        | 25                            | 1                                            | 未筛分                      |
| 7  | 1 : 1        | 30                            | 1                                            | 未筛分                      |
| 8  | 1 : 1        | 40                            | 1                                            | 未筛分                      |
| 9  | 1 : 1        | 50                            | 1                                            | 未筛分                      |
| 10 | 1 : 1        | 60                            | 1                                            | 未筛分                      |
| 11 | 1 : 1        | 50                            | 0.5                                          | 未筛分                      |
| 12 | 1 : 1        | 50                            | 1                                            | 未筛分                      |
| 13 | 1 : 1        | 50                            | 2                                            | 未筛分                      |
| 14 | 1 : 1        | 50                            | 3                                            | 未筛分                      |
| 15 | 1 : 1        | 50                            | 4                                            | 未筛分                      |
| 16 | 1 : 1        | 50                            | 4                                            | < 63                     |
| 17 | 1 : 1        | 50                            | 4                                            | 63 ~ 90                  |
| 18 | 1 : 1        | 50                            | 4                                            | > 90                     |

载药量（ $Q_i\%$ ）、平衡载药量（ $Q_e\%$ ）和药物利用率（ $A_i\%$ ）根据以下公式计算：

$$Q_i = (C_0 - C_i) / W_r \times 100\% \quad (1)$$

$$Q_e = (C_0 - C_e) / W_r \times 100\% \quad (2)$$

$$A_i = (C_0 - C_e) / C_e \times 100\% \quad (3)$$

其中  $C_0$ 、 $C_i$  和  $C_e$  ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 分别代表 0 时、

$t$  时和平衡时的药物浓度;  $V$  (L) 代表药物溶液体积;  $W_r$  (g) 为树脂重量。

## 2.2 载药动力学

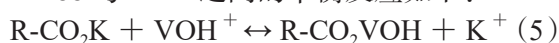
Boyd 模型被用来研究离子交换树脂载药动力学<sup>[17-19]</sup>。在此模型中, 假设所有的树脂颗粒都是均匀的球体, 其半径为  $r$ , 药物在树脂颗粒内部的扩散是一个限速步骤。根据此模型绘制  $B_t-t$  曲线, 其斜率代表了反应速率, 该模型的公式如下:

$$x = Q_t/Q_e = \sum_{n=1}^{\infty} e^{-n^2 B_t/n^2} \quad (4)$$

其中  $n$  是变量总数;  $x$  是时间  $t$  时的载药百分比;  $B$  ( $\text{min}^{-1}$ ) 是反应速率常数。

## 2.3 载药热力学

IRP88 与 VOH 之间的平衡反应如下:



$\text{R-CO}_2\text{K}$  (IRP88) 为弱酸性的钾型阳离子交换树脂,  $\text{VOH}^+$  是伏硫西汀药物离子。该平衡反应过程是可逆的, 反映出  $\text{K}^+$  和  $\text{VOH}^+$  之间的竞争。

根据质量作用定律, 当离子交换过程达到平衡时, 反应平衡关系可表述如下:

$$K_e = [\text{VOH}^+]_r [\text{K}^+]_s / [\text{VOH}^+]_s [\text{K}^+]_r \quad (6)$$

$[\text{VOH}^+]_s$  和  $[\text{K}^+]_s$  ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 分别是药物离子和  $\text{K}^+$  在溶液中的平衡浓度, 而  $[\text{VOH}^+]_r$  和  $[\text{K}^+]_r$  ( $\text{mmol}$ ) 分别是树脂中药物离子和  $\text{K}^+$  的平衡量。平衡常数  $K_e$  被用来描述溶液和树脂之间的离子分布<sup>[19-21]</sup>。根据离子交换反应, 可获得标准自由能  $\Delta G$ , 焓变  $\Delta H$  和熵变  $\Delta S$  参数。

## 2.4 VRCs 的表征

分别使用扫描电子显微镜 (SEM)、差示扫描量热仪 (DSC)、X-射线粉末衍射仪 (XRD) 和傅里叶红外光谱仪 (FTIR) 对 VOH、IRP88、两者 PM 以及 VRCs 复合物进行表征。

SEM 测试条件: 加速电压为 30 kV, 束斑为 3.0 nm, 工作距离为 13 mm; DSC 测试条件: 扫描温度为 25 ~ 280  $^{\circ}\text{C}$ , 升温速度为 10  $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ , 氮气气氛; XRD 测试条件: 扫描角度为 5 $^{\circ}$  ~ 80 $^{\circ}$ , 步长为 0.05 $^{\circ}$ , 速率为 2 ( $^{\circ}$ )  $\cdot \text{min}^{-1}$ ; FTIR 测试条件: 溴化钾压片, 扫描波长为 400 ~ 4000  $\text{cm}^{-1}$ 。

## 2.5 VRCs 体外溶出

采用 2020 年版《中国药典》四部通用技术要求 0931 溶出度与释放度测定法中第二法桨法测定, 溶出介质用量 900 mL, 转速 75  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 温度 (37 $\pm$ 0.5)  $^{\circ}\text{C}$ , 取 VRCs (约含 VOH 10 mg) 和 VOH 片 1 片 (约含 VOH 10 mg), 各式 3 份, 在规定的时间内, 从介质中取出 5 mL (用等体积的新鲜介质代替), 过滤样品后, 用 HPLC 检测药物的释放量。考察制备所得的 VRCs 复合物在

pH 1.2 的盐酸溶液中的溶出度是否与市售 VOH 片一致; 以及验证 VRCs 复合物较 VOH 片在人工唾液环境中是否有较好的掩味效果<sup>[19, 22]</sup>。

## 3 结果和讨论

### 3.1 药物树脂复合物的制备

总交换容量 (TEC) 是指单位重量或体积树脂中可转移的理论离子数量, 其大小受树脂结构和可嵌入药物数量的影响<sup>[15]</sup>。当药物溶解量超过树脂的 TEC 时, 药物利用率显著下降, 尤其在药物-树脂的质量比增加时更为明显。如图 2 所示, 当药物-树脂质量比为 4:1 时, 尽管平衡载药量 ( $Q_e\%$ ) 最大, 但药物利用率 ( $A_e\%$ ) 却降至 50%。在 0.5:1 和 1.5:1 之间的质量比范围内, 药物分子和树脂的相互作用增强, 药物利用率接近 100%。随着树脂质量比的提高, 平衡载药量逐渐减少。为优化药物利用率并避免药物负荷大幅下降, 本研究选择 1:1 的药物树脂质量比进行后续研究。

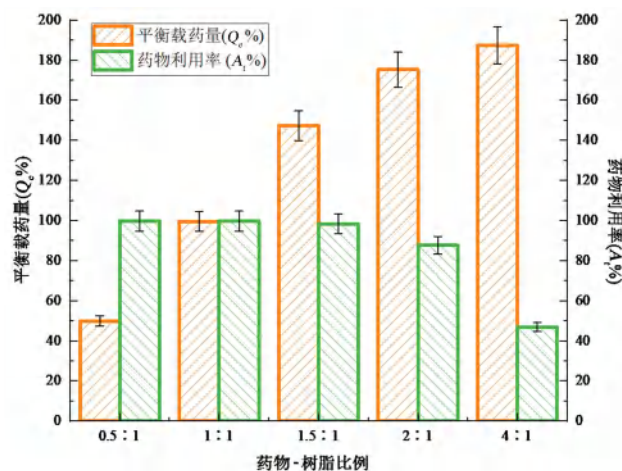


图 2 不同药物-树脂质量比 VRCs 的平衡载药量和药物利用率 ( $n=3$ )

Fig 2 Equilibrium drug loading and drug availability of VRCs with different drug-resin ratios ( $n=3$ )

如图 3A 所示, 药物-树脂质量比的增加延长了达到平衡的时间。例如, 在药物-树脂质量比为 0.5:1 和 4:1 时, 平衡时间分别为 0.25 h 和 4 h, 表明更高的药物-树脂质量比会导致较慢的平衡动态。如图 3B 显示, 温度升高加快了反应速率, 缩短了平衡时间, 说明高温有利于药物-树脂的交换。实验选择 50  $^{\circ}\text{C}$  作为载药温度, 兼顾效率、成本和实际操作性。图 3C 表明, 在固定药物-树脂质量比的情况下, VOH 质量浓度从 0.5  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  增加至 4  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  对平衡载药量无显著影响, 但反应速度略有加快。因此选择 4  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  以提高实验效率。图 3D 显示, 减小树脂粒径可加快离子交换反应, 缩短平衡时间, 但不影响平衡载药量。



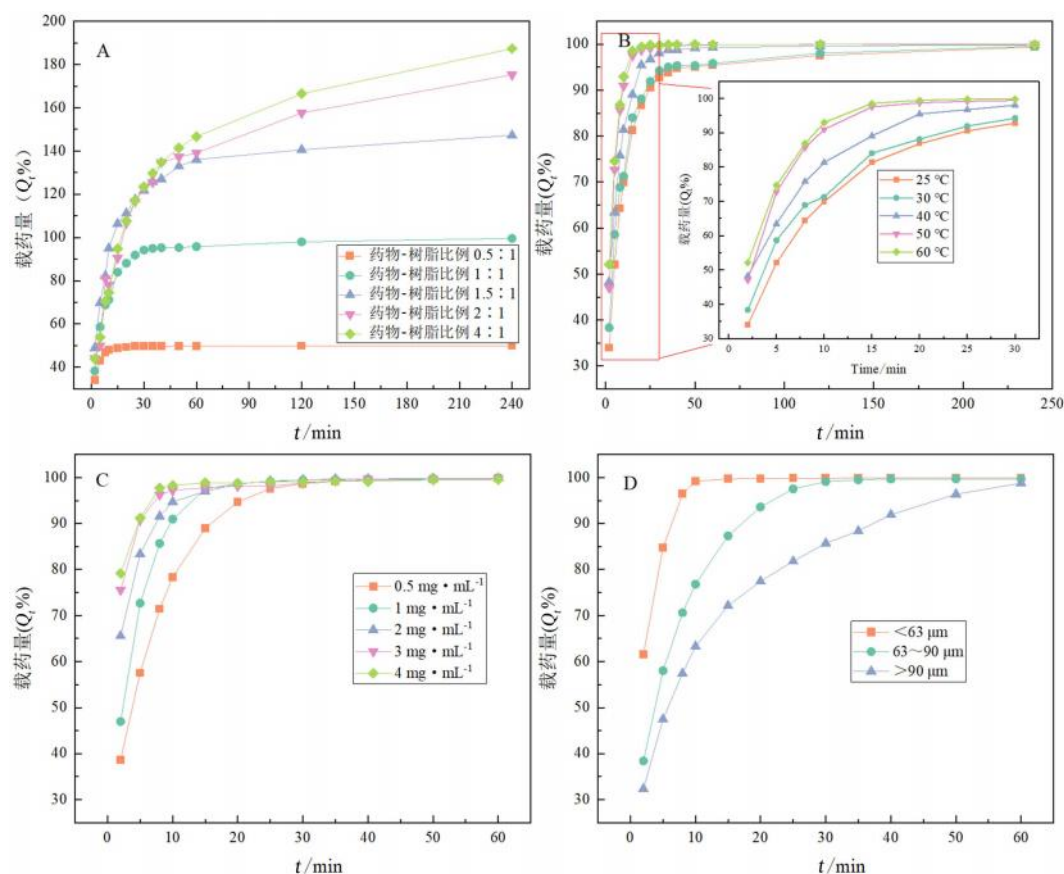


图 3 不同药物-树脂质量比 (A)、反应温度 (B)、药物浓度 (C) 和树脂粒径 (D) 下的离子交换动力学曲线

Fig 3 Ion-exchange kinetic curves with different drug-resin ratios (A), reaction temperatures (B), drug concentrations (C) and resin particle sizes (D)

### 3.2 载药动力学

离子交换动力学研究离子交换机制、限速步骤和影响反应速率的变量。离子交换树脂的活性基团均匀地分布在三维交联的网络骨架中, 离子交换反应通常始于树脂表面, 随后逐步向内部迁移。药物离子通过反应层移动至未反应的核心区域, 该过程可用收缩核模型 (SCM) 描述<sup>[19, 23-24]</sup>。

液体中的对流离子扩散速率 (约为  $0.01 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ ) 显著快于树脂周围液膜和内部的扩散。因此反应速率通常受限于液膜或颗粒扩散, 其中较慢的扩散过程决定了整体反应速率。Boyd 模型将树脂视为均匀的球体, 认为离子在树脂内外的扩散性质无显著差异<sup>[25]</sup>。水溶液中的树脂高度膨胀的网络结构, 对药物离子扩散的阻碍可忽略, 离子可从树脂表面的任何位置扩散至树脂内部<sup>[26]</sup>。

如果  $B_t$  与时间  $t$  呈线性关系, 表明药物在树脂颗粒中的扩散是限速步骤。如图 4 所示, VRCs 的  $B_t$ - $t$  曲线线性良好 ( $r$  大于 0.98), 证实离子扩散为限制步骤。图 4A 所示, 药物-树脂质量比增加会增强反应饱和度, 因药物离子竞争有限结合位点, 导致反应速率减慢。图 4B 表明, 温度升高加

速离子交换, 因高温下药物分子的热运动加剧, 树脂颗粒膨胀, 孔隙增大, 利于离子扩散。图 4C 显示, 药物浓度对反应速率的影响较小。图 4D 显示, 交换速率与树脂粒径成反比。离子交换过程是一个固液两相传质和化学反应过程, 根据 SCM 的理论, 离子交换通常从树脂的最外层开始, 逐渐向内移动。粒径小的树脂具有相对较大的比表面积和相对较小的内部体积, 使得离子交换的反应速率变快, 因此减小粒径会减少离子交换达到平衡的时间<sup>[23, 26-27]</sup>。综上, 药物-树脂质量比影响载药能力, 而药物浓度、反应温度和树脂粒径影响平衡时间。因此, 根据制剂需求, 可选择合适的树脂粒径和反应条件以提高反应速率, 实现高的药物释放。

为了拟合零级、一级和二级简单级数反应, 选择了 298 K 下的离子交换动力学曲线。拟合结果见表 2, VOH 与 IRP88 的离子交换与一级动力学拟合系数最高 ( $r = 0.9952$ )。根据化学反应理论, VOH 与 IRP88 的离子交换符合一阶反应动力学; 反应速率常数 ( $k$ ) 为 0.0815, 半衰期为 8.5 min。

活化能是决定反应速率的关键参数, 反映了反应物达到过渡态所需的能量壁垒。通过 Arrhenius

表 2 298 K 条件下简单级数反应的离子交换动力学曲线拟合结果  
Tab 2 Fitting ion-exchange kinetic curve for simple steps at 298 K

| 反应级数 | 动力学方程                  | 回归方程                     | <i>r</i> | <i>k</i> |
|------|------------------------|--------------------------|----------|----------|
| 零级   | $Q_e - Q_t = -kt$      | $y = -1.8899x + 54.8916$ | 0.9173   | 1.8899   |
| 一级   | $\ln(Q_e - Q_t) = -kt$ | $y = -0.0815x + 4.2291$  | 0.9952   | 0.0815   |
| 二级   | $1/(Q_e - Q_t) = kt$   | $y = 0.0048x - 0.0069$   | 0.9772   | 0.0048   |

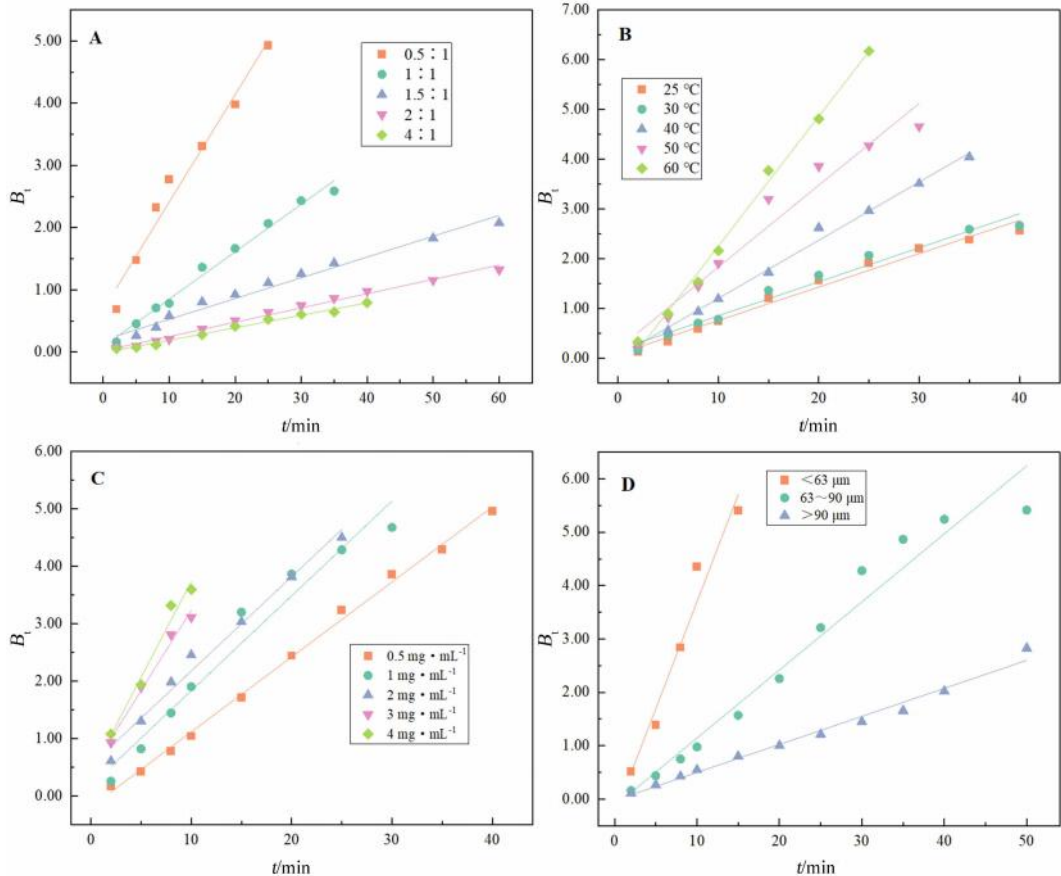


图 4 不同药物树脂质量比 (A)、反应温度 (B)、药物浓度 (C) 和树脂粒径 (D) 下的  $B_t$ - $t$  拟合曲线  
Fig 4  $B_t$ - $t$  fitting curve with different drug-resin ratios (A), reaction temperatures (B), drug concentrations (C) and resin particle sizes (D)

方程  $[\ln k = -(E_a/RT) + A]$ ,  $R$  代表理想气体常数, 值为  $8.314 \text{ J}/(\text{mol} \cdot \text{K})$ ,  $T$  代表绝对温度,  $A$  代表常数]对 VOH 和 IRP88 的离子交换反应进行动力学分析, 结果表明活化能  $E_a = 26.616 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  ( $r = 0.9881$ ), 远低于  $120 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  的临界值。这一结果表明, IRP88 和 VOH 之间的离子交换反应能量壁垒较低, 反应易于进行<sup>[28]</sup>。

3.3 载药热力学

热力学分析表明 (见表 3), VOH 和 IRP88 的离子交换反应为吸热过程 ( $\Delta H > 0$ ), 平衡常数 ( $K_e$ ) 随温度升高而增大, 说明高温有利于反应进行。自由能变  $\Delta G < 0$  表明反应自发, 但  $\Delta G$  随温度升高而增大, 提示 VOH 与树脂的结合力减弱, 可能影响载药效率。熵变  $\Delta S > 0$  反映了 VOH 离子与树脂结合后自由度降低<sup>[19, 29]</sup>。动力学与热力学结果一致, 均支持高温加速反应速率。

通过平衡常数  $K_e$  可预测药物分布及稳定性, 为优化制剂工艺提供理论依据。因此, 控制适宜的温度和离子环境对维持载药效率和疗效至关重要。

表 3 不同温度下的  $K_e$  和热力学参数  
Tab 3  $K_e$  and thermodynamic parameters under different temperatures

| 温度 /K | $K_e$   | 热力学参数                                                |                                                      |                                                      |
|-------|---------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
|       |         | $\Delta G/$<br>( $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) | $\Delta H/$<br>( $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) | $\Delta S/$<br>( $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) |
| 298   | 1.9960  | -1.7123                                              | 77.4877                                              | 0.2658                                               |
| 303   | 2.7819  | -2.5774                                              | 77.4877                                              | 0.2642                                               |
| 313   | 9.4564  | -5.8465                                              | 77.4877                                              | 0.2662                                               |
| 323   | 26.0399 | -8.7535                                              | 77.4877                                              | 0.2670                                               |
| 333   | 44.5629 | -10.5120                                             | 77.4877                                              | 0.2643                                               |

3.4 VRCs 的表征

SEM 结果显示, VOH 呈短棒状晶体, IRP88 为不规则块状颗粒 (见图 5)。PM 中仍然可以看到清晰的 VOH 晶体。而 VRCs 的结构特征与树脂一

致。表明 VOH 与 IRP88 之间为复杂的离子交换过程,而非简单物理混合。尽管药物-树脂质量比为 1.5:1 时,载药量较高,但 SEM 仍观察到少量未包裹的 VOH 颗粒,提示了载药过程中的不完全性。为优化口感并减少 VOH 的苦味及对口腔黏膜的刺激性,最终将药物-树脂质量比调整为 1:1。

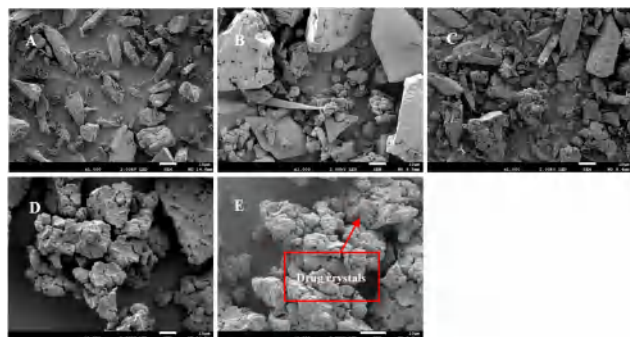


图 5 VOH、IRP88、PM 和 VRCs 的 SEM 图

Fig 5 SEM patterns of VOH, IRP88, PM and VRCs

A.VOH ( $\times 1000$ ); B. IRP88 ( $\times 1000$ ); C. PM ( $\times 1000$ ); D. VRCs (药物-树脂质量比 1:1,  $\times 1000$ )(drug-to-resin mass ratio of 1:1); E. VRCs (药物-树脂质量比 1.5:1) ( $\times 1500$ )(drug-to-resin mass ratio of 1.5:1)

由 DSC 曲线(见图 6)所示,VOH 在 238.9℃ 出现熔融峰;IRP88 在 120℃ 出现吸热峰;在物理混合物(PM)中 VOH 的熔融峰位下移至 212.7℃,这可能是由于树脂的存在,对药物有稀释作用,使药物的熔融峰向前移动;在 VRCs 中未观察到熔融峰的出现,表明 VOH 和 IRP88 结合形成了一种与 PM 不同的结合物<sup>[6]</sup>。

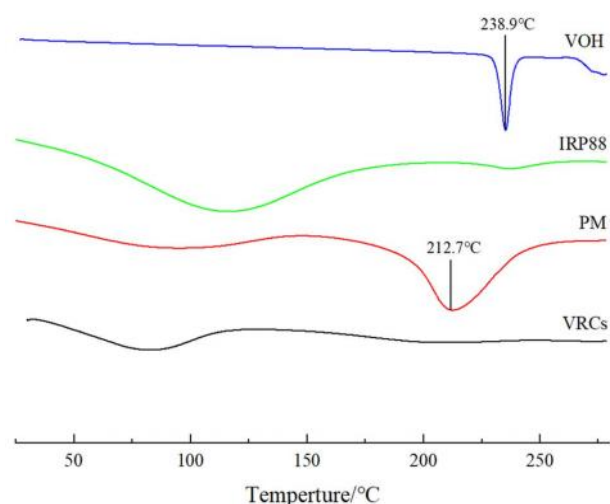


图 6 VOH、IRP88、PM 和 VRCs 的 DSC 图

Fig 6 DSC patterns of VOH, IRP88, PM and VRCs

由 XRD 曲线(见图 7)所示,VOH 在  $2\theta$  角 13.9°、14.7°、20.8° 和 29.8° 处显示出明显的特征衍射峰,表明其为结晶态;而 IRP88 表现

为非晶态聚合物,因此不存在衍射峰;虽然 PM 中在 10° 和 30° 之间的峰频率和强度有所下降,但可观察到明显的衍射峰,如 13.9°、14.7°、20.8° 和 29.8°;VRCs 与 PM 的曲线图显著不同,VRCs 中没有 VOH 晶体衍射峰,表明在 VRCs 系统中 VOH 主要以非晶状态存在<sup>[29]</sup>。

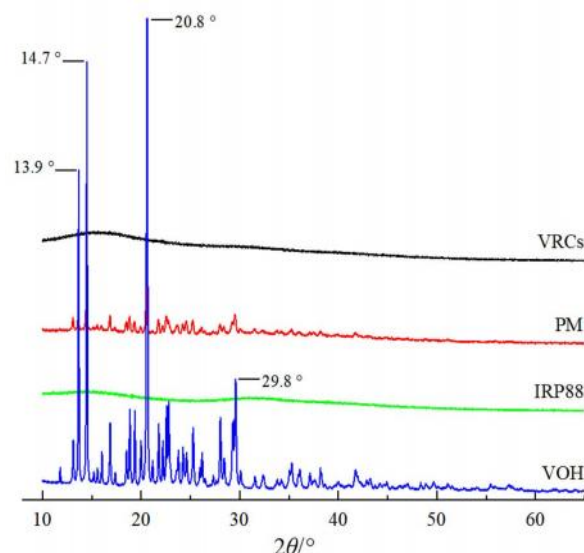


图 7 VOH、IRP88、PM 和 VRC 的 XRD 图

Fig 7 XRD patterns of VOH, IRP88, PM and VRCs

由 FTIR 曲线(见图 8)所示,VOH 在 2459.97  $\text{cm}^{-1}$ 、2707.5  $\text{cm}^{-1}$  和 2911.40  $\text{cm}^{-1}$  处显示出 N-H 特征吸收峰,体现了其作为仲胺铵盐的特性;VOH 在 3000 ~ 2200  $\text{cm}^{-1}$  的范围内有一个宽的吸收峰和尖锐的弯曲,表明其氨基特征。IRP88 树脂在 1697.1  $\text{cm}^{-1}$  处有 -CO 伸缩振动,为羧酸盐的特征峰,在 850.3  $\text{cm}^{-1}$  和 768.5  $\text{cm}^{-1}$  处有芳香环 C-H 的伸缩振动,在 2941.1  $\text{cm}^{-1}$  处有 CH<sub>2</sub> 的 C-H 伸缩振动。PM 的特征吸收峰与 VOH 相似。与 PM 比较,VRCs 中大部分的 VOH 峰被削弱、移位(如 2911.40  $\text{cm}^{-1}$ )或消失(如 2459.97  $\text{cm}^{-1}$ ),这是由于 VOH 中 N-H 的 N 原子与 IRP88 中的羧基 COO<sup>-</sup> 结合后限制了基团振动,表明 VOH 和氢溴酸离子之间的键几乎被破坏。VRCs 中的峰变化表明药物的 NH 基团和树脂的羧酸基团之间通过离子键结合<sup>[15, 27]</sup>。药物-树脂之间除离子键结合外,Li 等<sup>[27]</sup>通过分子动力学模拟研究药物分子与离子交换树脂的相互作用,发现药物分子与树脂分子之间还存在氢键、堆积效应及盐桥作用。

### 3.5 VRCs 体外溶出

VOH 片和 VRCs 在 pH 1.2 盐酸溶液和人工唾液中的累积溶出曲线如图 9 所示,VOH 片为薄膜包衣片剂,在 pH 1.2 盐酸溶液和唾液环境中可完



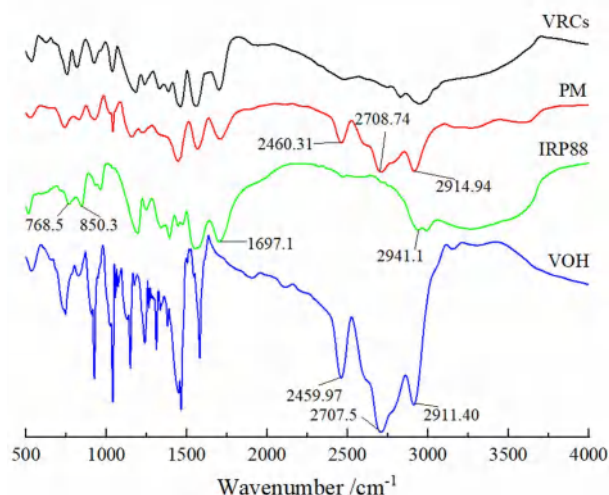


图 8 VOH、IRP88、PM 和 VRC 的 FTIR 图

Fig 8 FTIR patterns of VOH, IRP88, PM and VRCs

全释药。当口服多颗粒剂型时，小部分会留在会厌谷中或黏附在会厌上 1 ~ 2 min，所以完全的味觉掩蔽必须允许药物延迟释放 2 min，VRCs 复合物在人工唾液中 2 min 内几乎不释药，其释放度仅为 3%，而在 pH 1.2 盐酸溶液中可快速释药，其释放度可达 86%，从而实现掩味和治疗的效果。这是因为 IRP88 是  $K^+$  型弱酸性阳离子交换树脂，所以在胃液的 pH 环境下，IRP88 和  $H^+$  的高亲和力就会使结合的药物离子迅速解离，从而使药物迅速释放，在正常人体胃液的 pH 值为 0.9 ~ 2.0 条件下，其离子浓度足以满足 VRCs 的快速释药，而人工唾液中的氢离子浓度较低，因而药物释放较慢 [24, 30]。

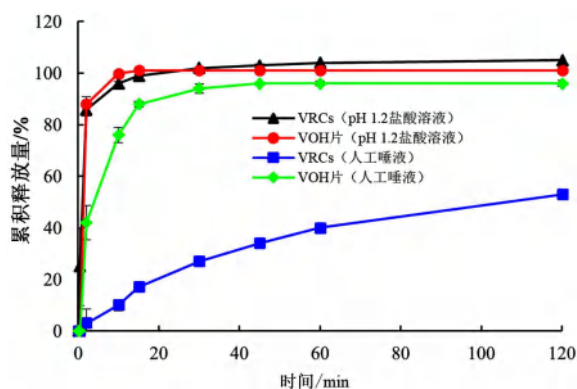

 图 9 VRCs 和 VOH 片在人工唾液和 pH 1.2 盐酸溶液中的释放曲线 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

 Fig 9 Release profiles in artificial saliva and pH 1.2 hydrochloric acid solution of VRCs and vortioxetine hydrobromide tablets ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

#### 4 结论

本研究创新性地利用 IRP88 离子交换树脂制备了 VRCs，实现了药物的掩味效果。研究表明，VOH 和 IRP88 的离子交换是一个熵增、吸热和自

发的一级动力学过程，药物扩散是限速步骤。微观表征显示 VRCs 中药物晶型消失，证实了 VOH 与 IRP88 离子键的形成，有效隔离了药物与口腔味蕾的接触。VRCs 在人工唾液中 2 min 内几乎不释药，验证了其掩味效果，而在人工胃液中的释药行为与市售片剂相似，表明树脂载体不影响药物释放特性。本研究为 VOH 的口服制剂开发提供了新方向，制备的 VRCs 具有掩盖苦味、提高患者依从性的潜力。然而，其临床转化面临临床试验复杂性、法规审批、生产成本及个体差异等挑战，需进一步优化工艺参数并开展稳定性及药动力学研究，以推动其临床应用。

#### 参考文献

- [1] Fries GR, Saldana VA, Finnstein J, et al. Molecular pathways of major depressive disorder converge on the synapse [J]. *Mol Psychiatry*, 2023, 28 (1): 284-297.
- [2] Schramm E, Klein DN, Elsaesser M, et al. Review of dysthymia and persistent depressive disorder: history, correlates, and clinical implications [J]. *Lancet Psychiatry*, 2020, 7 (9): 801-812.
- [3] Walsh J, Cram A, Woertz K, et al. Playing hide and seek with poorly tasting paediatric medicines: do not forget the excipients [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2014, 73: 14-33.
- [4] 普济生物科技(台州)有限公司. 用于口腔掩味的含氢溴酸沃替西汀的包衣颗粒, 固体分散体和制剂: CN202210477756. X [P]. 2022-07-29.
- [5] Christensen MC, Schmidt S, Grande I. Effectiveness of vortioxetine in patients with major depressive disorder comorbid with generalized anxiety disorder: results of the RECONNECT study [J]. *J Psychopharmacol*, 2022, 36 (5): 566-577.
- [6] Gao L, Zhang XR. Pharmaceutical salt hydrates of vortioxetine with maleic acid and fumaric acid: crystal structures, characterisation and solubility performance [J]. *J Mol Struct*, 2022, 1250: 131847.
- [7] Woertz K, Tissen C, Kleinebudde P, et al. Rational development of taste masked oral liquids guided by an electronic tongue [J]. *Int J Pharm*, 2010, 400 (1-2): 114-123.
- [8] Zheng X, Wu F, Hong YL, et al. Developments in taste-masking techniques for traditional Chinese medicines [J]. *Pharmaceutics*, 2018, 10 (3): 157.
- [9] Sagar T, Amol G, Rahul D, et al. Review on: taste masking approaches and evaluation of taste masking [J]. *Int J Pharm Sci*, 2012, 4 (1): 1895-1907.
- [10] Kumar S, Jain S. History, introduction, and kinetics of ion exchange materials [J]. *J Chem*, 2013, 2013 (1): 1-13.
- [11] Zhang TY, Du RF, Wang YJ, et al. Research progress of preparation technology of ion-exchange resin complexes [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2022, 23 (4): 105.
- [12] Anand V, Kandrapu R, Garg S. Ion-exchange resins:

- carrying drug delivery forward [J]. Drug Discov Today, 2001, 6 (17): 905-914.
- [13] Dixit F, Dutta R, Barbeau B, et al. PFAS removal by ion exchange resins: a review [J]. Chemosphere, 2021, 272 (525): 129777.
- [14] Guo X, Chang RK, Hussain MA. Ion-exchange resins as drug delivery carriers [J]. J Pharm Sci, 2009, 98 (11): 3886-3902.
- [15] Han XP, Zhang S, Chai ZD, et al. In vitro and in vivo evaluation of the taste-masking efficiency of Amberlite IRP88 as drug carries in chewable tablets [J]. J Drug Deliv Sci Technol, 2019, 49: 547-555.
- [16] Shang R, Liu C, Quan P, et al. Effect of drug-ion exchange resin complex in betahistine hydrochloride orodispersible film on sustained release, taste masking and hygroscopicity reduction [J]. Int J Pharm, 2018, 545 (1-2): 163-169.
- [17] Tan DCT, Ong JJ, Gokhale R, et al. Hot melt extrusion of ion-exchange resin for taste masking [J]. Int J Pharm, 2018, 547 (1-2): 385-394.
- [18] Ichikawa H, Fujioka K, Adeyeye MC, et al. Use of ion-exchange resins to prepare 100 microm-sized microcapsules with prolonged drug-release by the Wurster process [J]. Int J Pharm, 2001, 216 (1-2): 67-76.
- [19] Deng YX, Wang TT, Li JL, et al. Studies on the in vitro ion exchange kinetics and thermodynamics and in vivo pharmacokinetics of the carbinoxamine-resin complex [J]. Int J Pharm, 2020, 588 (3): 119779.
- [20] Jeong SH, Park K. Drug loading and release properties of ion-exchange resin complexes as a drug delivery matrix [J]. Int J Pharm, 2008, 361 (1-2): 26-32.
- [21] Zhang JW, Zhu CX, Zhou F, et al. Adsorption behavior and kinetics for L-valine separation from aqueous solution using ion exchange resin [J]. React Funct Polym, 2018, 130: 51-60.
- [22] Manosroi A, Pattamapun K, Chankhampan C, et al. A biological active artificial saliva formulation containing flower mucilage from Ceylon Spinach (*Basella alba* Linn.) [J]. Saudi J Biol Sci, 2020, 27 (3): 769-776.
- [23] Mahmoud MR, Soliman MA, Ali AH, et al. Kinetic studies on radio-selenium uptake by ion exchange resin [J]. Sep Sci Technol, 2016, 51 (6): 976-989.
- [24] Gittings S, Turnbull N, Roberts CJ, et al. Dissolution methodology for taste masked oral dosage forms [J]. J Control Release, 2014, 173 (1): 32-42.
- [25] Boyd GE, Schubert J, Adamson AW. The exchange adsorption of ions from aqueous solutions by organic zeolites. i. ion-exchange equilibria [J]. J Am Chem Soc, 1947, 69 (11): 2818-2829.
- [26] Othman SH, Ali AH, Mansour NA, et al. The effect of external and internal diffusion on the sorption of radioactive ions by reactive cloth filter: part I [J]. J Radioanal Nucl Chem, 2012, 291 (3): 685-698.
- [27] Li CH, Han XL, Hong XX, et al. Study on the complexation and release mechanism of methylphenidate hydrochloride ion exchange resin complex [J]. Polymers (Basel), 2021, 13 (24): 4394.
- [28] Skla B, Sk B, Nka C, et al. Indonesian Kaolin supported nZVI (IK-nZVI) used for the an efficient removal of Pb (II) from aqueous solutions: kinetics, thermodynamics and mechanism [J]. J Environ, 2021, 9 (6): 106483.
- [29] Cao Y, Du SC, Ke X, et al. Interplay between thermodynamics and kinetics on polymorphic behavior of vortioxetine hydrobromide in reactive crystallization [J]. Org Process Res Dev, 2020, 24 (7): 1233-1243.
- [30] Yamamoto Y, Kumagai H, Haneda M, et al. The mechanism of solifenacin release from a pH-responsive ion-complex oral suspension in the fasted upper gastrointestinal lumen [J]. Eur J Pharm Sci, 2020, 142: 105107.

(收稿日期: 2024-12-07; 修回日期: 2025-03-10)

## 综述

巨噬细胞外泌体在器官纤维化中的调控作用  
及其工程化应用研究进展

鄢钦文<sup>1, 2</sup>, 胡雨瞳<sup>1, 2</sup>, 汤洋<sup>1, 2</sup>, 刘锦<sup>1, 2</sup>, 谭洋<sup>1, 2\*</sup>, 裴刚<sup>2\*</sup> (1. 湖南中医药大学药学院, 长沙 410208; 2. 湖南省普通高等学校中药现代化研究重点实验室, 长沙 410208)

**摘要:** 外泌体是由多种细胞分泌的脂质双分子层囊泡, 是细胞间通信的重要介质之一。作为机体免疫系统的重要组成部分, 巨噬细胞对纤维化的进程发挥关键的调控作用。巨噬细胞外泌体通过递送蛋白质、非编码 RNA 等生物活性分子, 或工程化作为药物递送载体, 参与到纤维化的进程中, 对纤维化的发展和转归起着重要的作用。本文就巨噬细胞外泌体的形成及其在纤维化中的形成过程和工程化应用作一综述, 以期为其后续研究和应用提供参考。

**关键词:** 巨噬细胞; 外泌体; 纤维化; 工程化; 药物载体

中图分类号: Q25, R392.12 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)06-1719-07  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.033

Regulatory role of macrophage exosomes in organ fibrosis and  
engineering application

YAN Qin-wen<sup>1, 2</sup>, HU Yu-tong<sup>1, 2</sup>, TANG Yang<sup>1, 2</sup>, LIU Jin<sup>1, 2</sup>, TAN Yang<sup>1, 2\*</sup>, PEI Gang<sup>2\*</sup> (1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208; 2. Key Laboratory of Modern Research of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208)

**Abstract:** Exosomes, lipid bilayer vesicles secreted by multiple types cells, are important mediators in intercellular communication. Macrophages are important cells in the body's immune system, and play a crucial regulatory role in fibrosis. Macrophage exosomes participate in the process of fibrosis by delivering proteins and noncoding RNA, etc., or function as drug carriers to influence the development and outcome of fibrosis. This article reviewed the formation of macrophage exosomes, their biological functions and engineering applications in fibrosis, to provide insights for future research and engineering application.

**Key words:** macrophage; exosome; fibrosis; engineering; drug carrier

细胞可分泌多种类型的细胞外囊泡, 如凋亡小体、微囊泡和外泌体, 这些囊泡在人体的体液中广泛分布<sup>[1]</sup>。外泌体是直径 30 ~ 150 nm 的脂质双分子层囊泡, 主要由蛋白质、聚糖、脂质、DNA 和非编码 RNA 等成分构成, 已被证明在众多疾病的发生和发展中发挥重要的生物学功能<sup>[2]</sup>。

巨噬细胞在不同环境刺激下会极化为经典激

活型 (M1 型) 或替代激活型 (M2 型), 并在机体组织中参与调控炎症反应以及纤维化过程<sup>[3]</sup>。巨噬细胞外泌体 (macrophage exosomes, M-Exo) 通过携带并递送多种生物分子, 调节受损组织中的炎症环境及纤维化进程<sup>[4]</sup>。M-Exo 在多种疾病中发挥的作用已得到广泛验证, 其不仅能够充当疾病的生物标志物, 还具备潜在的治疗应用前景。

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (No.81874424)。

**作者简介:** 鄢钦文, 男, 硕士研究生, 主要从事中药药理学研究, email: 1437248383@qq.com \*通信作者: 谭洋, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药复方防治溃疡性结肠炎机制研究, email: 004746@hnu cm.edu.cn; 裴刚, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药有效成分及作用机制研究, email: 002173@hnu cm.edu.cn



本文将对 M-Exo 在纤维化过程中的作用机制及其工程化应用展开综述。

## 1 M-Exo 概述

### 1.1 M-Exo 的形成 (见图 1)

巨噬细胞的细胞质膜通过内吞作用产生内囊泡,包裹细胞膜表面的脂质、蛋白、DNA 和 miRNA 等分子,形成早期内体。内质网、高尔基体有助于早期内体的形成及物质交换。早期内体发展成熟为晚期内体,晚期内体通过限制膜内陷形成腔内囊泡 (intraluminal vesicles, ILVs), 最终转变为多囊泡小体 (multivesicular bodies, MVBs)。MVBs 成熟后,一方面可以与溶酶体或自噬体融合,继而发生降解;另一方面,部分 MVBs 在 Rab 家族蛋白的调控下与质膜融合,释放 ILVs,即外泌体<sup>[5]</sup>。当巨噬细胞溶酶体功能受损时,外泌体分泌量增多,这表明 M-Exo 的产生与溶酶体功能存在关联<sup>[6]</sup>。

MVBs 的形成涉及内体分选复合物 (endosomal sorting complex required for transport, ESCRT) 依赖性和 ESCRT 非依赖性分选机制。ESCRT 系统由 ESCRT-0、ESCRT-I、ESCRT-II、ESCRT-III 及相关蛋白组成,介导了泛素化蛋白的识别、货物的分选、囊泡与膜的分离及 ILVs 的形成。ESCRT 非依赖性机制如神经酰胺和四跨膜蛋白途径也在此过程中发挥重要作用<sup>[7]</sup>。

研究表明,胞外刺激 (如脂多糖) 可通过上调 Rab27a/b 诱导外泌体分泌,白细胞介素 (IL)-25 可逆转此效应<sup>[8]</sup>。此外,在缺氧条件下巨噬细胞释放更多外泌体<sup>[9]</sup>,外泌体的形成过程受到环境变化的调控,这一特性使其作为疾病诊断与预后判断的生物标志物也具有可行性。

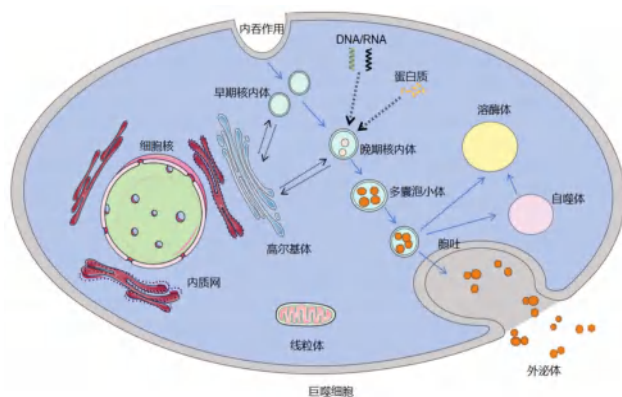


图 1 巨噬细胞外泌体的形成和发展过程<sup>[5]</sup>

Fig 1 Formation and development process of macrophage exosomes

### 1.2 M-Exo 的功能

外泌体被视作细胞间通信的重要载体。巨噬

细胞借助释放外泌体,与诸如肝癌细胞、T 细胞这类受体细胞相互作用,进而发挥生物学效应。M-Exo 通过内吞途径或与受体细胞膜上的靶向蛋白相结合,释放其内容物 (如脂质、蛋白质和 RNA), 由此对受体细胞的功能产生影响<sup>[10]</sup>。基于此, M-Exo 被认为是巨噬细胞与其他细胞之间进行通信的核心介质之一。

M-Exo 依托其生物学特征, 诸如独特的 miRNA/蛋白质构成、能够保护生物活性成分 (特别是 miRNA) 不被降解的脂质膜, 以及特异靶向能力, 在巨噬细胞调控疾病进程方面具有卓越的表现。M0、M1 和 M2 型巨噬细胞分泌的外泌体 (M0-Exo、M1-Exo、M2-Exo) 蕴含不同的生物信息, 执行与其亲代细胞表型密切相关的功能, 如调节炎症反应、呈递抗原与调控免疫反应等。研究表明, M1-Exo 中高表达的长链非编码 RNA 浆细胞瘤变异易位 1 (lncRNA PVT1) 通过下调 miRNA-186-5p 的表达, 诱导人主动脉平滑肌细胞 HA-VSMC 的炎症和焦亡<sup>[11]</sup>。而 M2-Exo 中的 miR-23a-3p 水平升高, 能够通过靶向抑制磷酸酶和张力蛋白同源物 (PTEN) 及紧密连接蛋白 1 (TJP1), 促进肝癌细胞转移, 且临床数据显示 M2-Exo 中的 miR-23a-3p 与肝癌患者术后不良预后相关, 突出显示了巨噬细胞与膀胱癌细胞之间的通信机制<sup>[12]</sup>。

综上所述, M-Exo 可调节靶基因的表达, 进而在肿瘤、炎症、纤维化等多个领域发挥重要作用 (见表 1)<sup>[12-19]</sup>。深入探索 M-Exo 的功能及其内在机制, 有望为疾病治疗挖掘新的靶点。

### 1.3 工程化 M-Exo

通过工程改造和表面修饰手段, M-Exo 可充当基因或药物递送载体, 实现靶向治疗。尽管纳米材料在药物递送系统中已广泛应用, 但人工药物载体往往存在潜在毒性和免疫原性方面的问题<sup>[20]</sup>。相比之下, 外泌体作为一种天然的递送系统, 凭借出色的生物相容性, 不会诱发长期的安全性隐患, 故而成为理想的药物载体<sup>[21]</sup>。

化疗药物多西他赛 (DTX) 具有多种不良反应。研究通过电穿孔方法将 M1-Exo 作为载体制备 DTX-M1-Exo, 发现 DTX-M1-Exo 对 4T1 荷瘤小鼠的肿瘤抑制率显著提高了, 同时降低了对器官的毒性; 在体外实验中, DTX-M1-Exo 对小鼠乳腺癌细胞 4T1 表现出更强的细胞毒性, 并诱导巨噬细胞向 M1 型分化, 增加了肿瘤中 M1 巨噬细胞的浸润<sup>[22]</sup>。

M-Exo 具有天然的肝脏靶向性, 可被肝巨噬细

表 1 M-Exo 的生物功能

Tab 1 Differences in biological functions among different types of M-Exo

| 生物功能 | 作用机制                                                                                                                          | 参考文献 |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 炎症反应 | M1-Exo 激活 M0 型巨噬细胞的核因子 (NF)- $\kappa$ B 通路, 促进炎症因子的释放                                                                         | [13] |
|      | M2 型骨髓来源巨噬细胞分泌的外泌体 (M2-Exo) 富含 miRNA-99a、miRNA-146b、miRNA-378a, 可通过抑制 NF- $\kappa$ B 和肿瘤坏死因子 (TNF- $\alpha$ ) 信号传导, 发挥抑制炎症的作用 | [14] |
| 肿瘤   | M1-Exo 通过 Bcl-2/BAX/Caspase-3 诱导膀胱癌细胞凋亡                                                                                       | [15] |
|      | M2-Exo 中 miR-23a-3p 通过抑制 PTEN 及 TJP1, 促进肝癌细胞转移                                                                                | [12] |
| 免疫调节 | M1-Exo 诱导促瘤 M2 型巨噬细胞转化为抗肿瘤 M1 型, 增加 CD8 <sup>+</sup> T 细胞水平, 缓解免疫抑制性肿瘤微环境                                                     | [16] |
|      | M2-Exo 促进巨噬细胞从促炎表型转变为抗炎表型, 介导免疫重编程                                                                                            | [17] |
| 抗原呈递 | 脾脏 F4/80 <sup>hi</sup> CD11b <sup>int</sup> 巨噬细胞吞噬死细胞, 并通过 M-Exo 将死细胞相关抗原呈递到树突状细胞, 参与后续 CD4 <sup>+</sup> T 细胞的增殖与免疫反应中        | [18] |
|      | 结核分枝杆菌感染后, 巨噬细胞将向 T 细胞呈递含有主要组织相容性复合体 II 类分子 (MHC-II) 的 M-Exo                                                                  | [19] |

胞摄取, 研究人员巧妙利用此特性, 将小干扰 RNA (siRNA)-受体相互作用蛋白激酶 3 (PIPK3) 转染至 M2-Exo 中 (M2-Exo/siRIPK3), 旨在解决 siRNA 临床应用时面临的非靶向限制, 结果显示, M2-Exo 和 M2-Exo/siRIPK3 均可改善小鼠肝损伤并抑制促炎介质分泌, 且 M2-Exo/siRIPK3 疗效更为显著, 表明 M-Exo 可作为靶向治疗肝脏疾病的药物载体<sup>[23]</sup>。因此, 通过工程化将 M-Exo 作为药物或者基因的载体, 应用于疾病诊断和治疗具有重要前景。

## 2 M-Exo 在器官纤维化中的作用

### 2.1 纤维化的概念

组织损伤后会诱发炎症反应, 在此过程中, 免疫细胞受到招募或者激活, 其中巨噬细胞在清除细胞碎片 (如凋亡中性粒细胞)、呈递抗原、协调组织修复等方面发挥着保护作用<sup>[24]</sup>。当伤口愈合顺利且炎症得到有效控制时, 炎症反应会迅速消退, 组织结构逐步恢复至正常状态。然而, 若组织损伤过重或反复遭受损伤, 炎症反应就会持续存在, 进而激活诸如肌成纤维细胞这类非免疫细胞, 促使胶原结缔组织过度积聚, 最终引发器官纤维化, 严重时甚至会导致器官衰竭<sup>[25]</sup>。

### 2.2 M-Exo 在肺纤维化中的作用

肺组织损伤往往伴随着细胞炎症反应及细胞外基质异常合成现象。当细胞外基质过度积聚, 覆盖正常肺组织区域时, 这种增生会对肺组织的固有结构造成破坏, 最终诱发肺纤维化<sup>[26]</sup>。巨噬细胞贯穿肺组织损伤与修复的各个关键阶段, 尤其是维系肺组织稳态平衡方面<sup>[27]</sup>。

硅肺是由长期吸入二氧化硅 (SiO<sub>2</sub>) 粉尘引起的致命性疾病, 特征为肺部弥漫性纤维化。研究发现, 在 SiO<sub>2</sub> 诱导的硅肺小鼠模型中, M-Exo 分泌显著增加, 且 M-Exo 通过高表达 HMGB3 蛋白, 激活单核细胞 STAT3/MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通

路, 进而促进肺部炎症<sup>[28]</sup>。在博来霉素诱导的肺纤维化模型小鼠中, M2-Exo 通过过表达 miR-129-5p, 靶向下调 STAT1, 促进肺间质成纤维细胞活化, 进一步推动肺纤维化进程<sup>[29]</sup>。M-Exo 也显示出抗肺纤维化作用。如单磷酸脂质 A 可诱导巨噬细胞向 M1 型分化并分泌 M1-Exo, M1-Exo 通过减轻肺泡上皮细胞 MLE-12 的死亡, 抑制上皮间质转化, 从而减轻辐射诱导的小鼠肺纤维化和损伤<sup>[30]</sup>。M-Exo 在肺纤维化发生发展过程中同样肩负重任, 深入探究 M-Exo 有助于探索肺纤维化的发病机制。

### 2.3 M-Exo 在肝纤维化中的作用

肝巨噬细胞主要由肝脏固有的库普弗细胞和单核细胞衍生的巨噬细胞组成<sup>[31]</sup>。在肝脏炎症调控进程中, 肝巨噬细胞担当关键调节者, 能够通过释放促纤维化因子, 如转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), 进而激活肝星状细胞 (HSC), 后者是肝脏中合成细胞外基质的主要细胞群<sup>[32]</sup>。而在这一系列细胞间的对话中, M-Exo 是巨噬细胞与靶细胞之间的重要通信载体。

研究表明, M-Exo 在 HSC 的活化中发挥重要作用。在脂多糖诱导巨噬细胞极化为 M1 型后, 对其外泌体展开分析发现, miR-155-5p、miR-500 和 lncRNA 核旁斑点组装转录本 1 (NEAT1) 表达增加, 它们能够通过激活 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路, 促进 HSC 的增殖和活化, 进而推动肝纤维化进程<sup>[33-35]</sup>。此外, M1-Exo 中高表达的 miR-423a-5p, 能够诱导小鼠肝星状细胞 (mHSC) 活化<sup>[36]</sup>。与此相对, M2-Exo 通过高表达 miR-411-5p, 下调钙调蛋白相关蛋白 1 表达, 进而抑制人 HSC 中 LX-2 的活化, 有效减缓了非酒精性脂肪肝炎早期阶段肝纤维化的发展进程<sup>[37]</sup>。综上可知, 巨噬细胞凭借 M-Exo 传递 miRNA, 调控 HSC 的活化状态, 进而对肝纤维化



的发生发展产生影响。深入研究 M-Exo, 可为后续探寻肝纤维化相关靶点指明方向。

#### 2.4 M-Exo 在心肌纤维化中的作用

在心脏受损过程中, 巨噬细胞浸润这一现象较为常见<sup>[38]</sup>。巨噬细胞在心肌损伤中发挥双重功效: 其一, 巨噬细胞会促进炎症反应, 使得心肌损伤程度进一步恶化; 其二, 巨噬细胞凭借抗炎适应性反应, 清除细胞碎片并参与到心肌组织修复中<sup>[39]</sup>。M-Exo 作为巨噬细胞的关键通信介质, 在心肌纤维化进程中扮演着重要角色。

尿毒症心肌病是慢性肾衰竭常见的并发症, 表现为心脏肥大、纤维化及炎症反应。研究发现, 尿毒症小鼠心肌中浸润巨噬细胞通过分泌富含 miR-155 的 M-Exo, M-Exo 与质膜融合导致 miR-155 被释放到心肌细胞中并抑制 FoxO3a 的转录, 促使心肌细胞焦亡, 进而加剧炎症反应, 导致心脏肥大与纤维化<sup>[40]</sup>。此外, 糖尿病环境促进心肌成纤维细胞的激活与胶原蛋白的过度沉积, 导致心肌纤维化<sup>[41]</sup>。功能失调的巨噬细胞不仅延长炎症反应, 还通过分泌 M-Exo 等纤维化介质, 促进心脏左心室纤维化重塑。有临床研究表明, 心力衰竭患者的心肌细胞中 RNA 结合蛋白人抗原 R (HuR) 表达显著增加; 进一步研究发现, 糖尿病小鼠心脏巨噬细胞通过 M-Exo 传递 HuR, 诱导成纤维细胞激活与炎症, 进而促进心脏纤维化与功能损伤<sup>[42]</sup>。心肌纤维化的发生会致使心脏结构损伤, 对心脏的收缩与舒张功能产生负面影响, 因此, 抗心肌纤维化对于心力衰竭和心律失常的治疗具备重要的临床价值。

#### 2.5 M-Exo 在肾纤维化中的作用

随着人口老龄化趋势的日益加剧, 慢性肾脏疾病的患病率不断上升。肾纤维化是慢性肾脏疾病中的普遍病理变化过程, 这一过程通常涉及肾小球或肾小管部位<sup>[43]</sup>。研究表明, 源自肾小管上皮细胞以及巨噬细胞的外泌体, 在维持肾脏正常生理功能过程中发挥着举足轻重的作用<sup>[44]</sup>。

慢性炎症可通过促进细胞衰老进而驱动肾纤维化的进展<sup>[45]</sup>。研究表明, 在血管紧张素 II 诱导的慢性肾病小鼠模型中, 巨噬细胞借助 M-Exo, 将 miR-155 传递于肾小管上皮细胞, 抑制其端粒重复结合因子 1 (TRF1) 的表达, 从而加剧细胞衰老, 进而推动炎症反应和肾纤维化的进程<sup>[46]</sup>。此外, 免疫球蛋白 A (IgA) 肾病是由 IgA 在肾小球系膜区沉积所致, 可引发肾小球间质纤维化。有研究发现, 在 IgA 刺激下, M-Exo 中 miR-146a

高表达, miR-146a 可激活集合管上皮细胞, 促使其分泌中性粒细胞明胶酶及促炎细胞因子, 加剧肾纤维化进程<sup>[47]</sup>。研究还发现, 源自髓系细胞触发受体 2 (TREM-2) 敲除小鼠的 M-Exo 能够有效抑制肾小管上皮细胞的胶原蛋白合成, 缓解小鼠的肾纤维化<sup>[48]</sup>。

#### 2.6 M-Exo 在其他纤维化中的作用

在纤维化相关研究领域, M-Exo 对腹膜纤维化、口腔黏膜下纤维化及肌腱纤维化愈合进程中的作用也有报道。

腹膜透析作为现阶段针对终末期肾病的一种常规治疗手段, 其长期应用存在着引发腹膜纤维化的潜在风险。已有研究表明, 经脂多糖诱导的巨噬细胞能够借助 M-Exo 激活腹膜间质细胞的叉头盒蛋白 C1 (Foxc1), 促使  $\beta$ -catenin/cyclin D1/C-myc 信号通路表达上调, 推动腹膜间质细胞的间皮间充质转化, 最终导致腹膜纤维化<sup>[49]</sup>。

在肌腱损伤后的修复进程中, 会引发纤维化疤痕的形成, 致使肌腱功能降低。巨噬细胞与肌腱细胞之间的通信在调节肌腱愈合过程中起着关键作用。在肌腱愈合阶段, M-Exo 中 miR-21-5p 高表达并作用于肌腱细胞, 抑制其 Smad7 表达, 进而激活 TGF- $\beta$  信号通路, 促使纤维化蛋白合成, 调控肌腱的纤维化愈合反应<sup>[50]</sup>。此外, 在屈肌腱损伤愈合过程中, M2-Exo 中环状 RNA-ep400 (circRNA-ep400) 的表达上调, circRNA-ep400 作用于肌腱细胞和成纤维细胞, 促使 miR-15b-5p 表达降低, 成纤维化生长因子 1 (FGF1)、FGF-7 和 FGF-9 表达增加, 纤维化蛋白的合成, 从而引发肌腱周围出现纤维化<sup>[51]</sup>。

在口腔黏膜下纤维化的病理进程中, 槟榔碱作为关键诱导因素, 可诱导 THP-1 单核细胞向 M1 型巨噬细胞极化。与此同时, M1-Exo 中 miR-155 水平升高, 可作用于口腔黏膜成纤维细胞, 促进其向纤维化表型转化, 合成胶原蛋白, 推动口腔黏膜下纤维化的发展<sup>[52]</sup>。

### 3 工程化 M-Exo 在纤维化中的应用 (见图 2)

近年来, 工程化修饰的外泌体在靶向治疗领域取得了显著进展。作为一种极具潜力的递送载体, 外泌体能够高效负载药物、蛋白或 RNA 等生物活性成分, 凭借其独特的生物学特性, 将负载物递送至靶部位, 进而实现对疾病的有效治疗。

在肝纤维化的治疗研究中, 工程化外泌体展现出了独特优势。有研究将氧化苦参碱负载于介孔聚多巴胺这一材料之中, 并利用 M2-Exo 对该



载药复合体进行包裹,得到 MPO,经体内外实验验证,与氧化苦参碱、载药复合体相比,MPO 在抑制 HSC 活化方面具有更突出的成效,并显著增强对小鼠肝纤维化的治疗效果<sup>[53]</sup>。

使用新型黏合性双敏感水凝胶负载 M2-Exo (M2-Exos@F127/HA-NB),可诱导大鼠骨髓间质充干细胞的成骨分化,促进纤维化和新骨的形成,以加速骨缺损愈合<sup>[54]</sup>。为有效调节异物反应并促进成骨,有研究借助同轴静电纺丝技术将 M2-Exo 锚定至具备拓扑孔结构的纳米纤维支架上 (PP-Exo),外泌体的固定使得纤维支架的纳米级粗糙度和亲水性显著增加。在小鼠颅骨缺损模型的研究中,观察到 PP-Exo 能够更显著地通过刺激 H 型血管的形成来促进新血管生成与骨再生,此外 PP-Exo 不但减轻了由纳米纤维支架引起的异物反应,还抑制了愈合过程中的过度纤维化<sup>[55]</sup>。

吡非尼酮广泛应用于肺纤维化治疗,但其常伴随胃肠道不良反应<sup>[56]</sup>。Chen 等<sup>[57]</sup>通过超声技

术将源自小鼠肺组织单核/巨噬细胞的外泌体作为吡非尼酮载体 (PDF-Exo),以靶向递送药物至肺部,结果显示 PDF-Exo 能有效抑制原代肺成纤维细胞向肌成纤维细胞分化,且在硅肺小鼠中展现更强的抗肺纤维化效果,同时避免了吡非尼酮引起的胃肠道不良反应。这一治疗效果归因于 M-Exo 优秀的药物递送方式、持续药物释放以及 M-Exo 中的生物活性分子协同效应。

随着现代科学技术的持续发展,工程化 M-Exo 依托其独特的生物学特性,高效的靶向递送能力以及良好的生物相容性等诸多优势,有望成为纤维化治疗领域的新型策略之一。然而,目前工程化 M-Exo 的相关应用尚处于探索与研发阶段,鉴于纤维化发病机制的复杂性,未来聚焦于利用 M-Exo 与特效药物、纳米材料或功能性 RNA 进行联合应用,通过协同作用实现对纤维化进程的多靶点精准干预。

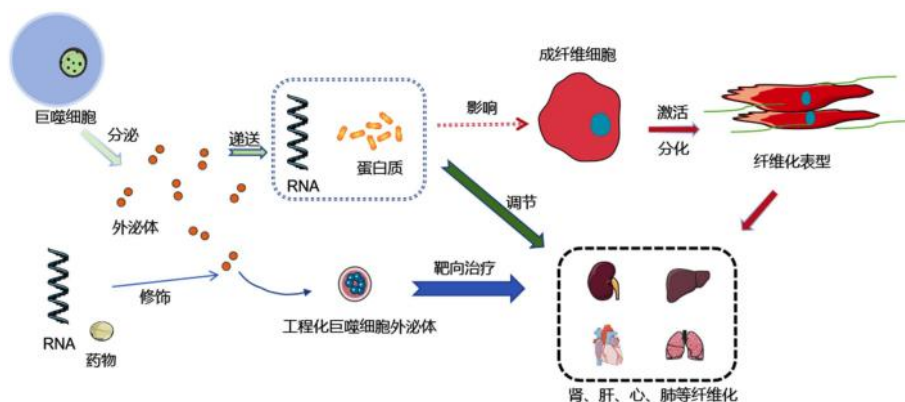


图 2 巨噬细胞外泌体调节纤维化进程及其工程化应用

Fig 2 Macrophage exosome exerts influence on fibrosis and its engineering

#### 4 结论与展望

在临床上,纤维化被视作一种高度动态变化的过程,鉴于巨噬细胞的极化会受到周围环境的影响,所以从动态的角度去考量 M-Exo 的作用显得尤为关键。在不同病理环境中,M-Exo 呈现出不同的基因组和蛋白质组特征,巨噬细胞借助 M-Exo 将自身所含蛋白质和 RNA 等,递送并作用于靶细胞如 HSC 及成纤维化细胞,影响到靶细胞的活化或上皮间质转化过程,进而促使或抑制胶原蛋白的合成,这对纤维化的发生发展具有重要的调控作用。因此以调控 M-Exo 作为切入点进行研究,有望成为抗纤维化极具潜力的创新性策略<sup>[58]</sup>。M-Exo 中蛋白质和 RNA 的异质性不仅决定了 M-Exo 在纤维化进程中的功能,还决定了它

作为生物标志物的效用,对于评估、诊断纤维化的发生与发展,以及探究其发病机制都极具潜力。

M-Exo 作为载体的研究尚处于起步阶段,但相较于人工纳米载体,M-Exo 具备优良的生物相容性、准确的靶向特性,并且无免疫原性,能够充当 RNA 以及药物的递送载体,不但可提升靶向成效,还可降低所需的有效剂量,在疾病治疗领域具有巨大的应用潜能。然而先前的研究表明,外泌体的治疗效率可能受到一些内在限制的影响,包括产量低、半衰期短、储存条件苛刻等<sup>[59]</sup>。后续研究可借助前沿的工程技术手段,对 M-Exo 展开功能化设计和靶向修饰,以期攻克现存难题,全方位提升其作为纤维化治疗剂的疗效与作用效率。

## 参考文献

- [1] 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.
- [2] Tomasetti M, Lee W, Santarelli L, et al. Exosome-derived microRNAs in cancer metabolism: possible implications in cancer diagnostics and therapy [J]. *Exp Mol Med*, 2017, 49 (1): e285.
- [3] 王绍展, 朱青霞, 陈井霞, 等. 异欧前胡素通过 NF- $\kappa$ 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.
- [4] Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function [J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2 (8): 569-579.
- [5] Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. *Science*, 2020, 367 (6478): eaau6977.
- [6] Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway [J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12 (1): 19-30.
- [7] Han QF, Li WJ, Hu KS, et al. Exosome biogenesis: machinery, regulation, and therapeutic implications in cancer [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21 (1): 207.
- [8] Li ZG, Scott MJ, Brzóška T, et al. Lung epithelial cell-derived IL-25 negatively regulates LPS-induced exosome release from macrophages [J]. *Mil Med Res*, 2018, 5 (1): 24.
- [9] Lan JQ, Sun L, Xu F, et al. M2 macrophage-derived exosomes promote cell migration and invasion in colon cancer [J]. *Cancer Res*, 2019, 79 (1): 146-158.
- [10] Shan XX, Zhang CY, Mai CT, et al. The biogenesis, biological functions, and applications of macrophage-derived exosomes [J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 715461.
- [11] Zhang JH, Zhang XL, Liu XQ, et al. M1 macrophage-derived exosome lncRNA PVT1 promotes inflammation and pyroptosis of vascular smooth muscle cells in abdominal aortic aneurysm by inhibiting miR-186-5p and regulating HMGB1 [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2024, 24 (3): 302-320.
- [12] Lu YW, Han GY, Zhang Y, et al. M2 macrophage-secreted exosomes promote metastasis and increase vascular permeability in hepatocellular carcinoma [J]. *Cell Commun Signal*, 2023, 21 (1): 299.
- [13] Wang PP, Wang HH, Huang QQ, et al. Exosomes from M1-polarized macrophages enhance paclitaxel antitumor activity by activating macrophages-mediated inflammation [J]. *Theranostics*, 2019, 9 (6): 1714-1727.
- [14] Bouchareychas L, Duong P, Covarrubias S, et al. Macrophage exosomes resolve atherosclerosis by regulating hematopoiesis and inflammation via microRNA cargo [J]. *Cell Rep*, 2020, 32 (2): 107881.
- [15] Tang ZL, Tang CY, Sun C, et al. M1 macrophage-derived exosomes synergistically enhance the anti-bladder cancer effect of gemcitabine [J]. *Aging (Albany NY)*, 2022, 14 (18): 7364-7377.
- [16] Wang D, Qiu GH, Zhu XQ, et al. Macrophage-inherited exosome excise tumor immunosuppression to expedite immune-activated ferroptosis [J]. *J Immunother Cancer*, 2023, 11 (5): e006516.
- [17] Cui Y, Hong SB, Xia Y, et al. Melatonin engineering M2 macrophage-derived exosomes mediate endoplasmic reticulum stress and immune reprogramming for periodontitis therapy [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2023, 10 (27): e2302029.
- [18] Xu YP, Liu Y, Yang CQ, et al. Macrophages transfer antigens to dendritic cells by releasing exosomes containing dead-cell-associated antigens partially through a ceramide-dependent pathway to enhance CD4<sup>+</sup> T-cell responses [J]. *Immunology*, 2016, 149 (2): 157-171.
- [19] Ramachandra L, Qu Y, Wang Y, et al. Mycobacterium tuberculosis synergizes with ATP to induce release of microvesicles and exosomes containing major histocompatibility complex class II molecules capable of antigen presentation [J]. *Infect Immun*, 2010, 78 (12): 5116-5125.
- [20] 张颖煜, 赵琳琳, 李良骁, 等. 纳米材料靶向药物递送系统在骨关节炎治疗中的研究进展 [J]. 中国生物医学工程学报, 2024, 43 (3): 369-376.
- [21] 王强, 鲍倩倩, 陈卫东, 等. 外泌体负载甲氨蝶呤递药体系的构建及表征 [J]. 中南药学, 2023, 21 (4): 839-843.
- [22] Zhao YM, Zheng YL, Zhu Y, et al. Docetaxel-loaded M1 macrophage-derived exosomes for a safe and efficient chemioimmunotherapy of breast cancer [J]. *J Nanobiotechnology*, 2022, 20 (1): 359.
- [23] Zhang L, Liu M, Sun Q, et al. Engineering M2 type macrophage-derived exosomes for autoimmune hepatitis immunotherapy via loading siRIPK3 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 171: 116161.
- [24] Moretti L, Stalfort J, Barker TH, et al. The interplay of fibroblasts, the extracellular matrix, and inflammation in scar formation [J]. *J Biol Chem*, 2022, 298 (2): 101530.
- [25] Smolgovsky S, Theall B, Wagner N, et al. Fibroblasts and immune cells: at the crossroad of organ inflammation and fibrosis [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2024, 326 (2): H303-H316.
- [26] Liu G, Philp AM, Corte T, et al. Therapeutic targets in lung tissue remodelling and fibrosis [J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 225: 107839.
- [27] Zhou BW, Liu HM, Xu F, et al. The role of macrophage polarization and cellular crosstalk in the pulmonary fibrotic microenvironment: a review [J]. *Cell Commun Signal*, 2024, 22 (1): 172.
- [28] Qin XF, Niu ZY, Chen H, et al. Macrophage-derived exosomal HMGB3 regulates silica-induced pulmonary inflammation by promoting M1 macrophage polarization and recruitment [J]. *Part Fibre Toxicol*, 2024, 21 (1): 12.
- [29] Qian QZ, Ma QH, Wang B, et al. Downregulated miR-129-5p expression inhibits rat pulmonary fibrosis by up-regulating STAT1 gene expression in macrophages [J]. *Int*

- Immunopharmacol, 2022, 109: 108880.
- [30] Guo XD, Du LH, Ma N, et al. Monophosphoryl lipid A ameliorates radiation-induced lung injury by promoting the polarization of macrophages to the M1 phenotype [J]. J Transl Med, 2022, 20 (1): 597.
- [31] Elchaninov AV, Fatkhudinov TK, Vishnyakova PA, et al. Phenotypical and functional polymorphism of liver resident macrophages [J]. Cells, 2019, 8 (9): 1032.
- [32] 梁耀丹, 井洁, 张泰程, 等. 白藜芦醇通过巨噬细胞源性外泌体调节肝星状细胞活化对肝纤维化的影响 [J]. 广西医科大学学报, 2023, 40 (12): 1949-1955.
- [33] 林嘉宜, 娄安妮, 李旭. 脂多糖刺激巨噬细胞分泌含 miR-155-5p 的外泌体促进肝星状细胞的活化及迁移 [J]. 南方医科大学学报, 2023, 43 (6): 994-1001.
- [34] Shu B, Zhang RZ, Zhou YX, et al. METTL3-mediated macrophage exosomal NEAT1 contributes to hepatic fibrosis progression through Sp1/TGF- $\beta$ 1/Smad signaling pathway [J]. Cell Death Discov, 2022, 8 (1): 266.
- [35] Chen LS, Huang Y, Duan ZX, et al. Exosomal miR-500 derived from lipopolysaccharide-treated macrophage accelerates liver fibrosis by suppressing MFN2 [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 716209.
- [36] Hu ZQ, Chen G, Yan CT, et al. Autophagy affects hepatic fibrosis progression by regulating macrophage polarization and exosome secretion [J]. Environ Toxicol, 2023, 38 (7): 1665-1677.
- [37] Wan ZP, Yang XA, Liu XQ, et al. M2 macrophage-derived exosomal microRNA-411-5p impedes the activation of hepatic stellate cells by targeting CAMSAP1 in NASH model [J]. iScience, 2022, 25 (7): 104597.
- [38] Chen B, Frangogiannis NG. Macrophages in the remodeling failing heart [J]. Circ Res, 2016, 119 (7): 776-778.
- [39] 周子程, 张润峰. 巨噬细胞在心肌梗死中的作用研究进展 [J]. 陕西医学杂志, 2024, 53 (5): 714-717.
- [40] Wang B, Wang ZM, Ji JL, et al. Macrophage-derived exosomal miR-155 regulating cardiomyocyte pyroptosis and hypertrophy in uremic cardiomyopathy [J]. JACC Basic Transl Sci, 2020, 5 (2): 148-166.
- [41] 杨惠杰. 糖尿病对心脏巨噬细胞功能的影响 [D]. 长沙: 中南大学, 2023.
- [42] Govindappa PK, Patil M, Garikipati VNS, et al. Targeting exosome-associated human antigen R attenuates fibrosis and inflammation in diabetic heart [J]. FASEB J, 2020, 34 (2): 2238-2251.
- [43] 杨依霖. 基于肾纤维化早期诊断的研究及探索 [D]. 太原: 山西医科大学, 2023.
- [44] Ståhl AL, Johansson K, Mossberg M, et al. Exosomes and microvesicles in normal physiology, pathophysiology, and renal diseases [J]. Pediatr Nephrol, 2019, 34 (1): 11-30.
- [45] Luo P, Zhang HX, Liang Y, et al. Pentraxin 3 plays a key role in tubular cell senescence and renal fibrosis through inducing  $\beta$ -catenin signaling [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2023, 1869 (7): 166807.
- [46] Yin Q, Tang TT, Lu XY, et al. Macrophage-derived exosomes promote telomere fragility and senescence in tubular epithelial cells by delivering miR-155 [J]. Cell Commun Signal, 2024, 22 (1): 357.
- [47] Pawluczyk IZA, Soares MSF, Barratt WA, et al. Macrophage interactions with collecting duct epithelial cells are capable of driving tubulointerstitial inflammation and fibrosis in immunoglobulin A nephropathy [J]. Nephrol Dial Transplant, 2020, 35 (11): 1865-1877.
- [48] Xiao ZH, Wang YJ, Chen YY, et al. Exosomes derived from TREM-2 knocked-out macrophages alleviated renal fibrosis via HSPa1b/AKT pathway [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2025, 328 (1): F131-F151.
- [49] Shan Y, Yu MS, Dai HB, et al. The role of macrophage-derived exosomes in reversing peritoneal fibrosis: insights from astragaloside IV [J]. Phytomedicine, 2024, 129: 155683.
- [50] Cui HM, He Y, Chen S, et al. Macrophage-derived miRNA-containing exosomes induce peritendinous fibrosis after tendon injury through the miR-21-5p/Smad7 pathway [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2019, 14: 114-130.
- [51] Yu YX, Sun BB, Wang ZY, et al. Exosomes from M2 macrophage promote peritendinous fibrosis posterior tendon injury via the MiR-15b-5p/FGF-1/7/9 pathway by delivery of circRNA-Ep400 [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 595911.
- [52] 黄永祺. 槟榔碱通过巨噬细胞外泌体 miR-155 促进口腔黏膜下纤维化 [D]. 广州: 南方医科大学, 2024.
- [53] Tang ZH, Li XJ, Tian L, et al. Mesoporous polydopamine based biomimetic nanodrug ameliorates liver fibrosis via antioxidation and TGF- $\beta$ /SMADS pathway [J]. Int J Biol Macromol, 2023, 248: 125906.
- [54] Zhao XY, Chen XM, Deng YX, et al. A novel adhesive dual-sensitive hydrogel for sustained release of exosomes derived from M2 macrophages promotes repair of bone defects [J]. Mater Today Bio, 2023, 23: 100840.
- [55] Jin SE, Wen J, Zhang Y, et al. M2 macrophage-derived exosome-functionalized topological scaffolds regulate the foreign body response and the coupling of angio/osteoclast/osteogenesis [J]. Acta Biomater, 2024, 177: 91-106.
- [56] 杨雪容, 郭璐, 何星, 等. 吡非尼酮治疗肺纤维化血药浓度与不良反应监测 [J]. 中南药学, 2023, 21 (1): 243-248.
- [57] Chen Z, Yun X, Tian JQ, et al. Engineering macrophage-derived exosome to deliver pirfenidone: a novel approach to combat silicotic pulmonary fibrosis [J]. Adv Healthc Mater, 2024: e2403227.
- [58] Ma C, Wang C, Zhang YF, et al. Phillygenin inhibited M1 macrophage polarization and reduced hepatic stellate cell activation by inhibiting macrophage exosomal miR-125b-5p [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 159: 114264.
- [59] 张茜, 鲁卫东. 改善外泌体应用局限性的研究进展 [J]. 中南药学, 2023, 21 (7): 1877-1882.

(收稿日期: 2025-01-16; 修回日期: 2025-03-20)



# 油橄榄叶化学成分和药理作用的研究进展及其质量标志物的预测分析

吴末姣<sup>1</sup>, 葛晶鑫<sup>1</sup>, 杨艳芳<sup>1, 2, 3</sup>, 吴和珍<sup>1, 2, 3\*</sup> (1. 湖北中医药大学药学院, 中药资源与中药化学湖北省重点实验室, 武汉 430065; 2. 现代中药与民族药湖北省工程研究中心, 武汉 430065; 3. 湖北时珍实验室, 武汉 430065)

**摘要:** 油橄榄叶主要含有萜类、黄酮类、苯丙素类及多酚类等多种类型的化合物, 具有抗炎、抗氧化、降压、降糖、降脂及抗肿瘤等多种药理作用。本综述基于国内外研究, 对油橄榄叶的化学成分、药理作用进行归纳总结, 并对油橄榄叶的质量标志物 (Q-Marker) 进行预测分析。初步预测橄榄苦苷、羟基酪醇、芹菜素-7-O-葡萄糖苷和木犀草素-7-O-葡萄糖苷等有作为油橄榄叶质量标志物的潜力, 为更好地开发和利用油橄榄叶提供参考。

**关键词:** 油橄榄叶; 化学成分; 药理作用; 质量标志物

中图分类号: R284.1, R285 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)06-1726-09  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.034

## Chemical compositions and pharmacological effect of olea europaea leaves and prediction of quality markers

WU Mo-jiao<sup>1</sup>, GE Jing-xin<sup>1</sup>, YANG Yan-fang<sup>1, 2, 3</sup>, WU He-zhen<sup>1, 2, 3\*</sup> (1. Hubei Key Laboratory of Resources and Chemistry of Chinese Medicine, School of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065; 2. Modern Engineering Research Center of Traditional Chinese Medicine and Ethnic Medicine of Hubei Province, Wuhan 430065; 3. Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430065)

**Abstract:** Olea europaea leaves mainly contain various types of chemical compounds such as terpenes, flavonoids, phenylpropanoids and polyphenols, and possess multiple pharmacological effects including anti-inflammatory, antioxidant, antihypertensive, hypoglycemic, lipid-lowering and anti-tumour effects. Based on domestic and international research, this review summarized the chemical compositions and pharmacological effects of olea europaea leaves, and predicted the quality marker (Q-Marker) of olea europaea leaves. Oleuropein, hydroxytyrosol, apigenin-7-O-glucoside and lignan-7-O-glucoside may serve as Q-Marker for olea europaea leaves, which provides a reference for the development and utilization of olea europaea leaves.

**Key words:** olea europaea leaf; chemical composition; pharmacological effect; quality marker

油橄榄即木樨榄 (*Olea europaea* L.), 为木樨科 (Oleaceae) 木樨榄属 (*Olea* L.) 的常绿乔木, 是著名的亚热带果树, 其果实油橄榄果可以生产橄榄油, 有较大的经济价值<sup>[1]</sup>, 人们在采收油橄榄果的过程中, 大量的油橄榄叶也一并摘下, 被当作废物扔掉, 造成资源的严重浪费<sup>[2]</sup>。

现代药理学研究表明, 油橄榄叶含有大量的生物活性化合物, 如橄榄苦苷、羟基酪醇、木犀草苷等, 具有抗氧化、降压、降糖、降脂、抗肿

瘤和保护脏器及骨骼等多种药理作用。本综述在现有报道的基础上对油橄榄叶的化学成分和药理作用进行更全面的归纳, 并对油橄榄叶的质量标志物进行了预测分析, 以期合理地开发和利用油橄榄叶提供参考。

### 1 油橄榄叶的化学成分

油橄榄叶富含多种类型的活性化合物, 包括萜类及其衍生物、黄酮类、苯丙素类、多酚类和酚酸类等。

**基金项目:** 国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项 (No.2017YFC1701000)。

**作者简介:** 吴末姣, 女, 硕士研究生, 主要从事中药的品种、质量及资源的开发, email: 15629015752@163.com \*通信作者: 吴和珍, 男, 博士研究生导师, 主要从事中药的品种、质量及资源的开发, email: hezh\_wu@163.com

### 1.1 萜类及其衍生物

萜类及其衍生物在油橄榄叶中普遍存在,其中裂环烯醚萜、五环三萜及萜烯占比较大。

**1.1.1 裂环烯醚萜类** 裂环烯醚萜类化合物在植物中分布广泛,具有降脂、降糖、抗炎镇痛、抗肿瘤以及神经保护等多种药理作用<sup>[1-3]</sup>。油橄榄叶中所含的裂环烯醚萜类化合物的信息见表 1,结构式见图 1。

表 1 油橄榄叶中的裂环烯醚萜类化学成分

| 编号 | 名称                                      | 分子式                                             | 文献  |
|----|-----------------------------------------|-------------------------------------------------|-----|
| 1  | 女贞苷 (ligstroside)                       | C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>12</sub> | [1] |
| 2  | 橄榄苦苷 (oleuropein)                       | C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>13</sub> | [1] |
| 3  | 断氧化马钱子苷                                 | C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub> | [5] |
| 4  | 脱甲基橄榄苦苷 (demethyleuropein)              | C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub> | [6] |
| 5  | 榄香酸                                     | C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>  | [6] |
| 6  | 女贞子苷元                                   | C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>  | [6] |
| 7  | 木樨榄苷 -11- 甲酯                            | C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub> | [6] |
| 8  | 油酸甘油酯                                   | C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>  | [6] |
| 9  | 对羟基苯乙醇 - 榄香酸二酯                          | C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>  | [6] |
| 10 | 橄榄苦苷元                                   | C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>  | [6] |
| 11 | dialdehydic form of oleuropein aglycon  | C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>  | [6] |
| 12 | dialdehydic form of ligstroside aglycon | C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>  | [6] |
| 13 | 二甲基油糖苷                                  | C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>11</sub> | [4] |
| 14 | 断马钱子苷                                   | C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub> | [4] |
| 15 | 断氧化马钱苷酸                                 | C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> | [4] |
| 16 | 毛蕊花糖苷 (verbascoside)                    | C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub> | [4] |
| 17 | 草莓糖苷                                    | C <sub>25</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub> | [7] |
| 18 | 10- 羟基油酸二甲酯                             | C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub> | [7] |
| 19 | 马钱苷酸                                    | C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub> | [7] |

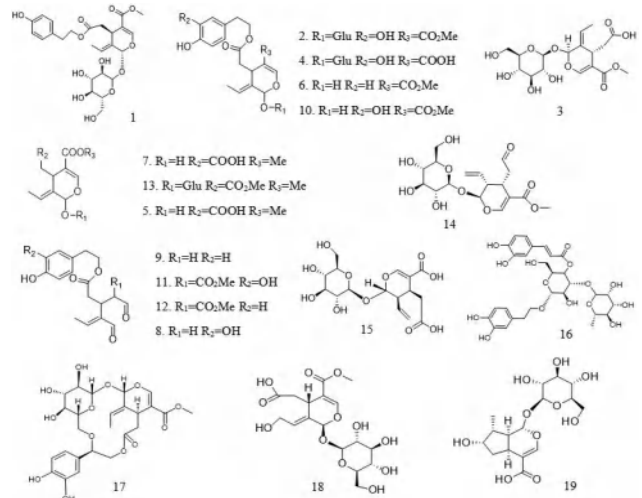


图 1 油橄榄叶中裂环烯醚萜类化合物的结构式

Fig 1 Chemical structure of secoiridoids from olea europaea leaves

**1.1.2 五环三萜类** 五环三萜类化合物在油橄榄叶中的含量较高,代表性化合物有齐墩果酸、熊果酸和马斯里酸等,化合物的信息见表 2,结构式见图 2。

**1.1.3 萜烯类** 萜烯是油橄榄叶挥发油中的主要成分,此类化合物的信息见表 3,结构式见图 3。

### 1.2 黄酮类

黄酮类化合物可分为黄酮、黄烷酮、黄酮醇、黄烷醇等多种类型<sup>[11]</sup>,在油橄榄叶中大多以苷元或者糖基化的形式存在,具体化合物的信息见表 4,结构式见图 4。

表 2 油橄榄叶中的五环三萜类化学成分

| Tab 2 Chemical constituents of pentacyclic triterpenoids from olea europaea leaves |      |                                                |     |    |                 |                                                |     |
|------------------------------------------------------------------------------------|------|------------------------------------------------|-----|----|-----------------|------------------------------------------------|-----|
| 编号                                                                                 | 名称   | 分子式                                            | 文献  | 编号 | 名称              | 分子式                                            | 文献  |
| 20                                                                                 | 齐墩果酸 | C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub> | [1] | 27 | 2A, 19A- 二羟基熊果酸 | C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>5</sub> | [7] |
| 21                                                                                 | 马斯里酸 | C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub> | [1] | 28 | 齐墩果酮酸           | C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub> | [7] |
| 22                                                                                 | 熊果醇  | C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub> | [1] | 29 | 科罗素酸            | C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub> | [8] |
| 23                                                                                 | 熊果酸  | C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub> | [1] | 30 | β- 香树素          | C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O              | [9] |
| 24                                                                                 | 白桦脂酸 | C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub> | [1] | 31 | 高根二醇            | C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub> | [9] |
| 25                                                                                 | 积雪草酸 | C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>5</sub> | [5] | 32 | 脱氢山楂酸           | C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub> | [9] |
| 26                                                                                 | 山楂酸  | C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub> | [5] |    |                 |                                                |     |

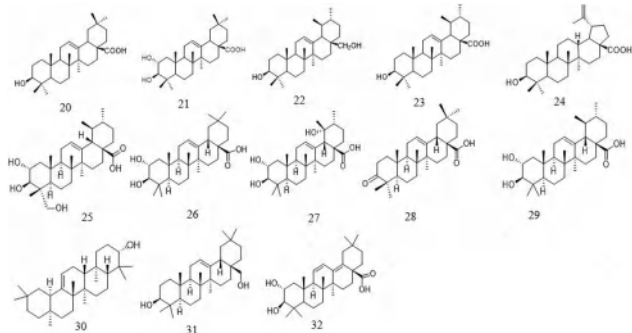


图 2 油橄榄叶中五环三萜类化合物的结构式

Fig 2 Chemical structure of pentacyclic triterpenoids from olea europaea leaves

表 3 油橄榄叶中的萜烯类化学成分

| Tab 3 Chemical constituents of terpenoids from olea europaea leaves |        |                                 |      |    |           |                                   |      |
|---------------------------------------------------------------------|--------|---------------------------------|------|----|-----------|-----------------------------------|------|
| 编号                                                                  | 名称     | 分子式                             | 文献   | 编号 | 名称        | 分子式                               | 文献   |
| 33                                                                  | α- 蒎烯  | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> | [10] | 42 | β- 芹子烯    | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>   | [10] |
| 34                                                                  | β- 蒎烯  | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> | [10] | 43 | α- 芹子烯    | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>   | [10] |
| 35                                                                  | α- 水芹烯 | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> | [10] | 44 | α- 金合欢烯   | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>   | [10] |
| 36                                                                  | 柠檬烯    | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> | [10] | 45 | 芳樟醇       | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O | [10] |
| 37                                                                  | β- 榄香烯 | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> | [10] | 46 | 3- 蒎烯     | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>   | [10] |
| 38                                                                  | α- 古芸烯 | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> | [10] | 47 | 1, 8- 桉叶素 | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O | [10] |
| 39                                                                  | β- 石竹烯 | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> | [10] | 48 | α- 古巴烯    | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>   | [10] |
| 40                                                                  | α- 石竹烯 | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> | [10] | 49 | δ- 杜松烯    | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>   | [10] |
| 41                                                                  | 马兜铃烯   | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> | [10] |    |           |                                   |      |

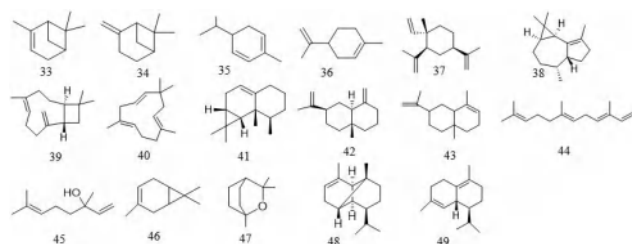


图 3 油橄榄叶中萜烯类化合物的结构式

Fig 3 Chemical structure of terpenoids from olea europaea leaves

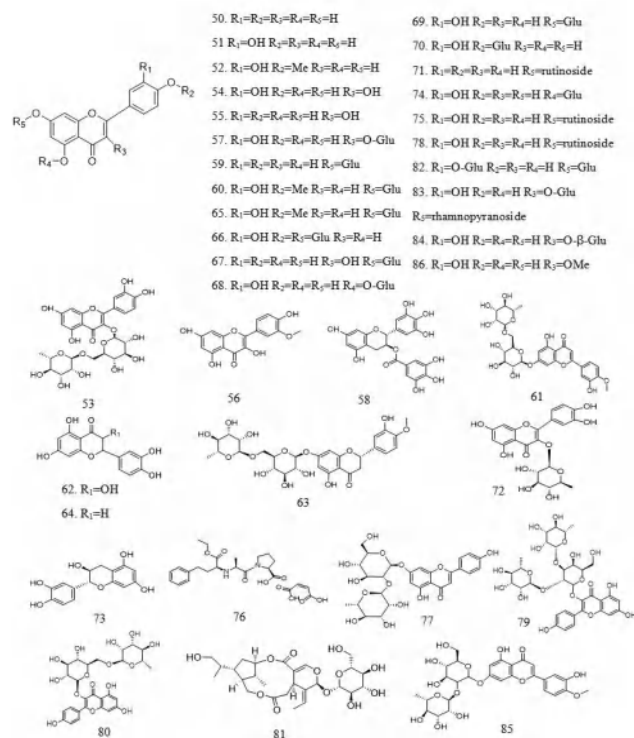


图 4 油橄榄叶中黄酮类化合物结构式

Fig 4 Chemical structure of flavonoids from olea europaea leaves

### 1.3 苯丙素类

油橄榄叶中苯丙素类化合物有咖啡酸、桂皮酸及阿魏酸等，具体化合物信息见表 5，结构式见图 5。

### 1.4 多酚类

油橄榄叶中多酚类化合物有羟基酚醇、酚醇及焦糖酸等，具体化合物信息见表 6，结构式见图 6。

### 1.5 酚酸类

酚酸广泛分布于植物的根、茎、叶及种子中。油橄榄叶中代表性的酚酸类化合物有香草酸、羟基肉桂酸、芥子酸等，具体信息见表 7，结构式见图 7。

### 1.6 其他类

研究者还从油橄榄叶中鉴定出其他类型的化合物，具体信息见表 8，结构式见图 8。

表 4 油橄榄叶中的黄酮类化学成分

Tab 4 Chemical constituents of flavonoids from olea europaea leaves

| 编号 | 名称                                       | 分子式                                                           | 文献   |
|----|------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|------|
| 50 | 芹菜素                                      | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>                | [1]  |
| 51 | 木犀草素                                     | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>                | [1]  |
| 52 | 香叶木素                                     | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>                | [1]  |
| 53 | 芦丁                                       | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>               | [1]  |
| 54 | 槲皮素                                      | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>                | [1]  |
| 55 | 山柰酚                                      | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>                | [1]  |
| 56 | 异鼠李素                                     | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>                | [1]  |
| 57 | 槲皮素-3-O-葡萄糖苷                             | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>               | [1]  |
| 58 | 表没食子儿茶素没食子酸酯                             | C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>               | [1]  |
| 59 | 芹菜素-7-O-葡萄糖苷                             | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>               | [1]  |
| 60 | 香叶木素-7-O-葡萄糖苷                            | C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>               | [1]  |
| 61 | 香叶木苷                                     | C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>               | [1]  |
| 62 | 花旗松素                                     | C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>                | [1]  |
| 63 | 橙皮苷                                      | C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>               | [1]  |
| 64 | 圣草酚                                      | C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>                | [1]  |
| 65 | 金圣草素-7-O-葡萄糖苷                            | C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>               | [1]  |
| 66 | 木犀草素-7, 4'-O-葡萄糖苷                        | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>               | [1]  |
| 67 | 山柰酚-7-O-葡萄糖苷                             | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>               | [5]  |
| 68 | 槲皮素-3-葡萄糖苷                               | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>               | [5]  |
| 69 | 木犀草素-7-O-葡萄糖苷 / 木犀草苷 (cynaroside)        | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>               | [8]  |
| 70 | 木犀草素-4'-O-葡萄糖苷                           | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>               | [8]  |
| 71 | 芹菜素-7-O-芸香糖苷                             | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>               | [8]  |
| 72 | 槲皮苷                                      | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>               | [1]  |
| 73 | 儿茶素                                      | C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>                | [1]  |
| 74 | 木犀草素-5-O-葡萄糖苷                            | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>               | [12] |
| 75 | 槲皮素-7-O-芸香糖苷                             | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>               | [12] |
| 76 | 马来酸依那普利 (olivin)                         | C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> | [13] |
| 77 | 野漆树苷                                     | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>               | [7]  |
| 78 | 木犀草素-7-O-芸香糖苷                            | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>               | [7]  |
| 79 | 毛里求斯排草素                                  | C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>19</sub>               | [7]  |
| 80 | 茨菲醇-3-O-芸香糖苷                             | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>               | [7]  |
| 81 | 迎春花素                                     | C <sub>26</sub> H <sub>38</sub> O <sub>12</sub>               | [7]  |
| 82 | 木犀草素-3', 7-二-O-葡萄糖苷                      | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>               | [8]  |
| 83 | 槲皮素-3-O-葡萄糖苷-7-O-鼠李糖苷                    | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>               | [8]  |
| 84 | 槲皮素-3β-D-葡萄糖苷 (quercetin 3β-D-glucoside) | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>               | [8]  |
| 85 | 新薯蓣素 (neodiosmin)                        | C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>               | [8]  |
| 86 | 3-O-甲基槲皮素 (3-O-methylquercetin)          | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>                | [8]  |

## 2 油橄榄叶的药理作用

油橄榄是木樨榄属最常见且分布最广泛的一种经济作物。相关研究表明，油橄榄叶具有抗炎、抗氧化、抑菌、抗肥胖、降血脂、降血压、降血糖和抗肿瘤等多种药理作用<sup>[18]</sup>。

### 2.1 抗炎

炎症是组织损伤或感染引发的重要防御反应，受免疫系统调节，在许多疾病的发生中至关重要。炎症反应过度激活，能引发一系列疾病。有研究证实，油橄榄叶中的活性成分能有效降低白细胞介素 (interleukin, IL) -1α (IL-1α)、IL-2 及肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) -α 等炎症



表 5 油橄榄叶中的苯丙素类化学成分

Tab 5 Chemical constituents of phenylpropanoids from olea europaea leaves

| 编号 | 名称  | 分子式                                            | 文献  | 编号 | 名称   | 分子式                                            | 文献  |
|----|-----|------------------------------------------------|-----|----|------|------------------------------------------------|-----|
| 87 | 咖啡酸 | C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>   | [1] | 90 | 七叶苷  | C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub> | [1] |
| 88 | 桂皮酸 | C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>   | [1] | 91 | 绿原酸  | C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub> | [8] |
| 89 | 阿魏酸 | C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> | [1] | 92 | 没食子酸 | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>   | [8] |

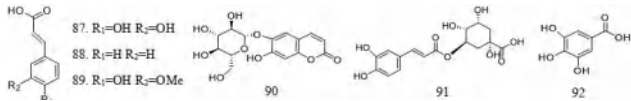


图 5 油橄榄叶中苯丙素类化合物的结构式

Fig 5 Chemical structure of phenylpropanoids from olea europaea leaves

表 6 油橄榄叶中的多酚类化学成分

Tab 6 Chemical constituents of polyphenols from olea europaea leaves

| 编号 | 名称   | 分子式                                            | 文献  | 编号  | 名称            | 分子式                                             | 文献   |
|----|------|------------------------------------------------|-----|-----|---------------|-------------------------------------------------|------|
| 93 | 羟基酚醇 | C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>  | [1] | 97  | 羟基酚醇 4-O-葡萄糖苷 | C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub>  | [5]  |
| 94 | 酚醇   | C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>  | [1] | 98  | 橄榄苦苷酸         | C <sub>25</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub> | [7]  |
| 95 | 焦苯酸  | C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>   | [1] | 99  | 羟基酚醇醋酸酯       | C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>  | [14] |
| 96 | 橄榄裂环 | C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub> | [7] | 100 | 红景天苷          | C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>  | [15] |

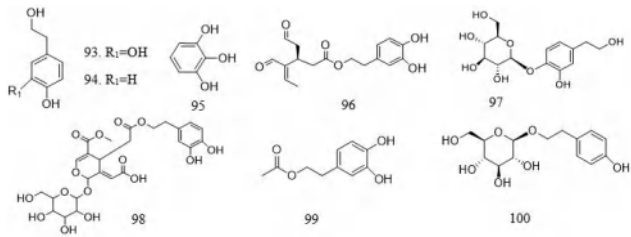


图 6 油橄榄叶中的多酚类化合物的结构式

Fig 6 Chemical structure of polyphenols from olea europaea leaves

表 7 油橄榄叶中的酚酸类化学成分

Tab 7 Chemical constituents of phenolic acids from olea europaea leaves

| 编号  | 名称                        | 分子式                                            | 文献   |
|-----|---------------------------|------------------------------------------------|------|
| 101 | 香草酸                       | C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>   | [1]  |
| 102 | 欧洲橄榄酸 8-O-葡萄糖苷            | C <sub>16</sub> H <sub>26</sub> O <sub>8</sub> | [7]  |
| 103 | 4-羟基肉桂酸 (4-coumaric acid) | C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>   | [8]  |
| 104 | 芥子酸 (sinapinic acid)      | C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub> | [8]  |
| 105 | 3-羟基-4-甲氧基苯甲酸             | C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>   | [16] |
| 106 | 3, 4-二羟基苯甲酸               | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>   | [16] |
| 107 | 肉桂酸                       | C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>   | [16] |

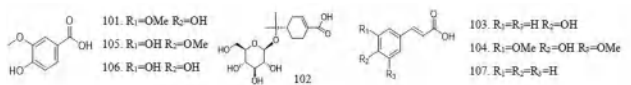


图 7 油橄榄叶中的酚酸类化合物的结构式

Fig 7 Chemical structure of phenolic acids from olea europaea leaves

因子的表达，抑制人体炎症反应<sup>[19]</sup>。

Hong 等<sup>[20]</sup>采用巨噬细胞样细胞系和大鼠关节炎模型，发现油橄榄叶乙醇提取物能明显降低脂多糖介导的炎症介质一氧化氮（nitric oxide，NO）和前列腺素 E<sub>2</sub>（prostaglandin E<sub>2</sub>，PGE<sub>2</sub>）的产生，并

表 8 油橄榄叶中的其他类化学成分

Tab 8 Chemical constituents of other constituents from olea europaea leaves

| 编号  | 名称         | 分子式                                             | 文献   |
|-----|------------|-------------------------------------------------|------|
| 108 | nuzhenal A | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>  | [7]  |
| 109 | 红景天苷       | C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>  | [7]  |
| 110 | 桂皮苷 H      | C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>11</sub> | [7]  |
| 111 | 木樨榄苷二甲酯    | C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>11</sub> | [7]  |
| 112 | 松果菊苷       | C <sub>35</sub> H <sub>46</sub> O <sub>20</sub> | [7]  |
| 113 | 顺乙酸-3-己烯酯  | C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>   | [7]  |
| 114 | 女贞子酸       | C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>14</sub> | [7]  |
| 115 | 吐叶醇        | C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub>  | [7]  |
| 116 | 大马酮        | C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O               | [7]  |
| 117 | 特女贞苷       | C <sub>31</sub> H <sub>42</sub> O <sub>17</sub> | [7]  |
| 118 | 肉豆蔻酸       | C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>  | [7]  |
| 119 | 油酸         | C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>  | [7]  |
| 120 | 橄榄酸        | C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>  | [7]  |
| 121 | 香叶醇        | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O               | [17] |

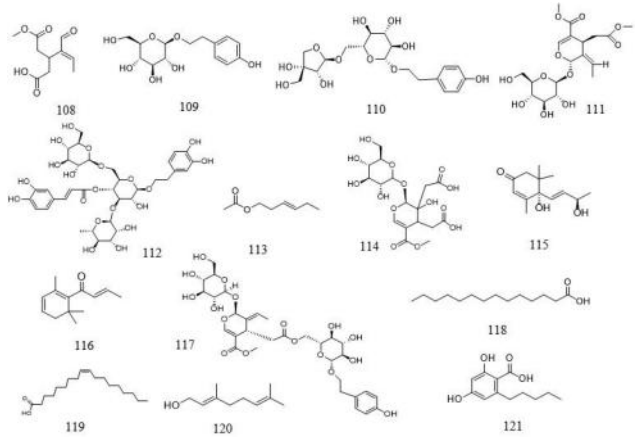


图 8 油橄榄叶中其他化合物的结构式

Fig 8 Chemical structures of others from olea europaea leaves

缓解弗氏完全佐剂诱导的关节炎大鼠爪肿胀及疼痛症状。表明该提取物可能调节 IL-6、诱导型 NO 合成酶（inducible nitric oxide synthase，iNOS）和基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinases，MMPs）的基因表达及炎症信号的激活，实现抗炎和抗风湿作用；De Cicco 等<sup>[21]</sup>使用肥胖诱导炎症的体外模型探索油橄榄叶提取物抗炎活性，发现该提取物能显著抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、NO 和 PGE<sub>2</sub> 等促炎介质，同时增强抗炎细胞因子 IL-10 的表达，并通过调节 NRF-2-KEAP1 通路降低巨噬细胞的氧化应激水平，能调节相关的核因子  $\kappa$ B（nuclear factor kappa-B，NF- $\kappa$ B）和过氧化酶体增殖物激活受体  $\gamma$ （peroxisome proliferator-activated receptors  $\gamma$ ，PPAR $\gamma$ ）信号通路，诱导巨噬细胞发生从具有强烈促炎特性的 M1 表型向炎症缓和、具备抗炎与组织修复能力的 M2 表型的转化，优化机体炎症平衡。

## 2.2 抗氧化

Šimat 等<sup>[22]</sup>利用不同方法测定不同地区 6 种油橄榄叶的抗氧化活性，发现这 6 种油橄榄叶对

DPPH 自由基的清除效果相似且清除率高(抑制率为 78.3% ~ 88.83%), 6 种油橄榄叶提取物的过氧自由基清除能力也非常强, 为  $49.71 \sim 78.19 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Trolox 等效浓度(trolox equivalent, TE); Rouibah 等<sup>[23]</sup>在 Wistar 大鼠的实验性哮喘模型中, 发现油橄榄叶提取物能改善哮喘的抗氧化状态; 原姣姣等<sup>[24]</sup>发现油橄榄叶提取物在 DPPH 自由基清除力方面, 呈现羟基酪醇>橄榄苦苷>油橄榄叶提取物的强弱关系。

### 2.3 抑菌

Moudache 等<sup>[25]</sup>通过肉汤微量稀释法, 比较了油橄榄叶提取物及其根茎甲醇提取物的体外抗菌活性, 前者抑制圈直径为  $10.55 \sim 22.36 \text{ mm}$ , 后者抑制圈直径为  $11.42 \sim 17.30 \text{ mm}$ , 表明油橄榄叶提取物抑菌效果更佳; Aliabadi 等<sup>[26]</sup>等筛选了油橄榄叶水提物对病原菌(金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌及蜡样芽孢杆菌)的抗菌活性, 发现其对鼠伤寒沙门氏菌抑制效果最好, 最大抑菌量抑制圈直径达  $11.5 \text{ mm}$ ; Gökmen 等<sup>[27]</sup>通过微量稀释和圆盘扩散评估油橄榄叶提取物对 10 种细菌的抗菌活性, 发现油橄榄叶提取物对单核细胞增生李斯特菌、大肠埃希菌 O157、坂崎克罗诺杆菌和铜绿假单胞菌的最低抑菌浓度(MIC)  $\geq 32 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 对蜡样芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、粪肠杆菌、假单胞菌、大肠埃希菌、鼠伤寒沙门氏菌的 MIC  $\geq 16 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

### 2.4 抗肥胖

肥胖是一种复杂的多因素疾病, 由脂肪堆积、脂肪组织扩张、肥大和增生引起。脂肪组织在人体的能量代谢体系中扮演着至关重要的角色, 是机体天然的能量储存器官, 其内分泌功能对整体能量平衡和体内平衡至关重要, 预防肥胖不容忽视。

Jiménez-Sánchez 等<sup>[28]</sup>探讨了油橄榄叶提取物在肥厚脂肪细胞模型上调节三酰甘油积累和一磷酸腺苷(AMP)激活的蛋白激酶活性(AMPK)的能力, 发现该提取物能通过 AMPK 依赖机制减少细胞内脂质积累; Vezza 等<sup>[29]</sup>评估油橄榄叶提取物对高脂饮食(high-fat diet, HFD)诱导小鼠肥胖的影响, 结果显示给药后能减轻体重、降低血糖并改善胰岛素抵抗, 对 HFD 诱导的小鼠肥胖产生有益影响; Jung 等<sup>[30]</sup>发现在 HFD 诱导小鼠模型中, 油橄榄叶提取物明显改善 HFD 小鼠体重、内脏脂肪和血脂水平的增加, 能显著抑制过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) 和 CCAAT 增强子结合蛋白  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ) 的表达, 并显著升高过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  辅激活因子-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) 和解偶联蛋白 1 (UPC-1) 水平, 以此调节与脂肪生成和产热相关分子的表达, 起到抗肥胖作用。

### 2.5 降血脂

卜文文<sup>[31]</sup>对从油橄榄叶中得到羟基酪醇进行降脂研究, 发现其在一定程度上能降低高脂血症小鼠的血脂水平; 周盼<sup>[32]</sup>给高脂小鼠灌胃油橄榄叶提取物, 发现与模型组比较, 小鼠的体重、腹脂和肝脏重量均受抑制, 高剂量给药组更明显; Mikami 等<sup>[33]</sup>发现油橄榄叶提取物抑制了 HFD 小鼠脂肪量和体重的增加, 缓解了认知能力的下降, 减少了抑郁行为; Alalwani 等<sup>[34]</sup>发现油橄榄叶提取物能改善 2 型糖尿病雄性白化大鼠的血脂水平, 且成本低、不良反应少。

### 2.6 降血压

Romero 等<sup>[35]</sup>评估了长期服用油橄榄叶提取物对自发性高血压大鼠的血压、内皮功能以及血管氧化和炎症状态的影响, 发现长期服用该提取物可降低收缩压、心率以及缓解心脏和肾脏肥大, 通过抑制丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号传导降低血管 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 的表达, 进而治疗遗传性高血压; Susalit 等<sup>[36]</sup>评估了油橄榄叶提取物在 I 期高血压患者中的抗高血压效果和耐受性, 发现以每日两次、每次 500 mg 的方案给药, 能有效降低其收缩压和舒张压。

### 2.7 降血糖

Mansour 等<sup>[37]</sup>评估了 3 种油橄榄叶提取物治疗或预防 2 型糖尿病的潜在活性, 在雄性大鼠糖尿病模型中, 发现给药后可明显使血糖、糖化血红蛋白、血脂参数及肝酶恢复到正常水平, 并使肝脏、肾脏和胰腺组织接近正常状态并维持其功能, 表明油橄榄叶提取物是治疗 2 型糖尿病的一种有前景的药物; Temiz 等<sup>[38]</sup>发现油橄榄叶提取物能显著提高链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠的超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶的活性, 并减轻肝脏和胰腺组织的退行性和坏死性变化, 增强抗氧化防御系统, 起到降血糖的作用。

### 2.8 抗肿瘤

油橄榄叶在医药领域有着悠久的历史, 以油橄榄为主的地中海式饮食习惯能显著降低多种肿瘤的发生率, 如胰腺癌、肝癌、前列腺癌、结直肠癌和胃癌等。橄榄苦苷为油橄榄叶提取物中的主要活性物质, 其抗肿瘤活性机制包括细胞周期阻滞、诱导肿瘤细胞凋亡等<sup>[39]</sup>。研究表明, 油橄榄叶提取物在减少冠心病和某些癌症方面作用显著, 能抑制癌细胞系的增殖, 并通过一些特殊途径抑制肿瘤细胞的活动, 如抑制 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白、PI3K-AKT-mTOR 等异常激活的促癌信号通路来阻碍肿瘤细胞增殖; 降低血管内皮生长因子及其受体活性来阻碍肿瘤血管生成, 限制肿瘤生长转移; 或者激活自然杀伤细胞、细胞毒性 T 淋巴细胞等免疫细



胞, 调节白细胞介素等细胞因子分泌, 营造抗肿瘤免疫环境, 发挥抗肿瘤功效。

Albogami 等<sup>[40]</sup>利用结直肠癌细胞株 HT29 和前列腺癌细胞株 PC3 对橄榄叶提取物的体外抗肿瘤活性进行研究, 发现橄榄叶提取物对 HT29 的抑制作用更强, 能够抑制肿瘤细胞生长、迁移、DNA 片段化及活性氧产生, 使细胞周期 S 期缩短, 是一种很有潜力的新型抗肿瘤剂; Samet 等<sup>[41]</sup>研究表明橄榄叶提取物能抑制 K562 细胞的增殖, 将细胞周期停滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 和 G<sub>2</sub>/M 期, 进一步分析显示其 *IFI16*、*EGR1*、*FOXP1*、*CXCL2*、*CXCL3* 和 *CXCL8* 等差异基因表达均显著增强, 证实 K562 细胞向单核细胞系凋亡和分化, 由此发挥抗白血病作用; Hong 等<sup>[42]</sup>研究观察到橄榄苦苷对肝肿瘤细胞有良好的抑制作用, 可限制葡萄糖摄取, 显著抑制糖酵解相关基因的表达, 能通过靶向 GPI, 抑制 *PFKL*、*ALDOA*、*PGK1*、*PGAM1*、*ENO1*、*ENO3*、*LDHA* 的表达, 发挥抑制肿瘤糖酵解作用, 有着良好的抗肿瘤活性且无毒副作用。

## 2.9 其他

橄榄叶富含橄榄苦苷, 橄榄苦苷能促进骨骼间充质干细胞向成骨细胞分化<sup>[43]</sup>, 有效保护心肌缺血再灌注损伤<sup>[44]</sup>, 对于骨质疏松、肿瘤骨转移和冠心病的治疗有一定前景。且其能通过增强机体免疫功能、提高抗氧化能力, 发挥延缓皮肤衰老、减少黑色素沉着等作用。还有研究表明, 将橄榄叶提取物外敷有促进伤口愈合的功效<sup>[45]</sup>。

## 3 橄榄叶质量标志物 (Q-Marker) 的预测

Q-Marker 是衡量和评价药物质量的关键性指标, 对保障药品质量、提高药物疗效、减少不良反应等方面具有极其重大的意义。Q-Marker 有五大原则: ① 特有性, 可以体现药材质量的特有的化学物质; ② 有效性, 预测的 Q-Marker 必须具有生物活性、安全性和有效性; ③ 可测性, 可以使用标准方法制备样品, 并进行定性定量; ④ 具有中医药理论的关联性, 即具有组方配伍特点的, 以君药为主, 臣、佐、使兼顾的原则; ⑤ 传递与溯源, 具有可追溯性。由于橄榄叶为天然药物, 未收入药典及地方标准中, 因此, 没有处方配伍方面的内容。参考相关学者的研究, 本综述以 Q-Marker 为指导, 从化学成分特有性、化学成分有效性、化学成分可测性、不同加工方式和储存条件对其影响及传递与溯源五方面, 对橄榄叶的 Q-Marker 进行初步预测分析<sup>[46]</sup>。

### 3.1 基于植物亲缘学及化学成分特有性的橄榄叶 Q-Marker 预测分析

橄榄 (*Olea europaea* L.) 为木犀科木犀榄属

植物的常绿乔木, 木犀榄属植物化学成分有裂环烯醚萜类、五环三萜类、萜烯类、黄酮类、苯丙素类等, 其中裂环烯醚萜类化合物是其标志性化合物, 主要从油橄榄叶中得到, 以橄榄苦苷最具有代表性, 且含量最高<sup>[3]</sup>。

谢普军<sup>[47]</sup>运用高效液相色谱法/紫外-可见光亮度法 (HPLC/UV-vis) 鉴定油橄榄叶提取物与油橄榄果提取物中的酚类化学组分, 发现两者均含有橄榄苦苷及其衍生物, 且在油橄榄叶提取物中含量最高, 为  $6.58 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 约为油橄榄果中含量的 150 倍; 陈静<sup>[48]</sup>采用 HPLC 法建立油橄榄叶提取物的指纹图谱, 利用液相质谱-串联质谱法对 9 个油橄榄叶提取物样品进行共有峰归属, 确定木犀草素-7-O-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-葡萄糖苷和橄榄苦苷是其共有峰。

综上所述, 橄榄叶中的橄榄苦苷、木犀草素-7-O-葡萄糖苷和芹菜素-7-O-葡萄糖苷可作为 Q-Marker 筛选的参考成分。

### 3.2 基于化学成分有效性的橄榄叶 Q-Marker 预测分析

Parra-Perez 等<sup>[49]</sup>评估羟基酪醇对急性人类白血病 T 淋巴细胞系 (Jurkat 和 HL60) 的抗肿瘤潜力以及对小鼠巨噬细胞 (RAW264.7) 的抗炎潜力, 发现羟基酪醇具有抗增殖作用, 可以作为天然药物用于白血病、骨髓瘤和淋巴瘤的治疗; Ercelik 等<sup>[50]</sup>在 T98G 和 A172 细胞中研究了橄榄苦苷对胶质母瘤 (glioblastoma, GB) 的影响, 发现橄榄苦苷对 GB 细胞有明显抑制作用, 有作为针对 GB 的个体抗肿瘤药物的潜力; Rahmani 等<sup>[51]</sup>评估了橄榄苦苷对四氯化碳诱导的大鼠肝损伤的保肝作用, 发现橄榄苦苷可能通过抑制氧化应激和炎症以及维持肝组织结构来减少肝损伤; 李勇杰等<sup>[15]</sup>对 16 种橄榄叶中的抗氧化成分进行分析, 发现最主要的成分是橄榄苦苷、山楂酸、羟基酪醇和红景天苷, 这些成分起保护心脑血管、抗肿瘤的作用。

综上所述, 橄榄叶中的橄榄苦苷、羟基酪醇、山楂酸和红景天苷, 可作为橄榄叶的 Q-Marker。

### 3.3 基于化学成分可测性的橄榄叶 Q-Marker 预测分析

化学成分能检测且易于检测是确定 Q-Marker 的一项重要原则, 可通过高效液相色谱仪 (HPLC) 或气相色谱仪等仪器, 建立指纹图谱或特征图谱以及含量测定的方法对药材进行定性鉴别、定量测定, 最后得出基于化学成分可测性的 Q-Marker 参考依据。

叶建中等<sup>[52]</sup>建立了羟基酪醇的 HPLC 分析方法, 成功对 10 个品种橄榄叶中羟基酪醇含量



进行了测定；王成章等<sup>[53]</sup>将油橄榄叶的乙酸乙酯萃取物作薄层色谱分析，以氯仿-甲醇-乙酸=（4：1：0.1）为展开剂，薄层色谱图中各斑点呈椭圆形且无脱尾现象，确定了橄榄苦苷的色谱斑点<sup>[6]</sup>；王碧霞等<sup>[54]</sup>通过 HPLC 分析了橄榄苦苷、芦丁、木犀草素-4'-O-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-葡萄糖苷、木犀草素、槲皮素和芹菜素 7 种成分，其中橄榄苦苷和木犀草素-4'-O-葡萄糖苷含量最高；何海荣等<sup>[14]</sup>建立了油橄榄叶提取物中橄榄苦苷、羟基酪醇乙酸酯、芹菜素-7-O-葡萄糖苷和木犀草素-7-O-葡萄糖苷的 HPLC 含量分析方法，方法简单快速准确；王和宇等<sup>[55]</sup>建立了一种同时测定油橄榄叶中毛蕊花糖苷、木犀草苷和橄榄苦苷的方法，对 6 批油橄榄叶中的上述 3 种成分进行了测定；焦志敏等<sup>[56]</sup>通过 HPLC 法对油橄榄各部位的山楂酸含量进行含量测定，发现油橄榄叶中山楂酸占比最大。

综上分析，羟基酪醇、橄榄苦苷、芹菜素-7-O-葡萄糖苷和木犀草素-4'-O-葡萄糖苷等可通过 HPLC 等方法进行定性定量的检测，可作为油橄榄叶的 Q-Marker。

3.4 基于不同加工方式和储存条件的油橄榄叶 Q-Marker 预测分析

中药的疗效与中药材的质量密切相关，而中药材的质量都会直接或间接地受到加工方式（干燥方法）和储存条件（温度）的影响，能够据此对中药材的 Q-Marker 进行预测。

赵夏莲等<sup>[57]</sup>将洗干净的油橄榄叶用 3 种方式干燥（液氮研磨冷冻干燥、45℃常压干燥、-20℃冷冻干燥），粉碎得到油橄榄叶的粉末，过 80 目筛后分成 4 份，分别在 -80℃、-20℃、4℃、25℃ 温度下储存 7 d，然后超声提取，HPLC 法测定橄榄苦苷含量，发现不同干燥方式的样品在相同温度下储存，橄榄苦苷含量有显著性差异，尤其是液氮研磨冷冻干燥的粉末在 25℃ 储存时橄榄苦苷几乎全被降解；45℃ 常压干燥，25℃ 储存的条件下橄榄苦苷达到最高值 77.9 mg·g<sup>-1</sup>；由此可知，随着干燥方式和储存温度的不同，油橄榄叶中橄榄苦苷的含量会受到很大的影响，因此橄榄苦苷可作为油橄榄叶 Q-Marker 的选项。

3.5 基于传递与溯源的油橄榄叶 Q-Marker 预测分析

中药的成分复杂多样，然而发挥药效的安全与否与体内的吸收和代谢紧密相关，了解其主要有效成分的吸收代谢方式尤为重要，是 Q-Marker 确定的指标之一。

De Bock 等<sup>[58]</sup>为了量化作为油橄榄叶提取物中橄榄苦苷和羟基酪醇的生物利用度及代谢，进行了临床试验。9 名（42.8±7.4）岁的志愿者（5 男

4 女），随机分配接受胶囊或液体油橄榄叶提取物，作为单一较低剂量（51.1 mg 橄榄苦苷、9.7 mg 羟基酪醇）或更高剂量（76.6 mg 橄榄苦苷、14.5 mg 羟基酪醇），然后在一周后接受相反强度的剂量（配方相同），摄入后 24 h 以固定间隔收集血浆和尿液样本，采用液相色谱电离串联质谱分析酚类物质含量，发现羟基酪醇的共轭代谢物（硫酸化和葡萄糖醛酸化）是血浆和尿液中的主要代谢物，油橄榄叶提取物中的橄榄苦苷和羟基酪醇的代谢物能有效进入人体血浆中。可见，橄榄苦苷作为油橄榄叶特有的活性成分摄入后被人体吸收再以羟基酪醇共轭代谢物排出。因此，橄榄苦苷、羟基酪醇可作为油橄榄叶的 Q-Marker。

综上所述，预测橄榄苦苷、羟基酪醇、木犀草素-7-O-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-葡萄糖苷、木犀草素-4'-O-葡萄糖苷、毛蕊花糖苷、山楂酸、红景天苷为油橄榄叶的 Q-Marker，其中橄榄苦苷最具有潜力。基于不同角度预测的质量标志物信息见表 9。

| 表 9 油橄榄叶的 Q-Marker 预测                             |                                                               |
|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| Tab 9 Q-Marker prediction of olea europaea leaves |                                                               |
| 五大原则                                              | 预测的 Q-Marker                                                  |
| 植物亲缘及化学成分特                                        | 橄榄苦苷、木犀草素-7-O-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-葡萄糖苷                               |
| 有性                                                | 素-7-O-葡萄糖苷                                                    |
| 成分有效性                                             | 羟基酪醇、橄榄苦苷、红景天苷、山楂酸                                            |
| 成分可测性                                             | 羟基酪醇、橄榄苦苷、木犀草素-4'-O-葡萄糖苷、木犀草素-7-O-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-葡萄糖苷、毛蕊花糖苷、山楂酸 |
| 加工方式和储存条件                                         | 橄榄苦苷                                                          |
| 质量传递与溯源                                           | 橄榄苦苷、羟基酪醇                                                     |

4 小结

油橄榄是著名的亚热带果树，多产自欧洲南部地中海沿岸的国家，我国近几年有大量引种，如甘肃陇南、湖北房县等。油橄榄富含多种活性物质，比如裂环烯醚萜、五环三萜、萜烯、黄酮、多酚和酚酸等，具有抗炎、抗氧化、抑菌、抗肥胖、降血脂、降血压、降血糖及抗肿瘤等作用，有着巨大的开发潜力。随着现代生物技术和分子生物学的发展，对油橄榄叶中活性成分和药理机制进行深入研究将成为未来的重要方向，通过揭示其分子作用机制和信号通路，为油橄榄叶的临床应用提供更加坚实的理论基础。随着对其活性成分和作用机制研究的深入，油橄榄叶在医药、化妆品、食品等多个领域具有广泛的应用前景，有望依据相关成果开发出针对性的药物，比如针对类风湿关节炎、心血管类疾病、肿瘤等病症的辅助治疗药物，若能通过严谨的临床试验证实其在人类疾病治疗和预防上的有效性及安全性，未来可在临床治疗上得到更广泛应用。基于油橄

榄叶的抗氧化功效,还可开发出具有抗衰、美白、保湿等功效的护肤品,满足消费者对肌肤健康和美容的需求,有望更多地与前沿美容技术结合,打造出高科技含量的化妆品系列,在国际化妆品市场占据一席之地,为化妆品行业增添新的优质原料;未来也应该继续拓展其应用领域,开发具有不同药效的产品,满足市场需求。同时,为了确保油橄榄叶的质量和安全性,建立标准的质量控制体系至关重要。本文对油橄榄叶的 Q-Marker 进行了初步的预测分析,表明橄榄苦苷、羟基酪醇、木犀草素-7-O-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-葡萄糖苷、木犀草素-4'-O-葡萄糖苷、毛蕊花糖苷、山楂酸、红景天苷等可作为油橄榄叶的 Q-Marker,可为油橄榄叶资源的进一步研究与开发奠定基础。

总之,油橄榄叶化学成分及药理作用的研究具有广阔的开发前景和重要的应用价值。未来应继续加强基础研究、临床验证和标准化工作,推动油橄榄叶资源在多个领域的应用和发展。

## 参考文献

- [1] 边雷. 油橄榄叶化学成分的研究[D]. 兰州: 兰州交通大学, 2023.
- [2] 汪浅, 葛怡青, 全涛. 橄榄苦苷的生物活性研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43 (19): 479-486.
- [3] 李楠, 赵兴文, 郭美佳, 等. 油橄榄叶有效成分的提取及药理活性的研究进展[J]. 食品工业科技, 2020, 41 (10): 327-331, 338.
- [4] 李婷, 张程程, 吴文俊, 等. 油橄榄叶抗氧化活性成分及其作用机制研究进展[J]. 中国粮油学报, 2023, 38 (11): 256-266.
- [5] 林鹏, 王洁雪, 李晓鲁, 等. 油橄榄叶中裂环烯醚萜类化合物的研究进展[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2008, 34 (5): 999-1003.
- [6] 赵艳敏, 延慧君, 刘岱琳. 橄榄叶化学成分及药理作用研究概况[J]. 武警后勤学院学报(医学版), 2013, 22 (4): 337-340.
- [7] 赵强宏, 邹诚, 王文亮, 等. 甘肃陇南不同品种油橄榄叶化学成分系统表征及抗氧化活性研究[J]. 中国油脂, 2025, 50 (4): 65-72, 81.
- [8] 李婷. 油橄榄叶不同形态多酚组成及其体内外抗氧化活性研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2024.
- [9] 王晓飞, 李辉, 刘铭佩, 等. 油橄榄叶中三萜类成分的提取、分离与结构鉴定[J]. 中国药房, 2017, 28 (19): 2639-2641.
- [10] 马惠芬, 闫争亮, 泽桑梓, 等. 利用 GC-MS 技术分析油橄榄叶挥发油化学成分[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24 (7): 920-923.
- [11] Santos-buelga C, Feliciano AS. Flavonoids: from structure to health issues[J]. Molecules, 2017, 22 (3): 477.
- [12] Talhaoui N, Taamalli A, Gómez-Caravaca AM, et al. Phenolic compounds in olive leaves: analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits[J]. Food Res Int, 2015, 77 (2): 92-108.
- [13] Laguerre M, López Giraldo LJ, Piombo G, et al. Characterization of olive-leaf phenolics by ESI-MS and evaluation of their antioxidant capacities by the CAT assay[J]. J Am Oil Chem Soc, 2009, 86: 1215-1225.
- [14] 何海荣, 魏鉴腾, 孙小明, 等. 油橄榄叶提取物中 4 种抗氧化活性成分的筛选和含量测定[J]. 营养学报, 2016, 38 (1): 81-86.
- [15] 李勇杰, 耿树香, 徐田. 云南引种油橄榄嫩叶中抗氧化成分含量分析[J]. 中国油脂, 2024, 49 (1): 134-139.
- [16] 王玉. 高速逆流色谱分离油橄榄叶中的多酚类化合物研究[D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2018.
- [17] 吴遵秋. 油橄榄叶中三种活性成分含量动态变化及橄榄苦苷的分离鉴定与活性研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2015.
- [18] Şahin S, Bilgin M. Olive tree (*Olea europaea* L.) leaf as a waste byproduct of table olive and olive oil industry: a review[J]. J Sci Food Agric, 2018, 98 (4): 1271-1279.
- [19] Nediani C, Ruzzolini J, Romani A, et al. Oleuropein, a bioactive compound from *Olea europaea* L., as a potential preventive and therapeutic agent in non-communicable diseases[J]. Antioxidants (Basel), 2019, 8 (12): 578-578.
- [20] Hong YH, Song C, Shin KK, et al. Tunisian *Olea europaea* L. leaf extract suppresses Freund's complete adjuvant-induced rheumatoid arthritis and lipopolysaccharide-induced inflammatory responses[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 268: 113602.
- [21] De Cicco P, Maisto M, Tenore GC, et al. Olive leaf extract, from *Olea europaea* L., reduces palmitate-induced inflammation via regulation of murine macrophages polarization[J]. Nutrients, 2020, 12 (12): 3663.
- [22] Šimat V, Skroza D, Tabanelli G, et al. Antioxidant and antimicrobial activity of hydroethanolic leaf extracts from six mediterranean olive cultivars[J]. Antioxidants (Basel), 2022, 11 (9): 1656.
- [23] Rouibah Z, Ben Mensour A, Rekik O, et al. Chemical composition, antioxidant activities, in an allergic asthma model, of *Olea europaea* L. leaf extracts from Collo (Skikda, Algeria)[J]. Drug Chem Toxicol, 2022, 45 (1): 197-208.
- [24] 原姣姣, 叶建中, 戴明明, 等. 油橄榄叶橄榄苦苷酶解制备羟基酪醇的研究[J]. 林产化学与工业, 2015, 35 (4): 65-71.
- [25] Moudache M, Silva F, Nerin C, et al. Olive cake and leaf extracts as valuable sources of antioxidant and antimicrobial compounds: a comparative study[J]. Wast Biomass Valori, 2020, 12 (3): 1-15.
- [26] Aliabadi MA, Darsanaki RK, Rokhi ML, et al. Antimicrobial activity of olive leaf aqueous extract[J]. Ann Appl Biol, 2012, 3: 4189-4191.
- [27] Gökmen M, Kara R, Akkaya L, et al. Evaluation of antimicrobial activity in olive (*Olea europaea*) leaf extract[J]. Curr Microbiol, 2014, 5 (2): 37-40.
- [28] Jiménez-Sánchez C, Olivares-Vicente M, Rodríguez-Pérez C, et al. AMPK modulatory activity of olive-tree leaves phenolic compounds: bioassay-guided isolation on adipocyte model and in silico approach[J]. PLoS One, 2017, 12 (3): e0173074.

- [29] Vezza T, Rodríguez-Nogales A, Algieri F, et al. The metabolic and vascular protective effects of olive (*Olea europaea* L.) leaf extract in diet-induced obesity in mice are related to the amelioration of gut microbiota dysbiosis and to its immunomodulatory properties [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 150: 104487.
- [30] Jung YC, Kim HW, Min BK, et al. Inhibitory effect of olive leaf extract on obesity in high-fat diet-induced mice [J]. *In Vivo*, 2019, 33 (3): 707-715.
- [31] 卜文文. 油橄榄叶中羟基酪醇的提取纯化及抗氧化性研究 [D]. 天津: 天津科技大学, 2010.
- [32] 周盼. 油橄榄叶主要化学成分分析及降脂功效研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2018.
- [33] Mikami T, Kim J, Park J, et al. Olive leaf extract prevents obesity, cognitive decline, and depression and improves exercise capacity in mice [J]. *Sci Rep*, 2021, 11 (1): 12495.
- [34] Alalwani AD, Hummdi LA, Qahl SH. Effect of nano extracts of *olea europaea* leaves, *ficus carica* and *liraglutide* in lipidemic liver of type 2 diabetic rat model [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2022, 29 (7): 103333.
- [35] Romero M, Toral M, Gómez-Guzmán M, et al. Antihypertensive effects of oleuropein-enriched olive leaf extract in spontaneously hypertensive rats [J]. *Food Funct*, 2016, 7 (1): 584-593.
- [36] Susalit E, Agus N, Effendi I, et al. Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: comparison with Captopril [J]. *Phytomedicine*, 2011, 18 (4): 251-258.
- [37] Mansour HMM, Zeitoun AA, Abd-Rabou HS, et al. Antioxidant and anti-diabetic properties of olive (*Olea europaea*) leaf extracts: in vitro and in vivo evaluation [J]. *Antioxidants*, 2023, 12 (6): 1275.
- [38] Temiz MA, Temur A. Olive (*Olea europaea* L.) leaf extract boosts antioxidant status and attenuates hepatic and pancreatic changes in diabetic rats [J]. *Appl Biol Res*, 2019, 21 (1): 10-19.
- [39] 郭卫平, 鲁绪, 褚泽军, 等. 橄榄苦苷提取工艺及生物活性研究进展 [J]. *食品与机械*, 2023, 39 (10): 233-240.
- [40] Albogami S, Hassan AM. Assessment of the efficacy of olive leaf (*Olea europaea* L.) extracts in the treatment of colorectal cancer and prostate cancer using in vitro cell models [J]. *Molecules*, 2021, 26 (13): 4069.
- [41] Samet I, Han J, Jlaiei L, et al. Olive (*Olea europaea*) leaf extract induces apoptosis and monocyte/macrophage differentiation in human chronic myelogenous leukemia K562 cells: insight into the underlying mechanism [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014 (2014): 927619.
- [42] Hong ZC, Lu Y, Liu B, et al. Glycolysis, a new mechanism of oleuropein against liver tumor [J]. *Phytomedicine*, 2023, 114: 154770.
- [43] 陈侯馨. 橄榄苦苷对破骨细胞分化以及骨吸收功能的影响 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2017.
- [44] 赵启明. 橄榄苦苷对心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2017.
- [45] 杨春苗, 刘雨萌, 杨东生. 油橄榄叶的化学成分及其在化妆品领域的研究进展 [J]. *广东化工*, 2022, 49 (22): 103-104, 87.
- [46] 郑荣蕾, 戴静, 何勇志, 等. 质量标志物 (Q-Marker) 预测分析途径研究进展 [J]. *中草药*, 2021, 52 (9): 2566-2574.
- [47] 谢普军. 油橄榄叶高值化利用技术及机理研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2015.
- [48] 陈静. 油橄榄叶提取物抑制酪氨酸酶活性成分和黑色素生成机制研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2022.
- [49] Parra-Perez AM, Pérez-Jiménez A, Gris-Cárdenas I, et al. Involvement of the PI3K/AKT intracellular signaling pathway in the anticancer activity of hydroxytyrosol, a polyphenol from *Olea europaea*, in hematological cells and implication of HSP60 levels in its anti-inflammatory activity [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (13): 7053.
- [50] Ercelik M, Tekin C, Tezcan G, et al. *Olea europaea* leaf phenolics oleuropein, hydroxytyrosol, tyrosol, and rutin induce apoptosis and additionally affect temozolomide against glioblastoma: in particular, oleuropein inhibits spheroid growth by attenuating stem-like cell phenotype [J]. *Life (Basel)*, 2023, 13 (2): 470.
- [51] Rahmani AH, Almatroudi A, Allemailem KS, et al. Oleuropein, a phenolic component of *Olea europaea* L. ameliorates CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in rats through the regulation of oxidative stress and inflammation [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2024, 28 (4): 1259-1271.
- [52] 叶建中, 王成章, 陈虹霞, 等. 油橄榄叶中羟基酪醇含量及提取工艺研究 [J]. *林产化学与工业*, 2011, 31 (1): 63-67.
- [53] 王成章, 高彩霞, 叶建中, 等. 引种阿斯油橄榄叶中橄榄苦苷提取分离及结构鉴定 [J]. *林产化学与工业*, 2009, 29 (3): 53-57.
- [54] 王碧霞, 杜小奇, 邓燕, 等. 凉山油橄榄主栽品种叶中营养物质和酚类含量的季节性变化 [J]. *南京林业大学学报*, 2022, 46 (4): 169-176.
- [55] 王和宇, 李春娜, 王旭, 等. HPLC 法测定油橄榄叶中毛蕊花糖苷、木犀草苷和橄榄苦苷的含量 [J]. *中医药导报*, 2016, 22 (7): 68-70.
- [56] 焦志敏, 陈龙胜, 许舒雯, 等. HPLC 测定油橄榄不同部位山楂酸的含量 [J]. *林产化学与工业*, 2010, 30 (2): 23-26.
- [57] 赵夏莲, 张煜泓, 曲继鹏. 油橄榄叶存储条件对橄榄苦苷的影响 [J]. *西昌学院学报 (自然科学版)*, 2019, 33 (2): 8-11.
- [58] De Bock M, Thorstensen EB, Derraik JG, et al. Human absorption and metabolism of oleuropein and hydroxytyrosol ingested as olive (*Olea europaea* L.) leaf extract [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2013, 57 (11): 2079-2085.

(收稿日期: 2024-12-13; 修回日期: 2025-01-21)



# 腺相关病毒载体药物非临床生物分布研究的设计要点

黄芯玉<sup>1, 2</sup>, 汪宁<sup>2</sup>, 杨欢<sup>2</sup>, 张巧<sup>1</sup>, 冯斐斐<sup>1</sup>, 张素才<sup>1, 2\*</sup> (1. 郑州大学公共卫生学院, 郑州 450066; 2. 北京昭衍新药研究中心股份有限公司, 北京 100176)

**摘要:** 腺相关病毒属于复制缺陷性病毒范畴, 因具备非致病性、免疫原性弱以及能够实现稳定长期表达等显著优势, 已成为基因治疗药物研发领域中备受瞩目的主流递送载体。目前, 尽管相关行业指南已对腺相关病毒载体的生物分布、脱落等方面提出一般要求的规范, 然而在具体的试验设计以及综合评价方案层面, 仍需要结合不同药物的特点进行个性化设计和考虑。本文紧密围绕腺相关病毒载体的自身特性、法规指南、已上市药物的相关资料以及已公开发表的研究数据展开深入剖析, 探讨该类药物非临床生物分布研究中需要关注的要点, 旨在为其非临床研究工作提供依据与指引。

**关键词:** 腺相关病毒载体; 基因治疗; 非临床生物分布研究

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)06-1735-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.035

## Key considerations for non-clinical biodistribution of adeno-associated virus vector drugs

HUANG Xin-yu<sup>1, 2</sup>, WANG Ning<sup>2</sup>, YANG Huan<sup>2</sup>, ZHANG Qiao<sup>1</sup>, FENG Fei-fei<sup>1</sup>, ZHANG Su-cai<sup>1, 2\*</sup> (1. College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450066; 2. JOINN Laboratories (China) Co., Ltd., Beijing 100176)

**Abstract:** Adeno-associated virus falls into the category of replication-deficient viruses. Owing to its obvious advantages such as non-pathogenicity, weak immunogenicity, and stable and long-term expression, it has become a mainstream delivery vector that attracts much attention in gene therapy research and development. Currently, although the relevant industry guidelines have provided general requirements and norms for the biological distribution and shedding of adeno-associated virus vectors, yet in the specific aspects of experiment design and comprehensive evaluation plans, personalized design needs to be considered in accordance with the characteristics of drugs. This article focused on the inherent characteristics of adeno-associated virus vectors, regulatory guidelines, relevant data from marketed drugs, and published research results. We explored the key points in the non-clinical biodistribution studies of such drugs, aiming to provide guidance for their non-clinical research.

**Key words:** adeno-associated virus vector; gene therapy; non-clinical biodistribution study

近年来, 随着基因治疗技术的不断发展, 以腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 为载体的基因治疗药物凭借其独特的递送优势, 为多种单基因遗传病、神经退行性疾病的治疗开启了希望之门。AAV 载体基因治疗药物是利用 AAV 载体携带外源目的基因 (或核酸片段), 给药后在体内转录、翻译, 获得目的蛋白, 随后目的蛋白在体内长

期表达, 从而发挥治疗作用。目前已鉴定出多种天然 AAV 血清型, 包括人类和非人灵长类<sup>[1]</sup>。不同血清型病毒基因组为 4.7 ~ 5 kb<sup>[2]</sup>, 包含两端的末端反向重复序列 (inverted terminal repeats, ITR), 中间基因组编码两个蛋白: Cap 和 Rep。Cap 蛋白为病毒衣壳蛋白, Rep 蛋白参与病毒的复制和整合<sup>[3]</sup>。含有 *rep* 基因的病毒基因组容易整合到人类

**基金项目:** 国家重点研发计划资助项目 (No.2021YFC2302505)。

**作者简介:** 黄芯玉, 女, 硕士研究生, 主要从事药物非临床安全性评价研究, email: huangxinyu@gs.zzu.edu.cn \* 通信作者: 张素才, 男, 副研究员, 硕士研究生导师, 主要从事药物非临床安全性评价研究, email: zhangsucai@joinn-lab.com

第 19 号染色体的特异位点——AAVS1 位点<sup>[4]</sup>。重组 AAV 载体删除了 *rep* 基因，从而使基因组整合的风险大大降低。野生型 AAV 是非致病性的，需要辅助病毒（如腺病毒）参与才能完成病毒复制。在不存在辅助病毒的情况下，AAV 载体仅感染细胞，在细胞核内形成稳定的游离型基因组，持续进行基因表达，但不会进行病毒复制<sup>[5]</sup>。

在对 AAV 载体类产品的潜在风险进行分析时，需考虑终产品本身、其采用的 AAV 载体、其递送的目的基因等，还需关注体内长期存续或表达带来的长期安全性风险<sup>[6]</sup>。因此，生物分布研究是该类基因治疗产品非临床研究的关键部分，有助于解释药理学、毒理学的研究发现，也为后续的临床试验提供参考。国内外监管机构先后发布了一系列指导原则，明确了 AAV 载体药物生物分布研究的必要性。本文结合已上市 AAV 载体药物的研发案例和已发表的 AAV 载体的生物分布研究数据，系统地归纳总结了 AAV 载体在临床前生物分布研究中的关键设计要点，以期对基因治疗药物的非临床生物分布研究方案设计提供参考。

1 AAV 载体药物的生物分布特征

1.1 AAV 类载体药物

目前已经从人和非人灵长类动物中发现 100 多种 AAV 变异株，临床常用的有 AAV1、AAV2、AAV5 ~ AAV9 等<sup>[7]</sup>。AAV 在疾病治疗研究中

的应用主要取决于不同血清型独特的组织嗜性。AAV1 对肌肉组织（骨骼肌和心肌）亲和性较强，常用于肌营养不良等肌肉疾病的治疗研究；AAV2 研究最为广泛，组织嗜性相对多样，对视网膜、中枢神经系统和肝脏等组织有感染能力，尤其在眼部疾病治疗中表现突出；AAV3 对肝脏和肌肉组织有一定的亲和性，在一些联合治疗或探索性治疗中有所涉及；AAV4 主要感染呼吸道和中枢神经系统部分细胞，在神经系统与呼吸道疾病治疗中有潜在的应用价值；AAV5 对肺、眼、肝脏等组织有亲和性，在血友病等疾病治疗中有应用潜力；AAV6 与 AAV1 类似，亲和肌肉组织且可感染呼吸道上皮细胞，在肌肉疾病和部分呼吸道疾病的基因治疗中有前景；AAV7 主要靶向肌肉组织，在肌肉萎缩等疾病的治疗研究中受关注；AAV8 对肝脏组织亲和性高，常用于血友病等血液疾病及肝脏代谢性疾病的治疗，且具有可携带较大基因片段的优势；AAV9 能够跨越血脑屏障，对中枢神经系统和心肌组织有良好亲和性，在脊髓性肌萎缩、阿尔茨海默病等神经系统疾病和某些心脏疾病的治疗中发挥重要作用<sup>[8]</sup>。

截至 2024 年 12 月，全球共 9 款 AAV 载体药物获批上市，涉及 46 种 AAV 血清型（见表 1），其主要治疗机制均是通过导入缺陷基因或者补充缺失的功能蛋白，以实现遗传性疾病的有效治疗。

表 1 已上市的 AAV 药物汇总

Tab 1 Marketed AAV drugs

| 上市药物      | 上市时间及批准机构                          | 血清型        | 适应证                   | 目的基因                       | 给药方式     |
|-----------|------------------------------------|------------|-----------------------|----------------------------|----------|
| Glybera   | 2012 年，欧洲药品管理局（EMA）                | AAV1       | 脂肪酶缺乏症                | <i>LPL</i> 基因              | 静脉注射     |
| Luxturna  | 2017 年，美国食品药品监督管理局（FDA）；2018 年，EMA | AAV2       | 莱伯先天性黑蒙；视网膜发育不良       | 视网膜色素上皮基因， <i>RPE65</i> 基因 | 视网膜下注射   |
| Zolgensma | 2019 年，FDA；2020 年，EMA              | AAV9       | 脊髓性肌萎缩                | 运动神经元存活基因， <i>SMN1</i> 基因  | 静脉注射     |
| Upstaza   | 2022 年，EMA                         | AAV2       | 芳香族 L-氨基酸脱羧酶缺乏症（AADC） | <i>DDC</i> 基因              | 立体定向外科手术 |
| Roctavian | 2022 年，EMA；2023 年，FDA              | AAV5       | 血友病 A                 | 凝血因子Ⅷ                      | 静脉注射     |
| Hemgenix  | 2022 年，FDA；2023 年，EMA              | AAV5       | 血友病 B                 | 凝血因子Ⅸ的 padua 变体            | 静脉注射     |
| Elevidys  | 2023 年，FDA                         | rAAVrh74   | 肌营养不良                 | <i>DMD</i> 基因              | 静脉注射     |
| Beqvez    | 2024 年，FDA，EMA                     | AAVRh74var | 血友病 B                 | 凝血因子Ⅸ                      | 静脉注射     |
| Kebilidi  | 2024 年，FDA                         | AAV2       | AADC                  | <i>DDC</i> 基因              | 立体定向外科手术 |

1.2 生物分布特征

AAV 载体药物由于不具备自我复制的能力，给药后在动物体内其载体 DNA 含量基本呈逐渐下降的趋势，但在部分组织中可长期存在。系统给药和局部给药后的生物分布特征有明显不同。不同血清型的 AAV 在体内的长期存续主要与组织嗜性和给药方式有关，在亲和力高的组织和给药局部中存留时间较长，其他组织中则清除较快。应根据目标组织和治疗需求选择最合适的 AAV 血清型，以确保最佳的治疗效果和安全性。

对于静脉注射的 AAV 药物 Glybera、Zolgensma、Roctavian、Hemgenix、Elevidys 和 Beqvez，给药剂量多在  $1\text{E}12 \sim 1\text{E}14 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，给药后载体 DNA 在各组织中广泛分布，且呈明显的剂量相关性。不同的血清型给药后基本均在肝脏中富集，其他组织中的分布趋势与不同血清型有关。AAV9 在心脏、肺脏中的分布量较高；Hemgenix 采用的 AAV5 和 Elevidys 采用的来源于猴的 rAAVrh74 血清型均在肾上腺中检测到较高的分布量。多个血清型在脑、性腺中也有少量分布，表明 AAV 可穿过血脑屏障，且

有垂直传播的风险。组织中目的基因的 mRNA 表达水平和蛋白表达量与组织中载体 DNA 含量成正相关，也与剂量有关，较高剂量水平下会在更多组织中检测到表达。对于组织特异性启动子的药物<sup>[9-10]</sup>，在高剂量下也可能会在非靶组织中检测到低水平的目的基因表达。

对于局部给药（如眼部、脑内、肌肉等）的 AAV 药物，受给药部位容积等因素限制，给药剂量通常低于静脉注射。局部给药后的系统暴露水平明显低于系统给药（如静脉注射、口服等）。不同途径给药后载体均主要分布在注射局部，也存在进入血液后随体循环在肝脏、脾脏等组织中分布的可能。视网膜下腔注射后，药物入血浓度较高，且持续时间较长，因此更易分布到其他脏器中，除眼部组织外，多在肝脏、脾脏等组织中分布，且呈剂量相关性。而玻璃体注射给药局部相对封闭，药物在非眼组织中分布相对较少<sup>[11-12]</sup>。视网膜下腔注射药物入血浓度较高，且持续时间较长，因此，更易分布到其他脏器中。而玻璃体给药局部相对封闭，因此入血量较少。壳核内注射途径给予 AAV 后，载体主要分布于壳核、小脑、大脑和脊髓，载体持续时间可达 6 个月，目的基因 mRNA 表达分布与载体分布结果也基本一致<sup>[13]</sup>。肌内注射后，载体 DNA 则主要分布于注射局部肌肉、肝脏和引流淋巴结<sup>[14-15]</sup>。

## 2 生物分布研究的设计要点

### 2.1 监管要求

AAV 载体产品的生物分布研究对提示其有效性和安全性至关重要，FDA 和 EMA 均明确指出，虽然使用相同转基因和 / 或 AAV 血清型研究获得的数据可用于支持新产品的申报，但是在非临床与临床阶段，都应针对特定的产品进行生物分布、脱落和垂直传播特性的评估<sup>[16-17]</sup>。AAV 载体产品的生物分布研究主要参考国际人用药品注册技术协调会（ICH）S12 对基因治疗产品的非临床生物分布研究的一般要求，旨在阐明 AAV 载体在体内的行为，包括其生物分布、存续和清除特征，以及携带目的基因和其表达产物的分布特征。

国家药品监督管理局（NMPA）于 2024 年发布的《腺相关病毒载体基因治疗产品非临床研究技术指导原则》，成为全球范围内首个专门针对 AAV 载体基因治疗产品的非临床研究的规范性文件。该指导原则综合了 ICH、FDA 及 EMA 各机构指导原则中针对 AAV 载体药物的考虑要点，对生物分布研究的种属选择、检测指标、采样时间点和样本类型、动物数量、方法学以及脱落研究均进行了一般要求的规范，为 AAV 载体基因治疗产品的非临床研究提供了全面且系统的参照依据。

FDA 和 EMA 截至目前尚未出台专门针对腺相关病毒载体药物非临床研究的指导原则，相关研究的开展多参考细胞和基因治疗药物、溶瘤病毒药物等领域的相关指南，具体指导原则汇总见表 2。

表 2 AAV 载体药物非临床生物分布相关指导原则

Tab 2 Guidelines for non-clinical biodistribution of AAV vector-based therapeutics

| 监管机构 发布时间 |      | 指导原则名称                                                                                                                                         |
|-----------|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| NMPA      | 2021 | 《基因治疗产品非临床研究及评价技术指导原则（试行）》                                                                                                                     |
|           | 2024 | 《腺相关病毒载体基因治疗产品非临床研究技术指导原则》                                                                                                                     |
| FDA       | 2013 | <i>Preclinical assessment of investigational cellular and gene therapy products</i>                                                            |
|           | 2015 | <i>Considerations for the design of early-phase clinical trials of cellular and gene therapy products</i>                                      |
|           | 2015 | <i>Design and analysis of shedding studies for virus or bacterial-based gene therapy and oncolytic products</i>                                |
|           | 2016 | <i>Recommendations for Microbial Vectors used for Gene Therapy</i>                                                                             |
|           | 2020 | <i>Long term follow-up after administration of human gene therapy products</i>                                                                 |
| EMA       | 2006 | <i>Guideline on non-clinical testing for inadvertent germline transmission of gene transfer vectors</i>                                        |
|           | 2008 | <i>Guideline on the non-clinical studies required before first clinical use of gene therapy medicinal products</i>                             |
|           | 2010 | <i>Reflection paper on quality, non-clinical and clinical issues related to the development of recombinant adeno-associated viral vectors</i>  |
|           | 2014 | <i>Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products</i>                                          |
|           | 2019 | <i>Guideline on quality, non-clinical and clinical requirements for investigational advanced therapy medicinal products in clinical trials</i> |
| ICH       | 2006 | <i>ICH Considerations general principles to address the risk of inadvertent germline integration of gene therapy vectors</i>                   |
|           | 2009 | <i>ICH Considerations general principles to address virus and vector shedding</i>                                                              |
|           | 2021 | <i>ICH S11: nonclinical safety testing in support of development of paediatric medicines</i>                                                   |
|           | 2023 | <i>ICH S12: nonclinical biodistribution considerations for gene therapy products</i>                                                           |

### 2.2 种属选择和动物数量

各国监管机构的法规和指南均明确指出，生物分布研究应尽可能选择相关动物种属或模型进行试验。不同血清型 AAV 的组织嗜性不同，同

时相同血清型 AAV 在不同种属中的组织嗜性也存在差异，见表 3。因此，在非临床生物分布研究中应尽可能选择受试物血清型与人体组织嗜性相似的动物种属。此外，由于野生型 AAV 宿主



广泛，实验动物体内多数存在针对 AAV 的预存免疫，影响 AAV 载体药物的体内暴露水平，进而影响对受试物生物分布的评估。尽管在非临床安全评价时，会尽量筛选预存抗体阴性或滴度较低动物入组，但生物分布研究目前尚未进行动物预存免疫筛选。主要原因是生物分布研究中多使用 SPF 级动物，预存免疫水平可控，如采用微生物控制条件宽松的普通级动物，建议进行预存抗体筛选后再入组实验，或采集相关样本以备必要时进行免疫原性的检测，来支持生物分布数据的解释分析。除 AAV 载体外，选择相关动物种属时，还必须考虑到目的基因的表达，以及表达产物的分布和可能的种属差异性。同时需要关注动物对于表达产物的免疫原性对于表达产物药代特征评估的影响。动物的生理特性，如体重、代谢率、血液循环等，会影响 AAV 载体的分布和

表达效率。例如，某些血清型在鼠中的表现可能与在大鼠或灵长类动物中的表现不同。不同的实验目的需要选择不同的动物模型。例如，如果目的是研究神经系统的基因治疗，可能会选择转基因小鼠或非人灵长类动物；如果目的是研究肌肉疾病，则可能会选择小鼠或大鼠。

生物分布研究中，除临床适应证仅针对单一性别（如前列腺癌或子宫癌）外，研究通常应纳入雌雄各半的动物。鉴于基因治疗产品个体间差异显著，一般要求每种性别/组/时间点至少使用 5 只啮齿类动物或 3 只非啮齿类动物。此外，当受试物对于临床适用人群年龄有特殊考虑时，还需参考 ICH S11 附录 A 中不同种属间器官成熟度的比较信息来确定研究动物的年龄<sup>[18]</sup>。如 Zolgensma 用于治疗 2 岁以下的患儿，其生物分布研究采用新生小鼠和 3 月龄猕猴。

表 3 不同 AAV 血清型在各种种属中的组织嗜性差别  
Tab 3 Tissue-specificity of different AAV serotypes in various species

| 种属 | 脑                                                    | 眼           | 心                            | 肝                      | 肺                            | 肌肉                                       | 关节/滑膜       |
|----|------------------------------------------------------|-------------|------------------------------|------------------------|------------------------------|------------------------------------------|-------------|
| 小鼠 | AAV1 ~ AAV9                                          | AAV1 ~ AAV9 | AAV1 ~ AAV9                  | AAV1 ~ AAV9            | AAV1 ~ AAV9                  | AAV1 ~ AAV9                              | AAV1 ~ AAV9 |
| 犬  | AAV1, AAV2, AAV4, AAV2, AAV8, AAV5, AAV8, AAV9       | AAV8, AAV9  | AAV2, AAV6, AAV8             | AAV6                   | AAV1, AAV2, AAV6, AAV8, AAV9 | /                                        |             |
| 猴  | AAV1, AAV2, AAV3, AAV2, AAV8, AAV4, AAV5, AAV6, AAV9 | AAV8, AAV9  | AAV1, AAV2, AAV3, AAV5, AAV8 | AAV2, AAV6             | AAV1, AAV9                   | /                                        |             |
| 人  | AAV2, AAV4, AAV9                                     | AAV2, AAV5  | /                            | AAV2, AAV3, AAV5, AAV8 | AAV2, AAV5                   | AAV1, AAV2, AAV3, AAV2, AAV6, AAV7, AAV9 |             |

2.3 给药途径和剂量

生物分布研究选择的给药途径应最大程度模拟临床拟用给药方式，当无法模拟临床给药方式时，研究需明确替代的给药方式或方法，并阐明其科学性和合理性。AAV 载体药物采用不同的给药途径，组织的载体含量、表达产物含量均有显著差异<sup>[19]</sup>。Glybera 分别以肌肉注射和静脉注射两种给药途径给予小鼠后，肌肉注射局部肌肉的载体含量约为静脉注射的 100 倍，淋巴结、睾丸和附睾中的载体含量约为静脉注射的 10 倍<sup>[20]</sup>，数据表明 AAV 载体局部给药后，存在部分非注射部位组织中的含量高于静脉注射的情况，这一现象与常规认知相悖。提示在开展 AAV 载体药物研究时，不能简单地以静脉注射给药途径所获得的高系统暴露水平下的分布数据来替代其他给药途径下的生物分布研究，否则可能会造成部分组织分布水平的低估，尤其是生殖腺等组织。此外，还需要关注不同给药途径下，AAV 产品的表达产物分布也存在差异。研究表明食蟹猴分别以壳核内、脑室内、鞘内 3 种途径注射给予 rAAV2-

hAADC，除了脑脊液和血液中 AAV 载体含量存在差异外，壳核内给药动物在壳核、尾状核和白球中产生了最高水平的转基因 mRNA 表达，而在脊髓和背根神经节中未检出；相反，在脑室内、鞘内给药的动物，在脊髓和背根神经节中观察到最高的转基因 mRNA 水平<sup>[21]</sup>。

AAV 产品的给药剂量的选择一般参照基因治疗产品生物分布研究的一般要求，应采用足够的给药剂量，给予的最高剂量水平应是毒理学研究中预期的最大剂量水平，经科学验证，预期的最大临床剂量水平也可以作为生物分布研究评估的最高剂量水平<sup>[22]</sup>。Nathwani 等<sup>[23]</sup>将 AAV2/8-LP1-hFIXco 静脉输注给予猕猴，其载体含量和转基因水平均呈剂量依赖性。王欣等<sup>[24]</sup>将 rAAV2-sTRAIL 肌肉注射给予 BALB/c 小鼠，主要组织的载体检出率、组织载体含量及载体存续时间均可见明显剂量相关性。Luxturna 一项猴子的生物分布数据也显示，视网膜下腔注射给予 3E11 μg/眼、7.5E11 μg/眼的 AAV2-hRPE65v2，给药后 3 个月，前房水、玻璃体、视神经载体含量未见剂量相关性，但高剂量组脾脏和肝

脏中载体含量约为低剂量组的 6 倍。此外, 仅高剂量组耳前淋巴结可见载体分布, 低剂量组未检出<sup>[25]</sup>。受限于视网膜下腔途径的给药容量, 受试物可选择的剂量范围有限, 高、低剂量仅相差 2.5 倍, 加之检测方法误差, 在注射局部相关组织中未见载体分布的剂量相关性, 但从非注射局部组织中, 可见明显剂量依赖性分布, 尤其是在部分载体含量低的组织中, 仅在高剂量水平下可观察到分布和/或长期存续的现象。另外, 不同的给药途径会导致药物在体内的吸收速率和程度不同, 为达到相同的治疗效果, 则需调整给药剂量。不同给药途径的剂量选择主要与靶组织的暴露量、给药部位的容量有关。例如, 静脉给药的系统暴露量较高, 给药剂量通常高于局部给药。对于眼部、关节腔等相对局限的部位, 最大给药剂量与最大给药容量有关。Upstaza 的一项猴子的生物分布试验, 采用了壳核内注射  $1.2 \times 10^6 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量, 而为了增加靶组织的暴露量, 侧脑室内和鞘内注射采用了更高的剂量  $1.2 \times 10^7 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 但壳核内给药的动物靶组织壳核中的基因表达量仍明显高于其他两种给药方式<sup>[26]</sup>。因此无论是系统给药途径还是局部给药途径, 选择合适的给药途径且在较高的剂量水平下进行生物分布研究, 更便于对载体分布较低的组织进行充分表征。

## 2.4 研究时长和样本采集

生物分布研究时长应覆盖载体的分布、存续和清除, 同时也要覆盖其目的基因及表达产物的分布特征。根据其药理学作用机制, AAV 载体药物一般为单次给药, 持续表达目的基因以发挥治疗作用。因此, 研究时长除需包括其在靶组织和非靶组织的峰值外, 还需考虑其稳态阶段以及长期存续阶段的时间。Zincarelli 等<sup>[27]</sup>将携带巨细胞病毒 (CMV) 启动的荧光素酶转基因的 AAV 尾静脉注射给予小鼠, 成像结果显示, 各组织中表达产物达峰时间多为给药后 2~3 个月, 而给药后 48 h 血液中 AAV 载体含量已降至给药量的 1% 以下, 给药后 3 个月除肝脏外, 大部分组织中的载体含量也降至  $1 \times 10^4 \text{ copies} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{ DNA}$ 。AAV 载体的药代特征与表达产物存在明显差异, 表达产物存在时间上的滞后性, 因此生物分布研究设计时既要考虑 AAV 载体的存续时间, 还需要覆盖表达产物的达峰和稳态时长。

除采集 ICH S12 要求的 13 种组织样本外<sup>[28]</sup>, 还应结合受试物的特点, 载体血清型嗜性, 采集其对应的组织、毒性靶组织、表达产物靶组织等。尤其对于局部给药途径的受试物, 样本采集时需考虑对注射部位解剖结构进行细分, 以获取不同组织中的分布数据, 支持药理毒理数据的分析。例如, 眼部注射给药时通常需要采集房水、玻璃体液、球结

膜、晶状体、视网膜、脉络膜、视神经等眼部组织。同时, 局部注射给药方式下, 给药部位受限, 给药方式操作复杂度高, 组织结构区分精细, 因此样本采集时, 应尽量固定样本采集位置、组织剥离方式及顺序, 最大程度降低取材导致的个体差异和样本间交叉污染的发生概率。组织样本采集时应严格控制采集顺序, 尽量按照受试物分布含量从低到高的顺序, 最后从注射局部进行采集。采集时使用的解剖器材也应提前灭菌处理或使用一次性无菌工具, 采集过程中注意及时清洗或更换手套。并且使用统一的采集工具和设备, 确保数据的一致性<sup>[29]</sup>。

## 2.5 病毒脱落

病毒脱落是指基因治疗产品通过排泄物 (尿液、粪便)、分泌物 (唾液、鼻咽液等) 或皮肤 (脓疱、疮、伤口) 排出体外。脱落试验需根据病毒感染途径、给药途径、剂量等因素考虑不同的脱落途径、采集频率和持续时间<sup>[30]</sup>。FDA 和 EMA 要求采集尿液、粪便和唾液, ICH 指出还应根据病毒/载体的特征以及临床给药途径采集对应的脱落样本, 如泪液、皮肤拭子等。

目前已有在犬、小鼠、猕猴、绵羊等不同种属中 AAV 载体脱落的文献报道<sup>[31-34]</sup>。检测方法多采用 qPCR 测定载体 DNA 拷贝数, 而 qPCR 结果只能说明这些基质中含有载体核酸片段, 不能区分完整的带有感染性的病毒 DNA 和已降解的病毒 DNA<sup>[35]</sup>。另外, 复杂的生物基质可能会导致假阴性或低估 AAV 的脱落量<sup>[36]</sup>。目前, 关于精准度、回收率及稳定性等指标的评估方法和接受标准仍存在争议, 亟待解决。Roctavin 的临床试验中采用了免疫沉淀偶联 qPCR 方法检测血浆和精液中衣壳包裹的载体 DNA, 即潜在感染性的病毒颗粒, 但该方法也可能会高估感染性病毒颗粒含量<sup>[37]</sup>。Farraha 等<sup>[38]</sup>在正常绵羊体内分别于冠状动脉内给予 AAV6、AAV8 和 AAV9, 检测了绵羊粪便、尿液、鼻黏液和唾液中的 AAV 基因组 DNA, 结果表明, AAV8 和 AAV9 载体 DNA 可在 72 h 内粪便和尿液中检出, 而有感染活性的病毒颗粒仅存在于给药后 48 h 内。鉴于 AAV 病毒本身无复制能力, 感染风险性较低, 非临床研究中尚未对脱落样本中病毒的感染活性进行检测。但考虑到可能存在的风险, 建议生物分布研究中设置阴性对照组, 通过与给药组动物换笼饲养的方式对脱落病毒的感染能力进行评估。

## 2.6 垂直传播

不同给药途径下 AAV 载体均可观察到在雄性生殖腺中的持续分布, 大大增加了病毒生殖传递的风险, 同时也增加了 AAV 载体基因整合事



件发生的风险<sup>[39]</sup>。但已有数据表明,精液中载体基因组的检测持续时间明显依赖于剂量和时间,基因组随着时间的推移而减少<sup>[40-41]</sup>。

NMPA、ICH 均指出如果在性腺组织中检测到载体,则可能需要进行下一步的研究,比如确定其在生殖细胞(例如卵母细胞、精子)的暴露水平<sup>[42]</sup>,并且根据载体类型、复制能力、基因组整合特性、剂量水平、给药途径等因素,分析评估基因治疗产品生殖系整合风险<sup>[43]</sup>。Couto 等<sup>[44]</sup>将高滴度 AAV 载体直接注射到小鼠睾丸和附睾中,未在生殖细胞中检测到病毒感染,将生精细胞和成熟精子直接暴露于高浓度载体下,体外受精后胚胎中也未检测到感染,证明了 AAV 载体生殖系转导的可能性极小。

因此评估垂直传播和/或基因整合引起的遗传毒性风险要根据实际情况决定。当确定 AAV 载体在性腺中长期存续时,首先要明确其在性腺中的具体分布情况,是分布在生殖细胞中,还是仅分布在支持细胞和间质细胞等其他细胞中;其次可通过垂直传播试验来评估病毒载体在子代动物中的分布风险,需根据血清型组织嗜性,对高亲和力的组织进行载体含量的分析;明确生殖细胞分布以及子代垂直传播后,需进一步评估其整合风险。基于目前的文献数据,尚无证据表明 AAV 通过性腺在子代中传播,但每个受试物仍需要具体数据来论证这一观点,且在后续临床研究中,也应持续关注 AAV 载体的生殖系整合风险。

### 3 总结与展望

生物分布研究可以确定载体和/或表达产物在目标靶组织、非靶组织和生物体液(如血液、脑脊液)中的存在、持续性和清除特征,用于指导临床前研究和临床试验设计<sup>[45]</sup>。AAV 载体药物的生物分布研究作为其非临床毒性评价的基础,试验设计时需遵循现有法规指南,全面考虑受试物血清型、动物种属、给药途径、给药剂量、样本采集、研究时长及生物分析方法等多种因素。综合分析载体生物分布、表达产物药代特征、预存免疫,以及表达产物抗药抗体对分布数据的影响。重点关注不同给药途径、高剂量水平下可能存在 AAV 载体的生殖器官,尤其是 AAV 载体的分布和存续时间,结合毒性数据评估是否需要评价药物垂直传播和整合风险。

尽管 AAV 载体已经在临床和非临床研究中取得显著进展,但基于 AAV 的基因治疗产品仍然面临很多挑战。靶向性不足、载体容量小、表达产物持久性有限、免疫原性风险、关于 AAV 的法规欠缺、生物分析方法法规不足等。在现有

的法规体系下针对具体的产品进行综合评价和研究,提高 AAV 产品的组织靶向性、基因表达效率等,并拓展更多的适应证,可为 AAV 载体的生物分布研究提供科学的指导。

### 参考文献

- [1] Gao G, Alvira MR, Somanathan S, et al. Adeno-associated viruses undergo substantial evolution in primates during natural infections [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100 (10): 6081-6086.
- [2] Wu Z, Yang H, Colosi P. Effect of genome size on AAV vector packaging [J]. *Mol Ther*, 2010, 18 (1): 80-86.
- [3] Colella P, Ronzitti G, Mingozzi F. Emerging issues in AAV-mediated in vivo gene therapy [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2017, 8: 87-104.
- [4] Berns KI, Daya S. Gene therapy using adeno-associated virus vectors [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2008, 21 (4): 583-593.
- [5] Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18 (5): 358-378.
- [6] 国家药品监督管理局.腺相关病毒载体基因治疗产品非临床研究技术指导原则(征求意见稿)[EB/OL]. (2024-12-01) [2024-12-18]. <https://www.nmpa.gov.cn/index.html>.
- [7] Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL, et al. Adeno-associated virus (AAV) as a vector for gene therapy [J]. *BioDrugs*, 2017, 31 (4): 317-334.
- [8] Zhang HL, Zhan Q, Huang B, et al. AAV-mediated gene therapy: advancing cardiovascular disease treatment [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 952755.
- [9] EMA (European Medicines Agency): assessment report for Hemgenix [EB/OL]. (2022-12-15) [2024-12-18]. <https://www.ema.europa.eu>.
- [10] EMA (European Medicines Agency): assessment report for Roctavian [EB/OL]. (2022-06-23) [2024-12-18]. <https://www.ema.europa.eu>.
- [11] Jacobson SG, Acland GM, Aguirre GD, et al. Safety of recombinant adeno-associated virus type 2-RPE65 vector delivered by ocular subretinal injection [J]. *Mol Ther*, 2006, 13 (6): 1074-1084.
- [12] EMA (European Medicines Agency): assessment report for Luxturna [EB/OL]. (2018-09-20) [2024-12-18]. <https://www.ema.europa.eu>.
- [13] EMA (European Medicines Agency): assessment report Upstaza [EB/OL]. (2022-05-19) [2024-12-18]. <https://www.ema.europa.eu>.
- [14] Favre D, Provost N, Blouin V, et al. Immediate and long-term safety of recombinant adeno-associated virus injection into the nonhuman primate muscle [J]. *Mol Ther*, 2001, 4 (6): 559-566.
- [15] Monahan PE, Samulski RJ, Tazelaar J, et al. Direct intramuscular injection with recombinant AAV vectors results in sustained expression in a dog model of hemophilia [J]. *Gene Ther*, 1998, 5 (1): 40-49.



- [16] FDA ( Food and Drug Administration ): guidance for industry preclinical assessment of investigational cellular and gene therapy products [EB/OL]. ( 2013-11-05 ) [2024-12-18]. <https://www.fda.gov>.
- [17] EMA ( European Medicines Agency ): reflection paper on quality, non-clinical and clinical issues related to the development of recombinant adeno associated viral vectors [EB/OL]. (2014-06-24) [2024-12-18]. <https://www.ema.europa.eu>.
- [18] International Conference on Harmonization ( ICH ). S11 Non-clinical safety testing in support of development of paediatric medicines [S]. 2021.
- [19] Turner PV, Brabb T, Pekow C, et al. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2011, 50 ( 5 ): 600-613.
- [20] Salmon F, Grosios K, Petry H. Safety profile of recombinant adeno-associated viral vectors: focus on alipogene tiparvovec ( Glybera<sup>®</sup> ) [J]. Expert Rev Clin Pharmacol, 2014, 7 ( 1 ): 53-65.
- [21] Compton DR, DeMarco SJ, Yalamanchili P. AAV2-hAADC ( Eladocagene Exuparvovec ) biodistribution and expression: superiority of intraputaminar versus intracerebroventricular and intrathecal ( Lumbar ) routes of administration [J]. Int J Toxicol, 2023, 42 ( 2 ): 135-145.
- [22] 国家药品监督管理局基因治疗产品非临床研究与评价技术指导原则 [EB/OL]. ( 2021-12-03 ) [2024-12-18]. <https://www.nmpa.gov.cn/index.html>.
- [23] Nathwani AC, Rosales C, McIntosh J, et al. Long-term safety and efficacy following systemic administration of a self-complementary AAV vector encoding human FIX pseudotyped with serotype 5 and 8 capsid proteins [J]. Mol Ther, 2011, 19 ( 5 ): 876-885.
- [24] 王欣, 李伟, 郑德先, 等. 基因治疗药物 rAAV2-sTRAIL 在小鼠体内生物分布研究 [J]. 中国药理学杂志, 2021, 56 ( 13 ): 1076-1082.
- [25] FDA ( Food and Drug Administration ): clinical review report: voretigene neparvovec ( Luxturna ) [EB/OL]. (2021-01-31) [2024-12-18]. <https://www.fda.gov>.
- [26] Keam SJ. Eladocagene exuparvovec: first approval [J]. Drugs, 2022, 82 ( 13 ): 1427-1432.
- [27] Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, et al. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection [J]. Mol Ther, 2008, 16 ( 6 ): 1073-1080.
- [28] International Conference on Harmonization ( ICH ). S12. Nonclinical biodistribution considerations for gene therapy products [S]. 2019.
- [29] FDA ( Food and Drug Administration ): draft guidance for industry: long term follow-up after administration of human gene therapy products [EB/OL]. ( 2020-01-30 ) [2024-12-18]. <https://www.fda.gov>.
- [30] International Conference on Harmonization ( ICH ). M6. General principles to address virus and vector shedding [S]. 2009.
- [31] Tchandre KT, Batabyal S, Galicia M, et al. Biodistribution of adeno-associated virus type 2 carrying multi-characteristic opsin in dogs following intravitreal injection [J]. Cell Mol Med, 2021, 25: 8676-8686.
- [32] Ferla R, Alliegro M, Marteau JB, et al. Non-clinical safety and efficacy of an AAV2/8 vector administered intravenously for treatment of mucopolysaccharidosis type VI [J]. Mol Ther Methods Clin Dev, 2017, 6: 143-158.
- [33] Bey K, Deniaud J, Dubreil L, et al. Intra-CSF AAV9 and AAVrh10 administration in nonhuman primates: promising routes and vectors for which neurological diseases? [J]. Mol Ther Methods Clin Dev, 2020, 17: 771-784.
- [34] Amrani N, Luk K, Singh P, et al. CRISPR-Cas9-mediated genome editing delivered by a single AAV9 vector inhibits HSV-1 reactivation in a latent rabbit keratitis model [J]. Mol Ther Methods Clin Dev, 2024, 32 ( 3 ): 101303.
- [35] Wang Y, Feschenko M, Shen S, et al. A qPCR method for AAV genome titer with ddPCR-level of accuracy and precision [J]. Mol Ther Methods Clin Dev, 2020, 19: 341-346.
- [36] Logar K, Kopinč R, Bandelj P, et al. Evaluation of combined high-efficiency DNA extraction and real-time PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in subclinically infected dairy cattle: comparison with faecal culture, milk real-time PCR and milk ELISA [J]. BMC Vet Res, 2012, 8: 49.
- [37] FDA ( Food and Drug Administration ): clinical review report: valoctocogene roxaparvovec-rvox ( Roctavin ) [EB/OL]. (2022-06-23) [2024-12-18]. <https://www.fda.gov>.
- [38] Farraha M, Barry MA, Lu J, et al. Analysis of recombinant Adeno-associated viral vector shedding in sheep following intracoronary delivery [J]. Gene Ther, 2019, 26: 399-406.
- [39] Nguyen GN, Everett JK, Kafle S, et al. A long-term study of AAV gene therapy in dogs with hemophilia A identifies clonal expansions of transduced liver cells [J]. Nat Biotechnol, 2021, 39 ( 1 ): 47-55.
- [40] Schuettrumpf J, Liu JH, Couto LB, et al. Inadvertent germline transmission of AAV2 vector: findings in a rabbit model correlate with those in a human clinical trial [J]. Mol Ther, 2006, 13 ( 6 ): 1064-1073.
- [41] Chen SJ, Sanmiguel J, Lock M, et al. Biodistribution of AAV8 vectors expressing human low-density lipoprotein receptor in a mouse model of homozygous familial hypercholesterolemia. Hum gene [J]. Ther Clin Dev, 2013, 24 ( 4 ): 154-160.
- [42] International Conference on Harmonization ( ICH ). Considerations. General principles to address the risk of inadvertent germline integration of gene therapy vectors [S]. 2006.
- [43] Balakrishnan B, Jayandharan GR. Basic biology of Adeno-associated virus ( AAV ) vectors used in gene therapy [J]. Curr Gene Ther, 2014, 14 ( 2 ): 86-100.
- [44] Couto L, Parker A, Gordon JW. Direct exposure of mouse spermatozoa to very high concentrations of a serotype-2 Adeno-associated virus gene therapy vector fails to lead to germ cell transduction [J]. Hum Gene Ther, 2004, 15 ( 3 ): 287.
- [45] Husain SR, Han J, Au P, et al. Gene therapy for cancer: regulatory considerations for approval [J]. Cancer Gene Ther, 2015, 22 ( 12 ): 554-563.

( 收稿日期: 2024-12-20; 修回日期: 2025-02-10 )

# 三维芳香性的碳硼烷在药理作用方面的研究进展

卓周萍, 周心怡, 姚坤, 肖强, 衷友泉\*, 姜涛\* (江西中医药大学药学院, 南昌 330004)

**摘要:** 随着人们对疾病机制的深入理解以及对治疗效果的更高追求, 具有新颖结构和高效生物活性的药物分子的研发需求日益增长。碳硼烷独特的二十面体笼状结构、高含硼量、卓越的热稳定性和化学稳定性, 以及特殊的电子结构, 使其在新型药物分子设计和研发中具备独特的优势。近些年, 碳硼烷类化合物在药理研究方面取得了诸多进展, 如抗肿瘤、抗炎、抗菌、抗病毒、抗抑郁、松弛肌肉作用等。本文主要概述了碳硼烷的新型化学结构、基本性质、制备方法及其相关药理作用, 特别是在抗肿瘤方面的研究, 旨在全面呈现碳硼烷在医药学领域的潜在价值, 为碳硼烷类药物的研发提供思路。

**关键词:** 碳硼烷; 抗肿瘤; 药理作用

中图分类号: R965, O613 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)06-1742-08  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.036

## Progress in pharmacological action of three-dimensional aromatic carboranes

ZHUO Zhou-ping, ZHOU Xin-yi, YAO Kun, XIAO Qiang, ZHONG You-quan\*, JIANG Tao\* (School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004)

**Abstract:** With people's in-depth understanding of disease mechanism and the pursuit of treatment efficacy, the demand for the research and development of drug molecules with novel structures and high biological activities has been increasing. Icosahedral carborane has a cage like structure, high boron content, excellent thermal stability and chemical stability, as well as the special electronic structure, which renders them unique advantages in the design and development of new drug molecules. In recent years, a lot of progress in pharmacological research on dicarbaboranes such as anti-tumor effects, anti-inflammatory effects, antibacterial effects, antiviral effects and muscle relaxant effects has been achieved. The chemical structure, properties and preparation methods of dicarbaboranes were briefly introduced. The research progress in pharmacological action, especially anti-tumor effect of dicarbaborane drug molecules was summarized in this paper. It aims to comprehensively present the potential value of dicarbaboranes in medicine and provide ideas for the research and development of dicarbaboranes-based drugs.

**Key words:** carborane; anti-tumor; pharmacological action

在当今医药领域, 随着人们对疾病机制的深入理解以及对治疗效果的更高追求, 对于具有新颖结构和高效生物活性的药物分子的研发需求日益增长。传统药物在面对复杂疾病, 尤其是肿瘤、炎症性疾病等时, 逐渐暴露出耐药性、疗效有限、不良反应多等问题<sup>[1]</sup>, 这促使科研人员不断探索新型药物来解决传统药物的相关问题。

碳硼烷作为一类结构独特的笼状化合物, 自 20 世纪 60 年代被发现以来便备受关注, 最近在医学领域中正逐渐崭露头角<sup>[2]</sup>。近年来, 科学家通过

化学结构修饰, 在碳硼烷的结构上引入了各种官能团, 从而生成一系列的碳硼烷衍生物, 发现其在肿瘤治疗、抗菌、抗感染、抗抑郁等方面都发挥着重要的作用。特别是在肿瘤治疗领域, 碳硼烷衍生物结合硼中子俘获治疗 (BNCT) 技术展现出了对肿瘤细胞独特的杀伤机制, 如能够精准地靶向肿瘤细胞, 减少对正常细胞的损伤, 提高治疗效果的同时降低毒副作用<sup>[3]</sup>。本文将系统梳理碳硼烷在药理作用方面的研究成果, 旨在全面呈现碳硼烷在医药学领域的巨大潜在价值, 促进医药领域的创新发展。

**基金项目:** 江西中医药大学博士科研启动基金 (No.2019BSZR003); 江西省 2023 年度研究生创新专项资金项目 (No.YC2023-S792)。

**作者简介:** 卓周萍, 女, 硕士研究生, 主要从事药物化学研究, email: 1193434085@qq.com \*通信作者: 衷友泉, 男, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事药物合成研究, email: 912012993@qq.com; 姜涛, 男, 硕士研究生导师, 主要从事药物化学研究, chjiangtao@jxutcm.edu.cn

1 碳硼烷的基本结构和性质

碳硼烷 (C<sub>2</sub>B<sub>10</sub>H<sub>12</sub>) 是由硼原子和碳原子组成的一种多面体硼簇化合物, 其含硼量高, 可视作苯的 3D 类似物<sup>[4]</sup>。根据构型的差异, 碳硼烷可分为闭式 (closo)、开式 / 巢式 (nido)、蛛网式 (arachno) 碳硼烷; 根据碳原子位置的不同可分为邻、间、对碳硼烷 (*o*-, *m*-, *p*-carboranes), 在高温条件下可发生原子重排, 其 3 种构型在高温条件下可以发生相互转化, 如图 1 所示。

碳硼烷具有独特的三维笼状结构和强缺电子结构, 化学键较为稳定, 在生理环境中不易被破坏, 能够保证药物分子在体内保持结构完整<sup>[5]</sup>。碳硼烷在体内稳定性较好, 其结构引入可延缓药物在体内的代谢, 延长药物作用时间, 提高药物的生物利用度, 从而更好地发挥药效。此外还具有较低的毒性和较强的疏水性, 这种疏水性可以用于调节药物分子的亲脂 - 亲水性平衡, 使药物更容易穿透生物被膜, 从而更好地发挥作用<sup>[6]</sup>。碳硼烷具备含硼量高

的特点, 可以作为硼的载体应用于 BNCT, 用于治疗肿瘤等疾病<sup>[7]</sup>。因碳硼烷独特的结构和特殊的性质, 可将其设计成新型的药物分子。

2 碳硼烷药物衍生物的制备方法

碳硼烷药物衍生物的制备方法主要有 3 种, 分别是炔烃加成法、强碱活化法、过渡金属偶联法, 对这 3 种方法进行对比<sup>[8-9]</sup>, 结果见表 1。其中癸硼烷与炔烃环加成反应是最成熟的方法, 该方法可分为一步法和两步法。一步法是最主要和最常用的方法, 即用癸硼烷和取代的炔烃加上 Lewis 碱直接加成得到邻碳硼烷; 两步法即将碳硼烷与二甲基甲酰胺或乙腈等溶剂反应得到癸硼烷络合物, 再与取代炔烃加成反应得到邻碳硼烷, 如图 2 所示, R 代表不同的官能团, L 代表乙腈、N, N-二甲基甲酰胺 (DMF)、N, N-二甲基乙酰胺 (DMA) 等。碳硼烷可与其他原子成键使其官能化, 可合成一系列不同结构的碳硼烷药物衍生物从而能发挥不同的药效。

表 1 碳硼烷药物衍生物的 3 种制备方法<sup>[8-9]</sup>

Tab 1 Three preparation methods of carborane drug derivatives<sup>[8-9]</sup>

| 对比项目    | 反应机制                                | 反应条件                       | 优点                              | 缺点                                                             |
|---------|-------------------------------------|----------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| 炔烃加成法   | 硼氢键与碳 - 碳三键反应形成环状物                  | 高温无水无氧体系, 芳烃类溶剂 (如甲苯)      | 方法成熟, 操作简便、反应高效、官能团耐受性好和底物适用范围宽 | ① 极性基团会使癸硼烷瓦解, 故不适用于含氨基、羧基、羟基等极性基团取代的炔烃反应物; ② 原料若为内部炔烃, 反应产率较低 |
| 强碱活化法   | 强碱夺取碳硼烷碳端质子形成碳负离子中间体, 再与卤代烃发生亲核取代反应 | 需强碱 (如正丁基锂, 低温使用), 无水无氧体系  | 方法经典, 使用广泛                      | 会出现多种副反应, 操作严格, 强碱有安全隐患, 后处理复杂                                 |
| 过渡金属偶联法 | 过渡金属催化剂与反应物形成配合物, 经氧化加成、还原消除促进反应    | 需要合适的过渡金属 (如钯、镍) 和配体, 特定温度 | 高效、新颖, 适用范围广                    | 过渡金属催化剂成本高, 有毒性, 对环境人体有一定危害                                    |

3 碳硼烷的药理作用

3.1 抗肿瘤作用

肿瘤是影响人类健康的重大疾病, 每年都有许多患者因患肿瘤而死亡。传统治疗肿瘤的方法有手术治疗、化疗和放疗, 但这些治疗方法都有一定的毒副作用。BNCT 是一种较新的二元靶向治疗肿瘤的方法<sup>[10]</sup>。相对于传统的治疗方法, BNCT 对肿瘤细胞的靶向性高, 能较好地选择性杀死肿瘤细

胞, 对正常细胞影响较小, 治疗效果更好, 这引起了科学家的关注。碳硼烷类衍生物具有高含硼量、卓越的热稳定性和化学稳定性, 易于功能化和附着到其他肿瘤靶向分子, 在 BNCT 中展现出巨大的潜力<sup>[11]</sup>。传统的化疗药物是抗肿瘤治疗的主力军, 而新型的碳硼烷药物也带来了新的希望, 笔者对抗肿瘤新旧药物进行了对比, 详见表 2。

表 2 传统抗肿瘤药物与新型碳硼烷药物的对比<sup>[12-15]</sup>

Tab 2 Comparison between traditional anti-tumor drugs and novel carborane drugs<sup>[12-15]</sup>

| 药物类型    | 作用机制                                                             | 药物类别                                                                | 优点                                      | 缺点                                                            |
|---------|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| 传统抗肿瘤药物 | ① 干扰核酸生物合成; ② 直接影响 DNA 的结构和功能; ③ 干扰转录过程阻止 RNA 的合成; ④ 干扰蛋白质的合成和功能 | ① 细胞毒类: 烷化剂、抗代谢药、抗生素类、植物碱类; ② 靶向药物: 小分子靶向药物、单克隆抗体; ③ 激素类药物: 糖皮质激素类等 | 适用范围广, 研究深入成熟, 价格层次多样                   | 毒副作用大: 会引起恶心、呕吐、脱发、骨髓抑制; 特异性差: 化疗药物在杀死肿瘤细胞的同时, 也会对周围正常细胞有严重影响 |
| 新型碳硼烷药物 | 通过 BNCT, 利用含硼药物在肿瘤细胞中聚集, 中子束照射后产生粒子, 精准破坏肿瘤细胞                    | ① 氨基酸 - 碳硼烷; ② 蛋白质 - 碳硼烷; ③ 胆固醇 - 碳硼烷; ④ 金属 - 碳硼烷; ⑤ 纳米颗粒 - 碳硼烷等    | 对肿瘤细胞的杀伤力更加精准, 对周围正常组织损伤小, 不良反应少, 治疗次数少 | 适用范围有限, 技术要求高: 需要有专门的中子源设备, 设备成本高                             |



**3.1.1 BNCT 的基本原理** 传统放射治疗主要是利用 X、 $\gamma$  射线对肿瘤细胞进行照射, 破坏肿瘤细胞的 DNA, 抑制肿瘤细胞的生长, 这种高能量放射线在穿透正常组织细胞的时候, 会与细胞中的分子相互作用造成细胞损伤。相对于传统放射治疗, BNCT 主要有以下优势: 对肿瘤细胞的杀伤力更加精准, 毒副作用小, 治疗疗程短。其基本原理是在人体中注射一种含  $^{10}\text{B}$  的药物, 该药物会选择性地大量聚集在肿瘤细胞上, 在正常组织细胞中分布较少, 再通过外源性热中子束的照射,  $^{10}\text{B}$  会发生核反应生成  $\alpha$  粒子和  $^7\text{Li}$  离子, 这些粒子仅具有一个细胞尺寸,  $\alpha$  粒子的射程约为  $5 \sim 9 \mu\text{m}$ , 锂离子的射程约为  $1 \sim 3 \mu\text{m}$ , 从而杀死肿瘤细胞, 对周围正常的组织细胞几乎无影响 (如图 3 所示) [16]。

### 3.1.2 新型碳硼烷抗肿瘤药物

① 生物大分子类 - 碳硼烷: 生物大分子类的碳硼烷主要包括氨基酸 - 碳硼烷和蛋白质 - 碳硼烷等, 这些生物大分子与碳硼烷结合可发挥抗肿瘤作用。

1) 氨基酸 - 碳硼烷: 氨基酸是生物体新陈代谢所必需的活性物质, 能够被设计成生物活性剂, 分子中存在的氨基酸片段可实现靶向递送和选择性结合生物靶标。硼苯丙氨酸 (BPA) 是最早发现的 BNCT 药物之一 [17-18]。此外, 碳硼烷与氨基酸结合生成的化合物可以作为潜在的 BNCT 药物, 用于治疗肿瘤 [19]。Crivello 等 [20] 合成了新型的碳硼烷化合物, 即 *o*-CB-Gln (结构如图 4 所示), 具有谷氨酰胺功能, 可解决 BNCT 分子与肿瘤细胞外表面的结合问题。它被 C6 神经胶质瘤细胞吸收的程度与成熟的硼酸钠 (BSH) 系统相同, 但具有减少肝细胞内化的优势。*o*-CB-Gln 的治疗指数与 BSH 相似, 并且肝毒性要低得多, 是一种潜在的 BNCT 药物。He 等 [21] 合成了 2-氨基-3-(1, 7-二碳-十二硼-1-硫代) 丙酸 (结构如图 4 所示), 这主要是一种通过半胱氨酸与间碳硼烷连接而成的硼输送剂。经研究发现, 该化合物对胶质母细胞瘤 U87 细胞的基因表达有抑制作用, 这也是首次报道碳硼烷化合物对转录的影响。

2) 蛋白质 - 碳硼烷: 烟酰胺磷酸核糖转移酶 (NAMPT) 是哺乳动物烟酰胺腺嘌呤二核苷酸循环途径中的第一种限速酶 [22], 可将烟酰胺转化为烟酰胺单核苷酸, NAMPT 会影响细胞代谢 [23] 及凋亡 [24], 参与炎症反应 [25], 发挥抗肿瘤作用 [26]。Asawa 等 [27] 合成了一系列新型的 NAMPT 抑制剂, 发现用碳硼烷取代苯基可以提高活性, 其碳硼烷酰胺部分对 NAMPT 抑制活性较好。

② 胆固醇 - 碳硼烷: 胆固醇是一种脂溶性的环戊烷多氢菲的衍生物, 具有四环结构和一个羟基, 在血液中通常与脂蛋白结合运输。胆固醇可以作为药物载体, 增强药物的稳定性、提高药物的靶向性、控制药物释放 [28-29]。Alberti 等 [30] 合成了一种含碳硼烷的胆固醇衍生物, 名为 Gd-B-AC01。Gd-B-AC01 是以碳硼烷为核心, 其左侧连接酰胺复合物, 右侧连接胆固醇单元。其中, 烟酰胺复合物对硼浓度的定量测定可通过磁共振成像 (MRI) 来实现, 胆固醇一般用于插入脂质体双层以增加颗粒的稳定性。研究显示, 嵌入了 MRI/BNCT 双探针的脂质体, 已采用聚乙二醇化磷脂进行了官能化处理。这种载体可以将大量药物转运到过表达叶酸受体的人类卵巢癌细胞 (IGROV-1) 中。IGROV-1 细胞经硼中子俘获治疗和热中子束照射后, 肿瘤细胞数量显著减少。

③ 金属碳硼烷: 碳硼烷可与金属离子发生配位形成金属配合物, 可发挥良好的抗肿瘤作用。Wu 等 [31] 合成了新型的碳硼烷衍生物抗癌剂, 即二茂铁取代的二硫代-*o*-碳硼烷偶联物 (分别为 FcSB1、FcSB2 和 FcSBCO), 并测定了其体外抗肿瘤活性, 抗肿瘤活性的大小为  $\text{FcSB2} > \text{FcSB1} > \text{FcSBCO}$ , 其中 FcSB1 和 FcSB2 对肿瘤细胞 SMMC-7721 和 HepG2 具有抑制作用, 且对正常细胞影响较小。Zhang 等 [32] 研究发现, 碳硼烷钆 (II)-芳炔复合物能诱导裂解的 Caspase-3 活性, 还能刺激聚合酶的蛋白水解裂解, 对人肺癌 HCC827 细胞具有显著的细胞毒性和肿瘤抑制特性, 在  $5 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的浓度范围内, 碳硼烷钆 (II)-芳炔复合物对 HCC827 细胞具有明显的细胞毒性作用,  $\text{IC}_{50}$  值范围为  $(19.6 \pm 5.3) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

④ 纳米颗粒 - 碳硼烷: 纳米颗粒可以包裹碳硼烷类药物, 增加药物的溶解度, 使其更好地在体内运输, 还能通过增强渗透和滞留效应 (EPR), 使药物更多地在肿瘤细胞中聚集, 从而更好地杀死肿瘤细胞。Wang 等 [33] 合成了具有亲水性的纳米颗粒碳硼烷 DOX/CB@DMSNs (R), 加载的抗肿瘤药物 DOX 可实现体内荧光追踪和化疗的双重功能。这种纳米颗粒可以抑制硼泄漏到血液中、具有高硼负载能力、良好的生物相容性, 是一种潜在的 BNCT 试剂。研究显示, 这类潜在的 BNCT 药物能使肿瘤与血液的硼浓度比值高达 27.1, 还能将硼选择性地输送到肿瘤部位, 肿瘤细胞中的硼含量可达  $24.4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  [33]。Xiong 等 [34] 通过自组装的方式, 让碳硼烷偶联的两亲性共聚物 PEGb-P (LA-co-MPCB) (简称 PLMB) 负载上阿霉素 (DOX) 制备纳米粒子 DOX@PLMB, 成功实现了阿霉素在 BNCT 和化疗中的联合给药;

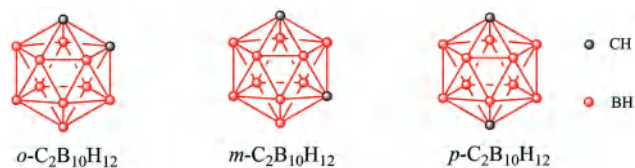


图 1 碳硼烷的基本结构

Fig 1 Basic structure of carboranes

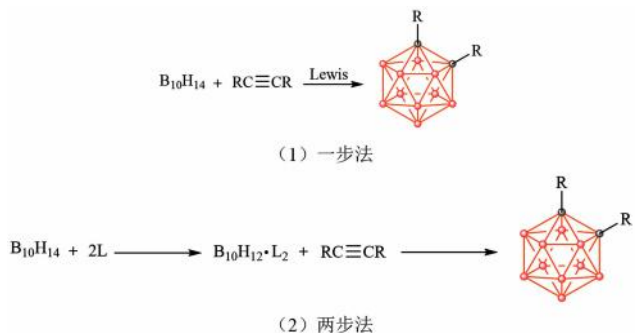


图 2 癸硼烷与炔烃的加成反应

Fig 2 Addition reaction of decaborane with alkynes

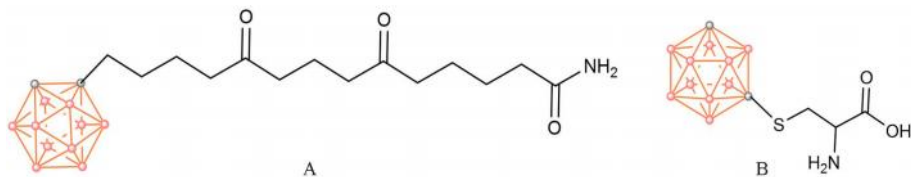

 图 4 *o*-CB-Gln (A) 和 2-氨基-3-(1,7-二碳-十二硼-十二硼-1-硫代)丙酸 (B) 的结构式

 Fig 4 Chemical structure of *o*-CB Gln (A) and 2-amino-3-(1,7-dicarbadecaborane-decaborane-1-thio) propionic acid (B)

延长了药物血液循环的时间,增加了肿瘤组织中的硼含量,提高了治疗效果。

### 3.2 抗炎作用

常见的抗炎药物主要有甾体类和非甾体类等,但目前存在的抗炎药物会引起消化不良、呕吐、胃肠道出血、向心性肥胖等较严重的不良反应,故还需要研发出不良反应较小的新型抗炎药物,而新型的碳硼烷药物分子有望克服传统抗炎药物耐药性的问题,笔者对新旧药物做了一个对比,详见表 3<sup>[35-37]</sup>。

Zhang 等<sup>[38]</sup>报道了 3 种碳硼烷金属配合物,即锇、钌和铱的金属络合物(结构如图 5 所示),并对这些络合物进行了细胞毒性和抗炎活性实验评估,研究结果表明,铱-碳硼烷金属络合物无细胞毒性,而对于细菌内毒素脂多糖诱导产生的一氧化氮,所有金属配合物都呈现出随剂量变化的抑制作用。特别是铱配合物,其抗炎效果更好。

Bednarska 等<sup>[37]</sup>探究了碳硼烷药效团修饰的腺苷对人类中性粒细胞活性的调节作用、潜在的作用机制。研究发现,腺苷-碳硼烷簇偶联物具有独特作用,一方面能够抑制中性粒细胞中 ROS 的产生,进而降低中性粒细胞的氧化应激水平;另一方面,该偶联物还能对相关信号通路进行调

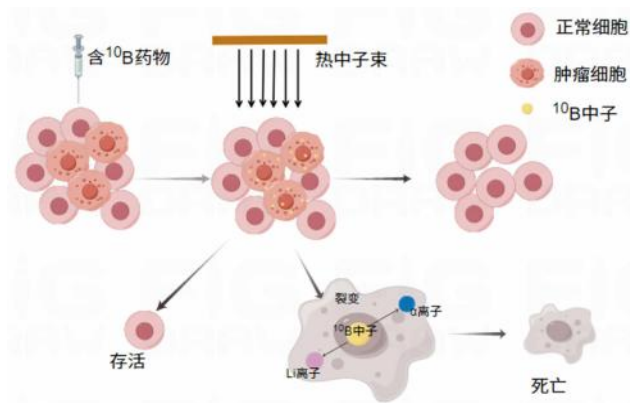


图 3 BNCT 的作用机制

Fig 3 Mechanism of action of BNCT

碳硼烷与聚合主链之间存在共价键,防止了硼化合物泄漏到血液里;同时,阿霉素与碳硼烷之间存在二氢键,能防止阿霉素瞬间大量释放,起到保护阿霉素的作用,研究结果表明,DOX@PLMB

节。这些作用使得腺苷-碳硼烷簇偶联物展现出潜在的抗炎和免疫调节特性。

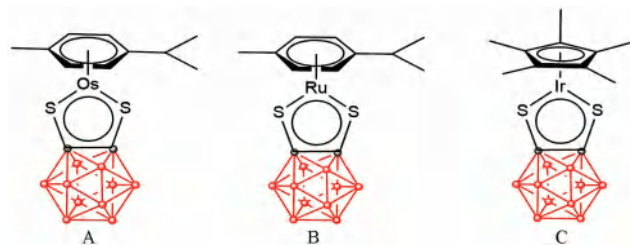


图 5 锇(A)、钌(B)和铱(C)碳硼烷金属配合物的结构式

Fig 5 Chemical structure of osmium (A), ruthenium (B), and iridium (C) carboborane metal complexes

### 3.3 抗菌作用

细菌耐药性是人类难以解决的问题,故还需要研发新型的抗菌药物,而碳硼烷的衍生物已经被报道具有抗菌作用,可作为潜在的新型抗菌剂,笔者对传统抗菌药物与新型碳硼烷抗菌药物进行了对比,详见表 4。

**3.3.1 金属-碳硼烷** 金属碳硼烷衍生物,可提高其对金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 的抗菌活性,以及对哺乳动物细胞的选择性<sup>[42]</sup>。Kubiński 等<sup>[43]</sup>研究发现,金属碳硼烷衍生物具有显著的抗白色念珠菌活性。在这些衍生物中,部分具有



表 3 传统抗炎药物与新型碳硼烷药物的对比<sup>[35-37]</sup>

| Tab 3 Comparison between traditional anti-inflammatory drugs and novel carborane drugs <sup>[35-37]</sup> |                                         |                                      |                                  |                          |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| 药物类型                                                                                                      | 化学结构                                    | 作用机制                                 | 优点                               | 缺点                       |
| 传统抗炎药物                                                                                                    | 具有多种不同的结构类型，主要通过抑制炎症介质的合成、释放或如甾体类、非甾体类等 | 作用于相关受体等方式来减轻炎症反应，如抑制环氧酶（COX）等       | 应用经验丰富，成本低，适用范围广                 | 选择性差，疗效差异大，不良反应明显，易产生耐药性 |
| 新型碳硼烷药物                                                                                                   | 由硼和碳原子组成的笼状结构，如碳硼烷金属配合物、腺苷碳硼烷等          | 可通过抑制中性粒细胞活性氧（ROS）的产生及调节相关信号通路发挥抗炎作用 | 结构新颖，有望克服传统药物的耐药性；选择性好，具有较强的抗炎活性 | 由于是新开发的药物类型，可能会存在未知的不良反应 |

表 4 传统抗菌药物与新型碳硼烷药物的对比<sup>[39-41]</sup>

| Tab 4 Comparison between traditional antibacterial drugs and novel carborane drugs <sup>[39-41]</sup> |                                            |                                    |                                         |                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------|
| 药物类型                                                                                                  | 化学结构                                       | 作用机制                               | 优点                                      | 缺点                   |
| 传统抗菌药物                                                                                                | ①β-内酰胺类；②氨基糖苷类；③大环内酯类；④喹诺酮类                | ①抑制细胞壁合成；②影响细胞膜功能；③抑制蛋白质合成；④抑制核酸合成 | 临床经验丰富，机制明确，抗菌谱广                        | 耐药性严重，不良反应多          |
| 新型碳硼烷药物                                                                                               | 以碳硼烷为核心结构，可与其他基团结合形成衍生物，如金属-碳硼烷、青霉素-碳硼烷类似物 | 尚未明确，有待进一步研究报道                     | 抗菌活性高；结构新颖，不易产生耐药性，细菌尚未针对这种新结构进化出新的耐药机制 | 作为新型药物，可能存在尚未发现的不良反应 |

抗菌活性的金属碳硼烷能够与具有抗病毒作用的两性霉素 B 相结合，以此来对抗具有耐药性的白色念珠菌。Li 等<sup>[44]</sup>对 3 种新型的二茂铁-碳硼烷衍生物（结构如图 6 所示）进行了抗菌活性测试。研究结果显示，这些化合物既没有细胞毒性，也不会引发最小抑菌浓度（MIC）的溶血现象。其中，FcSB1、FcSB2 和 FcSBC0 都呈现出浓度依赖性的抗菌作用。在每个测试浓度下，FcSB1 和 FcSBC0 均表现出抑菌活性，但没有杀菌活性。这为开发针对多重耐药病原菌的高效新型化学抗菌药物提供了实验基础。

**3.3.2 青霉素-碳硼烷类似物及其他** Różycka 等<sup>[45]</sup>将邻、间、对碳硼烷与氨基青霉素酸（6-APA）进行偶联合成了 3 种青霉素硼簇类似物（结构如图 7 所示），并测试了它们的抗菌活性。研究表明，邻、间、对位碳硼烷簇修饰的 6-APA 抑制革兰氏阳性菌作用依次减弱，偶联物 C 对金黄色葡萄球菌 12（MRSA）和 21（MSSA）的抑制活性高于 6-APA。

此外，Różycka 等<sup>[46]</sup>合成了新型异烟肼-碳硼烷杂合物，并且精确地对其结构进行了表征。体外抗结核活性测试表明，部分杂合物对结核分枝杆菌（包括耐药菌株）具有良好的抑制活性，效果优于异烟肼。Sun 等<sup>[47]</sup>合成了一类 3D 二硼并噁唑类似物，这类类似物中用十二硼酸盐取代了苯的部分，随后对其抗菌活性进行了测试，结果观察到该类似物对淋病奈瑟菌具有很强的选择性杀菌活性。Li 等<sup>[48]</sup>合成了 9 种含碳硼烷结构的 SQ109 类似物，并对其抗菌和抗原虫活性进行了测试，研究发现这些类似物对耻垢分枝杆菌、

枯草芽孢杆菌、酿酒酵母、大肠埃希菌具有抑制活性，这项研究为开发新型的抗菌药物提供了新的方向和思路。

3.4 抗病毒作用

碳硼烷首次被证明能刺激狂犬病病毒增殖，有研究人员合成了 5 种类型的三取代碳硼烷<sup>[49]</sup>，分别是邻碳硼烷支架 I 和 II、间碳硼烷支架 III 和 IV、对碳硼烷支架 V（结构如图 8 所示），并对三取代的碳硼烷化合物进行了缺氧诱导因子（HIF）-1 转录活性、抗狂犬病病毒活性和抗增殖活性检测。研究结果发现，支架 V 类型的碳硼烷具有刺激狂犬病病毒的增殖、抗病毒活性（ $IC_{50} = 3.87 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ），还能抑制 HIF-1 $\alpha$  诱导的转录途径，而不影响 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达；具有支架 II 的碳硼烷（化合物 II b-g）和 IV（化合物 IV b）也表现出抗狂犬病病毒活性。此外还有研究发现，含巢式碳硼烷的嘌呤衍生物具有抗病毒活性，即对 I 型单纯疱疹病毒的阿昔洛韦耐药菌株以及甲型和乙型流感病毒具有活性<sup>[50]</sup>。

3.5 抗抑郁作用

P2X<sub>7</sub> 受体是 ATP 敏感的离子型 P2X 受体家族的成员之一，在免疫细胞和神经系统中均有表达。在神经系统中，P2X<sub>7</sub> 受体的激活与炎症反应相关，可能参与了慢性疼痛、抑郁症等疾病的发生和发展过程。因此，P2X<sub>7</sub> 受体拮抗剂可能具有抗抑郁的潜力。Wilkinson 等<sup>[51]</sup>合成了一种新型的 P2X<sub>7</sub> 受体拮抗剂（结构如图 9 所示），并进行了生物活性测试。结果表明，P2X<sub>7</sub> 受体拮抗剂能够与 P2X<sub>7</sub> 受体特异性结合，并且在细胞实验中能够抑制 P2X<sub>7</sub> 受体介导的细胞内信号通路。



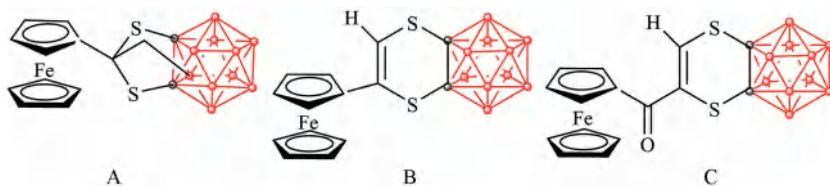


图 6 FeSB1 (A)、FeSB2 (B) 和 FeSBC0 (C) 金属碳硼烷的结构式

Fig 6 Chemical structure of metal carbaboranes FeSB1 (A), FeSB2 (B), and FeSBC0 (C)

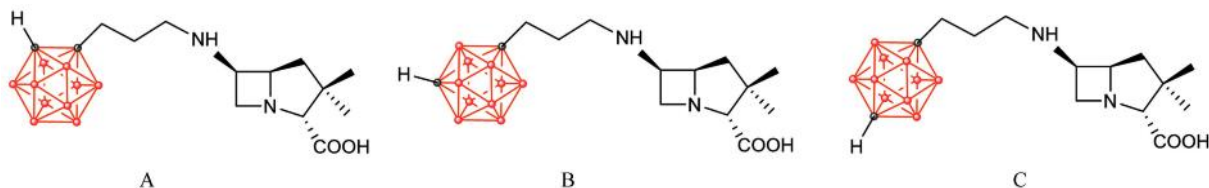


图 7 邻 (A)、间 (B)、对 (C) 碳硼烷青霉素类似物的结构式

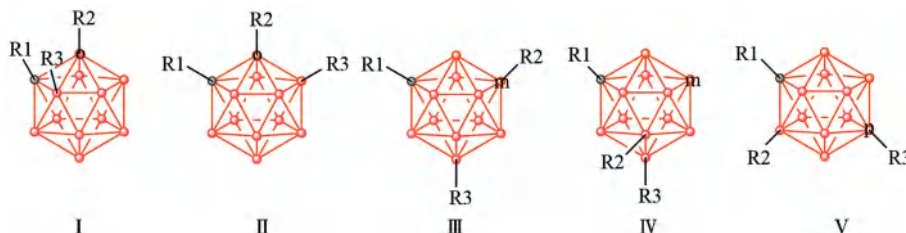
 Fig 7 Chemical structure of *o*-carboranes (A), *m*-carboranes (B), and *p*-carboranes (C) penicillin analogues


图 8 邻碳硼烷 I 和 II、间碳硼烷 III 和 IV、对碳硼烷 V 的结构式

 Fig 8 Chemical structure of *o*-carboranes I and II, *m*-carboranes III and IV, and *p*-carboranes V

这是第一个具有中枢神经系统活性的碳硼烷化合物，该化合物作为新型 P2X<sub>7</sub> 受体拮抗剂，具有穿越血脑屏障的能力和显著的抗抑郁效果。该研究拓宽了碳硼烷在药学方面的应用，为开发新型的抗抑郁药物提供了新的研究思路。

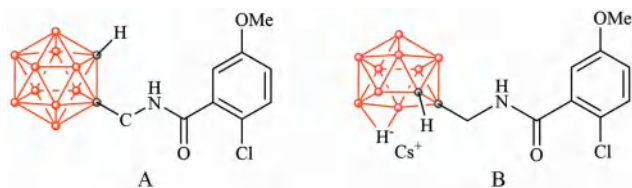

 图 9 闭式 (A) 和巢式 (B) 碳硼烷 P2X<sub>7</sub> 受体拮抗剂的结构式

 Fig 9 Chemical structure of closo (A) and nido (B) carbaborane P2X<sub>7</sub> receptor antagonists

### 3.6 松弛肌肉作用

神经肌肉阻断剂 (NMBA) 是一类作用于神经肌肉接头处，干扰神经冲动传递，从而使骨骼肌松弛的药物<sup>[52]</sup>。美国密苏里大学国际纳米与分子医学研究所的研究人员<sup>[53]</sup>合成了 3 种基于碳硼烷的同分异构体神经肌肉阻断剂。这类神经肌肉阻断剂是以十甲基铵为基础，在两个季铵基团之间的亚甲基链中引入碳硼烷簇，得到了 3 种碳硼烷的同分异构体，分别为邻位、间位和对位异构体，即 *o*-NMB、*m*-NMB 和 *p*-NMB (结构如图 10 所示)。对这些物质进行了神经肌肉阻断活性测

试、电生理测试和动物实验，其研究表明：3 种含碳硼烷的神经肌肉阻滞剂都表现出非去极化型神经肌肉阻断剂的特性，能够引起可逆的肌肉松弛。其中，对位异构体起效速度较快，阻断效果也较强；而邻位和间位异构体的作用相对较弱。这些化合物可能通过与神经肌肉接头处的乙酰胆碱受体相互作用，干扰乙酰胆碱的传递，从而产生神经肌肉阻断作用。在动物实验中，这些化合物的安全性较好，未观察到明显的毒性反应。未来可对这些化合物进行结构优化，提高其神经肌肉阻断效果和选择性，降低潜在的毒副作用。

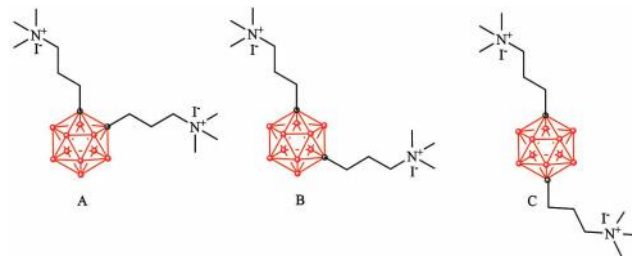

 图 10 *o*-NMB (A)、*m*-NMB (B) 和 *p*-NMB (C) 神经肌肉阻断剂的结构式

 Fig 10 Chemical structure of *o*-NMB (A), *m*-NMB (B) and *p*-NMB (C) neuromuscular blockers

### 3.7 其他作用

碳硼烷衍生物还被报道在骨组织中起雄激素的作用<sup>[54]</sup>，是老年相关骨弱点男性骨稳态的潜在

AR 调节剂。雄激素可以刺激成骨细胞的活性,成骨细胞主要负责骨形成,促进骨基质的合成和矿化。同时,雄激素还能抑制破骨细胞的形成和活性,破骨细胞主要功能是骨吸收,这样就减少了骨质的破坏,有助于维持骨量的平衡<sup>[55]</sup>。在男性的整个生命周期中,雄激素对于维持正常的骨密度和骨强度都很重要,有助于预防骨质疏松症。

#### 4 小结和展望

以碳硼烷为母体结构进行结构修饰可以合成一系列不同的碳硼烷衍生物,从而表现出多种不同的药理活性,在抗肿瘤、抗感染等医学领域方面的研究属于新兴阶段。无论是抗肿瘤药物研发,还是抗炎与抗感染药物探索,含碳硼烷的药物都在临床前研究和临床试验中表现出良好的活性与安全性。目前,碳硼烷作为 BNCT 药物用于肿瘤治疗是研究的热门方向,其研究热点是如何将含硼药物精准地且高浓度地递送至肿瘤细胞。然而,碳硼烷在药物研发过程中仍面临诸多挑战,如毒性与不良反应评估不全面、相关作用机制缺乏深入研究、药物递送难等问题,限制了其进一步的临床应用与推广。随着研究的不断深入,相信碳硼烷未来在医学研究领域将有着更广泛的应用。

#### 参考文献

- [1] 姜泽慧,何芳,刘嵩,等.肿瘤耐药性的研究进展[J].中国医药导刊,2024,26(7):685-690.
- [2] Marfavi A, Kavianpour P, Rendina LM. Carboranes in drug discovery, chemical biology and molecular imaging [J]. Nat Rev Chem, 2022, 6(7): 486-504.
- [3] Zargham EO, Mason CA, Lee JrMW. The use of carboranes in cancer drug development [J]. Int J Cancer Clin Res, 2019, 6: 110.
- [4] Chen Y, Du FK, Tang LY, et al. Carboranes as unique pharmacophores in antitumor medicinal chemistry [J]. Mol Ther Oncolytics, 2022, 24: 400-416.
- [5] 赵薇佳,贺嘉俊,芦昌盛.碳硼烷化学发展之路[J].大学化学,2019,34(1):39-47.
- [6] Issa F, Kassiou M, Rendina LM. Boron in drug discovery: carboranes as unique pharmacophores in biologically active compounds [J]. Chem Rev, 2011, 111(9): 5701-5722.
- [7] Marforio TD, Carboni A, Calvaresi M. In vivo application of carboranes for boron neutron capture therapy (BNCT): structure, formulation and analytical methods for detection [J]. Cancers, 2023, 15(20): 4944.
- [8] 陈浩楠,王锐,肖金武,等.碳硼烷衍生物的合成与应用进展[J].固体火箭技术,2019,42(5):585-590,603.
- [9] 陆居有,杜咏梅,万洪等.碳硼烷衍生物的合成研究进展[J].合成化学,2015,23(9):883-892.
- [10] Suzuki M. Boron neutron capture therapy (BNCT): a unique role in radiotherapy with a view to entering the accelerator-based BNCT era [J]. Int J Clin Oncol, 2020, 25(1): 43-50.
- [11] 廖才智,叶涛生,钟琴,等.碳硼烷作为药效团在硼中子俘获疗法中的研究进展[J].现代诊断与治疗,2024,35(12):1767-1774.
- [12] Dymova MA, Taskaev SY, Richter VA, et al. Boron neutron capture therapy: current status and future perspectives [J]. Cancer Commun, 2020, 40(9): 406-421.
- [13] 王森,童永彭.硼中子俘获治疗的进展及前景[J].同位素,2020,33(1):14-26.
- [14] 杨璐,余聂芳.长春碱类抗肿瘤药物的研究进展[J].中南药学,2016,14(6):625-630.
- [15] 徐焦,蒙凌华,卿晨.传统抗肿瘤药物的临床应用现状与发展[J].药学报,2021,56(6):1551-1561.
- [16] He HF, Li JY, Jiang P, et al. The basis and advances in clinical application of boron neutron capture therapy [J]. Radiat Oncol, 2021, 16: 1-8.
- [17] Laird M, Matsumoto K, Higashi YY, et al. Organosilica nanoparticles containing sodium borocaptate (BSH) provide new prospects for boron neutron capture therapy (BNCT): efficient cellular uptake and enhanced BNCT efficacy [J]. Nanoscale Adv, 2023, 5(9): 2537-2546.
- [18] Idrees M, Mohammad AR, Karodia N, et al. Multimodal role of amino acids in microbial control and drug development [J]. Antibiotics, 2020, 9(6): 330.
- [19] Gruzdev DA, Levit GL, Krasnov VP, et al. Carborane-containing amino acids and peptides: synthesis, properties and applications [J]. Coordin Chem Rev, 2021, 433: 213753.
- [20] Crivello A, Nervi C, Gobetto R, et al. Towards improved boron neutron capture therapy agents: evaluation of in vitro cellular uptake of a glutamine-functionalized carborane [J]. J Biol Inorg Chem, 2009, 14: 883-890.
- [21] He TY, Chittur SV, Musah RA. Impact on glioblastoma U87 cell gene expression of a carborane cluster-bearing amino acid: implications for carborane toxicity in mammalian cells [J]. Acs Chem Neurosci, 2018, 10(3): 1524-1534.
- [22] Audrito V, Managò A, Gaudino F, et al. Targeting metabolic reprogramming in metastatic melanoma: the key role of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) [J]. Semin Cell Dev Biol, 2019, 98(C): 192-201.
- [23] Garten A, Schuster S, Penke M, et al. Physiological and pathophysiological roles of NAMPT and NAD metabolism [J]. Nat Rev Endocrinol, 2015, 11(9): 535-546.
- [24] Oita RC, Camp SM, Ma W, et al. Novel mechanism for nicotinamide phosphoribosyltransferase inhibition of TNF- $\alpha$ -mediated apoptosis in human lung endothelial cells [J]. Am J Resp Cell Mol, 2018, 59(1): 36-44.
- [25] Audrito V, Messana VG, Deaglio S. NAMPT and NAPRT: two metabolic enzymes with key roles in inflammation [J]. Front Oncol, 2020, 10: 358.
- [26] Wu Y, Wang L, Huang YH, et al. Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) is a new target of antitumor agent chidamide [J]. Acs Med Chem Lett, 2019, 11(1): 40-44.
- [27] Asawa Y, Katsuragi K, Sato A, et al. Structure-based drug design of novel carborane-containing nicotinamide phosphori-

- bosyltransferase inhibitors [J]. Bioorgan Med Chem, 2019, 27 (13): 2832-2844.
- [28] Xu HJ, Zhou S, Tang QL, et al. Cholesterol metabolism: new functions and therapeutic approaches in cancer [J]. BBA-Rev Cancer, 2020, 1874 (1): 188394.
- [29] Ruwizhi N, Aderibigbe BA. The efficacy of cholesterol-based carriers in drug delivery [J]. Molecules, 2020, 25 (18): 4330.
- [30] Alberti D, Toppino A, Crich SG, et al. Synthesis of a carborane-containing cholesterol derivative and evaluation as a potential dual agent for MRI/BNCT applications [J]. Org Biomol Chem, 2014, 12 (15): 2457-2467.
- [31] Wu CH, Ye HD, Bai WJ, et al. New potential anticancer agent of carborane derivatives: selective cellular interaction and activity of ferrocene-substituted dithio-*o*-carborane conjugates [J]. Bioconjug Chem, 2011, 22 (1): 16-25.
- [32] Zhang G, Wu CH, Ye HD, et al. Nanoscaled carborane ruthenium ( II )-arene complex inducing lung cancer cells apoptosis [J]. J Nanobiotechnol, 2011, 9: 1-8.
- [33] Wang Y, Xu YW, Yang JY, et al. Carborane based mesoporous nanoparticles as a potential agent for BNCT [J]. Mater Chem Front, 2021, 5 (6): 2771-2776.
- [34] Xiong HJ, Zhou DF, Qi YX, et al. Doxorubicin-loaded carborane-conjugated polymeric nanoparticles as delivery system for combination cancer therapy [J]. Biomacromolecules, 2015, 16 (12): 3980-3988.
- [35] 姑丽尼格尔·艾尼瓦尔, 谢茜, 陈心怡, 等. 非甾体抗炎药疗效影响因素的研究进展 [J]. 中国药师, 2024, 27 (5): 885-891.
- [36] 戴海霞, 张晓燕, 徐开俊, 等. 非甾体抗炎药研究的最新进展 [J]. 药物生物技术, 2012, 19 (1): 90-94.
- [37] Bednarska K, Olejniczak AB, Klink M, et al. Modulation of human neutrophil activity by adenosine modified with a carborane pharmacophore [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2014, 24 (14): 3073-3078.
- [38] Zhang JW, Pitto-Barry A, Shang LJ, et al. Anti-inflammatory activity of electron-deficient organometallics [J]. Roy Soc Open Sci, 2017, 4 (11): 170786.
- [39] 刘铭宇, 王琳琳, 董天奇, 等. 抗菌药物的作用机制及其研究进展 [J]. 广东化工, 2021, 48 (15): 125-126.
- [40] Fink K, Uchman M. Boron cluster compounds as new chemical leads for antimicrobial therapy [J]. Coordin Chem Rev, 2021, 431: 213684.
- [41] Romero I, Martinez-Medina M, Camprubi-Font C, et al. Metallacarborane assemblies as effective antimicrobial agents, including a highly potent anti-MRSA agent [J]. Organometallics, 2020, 39 (23): 4253-4264.
- [42] Cebula J, Fink K, Goldeman W, et al. Structural patterns enhancing the antibacterial activity of metallacarborane-based antibiotics [J]. J Med Chem, 2023, 66 (21): 14948-14962.
- [43] Kubiński K, Małyk M, Janeczko M, et al. Metallacarborane derivatives as innovative anti-candida albicans agents [J]. J Med Chem, 2022, 65 (20): 13935-13945.
- [44] Li SH, Wu CY, Lv XY, et al. Discovery of ferrocene-carborane derivatives as novel chemical antimicrobial agents against multidrug-resistant bacteria [J]. Sci China Chem, 2012, 55: 2388-2395.
- [45] Różycka D, Leśnikowski ZJ, Olejniczak AB. Synthesis of boron cluster analogs of penicillin and their antibacterial activity [J]. J Organomet Chem, 2019, 881: 19-24.
- [46] Różycka D, Korycka-Machała M, Żaczek A, et al. Novel isoniazid-carborane hybrids active in vitro against mycobacterium tuberculosis [J]. Pharmaceuticals, 2020, 13 (12): 465.
- [47] Sun YJ, Zhang JL, Zhang YB, et al. Cover feature: the closo - dodecaborate dianion fused with oxazoles provides 3D diboraheterocycles with selective antimicrobial activity [J]. Chem Eur J, 2018, 24 (41): 10267.
- [48] Li K, Wang Y, Yang G, et al. Oxa, thia, heterocycle, and carborane analogues of SQ109: bacterial and protozoal cell growth inhibitors [J]. ACS Infect Dis, 2015, 1 (5): 215-221.
- [49] Asawa Y, Hatsuzawa S, Yoshimori A, et al. Comprehensive exploration of chemical space using trisubstituted carboranes [J]. Sci Rep-Uk, 2021, 11 (1): 24101.
- [50] Gruzdev DA, Telegina AA, Ol'shevskaya VA, et al. New nido-carborane-containing conjugates of purine: synthesis and antiviral activity [J]. Russ Chem Bull, 2022, 71 (11): 2375-2382.
- [51] Wilkinson SM, Gunosewoyo H, Barron ML, et al. The first CNS-active carborane: a novel P2X<sub>7</sub> receptor antagonist with antidepressant activity [J]. ACS Chem Neurosci, 2014, 5 (5): 335-339.
- [52] Farooq K, Hunter JM. Neuromuscular blocking agents and reversal agents [J]. Anaesth Intens Care M, 2017, 18 (6): 279-284.
- [53] Goswami LN, Olds TJ, Monk TG, et al. Isomeric carborane neuromuscular blocking agents [J]. Chem Med Chem, 2019, 14 (11): 1108-1114.
- [54] Stockmann P, Gozzi M, Kuhnert R, et al. New keys for old locks: carborane-containing drugs as platforms for mechanism-based therapies [J]. Chem Soc Rev, 2019, 48 (13): 3497-3512.
- [55] 陈晓婷, 宋迎香. 选择性雄激素受体调节剂在男性骨质疏松中的作用及机制 [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2024, 17 (2): 182-188.

(收稿日期: 2024-12-19; 修回日期: 2025-02-06)



# 无定形固体分散体技术在贴剂中的处方工艺探讨与应用

林嘉宁<sup>1</sup>, 侯志远<sup>1</sup>, 丁劲松<sup>1, 2\*</sup> (1. 中南大学湘雅药学院, 长沙 410083; 2. 长沙晶易医药科技股份有限公司, 长沙 410013)

**摘要:** 作为提高无定形药物物理稳定性的有效策略, 无定形固体分散体技术展现出广阔的应用前景。随着无定形固体分散体技术的不断创新与发展, 其在贴剂领域中的应用趋于成熟。无定形固体分散体的处方组成与制备工艺直接决定了贴剂中无定形药物的物理稳定性、释放性能以及经皮渗透速率等。本文综述了无定形固体分散体的处方工艺对贴剂关键质量属性的影响, 并回顾了其在贴剂中的应用现状, 以期在无定形固体分散体贴剂的研究和开发提供借鉴。

**关键词:** 贴剂; 无定形固体分散体; 聚合物载体; 物理稳定性

**中图分类号:** R943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)06-1750-08  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.037

## Role of amorphous solid dispersion in the preparation of patches

LIN Jia-ning<sup>1</sup>, HOU Zhi-yuan<sup>1</sup>, DING Jin-song<sup>1, 2\*</sup> (1. Xiangya School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410083; 2. Changsha King-eagle Medical Science and Technology Co., Ltd., Changsha 410013)

**Abstract:** Amorphous solid dispersion technology helps enhance the physical stability of amorphous drugs with broad application potential. The continuous innovation and development of amorphous solid dispersion technology has led to its increasing application in developing patches. The prescription composition and preparation of amorphous solid dispersion directly influence the physical stability, release properties and transdermal penetration rate of the amorphous drugs in the patch. This paper reviewed the impact of the prescription and preparation of amorphous solid dispersion on the key quality attributes of patches. It also reviewed the current status of amorphous solid dispersion in patches, providing a reference for the research and development of amorphous solid dispersion patches.

**Key words:** patch; amorphous solid dispersion; polymer carrier; physical stability

贴剂是一种将原料药物与适宜材料制成的供贴敷在皮肤上, 可产生全身性或局部作用的薄片状柔性制剂<sup>[1]</sup>。与片剂、注射剂等传统剂型相比, 贴剂能够有效避免口服给药可能伴随的肝脏首过效应和胃肠道刺激性, 给药方式无创无痛, 患者依从性良好<sup>[2]</sup>。在贴剂的研制过程中, 无定形药物表现出更高的表观溶解度和更快的溶出速率, 进而增强药物经皮渗透性能, 并减小贴剂的给药面积。然而, 这一状态在热力学上表现为不稳定, 在制备与长期贮存过程中存在药物重结晶的风险<sup>[3]</sup>, 可能导致贴剂产品的关键质量属性(如体外释放、体外透皮、黏附性能以及物理稳定性等)出现波动, 进而影响贴剂的疗效与安全性<sup>[4]</sup>。

无定形固体分散体(amorphous solid dispersion, ASD)系指将药物以无定形态高度分散于适宜聚合物载体中形成的单一均相分散体系<sup>[5]</sup>。聚合物载体能够与无定形药物之间形成氢键或离子键等相互作用力, 降低药物分子迁移率, 提高结晶能垒等, 从而维持无定形药物的物理稳定性<sup>[6]</sup>。随着药物递送技术的不断发展与创新, ASD技术已逐渐应用于贴剂领域, 并已有ASD贴剂产品成功上市<sup>[7]</sup>。然而, 基于ASD技术的贴剂产品开发与生产仍面临较高的技术壁垒。例如, ASD载体材料的物理性质以及ASD中药物-载体材料的比例均对贴剂的关键质量属性具有直接影响; 无定形药物易受温湿度等工艺参数影响出现析晶<sup>[8-9]</sup>。因此, 理解

作者简介: 林嘉宁, 男, 硕士研究生, 主要从事经皮递药系统方面的研究, email: 227211043@csu.edu.cn \*通信作者: 丁劲松, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事经皮递药系统的研究与开发, email: 204062@csu.edu.cn

ASD 的处方与制备工艺对贴剂关键质量属性的影响,有助于合理设计 ASD 贴剂产品。

基于此,本文从产品开发角度论述了 ASD 处方组成和制备工艺对贴剂关键质量属性的影响,并回顾其在贴剂中的应用现状,以期 ASD 贴剂产品的研制与开发提供理论指导。

### 1 ASD 的处方设计

ASD 主要由药物与聚合物载体组成,其中聚合物载体比例一般较高。因此,载体的物理性质以及药物-载体比例均能显著影响贴剂的关键质量属性<sup>[10]</sup>。适宜的载体材料不仅可以与药物之间形成相互作用力阻碍药物分子间的结合,增强药物的物理稳定性,还可以提高药物在基质中的分散度,进而提高药物的释放速率<sup>[11]</sup>。

#### 1.1 聚合物载体的物理性质

ASD 中常用的聚合物载体根据化学结构主要

分为聚乙烯吡咯烷酮(PVP)及相关共聚物、纤维素衍生物和甲基丙烯酸-甲基丙烯酸甲酯及相关共聚物(见图1)。这些载体材料通常具备不同的物理性质,包括分子量、玻璃化转变温度( $T_g$ )和吸湿性等(见表1)。

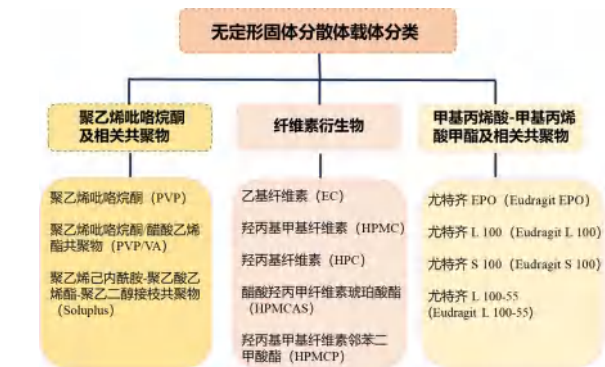


图1 ASD 常用载体分类

Fig 1 Classification of commonly used carriers in ASD

表 1 ASD 常用载体的关键物理性质<sup>[5, 12-16]</sup>

Tab 1 Key physical properties of commonly used carriers in ASD

| 种类                  | 化学名称<br>(缩写) | 通用名               | 分子量 /Da               | 溶解性         | 25℃, 60%RH<br>下吸水增重 /% | 玻璃化转<br>变温度 /℃ |
|---------------------|--------------|-------------------|-----------------------|-------------|------------------------|----------------|
| 聚乙烯吡咯烷酮及相关共聚物       | PVP          | PVP K12           | 2000 ~ 3000           | 与水互溶        | 21.9                   | 72.0           |
|                     |              | PVP K17           | 7000 ~ 11 000         | 与水互溶        | 23.0                   | 140.0          |
|                     |              | PVP K30           | 1 000 000 ~ 1 500 000 | 与水互溶        | 23.6                   | 160.0          |
|                     |              | PVP K90           | 44 000 ~ 54 000       | 与水互溶        | 24.4                   | 177.0          |
|                     | PVP/VA       | PVP/VA 64         | 45 000 ~ 70 000       | 与水互溶        | 12.6                   | 105.0          |
|                     | Soluplus     | Soluplus          | 90 000 ~ 140 000      | 与水互溶        | 5.7                    | 72.0           |
| 纤维素衍生物              | EC           | EC N7             | 63 800                | 几乎不溶于水      | N/A                    | 130.0          |
|                     |              | EC N10            | 79 200                | 几乎不溶于水      | N/A                    | 129.0          |
|                     |              | EC N20            | 79 200                | 几乎不溶于水      | N/A                    | 115.0          |
|                     | HPMC         | HPMC 15cP         | 80 000                | 与水互溶        | 3.6                    | 104.7          |
|                     |              | HPMC 100cP        | 180 000               | 与水互溶        | 3.8                    | 109.7          |
|                     |              | HPMC 4M           | 550 000               | 与水互溶        | 3.6                    | 107.8          |
|                     | HPC          | HPC EXF           | 80 000                | 与水互溶        | 6.5                    | N/A            |
|                     |              | HPC MXF           | 850 000               | 与水互溶        | 6.3                    | N/A            |
|                     |              | HPC HXF           | 1 150 000             | 与水互溶        | 5.8                    | N/A            |
|                     | HPMCAS       | HPMCAS LF         | 18 000                | pH 5.0 以上溶解 | 4.3                    | 121.7          |
|                     |              | HPMCAS MF         | 18 000                | pH 6.0 以上溶解 | 3.9                    | 123.0          |
|                     |              | HPMCAS HF         | 18 000                | pH 6.5 以上溶解 | 3.4                    | 121.8          |
|                     | HPMCP        | HPMCP HP 50       | 37 900                | PH 5.0 以上溶解 | 4.9                    | 143.0          |
|                     |              | HPMCP HP 55       | 45 600                | PH 5.5 以上溶解 | 4.8                    | 147.0          |
| 甲基丙烯酸-甲基丙烯酸甲酯及相关共聚物 | N/A          | Eudragit EPO      | 47 000                | pH 5.0 以下溶解 | 1.3                    | 52.0           |
|                     |              | Eudragit L 100    | 125 000               | pH 6.0 以上溶解 | 7.5                    | 195.0          |
|                     |              | Eudragit S 100    | 125 000               | pH 7.0 以上溶解 | 5.8                    | 173.0          |
|                     |              | Eudragit L 100-55 | 320 000               | pH 5.5 以上溶解 | 4.7                    | 111.0          |

**1.1.1 分子量** 聚合物载体的分子量是影响 ASD 贴剂中无定形药物物理稳定性与释放速率的关键因素之一<sup>[17]</sup>。以市售 ASD 贴剂中广泛应用的水溶性载体 PVP 为例, PVP 溶液的黏度与其分子量成正比,高分子量 PVP 溶液所具备的高黏度有助于降低体系的分子流动性,阻碍药物分子碰撞形成晶核,进而延缓药物析晶进程<sup>[18-19]</sup>。然而, PVP

的抑晶能力并非与其分子量成完全正相关,当 PVP 分子量增大至特定范围内,其抑晶能力将达到最大值<sup>[20]</sup>。Knopp 等<sup>[21]</sup>研究了不同分子量 PVP (K60、K30、K25、K17、K12)对塞来昔布 ASD 物理稳定性的影响。结果显示,物理稳定性排序依次为 K60 = K30 > K25 > K17 > K12,所制备 ASD 的物理稳定性随 PVP 分子量的增加而逐

渐增强,但继续采用分子量大于 K30 的 K60 时,其物理稳定性并未进一步增强,达到了平台期。该结果与 Khougaz 等<sup>[22]</sup>研究 PVP 分子量(K90、K30、K17、K12)对生物药剂学分类系统(bio-pharmaceutical classification system, BCS)Ⅱ类化合物 MK-0591 的物理稳定性影响结果一致(物理稳定性排序依次为:K90 = K30 > K17 > K12)。作者认为 PVP 的黏度在特定范围内时,其增黏抑晶效果可能达到饱和。超过此黏度范围时,PVP 与药物之间的相互作用力类型与强度(如 PVP 的羰基与塞来昔布的氨基之间的强氢键作用力)可能成为其抑晶效果的主要控制因素,且药物-载体相互作用强度与聚合物分子量无关,因此,PVP K30 与更高分子量的 PVP 材料对特定药物表现出相近的抑晶能力。需要注意的是,PVP 溶液所具备的高黏度也会降低药物释放速率,且降低幅度随 PVP 分子量的增加而增大。Knopp 等<sup>[21]</sup>同时考察了使用不同分子量 PVP 所制备的塞来昔布 ASD 的体外溶出行为,结果显示,药物的溶出速率随 PVP 分子量的增加而降低(溶出速率排序依次为 K12 > K17 > K25 > K30 > K60)。因此,在选择不同分子量的载体材料时,需要综合考虑其对无定形药物物理稳定性和释放速率的影响。

**1.1.2 玻璃化转变温度 ( $T_g$ )**  $T_g$  值被认为是衡量体系分子迁移率的指标之一,通常情况下,较高的  $T_g$  值表明体系的分子迁移率较低,流动性较差<sup>[23]</sup>。ASD 载体通常具有较高的  $T_g$  值,将低  $T_g$  的无定形药物分散于高  $T_g$  的 ASD 载体,所得 ASD 的  $T_g$  值会显著高于单独的无定形药物,进而提高药物的物理稳定性<sup>[24]</sup>。Powell 等<sup>[24]</sup>以硝苯地平为模型药物,考察了不同  $T_g$  值载体材料对 ASD 物理稳定性的影响,结果显示,ASD 的物理稳定性与载体材料的  $T_g$  值成显著的正相关,物理稳定性排序依次为 PVP > PVP/VA > HPMCAS > 聚苯乙烯(PS) > 聚乙酸乙烯酯(PVAc)。Powell 等<sup>[24]</sup>认为高  $T_g$  值载体的“抗塑化作用”可能是其发挥抑晶作用的关键机制之一,且所用载体的  $T_g$  值越高,越利于降低药物的分子迁移率,延缓药物重结晶。

**1.1.3 吸湿性**  $T_g$  值可以用于衡量体系的分子迁移率。水作为增塑剂,能够显著削弱聚合物的分子间作用力,进而提高体系的分子迁移率。水的  $T_g$  值较低(135 K, -138℃),通常,每吸水 1% 即可使体系的  $T_g$  值降低约 10℃,分子迁移率加快 2 个数量级,这无疑增大了贴剂的析晶风险<sup>[25-27]</sup>。ASD 贴剂的吸水量主要取决于所用亲水性载体材料的吸湿性,在选择载体材料时,可先采用差示扫描量

热法(differential scanning calorimetry, DSC)测定聚合物载体吸水前后的  $T_g$  值变化幅度来研究其相对吸湿性与分子迁移率<sup>[26, 28]</sup>。例如, Teng 等<sup>[29]</sup>发现强吸湿性的 PVP K12 在环境湿度由 0%RH 提升至 53%RH 时,其  $T_g$  值由 170℃ 骤降至 23℃;而低吸湿性的 HPMCAS 在环境湿度由 0%RH 提升至 75%RH 时,其  $T_g$  值仅从 120℃ 降低至 70℃<sup>[30]</sup>。

低吸湿性载体材料因其在含水环境中  $T_g$  值变化幅度较小,引起了研究者的广泛关注。Konno 等<sup>[31]</sup>以强疏水性药物非洛地平为模型药物,研究了不同吸湿性载体材料(PVP 和 HPMCAS)对非洛地平 ASD 抑晶能力的影响,结果显示:在去除环境中的水蒸气时,两种载体材料表现出相近的抑晶能力;然而,当暴露于水蒸气时,低吸湿性 HPMCAS 所表现的抑晶能力显著强于强吸湿性 PVP,且重结晶速率均随着环境湿度增大而加快。通常建议在 ASD 贴剂的生产过程中严格控制环境的湿度,并采用铝箔包封等防潮措施贮存贴剂,以避免水分引起的药物重结晶。

## 1.2 药物-载体比例

药物与载体的比例对贴剂中无定形药物的物理稳定性以及释放速率具有直接影响。具体而言,相同载药量下,载体比例过低可能导致 ASD 贴剂在贮存过程中析晶。例如,罗替戈汀透皮贴剂专利中以 PVP 为载体材料,成功构建了罗替戈汀 ASD 贴剂,并对药物与载体质量比在 9:2 ~ 9:11 的贴剂样品在 25℃/60%RH 条件下的物理稳定性进行考察。结果显示,9:2 与 9:3 组样品均在贮存 7 d 内出现析晶,而 9:4 以及更高比例组样品贮存 24 个月均未观察到析晶<sup>[32]</sup>。Hou 等<sup>[33]</sup>同样研究了药物-载体质量比对胍法辛 ASD 贴剂物理稳定性的影响。实验结果显示,药物-载体质量比为 1:3 及以上的贴剂样品在长期稳定性条件下贮存 6 个月均未出现析晶。

此外,ASD 载体在一定比例范围内还有助于提高贴剂的药物释放速率,比例过高则会限制药物释放。在筛选出长期稳定性条件下贮存 24 个月不析晶的药物与载体比例后,罗替戈汀贴剂专利中采用桨碟法进一步考察上述样品的体外释放行为。结果显示,在药物与 PVP 质量比为 9:4 ~ 9:6 时,随着 PVP 比例的增加,贴剂的体外释放速率逐渐提升,180 min 的累积释放量由 2.3 mg 增加至 2.7 mg。然而,贴剂的体外释放速率并未随 PVP 比例的进一步增加而继续提升,反而呈下降趋势,9:11 组 180 min 的累积药物释放量仅为 0.6 mg<sup>[32]</sup>。该结果与 Hou 等<sup>[33]</sup>的实验结果一致,载体比例的进一步增加引起胍法辛



ASD 贴剂的释放速率明显下降。体外释放速率的下降可归因为高比例的 PVP 在药物表面形成了高厚度的黏性凝胶层, 进而阻碍了药物的自由扩散 (见图 2)。综合考虑上述情况, 罗替戈汀贴剂专

利优选药物与 PVP 质量比为 9:4 ~ 9:6 进行贴剂制备。因此, 药物与载体比例的确证需对贴剂中无定形药物的物理稳定性与释放速率等多种关键质量属性进行综合考虑。

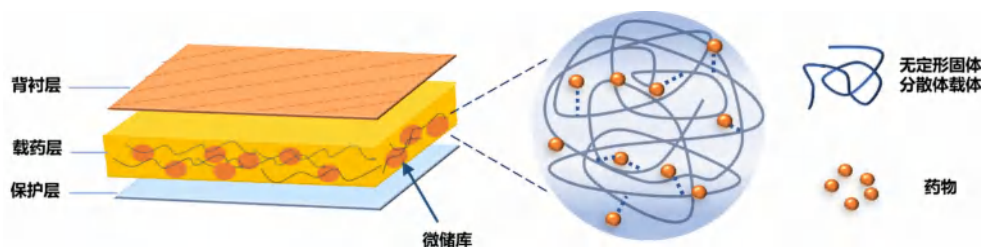


图 2 罗替戈汀 ASD 贴剂的结构示意图

Fig 2 Schematic structure of Rotigotine ASD patch

在 ASD 贴剂处方探索阶段, 建议将药物 - 载体不同比例样品置于加速稳定性条件 (如高温、高湿和强光) 下, 以物理稳定性与有关物质为考察指标进行初筛。评估初步风险后, 以体外释放与透皮实验做进一步筛选, 以确定最终的药物 - 载体比例。此外, 从处方优化角度分析, 载体所需比例越低, 越有利于后续载药量的提升以及功能辅料 (如促渗剂、增塑剂等) 的使用。

## 2 ASD 的制备工艺

目前, ASD 中间体的制备工艺主要包括溶剂法和熔融法, 通过将药物与载体材料溶解于溶剂中或加热以打破晶格状态, 再迅速干燥或冷却使其脱离热力学平衡状态, 从而得到 ASD 中间体<sup>[18]</sup>。需要注意的是, 在 ASD 贴剂的生产过程中无需制备 ASD 中间体, 而是采用一步法制备, 即向药物与载体混合体系中继续添加贴剂基质以及其余组分, 再进行干燥或冷却处理得到 ASD 贴剂样品 (见图 3)。

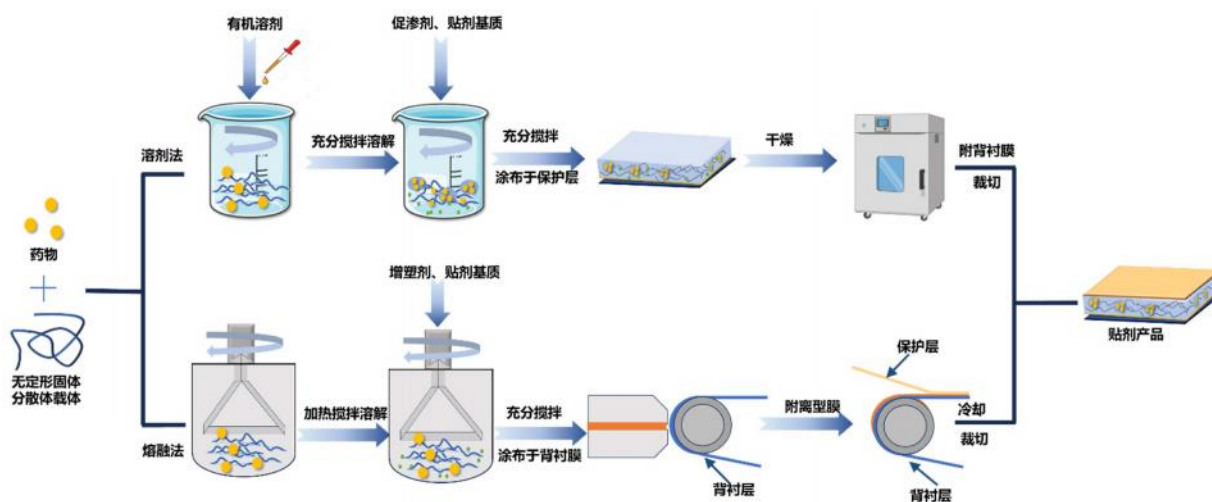


图 3 溶剂法与熔融法制备 ASD 贴剂的简易制备流程图

Fig 3 Simple preparation flowchart for ASD patches by solvent and melt method

### 2.1 溶剂法

**2.1.1 有机溶剂的选择** 溶剂法中所用的有机溶剂应与药物及载体具有相近的溶解性, 并与 ASD 贴剂处方的其余组分相容, 以保证体系的均匀性。若组分在所选溶剂中的溶解性差异较大, 低溶解度组分可能在干燥过程中出现沉淀, 导致胶体表面出现孔洞、波纹等现象, 影响贴剂的外观<sup>[21-22]</sup>。Luebbert 等<sup>[34]</sup>以萘普生为模型药物, 研究了不同有机溶剂 (无水乙醇与丙酮) 溶解 PVP 所制备的 ASD 薄膜的均匀性。结果显示, 无水乙醇组薄膜

的外观透明且均匀, 相比之下, 丙酮组薄膜的外观出现褶皱与大量液滴状结构。采用拉曼成像进一步研究药物在 ASD 薄膜中的分布情况, 结果无水乙醇组的药物呈均匀分布, 而丙酮组的药物富集于液滴状结构中。在满足上述溶解性要求外, 尽量选择低沸点、低毒性的有机溶剂, 以降低干燥工艺的能耗并减少终产品中的溶剂残留。残留的有机溶剂不仅可能降低贴剂的  $T_g$  值, 引起药物重结晶, 还可能增加患者皮肤刺激或过敏的风险<sup>[18, 35]</sup>。以“万能溶剂”二甲基亚砜 (DMSO) 为

例, DMSO 具有强烈的吸湿性, 在 20 °C /60%RH 时, 可从空气中吸收相当于自身重量 70% 的水分, 进而增加体系的分子迁移率。此外, DMSO 可使皮肤角蛋白变性, 引起贴敷部位皮肤出现红肿、瘙痒以及脱屑等刺激性反应<sup>[35]</sup>。

**2.1.2 溶剂法工艺参数的影响** 在溶剂法生产过程中, 工艺参数如溶剂蒸发速率、搅拌转速和投料速度均对 ASD 贴剂的关键质量属性产生直接影响。① 溶剂蒸发速率作为较重要的工艺参数, 对 ASD 贴剂的物理稳定性具有显著影响。Wu 等<sup>[36]</sup>以吡罗昔康为模型药物, 研究了关键工艺因素(溶剂蒸发速率)和两个处方因素(PVP 分子量、PVP- 药物比例)对溶剂法所制备 ASD 薄膜物理稳定性的影响。结果显示, 抑制药物成核速率的影响因素依次为溶剂蒸发速率> PVP 与药物比例> PVP 分子量。值得关注的是, Wu 等<sup>[36]</sup>发现低蒸发速率组的样品因其边缘的溶剂黏度分布不均匀, 导致薄膜出现折叠, 显微观察发现边缘均出现了带有尖锐边缘的孔道。并且这些位于粗糙表面(如边角和尖锐边缘)的药物分子会受到更高的表面张力, 进而增加了晶核形成位点。此外, 低蒸发速率组的干燥时间较长, 药物分子有相对充裕的时间重新排列形成晶格, 有助于药物重结晶。② 搅拌过程中的机械力与热量可能诱导晶核形成。搅拌转速较快时, 液体与搅拌罐罐壁、液体与液体之间摩擦产生的热量较高, 导致药物的热力学活性增大。此外, 搅拌转速也会影响药物的物理稳定性。以亲水性载体 PVP 为例, PVP 溶液的黏度较高, 若搅拌转速较慢或投料速度较快, PVP 分子链在流动过程中易发生相互缠绕, 形成较大的聚集体。聚集体外部为浸润的 PVP 凝胶层, 内部仍为未溶解的 PVP 粉末, 部分药物未与载体结合形成 ASD, 导致后续工艺中的析晶风险增大。因此, 在 ASD 贴剂生产过程中, 需对每个步骤得到的中间体进行析晶考察, 以确保终产品中药物处于无定形态。

## 2.2 熔融法

**2.2.1 增塑剂的选择** 在熔融工艺中, 物料黏度大小是决定能否形成均匀 ASD 贴剂的关键因素。尽管部分药物与促渗剂具有一定增塑效果, 为保证熔融体系的均匀性, 仍需额外添加增塑剂(5% ~ 30%, w/w)以降低熔融黏度, 改善成型加工特性<sup>[37]</sup>。增塑剂又称塑化剂, 可以通过削弱高分子聚合物之间的分子间作用力, 增加链段的活动性, 进而降低体系黏度。此外, 增塑剂还可以提高体系的流动性, 有助于加快药物的释放速率<sup>[38]</sup>。Wang 等<sup>[39]</sup>制备了基于苯乙烯-异戊

二烯-苯乙烯(styrene-isoprene-styrene, SIS)热塑性弹性共聚物的热熔贴片, 以水杨酸甲酯、辣椒碱和盐酸苯海拉明为模型药物, 研究了增塑剂(液状石蜡)用量对贴片药物释放行为的影响。其中, 疏水性药物水杨酸甲酯与辣椒碱的释放行为主要受基质扩散机制约束, 增塑剂有助于提高体系的分子流动性, 进而促进药物的扩散。体外释放结果显示, 随着增塑剂用量的增加, 水杨酸甲酯与辣椒碱贴片的体外释放速率逐渐加快。然而, 液状石蜡作为一种矿物质油, 会阻碍体系对水分的吸收, 且亲水性药物盐酸苯海拉明的药物释放行为受水分增塑机制与基质扩散机制的共同影响。结果显示, 盐酸苯海拉明贴片中液状石蜡比例越高, 体系所表现的吸水率越低, 进而导致体外释放速率下降。需要注意的是, 增塑剂会增强贴剂基质的液体性质, 即显著削弱体系的内聚力, 提升初黏力, 若内聚力过低可能导致贴剂在贴敷过程中出现冷流或移位现象, 进而影响治疗效果<sup>[40]</sup>。因而, 在研发过程中, 还需重点关注增塑剂种类与用量对贴剂内聚力的削弱幅度。

**2.2.2 熔融法工艺参数的影响** 在熔融工艺中, ASD 贴剂的所有组分均需经历加热、塑化、混合、分散后通过模具涂布成型。熔融法中的关键工艺参数包括投料速度、加热温度与时间等。其中, 加热温度作为较重要的工艺参数。由于不同种类的载体材料所对应的熔融温度范围不同, 所选加热温度应保证药物与聚合物载体材料的稳定性<sup>[37]</sup>。Dinunzio 等<sup>[41]</sup>采用 DSC 和热台显微镜观察法, 筛选熔融法制备热敏感药物氢化可的松 ASD 的最佳载体, 结果显示, PVP/VA 可使药物在低至 160 °C 条件下熔于载体材料中, 而 HPMC 组需高于 180 °C 时才能熔化。此外, 体系黏度通常随温度的降低而逐渐升高, 在确保药物与载体全部熔化的前提下, 还需兼顾不同温度下体系的黏度, 进而保证产品的成型性。

## 2.3 ASD 制备工艺的选择

溶剂法适用性强, 且溶剂挥发过程可在远低于药物与载体熔点的温度下进行, 可作为热敏型药物制备 ASD 贴剂的首选工艺。例如, 透皮贴剂中常选用经皮渗透性更强的游离酸或游离碱药物, 然而, 大多数游离酸与游离碱药物易在高温条件下发生降解, 采用溶剂法可有效降低药物因热不稳定带来的风险<sup>[4]</sup>。熔融法适合大规模连续生产, 且无需使用有机溶剂, 降低了有机溶剂残留风险与溶剂回收难度。但需要密切关注药物与载体材料的热稳定性与熔点, 若两者能在 150 °C 以下熔化而不发生降解, 熔融法可作为其制备工



艺的选择<sup>[14]</sup>。

### 3 ASD 在贴剂中的应用

#### 3.1 提高贴剂中无定形药物的物理稳定性

贴剂中药物的扩散主要由基质与皮肤之间的浓度梯度驱动。为实现高效经皮递送药物,贴剂中的药物负载通常需达到其在基质中的饱和溶解状态。然而,该状态在热力学上表现为不稳定,易向稳定的结晶态转变。更重要的是,药物晶体必须溶解为非晶态后才能有效透过皮肤,因此药物重结晶会显著降低贴剂的渗透速率,进而导致疗效下降<sup>[42]</sup>。Mohamed 等<sup>[43]</sup>制备了含有不同数量药物晶体的鞣酐贴片,用于评估药物重结晶对贴剂关键质量属性的影响。结果显示,鞣酐贴片的药物释放速率与渗透速率均随药物晶体数量的增加而显著降低,并且经皮渗透的时滞时间随晶体数量的增加而显著延长。药物经皮渗透的延迟可能是由药物在黏附基质中重结晶引起的热力学活性降低所致。

与单独的无定形药物相比,ASD 具有较高的物理稳定性,原因如下:①载体材料的“抗塑化作用”提高了无定形药物的  $T_g$ ,进而降低药物的分子迁移率;②从热力学角度分析,ASD 降低了无定形药物的化学势能,并提高了结晶的能垒;③从分子相互作用角度分析,载体分子通过与药物分子之间形成离子键或氢键,阻碍药物分子间的碰撞结晶<sup>[44-45]</sup>。此外,ASD 技术通过提高药物在贴剂基质中的饱和溶解度,提高热力学活性,有助于提高药物的释放速率<sup>[46]</sup>。

贴剂产品中以 ASD 技术提高无定形药物物理稳定性的实例主要包括罗替戈汀贴剂与雌二醇贴剂。2008 年,已上市的罗替戈汀贴剂因贮存过程中出现转晶被 FDA 紧急召回。研究者观察到药物由非晶态聚集形成了热力学更稳定、溶解度更低的“雪花状”晶体(多晶型 II),并推测其可能进一步导致药物经皮渗透性能下降<sup>[47]</sup>。原研厂商 UCB Pharma 以 PVP 为载体,成功构建罗替戈汀 ASD 透皮贴剂,有效抑制了药物转晶。并且仅加入 2% 的 PVP,药物释放速率即可得到提升,180 min 的累积释放量由 0.7 mg 增加至 2.1 mg,以长期稳定性条件下是否出现转晶与体外释放为指标,确定了处方中药物与 PVP 的质量比。人体生物等效性(bioequivalency, BE)试验验证了其与新制备的贴剂具有生物等效性,并于 2012 年重新上市<sup>[32]</sup>。雌二醇极易因吸收水分转化为溶解度更低的半水合物多晶型晶体,1994 年,由 Bayer Healthcare 研制生产的雌二醇缓释贴片获 FDA 批准上市,成为全球首款可连续贴敷 7 d 的外用贴

剂。在专利中同样以 PVP 为载体,构建雌二醇 ASD 透皮贴剂。PVP 可以与雌二醇之间以强相互作用力结合,并竞争性结合体系中的水分,进而延缓雌二醇半水合物晶体的形成<sup>[48]</sup>。

#### 3.2 提高胶黏分散型贴剂的内聚力

贴剂的内聚力可以反映其在贴敷过程中抵抗日常活动与衣物摩擦引起的切向力的能力<sup>[39]</sup>。若贴剂在贴敷过程中内聚力不足,胶体可能溢出贴剂的切割边缘,减小载药基质与皮肤的有效接触面积,进而影响疗效<sup>[49]</sup>。针对上述问题,除进行基质单体修饰外,研究者常加入高  $T_g$  值聚合物(如 PVP 和 HPMC 等)以提高基质体系的黏度,进而改善内聚力。近年来,为降低患者安全性风险,简化生产工艺,市售贴剂产品越来越多地采用胶黏分散型的结构设计。胶黏分散型贴剂通过将药物与其余辅料直接溶解分散于黏附基质中,保证了贴剂皮肤黏附性能,可省去黏合层<sup>[50]</sup>。从贴剂黏附性角度分析,胶黏分散型 ASD 贴剂中所使用的高  $T_g$  值载体材料也可以改善体系的内聚力。David 等<sup>[51]</sup>以昂丹司琼为模型药物,研究了 PVP 用量对贴片机械性能的影响。结果显示,随着 PVP 含量由 0 mg 增加至 100 mg,贴片的拉伸强度由  $(4.36 \pm 0.40)$  MPa 逐渐提高至  $(5.15 \pm 0.30)$  MPa。该结果与 Satturwar 等<sup>[52]</sup>研究 PVP 用量对盐酸地尔硫革贴片抗拉伸强度影响的实验结果一致。

### 4 展望

ASD 技术在贴剂中的应用潜力已被广泛证实,并已有 ASD 贴剂产品成功获批上市,这充分展示了其在贴剂领域的广阔应用前景。然而,ASD 在应用过程中仍面临一系列亟须深入探索的问题。首先,基于理论进行载体种类以及药物-载体比例的考察仍面临巨大挑战,在针对特定药物进行 ASD 设计时,仍需开展大量实验验证工作。其次,ASD 对于贴剂的关键质量属性存在综合影响,例如,药物高效经皮渗透所需的高分子迁移率与抑制药物重结晶所需的低分子迁移率之间存在矛盾,使得载体的选择需在多因素衡量下寻找平衡点。最后,小试阶段的制备工艺难以直接用于放大工艺的桥接,一方面,大型搅拌设备做机械运动时所产生的热量与小试阶段的显著不同,药物析晶风险不同;另一方面,放大工艺中每个步骤得到的中间体都需取样检测是否出现析晶,使放大生产进一步复杂化。

笔者认为,可以将 ASD 载体的功能单体直接引入基质材料中,提高基质材料对药物的负载能力。例如,Gong 等<sup>[53]</sup>将 PVP 的功能单体 N-乙烯基吡咯烷酮(NVP)组装至压敏胶聚合物链



中,进而提高了压敏胶的载药能力。为提高 ASD 的物理稳定性,更多新型聚合物载体被应用于 ASD 的制备中。多孔辅料(如介孔二氧化硅以及硅酸盐等)逐渐用于无定形药物的递送,药物分子可吸附于载体的纳米孔道中,孔道的空间约束导致分子迁移率显著降低,从而提高药物物理稳定性<sup>[54]</sup>。此外,ASD 贴剂的放大工艺应遵循质量源于设计(QbD)的原则,强化研究人员对产品开发的理解,确定工艺中对贴剂关键质量属性存在潜在影响的环节,选择合适的生产过程并制定解决策略<sup>[55]</sup>。相信随着对聚合物载体的深入研究,以及 ASD 工艺技术与表征手段的不断进步,ASD 技术将被广泛应用于更多的制剂领域。

## 参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020: 21.
- [2] Ramadan D, Mccrudden MTC, Courtenay AJ, et al. Enhancement strategies for transdermal drug delivery systems: current trends and applications [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2022, 12 (4): 758-791.
- [3] Sharma PK, Panda A, Pradhan A, et al. Solid-state stability issues of drugs in transdermal patch formulations [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2018, 19 (1): 27-35.
- [4] Hadgraft J, Lane ME. Drug crystallization-implications for topical and transdermal delivery [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2016, 13 (6): 817-830.
- [5] Shi Q, Li F, Yeh S, et al. Physical stability of amorphous pharmaceutical solids: nucleation, crystal growth, phase separation and effects of the polymers [J]. *Int J Pharm*, 2020, 590: 119925.
- [6] Hate SS, Reutzel-Edens SM, Taylor LS. Insight into amorphous solid dispersion performance by coupled dissolution and membrane mass transfer measurements [J]. *Mol Pharm*, 2019, 16 (1): 448-461.
- [7] Dengale SJ, Grohgan H, Rades T, et al. Recent advances in co-amorphous drug formulations [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 100: 116-125.
- [8] Duong TV, Van den Mooter G. The role of the carrier in the formulation of pharmaceutical solid dispersions. Part II: amorphous carriers [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2016, 13 (12): 1681-1694.
- [9] Huang SY, Williams RO. Effects of the preparation process on the properties of amorphous solid dispersions [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2018, 19 (5): 1971-1984.
- [10] Grohgan H, Löbmann K, Priemel P, et al. Amorphous drugs and dosage forms [J]. *J Drug Deliv Sci Tec*, 2013, 23 (4): 403-408.
- [11] Duong TV, Van den Mooter G. The role of the carrier in the formulation of pharmaceutical solid dispersions. Part I: crystalline and semi-crystalline carriers [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2016, 13 (11): 1583-1594.
- [12] Pajula K, Lehto VP, Ketolainen J, et al. Computational approach for fast screening of small molecular candidates to inhibit crystallization in amorphous drugs [J]. *Mol Pharm*, 2012, 9 (10): 2844-2855.
- [13] Patel NG, Banella S, Serajuddin A. Moisture sorption by polymeric excipients commonly used in amorphous solid dispersions and its effect on glass transition temperature: II. cellulosic polymers [J]. *J Pharm Sci*, 2022, 111 (11): 3114-3129.
- [14] Patel NG, Serajuddin ATM. Moisture sorption by polymeric excipients commonly used in amorphous solid dispersion and its effect on glass transition temperature: I. Polyvinylpyrrolidone and related copolymers [J]. *Int J Pharm*, 2022, 616: 121532.
- [15] Patel NG, Banella S, Serajuddin A. Moisture sorption by polymeric excipients commonly used in amorphous solid dispersions and its effect on glass transition temperature: III. methacrylic acid-methyl methacrylate and related copolymers (Eudragit®) [J]. *Int J Pharm*, 2023, 636: 122745.
- [16] Cilurzo F, Selmin F, Gennari CGM, et al. Application of methyl methacrylate copolymers to the development of transdermal or loco-regional drug delivery systems [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2014, 11 (7): 1033-1045.
- [17] Karavas E, Georgarakis E, Sigalas MP, et al. Investigation of the release mechanism of a sparingly water-soluble drug from solid dispersions in hydrophilic carriers based on physical state of drug, particle size distribution and drug-polymer interactions [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2007, 66 (3): 334-347.
- [18] Bhujbal SV, Mitra B, Jain U, et al. Pharmaceutical amorphous solid dispersion: a review of manufacturing strategies [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11 (8): 2505-2536.
- [19] Franco P, De Marco I. The use of poly (N-vinyl pyrrolidone) in the delivery of drugs: a review [J]. *Polymers (Basel)*, 2020, 12 (5): 1114.
- [20] Kestur US, Lee H, Santiago D, et al. Effects of the molecular weight and concentration of polymer additives, and temperature on the melt crystallization kinetics of a small drug molecule [J]. *Cryst Growth Des*, 2010, 10 (8): 3585-3595.
- [21] Knopp MM, Nguyen JH, Becker C, et al. Influence of polymer molecular weight on in vitro dissolution behavior and in vivo performance of celecoxib: PVP amorphous solid dispersions [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016, 101: 145-151.
- [22] Khougaz K, Clas SD. Crystallization inhibition in solid dispersions of MK-0591 and poly (vinylpyrrolidone) polymers [J]. *J Pharm Sci*, 2000, 89 (10): 1325-1334.
- [23] Budd PM, McKeown NB, Fritsch D. Free volume and intrinsic microporosity in polymers [J]. *J Mater Chem*, 2005, 15 (20): 1977-1986.
- [24] Powell CT, Cai T, Hasebe M, et al. Low-concentration polymers inhibit and accelerate crystal growth in organic glasses in correlation with segmental mobility [J]. *J Phys Chem B*, 2013, 117 (35): 10334-10341.
- [25] Hermans A, Milsman J, Li HL, et al. Challenges and strategies for solubility measurements and dissolution method development for amorphous solid dispersion formulations [J]. *AAPS J*, 2022, 25 (1): 11.
- [26] Liu HY, Taylor LS, Edgar KJ. The role of polymers in oral

- bioavailability enhancement: a review [J]. *Polymer*, 2015, 77: 399-415.
- [27] Baird JA, Taylor LS. Evaluation of amorphous solid dispersion properties using thermal analysis techniques [J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 2012, 64 (5): 396-421.
- [28] Rumondor ACF, Marsac PJ, Stanford LA, et al. Phase behavior of poly (vinylpyrrolidone) containing amorphous solid dispersions in the presence of moisture [J]. *Mol Pharm*, 2009, 6 (5): 1492-1505.
- [29] Teng J, Bates S, Engers DA, et al. Effect of water vapor sorption on local structure of poly (vinylpyrrolidone) [J]. *J Pharm Sci*, 2010, 99 (9): 3815-3825.
- [30] Friesen DT, Shanker R, Crew M, et al. Hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate-based spray-dried dispersions: an overview [J]. *Mol Pharm*, 2008, 5 (6): 1003-1019.
- [31] Konno H, Taylor LS. Ability of different polymers to inhibit the crystallization of amorphous felodipine in the presence of moisture [J]. *Pharm Res*, 2008, 25 (4): 969-978.
- [32] Hansm W, Christoph A, Luc Q, et al. Polyvinylpyrrolidone for the stabilization of a solid dispersion of the non-crystalline form of rotigotine: U.S. 10130589 B2 [P]. 2018-11-20.
- [33] Hou ZY, Zhao XC, Ding JS. First promising non-stimulant (guanfacine) transdermal patch for long-acting treatment of ADHD by solid dispersion technique [J]. *J Drug Deliv Sci Tec*, 2024, 100: 106117.
- [34] Luebbert C, Real D, Sadowski G. Choosing Appropriate Solvents for ASD preparation [J]. *Mol Pharm*, 2018, 15 (11): 5397-5409.
- [35] Mazumder S, Shakleya D, Mattson S, et al. Influence of residual solvents on the physical properties of transdermal drug delivery systems [J]. *Int J Pharm*, 2020, 588: 119713.
- [36] Wu JX, Yang MS, Van den Berg F, et al. Influence of solvent evaporation rate and formulation factors on solid dispersion physical stability [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2011, 44 (5): 610-620.
- [37] Patil H, Tiwari RV, Repka MA. Hot-melt extrusion: from theory to application in pharmaceutical formulation [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2016, 17 (1): 20-42.
- [38] El-Gendy NA. Pharmaceutical plasticizers for drug delivery systems [J]. *Curr Drug Deliv*, 2012, 9 (2): 148-163.
- [39] Wang CX, Han W, Tang XZ, et al. Evaluation of drug release profile from patches based on styrene-isoprene-styrene block copolymer: the effect of block structure and plasticizer [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2012, 13 (2): 556-567.
- [40] Wokovich AM, Prodduturi S, Doub WH, et al. Transdermal drug delivery system (TDDS) adhesion as a critical safety, efficacy and quality attribute [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2006, 64 (1): 1-8.
- [41] Dinunzio JC, Brough C, Hughey JR, et al. Fusion production of solid dispersions containing a heat-sensitive active ingredient by hot melt extrusion and Kinetisol® dispersing [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2010, 74 (2): 340-351.
- [42] Coldman MF, Poulsen BJ, Higuchi T. Enhancement of percutaneous absorption by the use of volatile: nonvolatile systems as vehicles [J]. *J Pharm Sci*, 1969, 58 (9): 1098-1102.
- [43] Mohamed LA, Kamal N, Elfakhri KH, et al. Drug recrystallization in drug-in-adhesive transdermal delivery system: a case study of deteriorating the mechanical and rheological characteristics of testosterone TDS [J]. *Int J Pharm*, 2020, 578: 119132.
- [44] Bookwala M, Wildfong PLD. The implications of drug-polymer interactions on the physical stability of amorphous solid dispersions [J]. *Pharm Res*, 2023, 40 (12): 2963-2981.
- [45] Van den Mooter G, Wuyts M, Bleton N, et al. Physical stabilisation of amorphous ketoconazole in solid dispersions with polyvinylpyrrolidone K25 [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2001, 12 (3): 261-269.
- [46] Kalia YN, Guy RH. Modeling transdermal drug release [J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 2001, 48 (2-3): 159-172.
- [47] McAfee DA, Hadgraft J, Lane ME. Rotigotine: the first new chemical entity for transdermal drug delivery [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2014, 88 (3): 586-593.
- [48] Jesus M, Steven S. Solubility parameter based drug delivery system and method for altering drug saturation concentration: U.S. 5656286 [P]. 1997-08-12.
- [49] Cilurzo F, Gennari CGM, Minghetti P. Adhesive properties: a critical issue in transdermal patch development [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2012, 9 (1): 33-45.
- [50] Food and Drug Administration. Transdermal and topical delivery systems-product development and quality considerations guidance for Industry [EB/OL]. (2019-11-21) [2024-08-10]. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/transdermal-and-topical-delivery-systems-product-development-and-quality-considerations>.
- [51] David SRN, Rajabalaya R, Zhia ES. Development and in vitro evaluation of self-adhesive matrix-type transdermal delivery system of ondansetron hydrochloride [J]. *Trop J Pharm Res*, 2015, 14 (2): 211-218.
- [52] Satturwar PM, Fulzele SV, Dorle AK. Evaluation of polymerized rosin for the formulation and development of transdermal drug delivery system: a technical note [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2005, 6 (4): E649-654.
- [53] Gong KH, Sun P, Cai Y, et al. Water-compatible cross-linked pyrrolidone acrylate pressure-sensitive adhesives with persistent adhesion for transdermal delivery: synergistic effect of hydrogen bonding and electrostatic force [J]. *Acta Biomater*, 2024, 179: 130-148.
- [54] Zolotov SA, Demina NB, Zolotova AS, et al. Development of novel darunavir amorphous solid dispersions with mesoporous carriers [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2021, 159: 105700.
- [55] Grangeia HB, Silva C, Simoes SP, et al. Quality by design in pharmaceutical manufacturing: a systematic review of current status, challenges and future perspectives [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2020, 147: 19-37.

(收稿日期: 2024-08-26; 修回日期: 2024-11-06)

# 肾可清除纳米载体在肿瘤诊断与治疗中的应用研究进展

张亚东<sup>1, 2</sup>, 于凌波<sup>2, 3</sup>, 许瑞<sup>2, 3</sup>, 孙慧欣<sup>2</sup>, 管华<sup>2</sup>, 崔亚男<sup>2\*</sup> (1. 山东第一医科大学药学院, 济南 250117; 2. 济宁医学院药学院, 山东 日照 272067; 3. 山东第二医科大学药学院, 山东 潍坊 261053)

**摘要:** 癌症的早期诊断和治疗是全球医学领域急需解决的一大难题。纳米药物递送系统由于其独特的优势备受药学科工作者的青睐。近几十年来, 尽管研究取得了一定的突破, 但传统纳米药物递送系统的整体表现仍不尽如人意。肾可清除纳米载体是近年来发展起来的新型药物递送技术, 其尺寸小, 能够快速渗透, 并可通过肾脏排泄, 一定程度上可弥补传统纳米递送系统的不足。本文通过总结分析传统纳米递送系统的安全性和靶向性问题, 对肾可清除纳米载体的设计、优势以及在肿瘤诊疗中的应用等进行了综述, 并对其目前存在的缺陷以及今后的应用进行了分析展望, 以期抗肿瘤药物的精准安全递送研究提供参考。

**关键词:** 肾可清除纳米载体; 肿瘤诊断与治疗; 肿瘤靶向性; 安全性; 纳米载体

中图分类号: R730.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)06-1758-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.038

## Advances of renal clearable nanocarriers in tumour diagnosis and therapy

ZHANG Ya-dong<sup>1, 2</sup>, YU Ling-bo<sup>2, 3</sup>, XU Rui<sup>2, 3</sup>, SUN Hui-xin<sup>2</sup>, GUAN Hua<sup>2</sup>, CUI Ya-nan<sup>2\*</sup> (1. School of Pharmacy, Shandong First Medical University, Jinan 250117; 2. College of Pharmacy, Jining Medical University, Rizhao Shandong 272067; 3. College of Pharmacy, Shandong Second Medical University, Weifang Shandong 261053)

**Abstract:** Early diagnosis and treatment of tumors have been a world conundrum in medicine. Nanocarriers, which have received much attention for decades, are reported to be less satisfactory than initially expected. As an alternative, renal clearable nanocarriers (RCNCs) were developed. RCNCs, though much smaller, exhibited fair tumor penetration ability as well as kidney-clearable property. This paper summarized the keypoints of construction, advantages, and application of RCNCs in cancer diagnosis and treatment. The limitations and prospects of RCNCs were discussed to provide valuable information for the safe and precise delivery of anti-cancer drugs.

**Key words:** renal clearable nanocarriers; tumor diagnosis and treatment; tumor targeting; safety; nanocarrier

自 20 世纪 60 年代脂质体的结构被发现以来, 纳米技术在抗肿瘤药物递送方面的优势被广泛报道<sup>[1-3]</sup>, 受到许多药学研究工作者的青睐。尽管目前有脂质体、白蛋白纳米粒以及聚合物胶束等递送系统上市, 但能够上市的主动靶向递送系统很少<sup>[4-5]</sup>。同时有大量文献报道纳米药物载体, 其无论在肿瘤靶向效率<sup>[6]</sup>、改善患者生存率<sup>[7]</sup>, 以及体内安全性<sup>[8]</sup>等方面整体表现不尽如人意。尤其是 2019 年 5 月, 美国国家癌症中心宣布将撤销

其附属癌症纳米技术研究中心, 永久性停止该中心的项目资助<sup>[9]</sup>, 使得传统纳米药物载体的研究更具挑战性。

近 10 年来, 肾可清除纳米载体 (renal clearable nanocarriers, RCNCs) 由于具有粒径小, 血管渗透能力强, 可通过肾脏排泄清除出体外等特性, 引起相关学者的研究兴趣<sup>[10-14]</sup>。本文拟从 RCNCs 的设计、优势以及在肿瘤诊疗中的应用等方面进行综述, 并对其目前存在的缺陷以及今后的应用进行了分析和

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (No.81903553); 山东省自然科学基金项目 (No.ZR2017QH006)。

**作者简介:** 张亚东, 女, 在读硕士研究生, 主要从事药物递送及机制研究, email: east030@163.com \* **通信作者:** 崔亚男, 女, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事药物递送及机制研究, email: guancyn@sina.com



展望，以期为抗肿瘤药物的精准安全递送研究提供参考。

1 RCNCs 的设计要点

1.1 粒径

由于肾小球滤过屏障（glomerular filtration barrier, GFB）的存在，水合粒径小于 6 nm 的粒子能够有效地通过肾小球并随尿液快速排出体外。且随水合粒径的减小，肾脏清除效率呈现明显的尺寸效应，即水合粒径越小，清除率越高<sup>[15]</sup>。有文献报道<sup>[16]</sup>，二氧化硅纳米粒水合粒径从 6 nm 减少到 3.3 nm，给药 48 h 后，肾脏清除效率从 55% 注射剂量（injected dose, ID）增加到 67.5%ID。但 Du 等<sup>[17]</sup>发现，水合粒径在 1 nm 以下的金纳米团簇（AuNCs），其粒径越小与肾小球内皮细胞表面的内皮萼作用越强，肾脏清除效率越低。理论上，RCNCs 的水合粒径一般应控制在 2 ~ 6 nm，而柔性的纳米粒水合粒径在 1 ~ 10 nm 内可以通过肾脏排出<sup>[15]</sup>。近年来亦有不少报道，粒子水合粒径虽已远超肾小球过滤阈值（kidney filtration threshold, KFT），但仍能通过肾脏排泄<sup>[18]</sup>。

1.2 形状

纳米粒的形状也会影响其在体内的分布以及在肾脏的滞留时间<sup>[19]</sup>。球形和椭球形纳米粒在体内具有较短的半衰期，比非球形纳米粒更容易通过 GFB 经肾脏排泄。Zhao 等<sup>[20]</sup>设计了三种不同形状的荧光介孔二氧化硅纳米粒（MSNs）：长棒状纳米粒（NLR）、短棒状纳米粒（NSR）和球形纳米粒（NS）。通过分析小鼠尿液中的硅含量发现，口服给药 2 h 后，大量 NS 降解产物从尿液中排泄，而 NLR 和 NSR 的降解产物较少，24 h 后，尿液中 NLR 和 NSR 的降解产物增加，NS 则减少。结果表明，球形 MSNs 更容易通过肾脏随尿液快速排出体外。大多数 RCNCs 采用球形或近似球形的设计，但长径比大且直径小于 KFT 的

结构也可通过肾脏排泄<sup>[21]</sup>。

1.3 电荷

由于肾小球基底膜（glomerular basement membrane, GBM）带负电荷，电荷在肾小球滤过中起重要作用，与带负电荷的颗粒相比，带正电荷的纳米粒通过肾脏途径清除的速度更快<sup>[22]</sup>。例如，硅纳米颗粒（SiNPs）（ $\lambda = 5.4$  mV，水合粒径为 2.4 nm）在注射 24 h 后，肾脏清除率为 100% ID<sup>[16]</sup>，而谷胱甘肽和半胱胺包覆的金纳米颗粒（GS-AuNPs）（ $\lambda = -22.1$  mV，水合粒径为 2.9 nm）肾脏清除率仅为 40% ~ 50% ID<sup>[23]</sup>。

此外，血清蛋白可能与带电纳米粒相互作用形成蛋白冠，从而增加颗粒的流体动力学直径，影响肾脏清除<sup>[24]</sup>。研究显示，中性及两性离子涂层也有助于纳米粒进入肾脏，而带负电荷或正电荷的颗粒更倾向于与血浆蛋白非特异性结合，滞留于网状内皮系统（RES）<sup>[25]</sup>。Kang 等<sup>[14]</sup>比较了四种不同的 ZW800-CDPL 衍生物，发现两性离子 ZW800-CDPL 在给药 4 h 后具有更快的血药浓度衰减和更大的血浆清除率。此外，还可以使用亲水性聚乙二醇（PEG）来掩盖纳米粒的表面，减少血浆蛋白的非特异性吸附，延长血液循环<sup>[26]</sup>。

1.4 密度

纳米药物载体的核心密度对其在肾脏的蓄积和清除有显著影响。较低密度的纳米药物载体在血流中循环更快，体内分布更广，因此具有更短的血液滞留时间和更快的肾脏清除速度<sup>[27]</sup>。Tang 等<sup>[28]</sup>发现，随着颗粒密度的降低，肾清除效率在注射后 2 h 内呈指数增加。具有相同尺寸的两 种纳米粒 GS-AuNPs（密度为 19.3 g · cm<sup>-3</sup>）和 GS-AgNPs（密度为 10.5 g · cm<sup>-3</sup>），给药后 2 h，GS-AgNPs 的肾清除率可达 45.87%ID，而密度较大的 GS-AuNPs 肾清除率仅为 29.19%ID。

综上，RCNCs 的设计总结如表 1 所示。

表 1 RCNCs 的设计  
Tab 1 Design of the RCNCs

| 设计要点 | 类别        | 肾脏可清除能力评价                                                    |
|------|-----------|--------------------------------------------------------------|
| 粒径   | 1 nm      | 能够通过肾小球，无尺寸效应                                                |
|      | 2 ~ 6 nm  | 能够有效通过肾小球，有尺寸效应                                              |
|      | 6 ~ 10 nm | 一些柔性的纳米粒可以通过肾小球                                              |
|      | > 10 nm   | 通常难以通过肾小球，但可解离成单聚体的纳米粒、阳离子环糊精聚合物纳米粒 <sup>[18]</sup> 等能通过肾脏排泄 |
| 形状   | 球形、椭球形    | 易通过肾脏排泄                                                      |
|      | 链状、条状、棒状  | 不易通过肾脏排泄，但长径比大且直径小于 KFT 的结构可通过肾脏排泄 <sup>[21]</sup>           |
| 电荷   | 正电荷       | 易通过肾小球且肾清除率高，滞留于 RES                                         |
|      | 负电荷       | 不易通过肾小球且肾清除率低，滞留于 RES                                        |
|      | 中性电荷      | 肾清除率高，减少 RES 滞留                                              |
| 密度   | 低密度       | 血液滞留时间短，肾清除率高                                                |

## 2 RCNCs 的优势

### 2.1 经肾脏快速清除, 避免单核吞噬细胞系统 (MPS) 摄取

进入机体的给药系统, 能否在合理的时间从体内完全清除, 是判断机体安全性的重要指标。一般来说, 纳米粒的代谢和清除途径主要通过肝脏和肾脏。相比于耗时长和清除效率低的肝脏排泄, 肾脏排泄具有较高的清除效率和较短的清除时间<sup>[29]</sup>。此外, 传统的纳米药物载体通常会被单核吞噬细胞系统 (MPS) 识别并吞噬, 导致药物在肝脏、脾脏等非靶器官积累, 从而影响了其治疗效果<sup>[30]</sup>。而 RCNCs 由于其优化的尺寸和表面特性, 可以通过肾小球快速排出体外, 避免了传统纳米粒在机体中的蓄积, 从而减少了潜在的毒性风险<sup>[31]</sup>。通过特定的表面修饰, 尤其是通过 PEG 等亲水性涂层的表面功能化, 能够有效防止血清蛋白的吸附, 从而减少 MPS 的摄取, 延长其在血液中的循环时间<sup>[26]</sup>。

### 2.2 高效的肿瘤靶向性

肿瘤靶向性是限制纳米粒临床转化的另一个重要因素。RCNCs 利用肿瘤血管的增强渗透和滞留效应 (EPR 效应)<sup>[32]</sup> 被动靶向肿瘤, 同时通过配体修饰实现主动靶向<sup>[33]</sup>, 最大限度地减少 MPS 的摄取, 能有效地识别和结合肿瘤细胞, 降低对正常细胞的影响, 以增加肿瘤靶向性<sup>[31]</sup>。Kang 等<sup>[34]</sup> 设计的小尺寸 PEG-ZW800 可以通过 EPR 效应靶向肿瘤部位, 并且比较了粒径为 11 nm 和 19 nm 的 PEG-ZW800 的生物分布和肿瘤靶向效果, 结果发现粒径为 11 nm 的 PEG-ZW800, 在注射 1 h 后排泄至膀胱, 注射后 24 h 肿瘤与背景比 (tumor-to-background ratio, TBR) 为 4.4, 表现出显著的肿瘤靶向性; 而粒径为 19 nm 的 PEG-ZW800, 在肝脏、胰腺等器官中分布, 其 TBR 值相对较低。Fu 等<sup>[35]</sup> 通过将 MCP (CXCR4 受体拮抗剂) 与 MnIO NPs 生物缀合, 构建了肾可清除的 MnIO-MCP, 尾静脉注射到小鼠体内 1 h 后, 在 MCF-7 肿瘤中积累高达  $15.9\% \text{ ID} \cdot \text{g}^{-1}$ , 远高于 MnIO-PEG 通过 EPR 效应被动靶向肿瘤的肿瘤蓄积量 (约  $4.1\% \text{ ID} \cdot \text{g}^{-1}$ )。结果表明, MnIO-MCP 可以通过 MCP 与肿瘤中过表达的 CXCR4 相互作用以增强其肿瘤靶向性和抑制肿瘤生长。

### 2.3 高血管渗透性, 增强瘤内转运

肿瘤血管的特性使得纳米药物能够基于 EPR 效应被动靶向肿瘤部位, 然而, 肿瘤异质性、复杂的肿瘤微环境、实验室模型和人类肿瘤之间的差异等因素<sup>[36]</sup> 限制了药物通过血管壁的渗透和扩散, 并使瘤内药物分布不均。而尺寸是影响纳米载体在肿

瘤内分布和渗透的最重要特征之一<sup>[37]</sup>, 小尺寸的纳米载体能够通过血管渗透, 进入肿瘤微环境, 并有效穿透肿瘤组织, 达到肿瘤内部的深层区域, 更均匀地分布在肿瘤中<sup>[38]</sup>。Peng 等<sup>[13]</sup> 深入比较了肾可清除负载阿霉素 (DOX) 的 AuNPs [ $(4.7 \pm 0.9) \text{ nm}$ , 即 DDS-5] 和非肾可清除 DOX@AuNPs [ $(30.9 \pm 6.2) \text{ nm}$ , 即 DDS-30], 尾静脉注射 12 h 后观察荧光成像发现, DDS-5 能够从肿瘤血管系统中渗出并深入渗透到肿瘤微环境中, 而 DDS-30 大部分被限制在血管内或血管附近。结果表明, DDS-5 具有更高的血管渗透性和更深的瘤内渗透性。

### 2.4 智能控制释放药物

RCNCs 能够以较高的药物载量携带抗肿瘤药物, 并通过控制释放技术, 在肿瘤微环境的低 pH、特定酶的作用等条件下释放药物<sup>[39]</sup>。特别是在肿瘤组织的酸性环境中, RCNCs 能够通过表面功能化材料的变化, 促进药物从载体中释放出来, 增加药物的局部浓度, 从而提高疗效。研究显示, DOX@AuNPs 在保持粒径 [水合粒径为  $(4.70 \pm 0.89) \text{ nm}$ ] 的同时, 成功避免了与血清蛋白结合, 并显著提高了药物的稳定性和体内保留能力<sup>[40]</sup>。DOX@AuNPs 在注射后 24 h 内肾脏清除率超过  $22\% \text{ ID}$ , 远高于游离 DOX (仅约  $6\% \text{ ID}$ )。因肾可清除 AuNPs, 从而降低了 DOX 与血清蛋白的结合及其肝胆消除, 血液中 DOX 保留 ( $63.7\% \text{ ID} \cdot \text{h} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 仍比游离 DOX ( $7.7\% \text{ ID} \cdot \text{h} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 高近 10 倍。在肿瘤微酸性环境 (pH 6.5) 中, DOX 48 h 内释放约  $77.8\%$ , 其释放速率显著提高, 在增强药物肿瘤特异性的同时, 降低了对正常组织的毒性。

### 2.5 提高药物溶解性和生物可利用度

传统的抗肿瘤药物存在药物吸收差、溶解度低、生物利用度低等缺陷<sup>[41]</sup>。采用纳米技术将药物粒径从微米级减小到纳米级后, 表面积增加, 可改善其溶解性, 减少药物在体内的降解或不良反应, 确保药物在体内具有较高的稳定性; 环糊精及其衍生物利用包合技术也可以增加药物的溶解度<sup>[42]</sup>。Kang 等<sup>[14]</sup> 设计了一种由聚赖氨酸 (EPL) 和  $\beta$ -环糊精 ( $\beta$ -CD) 组成的粒径为 5.5 nm 的肾可清除纳米载体 CDPL, 其中两性离子 CDPL 能有效递送药物。伊马替尼 (IM) 是一种酪氨酸激酶抑制剂, 其溶解度和口服利用度较差<sup>[43]</sup>, CDPL 中  $\beta$ -CD 疏水性的空腔结构与 IM 分子的非极性基团以范德华力形成弱结合, 极大地改善了 IM 的水溶性。

## 3 RCNCs 在抗肿瘤中的应用

### 3.1 肿瘤成像与诊断

精准的肿瘤影像在肿瘤的早期诊断和手术影像



引导中具有重要作用。纳米药物载体作为造影剂或荧光探针,能够通过多种成像技术,如计算机断层扫描(CT)、磁共振成像(MRI)、荧光成像(FI)以及多模态成像技术,显著提高肿瘤检测的灵敏度和准确性。这些技术将为早期检测、手术引导和后续治疗提供有力支持。此外,这些纳米药物载体在实时手术导航和超声成像中也表现出优异的性能,可帮助识别肿瘤边界,确保手术安全。

**3.1.1 FI** 根据荧光波长不同,FI可分为传统荧光成像(可见光区、近红外 I 区荧光成像)和近红外 II 区荧光成像<sup>[44]</sup>。在特殊激光激发下,FI可以利用不同的荧光探针来可视化肿瘤部位并监测肿瘤进展。近红外 II 区荧光成像的大多数探针都是通过肝胆代谢的纳米材料,这通常需要几个月来代谢,导致其具有长期毒性。而 Shi 等<sup>[45]</sup>合成了一种可用于活体小鼠肿瘤近红外 II 区荧光成像的可经肾清除的 PEG 化半导体寡聚物(PSO)。在 808 nm 光激发下,PSO 可发射近红外 II 区荧光信号。注射 PSO 后,肿瘤逐渐被近红外 II 区荧光信号照亮,4 h 后可以清楚地看到肿瘤,且肿瘤区域的荧光信号是注射前的 5.4 倍,这表明 PSO 可有效地在肿瘤内蓄积,对肿瘤近红外 II 区荧光成像有较好的效果。

**3.1.2 MRI** MRI 是一种非入侵性、无辐射的成像方式。为了提高早期诊断的准确性,通过使用造影剂来提高肿瘤组织的信噪比(SNR)。MRI 造影剂分为阳性( $T_1$ )和阴性( $T_2$ )造影剂。氧化铁纳米颗粒(IONPs)以其独特的磁性和物理化学性质,成为典型的  $T_1$  造影剂。然而,由于铁离子的分解和与其他生物存在相互作用而产生潜在毒性,开发肾可清除的 IONPs 通过体内清除减少潜在毒性<sup>[46]</sup>。Liu 等<sup>[47]</sup>开发了一种粒径为 7 nm 的单分散空心  $Fe_3O_4$  纳米粒子,可以通过在内外表面形成自旋无序壳层来削弱磁各向异性,从而降低横向弛豫率( $r_2$ ),增加纵向弛豫率( $r_1$ )。此外,还采用两性离子型多巴胺磺酸盐(ZDS)改善纳米粒的溶解性和生物相容性,得到了 ZDS 共轭的  $Fe_3O_4@ZDS$  NPs 在 0.5T 磁共振扫描仪上获得  $T_1/T_2$  图像,其中  $r_1$  为  $0.23 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $r_2$  为  $0.92 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  ( $r_2/r_1 = 4.00$ ),具有优异的  $T_1$  加权 MRI 成像性能。在 4T1 异位种植小鼠模型中,静脉注射  $7\text{-Fe}_3\text{O}_4@ZDS$  NPs 后,  $T_1$  加权 MRI 的肿瘤信号强度比造影前增强近 23%。更重要的是,  $7\text{-Fe}_3\text{O}_4@ZDS$  NPs 能够通过血液循环进入肾脏,并被肾脏代谢,从而减少长期毒性风险。

**3.1.3 多模态成像** 单一成像模式通常不能满足所有的医疗诊断要求,FI 因其灵敏度高、成本低、

操作简便,对于早期非侵入性诊断极具吸引力。然而,其临床应用受到穿透深度有限和空间分辨率低的限制。尽管 CT 具有高空间和密度分辨率等优点,但它仍然存在灵敏度差的缺陷<sup>[48]</sup>。多模态成像技术通过结合两种或多种成像模式的优点,为 RCNCs 在肿瘤诊断中的应用提供了新的方向。Su 等<sup>[12]</sup>利用活体成像系统对 H22 肝癌荷瘤小鼠进行铈掺杂碳点(HfCDs)的活体荧光成像,可以在肿瘤部位检测到强荧光信号且随时间减弱。并且用市售造影剂(碘克沙醇)作对照,发现随着 HfCDs/碘克沙醇浓度的增加,CT 值呈线性增加。此外,CT 值与不同 HfCDs 浓度之间的线性关系的斜率( $7.21 \text{ HU mM}^{-1}$ )高于碘克沙醇( $5.07 \text{ HU mM}^{-1}$ ),结果表明 HfCDs 具有更高的对比性能,可以作为 CT 成像的有效造影剂。因此,HfCDs 可以作为 FI/CT 成像的有效纳米探针,用于原位肝肿瘤的体内 CT/FI 双模式成像,且具有高肿瘤靶向特异性和肾清除率。

### 3.2 肿瘤治疗

目前,肿瘤的临床治疗主要包括化疗、手术和放疗,但这些方法缺乏对肿瘤组织的靶向性,会对正常细胞产生毒副作用。新型治疗策略,如光热治疗(PTT)、光动力治疗(PDT)和化学动力疗法(CDT)等<sup>[49-50]</sup>,为抗肿瘤治疗提供了新的选择。RCNCs 在这些疗法中表现出色,能快速通过肾脏排泄,减少对健康组织的毒副作用。

**3.2.1 PTT** PTT 是一种利用光敏材料吸收特定波长的光照,将光能转化为热能的抗肿瘤方法。其核心优势在于高度的选择性,通过调节激光波长和优化光敏材料,可实现肿瘤部位的局部加热,诱导肿瘤细胞热损伤与坏死,同时减少对正常组织的影响<sup>[51]</sup>。Park 等<sup>[52]</sup>将两性离子近红外荧光团(ZW800-1)与异烟肼(INH)结合,构建了肾可清除的 INH-ZW,不仅表现出快速的肿瘤蓄积,而且在注射后 1 h 内表现出高肾清除率。在 HT-29 荷瘤小鼠模型中,注射 INH-ZW,在 808 nm 激光照射下能够产生热能,从而诱导肿瘤细胞死亡,使肿瘤的生长被有效抑制且没有明显的不良反应。

**3.2.2 PDT** PDT 是一种非侵入性的治疗方法,利用光敏剂(PS)在特定波长的光激发下生成活性氧(ROS),从而引发肿瘤细胞死亡<sup>[53]</sup>,而在无光条件下 PS 仍能保持其稳定性。较大尺寸的纳米粒通常导致体内清除效率低下,PDT 效果不理想,放大了它们的长期毒性。Wang 等<sup>[54]</sup>研发的超小型卟啉金属有机骨架纳米点(MOF QDs),经肾脏清除降低毒性的同时显著增强了 PDT 疗效。研究表明,与传统较大的卟啉金属有机骨架(NMOFs)相比,小尺寸的



MOF QDs 在相同光照条件下能生成约两倍的 ROS, 减少了活性氧簇的扩散距离, 提高了其利用效率, 从而增强 PDT 效果。在 HeLa 细胞实验中, MOF QDs 与光照组合的  $IC_{50}$  值 ( $3.13 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 显著低于其前体 NMOFs ( $8.43 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 和 PEG-NMOFs ( $10.32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 表明其有更高的治疗效率。

**3.2.3 CDT** CDT 是一种基于芬顿反应的新型治疗方法。该疗法利用 Fe、Cu 等金属离子与肿瘤微环境中过量的过氧化氢 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 反应, 产生具有高细胞毒性的羟基自由基, 进而诱导肿瘤细胞凋亡和坏死。与传统治疗相比, CDT 具有肿瘤特异性强、全身毒性低的优点, 并且不依赖外部氧气或激光刺激<sup>[55]</sup>。Wu 等<sup>[56]</sup>通过使用 BNBT-6 纳米晶体提高 CDT 的效率。这些纳米晶体在压电感应电场和富电子氧空位的影响下, 可以加速羟基自由基的生成。体内外实验表明, BNBT-6 不仅通过常规的凋亡途径杀伤肿瘤细胞, 还通过氧化应激增强了细胞杀伤效果。

### 3.3 多功能诊疗一体化的实现

RCNCs 集成了诊断、治疗及监控功能, 通过荧光、光热等多模态技术实现肿瘤的早期检测和精准治疗, 并提供实时治疗监控, 改善疗效。研究表明, RCNCs 在提高药物递送效率和优化肿瘤手术切除方面具有独特优势。Kang 等<sup>[11]</sup>证明了肾可清除的 H-Dots 可以与抗肿瘤药物 IM 形成包合物, 并将 IM 递送和释放至胃肠道间质瘤 (GIST)。在小鼠异位种植 GIST 的模型中, 静脉注射治疗剂量的 IM/H-Dots 显著抑制了肿瘤的相对体积 ( $V/V_0$ ), 且小于 IM 组的肿瘤体积。

这种显著的治疗效果归因于 IM/H-Dot 包合物的独特优势。一方面, 该复合物通过有效逃避脱靶器官和组织的非特异性吸收, 显著提高了药物在肿瘤部位的靶向递送效率; 另一方面, H-Dots 的荧光信号使其能够特异性靶向肿瘤组织, 并提供高信号背景比 (signal-to-background ratio, SBR) 值的实时成像数据, 支持图像引导下的精准手术切除。这一技术还可以区分小于 1 cm 的肿瘤与周围正常组织, 从而确保手术切除后无肿瘤残留。该研究不仅展示了 H-Dots 在药物递送和肿瘤靶向治疗中的优势, 还表明其在手术中成像和肿瘤边缘切除方面的潜力, 为复杂肿瘤的综合治疗提供了一种新的解决方案。

### 3.4 药物递送

近年来, RCNCs 在肿瘤诊断及影像领域取得了显著进展, 多个 RCNCs 平台已经进入临床试验阶段。这些 RCNCs 凭借其优异的生物相容性和高效的肾脏清除能力, 为肿瘤的早期检测和精

准诊断提供了新的可能性。然而, 相较于在诊断和影像方面的迅猛发展, RCNCs 在药物递送领域仍处于起步阶段, 仍需进一步的深入研究和优化。抗肿瘤药物大多溶解性差, 毒副作用多, 在已有的 RCNCs 中, AuNPs、C-Dots、H-Dots 是目前经研究显示能有效递送药物的代表。

AuNPs<sup>[40]</sup>作为一种经典的 RCNCs, 已被广泛应用于抗肿瘤药物的递送。例如, AuNPs 可以有效负载抗肿瘤药物 DOX 和紫杉醇 (PTX)。通过 PEG 修饰, AuNPs 不仅能够增强 PTX 的水溶性, 还能提高其肿瘤靶向性。C-Dots 也具有良好的水溶性和生物降解性<sup>[57]</sup>, 可有效负载 DOX 和西妥昔单抗<sup>[58]</sup>, 有效靶向肿瘤细胞。

相较于前两种无机材料构建的 RCNCs, H-Dots 是基于有机材料聚赖氨酸所构建的柔性 RCNCs 系统<sup>[14]</sup>, H-Dots 相比传统的 RCNCs, 具有更大的灵活性和较小的临界粒径 (由传统的 5.5 nm 提升至 12 nm)。H-Dots 在负载抗肿瘤药物 IM<sup>[11]</sup>后, 仍能保持显著的肿瘤靶向性, 并具备高效的肾脏清除能力。

总体来看, AuNPs、C-Dots 和 H-Dots 在肿瘤诊断、影像以及药物递送中的应用已展现出巨大的潜力。尽管目前在药物递送方面仍需进一步优化, 但这些 RCNCs 的多功能性为精准肿瘤治疗和个性化医疗提供了新的思路 and 方案。

## 4 结语

RCNCs 作为一种新兴的策略, 凭借其优异的生物相容性、高效的肾脏清除能力以及在肿瘤诊断和治疗中的广阔应用前景, 受到广泛关注。然而, RCNCs 从实验室研究到临床应用仍面临诸多挑战。其快速清除特性虽然减少了体内蓄积及长期毒性, 但同时也限制了药物在肿瘤部位的滞留时间, 影响治疗效果。此外, RCNCs 的制备过程复杂且成本高昂, 未来需要开发更加简便高效的合成方法, 提高产率并降低成本, 以满足大规模生产需求。在功能化方面, 如何平衡小粒径 ( $< 10 \text{ nm}$ ) 与高稳定性和多功能性的矛盾, 也是亟待解决的问题, 可通过优化化学修饰策略或开发新型柔性材料加以改善。在临床转化过程中, RCNCs 还需克服一系列生物学和技术性障碍。例如, 个体间生理差异可能影响 RCNCs 的分布、清除及疗效, 这需要进行更广泛的临床试验以验证其安全性和普适性。未来, RCNCs 的应用领域将不仅局限于肿瘤, 还可能扩展至神经系统疾病、心血管疾病及其他难治性疾病的诊断与治疗。此外, 将 RCNCs 与多模态成像、基因疗法及免疫疗法相结合, 有望实现从早期诊断到治疗监控的全

流程优化。总之, 尽管 RCNCs 的临床转化仍面临诸多挑战, 但随着技术的不断突破和创新, 其在精准医学中的价值将持续提升, 为复杂疾病的诊断和治疗提供更加安全、高效的解决方案。

## 参考文献

- [1] Cheng Z, Li MY, Dey R, et al. Nanomaterials for cancer therapy: current progress and perspectives [J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14 (1): 85.
- [2] 徐寅生, 任翔宇, 余梦真, 等. 基于纳米技术的药物递送策略及其在癌症治疗中的应用 [J]. *科学通报*, 2023, 68 (32): 4346-4372.
- [3] 郭惠婕, 姜文姣, 缪明星, 等. 抗肿瘤纳米药物的靶向递送及药代动力学模型研究进展 [J]. *中南药学*, 2020, 18 (1): 74-79.
- [4] 张曼玉, 楼晨曦, 曹傲能. 主动靶向载药脂质体在肿瘤治疗中的研究进展 [J]. *生物医学工程学杂志*, 2022, 39 (3): 633-638.
- [5] Shan XT, Gong X, Li J, et al. Current approaches of nanomedicines in the market and various stage of clinical translation [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12 (7): 3028-3048.
- [6] Cheng YH, He C, Riviere JE, et al. Meta-analysis of nanoparticle delivery to tumors using a physiologically based pharmacokinetic modeling and simulation approach [J]. *ACS Nano*, 2020, 14 (3): 3075-3095.
- [7] Petersen GH, Alzghari SK, Chee W, et al. Meta-analysis of clinical and preclinical studies comparing the anticancer efficacy of liposomal versus conventional non-liposomal doxorubicin [J]. *J Control Release*, 2016, 232: 255-264.
- [8] 孙百阳, 耿兴超, 李波. 纳米药物及纳米颗粒肝毒性研究进展 [J]. *中国新药杂志*, 2023, 32 (1): 24-29.
- [9] Park K. The beginning of the end of the nanomedicine hype [J]. *J Control Release*, 2019, 305: 221-222.
- [10] Baek MJ, Nguyen DT, Kim D, et al. Tailoring renal-clearable zwitterionic cyclodextrin for colorectal cancer-selective drug delivery [J]. *Nat Nanotechnol*, 2023, 18 (8): 945-956.
- [11] Kang H, Stiles WR, Baek Y, et al. Renal clearable therapeutic nanoplatforms for gastrointestinal stromal tumors [J]. *Adv Mater*, 2020, 32 (6): e1905899.
- [12] Su Y, Liu S, Guan YY, et al. Renal clearable Hafnium-doped carbon dots for CT/Fluorescence imaging of orthotopic liver cancer [J]. *Biomaterials*, 2020, 255: 120110.
- [13] Peng CQ, Yu MX, Hsieh JT, et al. Correlating anticancer drug delivery efficiency with vascular permeability of renal clearable versus non-renal clearable nanocarriers [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, 58 (35): 12076-12080.
- [14] Kang H, Gravier J, Bao K, et al. Renal clearable organic nanocarriers for bioimaging and drug delivery [J]. *Adv Mater*, 2016, 28 (37): 8162-8168.
- [15] Xu MZ, Qi YM, Liu GS, et al. Size-dependent in vivo transport of nanoparticles: implications for delivery, targeting, and clearance [J]. *ACS Nano*, 2023, 17 (21): 20825-20849.
- [16] Singh G, Ddungu JLZ, Licciardello N, et al. Ultrasmall silicon nanoparticles as a promising platform for multimodal imaging [J]. *Faraday Discuss*, 2020, 222: 362-383.
- [17] Du BJ, Jiang XY, Das A, et al. Glomerular barrier behaves as an atomically precise bandpass filter in a sub-nanometre regime [J]. *Nat Nanotechnol*, 2017, 12 (11): 1096-1102.
- [18] Zuckerman JE, Choi CHJ, Han H, et al. Polycation-siRNA nanoparticles can disassemble at the kidney glomerular basement membrane [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109 (8): 3137-3142.
- [19] Shah S, Famta P, Bagasariya D, et al. Nanotechnology based drug delivery systems: does shape really matter? [J]. *Int J Pharm*, 2022, 625: 122101.
- [20] Zhao YT, Wang Y, Ran F, et al. A comparison between sphere and rod nanoparticles regarding their in vivo biological behavior and pharmacokinetics [J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 4131.
- [21] Ruggiero A, Villa CH, Bander E, et al. Paradoxical glomerular filtration of carbon nanotubes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107, (27): 12369-74.
- [22] Huang YY, Yu MX, Zheng J. Charge barriers in the kidney elimination of engineered nanoparticles [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2024, 121 (23): e240313121.
- [23] Yu MX, Zhou C, Liu L, et al. Interactions of renal-clearable gold nanoparticles with tumor microenvironments: vasculature and acidity effects [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, 56 (15): 4314-4319.
- [24] Adhipandito CF, Cheung SH, Lin YH, et al. Atypical renal clearance of nanoparticles larger than the kidney filtration threshold [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (20): 11182.
- [25] Loiola LMD, Batista M, Capeletti LB, et al. Shielding and stealth effects of zwitterion moieties in double-functionalized silica nanoparticles [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2019, 553: 540-548.
- [26] Rampado R, Crotti S, Caliceti P, et al. Recent advances in understanding the protein corona of nanoparticles and in the formulation of "stealthy" nanomaterials [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 166.
- [27] 赖连英, 王颖, 李莉, 等. 纳米颗粒在肾脏疾病中的应用及研究进展 [J]. *实用药物与临床*, 2024, 27 (9): 695-700.
- [28] Tang SH, Peng CQ, Xu J, et al. Tailoring renal clearance and tumor targeting of ultrasmall metal nanoparticles with particle density [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 55 (52): 16039-16043.
- [29] Yang GB, Phua SZF, Bindra AK, et al. Degradability and clearance of inorganic nanoparticles for biomedical applications [J]. *Adv Mater*, 2019, 31 (10): e1805730.
- [30] Zhu GH, Gray ABC, Patra HK. Nanomedicine: controlling nanoparticle clearance for translational success [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2022, 43 (9): 709-711.
- [31] Peng CQ, Huang YY, Zheng J. Renal clearable nanocarriers: overcoming the physiological barriers for precise drug delivery and clearance [J]. *J Control Release*, 2020, 322:

- 64-80.
- [32] Sun R, Xiang JJ, Zhou Q, et al. The tumor EPR effect for cancer drug delivery: current status, limitations, and alternatives [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 191: 114614.
- [33] Goddard ZR, Marín MJ, Russell DA, et al. Active targeting of gold nanoparticles as cancer therapeutics [J]. *Chem Soc Rev*, 2020, 49 (23): 8774-8789.
- [34] Kang H, Rho S, Stiles WR, et al. Size-dependent EPR effect of polymeric nanoparticles on tumor targeting [J]. *Adv Healthc Mater*, 2020, 9 (1): e1901223.
- [35] Fu Y, Li XD, Chen HD, et al. CXC chemokine receptor 4 antagonist functionalized renal clearable manganese-doped iron oxide nanoparticles for active-tumor-targeting magnetic resonance imaging-guided bio-photothermal therapy [J]. *ACS Appl Bio Mater*, 2019, 2 (8): 3613-3621.
- [36] Zi YX, Yang KY, He JH, et al. Strategies to enhance drug delivery to solid tumors by harnessing the EPR effects and alternative targeting mechanisms [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 188: 114449.
- [37] 许子艺, 樊莉, 卢光照, 等. 尺寸可调纳米颗粒的抗肿瘤作用研究进展 [J]. *中国药学杂志*, 2023, 58 (20): 1814-1822.
- [38] Zhang JJ, Wang XF, Wen J, et al. Size effect of mesoporous organosilica nanoparticles on tumor penetration and accumulation [J]. *Biomater Sci*, 2019, 7 (11): 4790-4799.
- [39] 邹蔓姝, 雷昌, 黄丹, 等. 用于肿瘤治疗的智能调控/响应肿瘤微环境的纳米递药系统研究进展 [J]. *中国新药杂志*, 2024, 33 (15): 1564-1570.
- [40] Peng CQ, Xu J, Yu MX, et al. Tuning the in vivo transport of anticancer drugs using renal-clearable gold nanoparticles [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, 58 (25): 8479-8483.
- [41] Alven S, Aderibigbe BA. Efficacy of polymer-based nanocarriers for co-delivery of curcumin and selected anticancer drugs [J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2020, 10 (8): 1556.
- [42] 曹麒麟, 韩晓璐, 高静, 等. 提高难溶性药物生物利用度的研究进展 [J]. *湖北科技学院学报 (医学版)*, 2021, 35 (4): 352-356.
- [43] Russo E, Spallarossa A, Tasso B, et al. Nanotechnology of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy: a perspective [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (12): 6538.
- [44] Ma KM, Jiang QY, Yang Y, et al. Recent advances of versatile fluorophores for multifunctional biomedical imaging in the NIR-II region [J]. *J Mater Chem B*, 2024, 13 (1): 15-36.
- [45] Shi WH, Diao SC, Liang TT, et al. A renal-clearable PEGylated semiconducting oligomer for the NIR-II fluorescence imaging of tumor [J]. *ACS Appl Bio Mater*, 2022, 5 (10): 4965-4971.
- [46] Zhang QP, Yin R, Guan GQ, et al. Renal clearable magnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging and guided therapy [J]. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2024, 16 (1): e1929.
- [47] Liu W, Deng G, Wang DL, et al. Renal-clearable zwitterionic conjugated hollow ultrasmall  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles for  $T_1$ -weighted MR imaging in vivo [J]. *J Mater Chem B*, 2020, 8 (15): 3087-3091.
- [48] Liao WH, Lei P, Pan JB, et al. Bi-DTPA as a high-performance CT contrast agent for in vivo imaging [J]. *Biomaterials*, 2019, 203: 1-11.
- [49] Gong F, Cheng L, Yang NL, et al. Preparation of  $\text{TiH}_{1.924}$  nanodots by liquid-phase exfoliation for enhanced sonodynamic cancer therapy [J]. *Nat Commun*, 2020, 11 (1): 3712.
- [50] Lei LL, Dong Z, Xu L, et al. Metal-fluorouracil networks with disruption of mitochondrion enhanced ferroptosis for synergistic immune activation [J]. *Theranostics*, 2022, 12 (14): 6207-6222.
- [51] Shi XL, Tian Y, Liu Y, et al. Research progress of photothermal nanomaterials in multimodal tumor therapy [J]. *Front Oncol*, 2022, 6 (12): 939365.
- [52] Park MH, Jo G, Lee BY, et al. Rapid tumor targeting of renal-clearable ZW800-1 conjugate for efficient photothermal cancer therapy [J]. *Biomedicines*, 2021, 9 (9): 1151.
- [53] Correia JH, Rodrigues JA, Pimenta S, et al. Photodynamic therapy review: principles, photosensitizers, application and future directions [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13 (9): 1332.
- [54] Wang H, Yu DQ, Fang J, et al. Renal-clearable porphyrinic metal-organic framework nanodots for enhanced photodynamic therapy [J]. *ACS Nano*, 2019, 13 (8): 9206-9217.
- [55] Jia CY, Guo YX, Wu FG. Chemodynamic therapy via Fenton and Fenton-like nanomaterials: strategies and recent advances [J]. *Small*, 2022, 18 (6): e2103868.
- [56] Wu JY, Meng Y, Wu F, et al. Ultrasound-driven non-metallic fenton-active center construction for extensive chemodynamic therapy [J]. *Adv Mater*, 2024, 36 (2): e2307980.
- [57] Naik K, Chaudhary S, Ye L, et al. A strategic review on carbon quantum dots for cancer-diagnostics and treatment [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10: 882100.
- [58] Jha A, Viswanadh MK, Burande AS, et al. DNA biodots based targeted theranostic nanomedicine for the imaging and treatment of non-small cell lung cancer [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 150: 413-425.

(收稿日期: 2024-12-05; 修回日期: 2025-01-18)



# 真菌组蛋白去乙酰化酶 Set3 及其复合物 生物学功能和机制的研究进展

施乔, 李超陈, 冯茜元, 苏清亲, 刘娜\* (中国人民解放军海军军医大学, 上海 200433)

**摘要:** 组蛋白去乙酰化酶 (HDAC) 是一种重要的表观遗传蛋白, 在真菌的形态转换、毒力因子表达等致病过程中起重要作用, 且在真核细胞中高度保守。研究表明, HDAC 抑制剂与唑类抗真菌药物联用能协同抑制白念珠菌生长, 降低真菌对唑类药物的耐药性。因此, HDAC 是抗真菌潜在的新靶点。目前, 在白念珠菌中鉴定出四类关键 HDAC 亚型蛋白, 其中 Set3 是一类以烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 为基础的、真菌特有的 HDAC 亚型蛋白, Set3 在 Set3 组蛋白去乙酰化酶复合物 (Set3C) 中为重要的核心亚基。Set3C 对白念珠菌的酵母-菌丝态二相转化、白色-不透明形态转换以及生物被膜形成等过程起到关键作用。本文综述了真菌 HDAC 分类、Set3 及 Set3C 的组成和生物学功能, 讨论了 Set3 作为抗真菌靶点的潜力和前景, 为全新抗真菌作用靶点的发现及抗真菌药物研发提供新的思路。

**关键词:** 真菌感染; 白念珠菌; 耐药性; 组蛋白去乙酰化酶; Set3

中图分类号: R54

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)06-1765-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.039

## Biological function and mechanism of fungal histone deacetylase Set3 and its complex

SHI Qiao, LI Chao-chen, FENG Qian-yuan, SU Qing-qin, LIU Na\* (Naval Medical University, Shanghai 200433)

**Abstract:** Histone deacetylase (HDAC) is an important epigenetic protein in eukaryotic cells, which plays an important role in the pathogenic function of fungi, such as morphological transformation and virulence factor expression. Studies have shown that the combination of HDAC inhibitors and azole antifungal drugs synergistically inhibits the growth of *Candida albicans* and reduces the resistance of fungi to azole drugs. Therefore, HDAC is a potential new target for antifungal drugs. Currently, four key HDAC subtypes have been identified in *Candida albicans*, among which Set3 is a nicotinamide adenine dinucleotide-based HDAC subtype protein specific to fungi. Set3 serves as an important core subunit in its complex (Set3 complex, Set3C) which plays a crucial role in the yeast-hyphal phase transition, white-opaque morphological transition, and biofilm formation of *Candida albicans*. This article reviewed the classification of fungal HDAC, the compositions and biological functions of Set3 and Set3C to determine its potential and prospects as an antifungal target, providing new ideas for the development of new targets and drugs.

**Key words:** fungal infection; *Candida albicans*; resistance; histone deacetylase; Set3

据估计, 全球近 10 亿人患有皮肤、指甲和毛发等浅表性真菌感染, 超过 1.5 亿人患有严重的真菌感染性疾病<sup>[1]</sup>; 每年约有 650 万人患侵

袭性真菌感染, 死亡人数约为 380 万, 其中约有 250 万死亡直接由侵袭性真菌感染导致<sup>[2]</sup>。严重的真菌感染常常继发于获得性免疫缺陷综合

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (No. 82373734)。

**作者简介:** 施乔, 女, 硕士研究生, 主要从事抗真菌药物研究, email: shiqiao6481@163.com \* **通信作者:** 刘娜, 女, 副教授, 主要从事抗真菌药物研究, email: liuna66@aliyun.com

征、肿瘤、器官移植和糖皮质激素治疗<sup>[1]</sup>,大大增加了这些疾病的治疗难度。白念珠菌是一种重要的机会性致病真菌,在 2022 年世界卫生组织(WHO)发布的全球首份重点真菌病原体清单(fungal priority pathogens list, FPPL)中被列为危重级病原体,常在免疫系统受损的个体中引起感染,对公共卫生造成极大威胁。

目前,临床上仅有四类抗真菌药物用于侵袭性真菌感染的治疗,包括唑类(如氟康唑、伊曲康唑等),棘白菌素类(如卡泊芬净、米卡芬净等),多烯类(如两性霉素 B)以及作为辅助联合用药的抗代谢药物(如氟胞嘧啶)等。上述药物存在诸多缺陷,如唑类药物面临愈发严重的耐药性,棘白菌素类药物抗菌谱窄且价格昂贵、不能口服,多烯类药物具有较大的肝肾毒性等,这些缺陷使得侵袭性真菌感染的治疗面临严峻的挑战<sup>[3]</sup>。然而,基于已有抗真菌药物的改造不能从根本上解决该类药物存在的问题。因此,基于新的抗真菌作用机制和新靶点开发新型抗真菌药物十分重要。

已有研究表明,组蛋白去乙酰化酶(HDAC)在真菌对唑类药物耐药性的形成中发挥重要作用,HDAC 抑制剂与唑类抗真菌药物联用能协同抑制白念珠菌生长,降低真菌对唑类药物的耐药性<sup>[4-5]</sup>。因此,HDAC 被认为是潜在的抗真菌新靶点。然而,目前 HDAC 的相关研究主要针对抗肿瘤药物,真菌 HDAC 研究尚处于起步阶段,多数文献报道的 HDAC 抑制剂虽然具有一定的抗真菌活性,但存在毒性大、对真菌选择性差的问题,而对于真菌 HDAC 亚型蛋白及其抑制剂的研究可能是该领域未来的热点方向<sup>[6-8]</sup>。基于此,本文对真菌 HDAC 分类、真菌特有的 HDAC 亚型蛋白 Set3 及其复合物(Set3C)的组成和生物学功能进行综述,旨在为全新抗真菌作用靶点及抗真菌药物研发提供新的思路。

## 1 白念珠菌中的 HDAC

截至目前,白念珠菌中已鉴定出的四大类共 11 种 HDAC,即 I 类(Rpd31、Rpd32、Hos1 和 Hos2)、II 类(Hda1 和 Hos3)、III 类(Sir2、Hst1、Hst2 和 Hst3)及 IV 类(Set3)。根据其保守地去乙酰化酶催化结构域及辅因子依赖性分为两大类: $Zn^{2+}$ 依赖型及 NAD 依赖型 HDAC,其中 I 类和 II 类是  $Zn^{2+}$  依赖型 HDAC,III 类和 IV 类是 NAD 依赖性 HDAC<sup>[9-11]</sup>。Set3 是真菌特有的 HDAC,在哺乳动物细胞中不存在。

### 1.1 I 类 HDAC: Rpd31、Rpd32、Hos1 和 Hos2

白念珠菌有两个酿酒酵母 *RPD3* 潜在种间同

源基因,即 *RPD31* 和 *RPD32*。2001 年首次在白念珠菌中鉴定并克隆出 Hos1,但是目前尚不清楚其功能<sup>[12-13]</sup>。最初念珠菌基因组数据库(CGD)将 Hos2 划分为具有 Sirtuin 活性的 III 类酶<sup>[14]</sup>,但是现在将其划分为 I 类 HDAC<sup>[15]</sup>。根据体外实验结果,重组 Hos2 对乙酰化微管蛋白具有去乙酰化的作用,但是对于乙酰化组蛋白尚未显示出显著功能<sup>[14]</sup>。目前还没有相关的体内实验进一步证明这些成果。

### 1.2 II 类 HDAC: Hos3 和 Hda1

Hda1 在 2001 年被分离鉴定出在菌丝发育以及在白色态向不透明态转变过程中发挥重要作用,而 Hos3 在念珠菌中的作用目前尚不明确<sup>[13]</sup>。

### 1.3 III 类 HDAC: Sir2、Hst1、Hst2 和 Hst3

Sirtuin 家族在细菌、真菌、哺乳动物细胞中广泛存在。它们作为  $NAD^+$  依赖性 HDAC,对于调节细胞的能量代谢、氧化应激等具有重要作用。Sir2 蛋白与白念珠菌表型转换和菌丝生长过程有关<sup>[16]</sup>。Sir2 和 Hst1 定位于细胞核,且 Sir2 特别集中在核仁上,而 Hst2 则定位于细胞质。这种核定位表明 Sir2 和 Hst1 在调节基因表达中发挥作用<sup>[17]</sup>。有研究表明,Sir2 还可以调节白念珠菌中的细胞衰老<sup>[18]</sup>。值得注意的是,在有些念珠菌(如葡萄牙念珠菌)中没有检测到 Sir 的相关功能,提示有些念珠菌并不拥有 *SIR2* 基因<sup>[19]</sup>。Hst3 是真菌特异性  $NAD^+$  依赖性蛋白去乙酰化酶,参与组装核小体<sup>[20]</sup>。Hst1 参与构成 Set3C。

### 1.4 IV 类 HDAC: Set3

Set3 是真菌中特有的、 $NAD^+$  依赖的 HDAC,是 Set3C 的核心亚基。

## 2 Set3C 的组成

酿酒酵母的 Set3C 由四个核心亚基(Set3、Hos2、Snt1、Sif2)和三个外围亚基(Hos4、Hst1、Cpr1)组成,破坏任何核心亚基基因都使得复合物不能正常装配,而破坏外围亚基基因则无此作用。

Set3 具有两个已知的代表性结构域: Set3 和植物同源结构域(PHD),具有染色质结合功能; Hos2 是主要的 HDAC,负责催化组蛋白去乙酰化; Sif2 和 Snt1 相互作用并形成 2:2 的四聚体,它与 Set3 及其 Set3C 组件相互作用。外围亚基 Hos4 与 Hst1 和 Hos2 相互作用。Hst1 还与其他亚基形成复合物,以抑制参与营养生长的基因的转录。Cpr1 等亚基的功能尚未明确,可能与 Set3C 的结构稳定性有关(见图 1)<sup>[21]</sup>。

通过对酿酒酵母和白念珠菌蛋白质组双向检索,发现核心亚基高度保守,提示白念珠菌中也存在类似的 Set3C 结构(见表 1)。研究表明,HDAC



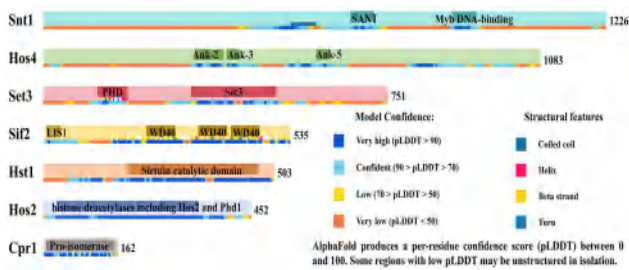


图 1 Set3C 亚基可视化图谱

Fig 1 Domain maps of Set3C

底物特异性相对较低，通常与其他酶共同作用形成复合物，参与调节细胞增殖、再生、凋亡和分化等基本细胞功能。据研究，Set3C 可能执行多种细胞生物功能，对于白念珠菌的形态、毒力及耐药性均有重要作用<sup>[11]</sup>。蛋白质序列的 BLAST *E* 值表明白念珠菌的每个亚基都是进化保守的（*E* 值  $< 1 \times 10^{-30}$ ）。每个条带包含蛋白质氨基酸长度、已知或预测结构域的鉴定、序列保守性、结构特征。数据来源于 UniProt 和参考文献<sup>[20]</sup>。

表 1 酿酒酵母和白念珠菌 Set3C 的组成

Tab 1 Composition of Set3C Complex in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*

| <i>Saccharomyces cerevisiae</i><br><i>Gene</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i><br>系统命名 | 结构完整性要<br>求 | <i>Candida albicans</i><br>系统名称 (ORF) | 同源性评估<br>(aa)           |
|------------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------|---------------------------------------|-------------------------|
| <i>SET3</i>                                    | YKR029C                                 | +           | 19.7221                               | $2.00 \times 10^{-47}$  |
| <i>HOS2</i>                                    | YGL194C                                 | +           | 19.5377                               | $< 1 \times 10^{-150}$  |
| <i>SNT1</i>                                    | YCR033W                                 | +           | 19.5241                               | $6.00 \times 10^{-37}$  |
| <i>SIF2</i>                                    | YBR103W                                 | +           | 19.1320                               | $1.00 \times 10^{-34}$  |
| <i>HOS4</i>                                    | YIL112W                                 | —           | 19.4728                               | $4.00 \times 10^{-31}$  |
| <i>HST1</i>                                    | YOL068C                                 | —           | 19.4761                               | $5.00 \times 10^{-105}$ |
| <i>CPR1</i>                                    | YDR155C                                 | —           | 19.6472                               | $1.00 \times 10^{-73}$  |

### 3 Set3C 调控基因表达

真核生物基因转录涉及多个层次的调控，Set3C 通过去乙酰化组蛋白 H3 和 H4，抑制特定基因的转录，主要作用于基因的启动子区域，调节基因的沉默或低表达状态。2012 年，有研究人员利用染色质免疫沉淀测序（CHIP-SEQ）和全转录组测序（RNA-SEQ）发现 Set3C 调控与真菌形态发生相关的各种转录因子的基因表达动力学。Set3 中的 PHD 结构域以较高的亲和力结合组蛋白 H3 二甲基化的 4- 赖氨酸（H3K4me2），介导 5' 转录区组蛋白的去乙酰化<sup>[18]</sup>。

为了探究 Set3C 对基因表达的影响机制，Kim 等<sup>[22]</sup>对经历一系列碳源转移的酵母进行了全基因组转录分析。研究结果表明，*SET3* 基因的缺失主要导致过渡期的变化，表现为基因的诱导或抑制；受 Set3C 影响的多数基因与非编码 RNA（ncRNA）转录区域存在重叠现象。进一步分析发现，H3K4me3

在转录起始位点附近表现出最高的信号强度，而 H3K4me2 则在转录活跃区域呈现显著的富集特征。由于末端启动子或反义启动子的 H3K4me3 水平降低以及 ncRNA 转录减少，许多受 Set3C 抑制的基因在启动子区域上以 H3K4me2 为主而非 H3K4me3。此外，Set3C 可通过抑制内部隐秘启动子来调控基因表达，并通过抑制重叠的拮抗反义转录物激活 *YEF3* 和 *PMA1* 等基因。值得注意的是，这种重叠的非编码转录可通过储存 H3K4me2 募集 Set3C，从而实现对基因表达的精细调控。

此外，促转录染色质（FACT）蛋白在染色质的转录过程中起着重要的促进作用。作为一种关键的组蛋白伴侣，它在 DNA 复制和基因转录等多种细胞活动中与不同的蛋白质相互作用。值得注意的是，FACT 的 Spt16 亚基的 N- 末端结构域能够与 Set3C 发生相互作用。在某些情况下，FACT 和 Set3C 通过相同的途径来调节基因表达，而且这种调节作用并不依赖于组蛋白 H3 和 H4 的介导<sup>[23-25]</sup>。

研究表明，Set3C 中的 Set3 亚基和 Sif2 亚基是 FACT 新的结合伴侣，而 Set3 亚基和 Hos2 亚基也是响应由三糖转换为半乳糖的环境刺激碳源转移所必需的。从机制来看，在诱导条件下，*set3<sup>Δ/Δ</sup>* 突变体和 FACT 突变体显示出组蛋白乙酰化程度的降低以及 *GAL1* 启动子处核小体数量的增加。此外，*GAL10* ncRNA 转录的抑制部分逆转了这些染色质变化。这些结果表明，FACT 与 Set3C 之间的相互作用可以阻止 *GAL10* 的 ncRNA 转录，并在碳源变化时对 *GAL* 基因的表达进行微调，揭示了 Set3C 在基因调控中有新的相互作用和基因调控机制<sup>[26-27]</sup>。

### 4 Set3C 对白念珠菌形态的影响

白念珠菌是一种常见的致病真菌，通常会在免疫功能受损患者体内引发感染。HDAC 及相关基因对白念珠菌形态转换有重要影响，例如白念珠菌存在酵母和菌丝两种形态，形态转换与毒力相关，后者增加侵袭性。Hda1 由转录因子 Brg1 募集并阻止 Nrg1 阻遏蛋白和染色质结合，影响形态转换，调控菌丝基因表达<sup>[28]</sup>。Rpd31-Ssn6 复合体双向调节形态转化，抑制或激活丝状基因<sup>[29]</sup>（见图 2A）。白念珠菌存在白色和不透明两种细胞形态，白色细胞毒性更强，常见于人体感染，当删除 *HDA1* 基因后，可以促进白色态转变为不透明态；删除 *RPD31* 后，两个方向的进程都可以被促进<sup>[29]</sup>（见图 2B）。生物被膜是白念珠菌的一种重要毒力因子，其内部包含了大量酵母和菌丝态的真菌细胞（见图 2C）。Set3C 在上述三种白念珠菌的形态转换中均有重要意义。



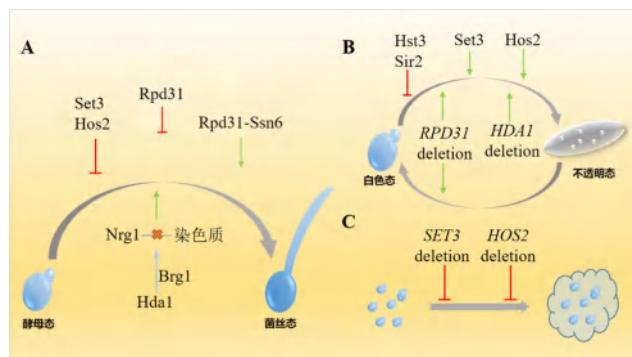


图2 HDAC及相关基因对白念珠菌形态的影响

Fig 2 Influence of HDAC and related genes on the morphology of *Candida albicans*

A. HDAC及相关基因对白念珠菌从酵母态向菌丝态的影响 (HDACs affect the transformation of *Candida albicans* from yeast form to hyphal form); B. HDAC及相关基因对白念珠菌白色态与不透明态双向转变的影响 (HDACs affect the bidirectional transformation between white form and opaque form of *Candida albicans*); C. 删除 *SET3* 或 *HOS2* 基因可以促进生物被膜形成 (deletion of *SET3* or *HOS2* genes promotes biofilm formation)

#### 4.1 Set3C 调节白念珠菌丝形态转化

与其他多形态真菌病原体一样,白念珠菌能够在单细胞酵母样细胞和多细胞菌丝之间转化。菌丝形态具有潜在的侵袭性和播散性,因此从酵母态转化到菌丝态的能力与毒力相关。研究发现,Set3C在白念珠菌酵母态向菌丝态转化的过程中起负向调节的作用<sup>[9]</sup>,菌丝特异因子在 *set3*<sup>Δ/Δ</sup> 突变体中展现了更高的转录水平,而酵母特异因子则在菌丝分化时受到抑制<sup>[17]</sup>。通过抑制 cAMP/PKA 通路及其下游转录因子 Efg1, Set3C 可抑制酵母期菌丝特异性基因的表达。因此,即使是在 37℃ 菌丝诱导条件不足的酵母提取物-蛋白胨-葡萄糖培养基 (YPD 培养基) 中生长, *SET3* 或 *HOS2* 突变体也会有菌丝生长,可以维持白念珠菌的所有发育形态,并由于 cAMP/PKA 信号通路高度活跃,给予丝状诱导信号时会出现高丝状表型<sup>[30]</sup>。

#### 4.2 Set3C 调节白念珠菌白色-不透明形态转换

白念珠菌具有白色细胞和不透明细胞两种形态,白色细胞小而圆,在固体培养基上形成白色有光泽的菌落,而不透明细胞大而长,形成扁平而粗糙的菌落,在一定条件下两者可以相互转化。在小白鼠体内模型中,白色菌落具有更强的毒性,在个体发生系统性真菌感染时,更容易分离出白色念珠菌细胞,而不透明念珠菌细胞可能更适合在体内定植<sup>[31-32]</sup>。

运用染色质免疫共沉淀技术及与芯片方法结合 (ChIP-chip) 等技术可以分析白色和不透明细胞基因转录调控网络<sup>[33]</sup>,而后续研究发现,在白念珠菌从白色态向不透明态转化过程中,抑制或删除 *SET3* 和 *HOS2* 则能够促进白色态向不透明态的转

化,因此 Set3 和 Hos2 是白色到不透明开关的关键激活物<sup>[34]</sup>。

#### 4.3 Set3C 影响白念珠菌生物被膜的形成

生物被膜是白念珠菌的一种重要毒力因子,其内部包含了大量酵母和菌丝态的真菌细胞,周围则是被细胞外基质包裹,通常会在血管内导管等医疗器械或黏膜表面上发育。生物被膜将酵母细胞释放到血液中造成血源性播散,造成继发感染灶。由于细胞外基质阻碍了药物在真菌细胞上发挥作用,所以生物被膜也是真菌产生耐药性的一个重要因素<sup>[35-36]</sup>。

通过全基因组通路分析白念珠菌中生物被膜形成的转录网络,六个主要调节子 (Bcr1、Tec1、Efg1、Ndt80、Rob1 和 Brg1) 排列在紧密交织的转录网络中,下游的三个转录调节子 (Sfu1、Crz2 和 Nrg1) 是它们的特殊靶标。有研究表明,Set3C 能与上述转录调节子结合,进而影响白念珠菌的形态。形态转换是白念珠菌致病性的关键因素 (见图 3), Set3C 通过调控相关基因的表达影响这一过程<sup>[11]</sup>。

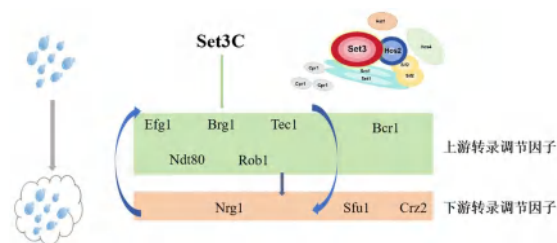


图3 Set3C与转录调节因子结合影响生物被膜形态转变

Fig 3 Set3C binds to master transcriptional regulators and affects the morphological transformation of biofilms

**4.3.1 调节白念珠菌生物被膜发育** Set3C 对于生物被膜的发育具有重要意义。删除 *SET3* 和 *HOS2* 基因可以促进生物被膜的生成,并且这些突变株的生物被膜具有更强的韧性,使真菌细胞更难以从生物被膜中释放出去。研究证明 Set3C 直接结合五个主要生物被膜调节因子 (Tec1、Efg1、Ndt80、Rob1 和 Brg1), 以及“下游”调节因子 Nrg1, 参与真菌细胞扩散的调节。这些转录调节因子在此过程中被 Set3C 短暂抑制,影响白念珠菌生物被膜的发育<sup>[11, 37]</sup>。

**4.3.2 调节白念珠菌生物被膜的扩散功能** 生物被膜将酵母细胞释放到血液中,造成血源性播散,造成继发感染灶。对 Set3C 突变体 (*hos2*<sup>Δ/Δ</sup>、*sif2*<sup>Δ/Δ</sup>、*snt1*<sup>Δ/Δ</sup>、*set3*<sup>Δ/Δ</sup>) 研究发现,无论是在标准扩散实验还是在连续扩散实验中,突变株形成的生物被膜更具有韧性,突变株中的真菌细胞相较于野生型更不易从被膜中扩散出去。白念珠菌被“困在”生物被膜当中,被限制不能向远处播散,继而能够降低白念珠菌的毒力<sup>[11]</sup>。

**4.3.3 调节白念珠菌生物被膜的耐药性** 由于细胞外基质阻碍了药物在真菌细胞上发挥作用,所以生物被膜也是真菌耐药性产生的一个重要因素。用两性霉素 B、卡泊芬净、1, 10- 菲罗啉、4- 硝基喹啉氧氮芥以及氟康唑作为杀菌剂或者抑菌剂对菌株进行处理,与野生型相比,Set3C 突变株的耐药性在生物被膜未形成的情况下并没有表现出明显差异。但是突变株在生物被膜中测得的存活细胞数量与野生型相比明显增多,从而产生耐药性。此外,有研究对耐药性生成的原因进行调研,并通过实验排除了 ATP 结合盒(ABC)超家族的多药转运蛋白上调、细胞膜通透性影响以及细胞外基质中的  $\beta$ -1, 3- 葡聚糖成分变化等常规因素,目前只能推测还有其他生物被膜特有的属性机制影响耐药性。因此,Set3C 突变体所致耐药性增加的原因仍需进一步探究<sup>[11]</sup>。

## 5 Set3C 的其他功能

白念珠菌可能存在于多种微生物共同感染的条件下。例如,在体外实验中,白念珠菌与铜绿假单胞菌之间的相互作用表现为拮抗性,铜绿假单胞菌能够抑制白念珠菌从酵母型向菌丝型的转变。通过分析多微生物被膜的转录情况,发现参与形态调节和生物被膜形成的 *SET3* 基因表达上调,这一变化在多种微生物的生物被膜形成的早期阶段产生影响,并降低白念珠菌 *set3<sup>Δ/Δ</sup>* 突变体的毒力<sup>[38]</sup>。

Set3C 除了对于白念珠菌感染条件下的形态、毒力及耐药性均有重要作用之外,在新生隐球菌中,Set3C 的核心亚基 Set3 突变体通过降解错误折叠的蛋白起到影响耐热性和黑色素等致病性毒力因子的作用<sup>[39]</sup>。在谷禾镰刀菌中,Set3C 的核心亚基 FgSnt1 影响调节其病原体生长、分化和发病的 cAMP-PKA 途径<sup>[40]</sup>。此外,Set3C 还是糖酵解调节因子的转录辅因子<sup>[20]</sup>。由于序列保守,这些研究对于今后 Set3C 在白念珠菌中的研究都有一定启发。

## 6 总结和展望

HDAC 是真核生物中一类高度保守的蛋白,在细胞的生长发育中发挥重要作用。目前已有文献报道,将 HDAC 抑制剂与唑类等抗真菌药物联合使用,是治疗耐药真菌引起的侵袭性真菌感染的新策略。但已上市的 HDAC 抑制剂的主要靶点是针对抗肿瘤治疗的人源 HDAC,相应的毒副作用使得它们并不适合直接用于抗真菌治疗,而提高抑制剂对真菌的选择性是一种降低抑制剂对人体毒副作用的有效策略。因此,开发新型的选择性真菌 HDAC 抑制剂是未来该领域的重要研究方向。

将人源的 HDAC 序列与白念珠菌序列进行比对后发现,Set3 与其他 HDAC 的同源性均小于

20%,提示可能是真菌特有的 HDAC。Set3 在真菌的生长发育以及毒力因子的生成等方面都发挥着至关重要的作用,加之 Set3 与人类 HDAC 差异较大,相应的抑制剂对于人体正常细胞的影响也会相对更低。因此,在真菌特异性 HDAC 抑制剂的研究方面,Set3 可能是潜在的抗真菌靶点,值得进一步深入研究。

结合之前的调研,研究 Set3C 有助于揭示白念珠菌表观遗传调控的机制,为抗真菌新靶点研究提供重要线索;Set3C 在白念珠菌的致病性中起重要作用,研究其功能有助于理解白念珠菌的感染机制;目前没有已知上市的 Set3 抑制剂,但有研究报道 Set3 突变体对 6- 氮杂尿嘧啶有敏感性差异,或许可以为进一步研究提供线索<sup>[41]</sup>;HDAC 抑制剂(如曲古抑菌素 A, TSA)也已被用于研究 Set3C 的功能,针对 Set3C 研发的药物可能成为治疗白念珠菌感染的新选择。

## 参考文献

- [1] Bongo-min F, Gago S, Oladele RO, et al. Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision [J]. J Fungi (Basel), 2017, 3 (4): 57.
- [2] David WD. Global incidence and mortality of severe fungal disease [J]. Lancet Infect Dis, 2024, 24 (7): 428-438.
- [3] Puumala E, Fallah S, Robbins N, et al. Advancements and challenges in antifungal therapeutic development [J]. Clin Microbiol Rev, 2024, 37 (1): e0014223.
- [4] Smith WL, Edlind TD. Histone deacetylase inhibitors enhance *Candida albicans* sensitivity to azole a and related antifungals: correlation with reduction in CDR and ERG regularization [J]. Antimicrob Agents Ch, 2002, 46: 3532-3539.
- [5] Pfaller MA, Messer SA, Georgopapadakou N, et al. Activity of MGCD290, a Hos2 histone deacetylase inhibitor, in combination with azole antifungals against opportunistic fungal pathogens [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47: 3797-3804.
- [6] Liu N, Tu J, Huang YH, et al. Target-and prodrug-based design for fungal diseases and cancer-associated fungal infections [J]. Adv Drug Delivery Rev, 2023, 197: 114819.
- [7] Li CC, Tu J, Han GY, et al. Heat shock protein 90 (Hsp90)/histone deacetylase (HDAC) dual inhibitors for the treatment of azoles-resistant *Candida albicans* [J]. Eur J Med Chem, 2022, 227: 113961.
- [8] Li Z, Tu J, Han GY, et al. Novel carboline fungal histone deacetylase (HDAC) inhibitors for combinational treatment of azole resistant *Candidiasis* [J]. J Med Chem, 2021, 64 (2): 1116-1126.
- [9] Garnaud C, Champeboux M, Maubon D. Histone deacetylase and their inhibition in *candida* species [J]. Front Microbiol, 2016, 7: 1238.
- [10] Lu Y, Su C, Wang A, et al. Hyphal development in *Candida albicans* requires two temporally linked changes in promoter chromatin for initiation and maintenance [J]. PLoS Biol, 2011,



- 9 (7): e1001105.
- [11] Nobile CJ, Fox EP, Hartooni N. A histone deacetylase complex mediates biofilm dispersal and drug resistance in *Candida albicans* [J]. mBio, 2014, 5 (3): e01201-1214.
  - [12] Srikantha T, Tsai L, Daniels K, et al. The histone deacetylase genes HDA1 and RPD3 play distinct roles in regulation of high-frequency phenotypic switching in *Candida albicans* [J]. Bacteriol, 2001, 183: 4614-4625.
  - [13] Zacchi LF, Schulz WL, Davis DA. HOS2 and HDA1 encode histone deacetylases with opposing roles in *Candida albicans* morphogenesis [J]. PLoS One, 2010, 5 (8): e12171.
  - [14] Karthikeyan G, Paul-Satyaseela M, Dhatchana N, et al. Functional characterization of *Candida albicans* Hos2 histone deacetylase [J]. F1000Research, 2013, 2: 238.
  - [15] Kim J, Lee JE, Lee JS. Histone deacetylase-mediated morphological transition in *Candida albicans* [J]. J Microbiol, 2015, 53 (12): 805-811.
  - [16] Pérez-Martín J, Uriá JA, Johnson AD. Phenotypic switching in *Candida albicans* is controlled by a *SIR2* gene [J]. EMBO J, 1999, 18 (9): 2580-2592.
  - [17] Zhao G, Rusche LN. Genetic analysis of sirtuin deacetylases in hyphal growth of *Candida albicans* [J]. mSphere, 2021, 6 (3): e00053-21.
  - [18] Hnisz D, Bardet AF, Nobile CJ, et al. A histone deacetylase adjusts transcription kinetics at coding sequences during *Candida albicans* morphogenesis [J]. PLoS genetics, 2012, 8: e1003118.
  - [19] Rupert CB, Heltzel JM, Taylor DJ, et al. Sporadic gene loss after duplication is associated with functional divergence of sirtuin deacetylases among *Candida* yeast species [J]. G3 (Bethesda), 2016, 6 (10): 3297-3305.
  - [20] Ghugari R, Tsao S, Schmidt M, et al. Mechanisms to reduce the cytotoxicity of pharmacological nicotinamide concentrations in the pathogenic fungus *Candida albicans* [J]. FEBS J, 2021, 288 (11): 3478-3506.
  - [21] Reyes AA, Fishbain S, He Y. Structural and functional analysis of the Set3 histone deacetylase complex [J]. Acta Crystallogr F Struct Biol Commun, 2022, 78 (Pt 3): 113-118.
  - [22] Kim T, Xu Z, Clauder-Münster S, et al. Set3 HDAC mediates effects of overlapping noncoding transcription on gene induction kinetics [J]. Cell, 2012, 150 (6): 1158-1169.
  - [23] Wang A, Kurdistan SK, Grunstein M. Requirement of Hos2 histone deacetylase for gene activity in yeast [J]. Science, 2002, 298 (5597): 1412-1414.
  - [24] Kim T, Buratowski S. Dimethylation of H3K4 by Set1 recruits the Set3 histone deacetylase complex to 5' transcribed regions [J]. Cell, 2009, 137 (2): 259-272.
  - [25] Hang M, Smith MM. Genetic analysis implicates the Set3/Hos2 histone deacetylase in the deposition and remodeling of nucleosomes containing H2A.Z [J]. Genetics, 2011, 187 (4): 1053-1066.
  - [26] Harrison MC, LaBella AL, Hittinger CT, et al. The evolution of the GALactose utilization pathway in budding yeasts [J]. Trends Genet, 2022, 38 (1): 97-106.
  - [27] Leng H, Liu SF, Lei Y, et al. FACT interacts with Set3 HDAC and fine-tunes *GAL1* transcription in response to environmental stimulation [J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49 (10): 5502-5519.
  - [28] Parvizi-Omran R, Ramírez-Zavala B, Aji-Tebung W, et al. The zinc cluster transcription factor Rha1 is a positive filamentation regulator in *Candida albicans* [J]. Genetics, 2022, 220 (1): iyab155.
  - [29] Lee JE, Oh JH, Ku M, et al. Ssn6 has dual roles in *Candida albicans* filament development through the interaction with Rpd31 [J]. FEBS Lett, 2015, 589 (4): 513-520.
  - [30] Antinori S, Milazzo L, Sollima S. Candidemia and invasive candidiasis in adults: a narrative review [J]. Eur J Intern Med, 2016, 34: 21-28.
  - [31] Tao L, Du H, Guan GB, et al. Discovery of a "white-gray-opaque" tristable phenotypic switching system in *Candida albicans*: roles of non-genetic diversity in host adaptation [J]. PLoS Biol, 2014, 12 (4): e1001830.
  - [32] Yang J, Feng WL, Xi ZQ. Virulence of "white-gray-opaque" tri-stable transformation in clinical *Candida albicans* in vitro and in vivo [J]. Microb Pathog, 2021, 154: 104825.
  - [33] Hernday AD, Lohse MB, Fordyce PM, et al. Structure of the transcriptional network controlling white-opaque switching in *Candida albicans* [J]. Mol Microbiol, 2013, 90 (1): 22-35.
  - [34] Xie J, Jenull S, Tscherner M, et al. The paralogous histone deacetylases Rpd3 and Rpd31 play opposing roles in regulating the white-opaque switch in the fungal pathogen *Candida albicans* [J]. mBio, 2016, 7 (6): e01807-e01816.
  - [35] Taff HT, Mitchell KF, Edward JA, et al. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance [J]. Future Microbiol, 2013, 8 (10): 1325-1337.
  - [36] Borghi E, Borgo F, Morace G. Fungal Biofilms: update on resistance [J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 931: 37-47.
  - [37] Uppuluri P, Acosta Zaldívar M, Anderson MZ, et al. *Candida albicans* dispersed cells are developmentally distinct from biofilm and planktonic cells [J]. mBio, 2018, 9 (4): e01338-18.
  - [38] Fourie R, Albertyn J, Sebolai O, et al. *Candida albicans* SET3 plays a role in early biofilm formation, interaction with *Pseudomonas aeruginosa* and virulence in *Caenorhabditis elegans* [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 680732.
  - [39] Ni Y, Qiao Y, Tian X, et al. Unraveling the mechanism of thermotolerance by Set302 in *Cryptococcus neoformans* [J]. Microbiol Spectr, 2024, 12 (8): e0420223.
  - [40] Gong C, Xu DY, Sun DY, et al. FgSnt1 of the Set3 HDAC complex plays a key role in mediating the regulation of histone acetylation by the cAMP-PKA pathway in *Fusarium graminearum* [J]. PLoS Genet, 2022, 18 (12): e1010510.
  - [41] Zhou H, Liu Q, Shi TF, et al. Genome-wide screen of fission yeast mutants for sensitivity to 6-azauracil, an inhibitor of transcriptional elongation [J]. Yeast, 2015, 32 (10): 643-655.

(收稿日期: 2025-02-21; 修回日期: 2025-04-21)



# 瑞美吉泮在神经性疼痛疾病中的药理作用研究进展

王珊珊, 章超凡, 范超云, 俞苏纯, 唐琦, 丁林仙, 刘红梅, 彭丽霞\* (上海市杨浦区市东医院 (上海理工大学附属市东医院), 上海 200438)

**摘要:** 瑞美吉泮是一种新型的降钙素基因相关肽 (CGRP) 受体拮抗剂, 能够有效缓解偏头痛症状, 同时具有较好的耐受性和安全性, 已被广泛应用于偏头痛的急性治疗。本文综述了瑞美吉泮在偏头痛、丛集性头痛、三叉神经痛等疼痛疾病中的药理作用及安全性, 旨在为瑞美吉泮的进一步研究和临床应用提供参考。

**关键词:** 瑞美吉泮; 降钙素基因相关肽; 偏头痛; 丛集性头痛; 三叉神经痛

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)06-1771-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.040

## Progress in the pharmacological effect of rimegepant on pain disorders

WANG Shan-shan, ZHANG Yue-fan, FAN Chao-yun, YU Su-chun, TANG Qi, DING Lin-xian, LIU Hong-mei, PENG Li-xia\* (Shidong Hospital, YangPu District, Shidong Hospital Affiliated to University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200438)

**Abstract:** Rimegepant is a novel calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptor antagonist. By inhibiting CGRP receptors, rimegepant effectively relieves the main symptoms of migraine. With good tolerability and safety, it is widely used for acute migraine. This article reviewed the pharmacological effect and drug safety of rimegepant on pains such as migraines, cluster headache, and trigeminal neuralgia to provide a reference for its further research and clinical application.

**Key words:** rimegepant; calcitonin gene-related peptide; migraine; cluster headache; trigeminal neuralgia

降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP) 是一种由 37 个氨基酸组成的具有广泛生理作用的神经肽。CGRP 通过与 CGRP 受体结合发挥扩张血管、降低血管内压力、调节痛觉信号的传导、参与炎症反应的调控、调节胃肠道的运动及分泌功能等作用<sup>[1]</sup>。

研究发现, CGRP 水平异常或受体功能异常与偏头痛密切相关。第一代 CGRP 受体拮抗剂, 被用于研究 CGRP 受体阻断在偏头痛中的作用, 然而, 由于其较差的口服生物利用度和不良的药代动力学特性, 未能进一步开发为药品。瑞美吉泮是第二代 CGRP 受体拮抗剂, 是全球首个且唯一在欧洲和美国获批偏头痛急性期治疗和预防性治疗双重适应证的药物<sup>[2]</sup>。2024 年 1 月, 国家药品监督管理局 (NMPA) 批准瑞美吉泮上市, 用于偏头痛的治疗。

除了在偏头痛治疗中展现了显著的疗效外, 瑞美吉泮还在丛集性头痛、三叉神经痛等多种疼

痛疾病中表现出潜在的治疗价值。虽然目前大部分研究仍处于早期阶段, 但其应用前景仍值得期待。随着研究的深入, 瑞美吉泮可能在这些领域拓展其临床应用, 造福更多患者。

本文将综述瑞美吉泮在疼痛疾病中的药理作用及研究进展, 为其临床应用及研究提供参考。

### 1 瑞美吉泮简介

#### 1.1 瑞美吉泮的化学结构

瑞美吉泮是一种小分子化合物, 其化学名称为 [(5S, 6S, 9R)-5-氨基-6-(2, 3-二氟苯基)-6, 7, 8, 9-四氢-5H-环庚烯并[b]吡啶-9-基]-4-(2-氧代-3H-咪唑并[4, 5-b]吡啶-1-基)哌啶-1-甲酸酯, 分子式为 C<sub>28</sub>H<sub>28</sub>F<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>, 相对分子质量约为 534.6。

#### 1.2 瑞美吉泮的作用机制

瑞美吉泮主要通过与其 CGRP 受体结合, 阻断 CGRP 与受体的相互作用, 抑制其所介导的

作者简介: 王珊珊, 女, 主要从事药物临床研究及护理研究, email: jessica19910802@163.com \* 通信作者: 彭丽霞, 女, 主管护师, 主要从事药物临床研究及护理研究, email: 39751148@qq.com

cAMP 信号传导途径, 从而抑制 CGRP 介导的生理效应<sup>[3]</sup>。瑞美吉泮的药效团为二氢喹唑啉酮衍生物, 与 CGRP 受体的结合力弱于同类的奥塞吉泮 (olcegepant) 和乌布罗吉泮 (ubrogepant)<sup>[4]</sup>。

## 2 瑞美吉泮在疼痛疾病中的药理作用

### 2.1 瑞美吉泮在偏头痛中的药理作用

偏头痛是一种常见的慢性、复发性神经血管性疾病, 其特征是反复发作的剧烈头痛。瑞美吉泮以 CGRP 为靶标, 通过抑制脑动脉收缩从而缓解偏头痛症状<sup>[5]</sup>。

瑞美吉泮在多个临床试验中展现了显著的疗效。对于中度或重度的偏头痛单次发作, 瑞美吉泮具有显著的疗效。在一项多中心的Ⅲ期临床试验中, 偏头痛患者接受瑞美吉泮 (75 mg 口腔崩解片) 或安慰剂用药 2 h, 瑞美吉泮口腔崩解片在消除疼痛方面优于安慰剂, 并且能消除相关的症状 (如恶心、畏光、畏声)<sup>[6]</sup>。在针对中国和韩国患者的临床研究中, 单剂量口服 75 mg 的瑞美吉泮 2 h 后, 也可缓解偏头痛的疼痛症状, 并且在减少偏头痛相关症状 (如恶心、畏光、畏声) 方面也表现出优异的疗效<sup>[7]</sup>。进一步研究表明, 瑞美吉泮不仅能迅速缓解症状, 还具有持续的效果, 部分患者在给药后 48 h 内保持无痛状态<sup>[6, 8]</sup>。

在真实世界研究中, 使用瑞美吉泮治疗急性偏头痛与减少使用阿片类药物之间存在相关性。使用瑞美吉泮治疗后, 患者平均每月的吗啡剂量减少了 3.17%, 平均每月阿片类药物处方量减少了 16.11%。此外, 40.1% 的患者在开始使用瑞美吉泮后停止使用阿片类药物<sup>[9]</sup>。

虽然瑞美吉泮主要用于急性偏头痛的治疗, 但其在偏头痛预防中的应用潜力也正在被研究。这些研究旨在确定瑞美吉泮是否能够作为一种预防性治疗药物, 减少偏头痛的发作次数, 并改善患者的整体生活质量。临床试验显示, 当每隔一日服用一次瑞美吉泮以预防性治疗偏头痛 52 周后, 月平均偏头痛发作天数从基线时的 10.9 d 减少到第 52 周时的 8.9 d, 中度或重度月平均偏头痛发作天数减少超过 50% 的患者比例从第 1~4 周的 63.6% 提升到第 49~52 周的 80.9%, 月平均偏头痛发作天数减少超过 75% 的患者比例从第 1~4 周的 44.1% 增加到第 49~52 周的 65.8%, 月平均偏头痛发作天数减少超过 100% 的患者比例从第 1~4 周的 25.6% 增加到第 49~52 周的 49.3%<sup>[10]</sup>, 使用瑞美吉泮预防性治疗也改善了患者的生活质量并减少偏头痛相关残疾<sup>[11-12]</sup>。

### 2.2 瑞美吉泮在丛集性头痛中的药理作用

丛集性头痛是一种少见但极为剧烈的原发性头痛, 其发作特征为一侧眼周或颞部的剧烈疼痛, 常伴随眼泪、鼻塞、瞳孔缩小等自主神经症状。丛集性头痛与 CGRP 的释放密切相关, 在急性丛集性头痛中, CGRP 水平明显升高, 并且 CGRP 水平的升高可引发患者的丛集性头痛发作<sup>[13]</sup>。

因此, 瑞美吉泮被认为可能在丛集性头痛的治疗中具有疗效。目前, 针对瑞美吉泮治疗丛集性头痛的研究尚处于早期阶段。一些临床前研究和小规模临床试验正在评估其疗效和安全性。初步结果显示, 瑞美吉泮能够有效缓解丛集性头痛的急性发作, 并且耐受性良好<sup>[14]</sup>。然而, 仍需更大规模的随机对照试验来进一步验证其在该病治疗中的作用。

### 2.3 瑞美吉泮在三叉神经痛中的药理作用

三叉神经痛是一种剧烈的面部疼痛, 通常由三叉神经的异常活动引发。虽然其确切的病理机制尚不完全明确, 但 CGRP 在三叉神经系统中的表达提示其可能在三叉神经痛的发作中扮演角色。一些动物实验显示, 瑞美吉泮能够减少三叉神经相关的疼痛反应, 提示其在三叉神经痛治疗中的潜力<sup>[15]</sup>。不过, 瑞美吉泮用于三叉神经痛治疗的临床试验正在进行, 需要进一步的临床数据来确定其在这一适应证中的疗效和安全性<sup>[2]</sup>。

## 3 瑞美吉泮的安全性

瑞美吉泮的临床试验数据显示, 瑞美吉泮的长期安全性和耐受性较好, 不良反应大多数为轻度至中度, 不需要特殊处理, 其不良反应发生率与安慰剂组相似。常见的不良反应有恶心、嗜睡、眩晕、尿路感染、上呼吸道感染、上腹痛等, 通常不严重且可自我缓解, 未发现药物诱导的肝损伤信号<sup>[16-18]</sup>。

与传统的曲坦类药物不同, 瑞美吉泮通过 CGRP 受体拮抗作用而非血管收缩作用缓解偏头痛, 因此其在心血管中较好的安全性成为一大优势。临床研究未发现使用瑞美吉泮会引起心电图的改变<sup>[19]</sup>。然而, 有研究人员在动物试验中观察到阻断 CGRP 途径剂可能会加剧脑缺血损伤<sup>[20]</sup>。因此, 必须更好地界定瑞美吉泮的脑血管安全性, 特别是在高缺血事件风险的患者中。

瑞美吉泮主要通过肝脏代谢, 少部分经肾脏排泄。因此, 针对肝肾功能不全患者的安全性研究也非常重要。研究显示, 轻至中度肝功能不全的患者无需调整瑞美吉泮的剂量, 但对于重度肝功能不全患者, 需谨慎使用, 并建议在医师的监控下进行治疗。

瑞美吉泮在妊娠期和哺乳期的安全性尚缺乏充足的临床数据支持。建议在妊娠和哺乳期间慎用瑞美吉泮, 仅在明确的益处大于风险时方可使用。

#### 4 展望

随着对 CGRP 在多种疾病病理机制中作用的深入了解, 瑞美吉泮的应用范围有望进一步扩大。目前, 除了在偏头痛治疗中的应用外, 瑞美吉泮在丛集性头痛、三叉神经痛等其他神经性疼痛疾病中的潜在疗效已引起了广泛关注。未来的临床研究可能揭示出瑞美吉泮在这些领域中的有效性, 并推动其成为多种难治性头痛的标准治疗方案之一。此外, CGRP 在神经性炎症和某些神经退行性疾病中的作用也逐渐被认识。瑞美吉泮在这些领域中的研究可能为其开辟新的治疗途径, 特别是在神经性炎症、纤维肌痛等与慢性疼痛相关的疾病中, 其作用机制可能带来新的治疗选择。

随着精准医学的进展, 个体化治疗成为未来药物应用的重要趋势。基因组学研究有望揭示 CGRP 信号通路在不同患者群体中的差异。这将有助于识别哪些患者最适合使用瑞美吉泮, 并通过基因检测或其他生物标志物指导个体化的用药选择。未来可能通过对 CGRP 通路的更深入研究, 开发出个性化的治疗方案, 例如与其他靶向疗法联合使用, 或在特定的患者群体中调整药物剂量, 以优化治疗效果。

#### 参考文献

- [1] Bedrin K, Shah T, Vaidya S, et al. CGRP modulating therapies: an update [J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2024, 24 (9): 453-459.
- [2] Scott LJ. Rimegepant: first approval [J]. *Drugs*, 2020, 80 (7): 741-746.
- [3] Bhakta M, Vuong T, Taura T, et al. Migraine therapeutics differentially modulate the CGRP pathway [J]. *Cephalalgia*, 2021, 41 (5): 499-514.
- [4] Leung L, Liao S, Wu C. To probe the binding interactions between two FDA approved migraine drugs (Ubrogepant and Rimegepant) and calcitonin-gene related peptide receptor (CGRPR) using molecular dynamics simulations [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2021, 12 (14): 2629-2642.
- [5] 王壮, 王天晓, 张锐, 等. 降钙素基因相关肽受体拮抗剂治疗偏头痛急性期的进展 [J]. *中国新药杂志*, 2024, 33 (16): 1676-1680.
- [6] Croop R, Goadsby PJ, Stock DA, et al. Efficacy, safety, and tolerability of rimegepant orally disintegrating tablet for the acute treatment of migraine: a randomised, phase 3, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Lancet*, 2019, 394 (10200): 737-745.
- [7] Yu S, Kim BK, Guo A, et al. Safety and efficacy of rimegepant orally disintegrating tablet for the acute treatment of migraine in China and South Korea: a phase 3, double-blind, randomised, placebo-controlled trial [J]. *Lancet Neurol*, 2023, 22 (6): 476-484.
- [8] Yu SY, Guo AH, Wang Z, et al. Rimegepant orally disintegrating tablet 75 mg for acute treatment of migraine in adults from China: a subgroup analysis of a double-blind, randomized, placebo-controlled, phase 3 clinical trial [J]. *J Headache Pain*, 2024, 25 (1): 57.
- [9] Mohajer A, Scripture J, Harris L, et al. Decreased opioid use in migraine patients following rimegepant initiation: a real-world analysis [J]. *Value Health*, 2022, 25 (Suppl. 1): S134.
- [10] Ailani J, Kudrow D, Smith TR, et al. Effects of rimegepant 75 mg on monthly migraine days: a 52-week, open-label extension study [J]. *Headache*, 2022, 62 (Suppl. 1): 139-140.
- [11] Johnston KM, L' Italien G, Popoff E, et al. Mapping migraine-specific quality of life to health state utilities in patients receiving rimegepant [J]. *Adv Ther*, 2021, 38 (10): 5209-5220.
- [12] Lipton RB, McAllister P, Turner IM, et al. Effect of long-term preventive treatment with oral rimegepant 75 mg on migraine-related disability: a 52-week, open-label extension study [J]. *Headache*, 2022, 62 (Suppl. 1): 136-137.
- [13] Vollesen ALH, Snoer A, Beske RP, et al. Effect of infusion of calcitonin gene-related peptide on cluster headache attacks: a randomized clinical trial [J]. *JAMA Neurol*, 2018, 75: 1187-1197.
- [14] Goadsby PJ. Primary headache disorders: five new things [J]. *Neurol Clin Pract*, 2019, 9 (3): 233-240.
- [15] Negro A, Martelletti P. Rimegepant for the treatment of migraine [J]. *Drugs Today (Barc)*, 2020, 56 (12): 769-780.
- [16] 郭丽萍, 杨健, 赵拯. 基于真实世界数据的 CGRP 靶向药物不良事件的对比分析 [J]. *实用药物与临床*, 2024, 27 (5): 326-332.
- [17] Polavieja P, Belger M, Venkata SK, et al. Relative efficacy of lasmiditan versus rimegepant and ubrogepant as acute treatments for migraine: network meta-analysis findings [J]. *J Headache Pain*, 2022, 23 (1): 76.
- [18] Croop R, Berman G, Kudrow D, et al. A multicenter, open-label long-term safety study of rimegepant for the acute treatment of migraine [J]. *Cephalalgia*, 2024, 44 (4): 3331024241232944.
- [19] Bhardwaj R, Hanna MS, Morris BA, et al. No clinically relevant electrocardiogram effects in a randomized TQT study of single therapeutic/supratherapeutic rimegepant doses in healthy adults [J]. *Clin Transl Sci*, 2024, 17 (3): e13727.
- [20] Mulder IA, Li M, Vries T, et al. Anti-migraine calcitonin gene-related peptide receptor antagonists worsen cerebral ischemic outcome in mice [J]. *Ann Neurol*, 2020, 88 (4): 771-784.

(收稿日期: 2024-11-01; 修回日期: 2024-12-02)



# 纳米技术在体外膜氧合抗凝管理中的应用

周培根, 欧好 (中南大学湘雅三医院重症医学科, 长沙 410013)

**摘要:** 体外膜氧合作为重症监护中重要的心肺支持技术, 在临床应用中存在血栓形成与出血风险之间的微妙平衡。纳米技术的引入为体外膜氧合抗凝策略的优化提供了显著潜力, 有望提升其安全性和治疗效果。本文重点探讨了纳米材料 (包括纳米颗粒、纳米球体与纳米纤维等) 在抗凝治疗中的应用。纳米技术通过药物递送和表面修饰, 不仅增强了抗凝效果, 还能有效降低并发症风险, 为实现更为精准的抗凝提供了解决方案, 可在降低出血风险的同时改善患者预后。

**关键词:** 体外膜氧合; 抗凝策略; 纳米技术; 出血风险

中图分类号: R459.7

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)06-1774-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.041

## Nanotechnology in extracorporeal membrane oxygenation anticoagulants

ZHOU Pei-gen, OU Hao (Department of Critical Care Medicine, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013)

**Abstract:** Extracorporeal membrane oxygenation is a crucial cardiopulmonary support in intensive care, but it faces a delicate balance between the risks of thrombosis and bleeding. The introduction of nanotechnology offers great potential in optimizing extracorporeal membrane oxygenation anticoagulation strategies, the promise of enhancing both safety and therapeutic efficacy. This paper focuses on the application of nanotechnological materials (including nanoparticles, nanospheres, and nanofibers) in anticoagulation therapy. Through drug delivery and surface modification, these materials not only improved anticoagulation effects but also reduced the occurrence of complications. Nanotechnology provides a more precise anticoagulation solution for extracorporeal membrane oxygenation, which can lower bleeding risks while improving patient prognosis.

**Key words:** extracorporeal membrane oxygenation; anticoagulation strategy; nanotechnology; bleeding risk

体外膜氧合 (extracorporeal membrane oxygenation, ECMO) 是一项广泛应用于重症监护中的生命支持技术<sup>[1]</sup>, 为心肺功能严重受损的患者提供支持。在急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)、严重肺炎及心搏骤停等情况下, ECMO 通过外部回路中的人工肺 (氧合器) 促进气体交换和循环支持。作为连接康复或进一步治疗 (如移植手术或心室辅助装置) 的桥梁, ECMO 显著提高了危重患者的生存率, 已成为现代重症监护病房中的重要工具。然而, 在 ECMO 治疗过程中, 血液与合成材料表面的持续接触可导致血栓形成, 使得抗凝管理成为一项复杂且至关重要的任务。

目前, ECMO 治疗过程中的抗凝管理面临着

防止血栓形成与避免出血并发症之间的狭窄治疗窗<sup>[2]</sup>。常用的抗凝剂 (如肝素) 尽管有效, 但由于个体差异及潜在不良反应, 仍需频繁监测和调整剂量。即使在精细监测下, 出血与血栓形成仍时有发生。出血发生在手术部位、插管或体内, 导致较高的发生率和死亡率; 而抗凝不足则增加了栓塞及系统功能障碍的风险。因此, 临床上常通过激活凝血时间 (ACT)、活化部分凝血活酶时间 (APTT) 或抗 Xa 因子水平等实验室检查来评估抗凝效果, 但这些方法烦琐且资源消耗大。此外, 患者既有的凝血障碍或多种合并症也增加了抗凝管理的复杂性, 凸显了开发更精准、安全的治疗策略的迫切需求。

**基金项目:** 湖南省自然科学基金项目 (No. 2024JJ9099)。

**作者简介:** 周培根, 男, 硕士, 主要从事 ICU 临床工作, email: bacon911@126.com \* **通信作者:** 欧好, 男, 副主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事脓毒症、ECMO 基础及临床研究, email: 7915892@qq.com

纳米技术作为一种在原子和分子尺度上操控材料的前沿技术,已展现出其在医学领域的巨大潜力<sup>[3]</sup>。纳米材料因其小尺寸和高表面积的特性,在药物递送、药物开发和医疗设备功能改进方面提供了新的解决方案。特别是在 ECMO 的抗凝管理中,纳米技术有望取得突破性进展。通过设计纳米材料作为抗凝物载体或修改 ECMO 回路表面特性,可实现抗凝效果的精准调控。这种策略不仅可最小化抗凝剂的全身暴露,降低出血风险,还能显著提升 ECMO 组件的血液相容性。此外,纳米技术还可以实现对凝血路径的精确调节,并开发出能够根据实时生理条件调整抗凝效果的响应系统,进一步优化抗凝管理,改善患者治疗效果。

总之,将纳米技术整合到 ECMO 抗凝策略中,不仅能解决当前治疗中的局限性,还可能在重症监护环境中彻底变革凝血管理方法。随着研究的深入与技术的创新,纳米技术在 ECMO 治疗中的应用前景广阔,有望显著提升 ECMO 治疗的有效性和安全性。

## 1 纳米技术在抗凝中的应用

### 1.1 医学中使用的纳米材料类型

纳米技术通过在纳米尺度上的精准操控,成功研发出具有独特性能的创新材料,这些材料广泛应用于药物递送系统及治疗剂的开发。在医学领域,纳米颗粒和纳米纤维是最常用的关键纳米材料<sup>[4]</sup>。纳米颗粒,包括纳米球体,因其能够高效包裹和保护药物,已被广泛应用于医学领域。纳米颗粒的尺寸通常在 1 ~ 100 nm,可以由金属、脂质和聚合物等材料制成。在抗凝应用中,高表面积和体积比使其可实现高效药物负载和可控释放。尤其是金纳米颗粒,因其具有优良的生物相容性和易于功能化的特性,是抗凝药物的理想载体<sup>[5]</sup>。

纳米球体作为纳米颗粒的一种,具有球形结构,能够有效包裹药物并提供保护,避免药物降解,同时实现持续释放。采用聚乳酸(PLA)或聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)等生物降解聚合物制成的纳米球体,在特定环境因素(如 pH 值或酶活性)刺激下可精确释放抗凝药物,从而提高治疗效果和精准性<sup>[6]</sup>。

纳米纤维是一类直径在 1 ~ 100 nm 的纤维材料,可通过电纺等方法制备。纳米纤维可形成垫状或涂层结构,提供极高的表面积,可通过功能化修饰赋予其抗凝特性<sup>[7]</sup>。在 ECMO 回路中应用时,纳米纤维涂层可有效防止蛋白质和血小板黏附,从而减少血栓形成,显著降低凝血风险<sup>[8]</sup>。纳米材料之所以在抗凝剂领域展现出巨大的潜力,主要得益于其可实现药物的局部化及精准递送,同时通过表面特性的调节显著改善血液

相容性,并能与生物系统实现高度可控的相互作用。这些特性为设计兼具高效性与安全性的抗凝策略提供了可能性,从而有效克服了传统抗凝剂的局限性。具体而言,纳米材料的高表面积与体积比使其可实现高效的药物负载与释放,而其响应性设计(如 pH 或温度响应)则能进一步提升治疗的精准性和安全性。此外,纳米材料在 ECMO 等医疗设备中的涂层应用,可以显著降低血栓形成风险,为复杂临床场景下的抗凝管理提供创新解决方案。

### 1.2 纳米材料抗凝作用机制

纳米材料通过多种机制增强抗凝效果。其中最主要的机制是靶向药物传递<sup>[9]</sup>。纳米颗粒通常通过静脉注射的方式给药,可以直接携带抗凝剂到达作用部位,最小化系统暴露并降低出血风险。通过与靶向配体功能化,这些颗粒可以识别特定标记,确保精确传递。

另一种机制是 ECMO 回路表面的修饰。ECMO 回路的表面修饰通常使用聚乙二醇(PEG)或肝素等材料。PEG 通过形成亲水屏障来减少蛋白质和血小板黏附,而肝素则通过其抗凝特性直接抑制凝血级联反应。此外,含有磺酸基团或羧基的聚合物也被广泛应用,它们通过提供负电荷屏障从而减少血液成分的黏附。纳米涂层的应用不仅减少了蛋白质和血小板黏附,还能实现抗凝剂的局部可控释放,显著提升抗凝效果和治疗安全性<sup>[10]</sup>。

此外,纳米材料可以直接与血液成分相互作用以调节凝血途径。通过设计抑制凝血中关键酶(如凝血酶)或关键路径的纳米颗粒,可以实现更为精准和高效的抗凝调控。

上述机制的协同作用不仅显著优化了纳米材料在抗凝治疗中的性能和安全性,还为改善 ECMO 治疗中的患者预后提供了重要支持。通过靶向传递、ECMO 回路表面修饰及凝血路径调节,纳米技术为降低血栓形成风险和减少出血并发症开辟了新的治疗途径。

### 1.3 纳米技术创新

#### 1.3.1 药物递送

设计纳米载体(如 PLGA 纳米颗粒)作为抗凝剂的递送平台,能够实现药物的靶向释放和控释,使其在抗凝药物递送中展现重要的创新价值<sup>[11]</sup>。在众多纳米载体中,脂质体、胶束和树状大分子因其独特的结构特性和多维功能性而备受关注。

脂质体是由磷脂双层构成的球形囊泡,能够同时封装亲水性和疏水性药物。其磷脂双层结构与细胞膜高度相似,可通过膜融合机制将药物直接递送至细胞内。此外,脂质体表面可通过修饰



靶向配体[如肝素、RGD肽(精氨酸、甘氨酸、天冬氨酸组成的短肽序列)或针对凝血因子活化的抗体分子],实现对特定组织或细胞的精准递送。例如,在ECMO抗凝治疗中,通过特异性配体修饰,脂质体可靶向递送抗凝剂至受损或活化的内皮细胞,显著提高治疗效果的同时最小化系统性暴露风险。这种精准靶向策略结合其优异的生物相容性,使脂质体成为抗凝剂递送的理想载体<sup>[12]</sup>。

胶束是由两亲性分子自组装形成的纳米载体,具有典型的核壳结构:疏水性内核可包裹疏水性药物,而亲水性外壳则增强其在水环境中的溶解度和稳定性。胶束通常通过静脉注射给药,其疏水性核心能够稳定地递送疏水性药物。通过表面修饰,胶束可实现主动靶向特定细胞或组织,从而提高药物局部浓度并降低全身毒性。此外,胶束可设计为响应pH值变化或酶活性等生理触发因素释放药物,提供一种可控释放机制,从而显著提高抗凝药物的治疗指数<sup>[13]</sup>。

树状大分子是一类具有高度分支结构的聚合物,其尺寸、形状和表面功能可精确调控。这种结构的精准性使其能够同时连接多种功能基团,实现抗凝药物与靶向配体的共递送。树状大分子通常通过静脉注射给药,其多功能末端基团可高效负载药物或靶向配体,从而实现特定部位的靶向递送。其独特结构促进了药物与生物靶标的多价相互作用,

显著提高了结合特异性和治疗效果。例如,在抗凝治疗中,树状大分子可通过靶向递送抗凝剂,增强局部疗效并减少全身性不良反应<sup>[14]</sup>。这些纳米载体通过控制释放机制和靶向策略,能够提供持久且局部化的药物递送,从而减少给药频率并提高患者的依从性。例如,在ECMO系统中,脂质体通过表面修饰靶向配体(如肝素或RGD肽)可将抗凝药物精准递送至活化内皮细胞,显著减少血栓形成并降低全身性不良反应<sup>[12]</sup>;胶束则通过响应局部pH或酶活性变化,在特定部位释放药物,进一步提高治疗的靶向性和安全性<sup>[13]</sup>;树状大分子则利用其高度分支结构和多价结合能力,将抗凝剂与靶向配体共递送,在ECMO回路中实现高效且精准的抗凝效果<sup>[14]</sup>。这些策略不仅确保了抗凝效果集中在需要的地方,还最大程度地减少了系统性暴露和不良反应。

**1.3.2 表面改性** 利用纳米技术对ECMO组件进行表面改性是一种极具前景的方法,旨在降低血栓形成性并提高生物相容性。在ECMO回路内表面应用纳米涂层,可以创造一个抗血小板黏附和蛋白质沉积的环境,从而最小化凝血级联反应的激活<sup>[15]</sup>。目前,用于ECMO组件改性的纳米材料包括PEG<sup>[16]</sup>、肝素及其他抗凝剂<sup>[17]</sup>,这些材料能够显著减少血栓形成并改善血液相容性。

纳米涂层的4种制备方法汇总见表1。

表1 纳米涂层的制备

Tab 1 Preparation of nanocoatings

| 方法                             | 原理                                 | 步骤                        |
|--------------------------------|------------------------------------|---------------------------|
| 自组装单分子层(SAMs)技术                | 分子通过化学键合在表面形成有序单分子层,头基团键合表面,尾基团功能化 | 清洁表面→浸入功能化分子溶液→控制条件,形成纳米层 |
| 层层自组装(layer-by-layer assembly) | 带相反电荷的聚电解质交替沉积,通过静电作用形成多层薄膜        | 交替浸入阳离子和阴离子溶液→每次冲洗→重复达到层数 |
| 旋涂法(spin coating)              | 高速旋转使溶液均匀分布,形成薄膜                   | 滴加溶液→高速旋转→调节条件控制厚度        |
| 电沉积法(electrodeposition)        | 电场驱动带电纳米颗粒沉积在导电基底上                 | 连接组件为阴极→施加电压沉积→调节参数控制厚度   |

纳米涂层固定在ECMO组件表面后,为血液接触面提供了一道屏障,有效减少与血液成分的相互作用,从而显著降低血栓形成的风险。通过自组装单分子层、层层自组装、旋涂法和电沉积法等方法,可以在ECMO组件表面形成均匀且功能化的纳米层,为抗血栓治疗提供了重要技术支持。

多项研究已验证了这种方法的有效性。例如,在ECMO回路上涂覆肝素功能化纳米颗粒的临床前和临床试验显示,该方法显著减少了凝块形成并提高了血液相容性<sup>[18]</sup>。此外,仿生内皮细胞层的纳米结构表面也被成功开发,这种仿生解决方案进一步减少了血栓形成,展现了纳米涂层技术在提高生物相容性方面的巨大潜力。

这些进展表明,表面改性技术在提高ECMO

治疗安全性和有效性方面具有广阔的应用前景。通过减少血栓形成,可降低对系统性抗凝的依赖,从而减少相关出血风险<sup>[19]</sup>。这种技术为改进ECMO治疗提供了新的方向,有望推动其在临床中的广泛应用,为患者带来更安全、更高效的治疗方案。

**1.3.3 智能纳米颗粒** 智能纳米颗粒<sup>[20]</sup>的发展代表了抗凝治疗领域的一项前沿技术,具有彻底改变抗凝剂管理与监测的潜力。某研究小组开发了一种基于pH敏感聚合物的纳米颗粒系统,该系统可在血栓形成的酸性环境中快速释放肝素,有效抑制局部凝血。Russell等<sup>[21]</sup>研究表明,这些纳米颗粒在正常生理pH下保持稳定,而在酸性条件下迅速响应,展现了其精准的药物递送能



力。Hiruta 等<sup>[22]</sup>研究表明以聚 *N*-异丙基丙烯酰胺 (PNIPAM) 为基础的温度响应性纳米颗粒, 用于抗凝药物的可控释放。该系统能够在微小的温度变化 (如局部炎症) 下调节药物释放速率, 实现对抗凝强度的动态调控。这些响应性纳米颗粒通过感知特定生理条件 (如血液凝固因子的变化、pH 值或温度) 作出反应, 从而实现抗凝水平的实时调整, 显著降低了血栓形成与出血的风险<sup>[23]</sup>。

此外, 智能纳米颗粒还可被设计为在凝血酶或其他凝血级联反应激活物存在时释放抗凝剂, 提供一种动态且自适应的抗凝策略。这种响应能确保抗凝剂在需要的时间与地点精确递送, 进一步提升了治疗效果与安全性。除了药物递送功能, 智能纳米颗粒还可集成诊断元素, 实现抗凝状态的实时监测。例如, Wang 等<sup>[24]</sup>开发了一种创新型的纳米光声传感器, 通过肝素/鱼精蛋白诱导的纳米粒子聚集调控光声信号, 实现了全血凝血时间 (CT) 的动态监测与肝素药物浓度检测 (灵敏度达  $0.05 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 为抗凝治疗提供了实时工具。Niu 等<sup>[25]</sup>开发的纤维蛋白原-金纳米颗粒复合比色传感器, 利用凝血酶催化交联反应触发纳米粒子聚集, 通过溶液显色变化实现凝血酶检测, 其线性范围在  $0.06 \sim 60 \text{ nm}$ , 检测限达  $0.02 \text{ nm}$ 。此外, 纳米材料与多模态技术 (如电化学、荧光) 的融合显著提升了纤维蛋白原的性能 (检测限可达  $\text{fg} \cdot \text{mL}^{-1}$  级), 进一步推动了纳米技术在 ECMO 抗凝中的应用<sup>[26]</sup>。未来, 通过微流控芯片与人工智能算法的结合, 有望实现凝血功能的多参数实时监测与个性化抗凝治疗指导, 构建一个基于反馈循环的动态优化系统, 显著提升治疗的安全性与有效性。

智能纳米颗粒在提供个性化与自适应抗凝治疗方面的潜力, 标志着该领域的重大进步, 特别是在 ECMO 等复杂治疗场景中, 为满足患者的特定需求提供了一种定制化方法<sup>[27]</sup>。

## 2 纳米技术在提升抗凝剂疗效中的潜力

纳米技术增强的抗凝剂在治疗效果上显著提升, 克服了传统抗凝方法的诸多局限性。其主要优势之一是通过较低的剂量实现更强的治疗效果。传统抗凝剂需要较高的剂量才能达到预期效果, 但高剂量可能增加出血风险, 而低剂量则可能导致管路凝血风险。相比之下, 纳米技术可将抗凝剂封装在纳米颗粒或纳米球体内, 从而更高效、精准地将药物递送至目标部位<sup>[28]</sup>。这种靶向传递不仅增强了治疗效果, 还降低了药物的整体剂量, 减少了全身性不良反应的风险。

另一个关键优势是靶向药物递送。通过特定配体或抗体功能化的纳米颗粒, 这些递送系统能

够精确定位并锁定 ECMO 回路中最需要抗凝的部位。靶向传递确保了抗凝效果局部化, 最大程度减少了全身暴露, 降低了系统性并发症的发生风险<sup>[29]</sup>, 从而提高了治疗的安全性。例如, 表面修饰有特定配体的靶向纳米颗粒能识别并结合目标受体。此外, 刺激响应型载体以及磁性或光敏性纳米材料的应用增强了靶向性, 确保抗凝剂仅在需要的部位释放, 从而最小化对全身循环的影响, 降低出血风险。在 ECMO 治疗中, 这一优势尤为重要, 因为它能够有效平衡防止血栓形成与出血风险。

纳米技术增强的抗凝剂还具有良好的生物相容性, 有助于减少免疫反应, 提高安全性。通过设计生物相容性纳米材料, 如 PEG 涂层, 可以避免免疫系统识别, 从而减少免疫介导的清除或过敏反应<sup>[30]</sup>。这种生物相容性确保了纳米技术增强的抗凝剂能安全地整合入体内, 避免引发显著的异物反应。

总之, 纳米技术增强的抗凝剂为提高抗凝治疗效果和安全性提供了广阔的应用前景。因其能够以较低剂量、减少系统性暴露的方式实现高疗效和高安全性, 这些特性将使其成为 ECMO 等重症监护环境中抗凝管理的革命性方法。

## 3 临床前和临床研究

### 3.1 临床前证据

当前大量动物研究已开展, 以评估基于纳米技术增强的抗凝剂及纳米涂层 ECMO 回路的性能。例如, 啮齿动物模型被用于测试脂质体包封抗凝剂的靶向递送与控释能力。这些研究结果表明, 纳米载体能够将抗凝效果集中于预定部位, 同时减少全身暴露。Haba 等<sup>[31]</sup>研究表明, 纳米载体的靶向药物递送在动物模型中显著降低了血栓形成率, 并最大程度地减少了出血并发症, 显示出在提升治疗效果与安全性方面的潜力。

在大型动物模型 (如猪和羊) 中, Zhang 等<sup>[32]</sup>研究纳米涂层在 ECMO 回路上的应用, 以评估其在临床相关条件下的性能。研究表明, 与未涂层回路相比, 涂覆肝素功能化纳米颗粒或 PEG 的 ECMO 回路能够显著降低血栓形成倾向。具体表现为血小板黏附与纤维蛋白沉积的明显减少, 这两者是血栓形成的关键因素。

这些临床前研究的关键发现凸显了纳米技术通过精准药物递送机制与生物相容性表面改良来革新抗凝管理方面的巨大潜力。然而, 研究也指出了一些亟待解决的挑战, 包括确保纳米载体的长期稳定性与生物利用度、解决某些纳米材料可能引发的免疫反应, 以及提升生产能力以满足临床需求。此外, 由于跨物种差异的存在, 在将动物模型的研究

结果应用于人类时需进行谨慎考量。

### 3.2 临床试验和人体研究

从临床前模型向人体试验的过渡是开发纳米技术增强的抗凝剂的关键步骤。临床试验与人体研究为这些创新疗法在 ECMO 或其他需要抗凝治疗的患者中的安全性、有效性及可行性提供了必要的数据支持。

目前,多项临床试验已启动,以评估基于纳米技术增强的抗凝剂及表面改性的 ECMO 回路在人体中的性能。这些研究不仅聚焦于评估其在预防血栓方面的效果,还仔细考虑了出血风险与生物相容性等安全性指标。以下是一些相关的临床试验与研究:

① 纳米颗粒递送系统的抗凝治疗试验:某些临床试验正在评估使用纳米颗粒作为抗凝剂递送系统的安全性与有效性。Başaran 等<sup>[33]</sup>研究了 PLGA 纳米颗粒递送肝素的方法,重点关注降低出血风险的同时维持抗凝效果。② 表面改性 ECMO 回路的研究:采用 PEG 或其他生物相容性聚合物涂层的 ECMO 回路的研究,可减少蛋白质吸附与血小板黏附。Zhang 等<sup>[34]</sup>研究表明,纳米涂层具有良好的体内和体外抗血栓作用,但仍需评估表面改性的 ECMO 回路在体内长期使用时的抗血栓性能及生物相容性。③ 智能纳米材料在 ECMO 中的应用: Bolla 等<sup>[35]</sup>研究智能纳米材料(如 pH 或温度响应性颗粒)在动态调节抗凝剂释放中的作用,致力于实时调节抗凝强度以最大化疗效与安全性。与接受传统全身抗凝治疗的患者相比,研究对象经历的血栓事件更少,且出血并发症发生率显著降低。Šoltés 等<sup>[36]</sup>研究使用纳米涂层的 ECMO 回路在减轻常规 ECMO 治疗中常见的炎症反应方面也展现出良好前景。

### 3.3 纳米材料在 ECMO 设备中的应用现状与挑战

尽管纳米技术在 ECMO 抗凝中展现出卓越性能,但目前 ECMO 设备中尚未广泛使用纳米材料。纳米材料在医疗设备中的应用仍处于研究与开发阶段,特别是对于 ECMO 这类关键且复杂的设备。限制纳米材料在医疗设备中应用的因素主要包括以下几点:

① 安全性与生物相容性:纳米材料的生物相容性及长期植入人体后的安全性尚未完全明确,可能会引发免疫反应、毒性或其他不良反应,需长期研究与临床试验数据验证;② 监管审批:纳米材料的使用需通过严格的监管审批[如美国食品药品监督管理局(FDA)或欧洲药品管理局(EMA)],通常需要大量科学数据证明其安全性与有效性;③ 生产与质量控制:纳米材料的规模化生产与质量控制存在技术挑战,确保每一批次材料性能一致对医疗器械的可靠性至关重要;④

成本与经济性:纳米材料的研发、生产与应用成本较高,可能影响其商业可行性;⑤ 伦理与公众接受度:由于纳米技术的潜在风险与不确定性,公众对其在医疗健康中的应用可能存在疑虑。

## 4 总结与展望

综上所述,本文重点探讨了纳米载体、纳米涂层与智能纳米颗粒药物递送系统在 ECMO 抗凝中的优势。未来,纳米传感器在 ECMO 抗凝的实时监测、生物活性纳米颗粒的应用,以及多功能纳米复合材料的开发,将进一步丰富纳米技术在这一领域的应用。尽管纳米技术已在 ECMO 抗凝中展现出卓越性能并获得了临床试验支持,但由于多种原因,其在 ECMO 设备中的广泛应用仍需克服诸多挑战。

未来需要开展更大规模的临床试验以验证初步发现,并进一步探索纳米技术增强的抗凝剂的长期影响。研究者正致力于将具备实时监测能力的智能纳米颗粒整合到临床实践中,以实现根据患者生理状况进行动态且个性化的治疗调整,从而优化抗凝治疗效果<sup>[37]</sup>。

总之,尽管从临床前证据到临床应用的转化过程复杂且需严格验证,但初步研究结果表明纳米技术在 ECMO 等高风险环境的抗凝管理中具有显著改进潜力。

## 参考文献

- [1] Bernhardt AM, Schrage B, Schroeder I, et al. Extracorporeal membrane oxygenation [J]. Dtsch Arztebl Int, 2022, 119 (13): 235-244.
- [2] Dager WE, Trujillo TC, Gilbert BW. Approaches to precision-based anticoagulation management in the critically ill [J]. Pharmacotherapy, 2023, 43 (11): 1221-1236.
- [3] Malik S, Muhammad K, Waheed Y. Emerging applications of nanotechnology in healthcare and medicine [J]. Molecules, 2023, 28 (18): 6624.
- [4] Elsherbini AM, Sabra SA. Nanoparticles-in-nanofibers composites: emphasis on some recent biomedical applications [J]. J Control Release, 2022, 348: 57-83.
- [5] Facchi PD, da Cruz AJ, Bonafe GE, et al. Polysaccharide-based materials associated with or coordinated to gold nanoparticles: synthesis and medical application [J]. Curr Med Chem, 2017, 24 (25): 2701-2735.
- [6] Su S, Kang PM. Systemic review of biodegradable nanomaterials in nanomedicine [J]. Nanomaterials (Basel), 2020, 10 (4): 656.
- [7] Khan RS, Rather AH, Wani TU, et al. Hemocompatibility of differently modified polymeric nanofibers: current progress in the biomedical industry [J]. Interact Nanomater Living Cells, 2023, 19 (5): 251-278.
- [8] Luu CH, Nguyen NT, Ta HT. Unravelling surface modification strategies for preventing medical device-induced thrombo-



- sis [J]. *Adv Healthc Mater*, 2024, 13 (1): 2301039.
- [9] Salavati M, Arabshomali A, Nouranian S, et al. Overview of venous thromboembolism and emerging therapeutic technologies based on nanocarriers-mediated drug delivery systems [J]. *Molecules*, 2024, 29 (20): 4883.
- [10] He T, Wang XY, Sun ZY, et al. Improvement hemocompatibility of antithrombotic PMP hollow fiber membranes based on the modification of zwitterionic polymer in ECMO application [J]. *J Membrane Sci*, 2024, 704: 122891.
- [11] Ramasundaram S, Saravanakumar G, Sobha S, et al. Dextran sulfate nanocarriers: design, strategies and biomedical applications [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 24 (1): 355.
- [12] Lombardo D, Kiselev MA. Methods of liposomes preparation: formation and control factors of versatile nanocarriers for biomedical and nanomedicine application [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14 (3): 543.
- [13] Mocanu G, Nichifor M, Sacarescu L. Dextran based polymeric micelles as carriers for delivery of hydrophobic drugs [J]. *Curr Drug Deliv*, 2017, 14 (3): 406-415.
- [14] Kesharwani P, Tekade RK, Gajbhiye V, et al. Cancer targeting potential of some ligand-anchored poly ( propylene imine ) dendrimers: a comparison [J]. *Nanomedicine*, 2011, 7 (3): 295-304.
- [15] Zhang M, Pauls JP, Bartnikowski N, et al. Anti-thrombogenic surface coatings for extracorporeal membrane oxygenation: a narrative review [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2021, 7 (9): 4402-4419.
- [16] Wang WP, Huang X, Yin HY, et al. Polyethylene glycol acrylate-grafted polysulphone membrane for artificial lungs: plasma modification and haemocompatibility improvement [J]. *Biomed Mater*, 2015, 10 (6): 065022.
- [17] Li MJ, Shi JY, Zhang JH. Bivalirudin vs. heparin in paediatric and adult patients on extracorporeal membrane oxygenation: a meta-analysis [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2022, 88 (6): 2605-2616.
- [18] He T, He JH, Wang ZH, et al. Modification strategies to improve the membrane hemocompatibility in extracorporeal membrane oxygenator ( ECMO ) [J]. *Adv Compos Hybrid Mater*, 2021, 4 (4): 847-864.
- [19] Nazarzadeh ZE, Khorsandi D, Zarepour A, et al. Biomedical applications of engineered heparin-based materials [J]. *Bioact Mater*, 2024, 31: 87-118.
- [20] Nguyen TD, Nguyen TN, Nguyen TTT, et al. Nanoencapsulation enhances anticoagulant activity of adenosine and dipeptide IleTrp [J]. *Nanomaterials ( Basel )*, 2019, 9 (9): 1191.
- [21] Russell P, Hagemeyer CE, Esser L, et al. Theranostic nanoparticles for the management of thrombosis [J]. *Theranostics*, 2022, 12 (6): 2773-2800.
- [22] Hiruta Y. Poly ( *N*-isopropylacrylamide ) -based temperature and pH-responsive polymer materials for application in biomedical fields [J]. *Polymer J*, 2022, 54 (12): 1419-1430.
- [23] Su M, Dai QX, Chen C, et al. Nano-medicine for thrombosis: a precise diagnosis and treatment strategy [J]. *Nanomicro Lett*, 2020, 12 (1): 96.
- [24] Wang J, Chen F, Arconada-Alvarez SJ, et al. A nanoscale tool for photoacoustic-based measurements of clotting time and therapeutic drug monitoring of heparin [J]. *Nano Lett*, 2016, 16 (10): 6265-6271.
- [25] Niu YJ, Wang P, Zhao YJ, et al. Turn-on colorimetric sensor for ultrasensitive detection of thrombin using fibrinogen-gold nanoparticle conjugate [J]. *Analyst*, 2013, 138 (5): 1475-1482.
- [26] Mohammadinejad A, Aleyaghoob G, Nooranian S, et al. Development of biosensors for detection of fibrinogen: a review [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2024, 416 (1): 21-36.
- [27] Zeibi SS, Carberry J, Mcquilten ZK, et al. Current and future strategies to monitor and manage coagulation in ECMO patients [J]. *Thromb J*, 2023, 21 (1): 11.
- [28] Patriota YBG, Chaves LL, Gocke EH, et al. Applied nanotechnologies in anticoagulant therapy: from anticoagulants to coagulation test performance of drug delivery systems [J]. *Appl Nano*, 2021, 2 (2): 98-117.
- [29] Beavers CJ, DiDomenico RJ, Dunn SP, et al. Optimizing anticoagulation for patients receiving impella support [J]. *Pharmacotherapy*, 2021, 41 (11): 932-942.
- [30] Chen WA, Chang DY, Chen BM, et al. Antibodies against poly ( ethylene glycol ) activate innate immune cells and induce hypersensitivity reactions to PEGylated nanomedicines [J]. *ACS Nano*, 2023, 17 (6): 5757-5772.
- [31] Haba MŞC, Şerban DN, Şerban IL, et al. Nanocarrier-based management of venous and arterial thrombosis [J]. *Crystals*, 2022, 12 (4): 450.
- [32] Zhang ML, Chan CHH, Pauls JP, et al. Investigation of heparin-loaded poly ( ethylene glycol ) -based hydrogels as anti-thrombogenic surface coatings for extracorporeal membrane oxygenation [J]. *J Mater Chem B*, 2022, 10 (26): 4974-4983.
- [33] Başaran DDA, Gündüz U, Tezcaner A, et al. Topical delivery of heparin from PLGA nanoparticles entrapped in nanofibers of sericin/gelatin scaffolds for wound healing [J]. *Int J Pharm*, 2021, 597: 120207.
- [34] Zhang ML, Pauls JP, Bartnikowski N, et al. Anti-thrombogenic surface coatings for extracorporeal membrane oxygenation: a narrative review [J]. *ACS Biomater Sci*, 2021, 7 (9): 4402-4419.
- [35] Bolla PK, Rodriguez VA, Kalhapure RS, et al. A review on pH and temperature responsive gels and other less explored drug delivery systems [J]. *J Drug Delivery Sci Technol*, 2018, 46: 416-435.
- [36] Šoltés J, Skribuckij M, Říha H, et al. Update on anticoagulation strategies in patients with ECMO—a narrative review [J]. *J Clin Med*, 2023, 12 (18): 6067.
- [37] Goh T, Gao LZ, Singh J, et al. Platelet adhesion and activation in an ECMO thrombosis-on-a-chip model [J]. *Adv Sci*, 2024, 11 (30): e2401524.

( 收稿日期: 2025-01-02; 修回日期: 2025-03-05 )



# 慢性难愈合创面的药物治疗研究进展

林书俊, 魏泽泽, 程丽源, 郭怀忠\* (河北大学药学院, 河北 保定 071002)

**摘要:** 随着老龄化社会的到来, 慢性难愈合创面 (CRW) 患者日益增多。此类创面病变机制复杂, 治疗费用高、周期长, 患者常常面临截肢甚至死亡的风险。病原微生物的定植是造成 CRW 难以愈合的重要因素之一, 尤其是耐药菌感染导致的 CRW, 其高发病率和高死亡率已引起社会广泛关注。鉴于此, 本文通过查阅国内外相关文献, 对 CRW 抗感染和促进愈合的药物治疗研究进展进行综述, 为 CRW 的临床治疗提供参考。

**关键词:** 慢性难愈合创面; 病原微生物; 抗感染; 愈合

**中图分类号:** R283

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-2981(2025)06-1780-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.042

## Progress in drug therapy for chronic refractory wounds

LIN Shu-jun, WEI Ze-ze, CHENG Li-yuan, GUO Huai-zhong\* (College of Pharmaceutical Sciences, Hebei University, Baoding Hebei 071002)

**Abstract:** With the arrival of aging society, the number of patients with chronic refractory wounds (CRW) is increasing. This type of wound surface has complex mechanism, high treatment costs and long healing cycle, so patients often face the risk of amputation or even death. The colonization of pathogenic microorganisms is an important factor that makes CRW difficult to heal, especially the high incidence rate and mortality of CRW caused by drug-resistant bacteria infection, which has aroused wide concern globally. This article reviewed the progress in drug therapy for anti-infection and healing promotion by referring to relevant literatures at home and abroad, to provide reference for the clinical treatment of CRW.

**Key words:** chronic refractory wound; pathogenic microorganism; anti-infection; healing

慢性难愈合创面 (chronic refractory wound, CRW) 多见于糖尿病患者、老年患者和长期卧床患者, 包括糖尿病足溃疡 (diabetic foot ulcer, DFU)、压疮和静脉性溃疡等<sup>[1]</sup>。患者常免疫力低下, 感染严重, 治疗周期长, 费用高, 截肢和死亡风险较高。在发达国家, 与 CRW 治疗相关的支出占医疗保健总支出的 3%<sup>[2]</sup>。

伤口正常愈合的生理过程包括止血、炎症、增殖和成熟, 且各环节需紧密联系、协调运行才能顺利完成创面的修复, 否则易导致 CRW 的形成。CRW 的常见特征包括持续渗液、反复感染、组织坏死、再上皮化缺陷、血管生成减少和活性氧过量产生等<sup>[3]</sup>。

创面皮肤软组织缺损过大以及病原微生物感

染是创面难以愈合的主要因素, 耐药菌感染使 CRW 愈合更加困难。不同损伤程度和感染类型的伤口应采用不同的治疗措施, 但均应遵循 TIME 原则, 即: ① 清除创面坏死组织 (tissue, T); ② 控制炎症并减轻感染 (infection/inflammation, I); ③ 保持创面正常的湿度, 为肉芽组织的生长和创面再上皮化创造条件 (moisture imbalance, M); ④ 去除创缘迁移受损的表皮 (edge of wound, E)<sup>[4]</sup>。临床上, 常通过控制患者的基础疾病、解除局部压迫、清创、抗感染和促进创面愈合, 并结合负压封闭引流、皮片/皮瓣移植、高压氧、基因疗法和干细胞疗法等手段对 CRW 进行治疗。其中, 抗感染和促进创面愈合是两个关键环节, 其有效治疗离不开药物的相辅相成, 是实现 CRW 个

**基金项目:** 河北省自然科学基金项目 (No.H2021201018)。

**作者简介:** 林书俊, 女, 硕士, 主要从事药物制剂研究与开发工作, email: 2339705604@qq.com \* **通信作者:** 郭怀忠, 男, 教授, 主要从事药品质量控制及其药效学研究, email: ghuaizh@aliyun.com

体化治疗的重要基础。

本文通过查阅国内外相关文献，重点对 CRW 中常见病原微生物种类、抗感染药物和促进愈合类中药治疗进展进行综述，以期为 CRW 的精准治疗提供参考。

## 1 抗 CRW 感染治疗

### 1.1 CRW 感染病原微生物分析

Dong 等<sup>[5]</sup>的研究表明，CRW 分泌物中 G<sup>+</sup>菌和 G<sup>-</sup>菌的检出率均约为 50%，而王燕平等<sup>[6]</sup>的研究中检出的 G<sup>-</sup>菌占 60%。CRW 伤口中常见的病原菌是葡萄球菌、肠球菌、肠杆菌和假单胞菌等<sup>[7]</sup>。葡萄球菌在 CRW 中最为常见，在 Wolcott<sup>[8]</sup>和 Malka<sup>[9]</sup>的研究中，检出率分别达到 63% 和 31.3%，病原微生物的种类组成和数量分布存在地域差异。粪肠球菌是仅次于金黄色葡萄球菌的第二种病菌，占 26.3%<sup>[9]</sup>。病菌通常可在伤口表面定植，但 G<sup>-</sup>菌还可深入伤口，从而引起更严重的感染。Yates 等<sup>[10]</sup>的研究发现，耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）占有所有分离的金黄色葡萄球菌的 39.6%，而在 Kasithevar 等<sup>[11]</sup>的研究中这一比例为 48.1%。在一项对 210 株糖尿病溃疡分泌物病原菌的分析中，分离出的 39 株大肠埃希菌对多数抗菌剂耐药，其中对环丙沙星的耐药率达到 100%<sup>[12]</sup>。另有研究表明，从 56 例 CRW 患者伤口处分离的病菌中，G<sup>+</sup>菌对青霉素、头孢唑啉、克林霉素等高度耐药，G<sup>-</sup>菌对头孢噻肟、头孢氨苄及红霉素等的耐药性也较为严重<sup>[13]</sup>。耐药菌的存在更易导致 CRW 的深层感染和其他并发症。

真菌也可引起 CRW 伤口感染，导致过敏反应和危及生命的侵袭性真菌病。研究表明，大约 23% 的 CRW 中含有真菌<sup>[14]</sup>；另一项研究发现，518 例糖尿病患者下肢伤口中有 27% 存在真菌<sup>[15]</sup>。CRW 感染的真菌中，念珠菌属通常占主导地位<sup>[16]</sup>。念珠菌能够形成生物被膜，从而对多种抗真菌药产生耐受，且毒力增强，不仅使 CRW 感染难以治愈，还可能形成侵袭性念珠菌病甚至念珠菌血症，导致极高的死亡率<sup>[17]</sup>。

### 1.2 CRW 抗感染药物治疗进展

目前，多用莫匹罗星、硫酸新霉素、环丙沙星、磺胺嘧啶银等传统抗菌药物进行 CRW 的抗感染治疗。前两者分别用于治疗 G<sup>+</sup>球菌和肠杆菌科细菌感染，后两者的抗菌谱较广，可用于多数 G<sup>+</sup>菌和 G<sup>-</sup>菌感染的治疗。临床上常采用传统抗菌药物的软膏、乳膏和凝胶剂，实现对不规则伤口表面均匀覆盖，药物不易脱落，且具有一定的药物缓释作用。

软膏剂和乳膏剂使用方便，患者依从性高，在 CRW 治疗中被广泛应用。Lipsky 等<sup>[18]</sup>研究表明，局部使用醋酸培西加南乳膏与口服氧氟沙星相比，在轻度感染 DFU 患者的临床改善率、总体微生物根除率和伤口愈合率方面的效果相当。Sami 等<sup>[19]</sup>使用姜黄、牛至提取物和壳聚糖纳米颗粒制备的软膏对金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌显示出 100% 的抗菌活性，该软膏可促进糖尿病大鼠压疮愈合。Meimeti 等<sup>[20]</sup>的研究表明，含有 *Ceratothoa oestroides* 提取物的软膏对 G<sup>-</sup>菌感染的 DFU 具有治疗潜力。Takayama 等<sup>[21]</sup>发现，0.2% 生物壳氧化钙软膏可显著降低大鼠创面菌落数。

与软膏剂和乳膏剂相比，凝胶剂具有吸收迅速、保湿性好及黏度可调等优势。万婷等<sup>[22]</sup>和朱伟东等<sup>[23]</sup>分别采用蝎肽抗菌凝胶和安柯信银离子抗菌凝胶治疗，与常规疗法相比，均缩短了 CRW 的愈合时间。CRW 抗感染药物凝胶剂基质材料的选择极大地影响其性能和稳定性，见表 1。但单一基质凝胶剂的性能常常不理想，如黄原胶水凝胶胶体较脆，机械性能不佳。王琴等<sup>[31]</sup>以黄原胶为基质，N，N-亚甲基双丙烯酰胺为交联剂，芦荟为抗菌材料制备了凝胶剂，其机械性能得到很大改善。

表 1 CRW 抗感染治疗的凝胶剂基质材料

| Tab 1 Gel matrix materials for CRW anti-infection treatment |                                           |      |
|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|------|
| 基质种类                                                        | 特点                                        | 文献   |
| 聚乙烯醇                                                        | 亲水性、成膜性、生物相容性                             | [24] |
| 羟丙基甲基纤维素                                                    | 亲水性、黏附性、稳定性较高、生物相容性、可生物降解性                | [25] |
| 明胶                                                          | 生物相容性、可生物降解性                              | [26] |
| 透明质酸                                                        | 保湿性、促进细胞增殖和迁移、促进胶原蛋白和弹性纤维的生成、生物相容性、可生物降解性 | [27] |
| 黄原胶                                                         | 黏附性、稳定性较高、生物相容性                           | [28] |
| 海藻酸盐                                                        | 高吸水性、保湿性、生物相容性                            | [29] |
| 聚乳酸-羟基乙酸共聚物                                                 | 机械强度良好、生物相容性、可生物降解性                       | [29] |
| 壳聚糖                                                         | 高吸水性和高透气性、生物相容性、可生物降解性                    | [30] |

然而，软膏剂、乳膏剂、凝胶剂易导致药物突释，需频繁换药，并可能引起病菌耐药。原位凝胶作为一种新型凝胶剂，可提供可控和延迟的药物释放，包括温度敏感、pH 敏感、离子敏感和多响应凝胶系统<sup>[32]</sup>。Chu 等<sup>[30]</sup>制备的原位凝胶避免了药物突释，作用时间延长，将其应用于感染性大鼠模型后，治疗第 13 日时，用药组创面菌落数约降至对照组的 22.2%。Yang 等<sup>[33]</sup>制备了可调



控原位凝胶,通过葡萄糖氧化酶分解葡萄糖改变伤口微环境,促进锌离子和甲磺酸去铁胺的释放,发挥抑菌和促进血管生成作用。该凝胶避免了药物突释,实现了糖尿病溃疡小鼠的个性化治疗和更高的靶向性。针对感染性糖尿病溃疡,Zheng 等<sup>[34]</sup>利用光热增强 Fenton 反应促进原位凝胶中羟基自由基的产生,在促进凝胶形成的同时具有抗菌作用,第 14 日,用药组创面愈合率约为 3M 医用胶带组的 1.2 倍。原位凝胶能够根据环境变化自动调节其理化性质,从而满足 CRW 特定的应用需求。但对外部刺激的高度依赖可能导致其在不理想的环境中疗效不佳。同时,复杂的制备过程提高了原位凝胶的生产成本和技术要求。在技术创新、性能优化等方面,原位凝胶仍有较大发展空间。

对于耐药菌感染 CRW 的治疗也备受关注。胶体银凝胶可有效防止病菌生物被膜的形成,但对 MRSA 的抑制作用较弱<sup>[35]</sup>。但 Li 等<sup>[36]</sup>的研究表明,银纳米颗粒可以显著抑制 MRSA 生物被膜的形成,当其质量浓度为  $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,抑制率为 65.53%。推测是由于银纳米颗粒的尺寸小,比表面积大,银离子的释放速度快,从而作用效果显著。槲皮素和黄芩苷可分别有效治疗耐碳青霉烯类肠杆菌<sup>[37]</sup>和 MRSA<sup>[38]</sup>。由 *Sebastiania hispidia* 的乙醇粗提物制备的凝胶促进了 MARS 感染伤口的愈合<sup>[39]</sup>。抗菌肽 P60.4Ac 羟丙基甲基纤维素凝胶在根除 MRSA 上的效果超过其乳膏剂,共培养 24 h 后,凝胶剂的 LC99 值分别为羊毛脂和聚乙二醇十六烷基醚制备的两种乳膏剂的 8.8% 和 11.3%<sup>[40]</sup>。Bei 等<sup>[41]</sup>制备的水凝胶生物相容性和抗菌性能良好,可有效修复感染 MRSA 的创面。

## 2 促进 CRW 愈合的中药研究进展

中药可在细胞增殖、迁移、分化、血管生成和组织重建等环节发挥作用,促进 CRW 愈合。中药治疗强调个体化和整体观念,这一原则在 CRW 治疗中至关重要,以下将重点从中药有效部位和中药复方制剂两方面概述中药在 CRW 治疗中的研究进展。

### 2.1 中药有效部位

**2.1.1 多糖** 中药多糖通过多重机制对 CRW 产生积极的修复作用,主要包括调节炎症因子、相关炎症蛋白和趋化蛋白;激活生长因子以募集内皮细胞和成纤维细胞;促进血管新生,改善创面血流;促进胶原蛋白合成,调节细胞外基质等<sup>[42]</sup>。Jakfar 等<sup>[43]</sup>制备了基于白及多糖、甲基纤维素和

对羟基苯甲酸甲酯的水凝胶伤口敷料,实验结果表明,孵育 24 h 后,用药组划痕线周围的 L929 细胞密度较对照组显著增加,第 3 日时的伤口愈合率为对照组的 2.3 倍。

**2.1.2 黄酮** 黄酮类成分兼具抗菌和促进愈合的作用,在 CRW 修复中展现出多重优势。银杏异黄酮可通过提高局部转化生长因子- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 的含量,并降低基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 水平促进 DFU 创面的愈合<sup>[44]</sup>。通过局部注射银杏叶提取物注射液,可激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路,减轻氧化应激反应,促进 DFU 大鼠创面微血管生成<sup>[45]</sup>。红花黄色素可提高血管生成、胶原形成和细胞增殖能力,并降低胰岛素抵抗、炎症反应和细胞凋亡<sup>[46]</sup>。马盼等<sup>[47]</sup>发现黄芪中的异黄酮类化合物可通过抗氧化应激减轻高糖诱导的内皮细胞损伤。王永生等<sup>[48]</sup>将当归黄芪汤联合硫辛酸治疗糖尿病足,发现患者的溃疡面积、创面肉芽和足背血流动力学等明显改善。

**2.1.3 皂苷** 邓智雯等<sup>[49]</sup>将载有微米级三七粉的白及胶海绵用于下肢静脉溃疡患者的治疗,临床有效率高达 91.2%,显著高于对照组的 64.7%,其运用的超微粉碎技术可使三七总皂苷充分溶出。李雪等<sup>[50]</sup>和李静平等<sup>[51]</sup>的研究表明,人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 和 Rg<sub>3</sub> 可促进糖尿病大鼠创面的血管和胶原蛋白生成,从而显著促进创面愈合。将人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 和透明质酸水凝胶结合,还可改善微环境加速伤口愈合<sup>[52]</sup>。

### 2.2 中药复方制剂

“煨脓长肉”是中医外治 CRW 的独特经验和理论基础。象皮膏、太乙膏、生肌玉红膏、煨脓生肌膏和湿润烧伤膏等生肌系列膏药的处方设计和使用均基于“煨脓长肉”这一中医理论<sup>[53]</sup>。湿润烧伤膏联合中药汤剂共同治疗 CRW 疗效显著<sup>[54]</sup>。CRW 治疗复方中药制剂多为软膏剂,更多常见软膏剂见表 2,其治疗针对 CRW 多个病理环节,具有综合调理、协同增效的作用,均可有效促进伤口愈合。

## 3 讨论

当前,用于 CRW 治疗的抗感染药物和促进愈合类中药的品种及剂型日益丰富,同时,在开发具备缓释、控释及靶向性能的智能药物方面,制剂的安全性和有效性稳步提升。现代制剂技术的应用促进了新型 CRW 治疗药物的研发和上市,推动其向更安全、更高效的方向发展。

但在临床实践中,针对不同病情和病原微生物



表 2 中药软膏剂在促进 CRW 愈合中的应用

Tab 2 Applications of healing promoting ointment prepared from TCM extracts in CRW

| 药品名称  | 药效成分 / 组分药材 | 研究对象       | 治疗机理                                                                | 文献   |
|-------|-------------|------------|---------------------------------------------------------------------|------|
| 莪术醇软膏 | 莪术醇         | SD 大鼠糖尿病溃疡 | 加快胶原合成, 血小板内皮细胞黏附分子 -1 和 TGF- $\beta$ 1 表达上调                        | [55] |
| 全蝎软膏  | 全蝎、蜈蚣、冰片    | SD 大鼠糖尿病溃疡 | 肉芽组织和毛细血管生长加快, 碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、血管性血友病因子表达上调                      | [56] |
| 银芪软膏  | 黄芪、金银花、三七等  | DFU        | 肉芽组织面积和覆盖率增大, 患肢足背动脉血流速度、足背动脉血管内径和腓总神经传导速度增大, VEGF、bFGF 和表皮生长因子表达上调 | [57] |
| 紫朱软膏  | 朱砂、紫草、龙血竭等  | DFU        | 超敏 C 反应蛋白、血清淀粉样蛋白 A 表达下调, VEGF 和 bFGF 表达上调                          | [58] |
| 京万红软膏 | 大黄、当归、冰片等   | DFU        | 促进肉芽组织增生、血液循环、局部血供和氧合                                               | [59] |

物的特点, 需要采取针对性强、疗效确切的治疗方案。生物疗法与常规疗法的结合可提升个体化治疗的水平, 主要包括局部应用生长因子、干细胞疗法及基因疗法等。基于 bFGF、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 和 VEGF 等的治疗方法已有报道<sup>[60]</sup>。刘国兴<sup>[61]</sup>和 Zhang 等<sup>[62]</sup>分别使用重组人表皮生长因子和重组人碱性成纤维细胞生长因子, 结合复方多黏菌素 B 软膏治疗 CRW, 均促进了创面愈合。富血小板血浆能够提供大量的生长因子, 在促进伤口愈合方面展现出诱人前景<sup>[63]</sup>, 但其制备和应用方法有待标准化。生物疗法的安全性和有效性尚需更大规模的临床试验验证, 以及多学科协作、持续的研究投入和政策支持。

CRW 的精准治疗不仅涉及合理选用抗感染药物和促进愈合类药物, 还包括后续的创面修复护理。将抗菌药物、促进愈合类药物共同负载在基质材料中制备新型药用敷料前景广阔。鉴于当前细菌耐药性问题日益严峻、抗感染药物选择受限的现状, 抗菌增敏剂能恢复抗菌药物的杀菌活性<sup>[64]</sup>, 减缓耐药性的发展, 将其与传统抗菌剂结合制备成新型制剂, 可推进抗 CRW 感染药物的研发。

综上, 随着人口老龄化趋势和耐药菌问题的加剧, 还需要结合多种药物的协同作用机制, 探索开发具有针对性的复合制剂, 以更好地应对当前面临的 CRW 医疗挑战。

## 参考文献

- [1] Fernández-Guarino M, Bacci S, Pérez González LA, et al. The role of physical therapies in wound healing and assisted scarring [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24 (8): 7487.
- [2] Olsson M, Järbrink K, Divakar U, et al. The humanistic and economic burden of chronic wounds: a systematic review [J]. Wound Repair Regen, 2019, 27 (1): 114-125.
- [3] Raziyeve K, Kim Y, Zharkinbekov Z, et al. Immunology of acute and chronic wound healing [J]. Biomolecules, 2021, 11 (5): 700.
- [4] Bowers S, Franco E. Chronic wounds: evaluation and management [J]. Am Fam Physician, 2020, 101 (3): 159-166.
- [5] Dong XM, Pei LL, Lu PS, et al. Bacteriological investigation and drug resistance analysis of chronic refractory wound secretions [J]. J Craniofac Surg, 2022, 33 (7): 2028-2030.
- [6] 王燕平, 裴小兰. 60 例慢性难愈合创面病原微生物分布特点及耐药性分析 [J]. 现代诊断与治疗, 2023, 34 (20): 3114-3116.
- [7] Ghoreishi FS, Roghanian R, Emtiazi G. Novel chronic wound healing by anti-biofilm peptides and protease [J]. Adv Pharm Bull, 2022, 12 (3): 424-436.
- [8] Wolcott RD, Hanson JD, Rees EJ, et al. Analysis of the chronic wound microbiota of 2963 patients by 16S rDNA pyrosequencing [J]. Wound Repair Regen, 2016, 24 (1): 163-174.
- [9] Malka M, Krakowiecki A, Chojak M, et al. The pathogen isolates in chronic wound infections in Poland [J]. Pol J Microbiol, 2023, 72 (2): 133-142.
- [10] Yates C, May K, Hale T, et al. Wound chronicity, inpatient care, and chronic kidney disease predispose to MRSA infection in diabetic foot ulcers [J]. Diabetes Care, 2009, 32 (10): 1907-1909.
- [11] Kasithevar M, Periakaruppan P, Muthupandian S, et al. Antibacterial efficacy of silver nanoparticles against multi-drug resistant clinical isolates from post-surgical wound infections [J]. Microb Pathog, 2017, 107: 327-334.
- [12] 楼世贵. 糖尿病足溃疡分泌物病原菌分布及多重耐药菌的耐药性分析 [J]. 中国卫生检验杂志, 2021, 31 (23): 2865-2869, 2873.
- [13] 江浩. 2 型糖尿病患者糖尿病足复发感染的病原菌特点及危险因素分析 [J]. 广东医科大学学报, 2017, 35 (5): 474-477.
- [14] Dowd SE, Delton Hanson J, Rees E, et al. Survey of fungi and yeast in polymicrobial infections in chronic wounds [J]. J Wound Care, 2011, 20 (1): 40-47.
- [15] Chellan G, Shivaprakash S, Karimassery Ramaiyar S, et al. Spectrum and prevalence of fungi infecting deep tissues of lower-limb wounds in patients with type 2 diabetes [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48 (6): 2097-2102.
- [16] Peng K, Li MS, Himawan A, et al. Amphotericin B-and

- levofloxacin-loaded chitosan films for potential use in antimicrobial wound dressings: analytical method development and its application [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14 (11): 2497.
- [17] Alherz FA, Negm WA, Elekhawwy E, et al. Silver nanoparticles prepared using encephalartos laurentianus de wild leaf extract have inhibitory activity against *Candida albicans* clinical isolates [J]. *J Fungi (Basel)*, 2022, 8 (10): 1005.
- [18] Lipsky BA, Holroyd KJ, Zasloff M. Topical versus systemic antimicrobial therapy for treating mildly infected diabetic foot ulcers: a randomized, controlled, double-blinded, multicenter trial of pexiganan cream [J]. *Clin Infect Dis*, 2008, 47 (12): 1537-1545.
- [19] Sami DG, Abdellatif A, Azzazy HME. Turmeric/oregano formulations for treatment of diabetic ulcer wounds [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2020, 46 (10): 1613-1621.
- [20] Meimeti E, Tentolouris N, Manes C, et al. Ointments containing *Ceratothoa oestroides* extract: evaluation of their healing potential in the treatment of diabetic foot ulcers [J]. *Wound Repair Regen*, 2020, 28 (2): 234-241.
- [21] Takayama T, Ishihara M, Nakamura S, et al. Bioshell calcium oxide (BiSCaO) ointment for the disinfection and healing of *Pseudomonas aeruginosa*-infected wounds in hairless rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (11): 4176.
- [22] 万婷, 周海孝, 朱占永, 等. 蝎肽抗菌凝胶联合外科手术下肢静脉性溃疡的疗效观察 [J]. *临床外科杂志*, 2019, 27 (6): 512-513.
- [23] 朱伟东, 王富生. 安柯信银离子抗菌凝胶治疗慢性难愈性创面的效果观察 [J]. *中国当代医药*, 2017, 24 (4): 138-140.
- [24] Alshehri S, Imam SS. Formulation and evaluation of butenafine loaded PLGA-nanoparticulate laden chitosan nano gel [J]. *Drug Deliv*, 2021, 28 (1): 2348-2360.
- [25] Osanloo M, Noori F, Varaa N, et al. The wound healing effect of polycaprolactone-chitosan scaffold coated with a gel containing *Zataria multiflora* Boiss. volatile oil nanoemulsions [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2024, 24 (1): 56.
- [26] 邵杰, 许玉莲, 王丽伟, 等. 载纳米磺胺嘧啶银明胶凝胶体外抗菌及体内促愈合性能 [J]. *国际药学研究杂志*, 2017, 44 (6): 561-566.
- [27] Zhang SX, Pan YQ, Mao ZY, et al. Hyaluronic acid-g-lipoic acid granular gel for promoting diabetic wound healing [J]. *Bioeng Transl Med*, 2022, 8 (2): e10402.
- [28] Alam A, Jawaid T, Alsanad SM, et al. Solubility enhancement, formulation development, and antibacterial activity of xanthan-gum-stabilized colloidal gold nanogel of hesperidin against *Proteus vulgaris* [J]. *Gels*, 2022, 8 (10): 655.
- [29] 陈雨彤, 陈姝含, 陶雨霖, 等. 硫化氢缓释凝胶的制备及其对糖尿病小鼠皮肤溃疡的影响 [J]. *徐州医科大学学报*, 2021, 41 (6): 414-417.
- [30] Chu WH, Wang P, Ma Z, et al. Lupeol-loaded chitosan-Ag<sup>+</sup> nanoparticle/sericin hydrogel accelerates wound healing and effectively inhibits bacterial infection [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 243: 125310.
- [31] 王琴, 马力群, 曹婕, 等. 抗菌透明细胞相容性良好的水凝胶创面敷料制备研究 [J]. *宁夏师范学院学报*, 2024, 45 (4): 64-71.
- [32] Garg A, Agrawal R, Chauhan CS, et al. In-situ gel: a smart carrier for drug delivery [J]. *Int J Pharm*, 2024, 652: 123819.
- [33] Yang JX, Zeng WN, Xu P, et al. Glucose-responsive multifunctional metal-organic drug-loaded hydrogel for diabetic wound healing [J]. *Acta Biomater*, 2022, 140: 206-218.
- [34] Zheng C, Wu X, Liu M, et al. Photothermal-enhanced in situ supramolecular hydrogel promotes bacteria-infected wound healing in diabetes [J]. *Smart Med*, 2024, 3 (1): e20230047.
- [35] Tran PL, Huynh E, Hamood AN, et al. The ability of a colloidal silver gel wound dressing to kill bacteria in vitro and in vivo [J]. *J Wound Care*, 2017, 26 (4 Suppl): S16-S24.
- [36] Li H, You QX, Feng XY, et al. Effective treatment of *Staphylococcus aureus* infection with silver nanoparticles and silver ions [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2023, 80, 104165.
- [37] Pal A, Tripathi A. Quercetin inhibits carbapenemase and efflux pump activities among carbapenem-resistant gram-negative bacteria [J]. *APMIS*, 2020, 128 (3): 251-259.
- [38] Zhang SP, Hu B, Xu JF, et al. Baicalin suppress growth and virulence-related factors of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro and vivo [J]. *Microb Pathog*, 2020, 139: 103899.
- [39] Muller JAI, Matias R, Guilhermino JF, et al. The effect of *Sebastiania hispidula* gel on wound model infected by methicillin resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 105: 1311-1317.
- [40] Haisma EM, Göblyös A, Ravensbergen B, et al. Antimicrobial peptide P60.4Ac-containing creams and gel for eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from cultured skin and airway epithelial surfaces [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60 (7): 4063-4072.
- [41] Bei ZW, Zhang LH, Li JN, et al. A smart stimulation-deadhesion and antimicrobial hydrogel for repairing diabetic wounds infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Adv Healthc Mater*, 2024, 13 (5): e2303042.
- [42] 许东敏, 杜娟娟, 杨莹, 等. 中药多糖类成分促进慢性难愈创面修复机制的研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30 (8): 245-252.
- [43] Jakfar S, Lin TC, Chen ZY, et al. A polysaccharide isolated from the herb *Bletilla striata* combined with meth-

- ylcellulose to form a hydrogel via self-assembly as a wound dressing [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23 (19): 12019.
- [44] 伍先明, 李爱琼, 周丽丽, 等. 银杏异双黄酮改善糖尿病大鼠足溃疡创面愈合的机制研究 [J]. 湘南学院学报 (医学版), 2019, 21 (4): 6-10.
- [45] 何丰来, 肖聪, 龙能吉, 等. 银杏叶提取物注射液对糖尿病足溃疡模型大鼠创面恢复的作用及机制研究 [J]. 广西医科大学学报, 2022, 39 (1): 67-73.
- [46] 张杰, 刘自新, 贾炳学, 等. 红花黄色素对糖尿病小鼠足溃疡创面愈合的影响及机制 [J]. 新乡医学院学报, 2024, 41 (5): 412-418.
- [47] 马盼, 刘汉滢, 彭美中, 等. 黄芪水提物 3 种效应成分对高糖诱导的内皮细胞损伤的保护作用及机制研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2024, 47 (2): 188-198.
- [48] 王永生, 周海琴, 刘志伟. 当归黄芪汤联合硫酸辛治疗糖尿病足临床观察 [J]. 实用中医药杂志, 2024, 40 (8): 1607-1609.
- [49] 邓智雯, 颀琦, 毛乔, 等. 中药海绵外敷联合负压封闭引流治疗下肢静脉性溃疡的临床研究 [J]. 陕西中医药大学学报, 2023, 46 (4): 100-104.
- [50] 李雪, 朱永展, 谭彩霞, 等. 人参皂苷  $Rg_1$  对糖尿病大鼠足创面修复的影响及机制 [J]. 解剖学研究, 2018, 40 (4): 263-267, 271.
- [51] 李静平, 郑永仁, 张燕. 人参皂苷  $Rg_3$  对糖尿病大鼠创面修复作用的实验研究 [J]. 云南中医中药杂志, 2016, 37 (1): 25-28.
- [52] 王千新, 何鑫, 孙泽, 等. 人参皂苷  $Rg_3$  复合水凝胶的制备及抗菌性能研究 [J]. 人参研究, 2024, 36 (5): 23-26.
- [53] 赵杰, 孙业祥. 浅析“煨脓长肉”理论在慢性难愈合创面中的作用机制及研究进展 [J]. 中国烧伤创疡杂志, 2024, 36 (6): 425-428.
- [54] 徐海锋, 苏洁, 马富贵, 等. 湿润烧伤膏联合中药汤剂治愈慢性难愈合创面合并多重耐药性金黄色葡萄球菌感染 1 例报告 [J]. 中国烧伤创疡杂志, 2024, 36 (1): 8-10.
- [55] 周洁, 朱雁林, 董建勇, 等. 莪术醇软膏对糖尿病溃疡创面愈合的作用 [J]. 温州医科大学学报, 2014, 44 (6): 411-416.
- [56] 王景, 回雪颖, 郭伟光, 等. 全蝎软膏对大鼠糖尿病皮肤溃疡创面愈合的效果评价 [J]. 现代生物医学进展, 2020, 20 (12): 2252-2257.
- [57] 张一平, 靳思思, 李金生. 银芪软膏联合前列地尔治疗糖尿病足溃疡临床效果分析 [J]. 内科, 2020, 15 (5): 558-561.
- [58] 施陈燕, 黄仁燕, 黄何尘, 等. 紫朱软膏联合奚氏中医外科技术治疗糖尿病足溃疡 36 例临床观察 [J]. 中医杂志, 2022, 63 (10): 956-961.
- [59] 黄志锋, 郑少逸, 赖文, 等. 京万红软膏和纳米银凝胶治疗糖尿病足溃疡的临床疗效比较研究 [J]. 中华损伤与修复杂志 (电子版), 2018, 13 (6): 455-458.
- [60] Barrientos S, Brem H, Stojadinovic O, et al. Clinical application of growth factors and cytokines in wound healing [J]. Wound Repair Regen, 2014, 22 (5): 569-578.
- [61] 刘国兴. 复方多黏菌素 B 软膏联合重组人表皮生长因子治疗糖尿病皮肤难愈性溃疡的疗效分析 [J]. 糖尿病新世界, 2023, 26 (7): 72-75.
- [62] Zhang JB, Li H, Zhang L, et al. Observation of curative effect of recombinant human basic fibroblast growth factor combined with compound polymyxin B ointment and local application of insulin on wound healing of deep second-degree burn in diabetes mellitus: a randomized study [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23 (13): 5987-5993.
- [63] Li Y, Gao YY, Gao Y, et al. Autologous platelet-rich gel treatment for diabetic chronic cutaneous ulcers: a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. J Diabetes, 2019, 11 (5): 359-369.
- [64] 卢嵘, 成泓, 赵西林, 等. 抗菌增敏剂恢复耐药细菌对抗生素敏感性的研究进展 [J]. 中国抗生素杂志, 2023, 48 (11): 1201-1210.

(收稿日期: 2024-12-31; 修回日期: 2025-01-25)



## 临床药师在临床

## 1 例围产期首发精神分裂症患者的用药分析及监护

杨燕, 龚尧, 刘哲宇, 蒲丽\* (成都市第四人民医院/成都市精神卫生中心, 成都 610000)

**摘要:** 精神分裂症患者妊娠及哺乳期抗精神病药治疗是一项须权衡利弊、充分知情告知的复杂决策。临床药师对 1 例孕 33 周首发精神分裂症患者的治疗进行分析, 总结精神分裂症的遗传风险、妊娠和哺乳期抗精神病药物的选择及监护要点, 为围产期精神分裂症的治疗提供参考。

**关键词:** 精神分裂症; 抗精神病药; 妊娠期; 哺乳期; 用药监护

**中图分类号:** R969.3

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-2981(2025)06-1786-04

**doi:** 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.043

精神分裂症是一种多起病于青壮年, 常有知觉、思维、情感和行为等方面障碍的严重精神疾病, 患者在疾病症状期有可能出现危害人身安全的异常行为, 给社会安全带来不良影响<sup>[1]</sup>。围产期(孕满 28 周至产后 4 周)精神分裂症是围产期严重精神疾病之一, 可能导致孕产妇及其子代出现不良结局<sup>[2-3]</sup>。抗精神病药(antipsychotic drugs, APDs)分为第一代和第二代抗精神病药。抗精神病药可通过胎盘或乳汁使胎儿或新生儿出现一些不良反应, 对神经行为也可能产生远期影响; 而不使用抗精神病药治疗, 精神症状的不稳定可能对母亲和子代的健康产生更严重的不良影响<sup>[1, 4-5]</sup>。此外, 患者及家属对精神分裂症的遗传风险、能否继续妊娠也存在顾虑。因此, 围产期精神分裂症的治疗是一项须权衡利弊、充分知情告知的复杂决策。本文报道 1 例围产期首发精神分裂症患者的治疗过程, 总结疾病的遗传风险、妊娠和哺乳期抗精神病药物的选择及监护要点, 以期围产期精神分裂症的治疗提供参考。

## 1 病例概况

患者, 女, 21 岁, 孕 33 周, 因“反复情绪暴躁、冲动行为 3 年, 加重 2 周”于 2024 年 3 月 12 日首次入院住院治疗。患者入院 3 年前无明显诱因开始出现脾气暴躁, 偶有心情不好, 不顺意时会有一些冲动行为, 因未引起重视而未治疗。患者入院前 2 周出现情绪低落、摔东西的行为。入院前 2 日, 开始反复敲邻居的门, 感觉家

里不安全, 有人要害自己。入院前 1 日, 用刀砍邻居家的门, 情绪激动、哭泣, 要用火点燃被子, 家属及警察陪同其入院。患病以来, 患者精神欠佳, 睡眠差, 入睡困难, 饮食如常, 有冲动毁物行为、伤人行为, 有消极想法。个人史、既往史、家族史及药物过敏史无特殊。

入院查体: 体温(T) 36.6℃, 脉率(P) 90 次·min<sup>-1</sup>, 呼吸(R) 20 次·min<sup>-1</sup>, 血压(BP) 140/88 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa); 腹部膨隆, 心肺检查未见异常, 生理反射存在, 病理征未引出。精神检查: 患者年貌相符, 强行送入、平车推入病室; 意识清晰, 言行冲动, 情绪易激惹; 查及关系妄想、被害妄想, 行为难以理解; 情感反应与周围环境不协调, 自知力部分存在; 社会功能明显受损。诊断: 精神分裂症。

## 2 主要治疗经过

### 2.1 疾病遗传风险及妊娠期用药咨询

患者为孕晚期首发精神分裂症, 患者及家属咨询当前疾病是否遗传, 患者能否继续妊娠, 能否接受抗精神病药治疗。医师及药师查阅相关资料后充分告知, 患者及家属对疾病遗传风险、药物治疗风险表示理解, 签署知情同意书, 同意接受抗精神病药治疗, 且继续妊娠。

### 2.2 妊娠晚期抗精神病治疗

患者孕晚期住院治疗共 2 次。2024 年 3 月 12—20 日为第一次住院治疗, 入院后给予奋乃静注射液控制患者急性期精神症状, 予以喹硫平片

**基金项目:** 成都市医学科研课题 (No.2022406)。

**作者简介:** 杨燕, 女, 主管药师, 主要从事临床药学工作, email: 714754548@qq.com \*通信作者: 蒲丽, 女, 副主任医师, 主要从事精神分裂症相关治疗方面的工作, email: 119524349@qq.com

口服抗精神病治疗（详见图 1）。患者入院时阳性与阴性症状量表（PANSS 量表）得分为 65 分，经治疗后部分好转，家属要求出院，出院时 PANSS 量表评分为 53 分。出院后嘱患者长期口服喹硫平片 200 mg 继续抗精神病治疗。

患者出院后不愿服药，10 d 后病情加重，2024 年 4 月 1 日再次入院治疗，入院时 PANSS 量表得分为 65 分。入院后针对患者激越、冲动、治疗不配合等急性症状予以氟哌啶醇注射液、地西洋注射液治疗。初予以奥氮平口溶膜片治疗，后因效果不佳改为氯氮平片治疗（见图 1）。2024 年 4 月 10 日，患者临产转院至产科医院生产，并顺产 1 名男婴，新生儿 Apgar 评分为 8-10-10，状态良好。

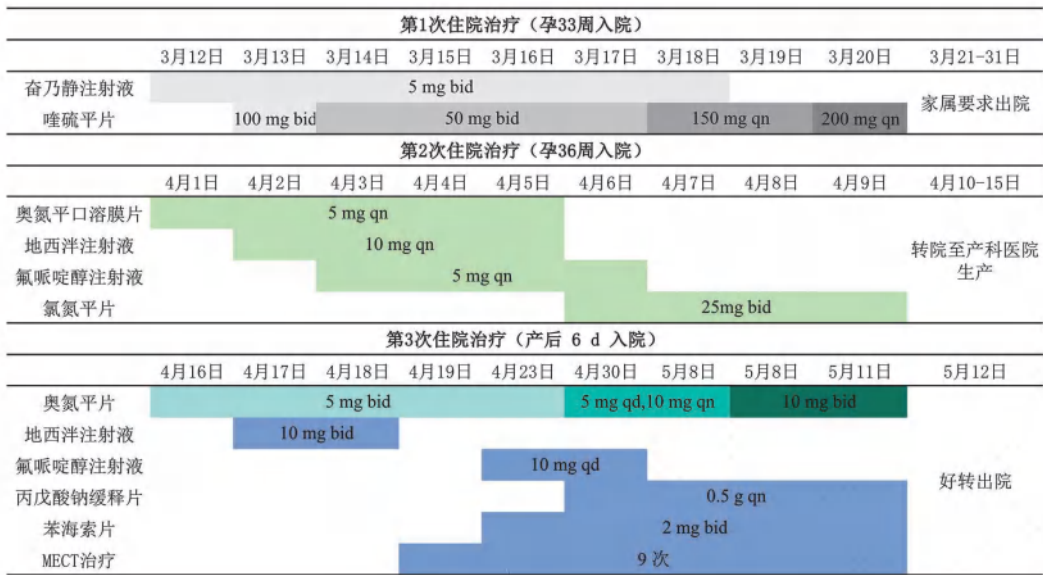


图 1 患者围产期治疗方案

### 3 分析及讨论

#### 3.1 精神分裂症的遗传风险

精神分裂症是一种以阳性、阴性症状和紊乱综合征为主要临床特征的慢性精神疾病<sup>[6]</sup>。其病因未明，目前多认为该病是脑功能失调的一种神经发育性障碍，复杂的遗传、生物及环境因素的相互作用导致疾病的发生<sup>[7]</sup>。目前在人类基因组中已发现有 100 多个基因位点与精神分裂症有关<sup>[7]</sup>。此外，来自家系和双生子的研究提示，精神分裂症的遗传度约为 80%，亲缘关系越近，患病风险越大<sup>[7]</sup>。精神分裂症在一般人群中的终身患病风险约为 1%，父母一方患病其后代患病风险为 6%，父母双方均患病的其后代患病风险为 46%；兄弟姐妹中有患病的其患病风险为 9%，异卵双胞胎患病风险为 17%，同卵双胞胎患病风险为 48%<sup>[8]</sup>。本文报道的案例系患者与健康人所生

#### 2.3 产后抗精神病治疗

2024 年 4 月 16 日，患者产后第 7 日，因病情加重再次强制送入院。入院第 2 日（4 月 17 日）PANSS 量表得分为 78 分，进入封闭式病房住院治疗，医师及药师建议患者暂不哺乳，患者及家属决定人工喂养。针对患者激越、冲动、治疗不配合等急性症状予以氟哌啶醇注射液、地西洋注射液治疗，后给予奥氮平片、丙戊酸钠缓释片口服治疗控制精神症状，予以苯海索片对抗抗精神病药导致的锥体外系副反应，同时予以无抽搐电休克治疗 9 次（见图 1）。2024 年 5 月 10 日 PANSS 量表得分为 48 分，患者病情好转，于 2024 年 5 月 11 日出院。嘱患者院外长期口服奥氮平片、丙戊酸钠缓释片治疗，门诊随访。

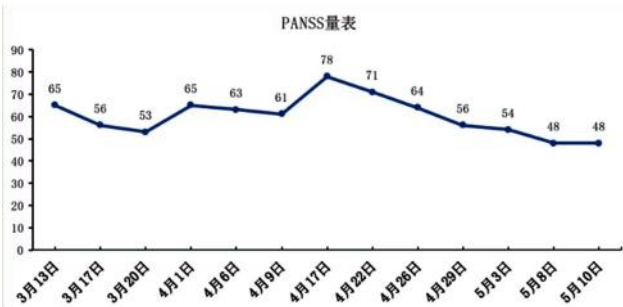


图 2 患者住院期间的 PANSS 量表评分

子女，后代患精神分裂症概率增加，较正常人群增高，存在一定风险。患者及家属权衡利弊后，继续妊娠。

#### 3.2 妊娠期抗精神病药治疗的选择

目前对于妊娠期 APDs 治疗的安全性证据仍然有限。APDs 主要通过作用于多巴胺及 5- 羟色胺等神经递质系统发挥治疗作用，已知的 APDs



均可通过胎盘屏障<sup>[9]</sup>。因此,理论上 APDs 对胎儿有一定的暴露风险,有可能通过干扰子代神经递质系统的发育从而产生不良影响<sup>[5]</sup>。多项流行病学研究评估了妊娠期服用 APDs 与发生畸形的潜在风险,但得出不同结论:一些研究显示没有关联<sup>[10-15]</sup>,少数研究提示 APDs 会增加致畸风险<sup>[16-18]</sup>。一项基于人群的队列研究表明,服用 APDs 的孕妇中先天畸形的发生率为 7.3%,未服用 APDs 的孕妇发生率为 5.1%,结论提示 APDs 不增加先天性畸形的发生风险<sup>[19]</sup>。一项荟萃分析纳入了 16 125 名接触了 APDs 的儿童,结果提示 APDs 不会显著增加后代发生畸形的风险<sup>[20]</sup>。也有研究表明,妊娠晚期暴露于 APDs 的新生儿可能存在戒断症状或神经系统影响,症状可能包括躁动、肌张力异常增加或下降、震颤、嗜睡、严重呼吸困难和进食困难<sup>[21]</sup>。

尽管 APDs 安全性证据尚不足,但患者如果不进行治疗或治疗不充分,严重的精神症状可增加早产、子痫、产前出血等风险,增加患者出现自伤或伤人等行为的危险<sup>[22]</sup>。妊娠期是否进行 APDs 治疗需要权衡利弊,须充分知情告知患者及家属。世界生物精神病学学会联合会(WFSBP)精神分裂症生物治疗指南,为妊娠期 APDs 的选择提供了部分参考<sup>[23]</sup>:①对于已患病的妇女来说,继续 APDs 治疗以减少复发的获益可能将超过潜在的胎儿风险;②药物剂量应以控制病情的最低有效剂量为限;③药物选择方面,第一代 APDs 中可考虑使用最低必要剂量的氟哌啶醇,第二代 APDs 中奥氮平、利培酮、喹硫平可作为治疗选择,不推荐使用氯氮平;④患者病情稳定情况下,通常不建议换药,即使所换的药物具有更多的安全信息。因为换药会使子代暴露于两种不同的药物,同时换药也增加孕产妇精神疾病复发的风险。

对于本文报道的病例,患者为孕晚期首发精神分裂症,精神症状明显,家属权衡利弊后同意予以 APDs 治疗。初始予以奋乃静、喹硫平治疗,好转后出院。出院后,患者服药依从性差、精神症状加重,再次入院予以奥氮平、氟哌啶醇控制精神症状,效果不佳后予以氯氮平治疗。虽然氯氮平在美国食品药品监督管理局(FDA)药物妊娠安全分级为 B 级,但是氯氮平具有特殊的不良反应和高比例的围产期并发症,不作为首选推荐<sup>[24]</sup>。氯氮平是治疗难治性精神分裂症的首选药物,该患者其他药物治疗无效,因此临床权衡利弊后,使用氯氮平进行治疗,并加强监护。

### 3.3 哺乳期 APDs 治疗的选择

精神分裂症患者产后因激素变化,病情复发风险高,需要继续药物治疗<sup>[1]</sup>。本文报道的案例,患者产后病情加重,强制入封闭病房治疗,患者及家属决定人工喂养,APDs 选择可不考虑对哺乳的影响。但对于有哺乳条件的患者来说,APDs 可参照药物哺乳安全性分级和相对婴儿剂量(RID)来选择。哺乳安全性分级分为 L1 ~ L5 级:L1 安全,L2 较安全,L3 可能安全,L4 可潜在风险,L5 有风险。RID 是由世界卫生组织(WHO)制定,定义为婴儿从母乳中摄入的活性药物剂量与母亲摄入剂量的比值,一般情况下 RID < 10% 视为安全,RID < 5% 时推荐母乳喂养。研究表明,大多数 APDs 哺乳安全性分级多为 L2 ~ L3 级,RID 多 < 2%<sup>[21]</sup>。目前指南建议服用奥氮平、喹硫平、阿立哌唑可接受哺乳,利培酮需在医疗监护下使用,氯氮平和舒必利哺乳期禁用<sup>[21-22]</sup>。哺乳期 APDs 的选择需综合患者病情、家庭及环境因素考虑,充分知情同意,选择合适的治疗方案。

### 3.4 用药监护

在妊娠期使用第一代 APDs 有低出生体重、早产的发生风险,孕晚期易出现锥体外系和戒断症状,因此要监护新生儿此类不良事件;使用利培酮、奥氮平、喹硫平、氯氮平等第二代 APDs,要注意监护其增加产妇体重,增加母体妊娠糖尿病风险,增加子代出生体重等潜在并发症风险,定期产检和监测胎儿生长情况<sup>[2]</sup>。此外,若使用氯氮平,需监测粒细胞缺乏症。哺乳期使用 APDs,要监护婴儿可能发生的过度镇静、易怒、喂养不良和锥体外系症状等不良反应,临床中需权衡母乳喂养的益处和药物暴露的潜在不良反应。

本文报道的案例中,由于患者治疗不配合及疾病本身的发展,导致患者孕晚期暴露于多种 APDs,存在一定的风险,医师、护士及药师予以密切监护。最后,本例患者顺产 1 名新生儿,新生儿状态良好,未出现过度镇静、中毒、戒断症状等不良反应,患者在治疗中未见明显药品不良反应。APDs 对子代的长远影响,还有待于进一步长期随访观察。

## 4 小结

随着精神疾病诊疗技术的进步,许多患精神分裂症的女性可以正常妊娠,但围产期使用 APDs 仍然存在许多挑战,尚缺乏充足的循证医学证据及临床实践。本文就 1 例围产期首发精神分裂症患者治疗中的疾病遗传风险、药物选择和



监护进行分析, 为此类病例提供参考, 但 APDs 对子代的长远影响有待长期随访, 未来也需要更多的研究进行验证。

## 参考文献

- [1] 赵靖平, 施慎逊. 中国精神分裂症防治指南 [M]. 北京: 中华医学电子音像出版社, 2015.
- [2] 王萍. 围产期医学中的有关定义 [J]. 中国初级卫生保健, 1988 (2): 21.
- [3] 陈静, 邹涛, 赵丹青, 等. 围产期精神障碍筛查与诊治专家共识 [J]. 中国全科医学, 2023, 26 (28): 3463-3470.
- [4] Howard LM, Kumar R, Thornicroft G. Mother with psychotic disorders [J]. Br J Psychiatry, 2001, 178: 427-432.
- [5] 王瀚, 苏允爱, 李继涛, 等. 孕期使用抗精神病药对子代神经发育影响的研究进展 [J]. 中华精神科杂志, 2020, 53 (4): 347-350.
- [6] Jauhar S, Johnstone M, McKenna PJ. Schizophrenia [J]. Lancet, 2022, 399 (10323): 473-486.
- [7] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 精神障碍诊疗规范 [M]. 北京: 科学出版社, 2020.
- [8] Tsuang M. Schizophrenia: genes and environment [J]. Biol Psychiatry, 2000, 47 (3): 210-220.
- [9] 韦石凤, 马登磊, 李林, 等. 精神分裂症药物治疗研究进展 [J]. 中国新药与临床杂志, 2023, 42 (4): 209-215.
- [10] Huybrechts KF, Hernández-Díaz S, Paterno E, et al. Antipsychotic Use in Pregnancy and the Risk for Congenital Malformations [J]. JAMA Psychiatry, 2016, 73 (9): 938-946.
- [11] Vigod SN, Gomes T, Wilton AS, et al. Antipsychotic drug use in pregnancy: high dimensional, propensity matched, population based cohort study [J]. BMJ, 2015, 350: 1-10.
- [12] Cohen LS, Viguera AC, McInerney KA, et al. Reproductive safety of second-generation antipsychotics: current data from the massachusetts general hospital national pregnancy registry for atypical antipsychotics [J]. Am J Psychiatry, 2016, 173 (3): 263-270.
- [13] Reis M, Källén B. Maternal use of antipsychotics in early pregnancy and delivery outcome [J]. J Clin Psychopharmacol, 2008, 28 (3): 279-288.
- [14] Petersen I, McCrea RL, Sammon CJ, et al. Risks and benefits of psychotropic medication in pregnancy: cohort studies based on UK electronic primary care health records [J]. Health Technol Assess, 2016, 20 (23): 1-176.
- [15] Huybrechts KF, Straub L, Karlsson P, et al. Association of in utero antipsychotic medication exposure with risk of congenital malformations in nordic countries and the US [J]. JAMA Psychiatry, 2023, 80 (2): 156-166.
- [16] Ellfolk M, Leinonen MK, Gissler M, et al. Second-generation antipsychotic use during pregnancy and risk of congenital malformations [J]. Eur J Clin Pharmacol, 2021, 77: 1737-1745.
- [17] Anderson KN, Ailes EC, Lind JN, et al. Atypical antipsychotic use during pregnancy and birth defect risk: national birth defects prevention study [J]. Schizophr Res, 2020, 215: 81-88.
- [18] Habermann F, Fritzsche J, Fuhlbrück F, et al. Atypical antipsychotic drugs and pregnancy outcome: a prospective, cohort study [J]. Clin Psychopharmacol, 2013, 33 (4): 453-462.
- [19] Liu X, Kolding L, Momen N, et al. Maternal antipsychotic use during pregnancy and congenital malformations [J]. Am J Obstet Gynecol MFM, 2023, 5 (6): 1-9.
- [20] Wang Z, Brauer R, Man KKC, et al. Prenatal exposure to antipsychotic agents and the risk of congenital malformations in children: a systematic review and meta-analysis [J]. Br J Clin Pharmacol, 2021, 87 (11): 4101-4123.
- [21] 厉星, 赵蕊, 应苗法. 精神药物在妊娠期使用的安全性探讨 [J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41 (8): 860-866.
- [22] Schneid-Kofman N, Sheiner E, Levy A. Psychiatric illness and adverse pregnancy outcome [J]. Int J Gynaecol Obstet, 2008, 101 (1): 53-56.
- [23] Hasan A, Falkai P, Wobrock T, et al. World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) Guidelines for Biological Treatment of Schizophrenia. Part 3: Update 2015 Management of special circumstances: depression, Suicidality, substance use disorders and pregnancy and lactation [J]. World J Biol Psychiatry, 2015, 16 (3): 142-170.
- [24] Larsen ER, Damkier P, Pedersen LH, et al. Use of psychotropic drugs during pregnancy and breast-feeding [J]. Acta Psychiatr Scand Suppl, 2015, 132: 1-28.

(收稿日期: 2024-08-27; 修回日期: 2024-10-27)

## 中药与临床

## 周乃玉教授治疗风湿病中“通”药的临床运用探讨

吴心玥<sup>1</sup>, 张秦<sup>2\*</sup> (1. 北京中医药大学北京中医医院临床医学院, 北京 100105; 2. 北京中医医院风湿科, 北京 100010)

**摘要:** 周乃玉教授是国家级名老中医, 对风湿病的理解和治疗经验丰富、见解深刻, 其经验值得进一步总结与挖掘。本文介绍了国医名师周乃玉基于广义“通法”思想, 将“通法”贯穿风湿病治疗始终, 活用“通”药治疗风湿病早、中、晚三期的临证经验。早期运用解表通络、通气和血药; 中期运用化痰瘀、疏肝、通腑药; 晚期运用通阳、藏阴药。并分享两则体现周乃玉教授“通”药运用的验案组方分析。

**关键词:** 风湿病; 痹证; “通”药

**中图分类号:** R283

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-2981(2025)06-1790-04

**doi:** 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.044

周乃玉, 首都国医名师, 全国著名中医风湿病大家, 从事中医风湿病工作 50 余年, 积累了丰富的临床经验, 创建了“健脾益气法”治疗干燥综合征的基本原则<sup>[1]</sup>, “泄浊化瘀”之法治疗痛风<sup>[2]</sup>等学术思想。风湿病属中医“痹证”范畴, 是一类以肢体肌肉关节疼痛、肿胀、僵硬、麻木、重着为主要表现的疾病。周老认为: “痹者闭也, 闭者不通”, 治疗以“通法”为纲, 其将风湿病分为三阶段论治, 而“通法”的应用贯穿疾病全过程, 三期临床治疗中均运用大量具有通调特性的药物, 现将其经验及思想总结如下。

## 1 “通”与“通”药的含义源流

### 1.1 “通”字的含义

“通”, 本义是到达、通到。《易·系辞上》: “一阖一闢谓之变, 往来不穷谓之通。”一闭一开叫作变化, 来来往往地变化无穷叫作贯通。《尔雅·释天》: “四时和为通正。”郭璞注: “通, 平畅也。”可见广义的“通”并不只是指无障碍, 在中医理论中也不只是指经脉中无病理产物的堆积, 而是指人体各处调和平畅、往来无穷的状态。

### 1.2 “通”药的内涵及其组方应用

“通”药是一类基于“通法”的治疗原则, 具备“通”的特性的药物。“通法”在中医中可分为狭义和广义, 狭义的“通法”包括《伤寒论》之汗法, 代表方剂有麻黄汤、桂枝汤等;《儒门事亲》之吐法,

代表方剂有瓜蒂散、三圣散等;《河间三书》之下法, 代表方剂有三承气汤等;《景岳全书》古方八阵之攻阵, 代表方剂有赤金豆、太平丸等;陈士铎《石室秘录》之通治法, 代表方剂有解酒散火汤等。广义的“通法”是一切因势利导、调畅气机、疏通经脉之法的总称, 如《医学心悟》八法之汗、吐、下、和、温、清、补、消均可谓广义“通法”之延伸。

## 2 周乃玉教授治疗风湿病全程的“通”药运用

周老将风湿病分为早、中、晚三期论治。早期因感受风、寒、湿邪, 导致气血失调<sup>[3]</sup>, 或素体气血不足, 因外邪引动而发病。中期逐渐累及脏腑, 致使病理产物痰、瘀蓄积成坚。晚期病久入里, 肝、脾、肾亏虚较重, 阴阳衰弱。

### 2.1 早期解肌表、通气血

对于周老的处方进行基于关联规则和复杂系统熵的聚类分析, 结果表明, 甘草、黄芪、白芍、桂枝、防风、防己是疾病早期使用频次较高的“通”药<sup>[4]</sup>, 经常相须为用的药物组合有黄芪-桂枝、黄芪-白芍、甘草-桂枝、防己-桂枝、柴胡-桂枝、防风-防己、黄芪-甘草、桂枝-白芍等。

**2.1.1 解表通络药** 若以风、湿偏盛, 周老常用防风与防己配伍, 其出自《金匮要略》防己地黄汤, 防风辛、甘性温, 位在肌表, 擅解表疏风, 防己辛、苦性寒, 位在经络, 可通泄经络湿邪, 两者合用, 寒热相济, 上散风邪、下通水气。若

**基金项目:** 首都卫生发展科研专项重点攻关项目 (No. 首发 2024-1-4162)。

**作者简介:** 吴心玥, 女, 硕士, 主要从事风湿病的中医中药治疗, email: 421872432@qq.com \*通信作者: 张秦, 女, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事风湿病的中医中药治疗, email: qinzhang1974@126.com

以寒、湿偏盛，可用桂枝配伍防己，出自《金匮要略》木防己汤，其中桂枝辛热，解表散寒，擅通血脉，开结气，宣导诸气；且湿为阴邪，“当以温药和之”，故取其温通阳气之效，助防己利水化饮，开通经络。若患者不恶风，反自觉烦热，周老认为此为邪入少阳、湿热交争于表里之间，小柴胡汤主之。少阳经在半表半里之间，位同枢机，枢机不通则一身不通。小柴胡汤和解少阳，疏通三焦，宣通内外，交通上下，和畅气机，是初期通法集大成之方。

**2.1.2 通气和血药** 若以素体气虚为主，血为气载，以致血瘀，周老常用生黄芪-桂枝-生甘草之角药以达通脉透邪之功，取生黄芪益气固表之意，以增桂枝通经蠲痹、和营散风之效，取其升阳利水之意，与防己一升一降，使阴阳相贯、气营调达。若以血虚为主，则换桂枝为白芍，养血而不留瘀。生甘草是周老方中最常见的药物，除取其补气解毒、调和诸药的作用外，现代药理学也表明其所含甘草素、甘草黄酮、甘草酸等成分，能抑制炎症因子白细胞介素（IL）-1 $\beta$ 和肿瘤坏死因子- $\alpha$ （TNF- $\alpha$ ）的释放，具有抗炎、调节免疫的作用<sup>[5]</sup>。

## 2.2 中期祛痰瘀、通脏腑

由于失治误治，病理产物逐渐聚积，坚硬难化，关节肌肉肿痛加剧，范围更广，难以活动，兼有高热反复、局部皮肤青紫、乏力疲倦等脏腑内伤之象。周老言明风湿病进程中以痰火、瘀血阻塞经络为主时，宜一清经络瘀阻，一调脏腑虚实。

**2.2.1 化痰、祛瘀、通络药** 痰瘀阻络时，周老惯用多种药对通利经络关节，如炒白芥子配伍土鳖虫，其中炒白芥子入气分，疏通皮里膜外及经络筋骨间之痰结；土鳖虫入血分，消肿化瘀，通经止痛；两者相配可直达病所。且白芥子味辛性温，可化水饮积久所致脾肾虚寒；土鳖虫味咸性寒，能清久瘀所化血分热邪。全蝎、水蛭配伍破血逐瘀，推陈出新，剔除关节骨骼所附坚韧顽痰。此外还常单独应用乌梢蛇、地龙、蜂房等虫类药，认为此筋骨之沉痾痼疾，非虫蚁之走窜通透之力所不能达，虫类药易伤肝肾，故还需佐以补益肝肾之品防止其伤精燥血。现代药理研究也表明，虫类药能够打破免疫失衡，下调炎症因子及促炎因子的表达，参与凝血过程，改善微循环，防止破骨细胞过度分化，抑制外周与中枢对痛感的过敏反应，从而达到调节免疫、抗炎止痛、延缓疾病进程的效果<sup>[6]</sup>。

**2.2.2 疏肝、补肾、通腑药** 对于热结阳明、下

焦痞满者，用小承气汤之大黄-厚朴泄浊通下、消肿止痛。于寒痰化热、兼脾肾亏虚者，用薏苡附子败酱散之附子-薏苡仁，轻用附子匡扶阳气，重用薏苡仁利湿通腑排邪。于肝郁肾虚者，用巴戟天与绵萆薢配伍，两者均有祛风湿、强筋骨之功，巴戟天味辛甘性温，能温下焦之阳，绵萆薢味苦性平，能疏厥阴肝经，一补一泄，一以温为通，一以降为通。于热入血分者，用风引汤之生石膏-桂枝-大黄-干姜，其中生石膏与桂枝同用可引清热之力入血，通心经阳气，大黄荡涤痰热之痹阻，干姜温阳燥湿反佐，清热而不伤阳，寒而不凝。此外还常用香橼、佛手配伍疏肝和中，燥湿化痰；菖蒲、郁金配伍开窍豁痰，疏肝解郁；二陈汤、柴胡加龙骨牡蛎汤化裁以达疏肝健脾、泻热逐饮之功。

## 2.3 晚期通阳气、复阴精

若久病不治，发展到晚期，关节筋骨已损，耗竭阴阳，为难治或不治，精神萎靡，目涩血枯。命门火已衰，以致阴寒内生。《景岳全书》：“经曰：邪入于阴则痹，正谓此也。是以治痹之法，最宜峻补真阴，使血气流行，则寒邪遂去。若过用风湿痰滞等药，而再伤阴气，必反增其病矣”。周老亦强调此时不该再过用破血逐瘀、化痰消浊之品，会更伤元阴元阳，应先滋阴生火，恢复人体自身功能，正气津液得复，则络自通。

周老遣方重用辛温大热之品治疗风湿病晚期，以附子为君药，用量达 30 g，配伍蜂房取其收藏之力，以敛为通，封藏阴精；配伍肉桂取其味厚沉下之力，走守相合，以降为通；配伍白芍取其酸收寒敛解郁之力，交通阴阳，以和为通，《伤寒论》之通脉四逆汤、四逆散等均用此配伍，以治热郁于内，寒盛于外之证；配伍熟地黄取其滋阴之力，制约附子之火，缓和其燥性，同时熟地黄借附子走窜之性，使阴血通行，动静相依，阴阳双补。此外，还有仙茅配伍淫羊藿，补脾肾之阳，温通寒湿；阳和汤、乌头汤化裁通阳复脉、宣痹通络。其以“附子、肉桂、干姜、麻黄”等组成的经验成方“痹玉康”在临床中也被证实对中、晚期寒湿痹阻型风湿病的疗效良好<sup>[7]</sup>，在动物实验中也发现其可改善关节及关节间质炎性细胞浸润和软骨组织及骨膜增生、增厚<sup>[8]</sup>。现代研究证实，附子中的生物碱成分可多途径、多环节对机体起到镇痛、抗炎的作用，增强非特异性免疫功能<sup>[9-10]</sup>；网络药理学研究发现附子-白芍药对中，柚皮苷及芒柄花素的度值最高<sup>[11]</sup>。柚皮苷可



抑制 JAK2/STAT3 炎症通路的激活,该通路也是近年发现的类风湿关节炎发展中的重要通路,增加 Sema3A 的分泌,减少破骨细胞的生成、增殖,促进骨形成和骨吸收功能的作用<sup>[12-13]</sup>;芒柄花素具有抗肿瘤、抗脂质过氧化、清除氧自由基等作用<sup>[14]</sup>。皆为其用药疗效的佐证。

### 3 周乃玉教授“通法”临证验案举例

#### 3.1 “四通方”治“热痹”

患者 19 岁女性,双足疼痛间作 6 年,劳累及食用牛肉后发作,跖趾关节胀热,皮温升高,口唇干燥,心烦恶热,纳可,眠欠安,舌淡尖略红,苔白,脉弦滑。完善血尿酸检查未见升高,既往有先天性心脏瓣膜病变病史。中医诊断为热痹,辨证为心火亢盛、湿热瘀阻证,治以清热利湿、化瘀通络。中成药:三参通脉合剂 20 mL 每日两次联合清热养阴除湿丸 6 g 每日三次。中药方剂:土茯苓 30 g、穿山龙 30 g、肿节风 15 g、玄参 15 g、连翘 30 g、绵萆薢 15 g、青蒿 15 g、山药 10 g、防风 3 g、水红花子 15 g、五味子 3 g、仙鹤草 15 g、莲子心 3 g、醋延胡索 20 g、伸筋草 15 g、薤白 10 g,每日 1 剂,水煎温服 200 mL,每日两次;配合中成药三参通脉合剂 20 mL,每日两次;清热养阴除湿丸 6 g 每日三次;应用 14 d 后患者肿痛基本已消,阴阳气血皆通,且未再复发。

本患者肌肉热极,唇口干燥,筋骨痛不可按,此《内经》云“阳气多,阴气少,阳独盛”,故辨病为热痹。疼痛以热痛、夜间痛为主,伴舌尖红,脉弦滑,辨证属心火亢盛、湿热瘀阻证。《内经》谓:“厥阴有余,病阴痹;不足病生热痹”,故以连翘、莲子心泻心火之亢盛,则阴气复,以泻为通;患者既往有先天性心脏瓣膜病变病史,心乃君主之官,心包代心受邪,主不明则十二官危,故以五味子敛心气,以敛为通;三参通脉合剂益气养阴、活血化瘀,以化为通;薤白辛散苦降,温中通阳,以温为通;一泻一敛一化一温谓“四通”,以求补厥阴气之不足则热痹不生。明代医家秦景明在《症因脉治》云“此真高粱积热,足蹇挛,皆因高粱积热而起……即专用滋阴降火”;《内经》:“热淫于内,治以咸寒,佐以甘苦,以酸收之,以苦发之”,故以咸寒之玄参配伍苦味之穿山龙、绵萆薢、肿节风,甘淡之土茯苓,凉血清热、除湿解毒;且风能胜湿,选风中润剂防风祛风胜湿;湿热日久,灼筋炼血,血液凝滞,瘀而化热,脾主运化水湿,湿热瘀下注脾经,可见足第一跖趾关节热痛(脾经起于大指之端),故清热祛湿同时以醋

延胡索、水红花子活血逐瘀、伸筋草舒筋通络;湿热、瘀血日久郁而化热,故以辛香透散、苦寒清泄之青蒿清虚热、除实热;热痹日久耗伤气血,酌情加入平补肺脾肾三脏气阴之生山药,补虚强壮、补益气血之仙鹤草,并配伍清热养阴除湿丸以增强全方清热养阴、活血除湿、通络止痛之功。

#### 3.2 “三期三法”活“通痹”

患者 71 岁男性,全身多关节肿痛 2 年,于外院诊断为“类风湿关节炎”,予口服甲氨蝶呤片 10 mg qw 后出现肝功能异常,改予口服来氟米特 10 mg qd、甲泼尼龙 8 mg qd 联合雷公藤多苷片治疗后出现血糖难以控制及食欲不佳、消瘦,遂又停用。来就诊时仍存在双手指间关节及双膝关节疼痛,神弱,畏寒恶风,以双下肢为重,口干少津,食欲缺乏,眠欠安,半年体重下降 25 kg。舌暗红,苔黄白燥,脉弦滑。既往有 2 型糖尿病病史,血糖控制不佳。中医诊断为痹病,辨证为湿热痹阻、痰瘀阻络证。处方:土茯苓 30 g、穿山龙 30 g、威灵仙 10 g、板蓝根 15 g、连翘 30 g、绵萆薢 20 g、防风 3 g、山药 10 g、莲子心 3 g、土鳖虫 3 g、鬼箭羽 15 g、黄精 15 g、白芷 20 g、醋延胡索 30 g、伸筋草 15 g、鸡骨草 20 g,每日 1 剂,水煎温服 200 mL,每日两次,14 剂后全身关节疼痛明显减轻,但双下肢仍有畏寒恶风,苔由燥转腻。原方基础上,防风增至 5 g,去莲子心、黄精、伸筋草,加肉桂 10 g、五味子 5 g、焦鸡内金 15 g、苍术 15 g、厚朴 10 g、陈皮 10 g。28 剂后患者关节疼痛基本痊愈,血糖稳定,纳眠俱佳,恶风好转,仍遗留下肢畏寒。调整处方:黑附片 30 g、熟地黄 30 g、巴戟天 15 g、绵萆薢 20 g、防风 5 g、山药 10 g、鬼箭羽 15 g、白芷 20 g、醋延胡索 30 g、肉桂 10 g、五味子 5 g、怀牛膝 20 g、杜仲叶 10 g。每日 1 剂,水煎温服 200 mL 每日 2 次,14 d 后患者畏寒好转,阳气经络乃通。

本患者治疗经历可分为最初的发作期、中期的稳定期、晚期的恢复期。早期患者以全身关节肿痛难忍为主,急则治标,以祛邪通络为主,龚廷贤《济世全书》云:“周痹者,周身疼痛也,皆邪气有余之候也”,故方中以土茯苓为君药,配伍穿山龙、绵萆薢、醋延胡索、伸筋草、威灵仙、防风解毒祛邪、通利关节,连翘、板蓝根除湿通络、清热解毒,黄精、山药、莲子心泻南补北,逐瘀通络,急速缓解患者关节症状,又因患者既往服药后肝功能异常,佐以鸡骨草舒筋通络、未病防变。二诊患者急性肿痛基本痊愈,但仍存在脏腑

失衡，脾肾两虚，故畏寒、食欲缺乏，舌苔由燥转腻，故去黄精、去莲子心，加五味子补肾宁心，加肉桂引火归原，两者联用水火既济，各归其位；防风加量，因其为本经上品，取其愈风宁心之效；焦鸡内金，张锡纯谓其乃善化瘀积之要药，化其腻苔。陈士铎《辨证奇闻》云：“身上下作痛……然三焦不可轻治，宜兼治肾、肺、脾胃”，加苍术、厚朴、陈皮配伍原方山药健脾除湿，下气除满，改善纳食。三诊患者纳食恢复、血糖平稳，而畏寒依然顽固，表明其本有肝肾阳虚，故换用附子为君药，阳和汤加经典药对巴戟天-绵萆薢温阳通脉，熟地-怀牛膝-杜仲叶配伍壮阳暖肝。

#### 4 总结与展望

周乃玉教授论治风湿病具有丰富的临床经验，认为风湿病的辨治应该分三阶段而论，以通为顺，以通为和，早期气血不通，故外邪易犯，解表通络药与通气和血药的搭配能起到事半功倍的效果，常用防风配伍防己、桂枝配伍防己、黄芪配伍桂枝、柴胡剂，以阻止疾病入里传变；病至中期，所至之脏腑失和，病理产物逐渐壅塞经络，应在化痰逐瘀的基础上固护五脏，使脏腑功能调畅，使痰瘀不再生，虫类药的合用和单用具有极强的搜风刮络之效，如全蝎、水蛭、乌梢蛇、地龙、蜂房，同时注重疏肝补肾、泄热通腑等治法；病至后期，久病必耗损真阴真阳，阴精失藏，肾阳虚弱，重用辛温大热之附子先扶阳气，并佐以蜂房、白芍、熟地，使阴阳各归其位，往来通畅，补而不滞，藏而不泄。

周乃玉教授治疗风湿病在临床上收获了极佳的疗效，其诊疗思路也为许多医家及学子广泛传承及发扬，但从现代医学的疗效评价体系以及中医文化向国际的推广角度来看，仍缺乏系统规范的大样本临床数据支持，其经验及思想是中医风湿病领域宝贵的财富，值得更进一步地挖掘并用实验数据论证。

#### 参考文献

- [1] 陈爱萍, 张秦. 周乃玉教授从脾论治干燥综合征经验总结 [A]/ 基层医疗机构从业人员科技论文写作培训会议论文集 [C]. 北京: 中国中药杂志, 2016: 2.
- [2] 谢幼红, 王北. 周乃玉治疗痛风的经验 [J]. 北京中医, 2006, 25 (6): 339-340.
- [3] 龚蓓, 赵福涛, 苏励, 等. 论“营卫留止”对风湿免疫疾病证治的启示 [J]. 上海中医药杂志, 2023, 57 (12): 64-66.
- [4] 邵培培, 杨卫彬, 谢幼红, 等. 基于关联规则和复杂系统熵聚类的周乃玉教授治疗类风湿关节炎的用药规律 [J]. 风湿病与关节炎, 2018, 7 (5): 16-21.
- [5] 王波, 王丽, 刘晓峰, 等. 中药甘草成分和药理作用及其现代临床应用的研究进展 [J]. 中国医药, 2022, 17 (2): 316-320.
- [6] 鲁善为, 李松伟. 虫类药治疗类风湿关节炎作用机制研究进展 [J]. 陕西中医, 2024, 45 (3): 427-429.
- [7] 张秦, 谢幼红, 王北, 等. “痹玉康 I 号”方治疗类风湿关节炎 (RA) 中晚期寒湿痹阻证患者疗效观察 [J]. 内蒙古中医药, 2012, 31 (3): 3-4.
- [8] 顾文, 毕聪玥, 温博, 等. 痹玉康 I 号干预 CIA 模型大鼠关节炎症病理损伤的实验研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2020, 15 (12): 2231-2235, 2240.
- [9] 梁小雨, 石玉姣, 刘永成, 等. 附子药理作用机制及减毒增效技术的研究进展 [J]. 环球中医药, 2024, 17 (7): 1428-1439.
- [10] 薛利娟, 王喆, 澈力木格, 等. 乌头属植物的药理毒理学机制研究进展 [J]. 内蒙古医学杂志, 2024, 56 (11): 1336-1339.
- [11] 张林华. 基于数据挖掘的中医治疗风湿病临床用药规律与作用机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [12] 王文驰, 武瑞骐, 黄杰荣, 等. 柚皮苷防治骨质疏松症的分子机制 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28 (34): 5528-5535.
- [13] 金环, 何紫移, 沈霖, 等. 柚皮苷介导成骨细胞促进骨形成的机制研究进展 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2024, 32 (8): 92-96.
- [14] 王健, 孙瑜, 陈磊, 等. 芒柄花素的现代研究进展 [J]. 山西中医学院学报, 2017, 18 (5): 74-77.

(收稿日期: 2024-12-09; 修回日期: 2025-03-15)

## 医院药学

## 临床药师干预对 ICU 处方环节用药错误的影响

陈凡<sup>1</sup>, 胡述立<sup>2</sup>, 刘杨从<sup>1</sup>, 张韶辉<sup>1\*</sup> (武汉市第一医院, 1.药学部; 2.重症医学科, 武汉 430022)

**摘要:** **目的** 探讨临床药师干预对重症监护病房 (ICU) 处方环节用药错误的影响。**方法** 以 2022 年 1—6 月及 2023 年 1—6 月武汉市第一医院 ICU 住院患者为研究对象, 根据临床药师是否执行干预措施分为对照组和干预组, 选择性别、年龄、体重、ICU 住院天数等变量对对照组与干预组患者按 1:1 的比例进行倾向性评分匹配 (PSM)。以用药错误发生率为结局指标, 比较两组患者 PSM 前后用药错误发生率。**结果** 共纳入 777 例患者, 对照组 361 例, 其中发生处方环节用药错误 216 例; 干预组 416 例, 其中发生处方环节用药错误 119 例。两组患者用药错误发生率在 PSM 前后差异均具有统计学意义 [59.8% (216/361) vs 28.6% (119/416),  $P < 0.01$ ; 59.8% (216/361) vs 28.0% (101/361),  $P < 0.01$ ]。用药错误类型主要为给药剂量错误 (32.4%)、药物选择错误 (21.4%) 及治疗疗程错误 (17.4%)。**结论** 临床药师干预能显著减少 ICU 处方环节用药错误的发生。

**关键词:** 处方环节用药错误; 重症监护病房; 临床药师

中图分类号: R965.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)06-1794-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.045

## Effect of pharmacist intervention on medication errors in prescriptions in the intensive care unit

CHEN Fan<sup>1</sup>, HU Shu-li<sup>2</sup>, LIU Yang-cong<sup>1</sup>, ZHANG Shao-hui<sup>1\*</sup> (1. Department of Pharmacy, 2. the Intensive Care Unit, Wuhan No. 1 Hospital, Wuhan 430022)

**Abstract:** **Objective** To determine pharmacist intervention on medication errors in prescriptions in the intensive care unit (ICU). **Methods** The hospitalized patients in the ICU of Wuhan No. 1 Hospital from January to June 2022 and from January to June 2023 were divided into a control group and an intervention group according to whether clinical pharmacists intervened. Propensity score matching (PSM) was performed for gender, age, weight, and hospital stay, etc. in a 1:1 ratio in both groups. Taking medication errors as the outcome index, the incidence of medication errors in both groups before and after the PSM were compared. **Results** Totally 777 patients were included, 361 patients were in the control group, and prescription medication errors occurred in 216 patients. There were 416 patients in the intervention group, and prescription medication errors occurred in 119 patients. The difference in the incidence of medication errors in prescription between both groups was significant before or after the PSM [59.8%(216/361) vs 28.6%(119/416),  $P < 0.01$ ; 59.8%(216/361) vs 28.0%(101/361),  $P < 0.01$ ]. The main types of medication errors included dosage errors (32.4%), drug selection errors (21.4%) and treatment course errors (17.4%). **Conclusion** Clinical pharmacist intervention can greatly reduce the occurrence of medication errors in prescriptions in the ICU.

**Key words:** medication error in prescription; intensive care unit; clinical pharmacist

**基金项目:** 武汉药学会第二届医院药学科发展项目孵化营课题 (No.WHPA202305006)。

**作者简介:** 陈凡, 男, 主管药师, 主要从事重症医学临床药学实践研究, email: 251181479@qq.com \* **通信作者:** 张韶辉, 女, 副主任药师, 主要从事抗凝药物治疗研究, email: zshjmu@hotmail.com



用药错误 (medication error, ME) 是指药品在临床使用及管理全过程中出现的、任何可以防范的用药疏失, 这些疏失可导致患者发生潜在的或直接的损害<sup>[1]</sup>。用药错误可能给患者带来严重伤害并导致巨大经济损失, 2022 年 7 月, 国家医政医管局发布《关于进一步加强用药安全管理提升合理用药水平的通知》, 要求医疗机构降低用药错误风险, 提高用药安全水平<sup>[2]</sup>。在医疗机构内, 重症监护病房 (Intensive Care Unit, ICU) 患者用药错误发生率更高, 且显著增加死亡率和医疗成本<sup>[3-5]</sup>。Benkirane 等<sup>[6-7]</sup>的研究发现, ICU 用药错误主要发生于处方环节。我国临床安全用药监测网 2022 年年度报告显示, 全国上报的用药错误主要是由药师发现上报 (74.7%)<sup>[8]</sup>。作为临床治疗团队的重要成员, 临床药师参与药物治疗管理和患者教育可以降低患者病死率, 减少用药错误并降低医疗成本<sup>[5]</sup>。国内未见临床药师干预对 ICU 用药错误影响的相关研究, 本研究探索临床药师干预对 ICU 处方环节用药错误的影响, 研究方案通过武汉市第一医院医学伦理委员会批准 (伦理批件号: 武卫一院伦审 [2023]17 号)。

## 1 资料与方法

### 1.1 用药错误评估方法

按照指南<sup>[1]</sup>, 临床药师采取病历审查的方法评估处方环节用药错误: 根据药品使用说明书、权威书籍、高级别期刊文献及相关临床诊疗指南等文件, 结合 ICU 患者病情对用药医嘱进行审查, 发现用药错误时与医师沟通, 修正医嘱并记录, 评估用药错误造成后果的严重程度。处方环节用药错误具体类型分为药物选择错误、药物剂型选择错误、药物剂量错误、治疗疗程错误、给药频次错误等<sup>[9]</sup>。用药错误造成后果的严重程度归纳为 4 个层级: 第一层级, 错误尚未发生 (存在隐患); 第二层级, 发生错误, 但尚未对患者造成伤害; 第三层级, 发生错误且对患者造成伤害; 第四层级, 发生错误, 造成患者死亡。

### 1.2 研究分组及干预

对照组: 2022 年 1—6 月期间在 ICU 病区住院的患者, 临床药师对用药医嘱进行审查, 与医师沟通用药错误, 但此期间不执行干预措施; 干预组: 2023 年 1—6 月期间在 ICU 病区住院的患者, 临床药师对用药医嘱进行审查, 与医师沟通用药错误, 且此期间执行干预措施 (研究期间患者入科时进行药物重整、对医护进行用药错误宣教及药物知识培训、完善信息化管控)。

入组标准: ICU 住院时间  $\geq 1$  d, 在 24 h 内办理

ICU 出院后再入院的患者计 1 次住院。排除标准: 非临床药师工作日期间收入 ICU 且转出 ICU 的患者。

### 1.3 基线指标及评价指标

纳入基线指标包括性别、年龄、体重、ICU 住院天数、急性生理学及慢性健康状况评分 (APACHE II 评分) 等。评价指标为用药错误发生率。同一患者在 ICU 治疗期间可能发生一次或多次用药错误, 用药错误发生率定义为发生用药错误的患者人数占纳入总人数的比例。

### 1.4 统计学处理

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料采用 ( $\bar{x} \pm s$ ) 描述, 组间比较采用  $t$  检验; 非正态分布采用中位数及上下四分位数  $M (Q1, Q3)$  表示, 组间比较采用 Mann-Whitney 检验; 计数资料采用频数和百分数表示, 组间比较采用卡方检验或 Fisher 检验; 选择性别、年龄、体重、ICU 住院天数等变量对对照组与干预组患者按 1:1 的比例进行倾向评分匹配 (propensity score matching, PSM), 比较两组患者 PSM 前后的用药错误发生率。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 用药错误发生的基本情况及其发生率

2022 年 1—6 月和 2023 年 1—6 月 ICU 总住院人数为 832 例次, 根据纳入和排除标准共 777 例患者纳入研究, 平均年龄 69 岁, 男性患者 525 例 (67.6%), 女性患者 252 例 (32.4%), 对照组和干预组分别纳入 361 例和 416 例。发生用药错误  $\geq 1$  次的患者共 335 例。

PSM 前两组患者肾功能不全、合并慢性疾病及长期服用药物史的均衡性较差 ( $P < 0.05$ ), PSM 后两组间各项基线指标更为均衡 ( $P > 0.05$ )。对照组发生用药错误  $\geq 1$  次的患者 216 例 (59.8%), 干预组 119 例 (28.6%), 差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 76.849, P < 0.01$ )。PSM 后对照组和干预组用药错误发生率分别为 59.8% 和 28.0%, 差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 74.374, P < 0.01$ )。具体情况见表 1。

### 2.2 用药错误类型及严重程度

本院 ICU 住院患者多是高龄患者, 肝肾功能不全比例较高, 且常合并有慢性疾病及长期服药史, 发生用药错误  $\geq 1$  次的 335 例患者具体用药错误共计 407 次, 主要用药错误发生类型为给药剂量错误 132 例 (32.4%)、药物选择错误 87 例 (21.4%)、治疗疗程错误 71 例 (17.4%)、药物剂型选择错误 45 例 (11.1%)、给药频次错误 39 例

表 1 患者倾向性评分匹配前后基线临床特征及处方环节用药错误发生率

Tab 1 Baseline clinical characteristics of patients and incidence of medication errors in the prescription before and after propensity score matching

| 临床特征                               | 倾向性评分匹配前         |                  |                      |        | 倾向性评分匹配后         |                  |                      |        |
|------------------------------------|------------------|------------------|----------------------|--------|------------------|------------------|----------------------|--------|
|                                    | 对照组<br>(n = 361) | 干预组<br>(n = 416) | 统计值                  | P 值    | 对照组<br>(n = 361) | 干预组<br>(n = 361) | 统计值                  | P 值    |
| 性别 [n (%)]                         |                  |                  | 0.827 <sup>a</sup>   | 0.363  |                  |                  | 2.320 <sup>a</sup>   | 0.128  |
| 男性                                 | 238 (65.9)       | 287 (69.0)       |                      |        | 238 (65.9)       | 257 (71.2)       |                      |        |
| 女性                                 | 123 (34.1)       | 129 (31.0)       |                      |        | 123 (34.1)       | 104 (28.8)       |                      |        |
| 年龄 [岁, $\bar{x} \pm s$ ]           | 70 $\pm$ 16      | 69 $\pm$ 16      | 0.785 <sup>b</sup>   | 0.433  | 70 $\pm$ 16      | 70 $\pm$ 15      | - 0.451 <sup>b</sup> | 0.652  |
| 体重 [kg, $\bar{x} \pm s$ ]          | 64.4 $\pm$ 7.2   | 65.5 $\pm$ 10.3  | - 1.721 <sup>b</sup> | 0.086  | 64.4 $\pm$ 7.2   | 65.0 $\pm$ 10.3  | - 0.891 <sup>b</sup> | 0.373  |
| ICU 住院天数 [d, M (Q1, Q3)]           | 6 (4, 11)        | 8 (4, 12)        | - 1.696 <sup>c</sup> | 0.090  | 6 (4, 11)        | 8 (4, 12)        | - 1.919 <sup>c</sup> | 0.055  |
| APACHE II 评分 [分, $\bar{x} \pm s$ ] | 23 $\pm$ 8       | 24 $\pm$ 8       | - 0.753 <sup>b</sup> | 0.452  | 23 $\pm$ 8       | 24 $\pm$ 8       | - 0.696 <sup>b</sup> | 0.487  |
| 肾功能不全 [n (%)]                      | 179 (49.6)       | 236 (56.7)       | 3.967 <sup>a</sup>   | 0.046  | 179 (49.6)       | 200 (55.4)       | 2.449 <sup>a</sup>   | 0.118  |
| 肝功能不全 [n (%)]                      | 135 (37.4)       | 154 (37)         | 0.012 <sup>a</sup>   | 0.914  | 135 (37.4)       | 136 (37.7)       | 0.006 <sup>a</sup>   | 0.939  |
| 合并慢性疾病 [n (%)]                     | 338 (93.6)       | 363 (87.3)       | 8.885 <sup>a</sup>   | 0.003  | 338 (93.6)       | 332 (92.0)       | 0.746 <sup>a</sup>   | 0.388  |
| 长期服用药物史 [n (%)]                    | 334 (92.5)       | 360 (86.5)       | 7.250 <sup>a</sup>   | 0.007  | 334 (92.5)       | 330 (91.4)       | 0.300 <sup>a</sup>   | 0.584  |
| 处方环节用药错误发生率 [n (%)]                | 216 (59.8)       | 119 (28.6)       | 76.849 <sup>a</sup>  | < 0.01 | 216 (59.8)       | 101 (28.0)       | 74.374 <sup>a</sup>  | < 0.01 |

注 (Note): <sup>a</sup>.  $\chi^2$ ; <sup>b</sup>.  $t$ ; <sup>c</sup>.  $Z$ .

(9.6%) 及其他用药错误 33 例 (8.1%)。给药剂量错误主要涉及抗感染药物, 未根据患者肝功能、肾功能、体重及治疗过程中病理生理变化等正确制订和调整药物剂量 (如肾功能不全患者万古霉素未根据内生肌酐清除率或肾替代治疗模式调整剂量), 可能会导致药品不良反应及细菌耐药风险增加。药物选择错误涉及药物较多, 如抗菌药物、抗血小板药物、护肝护胃药物等, 主要原因是医师对药物组织分布特点、药品不良反应及药物相互作用等知识掌握不够 (如念珠菌性膀胱炎患者选择卡泊芬净抗感染治疗); 疗程错误主要是用药疗程过长, 未注意药品说明书规定疗程以及缺乏对药物治疗的评估 (如急性呼吸窘迫综合征患者连续使用注射用西维来司他钠超过 14 d); 药物剂型选择错误和给药频次错误主要涉及鼻饲药物及抗菌药物, ICU 患者以静脉药物治疗为主, 口服药物主要通过鼻饲给药, 由于对缓控释制剂、肠溶制剂等药物剂型特点认识不足导致用药错误, 给患者治疗带来风险 (如选择硝苯地平控释片、美托洛尔缓释片等缓控释制剂鼻饲给药); 同时因为对抗菌药物药代动力学 / 药效动力学知识不熟悉, 未能结合患者病理生理状态及药物特点制订药物最佳用法用量 (如浓度依赖性抗菌药物左氧氟沙星、阿米卡星每日 2 次给药)。其他处方环节用药错误主要包括药物溶媒选择及用量错误、遗漏错误、重复用药等 (如注射用两性霉素 B 选用生理盐水稀释而产生沉淀)。

严重程度分级结果显示, ICU 用药错误以第

二层级 (发生错误但尚未造成患者伤害) 为主, 共 428 例 (94.9%), 其次为第三层级 (发生错误且造成患者伤害), 共 23 例 (5.1%), 未发生用药错误导致的患者死亡事件。

3 讨论

用药错误可发生于药物使用及管理中的任一环节, 如处方环节、药品调剂与分发、给药环节、用药指导环节等。目前减少用药错误发生风险的措施包括使用计算机辅助医嘱系统和临床决策支持系统、药品智能化调配与传输系统、条形码技术和智能输液泵、安全用药文化建设、加强岗位培训及完善工作流程等<sup>[1, 10-11]</sup>。作为临床治疗团队的重要成员, 临床药师在降低用药错误风险和降低医疗费用方面发挥着重要作用<sup>[5]</sup>。临床药师参与药物治疗和管理是减少用药错误的关键环节, 临床药师可以通过对患者入科及出科时药物重整与用药教育、协助医师正确开具处方、协助护士优化给药流程等方面减少用药错误, 且高水平的临床药师可以发现平时临床未被发现的用药错误<sup>[12-16]</sup>。

本研究分析 ICU 处方环节常见用药错误类型, 探讨临床药师干预对处方环节用药错误的影响。临床药师在总结对照组患者处方环节用药错误特点后制订了相应的干预措施。针对遗漏错误、重复用药等问题, 在患者入科阶段, 临床药师进行药物重整并制订标准化流程和规范化记录文档。临床药师通过查阅医院信息系统病程记录、对患者或其监护人的药学问诊等途径收集患者具体用药史, 制订入科最佳用药清单并记录, 协助

医师制订和调整用药方案。

对于药物选择、用法用量及用药疗程等用药错误,临床药师制订 ICU 易出错药品合理使用参考资料,包括特殊患者(如肾功能不全及肾替代治疗、肝功能不全、药物过敏、近期饮酒患者等)的药物选择及用法用量表、ICU 常用不可碾碎鼻饲药品及替代药品表、ICU 特殊静脉输注药品配制及使用注意事项表(包括需要避光、输注时间要求、溶媒及浓度要求)等,并定期更新,供医护参考。

为提高医护对用药错误的认识和用药水平,临床药师定期在 ICU 医师、护士科室业务学习时进行近期用药错误问题总结分析宣讲及药物知识培训,加强医师、护士及药师的沟通交流,增强医护对用药错误的认识,倡导安全用药文化,掌握发生用药错误药品的使用方法及防范措施,学习科室新进药品的信息,共同防范用药错误的发生。

最后,临床药师实时完善信息化管控。一项系统评价和荟萃分析显示,计算机辅助医嘱系统和临床决策支持系统的应用使 ICU 患者处方错误发生率和死亡率分别降低了 85% 和 12%<sup>[17]</sup>。信息化管控可以使安全用药事半功倍,临床药师整理了本院 ICU 常用药品目录,结合用药错误问题对重点药品特殊使用要求(溶媒要求、滴注时间、配伍禁忌等)录入临床决策支持系统,在医师开具相应药物的不合理医嘱时弹框提醒或拦截,减少类似用药错误发生。

综上所述,临床药师参与 ICU 用药错误管控后,处方环节用药错误发生率显著降低,说明临床药师参与 ICU 用药错误管控是有益的,能显著降低用药错误的发生率,但研究也存在不足,评价指标仅有用药错误发生率,对临床结局的影响(如 ICU 住院时间、医疗费用、死亡率等)有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] 合理用药国际网络中国中心组临床安全用药组,中国药理学学会药源性疾病学专业委员会,中国药学会医院药学专业委员会,等.中国用药错误管理专家共识[J].药物不良反应杂志,2014,16(6):321-326.
- [2] 国家卫生健康委,国家中医药局.关于进一步加强用药安全管理提升合理用药水平的通知(国卫医函[2022]122号)[EB/OL].(2022-07-27)[2024-07-14].[https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2022-07/30/content\\_5703604.htm](https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2022-07/30/content_5703604.htm).
- [3] Suclupe S, Martinez-Zapata MJ, Mancebo J, et al. Medication errors in prescription and administration in critically ill patients[J]. J Adv Nurs, 2020, 76(5): 1192-1200.
- [4] Dionisi S, Giannetta N, Liquori G, et al. Medication errors in Intensive Care Units: an umbrella review of control measures[J]. Healthcare (Basel), 2022, 10(7): 1221.
- [5] Arredondo E, Udeani G, Horseman M, et al. Role of clinical pharmacists in Intensive Care Units[J]. Cureus, 2021, 13(9): e17929.
- [6] Benkirane RR, Abouqal R, Haimeur CC, et al. Incidence of adverse drug events and medication errors in Intensive Care Units: a prospective multicenter study[J]. J Patient Saf, 2009, 5(1): 16-22.
- [7] Escrivá Gracia J, Aparisi Sanz Á, Brage Serrano R, et al. Medication errors and risk areas in a Critical Care Unit[J]. J Adv Nurs, 2021, 77(1): 286-295.
- [8] 张青霞,白向荣,王子民,等.全国临床安全用药监测网年度报告(2022年)[J].药物不良反应杂志,2023,25(7):389-397.
- [9] 合理用药国际网络中国中心组临床安全用药组,中国药理学学会药源性疾病学专业委员会,中国药学会医院药学专业委员会,等.处方环节用药错误防范指导原则[J].药物不良反应杂志,2017,19(2):84-88.
- [10] 马丽萍,文程,左晓霞,等.医疗机构用药错误防范系统构建策略[J].中国合理用药探索,2021,18(9):6-10.
- [11] 柳鹏程,朱珠,刘芳.医疗机构药物警戒体系建设专家共识[J].中国药物应用与监测,2022,19(3):135-144.
- [12] 马翔,彭文星,杨莉,等.药师参与是减少用药错误的关键环节[J].药品评价,2014,11(12):13-17,27.
- [13] Wang Y, Zhang XT, Hu X, et al. Evaluation of medication risk at the transition of care: a cross-sectional study of patients from the ICU to the non-ICU setting[J]. BMJ Open, 2022, 12(4): e049695.
- [14] McCarthy S, Laaksonen R, Silviri V. Transition of care from adult intensive care settings-implementing interventions to improve medication safety and patient outcomes[J]. BMJ Qual Saf, 2022, 31(8): 565-568.
- [15] Bosma LBE, Hunfeld NGM, Quax RAM, et al. The effect of a medication reconciliation program in two intensive care units in the Netherlands: a prospective intervention study with a before and after design[J]. Ann Intensive Care, 2018, 8(1): 19.
- [16] Bourne RS, Jennings JK, Panagioti M, et al. Medication-related interventions to improve medication safety and patient outcomes on transition from adult intensive care settings: a systematic review and meta-analysis[J]. BMJ Qual Saf, 2022, 31(8): 609-622.
- [17] Prgommet M, Li L, Niazkhani Z, et al. Impact of commercial computerized provider order entry (CPOE) and clinical decision support systems (CDSSs) on medication errors, length of stay, and mortality in intensive care units: a systematic review and meta-analysis[J]. J Am Med Inform Assoc, 2017, 24(2): 413-422.

(收稿日期:2024-07-20;修回日期:2024-09-20)



# 基于中国医院药物警戒系统评价甲氨蝶呤治疗 类风湿关节炎的安全性

苏桂玉<sup>1</sup>, 蔡丽萍<sup>1\*</sup>, 韩一波<sup>1</sup>, 梁建敏<sup>1</sup>, 曾忠荣<sup>1</sup>, 石振华<sup>2</sup> (1. 北海市人民医院药剂科, 广西 北海 536000; 2. 北海市食品药品安全信息与监控中心, 广西 北海 536000)

**摘要:** **目的** 借助中国医院药物警戒系统 (CHPS) 的真实世界数据, 评价某院甲氨蝶呤 (MTX) 用于类风湿关节炎治疗的安全性, 并分析 MTX 相关药品不良反应 (ADR) 的发生情况及影响因素。**方法** 基于 CHPS 平台, 对我院 2016 年 1 月至 2023 年 12 月使用 MTX 的类风湿关节炎住院患者进行单中心回顾性主动监测, 药师对系统监测病例进行评定, 获得 MTX 用于类风湿关节炎的 ADR 发生率, 并对 ADR 按患者性别、年龄、体重、给药剂型、用法用量、ADR 累及的器官或系统、发生时间、转归等进行统计分析, 同时对其影响因素进行分析。**结果** 系统共回顾性监测了 202 例使用 MTX 的类风湿关节炎患者, 排除后共纳入 161 例病例, 51 例出现 ADR, ADR 发生率为 31.68%, 其中严重的 ADR 发生率为 4.35% (7/161)。发生 ADR 的患者年龄为 (60.22±10.78) 岁。ADR 临床表现主要为血液系统损伤, 占 36.77%; 其次是肝功能损伤, 占 33.82%; 胃肠损伤占 14.71%。多因素 Logistic 回归分析显示, MTX 联合来氟米特是类风湿关节炎患者使用 MTX 发生 ADR 的独立影响因素。此外, 肾小球滤过率与药品不良反应的发生率成负相关 ( $\beta = -0.014$ ), 但这种关联性差异无统计学意义 ( $P = 0.058$ )。**结论** 低剂量使用 MTX 治疗类风湿关节炎时, ADR 大部分为轻微, 但仍需关注其潜在的严重性。同时建议临床医师若需要 MTX 联合来氟米特治疗类风湿关节炎, 需更密切关注肝功能损伤及血液系统等不良反应, 并评估其肾功能状态, 以确保治疗的安全性并降低不良反应的风险。

**关键词:** 甲氨蝶呤; 类风湿关节炎; 药品不良反应; 中国医院药物警戒系统

**中图分类号:** R952, R969.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)06-1798-07  
**doi:** 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.046

## Safety of methotrexate for rheumatoid arthritis based on China Hospital Pharmacovigilance System

SU Gui-yu<sup>1</sup>, CAI Li-ping<sup>1\*</sup>, HAN Yi-bo<sup>1</sup>, LIANG Jian-min<sup>1</sup>, ZENG Zhong-rong<sup>1</sup>, SHI Zhen-hua<sup>2</sup> (1. Department of Pharmacy, People's Hospital of Beihai, Beihai Guangxi 536000; 2. Food and Drug Safety Information and Monitoring Center of Beihai, Beihai Guangxi 536000)

**Abstract: Objective** To evaluate the safety of methotrexate (MTX) for rheumatoid arthritis and analyze the occurrence and influencing factors of related adverse drug reactions (ADRs) with data from the China Hospital Pharmacovigilance System. **Methods** Utilizing the CHPS platform, we actively monitored hospitalized patients with rheumatoid arthritis who were given methotrexate between January 2016 and December 2023 in a single-center retrospective way. The system monitored cases were assessed by two pharmacists to obtain the incidence of ADRs induced by MTX in patients with rheumatoid arthritis. Variables including gender, age, body weight, administration type, usage and dosage, affected organs/systems by ADRs, time of occurrence, prognosis, and influence factors were analyzed. **Results** Totally 202 patients with rheumatoid arthritis who were given MTX were retrospectively monitored. 161 of whom were included. Totally 51 patients (31.68%) experienced ADRs, with a severe ADR incidence rate of 4.35% (7/161). The patients with ADRs was

**基金项目:** 广西北海市科技计划项目 (No. 北科合 20210201Z)。

**作者简介:** 苏桂玉, 女, 主管药师, 主要从事临床药学工作, email: 175055880@qq.com \***通信作者:** 蔡丽萍, 女, 副主任药师, 主要从事临床药学工作, email: 352512070@qq.com

(60.22±10.78) years old. The primary outcomes of ADRs cases included hematological damage (36.77%), hepatic damage (33.82%), and gastrointestinal damage (14.71%). A multifactorial Logistic regression identified the combination of MTX and leflunomide as an independent determinant of fever-related ADRs in patients with rheumatoid arthritis undergoing MTX treatment. Furthermore, the glomerular filtration rate (GFR) showed a negative correlation with the incidence of ADRs ( $\beta = -0.014$ ), but without statistical significance ( $P = 0.058$ ). **Conclusion** In the administration of low dose MTX for rheumatoid arthritis, most ADRs tend to be mild; nonetheless, their potential severity needs consideration. Clinicians should closely monitor liver function and hematological reactions and assess patients' renal function in the combined use of MTX and leflunomide for rheumatoid arthritis, to ensure the safety of treatment and to mitigate the risk of ADRs.

**Key words:** methotrexate; rheumatoid arthritis; adverse drug reaction; China Hospital Pharmacovigilance System

20 世纪 80 年代末以来, 甲氨蝶呤 (methotrexate, MTX) 被广泛用于治疗类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA)。目前, MTX 是 RA 初始治疗的首选药物。我国 MTX 治疗 RA 平均使用率为 55.9%<sup>[1]</sup>, 而欧美平均使用率达 83%<sup>[2]</sup>。RA 指南推荐常用剂量为 7.5 ~ 20 mg/周<sup>[3-4]</sup>。经过几十年的临床应用, 发现长期使用低剂量 MTX 也会导致许多不良反应, 如呕吐、恶心、腹泻、骨髓抑制、肝功能损伤、肾功能损伤、肺部症状、黏膜炎、口炎、胃肠溃疡和皮肤溃疡等<sup>[5-6]</sup>。中国医院药物警戒系统 (China Hospital Pharmacovigilance System, CHPS), 是由国家药品不良反应监测中心主导开发的一个信息化平台。该系统旨在协助监测哨点单位在药物和医疗器械领域内发现、上报、评估不良反应 (ADR) / 不良事件 (ADE), 同时支持开展重点监测工作和上市后的研究活动, 以便于收集和获取药物警戒相关的信息。本文以 CHPS 药品评价系统模块的真实世界数据为依据进行探索, 对我院 MTX 用于 RA 患者开展回顾性监测并进行安全性评价, 以期临床用药提供参考。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

选择我院 2016 年 1 月至 2023 年 12 月所有使用 MTX 的 RA 住院患者的资料, 回顾性分析患者用药情况、不良反应发生率、不良反应类型及影响因素。笔者通过专家咨询法制订纳入排除标准。纳入标准: ① 确诊为 RA 的住院患者<sup>[7]</sup>; ② 入院后拥有完整的医疗记录、实验室检测结果及临床治疗信息; ③ 在院治疗及出院时需使用 MTX 治疗的患者。排除标准: ① 患者的基本情况、诊断资料、医嘱记录、病程记录等信息不全; ② 出院后未再使用 MTX 的患者; ③ 出院后未再到我院复查的患者; ④ 肝炎及血液性疾病的患者。本研究经北海市人民医院伦理委员会审核批准 [伦理审批号: 北医 (伦

申) 2021 第 033 号]。本研究仅对患者的诊断和治疗数据进行回顾性汇总, 未进行随访, 且已获得伦理委员会批准, 免除所有患者的知情同意。

### 1.2 方法

基于 CHPS 中的药品评价系统模块, 根据美国食品药品监督管理局 (FDA) 药品说明书<sup>[8]</sup> 及指南<sup>[9]</sup> 中提到的 MTX 相关各个器官 / 系统 ADR 的特点, 参照我国药品不良反应监测体系中应用世界卫生组织 (WHO) 不良反应术语集<sup>[10]</sup> 通过审查病历中关于药品不良反应的描述记录, 结合血液系统、肝功能、肾功能损伤等相关的实验室指标, 同时依据针对骨髓抑制、肝功能损伤的对症用药医嘱, 以及运用“停用”“不良反应”等关键词与“甲氨蝶呤”进行组合检索, 结合布尔逻辑和纳入排除标准 (如纳入确诊为 RA 的住院患者, 排除血液性疾病及肝炎的患者), 构建了针对 MTX 相关 ADR 的主动监测模型。由两名临床药师逐一收集了调查时间段内住院患者使用 MTX 的 RA 患者病例的临床资料: 包括性别、年龄、体重、身高、给药剂型、给药途径、用药剂量、血清肌酐、血清白蛋白、合并疾病、合并用药以及药品不良反应等信息。所有收集到的资料均经过人工复核, 以确保数据的准确性和一致性。在数据处理过程中, 对于重复住院的患者, 仅将其作为 1 例纳入分析。如果患者用药之前已有肝肾功能异常、胃肠道损伤、皮疹、间质性肺炎等, 用药后没有加重、没有新发症状就不算不良反应。

### 1.3 ADR 关联性评价标准

由 CHPS 中筛查出来的阳性病例, 两名临床药师一起核对, 意见不一致时由研究成员共同讨论。依据《药品不良反应报告和监测管理办法》<sup>[11]</sup> 及诺氏评估量表<sup>[12]</sup> 对 ADR 与药物的关联性进行评价, 根据药品 ADR/ADE 关联性评价的五条标准及诺氏评估量表得出的分值, 将评价结果为“可能”“很可能”“肯定”的情况, 判定为药物所致 ADR。将

药物引起的 ADR 病例定义为病例组，排除阳性病例，剩余所有符合纳入条件的病例定义为对照组。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 26.0 软件进行数据处理与分析。计数资料采用例数（百分比） $[n(\%)]$  表示，组间比较采用  $\chi^2$  检验。符合正态分布的计量资料采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，采用  $t$  检验来进行组间差异的比较；不符合正态分布的计量资料以  $M(P_{25}, P_{75})$  表示，组间比较采用秩和检验。采用多因素 Logistic 回归分析法分析 MTX 致 ADR 的危险因素。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 用药人群及 ADR 发生率

2016 年 1 月至 2023 年 12 月监测期间，共有 202 例 RA 患者使用 MTX，排除 41 例（其中 25 例出院后未再来我院就诊复查，9 例出院后未再服用

MTX，7 例为乙型肝炎患者）后共 161 例类风湿关节炎患者使用 MTX 纳入本研究。所有纳入的患者中 2 例使用 MTX 的剂量是 7.5 mg qw，95 例使用剂量是 10 mg qw，56 例使用剂量是 12.5 mg qw，7 例使用剂量是 15 mg qw，1 例使用剂量是 20 mg qw，均符合指南<sup>[3-4]</sup>推荐的常用剂量即 7.5 ~ 20 mg/周。纳入的所有患者不存在 MTX 禁忌用药情况。最终经过两名药师评价确定 RA 患者使用 MTX 出现相关 ADR 共 51 例，MTX 致 ADR 发生率为 31.68%。

2.2 ADR 累及的系统 / 器官及主要临床表现

参照《WHO 药品不良反应术语集》<sup>[13]</sup>，对报告中的 ADR 表现按系统分类进行规整和统计。在 51 例 MTX 相关 ADR 中，共记录 68 例次涉及不同系统 / 器官的临床表现。最常见的 ADR 为血液系统损伤，出现 25 例次，其次是肝功能损伤（23 例次），胃肠损伤（10 例次）等。详见表 1。

表 1 MTX 发生 ADR 涉及的器官 / 系统及临床表现

Tab 1 Organ/system and clinical manifestations of ADR caused by methotrexate

| 系统损伤     | 临床表现 (n)                                       | 例次 / n | 构成比 / % |
|----------|------------------------------------------------|--------|---------|
| 血液系统损伤   | 中性粒细胞计数减少 (12)、白细胞计数减少 (4)、全血细胞计数减少 (5)、贫血 (4) | 25     | 36.77   |
| 肝功能损伤    | 肝功能损伤 (23)                                     | 23     | 33.82   |
| 胃肠损伤     | 口腔黏膜溃疡 (4)、胃肠道黏膜损伤伴出血 (3)、食欲减退 (2)、恶心 (1)      | 10     | 14.71   |
| 肾功能损伤    | 肾功能损伤 (3)                                      | 3      | 4.41    |
| 皮肤及其附件损伤 | 全身片状暗红色、紫红色斑疹、斑丘疹 (1)、皮疹 (1)、脱发 (1)            | 3      | 4.41    |
| 呼吸系统损伤   | 间质性肺炎 (1)、结核性胸膜炎 (1)                           | 2      | 2.94    |
| 神经系统损伤   | 头晕 (1)                                         | 1      | 1.47    |
| 其他       | 胸闷 (1)                                         | 1      | 1.47    |
| 合计       |                                                | 68     | 100     |

2.3 ADR 发生时间

在 51 例患者中，ADR 的发生时间最短为用药后 3 d，最长达 15 年。大多数 ADR 发生在 0 ~ 6 个月内，共计 27 例，占 52.94%，见表 2。

2.4 ADR 程度分级、处理及转归

51 例 RA 患者使用 MTX 引起的 ADR 中，44 例（占比 86.27%）为一般 ADR，7 例（占比 13.73%）为严重 ADR。本研究中，MTX 引起的严重 ADR 发生率为 4.35%。在这些患者中，22 例因 ADR 永久停用 MTX，停药后有 16 例进行了对症治疗（其中 7 例因病情严重需要住院治疗），剩余 6 例只进行了观察。在未因 ADR 停药的 26 例患者中，7 例接受了对症治疗，其余患者则继续观察。此外，3 例患者在停药治疗后，随着病情好转，选择继续使用 MTX 或减少用药剂量。在治疗结果方面，18 例（35.30%）痊愈，17 例（33.33%）好转，16 例（31.37%）结果不详。

2.5 关联性评价情况

根据《药品不良反应报告和监测管理办法》<sup>[11]</sup> 的评估准则，本项研究中药品不良反应的关联性评价显示：肯定 3 例，很可能 12 例，可

表 2 ADR 发生时间分布

Tab 2 Distribution of ADR occurrence time

| 发生时间      | 例数 / n | 构成比 / % | 累计构成比 / % |
|-----------|--------|---------|-----------|
| 0 ~ 1 个月  | 11     | 21.57   | 21.57     |
| 1 ~ 6 个月  | 16     | 31.37   | 52.94     |
| 6 ~ 12 个月 | 6      | 11.77   | 64.71     |
| 1 年以后     | 16     | 31.37   | 96.08     |
| 不详        | 2      | 3.92    | 100       |
| 合计        | 51     | 100     | —         |

能 36 例。依据诺氏评估量表<sup>[12]</sup> 的标准，本项研究中药品不良反应的关联性评价结果为：很可能 8 例，可能 43 例。

2.6 MTX 致 ADR 单因素分析

以发生不良反应的病例为病例组，未发生不良反应的病例为对照组。其中病例组男 10 例，女 41 例，年龄（60.22  $\pm$  10.78）岁；对照组男 36 例，女 74 例，年龄（61.93  $\pm$  13.78）岁。将发生 ADR 作为因变量，把可能影响 ADR 发生的因素（如性别、年龄、体重、给药剂型、给药途径、用药剂量、肾小球滤过率（GFR）、血清白蛋白、糖尿病、冠心病、高血脂、脂肪肝、合并用药等）作为协变量进行单因素分析，结果发现两组患者在性别、年龄、



体重、给药剂型、给药途径、用药剂量、肌酐清除率、血清白蛋白、糖尿病、冠心病、高血脂、脂肪

肝及联合用药方面的差异无统计学意义（见表 3）。

表 3 ADR 与各因素之间的单因素分析  
Tab 3 Single factor analysis of relationship between ADR and various factors

| 因素                                                                           | 对照组 (n = 110)     | 病例组 (n = 51)      | t 或 $\chi^2$ 值 | P 值   |
|------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|----------------|-------|
| 性别 [n (%)]                                                                   |                   |                   | 2.331          | 0.127 |
| 男                                                                            | 36 (32.73)        | 10 (19.61)        |                |       |
| 女                                                                            | 74 (67.27)        | 41 (80.39)        |                |       |
| 年龄 ( $\bar{x} \pm s$ ) / 岁                                                   | 61.93 $\pm$ 13.78 | 60.22 $\pm$ 10.78 | - 0.782        | 0.435 |
| 体重 ( $\bar{x} \pm s$ ) / kg                                                  | 57.05 $\pm$ 10.91 | 54.04 $\pm$ 10.78 | - 1.637        | 0.104 |
| 给药剂型 [n (%)]                                                                 |                   |                   |                | 0.317 |
| 片剂                                                                           | 110 (1)           | 50 (98.04)        |                |       |
| 注射剂                                                                          | 0 (0)             | 1 (1.96)          |                |       |
| 给药途径 [n (%)]                                                                 |                   |                   |                | 0.317 |
| 口服                                                                           | 110 (1)           | 50 (98.04)        |                |       |
| 静脉注射                                                                         | 0 (0)             | 1 (1.96)          |                |       |
| MTX 剂量 [n (%)]                                                               |                   |                   | 3.807          | 0.419 |
| 7.5 mg qw                                                                    | 1 (0.91)          | 1 (1.96)          |                |       |
| 10 mg qw                                                                     | 63 (57.27)        | 32 (62.75)        |                |       |
| 12.5 mg qw                                                                   | 40 (36.36)        | 16 (31.37)        |                |       |
| 15 mg qw                                                                     | 6 (5.46)          | 1 (1.96)          |                |       |
| 20 mg qw                                                                     | 0 (0.00)          | 1 (1.96)          |                |       |
| 肾小球滤过率 [ ( $\bar{x} \pm s$ ) / ( mL / ( min $\times$ 1.73 m <sup>2</sup> ) ] | 78.13 $\pm$ 34.76 | 72.40 $\pm$ 33.74 | - 0.984        | 0.327 |
| 血清白蛋白 ( $\bar{x} \pm s$ ) / ( g $\cdot$ L <sup>-1</sup> )                    | 34.63 $\pm$ 5.09  | 35.52 $\pm$ 4.53  | 1.069          | 0.287 |
| 合并糖尿病 [n (%)]                                                                |                   |                   | 0.460          | 0.498 |
| 是                                                                            | 13 (11.82)        | 8 (15.69)         |                |       |
| 否                                                                            | 97 (88.18)        | 43 (84.31)        |                |       |
| 合并冠心病 [n (%)]                                                                |                   |                   | 0.567          | 0.451 |
| 是                                                                            | 4 (3.64)          | 4 (7.84)          |                |       |
| 否                                                                            | 106 (96.36)       | 47 (92.16)        |                |       |
| 合并高血脂 [n (%)]                                                                |                   |                   | 1.727          | 0.189 |
| 是                                                                            | 13 (11.82)        | 10 (19.61)        |                |       |
| 否                                                                            | 97 (88.18)        | 41 (80.39)        |                |       |
| 合并脂肪肝 [n (%)]                                                                |                   |                   | 0.220          | 0.639 |
| 是                                                                            | 8 (7.27)          | 2 (3.92)          |                |       |
| 否                                                                            | 102 (92.73)       | 49 (96.08)        |                |       |
| 联合叶酸 [n (%)]                                                                 |                   |                   | 0.357          | 0.550 |
| 是                                                                            | 68 (61.82)        | 29 (56.86)        |                |       |
| 否                                                                            | 42 (38.18)        | 22 (43.14)        |                |       |
| 联合来氟米特 [n (%)]                                                               |                   |                   | 2.583          | 0.108 |
| 是                                                                            | 90 (81.82)        | 36 (70.59)        |                |       |
| 否                                                                            | 20 (18.18)        | 15 (29.41)        |                |       |
| 联合激素 [n (%)]                                                                 |                   |                   | 1.176          | 0.278 |
| 是                                                                            | 51 (46.36)        | 19 (37.25)        |                |       |
| 否                                                                            | 59 (53.64)        | 32 (62.75)        |                |       |
| 联合质子泵抑制剂 (PPI) [n (%)]                                                       |                   |                   | 0.955          | 0.328 |
| 是                                                                            | 83 (75.45)        | 42 (82.35)        |                |       |
| 否                                                                            | 27 (24.55)        | 9 (17.65)         |                |       |
| 联合非甾体抗炎药 [n (%)]                                                             |                   |                   | 0.552          | 0.458 |
| 是                                                                            | 60 (54.55)        | 31 (60.78)        |                |       |
| 否                                                                            | 50 (45.45)        | 20 (39.22)        |                |       |
| 联合他汀 [n (%)]                                                                 |                   |                   | 2.011          | 0.156 |
| 是                                                                            | 6 (5.45)          | 6 (11.76)         |                |       |
| 否                                                                            | 104 (94.55)       | 45 (88.24)        |                |       |

2.7 MTX 致 ADR 多因素回归分析

以指南<sup>[3, 9]</sup>中提到的 MTX 致 ADR 危险因素（MTX 用量、年龄、GFR、血清白蛋白、脂肪肝、

合并用药）作为自变量，以发生 ADR 作为因变量，进行二元 Logistic 回归分析，结果发现 MTX 联合来氟米特是 MTX 治疗 RA 过程中出现 ADR 的独

立影响因素 ( $P < 0.05$ )。此外, 肾小球滤过率分析  $\beta = -0.014$ , 表示肾小球滤过率每增加一个

单位, ADR 发生的概率减少; 但肾小球滤过率对 ADR 的影响无统计学意义 ( $P = 0.058$ )(见表 4)。

表 4 ADR 与各因素之间关系的多因素 Logistic 回归分析  
Tab 4 Multivariate Logistic regression analysis of relationship between ADR and various factors

| 影响因素     | $\beta$ | SE    | Wald $\chi^2$ | P     | OR (95%CI)     |
|----------|---------|-------|---------------|-------|----------------|
| MTX 用量   | -0.343  | 0.299 | 1.316         | 0.251 | 0.395 ~ 1.275  |
| 年龄       | -0.028  | 0.017 | 2.846         | 0.092 | 0.941 ~ 1.005  |
| 肾小球滤过率   | -0.014  | 0.007 | 3.603         | 0.058 | 0.972 ~ 1.000  |
| 血清白蛋白    | 0.037   | 0.040 | 0.829         | 0.362 | 0.959 ~ 1.123  |
| 合并脂肪肝    | 0.531   | 0.935 | 0.322         | 0.570 | 0.272 ~ 10.625 |
| 联合叶酸     | 0.186   | 0.372 | 0.251         | 0.616 | 0.581 ~ 2.497  |
| 联合来氟米特   | 0.879   | 0.441 | 3.979         | 0.046 | 1.015 ~ 5.713  |
| 联合激素     | 0.353   | 0.389 | 0.822         | 0.365 | 0.664 ~ 3.052  |
| 联合 PPI   | -0.580  | 0.517 | 1.261         | 0.262 | 0.203 ~ 1.541  |
| 联合非甾体抗炎药 | -0.109  | 0.392 | 0.078         | 0.780 | 0.415 ~ 1.934  |
| 联合他汀     | -0.950  | 0.661 | 2.068         | 0.150 | 0.106 ~ 1.412  |

3 讨论

3.1 MTX 相关 ADR 发生率分析

ADR 是指合格药品在正常用法用量下出现的与用药目的无关的有害反应<sup>[11]</sup>。根据收集到的病例分析, 所有患者使用 MTX 的用法用量合理。根据国际医学科学组织委员会 (CIOMS) 推荐的不良反应分级标准, 不良反应发生率大于 10% 被视为“很常见”, 大于 1% 且小于 10% 为“常见”, 大于 0.01% 且小于 0.1% 为“罕见”, 而小于 0.01% 则被归类为“极罕见”。本研究发现, 某院 2016 年 1 月—2023 年 12 月 RA 患者应用 MTX 的 ADR 发生率为 31.68%, 属于十分常见的不良反应, 与文献报道相符<sup>[14]</sup>。

3.2 ADR 累及系统 / 器官

经 MTX 治疗的 RA 患者可能出现该药物引起的血液毒性, 包括全血细胞计数减少、血小板计数减少、白细胞计数减少、中性粒细胞计数减少和巨幼细胞贫血<sup>[15]</sup>。51 例 ADR 中, 25 例出现血液系统损伤, 表现为全血细胞计数减少、中性粒细胞计数减少、白细胞计数减少和贫血, 与文献报道一致<sup>[15]</sup>。其中 2 例患者同时出现全血细胞计数减少、口腔溃疡、肾功能损伤、胃肠道黏膜损伤伴出血, 1 例还合并有全身皮肤及黏膜损伤。MTX 引起骨髓抑制及黏膜损伤的原因为 MTX 是二氢叶酸还原酶的竞争性抑制剂, 在 DNA 合成和细胞复制过程中催化二氢叶酸还原为四氢叶酸。MTX 可通过抑制这种酶, 干扰细胞繁殖, 影响快速更新的组织, 例如骨髓或胃肠道黏膜<sup>[16-17]</sup>。本研究发现了 3 例在服用 MTX 后出现肾功能损伤的病例, 其原因可能是 MTX 及其代谢物在肾小管中的沉积, 或者 MTX 可能对肾小管有直接的毒性作用<sup>[18]</sup>。

一项关于评估 MTX 对 RA 患者常见不良反应的前瞻性观察性研究结果显示, 在 RA 患者中, 低剂量 MTX 的不良事件最常见的是肝功能

异常<sup>[19]</sup>。在 51 例 ADR 中, 23 例出现肝功能损伤。MTX 引起肝毒性的原因可能是药物对肝细胞的直接损伤<sup>[20]</sup>。本研究出现的肝功能损伤病例中, 15 例患者肝酶轻度升高, 14 例未停药继续观察或对症处理, 1 例停药; 8 例谷丙转氨酶升高超过 3 倍, 停药及护肝处理后, 7 例痊愈, 1 例好转。

51 例 ADR 中, 1 例患者出现了间质性肺炎, 停药后好转。但间质性肺炎是否与 MTX 有关存在争议。近期文献研究表明, MTX 并不会引起间质性肺炎, 反而可能会延迟 RA 相关间质性肺炎的发作<sup>[21]</sup>。但也有病例报道了 MTX 引起间质性肺炎<sup>[22]</sup>。因而该患者在服用 MTX 期间出现间质性肺炎是 MTX 引起的, 还是因本身疾病引起的不确定。

3.3 ADR 发生时间

51 例患者中发生 ADR 的最短时间为用药后 3 d, 最长为 15 年。服用 MTX 的前 6 个月 ADR 的发生率 (27 例, 52.94%) 偏高, 这与文献报道一致<sup>[15]</sup>。由此可见, 服用低剂量 MTX 发生 ADR 可以在任何时间段, 但主要集中在前 6 个月。51 例 ADR 患者中, 2 例患者服用一次 10 mg 的 MTX 就出现了血液系统的损伤, 其中 1 例 3 d 后测血常规, 中性粒细胞计数为  $1.51 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ , 及时停药后痊愈; 另外 1 例 1 个星期后复查血常规发现 IV 度骨髓抑制, 全身皮肤及黏膜损伤, 口腔溃疡伴肾功能损伤需再入院治疗。有文献报道甲基四氢叶酸还原酶突变的患者低剂量 MTX 治疗异位妊娠后出现持续发热、IV 度骨髓抑制、皮肤损伤、黏膜炎和肝损伤<sup>[23]</sup>。因此, 只服用一次就出现严重不良反应的患者可能与遗传因素有关。有些服用几年甚至十几年才出现的 ADR, 是与累计剂量有关还是患者的身体状态或药物饮食的改变因素相关需要进一步研究。指南<sup>[24]</sup>推荐为预防 MTX 血液系统毒性, 建议在用药 (或加量)

一般第 1 个月每 1~2 周检查 1 次血常规。但本研究发现 2 例患者服用 MTX 后 1 周内已经出现了骨髓抑制, 其中 1 例用药后 3 d 后出现骨髓抑制, 停药处理好转; 另外 1 例用药后第 4 日即出现了口腔溃疡和发热, 1 周后复查血常规已出现 IV 度骨髓抑制, 同时合并感染。因此, 用药后 3 d 复查血常规或许能及早发现 MTX 的血液系统损伤并及时处理, 避免患者进一步的药物损伤。

### 3.4 ADR 严重程度、处理及转归

本次研究发现低剂量 MTX 引起的 ADR 大多数是轻微的, 一般的 ADR 发生率为 27.33%。但仍有一部分患者发生了严重的 ADR, 发生率为 4.35%, 这需要在临床治疗中给予足够的重视。低剂量 MTX 出现的 ADR 需要根据其类型及严重程度进行相应的处理<sup>[3, 11]</sup>。使用 MTX 过程中若出现血液系统毒性, 白细胞计数  $< 3.5 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ , 血小板计数  $< 100 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ , 应减量或暂时停药; 出现肝功能损伤: 若肝酶升高  $<$  正常值 2~3 倍, 考虑减少 MTX 剂量或增加叶酸剂量 (最多 10 mg/周); 若肝酶升高  $>$  正常值 2~3 倍, 建议减少 MTX 剂量或停止 MTX 治疗, 并增加叶酸剂量; 当患者发生间质性肺炎时, 应立即停用 MTX, 并作出鉴别诊断以排除其他可能性; 若发生胃肠道功能损伤, 如口炎和恶心, 应在 MTX 治疗开始时进行沟通, 增加叶酸的剂量和给予止吐药。目前指南<sup>[3, 11]</sup>并未要求使用低剂量 MTX 需要监测血药浓度, 除非怀疑 MTX 时过量。在本次研究中, 发现 MTX 引起的一般 ADR 通常是一过性或可逆的, 26 例对症处理或继续观察, 18 例停药或减量治疗好转。7 例发生严重 ADR 的患者需要住院治疗, 停药并对症治疗后好转, 其中 3 例同时需要补液、碱化尿液及给予亚叶酸钙治疗。

### 3.5 MTX 相关 ADR 的影响因素分析

MTX 引起 ADR 的危险因素包括相对肾功能损伤、高龄、低血清白蛋白、使用多种伴随药物、叶酸缺乏等<sup>[3, 9]</sup>。因此, 本研究对两组患者基线 GFR、血清白蛋白及药物相互作用进行比较, 结果发现 MTX 联合来氟米特是 MTX 治疗 RA 过程中出现 ADR 的独立影响因素 ( $P < 0.05$ )。指南<sup>[25]</sup>推荐传统抗风湿药物单一治疗效果不佳时, 可以考虑联合选择 MTX、柳氮磺吡啶、来氟米特中的两种或三种进行联合治疗。然而, 特别指出若 MTX 与来氟米特联用, 需注意其肝功能损伤及血液系统的不良反应。Kis 等<sup>[26]</sup>应用 BCRP-HAM-Sf9 膜制剂和细胞试验 (Hoechst 试验和细胞毒性试验) 对过度表达乳腺癌耐药蛋白 (BCRP) 的 PLB985-BCRP 和 HEK293-BCRP 细胞系进行不同的体外膜基方法 (ATP 酶和囊泡转运试验)。考

察了来氟米特、特立氟胺和 MTX 与 BCRP 的相互作用。结果发现, 来氟米特及其代谢产物特立氟胺都是 BCRP 底物, 均抑制 BCRP 介导的 MTX 转运, 增加 MTX 的暴露量。这一发现与文献报道<sup>[27-28]</sup>中提到的来氟米特与 MTX 合用可能增加骨髓抑制、肝功能损伤等风险相一致, 进一步支持了本文的研究结果。Hall 等<sup>[29]</sup>的回顾性研究未发现低剂量 MTX 与非甾体抗炎药、PPI 有临床意义的相互作用。此次研究得出了类似的结论。

MTX 及其代谢产物 7-OH-MTX 主要由肾脏 (40%~90%) 排出<sup>[5]</sup>。肌酐清除率低于  $79 mL \cdot min^{-1}$  时, MTX 引起骨髓抑制及肝毒性的发生率增加, 因此对严重肾功能损伤患者, 应避免使用 MTX<sup>[4]</sup>。本研究发现 GFR 的增加与 ADR 发生概率的减少相关, 尽管统计学上未达到显著性差异 ( $P = 0.058$ ), 但这可能与样本量不足相关, 提示我们在未来的研究方向上需要扩大样本量以进一步验证这一发现。在临床实践中, 监测患者的肾功能, 对于评估 MTX 的安全性和有效性至关重要。

本研究的局限性在于: ① 为单中心回顾性研究, 病例数量较少; ② 部分患者未回我院定期复查未能纳入研究, 可能会对最终结果造成一定偏倚; ③ 由于医院医疗数据的结构化程度和信息系统的兼容性限制, 同时考虑到医护人员对 ADR 的识别不足, 对出现可能的 ADR 未在病程中记录, 可能导致 CHPS 系统存在真阳性病例遗漏。

### 3.6 CHPS 在 ADR 监测方面的优势

CHPS 通过整合医疗病历资源, 利用真实世界电子诊疗数据开展主动监测, 探索 ADR 主动监测模式, 旨在提高未来 ADR 报告的数量和质量, 为医院用药安全防控提供技术支持。

综上所述, 使用 MTX 的 RA 患者的用药过程中, 应密切关注患者用药时的皮肤和黏膜状态、肺部症状、全身性反应等, 并定期监测血常规、肝肾功能指标, 且最好在第一次用药后的第 3 日监测血常规。本研究结果提示, 在考虑 MTX 联合来氟米特治疗时, 需要对患者进行更严格的监测和管理, 以预防 ADR 的发生。其次, 它们提示在评估 MTX 治疗的适宜性时, 应考虑患者的肾功能状态, 尤其是对于那些 GFR 较低的患者, 可能需要调整治疗方案或采取额外的预防措施。未来的研究应继续探索肾功能与 MTX 毒性之间的关联, 并优化个体化治疗方案, 以最大限度地减少 ADR 的发生, 提高治疗效果。

## 参考文献

- [1] Jin SY, Li MT, Fang YF, et al. Chinese Registry of rheumatoid arthritis (CREDIT): II. prevalence and risk factors



- of major comorbidities in Chinese patients with rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2017, 19 (1): 251.
- [2] Sokka T, Kautiainen H, Toloza S, et al. QUEST-RA: quantitative clinical assessment of patients with rheumatoid arthritis seen in standard rheumatology care in 15 countries [J]. *Ann Rheum Dis*, 2007, 66 (11): 1491-1496.
  - [3] Kameda H, Yamaoka K, Yamanishi Y, et al. Japan College of rheumatology guidance for the use of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: secondary publication [J]. *Mod Rheumatol*, 2023, 34 (1): 1-10.
  - [4] 中国医师协会风湿免疫科医师分会. 甲氨蝶呤在风湿性疾病中的应用中国专家共识 [J]. *中华内科杂志*, 2018, 57 (10): 719-722.
  - [5] 杜思颖, 欧阳华. 小剂量甲氨蝶呤治疗类风湿关节炎的临床研究进展 [J]. *中南药学*, 2021, 19 (7): 1382-1387.
  - [6] Pivovarov K, Zipursky JS. Low-dose methotrexate toxicity [J]. *CMAJ*, 2019, 191 (15): E423.
  - [7] 中华医学会风湿病学分会. 2018 中国类风湿关节炎诊疗指南 [J]. *中华内科杂志*, 2018, 57 (4): 242-251.
  - [8] U. S. Food and Drug Administration. Methotrexate Tablets ( West-Ward Pharmaceuticals Corp. ) [EB/OL]. ( 2020-10-29 ) [2024-11-15]. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2020/040054s015,s016,s017](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2020/040054s015,s016,s017).
  - [9] 中华医学会皮肤性病学会银屑病专业委员会. 甲氨蝶呤治疗银屑病应用专家共识 [J]. *临床皮肤科杂志*, 2022, 51 (2): 108-117.
  - [10] 吴桂芝, 田春华, 王丹, 等. WHO ART 和 Med DRA 在药品不良反应监测中的应用 [J]. *中国药物警戒*, 2010, 7 (2): 81-85.
  - [11] 吴仪, 郑筱萸. 药品不良反应报告和监测管理办法 [J]. *中国药事*, 2004, 18 (4): 3.
  - [12] 郑飞跃, 吴燕, 饶跃峰, 等. 诺氏评估量表在药品不良反应评价中的作用及实例分析 [J]. *中国药理学杂志*, 2012, 47 (8): 650-652.
  - [13] WHO 药品不良反应术语集 [J]. *中国药物警戒*, 2008, 5 (6): 385-386.
  - [14] Giraud EL, Jessurun NT, van Hunsel FPAM, et al. Frequency of real-world reported adverse drug reactions in rheumatoid arthritis patients [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2020, 19 (12): 1617-1624.
  - [15] Wang WY, Zhou H, Liu L. Side effects of methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: a systematic review [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 158: 502-516.
  - [16] Schelzel G, Palicherla A, Tauseef A, et al. Low-dose methotrexate toxicity leading to pancytopenia: leucovorin as a rescue treatment [J]. *Proc ( Bayl Univ Med Cent )*, 2024, 37 (2): 339-343.
  - [17] Chamorro-Petronacci C, García-García A, Lorenzo-Pouso AI, et al. Management options for low-dose methotrexate-induced oral ulcers: a systematic review [J]. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2019, 24 (2): e181-e189.
  - [18] Grönroos M, Chen M, Jahnukainen T, et al. Methotrexate induces cell swelling and necrosis in renal tubular cells [J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2006, 46 (5): 624-629.
  - [19] Nakarmi S, Pudasaini K, Adhikari B, et al. Adverse events profile of low-dose methotrexate in nepalese patients with rheumatoid arthritis: an observational study [J]. *J Nepal Health Res Counc*, 2020, 18 (3): 360-365.
  - [20] Moriyama A, Ueda H, Narumi K, et al. Contribution of aldehyde oxidase to methotrexate-induced hepatotoxicity: in vitro and pharmacoepidemiological approaches [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2024, 20 (5): 399-406.
  - [21] Kim K, Woo A, Park Y, et al. Protective effect of methotrexate on lung function and mortality in rheumatoid arthritis-related interstitial lung disease: a retrospective cohort study [J]. *Ther Adv Respir Dis*, 2022, 16: 17534666221135314.
  - [22] Hanai S, Kobayashi Y, Ito R, et al. Methotrexate-associated pneumonitis [J]. *QJM*, 2022, 115 (5): 305-307.
  - [23] Yu H, Wang WH, Liang HY, et al. Severe adverse toxic effects of low-dose methotrexate treatment on an ectopic pregnancy patient with methylenetetrahydrofolate reductase mutations: a case report [J]. *Front Med ( Lausanne )*, 2021, 8: 738315.
  - [24] 中华医学会皮肤性病学会银屑病专业委员会. 中国银屑病诊疗指南 ( 2023 版 ) [J]. *中华皮肤科杂志*, 2023, 56 (7): 573-625.
  - [25] 国家皮肤与免疫疾病临床医学研究中心 ( 北京协和医院 ), 中国医师协会风湿免疫专科医师分会, 中国康复医学会风湿免疫病康复专业委员会, 等. 2024 中国类风湿关节炎诊疗指南 [J]. *中华内科杂志*, 2024, 63 (11): 1059-1077.
  - [26] Kis E, Nagy T, Jani M, et al. Leflunomide and its metabolite A771726 are high affinity substrates of BCRP: implications for drug resistance [J]. *Ann Rheum Dis*, 2009, 68 (7): 1201-1207.
  - [27] 孙祥瑞, 崔晨玲, 司福国, 等. 来氟米特片合理用药评价标准的建立及应用 [J]. *西北药学杂志*, 2023, 38 (3): 205-210.
  - [28] Londono J, Santos AM, Santos PI, et al. Therapeutic efficacy and safety of methotrexate + leflunomide in Colombian patients with active rheumatoid arthritis refractory to conventional treatment [J]. *Rev Bras Reumatol*, 2012, 52 (6): 837-845.
  - [29] Hall JJ, Bolina M, Chatterley T, et al. Interaction between low-dose methotrexate and nonsteroidal anti-inflammatory drugs, penicillins, and proton pump inhibitors [J]. *Ann Pharmacother*, 2017, 51 (2): 163-178.

( 收稿日期: 2024-11-22; 修回日期: 2025-03-11 )

# 干细胞治疗脑卒中首次人体试验的主要风险因素及管理策略

李丹<sup>1</sup>, 管志美<sup>2</sup>, 杨泽华<sup>2</sup>, 秦群<sup>1</sup> (1. 中南大学湘雅医院国家药物临床试验机构, 长沙 410008; 2. 湖南省药品审核查验中心, 长沙 410008)

**摘要:** **目的** 探讨与分析创新干细胞临床试验从立项到实施各环节的主要风险因素, 为新政策环境下干细胞临床试验的规范开展提供参考。**方法** 结合干细胞临床试验监管要求及所在机构管理经验进行分析与论述, 制订创新干细胞临床试验风险管控策略。**结果** 创新干细胞临床试验风险存在于临床试验各环节, 风险因素主要为政策法律风险、试验机构及研究团队风险、方案设计风险、受试者风险、干细胞产品风险等。**结论** 干细胞临床试验技术标准、临床疗效与潜在风险的认知与评估处在不断发展与经验积累的阶段, 临床试验机构、伦理委员会、研究者、申办方需各司其职, 加强试验全过程的风险管控, 降低风险发生率和影响程度, 为受试者的安全保驾护航。**关键词:** 干细胞; 脑卒中; 首次人体试验; 风险因素; 管理策略  
**中图分类号:** R95 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)06-1805-07  
**doi:**10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.047

## Risk factors and management strategies in the first human trial of stem cell therapy for stroke

LI Dan<sup>1</sup>, GUAN Zhi-mei<sup>2</sup>, YANG Ze-hua<sup>2</sup>, QIN Qun<sup>1</sup> (1. National Drug Clinical Trial Institute of Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008; 2. Hunan Drug Inspection Center, Changsha 410008)

**Abstract:** **Objective** To determine the risk factors of innovative stem cell clinical trials from project initiation to implementation, to provide reference for the standardization of stem cell clinical trials in the new policy environment. **Methods** Combining the regulatory requirements of stem cell clinical trials with the management experience of the institution, we analyzed the risk management strategy of innovative stem cell clinical trials. **Results** The risk of innovative stem cell clinical trials existed in all aspects of clinical trials, namely policy and legal risk, risk of experimental institutions and research teams, risk of scheme design, risk of participants, and risk of stem cell products. **Conclusion** The technical standards, clinical efficacy and the cognition and evaluation of potential risks of stem cell clinical trials undergo continuous development and experience accumulation. Clinical trial institutions, ethics committees, researchers and sponsors need to fulfill their respective duties, strengthen risk management throughout the trial process, and reduce the possibility and impact of risks to improve the safety of research participants.

**Key words:** stem cell; stroke; first human trial; risk factor; management strategy

缺血性脑卒中是由于脑供血不足导致正常神经功能受损的疾病, 其病理基础为脑动脉氧气和能量供应中断导致的不可逆神经元损伤等<sup>[1-2]</sup>。《中国脑卒中防治报告 2020》显示, 缺血性脑卒中已成为我国成人致死、致残的首要原因, 占所有脑卒中的 60% ~ 80%<sup>[3]</sup>。脑卒中作为一种严重的脑血管疾病, 给患者带来了巨大的健康负担,

同时也对社会和家庭造成了沉重的经济压力。在传统的治疗方法中, 人们更多地关注脑卒中的急性期治疗, 而对于慢性期的神经修复和功能重建关注不足。随着干细胞技术的发展, 人诱导多能干细胞 (iPSCs) 因其能够分化为包含各级神经细胞在内的多种细胞类型, 而成为治疗脑卒中的新希望<sup>[4]</sup>。当前, iPSCs 在脑卒中治疗方面的研究已

取得一定的进展。临床前研究表明，iPSCs 能够促进神经保护和再生，改善脑卒中后的功能恢复<sup>[5]</sup>。然而，这一领域的研究仍面临着许多挑战，包括干细胞移植的安全性、有效性及如何精确控制干细胞分化和功能整合等问题。加之创新干细胞临床试验耗时长、投资大、风险高，成为该类产品研发及注册过程中的“限速步骤”，很大程度上影响着创新产品的临床开发进程。因此，在创新干细胞临床试验中风险管理极为重要，通过风险识别、评估及管控可以保障受试者的安全和权益，有效降低试验失败风险并减少经济损失。

1 资料与方法

1.1 一般资料

数据来源于 2023 年开展的创新干细胞临床试验，对从项目立项到实施各环节的风险因素进行探讨，并提出相应的风险管控策略。

干细胞治疗脑卒中临床试验项目为国际首个获注册临床试验默许的多能干细胞衍生前脑神经前体细胞产品首次人体临床试验（FIH），目的是探讨 iPSCs 来源的前脑神经前体细胞（NPCs）治疗缺血性脑卒中偏瘫后遗症的安全性和有效性（临床试验登记号 CTR20233368），目标人群为临床确诊缺血性脑卒中偏瘫后遗症的受试者，所有受试者均签署经伦理委员会审核批准的知情同意书，严格按照试验方案入选标准和排除标准（见表 1）筛选受试者。

表 1 创新干细胞临床试验的项目主要入选标准和排除标准

Tab 1 Main inclusion and exclusion criteria for innovative stem cell clinical trials

| 名称     | 内容                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 主要入选标准 | ① 年龄 30 ~ 65 岁（含界值）；② 符合中华医学会神经病学分会制订的《中国急性缺血性脑卒中诊治指南》的诊断标准，并经头颅 CT 或磁共振等检查确诊属于单侧大脑中动脉 / 豆纹动脉梗死造成的皮层下缺血性梗死，伴或不伴皮层缺血性梗死；③ 缺血性脑卒中急性发病后的 6 ~ 60 个月，并且伴有一侧肢体运动功能障碍（如有双侧肢体运动障碍，选择症状重的一侧对应的病灶进行手术），伴 / 不伴失语；④ Modified Rankin 评分 3 分或者 4 分；⑤ 术前间隔至少 3 周的两次评估 Fugl-Meyer 运动量表分数低于 55，分数变化不高于 5 分；⑥ 术前间隔至少 3 周的两次评估 NIH 卒中量表（NIHSS）分数变化不超过 4 分；⑦ 缺血性脑卒中发病后定期接受物理治疗和康复治疗，可以并愿意入组后继续接受物理治疗和康复治疗  |
| 主要排除标准 | ① 超过一次的症状性脑卒中病史（以超过一次发作对应的医院检查结果为准），除外短暂性脑缺血发作（TIAs）；② 有颅内疝或颅内压升高的症状和体征者；③ 有癫痫病史或同时服用抗癫痫药物的患者；④ 脑内动脉瘤或动静脉畸形，2 周内缺血性梗死灶出血转化，烟雾病（MMD），伴皮层下梗死和白质脑病的常染色体显性遗传性脑血管病，巨大面积脑梗死受试者（MRI 确认梗死区大于 150 cm <sup>3</sup> ），术前头颈部血管造影（CTA）有颅内或颈部关键血管节段重度狭窄；⑤ 既往神经类疾病如帕金森病、运动神经元病变、关节炎或解剖畸形等导致的一侧肢体运动功能严重受损的患者；筛选前 8 周内接受过大型手术的患者；⑥ 严重的肌萎缩或肌营养不良的患者；⑦ 3 个月内严重的心血管疾病者，如恶性心律失常、房颤、急性心肌梗死、充血性心力衰竭等（心功能Ⅲ~Ⅳ级） |

1.2 试验各环节时间节点

创新干细胞临床试验项目从立项至启动共耗时 79 d，由研究机构和申办方共同推进立项审批、学术审查、伦理审查、合同审签等环节，双方的流程属于强制性依赖关系。启动到首例干细胞移植耗时 38 d，知情、筛选、入组、干细胞移植 4 个环节主要由研究者推进，干细胞产品制备、放行检验、异地转运 3 个环节由申办方推进。干细胞治疗脑卒中临床试验项目从立项到低剂量组完成移植耗时不足 5 个月（见表 2），总体推进快速，主要归因于研究机构由专人负责与申办方和主要研究者（PI）进行专项对接，机构流程清晰快捷、学术审查和伦理审查高效、研究团队熟悉方案且积极性高、申办方选择机构合同模板和伦理知情模板等这些行之有效的策略，大幅缩短了临床试验耗时。

1.3 试验不良事件情况统计

临床试验过程中发生的不良事件（AE）是指受试者接受试验药物后出现的所有不良医学事件<sup>[6]</sup>，既可能与受试者疾病本身有关，也可能与试验药物有关，在进行相关性判断时，需要考虑各方面因

表 2 创新干细胞临床试验项目从立项到干细胞移植各环节的时间节点

Tab 2 Time points for the initiation of innovative stem cell clinical trials to the various stages of stem cell transplantation

| 事项                  | 时间               |
|---------------------|------------------|
| 立项审批                | 2023 年 8 月 14 日  |
| 学术审查                | 2023 年 9 月 4 日   |
| 伦理初始审查              | 2023 年 9 月 14 日  |
| 伦理复审                | 2023 年 10 月 18 日 |
| 药物临床试验登记与信息公示平台首次公示 | 2023 年 10 月 24 日 |
| 合同审签                | 2023 年 10 月 26 日 |
| 启动                  | 2023 年 10 月 31 日 |
| 首例知情                | 2023 年 11 月 9 日  |
| 首例干细胞移植             | 2023 年 12 月 7 日  |
| 干细胞移植实时质控           | 2023 年 12 月 7 日  |
| 首例入组质控              | 2023 年 12 月 25 日 |
| 首剂量组完成移植            | 2024 年 1 月 11 日  |

素，从而全面、准确地评估 AE 与试验用药之间的因果关系。截至 2024 年 2 月，本项目未发生严重不良事件（SAE），共发生 3 例次 AE，均为头痛，1 例症状持续，2 例症状缓解，AE 分级均为 1 级，严重程度为轻度，无需治疗，与试验药物的相关性判



断为无关/可能无关, 入组受试者均已顺利出院, 并按照方案要求进行定期随访和康复训练。

#### 1.4 试验方案偏离情况统计

药物临床试验必须遵循《药物临床试验质量管理规范》(简称 GCP) 原则, 依从伦理委员会批准的试验方案, 任何有意或无意偏离或违反 GCP 原则和试验方案的行为, 称之为方案偏离 (PD)<sup>[6]</sup>。本项

目为创新干细胞的 FIH, 虽然研究者按照方案要求去实施临床试验, 但仍有 PD 的发生, 影响试验数据的质量和受试者的安全。本项目共发生了 15 例次 PD (见表 3), 主要集中在试验操作和药物管理方面, 未发生不符合入选、排除标准和严重损害受试者安全的 PD, 所有 PD 均及时上报伦理委员会, 并积极采取了干预措施。

表 3 创新干细胞临床试验项目 PD 汇总

Tab 3 PD for innovative stem cell clinical trial projects

| PD 分类 | PD 子分类   | PD 描述                                                | PD 分级 | PD 发生例次 |
|-------|----------|------------------------------------------------------|-------|---------|
| 试验操作  | 检验检查项目未做 | 研究者对方案要求的检验检查不熟悉, 导致生命体征、体重、实验室检验项目缺项                | 轻度    | 5       |
|       | 检验结果缺失   | 因实验室标本接收异常, 研究者未及时追踪检验结果, 未及时进行复查                    | 轻度    | 3       |
|       | 检查项目错误   | 方案检查与常规医疗流程不一致, 方案要求术后进行 CT 检查, 受试者术后进行 MRI 而非 CT 检查 | 轻度    | 2       |
|       | 试验流程     | 研究者操作流程不熟悉, 注射点及针道数不符合方案要求                           | 轻度    | 1       |
| 药物管理  | 受试者服药依从性 | 受试者随访期间用药宣教不到位, 导致受试者未遵医嘱用药                          | 严重    | 1       |
|       | 用药超窗     | 等待手术时间延长, 导致受试者术前基础用药使用超窗                            | 严重    | 1       |
|       | 基础用药漏服   | 访视期间基础用药剂量调整, 受试者带药数量不足导致漏服基础药物                      | 严重    | 1       |
|       | 药物缺外包装   | 研究者对受试者宣教不到位, 导致受试者基础药物外包装丢失                         | 轻度    | 1       |

#### 1.5 方法

收集创新干细胞临床试验项目数据进行分析。研究者按照 GCP 法规和试验方案执行, 对入组受试者进行知情、筛选、干细胞移植、治疗、观察、随访、评估、记录, 所有受试者均接受单次细胞移植治疗, 试验数据真实、可溯源。

### 2 干细胞治疗脑卒中临床试验的主要风险因素及控制策略

干细胞治疗脑卒中临床试验是一项前沿的医学研究, 其潜在的治疗效果备受期待。同时, 国家卫生健康委员会、国家药品监督管理局 (NMPA) 等监管部门对临床试验的质量提出了更高、更严的要求, 监管部门更加注重创新药物临床试验过程的规范性、数据与结果的科学性和真实性。与传统小分子化学药物不同, 干细胞在人体内是通过功能代偿产生生物学效应的, 其动物模型研究数据可为人体应用提供的有效信息相对有限。因此, 在干细胞治疗临床试验中, 特别是在 FIH 时, 风险管控极为重要。

#### 2.1 政策法律风险管控

干细胞治疗脑卒中临床试验的开展应符合《药物临床试验质量管理规范》《干细胞临床研究管理办法》(简称《管理办法》)、《干细胞临床研究基地管理办法》和《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则》等相关规定。该项目已经被 NMPA 批准, 要求在干细胞临床研究机构开展, 严格按照试验批件和方案执行, 不得随意变更方案。国家卫生健康委员会和 NMPA 负责干细胞临床试验研究机构的确定工作, 各省卫健委、药品监督管理局负责干细胞临床研究机构的日常监督工作<sup>[7]</sup>。

#### 2.2 试验机构风险管控

**2.2.1 细胞临床试验专门管理部门** 机构必须获得相关专业的药物临床试验机构和干细胞临床研究机构资质。本机构于 2016 年正式获批成为国家卫生健康委员会认定的首批干细胞临床研究机构 (共 30 家), 也是湖南省首家获此资质的医疗机构, 成立了干细胞临床研究管理委员会、学术委员会和伦理委员会, 依托于 GCP 办开展工作, 对干细胞临床试验项目进行立项审查、登记备案和过程监管, 并对干细胞制剂的制备和临床试验全过程进行质量管理和风险管控。目前已在国家卫生健康委员会和 NMPA 备案的干细胞临床研究项目 6 项, 结题项目 2 项, 在研项目 4 项, 在项目审核、过程监管、风险管控等方面积累了丰富的经验。

**2.2.2 干细胞临床试验文件体系** 本中心已建立了能够满足开展干细胞临床试验需要的文件体系, 制订了干细胞临床试验管理制度、标准操作规程等相关文件, 其内容与现行法律法规相符, 具有防范和处理干细胞临床试验中突发事件的管理机制与措施。该项目除了常规药物临床试验必备资料外, 还包括干细胞临床研究质量管理手册, 干细胞制备过程中主要辅料标准, 干细胞制剂制备工艺的质量控制标准、制订依据以及工艺稳定性依据, 干细胞制剂的完整记录和干细胞制剂质量检验报告, 干细胞制剂标签、储存、运输和使用追溯方案, 不合格和/或剩余干细胞制剂的处理措施等相关材料。

**2.2.3 干细胞临床试验场地及设施设备** 具有与干细胞临床试验相适应的独立场所及必要的设备设施。本中心有干细胞检验室、干细胞放行室、知情接待室、细胞计数仪等。

**2.2.4 人员资质与培训** 本中心干细胞临床试验项目负责人和制剂质量受权人由机构主要负责人正式

授权,具有正高级专业技术职称,具有良好的科研信誉。机构配置充足的具备资质的研究人员开展试验,制订并实施人员培训计划,并对培训效果进行监测<sup>[7]</sup>。该项目研究人员经过 GCP、方案、干细胞移植、法律法规等培训,确保项目参与研究者掌握干细胞临床试验技术与相关法规,能承担干细胞治疗脑卒中临床试验。

## 2.3 项目立项审核风险管控

**2.3.1 试验方案入选排除标准审核** 通常 FIH 前的非临床安全性研究可阐明干细胞产品的毒性反应特征,这些信息可用于测算 FIH 的安全起始剂量和剂量范围,确定潜在不良反应的临床监测指标,指导试验风险控制计划的制订。但非临床安全性研究也有其局限性,从非临床过渡到临床时仍有很多不确定性,仅依靠非临床安全性试验难以预测人体临床试验中出现的部分不良反应。为减少不确定性,建议在试验开展前尽可能获得充分的安全性风险信息,在进行 FIH 风险评估时关注靶点特性、药理学特征、毒理学特征、动物模型的相关性和局限性、干细胞产品质量代表性、同类/类似细胞产品的安全性信息等。

该项目为单中心临床试验,研究者与申办者共同参与制订试验方案,入选、排除标准经过主要研究者、研究医师、申办方医学专家等逐条讨论确定。主要从以下方面进行制订:

### (1) 入选标准。

① 明确研究目的:深入理解试验的目标和预期结果,确定所需的受试者特征;根据研究目的确定年龄范围、性别要求等基本条件。

② 参考相关指南和文献:查阅已有的临床指南、专家共识和类似研究,了解该领域对于受试者入选的普遍标准,为制订入选标准提供重要的参考依据,确保标准的科学性和合理性。

③ 关注研究进展,及时调整:关注最新的研究进展,及时调整入选标准以适应新的认识和技术发展。

④ 与多学科团队协作:与临床医师、统计学家、伦理专家等组成的多学科团队密切合作。临床医师可以根据临床经验提供关于疾病表现和患者特征的专业意见;统计学家可以帮助确定样本量和统计分析方法,从而影响入选标准的制订;伦理专家则确保入选标准符合伦理要求。共同讨论和确定入选标准,充分考虑各方面的因素,避免单一视角带来的偏差。

⑤ 严格筛选受试者:在招募受试者时,严格按照入选标准进行筛选。仔细审查受试者的病历资料、检查结果和临床表现,确保其符合入选条件。对于有疑问的情况,及时与多学科团队进行讨论和决策,避免主观判断和随意入选。

### (2) 排除标准。

① 考虑安全性因素:排除可能对试验药物或干预措施有严重不良反应风险的人群;排除合并症的影响,如患有其他严重疾病可能干扰试验结果或增加不良事件风险的患者。

② 避免混杂因素:排除可能影响试验结果的因素,如正在使用可能干扰试验药物疗效或安全性评价的其他药物的患者。对于某些特定的研究,可能需要排除具有特定生活方式或环境因素的人群,以减少混杂因素的影响。

③ 明确排除标准的依据:每一项排除标准都应有明确的科学依据和临床合理性。在制订排除标准时,要详细说明排除的原因,以便在与受试者沟通和解释时能够清晰地传达。定期对排除标准进行评估和修订,根据试验的进展和新的认识及时调整不合理的排除标准。

④ 严格执行排除标准:在筛选受试者时,要严格按照排除标准进行排除。不能因为招募困难而放宽排除标准,否则可能影响试验的质量和结果的可靠性。对于不符合排除标准但被错误纳入的受试者,应及时发现并采取相应的措施,如退出试验或进行特殊的监测和处理。

总之,研究者在把控临床试验的入选标准、排除标准时,需要综合考虑研究目的、受试者安全、试验质量和结果可靠性等多个方面的因素,严格按照标准进行筛选、监测和决策,确保临床试验的科学性、规范性和有效性。

**2.3.2 安全性评估及干预措施风险管控** 该项目临床试验方案中,除常规安全性监测指标,如生命体征、心电图、实验室检查、神经学评估、体格检查和面谈外,还针对非临床以及同类细胞产品研究中所识别的风险,制订合理的安全性监测和控制措施。所有的安全性监测和控制措施的具体内容和时间安排都预先明确。在受试者入组后,定期进行安全性评估,成立安全监查委员会(SRC),当受试者出现 SAE 时,应快速对所有可用的非临床及新产生的临床数据进行整合分析评估,可在 SAE 发展的早期或可能可逆的阶段及早采取干预措施,控制和减轻受试者风险。此外,临床试验方案还对受试者的后期随访进行规定,以监测可能出现的迟发性 AE。

**2.3.3 干细胞治疗产品的剂量递增** 干细胞相关产品在 FIH 试验中选择剂量增幅时,应考虑非临床研究及类似产品的临床数据中剂量变化对受试者安全性和有效性的影响。对每一剂量水平的受试者数量的要求,应考虑不同人群对风险的可接受程度,或者对安全性的评价要求<sup>[8]</sup>。

干细胞治疗脑卒中临床试验评估干细胞产品的安全性和耐受性,同时评估用于一次性脑内细胞移



植的最大耐受剂量 (MTD)。首先进行第一个细胞剂量组的爬坡试验,第 1 队列首先纳入 3 名受试者进行相应剂量的细胞移植,完成移植后将收集受试者的不适及实验室检验/检查等异常值并分析其 AE,之后决定是否递增至更高剂量组。决定是否递增至高剂量组的方法如下:在任一治疗组内 1 名受试者出现细胞相关的严重不良反应(剂量限制性毒性,DLT)时,则在此剂量组内增加 3 名受试者。如果总共 6 名受试者中的 2 名或以上出现 DLT,则其他受试者不再接受更高剂量的治疗。第 2~3 队列各纳入 6 名受试者进行相应剂量的细胞移植,完成移植后将收集受试者的不适及实验室检验/检查等异常值并分析其 AE,之后决定是否递增至更高剂量组。如果 2 名以下的受试者发生 DLT,则补充相应的受试者,若总共 9 名受试者中的 3 名或以上出现 DLT,则其他受试者不再接受此剂量及更高剂量的治疗,并且前一低剂量被定义为假定 MTD。若 1~3 队列均完成试验且经 SRC 评估与细胞移植相关的 AE(与手术操作相关和与细胞治疗相关)的发生风险符合可接受范围,包括<50%的受试者出现 2 级及以上的肯定相关的 AE,将递增至第 4 队列 MTD 剂量组。

**2.3.4 干细胞治疗产品给药方案的制订** 在 FIH 试验中,常采用受试者之间设置一定间隔、逐例给药的方式,避免多个受试者同时暴露而增加安全性风险。对首例受试者应加强 AE 监测,还要考虑迟发性 AE 的可能。同一剂量组内下一例受试者或下一个剂量组受试者给药前,应规定一定的随访间隔,以观察急性和亚急性不良反应<sup>[8]</sup>。该项目要求每个剂量入组完成后,受试者需随访 2 个月方可开始下一个剂量入组,以规避迟发性可疑且非预期严重不良反应(SUSAR)的发生。

**2.3.5 其他重点审核内容** 细胞临床试验项目立项审核时需要重点审核的内容还包括:

① 研究者手册:研究产品相关信息、研发现状、作用机制等;研究产品的物理、化学、药学特性(组成成分和性状)、制剂的剂型和规格、制备过程、产品的使用流程以及产品的来源;临床前研究结果(体外、体内),安全性和有效性结果及分析等;临床应用安全性总结;产品工艺、综合评价等;潜在风险;产品制备、质量控制、输注前准备工作、用法用量、合并用药、临床安全性和疗效判定等;其他与本研究操作相关的内容。② 产品相关的检测报告:检验报告相关说明、检测内容、成品检测报告等。③ 制备过程中主要的原辅料标准。④ 制备工艺、质量控制标准。⑤ 制备过程的完整记录。⑥ 风险防控预案。⑦ 试验方案的其他内容。⑧ 知情同意书等。

## 2.4 学术审查风险管控

本中心机构已建立干细胞临床研究项目学术、伦理审查制度,接受国家和省级干细胞临床研究专家委员会和伦理委员会的监督,促进学术、伦理审查的公开、公平、公正。

**2.4.1 学术委员会组织架构** 机构在组建干细胞学术委员会时,要求其成员的专业领域需覆盖临床相关学科、干细胞基础与临床研究、干细胞制备技术、干细胞质量控制、生物医学统计以及流行病学等方面。学术审查是推进干细胞临床试验工作的重要监督保障手段。本中心干细胞学术委员会有主任委员 1 名,副主任委员 2 名,委员 12 名,秘书 1 名,专业领域符合《管理办法》的要求,能充分发挥其主体作用,从独立性、学术性、规范性完善了学术委员会的组织架构,委员数量、背景、身份均符合规定,同时避免学术委员会和伦理委员会委员重叠,提高了干细胞临床试验院内审查水平。

**2.4.2 学术委员会审查标准** 结合《管理办法》制订针对干细胞临床试验的学术审查标准操作规程,主要从 6 个方面审查。① 科学性:审核项目是否有开展的必要性、方案设计是否科学合理、后期追踪随访规划是否完整、经费来源是否充足、应急预案是否完备。② 安全性:审核干细胞制剂生产过程、细胞运输与移植过程的安全性及制备方制剂质量控制的能力、放行检验的流程是否安全可控。③ 充分性:审核干细胞制剂临床前研究数据是否完整、对临床研究能否提供有效的安全证据。④ 可行性:主要研究者及研究团队是否具备一定的资质与科研能力,干细胞制剂提供单位资质及实力和干细胞临床试验质量授权人资质及相关人员能力与培训情况。⑤ 实用性:项目是否具有一定的应用和推广价值,对临床有一定的指导和参考价值,或者预期有良好的应用前景。⑥ 实操性:审核项目风险控制计划及相关预案是否具有实操性,以及在发生意外情况时申办方给受试者的赔偿/补偿方案等是否合理<sup>[7]</sup>。

## 2.5 伦理审查风险管理

开展干细胞临床试验应当遵守伦理准则,符合《涉及人的生物医学研究伦理审查办法》《人胚胎干细胞研究伦理指导原则》《涉及人的临床研究伦理委员会建设指南》(以下简称《建设指南》)和《涉及人的生命科学和医学研究伦理审查办法》等要求。2020 年《建设指南》公布,附则六对干细胞临床研究伦理审查进行了专门规定:干细胞临床研究除遵循通用伦理准则之外,还需要专门适用于干细胞临床研究的伦理要求。即干细胞临床研究需同时遵循“通用伦理原则”和“专门伦理原则”,以确保受试者的权益得到充分尊重和保护。

干细胞临床试验除常规药物临床试验伦理审查内容外,还需特别关注干细胞来源、获取和操作过



程是否符合伦理,对制备过程中不合格和临床试验中剩余的细胞是否采取了妥善、合法并符合伦理的方法处理等<sup>[7]</sup>。

**2.5.1 伦理委员会组织架构** 《管理办法》规定“干细胞临床研究伦理委员会应当由了解干细胞研究的医学、伦理学、法学、管理学、社会学等专业人员及至少 1 位非专业的社会人士组成,人员不少于 7 位,负责对干细胞临床研究项目进行独立伦理审查,确保干细胞临床研究符合伦理规范”。《建设指南》进一步明确“伦理审查委员会对干细胞临床研究方案审查时,参加审查的成员必须包括具有能力评估干细胞临床前研究的专家,参加审查的成员应当至少包含 1 名具有从事过干细胞相关基础、产品研发或临床研究 3 年以上经历的研究人员”。本中心伦理委员会人员组成符合《管理办法》和《建设指南》的要求,已完成 NMPA 批准的干细胞临床试验 8 项及研究者发起的干细胞临床研究项目(简称 IIT 研究)20 项的伦理审查。

**2.5.2 伦理委员会跟踪审查** 对批准的干细胞临床试验,伦理委员会需规范地进行实质跟踪审查。重视研究期间受试者发生的 AE 和 SAE,及时关注研究进展情况。在研究各阶段开展的关键点进行伦理审查,在首例受试者安全性问题尽可能充分暴露后,再逐一入组其他受试者,以降低对受试者的影响。关注安全性事件和受试者的转归,判断研究者对于发生的 SAE 及 SUSAR 的处理措施是否合理。本中心根据临床研究需求可随时召开紧急伦理审查会议,针对特殊事件进行讨论,若发生影响受试者权益或重大安全性事件,伦理委员会有权决定已批准的试验项目暂停。

## 2.6 受试者风险管控

干细胞治疗脑卒中临床试验按照伦理委员会批准的试验方案中入选、排除标准筛选合格的受试者。当出现研究方案、范围、内容等发生变化的情况时,需再次获取受试者的知情同意。研究者需对受试者进行充分知情,给予充足的时间考虑和提问,知情同意过程及时准确地记录在病历中,试验过程中及时解答和关注受试者需求和病情变化,提高其用药依从性和访视依从性。

干细胞治疗脑卒中临床试验在试验启动会后受试者入组前开展了试验全流程预演,确保研究者熟悉方案及流程,首例受试者移植时机机构办质控员全程实时质控,首例入组完成后及时进行全过程质控,发现问题及时整改,并制订风险防控预案。

干细胞治疗脑卒中临床试验项目根据方案要求需在手术室完成,待受试者全身麻醉后,于受试者头颅固定立体定向头架,根据术前计划指示位置在受试者额顶部的颅骨上钻孔,因此需要提前制订手术方案,做好术前准备工作。由于干细胞产品(有

效期 72 h)生产后须尽快使用,每批次干细胞产品细胞数量和存活率的不确定性等因素,试验过程中研究者需要准确控制受试者全身麻醉时间、颅骨钻孔时间等,研究者只有拿到细胞产品放行检验报告后方可进行治疗性操作,麻醉和颅骨钻孔时间均不能早于干细胞产品放行检验时间,以避免出现干细胞产品质量检测不达标,受试者麻醉时间延长和颅骨钻孔频次多,增加受试者安全风险的情况。

## 2.7 干细胞产品风险管控

干细胞的来源、质量监控以及临床前研究和临床试验的标准化是干细胞治疗脑卒中临床试验中不可忽视的关键问题,申办者是干细胞制剂制备质量的责任主体。

**2.7.1 制剂制备质量要求** 干细胞制剂制备质量包括主要原辅料标准、制备工艺、质量控制标准和制订依据及工艺稳定性数据、制备过程完整记录、质量检验报告、干细胞制剂的标签/储存/运输和使用追溯方案、不合格和剩余干细胞制剂的处理措施等均符合要求<sup>[9]</sup>。

**2.7.2 干细胞质量检验** 质量检验包括细胞鉴别、存活率及生长活性、纯度和均一性、无菌试验和支原体、细胞内外源致病因子、内毒素、异常免疫学反应、生物学效力试验、致瘤性、培养基及其他添加成分残余量的检测<sup>[9]</sup>。

**2.7.3 干细胞过程管理** 干细胞过程管理主要包括干细胞活力及数量稳定性、细胞运输条件、全过程专人管理、复核质检报告、干细胞移植操作程序、移植后观察和记录等。研究者和操作人员的临床经验和技能可能影响产品使用的安全性和有效性。该项目首例移植时存在过程记录缺失、记录文件设计不合理等问题,研究者立即进行了补充和完善。

## 2.8 干细胞放行检验风险管控

放行检验是确保最终用于临床试验的干细胞没有被污染的关键检测之一。干细胞治疗脑卒中临床试验项目中,干细胞运输到机构后还需开展放行检验。《管理办法》明确医疗机构是干细胞临床研究的责任主体,并要求医疗机构建立健全的干细胞产品质量管控机制。干细胞产品的放行检验过程如不受医疗机构监管,受试者将存在安全风险。本中心要求所有批次干细胞由机构开展放行检验,临床科室需在机构实验室出具放行检验报告后方可进行受试者麻醉和手术等试验操作。

**2.8.1 干细胞形态观察** 在显微镜下观察,细胞形态特征正常,细胞膜清晰。

**2.8.2 干细胞数量和活率检测** 干细胞治疗脑卒中临床试验项目干细胞数量的放行标准为干细胞产品目标剂量(80%~110%),细胞活率的放行标准为干细胞产品活率不低于 80%。

**2.8.3 干细胞可见异物检查** 干细胞产品中不得检出金属屑、玻璃屑、长度超过毫米的纤维、最大粒径超过 2 mm 的块状物、静置一定时间后轻轻旋转时摇不散的沉淀,以及在规定时间内较难以计数的蛋白质絮状物等明显可见异物。

## 2.9 研究团队风险管控

**2.9.1 专业化的研究团队** 具有丰富的临床试验实施经验和良好的合作精神的研究团队是临床试验项目得以顺利开展和高质量完成的重要保证。申办方、研究机构在试验开展前遴选有类似项目经验的人员参与到项目研究中,从入组效率、管理能力、协作能力等方面进行考核,选择拥有完善的管理和监督体系的高水平研究团队,保证临床试验的质量。研究者熟悉试验方案和研究者手册中相关内容,严格把握试验产品的使用范围,在实施过程中严格遵守试验方案中的各项规定,熟悉干细胞不良反应的处理流程,及早对安全性相关事件进行合理的判断和处理,及时评估受试者的获益风险比。该项目研究团队基于风险重点关注相关的安全性信息,对于接受干细胞移植的受试者进行长期随访,在细胞移植期间和移植后对受试者密切观察,及时研判受试者的所有检验检查、AE/SAE 等,按照试验方案要求认真完成跟踪随访,做好跟踪随访记录<sup>[10]</sup>。

**2.9.2 完备的应急预案** 在干细胞治疗脑卒中的临床试验项目中,研究者应充分熟悉干细胞不良反应的处理方法和流程,通过在试验前进行应急预案处置流程的演练来增强应对能力,提升紧急情况下如出现过敏反应、细胞因子释放综合征等情况时的应急处置能力。

**2.9.3 有效的人员培训** 干细胞治疗脑卒中临床试验项目由机构办派专人到神经外科进行临床试验专项培训,培训内容包含法规知识、原始病历书写、数据采集、安全性事件报告等,做到有效培训,同时提升研究人员的沟通协作效率和增强法规意识。

**2.9.4 及时的监查、质控、稽查** 干细胞治疗脑卒中临床试验项目要求监查员全程监查,机构质控员首例入组全程实时质控,后续根据实际情况和项目质量制订质控计划,对于监督部门、机构、申办方、质控员等发现的问题,研究者应及时整改,避免再次出现,对于方案不完善的地方及时组织专家讨论修订并提交伦理委员会审核。

**2.9.5 试验过程其他风险管控** 干细胞治疗脑卒中临床试验项目其他风险管控包括生物样本采集、接收与处理、储存与运输全过程管理,安全性数据采集、记录与处理、报告等,均按照 GCP 法规、《药物临床试验机构检查要点》和《药物临床试验数据现场核查要点》等要求进行全流程风险管理。

## 3 总结与展望

国内干细胞临床研究发展迅猛,但对风险管控缺乏成熟经验。干细胞治疗作为一种新兴的治疗手段,不仅需要关注其科学性和技术的进步,更要重视风险的识别与管理措施的制订,以保障受试者的安全和权益,同时也为干细胞治疗的未来应用奠定坚实的基础。机构、伦理委员会和研究者应充分了解新技术的发展,结合国家卫生行政部门相关法规,不断加强自身的学习,提升认知与审查能力,提高对干细胞临床试验风险的辨识能力,合理评估试验的风险与获益比。依法、科学监管,有助于推进干细胞临床试验在国内的健康发展,尽快安全、有效地惠及更多的患者。临床试验参与各方需要重点监测试验全过程的风险因素,建立动态化的监测管控机制和实时保障机制,有效预防和管控风险,促进临床试验顺利实施,保障受试者权益和安全。

## 参考文献

- [1] Phipps MS, Cronin CA. Management of acute ischemic stroke [J]. BMJ, 2020, 368 (1): 16983.
- [2] Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, et al. Heart disease and stroke statistics-2019 update: a report from the American Heart Association [J]. Circulation, 2019, 139 (10): e56-e528.
- [3] 王陇德,彭斌,张鸿祺,等.《中国脑卒中防治报告 2020》概要 [J]. 中国脑血管病杂志, 2022, 19 (2): 136-144.
- [4] Nikolas GT, Andrew WG, Walter CL. Neural repair in stroke [J]. Cell Transplant, 2019, 28 (9-10): 1123-1126.
- [5] 沈友进,戚晓昆,周宗华,等.神经干细胞移植用于脑梗死的神经保护和再生治疗的研究进展 [J]. 中国医药导报, 2021, 18 (36): 45-49.
- [6] 国家药品监督管理局,国家卫生健康委员会.药物临床试验质量管理规范〔2020 年第 57 号〕[EB/OL]. (2020-04-26) [2024-03-22]. <http://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/gzwj/gzwj-yp/20200426084301220.html>.
- [7] 国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局.干细胞临床研究管理办法(试行)[EB/OL]. (2015-07-20) [2024-03-22]. <http://www.nhc.gov.cn/qjjys/s7945/201508/1a794a9558b54b7f9a2d57e5c2d782e1.shtml>.
- [8] 国家药品监督管理局药品审评中心.人源性干细胞及其衍生细胞治疗产品临床试验技术指导原则(试行)[EB/OL]. (2023-06-21) [2024-03-22]. <http://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/qtggtg/20230625160413117.html>.
- [9] 国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局.干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行)[EB/OL]. (2015-07-31) [2024-03-22]. <http://www.nhc.gov.cn/qjjys/s7945/201508/1a794a9558b54b7f9a2d57e5c2d782e1.shtml>.
- [10] 张秋菊,周吉银,蒋辉.我国干细胞临床研究现状与伦理问题分析 [J]. 临床伦理, 2022, 35 (3): 259-262.

(收稿日期: 2024-07-26; 修回日期: 2024-10-26)



# 欧洲人群阿司匹林与鳞状细胞肺癌的因果关联： 一项两样本孟德尔随机化研究

刘丽艳<sup>1, 2, 3</sup>, 孙传铎<sup>2</sup>, 余克富<sup>1</sup>, 史卫忠<sup>1</sup>, 赵志刚<sup>1\*</sup> (1. 解放军总医院京中医疗区, 北京 100050; 2. 首都医科大学附属北京天坛医院药学部, 北京 100088; 3. 首都医科大学药学院, 北京 100069)

**摘要：目的** 通过两样本孟德尔随机化方法，探讨阿司匹林与鳞状细胞肺癌（SqCLC）的因果关联。**方法** 从全基因组关联研究数据中筛选出与阿司匹林相关的遗传变异作为工具变量，以逆方差加权法（IVW）为主要方法来估计因果效应，并对研究结果进行敏感性分析。**结果** IVW 分析结果表明，阿司匹林对 SqCLC 有一定的保护作用（ $OR = 0.000\ 97$ ,  $95\%CI: 2.86 \times 10^{-5} \sim 0.03$ ,  $P < 0.05$ ）；异质性检验结果表明，阿司匹林与 SqCLC 之间的因果关联不存在异质性（ $P > 0.05$ ）；水平多效性检验结果表明，阿司匹林与 SqCLC 不存在水平多效性的影响（ $P > 0.05$ ）。**结论** 本研究证实了阿司匹林和 SqCLC 风险之间存在因果关联，服用阿司匹林可降低 SqCLC 的发病风险。

**关键词：**阿司匹林；鳞状细胞肺癌；孟德尔随机化；因果关联

**中图分类号：**R735.9

**文献标识码：**A

**文章编号：**1672-2981(2025)06-1812-05

**doi:**10.7539/j.issn.1672-2981.2025.06.048

## Causal association between aspirin and squamous cell lung cancer: a two-sample Mendelian randomization study in European population

LIU Li-yan<sup>1, 2, 3</sup>, SUN Chuan-duo<sup>2</sup>, YU Ke-fu<sup>1</sup>, SHI Wei-zhong<sup>1</sup>, ZHAO Zhi-gang<sup>1\*</sup> (1. Central Medical Branch of the PLA General Hospital, Beijing 100088; 2. Department of Pharmacy, Tiantan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100050; 3. School of Pharmacy, Capital Medical University, Beijing 100069)

**Abstract: Objective** To determine the causal association between aspirin and squamous cell lung cancer (SqCLC) by a two-sample Mendelian randomization method. **Methods** Genetic variants associated with aspirin were screened from genome-wide association study (GWAS) data as instrumental variables for genes, with the inverse variance weighting (IVW) method serving as the primary approach to estimate the causal effects. Sensitivity analyses were further conducted on the research findings. **Results** IVW analysis showed that aspirin had a protective effect on SqCLC ( $OR = 0.00097$ ,  $95\%CI = 2.86 \times 10^{-5} \sim 0.03$ ,  $P < 0.05$ ). The heterogeneity test indicated no significant heterogeneity in the causal association between aspirin and SqCLC ( $P > 0.05$ ). The horizontal pleiotropy test showed that aspirin did not exert a horizontal pleiotropic effect on SqCLC ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** This study demonstrates a causal association between aspirin and SqCLC risks: aspirin usage might reduce the risk of SqCLC.

**Key words:** aspirin; squamous cell lung cancer; Mendelian randomization; causal association

肺癌是一种普遍见于全球的恶性肿瘤，其中非小细胞肺癌的患病人数约占肺癌的 80% ~ 85%，且具有较高的发病率和死亡率<sup>[1-4]</sup>。鳞状细胞肺癌（squamous cell lung cancer, SqCLC）是非小细胞

肺癌的一种常见亚型，其发病与长期吸烟和一些吸入致癌物质有关，近年来治疗和管理方面的提升大大减少了肺癌的发病率，但肺癌病例的 5 年生存率仅为 19%。因此，发现有效预防肺癌发病

**基金项目：**首都医科大学科研培育基金（No.PYZ23117）。

**作者简介：**刘丽艳，女，主管药师，主要从事临床药学工作，email: lily559926@163.com \* **通信作者：**赵志刚，男，主任药师，教授，博士研究生导师，主要从事临床药学与药事管理研究，email: 1022zzg@sina.com



的方案具有重要意义<sup>[5-7]</sup>。

研究表明,阿司匹林可降低食道癌<sup>[8]</sup>、胃癌<sup>[9]</sup>、结直肠癌<sup>[10]</sup>、前列腺癌<sup>[11]</sup>和乳腺癌<sup>[12]</sup>的患病风险。有部分研究调查了阿司匹林与肺癌风险之间的关联,但研究结论并不一致<sup>[13-18]</sup>,因此本研究从遗传学的角度探讨阿司匹林和 SqCLC 之间的关联。

孟德尔随机化(Mendelian randomization, MR)是一种应用遗传工具变量的方法分析基因数据,能够提供因果效应的估计,避免观察性研究中混杂因素的影响,较好地反映暴露对结果的长期影响,已成为建立疾病和风险因素之间因果关联的重要评价方式<sup>[19]</sup>。本次研究使用全基因组关联研究(genome-wide association study, GWAS)的两样本 MR 研究方法,探讨服用阿司匹林与 SqCLC 发病风险之间的潜在因果关系,阐明阿司匹林与 SqCLC 发病的关联。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究设计

本研究采用两样本 MR 分析方法,挖掘药物阿司匹林与 SqCLC 患病风险的因果关系。在本研究中,选取与暴露因素(阿司匹林)强相关的单核苷酸多态性(SNP)为工具变量(IV),SqCLC 为结局,评估暴露与结局之间的因果关系。进行 MR 研究需要满足三个关键假设:第一,所选的 SNP 应该与暴露显著相关(阿司匹林);第二,SNP 必须独立于潜在的混杂因素;第三,工具变量仅通过阿司匹林的作用影响 SqCLC 发生的风险。

### 1.2 数据来源

从 GWAS 中获取与阿司匹林显著相关的 SNP 作为 IV,筛选 SNP 需满足以下标准:① SNP 要与阿司匹林强相关,以  $P < 5 \times 10^{-8}$  作为标准;② SNP 之间要相互独立,满足连锁不平衡( $r^2 < 0.001$  且每两个基因间的物理距离  $> 10\ 000\text{ kb}$ );③ 统计学强度以统计量  $F > 10$  作为强相关标准,避免弱 IV 导致偏倚;④ SqCLC 的混杂因素,如吸烟、炎症、慢性肺疾病和遗传因素<sup>[5-7]</sup>等可能会对结果造成一定的偏移,因此本研究剔除了与这些混杂因素相关的 SNP。

本研究阿司匹林 GWAS 数据集样本量是 337 159, SNP 数量是 108 945 968。SqCLC 样本量是 62 467, SNP 数量是 10 341 529。GWAS 数据信息具体见表 1。

表 1 两样本 MR 研究 GWAS 数据信息

Tab 1 GWAS data information of two samples of MR research

| GWAS ID   | 变量    | 样本量     | SNP 数量      | 人种  | 性别    |
|-----------|-------|---------|-------------|-----|-------|
| ukb-a-132 | 阿司匹林  | 337 159 | 108 945 968 | 欧洲人 | 男性和女性 |
| ieu-a-989 | SqCLC | 62 467  | 10 341 529  | 欧洲人 | 男性和女性 |

### 1.3 两样本 MR 分析

使用 R 软件的 TwoSampleMR 包进行统计分

析。本研究使用了 5 种 MR 方法,即逆方差加权法(inverse variance weighting, IVW)、Egger 回归法(MR-Egger regression, MR-Egger)、加权中位数法(weighted median estimate, WME)、简单模式及加权模式进行双样本 MR 分析。IVW 方法作为最主要的 MR 分析,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义,其他方法对上述结果进行补充。采用 MR-Egger 和 IVW 法对研究结果进行异质性检验,当  $P < 0.05$  时为差异具有统计学意义,即不同研究结果之间存在明显的异质性。使用 MR-Egger 截距项检验水平多效性,如果截距与零有显著差异( $P < 0.05$ ),则说明存在水平多效性,即不同因果估计结果受到水平多效性的影响。IVW 法作为最主要的 MR 分析,其他方法对上述结果进行补充。采用留一法(leave-one-out)逐一剔除单个 SNP,观察结果的稳定性。通过逐步剔除每个 SNP 并重新分析,可以评估单个 SNP 对结果的贡献以及是否存在离群值。同时通过森林图和漏斗图构建可视化图,检验 MR 分析是否存在水平多效性, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义,提示 MR 分析存在潜在的因果关系。

## 2 结果

### 2.1 工具变量

剔除阿司匹林存在连锁不平衡的 SNP 后,共有 6 个与 SqCLC 相关的 SNP 作为 IV,结果中  $F$  值均  $> 10$ ,即本研究未受弱工具变量的影响。

### 2.2 孟德尔随机化分析

IVW 显示使用药物阿司匹林可降低 SqCLC 风险 [ $OR = 0.000\ 97$ ,  $95\%CI = 2.86 \times 10^{-5} \sim 0.03$ ,  $P < 0.05$ ],WME 同样证实阿司匹林可降低 SqCLC 风险 [ $OR = 0.0018$ ,  $95\%CI = 4.18 \times 10^{-5} \sim 0.08$ ,  $P < 0.05$ ],两种方法差异均具有统计学意义。5 种方法得到的因果关系方向一致,显示阿司匹林对 SqCLC 的保护作用,见表 2 和图 1。

表 2 不同方法下阿司匹林与鳞状细胞肺癌的 MR 分析结果

Tab 2 MR analysis of aspirin and SqCLC under different methods

| 方法       | SNP | OR       | 95%CI                              | P      |
|----------|-----|----------|------------------------------------|--------|
| IVW      | 6   | 0.000 97 | ( $2.86 \times 10^{-5}$ , 0.03)    | 0.0001 |
| MR-Egger | 6   | 0.000 51 | ( $3.11 \times 10^{-10}$ , 821.03) | 0.36   |
| WME      | 6   | 0.0018   | ( $4.18 \times 10^{-5}$ , 0.08)    | 0.001  |
| 加权模式     | 6   | 0.039    | ( $1.06 \times 10^{-5}$ , 144.32)  | 0.47   |
| 简单模式     | 6   | 0.027    | ( $2.19 \times 10^{-5}$ , 34.29)   | 0.37   |

### 2.3 异质性及水平多效性分析

采用 MR-Egger 和 IVW 法对研究结果进行异质性检验,显示心肌梗死的  $P > 0.05$ ,说明 SNP 不存在异质性,结果见表 3 和图 2。MR-Egger 的 egger\_intercept 结果( $P = 0.931$ )说明阿司匹林与 SqCLC 的因果关联不存在水平多效性,见图 3。

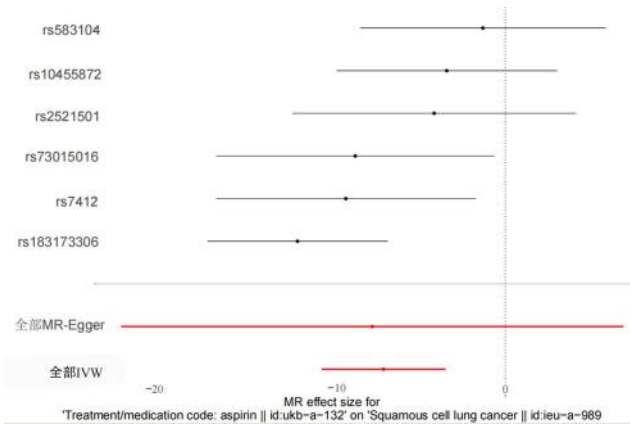


图 1 阿司匹林与 SqCLC 相关性的森林图

Fig 1 Forest map of correlation between aspirin and SqCLC

表 3 不同方法下鳞状细胞肺癌异质性分析结果

| 方法       | <i>Q</i> | <i>P</i> |
|----------|----------|----------|
| MR-Egger | 8.264    | 0.082    |
| IVW      | 8.281    | 0.141    |

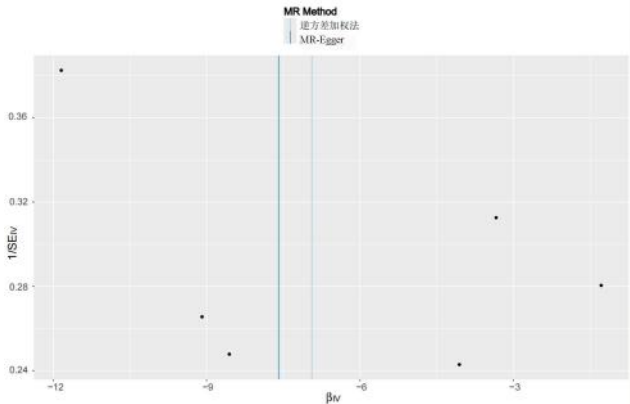


图 2 阿司匹林与 SqCLC 相关性的漏斗图

Fig 2 Funnel diagram of correlation between aspirin and SqCLC

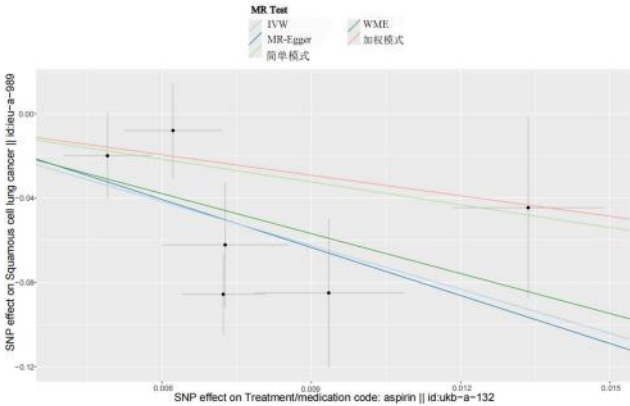


图 3 阿司匹林与 SqCLC 相关性的散点图

Fig 3 Scatter diagram of correlation between aspirin and SqCLC

## 2.4 敏感性分析

“留一法”敏感性分析结果表明，没有单个 SNP 对整体结果有较大影响，见图 4。

## 3 讨论

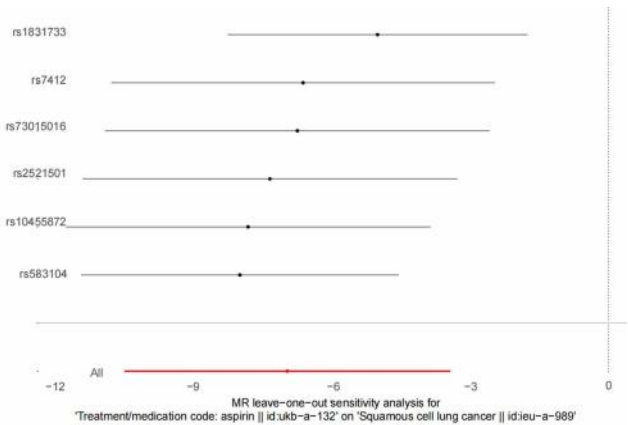


图 4 阿司匹林与 SqCLC 相关性的“留一法”图

Fig 4 “Leave-one-out” correlation between aspirin and SqCLC

本研究采用两样本 MR 设计，基于遗传变异探讨阿司匹林与 SqCLC 发病风险之间的因果关系，研究发现服用阿司匹林可显著降低 SqCLC 的发病风险，近年已有多项研究为其提供支持<sup>[18, 20]</sup>。很多临床研究探究了阿司匹林与肺癌之间的关联，有研究通过对已发表的 meta 分析研究、队列研究、病例对照研究和随机对照试验并纳入 MR 研究，阐明阿司匹林使用与肺癌风险之间的关系，结果证明了阿司匹林对肺癌、男性肺癌、SqCLC 的保护作用<sup>[21-22]</sup>。

阿司匹林是最常用的非甾体抗炎药之一，其通过抑制环氧合酶-2 (COX-2) 和减少血管生成来降低癌症发病率和死亡率<sup>[23]</sup>，还可通过抑制环氧合酶-1 (COX-1) 来减少肺癌转移<sup>[24]</sup>。本研究证实了基因预测的阿司匹林使用与 SqCLC 之间存在显著的负相关，与以上研究结果一致。

本研究采用 MR 分析方法探讨阿司匹林与 SqCLC 的因果关联。使用 SNP 作为暴露的工具变量，并在人群中随机分配，工具变量按  $P < 5 \times 10^{-8}$  阈值进行筛选，它可以从 GWAS 数据库中筛选出与阿司匹林具有显著关联的 SNP。连锁不平衡主要使用参数  $r^2$  和每两个基因间的物理距离来衡量，因为连锁不平衡 SNP 之间距离相近，往往功能相似，对结果影响的效应值相关，违背了 MR 的核心假设，因此需要剔除连锁不平衡的 SNP，设置参数为  $r^2 < 0.001$  且每两个基因间的物理距离  $> 10\,000$  kb。工具变量相关性的评估采用计算弱工具变量 ( $F$  值)，本研究设置为  $F > 10$ ，以确保工具变量的强度足够。以前的研究表明，吸烟、空气污染、慢性肺部疾病和遗传因素等都会诱发肺癌，可能会干扰对结果的测定，本文采用 phenoscanner (<http://www.phenoscanner.medschl.cam.ac.uk/>) 网站进行检索，剔除混杂因素。这些标准也是目前 MR 研究中普遍采用的严格标准，

能够有效筛选出强相关的工具变量<sup>[25-28]</sup>。

在本研究中,为降低误差,阿司匹林和 SqCLC 的数据集均来自不同的实验样本,以避免样本重叠,本文同时使用 IVW、MR-Egger 回归、WME、简单模式及加权模式进行双样本 MR 分析,结果发现,IVW 和 WME 方法均显示差异具有统计学意义,其余方法虽然差异无统计学意义,但趋势与前两种方法一致。敏感性分析也显示不存在异质性和水平多效性。本研究分析结果显示阿司匹林对 SqCLC 具有显著保护效应 [ $OR = 0.000\ 97$ ,  $95\%CI = 2.86 \times 10^{-5} \sim 0.03$ ,  $P < 0.05$ ], 但  $OR$  值接近 0, 认为  $OR$  值偏低可能有以下几个原因:

① 样本量较小: 相对于阿司匹林的 337 159 个样本, SqCLC 的样本量 62 467 相对较小, 样本量不足可能导致效应值估计偏低。② 潜在的混杂因素: 虽然已经尽可能排除了已知的主要混杂因素如吸烟、慢性肺部疾病等的影响, 但仍可能存在一些未知的混杂因素导致效应值偏低, 如社会经济地位、饮食习惯、职业暴露等也可能影响 SqCLC 的发病风险, 而这些因素目前尚难以完全排除。③ 药物剂量和用药时间的影响: 不同剂量和服药时间的阿司匹林可能对 SqCLC 的保护效果存在差异。目前的研究受限于 GWAS 数据的特点, 难以对药物剂量和服药时间进行细分, 这可能导致效应值偏低。但阿司匹林对肺癌的保护作用已经得到流行病学证据的初步支持, 本文 MR 研究从遗传学角度进一步证实了两者的因果关联, 因此效应值的可靠性还需要更多研究予以验证, 未来研究还应扩大样本量, 细化药物暴露分层, 纳入更多种族的样本, 同时尽可能收集和调整更全面的混杂因素, 以期获得更精准的因果效应估计, 并明确阿司匹林预防 SqCLC 的适应人群。

本研究优势: ① MR 分析使用 SNP 作为暴露的工具变量, 在人群中随机分配, 被用作随机对照试验的替代方案, 与观察性研究相比, 它更不容易受到潜在混杂因素和反向因果关系的影响, 研究结果稳定可靠; ② 本文研究采用双样本 MR 方法, 对来自两个不同研究的汇总数据进行分析, 比单样本 MR 分析精度更高; ③ 目前尚无 MR 研究关注这个问题, 本研究首次阐明阿司匹林摄入与 SqCLC 发病率的因果关系, 从遗传学角度证实了阿司匹林对 SqCLC 的保护作用, 为阿司匹林与 SqCLC 之间的因果关系提供了重要的初步证据, 尤其是在欧洲人群中。

本研究为阿司匹林对 SqCLC 发病率的因果

保护作用提供了证据, 通过两样本 MR 分析证实了阿司匹林对 SqCLC 的保护和预防作用, 为未来更广泛、更全面的研究奠定了基础, 为临床抗肿瘤治疗提供了重要的证据。

## 参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, et al. Cancer statistics, 2023 [J]. CA Cancer J Clin, 2023, 73 (1): 17-48.
- [2] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65 (2): 87-108.
- [3] Gao SG, Li N, Wang SH, et al. Lung cancer in People's Republic of China [J]. J Thorac Oncol, 2020, 15 (10): 1567-1576.
- [4] Chen PX, Liu YH, Wen YK, et al. Non-small cell lung cancer in China [J]. Cancer Commun (Lond), 2022, 42 (10): 937-970.
- [5] Bade BC, Dela Cruz CS. Lung cancer 2020: epidemiology, etiology, and prevention [J]. Clin Chest Med, 2020, 41 (1): 1-24.
- [6] Lau SCM, Pan Y, Velcheti V, et al. Squamous cell lung cancer: current landscape and future therapeutic options [J]. Cancer Cell, 2022, 40 (11): 1279-1293.
- [7] Fathy M, Hamed M, Youssif O, et al. Association between environmental tobacco smoke exposure and lung cancer susceptibility: modification by antioxidant enzyme genetic polymorphisms [J]. Mol Diagn Ther, 2014, 18 (1): 55-62.
- [8] Sivarasan N, Smith G. Role of aspirin in chemoprevention of esophageal adenocarcinoma: a meta-analysis [J]. J Dig Dis, 2013, 14 (5): 222-230.
- [9] Ye XH, Fu JJ, Yang Y, et al. Frequency-risk and duration-risk relationships between aspirin use and gastric cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. PLoS One, 2013, 8 (7): e71522.
- [10] Ishikawa H, Wakabayashi K, Suzuki S, et al. Preventive effects of low-dose aspirin on colorectal adenoma growth in patients with familial adenomatous polyposis: double-blind, randomized clinical trial [J]. Cancer Med, 2013, 2 (1): 50-56.
- [11] Mahmud S, Franco E, Aprikian A. Prostate cancer and use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: systematic review and meta-analysis [J]. Br J Cancer, 2004, 90 (1): 93-99.
- [12] Khuder SA, Mutgi AB. Breast cancer and NSAID use: a meta-analysis [J]. Br J Cancer, 2001, 84 (9): 1188-1192.
- [13] Hochmuth F, Jochem M, Schlattmann P. Meta-analysis of aspirin use and risk of lung cancer shows notable results [J]. Eur J Cancer Prev, 2016, 25 (4): 259-268.
- [14] Jiang HY, Huang TB, Xu L, et al. Aspirin use and lung cancer risk: a possible relationship evidence from an updated meta-analysis [J]. PLoS One, 2015, 10 (4): e0122962.



- [15] Bosetti C, Rosato V, Gallus S, et al. Aspirin and cancer risk: a quantitative review to 2011 [J]. *Ann Oncol*, 2012, 23 (6): 1403-1415.
- [16] Mc Menamin ÚC, Cardwell CR, Hughes CM, et al. Low-dose aspirin and survival from lung cancer: a population-based cohort study [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 911.
- [17] Hochmuth F, Jochem M, Schlattmann P. Meta-analysis of aspirin use and risk of lung cancer shows notable results [J]. *Eur J Cancer Prev*, 2016, 25 (4): 259-268.
- [18] Jonsson F, Yin L, Lundholm C, et al. Low-dose aspirin use and cancer characteristics: a population-based cohort study [J]. *Br J Cancer*, 2013, 109 (7): 1921-1925.
- [19] Birney E. Mendelian randomization [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2022, 12 (4): a041302.
- [20] Van Dyke AL, Cote ML, Prysak G, et al. Regular adult aspirin use decreases the risk of non-small cell lung cancer among women [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2008, 17 (1): 148-57.
- [21] Li CC, Li JF, Xiong S, et al. Risk mapping of lung cancer: a comprehensive appraisal of published meta-analyses incorporating Mendelian randomization studies [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2023, 149 (10): 6857-6873.
- [22] Jiang Y, Su ZX, Li CC, et al. Association between the use of aspirin and risk of lung cancer: results from pooled cohorts and Mendelian randomization analyses [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2021, 147 (1): 139-151.
- [23] Salinas CA, Kwon EM, FitzGerald LM, et al. Use of aspirin and other nonsteroidal antiinflammatory medications in relation to prostate cancer risk [J]. *Am J Epidemiol*, 2010, 172 (5): 578-590.
- [24] Lucotti S, Cerutti C, Soyer M, et al. Aspirin blocks formation of metastatic intravascular niches by inhibiting platelet-derived COX-1/thromboxane A2 [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129 (5): 1845-1862.
- [25] Rothwell PM, Fowkes FG, Belch JF, et al. Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials [J]. *Lancet*, 2011, 377 (9759): 31-41.
- [26] Larsson SC, Burgess S, Michaëlsson K. Association of genetic variants related to serum calcium levels with coronary artery disease and myocardial infarction [J]. *JAMA*, 2017, 318 (4): 371-380.
- [27] Zhan YQ, Fang F. Smoking and amyotrophic lateral sclerosis: a Mendelian randomization study [J]. *Ann Neurol*, 2019, 85 (4): 482-484.
- [28] Ren Z, Simons PIHG, Wesselius A, et al. Relationship between NAFLD and coronary artery disease: a Mendelian randomization study [J]. *Hepatology*, 2023, 77 (1): 230-238.

(收稿日期: 2024-08-27; 修回日期: 2024-09-21)