



# 中南药学

ZHONGNAN YAOXUE

月刊 2003 年 4 月创刊 第 23 卷 第 8 期 (总第 235 期) 2025 年 8 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

### 论著

- (2143) 基于网络药理学及实验验证探究甘草地上部分黄酮类成分抗慢性前列腺炎的有效成分及可能的作用机制 ..... 贾栖, 侯俊玲, 云鹭, 等
- (2151)  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX 靶向放射性核素药物的制备及其抗弥漫性大 B 细胞淋巴瘤初步研究 ..... 张馨雨, 于兴泰, 胡哲铭, 等
- (2157) 基于 UPLC-MS/MS、网络药理学、分子对接和体外实验探究左归丸治疗阿尔茨海默病的机制 ..... 王燕, 唐亮, 刘瑶, 等
- (2165) 基于网络药理学和实验验证探究杏贝止咳祛痰口服液治疗儿童支气管炎的作用机制 ..... 杨子烨, 谭征, 刘洁, 等
- (2173) LC-MS/MS 法测定 Beagle 犬血浆中泮托拉唑浓度及毒代动力学研究 ..... 侯利平, 谢昕, 曹贝希, 等
- (2178) 新型白藜芦醇-苯并呋喃类衍生物的设计、合成与体外抗结肠癌活性评价 ..... 陈昱, 李雅娜, 孟祥璟
- (2187) 超临界  $\text{CO}_2$  萃取法和水蒸气蒸馏法提取的花椒精油成分分析及其抑菌活性、抗氧化活性的比较 ..... 张蕾, 王友峰, 杨乐, 等
- (2193) 基于网络药理学和体外实验探究新藤黄酸抗肿瘤的作用机制 ..... 高慧敏, 刘珂, 彭雷, 等
- (2201) 辰砂六一散中活性成分对慢性肝损伤大鼠的药效学和药动学分析 ..... 富薪竹, 刘烁, 国宁宁, 等
- (2208) 基于网络药理学的蛹虫草活性成分抗乳腺癌活性及作用机制研究 ..... 窦瑶, 王宏英, 孙聪, 等
- (2217) 新型钙激活氯离子通道 ANO1 抑制剂抗前列腺癌作用研究 ..... 杨小花, 陈攀, 罗桂芳, 等
- (2225) 基于网络药理学和铁死亡探讨白芍总苷改善肠缺血再灌注的潜在作用机制 ..... 车轩, 郭依然, 赵国杰
- (2232) 左氧氟沙星对小鼠他克莫司血药浓度与肠道菌群的影响 ..... 张淑婷, 钱敏燕, 徐草梅, 等
- (2238) 麻杏石甘汤对脂多糖诱导的 II 型肺泡上皮细胞炎性损伤的影响 ..... 陆桥, 陈垣, 黄九林, 等
- (2244) 基于 HPLC-FT-ICR-MS 的荷丹片化学成分研究 ..... 金凤, 靳彤, 刘烁, 等
- (2253) 基于结块强度研究薏苡仁配方颗粒干法制粒工艺 ..... 吴贞澳, 杨凌宇, 张爱玲, 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

- (2259) 紫草素通过 FOXA2-SIRT1 信号轴抑制心肌细胞焦亡的研究  
..... 童中艺, 汪柯, 郭涛, 等
- (2265) 基于 JAK/STAT 信号通路探讨泻白散外治对玫瑰痤疮小鼠的作用及  
机制 ..... 赵艺凡, 何金穗, 刘雪英, 等
- (2272) 葶苈宁对盐酸异丙肾上腺素诱导的小鼠心肌肥厚的保护作用及机制  
..... 王志华, 初雨萌, 张媛, 等
- (2277) 基于化学成分 - 活性的白毛银露梅产地干燥加工方法研究  
..... 崔小敏, 陈志永, 张红, 等
- (2283) 通心络通过调控蛋白组中 Wnt 信号通路缓解过氧化氢诱导的 H9c2  
心肌细胞损伤 ..... 张维, 程诺, 曹辉, 等
- (2290) 基于 PI3K/AKT 信号通路探讨氧化小檗碱和小檗胺对心肌细胞的保护  
作用 .....  
努尔比耶·努尔艾合麦提, 地力乎马·地力木拉提, 阿乐哈尔·拜山, 等
- (2298) 共载多种生物酶的金属离子配位纳米粒的制备及其体外抗肿瘤作用  
研究 ..... 黎绫, 廖艳, 刘治芳, 等
- (2303) 基于清肺排毒汤煎煮汤剂质量评价的相对密度 95% 预测区间模型研究  
..... 郑琼芳, 闫斌, 赵伟, 等
- (2308) 2 株实验鼠源金黄色葡萄球菌的耐药性与致病性特征分析  
..... 夏志强, 徐子易, 张泽辉, 等

## 药师处方审核培训与胜任力专题

- (2315) 湖南省药学会处方审核 PHARMD 培训模式的实践与效果分析  
..... 刘丽华, 邓紫薇, 周菊香, 等
- (2321) 基于因子分析法的医院药师处方审核专业胜任力评价模型构建及现  
状调查 ..... 邓紫薇, 刘丽华, 周菊香, 等
- (2328) 药师岗位与湖南省处方审核培训满意度的 Logistic 回归分析  
..... 周菊香, 邓紫薇, 刘丽华, 等

## 中药抗结直肠癌研究进展专题

- (2334) 人参滴丸对结直肠癌细胞抗乳酸及抗氧化能力的影响  
..... 韩笑, 杨中天, 李依昕, 等
- (2342) 天然产物来源的有效成分抗结肠炎相关结直肠癌的作用及机制的研究  
进展 ..... 黄家彦, 韩笑, 刘彩艳, 等

## 综述

- (2350) 磷酸二酯酶 4 抑制剂在治疗帕金森病中的研究进展  
..... 钟佳宏, 余玺辉, 练昌林, 等
- (2358) 槲皮素在年龄相关性黄斑变性中的作用机制及其纳米制剂研究进展  
..... 王子恒, 刘娟, 杨玉畅, 等
- (2366) 姜黄素及其相关化合物的抗病毒作用研究进展 ..... 李森, 黄兴振
- (2375) 风轮菜化学成分和药理活性研究进展 ..... 陈小兵, 袁章林, 黄小琼, 等
- (2381) 中药单体抗类风湿关节炎作用机制研究进展  
..... 罗照勇, 李玉珊, 李森浩

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: 邬志娟 彭金飞 李 科  
陆窈窈

#### 本刊声明:

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

除非特别声明,本刊刊出的所有文章不代表本刊编委会的观点。

(2388) 酸枣仁抗失眠活性成分及其作用机制研究进展…井泽,李先娜,杨波

## 药物分析与检验

- (2395) 超高效液相色谱-质谱联用技术评价更年宁中人参投料情况  
…………… 蒋芦荻,杨琰,刘亚楠,等
- (2402) 雏凤精口服液 HPLC 指纹图谱及多指标成分含量测定方法的建立  
…………… 刘子夜,罗毅,张艳欣,等
- (2408) 离子色谱法测定低分子量肝素钠注射液中的亚硝酸根离子含量  
…………… 左利民,唐敬亮,赵婷,等
- (2412) 离子色谱-积分脉冲安培检测法测定木糖醇产品中木糖醇及其他多元醇的含量  
…………… 粟贵,谢莹莹,李颖,等
- (2416) 基于指纹图谱和含量测定结合化学模式识别评价仙鹤草质量  
…………… 杨国,陈洁,方盈凤,等
- (2421) 不同企业、不同级别聚山梨酯 80 中过氧化物测定及比较研究  
…………… 周颖,蒋贇,李昌亮,等
- (2428) HPLC-PDA 法同时测定附炎片中 6 种成分的含量  
…………… 杨寿圆,嵯君,周亚丽,等

## 医院药学

- (2433) 基于多中心真实世界数据构建丙戊酸钠血药浓度预测模型  
…………… 徐金军,洪术霞,史金平,等
- (2439) 基于倾向性评分匹配法分析质子泵抑制剂致白细胞减少的风险因素  
…………… 潘玉艳,钱晓丹
- (2444) 基于前置审方系统的门诊麻醉精神药品的信息化建设  
…………… 陈静静,张慧丽,田京辉,等

## 中药资源的开发与利用

- (2451) 中药“润”性理论探讨 …… 李彩霞,宋亚刚,田硕,等

## 药学教育

- (2457) 借鉴美英两国的经验完善我国不同类型药学专业人才培养体系  
…………… 熊堉,杜奋旗,宁红,等

## 药品不良反应

- (2464) 屈螺酮炔雌醇致肾静脉血栓不良反应 1 例  
…………… 冯占芹,曲秀君,曹建英,等
- (2467) 卡马西平致 *HLA-B\*1502* 基因阴性成年患者发生 Stevens-Johnson 综合征 1 例并文献分析  
…………… 阮旭,韩晶晶,李宇,等
- (2470) 恩曲替尼致急性肝衰竭 1 例…………… 武会芝,张桢,付饶,等

[ 本刊基本参数 ] CN43-1408/R\*2003\*m\*A4\*330\*zh\*P\*30.0\*700\*51\*2025-8

本期责任编辑: 邬志娟, 彭金飞, 李科, 陆窈窈

英文编辑: 周静

# CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 23, Number 8 August 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

- (2143) Active flavonoid components and potential mechanisms of aerial parts of *Glycyrrhiza uralensis* for chronic prostatitis based on network pharmacology and experimental validation ..... JIA Xi, HOU Jun-ling, YUN Lu, et al
- (2151) Preparation of  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX targeted radionuclide drugs and preliminary study on anti diffuse large B-cell lymphoma ..... ZHANG Xin-yu, YU Xing-tai, HU Zhe-ming, et al
- (2157) Mechanism of Zuogui pills in Alzheimer's disease based on UPLC-MS/MS, network pharmacology, molecular docking and in vitro experiments ..... WANG Yan, TANG Liang, LIU Yao, et al
- (2165) Mechanism of Xingbei Zhike Qutan oral liquid in pediatric bronchitis based on network pharmacology and experimental verification ..... YANG Zi-ye, TAN Zheng, LIU Jie, et al
- (2173) Determination of pantoprazole concentration in Beagle dog plasma by LC-MS/MS and its toxicokinetics ..... HOU Li-ping, XIE Xin, CAO Bei-xi, et al
- (2178) Design, synthesis, and evaluation of anti-colon cancer activity of resveratrol-benzofuran derivatives ..... CHEN Gang, LI Ya-na, MENG Xiang-jing
- (2187) Composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oils from *Zanthoxylum schinifolium* by supercritical  $\text{CO}_2$  extraction and steam distillation ..... ZHANG Lei, WANG You-feng, YANG Le, et al
- (2193) Mechanism of gambogenic acid in cancer based on network pharmacology and in vitro experiments ..... GAO Hui-min, LIU Ke, PENG Lei, et al
- (2201) Pharmacodynamics and pharmacokinetics of active ingredients in Chensha Liuyi powder in rats with chronic liver injury ..... FU Xin-zhu, LIU Shuo, GUO Ning-ning, et al
- (2209) Anti-breast cancer properties and mechanism of the active components of *Cordyceps militaris* based on network pharmacology ..... DOU Yao, WANG Hong-ying, SUN Cong, et al
- (2217) Anti-prostate cancer effect of novel calcium-activated chloride channel ANO1 inhibitors ..... YANG Xiao-hua, CHEN Pan, LUO Gui-fang, et al
- (2225) Potential mechanism of total glucosides of paeony in alleviating intestinal ischemia-reperfusion injury based on network pharmacology and ferroptosis ..... CHE Xuan, GUO Yi-ran, ZHAO Guo-jie
- (2232) Effect of levofloxacin on tacrolimus blood concentration and gut microbiota in mice ..... ZHANG Shu-ting, QIAN Min-yan, XU Cao-mei, 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.

- (2238) Effect of Maxing Shigan decoction on lipopolysaccharide-induced inflammatory injury of type II alveolar epithelial cells  
..... LU Qiao, CHEN Yuan, HUANG Jiu-lin, et al
- (2244) Chemical compositions of Hedan tablets based on HPLC-FT-ICR-MS  
..... JIN Feng, JIN Tong, LIU Shuo, et al
- (2253) Dry granulation of Coicis Semen formula granules based on caking strength  
..... WU Zhen-ao, YANG Ling-yu, ZHANG Ai-ling, et al
- (2259) Inhibitory effect of shikonin on the pyroptosis of cardiomyocytes via the FOXA2-SIRT1 signaling axis  
..... TONG Zhong-yi, WANG Ke, GUO Tao, et al
- (2266) Exploration on the effect and mechanism of external application of Xiebai powder for rosacea mice based on JAK/STAT signaling pathway  
..... ZHAO Yi-fan, HE Jin-sui, LIU Xue-ying, et al
- (2272) Protective effect and mechanism of piperlonguminine on myocardial hypertrophy induced by isoproterenol hydrochloride in mice  
..... WANG Zhi-hua, CHU Yu-meng, ZHANG Ai, et al
- (2277) Origin drying methods for *Dasiphora mandshurica* (Maxim.) Juz. based on chemical compositions and activity  
..... CUI Xiao-min, CHEN Zhi-yong, ZHANG Hong, et al
- (2283) Protection of Tongxinluo on hydrogen peroxide-induced H9c2 myocardial cell injury by regulating Wnt signal in proteomic atlas  
..... ZHANG Wei, CHENG Nuo, CAO Hui, et al
- (2290) Protective effect of oxyberberine and berbamine on cardiomyocytes based on PI3K/AKT signaling pathway  
..... Nuerbiye Nueraihemaiti, Dilihuma Dilimulati, Alehaer Baishan, et al
- (2298) Preparation of metal ion coordination nanoparticles co-loaded with various biological enzymes and their in vitro antitumor effect  
..... LI Ling, LIAO Yan, LIU Zhi-fang, et al
- (2304) The 95% prediction interval model of relative density based on the quality evaluation of Qingfei Paidu decoction  
..... ZHENG Qiong-fang, YAN Bin, ZHAO Wei, et al
- (2308) Drug resistance and pathogenicity of two strains of experimental murine *Staphylococcus aureus*  
..... XIA Zhi-qiang, XU Zi-yi, ZHANG Ze-hui, et al
- (2316) Effectiveness of PHARMD training model by Hunan Pharmaceutical Association..... LIU Li-hua, DENG Zi-wei, ZHOU Ju-xiang, et al
- (2321) Factor analysis-based competence assessment model for hospital pharmacists' prescription review  
..... DENG Zi-wei, LIU Li-hua, ZHOU Ju-xiang, et al
- (2328) Logistic regression of pharmacist position and satisfaction with prescription review training in Hunan  
..... ZHOU Ju-xiang, DENG Zi-wei, LIU Li-hua, et al
- (2335) Effect of ginseng drops on anti-lactic acid and antioxidant capacity of colorectal cancer cells  
..... HAN Xiao, YANG Zhong-tian, LI Yi-xin, et al
- (2342) Research progress in the role and mechanism of natural source active ingredients for colitis associated colorectal cancer  
..... HUANG Jia-yan, HAN Xiao, LIU Cai-yan, et al

- (2350) Research progress in phosphodiesterase 4 inhibitors for Parkinson' s disease  
..... ZHONG Jia-hong, YU Xi-hui, LIAN Chang-lin, et al
- (2358) Research progress in the mechanism of quercetin in age-related macular degeneration and its nano-formulations  
..... WANG Zi-heng, LIU Juan, YANG Yu-chang, et al
- (2366) Research progress in antiviral effect of curcumin and its related compounds  
..... LI Miao, HUANG Xing-zhen
- (2375) Progress in chemical compositions and pharmacological activity of *Clinopodium chinense*  
..... CHEN Xiao-bing, YUAN Zhang-lin, HUANG Xiao-qiong, et al
- (2381) Mechanism of anti-rheumatoid arthritis by traditional Chinese medicine monomers .....LUO Zhao-yong, LI Yu-shan, LI Sen-hao
- (2388) Research progress in anti-insomnia active compounds of Ziziphi Spinosae Semen and related mechanisms .....JING Ze, LI Xian-na, YANG Bo
- (2395) Quality evaluation of *Panax ginseng* in Gengnianning by UPLC-MS/MS  
..... JIANG Lu-di, YANG Yan, LIU Ya-nan, et al
- (2402) HPLC fingerprint content and determination of multi-index components of Chufengjing oral liquid  
..... LIU Zi-ye, LUO Yi, ZHANG Yan-xin, et al
- (2408) Determination of nitrite ion in low molecular weight heparin sodium injection by ion chromatography  
..... ZUO Li-min, TANG Jing-liang, ZHAO Ting, et al
- (2412) Determination of xylitol and other polyhydric alcohols in xylitol products by ion chromatography with integral pulse amperometric detection  
..... SU Gui, XIE Ying-ying, LI Ying, et al
- (2416) Quality evaluation of Agrimonia based on fingerprints and content determination combined with chemical pattern recognition  
..... YANG Guo, CHEN Jie, FANG Ying-feng, et al
- (2422) Content determination of peroxide in polysorbate 80 from different manufacturers and grades  
..... ZHOU Ying, JIANG Yun, LI Chang-liang, et al
- (2428) Simultaneous determination of 6 components in Fuyan tablets by HPLC-PDA  
..... YANG Shou-yuan, ZHUO Jun, ZHOU Ya-li, et al
- (2433) Prediction model for sodium valproate blood concentration based on multicenter real world data  
..... XU Jin-jun, HONG Shu-xia, SHI Jin-ping, et al
- (2439) Risk factors of leukopenia induced by proton pump inhibitors based on propensity score matching ..... PAN Yu-yan, QIAN Xiao-dan
- (2444) Information network of out-patient narcotics and psychotropic drugs based on prescription pre-examination system  
..... CHEN Jing-jing, ZHANG Hui-li, TIAN Jing-hui, et al
- (2457) Improve the training system of different types of pharmacy professionals in China by learning from the experience of the United States and the United Kingdom ..... XIONG Yu, DU Fen-qi, NING Hong, et al

## 论著

# 基于网络药理学及实验验证探究甘草地上部分黄酮类成分抗慢性前列腺炎的有效成分及可能的作用机制

贾栖<sup>1</sup>, 侯俊玲<sup>1, 2\*</sup>, 云鹭<sup>1</sup>, 张黄慧<sup>1</sup>, 王宇航<sup>1</sup>, 彭一峰<sup>3</sup>, 冀祖恩<sup>3</sup>, 王文全<sup>3, 4, 5</sup> (1.北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2.中药材规范化生产教育部工程研究中心, 北京 102488; 3.新疆全安药业股份有限公司, 新疆巴音郭勒蒙古自治州 841312; 4.北京灵泉药材研究所, 北京 100006; 5.中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193)

**摘要:** 目的 探究甘草地上部分黄酮类成分抗慢性前列腺炎的有效成分及可能作用机制。方法

采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱 (UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS) 鉴定甘草地上部分醇提物中的主要黄酮类化学成分, 利用网络药理学和分子对接, 预测甘草地上部分抗慢性前列腺炎的核心成分与关键靶点。采用角叉菜胶诱导构建慢性前列腺炎大鼠模型, 通过 HE 染色观察大鼠前列腺组织病理变化, ELISA 法检测血清中双氢睾酮 (DHT)、干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、免疫球蛋白 G (IgG)、白细胞介素-6 (IL-6)、前列腺特异抗原 (PSA)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 水平, 评价甘草地上部分醇提物对慢性前列腺炎的治疗效果。结果

从甘草地上部分醇提物中共鉴定出 44 种黄酮类化合物, 通过网络药理学分析, 预测甘草素、毛蕊异黄酮、刺芒柄花素、甘草苷等为核心成分, 通过作用于 AKT1、TNF、VEGFA、EGFR、MMP9 等关键靶点, 调控相关信号通路, 发挥抗慢性前列腺炎作用。分子对接验证显示核心成分与关键靶点具有较好的结合能力。动物实验结果表明甘草地上部分醇提物对大鼠慢性前列腺炎有较好的治疗作用。结论 本研究验证了甘草地上部分醇提物的抗慢性前列腺炎药效, 其活性成分为刺芒柄花素、毛蕊异黄酮、甘草素等, 可能通过 PI3K-AKT 信号通路, 调控 EGFR、AKT1、MMP9 等关键靶点发挥治疗功效。

**关键词:** 甘草地上部分; 慢性前列腺炎; 黄酮类成分; 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱; 网络药理学

中图分类号: R286 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)08-2143-08  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.001

## Active flavonoid components and potential mechanisms of aerial parts of *Glycyrrhiza uralensis* for chronic prostatitis based on network pharmacology and experimental validation

JIA Xi<sup>1</sup>, HOU Jun-ling<sup>1, 2\*</sup>, YUN Lu<sup>1</sup>, ZHANG Huang-hui<sup>1</sup>, WANG Yu-hang<sup>1</sup>, PENG Yi-feng<sup>3</sup>, JI Zu-en<sup>3</sup>, WANG Wen-quan<sup>3, 4, 5</sup> (1. School of Traditional Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488; 2. Ministry of Education Engineering Research Center of Standardized Production of Chinese Materia Medica, Beijing 102488; 3. Xinjiang Quan'an Pharmaceuticals Co., Ltd., Bayingol Mongolia Autonomous Prefecture Xinjiang 841312; 4. Beijing Lingquan Institute of Medicinal Materials, Beijing 100006; 5. Institute of Medicinal Plants, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193)

**Abstract: Objective** To determine the active ingredients and possible mechanism of action of flavonoids from aerial parts of *Glycyrrhiza uralensis* for chronic prostatitis. **Methods** Ultra

基金项目: 国家重点研发计划项目 (No.2018YFC1706500)。

作者简介: 贾栖, 男, 在读硕士研究生, 主要从事中药资源开发利用研究, email: 1072858746@qq.com \*通信作者: 侯俊玲, 女, 教授, 主要从事中药资源的有效利用与产品研发, email: mshjl@126.com

performance liquid chromatography-quadrupole-electrostatic field orbitrap high-resolution mass spectrometry (UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS) was used to identify the main flavonoid components in the alcoholic extract of aerial parts of *Glycyrrhiza uralensis*, and to predict corresponding core components and key targets for chronic prostatitis with network pharmacology and molecular docking. A rat model of chronic prostatitis was induced by carrageenan gum, and the histopathological changes of rat prostate were observed by HE staining. The levels of DHT, IFN- $\gamma$ , IgG, IL-6, PSA, and TNF- $\alpha$  were detected in the serum by ELISA, to evaluate their therapeutic efficacy extract on chronic prostatitis. **Results** Totally 44 flavonoids were identified in the alcoholic extracts. Through the network pharmacological analysis, glycyrrhizin, trichothecene isoflavones, prickly manzanita florifera, and glycyrrhizin were predicted to be the core components, which exerted the antichronic prostatitis effects by acting on the key targets, such as AKT1, TNF, VEGFA, EGFR, and MMP9, and regulating the related signaling pathways. The molecular docking validation showed that the core components had better binding ability with the key targets. The animal experiments showed that the alcoholic extract of aerial parts of *Glycyrrhiza uralensis* had a fairly good therapeutic effect on chronic prostatitis in rats. **Conclusion** The anti-chronic prostatitis efficacy of aerial parts of *Glycyrrhiza uralensis* is verified. The active components included spiny aristolochicin, trichostatin isoflavones, and glycyrrhizin, whose therapeutic efficacy may through the PI3K-AKT signaling pathway, regulate the key targets of EGFR, AKT1, and MMP9.

**Key words:** aerial parts of *Glycyrrhiza uralensis*; chronic prostatitis; flavonoid; UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS; network pharmacology

中药甘草为豆科植物甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)、胀果甘草 (*Glycyrrhiza inflata* Bat.) 或光果甘草 (*Glycyrrhiza glabra* L.) 的干燥根和根茎, 是我国重要的大宗中药材, 具有补脾益气、清热解毒、缓急止痛、调和诸药的功效, 常作佐使药入多种中药复方<sup>[1]</sup>。甘草国内外市场需求量大, 其茎、叶等地上资源丰富, 亟待开发利用。

慢性前列腺炎 (chronic prostatitis) 是青壮年群体中高发泌尿系统疾病, 其临床症状包括下腹部或盆腔疼痛、尿痛、尿频等, 若不及时进行治疗, 还会引起早泄、阳痿等性功能障碍, 严重影响男性的身心健康<sup>[2]</sup>。

甘草地上部分中黄酮类成分含量丰富, 且具有较佳的抗炎、抗肿瘤等活性。张鲁等<sup>[3]</sup>研究表明, 甘草地上部分中的化学成分主要是黄酮类化合物, 其具有抗肿瘤、抗炎等活性。李红丽<sup>[4]</sup>对甘草地上部分黄酮类成分富集后进行体外抗氧化实验, 结果表明甘草地上部分黄酮类成分具有较好的抗氧化活性。张琳等<sup>[5]</sup>通过药效研究发现甘草地上部分黄酮类成分对慢性前列腺炎有较好的预防和治疗作用。

本研究采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱 (UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS) 技术, 解析甘草地上部分醇提物中的黄酮类化学成分, 通过网络药理学预测其作用于慢性前列腺炎的关键靶点及信号通路, 采用分子对接技

术预测其作用机制, 并通过动物实验验证甘草地上部分醇提物抗慢性前列腺炎活性, 为后续的药物开发和临床应用提供参考。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级 SD 雄性大鼠, 24 只, 6~7 周龄, 体质量 (230~250) g [北京斯贝福生物技术有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK (京) 2019-0010]。饲养于北京中医药大学实验动物中心 SPF 级动物实验室, 该实验经北京中医药大学动物实验中心伦理委员会批准, 批件号: BUCM-2023110204-4271。

### 1.2 仪器

Ultimate3000 型超高效液相色谱仪 (美国 Dionex 公司); Thermo Q Exactive Plus 型高分辨质谱仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); KH-500DE 型数控超声波清洗器 (昆山禾创超声仪器有限公司); FA2004N 型电子天平 (北京赛多利斯科学仪器有限公司); H1650 台式低速冷冻离心机 (长沙湘仪离心机仪器有限公司); RE-5023 型旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂); 电子调温电热套 (天津泰斯特仪器有限公司); Multiskan MK3 型酶标仪 (上海赛默飞仪器有限公司); B032 型荧光倒置生物显微镜 (尼康仪器上海公司); N5000 型紫外分光光度计 (上海佑科仪器仪表有限公司)。

### 1.3 试药

甘草地上部分 (茎、叶和极少量的果荚), 于



2019 年 9 月采收自甘肃省酒泉市瓜州县河东乡, 经中国医学科学院药用植物研究所王文全教授鉴定为乌拉尔甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)。

乌拉坦 (山东科源生化有限公司, 批号: C15887472); 角叉菜胶 (北京索莱宝科技有限公司, 批号: 20220601); 前列康普乐安片 (浙江康恩贝制药股份有限公司); 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) (上海源叶生物科技有限公司, 批号: S14016); 大鼠双氢睾酮 (DHT)、干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、免疫球蛋白 G (IgG)、白细胞介素-6 (IL-6)、前列腺特异抗原 (PSA)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 酶联免疫试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司); Multiskan MK3 酶标仪 (Thermo Scientific); 组织固定液 (广州硕谱生物科技有限公司, 批号: 23257838); 乙醇 (北京化工厂, 分析纯); 甲醇、甲酸、乙腈 (Fisher Scientific, 质谱纯); 水 (娃哈哈集团有限公司); 甘草素 (批号: MUST-11041101)、葛根素 (批号: S02M9B54875)、维采宁 II (批号: D09GB170690)、柚皮素 (批号: YJ0603HA13)、异槲皮苷 (批号: MUST-22041603)、异甘草苷 (批号: MUST-15031204)、毛蕊异黄酮苷 (批号: MUST-13042915)、异槲皮苷 (批号: MUST-22041603)、槲皮素 (批号: C28J11Y116820)、紫云英苷 (批号: F18HB175834)、山柰酚 (批号: MUST-11041101)、金雀异黄酮 (批号: H30A9Z69019) (纯度均大于 98%, 上海源叶生物科技有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 甘草地上部分醇提物的化学成分分析

**2.1.1 样品溶液制备** 取适量甘草地上部分, 用 70% 乙醇提取后浓缩干燥得到浸膏, 加水超声溶解 20 min 后  $3000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min, 取上清液浓缩干燥, 取适量干燥样品置于 5 mL 量瓶, 用甲醇定容后得到供试品溶液。

### 2.1.2 色谱与质谱条件

① 液相色谱条件: 色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH  $\text{C}_{18}$  色谱柱 ( $2.1\text{ mm} \times 100\text{ mm}$ ,  $1.7\text{ }\mu\text{m}$ ); 流动相 A 为乙腈, B 为 0.5% 甲酸水溶液, 梯度洗脱 ( $0 \sim 20\text{ min}$ ,  $5\% \sim 20\%\text{A}$ ;  $20 \sim 70\text{ min}$ ,  $20\% \sim 30\%\text{A}$ ); 流速  $0.2\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 进样量  $2\text{ }\mu\text{L}$ ; 柱温  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

② 质谱条件: 采用加热电喷雾离子化源 (HESI), 正、负离子模式检测, 扫描模式为全扫描模式; 正离子检测模式喷雾电压为  $+3.2\text{ kV}$ ; 负离子检测模式喷雾电压为  $-3.0\text{ kV}$ ; 毛细管温度为  $320\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 鞘气流量为 40 arb; 辅助气体流量为 15 arb, 辅助气体加热器温度  $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; MS 分辨率 70 000, MS/MS 分辨率 17 500, 扫描范围  $m/z$   $100 \sim 1500$ 。

### 2.1.3 甘草地上部分醇提物的化学成分鉴定

草地上部分样品经过 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 分析, 得到总离子流图, 见图 1。运用 Thermo Xcalibur 软件对结果进行处理, 与化学成分库及参考文献对比分析, 共得到 44 种黄酮类成分。具体成分鉴定结果见表 1。

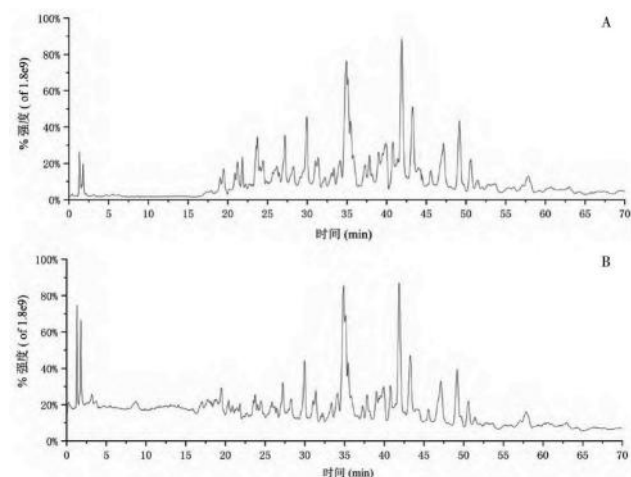


图 1 正 (A)、负 (B) 离子检测模式下的甘草地上部分总离子流图  
Fig 1 Total ion flow for aerial parts of *Glycyrrhiza uralensis* in positive (A) and negative (B) ion detection mode

## 2.2 网络药理学研究

将鉴定出的成分导入 TCMSP2.3 数据库 (<http://tcmsp.com/tcmsp.php>), 筛选出口服生物利用度 (OB)  $\geq 30.00\%$  且类药性 (DL)  $\geq 0.18$  的活性成分 19 个。检索活性成分的预测靶点和慢性前列腺炎疾病靶点, 两者取交集得到 88 个交集靶点。采用 STRING11.0 (<http://string-db.org>) 数据库分析交集靶点的蛋白互作网络 (PPI), 以 Degree 值大小筛选核心靶点, 排在前十的靶点如下: AKT1、TNF、VEGFA、EGFR、SRC、ESR1、PTGS2、MMP9、BCL2L1、MMP2 等。运用 DAVID 6.8 数据库 (<http://david.ncif-crf.gov>) 对交集靶点进行 GO 和 KEGG 通路富集分析, 结果显示甘草地上部分黄酮类成分抗慢性前列腺炎的作用靶点涉及的生物过程 (BP) 主要包括对蛋白激酶 B 的正向调节、对凋亡过程的负向调节、对 MAPK 激酶的正向调节等; 细胞组分 (CC) 主要涉及胞外区、大分子复合物、受体复合物等; 分子功能 (MF) 主要包括酪氨酸激酶活性、蛋白丝氨酸激酶活性、苏氨酸激酶活性等; KEGG 富集分析结果显示癌症通路、PI3K-AKT 信号通路、前列腺癌、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂抵抗等为重要通路。运用 Cytoscape 3.7.1 软件构建“活性成分-核心靶点-通路”网络图, 见图 2, Degree 值排名前十的活性成分为甘草素、刺芒柄花素、异牡荆素、香叶木素、圣草酚、山柰酚、沙苑子苷、木犀草素、毛蕊异黄酮苷、毛蕊异黄酮。

表 1 甘草地上部分黄酮类成分质谱数据

Tab 1 Mass spectrometric data of flavonoid constituents in aerial parts of *Glycyrrhiza uralensis*

| No.             | 分子式                                             | $t_R/\text{min}$ | 离子模式               | 误差 $/\times 10^{-6}$ | $m/z$    | MS <sup>2</sup> 碎片离子信息                                               | 鉴定成分                                             |
|-----------------|-------------------------------------------------|------------------|--------------------|----------------------|----------|----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 1               | C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>22</sub> | 23.856           | [M-H] <sup>-</sup> | - 0.52               | 787.1929 | 625.1420, 463.0880, 301.0352                                         | 槲皮素 -3-O-β-D- 葡萄糖 -7-O-β-D- 龙胆双糖苷 <sup>[6]</sup> |
| 2               | C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>  | 26.764           | [M-H] <sup>-</sup> | - 0.63               | 417.1188 | 285.3621, 255.0660, 135.0086, 119.0501                               | 甘草苷                                              |
| 3               | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub> | 28.441           | [M-H] <sup>-</sup> | - 0.19               | 593.1514 | 431.0981, 341.0665, 269.0432                                         | 牡荆素葡萄糖苷 <sup>[7]</sup>                           |
| 4 <sup>*</sup>  | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>  | 30.015           | [M+H] <sup>+</sup> | - 0.84               | 417.1178 | 381.0970, 351.0868, 307.0966, 297.0759                               | 葛根素                                              |
| 5 <sup>*</sup>  | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub> | 30.210           | [M-H] <sup>-</sup> | - 0.52               | 593.1508 | 503.1184, 473.1088, 383.0771, 353.0664                               | 维采宁 II                                           |
| 6               | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>  | 31.568           | [M-H] <sup>-</sup> | - 0.32               | 299.0771 | 299.0770, 255.875, 121.0293                                          | 高车前素 <sup>[8]</sup>                              |
| 7 <sup>*</sup>  | C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>  | 31.759           | [M-H] <sup>-</sup> | - 0.58               | 271.0611 | 253.0502, 227.0708, 177.0192, 151.0036, 119.0501, 107.0137           | 柚皮素                                              |
| 8               | C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub> | 34.307           | [M-H] <sup>-</sup> | - 0.89               | 563.1399 | 473.1083, 443.0970, 383.0770, 353.0665                               | 异夏佛塔苷 <sup>[9]</sup>                             |
| 9 <sup>*</sup>  | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub> | 34.503           | [M-H] <sup>-</sup> | - 0.10               | 463.2548 | 300.0273, 271.0241, 255.0297, 151.0036                               | 异槲皮苷                                             |
| 10              | C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub> | 34.761           | [M-H] <sup>-</sup> | - 1.06               | 435.1292 | 435.1296, 299.0867, 273.0766, 123.0450                               | 根皮苷                                              |
| 11              | C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub> | 35.095           | [M-H] <sup>-</sup> | - 0.67               | 563.1409 | 563.1401, 443.0977, 383.0770, 297.0768                               | 维采宁 III                                          |
| 12              | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub> | 35.655           | [M-H] <sup>-</sup> | - 0.51               | 447.0930 | 341.0659, 269.0450, 133.0294                                         | 异荭草素                                             |
| 13              | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub>  | 35.999           | [M-H] <sup>-</sup> | - 0.41               | 319.0447 | 193.0141, 178.9984, 151.0034, 125.0243                               | 杨梅素                                              |
| 14              | C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub> | 36.533           | [M-H] <sup>-</sup> | 0.65                 | 623.1982 | 461.1650, 299.0544, 151.0405, 133.0294                               | 沙苑子苷                                             |
| 15              | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>  | 37.501           | [M+H] <sup>+</sup> | - 0.51               | 417.1179 | 255.0652, 137.0234, 119.0492                                         | 大豆苷 <sup>[10]</sup>                              |
| 16 <sup>*</sup> | C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub> | 38.070           | [M-H] <sup>-</sup> | - 0.75               | 563.1399 | 473.1086, 443.0975, 383.0770, 353.0664                               | 夏佛塔苷                                             |
| 17 <sup>*</sup> | C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>  | 39.063           | [M-H] <sup>-</sup> | - 0.63               | 417.1188 | 285.3621, 255.0660, 135.0086, 119.0501                               | 异甘草苷                                             |
| 18 <sup>*</sup> | C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub> | 39.481           | [M+H] <sup>+</sup> | - 0.15               | 447.1285 | 285.0759, 253.0496, 225.0548, 213.0545, 197.0600, 137.0234           | 毛蕊异黄酮苷                                           |
| 19              | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub> | 39.987           | [M-H] <sup>-</sup> | - 0.97               | 431.0981 | 283.0609, 337.0682                                                   | 牡荆苷 <sup>[11]</sup>                              |
| 20              | C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub> | 40.190           | [M-H] <sup>-</sup> | - 0.67               | 549.1610 | 417.4067, 255.0660, 135.0087                                         | 芹糖甘草苷 <sup>[12]</sup>                            |
| 21              | C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>19</sub> | 40.248           | [M-H] <sup>-</sup> | - 0.2                | 739.2089 | 575.1426, 284.0324, 255.0297, 227.0349, 151.0034                     | 罗汉果黄素                                            |
| 22              | C <sub>34</sub> H <sub>42</sub> O <sub>20</sub> | 41.292           | [M+H] <sup>+</sup> | - 0.56               | 771.2343 | 479.1205, 317.0658                                                   | 香蒲新苷 <sup>[13]</sup>                             |
| 23              | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub> | 42.089           | [M+H] <sup>+</sup> | - 0.73               | 433.1126 | 397.0922, 79.0815, 367.0816, 337.0708, 283.0602                      | 异牡荆素                                             |
| 24              | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub> | 42.138           | [M-H] <sup>-</sup> | - 0.90               | 609.1454 | 301.0351, 271.0246, 255.0297, 243.0293, 178.9981, 151.0034           | 芦丁                                               |
| 25              | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub> | 42.403           | [M-H] <sup>-</sup> | - 0.85               | 579.1705 | 413.0873, 269.0134, 293.0452                                         | 牡荆素鼠李糖苷 <sup>[14]</sup>                          |
| 26 <sup>*</sup> | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub> | 43.476           | [M-H] <sup>-</sup> | - 0.5                | 463.0878 | 463.0878, 301.0351, 300.0273, 271.0245                               | 异槲皮苷                                             |
| 27 <sup>*</sup> | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>  | 43.482           | [M-H] <sup>-</sup> | - 0.63               | 301.0335 | 301.0335, 273.0387, 151.0027, 149.0234                               | 槲皮素                                              |
| 28              | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub> | 44.236           | [M-H] <sup>-</sup> | - 0.72               | 447.0930 | 285.0401, 241.0507, 151.0041, 133.0299                               | 木犀草苷                                             |
| 29              | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O               | 46.035           | [M-H] <sup>-</sup> | - 1.30               | 285.0767 | 285.0400, 241.0532, 151.0034, 133.0294, 107.0137                     | 木犀草素                                             |
| 30              | C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> | 46.263           | [M-H] <sup>-</sup> | - 0.17               | 461.2392 | 284.0320, 255.0298, 240.0415                                         | 射干苷 <sup>[15]</sup>                              |
| 31              | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>  | 46.631           | [M+H] <sup>+</sup> | - 0.72               | 271.0601 | 271.0603, 227.0704, 153.0184                                         | 芹菜素                                              |
| 32              | C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub> | 49.925           | [M+H] <sup>+</sup> | - 0.41               | 447.0919 | 303.0500, 285.0758, 271.0597, 229.0855                               | 黄豆黄苷                                             |
| 33              | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>  | 49.935           | [M+H] <sup>+</sup> | - 0.07               | 285.0757 | 270.0523, 253.0496, 225.0546, 214.0623, 213.0547, 153.0182, 137.0234 | 毛蕊异黄酮                                            |
| 34 <sup>*</sup> | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub> | 50.814           | [M-H] <sup>-</sup> | - 0.82               | 447.0928 | 285.0392, 284.0326, 255.0299, 227.0349                               | 紫云英苷                                             |
| 35 <sup>*</sup> | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>  | 50.814           | [M+H] <sup>+</sup> | - 0.95               | 287.0547 | 287.0550, 259.0592, 241.0498, 231.0648, 165.0185, 153.0184           | 山柰酚                                              |
| 36              | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>  | 51.651           | [M-H] <sup>-</sup> | - 0.38               | 315.0855 | 300.0287, 271.0246, 243.0660, 225.1130, 151.0036, 107.0136           | 异鼠李素                                             |
| 37              | C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub> | 51.670           | [M+H] <sup>+</sup> | 0.09                 | 625.1765 | 497.1149, 317.0657, 153.0184                                         | 异鼠李素 -3-O- 刺槐二糖苷 <sup>[16]</sup>                 |
| 38 <sup>*</sup> | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>  | 52.020           | [M+H] <sup>+</sup> | - 0.44               | 271.0601 | 271.0601, 253.0489, 225.0550, 153.0185                               | 金雀异黄酮                                            |
| 39              | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub> | 52.325           | [M+H] <sup>+</sup> | - 0.57               | 431.0979 | 271.0602, 243.0656, 153.0184, 119.0492                               | 芹菜素 -7-O-β-D- 吡喃葡萄糖苷                             |

续表 1

| No. | 分子式                                             | $t_R/\text{min}$ | 离子模式               | 误差 $/\times 10^{-6}$ | $m/z$    | MS <sup>2</sup> 碎片离子信息                                     | 鉴定成分                     |
|-----|-------------------------------------------------|------------------|--------------------|----------------------|----------|------------------------------------------------------------|--------------------------|
| 40  | C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub> | 53.092           | [M-H] <sup>-</sup> | - 0.39               | 477.1034 | 315.0484, 271.0245, 243.0295, 151.0035                     | 异鼠李素 -3-O- 葡萄糖苷          |
| 41  | C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub> | 53.372           | [M-H] <sup>-</sup> | 0.3                  | 609.1668 | 299.0557, 284.0323, 255.0287                               | 新地奥斯明 <sup>[17]</sup>    |
| 42  | C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> | 55.402           | [M-H] <sup>-</sup> | - 0.37               | 461.2391 | 446.0882, 299.0556, 298.0478, 283.0247, 255.0296           | 香叶木素 -7-O-β-D- 葡萄糖苷      |
| 43  | C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>  | 61.874           | [M-H] <sup>-</sup> | - 0.52               | 255.0886 | 255.0886, 135.0087, 119.0500                               | 甘草素或异甘草素 <sup>[18]</sup> |
| 44  | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>  | 62.300           | [M+H] <sup>+</sup> | - 0.45               | 255.0651 | 255.0653, 227.0704, 199.0755, 145.0285, 137.0235, 119.0493 | 大豆素 <sup>[19]</sup>      |

注：\* 为经对照品比对确定的成分。  
Note: \* Components identified by control comparison.

将“活性成分-核心靶点-通路”网络筛选出的 10 个核心成分与 PPI 网络分析筛选出的关键靶点进行两两对接。通过 TCMSP2.3 数据库下载核心成分的分子结构，保存为 mol2 格式；通过 PDB 数据库（<http://www.rcsb.org/>）下载关键靶点的 3D 结构，保存为 pdb 格式，使用 Autodock 对接每

个成分和配体。结合能  $< -20.92 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  的对接分数表明该化合物与靶点之间具有良好的结合活性，结合能越低，说明结合活性越好。对接结果较好的靶点见表 2。将与 5 个靶标结合较好的对接结果利用 PyMol 进行可视化，结果如图 3 所示。

表 2 甘草地上部分核心成分与关键靶点对接结果  
Tab 2 Docking results of core components in aerial parts of *Glycyrrhiza uralensis* and key targets

| 核心成分   | 成分 CID  | 结合能 $/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$ |         |         |         |         |         |         |
|--------|---------|------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|        |         | MMP9                                     | PTGS2   | EGFR    | MMP2    | AKT1    | VEGFA   | TNF     |
| 甘草素    | 114829  | - 24.77                                  | - 25.11 | - 22.81 | - 27.50 | - 20.64 | - 24.27 | - 24.96 |
| 刺芒柄花素  | 5280378 | - 25.24                                  | - 23.09 | - 25.82 | - 24.77 | - 21.78 | - 22.81 | - 23.05 |
| 异牡荆素   | 162350  | - 14.85                                  | - 17.99 | - 17.33 | - 12.80 | - 16.48 | - 14.02 | - 12.68 |
| 香叶木素   | 5281612 | - 19.25                                  | - 16.86 | - 19.49 | - 18.89 | - 20.58 | - 21.60 | - 24.18 |
| 圣草酚    | 440735  | - 20.76                                  | - 20.47 | - 20.30 | - 20.58 | - 19.57 | - 20.92 | - 21.04 |
| 山柰酚    | 5280863 | - 20.76                                  | - 20.48 | - 18.89 | - 21.46 | - 19.16 | - 21.13 | - 16.83 |
| 沙苑子苷   | 5492406 | - 10.59                                  | - 2.34  | - 5.41  | - 3.56  | - 7.24  | - 0.79  | - 8.45  |
| 木犀草素   | 5280445 | - 18.94                                  | - 18.96 | - 20.45 | - 20.54 | - 22.18 | - 18.03 | - 18.09 |
| 毛蕊异黄酮苷 | 5318267 | - 22.08                                  | - 19.49 | - 18.10 | - 18.74 | - 16.48 | - 14.53 | - 16.09 |
| 毛蕊异黄酮  | 5280448 | - 25.16                                  | - 21.27 | - 20.48 | - 26.36 | - 20.85 | - 20.54 | - 19.49 |

2.3 动物实验验证

2.3.1 动物分组及造模 SD 雄性大鼠适应性饲养一周后，随机分为假手术组、模型组、阳性药组（前列康普乐安片）和甘草地上醇提物组，每组 6 只。按照《慢性前列腺炎动物模型制备规范（草案）》<sup>[20]</sup> 中 1% 角叉菜胶生理盐水溶液注入精液囊方法对模型组、给药组和阳性药组进行造模，假手术组注射等量生理盐水，休养 3 d 后开始给药。  
2.3.2 动物给药 甘草地上醇提物组给药剂量为 63 mg/ (kg · d)，阳性药组给药剂量为 1.05 g/ (kg · d)，溶剂为 0.5%CMC-Na，灌胃体积为 1 mL，假手术组和模型组灌胃等量溶剂。每日固定时间给药一次，连续 28 d。

2.3.3 大鼠体质量及前列腺系数计算 实验期间每周称重一次。末次给药 24 h 后，麻醉大鼠，取前列腺组织，称重并计算前列腺系数。前列腺系数 (%) = 前列腺质量 (g) / 体质量 (g) × 100%。

结果各组大鼠体质量与前列腺质量无显著差异，模型组前列腺指数相比假手术组升高 ( $P < 0.05$ )，阳性药组、甘草地上醇提物组前列腺指数与模型组相比降低 ( $P < 0.05$ )，见表 3。

表 3 药物干预对大鼠体质量及前列腺指数的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )  
Tab 3 Effect of drug intervention on body mass and prostate index in rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

| 组别       | 体质量 /g      | 前列腺质量 /g      | 前列腺指数 /%                   |
|----------|-------------|---------------|----------------------------|
| 假手术组     | 464 ± 17.00 | 0.653 ± 0.112 | 0.140 ± 0.020              |
| 模型组      | 428 ± 45.93 | 0.704 ± 0.059 | 0.165 ± 0.008*             |
| 阳性药组     | 466 ± 24.34 | 0.656 ± 0.108 | 0.141 ± 0.023 <sup>#</sup> |
| 甘草地上醇提物组 | 460 ± 40.45 | 0.666 ± 0.047 | 0.145 ± 0.014 <sup>#</sup> |

注：与假手术组相比，\* $P < 0.05$ ；与模型组相比，<sup>#</sup> $P < 0.05$ 。  
Note: Compared with the sham-treated group, \* $P < 0.05$ ; compared with the model group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ .

2.3.4 ELISA 法检测大鼠血清炎症因子水平 末次给药 24 h 后，使用 20% 乌拉坦水溶液麻醉大鼠，进行腹主动脉取血，离心后取血清于一 80 ℃



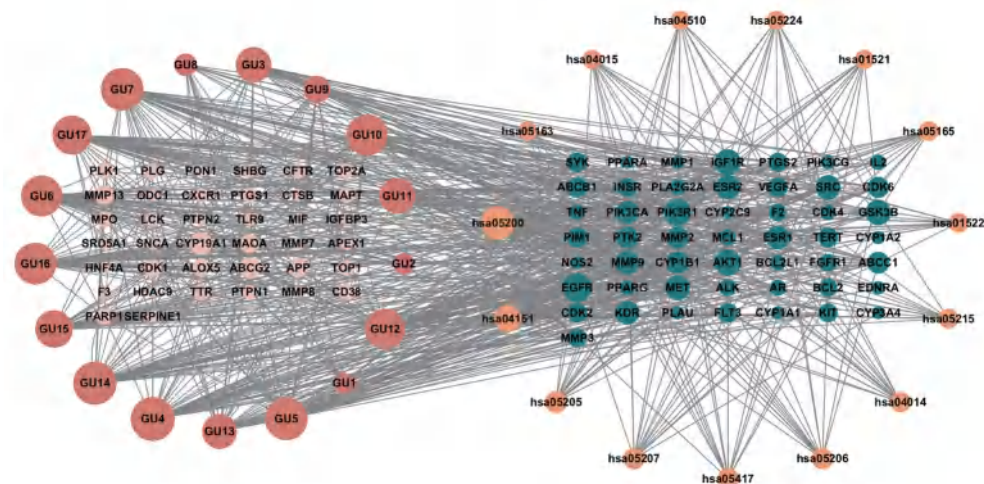


图2 甘草地上部分抗慢性前列腺炎“活性成分-核心靶点-通路”网络

Fig 2 Active compound-core target-pathway network of aerial parts of *Glycyrrhiza uralensis* for chronic prostatitis

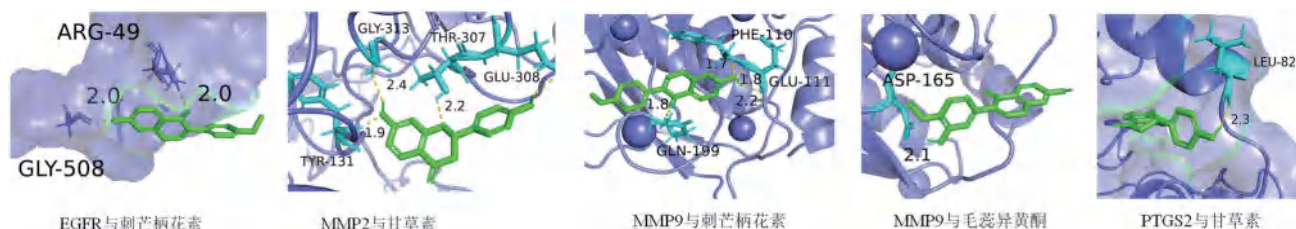


图3 甘草地上部分核心成分与关键靶点分子对接结果可视化

Fig 3 Visualization of molecular docking of core components in aerial parts of *Glycyrrhiza uralensis* and key targets

冰箱储存，参照试剂盒说明书，测定大鼠血清中 DHT、IFN- $\gamma$ 、IgG、IL-6、PSA、TNF- $\alpha$  的表达量。

与假手术组相比，模型组 DHT、IFN- $\gamma$ 、IgG、IL-6、PSA、TNF- $\alpha$  水平均升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )；

与模型组相比，甘草地上部分醇提物组 DHT、IFN- $\gamma$ 、IgG、IL-6、PSA、TNF- $\alpha$  水平均降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )，说明甘草地上部分醇提物对慢性前列腺炎有较好的治疗效果，见图 4。

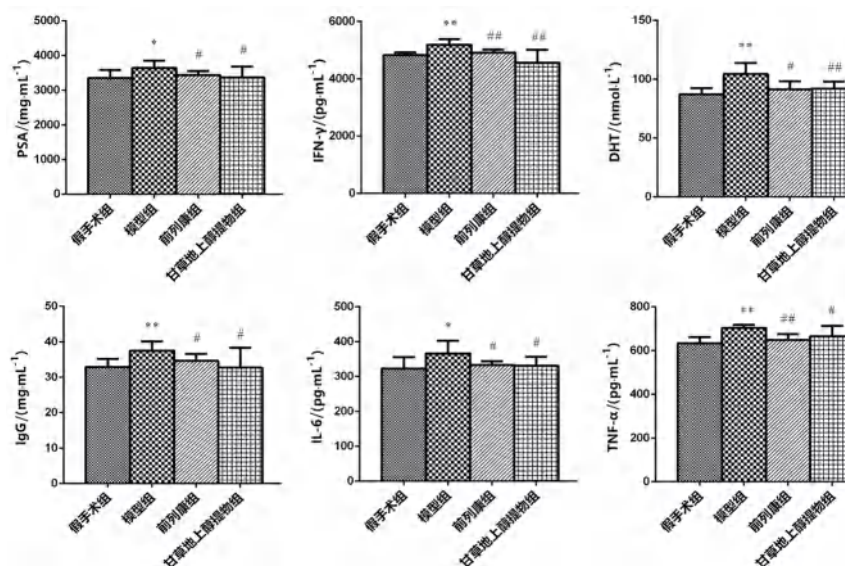


图4 药物干预对大鼠血清生化指标水平的影响

Fig 4 Effect of drug intervention on the levels of serum biochemical indicators in rats

注：与假手术组相比，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ ；与模型组相比，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the sham-treated group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; compared with the model group, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ .

2.3.5 HE 染色观察前列腺病理形态 采用组织固定液对大鼠前列腺组织进行固定 24 h 以上，脱

水，石蜡包埋后切片，进行苏木素-伊红 (HE) 染色，在光学显微镜下观察大鼠前列腺组织的病



理形态,记录前列腺组织腺体形态、前列腺间质炎症细胞浸润及纤维组织增生情况。

结果连续给药 28 d 后,假手术组大鼠前列腺颜色红润,质地柔软,富有弹性;模型组大鼠前列腺颜色暗红,质地较硬,弹性较小;甘草地上部分醇提物组与阳性药组大鼠前列腺情况较模型组相比有较好改善。

HE 染色结果表明,假手术组大鼠前列腺组织腺体完整,未见萎缩,腺上皮单层细胞结构完整无增生,腺体间隙无炎性细胞浸润;模型组大鼠前列腺腺体变形严重,腺体萎缩,腺上皮出现脱落、增生的现象,腺体间质有大量的炎性细胞浸润;甘草地上部分醇提物组和阳性药组与模型组相比,腺体形态得到了改善,炎性细胞浸润减少,腺上皮增生的现象得到抑制,见图 5。

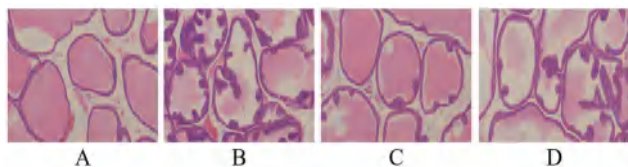


图 5 药物干预对大鼠前列腺组织的影响 ( $\times 100$ )

Fig 5 Effect of drug intervention on rat prostate tissue ( $\times 100$ )

A. 假手术组 (sham-treated group); B. 模型组 (blank group); C. 阳性药组 (Qianlickang group); D. 甘草地上部分醇提物组 (ethanol extract of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. group)

**2.3.6 统计学方法** 通过 SPSS 23.0 软件进行处理,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用  $t$  检验。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

### 3 讨论

慢性前列腺炎是常见的泌尿生殖系统疾病,在世界范围内 50 岁以下男性人群中的发病率达到 8%,常伴有下尿路刺激征和盆腔疼痛<sup>[21]</sup>。目前,现代医学对慢性前列腺炎的发病机制尚未十分明确,有学者认为其发病可能与不明微生物感染、自身免疫异常、氧化应激、内分泌失调等因素有关。临床上治疗慢性前列腺炎主要以西药治疗为主,包括  $\alpha$  受体阻滞剂、非甾体抗炎药、喹诺酮类抗菌药<sup>[22]</sup> 等。甘草地上部分中的黄酮类成分对慢性前列腺炎也有较佳的治疗效果。本研究结合网络药理学方法,对甘草地上部分中的黄酮类成分抗慢性前列腺炎的机制进行了初步探讨,并通过后续动物实验进行验证。

根据 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 法分析鉴定出甘草地上部分醇提物中的 44 种黄酮类化学物质,通过网络数据库筛选出 19 个活性成分,获得 956 个疾病靶点,138 个成分靶点,88 个交集靶点。将 PPI 网络结果中排名前十的靶点与活性成分进行分子对接,对接结果最好的 5 组分别是刺芒柄花

素-EGFR、甘草素-MMP2、毛蕊异黄酮-MMP9、刺芒柄花素-MMP9、甘草素-PTGS2。刺芒柄花素是异黄酮家族的主要成员,具有抗氧化、抗感染等药理作用,能够减弱炎症反应和氧化应激作用,降低细胞凋亡水平<sup>[23]</sup>。甘草素是一种二氢黄酮类化合物,能够下调促炎细胞因子水平达到抗炎作用<sup>[24]</sup>。毛蕊异黄酮能够下调病变组织中的下游促炎因子表达,而且还具有较好的抗肿瘤作用<sup>[25]</sup>。根据 KEGG 富集结果,甘草地上部分黄酮类成分抗慢性前列腺炎作用与 PI3K-AKT、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂抵抗等多条信号通路有关。

表皮生长因子受体 (EGFR) 是一种跨膜蛋白受体,在调节细胞生长、维持上皮完整性方面有重要作用<sup>[26]</sup>。激活的 EGFR 可通过 PI3K-AKT 等下游信号通路促进前列腺细胞增殖,这种异常增殖可能会引起前列腺间质增生、纤维组织增生,导致大鼠前列腺组织发生异常增生<sup>[27]</sup>。AKT1 作为靶点 AKT 的亚型,在细胞增殖凋亡、新陈代谢和基因组稳定性中发挥着关键作用<sup>[28]</sup>,AKT1 的激活过程,主要依赖于 PI3K-AKT 信号通路。当细胞外的相应刺激信号与细胞膜表面的特定受体结合后,该信号通路被启动,促使 AKT1 被激活并发挥其生物学功能<sup>[29]</sup>。AKT1 在前列腺炎细胞中被激活后,会促进炎症细胞因子的产生,这些细胞因子会进一步刺激前列腺组织中的其他细胞,引起疼痛、肿胀等炎症症状,并导致前列腺组织的损伤和纤维化,通过抑制 AKT1 的表达能减轻慢性前列腺炎<sup>[30]</sup>。基质金属蛋白酶 9 (MMP9) 是一种锌离子依赖性的内肽酶,能够特异性降解细胞外基质中的多种成分<sup>[31]</sup>。在慢性前列腺炎中,MMP9 的过度表达会破坏前列腺的组织结构,使腺泡的完整性受损,为炎症细胞在前列腺组织中的迁移提供了便利条件,让其更容易地从血管周围向炎症部位聚集,从而使炎症范围不断扩大。MMP9 可以通过多种方式与 PI3K-AKT 通路相互作用,同时,PI3K-AKT 通路的激活也可以上调 MMP9 的表达。推测甘草地上部分是通过 PI3K-AKT 信号通路调控 EGFR、AKT1、MMP9 等靶点发挥抗慢性前列腺炎作用的。

为验证甘草地上部分对慢性前列腺炎的作用,将 SD 大鼠进行角叉菜胶注射精液囊造模后给药。结果与模型组相比,甘草地上部分给药组 DHT、IFN- $\gamma$ 、IgG、IL-6、PSA、TNF- $\alpha$  水平均降低,大鼠前列腺腺体形态得到了改善,炎性细胞浸润减少。

综上所述,甘草地上部分黄酮类成分抗慢性前列腺炎作用具有多成分、多靶点、多途径的特征,其作用可能通过 PI3K-AKT 信号通路调控 EGFR、AKT1、MMP9 等靶点实现。本实验验证了甘草地上部分黄酮类成分对慢性前列腺炎的作用,初步探究了其抗慢性前列腺炎的潜在有效成分和作用机制,可为甘草地上部分药效物质基础和作用机制探究提供参考。

## 参考文献

- [1] 高雪岩,王文全,魏胜利,等.甘草及其活性成分的药理活性研究进展[J].中国中药杂志,2009,34(21):2695-2700.
- [2] 张敏建,常德贵,宾彬,等.慢性前列腺炎中西医结合诊疗指南[J].中国男科学杂志,2023,37(1):3-17.
- [3] 张鲁,崔洁,王文全,等.甘草属植物地上部分化学成分和药理作用研究进展[J].中药材,2018,41(6):1501-1505.
- [4] 李红丽.甘草地上部分水溶性成分的抗氧化及抗 CNP 活性研究[D].北京:北京中医药大学,2016.
- [5] 张琳,赵梓邯,于冰莉,等.甘草地上部分对慢性前列腺炎大鼠的影响[J].中成药,2019,41(6):1407-1410.
- [6] 孟作环,乔莉,王宗权,等.南葶苈子化学成分的上 UPLC/Q-TOF-MS/MS 分析(英文)[J].中国药学(英文版),2015,24(5):303-309.
- [7] 乔晓莉,吴士杰,祁向争,等.山楂中化学成分的上 UPLC/ESI-TOF/MS 分析[J].现代药物与临床,2014,29(2):120-124.
- [8] He LL, Zhang ZF, Lu LY, et al. Rapid identification and quantitative analysis of the chemical constituents in *Scutellaria indica* L. by UHPLC-QTOF-MS and UHPLC-MS/MS[J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 117: 125-139.
- [9] 肖观林,江洁怡,胥爱丽,等.基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 结合多元统计分析不同产地布渣叶化学成分的差异[J].湖南中医杂志,2021,37(12):171-177.
- [10] 孙志,赵灵芝,左莉华,等.UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 鉴定丹灯通脑软胶囊中多种化学成分[J].中国现代应用药学,2019,36(2):191-199.
- [11] 孙崇鲁,吴浩,楼天灵,等.UPLC-Q-TOF-MS 法分析三叶青地上部分化学成分[J].中成药,2018,40(6):1424-1429.
- [12] 段伟萍,李缘媛,郑云枫,等.基于 LC-MS/MS 法分析生、炙甘草中水溶性成分[J].中成药,2020,42(5):1237-1243.
- [13] 肖观林,江洁怡,胥爱丽,等.基于 UPLC-Q-TOF-MS 的布苈调脂胶囊化学成分分析[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(14):190-199.
- [14] 韩沙沙,郑伟,南易,等.基于 UHPLC-Q-TOF/MSE 技术分析武夷岩茶的化学成分[J].现代食品科技,2022,38(6):234-247.
- [15] 黄光强,梁洁,孙正伊,等.基于超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱技术的止咳颗粒化学成分研究[J].中南药学,2021,19(5):856-864.
- [16] 郭明鑫,吴霞,冯毅凡.刺糖总黄酮的提取工艺优化及其成分的快速分析[J].中药新药与临床药理,2020,31(9):1110-1116.
- [17] 于舒婷,刘海霞,李昆,等.采用 UHPLC-QExactive 轨道阱高分辨质谱快速识别脑震宁颗粒的化学成分[J].药科学报,2018,53(4):609-620.
- [18] 陈璐琳.桂枝汤化学成分液相色谱-质谱分析及其抗炎活性研究[D].杭州:浙江大学,2015.
- [19] 王艳萍,薛兴亚,张秀莉,等.HPLC/ESI-MS 法鉴定半枝莲乙酸乙酯组中黄酮苷元类化合物[J].质谱学报,2009,30(3):129-138.
- [20] 中华中医药学会,中药实验药理专业委员会.慢性前列腺炎动物模型制备规范(草案)[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(19):10-14.
- [21] 齐旻芳,黄高翔,周雪娟.慢性非细菌性前列腺炎发病机制的研究进展[J].广西医科大学学报,2017,34(8):1247-1249.
- [22] 陕文生.慢性前列腺炎药物治疗概述[J].中国男科学杂志,2008,37(5):214-215.
- [23] 李友宽,史焱,段琳楠,等.刺芒柄花素对脑卒中后自噬、炎症和氧化应激的交互作用[J].中国细胞生物学学报,2023,45(10):1551-1557.
- [24] 练强.甘草素调节 LKB1/AMPK 信号通路对冠心病大鼠的心脏保护作用研究[J].四川医学,2023,44(9):916-920.
- [25] 王睿,伍明桃,万玛索南,等.毛蕊异黄酮的研究进展[J].云南化工,2019,46(10):56-57.
- [26] Gill G N. Regulation of EGF receptor expression and function[J]. Mol Reprod Dev, 1990, 27(1): 46-53.
- [27] 叶晨昱,李宁,陈音孜,等.网络药理学、分子对接结合实验验证探讨飞蛾藤治疗类风湿关节炎的作用机制[J].药科学报,2025,60(1):117-129.
- [28] He Y, Zeng H, Yu Y, et al. Resveratrol improved detrusor fibrosis induced by mast cells during progression of chronic prostatitis in rats[J]. Eur J Pharmacol, 2017, 815: 495-500.
- [29] 嵇莹莹,龚国清.PI3K/AKT/mTOR 通路在炎症相关疾病中分子机制研究进展[J].药学研究,2018,37(4):226-229.
- [30] 郑磊,彭磊,葛骊,等.炎症小体在前列腺增生中的作用研究[J/OL].西部医学,https://link.cnki.net/urlid/51.1654.R.20241112.1117.002.
- [31] 关素敏.中间普氏菌增殖机制及对慢性牙周炎致病作用的研究[D].西安:第四军医大学,2008.

(收稿日期:2024-11-19;修回日期:2024-12-22)

# <sup>177</sup>Lu-DOTA-RTX 靶向放射性核素药物的制备及其抗弥漫性大 B 细胞淋巴瘤初步研究

张馨雨<sup>1</sup>, 于兴泰<sup>1</sup>, 胡哲铭<sup>1</sup>, 王文艺<sup>1</sup>, 张丽群<sup>1</sup>, 刘笑洋<sup>1</sup>, 王昌海<sup>1</sup>, 陆洋<sup>1\*</sup>, 郑宇<sup>2\*</sup> (1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100029; 2. 北京核工业医院 中医科, 北京 102413)

**摘要:** 目的 评估 <sup>177</sup>Lu-DOTA-RTX 作为放射性核素抗体偶联药物在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL) 治疗中的抗肿瘤效果。方法 通过将螯合剂 p-SCN-Bn-DOTA 与利妥昔单抗 (RTX) 偶联, 制备 DOTA-RTX 载体, 并与放射性核素 <sup>177</sup>Lu 螯合, 构建靶向制剂 <sup>177</sup>Lu-DOTA-RTX。采用激光共聚焦显微镜和近红外荧光成像评估其体外及体内靶向能力; 通过细胞毒性实验和荷瘤小鼠模型, 分析其抗肿瘤活性与安全性。结果 <sup>177</sup>Lu-DOTA-RTX 在 24 h 内显著富集于肿瘤组织, 且在主要脏器中迅速被清除。细胞实验显示, 该制剂可特异性结合 U2932 细胞并表现出剂量相关的细胞毒性。动物实验表明, <sup>177</sup>Lu-DOTA-RTX 高剂量组 (14.8 MBq) 在 7 d 内实现 63.5% 的肿瘤抑制率, 低剂量组 (1.85 MBq) 则在保持体重的同时仍展现出良好的疗效。结论 研究初步表明, <sup>177</sup>Lu-DOTA-RTX 具有显著的肿瘤靶向活性和可接受的安全性, 有望成为一种有前景的新型 DLBCL 治疗药物。

**关键词:** 放射性核素; <sup>177</sup>Lu; 抗体偶联制剂; 抗肿瘤; 利妥昔单抗

中图分类号: R943, R96 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)08-2151-06  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.002

## Preparation of <sup>177</sup>Lu-DOTA-RTX targeted radionuclide drugs and preliminary study on anti diffuse large B-cell lymphoma

ZHANG Xin-yu<sup>1</sup>, YU Xing-tai<sup>1</sup>, HU Zhe-ming<sup>1</sup>, WANG Wen-yi<sup>1</sup>, ZHANG Li-qun<sup>1</sup>, LIU Xiao-yang<sup>1</sup>, WANG Chang-hai<sup>1</sup>, LU Yang<sup>1\*</sup>, ZHENG Yu<sup>2\*</sup> (1. School of Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029; 2. Department of Traditional Chinese Medicine, Beijing Nuclear Industry Hospital, Beijing 102413)

**Abstract: Objective** To evaluate the anti-tumor efficacy of <sup>177</sup>Lu-DOTA-RTX, a radionuclide-labeled antibody conjugate, in the treatment of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). **Methods** DOTA-RTX was synthesized by conjugating p-SCN-Bn-DOTA with rituximab (RTX), and then chelated with the radionuclide <sup>177</sup>Lu to form the targeted therapeutic agent <sup>177</sup>Lu-DOTA-RTX. Laser confocal microscopy and near-infrared fluorescence imaging were used to assess its targeting ability in vitro and in vivo. Cytotoxicity assays and tumor-bearing mouse models were employed to evaluate anti-tumor activity and safety. **Results** <sup>177</sup>Lu-DOTA-RTX demonstrated significant tumor accumulation within 24 h and was rapidly cleared from major organs. In vitro, it specifically bound to U2932 cells and exhibited dose-dependent cytotoxicity. In vivo, the high-dose group of <sup>177</sup>Lu-DOTA-RTX (14.8 MBq) achieved a tumor inhibition rate of 63.5% within 7 days, the low-dose group (1.85 MBq) showed good therapeutic effects while maintaining stable body weight. **Conclusion** <sup>177</sup>Lu-DOTA-RTX possesses strong tumor-targeting activity and acceptable safety, indicating its potential as a promising therapeutic candidate for DLBCL.

**Key words:** radionuclide; <sup>177</sup>Lu; antibody conjugates; anti-tumor; rituximab

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 82173989)。

作者简介: 张馨雨, 女, 硕士研究生, 主要从事中药新剂型与新技术研究, email: lxxy2004302@163.com \*通信作者: 陆洋, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药新剂型与新技术研究, email: luyang@bucm.edu.cn; 郑宇, 男, 主治医师, 主要从事疾病中医学、针灸学研究, email: cacalote.yu@outlook.com



放射性核素在靶向放射性核素治疗 (TRT) 中的应用为肿瘤治疗开辟了新方向。TRT 使用特定的放射性核素结合小分子、肽或单克隆抗体, 通过靶向递送将放射性直接导向肿瘤病灶。相较于传统的外束放射治疗 (EBRT), TRT 通过内部放射治疗 (IRT) 在肿瘤内积聚放射性核素, 提高了肿瘤局部的辐射剂量, 同时减少了对周围正常组织的损伤<sup>[1]</sup>。其中, 放射性标记抗体偶联物 (RAC) 在 TRT 中具有显著优势。RAC 通过双功能螯合剂将放射性核素与抗体结合, 既延长了药物在血液循环中的时间, 又在肿瘤部位实现了高选择性聚集, 最大程度地降低了治疗的毒副作用<sup>[2]</sup>。

放射性核素  $^{177}\text{Lu}$  因其 6.6 d 的适中半衰期和  $\beta$  射线的理想能量, 在 RAC 类药物的研发中备受关注<sup>[3]</sup>。 $^{177}\text{Lu}$  的物理特性确保其在达到有效杀伤肿瘤细胞的同时, 降低对周围健康组织的损伤, 使其成为 TRT 的关键放射性源。常用的双功能螯合剂 p-SCN-Bn-DOTA 具有良好的  $^{177}\text{Lu}$  螯合能力, 且可与抗体上的

氨基反应, 形成稳定的硫脲键, 使  $^{177}\text{Lu}$  能牢固地结合在靶向抗体上, 从而增强  $^{177}\text{Lu}$  的靶向性。

在肿瘤靶向方面, CD20 是恶性 B 细胞淋巴瘤, 特别是弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL) 细胞膜上高表达的分子标志<sup>[4]</sup>。DLBCL 是一种高异质性、高度侵袭性的恶性淋巴瘤, 占非霍奇金淋巴瘤的 31%, 且易复发和转移<sup>[5]</sup>。针对 CD20 的靶向单抗利妥昔单抗 (rituximab, RTX) 已在临床广泛应用, 具有良好的靶向性和安全性, 其在 TRT 中的应用得到了广泛认可<sup>[6-8]</sup>。

如图 1 所示, 本研究以  $^{177}\text{Lu}$  为放射源, 制备放射性标记抗体偶联物  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX, 并评估其在 DLBCL 治疗中的抗肿瘤效果。首先探究  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX 的稳定性; 然后, 考察其载体 DOTA-RTX 的体外靶向作用和在荷瘤小鼠体内的分布情况; 最后, 对  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX 在体内的抗肿瘤作用和毒副作用进行评估, 以期 DLBCL 的治疗提供新思路。

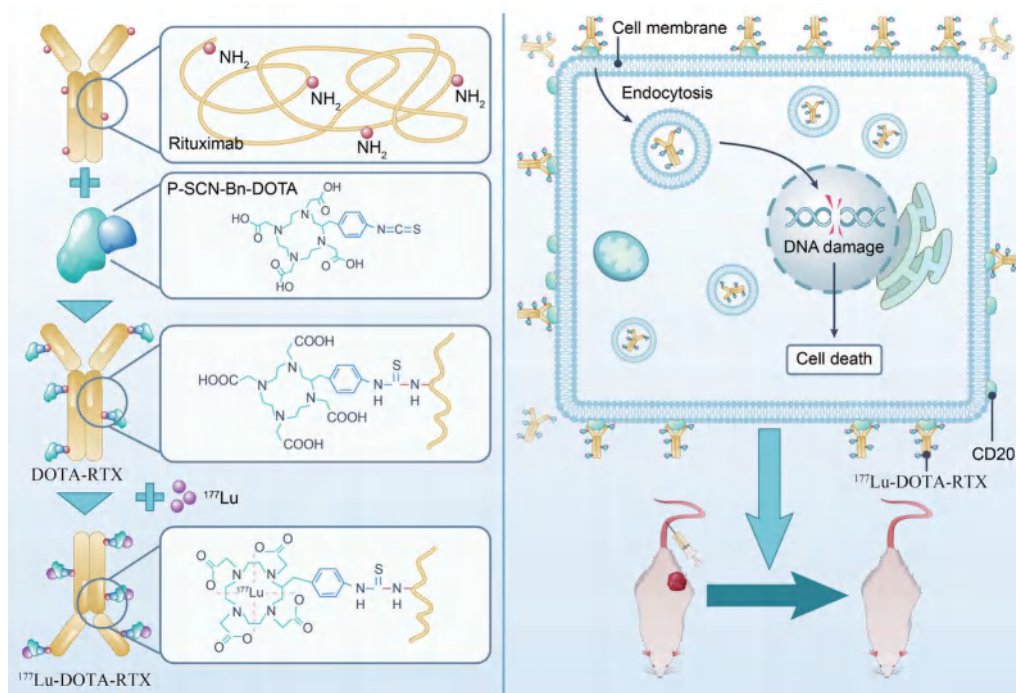


图 1  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX 的制备、机制及药效 (由 Adobe Illustrator CC 2019 绘制)

Fig 1 Preparation, mechanism, and efficacy of  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX (Drawn by Adobe Illustrator CC 2019)

## 1 材料

### 1.1 试剂

p-SCN-Bn-DOTA (美国 Macrocyclics Inc); 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液 (pH 9.0) (北京百诺威生物科技有限公司); RTX (MCE); 特级胎牛血清 (乌拉圭 ABW); RPMI 1640 培养基、抗青霉素/链霉素 (美国 Gibco); Hoechst 33342、抗荧光猝灭封片液 (碧云天生物技术公司); FlexAble 抗体标记试剂盒

(美国 Thermo); IR800-NHS 活性酯 (美国 Li-Cor);  $^{177}\text{LuCl}_3$  (中国原子能研究所); iTLC-SG 层析纸 (美国 Bioscan); Chelex 100 树脂、PD-10 尺寸排除柱 (美国 GE Healthcare)。

### 1.2 仪器

BS224S 电子天平 (德国 Sartorius); INESA-L6 紫外分光光度计 (上海仪电分析仪器有限公司); Series II 型二氧化碳培养箱 (美国 Thermo); CKX-

41 型倒置显微镜、FV3000 激光共聚焦显微镜(德国 Olympus); MoFlo XDP 流式细胞仪(美国 Beckman Coulter); 移液枪(德国 Eppendorf); IVIS 小动物活体成像仪(美国 Molecular Devices); TDL80-2B 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂); Heal Force 超净工作台(上海力华有限公司); 血球计数板(中国求精生化试剂仪器有限公司); RM-905a 放射性活度计(北京恒昌高科科学技术有限公司); 恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司); 涡旋振荡器(上海凌科实业发展有限公司); CT15RT 台式高速冷冻离心机(日本日立)。

### 1.3 实验细胞和动物

U2932 人 DLBCL 细胞(北纳生物工业微生物菌种工程技术研究中心); 雌性 BALB/c-nu 裸鼠(SPF 级, 体重 18 ~ 22 g), 用于体内成像实验[斯贝福(北京)生物技术有限公司], 雌性 NCG 重度免疫缺陷型小鼠(SPF 级, 体重 18 ~ 22 g), 用于体内靶向实验[江苏集萃药康生物科技股份有限公司, 使用许可证编号 SCXK(京)2019-0010]。

## 2 方法与结果

### 2.1 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX 靶向递送载体的制备

根据课题组前期研究基础, 将 5 mg 的 RTX 溶解于 2 mL pH 9 的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液中, 加入  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 p-SCN-Bn-DOTA 溶液  $119.5 \mu\text{L}$ ,  $4^\circ\text{C}$  孵育 24 h。孵育完成后, 将溶液转移至规格为 4 mL 的 Amicon Ultra-40K 离心管中,  $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 以纯化 DOTA-RTX 复合物。接着, 将纯化后的浓缩液加入 200  $\mu\text{L}$  的磷酸盐缓冲液(PBS)中, 并在相同转速下离心 5 min, 重复此步骤 3 次, 得到 DOTA-RTX 溶液。随后, 螯合反应在 pH 5.5 的环境中进行, 反应温度为  $60^\circ\text{C}$ ,  $^{177}\text{LuCl}_3$  与 DOTA-RTX 的比例为 1 : 50, 反应 1 h, 最终得到  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX。

### 2.2 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX 的体外稳定性

分别制备高 ( $0.37 \text{ MBq} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、中 ( $3.7 \text{ MBq} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、低 ( $37 \text{ MBq} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 三种放射性浓度的样品, 避光条件下于  $4^\circ\text{C}$  保存 0 ~ 7 d, 使用 iTLC (即时薄层层析) 方法监测其放射性纯度。

结果见图 2,  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX 在  $4^\circ\text{C}$  下放置 7 d 后, 纯度仍在 95% 以上, 表明其体外稳定性良好。

### 2.3 DOTA-RTX 的体外靶向作用

以 U2932 人 DLBCL 细胞为细胞模型, 基于激光共聚焦显微镜亚细胞共定位技术考察 DOTA-RTX 是否能够与人 DLBCL 细胞表面的 CD20 结合, 评价 DOTA-RTX 的体外靶向作用。

由于 DOTA-RTX 本身不具备荧光特性, 使用 FlexAble 抗体标记试剂盒对其进行荧光标记, 标记染

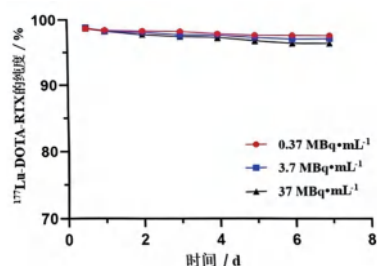


图 2 不同浓度  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX 的体外稳定性

Fig 2 In vitro stability of  $^{177}\text{Lu}$  DOTA-RTX at different concentrations

料为 Coralite Plus 550 (激发波长 554 nm, 发射波长 570 nm)。将解冻后的 DOTA-RTX (50  $\mu\text{g}$ ) 加入 0.5 mL 离心管内, 依次加入 10  $\mu\text{L}$  FlexLinker, 室温反应 10 s 后加入 80  $\mu\text{L}$  含 Coralite Plus 550 的 FlexBuffer, 室温孵育 5 min; 接着加入 FlexQuencher, 继续孵育 5 min, 制得 DOTA-RTX-CLP, 备用。

取对数生长期 U2932 细胞, 以 Hoechst 33342 ( $2.5 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 标记细胞核, 在  $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  条件下孵育 20 min。染色完成后, PBS 洗涤细胞两次, 重新悬液于完全培养基中, 并加入 DOTA-RTX-CLP (终质量浓度为  $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),  $37^\circ\text{C}$  孵育 30 min 后再次洗涤。细胞重悬后转移至激光共聚焦专用培养皿中, 使用激光共聚焦显微镜(双通道成像, 激发波长分别为 405 nm 和 550 nm)观察细胞核与 DOTA-RTX-CLP 的定位关系。图像结果使用拼图功能进行大视野成像分析。

激光共聚焦显微镜拍照结果见图 3, 图 3C 可以观察到每一个蓝色光点均被黄绿色圆环包住, 表明 DOTA-RTX 大量聚集到 U2932 细胞膜上, 与 U2932 细胞发生特异性结合, 具有较好的体外靶向作用。

### 2.4 DOTA-RTX 的体内分布

使用近红外染料 IR800-NHS 对 DOTA-RTX 进行荧光标记, 染料通过 NHS 酯与 DOTA-RTX 上的氨基共价偶联, 制备 DOTA-RTX-IR800。将  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 IR800-NHS 溶液与  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 DOTA-RTX 溶液按等摩尔比在 pH 9.0 缓冲液中反应,  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜。反应后通过超滤去除游离染料, 并用 PBS 洗涤纯化, 终得  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 DOTA-RTX-IR800 溶液。采用雌性 BALB/c-nu 裸鼠建立荷瘤小鼠模型, 在小鼠肿瘤体积长至  $50 \text{ mm}^3$  时开始实验。实验小鼠分为两组, 采用尾静脉注射法分别将 DOTA-RTX-IR800 (注射体积 100  $\mu\text{L}$ , 质量浓度  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 和游离 IR800-NHS (注射体积 100  $\mu\text{L}$ , 质量浓度  $0.76 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 注入小鼠体内。注射完毕时间记为第 0 h, 分别在第 2、4、6、8、12、24、36 h 时, 用异氟烷麻醉使小鼠昏迷, 使用 IVIS 小动物活体成像仪拍照, 观察 DOTA-RTX 在小鼠体内的经时分布情况。

两者在 IVIS 小动物活体成像仪中的荧光强



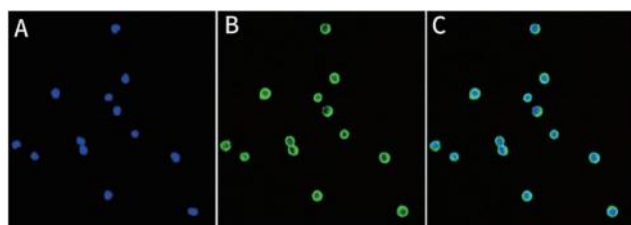


图3 DOTA-RTX 荧光标记物在 U2932 细胞中的体外共定位分析 ( $\times 40$ )  
Fig 3 In vitro co-localization analysis of fluorescently labeled DOTA-RTX in U2932 cells ( $\times 40$ )

A. Hoechst 33342 图像 (Hoechst 33342 image); B. DOTA-RTX-CLP 图像 (DOTA-RTX-CLP image); C. 融合图像 (fused image)

注: 蓝色圆点即代表 U2932 细胞细胞核的位置; 黄绿色圆环状光点即代表 DOTA-RTX 的位置。

Note: The blue dots represent the nucleus of U2932 cells, and the yellow ring-shaped spots indicate the location of DOTA-RTX.

度基本一致 (见图 4), 说明 IR800-NHS 连接到 DOTA-RTX 上后其荧光性能未受到影响, 可进一步用于后续的体内分布研究。

DOTA-RTX-IR800 (载体组) 和等剂量游离 IR800-NHS (游离组) 的体内分布结果见图 5。结果表明, 在第 2 h 时 DOTA-RTX-IR800 已显著聚集到肿瘤部位, 且至第 36 h 时肿瘤部位仍有较强的荧光强度; 而在注射游离 IR800-NHS 的小鼠照片中, 荧光信号

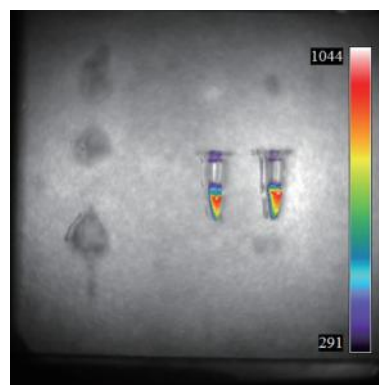


图4 DOTA-RTX-IR800 载体 (左) 和游离 IR800 (右) 样品荧光  
Fig 4 Fluorescence of DOTA-RTX-IR800 carrier (left) and free IR800 (right) samples

始终弥散在全身范围, 在第 24 h 时开始变得微弱。这表明 DOTA-RTX-IR800 具有显著的肿瘤靶向作用, 在 2 h 内能够实现肿瘤部位的大量蓄积, 荧光信号持续增强, 表现出良好的靶向速度和稳定性; 相对于游离 IR800-NHS, DOTA-RTX-IR800 经过 36 h 后在小鼠体内仍保持较强的荧光强度, 说明 DOTA-RTX 有望延缓小分子染料 (如 IR800-NHS) 的体内代谢, 提示其结构可能有助于提高放射性偶联物 (如  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX) 在体内的稳定性和蓄积潜力, 需进一步验证。

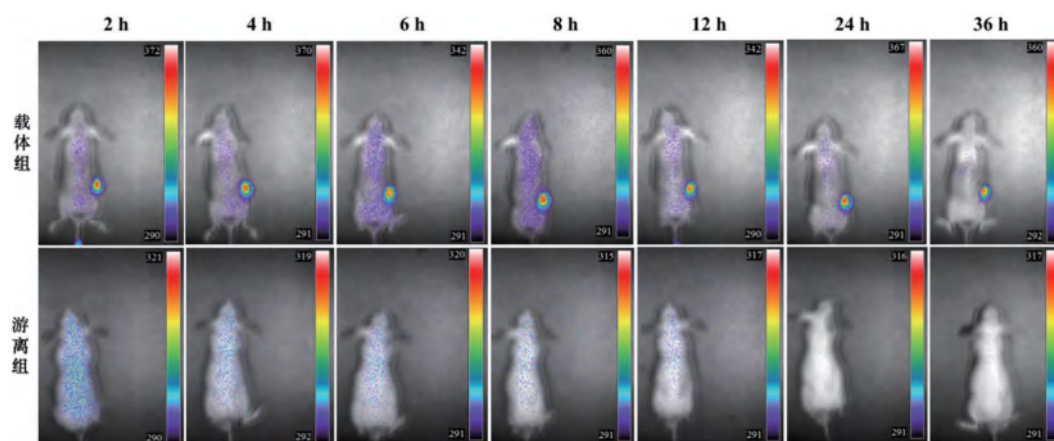


图5 DOTA-RTX 在 U2932 荷瘤裸鼠体内的分布情况  
Fig 5 Distribution of DOTA-RTX in U2932 tumor bearing nude mice

## 2.5 $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX 的抗肿瘤研究

**2.5.1  $^{177}\text{Lu}$  对 U2932 细胞的生长抑制作用** 为探究  $^{177}\text{Lu}$  对 U2932 细胞的放射敏感性, 在动物实验前开展 CCK-8 细胞毒性实验进行初步评估。

U2932 细胞于对数生长期收集后, 用完全培养基重悬, 并稀释至  $2 \times 10^5$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。将 50  $\mu\text{L}$  细胞悬液 (约 8000 个细胞) 接种于无菌 96 孔板中, 每组设置 6 个复孔 ( $n = 6$ ), 最外圈孔加入 PBS 以防边缘效应。使用无血清培养基将纯化后的  $^{177}\text{LuCl}_3$  溶液配制为不同浓度: 0.037、0.185、0.370、0.740、1.850  $\text{MBq} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。实验组各孔中加入 50  $\mu\text{L}$  相应

浓度的放射性溶液, 对照组加入等体积无血清培养基。所有孔共孵育 24 h ( $37^\circ\text{C}$ ,  $5\%\text{CO}_2$ )。孵育结束后, 每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液, 于  $37^\circ\text{C}$  避光孵育 1 h, 使用酶标仪在 450 nm 处测定 OD 值。参照公式 (1) 计算细胞生长抑制率。

$$\text{细胞生长抑制率}(\%) = (1 - A_{\text{加药组}}/A_{\text{对照组}}) \times 100\% \quad (1)$$

式中,  $A_{\text{加药组}}$  为加药孔的吸光度值;  $A_{\text{对照组}}$  为对照孔的吸光度值。

考察了不同剂量的游离  $^{177}\text{Lu}$  溶液对 U2932 细胞的生长抑制作用, 结果见图 6。游离  $^{177}\text{Lu}$



对 U2932 的细胞毒性具有一定的剂量相关性, 当  $^{177}\text{Lu}$  溶液浓度为  $1.850 \text{ MBq} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, 与 U2932 细胞孵育 24 h 后能够有效杀死 44.5% 的细胞。Li 等<sup>[9]</sup>关于  $^{177}\text{Lu}$  对 4T1 细胞的体外毒性研究结果,  $0.5 \text{ MBq} \cdot \text{mL}^{-1}$  浓度  $^{177}\text{Lu}$  与 4T1 细胞孵育 48 h 后, 细胞抑制率为  $(7.05 \pm 0.92) \%$ , 低于本研究中  $0.37 \text{ MBq} \cdot \text{mL}^{-1}$   $^{177}\text{Lu}$  与 U2932 细胞孵育 24 h 的抑制率  $(14.29 \pm 1.88) \%$ , 因此可以认为基于  $^{177}\text{Lu}$  的放射性核素治疗适用于 DLBCL。

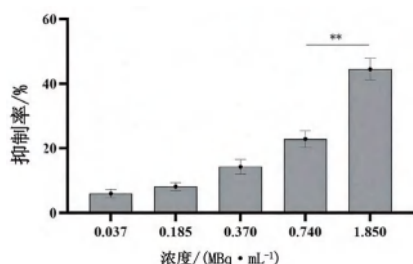


图 6  $^{177}\text{Lu}$  对 U2932 细胞的生长抑制作用 (\*\* $P < 0.01$ )

Fig 6 Growth inhibitory effect of  $^{177}\text{Lu}$  on U2932 cells (\*\* $P < 0.01$ )

**2.5.2  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX 体内靶向能力** 为评估  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX 在体内的靶向能力, 在构建的 U2932 荷瘤 NCG 裸鼠模型中进行放射性分布实验。

本研究以  $1 \times 10^7$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  U2932 细胞接种于 NCG 小鼠建立荷瘤模型, 选取肿瘤体积约为  $200 \text{ mm}^3$  的荷瘤小鼠 12 只, 随机分为 4 组, 分别于注射后 2、6、12、24 h 取样。

各组小鼠经尾静脉注射给予  $100 \mu\text{L}$  的  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX 溶液 (剂量为  $1.85 \text{ MBq}/20 \text{ g}$ )。取血方式为摘眼球取血, 所得血液置于预先称重的离心管中以测质量。随后处死动物, 剖取主要器官及组织 (包括心、肝、脾、肺、肾、胃、肠、骨、肌肉、皮肤、脑及肿瘤), 记录质量。

组织及血液的放射性活度通过  $\gamma$  计数器测定, 并计算放射性分布百分比 ( $\% \text{ID/g}$ ), 其计算公式如 (2) 所示:

$$\text{ID}\%/\text{g} = \text{ID}_n / (\text{ID}_0 \times m_n) \times 100\% \quad (2)$$

其中  $\text{ID}_0$  为注射总放射性活度,  $\text{ID}_n$  为器官  $n$  的放射性计数,  $m_n$  为器官质量。

图 7 分析了  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX 在不同时间点 (2、6、12、24 h) 内的体内分布情况。结果显示, 药物在肝、血液、肿瘤和肾组织中的分布随时间发生显著变化 ( $P < 0.01$ ), 提示其可能在药物代谢与排泄过程中发挥重要作用。

值得注意的是, 如图 8 所示,  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX 在肿瘤组织中的分布随时间显著增加, 在 24 h 达到峰值 ( $P < 0.001$ ), 且 24 h 时的摄取量显著高于 2、6、12 h。这一趋势表明该药物可能具有较好的肿瘤靶向

积聚能力, 并在体内保持较长的滞留时间, 有利于增强治疗效果。相比之下, 大多数代谢器官在 12 h 以后已基本清除药物, 仅肿瘤部位仍保持较高的放射性摄取量。这一结果说明  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX 可有效富集于肿瘤组织, 并随着时间推移增强其积累, 而在非靶器官中的快速清除可能有助于降低系统性毒性。

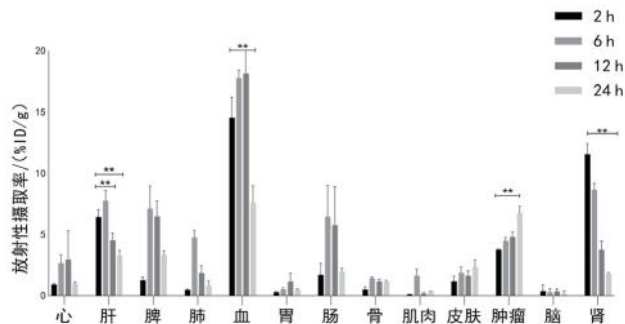


图 7  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX 在不同时间点的体内分布情况 (\*\* $P < 0.01$ )

Fig 7 In vivo biodistribution of  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX at different time points (\*\* $P < 0.01$ )

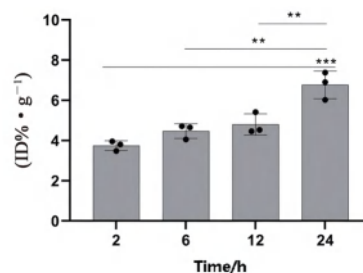


图 8  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX 在肿瘤部位的经时分布量 (\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ )

Fig 8 Time-dependent distribution of  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX in the tumor region (\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ )

**2.5.3  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX 的荷瘤小鼠药效实验** 确定了  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX 的肿瘤分布情况后, 进一步考察其对肿瘤生长的抑制作用。参照公式 (3) 计算肿瘤体积 ( $V$ ), 并于第 30 日, 处死小鼠, 剥离肿瘤并称重。使用公式 (4) 计算抑瘤率 ( $\%$ )。

$$V = L \times W^2 / 2 \quad (3)$$

式中,  $V$  为肿瘤体积;  $L$  为肿瘤最长直径;  $W$  为肿瘤最短直径。

$$\text{抑瘤率}(\%) = (1 - m_1) / m_0 \times 100\% \quad (4)$$

式中,  $m_1$  为实验组平均肿瘤重量;  $m_0$  为对照组平均肿瘤重量。

为评价不同剂量  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX 的体内抗肿瘤效果, 对每组荷瘤小鼠的肿瘤体积进行监测, 结果见图 9A。一次  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX 给药后, 各剂量肿瘤生长曲线斜率均低于 Control 组, 说明各治疗组均对肿瘤生长具有一定的抑制作用。需要注意的是, 最大剂量  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX ( $14.8 \text{ MBq}/20 \text{ g}$ ) 中 RTX 的用量不到  $10 \mu\text{g}$ , 远低于 RTX 治疗淋巴瘤的

剂量。结果显示,第3日14.8 MBq 组的肿瘤体积显著低于 Control 组 ( $P < 0.05$ );第6日,14.8 MBq 组的肿瘤体积显著低于 Control 组 ( $P < 0.001$ );第15日及以后,14.8 MBq 组的肿瘤抑制效果显著优于1.85 MBq 组和3.7 MBq 组 ( $P < 0.01$ )。

各治疗组小鼠的肿瘤抑制率见图9B。14.8 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX 组小鼠的肿瘤抑制率为  $(63.5 \pm 10.0)\%$ ,显著高于3.7 MBq 组  $(46.2 \pm 11.8)\%$  和1.85 MBq 组  $(38.1 \pm 11.7)\%$ ,而1.85 MBq 和3.7 MBq 之间肿瘤抑制率无显著差异,这一结果再次说明了14.8 MBq 的  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX 相较于1.85 MBq 和3.7 MBq 具有更强的抗肿瘤功效,这与上述研究结论一致。

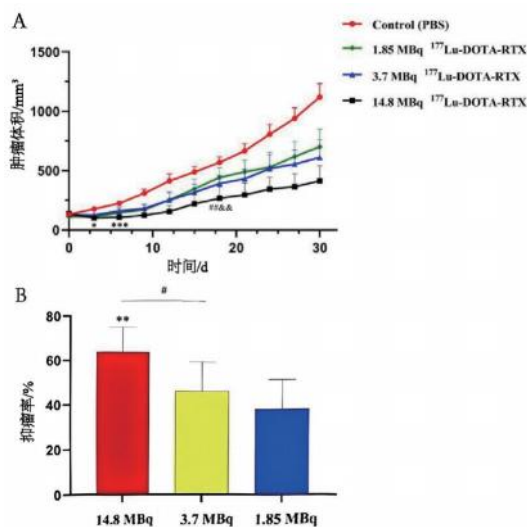


图9 不同剂量  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX 对小鼠肿瘤生长的影响 (A) 和抑瘤率的影响 (B) ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ ,  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ ,  $^{\&\&}P < 0.01$ ,  $^{\#\#}P < 0.01$ )

Fig 9 Effect of different doses of  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX on tumor growth (A) and tumor inhibition rate (B) in mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ ,  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ ,  $^{\&\&}P < 0.01$ ,  $^{\#\#}P < 0.01$ )

体重是反映小鼠健康状态的重要指标,为初步评价不同剂量  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX 治疗的安全性,本研究对各组小鼠体重变化进行了监测(见图10)。小鼠接受  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX 治疗后,第一周(约  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX 的一个半衰期,6.6 d)均出现体重减少。荷瘤小鼠体重变化程度呈现一定的剂量相关性,14.8 MBq 剂量组小鼠体重减少程度最严重,第6日时体重降低了7%,在第3周左右体重恢复到初始水平;3.7 MBq 组第7日体重降低约5%;1.85 MBq 剂量组对小鼠体重变化影响较小,在第7日时,小鼠体重基本恢复到初始水平。

#### 4 结论

本研究设计并制备了一种核素抗体偶联靶向制剂  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX,其体外稳定性良好。细胞共定位实验表明,载体 DOTA-RTX 可特异性结合 U2932

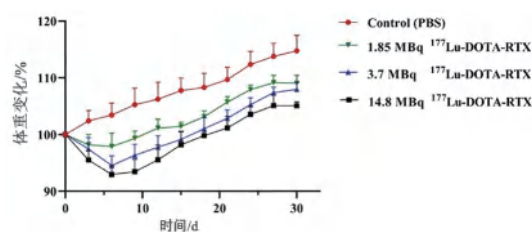


图10 不同剂量  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX 对小鼠体重变化的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )  
Fig 10 Effect of different doses of  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX on body weight changes in mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

细胞膜靶点。 $^{177}\text{Lu}$  标记后,注入荷瘤小鼠2 h 内即显著富集于肿瘤部位,36 h 仍有明显信号,说明其体外靶向能力未受显著影响。动物实验表明,14.8 MBq 剂量展现出较强的抗瘤效果但有一定毒性;而1.85 MBq 剂量可兼顾疗效与安全性,可为多次给药策略奠定基础。

综上,  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-RTX 具有良好的靶向性与治疗潜力,在治疗 DLBCL 方面展现出良好的靶向性和放射治疗潜力,具有进一步开发和临床转化的应用前景。

#### 参考文献

- [1] Dietrich A, Koi L, Zöphel K, et al. Improving external beam radiotherapy by combination with internal irradiation [J]. Br J Radiol, 2015, 88 (1051): 20150042.
- [2] Steiner M, Neri D. Antibody-radionuclide conjugates for cancer therapy: historical considerations and new trends [J]. Clin Cancer Res, 2011, 17 (20): 6406-6416.
- [3] 胡映江, 王磊, 吴建荣, 等. 利用 HFETR 制备有载体  $^{177}\text{Lu}$  [J]. 同位素, 2023, 36 (1): 83-88.
- [4] Fei Y, Yu JW, Li Y, et al. Plasma soluble PD-L1 and STAT3 predict the prognosis in diffuse large B cell lymphoma patients [J]. J Cancer, 2020, 11 (23): 7001-7008.
- [5] Li S, Wang Z, Lin LM, et al. BCL6 rearrangement indicates poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients: a meta-analysis of cohort studies [J]. J Cancer, 2019, 10 (2): 530-538.
- [6] Artigas C, Mileva M, Flamen P, et al. Targeted radionuclide therapy: an emerging field in solid tumours [J]. Curr Opin Oncol, 2021, 33 (5): 493-499.
- [7] Grzmil M, Boersema P, Sharma A, et al. Comparative analysis of cancer cell responses to targeted radionuclide therapy (TRT) and external beam radiotherapy (EBRT) [J]. J Hematol Oncol, 2022, 15 (1): 123.
- [8] Massicano AV, Pujatti PB, Alcarde LF, et al. Development and biological studies of  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-rituximab for the treatment of Non-Hodgkin's lymphoma [J]. Curr Radiopharm, 2016, 9 (1): 54-63.
- [9] Li K, Zhang YJ, Wang XM, et al. Exploring the application of bifunctional metal chelators in treating triple-negative breast cancer [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2021, 9: 697862.

(收稿日期: 2025-01-04; 修回日期: 2025-05-21)

# 基于 UPLC-MS/MS、网络药理学、分子对接和体外实验探究左归丸治疗阿尔茨海默病的机制

王燕<sup>1, 2</sup>, 唐亮<sup>2</sup>, 刘瑶<sup>2</sup>, 冯星<sup>1\*</sup> (1. 湖南师范大学医学部, 长沙 410081; 2. 长沙医学院基础医学院, 长沙 410219)

**摘要:** **目的** 基于 UPLC-MS/MS 和网络药理学探讨左归丸抗阿尔茨海默病 (AD) 药效物质及作用机制。**方法** 采用 UPLC-MS/MS 法鉴定左归丸的化学成分; 采用网络药理学方法分析左归丸的有效成分、作用靶点及信号通路; 采用分子对接技术分析左归丸活性成分与作用靶点的结合情况; 噻唑蓝比色法 (MTT) 测定左归丸对 HT22 细胞增殖的影响; 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测 AD 细胞模型的  $A\beta_{1-42}$  表达水平; 蛋白免疫印迹法检测 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白表达水平。**结果** UPLC-MS/MS 法共鉴定出 501 种化合物, 通过 HERB 和 SwissADME 数据库鉴定出 22 种有效成分。通过与 AD 相关的靶点取交集, 确定了 123 个交集靶点。从蛋白质互作网络 (PPI) 中获得 8 个核心靶点。GO 富集分析结果表明, 这些靶点主要与外源刺激、基因表达的正调控、对缺氧的反应有关。KEGG 通路分析表明, 这些靶点与癌症通路、神经变性 - 多发性疾病通路、阿尔茨海默病通路和 PI3K/AKT 信号通路相关。分子对接结果表明, 左归丸有效成分与磷脂酰肌醇-3 激酶催化亚基  $\alpha$  (PIK3CA)、表皮生长因子受体 (EGFR)、基质金属蛋白酶 9 (MMP9)、雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 和肿瘤坏死因子 (TNF)、丝裂原激活蛋白激酶 1 (MAP2K1)、RAF 激酶蛋白 (BRAF) 具有良好的结合亲和力。体外实验证明, 中、高浓度左归丸可显著提升细胞活力, 降低 HT22 细胞  $A\beta_{1-42}$  水平 ( $P < 0.05$ ), 提高 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白的表达水平 ( $P < 0.05$ )。**结论** 左归丸含有 22 种有效成分, 其可能通过调节 PI3K/AKT 通路, 减少  $A\beta_{1-42}$  的产生, 进而改善 AD。

**关键词:** 左归丸; UPLC-MS/MS; 网络药理; 分子对接; 阿尔茨海默病

**中图分类号:** R286

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-2981(2025)08-2157-08

**doi:** 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.003

## Mechanism of Zuogui pills in Alzheimer's disease based on UPLC-MS/MS, network pharmacology, molecular docking and in vitro experiments

WANG Yan<sup>1, 2</sup>, TANG Liang<sup>2</sup>, LIU Yao<sup>2</sup>, FENG Xing<sup>1\*</sup> (1. School of Medicine, Hunan Normal University, Changsha 410081; 2. School of Basic Medicine, Changsha Medical University, Changsha 410219)

**Abstract: Objective** To determine the pharmacodynamic substances and mechanism of Zuogui pills (ZGP) in Alzheimer's disease (AD) based on UPLC-MS/MS and network pharmacology. **Methods** UPLC-MS/MS was used to identify the chemical compounds in ZGP. Network pharmacology was used to analyze the active ingredients, targets and signal pathways of ZGP. Molecular docking was used to analyze the binding of ZGP's active ingredients and AD related targets. MTT was used to determine the effect of ZGP on the proliferation of HT22 cells, ELISA to detect the expression level of  $A\beta_{1-42}$  in AD cell models and Western blot to detect the expression levels of p-PI3K and p-AKT proteins. **Results** Totally 501 compounds were identified with UPLC-MS/MS, 22 active ingredients were identified via HERB and SwissADME databases. Totally 123 common targets were identified by intersecting with AD-related targets, and 8 core targets were obtained from the PPI network. The

**基金项目:** 湖南省卫健委科研计划课题重点指导项目 (No. C202303078708); 湖南省教育厅科学研究项目重点项目 (No. 22A0025); 长沙市自然科学基金 (No. kq2208175); 湖南省教育厅科研项目 (优秀青年) (No. 23B0875)。

**作者简介:** 王燕, 女, 在读硕士研究生, 主要从事神经退行性疾病机制与中药干预研究, email: yanwang871214@163.com \*通信作者: 冯星, 男, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事天然产物的药理学研究, email: fengxing@hunnu.edu.cn



GO enrichment analysis showed that these targets were mainly associated with exogenous stimuli, positive regulation of gene expression, and response to hypoxia. KEGG pathway analysis showed that these targets were also associated with the cancer pathway, neurodegenerative-multiple disease pathway, Alzheimer's disease pathway, and PI3K/AKT signaling pathway. Molecular docking revealed that active ingredients of ZGP had good binding affinity to PIK3CA, EGFR, MMP9, MTOR, TNF, MAP2K1 and BRAF. In vitro experiments demonstrated that medium and high concentrations of ZGP significantly enhanced the cell viability, reduced  $A\beta_{1-42}$  clustering in HT22 cells ( $P < 0.05$ ), and elevated the expression levels of p-PI3K and p-AKT proteins ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** ZGP contains 22 active ingredients, which may reduce the production of  $A\beta_{1-42}$  by regulating the PI3K/AKT pathway, and improve AD symptoms.

**Key words:** Zuogui pill; UPLC-MS/MS; network pharmacology; molecular docking; Alzheimer's disease

阿尔茨海默病 (AD) 是一种复杂、难治的神经退行性疾病, 其主要特征为进行性的记忆、认知功能损伤<sup>[1-2]</sup>。调查显示, 全球 65 岁以上人群 AD 发病率高达 1%, 预计 2050 年 AD 患者将增加 3 倍<sup>[3]</sup>。AD 具体病因及发病机制不详, 目前主要采用药物治疗, 如盐酸多奈哌齐<sup>[4]</sup>、美金刚烷<sup>[5]</sup>, 在一定程度上可以增强胆碱能的神经功能, 改善认知障碍, 延缓病情进展, 但尚无法治愈。中医认为 AD 属于“呆症”“痴呆”范畴, 与患者的肾虚髓亏、气虚血瘀、脑失濡养等病机有关<sup>[6]</sup>。AD 多发生于老年人, 由气虚和肾虚所致, 结合“肾脑相通”中医理论, 补肾治疗 AD 存在合理性<sup>[7]</sup>。

左归丸 (ZGP) 由熟地黄、山茱萸、山药、鹿角胶、龟甲胶、枸杞、菟丝子、牛膝组成, 是明代医家张敬月所创的补肾名方<sup>[8]</sup>。临床研究发现, AD 患者行穴位电针疗法配合左归丸治疗后, 能显著提高患者的认知功能, 生活自理能力和生活质量<sup>[9]</sup>。研究发现, 使用左归丸和多奈哌齐 (donepezil) 治疗老年 AD 患者的疗效无显著差别<sup>[10]</sup>。体外实验证明, 左归丸含药血清可促进体外培养的神经细胞生长和分化<sup>[11-12]</sup>, 提高缺血神经元的存活率<sup>[13]</sup>。左归丸具有滋阴补肾、填精益髓之效, 切合 AD 肾精不足、脑髓失养、神机失用的关键病机, 但其深入机制尚不清楚。因此, 探索左归丸治疗 AD 的作用机制具有重要意义。

左归丸有效成分复杂, 作用靶点众多, 但其治疗 AD 的有效成分及作用机制尚不清楚。因此, 本研究应用 UPLC-MS/MS、网络药理学、分子对接及体外实验探究左归丸治疗 AD 的潜在作用及机制, 以期为其临床应用提供依据。

## 1 材料

### 1.1 细胞

小鼠海马神经元 HT22 (货号: BNCC337709,

北京北纳创联生物技术研究院)。

### 1.2 试剂

左归丸 (北京同仁堂药店, 规格: 9 g/袋, 批号: J776960)。小鼠  $A\beta_{1-42}$  酶联免疫吸附 (ELISA) 试剂盒 (北京冬歌生物科技有限公司)。抗 PI3K 抗体 (上海信裕生物科技有限公司); 抗 p-PI3K 抗体 (上海联迈生物工程有限公司); 抗 Protein Kinase B (AKT) 抗体 (深圳欣博盛生物科技有限公司); 抗 p-AKT 抗体 (广州东锐科技有限公司); 抗 GAPDH 抗体 (ab245357, Abcam); 二抗 Goat Anti-Mouse IgG 抗体 (bs-0296G-HRP, 北京博奥森生物技术有限公司); SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、RIPA 总蛋白裂解液、BCA 蛋白质浓度测定试剂盒和 ECL 化学发光检测试剂盒 (艾斯本技术有限公司)。

### 1.3 仪器

Thermo-Obritrapp-QE 高分辨液质联用质谱仪 (Thermo), F-060SD 超声波清洗机 (深圳福洋科技集团有限公司); DYY-6C 电泳仪、DYCZ-400D 转移电泳仪槽、DYCZ-24DN 垂直电泳槽 (北京市六一仪器厂); 酶标仪 (Cmax plus, Molecular 公司)。

## 2 方法

### 2.1 UPLC-MS/MS

**2.1.1 左归丸溶液的制备** 取 1 g 左归丸, 研细后加 10 mL ddH<sub>2</sub>O, 制成 100 mg · mL<sup>-1</sup> 的溶液。4 °C 下静置 30 min 后, 再离心 10 min (12 000 r · min<sup>-1</sup>, 4 °C)。取上清液过 0.22 μm 的水相滤膜, 4 °C 保存备用。

**2.1.2 UPLC-MS/MS 检测条件** 采用 ACQUITY UPLC I-Class plus (Waters) 和 Thermo-Obritrapp-QE 检测。色谱条件: 以 ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) 为色谱柱; 柱温: 45 °C; 流动相 A 为水 (含 0.1% 甲酸), B 为乙腈; 流速: 0.35 mL · min<sup>-1</sup>; 进样体积: 5 μL。PDA 扫描范围: 210 ~ 400 nm; 质谱条件: 离子源为 HESI。质谱

信号采集分别采用正负离子扫描模式。数据采集模式采用 DDA 扫描方式 (Full MS/dd-MS<sup>2</sup>)。原始数据采用 Progenesis QI v3.0 软件 (Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK) 进行归一化处理。基于精确质量数、二级碎片以及同位素分布,使用 Traditional Chinese Medicines (TCM) 数据库 (<http://tcm.life-science.ntu.edu.tw/>) 对化合物进行定性鉴定。

## 2.2 网络药理学分析

**2.2.1 左归丸活性成分与作用靶点的预测** 根据左归丸中药材成分的名称,在 HERB 数据库 (<http://herb.ac.cn/>) 中检索成分及其 smiles、inchikey 等信息。在 SwissADME 网站 (<http://www.swissadme.ch/>) 上预测成分药理性性质。通过 SwissTargetPrediction 网站 (<http://swisstargetprediction.ch/>) 对有效活性成分靶点进行预测。采用 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 校正药物成分靶点基因名称,标准化蛋白质靶点信息。

**2.2.2 AD 相关靶点的筛选** 在 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、Therapeutic Target Database (TTD) (<https://db.idrblab.net/ttd/>)、Drugbank (<https://go.drugbank.com/>) 平台中以 “Alzheimer’s disease” 为关键词检索 AD 相关蛋白。将 3 个数据库得到的靶点整合取交集。

**2.2.3 左归丸抗 AD 潜在作用靶点** 将筛选得到的左归丸活性成分靶点与 AD 靶点取交集,并通过 Venn 在线工具绘制韦恩图。采用 STRING 平台 (<https://string-db.org/>) 构建蛋白质-蛋白质互作 (PPI) 网络模型。生物种类选择 “Homo sapiens”, 最小相互作用阈值设为 “medium confidence = 0.4”。将 PPI 网络图导入 Cytoscape 3.6.1 软件,使用 4 种拓扑分析算法: 度值 (Degree)、边缘渗透分量 (EPC)、最大邻域分量 (MNC) 和最大集团中心性 (MCC) 分析 PPI 网络图中的核心靶点。只有在 4 种算法中均出现的靶点才被识别为核心靶点。

**2.2.4 GO 功能和 KEGG 通路富集分析** 采用 DAVID 6.8 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对交集靶点进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析,筛选 false discovery rate (FDR) (Q 值) < 0.05 的前 15 名生物过程 (BP)、分子功能 (MF)、细胞组分 (CC) 和 KEGG 通路。

**2.2.5 “左归丸活性成分-AD 相关靶点-通路” 网络分析** 使用 KEGG 富集到的前 25 个通路用于网络分析。采用 Python 库中的 matplotlib 可视化工具构建左归丸活性成分-AD 相关靶点-通路网络图。

**2.2.6 分子对接** 筛选 “左归丸活性成分-AD 相关靶点-通路” 网络中 Degree 排名前 10 的活性成分与靶点作为受体和配体进行对接。通过

PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 得到左归丸有效成分的 2D 结构,并利用 ChemOffice 软件转化成 3D 结构。通过 PDB database (<https://www.rcsb.org/>) 下载 AD 靶点蛋白结构文件。通过 Auto Dock 进行分子对接。采用 PyMOL 进行 3D 可视化作图。

## 2.3 体外实验验证

### 2.3.1 MTT 法测定左归丸对 HT22 细胞增殖的影响

将 HT22 细胞在 100  $\mu$ L 培养基中以  $1 \times 10^4$  个细胞/孔的密度接种于 96 孔培养板中。孵育 48 h 后,对照组添加完全培养基。AD 组、Donepezil 组和给药组加入  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的  $A\beta_{25-35}$  100  $\mu$ L 干预 24 h 后,AD 组添加完全培养基,Donepezil 组加入含  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Donepezil 的完全培养基,给药组加入含左归丸的完全培养基,使其终质量浓度为 200 (ZGP-L)、400 (ZGP-M)、800 (ZGP-H)  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,每孔 200  $\mu$ L。干预 48 h 后,每孔加入 100  $\mu$ L 提前放至室温的 MTT 溶液,放入细胞培养箱孵育 4 h,孵育完毕加入 150  $\mu$ L 二甲基亚砜 (DMSO) 溶液,检测 490 nm 波长处的 OD 值,并计算细胞存活率。

**2.3.2 ELISA 法测定左归丸对 HT22 细胞  $A\beta_{1-42}$  表达的影响** 取细胞培养物,1000 g 离心 20 min,上清液用于后续检测。检测步骤按照 ELISA 试剂盒说明书进行,采用酶标仪测定 450 nm 处吸光度值。

**2.3.3 蛋白印迹法测定左归丸对 HT22 细胞 p-PI3K、PI3K、p-AKT 和 AKT 表达的影响** 收集各组细胞,用冰溶缓冲液提取总蛋白 1 h,4  $^{\circ}\text{C}$  13 000 g 离心 30 min。随后,收集上清液,用 BCA 法测定蛋白质浓度。等量的蛋白提取物通过 SDS-PAGE 分离,然后转移到 PVDF 膜上。用 5% 脱脂牛奶阻断后,分别用抗 p-PI3K 抗体 (1:500)、抗 PI3K 抗体 (1:500)、抗 p-AKT 抗体 (1:800) 和抗 AKT 抗体 (1:800) 的一抗在 4  $^{\circ}\text{C}$  下孵育过夜。用 PBS-Tween-20 洗涤 5 次,每次 5 min,与相应的二抗 (1:6000) 在室温下孵育 1 h,显影并固定印迹。使用 Image J 软件扫描膜,计算各蛋白带的灰度值。p-PI3K、PI3K、p-AKT 和 AKT 的相对蛋白表达量与内参 GAPDH 的相对蛋白表达量进行归一化处理。

## 2.4 统计分析

所有数据采用 GraphPad Prism 5 软件进行分析,计量结果以平均值  $\pm$  标准差表示。两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 化学成分鉴定

正、负模式下总离子流图如图 1 所示,通过质谱信息进行对比分析,利用 TCM 数据库进行结构鉴定,共得到 501 种化合物。利用 HERB、

SwissADME 等数据库及相关文献比对,鉴定出 22 种有效化学成分(见表 1)。

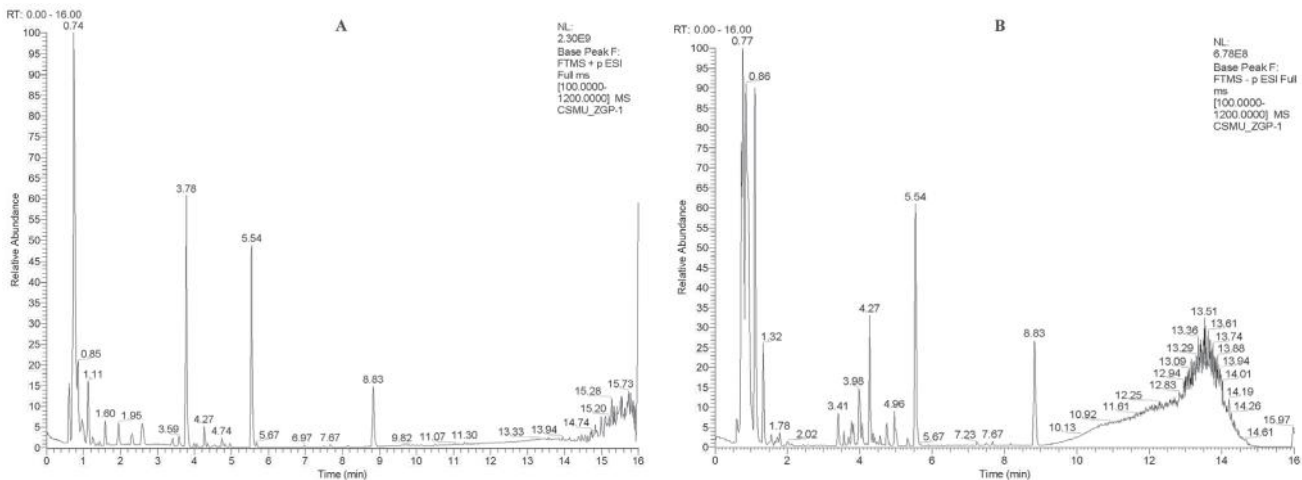


图 1 左归丸的化学成分鉴定的总离子流图

Fig 1 Total ion flow diagram of ZGP chemical component

A. 正离子模式 (positive ion mode); B. 负离子模式 (negative ion modes)

表 1 左归丸中 22 种活性成分的信息  
Tab 1 Information of 22 active ingredients in ZGP

| 成分编号 | 中文名                        | 英文名                      | 化学式                  | 加合物                      | 理论 $m/z$ | 实验 $m/z$ | 保留时间 /min | 离子模式 |
|------|----------------------------|--------------------------|----------------------|--------------------------|----------|----------|-----------|------|
| M1   | L-酪氨酸                      | L-tyrosine               | $C_9H_{11}NO_3$      | [M-H]                    | 180.0666 | 180.0669 | 1.20      | NEG  |
| M2   | N-乙酰亮氨酸                    | N-acetylucine            | $C_8H_{15}NO_3$      | [M-H]                    | 172.0979 | 172.0983 | 4.71      | NEG  |
| M3   | N-乙酰色氨酸                    | N-acetyltryptophan       | $C_{13}H_{14}N_2O_3$ | [M + H]                  | 247.1077 | 247.1078 | 5.05      | POS  |
| M4   | 芥子酰酰胺                      | N-trans-sinapoyltyramine | $C_{19}H_{21}NO_5$   | [M-H]                    | 342.1347 | 342.1352 | 5.95      | NEG  |
| M5   | 山药素 IV                     | batatasin IV             | $C_{15}H_{16}O_3$    | [M + H]                  | 245.1172 | 245.1172 | 8.07      | POS  |
| M6   | 壬二酸                        | azelaic acid             | $C_9H_{16}O_4$       | [M-H]                    | 187.0976 | 187.0979 | 5.32      | NEG  |
| M7   | 亮菌甲素                       | armillarisin A           | $C_{12}H_{10}O_5$    | [M + FA-H]               | 279.0511 | 279.0507 | 5.28      | NEG  |
| M8   | 二苯甲酰基甲烷                    | dibenzoylmethane         | $C_{15}H_{12}O_2$    | [M + H]                  | 225.0910 | 225.0910 | 11.07     | POS  |
| M9   | 二氢猕猴桃内酯                    | dihydroactinidiolide     | $C_{11}H_{16}O_2$    | [M + H]                  | 181.1223 | 181.1223 | 8.07      | POS  |
| M10  | L-精氨酸                      | L-arginine               | $C_6H_{14}N_4O_2$    | [M + H]                  | 175.1190 | 175.1191 | 0.67      | POS  |
| M11  | $\alpha$ -熊果苷              | alpha-arbutin            | $C_{12}H_{16}O_7$    | [M + FA-H]               | 317.0877 | 317.0884 | 1.39      | NEG  |
| M12  | 酒渣碱                        | flazin                   | $C_{17}H_{12}N_2O_4$ | [M + H]                  | 309.0870 | 309.0870 | 6.28      | POS  |
| M13  | L-亮氨酸                      | L-leucine                | $C_6H_{13}NO_2$      | [M + H]                  | 132.1019 | 132.1022 | 1.45      | POS  |
| M14  | 磷酸异丙酯                      | dihydroferulic acid      | $C_{10}H_{12}O_4$    | [M + H]                  | 197.0808 | 197.0809 | 4.95      | POS  |
| M15  | 苯酚葡萄糖苷                     | phenol glucuronide       | $C_{12}H_{14}O_7$    | [M + FA-H]               | 315.0721 | 315.0727 | 3.88      | NEG  |
| M16  | 邻苯二甲酸                      | phthalic acid            | $C_8H_6O_4$          | [M-H]                    | 165.0193 | 165.0197 | 4.27      | NEG  |
| M17  | 5-羟甲基糠醛                    | 5-hydroxymethylfurfural  | $C_6H_6O_3$          | [M + H]                  | 127.0390 | 127.0392 | 2.59      | POS  |
| M18  | 松脂醇-4-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷 | pinoresinol              | $C_{20}H_{22}O_6$    | [M + H-H <sub>2</sub> O] | 341.1383 | 341.1383 | 6.42      | POS  |
| M19  | 罗汉松甾酮 B                    | podecdysone B            | $C_{27}H_{42}O_6$    | [M + FA-H]               | 507.2963 | 507.2969 | 5.36      | NEG  |
| M20  | L-苯丙氨酸                     | L-phenylalanine          | $C_9H_{11}NO_2$      | [M + H]                  | 166.0863 | 166.0864 | 2.31      | POS  |
| M21  | 原儿茶酸                       | protocatechuic acid      | $C_7H_6O_4$          | [M-H]                    | 153.0193 | 153.0196 | 3.41      | NEG  |
| M22  | L-谷氨酸                      | L-glutamic acid          | $C_5H_9NO_4$         | [M + H]                  | 148.0604 | 148.0605 | 0.72      | POS  |

注 (Note): NEG. 负离子模式 (negative ion mode); POS. 正离子模式 (positive ion mode)。

3.2 左归丸活性成分的筛选及药效靶点的预测

通过 SwissTargetPrediction 网站对左归丸中 22 种有效活性成分靶点进行预测,合并去除重复靶点,共得到 255 个作用靶点。在 GeneCards 数据库共有 AD 相关靶点 14 316 个,其最大 Score 值为

200, 最小值为 0.16, 中位数 2.87, 故筛选 Score 值大于 2.87 的靶点作为潜在靶点。结合 TTD 数据库、Drugbank 数据库,共得到 AD 相关靶点 2949 个。通过 Venny 图取交集,得到 123 个交集靶点。

3.3 左归丸治疗 AD 相关靶点 PPI 网络



在 STRING 中录入上述 123 个共同靶点, 得到 PPI 关系网络, 共涉及 123 个节点, 3471 条边。其中肿瘤坏死因子 (TNF)、前列腺素内过氧化物合成酶 2 (PTGS2)、Caspase 3 (CASP3)、表皮生长因子受体 (EGFR)、缺氧诱导因子 1 $\alpha$  (HIF1A)、热休克蛋白 90  $\alpha$  家族 A 类成员 (HSP90AA1)、基质

金属蛋白酶 9 (MMP9) 和雌激素受体 1 (ESR1) 为核心靶点, 在整个蛋白网络中发挥重要作用 (见图 2)。其中 TNF、PTGS2、CASP3、EGFR、HIF1A、HSP90AA1、MMP9 和 ESR1 在 4 种算法中均出现, 被认定为核心靶点。

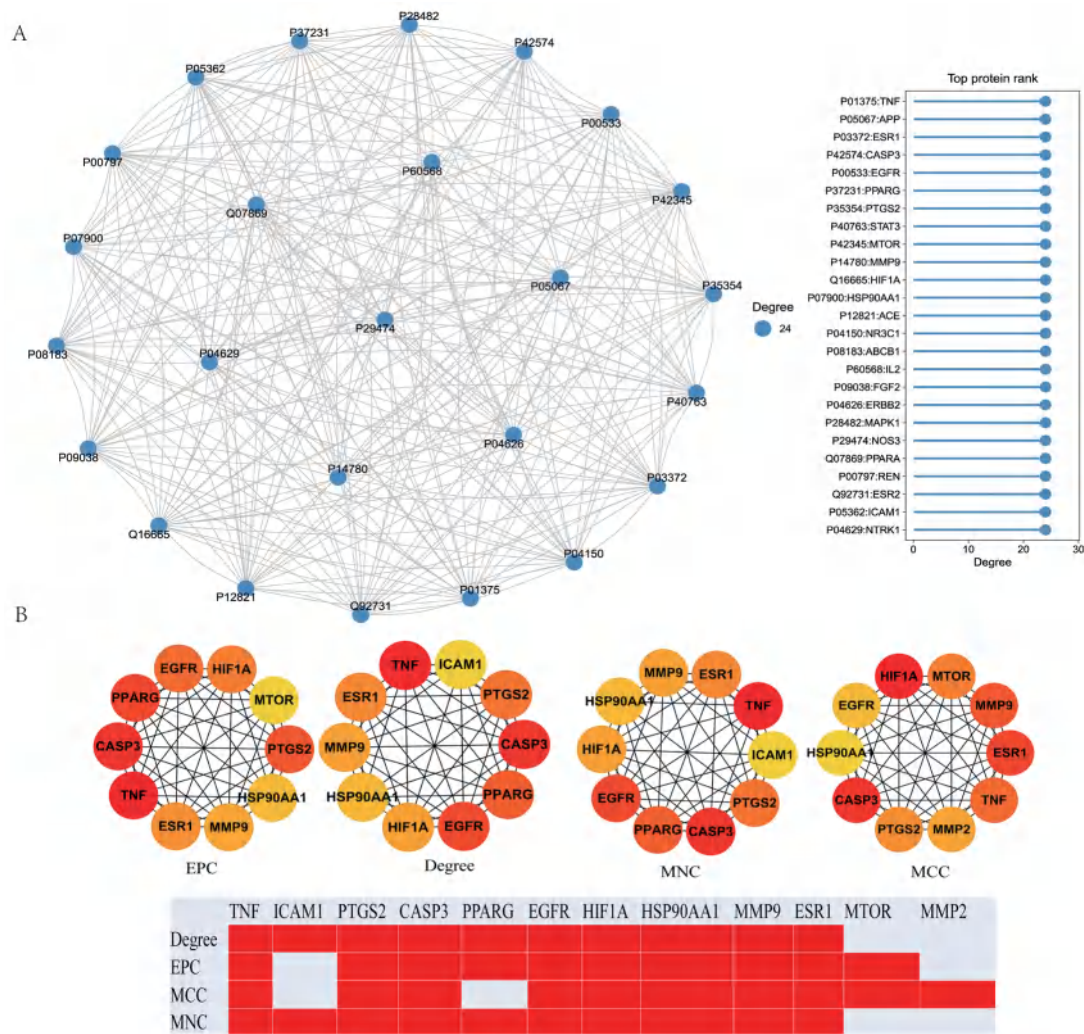


图 2 左归丸治疗 AD 相关靶点 PPI 网络 (A) 与核心靶点筛选 (B)

Fig 2 PPI network of AD related targets (A) and selection of hub targets (B) treated by ZGP

### 3.4 左归丸治疗 AD 相关靶点 GO 富集分析和 KEGG 通路分析

对左归丸治疗 AD 相关靶点 PPI 网络所涉及的 123 个蛋白质进行 GO 富集分析, 以基因数目和  $P < 0.05$  为筛选条件, 得到富集基因数量较多的生物过程和代谢通路。GO 富集分析中确定了 2865 个 GO 条目。将 BP、MF 和 CC 中排名前 5 的条目绘制成图 (见图 3A)。KEGG 通路富集分析共筛选出 253 条与 AD 相关通路。筛选出  $P$  值最小的前 20 条信号通路绘制成图 (见图 3B)。

### 3.5 “左归丸活性成分-AD 相关靶点-通路”网络通过左归丸活性成分-AD 相关靶点-通路图

显示, 网络图中 25 条通路对应 22 种活性成分, 共有 467 条边 (见图 4)。

### 3.6 分子对接

采用左归丸活性成分-AD 相关靶点-通路中前 10 个成分和靶点进行分子对接。配体与受体结合能越低, 结合的构象越稳定。结合能小于  $-6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  的表明受体与配体间有较好的亲和力。结果发现, 10 种活性成分与 10 个蛋白靶点均有良好的结合能力 (见表 2)。用 PyMOL 软件对结合能最低的成分与靶点对接结果进行可视化, 各组对接中自由能最低, 且小于  $-6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  的可视化结果见图 5。

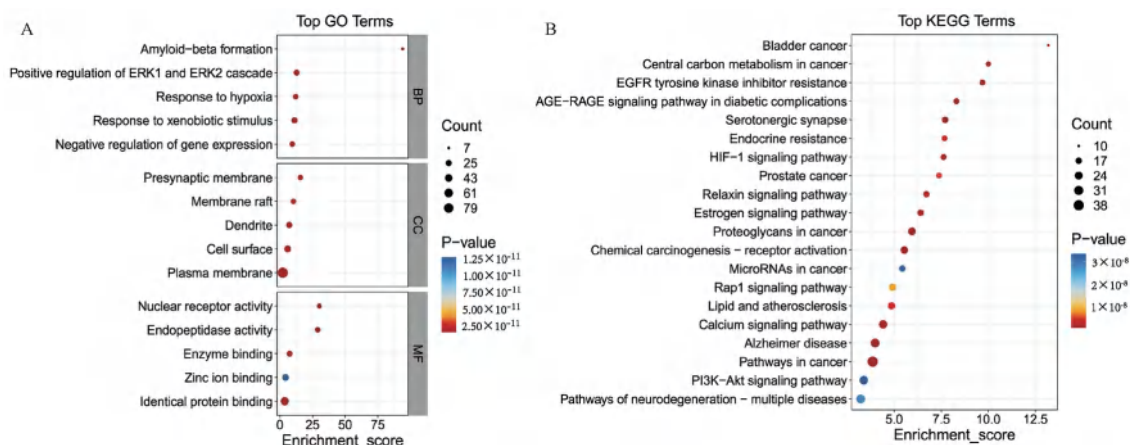


图3 左归丸治疗AD相关靶点GO功能(A)和KEGG通路富集分析(B)

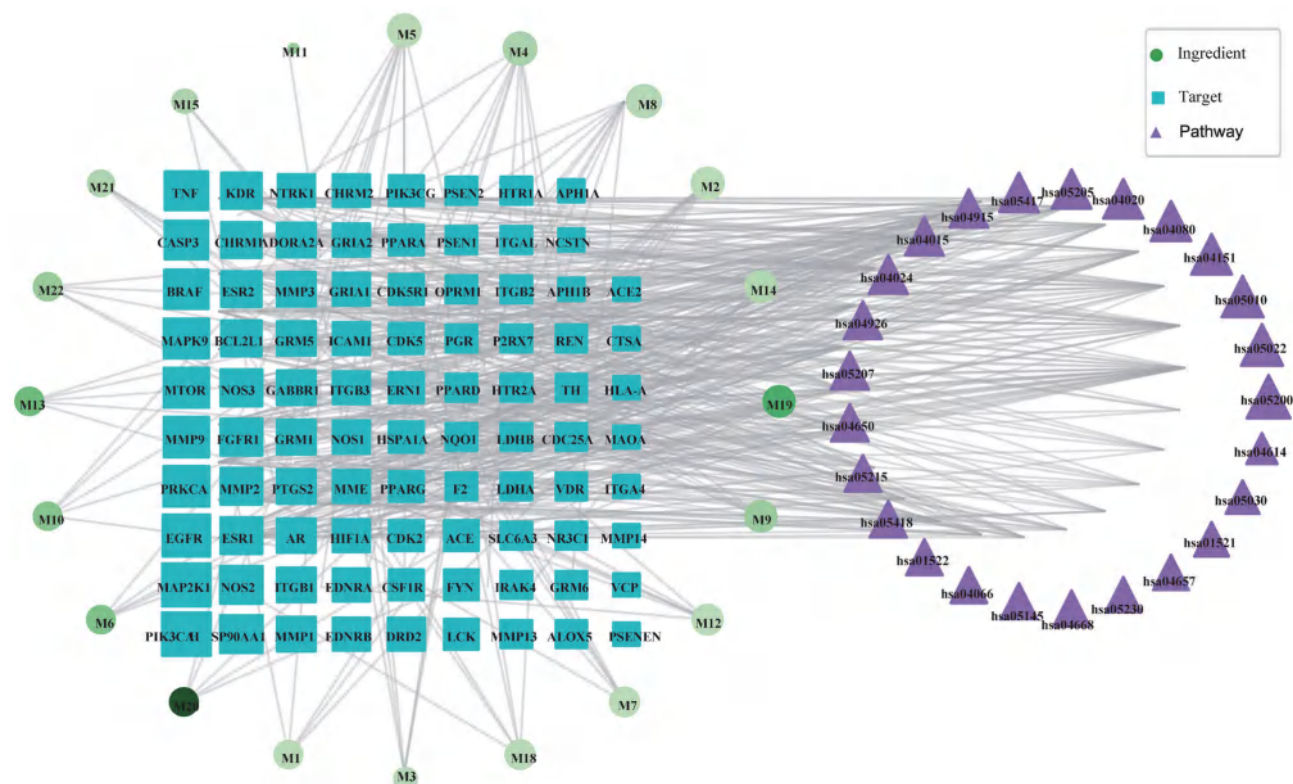


图4 左归丸活性成分-AD 相关靶点-通路网络

表 2 左归丸有效成分与 AD 相关靶点的结合能 ( $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ )

| 关键成分                | PIK3CA | MAP2K  | EGFR   | PRKCA  | MMP9   | MTOR   | MAPK9  | BRAF   | CASP3  | TNF    |
|---------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 亮菌甲素                | - 5.58 | - 4.74 | - 5.35 | - 5.12 | - 4.6  | - 5.54 | - 5.8  | - 5.37 | - 4.12 | - 6.24 |
| 山药素Ⅳ                | - 5.56 | - 6.1  | - 5.34 | - 4.09 | - 4.18 | - 4.73 | - 5.64 | - 6.24 | - 4.06 | - 6.28 |
| 二苯甲酰基甲烷             | - 6.39 | - 5.78 | - 7.07 | - 5.91 | - 7.11 | - 6.01 | - 5.53 | - 6.29 | - 4.61 | - 6.64 |
| 二氢猕猴桃内酯             | - 6.29 | - 5.45 | - 6.25 | - 5.34 | - 5.8  | - 5.65 | - 5.08 | - 5.45 | - 4.7  | - 6.41 |
| 磷酸异丙酯               | - 4.25 | - 3.36 | - 6.44 | - 3.32 | - 3.29 | - 3.38 | - 4.55 | - 5.81 | - 3.7  | - 4.53 |
| 酒渣碱                 | - 6.33 | - 5.95 | - 4.91 | - 5.86 | - 6.96 | - 5.67 | - 5.84 | - 4.56 | - 4.3  | - 6.07 |
| N- 乙酰亮氨酸            | - 3.3  | - 3.45 | - 5.3  | - 3.89 | - 3.38 | - 4.06 | - 3.4  | - 4.79 | - 3.18 | - 3.52 |
| 芥子酰酰胺               | - 5.15 | - 4.99 | - 5.6  | - 3.69 | - 5.67 | - 4.76 | - 2.37 | - 5.88 | - 3.63 | - 4.27 |
| 松脂醇-4-O-β-D- 吡喃葡萄糖苷 | - 5.09 | - 5.58 | - 6.9  | - 4.68 | - 6.32 | - 4.86 | - 5.73 | - 6.5  | - 5.04 | - 4.83 |
| 罗汉松甾酮 B             | - 2.98 | - 3.76 | - 4.65 | - 4.75 | - 4.27 | - 4.37 | - 5.48 | - 3.93 | - 3.3  | - 4.62 |

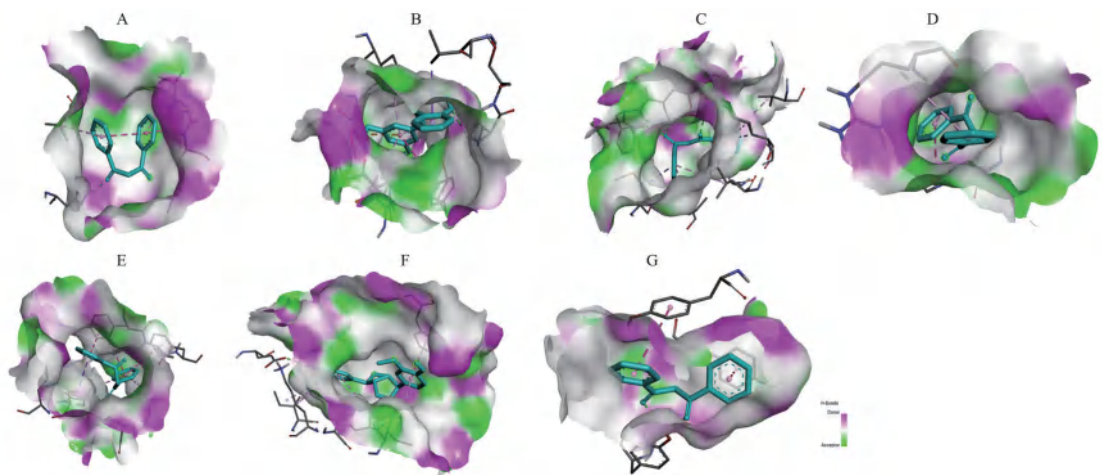


图 5 左归丸活性成分与 AD 相关靶点的分子对接结果 (自由能最低, 自由能小于  $-6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ )

Fig 5 Molecular docking results of ZGP active components and AD related targets ( With the lowest bonding energy; less than  $-6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ )

A. 二苯甲酰甲烷-PIK3CA (dibenzoylemethane-PIK3CA); B. 山药素 IV -MAP2K1 ( batatasin IV -MAP2K1); C. 二苯甲酰甲烷-EGFR (dibenzoylemethane-EGFR); D. 二苯甲酰甲烷-MMP9 (dibenzoylemethane-MMP9); E. 二苯甲酰甲烷-mTOR (dibenzoylemethane-mTOR); F. 松脂醇-4-*O*- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷-BRAF (pinoreisinol-BRAF); G. 二苯甲酰甲烷-TNF (dibenzoylemethane-TNF)

### 3.7 体外实验验证

如图 6A 所示, AD 组的细胞活力显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ), Donepezil 和中、高浓度的左归丸可显著提高 HT22 细胞活力 ( $P < 0.05$ )。以上结果提示, 左归丸可促进 HT22 细胞增殖。ELISA 法检测结果显示, AD 组的  $A\beta_{1-42}$  含量显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), Donepezil、中、高浓度的左归丸可显著降低  $A\beta_{1-42}$  含

量 ( $P < 0.05$ ) (见图 6B), 提示左归丸可抑制  $A\beta_{1-42}$  的生成。AD 组的 p-PI3K 和 p-AKT 表达水平显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ), Donepezil 和中、高浓度的左归丸可显著提高 p-PI3K 和 p-AKT 表达水平 ( $P < 0.05$ ) (见图 7A ~ 7C)。以上结果提示, 左归丸可能通过调控 PI3K/AKT 磷酸化水平抑制  $A\beta_{1-42}$  的生成。

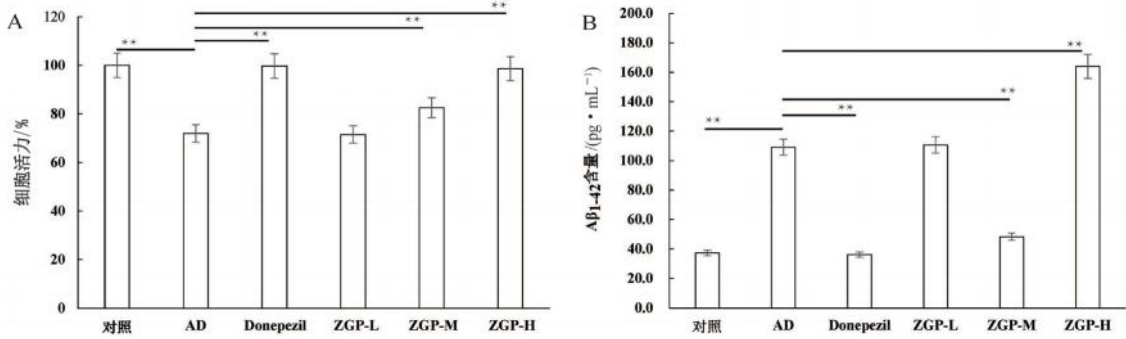


图 6 左归丸干预对 HT22 细胞活力及  $A\beta_{1-42}$  表达的影响 (\*\* $P < 0.05$ )

Fig 6 Effect of the cell viability and the expression level of  $A\beta_{1-42}$  after ZGP intervention in HT22 cells (\*\* $P < 0.05$ )

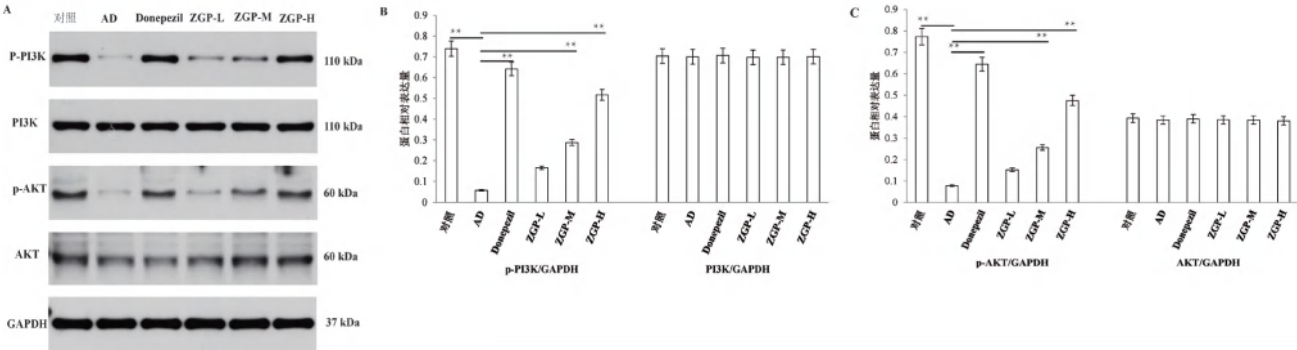


图 7 p-PI3K、PI3K、p-AKT 和 AKT 蛋白印迹结果 (\*\* $P < 0.05$ )

Fig 7 Western blot of p-PI3K, PI3K, p-AKT and AKT proteins (\*\* $P < 0.05$ )



#### 4 讨论

本实验首次使用 UPLC-MS/MS 技术对左归丸化学成分进行初步分析鉴定。通过部分对照品对比、二级质谱碎片信息及参考文献对比, 鉴定和推测了 22 种有效化学成分。通过网络药理学方法预测了其 AD 相关的 8 个核心靶点。

二苯甲酰基甲烷是甘草中的次要成分, 可引起 Keap1 解离和 Nrf2 的核易位<sup>[14]</sup>; 可有效抑制脂多糖诱导的一氧化氮合酶和环氧合酶 2 的产生, 调节 Bcl2、Bax 和 cleaved-Caspase-3 蛋白表达, 继而抑制肥胖诱导的炎症/氧化反应和炎症诱导的神经元细胞凋亡<sup>[15]</sup>; 可通过抑制小胶质细胞活化, 抑制神经元死亡<sup>[16]</sup>。上述结果提示, 左归丸中的二苯甲酰基甲烷可能通过抑制炎症和神经元凋亡, 改善 AD 症状。

研究发现 AD 患者脑中 PI3K/AKT 信号通路表达受抑制, 通过激活该信号通路, 继而调控凋亡、氧化应激、控制炎症反应、保护神经元, 发挥抗 AD 作用<sup>[17]</sup>。此外, PI3K/AKT 信号通路的激活可以保护神经元免受 A $\beta$  诱导的神经毒性作用<sup>[18]</sup>, 抑制 AKT 的磷酸化可以加重 AD 患者认知及记忆损伤<sup>[19]</sup>。与之相反, 上调 AKT 表达能显著抑制 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 引起的 Bax 表达上调, 改善 Tau 蛋白过度磷酸化<sup>[20]</sup>, 从而抑制凋亡。分子对接结果提示, 左归丸可能通过结合 PIK3CA 发挥抗 AD 的作用。体外实验也表明, 左归丸可有效提升磷酸化 PI3K 和 AKT 表达水平。上述结果提示, 左归丸可能通过调控 PI3K/AKT 磷酸化水平, 参与 A $\beta$  的生成调节, 继而影响 AD 的发生发展。

综上所述, 本文基于 UPLC-MS/MS 技术, 网络药理学、分子对接和体外细胞实验, 以左归丸为研究对象, 探讨了其治疗 AD 的作用机制。结果表明左归丸可能通过 PI3K/AKT 通路抑制 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 的生成, 保护神经元, 改善 AD 症状。

#### 参考文献

- [1] Ogbodo JO, Agbo CP, Njoku UO, et al. Alzheimer's disease: pathogenesis and therapeutic interventions [J]. *Curr Aging Sci*, 2022, 15 (1): 2-25.
- [2] Atri A. The Alzheimer's disease clinical spectrum: diagnosis and management [J]. *Med Clin North Am*, 2019, 103 (2): 263-293.
- [3] 2023 Alzheimer's disease facts and figures [J]. *Alzheimers Dement*, 2023, 19 (4): 1598-1695.
- [4] Birks JS, Harvey RJ. Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2018, 6 (6): CD001190.
- [5] Marotta G, Basagni F, Rosini M, et al. Memantine derivatives as multitarget agents in Alzheimer's disease [J]. *Molecules*, 2020, 25 (17): 4005.
- [6] 都梦帆, 胥冰, 郭东艳, 等. 基于 A $\beta$  蛋白的阿尔茨海默病的中医药治疗研究进展 [J]. *陕西中医药大学学报*, 2022, 45 (2): 146-150.
- [7] 陈靖, 刘晓丹, 许欣竹, 等. 从气机论治阿尔茨海默病 [J]. *长春中医药大学学报*, 2020, 36 (5): 841-843.
- [8] Li JY, Sun K, Qi BY, et al. An evaluation of the effects and safety of Zuogui pill for treating osteoporosis: current evidence for an ancient Chinese herbal formula [J]. *Phytother Res*, 2021, 35 (4): 1754-1767.
- [9] 倪鸣宇. 穴位电针疗法配合加味左归丸治疗老年性痴呆的临床疗效观察 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2017, 17 (47): 62-63.
- [10] 王恩龙. “加味左归丸”治疗老年性痴呆 20 例临床观察 [J]. *江苏中医药*, 2013, 45 (5): 38-39.
- [11] 刘宏, 仲丽丽, 于颖, 等. 左归丸含药血清对阿尔茨海默病细胞模型雌激素受体表达的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41 (1): 141-143.
- [12] 陈立铭, 裴磊. 脑络欣通和左归丸药物血清体外培养神经干细胞的增殖与分化 [J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20 (32): 4845-4851.
- [13] Li L, Liu Y, Zheng YW, et al. Exploring the mechanisms under Zuogui pill's treatment of ischemic stroke through network pharmacology and in vitro experimental verification [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1153478.
- [14] Kang B, Kim JH, Kim CY, et al. Dibenzoylemethane, a component of licorice, suppresses monocyte-to-macrophage differentiation and inflammatory responses in human monocytes and mouse macrophages [J]. *Biol Pharm Bull*, 2018, 41 (8): 1228-1236.
- [15] You YL, Choi HS. Dibenzoylemethane ameliorates adiposity-mediated neuroinflammatory response and inflammation-mediated neuronal cell death in mouse microglia and neuronal cells [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2023, 32 (8): 1123-1132.
- [16] Takano K, Ishida N, Kawabe K, et al. A dibenzoylemethane derivative inhibits lipopolysaccharide-induced NO production in mouse microglial cell line BV-2 [J]. *Neurochem Int*, 2018, 119: 126-131.
- [17] Kumar M, Bansal N. Implications of phosphoinositide 3-kinase-Akt (PI3K-Akt) pathway in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2022, 59 (1): 354-385.
- [18] Li HY, Kang TG, Qi B, et al. Neuroprotective effects of ginseng protein on PI3K/AKT signaling pathway in the hippocampus of D-galactose/AlCl<sub>3</sub> inducing rats model of Alzheimer's disease [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 179: 162-169.
- [19] Bagheri-Mohammadi S, Askari S, Alani B, et al. Cinnamaldehyde regulates insulin and caspase-3 signaling pathways in the sporadic Alzheimer's disease model: involvement of hippocampal function via IRS-1, Akt, and GSK-3 $\beta$  phosphorylation [J]. *J Mol Neurosci*, 2022, 72 (11): 2273-2291.
- [20] Lei L, Luo Y, Kang DK, et al. Gypenoside IX restores Akt/GSK-3 $\beta$  pathway and alleviates Alzheimer's disease-like neuropathology and cognitive deficits [J]. *Aging (Albany NY)*, 2023, 15 (23): 14172-14191.

(收稿日期: 2024-10-12; 修回日期: 2024-12-12)

# 基于网络药理学和实验验证探究杏贝止咳祛痰口服液 治疗儿童支气管炎的作用机制

杨子烨, 谭征, 刘洁, 刘润花, 杨畅, 关晶\*, 张建民\* (首都医科大学附属首都儿童医学中心, 北京 100020)

**摘要:** **目的** 运用网络药理学、分子对接以及体外细胞实验探究杏贝止咳祛痰口服液治疗儿童支气管炎的作用机制。**方法** 检索 TCMSP、BATMAN-TCM、PubChem、SwissTargetPrediction 等数据库, 获得杏贝止咳祛痰口服液活性成分、相关作用靶点以及儿童支气管炎相应疾病靶点, 并将杏贝止咳祛痰口服液作用靶点与疾病靶点的交集作为潜在作用靶点; 利用 Cytoscape 软件构建成分-疾病网络及蛋白互作网络, 分析其网络拓扑结构, 筛选关键成分及核心靶点, 并进行分子对接验证; 采用 R 语言对交集靶点进行 GO 功能及 KEGG 富集分析。最后, 基于香烟烟雾提取物 (CSE) 诱导人正常支气管上皮细胞 16-HBE 构建体外细胞模型, 采用 Western blot 技术进行相关通路靶点的验证。**结果** 杏贝止咳祛痰口服液关键成分包括光甘草定、槲皮素、山柰酚等, 主要通过调控 TNF- $\alpha$ 、STAT3、EGFR、PTGS2 等在内的核心靶点介导的 AGE-RAGE 等信号通路发挥治疗儿童支气管炎的作用。Western blot 实验结果显示, 与空白组相比, 模型组 TNF- $\alpha$ 、STAT3、MAPK3、ICAM1 和 PIK3CD 蛋白的表达显著上调 ( $P < 0.01$ ); 与模型组相比, 杏贝止咳祛痰口服液给药组对应蛋白显著下调 ( $P < 0.01$ )。**结论** 杏贝止咳祛痰口服液可通过多成分、多靶点、多途径改善儿童支气管炎临床症状, 其作用机制可能与抑制 AGE-RAGE 信号传导通路的活化有关。

**关键词:** 儿童支气管炎; 杏贝止咳祛痰口服液; 网络药理学; Western blot; AGE-RAGE 信号通路

**中图分类号:** R285, R286 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)08-2165-08  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.004

## Mechanism of Xingbei Zhike Qutan oral liquid in pediatric bronchitis based on network pharmacology and experimental verification

YANG Zi-ye, TAN Zheng, LIU Jie, LIU Run-hua, YANG Chang, GUAN Jing\*, ZHANG Jian-min\*  
(Capital Center for Children's Health, Capital Medical University, Beijing 100020)

**Abstract: Objective** To determine the mechanism of Xingbei Zhike Qutan oral liquid for pediatric bronchitis based on network pharmacology, molecular docking and experimental verification. **Methods** We searched TCMSP, BATMAN-TCM, PubChem, and SwissTargetPrediction database to collect active ingredients in Xingbei Zhike Qutan oral liquid, related action targets and corresponding disease targets of pediatric bronchitis. The intersections of action and disease targets were taken as the potential targets. Cytoscape software was used to construct the component-disease network and PPI network, analyze the network topology, screen the active components and core targets, and verify the molecular docking. The gene ontology function and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes enrichment of intersection targets were analyzed with R language. Finally, an in vitro cell model was constructed based on cigarette smoke extract (CSE) to induce human normal bronchial epithelial cells 16-HBE, and the relevant pathway targets were verified by Western blot. **Results** The active

**基金项目:** 国家重点研发计划 (No. 2022YFC3501901); 北京市卫生健康科技成果和适宜技术推广项目 (No. BHTPP2024060); 首都儿科研究所基础研究专项项目 (No. JCYJ-2023-13)。

**作者简介:** 杨子烨, 女, 硕士, 药师, 主要从事中药及其活性成分药理学研究及中药制剂开发, email: 903207161@qq.com \*通信作者: 关晶, 女, 主任药师, 主要从事中药制剂开发与临床转化研究, email: guanjing1119@126.com; 张建民, 男, 主任药师, 主要从事中药制剂临床转化及临床药学研究, email: zjm051525@126.com

ingredients of Xingbei Zhike Qutan oral liquid included glycyrrhizin, quercetin, kaempferol, etc, which mainly played their roles in the treatment of pediatric bronchitis by regulating AGE-RAGE, and other signaling pathways mediated by core targets such as TNF- $\alpha$ , STAT3, EGFR, PTGS2, etc. The Western blot showed that compared with the blank group, the expressions of TNF- $\alpha$ , STAT3, MAPK3, ICAM1 and PIK3CD in the model group were significantly up-regulated ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the corresponding proteins in Xingbei Zhike Qutan oral liquid group were significantly down-regulated ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Xingbei Zhike Qutan oral liquid works for pediatric bronchitis through multi-components, multi-targets and multi-pathways, whose mechanism may be related to inhibiting the activation of AGE-RAGE signal transduction pathway.

**Key words:** pediatric bronchitis; Xingbei Zhike Qutan oral liquid; network pharmacology; Western blot; AGE-RAGE signaling pathway

支气管炎是一种累及气管、支气管壁及周围组织的非特异性炎症,为儿童时期常见病,多发病于秋冬季。支气管炎患儿临床症状多表现为发热、咳嗽、喘憋以及多痰等,具有发病急、发病率高、反复发作的特点,严重影响了儿童生长发育<sup>[1-2]</sup>。现代医学常使用抗菌药物为主要治疗手段,但目前抗菌药物不规范使用事件频发,耐药菌日益增多<sup>[3]</sup>。同时长期依赖抗菌药物易使患儿肠道菌群失调,不利于患儿健康成长<sup>[4]</sup>。

中医药在儿童支气管炎的治疗中显示出独特的优势,可减少对抗菌药物的依赖,中药多成分多靶点的治疗特点在儿童支气管炎的预防及治疗中发挥着重要作用。杏贝止咳祛痰口服液来源于临床经验方,由桑白皮、苦杏仁、浙贝母、甘草、远志等多味中药配伍而成,具有止咳化痰的功效,适用于咳嗽、痰多以及上呼吸道感染等症状。已有临床研究证实了杏贝止咳祛痰口服液治疗儿童支气管炎疗效明显<sup>[5]</sup>。然而杏贝止咳祛痰口服液中活性成分及其治疗儿童支气管炎的作用机制尚不明确。因此,本研究运用网络药理学靶标预测、作用网络构建以及分子对接技术,并结合体外细胞实验,探究杏贝止咳祛痰口服液治疗儿童支气管炎的物质基础及潜在作用机制,为杏贝止咳祛痰口服液临床应用提供依据。

## 1 材料

### 1.1 细胞株

人正常支气管上皮细胞 16-HBE 系(ATCC 细胞库),于 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养,置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 恒温培养箱内。

### 1.2 试剂

DMEM 培养基(批号: 10569044)、胎牛血清(批号: 10091-418)、胰酶(批号: 15050057)、磷酸盐缓冲液(PBS)(批号: C10010500BT)(美国 Thermo 公

司); RIPA 裂解液(批号: P0013B)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号: P0010S)、TBST(批号: ST677)、marker(批号: P0066)、PBS(批号: C0221A)(碧云天); 香烟(红塔山); 实验用水由密理博纯水仪制备。

杏贝止咳祛痰口服液(桑白皮、苦杏仁、浙贝母、甘草、远志,加水煎煮 2 次,每次 1.5 h,合并煎液,滤过,离心,取上清液,加蔗糖与水适量,煮沸,滤过,滤液浓缩成 0.40 g·mL<sup>-1</sup> 药液,分装,灭菌,即得)。

### 1.3 仪器

酶标仪、CO<sub>2</sub> 恒温培养箱(美国 Thermo 公司); 离心机(德国 Eppendorf 公司); 分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司); 电泳仪电泳槽(上海天能科技有限公司); 水平脱色摇床、涡旋振荡器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 网络药理学

#### 2.1.1 杏贝止咳祛痰口服液活性成分及靶点的获取

杏贝止咳祛痰口服液主要包括桑白皮、苦杏仁等 5 味中药,通过中药系统药理学数据库分析平台(TCMSP),以口服生物利用度(OB)≥30% 和类药性(DL)≥0.18 两个条件筛选桑白皮、苦杏仁、浙贝母、甘草的主要作用成分;通过 BATMAN-TCM、PubChem 数据库获取远志的活性成分,筛选出具有较好口服吸收效果和较高成药性的有效活性成分。同时参考相关文献<sup>[6-12]</sup>,综合考虑化学成分在药材中的含量和生物学效能等多方面,最终得到 217 个活性成分。

通过 PubChem 数据库获取上述 217 个活性成分的 2D 结构,载入 SwissTargetPrediction 数据库获取其成分靶点,取预测得分大于 0 的靶标作为药物靶点,并统一在 Uniprot 蛋白质数据库(<https://www.uniprot.org/>)进行标准化处理,校



正并剔除重复项得到 977 个可能的作用靶点。

**2.1.2 儿童支气管炎相关靶点的获取** 以“Pediatric Bronchitis”为检索词，分别在 GeneCards (<http://www.genecards.org/>)、OMIM (<http://www.omim.org/>)、DrugBank (<https://go.drugbank.com/>) 数据库中检索，合并剔除重复项后，利用 UniProt 数据库校正，获得疾病相关靶点 802 个。利用 Venny2.1 平台 (<https://bioinfo.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 将活性成分的作用靶点与疾病靶点取交集，得到 97 个交集靶点。

**2.1.3 PPI 网络构建及拓扑分析** 将获得的交集靶点导入 STRING 平台 (<https://cn.string-db.org/>) 中，物种限定为“Homo sapiens”，最低相互作用阈值选择“medium confidence > 0.700”，获取靶点相互作用的网络关系数据，并导入 Cytoscape 3.8.2 软件。通过 CytoNCA 插件进行拓扑分析，以“degree (度值) > 3 (中位值)、betweenness (介数中心性) > 30.366 283 (中位值)、closeness (接近中心性) > 0.136 283 19 (中位值)”为参考标准，筛选获得肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、信号传导和转录激活因子 3 (STAT3)、表皮生长因子受体 (EGFR)、前列腺素内过氧化物合成酶 2 (PTGS2)、细胞间黏附分子 1 (ICAM1) 等 22 个核心靶点，具体拓扑参数见表 1。

将杏贝止咳祛痰口服液活性成分导入 Cytoscape 3.8.2 软件，绘制“杏贝止咳祛痰口服液成分-靶点-儿童支气管炎”网络图，见图 1。经分析发现，光甘草定 (glabridin)、槲皮素 (quercetin)、山柰酚 (kaempferol)、花葵素 (pelargonidin)、甘草查尔酮 A (licochalcone A)、新翼果苷 (shinpterocarpin)、4'-O-甲基光甘草定 (4'-methoxyglabridin)、kansonol F、7-羟基-1, 2, 3-三甲氧基黄原酮 (onjixanthone I)、3'-甲氧基光甘草定 (3'-methoxyglabridin) 这 10 个中药活性成分最有可能为杏贝止咳祛痰口服液干预儿童支气管炎的关键成分，相关信息见表 2。

**2.1.4 GO 富集分析和 KEGG 通路分析** 采用 R 语言对得到的潜在作用靶点进行 GO (Gene Ontology) 富集分析和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 信号通路富集分析，筛选出差异常具有统计学意义的过程和信号通路，同时对结果进行可视化处理。

GO 功能富集分析共获得 261 条生物学过程，45 条分子功能，65 条细胞组成。根据文献查阅与整理，筛选出其中 10 条相关性密切的生物学过程可视化，见图 2。GO 注释中显示杏贝止咳祛痰口

表 1 杏贝止咳祛痰口服液治疗儿童支气管炎核心靶点及拓扑参数  
Tab 1 Core target and topological parameters of Xingbei Zhike Qutan oral liquid for pediatric bronchitis

| 靶点名称          | 度值 | 介数中心性     | 接近中心性        |
|---------------|----|-----------|--------------|
| TNF- $\alpha$ | 19 | 1212.4366 | 0.158 762 89 |
| STAT3         | 17 | 292.8923  | 0.150 097 46 |
| EGFR          | 17 | 659.2256  | 0.155 241 94 |
| PTGS2         | 15 | 900.4590  | 0.156 822 82 |
| ALB           | 11 | 1687.3153 | 0.160 083 16 |
| MAPK3         | 10 | 127.3243  | 0.147 792 71 |
| HPGDS         | 10 | 360.2675  | 0.143 656 72 |
| CYP3A4        | 10 | 787.1030  | 0.148 076 92 |
| MAPK1         | 9  | 78.9888   | 0.147 227 54 |
| CYP1A2        | 9  | 236.4089  | 0.143 656 72 |
| MAPK14        | 9  | 48.4456   | 0.146 946 56 |
| MAPK8         | 8  | 56.5038   | 0.142 857 15 |
| PARP1         | 8  | 195.0913  | 0.145 009 41 |
| CYP2C19       | 8  | 216.9320  | 0.143 925 23 |
| CYP2C9        | 8  | 46.9719   | 0.142 857 15 |
| ICAM1         | 8  | 106.2530  | 0.151 574 80 |
| PGR           | 7  | 33.1416   | 0.141 025 65 |
| DPP4          | 6  | 1169.3132 | 0.148 648 65 |
| ADRB2         | 5  | 448.7416  | 0.143 389 20 |
| REN           | 5  | 280.2906  | 0.149 805 44 |
| PIK3CD        | 4  | 179.5776  | 0.141 804 78 |
| MPO           | 4  | 420.0000  | 0.146 387 83 |

表 2 杏贝止咳祛痰口服液治疗儿童支气管炎的关键成分信息  
Tab 2 Important active ingredients of Xingbei Zhike Qutan oral liquid for pediatric bronchitis

| 序号 | MOLID     | 度值 | 关键成分                 |
|----|-----------|----|----------------------|
| 1  | MOL004908 | 32 | 光甘草定                 |
| 2  | MOL000098 | 28 | 槲皮素                  |
| 3  | MOL000422 | 22 | 山柰酚                  |
| 4  | MOL001004 | 22 | 花葵素                  |
| 5  | MOL000497 | 19 | 甘草查尔酮 A              |
| 6  | MOL004891 | 19 | 新翼果苷                 |
| 7  | MOL004978 | 19 | 4'-O-甲基光甘草定          |
| 8  | MOL004988 | 19 | kansonol F           |
| 9  | MOL003370 | 18 | 7-羟基-1, 2, 3-三甲氧基黄原酮 |
| 10 | MOL004974 | 18 | 3'-甲氧基光甘草定           |

服液可调节对外源性刺激的反应 (response to xenobiotic stimulus)、 $\omega$ -羟化酶 P450 途径 (omega-hydroxylase P450 pathway)、炎症反应 (inflammatory response) 等生物学过程；可调节酶结合 (enzyme binding)、相同蛋白结合 (identical protein binding)、芳香化酶活性 (aromatase activity) 等分子功能；可作用于质膜 (plasma membrane)、突触前膜 (presynaptic membrane)、突触后膜 (postsynaptic membrane) 等细胞组分。

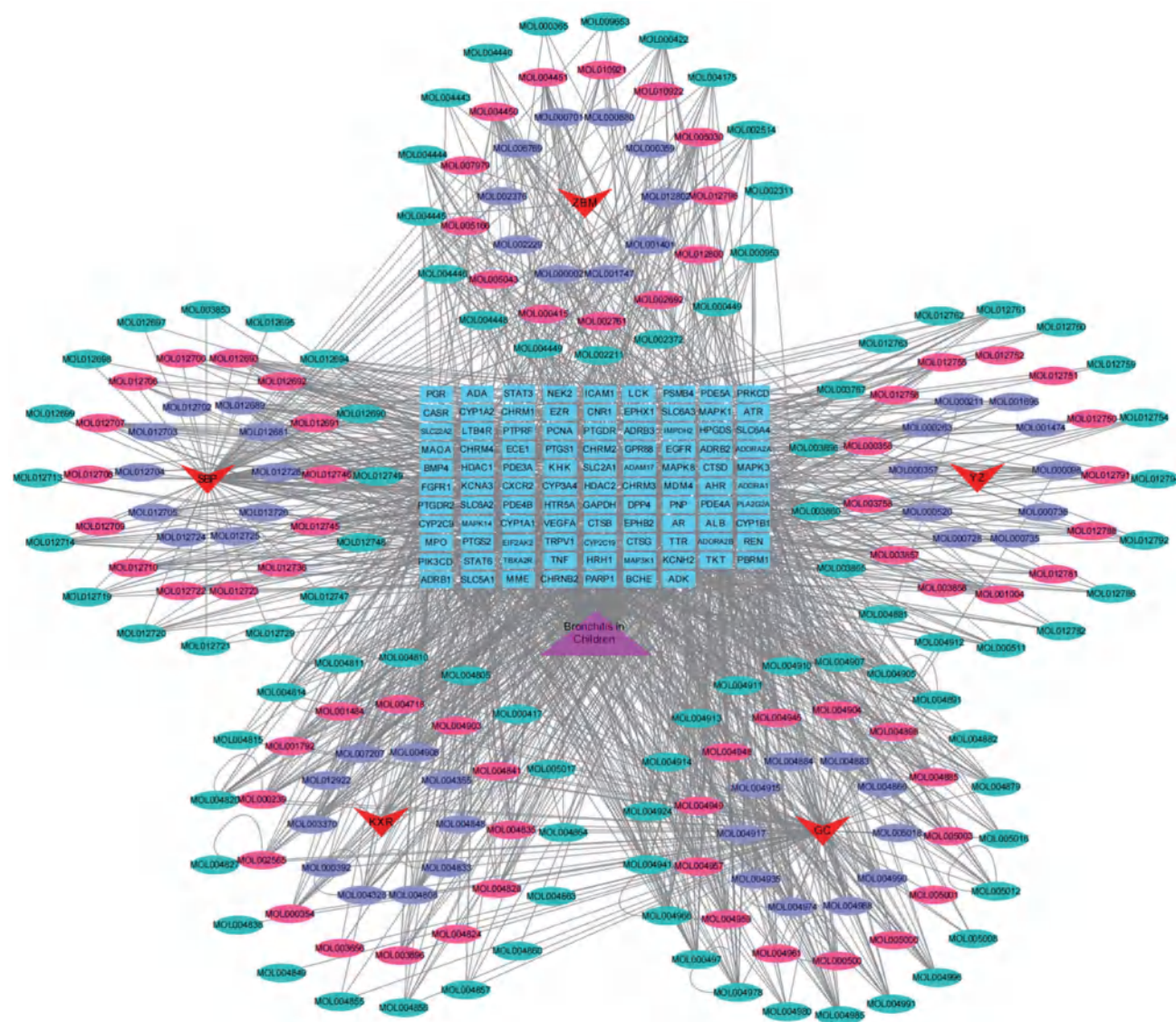


图1 “杏贝止咳祛痰口服液-成分-靶点-儿童支气管炎”网络图

Fig 1 Network of Xingbei Zhike Qutan oral liquid-active ingredient-target-pediatric bronchitis

KEGG 通路富集分析得到了 116 条通路, 涉及神经活性配体-受体相互作用通路 (neuroactive ligand-receptor interaction)、钙离子信号通路 (calcium signaling pathway)、cAMP 信号通路 (cAMP signaling pathway)、AGE-RAGE 信号通路 (AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)、TNF 信号通路 (TNF signaling pathway) 等, 见图 3。上述通路可能为杏贝止咳祛痰口服液治疗儿童支气管炎的作用途径。

## 2.2 “成分-靶点”分子对接验证

基于以上预测结果, 选取相关性较高的 AGE-RAGE 信号通路中核心靶点 TNF- $\alpha$ 、STAT3、MAPK3、ICAM1、PIK3CD 作为研究对象, 在 RCSB 蛋白数据库下载符合要求靶蛋白的 PDB 格式文件, 保存处理后的受体 PDBQT 文件。在 PubChem 网站

中查询下载 10 个关键成分 3D 结构的 SDF 文件, 保存为“mol 格式”。利用 AutoDock Tools 软件对靶点蛋白和配体进行分子对接, 获取两者对接所需的最低结合能, 结果显示光甘草定、槲皮素、山柰酚、甘草查尔酮 A 等 10 个关键成分均能够与核心靶点自发结合成稳定结构, 结合能均小于  $-21 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ , 可进一步实验验证, 对接结果热图见图 4。应用 PyMOL 软件对结合能较低的前 6 个对接结果进行可视化分析, 见图 5。

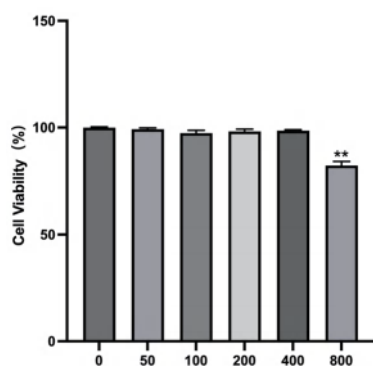
## 2.3 体外实验验证

**2.3.1 香烟烟雾提取物 (CSE) 制备** 采用橡皮管将香烟的过滤嘴的一端和 50 mL 注射器空针头一端连接起来, 点燃香烟, 抽拉注射器芯杆, 将香烟烟雾抽入注射器管内, 以此抽取 10 支香烟烟雾。将收集的香烟烟雾溶解在 50 mL 10% 胎牛血清的 DMEM

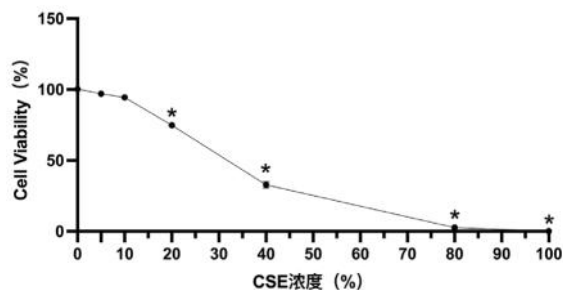






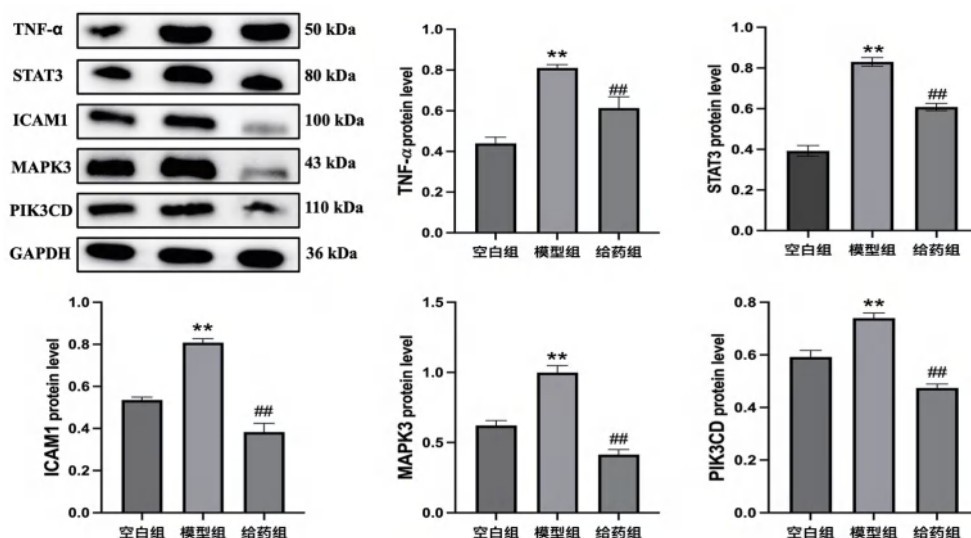
图6 杏贝止咳祛痰口服液对 16-HBE 细胞活性的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )Fig 6 Effect of Xingbei Zhike Qutan oral liquid on 16-HBE cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )注: 与空白组相比, \*\* $P < 0.01$ 。Note: Compared with the blank group, \*\* $P < 0.01$ .

细胞产生明显的增殖抑制。CSE 对 16-HBE 细胞的  $IC_{50}$  为 29.88%, 故本实验后期研究中采用 20% CSE 浓度建立 16-HBE 细胞炎症模型, 见图 7。

图7 不同浓度 CSE 对 16-HBE 细胞活性的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )Fig 7 Effect of different concentrations of CSE on 16-HBE cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )注: 与空白组相比, \* $P < 0.05$ 。Note: Compared with the blank group, \* $P < 0.05$ .

**2.3.5 Western blot 实验** 采用 Western blot 方法对 AGE-RAGE 信号通路中 TNF- $\alpha$ 、STAT3、MAPK3、ICAM1、PIK3CD 蛋白表达进行检测。接种对数生长期 16-HBE 细胞于 96 孔板中, 孵育过夜。分别设置空白组 (只加培养基)、模型组 (20% CSE)、给药组 (20% CSE + 400  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  杏贝止咳祛痰口服液), 作用 48 h 后, 收集各组 16-HBE 细胞, 弃去培养基, 用预冷的 PBS 冲洗细胞 3 次, 加入 RIPA 细胞裂解液, 之后将样品离心 (4  $^{\circ}\text{C}$ , 12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 15 min), 吸取上清液得到细胞总蛋白, 使用 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒测定样品蛋白浓度, 进行电泳、转膜、封闭, 分别加 GAPDH、TNF- $\alpha$ 、STAT3、MAPK3、ICAM1、PIK3CD 一抗, 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 次日孵育二抗, 室温孵育 1 h, 并显影曝光, 用蛋白条带的灰度值与内参蛋白条带的灰度值的比值计算相对蛋白相对表达量。

结果见图 8, 与空白组相比, 模型组中 TNF- $\alpha$ 、STAT3、MAPK3、ICAM1、PIK3CD 蛋白表达量均显著增加 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比, 杏贝止咳祛痰口服液给药组中 TNF- $\alpha$ 、STAT3、MAPK3、ICAM1、PIK3CD 蛋白表达量均显著降低 ( $P < 0.01$ ), 说明杏贝止咳祛痰口服液可通过下调 TNF- $\alpha$ 、STAT3、MAPK3、ICAM1、PIK3CD 蛋白的表达, 抑制 AGE-RAGE 信号通路, 减轻 16-HBE 细胞中炎症反应。

图8 杏贝止咳祛痰口服液对 TNF- $\alpha$ 、STAT3、MAPK3、ICAM1、PIK3CD 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )Fig 8 Effect of Xingbei Zhike Qutan oral liquid on the expression of TNF- $\alpha$ , STAT3, MAPK3, ICAM1, and PIK3CD protein ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )注: 空白组相比, \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组相比, ## $P < 0.01$ 。Note: Compared with the blank group, \*\* $P < 0.01$ ; compared with the model group, ## $P < 0.01$ .

**2.3.6 统计学分析** 采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据处理,应用 GraphPad Prism 10.0 软件进行图形构建。计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多组间采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 进行比较;组间两两比较方差齐则用 LSD 检验,方差不齐则采用 Games-Howell 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 讨论

杏贝止咳祛痰口服液在儿童支气管炎的临床治疗中疗效较佳,安全性较高,但其潜在的抗支气管炎的作用机制尚不明确,且未见相关研究。因此,本文采用网络药理学和分子对接的方法,探究杏贝止咳祛痰口服液治疗儿童支气管炎的物质基础和作用机制,为其临床应用及转化提供理论依据。

#### 3.1 网络药理学分析

本研究运用网络药理学,通过构建的 PPI 网络得出,杏贝止咳祛痰口服液可能通过调节 TNF- $\alpha$ 、STAT3、EGFR、PTGS2、ICAM1 等关键靶点发挥其抗支气管炎作用。其中 TNF- $\alpha$  与机体的炎症反应、免疫反应密切相关,能够促进多种炎症因子的表达,引起炎症级联反应,从而诱导支气管炎<sup>[13]</sup>。同时 TNF- $\alpha$  还能引起气道中性粒细胞聚集,参与中性粒细胞诱导黏蛋白合成的生物过程,刺激黏蛋白分泌,加重气道炎症<sup>[14]</sup>。STAT3 作为转录因子启动靶基因转录,能够编码炎症基因的蛋白质,释放炎症蛋白,引起呼吸道炎症反应<sup>[15-16]</sup>。EGFR 活化后可促进气道黏蛋白的合成,产生气道黏液高分分泌状态,引起气道堵塞,加重支气管炎<sup>[17-18]</sup>。

本研究推测光甘草定、槲皮素、山柰酚、甘草查尔酮 A 等是杏贝止咳祛痰口服液发挥作用的关键成分。槲皮素是一种天然黄酮类化合物,能够抑制促炎细胞因子,降低中性粒细胞对炎症因子的敏感性,并通过抑制 AKT1 蛋白磷酸化,减少 TNF- $\alpha$  等促炎细胞因子的释放,进而改善支气管炎炎症反应<sup>[19-22]</sup>。山柰酚可调节氧化应激、细胞凋亡、增殖和血管生成等多种生物过程,通过干扰 NF- $\kappa$ B 信号传导有效改善过敏性和炎症性气道疾病<sup>[23-24]</sup>。山柰酚还能够缓解组胺引起的气道痉挛,改善气道炎症<sup>[25-26]</sup>。甘草查尔酮 A 可通过抑制小鼠和人类气管上皮细胞中 IL-4、IL-5、OVA 等细胞因子诱导的肺组织嗜酸性粒细胞增多和气道杯状细胞分泌黏液过多,以缓解氧化应激、炎症等病理变化<sup>[27-28]</sup>。

本研究发现 AGE-RAGE 信号通路与杏贝止咳祛痰口服液抑制儿童支气管炎反应密切相关,且 AGE-RAGE 信号通路炎症和抗氧化应激有关。当 AGE-RAGE 信号通路被激活时,启动炎症因子的释放,导致炎症反应的发展<sup>[29]</sup>,并能够增强抗氧化酶活性<sup>[30]</sup>。晚期糖基化终末产物 (AGEs) 是 RAGE 的配体,其主要与呼吸系统疾病相关,AGEs 可促进细胞 RAGE 受体表达,激活 NADPH 氧化酶,升高 p38MAPK 磷酸化水平,促使 NF- $\kappa$ B 因子表达,引起多种黏附因子、趋化因子、炎症因子的释放,产生更多炎症介质,并调节细胞凋亡相关蛋白表达,从而导致气道高反应和细胞炎症损伤与凋亡<sup>[31-32]</sup>。因此,AGE-RAGE 信号通路可能是杏贝止咳祛痰口服液治疗儿童支气管炎的关键通路。

#### 3.2 杏贝止咳祛痰口服液对儿童支气管炎的作用机制研究

本研究利用 Western blot 技术对 AGE-RAGE 信号通路上核心靶点表达水平进行检测,结果显示杏贝止咳祛痰口服液可明显降低 16-HBE 细胞炎症模型 TNF- $\alpha$ 、STAT3、MAPK3、ICAM1、PIK3CD 的蛋白表达,表明杏贝止咳祛痰口服液可通过调节 AGE-RAGE 信号通路,减轻支气管上皮细胞的炎症反应,发挥治疗儿童支气管炎的作用。

综上,本研究为杏贝止咳祛痰口服液治疗儿童支气管炎的临床应用及二次开发提供了实验依据。但本研究基于现有的生物学信息数据分析以及细胞实验验证具有一定的局限性,需结合动物实验和临床观察进行系统验证。后续将借助动物模型分析杏贝止咳祛痰口服液入血成分,并通过转录组分析药效关键分子机制,以期儿童支气管炎的治疗及发病机制提供新的研究思路。

### 参考文献

- [1] 苑书华,张海霞,杨艳,等. 小儿支气管肺炎病情严重程度影响因素分析[J]. 河南医学研究, 2022, 31 (18): 3332-3335.
- [2] 熊洁,王军. 100 例小儿支气管肺炎患儿的临床特征、表现分析[J]. 中国妇幼保健, 2017, 32 (12): 2661-2663.
- [3] 刘景阳,丁强,张院. 小儿支气管肺炎中西医结合临床路径实施研究[J]. 实用临床医药杂志, 2020, 24 (21): 105-107.
- [4] 吉木斯古楞. 儿科抗菌药物使用现状及细菌耐药性监测[J]. 心理月刊, 2019, 14 (11): 171.
- [5] 常丽,李尔珍,张奕. 杏贝止咳祛痰口服液辅助治疗小儿支气管肺炎[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19 (18): 320-322.

- [6] 刘晓聪. 桑白皮化学成分及生物活性研究 [D]. 昆明: 昆明理工大学, 2023.
- [7] 刘瑾, 徐东川, 隋在云. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 的桑白皮大鼠体内入血成分研究 [J]. 中药材, 2022, 45 (4): 877-881.
- [8] 程遥, 毕玥琳, 冯欣, 等. 基于 UPLC-MS/MS 技术和代谢组学方法的苦杏仁“临方捣碎”的潜在质量标志物筛选 [J]. 药学学报, 2022, 57 (10): 3195-3202.
- [9] 罗益远, 崔明超, 王翰华, 等. UHPLC-Q-TOF-MS/MS 分析浙贝母不同部位化学成分 [J]. 中国现代应用药学, 2022, 39 (15): 1984-1991.
- [10] 陈琴, 郑文惠, 白海英, 等. 甘草抗炎活性质量标志物筛选 [J]. 中成药, 2024, 46 (9): 2841-2850.
- [11] 党小琳, 杨冰月, 姬海月, 等. 基于 HS-GC-IMS 技术解析远志及其炮制品中挥发性有机物的差异性 [J]. 中草药, 2024, 55 (18): 6363-6371.
- [12] 郑玉霄, 杨晨, 张彬, 等. 远志 HPLC 指纹图谱及 rbcL 序列分子鉴定研究 [J]. 中草药, 2024, 55 (2): 588-595.
- [13] 伍洪华, 张艺宁, 王亭. 清宣止咳颗粒联合头孢克洛治疗儿童慢性支气管炎的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2023, 38 (1): 126-130.
- [14] 张焕英, 于连峰, 杨俊玲. 支气管哮喘患者血清肿瘤坏死因子- $\alpha$  和透明质酸及羟脯氨酸水平表达及意义 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2016, 30 (10): 1022-1024.
- [15] 曹利华, 杨雪, 赵院院, 等. 基于网络药理学探讨芦根对慢性支气管炎的影响及作用机制 [J]. 中药药理与临床, 2021, 37 (2): 96-103.
- [16] 杜明红, 周云, 刘成军. 支气管哮喘患儿肺泡灌洗液 miR-98-5p 及靶蛋白 STAT3 的表达与气道炎症的相关性分析 [J]. 东南大学学报 (医学版), 2021, 40 (5): 599-605.
- [17] Wang J, Zhu MC, Wang LL, et al. Amphiregulin potentiates airway inflammation and mucus hypersecretion induced by urban particulate matter via the EGFR-PI3K-AKT/ERK pathway [J]. Cell Signal, 2019, 53: 122-131.
- [18] Huang LM, Pu JD, He F, et al. Positive feedback of the amphiregulin-EGFR-ERK pathway mediates PM<sub>2.5</sub> from wood smoke-induced MUC5AC expression in epithelial cells [J]. Sci Rep, 2017, 7 (1): 11084.
- [19] 司丽君, 王雪, 王林林, 等. 槲皮素的抗炎免疫及部分机制研究 [J]. 中国医药导报, 2021, 18 (27): 26-29, 34.
- [20] Celeste MG, Saveria RM, MG, et al. Quercetin induces apoptosis and autophagy in primary effusion lymphoma cells by inhibiting PI3K/AKT/mTOR and STAT3 signaling pathways [J]. J Nutr Biochem, 2017, 41: 124-136.
- [21] Kim SH, Park JG, Lee J, et al. The dietary flavonoid kaempferol mediates anti-inflammatory responses via the Src, Syk, IRAK1, and IRAK4 molecular targets [J]. Mediators Inflamm, 2015, 2015: 904142.
- [22] Zhao TT, Tang HL, Xie L, et al. *Scutellaria baicalensis* Georgi. (Lamiaceae): a review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology [J]. J Pharm Pharmacol, 2019, 71 (9): 1353-1369.
- [23] Kang DR, Belal SA, Choe HS, et al. Effect of kaempferol on cyclooxygenase 2 (Cox2) and cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) protein expression in BALB/c mice [J]. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2018, 17 (5): 428-435.
- [24] 柳春, 王艳杰, 赵丹玉. 补脾益气方药对脾虚哮喘大鼠肺组织 I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B 信号途径的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16 (10): 36-38.
- [25] Xu JF, Yu ZY, Li W, Kaempferol inhibits airway inflammation induced by allergic asthma through NOX4-Mediated autophagy [J]. Hum Exp Toxicol, 2023, 42: 960-1154.
- [26] Molitorisova M, Sutovska M, Kazimierova I, et al. The anti-asthmatic potential of flavonol kaempferol in an experimental model of allergic airway inflammation [J]. Eur J Pharmacol, 2020, 15: 173-198.
- [27] Kim SH, Yang M, Xu JG, et al. Role of licochalcone A on thymic stromal lymphopoietin expression: implications for asthma [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2015, 240 (1): 26-33.
- [28] Kim SH, Pei QM, Jiang P, et al. Role of licochalcone A in VEGF-induced proliferation of human airway smooth muscle cells: implications for asthma [J]. Growth Factors, 2017, 35 (1): 39-47.
- [29] Sukjamnong S, Chen H, Saad S, et al. *Fimbristylis ovata* and *Artemisia vulgaris* extracts inhibited AGE-mediated RAGE expression, ROS generation, and inflammation in THP-1 cells [J]. Toxicol Res, 2022, 38 (3): 331-343.
- [30] Nabi R, Alvi SS, Shah A, et al. Ezetimibe attenuates experimental diabetes and renal pathologies via targeting the advanced glycation, oxidative stress and AGE-RAGE signalling in rats [J]. Arch Physiol Biochem, 2021, 129 (4): 1-16.
- [31] 周盈, 曹磊, 平芬. 慢性阻塞性肺疾病相关炎性细胞因子的研究进展 [J]. 临床荟萃, 2020, 35 (3): 273-276.
- [32] 高亚, 刘明, 杨珂璐, 等. 热毒宁注射液治疗新冠肺炎的有效成分和机制初探 [J]. 中国医药导刊, 2020, 22 (3): 145-152.

(收稿日期: 2024-10-09; 修回日期: 2024-12-09)



# LC-MS/MS 法测定 Beagle 犬血浆中泮托拉唑浓度及毒代动力学研究

侯利平<sup>1</sup>, 谢昕<sup>1</sup>, 曹贝希<sup>1</sup>, 范朋云<sup>2</sup>, 黄魏<sup>2</sup>, 卢素云<sup>1</sup>, 邓友田<sup>1</sup>, 周融融<sup>3</sup>, 曾宏亮<sup>1, 3\*</sup> (1. 湖南安生美药物研究院有限公司, 长沙 410125; 2. 湖南九典制药股份有限公司, 长沙 410205; 3. 湖南省中医药研究院, 长沙 410013)

**摘要:** **目的** 建立 LC-MS/MS 法测定 Beagle 犬血浆中泮托拉唑的浓度, 并开展毒代动力学研究。**方法** 泮托拉唑含量测定采用 BEH C<sub>18</sub> (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 流动相 A 为含 0.1% 甲酸的 5 mmol·L<sup>-1</sup> 乙酸铵, 流动相 B 为含 0.1% 甲酸的乙腈, 流速 0.5 mL·min<sup>-1</sup>, ESI 源, 正离子 MRM 模式下, 以  $m/z$  384.2 → 200.0 为定量离子对, 以泮托拉唑-d<sub>3</sub> 为同位素内标。32 只 Beagle 犬随机分为空白对照组和泮托拉唑低、中、高剂量组 [5、15、45 mg/(kg·d)], 8 只/组, 雌雄各半。按 5 mL·kg<sup>-1</sup> 口服给药, 每日 1 次, 连续给药 7 d。首次、末次给药前后分别采集 15 个时间点的犬前肢头静脉全血, 检测犬血浆样本中泮托拉唑含量, 并用 WinNonlin 8.4 软件计算毒代动力学参数。**结果** 泮托拉唑在 60 ~ 3000 ng·mL<sup>-1</sup> 与峰面积线性关系良好 ( $r = 0.9998$ )。批内和批间精密度 ( $RSD$ ) 在 0.83% ~ 4.2%, 准确度在 95.18% ~ 102.37%。内标归一化基质效应  $RSD < 8.2\%$ , 回收率在 96.42% ~ 104.00%。泮托拉唑室温放置 17 h、反复冻融 3 次、-20℃ 和 -80℃ 保存 25 d、处理后进样器存放 44 h 后再进样, 稳定性均满足要求。Beagle 犬体内泮托拉唑的暴露量 ( $AUC$ ) 和达峰浓度 ( $C_{max}$ ) 随剂量增大而增加。与首次给药相比, 末次给药后泮托拉唑在 Beagle 犬体内的  $AUC$  减少,  $C_{max}$  呈现下降趋势。**结论** 本方法操作简单、分析速度快, 适用于检测 Beagle 犬血浆中泮托拉唑浓度。Beagle 犬连续给药 7 d, 泮托拉唑钠在体内无蓄积现象, 不出现毒性反应。

**关键词:** 泮托拉唑; Beagle 犬; 毒代动力学; 液相色谱-串联质谱

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)08-2173-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.005

## Determination of pantoprazole concentration in Beagle dog plasma by LC-MS/MS and its toxicokinetics

HOU Li-ping<sup>1</sup>, XIE Xin<sup>1</sup>, CAO Bei-xi<sup>1</sup>, FAN Peng-yun<sup>2</sup>, HUANG Wei<sup>2</sup>, LU Su-yun<sup>1</sup>, DENG You-tian<sup>1</sup>, ZHOU Rong-rong<sup>3</sup>, ZENG Hong-liang<sup>1, 3\*</sup> (1. Hunan Anshengmei Drug Research Institute Co., Ltd., Changsha 410125; 2. Hunan Jiudian Pharmaceutical Co., Ltd., Changsha 410205; 3. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410013)

**Abstract: Objective** To establish a LC-MS/MS method to determine pantoprazole concentration in Beagle dog plasma and study its toxicokinetics. **Methods** The pantoprazole concentration was determined by a BEH C<sub>18</sub> column (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm) with 5 mmol·L<sup>-1</sup> ammonium acetate containing 0.1% formic acid as mobile phase A, and acetonitrile containing 0.1% formic acid as mobile phase B. The flow rate was 0.5 mL·min<sup>-1</sup>. Mass spectrometry was used in the positive MRM mode, and quantitative analysis of pantoprazole at  $m/z$  384.2 → 200.0, with pantoprazole d<sub>3</sub> as the internal standard. Totally 32 Beagle dogs were randomly divided into a blank control group and three dose groups of low, medium, and high [5, 15, and 45 mg/(kg·d)]. Each group had 8

**基金项目:** 国家自然科学基金 (No. 82405386); 湖南省自然科学基金 (No. 2024JJ8200)。

**作者简介:** 侯利平, 男, 中级制药工程师, 主要从事药代动力学与毒代动力学研究, email: hlp\_33@163.com \*通信作者: 曾宏亮, 男, 副高级研究员, 主要从事新药筛选和临床前药理毒理学研究, email: zenghl155@163.com

dogs (4 males and 4 females). Pantoprazole administered orally at  $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  once a day for consecutive one week. Blood samples were collected from the dog's forelimb head vein at 15 time points before and after the first and last administration. The toxicokinetic parameters were analyzed by WinNonlin 8.4 software. **Results** Pantoprazole had a good linearity within  $60 \sim 3000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $r = 0.9998$ ). The intra-day and inter-day precision ( $RSD$ ) ranged  $0.83\% \sim 4.2\%$ , and the accuracy ranged  $95.18\% \sim 102.37\%$ . The  $RSD$  of the normalized matrix effect was less than  $8.2\%$ , and the recovery ranged  $96.42\% \sim 104.00\%$ . The plasma was placed at room temperature for 17 h, freeze-thawed 3 times, stored at  $-20^\circ\text{C}$  and  $-80^\circ\text{C}$  for 25 days, and stored in the sampler for 44 h. All stability parameters met the methodological requirements. The exposure dose ( $AUC$ ) and peak concentration ( $C_{\max}$ ) of pantoprazole in the dog plasma increased with dose. Compared with the first administration, the  $AUC$  was decreased and  $C_{\max}$  lowered at the last administration in the same dosing cycle. **Conclusion** The method is easy and fast, which is suitable for concentration determination of pantoprazole in Beagle dog plasma. After repeated oral administration to Beagle dogs for 7 days, no accumulation of pantoprazole is found in the body, indicating no obvious toxic reactions at this dose.

**Key words:** pantoprazole; Beagle dog; toxicokinetics; LC-MS/MS

泮托拉唑 (pantoprazole) 作为第三代质子泵抑制剂 (PPI), 通过共价阻断胃壁细胞  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶系统而发挥抑酸作用<sup>[1-2]</sup>, 用于治疗十二指肠溃疡、胃溃疡、中重度反流性食管炎等胃病。考虑到 PPIs 均具有苯并咪唑和吡啶的手性核心结构, 而外消旋药物的不同对映体可能呈现不同的药代动力学和毒理学特征, 因此不断衍生出特定旋光异构体应用品种, 如 *S*-奥美拉唑对 CYP2C19 不敏感, 能更好地控制胃液 pH; *R*-兰索拉唑则可以增强药物活性<sup>[3]</sup>。目前, 泮托拉唑旋光异构体的药理活性处于探索比对阶段, 临床应用仍以外消旋体为主。

消旋体泮托拉唑的注射改口服具有使用方便、作用时间长的优势, 而口服给予泮托拉唑的毒代动力学研究主要集中在旋光性的比对和检测方法的改进<sup>[4-6]</sup>, 存在分析时间较长, 未采用同位素标记物做内标的不足。以外消旋体泮托拉唑口服制剂为供试品在大动物体内的伴随毒代动力学研究未见报道。本文以泮托拉唑钠为受试物, 泮托拉唑- $\text{d}_3$  为内标, 建立了 3 min 内快速检测的 LC-MS/MS 方法, 对 Beagle 犬重复灌胃给药 7 d 进行犬血浆中泮托拉唑的含量测定, 通过毒代动力学评价受试物在犬的全身暴露量与给药剂量和时间的关系, 预测受试物在人体暴露时的潜在风险, 为泮托拉唑口服制剂的用药安全性提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Exion LC30-Triple Quad 5500<sup>+</sup> 型液相色谱-串联质谱联用仪 (美国 SCIEX 公司), BEH  $\text{C}_{18}$  色谱柱

( $2.1 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}$ ,  $1.7 \mu\text{m}$ , Waters); MS105DU/A 型电子天平 (瑞士梅特勒-托利多公司), H2050R 型台式高速冷冻离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司), WinNonlin 统计分析软件 (8.4, Certara)。

### 1.2 试药

泮托拉唑钠 (批号: T202211LD08, 纯度: 99.2%, 湖南九典宏阳制药有限公司), 泮托拉唑钠对照品 (批号: 100575-202106, 纯度: 95.4%, 中国食品药品检定研究院), 泮托拉唑- $\text{d}_3$  (批号: 2974-098A3, 纯度: 99.2%, TLC), 甲醇、乙腈、甲酸和异丙醇为色谱纯, 水为超纯水, 乙酸铵为分析纯。

### 1.3 实验动物

Beagle 犬 (普通级) 32 只, 雌雄各半, 7~10 月龄, 体重  $6 \sim 8 \text{ kg}$  [湖南宏顺康生物科技有限公司, 生产许可证号: SCXK (湘) 2021-000, 使用许可证号: SYXK (湘) 2023-0001, 伦理审查编号为 IACUC-2023 (Y) 077TKS5]。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液配制

**2.1.1 工作液** 精密称取泮托拉唑钠对照品适量, 用甲醇配制成质量浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的储备液。再用 50% 甲醇水分别稀释成 60.00、38.40、19.20、9.600、4.800、2.400、1.200  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的泮托拉唑系列标准曲线工作液及 45.00、24.00、3.600  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的泮托拉唑质控工作液。

**2.1.2 内标液** 精密称取泮托拉唑- $\text{d}_3$  适量, 用甲醇配制成质量浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的储备液。

再用乙腈稀释成质量浓度为  $40.00 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的同位素内标液。

**2.1.3 标准血浆样本** 分别取泮托拉唑系列标准曲线工作液、泮托拉唑质控工作液各  $10 \mu\text{L}$ ，分别加入 Beagle 犬混合空白血浆  $190 \mu\text{L}$ ，涡旋混匀。配制成  $60.00$ 、 $120.0$ 、 $240.0$ 、 $480.0$ 、 $960.0$ 、 $1920$ 、 $3000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的泮托拉唑系列标准曲线血浆样本及  $180.0$  (LQC)、 $1200$  (MQC)、 $2250$  (HQC)  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的泮托拉唑质控血浆样本。

## 2.2 样本前处理与 LC-MS/MS 检测

**2.2.1 蛋白沉淀** 精密移取血浆样本  $100 \mu\text{L}$  到 96 孔深孔板中，加入  $300 \mu\text{L}$  内标液，振荡混匀  $5 \text{ min}$ ， $4^\circ\text{C}$  下以  $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心  $10 \text{ min}$ 。移取离心上清液  $100 \mu\text{L}$  到新的 96 孔深孔板中，加入  $400 \mu\text{L}$  超纯水，振荡混匀  $5 \text{ min}$ ，置于进样器中。

**2.2.2 色谱条件** 色谱柱为 BEH  $\text{C}_{18}$  ( $2.1 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}$ ,  $1.7 \mu\text{m}$ )，柱温  $40^\circ\text{C}$ ，流动相 A 为含  $0.1\%$  甲酸的  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙酸铵，流动相 B 为含  $0.1\%$  甲酸的乙腈，流速  $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ，进样量  $2 \mu\text{L}$ ，梯度洗脱 ( $0 \sim 1.7 \text{ min}$ ,  $30\% \sim 98\% \text{B}$ ;  $1.7 \sim 1.9 \text{ min}$ ,  $98\% \text{B}$ ;  $1.9 \sim 2.4 \text{ min}$ ,  $98\% \sim 30\% \text{B}$ ;  $2.4 \sim 2.7 \text{ min}$ ,  $30\% \text{B}$ )。

**2.2.3 质谱条件** 电离模式为  $\text{ESI}^+$ ；离子源温度  $400^\circ\text{C}$ ；入口电压  $15 \text{ kV}$ ；Gas1 为  $50 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ ；Gas2 为  $50 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ ；Curtain Gas 为  $40 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ ；Collision Gas 为  $8 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ ；扫描方式为多反应监测模式 (MRM)；泮托拉唑定量离子对为  $m/z$   $384.2 \rightarrow 200.0$  (去簇电压  $80 \text{ V}$ ，碰撞能  $15 \text{ eV}$ ，驻留时间  $150 \text{ ms}$ )；泮托拉唑- $\text{d}_3$  定量离子对为  $m/z$   $387.2 \rightarrow 203.2$  (去簇电压  $80 \text{ V}$ ，碰撞能  $15 \text{ eV}$ ，驻留时间  $150 \text{ ms}$ )。

## 2.3 方法学验证

**2.3.1 专属性** 分别取 Beagle 犬空白血浆基质、定量下限标准曲线血浆样本、给药后犬血浆样本，按“2.2”项下方法对样本前处理后，分别进样检测泮托拉唑、泮托拉唑- $\text{d}_3$ 。质谱图结果表明，空白血浆中未检测到与待测物和内标物共洗脱的内源性化合物干扰峰，且加标血浆样本和给药  $15 \text{ min}$  后血浆样本中待测物和内标物的出峰时间均为  $0.86 \text{ min}$  (见图 1)，说明本文所建立的 LC-MS/MS 方法专属性良好。

**2.3.2 线性关系考察** 配制泮托拉唑系列标准曲线血浆样品，按“2.2”项下方法处理，以泮托拉唑与内标的响应比值 ( $y$ ) 为纵坐标，以系列标准曲线血浆样品浓度 ( $x$ ) 为横坐标，权重因子为  $1/\chi^2$ ，采用最小二乘法拟合。获得线性回归方程  $y =$

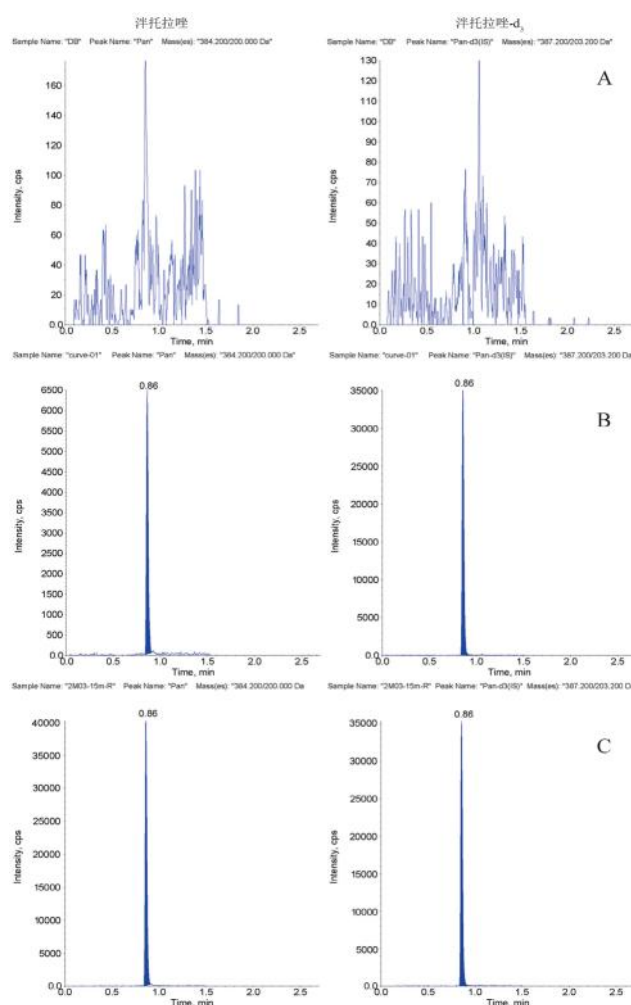


图 1 LC-MS/MS 检测 Beagle 犬血浆中泮托拉唑的方法专属性

Fig 1 LC-MS/MS method specificity for detecting pantoprazole in Beagle dog plasma

A. 空白血浆 (blank plasma); B. 含  $60.00 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  泮托拉唑的标准血浆 (standard plasma with  $60.00 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  pantoprazole); C. 给药后  $15 \text{ min}$  采集的血浆 (plasma collected  $15 \text{ min}$  after the administration)

$0.0031x + 0.0265$ ，相关系数  $r = 0.9998$ ，表明犬血浆中的泮托拉唑在  $60 \sim 3000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  内的线性关系良好。

**2.3.3 精密度与准确度** 取 LQC、MQC 和 HQC 质控血浆样品各 5 份， $2 \text{ d}$  内各配制 3 个独立批次。按“2.2”项下方法处理和采集。比较各质控血浆样本实测值与标示值的批内、批间偏差。批内和批间精密度  $RSD$  在  $0.83\% \sim 4.2\%$ ，准确度在  $95.18\% \sim 102.37\%$ ，符合生物分析指导原则要求。

**2.3.4 基质效应与回收率** 取 6 只健康 Beagle 犬的空白血浆，分成 2 份。第 1 份配制 LQC、MQC 和 HQC 质控血浆样本，按“2.2.1”项下方法进行前处理，获得待测物与内标的响应值 (记为  $A_1$ )；第 2 份空白血浆先进行蛋白沉淀处理，离心上清液作为空白基质提取液用于制备质控样



本, 获得待测物与内标的响应值 (记为  $A_2$ )。另取质控工作液和内标液, 配制成不含基质的相同浓度质控, 获得待测物与内标的响应值 (记为  $A_3$ )。基质效应 =  $A_2/A_3$ , 回收率 =  $A_1/A_2$ 。结果回收率在 96.42% ~ 104.00%, 内标归一化的基质效应变异性小于 8.2%, 说明空白基质中无明显离子抑制或增强。

**2.3.5 稳定性考察** 平行配制 LQC、HQC, 分别进行如下处理: ① 室温放置 ( $24 \pm 10$ ) h, 考察室温稳定性; ②  $-80^\circ\text{C}$  冻存 24 h 后再室温解

冻 30 min, 循环 3 次, 考察冻融稳定性; ③ 在  $-20^\circ\text{C}$ 、 $-80^\circ\text{C}$  条件下储存 25 d, 考察长期稳定性; ④ 采用进样合格的标准曲线血浆样品和质控血浆样品, 持续在进样器中放置 ( $48 \pm 10$ ) h 再进样, 考察处理后再进样稳定性。稳定性考察结果见表 1, 泮托拉唑 LQC、HQC 在室温持续放置 17 h、反复冻融 3 次仍稳定;  $-20^\circ\text{C}$  和  $-80^\circ\text{C}$  保存 25 d 后的准确度达标; 样本处理后置于进样器存放 44 h 后再进样, 仍满足测定要求。

表 1 泮托拉唑稳定性考察结果 ( $n = 6$ )  
Tab 1 Stability of pantoprazole ( $n = 6$ )

| 稳定性考察项                              | LQC                                         |         | HQC                                         |         |
|-------------------------------------|---------------------------------------------|---------|---------------------------------------------|---------|
|                                     | 实测浓度 / ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | 准确度 / % | 实测浓度 / ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | 准确度 / % |
| 室温稳定性 (17 h)                        | 172.30 $\pm$ 5.84                           | 95.72   | 2249.97 $\pm$ 62.23                         | 100.00  |
| 冻融稳定性 (3 次)                         | 176.55 $\pm$ 3.96                           | 98.09   | 2124.22 $\pm$ 85.05                         | 94.41   |
| 长期稳定性 ( $-20^\circ\text{C}$ , 25 d) | 180.38 $\pm$ 5.38                           | 100.21  | 2120.61 $\pm$ 29.12                         | 94.25   |
| 长期稳定性 ( $-80^\circ\text{C}$ , 25 d) | 179.25 $\pm$ 3.07                           | 99.58   | 2116.17 $\pm$ 55.99                         | 94.05   |
| 再进样稳定性 (10 $^\circ\text{C}$ , 44 h) | 168.83 $\pm$ 4.55                           | 93.80   | 2121.31 $\pm$ 55.35                         | 94.28   |

2.4 毒代动力学评价

选取 Beagle 犬 32 只, 雌雄各半, 按体重和性别随机分成空白对照组和泮托拉唑低、中、高剂量组 4 组, 8 只 / 组。其中低、中、高剂量组给药剂量分别为 5、15、45  $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ , 约相当于成人临床拟用剂量 (按体表面积计算) 的 5 倍、14 倍、42 倍。给药前禁食不禁水 16 h 以上, 给药后禁食 4 h, 采用灌胃给药, 给药体积为  $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 每日上午给药 1 次, 连续给药 7 d, 空白对照组灌胃等体积纯水。分别于首次给药、末次给药 0、0.083、0.167、0.25、0.333、0.5、0.75、1、1.5、2、3、4、6、8、24 h 经前肢头静脉采集全血 2 mL, 置于含 EDTA- $\text{K}_2$  采血管中, 混匀后  $4^\circ\text{C}$  下 2000 g 离心 10 min 分离血浆。采用 LC-MS/MS 方法检测采集的血浆样本中泮托拉唑含量。个体间的实验数据经 SPSS 11.5 软件进行组间统计分析, 将每项指标以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用 WinNonlin 8.4 软件通过非房室模型计算 Beagle 犬首次、末次给药后的毒代动力学参数。平均血浆浓度 - 时间曲线见图 2, 各剂量下的比对结果见表 2。

在 5、15、45  $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  的给药剂量下, Beagle 犬体内泮托拉唑的暴露量 AUC 和达峰浓度  $C_{\text{max}}$  均随剂量增大而增加。相同给药剂量下, 相比于首次给药, 末次给药后 AUC 均减少, 表明重复给药 7 d, 泮托拉唑在 Beagle 犬体内无蓄积。与首次给药相比, 末次给药后  $t_{\text{max}}$ 、 $C_{\text{max}}$  呈下降趋势, 说明给药次数增加, Beagle 犬体内相应

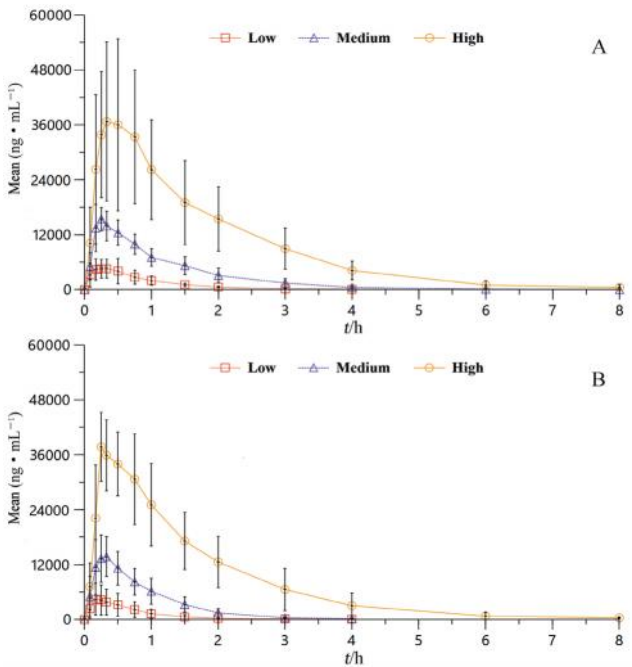


图 2 泮托拉唑首次给药 (A) 和末次给药 (B) 的平均血药浓度 - 时间曲线

Fig 2 Mean blood drug concentration time curve after the first administration (A) and last administration (B) of pantoprazole

代谢酶诱导代谢加快, 以及肠道吸收泮托拉唑减弱, 综合导致暴露量减少。随着剂量增加, 同一给药周期的  $t_{1/2}$  呈增加趋势,  $\text{AUC}/\text{Dose}$  呈上升趋势, 说明泮托拉唑在 Beagle 犬体内存在线性动力学特征。

3 讨论

本文所建立的 LC-MS/MS 法采用色谱短柱

表 2 泮托拉唑低、中、高剂量组主要毒代动力学参数 (n = 8)

Tab 2 Main toxicokinetic parameters of pantoprazole in low, medium, and high dose groups (n = 8)

| 组别       | 给药周期 | $AUC_{0 \rightarrow t} / (h \cdot ng \cdot mL^{-1})$ | $AUC_{0 \rightarrow \infty} / (h \cdot ng \cdot mL^{-1})$ | $t_{1/2}/h$ | $t_{max}/h$ | $C_{max} / (ng \cdot mL^{-1})$ |
|----------|------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------|-------------|--------------------------------|
| 泮托拉唑低剂量组 | 首次给药 | 4953.42±2090.25                                      | 5053.08±2074.40                                           | 0.58±0.13   | 0.25±0.12   | 5529.58±2816.64                |
|          | 末次给药 | 3593.15±2832.30                                      | 3692.45±2839.00                                           | 0.69±0.68   | 0.18±0.03   | 4561.79±3456.84                |
| 泮托拉唑中剂量组 | 首次给药 | 19 079.20±5105.17                                    | 19 551.34±5532.37                                         | 0.63±0.14   | 0.27±0.11   | 16 216.44±2929.86              |
|          | 末次给药 | 14 057.78±5582.47                                    | 14 176.99±5624.37                                         | 0.50±0.13   | 0.26±0.07   | 14 605.66±4560.25              |
| 泮托拉唑高剂量组 | 首次给药 | 74 455.80±29 856.42                                  | 75 459.27±28 861.58                                       | 0.97±0.60   | 0.39±0.18   | 39 109.51±17 420.69            |
|          | 末次给药 | 64 332.22±25 535.58                                  | 64 699.92±25 682.58                                       | 0.73±0.20   | 0.35±0.19   | 39 198.50±7962.88              |

(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm) 进行分离富集, 并以同位素标记待测物作内标, 分析时间相比文献<sup>[4]</sup>缩短, 不到 3 min, 定量下限低且无明显残留, 具有操作简单、分析速度快、专属性好、基质干扰低的优势, 适用于检测 Beagle 犬血浆中的泮托拉唑含量。

目前泮托拉唑的药代动力学和毒代动力学研究较多关注在旋光异构体的差异性, 但尚未发现明显差异, 如 Chen 等<sup>[5]</sup>通过手性色谱柱实现了左旋、右旋泮托拉唑的分离和检测, 比对不同剂量下 Beagle 犬静脉注射泮托拉唑, 结果无显著差异。由此可知, 虽然 PPIs 药物具有苯并咪唑和吡啶的手性核心结构, 但并不是所有 PPIs 都可以开发为手性药物。因此, 本文以外消旋体泮托拉唑为受试物作为比格犬的毒代动力学研究对象, 符合泮托拉唑目前的临床用药规律。Mansell 等<sup>[7]</sup>检测到幼犬重复给药 1 周后泮托拉唑的  $t_{1/2}$  在 0.5 ~ 2.1 h, 并通过剂量与  $AUC_{0 \rightarrow 24h}$  归一化比对, 未发现性别或剂量对毒代动力学研究有影响, 本文所统计的泮托拉唑在犬体内的  $t_{1/2}$  在 0.5 ~ 1.0 h, 不同剂量的毒代动力学研究结果与该报道略提前, 说明成年犬的肝脏代谢泮托拉唑能力得到提高, 使得其代谢和排泄加快。Chen 等<sup>[8]</sup>列举了影响 PPIs 生物等效性的因素包括代谢酶活性、胃肠 pH 值、食物消耗量等, 建议禁食一段时间后给药, 同时适当提高采血点的密集度、以降低受试物的高变异情况, 这是面对 PPIs 高变异药物的合理临床前/临床试验设计考量。因此本文在给药前充分禁食 16 h 以上, 给药后持续禁食 4 h (泮托拉唑在犬体内已处于排泄阶段), 并将采血点由常见的 8 ~ 10 个点增加到 15 个, 且多数集中在 2 h 内, 所获毒代动力学特征参数反映了泮托拉唑钠在 Beagle 犬体内的毒理学和代谢情况。

Beagle 犬重复口服灌胃给药 7 d 后, 相同剂量时, 末次给药的  $AUC$  均减少,  $t_{max}$ 、 $C_{max}$  呈下降趋势, 说明泮托拉唑钠在体内无蓄积, 主要是

由于 Beagle 犬体内相应代谢酶诱导代谢加快, 以及肠道吸收泮托拉唑减弱, 导致暴露量减少。随着剂量增加, 同一给药周期的  $t_{1/2}$  呈增加趋势,  $AUC/Dose$  呈上升趋势, 说明泮托拉唑在 Beagle 犬体内存在线性动力学特征。

参考文献

[1] Shin JM, Kim NY. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the proton pump inhibitors [J]. J Neurogastroenterol Motil, 2013, 19 (1): 25-35.

[2] Ward RM, Kearns GL. Proton pump inhibitors in pediatrics: mechanism of action, pharmacokinetics, pharmacogenetics, and pharmacodynamics [J]. Paediatr Drugs, 2013, 15 (2): 110-131.

[3] Wedemeyer RS, Blume H. Pharmacokinetic drug interaction profiles of proton pump inhibitors: an update [J]. Drug Saf, 2014, 37 (4): 201-211.

[4] Jiao HW, Li YQ, Sun LN, et al. A chiral LC-MS/MS method for the enantioselective determination of R- (+) - and S- ( - ) -pantoprazole in human plasma and its application to a pharmacokinetic study of S- ( - ) -pantoprazole sodium injection [J]. Biomed Chromatogr, 2017, 31 (10): 257-266.

[5] Chen MX, Xia Y, Ma ZY, et al. Validation of a chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of pantoprazole in dog plasma [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2012, 906: 85-90.

[6] 徐玲玲, 王芳, 刘小雨, 等. 液相色谱-串联质谱法测定犬血浆中左旋泮托拉唑钠的浓度及其毒代动力学研究 [J]. 中国药学杂志, 2017, 52 (15): 1359-1362.

[7] Mansell P, Robinson K, Minck D, et al. Toxicology and toxicokinetics of oral pantoprazole in neonatal and juvenile dogs [J]. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol, 2011, 92 (4): 345-352.

[8] Chen ZM, Gan FL, Rao XL, et al. Pharmacokinetics, bioequivalence, and safety studies of pantoprazole sodium enteric-coated tablets in healthy subjects [J]. Clin Pharmacol Drug Dev, 2021, 10 (5): 502-509.

(收稿日期: 2024-10-17; 修回日期: 2024-12-06)

# 新型白藜芦醇-苯并呋喃类衍生物的设计、合成与体外抗结肠癌活性评价

陈罡<sup>1, 3</sup>, 李雅娜<sup>1, 3\*</sup>, 孟祥瑞<sup>2\*</sup> (1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2. 山东省药学科学院 医药绿色智能技术山东省工程研究中心, 济南 205101; 3. 长三角药物高等研究院, 江苏 南通 226133)

**摘要:** **目的** 设计和合成了一系列未见文献报道的白藜芦醇-苯并呋喃类衍生物, 并初步筛选抗结肠癌活性更强的白藜芦醇-苯并呋喃类衍生物。**方法** 以白藜芦醇为先导化合物, 采用药效团拼合原理, 设计并合成了 17 个目标化合物, 化合物 **RE-01** ~ **RE-17** 的结构经 <sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 和 ESI-MS 确证。采用 CCK-8 试剂盒检测目标化合物在 20 μmol · L<sup>-1</sup> 浓度下对 HCT116 细胞与 SW480 细胞的增殖抑制作用, 并测定了部分化合物在 SW480、HCT116 两种细胞系中的 IC<sub>50</sub> 值。**结果** 在 HCT116 细胞中, **RE-13** 的抑制活性最好, 抑制率为 97.69%; 在 SW480 细胞中, **RE-10** 的抑制活性最好, 抑制率为 75.55%, 在 20 μmol · L<sup>-1</sup> 浓度下体外抑制活性较白藜芦醇提高了 4 ~ 5 倍。在 HCT116 细胞中, **RE-06** 的 IC<sub>50</sub> 最佳, 为 0.168 μmol · L<sup>-1</sup>; 在 SW480 细胞中, **RE-13** 的 IC<sub>50</sub> 最佳, 为 0.178 μmol · L<sup>-1</sup>。**结论** 本研究首次设计合成了白藜芦醇-苯并呋喃类衍生物, 并且多数衍生物具有良好的抗肿瘤活性, 这为白藜芦醇衍生物的药物开发提供了一条新的优化思路。

**关键词:** 白藜芦醇; 苯并呋喃; 药效团拼合; 抗结肠癌活性

中图分类号: R914, R96 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)08-2178-09  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.006

## Design, synthesis, and evaluation of anti-colon cancer activity of resveratrol-benzofuran derivatives

CHEN Gang<sup>1, 3</sup>, LI Ya-na<sup>1, 3\*</sup>, MENG Xiang-jing<sup>2\*</sup> (1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Shandong Provincial Engineering Research Center of Medicine Green and Intelligence Technology, Shandong Academy of Pharmaceutical Sciences, Jinan 205101; 3. Yangtze River Delta Institute of Pharmaceutical Research, Nantong Jiangsu 226133)

**Abstract: Objective** To design and synthesize a series of resveratrol-benzofuran derivatives, and identify those derivatives with enhanced anti-colon cancer activity. **Methods** Resveratrol was used as the lead compound, and 17 target compounds were designed and synthesized based on the pharmacophore fusion principle. The structures of compounds **RE-01** to **RE-17** were confirmed by <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, and ESI-MS. The proliferation inhibition of the target compounds at 20 μmol · L<sup>-1</sup> on HCT116 and SW480 cells was evaluated by CCK-8 assay. **Results** Among the tested compounds, **RE-13** showed the strongest inhibition in HCT116 cells, with an inhibition rate of 97.69%. In SW480 cells, **RE-10** showed the best inhibition, with an inhibition rate of 75.55%. At 20 μmol · L<sup>-1</sup> the in vitro inhibitory activity of these derivatives was 4 to 5 times higher than that of resveratrol. **Conclusion** Many newly developed resveratrol-benzofuran derivatives, exhibit potent anticancer activity. These findings provide a new strategy for optimizing resveratrol derivatives for colorectal cancer.

**Key words:** resveratrol; benzofuran; combination of pharmacophore; anti-colon cancer activity

**基金项目:** 济南市“新高校 20 条”项目 针对蛋白相互作用的肿瘤靶向新药研发创新团队 (No. 2021GXRC069)。

**作者简介:** 陈罡, 男, 在读硕士研究生, 主要从事药物化学研究, email: gcazy0612@163.com \*通信作者: 李雅娜, 女, 硕士研究生, 主要从事药物化学研究, email: lyana2021@163.com; 孟祥瑞, 女, 研究员, 主要从事医养健康产品开发、分子机制研究及临床前药理药效评价, email: fredamxj@163.com



结肠癌是最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和致死率位居世界前三<sup>[1]</sup>。根据世界卫生组织的数据,在 2020 年,结肠癌在全球发病人数超过 190 万<sup>[2]</sup>。在 2020 年全球癌症数据显示,我国结肠癌患者每年新增约 55.5 万,该癌症已成为我国第三大恶性肿瘤<sup>[3-4]</sup>。目前,结肠癌的治疗方法多样,主要包括化学药物、手术治疗、放疗和靶向治疗等<sup>[5]</sup>。手术治疗通常适用于早期阶段的结肠癌患者,而化疗则适合不同病程阶段的患者。然而,约 50% 的结肠癌患者因耐药性问题,最终发展为复发性疾病<sup>[6]</sup>。研究表明,饮食习惯是结肠癌发生的重要影响因素,植物性食物和水果的摄入被认为有助于降低患病风险<sup>[7-8]</sup>。因此,近年来,人们对天然物质在癌症及其他疾病治疗中的应用愈加关注<sup>[9]</sup>。白藜芦醇(resveratrol, RE)作为一种研究相对深入的植物来源多酚,已显示出对结肠癌的预防和抑制作用<sup>[10]</sup>。

白藜芦醇是具有三个酚羟基的二苯乙烯结构,也被称为芪三酚,是多种植物,如葡萄、虎杖、决明、买麻藤等受刺激分泌的一种植物抗毒素<sup>[11-13]</sup>,具有抗菌、抗炎、抗氧化、抗肿瘤等广泛药理活性<sup>[14-15]</sup>。在人结肠癌细胞 HCT116 和 SW480 中,白藜芦醇以剂量依赖的方式抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭<sup>[16]</sup>。研究表明,白藜芦醇在肿瘤细胞上的  $IC_{50}$  值通常大于  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[17]</sup>。

这说明其需要在高浓度下才能发挥显著抗肿瘤作用。白藜芦醇的生物利用度较低,导致其在体内的有效浓度有限,限制了其实际疗效。而提高白藜芦醇的生物利用度最常见的衍生物就是白藜芦醇的甲基化衍生物,紫檀芪是其二甲基衍生物,生物利用度高于白藜芦醇<sup>[18-20]</sup>。此外,白藜芦醇二苯乙烯骨架上的多个酚羟基结构导致其结构稳定性低,这可能是导致白藜芦醇生物活性较低的原因之一<sup>[21]</sup>,在分子设计时可根据这一特点对其酚羟基进行优化或修改。

含有苯并呋喃结构的呋喹替尼(fruquintinib)是用于治疗转移性结肠癌的临床药物<sup>[22]</sup>,临床试验中,呋喹替尼显示出了对结肠癌高效低毒、耐受性良好的优势。苯并呋喃类化合物是自然界分布广泛的一类化合物,常见于菊科、芸香科、百合科和莎草科植物中,这类化合物通常具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化等生物活性<sup>[23-27]</sup>。为了进一步开发新型有效的抗结肠癌药物,基于药效团融合策略,本研究在白藜芦醇 A 环的 2, 3 号位融入一个呋喃环,形成了以白藜芦醇为母核结构的新型衍生物。在母核基础上,将 5, 4' 位的酚羟基甲基化,并在呋喃环上使用不同酰基基团取代(见图 1),设计并合成了 17 个苯并呋喃类白藜芦醇衍生物(见图 2),并通过 CCK8 法验证各化合物在 HCT116 和 SW480 两种细胞系中的抗增殖活性。

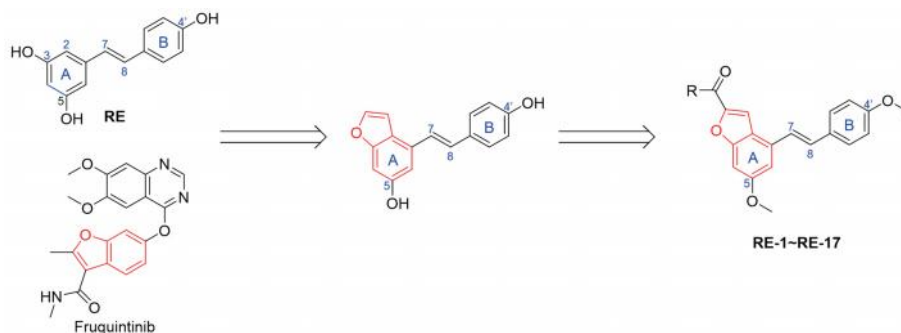


图 1 新型白藜芦醇-苯并呋喃类衍生物的设计思路

Fig 1 Design strategy for novel resveratrol-benzofuran derivatives

## 1 仪器与试剂

碘甲烷( $\text{CH}_3\text{I}$ )、白藜芦醇(RE)、环己胺盐酸盐、三氯氧磷( $\text{POCl}_3$ )、1 M 三氯化硼溶液(1 M  $\text{BCl}_3$ )、4-三氟甲基苯磺酰胺(纯度:98%,江苏艾康生物医药研发有限公司);苄胺、3-羟基吡咯烷(纯度:99%,江苏艾康生物医药研发有限公司);乙胺苯胺(纯度:99%,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);3-氟苯胺(纯度:97%,上海泰坦科技股份有限公司);甘氨酸甲酯盐酸盐,2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(HATU)、N,N-二异丙基乙基胺(DIPEA)(纯

度:99%,上海迈瑞尔化学技术有限公司);无水碳酸钾( $\text{K}_2\text{CO}_3$ )、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、二氯甲烷(DCM)(纯度:98%,上海迈瑞尔化学技术有限公司);正丙胺、异丙胺、环丙胺、吡咯烷、苯胺(纯度均 $\geq 98\%$ ,上海麦克林生化科技有限公司);苯胺(纯度 $\geq 99.5\%$ ,上海麦克林生化科技有限公司);氢氧化锂(LiOH)、四氢呋喃(THF)(纯度:99%,国药集团化学试剂有限公司)。

DF-101S 集热式加热磁力搅拌器(上海仪昕科学仪器有限公司);Bruker NMR 400 MHz 型核磁共振仪(TMS 为内标,德国 Bruker 公司);

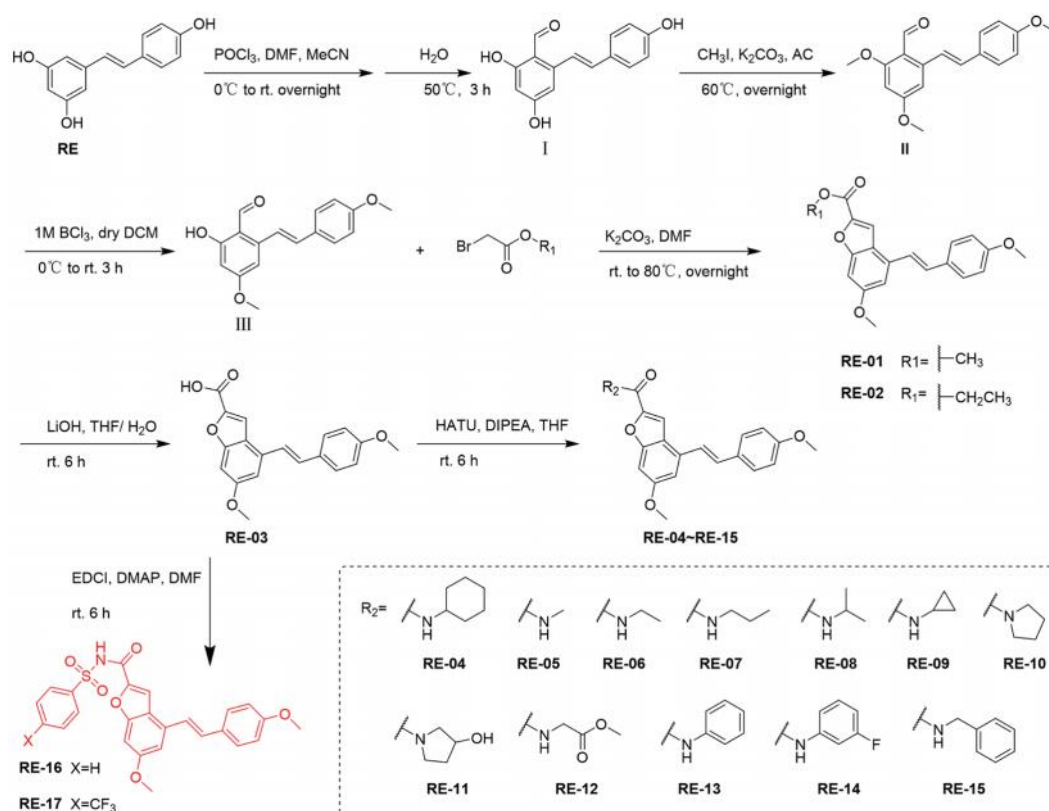


图2 化合物 RE-01 ~ RE-17 的合成路线

Fig 2 Synthesis routes of compounds RE-01 ~ RE-17

UPLC-MS 质谱仪 (Waters 中国有限公司); 旋转蒸发仪 (EYELA 东京理化器械株式会社); 200 ~ 300 目硅胶 (快速柱层析固定相, 青岛海洋); 制备液相色谱仪 (江苏汉邦科技有限公司); 多功能酶标仪 (珀金埃尔默仪器)。白藜芦醇 (含量: 98%, 江苏艾康生物医药研发有限公司), 其余试剂都为市售分析纯或化学纯产品。人结肠癌 HCT-116 细胞、SW-480 细胞 (武汉普诺赛生命科技有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 目标化合物 RE-01 ~ RE-17 合成

**2.1.1 中间体 I、II<sup>[28-29]</sup>、III 的合成** 称取白藜芦醇 (2.3 g, 10.08 mmol), 溶于 50 mL 乙腈, 加入 DMF (0.73 g, 10 mmol), 冰浴至  $0^\circ\text{C}$ , 滴加三氯氧磷 (2.3 g, 15 mmol), 反应 30 min 后升至常温反应过夜, 生成红色沉淀。TLC 监测反应, 抽滤后收集红色沉淀并用冷乙腈洗涤。将沉淀加入 200 mL 冰水, 用稀氢氧化钠调至中性,  $50^\circ\text{C}$  水解 3 h, 得黄色沉淀。用乙酸乙酯萃取, 合并有机相, 经水、饱和氯化钠洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 柱层析 (石油醚-乙酸乙酯 = 3 : 1) 得中间体 I (白藜芦醇醛), 收率 67%;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{Chloroform-}d$ )  $\delta$ : 11.69 (s, 1H), 10.31 (s, 1H), 8.82 (s,

1H), 7.62 (d,  $J = 16.0$  Hz, 1H), 7.43 ~ 7.35 (m, 2H), 7.18 ~ 7.09 (m, 1H), 6.83 ~ 6.76 (m, 2H), 6.59 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 6.37 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 6.08 (s, 1H)。ESI-Mass for  $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$ :  $m/z$  ( $\text{M} + \text{H}$ )<sup>+</sup> 254.9, found 254.9。

称取中间体 I (1 g, 3.9 mmol), 用 10 mL 丙酮溶解于 50 mL 三口瓶, 加入碘甲烷 (2.22 g, 15.6 mmol) 和碳酸钾 (1.63 g, 11.8 mmol),  $60^\circ\text{C}$  回流反应过夜。TLC 跟踪检测, 反应完全后过滤除去碳酸钾, 滤液减压浓缩, 柱层析 (石油醚-乙酸乙酯 = 5 : 1), 得到中间体 II, 为淡黄色固体, 收率 90%。 $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 10.42 (s, 1H), 7.95 (d,  $J = 16.3$  Hz, 1H), 7.50 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 7.21 (d,  $J = 16.3$  Hz, 1H), 6.98 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 6.91 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 6.63 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 3.92 (d,  $J = 7.7$  Hz, 6H), 3.79 (s, 3H)。ESI-Mass for  $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_4$ :  $m/z$  ( $\text{M} + \text{H}$ )<sup>+</sup> 299.1, found 299.2。

将中间体 II (1.50 g, 5.03 mmol) 溶于 40 mL 无水二氯甲烷中, 冰浴至  $0^\circ\text{C}$ , 滴加  $1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的三氯化硼的二氯甲烷溶液 (10 mL, 10.00 mmol),  $0^\circ\text{C}$  反应 30 min 后升至常温反应 2 h, TLC 检测反应完全, 减压除去溶剂, 饱和碳酸氢钠水溶液溶解, 乙酸乙酯 ( $3 \times 50\text{ mL}$ ) 萃取, 合并有机相用无

水硫酸钠干燥, 固液分离后减压浓缩, 浓缩物经硅胶色谱柱层析纯化(洗脱剂: 石油醚-乙酸乙酯=5:1,  $V/V$ ), 得到 1.2 g 黄色固体 **III**, 收率 85%;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Chloroform- $d$ )  $\delta$ : 12.47 (s, 1H), 10.21 (s, 1H), 7.48 ~ 7.42 (m, 2H), 7.37 (d,  $J$  = 15.9 Hz, 1H), 6.97 ~ 6.88 (m, 3H), 6.60 (dd,  $J$  = 2.4, 0.6 Hz, 1H), 6.35 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 1H), 3.86 (d,  $J$  = 12.2 Hz, 6H)。ESI-Mass for  $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_4$ :  $m/z$  ( $\text{M}-\text{H}$ ) $^+$  283.1, found 283.4。

**2.1.2 化合物 RE-01、RE-02 的合成** 将中间体 **III** (300 mg, 1.06 mmol), 无水碳酸钾 (580 mg, 4.22 mmol) 溶于 10 mL DMF 中, 向反应体系滴加 (190 mg, 1.24 mmol) 溴乙酸甲酯, 常温反应 2 h, TLC 检测未完全反应, 继续升温至 80  $^{\circ}\text{C}$  反应过夜。TLC 检测反应完全, 将反应液抽滤, 乙酸乙酯 (3 $\times$ 20 mL) 洗涤滤饼, 有机相合并, 使用饱和食盐水 (3 $\times$ 50 mL) 萃取。有机相用无水硫酸钠干燥, 固液分离后减压浓缩, 浓缩物经硅胶色谱柱层析纯化(洗脱剂: 石油醚-乙酸乙酯=5:1,  $V/V$ ), 得到 290 mg 黄色固体 **RE-01**, 收率 79%;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Chloroform- $d$ )  $\delta$ : 7.70 (d,  $J$  = 1.0 Hz, 1H), 7.47 ~ 7.40 (m, 2H), 7.17 ~ 7.06 (m, 2H), 7.02 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 6.91 ~ 6.84 (m, 3H), 3.91 (s, 3H), 3.80 (d,  $J$  = 16.3 Hz, 6H)。 $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, Chloroform- $d$ )  $\delta$ : 159.61, 158.92, 158.79, 156.49, 143.38, 132.23, 130.47, 128.56, 127.02, 121.70, 117.91, 113.22, 112.21, 109.07, 93.65, 54.72, 54.32, 51.18。ESI-Mass for  $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_5$ :  $m/z$  ( $\text{M} + \text{H}$ ) $^+$  339.4, found 339.7。

采用上述方法, 使用中间体 **III** 和溴乙酸乙酯为原料, 得到 293 mg 的 **RE-02**, 收率 80%;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Chloroform- $d$ )  $\delta$ : 7.71 (d,  $J$  = 0.8 Hz, 1H), 7.54 ~ 7.44 (m, 2H), 7.26 ~ 7.10 (m, 3H), 7.07 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 6.97 ~ 6.82 (m, 3H), 6.60 ~ 6.55 (m, 1H), 3.87 (d,  $J$  = 17.4 Hz, 6H), 3.05 (d,  $J$  = 5.0 Hz, 3H)。 $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, Chloroform- $d$ )  $\delta$ : 160.56, 159.82, 159.59, 157.50, 144.76, 133.22, 131.44, 129.63, 128.06, 122.77, 119.03, 114.26, 112.97, 109.99, 94.74, 61.33, 55.76, 55.36, 14.41。ESI-Mass for  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_5$ :  $m/z$  ( $\text{M} + \text{H}$ ) $^+$  353.1, found 353.2。

**2.1.3 化合物 RE-03 的合成** 将 **RE-01** (300 mg, 0.89 mmol) 溶于 10 mL 四氢呋喃, 氢氧化锂 (110 mg, 4.58 mmol) 用 5 mL 水溶解加入到反应体系中, 常温反应 6 h, TLC 检测反应完全, 减压除

去溶剂。残余物加 30 mL 水稀释, 用 1 mol  $\cdot$  L $^{-1}$  的盐酸调 pH 至 4 ~ 5, 乙酸乙酯 (3 $\times$ 30 mL) 萃取, 合并有机相用无水硫酸钠干燥, 固液分离后减压除去溶剂, 得到 230 mg 淡黄色固体 **RE-03**, 收率 80%;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 8.16 (s, 1H), 7.76 ~ 7.66 (m, 2H), 7.60 ~ 7.42 (m, 3H), 7.29 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 7.18 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H), 6.98 (dd,  $J$  = 8.7, 2.0 Hz, 2H), 3.84 (d,  $J$  = 30.7 Hz, 6H)。 $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 160.67, 160.59, 159.84, 157.28, 145.57, 133.41, 131.47, 129.97, 128.93, 122.66, 119.61, 114.60, 113.61, 108.91, 95.47, 56.31, 55.66。ESI-Mass for  $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}_5$ :  $m/z$  ( $\text{M} + \text{H}$ ) $^+$  325.1, found 325.3。

**2.1.4 化合物 RE-04 ~ RE-15 的通用合成方法**, 以 **RE-05** 为例 将化合物 **RE-03** (120 mg, 0.37 mmol), HATU (140 mg, 0.37 mmol) 和 *N,N*-二异丙基乙胺 (190 mg, 1.47 mmol) 溶于 10 mL 四氢呋喃, 常温搅拌 20 min 后加入 (27 mg, 0.40 mmol) 的甲胺盐酸盐, 常温反应 6 h, TLC 检测反应完全, 减压除去溶剂。残余物使用 50 mL 二氯甲烷溶解, 使用水 (3 $\times$ 30 mL) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 固液分离后减压浓缩, 浓缩物经硅胶色谱柱层析纯化(洗脱剂: 石油醚-乙酸乙酯=3:1,  $V/V$ ), 得到 74.8 mg 白色固体 **RE-05**, 收率 60%;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Chloroform- $d$ )  $\delta$ : 7.71 (d,  $J$  = 1.0 Hz, 1H), 7.55 ~ 7.44 (m, 2H), 7.24 ~ 7.12 (m, 2H), 7.07 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 6.97 ~ 6.90 (m, 2H), 6.87 (dd,  $J$  = 2.2, 1.0 Hz, 1H), 6.58 (d,  $J$  = 5.2 Hz, 1H), 3.87 (d,  $J$  = 17.4 Hz, 6H), 3.05 (d,  $J$  = 5.0 Hz, 3H)。 $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, Chloroform- $d$ )  $\delta$ : 159.95, 159.77, 159.64, 156.37, 147.98, 133.04, 131.36, 129.64, 128.02, 127.85, 122.95, 119.52, 114.26, 109.47, 109.31, 94.70, 55.78, 55.35, 26.06。ESI-Mass for  $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{NO}_4$ :  $m/z$  ( $\text{M} + \text{H}$ ) $^+$  338.1, found 338.3。

采用同样方法, 使用 **RE-03** 和环己胺盐酸盐为原料, 合成化合物 **RE-04**, 得白色固体 85.50 mg, 收率 57%;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Chloroform- $d$ )  $\delta$ : 7.52 ~ 7.43 (m, 3H), 7.19 ~ 7.10 (m, 2H), 6.96 ~ 6.89 (m, 3H), 3.86 (dq,  $J$  = 9.5, 4.8 Hz, 1H), 3.82 (d,  $J$  = 0.7 Hz, 6H), 1.76 ~ 1.50 (m, 8H), 1.53 ~ 1.34 (m, 4H)。 $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 158.74, 158.67, 156.62, 155.12, 147.79, 131.75, 130.13, 128.85, 127.64, 121.92, 118.65, 113.49, 107.89, 107.52, 94.47, 55.10,



54.52, 47.30, 31.68, 24.51, 24.26。ESI-Mass for  $C_{25}H_{27}NO_4$ :  $m/z$  ( $M + H$ )<sup>+</sup> 406.2, found 406.3。

采用同样方法,使用 **RE-03** 和乙胺为原料,合成化合物 **RE-06**,得白色固体 77.39 mg,收率 62%;  $^1H$  NMR (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ : 7.76 (d,  $J = 0.8$  Hz, 1H), 7.50 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 7.38 (s, 1H), 7.25 ~ 7.13 (m, 2H), 7.07 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 6.97 ~ 6.90 (m, 2H), 6.86 ~ 6.85 (m, 1H), 4.69 (d,  $J = 5.8$  Hz, 2H), 3.86 (d,  $J = 10.9$  Hz, 6H), 1.63 (s, 3H)。  $^{13}C$  NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 159.92, 159.81, 158.46, 156.29, 148.98, 132.92, 131.30, 129.98, 128.78, 123.08, 119.75, 114.63, 109.01, 108.79, 95.54, 56.23, 55.63, 34.04, 15.27。ESI-Mass for  $C_{21}H_{21}NO_4$ :  $m/z$  ( $M + H$ )<sup>+</sup> 352.2, found 352.2。

采用同样方法,使用 **RE-03** 和正丙胺为原料,合成化合物 **RE-07**,得黄色固体 91.11 mg,收率 73%;  $^1H$  NMR (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ : 7.66 (d,  $J = 0.8$  Hz, 1H), 7.51 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.20 (d,  $J = 4.2$  Hz, 2H), 7.08 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 6.97 ~ 6.90 (m, 2H), 3.99 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 3.90 (s, 6H), 3.85 (s, 2H), 3.72 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 2.06 ~ 1.95 (m, 3H)。  $^{13}C$  NMR (101 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ : 159.92, 159.77, 158.97, 156.35, 148.09, 133.02, 131.35, 129.66, 128.01, 122.99, 119.58, 114.26, 109.48, 109.35, 94.73, 55.78, 55.35, 41.05, 22.97, 11.44。ESI-Mass for  $C_{22}H_{23}NO_4$ :  $m/z$  ( $M + H$ )<sup>+</sup> 366.2, found 366.3。

采用同样方法,使用 **RE-03** 和异丙胺为原料,合成化合物 **RE-08**,得白色固体 104.84 mg,收率 84%;  $^1H$  NMR (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ : 7.70 (s, 1H), 7.50 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 7.24 ~ 7.10 (m, 2H), 7.07 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 6.99 ~ 6.84 (m, 3H), 6.37 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 4.32 (dq,  $J = 13.2, 6.6$  Hz, 1H), 3.87 (d,  $J = 18.6$  Hz, 6H), 1.31 (d,  $J = 6.6$  Hz, 6H)。  $^{13}C$  NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 159.89, 159.81, 157.82, 156.27, 148.97, 132.90, 131.29, 129.98, 128.78, 123.08, 119.76, 114.64, 108.96, 108.71, 95.60, 56.24, 55.65, 41.14, 22.74。ESI-Mass for  $C_{22}H_{23}NO_4$ :  $m/z$  ( $M + H$ )<sup>+</sup> 366.2, found 366.3。

采用同样方法,使用 **RE-03** 和环丙胺为原料,合成化合物 **RE-09**,得白色固体 43.69 mg,收率 35%;  $^1H$  NMR (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ : 7.71

(d,  $J = 1.0$  Hz, 1H), 7.54 ~ 7.46 (m, 1H), 7.24 ~ 7.13 (m, 1H), 7.07 (d,  $J = 2.1$  Hz, 2H), 6.97 ~ 6.89 (m, 1H), 6.89 ~ 6.84 (m, 2H), 6.64 (d,  $J = 3.2$  Hz, 2H), 3.87 (d,  $J = 15.8$  Hz, 5H), 2.94 (tq,  $J = 7.2, 3.7$  Hz, 2H), 0.91 (td,  $J = 7.1, 5.3$  Hz, 1H), 0.73 ~ 0.64 (m, 3H)。  $^{13}C$  NMR (101 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ : 160.26, 160.00, 159.77, 156.35, 147.82, 133.06, 131.37, 129.63, 128.03, 122.89, 119.54, 114.26, 109.46 (d,  $J = 2.6$  Hz), 94.67, 55.77, 55.35, 22.52, 6.81。ESI-Mass for  $C_{22}H_{21}NO_4$ :  $m/z$  ( $M + H$ )<sup>+</sup> 364.2, found 364.3。

采用同样方法,使用 **RE-03** 和吡咯烷为原料,合成化合物 **RE-10** 白色固体 42.44 mg,收率 34%;  $^1H$  NMR (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ : 7.66 (d,  $J = 0.9$  Hz, 1H), 7.55 ~ 7.47 (m, 2H), 7.20 (d,  $J = 4.2$  Hz, 2H), 7.08 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 6.97 ~ 6.89 (m, 3H), 3.98 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.72 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 2.04 (d,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 1.96 (d,  $J = 6.7$  Hz, 2H)。  $^{13}C$  NMR (101 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ : 159.75 (d,  $J = 4.5$  Hz), 158.73, 156.56, 148.90, 132.75, 131.16, 129.74, 128.01, 123.07, 119.09, 114.25, 111.13, 109.52, 94.72, 55.77, 55.36, 48.08, 47.36, 26.62, 23.74。ESI-Mass for  $C_{23}H_{23}NO_4$ :  $m/z$  ( $M + H$ )<sup>+</sup> 378.2, found 378.3。

采用同样方法,使用 **RE-03** 和 3-羟基吡咯烷为原料,合成化合物 **RE-11**,得白色固体 31.20 mg,收率 25%;  $^1H$  NMR (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ : 7.64 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 7.49 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.18 (dt,  $J = 16.4, 9.1$  Hz, 2H), 7.08 (d,  $J = 16.4$  Hz, 1H), 7.03 (s, 1H), 6.89 (dd,  $J = 25.2, 11.7$  Hz, 3H), 4.65 (s, 1H), 4.58 (s, 1H), 4.17 ~ 4.05 (m, 2H), 3.85 (s, 6H), 2.14 (s, 1H), 2.03 (d,  $J = 15.8$  Hz, 1H), 1.26 (s, 1H)。  $^{13}C$  NMR (101 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$ : 159.73 (d,  $J = 4.1$  Hz), 158.87 (d,  $J = 4.8$  Hz), 156.51 (d,  $J = 7.8$  Hz), 148.31 (d,  $J = 12.0$  Hz), 132.64 (d,  $J = 9.1$  Hz), 131.03 (d,  $J = 10.2$  Hz), 129.70, 128.04, 122.85, 118.88 (d,  $J = 11.5$  Hz), 114.23, 111.39, 109.44 (d,  $J = 9.9$  Hz), 94.48 (d,  $J = 11.2$  Hz), 71.49, 68.73, 56.30, 56.03 ~ 55.43 (m), 55.36, 45.97, 45.35, 34.81, 32.21。ESI-Mass for  $C_{23}H_{23}NO_5$ :  $m/z$  ( $M + H$ )<sup>+</sup> 394.2, found 394.3。

采用同样方法,使用 **RE-03** 和甘氨酸甲酯盐酸盐为原料,合成化合物 **RE-12**,得白色固体 94.86 mg,收率 76%;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Chloroform- $d$ )  $\delta$ : 7.75 (d,  $J = 0.7$  Hz, 1H), 7.50 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 7.24 ~ 7.12 (m, 2H), 7.08 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 7.05 (t,  $J = 5.3$  Hz, 1H), 6.93 (d,  $J = 8.8$  Hz, 3H), 4.29 (d,  $J = 5.3$  Hz, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.84 (d,  $J = 8.5$  Hz, 6H)。  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 170.60, 160.22, 159.84, 159.05, 156.46, 148.13, 133.13, 131.45, 129.96, 128.82, 122.97, 119.63, 114.64, 110.04, 108.99, 95.52, 56.29, 55.65, 52.31, 41.15。 ESI-Mass for  $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{NO}_6$ :  $m/z$  ( $M + \text{H}$ ) $^+$  396.1, found 396.3。

采用同样方法,使用 **RE-03** 和苯胺为原料,合成化合物 **RE-13**,得淡黄色固体 19.97 mg,收率 16%;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 10.39 (s, 1H), 8.24 ~ 8.20 (m, 1H), 7.83 (d,  $J = 7.7$  Hz, 2H), 7.70 (s, 2H), 7.46 (d,  $J = 4.4$  Hz, 2H), 7.42 ~ 7.33 (m, 2H), 7.30 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 7.19 ~ 7.10 (m, 2H), 7.00 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.81 (s, 3H)。  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 160.31, 159.87, 157.21, 156.65, 148.30, 138.99, 133.20, 131.56, 129.96, 129.18, 128.83, 124.37, 122.96, 120.86, 119.71, 114.67, 110.63, 109.07, 95.61, 56.32, 55.68。 ESI-Mass for  $\text{C}_{25}\text{H}_{21}\text{NO}_4$ :  $m/z$  ( $M + \text{H}$ ) $^+$  400.2, found 400.3。

采用同样方法,使用 **RE-03** 和 3-氟苯胺为原料,合成化合物 **RE-14**,得淡黄色固体 57.41 mg,收率 46%;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Chloroform- $d$ )  $\delta$ : 8.29 (s, 1H), 7.86 (d,  $J = 1.0$  Hz, 1H), 7.69 (d,  $J = 10.8$  Hz, 1H), 7.52 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.37 ~ 7.32 (m, 2H), 7.21 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 7.11 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 6.99 ~ 6.90 (m, 3H), 6.88 (s, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.86 (d,  $J = 2.1$  Hz, 3H)。  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 163.72, 161.32, 160.44, 159.88, 157.37, 156.72, 147.91, 140.84, 140.73, 133.29, 131.61, 130.84, 130.74, 129.93, 128.83, 122.88, 119.68, 116.52 (d,  $J = 2.6$  Hz), 114.66, 111.13, 110.90, 110.69, 109.10, 107.65, 107.39, 95.56, 56.30, 55.65。 ESI-Mass for  $\text{C}_{25}\text{H}_{20}\text{FNO}_4$ :  $m/z$  ( $M + \text{H}$ ) $^+$  418.1, found 418.3。

采用同样方法,使用 **RE-03** 和苄胺为原料,合成化合物 **RE-15**,得白色固体 49.93 mg,收率 40%;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Chloroform- $d$ )  $\delta$ :

7.76 (d,  $J = 0.9$  Hz, 1H), 7.53 ~ 7.47 (m, 2H), 7.41 ~ 7.30 (m, 5H), 7.25 ~ 7.14 (m, 2H), 7.07 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 6.95 ~ 6.90 (m, 2H), 6.87 ~ 6.81 (m, 2H), 4.69 (d,  $J = 5.8$  Hz, 2H), 3.86 (d,  $J = 10.9$  Hz, 6H)。  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 160.04, 159.83, 158.74, 156.42, 148.67, 139.83, 133.00, 131.38, 129.97, 128.78, 127.82, 127.32, 123.08, 119.69, 114.64, 109.49, 108.98, 95.54, 56.26, 55.64, 42.60。 ESI-Mass for  $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{FNO}_4$ :  $m/z$  ( $M + \text{H}$ ) $^+$  414.2, found 414.3。

**2.1.5 化合物 RE-16、RE-17 的合成** 将化合物 **RE-03** (150 mg, 0.46 mmol), EDCI (110 mg, 0.57 mmol), DMAP (110 mg, 0.9 mmol), 苯磺酰胺 (80 mg, 0.51 mmol) 溶于 5 mL DMF, 常温反应 6 h, TLC 检测反应完全, 反应液加 50 mL 水稀释, 乙酸乙酯 (3  $\times$  30 mL) 萃取, 合并有机相并用无水硫酸钠干燥, 固液分离后减压浓缩, 浓缩物经硅胶色谱柱层析纯化 (洗脱剂: 二氯甲烷-甲醇 = 15 : 1,  $V/V$ ), 得到 67.6 mg 黄色固体 **RE-16**, 收率 32%;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Chloroform- $d$ )  $\delta$ : 8.90 (s, 1H), 8.23 ~ 8.16 (m, 2H), 7.80 (d,  $J = 1.0$  Hz, 1H), 7.69 ~ 7.64 (m, 1H), 7.58 (dd,  $J = 8.4, 6.9$  Hz, 2H), 7.50 ~ 7.43 (m, 2H), 7.17 (d,  $J = 16.4$  Hz, 1H), 7.12 ~ 7.06 (m, 2H), 6.94 ~ 6.87 (m, 3H), 3.87 (d,  $J = 25.1$  Hz, 6H)。  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 159.04, 157.84, 155.32, 154.76, 143.13, 137.81, 132.15, 131.66, 129.90, 127.71, 127.54, 126.65, 125.97, 120.77, 116.69, 112.59, 111.93, 108.21, 93.21, 54.24, 53.56。 ESI-Mass for  $\text{C}_{25}\text{H}_{21}\text{NO}_6\text{S}$ :  $m/z$  ( $M + \text{H}$ ) $^+$  464.1, found 464.3。

采用上述方法,使用 **RE-03** 和 4-三氟甲基苯磺酰胺为原料,合成化合物 **RE-17** 黄色固体 85.81 mg, 收率 54%;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Chloroform- $d$ )  $\delta$ : 8.94 (s, 1H), 8.37 ~ 8.30 (m, 2H), 7.95 ~ 7.76 (m, 3H), 7.52 ~ 7.43 (m, 2H), 7.17 (d,  $J = 16.3$  Hz, 1H), 7.09 (dd,  $J = 9.2, 7.1$  Hz, 2H), 6.95 ~ 6.88 (m, 2H), 6.89 ~ 6.83 (m, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.84 (s, 3H)。  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 161.25, 159.96, 157.51, 157.14, 145.17, 143.82, 134.27 ~ 133.13 (m), 132.04, 129.85 (d,  $J = 6.8$  Hz), 129.16, 128.78, 128.50, 126.93 (d,  $J = 3.7$  Hz), 125.19, 122.82, 122.48, 118.84, 114.70, 110.30, 95.30, 56.39 (d,  $J = 5.8$  Hz), 55.64 (d,  $J = 4.4$  Hz)。 ESI-Mass for

$C_{26}H_{20}NO_6S$ :  $m/z$  ( $M + H$ )<sup>+</sup> 532.1, found 532.4.

## 2.2 苯并呋喃类白藜芦醇衍生物的初步抗肿瘤活性测试

HCT116 细胞和 SW480 细胞在临床结肠癌患者中有较高的代表性,能够反映结肠癌的不同亚型。将处于对数生长期的 HCT116 和 SW480 细胞株以每孔 2000 个细胞接种到 96 孔板中,接种 80  $\mu$ L 细胞悬液。次日观察细胞状态,细胞贴壁完好后开始加药。药物终浓度为 20  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>,每个化合物设置 3 个复孔,每孔 20  $\mu$ L,使用白藜芦醇 (RE) 为阳性对照,37  $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub> 培养箱中避光孵育 72 h。孵育结束后,向每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 溶液,于培养箱中孵育 3 h 后在酶标仪上测定 450 nm 波长下吸光度。

## 3 结果与讨论

### 3.1 目标化合物的合成工艺分析

本文制备得到苯并呋喃类白藜芦醇衍生物。使用白藜芦醇为起始原料,首先通过 Vilsmeier-Haack 反应在 2 号位引入醛基,再将 3, 5, 4' 位的酚羟基甲基化,通过三氯化硼选择性脱去醛基邻位的甲基,最后通过 Rap-Stoermer 反应使白藜芦醇 2, 3 号位与  $\alpha$ -溴乙酸酯类生成呋喃环结构,通过水解反应和酰胺缩合获得多种酰基取代的衍生物。

在目标化合物的合成工艺中,最关键的地方在于保留白藜芦醇的 3 号位酚羟基为反应位点,同时使 5, 4' 位酚羟基不参与反应。最初的设计是在白藜芦醇上使用保护基保护 5, 4' 位的酚羟基,但由于 3 个酚羟基化学环境相似,缺乏选择性,难以获得产率较高的目标产物。进一步分析发现,2 号位引入醛基后,可能改变了 3 号位酚羟基的化学环境,但是在控制保护基选择性地保护 5, 4' 位酚羟基的尝试中,依旧未能获得高产率的目标产物。从文献中了解到部分试剂对羰基邻位的甲氧基具有明显的专一作用<sup>[30]</sup>。故而先对白藜芦醇醛进行甲基化处理,再尝试使用选择性去甲基化试剂脱去 3 号位甲氧基,分别进行探索 (见表 1),从表中可知反应试剂中三氯化硼 1.0 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 和二氯甲烷溶液反应所得目标化合物收率最佳为 85%。因此,最终选择三氯化硼 1.0 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 和二氯甲烷溶液为反应试剂获得中间体 III。脱甲基后的环化使用 Rap-Stoermer 反应,该反应的机制为  $\alpha$ -卤代酮与酚羟基先形成醚中间体,该反应在常温下即可进行;然后酮的  $\alpha$ -氢原子与邻位的醛发生分子内缩合,受热失去一分子水完成分子内环化 (见图 3),最终获得 RE-01。

表 1 选择性去甲基化条件探索

Tab 1 Exploration of selective demethylation conditions

| 反应试剂                                                             | 溶剂  | 反应时间/h | 温度/ $^{\circ}$ C | 收率    |
|------------------------------------------------------------------|-----|--------|------------------|-------|
| 二氯化铝 (AlCl <sub>3</sub> )                                        | DCM | 2 ~ 3  | 25               | 非目标产物 |
| 氯化锂 (LiCl)                                                       | DMF | 22     | 160              | < 20% |
| 三氯化硼 (BCl <sub>3</sub> ) 1.0 mol $\cdot$ L <sup>-1</sup> 和二氯甲烷溶液 | DCM | 2 ~ 3  | 0 ~ 25           | 85%   |
| 三氯化硼 (BCl <sub>3</sub> ) 1.0 mol $\cdot$ L <sup>-1</sup> 和正庚烷    | DCM | 2 ~ 3  | 0 ~ 25           | 无反应   |

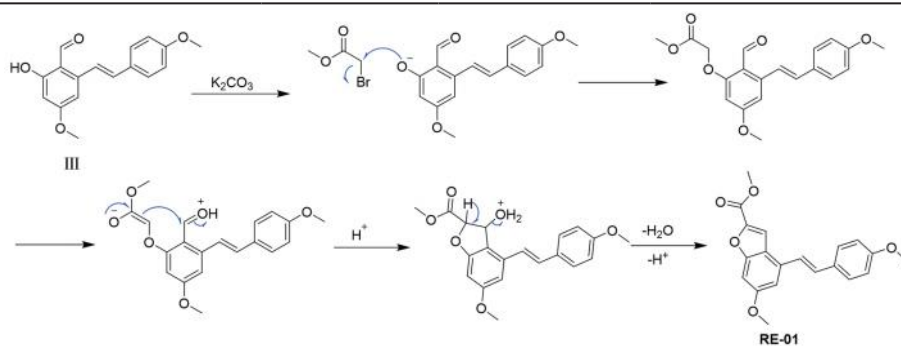


图 3 Rap-Stoermer 的反应机制

Fig 3 Reaction mechanism of Rap-Stoermer

### 3.2 抗肿瘤活性分析

在 HCT116 和 SW480 细胞中,抑制率高于 50% 的化合物均为酰胺取代的白藜芦醇-苯并呋喃衍生物。在 HCT116 细胞中,化合物在 20  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 浓度下对细胞增殖抑制率大于 50% 的有 RE-05、RE-06、RE-07、RE-09、RE-12、RE-13、RE-14 和 RE-15。其中,对 HCT116 细胞增殖

活性抑制作用最强的为 RE-13,抑制率 97.69%。在 SW480 细胞中,化合物在 20  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 浓度下对细胞增殖抑制率大于 50% 的有 RE-05、RE-06、RE-09、RE-10、RE-12、RE-13 和 RE-15。其中,对 SW480 细胞增殖活性抑制作用最强的为 RE-10,抑制率为 75.55% (见图 4)。



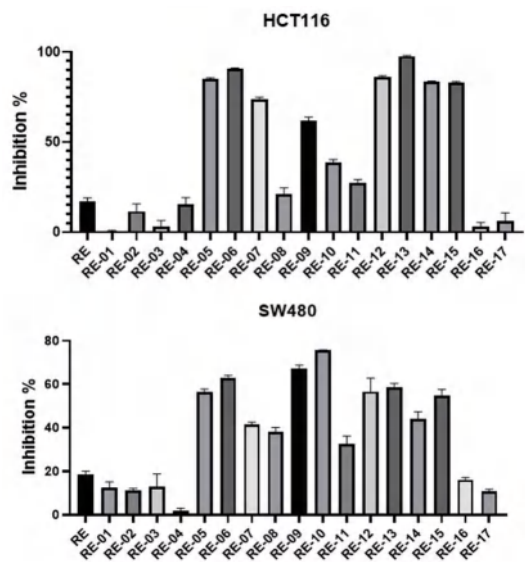


图 4 RE-01 ~ RE-17 在体外对不同细胞的抑制率  
Fig 4 In vitro inhibition rates of RE-01 to RE-17 on different cell lines

本研究测定了 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  RE ~ RE-17 的抗肿瘤活性，发现在 HCT116 和 SW480 细胞中这 18 种化合物的抗肿瘤活性具有一定的差异，因此，筛选出在两种细胞系中抑制率均大于 50% 的化合物 (RE-05、RE-06、RE-09、RE-12、RE-13、RE-15)，通过 CCK8 法测定化合物在 HCT116、SW480 细胞中的  $IC_{50}$ ，以进一步评价化合物的抗肿瘤活性，结果显示，优化得到的化合物在两种结肠癌细胞系中均呈现了较好的细胞活性，其中在 HCT116 细胞中，RE-06、RE-12、RE-15 的  $IC_{50}$  分别达到了 0.168、0.178、0.781  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ；在 SW480 细胞中 RE-12、RE-13、RE-15 的  $IC_{50}$  分别达到了 1.104、0.359、1.449  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (见表 2)。这些实验结果表明，采用药效基团拼接策略优化得到的化合物展现出优异的细胞活性。

表 2 7 种化合物在 HCT116 和 SW480 中的  $IC_{50}$  值  
Tab 2  $IC_{50}$  values of seven compounds in HCT116 and SW480 cells

| 化合物   | HCT116/ ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | SW480/ ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) |
|-------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| RE    | 27.650 $\pm$ 3.058                              | 75.890 $\pm$ 1.121                             |
| RE-05 | 4.181 $\pm$ 0.564                               | 10.640 $\pm$ 0.663                             |
| RE-06 | 0.168 $\pm$ 0.0645                              | 9.310 $\pm$ 1.499                              |
| RE-09 | 4.621 $\pm$ 0.225                               | 3.561 $\pm$ 0.134                              |
| RE-12 | 0.178 $\pm$ 0.0204                              | 1.104 $\pm$ 0.047                              |
| RE-13 | 1.892 $\pm$ 0.06367                             | 0.359 $\pm$ 0.006                              |
| RE-15 | 0.781 $\pm$ 0.021                               | 1.449 $\pm$ 0.038                              |

4 结论

本研究以白藜芦醇为先导化合物，通过文献检索发现，苯并呋喃结构具有良好的抗肿瘤活性，且临床上应用的呋喃替尼亦包含此类结构。因此，本文采用药效团拼合原理，将苯并呋喃结

构引入白藜芦醇的苯环上，设计并合成了 17 个苯并呋喃类的白藜芦醇衍生物。体外抗肿瘤细胞增殖活性测试表明，这些白藜芦醇 - 苯并呋喃衍生物在 HCT116 细胞和 SW480 细胞中均展现出较高的抑制活性，但在两种细胞系中的活性有所差异。根据 HCT116 细胞系的检测结果，17 个苯并呋喃衍生物中，有 8 个衍生物的抑制率超过 50%。其中，抑制 HCT116 细胞活性效果最佳的化合物为 RE-13，其细胞抑制率从白藜芦醇的 17.26% 提高至 97.69%。然而，在以苯磺酰胺取代的化合物 RE-16 和 RE-17 中，抗肿瘤活性低于白藜芦醇，这可能与磺酰基改变化合物的空间结构有关。在 SW480 细胞系中，RE-05、RE-06、RE-09、RE-10、RE-12、RE-13 和 RE-15 的抑制率均高于 50%，其中，RE-10 对 SW480 细胞增殖的抑制率最高，达到 75.55%。在两种细胞系中 RE-05、RE-06、RE-07 的化合物活性都具有一样的趋势，这 3 个化合物的取代基分别是甲胺、乙胺、丙胺，其中取代基为乙胺时，化合物的活性最好。有意思的是，机制将直链取代基更改为异丙胺后，化合物在两种细胞系中的活性都呈现了不同的下降程度，将其更换为环丙胺后，化合物活性又得到了提升。因此，机制尝试设计合成具有三元环、五元环和六元环的分子得到了 RE-09、RE-10、RE-11、RE-04、RE-13、RE-15、RE-16、RE-17，在 HCT116 细胞中活性最好的化合物 RE-13 的结构特征在于其取代基含有苯环，并且其他的酰胺取代基含苯环的化合物活性都较好。机制将取代基改为 3- 氟苯甲胺和苯乙胺得到了 RE-14 和 RE-15，发现化合物的抑制活性在两种细胞系中都分别降低，这说明取代基为苯胺时更有利于化合物的抗肿瘤活性。机制通过比较化合物在两种细胞系中的抑制率，筛选出了 RE-05、RE-06、RE-09、RE-12、RE-13、RE-15 共 6 个化合物检测其在 SW480 细胞中的  $IC_{50}$  值，以进一步评估化合物的活性。在 HCT116 细胞中，RE-06、RE-12、RE-15 的  $IC_{50}$  分别达到了 0.168、0.178、0.781  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ；在 SW480 细胞中 RE-12、RE-13、RE-15 的  $IC_{50}$  分别达到了 1.104、0.359、1.449  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。这与前面所述的构效分析基本吻合，也再次证明了该优化策略的有效性。此外，这些结果表明，白藜芦醇与苯并呋喃的结构融合对提升化合物的抗肿瘤活性具有潜在的积极作用，并且本研究对呋喃环上进行酰胺取代也产生了一系列的活性分子，多数是有利的，这为白藜芦醇衍生物的药物开发提供了一条新的优化思路。

## 参考文献

- [1] 王白燕, 汤江月, 韩倩倩, 等. 中药有效成分防治结肠癌机制研究进展 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2024, 26 (4): 1001-1007.
- [2] 郭兰伟, 张兴龙, 蔡林, 等. 全球结直肠癌流行和防控现状 [J]. 中华肿瘤杂志, 2024, 46 (1): 57-65.
- [3] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71 (3): 209-249.
- [4] Cao W, Chen HD, Yu YW, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020 [J]. Chin Med J (Engl), 2021, 134 (7): 783-791.
- [5] 任彩佩. 白藜芦醇通过抑制细胞焦亡抗结肠癌的机制 [D]. 太原: 山西医科大学, 2022.
- [6] Wen J, Min XJ, Shen MQ, et al. ACLY facilitates colon cancer cell metastasis by CTNNB1 [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38 (1): 401.
- [7] Johnson IT. Cruciferous vegetables and risk of cancers of the gastrointestinal tract [J]. Mol Nutr Food Res, 2018, 62 (18): e1701000.
- [8] Metere A, Giacomelli L. Absorption, metabolism and protective role of fruits and vegetables polyphenols against gastric cancer [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21 (24): 5850-5858.
- [9] Bishayee A, Sethi G. Bioactive natural products in cancer prevention and therapy: progress and promise [J]. Semin Cancer Biol, 2016, 40-41: 1-3.
- [10] Brockmueller A, Sajeev A, Koklesova L, et al. Resveratrol as sensitizer in colorectal cancer plasticity [J]. Cancer Metastasis Rev, 2024, 43 (1): 55-85.
- [11] Vastano BC, Chen Y, Zhu N, et al. Isolation and identification of stilbenes in two varieties of *Polygonum cuspidatum* [J]. J Agric Food Chem, 2000, 48 (2): 253-256.
- [12] Ariyanto EF, Danil AS, Rohmawaty E, et al. Effect of resveratrol in melinjo seed (*Gnetum gnemon* L.) extract on type 2 diabetes mellitus patients and its possible mechanism: a review [J]. Curr Diabetes Rev, 2023, 19 (2): e280222201512.
- [13] 王新萍, 郭芹, 李甜, 等. 植物中白藜芦醇提取和检测方法研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11 (21): 7957-7965.
- [14] Wu SX, Xiong RG, Huang SY, et al. Effects and mechanisms of resveratrol for prevention and management of cancers: an updated review [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2023, 63 (33): 12422-12440.
- [15] Wang Q, Yu Q, Wu M. Antioxidant and neuroprotective actions of resveratrol in cerebrovascular diseases [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 948889.
- [16] Buhrmann C, Shayan P, Popper B, et al. Sirt1 is required for resveratrol-mediated chemopreventive effects in colorectal cancer cells [J]. Nutrients, 2016, 8 (3): 145.
- [17] Ren B, Kwah MX, Liu C, et al. Resveratrol for cancer therapy: challenges and future perspectives [J]. Cancer Lett, 2021, 515: 63-72.
- [18] Sale S, Verschoyle RD, Boocock D, et al. Pharmacokinetics in mice and growth-inhibitory properties of the putative cancer chemopreventive agent resveratrol and the synthetic analogue trans 3, 4, 5, 4'-tetramethoxystilbene [J]. Br J Cancer, 2004, 90 (3): 736-744.
- [19] Suh N, Paul S, Hao XP, et al. Pterostilbene, an active constituent of blueberries, suppresses aberrant crypt foci formation in the azoxymethane-induced colon carcinogenesis model in rats [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13 (1): 350-355.
- [20] Walle T. Bioavailability of resveratrol [J]. Ann N Y Acad Sci, 2011, 1215: 9-15.
- [21] Pervaiz S, Holme AL. Resveratrol: its biologic targets and functional activity [J]. Antioxid Redox Signal, 2009, 11 (11): 2851-2897.
- [22] Tan SR, Zhang SY, Zhou N, et al. Efficacy and safety of fruquintinib dose-escalation strategy for elderly patients with refractory metastatic colorectal cancer: a single-arm, multicenter, phase II study [J]. Cancer Med, 2023, 12 (24): 22038-22046.
- [23] Radadiya A, Shah A. Bioactive benzofuran derivatives: an insight on lead developments, radioligands and advances of the last decade [J]. Eur J Med Chem, 2015, 97: 356-376.
- [24] Miao YH, Hu YH, Yang J, et al. Natural source, bioactivity and synthesis of benzofuran derivatives [J]. RSC Adv, 2019, 9 (47): 27510-27540.
- [25] Promchai T, Janhom P, Maneerat W, et al. Antibacterial and cytotoxic activities of phenolic constituents from the stem extracts of *Spatholobus parviflorus* [J]. Nat Prod Res, 2020, 34 (10): 1394-1398.
- [26] Ha HJ, Kang DW, Kim HM, et al. Discovery of an orally bioavailable benzofuran analogue that serves as a  $\beta$ -amyloid aggregation inhibitor for the potential treatment of Alzheimer's disease [J]. J Med Chem, 2018, 61 (1): 396-402.
- [27] Baldisserotto A, Demurtas M, Lampronti I, et al. Benzofuran hydrazones as potential scaffold in the development of multifunctional drugs: synthesis and evaluation of antioxidant, photoprotective and antiproliferative activity [J]. Eur J Med Chem, 2018, 156: 118-125.
- [28] 鲍亮亮. 白藜芦醇衍生物的合成和抗氧化性能研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2018.
- [29] 葛晓琳. 白藜芦醇氰乙酰胺类衍生物的合成及其活性评价 [D]. 合肥: 合肥工业大学, 2013.
- [30] 吴凯群, 许刘华, 翁玲玲, 等. 甲基醚的选择性去甲基试剂 [J]. 化学研究与应用, 2004, 16 (2): 165-168.

(收稿日期: 2024-11-20; 修回日期: 2025-02-18)

# 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取法和水蒸气蒸馏法提取的花椒精油成分分析及其抑菌活性、抗氧化活性的比较

张蕾<sup>1</sup>, 王友峰<sup>2</sup>, 杨乐<sup>3</sup>, 徐昌艳<sup>2</sup>, 覃容贵<sup>2</sup>, 彭梅<sup>4</sup>, 罗忠圣<sup>4\*</sup> (1. 观山湖区妇幼保健院, 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学药学院, 贵州 安顺 561000; 3. 德江县平原镇人民政府, 贵州 德江 565200; 4. 贵州省天然产物研究中心, 贵阳 550014)

**摘要:** **目的** 比较超临界 CO<sub>2</sub> 萃取法 (SFE) 和水蒸气蒸馏法 (SD) 提取的花椒精油在化学成分、抗菌和抗氧化活性上的差异。**方法** 采用 SFE 和 SD 提取花椒精油, 利用气相色谱-质谱联用技术分析其化学成分, 并计算各成分的相对含量; 采用滤纸片法评价其体外抗菌活性; 运用 DPPH 法和 ABTS 法考察其抗氧化活性。**结果** SFE 和 SD 提取的精油得率分别为 9.40%、11.76%, 化学成分以萜醇类和萜烯类化合物为主, 共有成分 8 种, 其中含量较高的共有成分为芳樟醇和柠檬烯; SFE 精油中化学成分种类更多, 包含烷烃类和酮类化合物。两种精油对大肠埃希菌、耻垢分枝杆菌、铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌均有抑菌、杀菌效果, SD 精油活性强于 SFE 精油。两种精油对 DPPH 自由基均有一定的清除能力, 且 SFE 精油更强; SFE 精油对 ABTS<sup>+</sup> 自由基有清除能力, 而 SD 精油无活性。**结论** 两种精油化学成分种类及相对含量差异较大; SD 精油抑菌活性较好, 而 SFE 精油抗氧化活性较好。

**关键词:** 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取法; 水蒸气蒸馏法; 花椒精油; 气相色谱-质谱联用; 抗菌活性; 抗氧化活性

中图分类号: R284.1, R283 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)08-2187-06  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.007

## Composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oils from *Zanthoxylum schinifolium* by supercritical CO<sub>2</sub> extraction and steam distillation

ZHANG Lei<sup>1</sup>, WANG You-feng<sup>2</sup>, YANG Le<sup>3</sup>, XU Chang-yan<sup>2</sup>, QIN Rong-gui<sup>2</sup>, PENG Mei<sup>4</sup>, LUO Zhong-sheng<sup>4\*</sup> (1. Maternal and Child Health Centre of Guanshanhu District, Guiyang 550025; 2. Guizhou Medical University, Anshun Guizhou 561000; 3. People's Government of Pingyuan in Dejiang County, Dejiang Guizhou 565200; 4. Guizhou Research Centre for Natural Products, Guiyang 550014)

**Abstract: Objective** To compare the differences in composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oils from *Zanthoxylum schinifolium* by supercritical CO<sub>2</sub> extraction (SFE) and steam distillation (SD). **Methods** Essential oils of *Zanthoxylum schinifolium* were extracted by SFE and SD, and the chemical components were analyzed by GC-MS. The relative content of each component was calculated. The in vitro antimicrobial activity was evaluated with the filter paper method, while the antioxidant activity by the DPPH method and ABTS method. **Results** The yields of the essential oils by SFE and SD were 9.40% and 11.76%, respectively. The chemical components of the two essential oils were mainly terpenoids and terpenes, with 8 common components. Among them, linalool and limonene were the common components with higher content. In addition, essential oils by SFE contained many chemical components, including alkanes and ketones. Both essential oils showed bacteriostatic and bactericidal effects against *Escherichia coli*, *Mycobacterium smegmatis*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus*. Essential oils by SD had stronger activity

**基金项目:** 铜仁市科技支撑项目 (No.2024-63); 贵州省科技支撑项目 (No.2021-129); 贵州省科技成果转化项目 (No.2023-63)。

**作者简介:** 张蕾, 女, 主管药师, 主要从事中药药剂学临床应用研究, email: 47258653@qq.com \*通信作者: 罗忠圣, 男, 副主任药师, 主要从事药食两用健康产品研发, email: 1052318167@qq.com



than essential oils by SFE. Both essential oils had a certain ability to scavenge DPPH free radicals, with stronger activity in essential oils by SFE. Essential oils by SFE could scavenge ABTS<sup>+</sup> free radicals, while SD Essential oils by was not active. **Conclusion** The essential oils by both methods show significant differences in chemical compositions and related content. SD essential oils has better antibacterial activity, while essential oils by SFE has better antioxidant activity.

**Key words:** supercritical CO<sub>2</sub> extraction; water vapor distillation; essential oils of *Zanthoxylum schinifolium*; GC-MS; antibacterial activity; antioxidant activity

花椒为芸香科青椒 *Zanthoxylum schinifolium* Sieb. et Zucc. 或花椒 *Zanthoxylum bungeanum* Maxim 的干燥成熟果皮, 其味辛、性温, 具有温中止痛、杀虫止痒的功效<sup>[1]</sup>, 是传统药食两用作物<sup>[2]</sup>, 主要含有精油、黄酮、生物碱和脂肪酸等多种活性成分<sup>[3]</sup>。其中, 精油是花椒中挥发性的主要含香物质, 具有抑菌防腐<sup>[4]</sup>、抗炎<sup>[5]</sup>、镇痛<sup>[6]</sup>和抗氧化<sup>[7]</sup>等药理作用, 开发潜力很大。课题组前期研究发现, 水蒸气蒸馏法 (SD) 提取的精油颜色为无色透明油状液体, 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取法 (SFE) 提取的精油为黄色油状液体, 与 SD 提取的精油相比, SFE 提取的精油香气更为浓郁, 猜测两种精油在化学成分上可能存在差异, 导致其抑菌和抗氧化活性也有差异。本研究分别以 SFE、SD 提取的花椒精油为研究对象, 通过 GC-MS 分析其化学成分, 采用滤纸片法和平板涂布法研究其抗菌活性, 运用 DPPH 法和 ABTS 法研究其抗氧化活性, 比较两者的差异, 以期为花椒精油在抗菌剂、抗氧化剂等精加工产品中的开发利用提供基础数据。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

QE-500 高能万能粉碎机 (浙江屹立工贸有限公司); HA120-40-0.5 超临界装置 (南通华安超临界萃取有限公司); BSM-320.3 电子天平 (十万分之一, 上海卓精电子科技有限公司); GCMS-QP2010C 气相色谱-质谱联用仪 (日本岛津公司); GHP-160 隔水式培养箱 (常州朗越仪器制造有限公司); SW-CJ-1D 单人净化工作台 (苏州净化设备有限公司); WGZ-XT 智能细菌浊度仪 (杭州齐威仪器有限公司); GR85DA 高压灭菌器 (南京聚康医药化工有限公司); 98-1-B 电子调温电热套、101-1AB 电热鼓风干燥箱 (天津市泰斯特仪器有限公司)。

### 1.2 试剂

花椒由德江县万进花椒种植专业合作社提供, 经贵州医科大学覃容贵教授鉴定为芸香科青椒 *Zanthoxylum schinifolium* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果皮。

C10389 大肠埃希菌 (E)、ATCC43300 金黄色葡萄球菌 (S)、ATCC9027 铜绿假单胞菌 (P)、ATCC700044 耻垢分枝杆菌 (M)(中国药品检定研究院); 营养肉汤 (批号: 20210309, 杭州百思生物技术有限公司), 注射用头孢呋辛钠 (批号: F2210602, 苏州二叶制药有限公司), 营养琼脂 (批号: 20211018, 青岛高科技工业海博生物技术有限公司), 1, 1-二苯基-2-苦基苯肼 (DPPH, 纯度 ≥ 97.0%)、2, 2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 (ABTS, 纯度: 98%)(上海麦克林生化科技有限公司), 维生素 C (纯度 ≥ 99%, 上海源叶生物科技有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 花椒精油提取

采用 SFE 和 SD 两种方法提取花椒的精油, 通过公式 (1) 计算两种方法提取精油的得率 (Yield)。

$$\text{得率}(\%) = M_1/M_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中,  $M_1$  为花椒精油质量,  $M_0$  为花椒的投入质量。

SFE: 经课题组前期优化, 称取过 40 目花椒粉 30 g, 在萃取压力 14 MPa、CO<sub>2</sub> 流量 18 L·h<sup>-1</sup>、萃取温度 55 °C 条件下进行萃取, 收集萃取物, 室温静置后为黄色油状液体, 香气较浓 (SFE 精油)。

SD: 参照罗忠圣等<sup>[8]</sup>的报道, 称取过 60 目花椒粉 100 g, 在料液比 1:20 (g/mL)、浸泡时间 40 min、蒸馏时间 120 min 的条件下提取, 经无水硫酸钠脱水得到有特殊香气的透明液体 (SD 精油)。

结果 SFE 精油的平均得率是 9.40%, SD 精油的平均得率是 11.76%, SD 法的提取效率更高。

### 2.2 花椒精油成分分析

取花椒精油 10 μL, 用二氯甲烷稀释 1000 倍, 取 1 μL 用固相微萃取装置萃取, 以微萃取小瓶装样, 置于水浴锅 (60 ~ 75 °C) 萃取 30 min, 备用。

参照色谱条件<sup>[9]</sup>进行 GC-MS 检测, 结果见图 1。采用面积归一化法计算花椒精油各成分相对含量, 从表 1 中可以看出, 两种精油共检测出 20 种成

分, SFE 精油和 SD 精油的成分分别为 18 种和 10 种。SFE 精油中 18 种成分占总峰面积相对含量较高的成分有  $\beta$ - 芳樟醇 (72.44%)、D- 柠檬烯 (4.94%)、 $\alpha$ - 松油醇 (2.89%)、侧柏烯 (2.34%)、 $\beta$ - 月桂烯 (2.20%)、 $\beta$ - 水芹烯 (1.14%)。SD 精油相对含量较高的成分有  $\beta$ - 芳樟醇 (91.10%)、D- 柠檬烯 (3.12%)、 $\beta$ - 月桂烯 (1.13%)、4- 萜品醇 (1.04%)，可见 SFE 精油和 SD 精油成分主要以萜醇和萜烯为主。两种精油相同成分有 8 种，分别为侧柏烯、 $\beta$ - 水芹烯、 $\beta$ - 月桂烯、D- 柠檬烯、 $\beta$ - 罗勒烯、 $\alpha$ - 侧柏酮、 $\beta$ - 芳樟醇、 $\alpha$ - 松油醇。由表 2 可知，SFE 精油的组成中除了萜烯和萜醇类化合物含量较高外，还有烷烃类和酮类化合物。而 SD 精油的组成以萜醇和萜烯类化合物为主。

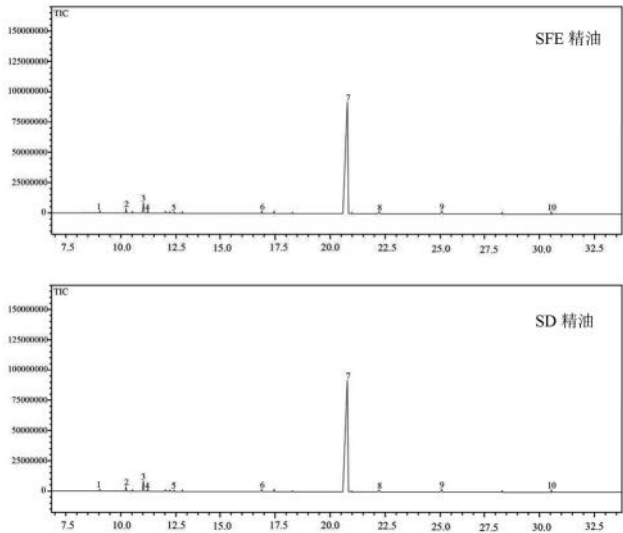


图 1 两种方法提取的花椒精油的主要成分  
Fig 1 Main compositions of essential oils of *Zanthoxylum schinifolium* extracted by two methods

2.3 两种方法提取的花椒精油的抑菌效果

在超净工作台中，将金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、耻垢分枝杆菌分别接种于营养琼脂培养基上，37℃培养箱培养 24 h<sup>[10]</sup>。用接种环从固体培养基上取菌种置于 10 mL 灭菌营养肉汤中，摇匀，放入培养箱 24 h 作为种子液，用无菌水稀释，配制成含菌数约为 1.5×10<sup>6</sup> CFU·mL<sup>-1</sup> 的菌悬液，备用<sup>[11]</sup>。

采用滤纸片法，通过测定抑菌圈的大小来判断花椒精油的抑菌效果。将已灭菌处理且直径为 5 mm 的圆滤纸片浸在体积分数为 50%、25%、12.5%、6.25% 的两种精油溶液中 30 min。取培养皿，倒入融化的琼脂培养基，待其凝固后，作为底层。取菌悬液 100 μL 涂布在琼脂培养基上。再将浸泡过的滤纸片放在培养基的对应区域，依次将平板均分为 6 个区域，将平板在 37℃培养箱中

表 1 两种方法提取的花椒精油化学成分及相对含量  
Tab 1 Chemical compositions and relative contents of essential oils from *Zanthoxylum schinifolium* extracted by two methods

| 序号 | 化合物                  | 分子式                                            | 相对含量 /% |       |
|----|----------------------|------------------------------------------------|---------|-------|
|    |                      |                                                | SFE 精油  | SD 精油 |
| 1  | 3, 7- 二甲基癸烷          | C <sub>12</sub> H <sub>26</sub>                | 2.40    | —     |
| 2  | 侧柏烯                  | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>                | 2.34    | 0.51  |
| 3  | $\beta$ - 水芹烯        | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>                | 1.14    | 0.53  |
| 4  | $\beta$ - 月桂烯        | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>                | 2.20    | 1.13  |
| 5  | $\alpha$ - 松油烯       | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>                | 0.90    | —     |
| 6  | D- 柠檬烯               | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>                | 4.94    | 3.12  |
| 7  | 4, 6- 二甲基十二烷         | C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>                | 3.74    | —     |
| 8  | $\beta$ - 罗勒烯        | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>                | 0.89    | 0.28  |
| 9  | p- 聚散花素              | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>                | 0.59    | —     |
| 10 | 4- 萜烯                | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>                | 0.55    | —     |
| 11 | $\alpha$ - 侧柏酮       | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O              | 0.95    | 0.51  |
| 12 | 1, 3- 二叔丁基苯          | C <sub>14</sub> H <sub>22</sub>                | 0.50    | —     |
| 13 | 顺 - 芳樟醇氧化物           | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub> | 0.87    | —     |
| 14 | 2, 6, 10, 15- 四甲基十七烷 | C <sub>21</sub> H <sub>44</sub>                | 1.07    | —     |
| 15 | $\beta$ - 芳樟醇        | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O              | 72.44   | 91.10 |
| 16 | $\alpha$ - 松油醇       | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O              | 2.89    | 0.97  |
| 17 | 环氧芳樟醇                | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub> | 0.51    | —     |
| 18 | 反式 - 橙花叔醇            | C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O              | 1.08    | —     |
| 19 | 4- 萜品醇               | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O              | —       | 1.04  |
| 20 | 反式 - 橙花叔醇            | C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O              | —       | 0.32  |

注：“—”表示未检出。  
Note: “—” Means not detected.

表 2 两种方法提取的花椒精油的组成分类和相对含量  
Tab 2 Composition classifications and relative contents of essential oils from *Zanthoxylum schinifolium* extracted by two methods

| 化合物种类 | 精油相对含量 % |       |
|-------|----------|-------|
|       | SFE      | SD    |
| 萜醇    | 76.92    | 93.43 |
| 萜烯    | 12.96    | 5.57  |
| 烷烃    | 7.21     | —     |
| 酮类    | 0.95     | 0.51  |
| 其他    | 1.96     | —     |
| 合计    | 100.00   | 99.51 |

注：“—”表示未检出。  
Note: “—” Means not detected.

倒置 24 h，测定抑菌圈大小<sup>[12]</sup>。  
由图 2、图 3 可知，两种提取方法的花椒精油对大肠埃希菌、耻垢分枝杆菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌均具有抑菌活性；抑菌效果随精油体积分数的增高而增大。当精油的体积分数相同时，SD 精油对 4 种细菌的抑菌圈要大于 SFE 精油。当精油体积分数为 50% 时，两种提取方法的花椒精油对铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌的抑菌效力高于大肠埃希菌、耻垢分枝杆菌。

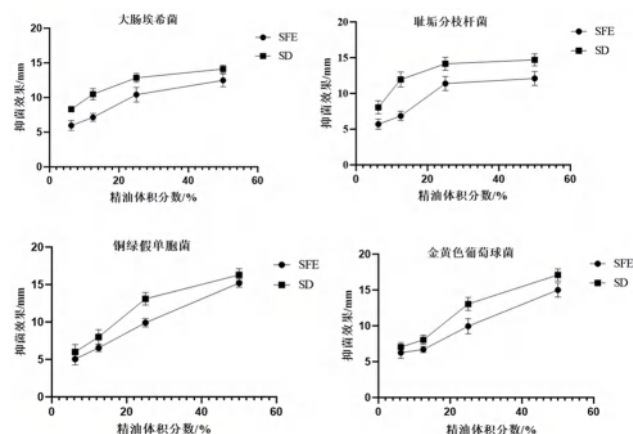


图2 两种方法提取的花椒精油的抑菌效果图

Fig 2 Antibacterial effect of essential oils from *Zanthoxylum schinifolium* extracted by two methods

## 2.4 两种方法提取的花椒精油对四种细菌的最小抑菌浓度 (MIC)、最小杀菌浓度 (MBC) 测定

用平板涂布法测定 MIC, 将适量融化的营养琼脂培养基倒入空白培养皿中。凝固后, 密封, 低温保存, 备用。向 NA 培养基中加入 100  $\mu\text{L}$  菌悬液, 涂布均匀, 再加入用二甲基亚砜 (DMSO) 稀释体积分数为 16%、8%、4%、2%、1% 的花椒精油 20  $\mu\text{L}$ , 以注射用头孢呋辛钠 (0.25 mg/mL) 作为阳性对照组, 以 DMSO 溶剂作空白对照, 再次涂布均匀, 每个体积分数下涂三块板, 并对平板进行标记。涂布后, 将 NA 培养基倒置放入 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中 24 h, 并记录平板中细菌的生长。以培养基中无菌生长的花椒精油浓度为 MIC。

将含菌培养基继续放置在 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养 24 h, 观察各花椒精油浓度下的含菌培养基的菌种生长情况, 若培养基无菌长出, 则认为该浓度下的花椒精油为该菌的 MBC。

由图 4 可知, SD 精油对细菌的抑制或杀灭作用都强于 SFE 精油。两种精油对耻垢分枝杆菌的抑制作用最强, SFE 精油的 MIC 为 4%, SD 精油为 2%。SFE 精油对其他 3 种细菌的 MIC 均为 8%, SD 精油为 4%。两种精油对大肠埃希菌和铜绿假单胞菌的杀菌作用相同, MBC 均为 8%; SFE 精油对耻垢分枝杆菌表现出较弱的杀灭作用 MBC 为 16%, SD 精油为 8%; 在这 4 种细菌中, SD 精油对金黄色葡萄球菌的杀灭作用最强, MBC 为 2%, 其 SFE 精油为 8%。

## 2.5 两种方法提取的花椒精油的抗氧化活性

本研究选取 DPPH 法和 ABTS 法对花椒精油的抗氧化活性进行测定, 参考标准 GB/T 39100-2020<sup>[13]</sup>, 并进行适当修改。

### 2.5.1 DPPH 法 准确称量 2 mg DPPH, 用无水乙醇

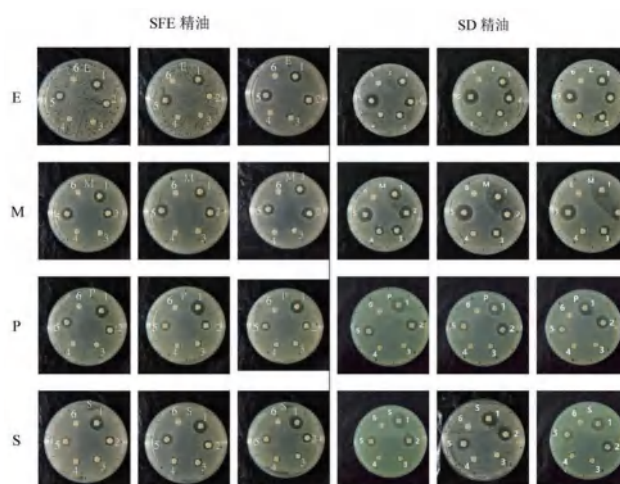


图3 两种方法提取的花椒精油的抑菌图

Fig 3 Antibacterial diagrams of essential oils from *Zanthoxylum schinifolium* extracted by two methods

注: 1~4 号分别为 50%、25%、12.5%、6.25% 的花椒精油浓度; 5 号为头孢呋辛钠 (阳性对照组); 6 号以 DMSO 为空白对照组; E 为大肠埃希菌, M 为耻垢分枝杆菌, P 为铜绿假单胞菌, S 为金黄色葡萄球菌。

Note: No.1 to 4 show 50%, 25%, 12.5% and 6.25% of essential oils from *Zanthoxylum schinifolium*; No.5 is cefuroxime sodium (the positive control group); No.6 is DMSO (the blank control group); E is *Escherichia coli*, M is *M. perfringens*, P is *Pseudomonas aeruginosa* and S is *Staphylococcus aureus*.

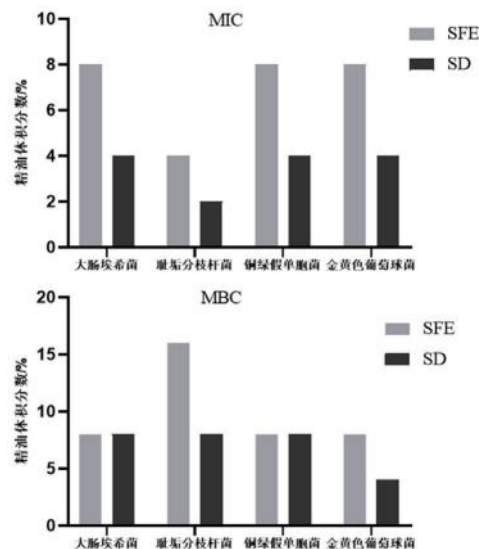


图4 两种方法提取的花椒精油的 MIC、MBC 图

Fig 4 MIC and MBC spectra of essential oils from *Zanthoxylum schinifolium* extracted by two methods

溶解定容至 10 mL, 得 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 DPPH 工作液, 制成 5~70  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的对照品溶液, 暗处保存备用。取 SFE 精油用无水乙醇配制成 5、10、20、30、40、50 和 60  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 取 SD 精油用无水乙醇配制成 80、100、120、140、160、180 和 200  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的供试品溶液。每个浓度下, 取 3 支试管, 第一支中加



入 1 mL 样品溶液、3 mL DPPH 溶液, 第二支中加入 1 mL 样品溶液、3 mL 无水乙醇, 第三支加入 1 mL 无水乙醇、3 mL DPPH 溶液, 室温避光反应 60 min, 于 517 nm 处测定吸光度值, 分别为  $A_0$ 、 $A_1$ 、 $A_2$ , 计算清除率及半抑制浓度 ( $IC_{50}$ )。

DPPH 自由基清除率 (%) =  $[1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$

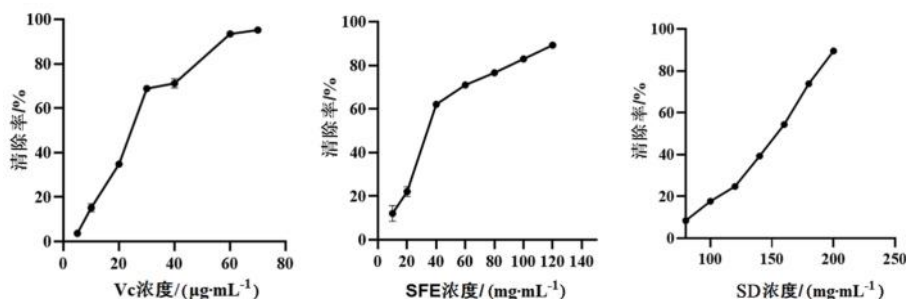


图 5 两种方法提取的花椒精油对 DPPH 自由基的清除能力

Fig 5 Scavenging ability of essential oils from *Zanthoxylum schinifolium* extracted by two methods on DPPH free radicals

**2.5.2 ABTS 法** ABTS<sup>+</sup>自由基工作液的制备: 称取 0.046 g ABTS 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 定容至 10 mL, 得 A 液。称取 0.007 g 过硫酸钾用 PBS 定容至 10 mL, 得 B 液。将 A 液和 B 液等体积混合置于暗处反应 12 h, 即得 ABTS<sup>+</sup>自由基工作液, 取适量 PBS 溶液将 ABTS 工作液稀释, 734 nm 下的吸光度值为  $0.700 \pm 0.02$ 。

样品溶液的制备: 取 SD 精油用无水乙醇配制成 50、100、200、300、400、500 和 600  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的供试品溶液。取 SFE 精油用无水乙醇配制成 12.5、50、100、200、400 和 800  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的供试品溶液。每个浓度下, 取三支试管, 第一支中加入 0.4 mL 样品溶液、3.6 mL ABTS 溶液, 室温避光反应 5 min; 第二支中加入 0.4 mL 无水乙醇、3.6 mL ABTS 溶液; 第三支中加入 0.4 mL 样品溶液、3.6 mL 无水乙醇, 室温避光反应 5 min。于 734 nm 处测定吸光度值, 分别为  $A_1$ 、 $A_0$ 、 $A_2$ , 以 Vc 作阳性对照。

ABTS<sup>+</sup>自由基清除率 (%) =  $[1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$

花椒精油清除 ABTS<sup>+</sup>自由基能力见图 6, 实验结果可得, Vc 和 SFE 精油对 ABTS<sup>+</sup>自由基清除能力随浓度增加而增强,  $IC_{50}$  分别为  $19.96 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $108.0 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。而 SD 精油在 ABTS<sup>+</sup>自由基清除实验中吸光度上升, 导致计算出的清除率为负值, 因此 SD 精油对 ABTS<sup>+</sup>自由基没有清除能力。

### 3 讨论

**3.1** 两种方法提取的花椒精油在化学成分上存在差异

花椒精油对 DPPH 自由基清除能力见图 5, 经 GraphPad Prism 9.0 分析得 SFE 精油对 DPPH 自由基的  $IC_{50}$  为  $39.16 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , SD 精油为  $150.8 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 表明 SFE 精油对 DPPH 自由基清除能力比 SD 精油的活性好。维生素 C (Vc) 的  $IC_{50}$  值为  $26.06 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 所测的花椒精油的抗氧化能力与 Vc 对比, 都有较大差距。

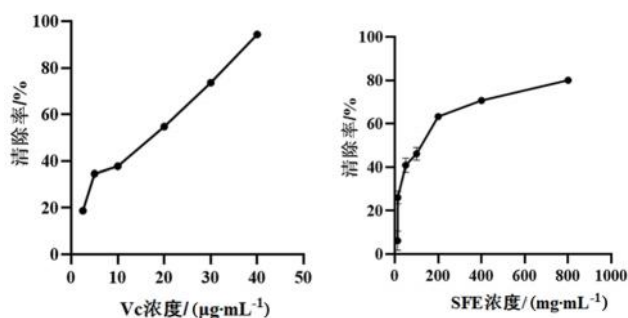


图 6 两种方法提取的花椒精油对 ABTS<sup>+</sup>自由基的清除能力

Fig 6 Scavenging ability of essential oils from *Zanthoxylum schinifolium* extracted by two methods on ABTS<sup>+</sup> free radicals

不同提取方法得到的花椒精油成分种类存在明显差异, 从 SFE 精油中鉴定出 18 种化合物, SD 精油中仅鉴定出 10 种化合物。除共有成分醇类及烯烃类化合物外, SFE 还含有烷烃类和酮类化合物。共有的 8 种萜醇类及萜烯烃类化合物成分相对含量差异较大, 在 SFE 精油中占 85.45%, 在 SD 精油中占 97.64%; 芳樟醇含量均较高, SD 精油中含量高达 91.10%, SFE 精油中达 72.44%, 与刘薇等<sup>[14]</sup>的研究结果一致; 而  $\beta$ -水芹烯、 $\beta$ -月桂烯、D-柠檬烯、 $\beta$ -罗勒烯、 $\alpha$ -侧柏酮和  $\alpha$ -松油醇在 SD 精油中含量均略低于 SFE 精油。造成化学成分种类和相对含量差异的主要原因是 SD 法很难蒸馏出沸点较高的物质, 在长时间蒸馏过程中沸点较低的物质流失, 而 SFE 法是在完全密闭的条件下低温萃取, 物质损失较小, 可萃取性强, 萃取的物质范围更广, 可以萃取出沸点和浓度较高的物质。

### 3.2 两种方法提取的花椒精油在抑菌活性上存在差异

抑菌实验结果表明两种花椒精油对 4 种致病菌有一定的抑制作用。SD 精油对耻垢分枝杆菌的抑制作用最强,对金黄色葡萄球菌的杀菌效果最好。与 SFE 精油相比,SD 精油对 4 种菌的 MIC 值小,对耻垢分枝杆菌、金黄色葡萄球菌的 MBC 值小,说明 SD 精油抑菌、杀菌作用强于 SFE 精油。原因可能与精油中芳樟醇的含量有关。据文献报道,芳樟醇是花椒精油中主要抑菌活性成分,通过影响大肠埃希菌细胞膜的结构和功能,使细胞膜通透性增大,细胞内容物丢失,三磷酸腺苷(ATP)含量下降,细胞功能异常,导致细胞死亡而达到抗菌作用<sup>[15]</sup>。SFE 精油中的芳樟醇占 72.44%,SD 精油中占 91.10%,较大的含量差异可能是导致 SD 精油的抑菌作用强于 SFE 精油的主要原因。

### 3.3 两种方法提取的花椒精油抗氧化活性差异

抗氧化实验结果表明,与 SD 精油相比,SFE 精油对 DPPH 自由基具有更强的清除作用,可能是 SFE 精油中的萜烯类成分含量高于 SD 精油,在 SFE 精油中萜烯类成分的相对含量为 12.96%,SD 精油中占 5.57%。花椒精油的抗氧化活性与其含的柠檬烯等萜烯类物质相关<sup>[16]</sup>。李潮俊<sup>[17]</sup>通过研究花椒精油中桉烯、 $\alpha$ -松油烯、D-柠檬烯、 $\gamma$ -萜品烯、芳樟醇等主要成分的 ABTS<sup>+</sup>自由基清除能力,得出清除 ABTS<sup>+</sup>自由基能力的化合物强弱排序为: $\alpha$ -松油烯> $\gamma$ -萜品烯>芳樟醇;当 $\alpha$ -松油烯的 IC<sub>50</sub> 为 10.37 mg·mL<sup>-1</sup>时,ABTS<sup>+</sup>自由基的清除能力达 91.04%。SD 精油对 ABTS<sup>+</sup>自由基无清除作用,可能与 SD 精油中不含 $\alpha$ -松油烯化合物有关。对于 DPPH 自由基和 ABTS<sup>+</sup>自由基,两种方法提取的精油显示出不同的清除效果,其中 SFE 精油的抗氧化作用更好,可能是因为 SFE 精油中的萜烯类成分含量高、种类多,协同发挥抗氧化作用。

综上所述,两种方法提取的花椒精油得率均较高,SD 得率高于 SFE,提取效率更高。两种精油均有较好的抑菌活性和抗氧化活性,SD 精油的抑菌作用更强,SFE 精油的抗氧化作用更强。在花椒精油精深加工中,可依据产品功效定位选择适宜的方法进行精油的提取。

## 参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版.一部[S]. 2020: 166-167.
- [2] He Q, Wang WX, Zhu L. Larvicidal activity of *Zanthoxylum acanthopodium* essential oil against the malaria mosquitoes, *Anopheles anthropophagus* and *Anopheles sinensis* [J]. Malar J, 2018, 17: 1-7.
- [3] Wongkattiya N, Akekawatchai C, Sanguanserm Sri P, et al. Chemical compositions and biological properties of essential oils from *Zanthoxylum rhetsa* (Roxb.) DC and *zanthoxylum limonella alston* [J]. Afr J Tradit Complement Altern Med, 2018, 15 (2): 12-18.
- [4] 脱聪聪, 丁旭, 周璐, 等. 甘肃陇南大红袍花椒芳香油成分分析及其抑菌活性 [J]. 食品工业科技, 2020, 41 (5): 227-231, 23.
- [5] 袁海梅, 黄旭, 宋雨, 等. 花椒属植物抗炎活性研究进展 [J]. 成都大学学报(自然科学版), 2021, 40 (4): 340-350.
- [6] 韦琳, 宗伟, 曾庆鸿, 等. 花椒抗炎镇痛网络药理学分析及实验验证研究 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46 (12): 3034-3042.
- [7] 王孟, 董林娟, 赵重博. 超声辅助复合酶法提取花椒多酚工艺及抗氧化作用研究 [J]. 中国食品添加剂, 2023, 34 (3): 56-63.
- [8] 罗忠圣, 黎浪, 严艳芳, 等. Box-Behnken 响应面法优选贵州产青椒精油提取工艺 [J]. 中国药业, 2023, 32 (5): 36-40.
- [9] 王友峰, 罗忠圣, 黎浪, 等. 黔产青椒精油成分分析及抑菌、抗氧化活性研究 [J]. 中国食品添加剂, 2023, 34 (4): 285-292.
- [10] Poudel DK, Rokaya A, Ojha PK, et al. The chemical profiling of essential oils from different tissues of *Cinnamomum camphora* L. and their antimicrobial activities [J]. Molecules, 2021, 26 (17): 5132.
- [11] 喻明洁, 冯伟, 熊丽蓉, 等. 西南地区野菊花挥发油主要成分和抗菌活性研究 [J]. 中南药学, 2019, 17 (11): 1819-1824.
- [12] 徐丽芝, 孟扬, 王欣茹, 等. 肉桂油-艾叶油复配亚微乳制备及协同抗菌研究 [J]. 中南药学, 2024, 22 (5): 1125-1130.
- [13] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 多肽抗氧化性测定 DPPH 法和 ABTS 法: GB/T39100—2020 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2020.
- [14] 刘薇, 赵孔发, 张锋伦, 等. 不同产地青椒精油的化学成分分析及体外抑制幽门螺杆菌研究 [J]. 中国野生植物资源, 2023, 42 (10): 68-74, 89.
- [15] 郭俸钰, 陈文学, 陈海明, 等. 芳樟醇对大肠杆菌的抑菌作用机制 [J]. 现代食品科技, 2020, 36 (4): 113-118.
- [16] 沈科萍, 刘文妮, 毕阳, 等. 花椒和当归精油抗氧化活性的比较 [J]. 中国调味品, 2014, 39 (10): 40-44.
- [17] 李潮俊. 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取竹叶花椒精油及其抗氧化性研究 [D]. 绵阳: 西南科技大学, 2023.

(收稿日期: 2024-10-14; 修回日期: 2024-12-27)

# 基于网络药理学和体外实验探究新藤黄酸抗肿瘤的作用机制

高慧敏<sup>1, 2, 3</sup>, 刘珂<sup>1, 2, 3</sup>, 彭雷<sup>3</sup>, 张彩云<sup>1\*</sup>, 陈卫东<sup>1, 4, 5, 6, 7\*</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. 合荣嘉医药科技(南通)有限公司, 江苏 南通 226133; 4. 省部共建安徽道地中药材品质提升协同创新中心, 合肥 230012; 5. 中药资源保护与开发研究所, 合肥 230012; 6. 中药复方安徽省重点实验室, 合肥 230012; 7. 中药饮片制造新技术安徽省重点实验室, 合肥 230012)

**摘要:** **目的** 基于网络药理学、分子对接及体外实验研究新藤黄酸抗肿瘤的作用机制。**方法** 通过 SwissTargetPrediction、PharmMapper、GeneCards、CTD 和 OMIM 数据库筛选新藤黄酸和肿瘤的潜在靶点, 利用 jvenn 网站获得新藤黄酸和肿瘤的交集靶点, 然后进行蛋白质-蛋白质相互作用网络分析筛选核心作用靶点, 并通过分子对接初步验证新藤黄酸与核心靶点的结合活性。最后利用体外实验验证新藤黄酸对多种肿瘤细胞的抑制作用, 并深入研究新藤黄酸对 NCI-H1299 细胞的作用机制。**结果** 网络药理学得到新藤黄酸的潜在靶点 331 个, 肿瘤相关靶点 3996 个, 共同靶点 54 个。利用网络分析筛选出新藤黄酸抗肿瘤的核心靶点可能为 STAT3、PTPRC、AR、ITGB1、MMP2、IKBKB、ITGB3、CDK2、HMOX1、ITGAV、SOD2, 分子对接结果验证了新藤黄酸与这些靶点均有较强的结合能力。体外实验显示新藤黄酸显著抑制肿瘤细胞生长, 并且能够诱导 NCI-H1299 细胞凋亡, 下调 JAK2、p-STAT3/STAT3、Bcl-2 蛋白的表达, 上调 Bax 蛋白的表达。**结论** 新藤黄酸可以通过多种途径、多靶点调控肿瘤的发生、发展, 并且可通过 JAK2/STAT3 通路诱导肺癌 NCI-H1299 细胞凋亡。

**关键词:** 新藤黄酸; 网络药理学; 分子对接; 细胞凋亡; JAK2/STAT3 通路

中图分类号: R286 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)08-2193-08  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.008

## Mechanism of gambogenic acid in cancer based on network pharmacology and in vitro experiments

GAO Hui-min<sup>1, 2, 3</sup>, LIU Ke<sup>1, 2, 3</sup>, PENG Lei<sup>3</sup>, ZHANG Cai-yun<sup>1\*</sup>, CHEN Wei-dong<sup>1, 4, 5, 6, 7\*</sup> (1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute, Nantong Jiangsu 226133; 3. He-Rong-Jia Pharmaceutical Technology (Nantong) Co., Ltd., Nantong Jiangsu 226133; 4. Ministry of Education Anhui Joint Collaborative Innovation Center for Quality Improvement of Anhui Genuine Chinese Medicinal Materials, Hefei 230012; 5. Institute of Traditional Chinese Medicine Resources Protection and Development, Hefei 230012; 6. Anhui Key Laboratory of Chinese Medicinal Formulas, Hefei 230012; 7. Anhui Key Laboratory of New Manufacturing Technology for Traditional Chinese Medicine Decoction Pieces, Hefei 230012)

**Abstract: Objective** To determine the pharmacological mechanism of gambogenic acid for cancer based on network pharmacology, molecular docking and in vitro experiments. **Methods** SwissTargetPrediction, PharmMapper, GeneCards, CTD and OMIM databases were used to screen potential targets of gambogenic acid and cancer. The jvenn website was used to obtain the intersection targets of gambogenic acid and cancer, and the protein-protein interaction network analysis was used to screen the core targets. The binding activity of gambogenic acid to the core target was preliminarily verified by molecular docking. Finally, we used in vitro experiments to verify the inhibitory effect of gambogenic acid on tumor

**基金项目:** 国家自然科学基金面上项目 (No. 81773988); 高水平中医药重点学科建设项目 (国中医药人教函 [2023]85 号)。

**作者简介:** 高慧敏, 女, 硕士研究生, 主要从事中药药理学研究, email: ghmin1@163.com \***通信作者:** 陈卫东, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事药代动力学、中药学和药剂学研究, email: wdchen@ahtcm.edu.cn; 张彩云, 女, 博士研究生导师, 主要从事中药学、药代动力学研究, email: cyzhang6@ustc.edu.cn



cells. The mechanism of gambogic acid on NCI-H1299 cells was further studied. **Results** The network pharmacological analysis revealed 331 potential targets for gambogic acid, 3996 cancer-related targets and 54 common targets. The core targets of gambogic acid anti-cancer screened by network analysis might be STAT3, PTPRC, AR, ITGB1, MMP2, IKBKB, ITGB3, CDK2, HMOX1, ITGAV, and SOD2. The molecular docking verified a strong binding ability of gambogic acid to these targets. In vitro experiments showed that gambogic acid greatly inhibited tumor cell growth. Moreover, gambogic acid induced the apoptosis of NCI-H1299 cells, reduced the expression of JAK2, p-STAT3/STAT3, and Bcl-2 protein, and increased the expression of Bax protein. **Conclusion** Gambogic acid can regulate the occurrence and development of cancer through multiple pathways and multiple targets, and can induce the apoptosis of lung cancer cells through the JAK2/STAT3 pathway.

**Key words:** gambogic acid; network pharmacology; molecular docking; cell apoptosis; JAK2/STAT3 pathway

肿瘤是一种高发病率和致死率的疾病, 2023 年美国肿瘤统计数据显示, 肿瘤是美国第二大致死原因, 也是 1 ~ 14 岁儿童的第二大常见死因<sup>[1]</sup>。目前肿瘤的治疗手段主要包括手术、放疗、化疗和靶向治疗, 但由于存在严重的毒副作用, 且治疗费用高昂, 很多患者难以负担, 因此仍需要探索治疗肿瘤的新靶点和新药物<sup>[2-3]</sup>。近年来, 中医药因其靶点多、毒副作用小的特性而备受关注, 联合放化疗可以显著降低肿瘤的复发率和转移率, 帮助患者改善生存质量, 在肿瘤的预防和治疗中发挥着不可替代的作用<sup>[4]</sup>。

藤黄是藤黄科植物藤黄 *Garcinia hanburyi* Hook.f. 所分泌的树脂, 现代药理学研究表明其具有抗肿瘤、消炎和抗菌等药理作用<sup>[5]</sup>。新藤黄酸 (GNA) 是从藤黄中提取出的一种笼状咕吨酮类活性成分, 具有较强的抗肿瘤作用<sup>[6]</sup>。GNA 对肝癌、肺癌、乳腺癌、胃癌等多种肿瘤细胞具有抑制作用, 并且毒性较低, 是一种很有前景的抗肿瘤候选药物<sup>[7-9]</sup>。网络药理学是一门以生物信息学、药理学和计算分析技术为基础的交叉学科, 从分子角度描述药物与疾病之间的复杂关系, 有助于加速药物靶标的识别, 发现新的生物标志物<sup>[10]</sup>。本研究通过网络药理学结合分子对接, 预测 GNA 抗肿瘤的作用机制和潜在靶点, 并利用体外实验探究 GNA 对肿瘤细胞的抑制作用及机制, 以期后续深入研究 GNA 抗肿瘤作用提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 细胞株

人肺癌 NCI-H1299 细胞由昆明理工大学医学院衰老与肿瘤分子遗传学实验室提供; 人肝癌

SNU-182 细胞、人卵巢癌 SK-OV-3 细胞、人胶质瘤 LN-229 细胞 (大连美仑生物技术有限公司)。NCI-H1299、SNU-182 细胞用 RPMI 1640 完全培养基培养, SK-OV-3 细胞用 McCoy's 5A 完全培养基培养, LN-229 细胞用 DMEM 完全培养基培养。

### 1.2 试剂

新藤黄酸 (纯度 ≥ 98%, 安徽中医药大学新藤黄酸课题组提供), RPMI 1640 培养基、DMEM 培养基、McCoy's 5A 培养基、磷酸盐缓冲液 (PBS)、胎牛血清、CCK-8 试剂盒、Hoechst33342 染色液、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (大连美仑生物技术有限公司), RIPA 裂解液、蛋白浓度测定试剂盒、10×TBST 缓冲液 (江苏晨逸京泽生物科技有限公司), PVDF 膜、转膜滤纸、Marker、电泳液、转膜缓冲液 (武汉赛维尔生物科技有限公司), STAT3 抗体、Bax 抗体、Bcl-2 抗体、N-cadherin 抗体、vimentin 抗体、GAPDH 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司), JAK2 抗体 (美国 immunoWay 公司), p-STAT3 抗体 (美国 CST 公司), ECL 化学发光液 [和元李记 (上海) 生物技术有限公司]。

### 1.3 仪器

BSC1000-II-A2 生物安全柜 (山东新华医疗器械股份有限公司), WCI-180T 三气培养箱 (维根技术有限公司), NIB610-FL 荧光显微镜 (宁波永新光学股份有限公司), HWS-26 电热恒温水浴锅 (上海一恒科学仪器有限公司), YCD-EL289 医用冷藏冷冻箱 (中科美菱低温科技股份有限公司), Victor Nivo 酶标仪 (美国 PerkinElmer 公司), CytoFLEX 流式细胞仪 (贝克曼公司), TU-10 金属浴 (上海一恒科学仪器有限公司), H1750R 高速台式冷冻离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),

PowerPac HC 电泳仪、ChemiDoc Touch 化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司), TS-2 脱色摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

2 方法与结果

2.1 网络药理学

2.1.1 蛋白质-蛋白质相互作用网络(PPI)的构建及核心靶点筛选 通过 SwissTargetPrediction、PharmMapper 数据库预测 GNA 的潜在靶点,共得到 331 个靶点。以“cancer”为关键词,利用 GeneCards、CTD 和 OMIM 数据库共获得 3996 个与肿瘤相关的靶点。利用 jvenn 网站整理得到 GNA 与肿瘤的共同靶点 54 个,将其导入 STRING 数据库,选择生物种类为“Homo sapiens”,设置置信度>0.4,隐藏网络中断开连接的节点,获得各靶点间相互作用关系,然后利用 Cytoscape 3.9.1 软件进行可视化,见图 1,并按照度值、介度、紧密度 3 个指标均大于平均值筛选出 11 个核心靶点,见表 1,其中 STAT3 的度值最高,说明该节点在网络中较重要,与其他靶点有较强的相互作用。

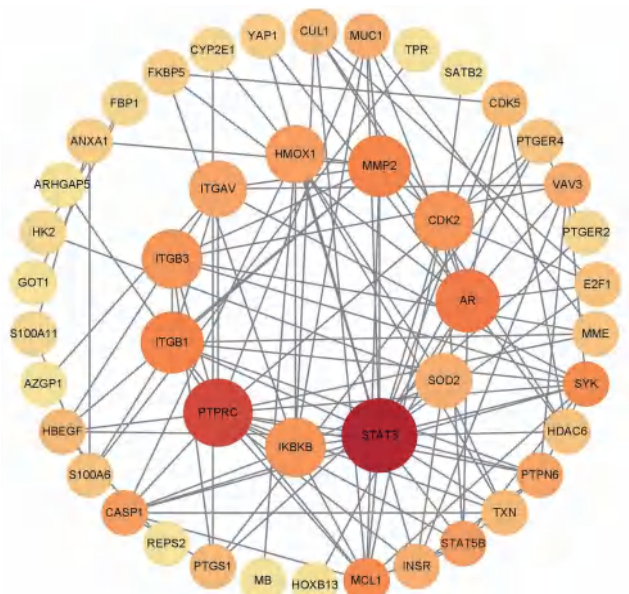


图 1 GNA 抗肿瘤潜在靶点的 PPI 网络图  
Fig 1 PPI network of the potential targets of GNA against cancer

2.1.2 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析 将交集靶点导入 DAVID 数据库,限定物种为“homo sapiens”,对靶点进行 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析。GO 富集分析得到 149 条生物功能条目(BP),33 条细胞组成条目(CC),50 条分子功能条目(MF),筛选前 10 条进行可视化分析,如图 2 所示,BP 包括 RNA 聚合酶 II 启动子转录的负调控、细胞迁移的正调控等,CC 包括细胞核、细胞质、胞质等,MF 包括结合蛋白、蛋白质同二聚化

表 1 GNA 抗肿瘤的 11 个核心靶点  
Tab 1 11 core targets of GNA treating cancer

| 蛋白名称                             | 蛋白简称  | 度值 | 介度  | 紧密度 |
|----------------------------------|-------|----|-----|-----|
| 信号传导和转录激活因子 3                    | STAT3 | 21 | 605 | 32  |
| 蛋白酪氨酸磷酸酶受体 C                     | PTPRC | 16 | 190 | 28  |
| 雄激素受体                            | AR    | 12 | 176 | 26  |
| 整合素 $\beta_1$                    | ITGB1 | 11 | 287 | 26  |
| 基质金属蛋白酶 2                        | MMP2  | 11 | 261 | 26  |
| 核因子 $\kappa$ -B 激酶亚基 $\beta$ 抑制剂 | IKBKB | 9  | 91  | 24  |
| 整合素 $\beta_3$                    | ITGB3 | 9  | 83  | 24  |
| 细胞周期蛋白依赖性激酶 2                    | CDK2  | 9  | 109 | 24  |
| 血红素加氧酶 1                         | HMOX1 | 8  | 173 | 24  |
| 整合素 $\alpha V$                   | ITGAV | 7  | 93  | 22  |
| 超氧化物歧化酶 2                        | SOD2  | 6  | 258 | 22  |

活性等。KEGG 富集分析得到 50 条通路,选取前 10 条通路进行可视化,见图 3,GNA 发挥抗肿瘤作用主要与 FoxO 通路、肿瘤信号通路、肿瘤中的蛋白聚糖信号通路、PI3K/AKT 通路等信号通路相关。这些结果表明,GNA 对肿瘤的调控作用涉及多个靶点和多种途径。

2.1.3 核心靶点分子对接验证 从 PDB 数据库下载核心靶点的 3D 结构,PyMOL 软件去除水分子和配体后导入 AutoDock Tools 1.5.6 软件进行预处理,保存为 PDBQT 格式文件。通过 PubChem 数据库获取 GNA 的 3D 结构,并利用 OpenBabel 2.4.1 软件转换为 PDB 格式,作为小分子配体。使用 AutoDock Vina 1.1.2 软件对蛋白受体和配体进行分子对接,结果见表 2,GNA 与各靶点之间的结合能均 $\leq -20.9$  kJ $\cdot$ mol $^{-1}$ ,表明 GNA 与核心靶蛋白之间具有良好的结合活性,其中 GNA 与 STAT3 的结合能最低,值得进一步实验验证。利用 PyMOL 软件对结合活性较高的对接结果进行可视化,结果见图 4,GNA 与 STAT3、AR、HMOX1、ITGB1 靶点间均能形成氢键。

2.2 体外细胞实验

2.2.1 CCK-8 实验 将对数生长期的 NCI-H1299、SNU-182、SK-OV-3、LN-229 细胞以适当的密度分别接种于 96 孔板中,待细胞贴壁后,将不同浓度的 GNA (0、0.5、5、10、20  $\mu$ mol $\cdot$ L $^{-1}$ ) 按顺序加入各组,每组设置 6 个复孔,培养 48 h 后,吸走废液,每孔加入 100  $\mu$ L 混匀的含 10% CCK-8 的培养基,利用酶标仪检测各孔在 450 nm 处的吸光度值,计算细胞存活率。

结果如图 5 所示,GNA 对 4 种不同的肿瘤细胞均有显著的抑制作用,对 NCI-H1299、SNU-182、SK-OV-3、LN-229 细胞增殖的  $IC_{50}$  分别为 6.01、7.31、



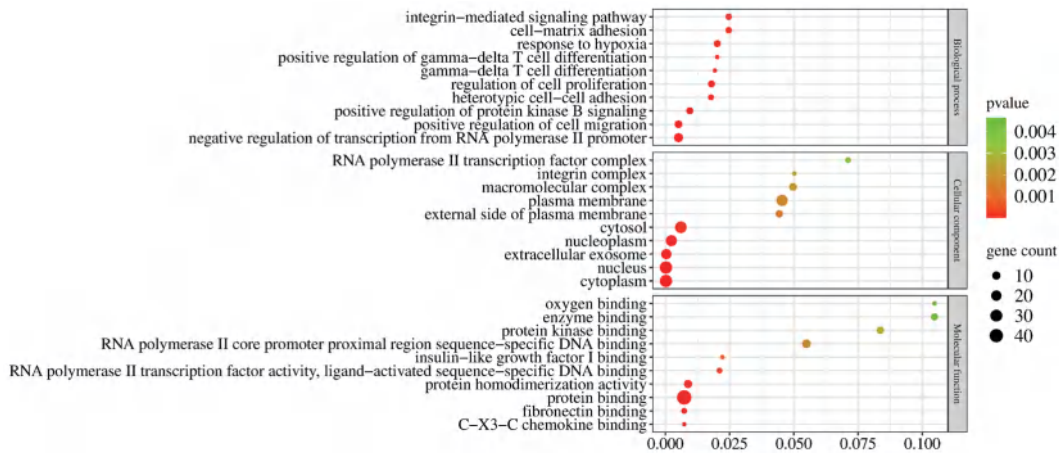


图 2 GNA 抗肿瘤作用 GO 富集分析气泡图  
Fig 2 GO enrichment analysis bubble diagram of the anti-cancer of GNA

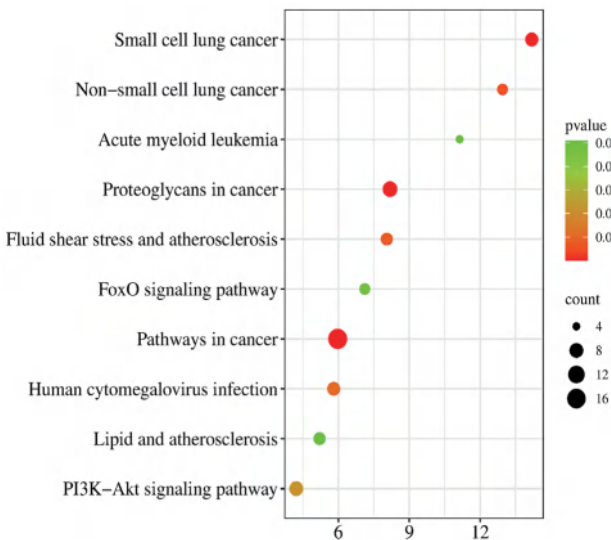


图 3 GNA 抗肿瘤作用 KEGG 富集分析气泡图  
Fig 3 KEGG enrichment analysis bubble diagram of the anti-cancer of GNA

表 2 GNA 与核心靶点的分子对接结合能

| Tab 2 Molecular docking binding energy of GNA with core targets |        |                                  |
|-----------------------------------------------------------------|--------|----------------------------------|
| 蛋白名称                                                            | PDB 编号 | 结合能 / ( kJ · mol <sup>-1</sup> ) |
| STAT3                                                           | 6TLC   | -35.6                            |
| AR                                                              | 2PIW   | -34.7                            |
| HMOX1                                                           | 6EHA   | -34.7                            |
| ITGB1                                                           | 4WJK   | -34.3                            |
| ITGB3                                                           | 2VDQ   | -33.9                            |
| PTPRC                                                           | 5FMV   | -33.5                            |
| ITGAV                                                           | 5FFG   | -32.7                            |
| CDK2                                                            | 3QQJ   | -32.2                            |
| MMP2                                                            | 3AYU   | -31.4                            |
| SOD2                                                            | 1PM9   | -30.6                            |
| IKBKB                                                           | 3BRV   | -29.3                            |

14.00、15.81  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。其中 GNA 对 NCI-H1299 细胞显示出较强的抑制作用，并呈浓度依赖性，后续实验选择该细胞进行进一步的研究。

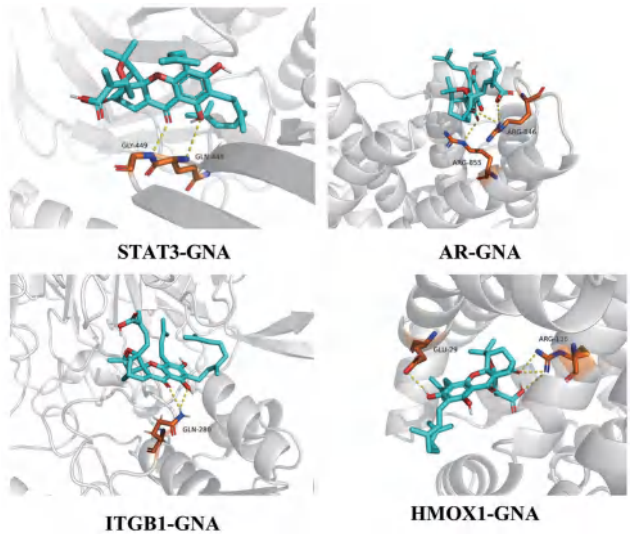


图 4 GNA 与 STAT3、AR、ITGB1、HMOX1 的分子对接可视化图  
Fig 4 Molecular docking visualization of GNA with STAT3, AR, ITGB1, and HMOX1

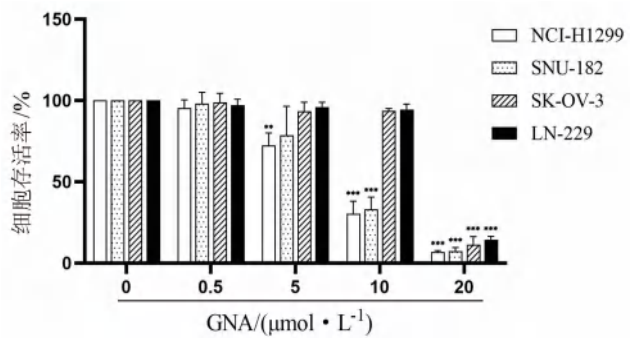


图 5 GNA 对不同肿瘤细胞存活率的影响  
Fig 5 Effect of GNA on the survival rate of different tumor cells  
注：与未给药组比较，\*\* $P < 0.01$ ，\*\*\* $P < 0.001$ 。  
Note: Compared with the untreated group, \*\* $P < 0.01$ ，\*\*\* $P < 0.001$ 。

2.2.2 Hoechst33342 染色实验 将生长状态良好的 NCI-H1299 细胞接种在 24 孔板中培养至细胞贴壁，将不同浓度的 GNA (0、1、1.5、2、4  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )



按顺序加入各组，处理 48 h 后，弃去培养液，用磷酸盐缓冲液（PBS）清洗，每孔加入 200  $\mu\text{L}$  稀释 100 倍的 Hoechst33342 染色液，放置在 37  $^{\circ}\text{C}$  的环境中，避光孵育 30 min 后，弃去染色液，PBS 洗

涤 2 次，倒置荧光显微镜下观察细胞形态，并拍照记录。结果见图 6，与未给药组相比，给药组细胞呈现核固缩、染色质凝聚等细胞凋亡典型特征，提示 GNA 可诱导 NCI-H1299 细胞凋亡。

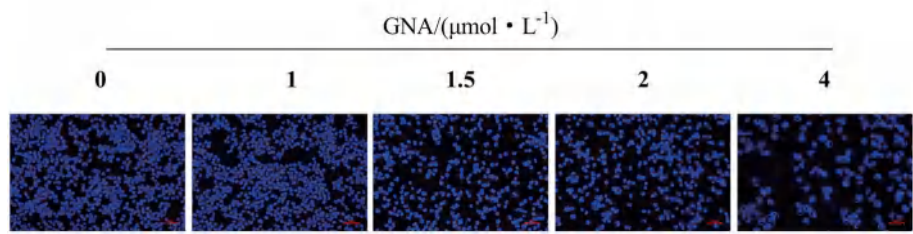


图 6 不同浓度 GNA 对 NCI-H1299 细胞形态学的影响 ( $\times 200$ )

Fig 6 Effect of different concentrations of GNA on the morphology of NCI-H1299 cells ( $\times 200$ )

**2.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡情况** 选择对数生长期的 NCI-H1299 细胞接种于 6 孔板中，按照“2.2.2”项下浓度分组并处理 48 h 后，收集各组细胞，用预冷 PBS 洗涤细胞，加入 100  $\mu\text{L}$  Binding Buffer 重悬细胞后，分别吸取 50  $\mu\text{L}$  细胞悬液置于

孔板中，然后加入 5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC、5  $\mu\text{L}$  PI，充分混匀，室温环境下避光孵育 15 min，流式细胞仪检测细胞凋亡率。结果见图 7，与未给药组比较，各给药组细胞凋亡率显著增加，且呈浓度依赖性。

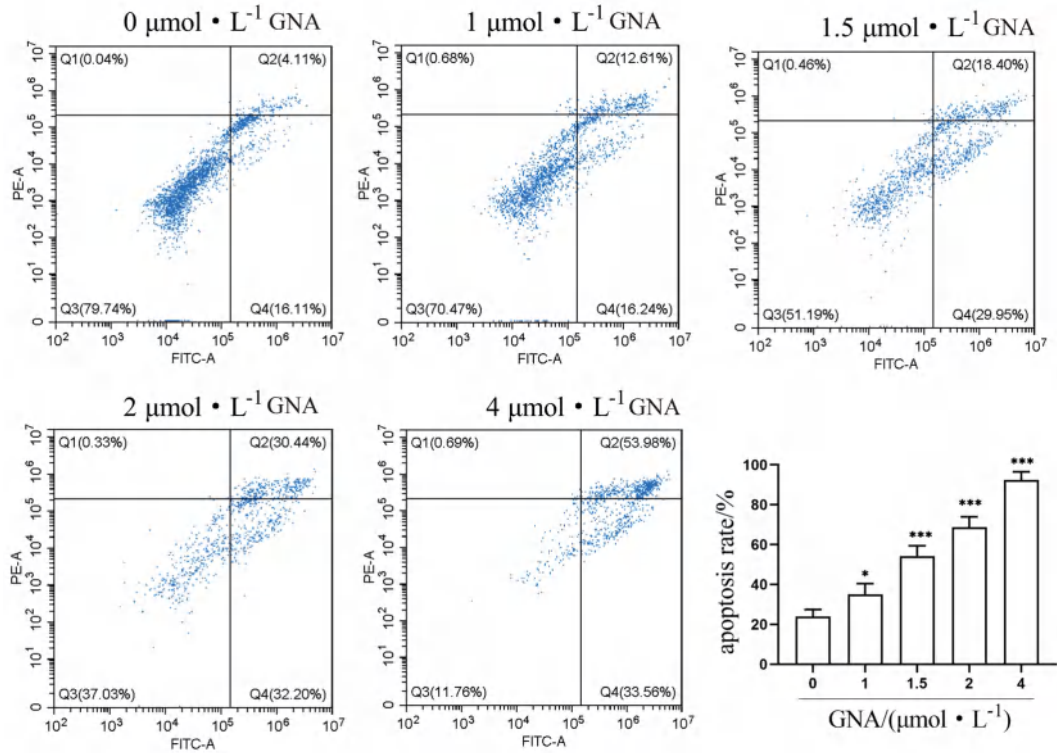


图 7 不同浓度 GNA 对 NCI-H1299 细胞凋亡率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig 7 Effect of different concentrations of GNA on the apoptosis rate of NCI-H1299 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

注：与未给药组比较，\* $P < 0.05$ ，\*\*\* $P < 0.001$ 。

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

**2.2.4 细胞划痕实验** 将 NCI-H1299 细胞接种于 6 孔板中，待细胞生长密度达 95% 时，用 200  $\mu\text{L}$  移液枪头划出直线，用 PBS 清洗去除细胞碎片，按照“2.2.2”项下浓度分组并在 0 h 和 48 h 两个时间点拍

照记录划痕愈合情况，利用 Image J 软件分析划痕面积，计算细胞迁移率。结果如图 8 所示，与未给药组比较，不同浓度 GNA 处理组细胞迁移率显著降低，提示 GNA 可以抑制 NCI-H1299 细胞迁移。

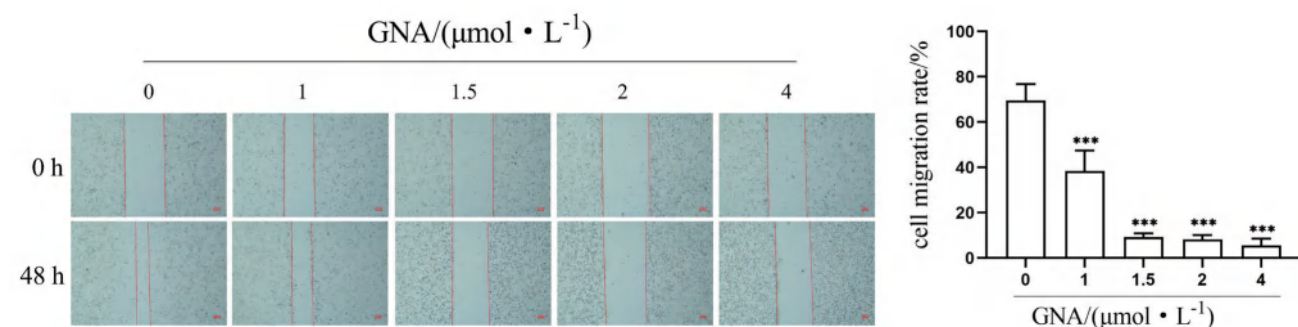


图8 不同浓度 GNA 对 NCI-H1299 细胞迁移率的影响 ( $\times 40$ ) ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig 8 Effect of different concentrations of GNA on the migration rate of NCI-H1299 cells ( $\times 40$ ) ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

注: 与未给药组比较, \*\*\* $P < 0.001$ 。

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

**2.2.5 Western blot 实验** NCI-H1299 细胞按照“2.2.2”项下浓度分组并处理 48 h 后, 收集各组细胞并提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。SDS-PAGE 电泳后, 采用湿转法转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 加入一抗 4℃ 孵育过夜, TBST 清洗 3 次, 每次 10 min, 室温孵育对应的二抗 2 h, TBST 洗膜后, 将 ECL 化学发光液 A 液和 B 液按照 1:1

混合, 均匀覆盖于膜上, 显影, Image J 软件对目标条带进行灰度分析。结果如图 9 所示, 经 GNA 处理后, NCI-H1299 细胞中 JAK2、p-STAT3/STAT3、Bcl-2 蛋白表达量显著降低, Bax 蛋白的表达量显著升高。迁移相关蛋白表达情况见图 10, GNA 作用细胞后, N-cadherin 和 vimentin 蛋白表达水平显著降低, 进一步证实了 GNA 对细胞迁移的抑制作用。

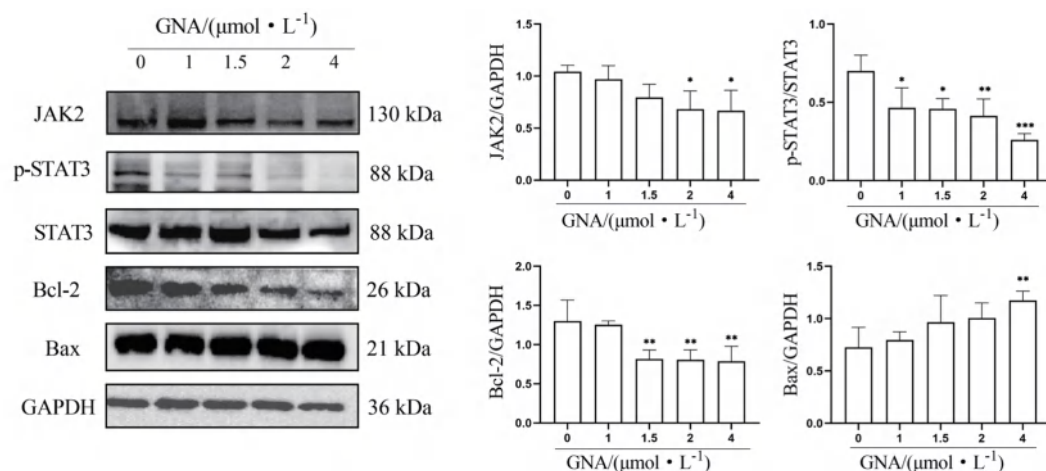


图9 GNA 对 JAK2、p-STAT3、STAT3、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig 9 Effect of GNA on the expression of JAK2, p-STAT3, STAT3, Bcl-2, and Bax protein ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

注: 与未给药组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the untreated group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

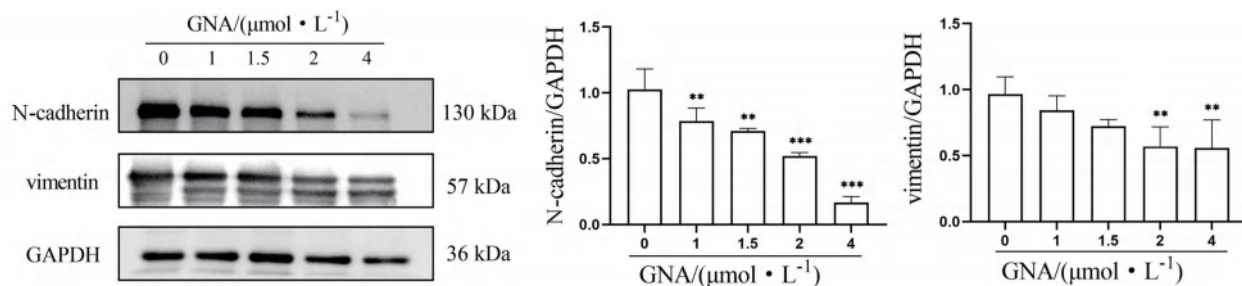


图10 GNA 对 N-cadherin 及 vimentin 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig 10 Effect of GNA on the expression of N-cadherin and vimentin protein ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

注: 与未给药组比较, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the untreated group, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

**2.2.6 统计学处理** 采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析, 使用 GraphPad Prism 8.3.0 软件进行作图, 实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组之间采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

### 3 讨论

本研究通过网络药理学获得了 GNA 与肿瘤相关的交叉靶点 54 个, 并构建 PPI 网络筛选出 STAT3、PTPRC、AR、ITGB1、MMP2、IKBKB、ITGB3、CDK2、HMOX1、ITGAV、SOD2 可能是 GNA 治疗肿瘤的核心靶点。进一步的 KEGG 分析显示 GNA 主要作用在肿瘤的蛋白聚糖信号通路、肿瘤相关途径、PI3K/AKT 信号通路、FoxO 信号通路, 表明 GNA 抗肿瘤的潜在作用机制主要集中在影响细胞增殖、凋亡、迁移以及周期调控等生物学过程。为了验证网络药理学的结果, 对 PPI 网络筛选出的核心蛋白与 GNA 进行分子对接, 结果表明 GNA 与核心靶蛋白间均具有良好的结合活性。其中 GNA 与靶点 STAT3、AR、ITGB1、HMOX1 的结合能力较强, 都具有氢键结合, 使结构趋于稳定。

AR 是类固醇激素受体超家族成员, 在前列腺癌中起主要的调控作用, 在前列腺癌细胞中经常发现 AR 突变, 进而使肿瘤恶化, 进展为去势抵抗性前列腺癌, AR 信号通路的下调是治疗前列腺癌的重要手段<sup>[11]</sup>。ITGB1 是整合素家族中最常见的亚基之一, 与肿瘤细胞的多种生物学行为密切相关, 在肝癌、肺癌、结肠癌、卵巢癌等多种肿瘤中呈现高表达<sup>[12]</sup>。有研究表明, 过表达 ITGB1 促进了肺腺癌细胞的增殖、迁移, 并且与肺腺癌患者的不良预后有关<sup>[13]</sup>。HMOX1 是血红素分解代谢的一种必需酶, 可以将血红素分解为亚铁离子、一氧化碳和胆绿素, 在诱导肿瘤细胞铁死亡过程中发挥重要作用。HMOX1 对铁死亡具有双向调节作用, 当 HMOX1 被适度激活时发挥细胞保护作用; 当 HMOX1 被过度激活时, 亚铁离子增加、活性氧 (ROS) 过载, 会导致氧化性的细胞死亡<sup>[14]</sup>。

体外抗肿瘤实验结果表明, GNA 可以显著抑制 NCI-H1299、SNU-182、SK-OV-3、LN-229 细胞的增殖, 其中对 NCI-H1299 细胞的抑制作用呈浓度依赖性。Hoechst33342 染色实验和流式凋亡数据证实了 GNA 可以诱导细胞凋亡, 这可能是 GNA 抑制肿瘤细胞生长的主要途径。STAT3 作为一种细胞质转录因子, 是干预肿瘤的重要靶点之一, 研究表明 STAT3 可在多种肿瘤中过表达从而调节细胞增殖、

侵袭和血管生长, 证实过度激活的 STAT3 可直接或间接促进肿瘤生长<sup>[15-16]</sup>。JAK2 作为非受体蛋白酪氨酸激酶家族成员, 是 STAT3 的上游靶点, STAT3 被激活后形成二聚体并转移进入细胞核, 从而触发基因转录<sup>[17]</sup>。JAK2/STAT3 信号通路在肿瘤细胞增殖和凋亡中起着关键作用, 靶向抑制这一通路是肿瘤治疗的一种重要途径, 尤其在肺癌的发生发展过程中, JAK2/STAT3 通路起着重要的调控作用<sup>[18-20]</sup>。此外, STAT3 的过度表达还会调节下游 Bax、Bcl-2 等蛋白的表达, 参与肿瘤的异常凋亡。当细胞内促凋亡蛋白 Bax 高表达时, 细胞对死亡信号敏感, 当抗凋亡蛋白 Bcl-2 高表达时, Bcl-2 与 Bax 形成二聚体, 抑制细胞凋亡<sup>[21-23]</sup>。在本研究中, Western blot 实验显示, GNA 处理可以显著降低 NCI-H1299 细胞中 JAK2、p-STAT3/STAT3、Bcl-2 蛋白的表达水平, 上调 Bax 蛋白的表达, 推测 GNA 可能通过抑制细胞内 JAK2、STAT3 蛋白水平, 进而调控下游凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax, 最终诱导 NCI-H1299 细胞凋亡。

随着科学的发展和技术的进步, 肿瘤的治疗已不仅仅局限于研究肿瘤细胞的死亡, 更多的研究开始关注肿瘤的侵袭和转移。N-cadherin 是一种钙依赖性跨膜糖蛋白, 在肿瘤患者中的表达水平高于健康人, N-cadherin 的异常表达与肿瘤的临床分期、分化和转移相关, 是肿瘤治疗和预后的一个重要靶点<sup>[24]</sup>。此外, vimentin 也是肿瘤迁移侵袭过程中的重要蛋白, 与肿瘤细胞的恶性程度成正相关<sup>[25]</sup>。本研究通过划痕实验表明 GNA 处理 48 h 可以显著抑制 NCI-H1299 细胞迁移, Western blot 实验进一步表明这可能与 N-cadherin、vimentin 蛋白表达降低有关。

综上所述, 本研究基于网络药理学和分子对接, 得到了 GNA 抗肿瘤的潜在靶点和相关通路, 并利用体外细胞实验进行了初步验证。结果表明, GNA 显著抑制多种肿瘤的生长, 并且可能通过调控 JAK2/STAT3 通路诱导 NCI-H1299 细胞凋亡; 同时 GNA 可能通过调控 N-cadherin、vimentin 蛋白表达从而抑制 NCI-H1299 细胞迁移。但本研究的机制探索仍有不足, 仅初步分析了可能的核心靶点, 并没有对其他类型的靶点进行验证, 如细胞周期相关蛋白 CDK2。细胞周期蛋白依赖性激酶 (CDK) 是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族成员, 它可以和周期蛋白相结合产生不同的细胞周期调控作用, CyclinE-CDK2 结合后可以调控细胞进入 S 期的进程, 而和 CyclinA 结合后可以调



控 S 期内 DNA 的复制进程<sup>[26]</sup>。这种复合物的形态能有效控制不同的细胞状态, 因此 CDK 活性的变化能调控细胞的分裂次数, 进而影响肿瘤的发展<sup>[27]</sup>。后期本课题组在扩展靶点研究的同时也需要对信号通路进行深入探索, 以期为新药研发提供思路 and 方向。

## 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] 曹进, 陈兴月, 雷双奕, 等. 肺癌化疗原则专家共识 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2022, 22 (12): 1428-1438.
- [3] The Lancet. Lung cancer: some progress, but still a lot more to do [J]. Lancet, 2019, 394 (10212): 1880.
- [4] Liu TH, Zuo L, Guo DQ, et al. Ginsenoside Rg<sub>3</sub> regulates DNA damage in non-small cell lung cancer cells by activating VRK1/P53BP1 pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 120: 109483.
- [5] 郑赵情, 张莉, 沈凯凯, 等. 藤黄的研究进展 [J]. 世界中医药, 2016, 11 (7): 1180-1188.
- [6] Asano J, Chiba K, Tada M, et al. Cytotoxic xanthenes from *Garcinia hanburyi* [J]. Phytochemistry, 1996, 41 (3): 815-820.
- [7] Jia BY, Li SS, Hu XR, et al. Recent research on bioactive xanthenes from natural medicine: *Garcinia hanburyi* [J]. AAPS PharmSciTech, 2015, 16 (4): 742-758.
- [8] 何焯, 王科明. 新藤黄酸抗肿瘤作用的研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2015, 23 (1): 126-128.
- [9] Wang M, Zhan F, Cheng H, et al. Gambogic acid inhibits basal autophagy of drug-resistant hepatoma cells and improves its sensitivity to adriamycin [J]. Biol Pharm Bull, 2022, 45 (1): 63-70.
- [10] Hopkins AL. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery [J]. Nat Chem Biol, 2008, 4 (11): 682-690.
- [11] Tan MH, Li J, Xu HE, et al. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery [J]. Acta Pharmacol Sin, 2015, 36 (1): 3-23.
- [12] Sun L, Guo SW, Xie YP, et al. The characteristics and the multiple functions of integrin  $\beta 1$  in human cancers [J]. J Transl Med, 2023, 21 (1): 787.
- [13] Chang RM, Xiao XX, Fu Y, et al. ITGB1-DT facilitates lung adenocarcinoma progression via forming a positive feedback loop with ITGB1/Wnt/ $\beta$ -catenin/MYC [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 631259.
- [14] Chiang SK, Chen SE, Chang LC. A dual role of heme oxygenase-1 in cancer cells [J]. Int J Mol Sci, 2018, 20 (1): 39.
- [15] 曹知勇, 陈静芹, 吕挺, 等. 莪术油对卵巢癌 VEGFA, STAT3, mTOR 的调控机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27 (14): 70-80.
- [16] Chai EZ, Shanmugam MK, Arfuso F, et al. Targeting transcription factor STAT3 for cancer prevention and therapy [J]. Pharmacol Ther, 2016, 162: 86-97.
- [17] Johnson DE, O'Keefe RA, Grandis JR. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2018, 15 (4): 234-248.
- [18] Huang B, Lang XL, Li XH. The role of IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway in cancers [J]. Front Oncol, 2022, 12: 1023177.
- [19] Liang Q, Gong MM, Zou JH, et al. A phosphoglycerate mutase 1 allosteric inhibitor overcomes drug resistance to EGFR-targeted therapy via disrupting IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway in lung adenocarcinoma [J]. Drug Resist Updat, 2023, 68: 100957.
- [20] Jin XY, Shang B, Wang JR, et al. Farnesoid X receptor promotes non-small cell lung cancer metastasis by activating Jak2/STAT3 signaling via transactivation of IL-6ST and IL-6 genes [J]. Cell Death Dis, 2024, 15 (2): 148.
- [21] Zhang SL, Liu N, Ma MX, et al. Methionine enkephalin (MENK) suppresses lung cancer by regulating the Bcl-2/Bax/caspase-3 signaling pathway and enhancing natural killer cell-driven tumor immunity [J]. Int Immunopharmacol, 2021, 98: 107837.
- [22] Liu ZQ, Ding Y, Ye N, et al. Direct activation of Bax protein for cancer therapy [J]. Med Res Rev, 2016, 36 (2): 313-341.
- [23] Hou Y, Pi C, Feng XH, et al. Antitumor activity in vivo and vitro of new chiral derivatives of baicalin and induced apoptosis via the PI3K/AKT signaling pathway [J]. Mol Ther Oncolytics, 2020, 19: 67-78.
- [24] Cao ZQ, Wang Z, Leng P. Aberrant N-cadherin expression in cancer [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 118: 109320.
- [25] Wang Q, Zhu GW, Lin CL, et al. Vimentin affects colorectal cancer proliferation, invasion, and migration via regulated by activator protein 1 [J]. J Cell Physiol, 2021, 236 (11): 7591-7604.
- [26] Liu J, Peng YH, Wei WY. Cell cycle on the crossroad of tumorigenesis and cancer therapy [J]. Trends Cell Biol, 2022, 32 (1): 30-44.
- [27] 孙光, 张树友. CDKs 与肿瘤关系的研究进展 [J]. 医学工程, 2009, 17 (4): 262-264, 267.

(收稿日期: 2024-10-08; 修回日期: 2024-12-08)

# 辰砂六一散中活性成分对慢性肝损伤大鼠的药效学和药动学分析

富薪竹<sup>1</sup>, 刘烁<sup>1</sup>, 国宁宁<sup>1</sup>, 秦国栋<sup>2\*</sup>, 赵春杰<sup>1\*</sup> (1. 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016; 2. 广东司法警官职业学院, 广州 510520)

**摘要:** **目的** 研究辰砂六一散活性成分对肝损伤模型大鼠的药效作用, 并建立药动学模型。**方法** 利用 10%CCl<sub>4</sub> 溶液诱导建立慢性肝损伤大鼠模型, 治疗组给予辰砂六一散, 并从脏器指数、肝脏组织病理、组织炎症因子含量来考察其治疗效果。以辰砂六一散中具有抗炎活性的 3 个入血成分(甘草苷、甘草素、异甘草素)为药动学考察指标, 以组织中肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、活性氧 (ROS)、谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT)、还原型谷胱甘肽 (GSH)、丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 作为药效学指标考察慢性肝损伤的治疗效果。**结果** 给予辰砂六一散后, 大鼠组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、ROS、ALT、AST、MDA 水平较模型组有所降低, GSH、SOD 水平较模型组升高, 肝脏组织病理形态改善, 脏器指数有所下调。甘草苷、甘草素、异甘草素的达峰浓度 ( $C_{\max}$ ) 分别为 1.95、0.63、0.79 ng·mL<sup>-1</sup>, 达峰时间 ( $t_{\max}$ ) 分别为 1.00、1.75、0.50 h, 半衰期 ( $t_{1/2}$ ) 分别为 6.52、8.53、9.77 h, 药时曲线下面积 ( $AUC_{0\sim 24\text{h}}$ 、 $AUC_{0\sim \infty}$ ) 分别为 9.38、5.28、5.73 ng·h·mL<sup>-1</sup> 和 11.11、7.86、10.08 ng·h·mL<sup>-1</sup>。**结论** 甘草苷的入血含量最高, 具有保肝抗炎、抗氧化、抗病毒和抗肿瘤等多种作用。

**关键词:** 辰砂六一散; 药效学; 药动学; 甘草素; 甘草苷; 异甘草素

**中图分类号:** R285

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-2981(2025)08-2201-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.009

## Pharmacodynamics and pharmacokinetics of active ingredients in Chensha Liuyi powder in rats with chronic liver injury

FU Xin-zhu<sup>1</sup>, LIU Shuo<sup>1</sup>, GUO Ning-ning<sup>1</sup>, QIN Guo-dong<sup>2\*</sup>, ZHAO Chun-jie<sup>1\*</sup> (1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016; 2. Guangdong Vocational College for Judicial Police Officers, Guangzhou 510520)

**Abstract: Objective** To determine the pharmacological effects of the active components in Chensha Liuyi powder on a rat model of liver injury and to establish the pharmacokinetic profile. **Methods** A chronic liver injury model was induced in rats with 10% CCl<sub>4</sub> solution. The treatment group was given Chensha Liuyi powder, and its therapeutic effects were evaluated with organ index measurements, liver histopathology, and tissue inflammatory cytokine levels. The pharmacokinetics focused on three active blood-absorbed components in Chensha Liuyi powder with known anti-inflammatory activity: liquiritin, isoliquiritigenin, and liquiritigenin. The therapeutic efficacy on chronic liver injury was assessed with pharmacodynamic markers, including tissue levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), reactive oxygen species (ROS), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), and superoxide dismutase (SOD). **Results** Chensha Liuyi powder reduced the tissue levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , ROS, ALT, AST, and MDA compared with those of the model group. Levels of GSH and SOD increased in the treatment group. Liver histopathology improved, and the organ index decreased. The peak concentrations ( $C_{\max}$ ) of glycyrrhizin, liquiritigenin, and isoliquiritigenin were 1.95, 0.63, and 0.79

**作者简介:** 富薪竹, 女, 硕士研究生, 主要从事药物分析研究, email: asheng19800829@163.com \*通信作者: 赵春杰, 男, 博士研究生导师, 主要从事中药药物分析研究, email: lab433@163.com

$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , respectively. The time to reach peak concentration ( $t_{\max}$ ) was 1.00, 1.75, and 0.50 h, respectively. The half-lives ( $t_{1/2}$ ) were 6.52, 8.53, and 9.77 h. The areas under the curve ( $AUC_{0-24\text{h}}$  and  $AUC_{0-\infty}$ ) were 9.38, 5.28, 5.73  $\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ , and 11.11, 7.86, 10.08  $\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ , respectively.

**Conclusion** Glycyrrhizin has the highest blood concentration, and demonstrates hepatoprotective, anti-inflammatory, antioxidant, antiviral, and anti-tumor effects.

**Key words:** Chensha Liuyi powder; pharmacodynamics; pharmacokinetics; liquiritigenin; liquiritin; isoliquiritigenin

肝损伤是指肝脏细胞或组织在结构和功能上的异常改变。肝脏作为人体的重要代谢器官,负责多种生理功能,包括解毒、合成蛋白质、存储糖原、产生胆汁等<sup>[1]</sup>。当肝脏受到损伤时,这些功能可能会受到不同程度的影响。肝损伤的发生机制因病因不同而有所差异,常见的病理生理过程包括氧化应激、细胞凋亡和坏死、炎症反应以及纤维化<sup>[2-3]</sup>。常见的症状和体征包括疲劳和乏力、黄疸、腹痛、肝脏肿大、脾大以及肝功能异常<sup>[4]</sup>。因此对损伤的肝脏进行保肝、降酶、利胆、抗纤维化的治疗,以减轻肝组织炎症、修复受损的肝细胞、降低纤维化程度<sup>[5]</sup>,阻止其病变的进一步发展。

辰砂六一散由滑石粉 75 g、甘草 12.5 g、辰砂 12.5 g 组成,主要有清暑利湿的治疗功能,用于具有身热、烦渴、大便如水、小便短少、舌红苔腻者。其中甘草中的甘草黄酮类化合物具有强大的抗氧化活性能够清除体内的自由基<sup>[6]</sup>。甘草还可以促进细胞内抗氧化酶的表达和活性进而提高细胞内抗氧化系统的防御能力,抑制脂质过氧化反应阻止自由基引发的细胞膜脂质过氧化链反应。甘草具有明显的抗炎抗病毒作用<sup>[7-9]</sup>,可调节肝脏解毒酶系,抑制肝纤维化,促进肝细胞再生,调节免疫反应<sup>[10]</sup>。本文以辰砂六一散中甘草的甘草素、甘草苷、异甘草素 3 种活性成分为对象<sup>[11]</sup>,基于药动学和药效学考察对慢性肝损伤大鼠的治疗机制,为临床合理用药提供基础研究依据和参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

HPLC Jasper MS TRIPLE QUAD 4500MD (美国 AB SCIEX 公司); XS205DU 十万分之一天平 (美国 MettlerToledo 公司); BSA124S 电子天平 (赛多利斯科学仪器有限公司); H2050R 高速冷冻离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); TGL-16C 型离心机 (上海安亭科学仪器厂); KQ2200DE 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); MD 200-2 干式氮吹仪 (杭州奥盛仪器有限公

司); QL-866 涡旋混合器 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司); Thermo Scientific 酶标仪 [赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司]; HS-2026 型组织切片机 (浙江华速科技公司); MDF-U53V 型  $-86^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱 (日本三洋公司)。

### 1.2 试药

辰砂六一散 (规格: 每包 0.5 g, 批号: 20230824, 自制); 四氯化碳 (分析纯) (天津市富宇精细化工厂有限公司); 大豆油 (益海嘉里食品营销有限公司); 肝素钠注射液 (国药集团容生制药有限公司); 氯化钠注射液 (哈尔滨三联药业股份有限公司); 纯化水 (杭州娃哈哈集团有限公司); 水飞蓟素胶囊 (国药准字 HJ20181067, 批号: 8158905, 德国马博士大药厂); 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素- $1\beta$  (IL- $1\beta$ )、活性氧 (ROS)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、还原型谷胱甘肽 (GSH) ELISA 试剂盒、谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 等 ELISA 试剂盒 (江苏酶免生物科技有限公司); 甘草苷对照品 (批号: 100109, 纯度: 99.8%, 上海融禾医药科技有限公司); 异甘草素对照品 (批号: C03A8Q41092, 纯度: 99.8%)、卡马西平对照品 (批号: H07J9L63102, 纯度: 99.8%) (上海源叶生物科技有限公司); 甘草素对照品 (批号: M2380005, 纯度: 99.8%, 上海安谱实验科技股份有限公司); 甲醇、乙腈 (色谱纯, 天津市康科德科技有限公司)。

### 1.3 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 (6~7 周龄, 体重 180~220 g), 由沈阳药科大学动物实验中心提供, 使用许可证号: SYXK (辽) 2021-0009, 动物质量合格证号: 210726241100573838。动物实验经沈阳药科大学动物研究伦理委员会批准 (批准号 SYPY-IACUC-S2023-1213-201)。

## 2 方法

### 2.1 药效学实验

**2.1.1 慢性肝损伤大鼠模型的建立、分组及给药**  
24 只雄性 SD 大鼠 (体重 180~220 g) 饲养在



相对温度(20 ~ 25 ℃)、相对湿度(40% ~ 70%)以及昼夜交替周期为 12 h 的环境中。实验前一周大鼠提前适应环境,自由获取标准饮食和水。适应期结束后,将大鼠随机分成正常组(Con)、模型组(Model)、辰砂六一散治疗组(CSLYS)和水飞蓟素组(SFJS),每组 6 只。模型组、辰砂六一散组和水飞蓟素组的大鼠采用灌胃给药 10% CCl<sub>4</sub> 食用油溶液,每周 2 次,持续 6 周,正常组大鼠灌胃等量的食用油。造模期间每日监测大鼠的进食、饮水和活动情况。

第 7 周起根据辰砂六一散和水飞蓟素成人每日服用剂量,以体表面积换算公式,分别采用灌胃给药为期 8 周的辰砂六一散[1.8 g/(kg·d)]和水飞蓟素[50 mg/(kg·d)],正常组和模型组给予等量的生理盐水。同时,为防止其自身的免疫恢复作用,在 8 周的治疗过程中,对模型组、辰砂六一散组和水飞蓟素组的大鼠采用灌胃给药 10% CCl<sub>4</sub> 食用油溶液每周 1 次,以防止自身恢复。

**2.1.2 肝脏样本的采集** 于第 14 周末给药结束后,采用水合氯醛麻醉处死各组大鼠,解剖大鼠,取各组织脏器,用生理盐水将脏器组织洗净,滤纸吸干多余水分。每组取一只大鼠肝脏的同一部位浸泡于甲醛中,多余肝脏样品与其他脏器保存于-80 ℃备用。

**2.1.3 肝脏样本的处理** 取大鼠肝脏样品 1 g,按照体积比 1:2 加入预冷生理盐水,配制成肝脏匀浆液,4000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清液备用。

**2.1.4 肝损伤模型大鼠脏器指数** 将动物解剖后取出的心脏、肝脏、脾脏、肾脏及胸腺组织进行称量后,将其重量与动物体重进行比值计算,按如下公式计算:脏器指数(%)=脏器质量(g)/动物体重(g)×100%。

**2.1.5 苏木素-伊红(HE)染色观察肝脏组织病理变化** 固定于中性多聚甲醛溶液中的肝脏组织样品,经石蜡包埋、切片对组织样本进行 HE 染色后,置于光学显微镜下,对肝脏组织进行病理学变化的观察。

**2.1.6 ELISA 法检测肝脏中 TNF-α、IL-1β、ROS、SOD、MDA、GSH、ALT、AST 含量** 取“2.1.2”项下的肝脏样本,按照 ELISA 试剂盒说明书测定肝脏中 TNF-α、IL-1β、ROS、SOD、MDA、GSH、ALT、AST 的含量。

**2.2 辰砂六一散中 3 个活性成分的血药浓度测定**

**2.2.1 色谱条件** 色谱柱: Shim-pack Velox C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 2.7 μm); 柱温: 40 ℃; 流速: 0.2 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量: 2 μL; 流动相: A 为 0.1%

甲酸/水(V/V), B 为纯甲醇,洗脱梯度[0.00 ~ 1.00 min, 20% ~ 45%B; 1.01 ~ 4.50 min, 45% ~ 60%B; 4.51 ~ 6.50 min, 60% ~ 92%B; 6.51 ~ 7.50 min, 92%B (并以 92%B 平衡至 8 min); 8.01 ~ 10.00 min, 20%B]。

**2.2.2 质谱条件** 离子源: 电喷雾离子源; 监测方式: 正离子模式、负离子模式; 雾化器和干燥气: 氮气; 扫描方式: 多反应扫描(MRM), 质谱参数: 采用 QUAD 4500 型三重四极杆质谱仪进行样品的质谱信号采集; 扫描模式为正负离子两种(喷嘴电压为 1500 V, 毛细管电压为 3500 V); 鞘气流量为 11 L·min<sup>-1</sup>; 数据采集模式为多反应监测; 离子源为电喷雾; 离子源温度为 350 ℃; 碰撞能电离参数设置为高; 碰撞气体为氮气; MRM 参数见表 1。

| 表 1 优化的质谱条件                                   |                    |               |        |         |
|-----------------------------------------------|--------------------|---------------|--------|---------|
| Tab 1 Optimized mass-spectrometric conditions |                    |               |        |         |
| 分析物                                           | 初级粒子               | 离子跃迁          | 锥形电压/V | 碰撞能量/eV |
| 卡马西平                                          | [M+H] <sup>+</sup> | 237.1 > 194.1 | 130    | 55      |
| 甘草苷                                           | [M-H] <sup>-</sup> | 417.1 > 254.8 | -160   | -38     |
| 甘草素                                           | [M-H] <sup>-</sup> | 255.1 > 119.0 | -100   | -27     |
| 异甘草素                                          | [M-H] <sup>-</sup> | 255.0 > 118.9 | -100   | -25     |

**2.2.3 对照品溶液和内标溶液的制备** 称取甘草素、甘草苷、异甘草素适量,精密称定,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解稀释至刻度,摇匀,得到含甘草素 100 ng·mL<sup>-1</sup>、甘草苷 128 ng·mL<sup>-1</sup>、异甘草素 98 ng·mL<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液。临用时用甲醇稀释配制其他浓度。

取卡马西平对照品适量,精密称定,加甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中,稀释成质量浓度为 100 μg·mL<sup>-1</sup> 的溶液作为内标储备液。精密量取内标储备液适量,用甲醇稀释成质量浓度为 2000.0 ng·mL<sup>-1</sup> 的内标溶液,将溶液储存在 4 ℃ 冰箱保存备用。

**2.2.4 血浆样品的采集** 6 只雄性 SD 大鼠(体重 180 ~ 220 g),适应性喂养(20 ~ 25 ℃,相对湿度 55% ~ 60%) 7 d,禁食过夜,自由饮水。称取辰砂六一散粉末并溶于生理盐水溶液中,根据辰砂六一散成人每日服药量,按照体表面积换算公式,以 1.8 g·kg<sup>-1</sup> 的剂量灌胃给药。在给药前和给药后 0.17、0.33、0.5、1、1.5、2、4、6、8、12、24 h,眼眶后静脉丛取血于肝素化试管中,并在 4000 r·min<sup>-1</sup> 下离心 10 min,储存于-80 ℃冰箱。

**2.2.5 血浆样品的处理** 取 100 μL 血浆置于 1.5 mL 离心管中,加入 10 μL 内标溶液、10 μL 甲醇,涡旋 1 min,加入 400 μL 乙腈,涡旋 1 min 并以 14 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min。取上清液在 40 ℃氮

气流下干燥,将残余物用 100  $\mu\text{L}$  甲醇-水 (20:80,  $V/V$ ) 复溶并涡旋 1 min,以 14 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,取 2  $\mu\text{L}$  上清液用于 LC-MS 分析。

**2.2.6 标准系列血浆样品和质控样品的制备** 取空白血浆 100  $\mu\text{L}$ ,加入甘草素溶液 (0.2、2、10、20、40、100、200  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),甘草苷溶液 (0.6、6、12、30、60、100、200  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),异甘草素溶液 (0.4、4、10、20、40、100、200  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 各 10  $\mu\text{L}$ ,除不加甲醇外均按照“2.2.5”项下方法处理,制成标准系列血浆样品溶液。加入甘草素溶液 (0.77、5.25、100  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),甘草苷溶液 (2、5.25、100  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),异甘草素溶液 (1.5、5.25、100  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 低、中、高三个浓度的混合对照品溶液各 10  $\mu\text{L}$ ,制成低、中、高浓度的质控样品。

**2.2.7 精密度与准确度考察** 取空白血浆 100  $\mu\text{L}$ ,按照“2.2.6”项下方法处理,制成低、中、高浓度的质控 (QC) 样品,每个浓度平行制备 6 份,连续测定 3 d,与标准曲线同批测定,以当日标准曲计算 QC 样品浓度,并计算方法的精密度与准确度。

**2.2.8 线性范围与定量限考察** 按照“2.2.6”项下方法制备标准系列血浆样品,每个样品双样本分析,进样量 2  $\mu\text{L}$ ;以血浆中待测物浓度为横坐标 ( $x$ ),以待测物与内标的峰面积比值为纵坐标 ( $y$ ),用加权最小二乘法进行线性回归,  $1/\chi^2$  为加权系数,所得方程即为回归方程。取空白血浆 100  $\mu\text{L}$ ,加入低浓度的混合对照品溶液 10  $\mu\text{L}$ ,除不加甲醇外,均按照“2.2.5”项下方法处理,平行制备 6 份,进样分析。

**2.2.9 专属性考察** 取来自 6 只大鼠的空白血浆,混匀,除用等体积甲醇代替内标外,均按照“2.2.5”项下方法处理,进行分析,得空白血浆样品色谱图;将空白血浆中加入浓度在定量下限处的甘草素、甘草苷、异甘草素的混合对照品溶液和 10  $\mu\text{L}$  内标溶液 (2000  $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ),以及灌胃给药辰砂六一散 1 h 的血浆样品,均同法处理,进样分析。

**2.2.10 提取回收率和基质效应考察** 取空白血浆 100  $\mu\text{L}$ ,按照“2.2.6”项下方法处理,制成低、中、高浓度的 QC 样品,每个浓度平行制备 6 份,进样分析,获得相应的峰面积的比值  $A$ 。另取空白血浆 100  $\mu\text{L}$ ,除不加对照品溶液和内标外,均按照“2.2.5”项下方法处理至取出上清液后,在上清液中加入内标溶液和相应浓度的混合对照品溶液各 10  $\mu\text{L}$ ,涡旋混合 1 min,在 40  $^{\circ}\text{C}$  氮气流下干燥。残余物用 100  $\mu\text{L}$  甲醇-水 (20:80,  $V/V$ ) 复溶,涡旋,离心两次后进样分析,获得相应的峰面积的比值  $B$ 。另取低、中、高浓度的混合对照品溶液和内标溶液各 10  $\mu\text{L}$ ,涡旋混合 1 min,在 40  $^{\circ}\text{C}$  氮气流下干燥。将残余物用 100  $\mu\text{L}$  甲醇-水 (20:80,

$V/V$ ) 复溶,涡旋,离心两次后进样分析,获得相应的峰面积的比值  $C$ 。 $A$  与  $B$  的比值即为提取回收率, $B$  与  $C$  的比值即为基质效应。

**2.2.11 辰砂六一散在大鼠中的血药浓度测定** LC/MS 平台测定不同时间点血浆中辰砂六一散 3 种活性成分 (甘草素、甘草苷、异甘草素) 的血药浓度,结合 DAS 2.0 软件计算药动力学参数。

**2.2.12 统计学方法** 所有实验数据以平均值  $\pm$  标准差表示。统计分析采用  $t$  检验进行组间比较,所有统计检验均在 SPSS 19.0 软件中完成。检验前对数据进行正态性检验,满足正态分布,则采用双侧  $t$  检验。以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 辰砂六一散抗慢性肝损伤药效学考察结果

**3.1.1 大鼠脏器指数** 正常组、模型组、辰砂六一散组和水飞蓟素组的大鼠心脏、肝脏、脾脏、肾脏和胸腺指数检测结果见图 1。结果表明,肝损伤大鼠的心指数、肝指数、脾指数、肾指数较正常组显著升高,胸腺指数显著下降。经辰砂六一散和水飞蓟素治疗后,心指数、肾指数、肝指数和脾指数显著下降,与此同时,胸腺指数显著上升。

**3.1.2 HE 染色对比** 各组大鼠肝脏样品组织病理学切片结果见图 2。正常大鼠肝脏组织肝小叶分界明显,排列规则,肝窦无损伤,汇管区结构清楚明显,无炎性细胞浸润 (见图 2A)。肝损伤大鼠肝小叶结构破坏,肝细胞坏死,胞核固缩、溶解,汇管区与中央静脉之间大量胶原纤维增生,中量以淋巴细胞为主的炎性细胞浸润,空泡变性、局部肝组织溶解 (见图 2B)。经给药治疗后,大鼠肝小叶破坏状况好转,炎性细胞减少,细胞水样变性程度相较于肝损伤大鼠存在减轻的情况 (见图 2C、2D)。

**3.1.3 辰砂六一散对慢性肝损伤大鼠炎症因子水平的影响** 结果见图 3。与正常大鼠相比,肝损伤大鼠肝脏中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  水平显著升高,说明机体炎症反应的发生;经辰砂六一散和水飞蓟素治疗后,IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平显著下降,说明在药物治疗后机体的炎症反应有所缓解。

**3.1.4 辰砂六一散对慢性肝损伤大鼠肝功能指标的影响** 结果见图 3。与正常大鼠相比,模型组、辰砂六一散组和水飞蓟素组的大鼠肝脏中的 ALT、AST 水平均显著升高,表明  $\text{CCl}_4$  诱导的肝损伤模型构建成功;与肝损伤大鼠相比,辰砂六一散组和水飞蓟素组的大鼠肝脏中的 ALT、AST 水平均显著降低,表明辰砂六一散和水飞蓟素对  $\text{CCl}_4$  所致的大鼠肝损伤均具有保护作用。

**3.1.5 辰砂六一散对慢性肝损伤大鼠氧化损伤程**



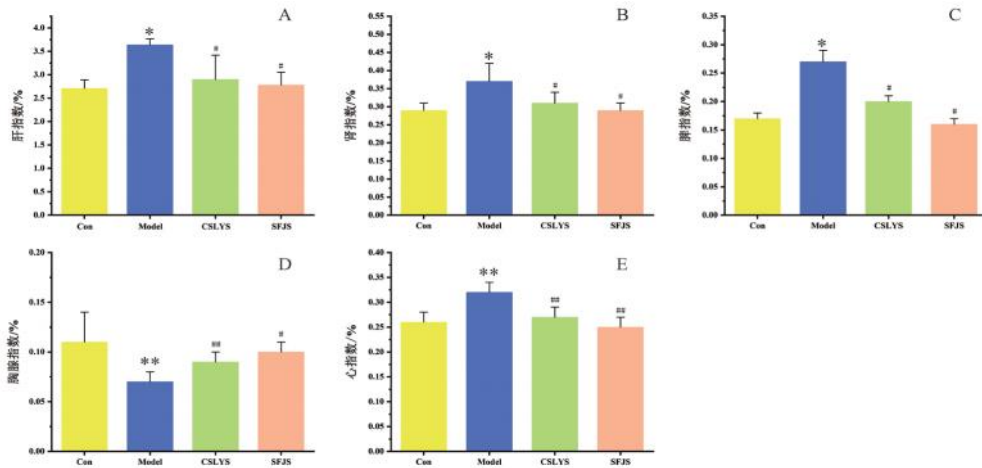


图 1 辰砂六一散对大鼠脏器指数的影响

Fig 1 Effect of Chensha Liuyi powder on the viscera index detection of rats

A. 肝 (liver); B. 肾 (kidney); C. 脾脏 (spleen); D. 胸腺 (thymus); E. 心脏 (heart)

注: 与正常组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与模型组相比, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ 。

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

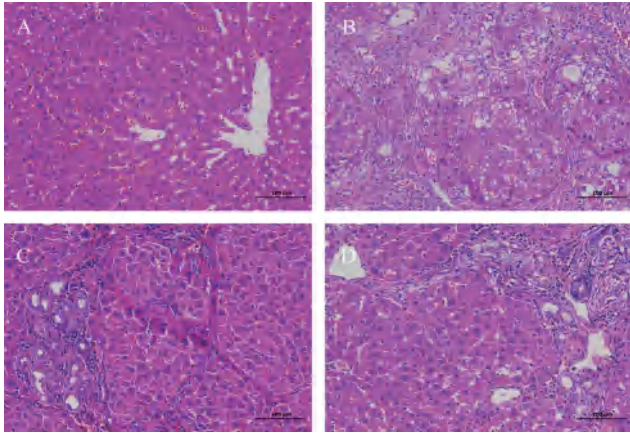


图 2 辰砂六一散对大鼠的代表性肝脏标本的组织病理学的影响 ( $\times 200$ )

Fig 2 Effect of Chensha Liuyi powder on the photomicrograph of representative liver specimens of rats ( $\times 200$ )

A. 正常组 (Control group); B. 模型组 (Model group); C 辰砂六一散组 (CSLYS group); D. 水飞蓟素组 (SFJS group)

度的影响 结果见图 4。与正常大鼠相比, 肝损伤大鼠肝组织中的 ROS 和 MDA 水平显著升高, SOD 活力和 GSH 水平显著降低, 经辰砂六一散治疗后, 显著降低 ROS 和 MDA 水平, 增加 SOD 活力和 GSH 水平, 说明辰砂六一散治疗后通过增强抗氧化酶的活力来改善肝脏损伤。

### 3.2 辰砂六一散中 3 种活性成分 LC/MS 方法学考察结果

**3.2.1 方法学考察结果** 3 种活性成分的日内和日间精密度  $RSD$  均不超过 6.1%, 准确度  $RSD$  为  $-5.0\% \sim 0.5\%$ , 均符合生物样品测定要求。各成分提取回收率为  $82.9\% \sim 97.5\%$ , 基质效应为  $83.9\% \sim 111.8\%$ , 符合生物样本分析的规定。稳定

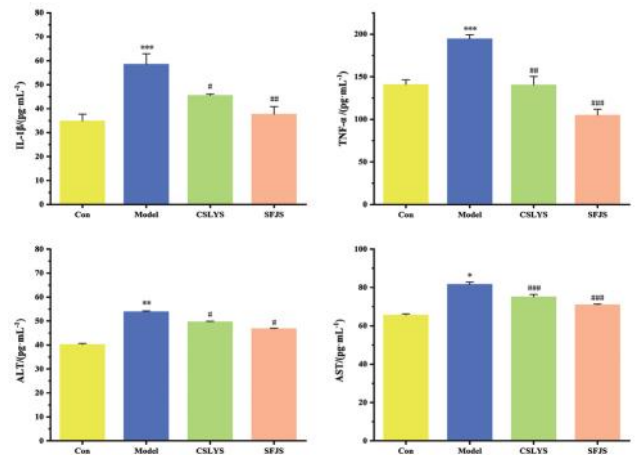


图 3 辰砂六一散对慢性肝损伤大鼠炎症因子水平的影响

Fig 3 Effect of Chensha Liuyi powder on the levels of inflammatory factors in rats with chronic liver injury

注: 与正常组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组相比, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ 。

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

$RE$  值均处于  $-4.1\% \sim 10.9\%$ , 证明它们在储存、处理和测定过程中均保持稳定。

**3.2.2 线性关系和定量限** 各待测成分在大鼠血浆中的标准曲线方程、线性范围及相关系数见表 2, 结果表明各待测成分在一定范围内与峰面积线性关系良好。

**3.2.3 专属性** 血浆中内源性物质不影响目标成分及内标的测定, 卡马西平、甘草苷、甘草素、异甘草素的保留时间分别为 5.95、3.57、4.95、7.02 min。血浆中的内源性物质不干扰分析, 待测物色谱峰形良好, 之间无交叉干扰, 表明本方法具有良好的专属性。



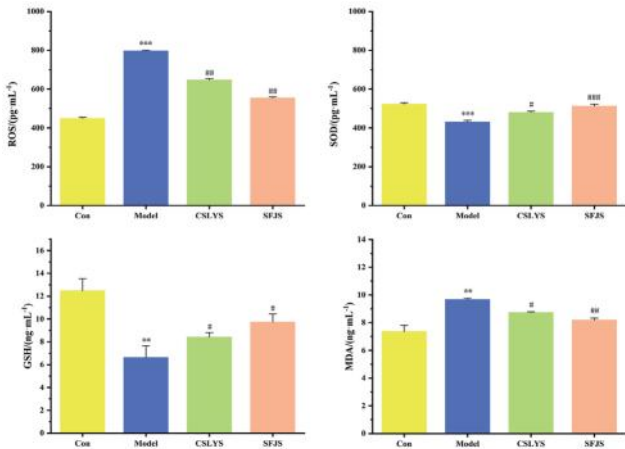


图 4 辰砂六一散对大鼠 ROS、MDA、SOD、GSH 生化检测结果  
Fig 4 Effect of Chensha Liuyi powder on the biochemical assay of ROS, MDA, SOD and GSH in rats

注：与正常组相比，\*\* $P < 0.01$ ，\*\*\* $P < 0.001$ ；与模型组相比，<sup>#</sup> $P < 0.05$ ，<sup>##</sup> $P < 0.01$ ，<sup>###</sup> $P < 0.001$ 。

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

表 2 3 种分析物在大鼠血浆中的标准曲线

Tab 2 Standard curves of the three analytes in rat plasma by LC/MS method

| 分析物  | 回归方程                                             | $r$    | 线性范围 /<br>( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) |
|------|--------------------------------------------------|--------|------------------------------------------------|
| 甘草苷  | $Y = 8.71 \times 10^{-2}X + 5.52 \times 10^{-3}$ | 0.9952 | 0.6 ~ 200                                      |
| 甘草素  | $Y = 8.26 \times 10^{-2}X + 1.92 \times 10^{-3}$ | 0.9969 | 0.2 ~ 200                                      |
| 异甘草素 | $Y = 6.79 \times 10^{-2}X + 5.56 \times 10^{-3}$ | 0.9959 | 0.4 ~ 200                                      |

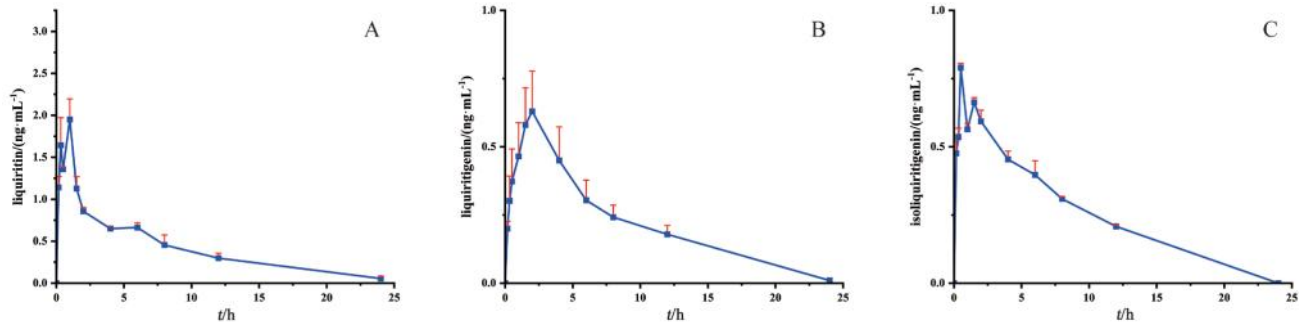


图 5 口服辰砂六一散后甘草素、甘草苷、异甘草素的平均血药浓度 - 时间曲线  
Fig 5 Mean concentration-time curves of liquiritin, liquiritigenin and isoliquiritigenin after oral administration of Chensha Liuyi powder  
A. 甘草苷 (liquiritin); B. 甘草素 (liquiritigenin); C. 异甘草素 (isoliquiritigenin)

表 4 口服辰砂六一散后甘草素、甘草苷、异甘草素的药动学参数 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Tab 4 Pharmacokinetic parameters of liquiritin, liquiritigenin and isoliquiritigenin after oral administration of Chensha Liuyi powder ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

| 分析物  | $C_{\max}/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$ | $t_{\max}/\text{h}$ | $t_{1/2}/\text{h}$ | $AUC_{0 \sim 24\text{h}}/(\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1})$ | $AUC_{0 \sim \text{inf}}/(\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1})$ |
|------|---------------------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| 甘草苷  | $1.95 \pm 0.18$                             | $1.00 \pm 0.27$     | $6.52 \pm 1.27$    | $9.38 \pm 0.57$                                                           | $11.11 \pm 1.29$                                                          |
| 甘草素  | $0.63 \pm 0.16$                             | $1.75 \pm 1.17$     | $8.53 \pm 4.01$    | $5.28 \pm 1.12$                                                           | $7.86 \pm 1.58$                                                           |
| 异甘草素 | $0.79 \pm 1.61$                             | $0.50 \pm 0.12$     | $9.77 \pm 1.04$    | $5.73 \pm 0.24$                                                           | $10.08 \pm 0.39$                                                          |

酸，导致脂质过氧化<sup>[13]</sup>。脂质过氧化会破坏细胞膜的完整性，导致细胞损伤和死亡。ALT 和 AST 存在各种组织中，主要集中于肝脏<sup>[14]</sup>。当肝脏受

3.2.4 药动学结果 大鼠采用灌胃给药后，3 种待测物各时间点的血药浓度见表 3，平均血药浓度 - 时间曲线见图 5。各待测物的药动学参数见表 4。

表 3 口服辰砂六一散后大鼠血浆中 3 种分析物的浓度 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )  
Tab 3 Concentration of three analytes in rat plasma after oral administration of Chensha Liuyi powder ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

| 时间 /h | 血药浓度 / ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) |                 |                 |
|-------|---------------------------------------------|-----------------|-----------------|
|       | 甘草苷                                         | 甘草素             | 异甘草素            |
| 0.17  | $1.49 \pm 0.13$                             | $0.20 \pm 0.02$ | $0.46 \pm 0.05$ |
| 0.33  | $1.64 \pm 0.33$                             | $0.30 \pm 0.09$ | $0.62 \pm 0.02$ |
| 0.5   | $1.39 \pm 0.02$                             | $0.37 \pm 0.12$ | $0.79 \pm 0.03$ |
| 1     | $1.95 \pm 0.25$                             | $0.47 \pm 0.12$ | $0.67 \pm 0.02$ |
| 1.5   | $1.15 \pm 0.14$                             | $0.58 \pm 0.13$ | $0.64 \pm 0.04$ |
| 2     | $1.05 \pm 0.04$                             | $0.63 \pm 0.15$ | $0.61 \pm 0.03$ |
| 4     | $0.77 \pm 0.03$                             | $0.45 \pm 0.12$ | $0.54 \pm 0.02$ |
| 6     | $0.60 \pm 0.06$                             | $0.31 \pm 0.07$ | $0.47 \pm 0.03$ |
| 8     | $0.45 \pm 0.12$                             | $0.24 \pm 0.04$ | $0.32 \pm 0.02$ |
| 12    | $0.30 \pm 0.06$                             | $0.18 \pm 0.03$ | $0.22 \pm 0.01$ |
| 24    | $0.07 \pm 0.02$                             | $0.01 \pm 0.01$ | $0.01 \pm 0.02$ |

4 讨论

本研究使用  $\text{CCl}_4$  诱导大鼠慢性肝损伤的机制是在其进入体内， $\text{CCl}_4$  在体内被肝脏中的细胞色素 P450 酶系统（主要是 CYP2E1）代谢成三氯甲基自由基 ( $\cdot \text{CCl}_3$ ) 和三氯甲基过氧自由基 ( $\cdot \text{CCl}_3\text{OO}$ )<sup>[12-13]</sup>。自由基产生的同时会导致机体氧化应激反应，ROS 形成增加，这些自由基会攻击肝细胞膜中的脂质，特别是多不饱和脂肪

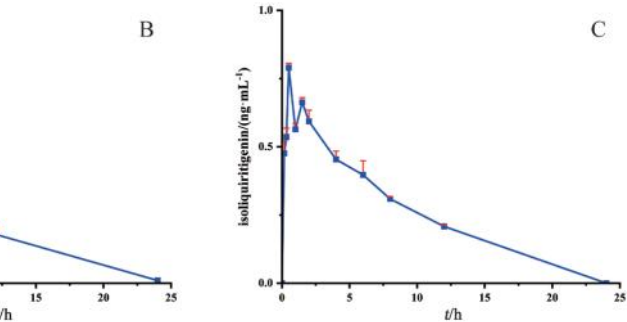


图 5 口服辰砂六一散后甘草素、甘草苷、异甘草素的平均血药浓度 - 时间曲线  
Fig 5 Mean concentration-time curves of liquiritin, liquiritigenin and isoliquiritigenin after oral administration of Chensha Liuyi powder  
A. 甘草苷 (liquiritin); B. 甘草素 (liquiritigenin); C. 异甘草素 (isoliquiritigenin)

| 分析物  | $C_{\max}/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$ | $t_{\max}/\text{h}$ | $t_{1/2}/\text{h}$ | $AUC_{0 \sim 24\text{h}}/(\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1})$ | $AUC_{0 \sim \text{inf}}/(\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1})$ |
|------|---------------------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| 甘草苷  | $1.95 \pm 0.18$                             | $1.00 \pm 0.27$     | $6.52 \pm 1.27$    | $9.38 \pm 0.57$                                                           | $11.11 \pm 1.29$                                                          |
| 甘草素  | $0.63 \pm 0.16$                             | $1.75 \pm 1.17$     | $8.53 \pm 4.01$    | $5.28 \pm 1.12$                                                           | $7.86 \pm 1.58$                                                           |
| 异甘草素 | $0.79 \pm 1.61$                             | $0.50 \pm 0.12$     | $9.77 \pm 1.04$    | $5.73 \pm 0.24$                                                           | $10.08 \pm 0.39$                                                          |

损，肝细胞损伤、细胞膜的通透性增加时，ALT、AST 释放进入血液中，导致其含量增加<sup>[15]</sup>。脂质过氧化产物可以激活 Kupffer 细胞（肝内巨噬细

胞)<sup>[16]</sup>, 释放出各种促炎因子, 如 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和其他趋化因子。这些因子进一步加重了炎症反应, 引起肝细胞的损伤和坏死。在 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝损伤过程中, 细胞内的抗氧化酶如 GPx、SOD 和 CAT 等被消耗, 从而减弱了抗氧化防御能力<sup>[17]</sup>。MDA、GSH 和 SOD 等氧化应激指标可反映机体氧化-抗氧化系统的平衡情况<sup>[18]</sup>。MDA 水平是衡量脂质过氧化程度和氧化应激水平的重要指标。MDA 水平升高通常表示氧化应激增强、脂质过氧化加剧, 提示细胞受到了显著的氧化损伤<sup>[19]</sup>。SOD 活性的高低反映了机体清除超氧阴离子的能力。高活性通常表示较强的抗氧化防御能力, 而低活性则提示抗氧化防御受损, 可能导致氧化应激增加<sup>[20-21]</sup>。GSH 水平反映了细胞的抗氧化能力和解毒能力, GSH 调节大脑中的脑内细胞信号传导、蛋白质功能、基因表达和细胞分化和增殖。较高的 GSH 水平一般表示抗氧化状态良好, 而 GSH 耗竭通常与氧化应激和细胞损伤有关<sup>[22-23]</sup>。

研究结果表明, 经辰砂六一散治疗后, 肝损伤大鼠的肝指数和脾脏指数下降, 胸腺指数升高。脾脏参与机体的体液免疫, 胸腺参与机体的细胞免疫<sup>[24-26]</sup>, 这表明辰砂六一散通过调节机体免疫而对肝脏起到保护作用。其他脏器指数的回调趋势, 表明辰砂六一散缓解了 CCl<sub>4</sub> 造成的多脏器损伤的现象。经治疗, 肝损伤大鼠的 ALT、AST、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、ROS 和 MDA 水平显著下降, GSH 和 SOD 活力显著上升, 表明辰砂六一散通过抑制炎症因子, 提高抗氧化酶的活性, 减轻 CCl<sub>4</sub> 对机体的伤害。辰砂六一散中 3 种成分的药动结果显示, 甘草苷具有入血含量最高, 清除最快的特点。

综上所述, 辰砂六一散可有效降低机体内的炎症因子和氧化应激生化指标的水平, 减轻 CCl<sub>4</sub> 对机体的伤害。本研究通过探索辰砂六一散中活性成分在大鼠体内的药动学特征, 揭示其代谢规律及分布特征, 可为其进一步体内研究及药物开发提供科学依据。

## 参考文献

- [1] Hasanein P, Ghafari-Vahed M, Khodadadi I, et al. Effects of isoquinoline alkaloid berberine on lipid peroxidation, antioxidant defense system, and liver damage induced by lead acetate in rats [J]. Redox Rep, 2017, 22 (1): 42-50.
- [2] Huang YQ, Zhang Y, Wu KR, et al. Role of gut microecology in the pathogenesis of drug-induced liver injury and emerging therapeutic strategies [J]. Molecules, 2024, 29 (11): 2663.
- [3] Hu CX, Zhao LF, Zhang LJ, et al. Mesenchymal stem cell-based cell-free strategies: safe and effective treatments for liver injury [J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11: 377.
- [4] Wang MY, Anderson G, Nowicki D, et al. Hepatic protection by noni fruit juice against CCl<sub>4</sub>-induced chronic liver damage in female SD rats [J]. Plant Foods Hum Nutr, 2008, 63: 141-145.
- [5] George J, Lu Y, Tsuchishima M, et al. Cellular and molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury: the role of oxidative stress and therapeutic approaches [J]. Redox Biol, 2024, 75: 103258.
- [6] José C, Pierre V, Lenka T, et al. Free radical-scavenging, antioxidant and immunostimulating effects of a licorice infusion (*Glycyrrhiza glabra* L.) [J]. Food Chem, 2010, 122 (3): 508-517.
- [7] Lin Y, Kuang Y, Li K, et al. Nrf2 activators from glycyrrhiza inflata and their hepatoprotective activities against CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in mice [J]. Bioorg Med Chem, 2017, 25: 5522-5530.
- [8] Hosseinzadeh H, Nassiri-Asl M. Pharmacological effects of glycyrrhiza spp and its bioactive constituents: update and review [J]. Phytother Res, 2015, 29 (12): 1868-1886.
- [9] Zhang Z, Yung KK, Ko JK, et al. Therapeutic intervention in cancer by isoliquiritigenin from licorice: a natural antioxidant and redox regulator [J]. Antioxidants, 2022, 11 (7): 1349.
- [10] Liu N, Liu JM, Jiang MW, et al. Isoliquiritigenin alleviates the development of alcoholic liver fibrosis by inhibiting ANXA2 [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 159: 114-173.
- [11] Saber G, Magdy A, Mleeh A, et al. Traditional uses, bioactive chemical constituents, and pharmacological and toxicological activities of glycyrrhiza glabra [J]. Biomolecules, 2020, 10 (3): 352.
- [12] Munakarmi S, Gurau Y, Shrestha J, et al. Synergistic effects of vitis vinifera L and centella asiatica against CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in mice [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24 (14): 11255.
- [13] Ali H, Jahan A, Samrana S, et al. Hepatoprotective potential of pomegranate in curbing the incidence of acute liver injury by alleviating oxidative stress and inflammatory response [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 607-694.
- [14] Fan XF, Wang XY, Hui YY, et al. Genipin protects against acute liver injury by abrogating ferroptosis via modification of GPX4 and ALOX15-launched lipid peroxidation in mice [J]. Apoptosis, 2023, 28: 1469-1483.
- [15] Zheng G, Yuan FF, Li HP, et al. The ameliorations of ganoderma applanatum residue polysaccharides against CCl<sub>4</sub> induced liver injury [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 137: 1130-1140.
- [16] Banerjee P, Gaddam N, Chandler V, et al. Oxidative stress-induced liver damage and remodeling of the liver vasculature [J]. Am J Pathol, 2023, 193 (10): 1400-1414.
- [17] Meng X, Tang GY, Liu PH, et al. Antioxidant activity and hepatoprotective effect of 10 medicinal herbs on CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in mice [J]. World J Gastroenterol, 2020, 26 (37): 5629-5645.
- [18] Du KH, Wang L, Wang ZL, et al. Angelica sinensis polysaccharide antagonizes 5-fluorouracil-induced spleen injury and dysfunction by suppressing oxidative stress and apopto-

- sis [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 162: 114602.
- [19] Valgimigli L. Lipid peroxidation and antioxidant protection [J]. Biomolecules, 2023, 13 (9): 1291.
- [20] 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 Immunopharmacol, 2016, 34: 44-52.
- [21] Li Q, Zhang W, Nuo C, et al. Pectolinarigenin ameliorates acetaminophen-induced acute liver injury via attenuating oxidative stress and inflammatory response in Nrf<sub>2</sub> and PPAR $\alpha$  dependent manners [J]. Phytomedicine, 2023, 113: 154726.
- [22] Hu KR, Xu YX, Fan JY, et al. Feasibility exploration of GSH in the treatment of acute hepatic encephalopathy from the aspects of pharmacokinetics pharmacodynamics and mechanism [J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1387409.
- [23] Golubkova A, Leiva T, Snyder K, et al. Response of the glutathione (GSH) antioxidant defense system to oxidative injury in necrotizing enterocolitis [J]. Antioxidants (Basel), 2023, 12 (7): 1385.
- [24] Eichwald T, Talbot S. Aching to defend: spleen innervation drives humoral immunity [J]. Trends Immunol, 2024, 45 (8): 574-576.
- [25] Li WY, Guo SX, Xu DN, et al. Polysaccharide of atracylodes macrocephala koidz (PAMK) relieves immunosuppression in cyclophosphamide-treated geese by maintaining a humoral and cellular immune balance [J]. Molecules, 2018, 23 (4): 932.
- [26] Wang HL, Zúñiga P, Juan C, et al. Thymic microenvironment: interactions between innate immune cells and developing thymocytes [J]. Front Immunol, 2022, 13: 885280.
- (收稿日期: 2024-10-30; 修回日期: 2024-12-20)

## 基于网络药理学的蛹虫草活性成分抗乳腺癌活性及作用机制研究

窦瑶, 王宏英, 孙聪, 周晓晶, 郭艳霞, 侯璐, 阎慧, 郭震宇, 王卫芳\* (长春中医药大学临床医学院, 长春 130117)

**摘要:** **目的** 从多成分、多靶点整合作用的角度, 探讨蛹虫草活性成分虫草素和虫草酸抗乳腺癌作用的分子机制。 **方法** 以蛹虫草为研究材料, 以蛹虫草的活性成分虫草素和虫草酸为研究对象, 基于网络药理学的原理, 构建蛹虫草活性成分虫草素和虫草酸抗乳腺癌作用蛋白质互作网络。并依据该网络, 分别选用 Luminal A 型乳腺癌细胞株 MCF-7 和三阴性乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 构建乳腺癌细胞模型, 在确立了虫草素和虫草酸合适的刺激浓度后, 分析其对细胞增殖活性及诱导凋亡作用, 再对在互作网络中筛选到的信号传导通路中的关键节点蛋白质的基因表达情况进行分析。 **结果** 收集得到蛹虫草活性成分虫草素和乳腺癌共有靶点 133 个, 虫草酸和乳腺癌共有靶点 164 个, 构建虫草素和虫草酸的抗乳腺癌作用靶点的蛋白质相互作用网络; 虫草素与乳腺癌共有靶点总共富集到 73 条信号通路, 虫草酸与乳腺癌共有靶点总共富集到 170 条信号通路。不同浓度的虫草素和虫草酸对两种乳腺癌细胞均有抑制增殖效应, 但虫草酸的抑制效应并没有虫草素高; 虫草素与虫草酸对两种乳腺癌细胞均有促进凋亡效果; 对互作网络中各筛选到的 10 个关键节点蛋白质的基因表达情况分析发现, 虫草素对两种乳腺癌细胞的调控机制是基本相反的, 虫草酸对两种乳腺癌细胞的调控机制无相似性。 **结论** 蛹虫草活性成分虫草素和虫草酸对乳腺癌作用的多条信号通路有调控介导作用, 通过调控多种关键靶蛋白表达情况参与抗乳腺癌作用机制, 可为进一步揭示蛹虫草的抗乳腺癌作用分子机制提供理论依据。

**关键词:** 蛹虫草; 乳腺癌; 网络药理学; 蛋白质互作网络; 信号通路; 虫草素; 虫草酸

**中图分类号:** R285.5

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-2981(2025)08-2208-09

**doi:** 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.010

**基金项目:** 吉林省教育厅科学技术研究项目 (No.JJKH20220853KJ; No.JJKH20241084KJ; No.JJKH20230951KJ); 长春中医药大学第二批“杏林学者工程”青年科学家项目培养计划 (No.QNKXJ2-2021 + ZR33); 吉林省自然科学基金 (No.YDZJ202501ZYTS180)。

**作者简介:** 窦瑶, 女, 博士研究生, 副教授, 主要从事中药治疗疾病机制及网络药理学研究, email: 95291433@qq.com \*通信作者: 王卫芳, 女, 博士研究生, 副教授, 主要从事中药治疗肿瘤的分子机制研究, email: 736792268@qq.com



## Anti-breast cancer properties and mechanism of the active components of *Cordyceps militaris* based on network pharmacology

DOU Yao, WANG Hong-ying, SUN Cong, ZHOU Xiao-jing, GUO Yan-xia, HOU Lu, YAN Hui, GUO Huan-yu, WANG Wei-fang\* (School of Clinical Medicine, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117)

**Abstract: Objective** To determine the molecular mechanism of the anti-breast cancer effect of cordycepin and cordycepic acid, active components of *Cordyceps militaris* via multi-component, multi-target integrative action. **Methods** This study used *Cordyceps militaris* as the research material, but focused on its active components cordycepin and cordycepic acid. Based on network pharmacology, a protein interaction network was established to elucidate the anti-breast cancer effect of these components. Breast cancer cell models were established with Luminal A-type cancer cell lines MCF-7 and triple-negative breast cancer cell lines MDA-MB-231. Upon determining the appropriate concentrations of cordycepin and cordycepic acid, we analyzed their effects on the cell proliferation inhibition and apoptosis induction. Subsequently, the gene expression of key node proteins in the signal transduction pathways identified in the interaction network was examined. **Results** The study identified 133 common targets between cordycepin and breast cancer, and 164 common targets between cordycepic acid and breast cancer. The protein interaction network for the anti-breast cancer effects of cordycepin and cordycepic acid was conducted, revealing 73 and 170 enriched signal pathways, respectively. Both compounds inhibited the proliferation in both breast cancer cell lines, with cordycepic acid showing weaker inhibition than cordycepin. Both compounds promoted apoptosis in the cells. Gene expression analysis of the 10 key node proteins selected from the interaction network displayed distinct regulatory mechanism of cordycepin in both breast cancer cell types, while the regulatory mechanism of cordycepic acid was different. **Conclusion** The active components in *Cordyceps militaris*, namely cordycepin and cordycepic acid, regulate multiple signaling pathways in breast cancer. By modulating the expression of various key target proteins, they are involved in the anti-breast cancer mechanism, providing a theoretical basis for further elucidating its molecular mechanism against breast cancer.

**Key words:** *Cordyceps militaris*; breast cancer; network pharmacology; protein interaction network; signaling pathway; cordycepin; cordycepic acid

蛹虫草 (*Cordyceps militaris* L. Link), 也有蛹草、北虫草、北冬虫夏草之称。在生物学上, 被归入子囊菌门 (*Ascomycota*)、肉座菌目 (*Hypocreales*)、虫草菌科 (*Cordycipitaceae*)<sup>[1]</sup>。蛹虫草与冬虫夏草具有极相似的生物活性成分<sup>[2]</sup>。其中活性成分如虫草素、虫草酸、虫草多糖、氨基酸、维生素、微量元素和超氧化物歧化酶 (SOD) 等的含量比冬虫夏草还要高<sup>[3]</sup>。我国对于蛹虫草的研究始载于《新华本草纲要》, 其性平、味甘, 能止血化痰、补精髓、益肺补肾。经现代药理研究证实, 蛹虫草所含活性物质虫草素、SOD、虫草酸、甾醇、虫草多糖等皆具有多种药理作用, 如抗炎、抗心律失常、抗肿瘤、抗衰老等<sup>[4]</sup>。

乳腺癌 (breast cancer, BC) 是极易发生于女性群体的一类恶性肿瘤<sup>[5]</sup>。据国家癌症中心相关统计数据可知, 乳腺癌是 45 岁以下女性癌症死

亡的一大主因<sup>[6]</sup>。乳腺癌发病机制的研究一直以来都是国内外科科研工作者的关注热点, 而蛹虫草中具有多种活性成分, 例如虫草素、虫草酸, 它们对乳腺癌的反应的调节机制尚不清楚<sup>[7]</sup>。

虫草素 (cordycepin), 即 3'-脱氧腺苷 (3'-deoxyadenosine), 是提取自真菌内的首个核苷类抗生素<sup>[8]</sup>。虫草素具有抗肿瘤<sup>[9]</sup>、抗菌、抗病毒、免疫调节、清除自由基等多种药理作用<sup>[10]</sup>。以虫草素为主要成分的新药已在临床上试用于白血病的治疗, 有着良好的临床应用前景<sup>[11]</sup>。

虫草酸 (cordycepic acid), 即 D-甘露醇 (D-mannitol), 是蛹虫草的主要有效成分之一<sup>[12]</sup>。蛹虫草中的虫草酸含量要高于天然的冬虫夏草<sup>[13]</sup>。虫草酸具有利尿脱水、提高血浆渗透压、镇喘祛痰等药理作用。

本研究以蛹虫草的活性成分虫草素和虫草酸为研究对象,基于网络药理学的原理,构建蛹虫草活性成分虫草素和虫草酸抗乳腺癌作用的蛋白质互作(PPI)网络。并参照第8版美国癌症联合委员会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)乳腺癌分型标准,分别选用Luminal A型乳腺癌细胞株MCF-7和三阴性乳腺癌细胞株MDA-MB-231构建乳腺癌细胞模型,在确立了虫草素和虫草酸合适的刺激浓度后,对其是否具有抑制细胞增殖活性及诱导凋亡作用进行分析,再对在PPI网络中筛选到的信号传导通路中的关键节点蛋白质的基因表达情况进行分析。

## 1 材料

### 1.1 细胞

人Luminal A型乳腺癌细胞MCF-7和人三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231购自沈阳汇佰生物科技有限公司,由本院生物化学与分子生物学实验室复苏培养。

### 1.2 试剂

虫草素、虫草酸(纯度>99%,成都德思特生物技术有限公司)。DMEM培养基、RPMI 1640培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、培养皿和多孔细胞培养板等[生工生物(上海)股份有限公司]。四甲基偶氮唑蓝(MTT)、碘化丙啶(PI)(杭州都俊生物技术有限公司)。AnnexinV-FITC/PI细胞凋亡双染试剂盒(美国BD Biosciences公司),SystemGoTaq qPCR Master Mix(美国Promega公司)。

### 1.3 仪器

低温高速离心机(天津市泰新特仪器有限公司),超微量紫外分光光度计、电子显微镜、二氧化碳培养箱(Termo公司),酶标仪(Tecan公司),细胞计数仪(LUNA-II公司),流式细胞仪(Luminex公司),实时荧光定量PCR仪(ABI公司)。

## 2 方法

### 2.1 网络药理学分析

**2.1.1 虫草素-乳腺癌和虫草酸-乳腺癌的靶点信息检索** 通过PubChem数据库获取蛹虫草的活性成分虫草素和虫草酸的SMILE ID和InChI ID,之后通过Similarity Ensemble Approach(SEA)数据库(<https://sea.bkslab.org/>)、Batman-TCM数据库<sup>[14]</sup>(<http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/>)以及GeneCards数据库<sup>[15]</sup>(<https://www.genecards.org/>)检索虫草素和虫草酸的靶点。检索的靶点经Uniprot数据库(<https://www.uniprot.org/>)校正去重。以“乳腺癌(breast cancer)”为关键词,通过数据库GeneCards<sup>[12]</sup>数据库(<https://www.genecards.org/>)与NCBI数据库<sup>[16]</sup>(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行乳腺癌相关靶点的检索。向Venny 2.1(韦恩图制作软件)内输入筛选所得的虫草素、虫草酸靶点以及乳腺癌靶点,

完成韦恩图的绘制,即获取交集靶点。

**2.1.2 PPI网络构建及拓扑分析** 向数据库STRING<sup>[17]</sup>(<https://string-db.org/cgi/input.pl>)内输入虫草酸、虫草素和乳腺癌交集靶点,以此开展PPI网络的构建,所设定的生物种类是“Homo sapiens”,完成PPI网络的制作。将PPI网络导入Cytoscape 3.8.0<sup>[18]</sup>中,通过NetworkAnalyzer工具进行拓扑分析,经度值(degree)排序,将分值在平均分以上的基因当作核心靶点,通过R 3.6.3基于前20个靶点来绘制图片,将各靶点度值作为横坐标参数。

### 2.1.3 虫草素、虫草酸-乳腺癌-靶点网络构建

为了更充分地认知疾病、成分、相应靶点之间的复杂相互作用关系,以纳入的成分即蛹虫草活性成分虫草素和虫草酸、疾病即乳腺癌以及作用靶点为基础,构建了成分-疾病-靶点网络图,导入Cytoscape 3.8.0中,绘制网络图。

**2.1.4 GO和KEGG通路富集分析以及核心靶点获取** 对于虫草酸、虫草素和乳腺癌的交集靶点开展GO的分子功能(MF)、生物过程(BP)以及细胞组分(CC)富集和KEGG途径富集分析,引用STRING数据库,将校正 $P$ 值<0.05的项目进行筛选。对于筛选所得靶点,通过R 4.0.3软件,安装并引用enrichplot、ggplot2和clusterProfiler包,以此绘制出柱状图。

根据已构建的虫草素、虫草酸与乳腺癌PPI网络,以及基于PPI网络的拓扑分析、GO和KEGG通路富集分析。将PPI网络通过NetworkAnalyzer工具进行拓扑分析,通过度值排序,选取分值大于平均分的基因作为关键核心靶点,并依据GO富集分析和KEGG通路富集分析结果,筛选虫草素、虫草酸与乳腺癌PPI网络中的关键核心蛋白质。

**2.1.5 虫草素/虫草酸-乳腺癌-通路-靶点网络构建** 将成分-疾病-通路-靶点网络文件导入Cytoscape 3.8.0进行通路网络图的绘制。更直观地展示蛹虫草活性成分在抗乳腺癌过程中的作用特点。

### 2.2 蛹虫草活性成分对乳腺癌细胞模型的影响实验

**2.2.1 MTT法观察蛹虫草活性成分对两种乳腺癌细胞增殖的影响** 细胞在5%CO<sub>2</sub>、37℃、100%湿度的条件下培养。将对数生长期的两种乳腺癌细胞分别配制成 $1 \times 10^5$ 个·mL<sup>-1</sup>的细胞液,接种于96孔细胞培养板中,各孔190 μL,培养4 h。当细胞贴壁后分别加入10 μL不同浓度虫草素溶液(1.0、2.0、4.0及8.0 μg·mL<sup>-1</sup>)和虫草酸溶液(1.0、2.0、4.0及8.0 μg·mL<sup>-1</sup>),每种浓度设6个平行孔,对照孔加入等量培养液,作用于细胞24、48、72 h后吸去培养液,每孔加入50 mg·mL<sup>-1</sup>的MTT 50 μL,继续孵育4 h,弃上清液,各孔再分

别放入 150  $\mu\text{L}$  二甲基亚砜 (DMSO), 低速振荡, 通过酶标仪测定 490 nm 处的光密度 (OD) 值, 均重复 3 次, 计算平均 OD 以及细胞生长抑制率。

**2.2.2 蛹虫草活性成分作用于两种乳腺癌细胞后细胞凋亡分析** 将对数生长期的乳腺癌细胞接种于 6 孔板中, 待板底呈 75% ~ 80% 细胞铺满率, 更换为 3 mL 内含不同浓度虫草素 (0、1.0、2.0、4.0、8.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 与不同浓度虫草酸 (0、1.0、2.0、4.0、8.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的培养液。经过 1、2 d 的培养, 加入小部分 Trypsin 用以除掉爬片细胞, 离心收集细胞, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 漂洗, 制成  $1 \times 10^6$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  的单细胞悬液, 加入 Annexin V 与预冷的 75% 乙醇, 4  $^{\circ}\text{C}$  下过夜, 通过含 Rnase 级 PI 遮光染色 30 min, 借助流式细胞仪查细胞膜不对称性改变, 测定细胞凋亡率。

**2.2.3 PPI 网络中筛选到的关键核心蛋白质的基因表达情况分析** 根据分析已得到的 MTT 和细胞凋亡结果, 确定虫草素和虫草酸对两种细胞合适的干预浓度为 8.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 其中虫草酸对 MCF-7 细胞的干预时间选择 24 h, 其余干预时间为 48 h。提取上述处理细胞的总 RNA, 利用 qRT-PCR 方法对在 PPI 网络中筛选到的关键核心蛋白质的基因表达情况进行分析。

### 2.3 统计学处理

数据采用软件 R 软件和 SPSS 16.0 软件进行统计处理。经单因素方差分析 (ANOVA) 实施多组对比, 经 Dunnett's 或者 Bonferroni's 检验开

展多因素对比。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 网络药理学分析结果

**3.1.1 虫草素 - 乳腺癌和虫草酸 - 乳腺癌的靶点信息检索** 通过 PubChem 数据库检索虫草素和虫草酸的靶点, 检索的靶点经 Uniprot 数据库校正去重后总共获得虫草素靶点 176 个, 虫草酸靶点 182 个。在 GeneCards 数据库检索到 7597 条乳腺癌相关靶点, 在 NCBI 数据库检索到 5013 条乳腺癌相关靶点, 合并这两个数据库的基因, 并进行删重处理, 获得 8678 个乳腺癌相关靶点。利用筛选出的虫草素和虫草酸靶点与乳腺癌靶点制作韦恩图, 得到虫草素与乳腺癌交集靶点 133 个, 虫草酸与乳腺癌交集靶点 164 个, 作为蛹虫草活性成分作用于乳腺癌的潜在靶点。

**3.1.2 PPI 网络构建及拓扑分析** 利用筛选出的虫草素与乳腺癌共有靶点构建 PPI 网络图, 该网络中有 133 个节点, 655 条边, 平均度值为 9.92。利用筛选出的虫草酸与乳腺癌共有靶点构建 PPI 网络图, 该网络中有 164 个节点, 2222 条边, 平均度值为 27.4。在 PPI 网络中选取分值在平均分以上的基因作为关键靶点, 虫草素与乳腺癌的 PPI 网络中一共筛选出 52 个关键靶点, 虫草酸与乳腺癌的 PPI 网络中一共筛选出 60 个关键靶点, 通过 R 3.6.3, 基于前 20 个靶点完成图片绘制, 各靶点的度值见图 1。

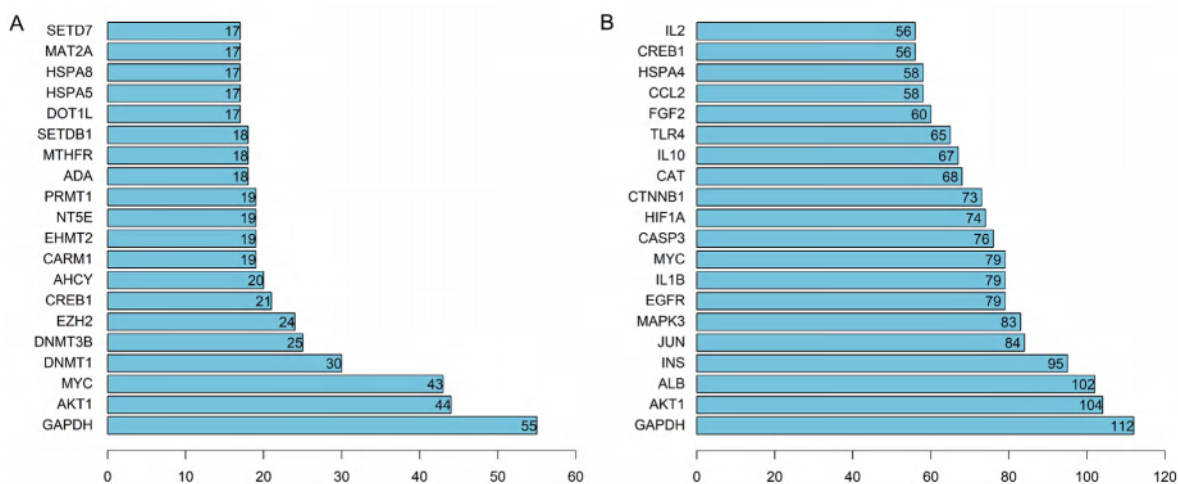


图 1 虫草素 (A) 及虫草酸 (B) 与乳腺癌作用靶点的 PPI 网络中的关键蛋白质筛选

Fig 1 Screening of key proteins in PPI network of action targets of cordycepin (A) and cordycepic acid (B) and breast cancer

**3.1.3 虫草素 / 虫草酸 - 乳腺癌 - 靶点网络** 为了更充分地认知成分、疾病、相关靶点之间的互作性, 构建虫草素 / 虫草酸 - 乳腺癌 - 靶点网络图见图 2。

**3.1.4 GO 和 KEGG 通路富集分析** 虫草素 - 乳腺癌共有靶点总共富集到 786 条 BP, 85 项 MF 相关,

21 项 CC 相关。虫草酸 - 乳腺癌共有靶点总共富集到 2110 条 BP, 114 项 MF 相关, 40 项 CC 相关。

将虫草素、虫草酸与乳腺癌共有靶点进行 KEGG 通路富集分析。虫草素与乳腺癌共有靶点总共富集到 73 条信号通路。虫草酸与乳腺癌共



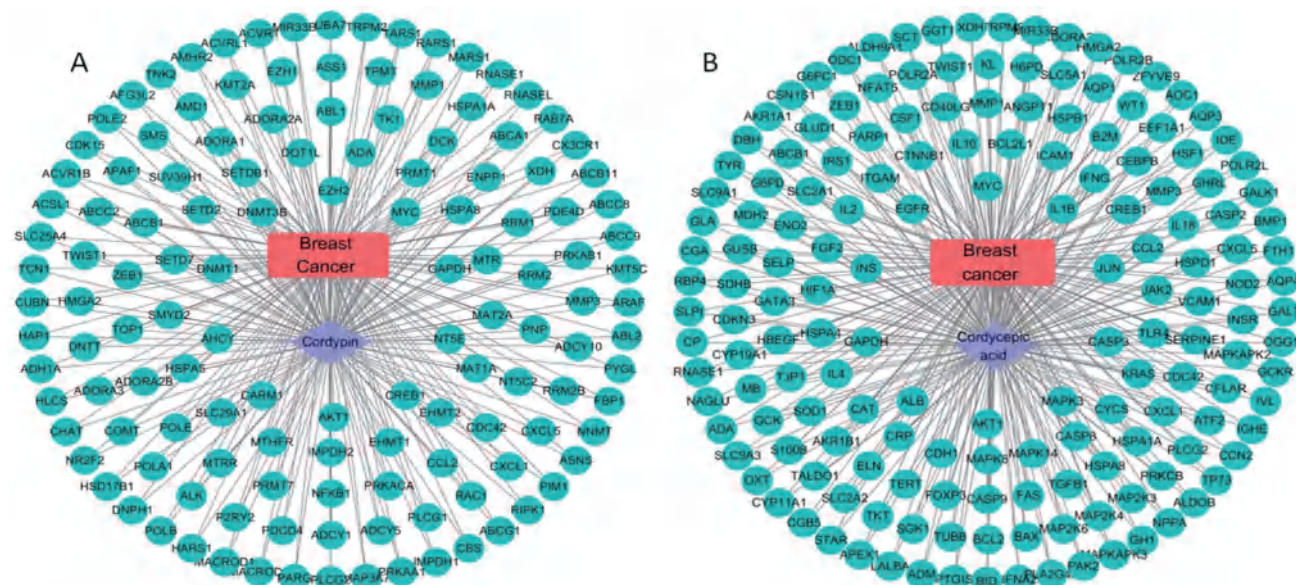


图2 虫草素(A)/虫草酸(B)-乳腺癌-靶点网络

Fig 2 Cordycepin (A) / cordycepin acid (B) -breast cancer-target network

有靶点总共富集到 170 条信号通路。

### 3.1.5 虫草素/虫草酸-乳腺癌-通路-靶点网络构建 虫草素/虫草酸-乳腺癌-通路-靶点的通

路网络图见图 3。通路网络图能够更加直观地呈现出虫草有效成分虫草酸与虫草素在抗乳腺癌方面的多成分、多靶点的特点。

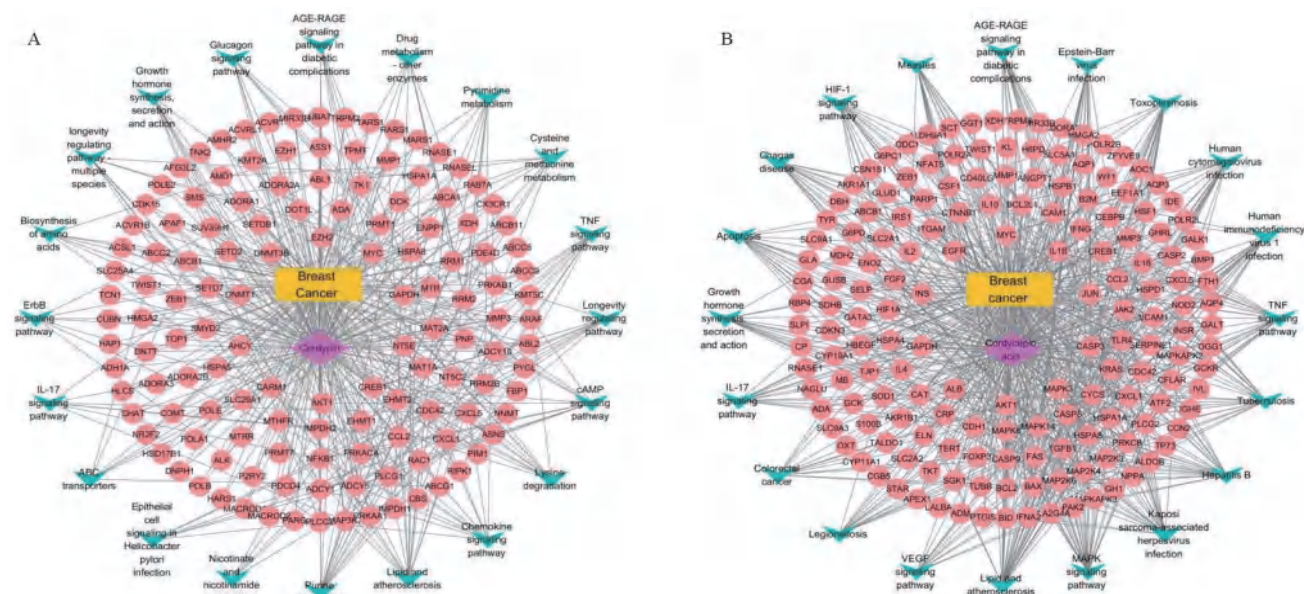


图3 虫草素(A)/虫草酸(B)-乳腺癌-通路-靶点的通路网络图

Fig 3 Pathway network diagram of cordycepin (A) / cordycepin acid (B) and breast cancer pathway target

## 3.2 蛹虫草活性成分对乳腺癌细胞模型的影响实验结果

**3.2.1 MTT 法观察蛹虫草活性成分对两种乳腺癌细胞增殖的影响结果** MTT 法测定结果显示：通过不同浓度的虫草酸与虫草素处理 MCF-7、MDA-MB-231 细胞后，在一定剂量水平上大幅削弱这两类细胞的增殖活性，在药物浓度上调的同时，抑制率随之提高（见图 4）。

虫草素在  $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的剂量时即表现出明显抑制两种细胞生长效应 ( $P < 0.05$ )，随着药物浓度的增大，抑制率相应增加，虫草素在  $8.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的剂量时作用于 MCF-7 细胞 48 h 和 MDA-MB-231 细胞 72 h 后，出现最高抑制效应，并且对 MDA-MB-231 细胞的抑制效果优于对 MCF-7 细胞的抑制效果。

虫草酸在  $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的剂量时作用于

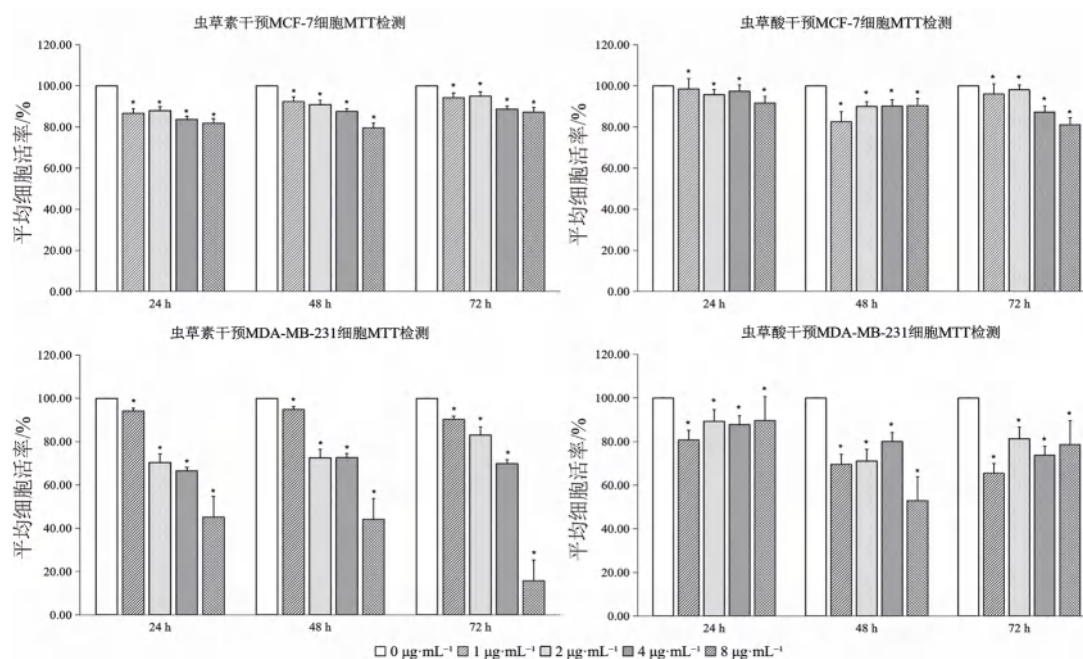


图 4 不同浓度虫草素和虫草酸对 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

Fig 4 Effect of different concentrations of cordycepin and cordycepin acid on the proliferation of MCF-7 and MDA-MB-231 cells

 注：与空白对照组比较，\* $P < 0.05$ 。

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

MDA-MB-231 细胞 24 h 后即表现出明显的抑制细胞生长效应 ( $P < 0.05$ )。8.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  虫草素在作用于 MDA-MB-231 细胞 48 h 后，出现最高抑制效应。对于 MCF-7 细胞，1.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  虫草素处理 48 h 时出现最高抑制效应。但虫草素抑制效应并没有虫草素强，且最高抑制效应出现在低浓度和处理 48 h 后。

**3.2.2 蛹虫草活性成分作用于两种乳腺癌细胞后细胞凋亡分析** 用 1.0、2.0、4.0 和 8.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  虫草素和虫草酸对两种乳腺癌细胞作用 24 h 和 48 h，细胞凋亡率分析显示：随着虫草素处理两种细胞浓度的增加和作用时间的延长，细胞凋亡率逐渐升高，与空白对照组相比，8.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  虫草素作用细胞 48 h 可使 MCF-7 细胞总凋亡率达到 (26.71±0.34) %，可使 MDA-MB-231 细胞总凋亡率达到 (41.73±0.99) %。并且虫草素处理两种细胞后，MDA-MB-231 细胞的总凋亡率高于 MCF-7 细胞，说明虫草素促进 MDA-MB-231 细胞凋亡效果更加显著 (见图 5)。

随着虫草素处理两种细胞浓度的增加和作用时间的延长，细胞凋亡率逐渐升高，与空白对照组相比，8.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  虫草素作用细胞 24 h 即可使 MCF-7 细胞总凋亡率达到 (22.81±0.89) %，48 h 的细胞总凋亡率反而低于 24 h，说明虫草素促进 MCF-7 细胞凋亡的时间点在 24 h。8.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  虫草素作用细胞 48 h 可使 MDA-MB-231 细胞总

凋亡率达到 (41.23±0.35) %。并且虫草素处理两种细胞后，MDA-MB-231 细胞的总凋亡率高于 MCF-7 细胞，说明虫草素促进 MDA-MB-231 细胞凋亡效果更加显著。与虫草素对比发现，除虫草素作用 MCF-7 细胞 48 h 的细胞总凋亡率反而低于 24 h 外，虫草素与虫草素对两种乳腺癌细胞的促进凋亡效果相当 (见图 5)。

**3.2.3 PPI 网络中筛选到的关键核心蛋白质的基因表达情况** 根据已构建的虫草素、虫草素与乳腺癌的 PPI 网络，以及基于 PPI 网络的拓扑分析、GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析，筛选得到虫草素与乳腺癌 PPI 网络中的 10 个关键核心蛋白质；筛选得到虫草素与乳腺癌 PPI 网络中的 10 个关键核心蛋白质。

根据分析已得到的细胞增殖和细胞凋亡结果，确定虫草素和虫草素对两种细胞合适的干预浓度为 8.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，其中虫草素对 MCF-7 细胞的干预时间选择 24 h，其余全部选择干预时间为 48 h。对在 PPI 网络中筛选到的关键核心蛋白质的基因表达情况进行分析，结果显示：8.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  虫草素干预 MCF-7 细胞 48 h 后，与正常细胞相比，10 个关键核心蛋白均明显表现出表达下调。8.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  虫草素干预 MDA-MB-231 细胞 48 h 后，与正常细胞相比，9 个关键核心蛋白表达均明显上调，只有 AHCY 蛋白表达下调。说明虫草素对两种乳腺癌细胞的调控机制是基本相反的。



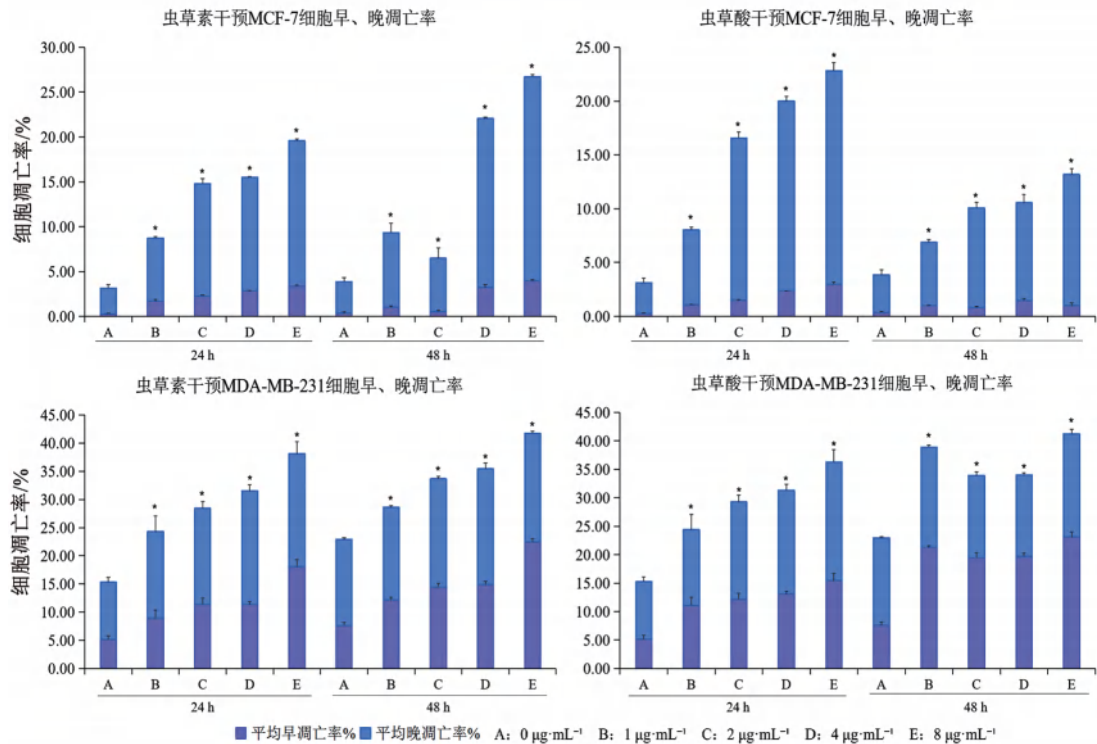


图 5 不同浓度虫草素和虫草酸对 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞凋亡率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Fig 5 Effect of different concentrations of cordycepin and cordycepin acid on the apoptosis rate of MCF-7 and MDA-MB-231 cells ( $\bar{x} \pm s$ )  
注：与空白对照组比较，\* $P < 0.05$ 。  
Note: Compared with the blank control group, \* $P < 0.05$ .

8.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  虫草酸干预 MCF-7 细胞 24 h 后，与给药前相比，10 个关键核心蛋白均明显表现出表达下调，并且虫草酸干预 MCF-7 细胞后与虫草素干预 MCF-7 细胞相比，关键核心蛋白表达下调的幅度较低。8.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  虫草酸干预 MDA-MB-231 细胞 48 h 后，与正常细胞相比，

6 个关键核心蛋白均明显表现出表达上调，4 个关键核心蛋白均明显表现出表达下调，并且虫草酸干预 MDA-MB-231 细胞与虫草素干预 MDA-MB-231 细胞相比，关键核心蛋白表达上调的幅度较高。说明虫草酸对两种乳腺癌细胞的调控机制并无相似性（见表 1 及表 2）。

表 1 虫草素干预细胞后关键核心蛋白质的基因表达情况  
Tab 1 Target proteins gene expression of cordycepin stimulate cells

| 蛋白质缩写 | 蛋白质全称                                                     | GC ID       | 基因 2 <sup>-ΔΔCt</sup> 均值 |                    | 变化趋势 | 基因 2 <sup>-ΔΔCt</sup> 均值 |                         | 变化趋势 |
|-------|-----------------------------------------------------------|-------------|--------------------------|--------------------|------|--------------------------|-------------------------|------|
|       |                                                           |             | 正常 MCF-7 细胞              | 干预 MCF-7 细胞 48 h 后 |      | 正常 MDA-MB-231 细胞         | 干预 MDA-MB-231 细胞 48 h 后 |      |
| MYC   | MYC proto-oncogene                                        | GC08P127735 | 1.00                     | 0.52**             | 下调   | 1.00                     | 1.04**                  | 上调   |
| TMSG1 | ceramide synthase 2                                       | GC01M150960 | 1.00                     | 0.64**             | 下调   | 1.00                     | 1.06**                  | 上调   |
| LIMK1 | LIM Domain Kinase 1                                       | GC07P074082 | 1.00                     | 0.64**             | 下调   | 1.00                     | 1.11**                  | 上调   |
| PAK4  | P21 ( RAC1 ) Activated Kinase 4                           | GC19P039125 | 1.00                     | 0.80**             | 下调   | 1.00                     | 1.21**                  | 上调   |
| USP7  | ubiquitin specific peptidase 7                            | GC16M008892 | 1.00                     | 0.57**             | 下调   | 1.00                     | 1.24**                  | 上调   |
| AKT1  | AKT serine/threonine kinase 1                             | GC14M104769 | 1.00                     | 0.70**             | 下调   | 1.00                     | 1.49**                  | 上调   |
| DNMT1 | DNA methyltransferase 1                                   | GC19M010133 | 1.00                     | 0.50**             | 下调   | 1.00                     | 1.12**                  | 上调   |
| EZH2  | enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit | GC07M148807 | 1.00                     | 0.70**             | 下调   | 1.00                     | 1.03**                  | 上调   |
| AHCY  | Adenosylhomocysteinase                                    | GC20M034422 | 1.00                     | 0.77**             | 下调   | 1.00                     | 0.88**                  | 下调   |
| CARM1 | Coactivator associated arginine methyltransferase 1       | GC19P010871 | 1.00                     | 0.51**             | 下调   | 1.00                     | 1.09**                  | 上调   |

注：与空白对照组比较，\*\* $P < 0.01$ 。  
Note: Compared with the blank control group, \*\* $P < 0.01$ .



表 2 虫草酸干预细胞后关键核心蛋白质的基因表达情况  
Tab 2 Target proteins gene expression of cordyceps acid stimulate cells

| 蛋白质缩写 | 蛋白质全称                              | GC ID       | 基因 2 <sup>-ΔΔCt</sup> 均值 |                    | 变化趋势 | 基因 2 <sup>-ΔΔCt</sup> 均值 |                         | 变化趋势 |
|-------|------------------------------------|-------------|--------------------------|--------------------|------|--------------------------|-------------------------|------|
|       |                                    |             | 正常 MCF-7 细胞              | 干预 MCF-7 细胞 24 h 后 |      | 正常 MDA-MB-231 细胞         | 干预 MDA-MB-231 细胞 48 h 后 |      |
| MYC   | MYC proto-oncogene                 | GC08P127735 | 1.00                     | 0.94**             | 下调   | 1.00                     | 1.43**                  | 上调   |
| TMSG1 | ceramide synthase 2                | GC01M150960 | 1.00                     | 0.84**             | 下调   | 1.00                     | 1.38**                  | 上调   |
| LIMK1 | LIM domain kinase 1                | GC07P074082 | 1.00                     | 0.90**             | 下调   | 1.00                     | 1.06**                  | 上调   |
| PAK4  | P21 ( RAC1 ) activated kinase 4    | GC19P039125 | 1.00                     | 0.94**             | 下调   | 1.00                     | 1.01**                  | 上调   |
| USP7  | ubiquitin specific peptidase 7     | GC16M008892 | 1.00                     | 1.09**             | 上调   | 1.00                     | 1.50**                  | 上调   |
| TGFB1 | transforming growth factor beta 1  | GC19M041301 | 1.00                     | 0.70**             | 下调   | 1.00                     | 0.86**                  | 下调   |
| EGFR  | epidermal growth factor receptor   | GC07P055019 | 1.00                     | 0.96**             | 下调   | 1.00                     | 0.80**                  | 下调   |
| IL1B  | interleukin 1 beta                 | GC02M112829 | 1.00                     | 0.56**             | 下调   | 1.00                     | 0.90**                  | 下调   |
| GLUD1 | glutamate dehydrogenase 1          | GC10M087050 | 1.00                     | 0.88**             | 下调   | 1.00                     | 1.88**                  | 上调   |
| MAPK3 | mitogen-activated protein kinase 3 | GC16M034315 | 1.00                     | 0.85**             | 下调   | 1.00                     | 0.93**                  | 下调   |

注：与空白对照组比较，\*\**P* < 0.01。  
Note: Compared with the blank control group, \*\**P* < 0.01.

4 讨论

4.1 蛹虫草活性成分抗乳腺癌的靶点、功能和信号通路比较

蛹虫草抗乳腺癌作用的机制还有待探讨，本研究采用网络药理学筛选出蛹虫草活性成分虫草素和虫草酸与乳腺癌的共有靶点是不同的，说明这两种蛹虫草的活性成分与乳腺癌的相关性存在差异，因此构建的虫草素和虫草酸的抗乳腺癌作用靶点的 PPI 网络也存在差异。

虫草素与乳腺癌共有靶点总共富集到 73 条信号通路，虫草酸与乳腺癌共有靶点总共富集到 170 条信号通路，虫草素和虫草酸共同富集到的信号通路包括 TNF 信号通路、AGE-RAGE 信号通路和 IL-17 信号通路等。其中 TNF 信号通路是细胞中参与免疫应答信号通路，该通路发挥对肿瘤细胞有细胞毒性、细胞溶解、抑制增殖等作用<sup>[19]</sup>。而 AGE-RAGE 信号通路中晚期糖基化产物的大量表达激活下游的 IL-17 信号通路和 TNF 信号通路等复杂的信号通路，表明蛹虫草的活性成分虫草素和虫草酸在抗乳腺癌的作用机制上有共同调控的信号通路。

虫草素单独与乳腺癌共有靶点富集到的信号通路包括：嘌呤嘧啶代谢信号通路，赖氨酸降解信号通路，半胱氨酸和甲硫氨酸代谢信号通路，氨基酸的生物合成信号通路等几条与氨基酸代谢相关的信号通路，推测虫草素抗乳腺癌的作用机制可能与氨基酸代谢相关。此外，还发现虫草素单独调控乳腺癌的信号通路包括：急性髓细胞性白血病信号通路，慢性髓性白血病信号通路，前列腺癌信号通路，甲状腺激素合成信号通路和甲状旁腺激素合成信号通路等，揭示虫草素抗乳腺癌的作用机制可能与这几种疾病中有相似的分子机制。

虫草酸单独与乳腺癌共有靶点富集到的信号通路包括脂质与动脉粥样硬化信号通路、胰岛素抵抗信号通路、戊糖和葡萄糖醛互变信号通路、脂肪细胞因子信号通路、癌症中的中心碳代谢和胰高血糖素信号通路等，提示虫草酸抗乳腺癌的作用机制可能与细胞中的糖、脂代谢途径相关。此外，还发现虫草酸单独调控乳腺癌的信号通路包括类风湿关节炎信号通路、子宫内膜癌信号通路、胰腺癌信号通路和黑素瘤信号通路等，提示虫草素抗乳腺癌的作用机制可能与这几种疾病中有相似的分子机制。

4.2 蛹虫草活性成分对两种乳腺癌细胞和关键核心蛋白质表达影响的比较

在抑制乳腺癌细胞增殖效应实验中，说明虫草素和虫草酸两种活性成分在抑制乳腺癌细胞增殖方面表现出了截然不同的抑制效应。虫草酸在抑制细胞增殖方面，对于 MDA-MB-231 细胞的抑制效果优于 MCF-7 细胞。在细胞凋亡实验中虫草素促进 MDA-MB-231 细胞凋亡效果更加显著，虫草酸处理两种细胞后，MDA-MB-231 细胞的总凋亡率高于 MCF-7 细胞，说明虫草酸促进 MDA-MB-231 细胞凋亡效果更加显著。

本研究还发现虫草素和虫草酸干预 MCF-7 细胞后人肿瘤转移抑制基因 *TMSG-1* 表达下调，而在干预 MDA-MB-231 细胞后人肿瘤转移抑制基因 *TMSG-1* 表达上调，表明虫草素和虫草酸对两种乳腺癌细胞的调控机制并不相同<sup>[20]</sup>。本研究也对信号传导通路中的蛋白因子如 TGFB1、MAPK3、IL1B 等的表达情况进行分析，表明虫草素和虫草酸对乳腺癌的调控机制涉及多种活性成分、多个靶点和多条信号通路，各种活性成分和靶点、通路协同作用。

以上实验结果都显示虫草酸与虫草素两种活

性成分在抗乳腺癌机制方面的不同,这也提示可以进一步研究这两种活动成分的抗乳腺癌机制的差异。后续研究也将参考上述发现来更深入地研究关键靶点与信号途径,以及蛹虫草其他活性成分和复方成分的抗乳腺癌机制,同时开展相关临床验证。

## 参考文献

- [1] Sung GH, Hywel-Jones NL, Sung JM, et al. Phylogenetic classification of Cordyceps and the clavicipitaceous fungi [J]. Stud Mycol, 2007, 57: 5-59.
- [2] 任思竹, 宋蕊, 尹啸天, 等. 蛹虫草活性成分及药用功效研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2025, 53 (13): 7-11, 19.
- [3] 都兴范, 李军, 米锐, 等. 蛹虫草和冬虫夏草主要活性成分含量比较 [J]. 食用菌, 2010, 32 (6): 61-62.
- [4] 赵璇, 田雨航, 庞道然, 等. 蛹虫草的化学成分、药理作用及产业化研究进展 [J]. 中草药, 2024, 55 (7): 2413-2422.
- [5] Radecka B, Litwiniuk M. Breast cancer in young women [J]. Ginekol Pol, 2016, 87 (9): 659-663.
- [6] Han BF, Zheng RS, Zeng HM, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022 [J]. J Natl Cancer Cent, 2024, 4 (1): 47-53.
- [7] 窦瑶, 魏琳, 宋伍, 等. 基于网络药理学的蛹虫草活性成分抗炎作用的药效机制 [J]. 中国老年学杂志, 2020, 40 (22): 4802-4806.
- [8] Cunningham KG, Manson W, Spring FS, et al. Cordycepin, a metabolic product isolated from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.) Link [J]. Nature, 1950, 166 (4231): 949.
- [9] 方唯炜, 应汉杰, 蒋敬庭. 虫草素的抗肿瘤作用机制研究进展 [J]. 中国医药生物技术, 2023, 18 (1): 51-55.
- [10] 胡贤达, 岳颖, 武鹏, 等. 虫草素药理作用研究及展望 [J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35 (12): 180-182, 185.
- [11] Kodama EN, McCaffrey RP, Yusa K, et al. Antileukemic activity and mechanism of action of cordycepin against terminal deoxynucleotidyl transferase-positive (TdT+) leukemic cells [J]. Biochem Pharmacol, 2000, 59 (3): 273-281.
- [12] 孙月, 卜宁, 刘建华. 蛹虫草虫草酸虫草素含量测定与分析 [J]. 中国食用菌, 1999, 18 (6): 19.
- [13] 江晓路, 孙月. 蛹虫草活性成分的测定 [J]. 食用菌学报, 1999, 6 (1): 47-50.
- [14] Liu ZY, Guo FF, Wang Y, et al. BATMAN-TCM: a bioinformatics analysis tool for molecular mechanism of traditional Chinese medicine [J]. Sci Rep, 2016, 6: 21146.
- [15] Marilyn S, Irina D, Justin A, et al. GeneCards Version 3: the human gene integrator [J]. Database, 2010: baq020.
- [16] Sayers EW, Beck J, Bolton EE, et al. Database resources of the national center for biotechnology information [J]. Nucleic Acids Res, 2024, 52 (D1): D33-D43.
- [17] Damian S, Gable AL, David L, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47 (D1): D607-D613.
- [18] Doncheva NT, Morris JH, Gorodkin J, et al. Cytoscape stringapp: network analysis and visualization of proteomics data [J]. J Proteome Res, 2019, 18 (2): 623-632.
- [19] Scheinfeld N. A comprehensive review and evaluation of the side effects of the tumor necrosis factor alpha blockers etanercept, infliximab and adalimumab [J]. J Dermatolog Treat, 2004, 15 (5): 280-294.
- [20] Welch DR, Rinker-Schaeffer CW. What defines a useful marker of metastasis in human cancer [J]. J Natl Cancer Inst, 1999, 91 (16): 1351-1353.

(收稿日期: 2024-10-28; 修回日期: 2025-02-28)

# 新型钙激活氯离子通道 ANO1 抑制剂抗前列腺癌作用研究

杨小花, 陈攀\*, 罗桂芳, 李专\* (湖南师范大学 医学院, 长沙 410013)

**摘要:** **目的** 研究新型 ANO1 抑制剂 YXH 系列化合物 (YXH-2215 ~ YXH-2226) 对前列腺癌的潜在治疗作用。**方法** 通过细胞增殖抑制实验检测 YXH 系列化合物对 ANO1 不同表达水平前列腺癌细胞增殖活性的影响; 进一步通过细胞迁移实验和 Western blot 技术, 检测 YXH-2219 对 PC-3 细胞迁移能力及 ANO1 表达的相关性; 采用 PC-3 细胞移植瘤模型, 探讨 YXH-2219 对异种移植瘤肿瘤生长的影响。**结果** YXH 系列化合物能以剂量依赖性方式抑制高表达 ANO1 前列腺癌细胞 PC-3 的增殖; YXH-2219 显著降低 PC-3 细胞迁移能力, 并下调了 PC-3 细胞中 ANO1 的表达, 对 PC-3 移植瘤模型肿瘤生长具有显著抑制作用。**结论** YXH 系列化合物, 尤其是 YXH-2219 具有良好的抗前列腺癌活性, 其作用机制可能与抑制 ANO1 表达作用有关。

**关键词:** YXH 系列化合物; 前列腺癌; 钙激活氯离子通道; ANO1; ANO1 抑制剂

中图分类号: R737.25

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)08-2217-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.011

## Anti-prostate cancer effect of novel calcium-activated chloride channel ANO1 inhibitors

YANG Xiao-hua, CHEN Pan\*, LUO Gui-fang, LI Zhuan\* (School of Medicine, Hunan Normal University, Changsha 410013)

**Abstract: Objective** To determine the potential therapeutic effect of novel ANO1 inhibitor YXH series compounds (YXH-2215 ~ YXH-2226) on prostate cancer. **Methods** The impact of YXH series compounds on the proliferation activity of prostate cancer cells with varying levels of ANO1 expression was assessed with cell proliferation inhibition experiments. The correlation between YXH-2219 and the migration of PC-3 cells as well as ANO1 expression was detected with cell migration assays and Western blot. The PC-3 cell xenograft tumor model was used to determine the effect of YXH-2219 on the growth of heterotopic transplanted tumors. **Results** YXH series compounds inhibited the proliferation of ANO1 highly expressed prostate cancer cells PC-3 in a dose-dependent manner; YXH-2219 markedly reduced the migration of PC-3 cells and downregulated the expression of ANO1 in PC-3 cells, indicating an obvious inhibitory effect on tumor growth in the PC-3 xenograft tumor model. **Conclusion** YXH series compounds, particularly YXH-2219, have good anti-prostate cancer effect whose mechanism may be related to the inhibition of ANO1 expression.

**Key words:** YXH series compound; prostate cancer; calcium-activated chloride channel; ANO1; ANO1 inhibitor

前列腺癌 (prostate cancer, PCa) 起源于前列腺上皮细胞, 发病机制尚未完全阐明<sup>[1]</sup>。PCa 在全球男性癌症发病率中排第二<sup>[2]</sup>。2022 年中国的 PCa 新发病例数约 12.6 万例, 死亡人数约 5.6 万例<sup>[3]</sup>。雄

激素剥夺治疗 (androgen deprivation therapy, ADT) 作为一线治疗方案, 可通过降低体内雄激素水平来治疗雄激素敏感型 PCa<sup>[4]</sup>。在美国, 非转移性雄激素敏感型 PCa 患者在接受手术去势和雄激素受体抑

作者简介: 杨小花, 女, 硕士研究生, 主要从事肿瘤药效机制研究, email: 008yxh@163.com \*通信作者: 李专, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事慢性肝脏疾病的病理学以及分子靶向性研究, email: zhuanli@hunnu.edu.cn; 陈攀, 男, 硕士研究生, 主要从事肿瘤药效机制研究, email: 303264490@qq.com



制剂治疗后, 5 年生存率接近 100%<sup>[5-8]</sup>。随着治疗时间的延长, PCa 进展为雄激素相关的去势抵抗性前列腺癌 (CRPC) 或转移性去势抵抗性前列腺癌 (mCRPC)。mCRPC 的侵袭性极高, 尽管在临床治疗上取得了一定进展, 但患者的生存预后仍然不容乐观, 中位生存时间介于 17.5 ~ 34.7 个月, 表现出雄激素抵抗性, 此时雄激素受体抑制剂的效果大为降低, 患者转而接受其他治疗方式等放化疗药物治疗, 但 5 年生存率仍仅为 30%<sup>[9]</sup>。

随着医疗技术的进步, 针对 mCRPC 的新型治疗药物和疗法不断涌现, 但疗效上普遍存在局限。因此, 在 mCRPC 的治疗策略中, 亟须开发新型药物来提高患者生活质量、减缓肿瘤进展、延长患者的生存期。在转移性和复发性的 PCa 组织细胞中发现有 ANO1/TMEM16A 蛋白表达上调<sup>[10]</sup>。ANO1 (anoctamin1) 是一种电压敏感性钙激活氯离子通道 (calcium-activated chloride channel, CaCC), 也称为跨膜蛋白 16A (TMEM16A)<sup>[11]</sup>, 在多种肿瘤组织中过表达<sup>[12-13]</sup>, 通过参与蛋白间的相互作用, 引起  $Ca^{2+}$  稳态的变化, 调节肿瘤细胞离子稳态, 参与多种信号通路<sup>[14-15]</sup>, 影响肿瘤的生物行为, 包括肿瘤的发生发展、增殖、转移、侵袭、抗凋亡、耐药性以及表观遗传调控<sup>[16-17]</sup>。抑制 PCa 中的 ANO1 表达, 可诱导半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (cysteinyl aspartate specific proteinase, caspase) 表达上调, 继而上调肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 表达, 抑制核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 的活性, 抑制 PI3K/AKT/mTORC1 通路的激活<sup>[18]</sup>, 抑制核糖体蛋白 S6 (RPS6) 磷酸化和激活, 最终诱导 PCa 细胞凋亡<sup>[19]</sup>。磷酸化的核糖体蛋白 S6 (p-RPS6) 的表达水平可以反映 mTORC1 通路的活性状态, 常用于评估 mTORC1 通路激活状

态<sup>[20]</sup>。在多种肿瘤细胞中, ANO1 抑制剂均具有良好的抗肿瘤细胞增殖、迁移作用<sup>[21]</sup>。在 PCa 荷瘤模型中, ANO1 抑制剂可抑制肿瘤体积生长和转移<sup>[22]</sup>。ANO1 在调节肿瘤微环境中扮演着重要角色, 可能成为癌症治疗的潜在靶点<sup>[23]</sup>。因此, ANO1 抑制剂有望成为 mCRPC 的新型治疗药物, 为 mCRPC 的治疗和药物研发提供新的研究策略。

本研究旨在筛选具有抑制 ANO1 活性的化合物, 利用体外细胞实验和裸鼠荷瘤模型, 对一系列化合物的 PCa 抑制作用进行了探讨。通过这些研究, 期望能够为 mCRPC 患者提供更有效的治疗选择, 改善患者的预后, 为未来癌症治疗策略提供新的方向。

1 材料

1.1 试剂

YXH 系列化合物: YXH-2215 ~ YXH-2226, 共 12 个, 由广东石油化工学院合成并提供, 相应的分子式和分子量见表 1; Ani9 (分子量: 332.78, 批号: 233313, 纯度: 99.53%, MCE 公司)<sup>[23]</sup>; 0.5% 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) (批号: 20230711, 纯度  $\geq$  99.0%, 国药集团化学试剂有限公司)。MEM 培养基、RPMI-1640 培养基、DMEM 培养基、Ham's F-12K 培养基、0.25% 胰蛋白酶溶液 (美国 GIBCO 公司); CCK-8 (TR687, 日本同仁化学研究所); 二甲基亚砜 (DMSO, CNW Technologies); 胎牛血清 (FBS, 苏州依科赛); 兔抗人 ANO1 抗体 (货号: orb523216, 英国 Biorbyt 公司); 兔抗人磷酸化 S6 抗体 (货号: F27A23, 美国 CST 公司); 免疫组织化学检测试剂盒、DAB 显色试剂盒 (北京中杉金桥); 异氟烷 (宠物用) (深圳瑞沃德公司)。

表 1 YXH 系列化合物的分子式和分子量

Tab 1 Molecular formula and weight of YXH series compounds

| 化合物      | 分子式                                                                          | 分子量    | 纯度 /% | 化合物      | 分子式                                                                            | 分子量    | 纯度 /% |
|----------|------------------------------------------------------------------------------|--------|-------|----------|--------------------------------------------------------------------------------|--------|-------|
| YXH-2215 | C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub> | 471.59 | 98.5  | YXH-2221 | C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>   | 471.59 | 98.2  |
| YXH-2216 | C <sub>24</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub> | 499.65 | 98.8  | YXH-2222 | C <sub>22</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>   | 467.56 | 98.5  |
| YXH-2217 | C <sub>26</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub> | 527.70 | 98.2  | YXH-2223 | C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>   | 430.54 | 98.6  |
| YXH-2218 | C <sub>27</sub> H <sub>35</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub> | 541.73 | 98.0  | YXH-2224 | C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>   | 480.60 | 98.4  |
| YXH-2219 | C <sub>25</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub> | 511.66 | 98.3  | YXH-2225 | C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> BrN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub> | 546.46 | 98.5  |
| YXH-2220 | C <sub>27</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub> | 539.71 | 98.4  | YXH-2226 | C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> IN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>  | 593.46 | 98.3  |

1.2 仪器

3111 型 CO<sub>2</sub> 培养箱、1300 型生物安全柜 (美国 Thermo Fisher 公司); ASP200S 全自动组织脱水机、DMi8 倒置显微镜、ST5010 AutoStainer XL 自动染色机 (德国 Leica 公司); 5200 Multi 型发光/荧光图像分析系统 (Tanno 公司); TAIJI 型小动物麻醉机 (深圳瑞沃德公司)。

1.3 细胞

人 PCaDU 145、22Rv1、VCaP、PC-3 细胞 (武汉普诺赛生命科技有限公司), 分别用添加有 10%FBS 和 1% 的青霉素 - 链霉素溶液 (双抗) 的 MEM、RPMI-1640、DMEM、Ham's F-12K 培养基培养, 培养条件为 37 °C、5% CO<sub>2</sub>, 当细胞覆盖率达到培养瓶底的 90% 时进行细胞传代。

## 1.4 实验动物

40 只 SPF 级雄性 BALB/c-nu 裸鼠, 体重为 18.3 ~ 20.6 g [广东维通利华实验动物技术有限公司, 动物合格证号: 44829700037420], 饲养于湖南安生美药物研究院有限公司屏障环境内 [实验动物使用许可证号: SYXK (湘) 2023-0001], 饲养温度 18 ~ 26 °C, 相对湿度 40% ~ 70%, 自由摄食及饮水, 适应性饲养 3 d。所有实验操作均经湖南安生美药物研究院有限公司实验动物福利伦理委员会批准 (批件号: IACUC-KY-20240043)。

## 2 方法

### 2.1 CCK-8 法检测 YXH 系列化合物对细胞增殖的抑制作用

选择 ANO1 高表达的 PC-3 和 ANO1 低表达的 DU 145、22Rv1、VCaP 细胞<sup>[21, 24]</sup>进行细胞增殖抑制实验。分别用对数生长期的 PCa 细胞 DU 145、22Rv1、VCaP、PC-3, 用各细胞对应的完全培养基分别调整细胞密度至  $3 \times 10^4$ 、 $3 \times 10^4$ 、 $6 \times 10^4$ 、 $3 \times 10^4$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ , 将细胞悬液加入至 96 孔板中, 体积为 100  $\mu\text{L}$ /孔, 振荡培养过夜使细胞贴壁。分别称取 YXH-2215 ~ YXH-2226 化合物和 Ani9 适量, 用 DMSO 溶解配制为 100  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的母液, 分别用各细胞对应的培养基配制系列梯度浓度的工作液, 以 100  $\mu\text{L}$ /孔加入至培养板中, 使终浓度分别为 50、15、5、1.5、0.5、0.15  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。同时设置溶媒对照组, 每组设置 3 个平行孔, 培养 72 h 后, 向培养板孔中加入 5  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 CCK-8, 20  $\mu\text{L}$ /孔, 继续培养 2 h 后, 用酶标仪于 450 nm 波长检测各孔光密度值 (OD 值)。以不加细胞, 只加培养基和 CCK-8 的孔调零, 以溶媒对照组 OD 值为 100% 细胞活力, 其余各组 OD 值与溶媒对照组 OD 值的比值为相对细胞活力。以细胞增殖抑制率表示化合物对 DU 145、22Rv1、VCaP、PC-3 细胞增殖的抑制作用, 以半数抑制率 ( $IC_{50}$ ) 比较各化合物的活性, 选择  $IC_{50}$  最小的化合物进行后续实验。

$$IC_{50} = [1 - (OD_{\text{样品}} - OD_{\text{调零}}) / (OD_{\text{溶媒}} - OD_{\text{调零}})] \times 100\%。$$

### 2.2 化合物 YXH-2219 对 PC-3 细胞克隆形成能力的影响

取对数生长期的 PC-3 细胞, 以  $2.0 \times 10^3$  个/孔接种于 24 孔板中, 分别向细胞培养基中加入对应浓度的 YXH-2219, 使终浓度分别为  $1/4 IC_{50}$ 、 $1/2 IC_{50}$ 、 $IC_{50}$ , 设置 Ani9 ( $IC_{50}$  浓度) 阳性对照和培养基溶媒对照, 每组设置 3 个平行孔, 培养 5 ~ 7 d, 弃去细胞上清液, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤后用 1 mL 4% 多聚甲醛固定 30 min, 再用 0.5 mL 0.2% 的结晶紫溶液避光染色 15 min, PBS 洗去多余的

结晶紫溶液, 控干水分, 拍摄细胞克隆照片。

### 2.3 YXH-2219 对 PC-3 细胞迁移能力的影响

**2.3.1 细胞迁移实验** 取对数生长期的 PC-3 细胞, 以无血清培养基饥饿细胞过夜, 降低血清对 PC-3 细胞迁移的影响。Transwell 小室中加入 50  $\mu\text{L}$  无血清培养基, 放入培养箱孵育 30 min 水化基底膜。取饥饿后的 PC-3 细胞用无血清培养基调节至  $5 \times 10^5$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ , 以 100  $\mu\text{L}$ /孔加入 Transwell 小室上室中, 分别向细胞培养基中加入对应浓度的 YXH-2219, 使终浓度分别为  $1/4 IC_{50}$ 、 $1/2 IC_{50}$ 、 $IC_{50}$ , 设置 Ani9 ( $IC_{50}$  浓度) 阳性对照和培养基溶媒对照, 每组设置 3 个平行孔。下室中加入 800  $\mu\text{L}$  完全培养基。将 Transwell 板放入培养箱培养 24 h, 取出 Transwell 小室上室, PBS 洗涤后用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 再用 0.2% 结晶紫溶液避光染色 15 min, PBS 洗去多余的结晶紫溶液, 用棉签轻轻拭去上室细胞后置于倒置显微镜下观察, 并计数穿过膜的细胞数, 比较各组的细胞迁移数量, 评估细胞迁移能力。

**2.3.2 细胞划痕实验** 取对数生长期的 PC-3 细胞以  $1 \times 10^6$  个/孔接种至 6 孔板中, 培养至细胞长满孔底时, 用 10  $\mu\text{L}$  枪头垂直于细胞平面划线, 用 PBS 清洗掉落的细胞, 加入无血清培养基, 标记拍照位置。分别向细胞培养基中加入对应浓度的 YXH-2219, 使终浓度分别为  $1/4 IC_{50}$ 、 $1/2 IC_{50}$ 、 $IC_{50}$ , 设置 Ani9 ( $IC_{50}$  浓度) 阳性对照和培养基溶媒对照, 每组设置 3 个平行孔。显微镜下记录 0 h 和 48 h 相同位置照片, 用 Image J 软件测量划痕宽度 ( $H$ ), 计算迁移率。迁移率 (%) =  $(H_{0h} - H_{48h}) / H_{0h} \times 100\%$ 。

### 2.4 YXH-2219 对 PC-3 细胞 ANO1 蛋白表达的影响

取对数生长期的 PC-3 细胞接种至 6 孔板中, 培养至细胞长满孔底部的 70% 时, 分别向细胞培养基中加入对应浓度的 YXH-2219, 使终浓度分别为  $1/4 IC_{50}$ 、 $1/2 IC_{50}$ 、 $IC_{50}$ , 设置 Ani9 ( $IC_{50}$  浓度) 阳性对照和培养基溶媒对照, 每组设置 3 个平行孔。培养 24 h 后, 收集细胞并使用 200  $\mu\text{L}$  预冷的 RIPA 裂解液在冰上裂解 30 min, 4 °C, 12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  的速度离心 20 min, 收集上清液, 即为细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。各组取 50  $\mu\text{g}$  总蛋白溶液与 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5 $\times$ ) 混匀, 经 105 °C 变性 5 min, 以 20  $\mu\text{g}$ /孔总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 加彩色预染蛋白 Marker 同步电泳。先用 80 V 电泳至溴酚蓝到达浓缩胶和分离胶交界位置, 再升压至 120 V 继续电泳至溴酚蓝接近分离胶底部。电泳结束后, 将整块分离胶湿转至 PVDF 膜上, 根



据 Marker 裁切 ANO1 和  $\beta$ -actin 对应位置的 PVDF 膜, TBST 洗涤后用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 再用 TBST 洗涤 3 次。分别用 ANO1 和  $\beta$ -actin 抗体分别孵育相应蛋白的 PVDF 膜 4℃ 过夜, TBST 洗涤 3 次, 用 HRP 标记的二抗 (1:5000) 室温孵育 2 h, 用 ECL 液覆盖 PVDF 膜, 用显影仪曝光。一抗稀释倍数分别为  $\beta$ -actin (1:5000)、ANO1 (1:500)。

## 2.5 化合物对 PC-3 细胞移植瘤模型的影响

### 2.5.1 PC-3 细胞移植瘤模型制备及给药

参照文献方法<sup>[25]</sup>, 取 40 只适应期结束的雄性 SPF 级 BALB/c-nu 裸鼠接种 PC-3 细胞制备移植瘤模型, 造模时体重在 20.6 ~ 22.7 g。调整 PC-3 细胞密度至  $3 \times 10^7$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ , 以 0.1 mL/只接种于裸鼠右侧腹部皮下, 观察成瘤结果。由于暂无 ANO1 抑制剂类药物获批上市, 因此参照第二代雄激素受体 (androgen receptor, AR) 抑制剂瑞维鲁胺的临床使用剂量  $240 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ <sup>[26]</sup>, 根据动物与人的剂量换算方法<sup>[27]</sup>, 小鼠等效剂量 =  $240 \times 0.0026/0.02 = 31.2 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ , 以  $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  为参照剂量设置  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  为高剂量,  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  为低剂量。选择 24 只肿瘤体积大于  $100 \text{ mm}^3$  的裸鼠, 按肿瘤体积随机分为模型对照组、Ani9 组 ( $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )<sup>[23]</sup> 及 YXH-2219 高剂量组、低剂量组, 6 只/组。灌胃给药, 给药体积  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 每日 1 次, 连续给药 28 d, 模型对照组经口灌胃给予同体积溶媒。给药后每隔一日测量肿瘤的长径 (L) 和短径 (W), 计算肿瘤体积, 记录动物体重。各组均以末次给药结束时的肿瘤体积 (记为  $\text{TV}_A$ ), 减去给药前的初始肿瘤体积 (记为  $\text{TV}_B$ ) 的差值作为相对肿瘤生长体积 (记为  $\Delta \text{TV}$ ), 将模型对照组相对肿瘤生长体积记为 100%, 计算给药组的相对肿瘤体积增殖率 (T/C)。末次给药 24 h 后, 用 2.5% 的异氟烷麻醉裸鼠后颈椎脱臼安乐死裸鼠, 剥离肿瘤组织, 取部分肿瘤组织用 10% 甲醛固定, 另一部分冻于超低温冰箱备用。

肿瘤体积 ( $\text{TV}, \text{mm}^3$ ) =  $1/2 \times \text{长径} \times \text{短径}^2$ ;

相对肿瘤体积增殖率 (T/C, %) =  $\Delta \text{TV}_{\text{给药组}} / \Delta \text{TV}_{\text{模型组}} \times 100\%$ 。

### 2.5.2 苏木精-伊红染色 (HE 染色) 检查肿瘤组织病理学

取固定好的肿瘤组织用 PBS 洗涤 3 次, 去除残留的固定液后用石蜡包埋, 切成  $3 \mu\text{m}$  厚度的切片, 依次进行二甲苯脱蜡、梯度浓度乙醇脱水、水化、苏木精染色、1% 盐酸酒精溶液分化、流水反蓝、伊红染色、二甲苯透明, 封片后显微镜下观察肿瘤组织病理学情况。

用免疫组织化学技术 (IHC) 检查肿瘤组织中 p-RPS6 表达。肿瘤组织经石蜡切片、脱蜡、

水化后, 用 Tris-EDTA 抗原修复液在微波炉中进行抗原修复, 冷却洗涤后用 Triton X-100 处理切片, 在湿盒中向组织上滴加 1:100 配制的 ANO1 抗体, 2 ~ 8℃ 孵育过夜, 再用 HRP 标记的二抗室温下孵育 2 h, 洗去残留的二抗后用 DAB 工作液显色, 显微镜下观察 p-RPS6 的表达及分布。

### 2.5.3 肿瘤组织中 ANO1 蛋白表达

称取约 50 mg 肿瘤组织剪成  $1 \text{ mm}^3$  的小碎片, 加入 400  $\mu\text{L}$  RIPA 裂解液 (含 PMSF,  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 在玻璃匀浆器中研磨裂解, 4℃、 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 20 min, 收集上清液, 测得蛋白浓度后用 Western blot 法检测肿瘤组织中 ANO1 蛋白的表达。

## 2.6 统计学方法

采用图像分析软件 Image J 和科学绘图工具 GraphPad Prism 软件分析实验数据和图形表示。符合正态分布数据以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 形式呈现。采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 评估不同组别间的均数的差异性。  $P \leq 0.05$  时, 表示组间差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 YXH 系列化合物对 PCa 细胞增殖能力的影响

实验结果显示, YXH 系列化合物在抑制 4 种 PCa 细胞的增殖方面效果各异, 与 Ani9 的效应相似, 尤其是在抑制 ANO1 高表达的 PC-3 细胞增殖方面, 其效果优于其他 3 种 ANO1 表达水平较低的 PCa 细胞, 这提示 YXH 系列化合物可能具有针对 ANO1 高表达 PCa 的潜在抗肿瘤活性。在这些化合物中, YXH-2219 展现了最低的  $\text{IC}_{50}$  值, 表明其在抑制细胞增殖方面具有最显著的活性。因此, 选定 YXH-2219 作为后续细胞实验和动物实验的研究重点 (见表 2)。

### 3.2 YXH-2219 对 PC-3 细胞集落形成的影响

细胞克隆实验结果显示, 与溶媒对照组比较, YXH-2219 能够抑制对 PC-3 细胞的集落形成能力 (见图 1A), 且具有浓度-效应关系 (见图 1B)。

### 3.3 YXH-2219 对 PC-3 细胞迁移能力的影响

Transwell 迁移实验和细胞划痕实验结果显示, 与溶媒对照组比较, YXH-2219 能够抑制 PC-3 细胞划痕的愈合速度, 降低 PC-3 细胞的跨膜迁移率, 且具有浓度-效应关系, 迁移能力差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (见图 2)。

### 3.4 YXH-2219 对 PC-3 细胞 ANO1 蛋白表达的影响

Western blot 实验结果显示, 与溶媒对照组比较, YXH-2219 和 Ani9 能够下调 PC-3 细胞 ANO1 表达, 且具有浓度-效应关系 ( $P < 0.05$ ) (见图 3)。

### 3.5 YXH-2219 对 PC-3 荷瘤模型肿瘤生长的抑制作用



表 2 YXH 系列化合物对前列腺癌细胞的增殖抑制作用 ( $IC_{50}$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )  
Tab 2 Inhibitory of YXH series compounds on PCa proliferation ( $IC_{50}$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

| 化合物      | $IC_{50}/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ |               |               |               |
|----------|-----------------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
|          | DU 145                                        | 22Rv1         | VCap          | PC-3          |
| Ani9     | 18.566±3.066                                  | 14.435±1.346  | 17.185±3.762  | 5.754±0.771   |
| YXH-2215 | > 50                                          | > 50          | 27.122±4.517  | 20.806±0.319  |
| YXH-2216 | > 50                                          | > 50          | > 50          | > 50          |
| YXH-2217 | > 50                                          | > 50          | > 50          | > 50          |
| YXH-2218 | > 50                                          | > 50          | > 50          | > 50          |
| YXH-2219 | > 50                                          | 24.289±3.615  | 18.312±2.618  | 12.875±1.853  |
| YXH-2220 | > 50                                          | 28.107±2.728  | 45.667±18.063 | 18.272±3.860  |
| YXH-2221 | > 50                                          | > 50          | 43.122±8.754  | 25.037±3.884  |
| YXH-2222 | > 50                                          | > 50          | 41.620±14.827 | 25.500±3.786  |
| YXH-2223 | > 50                                          | > 50          | > 50          | > 50          |
| YXH-2224 | 28.134±0.129                                  | 39.727±10.459 | 27.416±4.886  | 22.381±3.114  |
| YXH-2225 | > 50                                          | > 50          | > 50          | 50.381±13.221 |
| YXH-2226 | 37.907±3.908                                  | 32.081±2.867  | 41.695±7.026  | 15.076±6.427  |

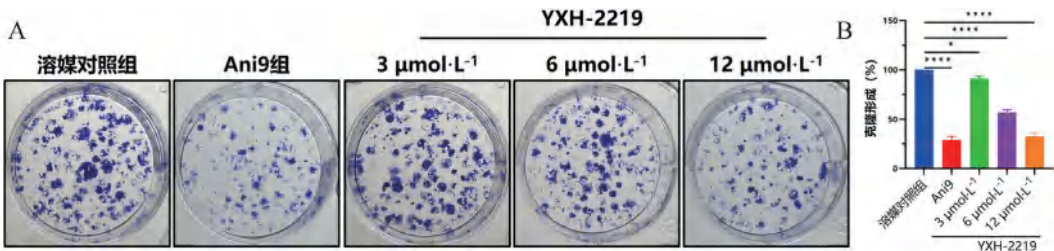


图 1 YXH-2219 对 PC-3 细胞克隆形成的影响 ( $n = 3$ )  
Fig 1 Effect of YXH-2219 on the clonogenic formation of PC-3 cells ( $n = 3$ )  
注：与溶媒对照组比较，\* $P < 0.05$ ，\*\*\*\* $P < 0.0001$ 。  
Note: Compared with the solvent control group, \* $P < 0.05$ ，\*\*\*\* $P < 0.0001$ .

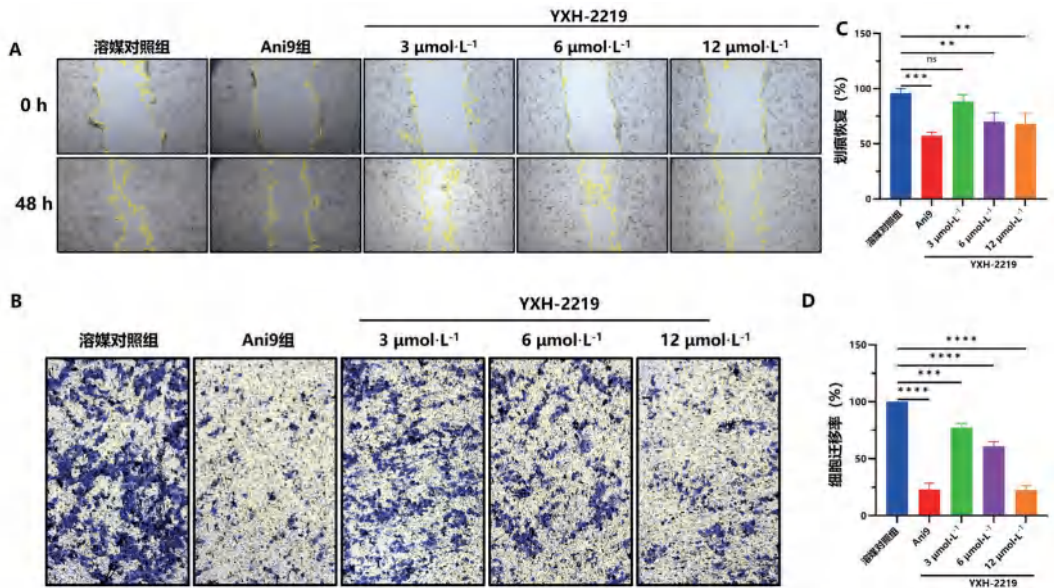


图 2 YXH-2219 对 PC-3 细胞迁移能力的影响 ( $n = 3$ )  
Fig 2 Effect of YXH-2219 on the migration capability of PC-3 cells ( $n = 3$ )  
注：与溶媒对照组比较，\*\* $P < 0.01$ ，\*\*\* $P < 0.001$ ，\*\*\*\* $P < 0.0001$ 。  
Note: Compared with the solvent control group, \*\* $P < 0.01$ ，\*\*\* $P < 0.001$ ，\*\*\*\* $P < 0.0001$ .

以模型对照组相对肿瘤体积增殖率为 100%，Ani9 组、YXH-2219 低剂量组、YXH-2219 高剂量组的相对肿瘤增殖率分别为  $(-2.0 \pm 5.4)\%$ 、 $(29.5 \pm 16.4)\%$ 、 $(1.2 \pm 6.7)\%$  (见图 4B)。PCa 荷瘤模型肿瘤生长抑制实验结果显示，在第 28 日给药结束 24 h 后，安乐死动物后剥离肿瘤，模型对照组、Ani9 组、

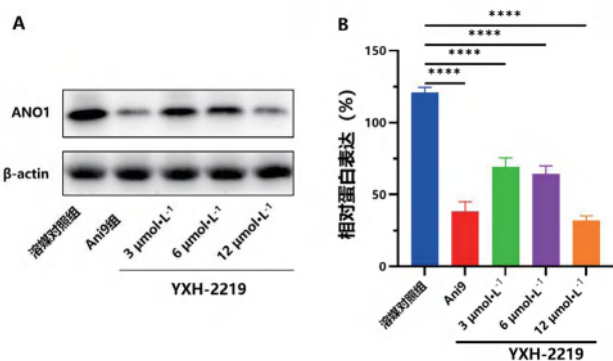


图3 YXH-2219 对 PC-3 细胞 ANO1 蛋白表达的影响 ( $n = 3$ )

Fig 3 Effect of YXH-2219 on ANO1 protein expression in PC-3 cells ( $n = 3$ )

注: 与溶媒对照组比较, \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

Note: Compared with the solvent control group, \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

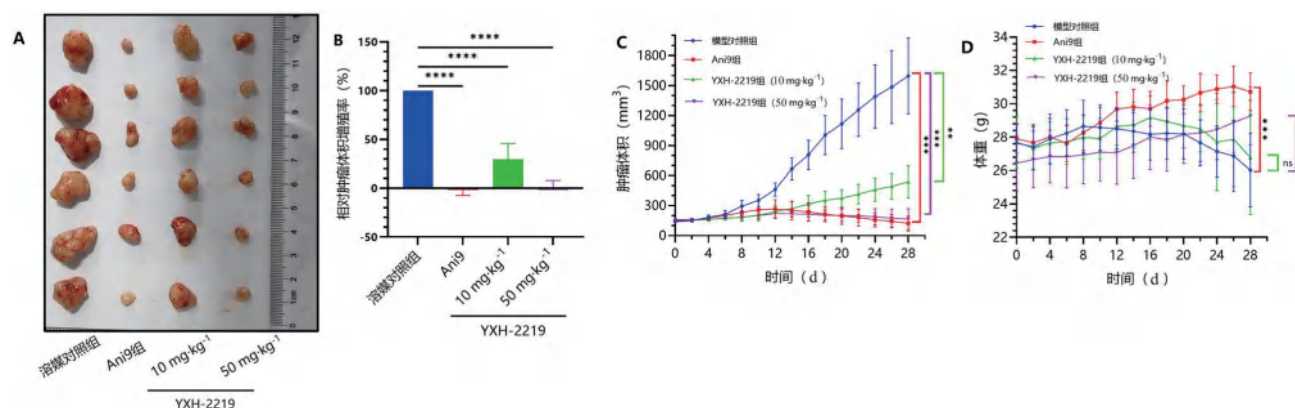


图4 YXH-2219 对 PC-3 荷瘤模型肿瘤生长的影响 ( $n = 6$ )

Fig 4 Effect of YXH-2219 on tumor growth in PC-3 xenograft models ( $n = 6$ )

注: 与溶媒对照组比较, \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

Note: Compared with the solvent control group, \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

### 3.6 YXH-2219 对 PC-3 荷瘤模型肿瘤组织病理学检测

HE 染色结果显示, 模型对照组肿瘤细胞多, 体积较大, 呈肿瘤病灶样团状分布并伴随肿瘤组织内部出血, 肿瘤外周可见纤维结缔组织增生和炎症细胞浸润, 具有大量异常核分裂象细胞, 部分肿瘤细胞已侵袭至肌肉组织。两个剂量的

YXH-2219 低剂量组、YXH-2219 高剂量组的肿瘤体积分别为 ( $1597.0 \pm 379.5$ )、( $123.2 \pm 74.6$ )、( $537.1 \pm 161.8$ )、( $164.8 \pm 104.2$ )  $\text{mm}^3$  (见图 4C)。与模型对照组比较, 随着给药次数的增加,  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量的 YXH-2219 和 Ani9 给药组肿瘤体积小于模型对照组肿瘤体积 ( $P < 0.05$ , 见图 4C), 肿瘤体积增殖速度降低, 且 Ani9 组给药结束时的肿瘤体积小于给药前体积 (见图 4C)。  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量的 YXH-2219 和 Ani9 对荷瘤模型的体重呈震荡增加趋势 ( $P < 0.05$ ); 而模型对照组、 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量的 YXH-2219 组分别从给药第 8 日、第 16 日开始逐渐下降,  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量的 YXH-2219 与模型对照组体重差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 见图 4D)。

YXH-2219 和 Ani9 组肿瘤细胞多, 肿瘤组织内出现细胞空泡变性伴随多个局灶性坏死而出现空腔结构, 未见肿瘤细胞侵袭至肌肉组织 (见图 5A)。

IHC 染色结果显示, YXH-2219 和 Ani9 给药后, PCa 组织中 p-RPS6 蛋白明显减少 (见图 5B、5C), 说明应用 YXH-2219 和 Ani9 后, p-RPS6 的表达受到了抑制。

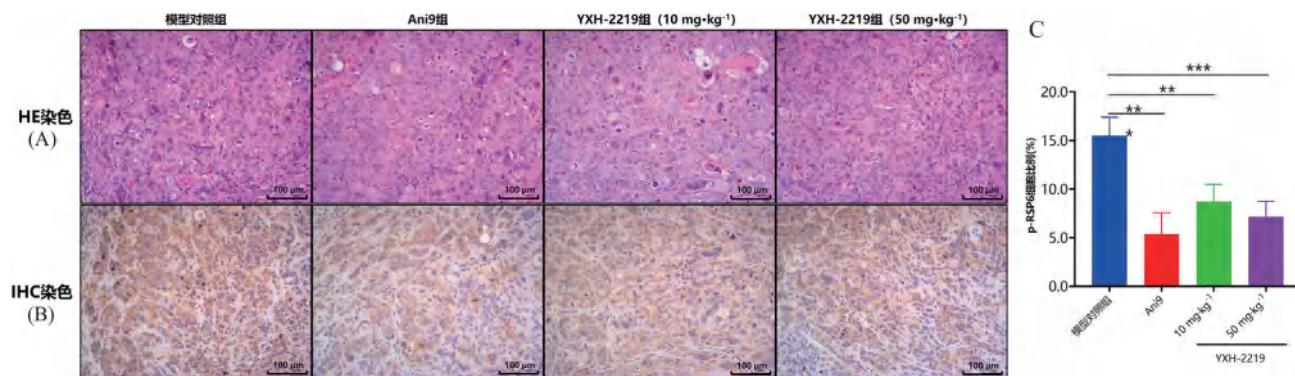


图5 YXH-2219 对肿瘤组织病理变化及 p-RPS6 表达变化的影响 ( $\times 200$ ) ( $n = 6$ )

Fig 5 Effects of YXH-2219 on Histopathological Changes in Tumor Tissues and Alterations in p-RPS6 Expression ( $\times 200$ ) ( $n = 6$ )

注 (Note): 与模型对照组比较, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (Compared with control, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).



### 3.7 YXH-2219 对 PC-3 荷瘤模型肿瘤组织中 ANO1 表达的影响

结果显示,与溶媒对照组比较,50 mg·kg<sup>-1</sup>剂量的 YXH-2219 和 Ani9 均可下调 PC-3 荷瘤模型组织中 ANO1 的表达水平 ( $P < 0.05$ )(见图 6)。这与体外研究结果一致。

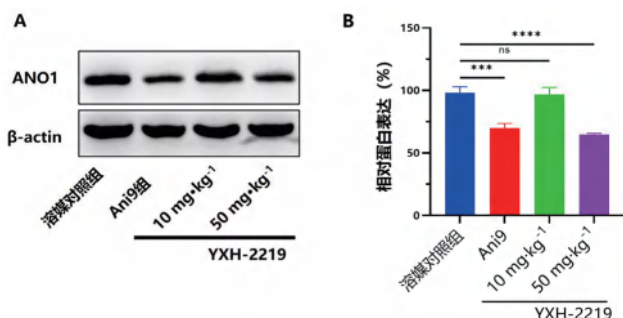


图 6 YXH-2219 对肿瘤中 ANO1 表达的影响 ( $n = 3$ )

Fig 6 Expression of ANO1 in tumors after YXH-2219 treatment ( $n = 3$ )

注:与溶媒对照组比较,\*\*\* $P < 0.001$ ,\*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

Note: Compared with the solvent control group, \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

## 4 讨论

mCRPC 患者在经历 ADT 后,疾病依旧进展,这一阶段是 PCa 的一个特征性且关键的节点,对临床治疗策略的选择具有重要意义。抑制 ANO1 的活性能够诱导 mCRPC 细胞凋亡<sup>[21]</sup>,开发针对 ANO1 的靶向抑制剂对于 mCRPC 的治疗具有重大意义。

肿瘤细胞的迁移能力是癌症转移的核心机制之一<sup>[28]</sup>,ANO1 的高表达水平与 PCa 细胞的局部侵袭和远端转移密切相关<sup>[22, 29]</sup>,而抑制 ANO1 的活性能够降低 PCa 的转移能力<sup>[21, 30]</sup>。体外实验揭示了 YXH 系列化合物对 PCa 细胞的增殖抑制作用与 ANO1 表达水平成正相关,后续的实验结果验证了 YXH-2219 降低了 PC-3 细胞的跨膜迁移能力和划痕愈合能力。Western blot 结果显示 YXH-2219 可以抑制 PC-3 细胞的 ANO1 表达。体外实验结果表明, YXH-2219 可能是通过下调 PC-3 细胞中 ANO1 表达来抑制其迁移能力,进而降低 PCa 的侵袭和转移能力。

在 PC-3 细胞移植瘤模型中, YXH-2219 降低了肿瘤的生长速度,50 mg·kg<sup>-1</sup>剂量下的肿瘤体积相较于给药前有所减小,表明 YXH-2219 具有良好的体内抗 PCa 活性。肿瘤组织的 HE 染色结果显示,荷瘤模型组的部分 PCa 细胞已侵袭至肌肉组织,而在 Ani9 组和两个剂量的 YXH-2219 组中,均未观察到 PCa 细胞侵袭至其他组织的现象,且出现了由细胞空泡变性引起的局灶性坏死和空腔结构。给药后, Western blot 结果显示肿瘤组织中的 ANO1 表

达下调, IHC 染色结果显示 50 mg·kg<sup>-1</sup>剂量下 RPS6 磷酸化水平降低,这表明 YXH-2219 可能通过抑制 ANO1 表达来降低 RPS6 的磷酸化水平,进而诱导 PCa 细胞的凋亡,抑制 PC-3 荷瘤模型肿瘤的生长,展现出明显的体内抗 PCa 活性。

RPS6 的磷酸化受哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合体 1 (mTORC1) 调控,选择性控制细胞蛋白质合成、生长和增殖,而去磷酸化后则诱导细胞生长停滞<sup>[31]</sup>。由于细胞膜上的跨膜蛋白 ANO1 并不直接调控 mTORC1 或 RPS6, YXH-2219 通过抑制 ANO1 表达来调控 RPS6 的磷酸化的确切机制仍需进一步研究。

ANO1 作为一种潜在的实验性药物靶点,目前仍处于研究阶段,尚无相关药物上市。虽然有研究对 ANO1 作为靶点的化合物进行筛选和测试<sup>[32-33]</sup>,但这些化合物的药理作用并不一致,且活性相对较低。此外,尽管 ANO1 在多种肿瘤细胞中高表达,参与多种病理过程,但目前针对 ANO1 的特异性抑制剂的开发仍处于早期研究阶段,且面临数量少、活性低的问题。因此,基于 ANO1 靶点开发新药,尤其是用于治疗肿瘤,仍面临重大挑战,需要进一步的基础研究和药物开发工作。未来的研究方向包括但不局限于提高 ANO1 抑制剂的活性和选择性,以及深入研究 ANO1 在肿瘤发生发展中的具体作用机制,从而为开发新型治疗药物提供理论基础和实验依据。本研究为 ANO1 作为肿瘤治疗的潜在靶点提供了新的见解,并为未来的肿瘤治疗策略提供了新的方向。随着对 ANO1 在肿瘤微环境和免疫逃逸中作用的进一步研究, ANO1 可能成为肿瘤治疗中的一个重要靶点。

## 参考文献

- [1] Oseni SO, Naar C, Pavlović M, et al. The molecular basis and clinical consequences of chronic inflammation in prostatic diseases: prostatitis, benign prostatic hyperplasia, and prostate cancer [J]. *Cancers*, 2023, 15 (12): 3110-3156.
- [2] Occhipinti S, Brunckhorst O, Liszka J, et al. Mental wellbeing and quality of life in prostate cancer (MIND-P): protocol for a multi-institutional prospective cohort study [J]. *PLoS One*, 2023, 18 (4): 1-15.
- [3] Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, et al. Cancer statistics, 2023 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2023, 73 (1): 17-48.
- [4] Le TK, Duong QH, Baylot V, et al. Castration-resistant prostate cancer: from uncovered resistance mechanisms to current treatments [J]. *Cancers*, 2023, 15 (20): 5047-5063.
- [5] Ryan CJ, Smith MR, De Bono JS, et al. Abiraterone in metastatic prostate cancer without previous chemotherapy [J].



- N Engl J Med, 2013, 368 (2): 138-148.
- [6] Freedland SJ, de Almeida Luz M, de Giorgi U, et al. Improved outcomes with Enzalutamide in biochemically recurrent prostate cancer [J]. N Engl J Med, 2023, 389 (16): 1453-1465.
  - [7] Saad F, Small EJ, Feng FY, et al. Deep prostate-specific antigen response following addition of apalutamide to ongoing androgen deprivation therapy and long-term clinical benefit in SPARTAN [J]. Eur Urol, 2022, 81 (2): 184-192.
  - [8] Saad F, Hussain MHA, Tombal B, et al. Deep and durable prostate-specific antigen response to darolutamide with androgen deprivation therapy and docetaxel, and association with clinical outcomes for patients with high-or low-volume metastatic hormone-sensitive prostate cancer: analyses of the randomized phase 3 ARASENS study [J]. Eur Urol, 2024, 86 (4): 329-339.
  - [9] He Y, Xu W, Xiao YT, et al. Targeting signaling pathways in prostate cancer: mechanisms and clinical trials [J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7 (1): 198-228.
  - [10] Diss JKJ, Stewart D, Pani F, et al. A potential novel marker for human prostate cancer: voltage-gated sodium channel expression in vivo [J]. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2005, 8 (3): 266-273.
  - [11] Paulino C, Neldner Y, Lam AK, et al. Structural basis for anion conduction in the calcium-activated chloride channel TMEM16A [J]. Elife, 2017, 6: e26232-e26254.
  - [12] Duvvuri U, Shiwerski DJ, Xiao D, et al. TMEM16A induces MAPK and contributes directly to tumorigenesis and cancer progression [J]. Cancer Res, 2012, 72 (13): 3270-3281.
  - [13] Zhang L, Wang H, Guo J, et al. High level of ANO1 promotes pancreatic cancer growth in concert with oncogenic KRAS [J]. Mol Biol Rep, 2023, 50 (4): 3297-3307.
  - [14] Wang H, Yao F, Luo SY, et al. A mutual activation loop between the  $\text{Ca}^{2+}$ -activated chloride channel TMEM16A and EGFR/STAT3 signaling promotes breast cancer tumorigenesis [J]. Cancer Lett, 2019, 455: 48-59.
  - [15] Deng CM, Zhang GG, Liu QW, et al. ANO1 reprograms cholesterol metabolism and the tumor microenvironment to promote cancer metastasis [J]. Cancer Res, 2023, 83 (11): 1851-1865.
  - [16] Jiang FL, Jia KR, Chen Y, et al. ANO1-mediated inhibition of cancer ferroptosis confers immunotherapeutic resistance through recruiting cancer-associated fibroblasts [J]. Adv Sci, 2023, 10 (24): 2300881-2300897.
  - [17] Numata T, Sato-Numata K, Hermosura MC, et al. TRPM7 is an essential regulator for volume-sensitive outwardly rectifying anion channel [J]. Commun Biol, 2021, 4 (1): 599-612.
  - [18] Zhong CX, Xiong GS, Yang HT, et al. Phosphorylation by IKK $\beta$  promotes the degradation of HMGCL via NEDD4 in lung cancer [J]. Int J Biol Sci, 2023, 19 (4): 1110-1122.
  - [19] Luo SY, Wang H, Bai LC, et al. Activation of TME-16A  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  channels by ROCK1/moesin promotes breast cancer metastasis [J]. J Adv Res, 2021, 33: 253-264.
  - [20] Yi YW, You KS, Park JS, et al. Ribosomal protein S6: a potential therapeutic target against cancer? [J]. Int J Mol Sci, 2021, 23 (1): 48.
  - [21] Park SH, Lee Y, Jeon H, et al. Anticancer effect of hemin through ANO1 inhibition in human prostate cancer cells [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25 (11): 6032-6045.
  - [22] Shin YW, Kim SM, An WJ. Promoter hypermethylation as a novel regulator of ANO1 expression and function in prostate cancer bone metastasis [J]. Sci Rep, 2024, 14 (1): 11595-11606.
  - [23] Seo YH, Kim JW, Chang JW, et al. Synthesis and biological evaluation of novel Ani9 derivatives as potent and selective ANO1 inhibitors [J]. Eur J Med Chem, 2018, 160: 245-255.
  - [24] Song Y, Gao J, Guan LZ, et al. Inhibition of ANO1/TMEM16A induces apoptosis in human prostate carcinoma cells by activating TNF-alpha signaling [J]. Cell Death Dis, 2018, 9 (6): 703-716.
  - [25] Tai S, Sun Y, Squires JM, et al. PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma [J]. Prostate, 2011, 71 (15): 1668-1679.
  - [26] Gu WJ, Han WQ, Luo H, et al. Rezvilutamide versus bicalutamide in combination with androgen-deprivation therapy in patients with high-volume, metastatic, hormone-sensitive prostate cancer (CHART): a randomised, open-label, phase 3 trial [J]. Lancet Oncol, 2022, 23 (10): 1249-1260.
  - [27] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9 (9): 1069-1072.
  - [28] Mosier JA, Schwager SC, Boyajian DA, et al. Cancer cell metabolic plasticity in migration and metastasis [J]. Clin Exp Metastasis, 2021, 38 (4): 343-359.
  - [29] Tzelepi V. Prostate cancer: pathophysiology, pathology and therapy [J]. Cancers, 2022, 15 (1): 281-286.
  - [30] Jeon DK, Jo MJ, Lee YC, et al. Inhibition of ANO1 by cis-and trans-resveratrol and their anticancer activity in human prostate cancer PC-3 cells [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24 (2): 1186-1200.
  - [31] Bohlen J, Roiuk M, Teleman AA. Phosphorylation of ribosomal protein S6 differentially affects mRNA translation based on ORF length [J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49 (22): 13062-13074.
  - [32] Seo Y, Jeong SB, Woo JH, et al. Diethylstilbestrol, a novel ANO1 inhibitor, exerts an anticancer effect on non-small cell lung cancer via inhibition of ANO1 [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22 (13): 7100-7112.
  - [33] Zhang X, Zhang GH, Zhao ZJ, et al. Cepharanthine, a novel selective ANO1 inhibitor with potential for lung adenocarcinoma therapy [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2021, 1868 (12): 119132-119141.

(收稿日期: 2024-10-05; 修回日期: 2024-11-10)

# 基于网络药理学和铁死亡探讨白芍总苷改善肠缺血再灌注的潜在作用机制

车轩<sup>1</sup>, 郭依然<sup>2</sup>, 赵国杰<sup>1</sup> (邯郸市中心医院, 1. 普外七科, 2. 教学科, 河北 邯郸 056001)

**摘要:** **目的** 基于网络药理学和铁死亡探讨白芍总苷改善肠缺血再灌注 (I/R) 的潜在作用机制。**方法** 利用 HERB、SEA、SwissTargetPrediction、TCMID 和 TCMSP 数据库预测白芍总苷的潜在靶点, 并通过 GeneCards、GEO、OMIM 和 PharmGKB 数据库预测 I/R 的潜在靶点。筛选出白芍总苷调控铁死亡改善 I/R 的作用靶点。通过 STRING 数据库构建 PPI 网络, 并利用 Cytoscape 软件中的 CytoNCA 插件进行拓扑分析, 识别核心作用靶点。基于 Metascape 数据库对核心靶点进行功能富集分析, 筛选出关键核心通路。采用分子对接方法验证白芍总苷与核心靶点之间的相互作用。最后通过体外细胞实验, 结合 Western blot 与 RT-PCR, 评估白芍总苷对白细胞介素相关铁死亡核心靶点 (PARP1、HSPA5 和 PTGS2) 蛋白及 mRNA 表达水平的调控作用, 从而验证其在 I/R 中的作用机制。**结果** 共得到 839 个白芍总苷的潜在靶点和 1985 个 I/R 的潜在靶点。通过与 728 个铁死亡基因映射得出 33 个白芍总苷调控铁死亡改善 I/R 的作用靶点。借助 PPI 网络及拓扑分析获得了 11 个核心作用靶点。Metascape 富集分析结果显示关键核心通路为细胞对缺氧的响应、跨膜调控、对激素的响应、尿激肽 II 介导的信号传导、脂质与动脉粥样硬化。分子对接结果显示, 白芍总苷能够稳定结合于 11 个靶蛋白的活性位点, 结合能均远小于  $-5.0 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。体外细胞实验显示, 白芍总苷可显著抑制 I/R 中 PARP1、HSPA5 和 PTGS2 的 mRNA 和蛋白的表达 ( $P < 0.05$ )。**结论** 本研究共鉴定了 11 个白芍总苷调控铁死亡以改善 I/R 的核心靶点, 体外细胞实验证明白芍总苷可通过抑制 PARP1、HSPA5 和 PTGS2 的 mRNA 和蛋白表达来改善 I/R。

**关键词:** 肠缺血再灌注; 白芍总苷; 网络药理学; 铁死亡

**中图分类号:** R285.5, R657.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)08-2225-07  
**doi:**10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.012

## Potential mechanism of total glucosides of paeony in alleviating intestinal ischemia-reperfusion injury based on network pharmacology and ferroptosis

CHE Xuan<sup>1</sup>, GUO Yi-ran<sup>2</sup>, ZHAO Guo-jie<sup>1</sup> (1. Seven Department of General Surgery, 2. Department of Teaching, Handan Central Hospital, Handan Hebei 056001)

**Abstract: Objective** To determine the potential mechanism of total glucosides of paeony (TGP) in alleviating intestinal ischemia-reperfusion (I/R) injury with network pharmacology and ferroptosis-related analysis. **Methods** Potential targets of TGP were predicted with HERB, SEA, SwissTargetPrediction, TCMID, and TCMSP databases, while potential targets of I/R were identified with GeneCards, GEO, OMIM, and PharmGKB databases. Targets for TGP that modulated ferroptosis to improve I/R injury were screened. A protein-protein interaction (PPI) network was established with STRING database, and the core targets were identified by topological analysis with the CytoNCA plugin in Cytoscape software. Functional enrichment analysis of these core targets was performed with the Metascape database, and the key pathways were identified. Molecular docking was used to verify the interactions between TGP and the core targets. Finally, in vitro cell experiments combined with Western blot and RT-PCR were conducted to evaluate the regulatory effects of total glucosides of paeony (TGP)

**基金项目:** 邯郸市科学技术研究与发展计划项目 (No.19422083009)。

**作者简介:** 车轩, 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事胃肠外科和结直肠外科的研究, email: chexuan07@163.com

on the expression levels of key ferroptosis-related targets (PARP1, HSPA5, and PTGS2) at both the protein and mRNA levels, thereby verifying its mechanism of action in intestinal ischemia/reperfusion (I/R) injury. **Results** Totally 839 potential targets of TGP and 1985 potential targets of I/R were identified. Thirty-three targets were associated with TGP regulation of ferroptosis in I/R injury alleviation by mapping against 728 ferroptosis-related genes. Through PPI network construction and topological analysis, 11 core targets were obtained. Functional enrichment analysis revealed key pathways, including cellular responses to hypoxia, transmembrane regulation, responses to hormones, urotensin II-mediated signaling, and lipid and atherosclerosis pathways. Molecular docking demonstrated that paeoniflorin stably bound to the active sites of the 11 target proteins, with binding energies consistently below  $-5.0 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ . In vitro cell experiments showed that TGP significantly inhibited the expression of PARP1, HSPA5, and PTGS2 mRNA and protein in the I/R model ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** This study identifies 11 core targets regulated by TGP to ameliorate I/R injury through ferroptosis modulation. In vitro cell experiments further validate that TGP may improve I/R injury by inhibiting the expression of PARP1, HSPA5, and PTGS2 at both mRNA and protein levels.

**Key words:** intestinal ischemia-reperfusion; total glucosides of paeony; network pharmacology; ferroptosis

肠缺血再灌注 (I/R) 损伤是一种由肠道血流中断后恢复供血所引起的复杂病理过程, 可导致肠道组织发生显著损伤, 表现为血管功能障碍和黏膜屏障失效。病因包括急性动脉血栓、栓塞、非闭塞性肠系膜缺血等, 常见于老年患者, 且发病率随着年龄增长而显著增加<sup>[1]</sup>。I/R 损伤的病理机制涉及缺氧导致的细胞代谢紊乱以及再灌注过程中产生的大量活性氧 (ROS) 和炎症介质, 这些因素共同加重了组织损伤和系统性炎症反应<sup>[2]</sup>。西药在治疗 I/R 损伤方面存在显著的不良反应, 如引发全身性炎症反应及器官毒性, 长期使用还可能导致免疫功能受损, 增加感染风险<sup>[3]</sup>。相比之下, 中药在多靶点协同调节、炎症反应抑制、抗氧化应激及组织修复促进等方面展现出独特优势。研究表明, 白芍总苷 (TGP) 可通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路, 减少炎症细胞因子释放, 减轻炎症反应; 白芍总苷还能增强抗氧化能力, 保护肠黏膜屏障功能, 有效防止氧化应激损伤<sup>[4]</sup>。

网络药理学通过构建生物分子网络, 将疾病表型靶点与药物靶点进行映射, 能够揭示复杂疾病的分子机制及药物的治疗机制<sup>[5]</sup>。铁死亡作为一种新型细胞程序性死亡机制, 与 I/R 有着密切联系<sup>[6]</sup>。研究表明, 铁死亡通过调控细胞内铁离子水平和氧化还原状态, 影响细胞存活和组织损伤的程度, 在 I/R 的过程中起关键作用<sup>[7]</sup>。本研究结合网络药理学与铁死亡机制, 探讨白芍总苷改善 I/R 的作用机制。通过多数据库预测靶点, 筛选白芍总苷调控铁死亡的 I/R 靶点, 构建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络并识别核心靶点, 进行功能富集和分子对接验证。最后通过体外细胞实验, 结合 Western blot 与实时定量 PCR (RT-PCR), 评

估白芍总苷在 I/R 和铁死亡途径中的调控作用。

## 1 材料

### 1.1 仪器

J10100902022712 型二氧化碳细胞培养箱 (中国博迅); Q33238 型核酸定量仪 (美国赛默飞); E6006 型蛋白电泳系统、E6155 型 Western Blot 转膜系统 (中国 Beyotime); LightCycler 480 II 型实时定量 PCR 仪 (瑞士 Roche)。

### 1.2 试药

人类结肠癌细胞系 Caco-2 (批号: iCell-h032, 赛百慷); 白芍总苷 (纯度不低于 98%, 泰州丹鼎生物科技有限公司); DMEM 高糖培养基 [含 10% 胎牛血清 (FBS) 和 1% 青霉素-链霉素溶液] (批号: PM150210P-1, 普诺赛); 含氧 DMEM 高糖培养基 (批号: 21063045, 赛默飞); PARP1、HSPA5、PTGS2 的单克隆抗体 (Abclonal); 辣根过氧化物酶标记抗体 (批号: AU100302S, Abmart); TRIzol 试剂 (批号: 15596026, 赛默飞); PrimeScript RT reagent 试剂盒 (批号: RR092A)、SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒 (货号: RR820A) (TAKARA)。

## 2 方法与结果

### 2.1 预测白芍总苷和 I/R 的潜在靶点

为了预测白芍总苷的潜在靶点, 本研究搜索了多个数据库, 包括 HERB<sup>[8]</sup> (<http://herb.ac.cn>)、SEA<sup>[9]</sup> (<https://sea.bkslab.org>)、SwissTargetPrediction<sup>[10]</sup> (<http://www.swisstargetprediction.ch>)、TCMID<sup>[11]</sup> (<https://bidd.group/TCMID/index.html>) 和 TCMSP<sup>[12]</sup> (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)。本研究通过整合这些平台的数据并进行合并去重, 全面预测了白芍总苷的潜在生物靶点。以“intestinal ischemia/reperfusion”作为关键词, 利用 Gen-



eCards<sup>[13]</sup> (<https://www.genecards.org>)、GEO<sup>[14]</sup> (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)、OMIM<sup>[15]</sup> (<https://omim.org/>) 和 PharmGKB<sup>[16]</sup> (<https://www.pharmgkb.org/>) 数据库, 整合收集的基因列表合并去重, 以预测 I/R 的潜在靶点。

本研究在 5 个数据库中预测白芍总苷的潜在靶点, 其中 HERB 数据库有 26 个、SEA 数据库有 149 个、SwissTargetPrediction 数据库有 130 个、TCMID 数据库有 14 个、TCMSP 数据库有 637 个, 合并去重后共得到了 839 个白芍总苷的潜在靶点。本研究在 4 个数据库中预测 I/R 的潜在靶点, 其中 GeneCards 数据库有 1686 个、GEO 数据库有 81 个、OMIM 数据库有 196 个、PharmGKB 数据库有 106 个, 合并去重后总共得到 1985 个 I/R 的潜在靶点。

## 2.2 筛选白芍总苷调控铁死亡改善 I/R 的作用靶点

本研究收集了 728 个铁死亡相关基因<sup>[17]</sup> (包含 driver 基因 369 个、marker 基因 11 个和 suppressor 基因 348 个), 并利用 Venny 2.1 平台 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) 对 839 个白芍总苷潜在靶点、1985 个 I/R 潜在靶点及铁死亡相关基因进行交集分析, 最终筛选出 33 个共同靶点, 作为白芍总苷调控铁死亡改善 I/R 的作用靶点。

## 2.3 构建 PPI 网络及拓扑分析<sup>[18]</sup>

为筛选白芍总苷调控铁死亡改善 I/R 的关键作用靶点, 本研究将 33 个交集靶点导入 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>), 构建 PPI 网络, 设置最低相互作用评分为 0.4, 得到包含 33 个节点和 228 条边的网络, 平均节点度为 13.8。随后使用 Cytoscape 3.7.2 软件及其 CytoNCA 插件, 从中介中心性 (BC)、度中心性 (DC)、特征向量中心性 (EC) 等六项网络拓扑参数进行综合筛选, 确定 BC = 9.435、DC = 14.000 等阈值, 最终获得由 11 个核心节点构成的 PPI 核心网络, 核心靶点包括 HMOX1、TP53、PPARG、HSPA5、PTGS2、NFE2L2、IL6、PTEN、RELA、TGFB1 和 PARP1。这些靶点在网络中显示出较高的中心性与关键调控地位, 可能在白芍总苷介导的 I/R 保护机制中发挥重要作用。

## 2.4 基于 Metascape 数据库的富集分析

为进一步探讨核心靶点的功能机制及信号通路参与情况, 将上述 11 个白芍总苷调控铁死亡改善 I/R 的核心靶点导入 Metascape 数据库 (<http://metascape.org>) 进行功能富集分析。分析内容涵盖 GO 生物过程、KEGG 通路、Reactome 基因集、WikiPathways 及 PANTHER 通路等多个注释系统。结果表明, 核心靶点显著富集于细胞对缺氧的响应、跨膜转运调控、激素应答、尿激肽 II 介导的

信号传导及脂质代谢与动脉粥样硬化等关键生物过程, 提示白芍总苷可能通过多条信号途径协同调控 I/R 损伤进程。富集结果导入 Cytoscape 进一步构建“白芍总苷-靶点-通路”可视化网络, 有助于揭示其作用机制的系统调控特征 (见图 1)。

## 2.5 分子对接验证

本研究选取白芍总苷与白芍总苷调控铁死亡改善 I/R 的核心作用靶点进行分子对接。从 PubChem 数据库获取白芍总苷的 3D 结构, 并从 PDB 数据库下载 I/R 相关的核心靶点蛋白结构。使用 AutoDockTools 对靶蛋白进行预处理, 包括去除水分子和配体, 添加氢原子, 并修复缺失的氨基酸残基。定义靶蛋白的活性位点并设置网格参数, 使用 AutoDock Vina 软件运行分子对接计算。通过分子可视化工具 PyMOL 分析白芍总苷与靶蛋白之间的相互作用。

本研究选取白芍总苷与排名前 5 的核心作用靶点分别进行分子对接。当结合能  $\leq -5.0$  kJ  $\cdot$  mol<sup>-1</sup> 时, 表明分子间有较强的相互作用, 配体与靶标分子能形成稳定的复合物<sup>[19]</sup>。结果显示, 白芍总苷能够稳定结合于 5 个靶蛋白的活性位点, 结合能均远小于  $-5.0$  kJ  $\cdot$  mol<sup>-1</sup>, 具有较高的结合亲和力。表明白芍总苷能够与改善 I/R 的 5 个铁死亡核心作用靶点高效结合, 且结合结构稳定, 结果见表 1。5 个核心作用靶点分子对接模式见图 2。

## 2.6 体外细胞实验

**2.6.1 细胞培养** 使用人类结肠癌细胞系 Caco-2 作为体外实验模型。细胞在含有 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素的高糖 DMEM 培养基中培养, 在 37℃、5%CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中培养。细胞生长至 70%~80% 融合状态后传代用于后续实验, 以确保实验的稳定性和可重复性。

**2.6.2 分组** 将细胞分为 3 组, 正常对照组 (Control): 不进行任何处理, 保持常规培养; 缺氧复氧组 (I/R): 细胞在缺氧条件下处理 4 h 后, 再复氧处理 24 h; 缺氧复氧+白芍总苷组 (I/R + TGP): 在缺氧 4 h 后加入适量白芍总苷, 再复氧处理 24 h, 每组 6 个复孔。

**2.6.3 剂量效应实验** 用不同质量浓度白芍总苷 (Control 组、25、50、75、100、125、150、175、200  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>) 处理缺氧复氧 (I/R) 模型的 Caco-2 细胞后, 分别检测 PARP1、HSPA5 和 PTGS2 的 mRNA 及蛋白表达水平。结果显示, 随着白芍总苷浓度的升高, PARP1、HSPA5 和 PTGS2 蛋白表达逐渐下降, 呈现剂量依赖性 ( $P < 0.05$ )。当白芍总苷质量浓度达到 100  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 时, 蛋白表达恢复接

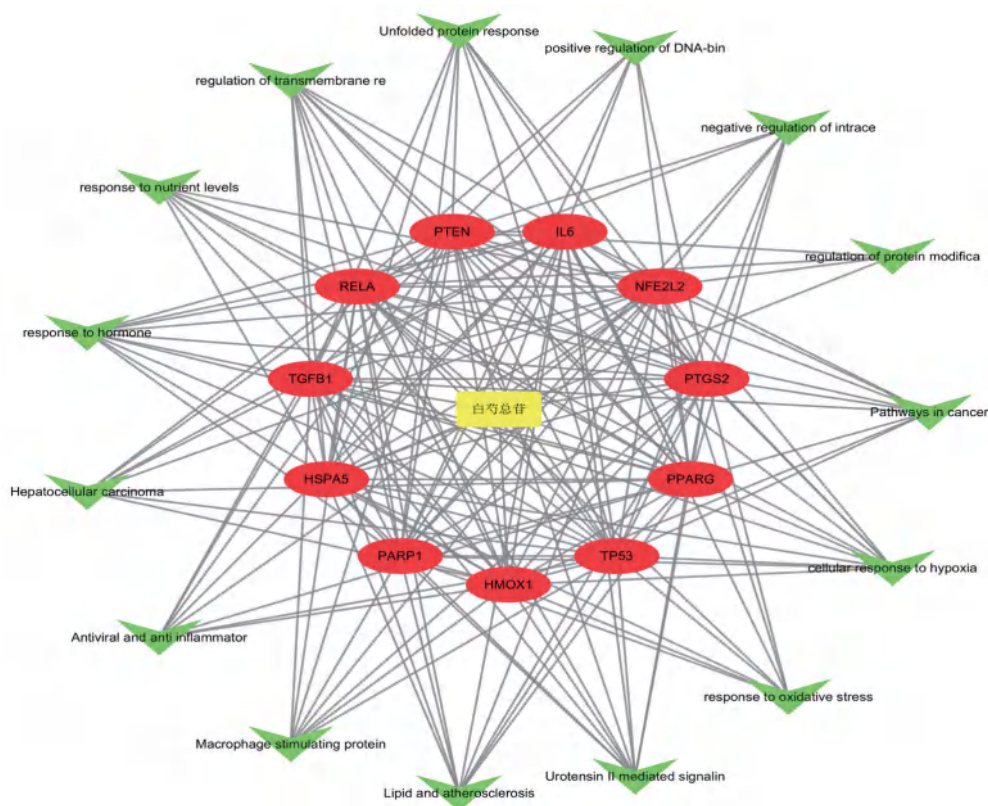


图1 “白芍总苷-靶点-通路”网络图

Fig 1 "TGP-targets-pathways" network diagram

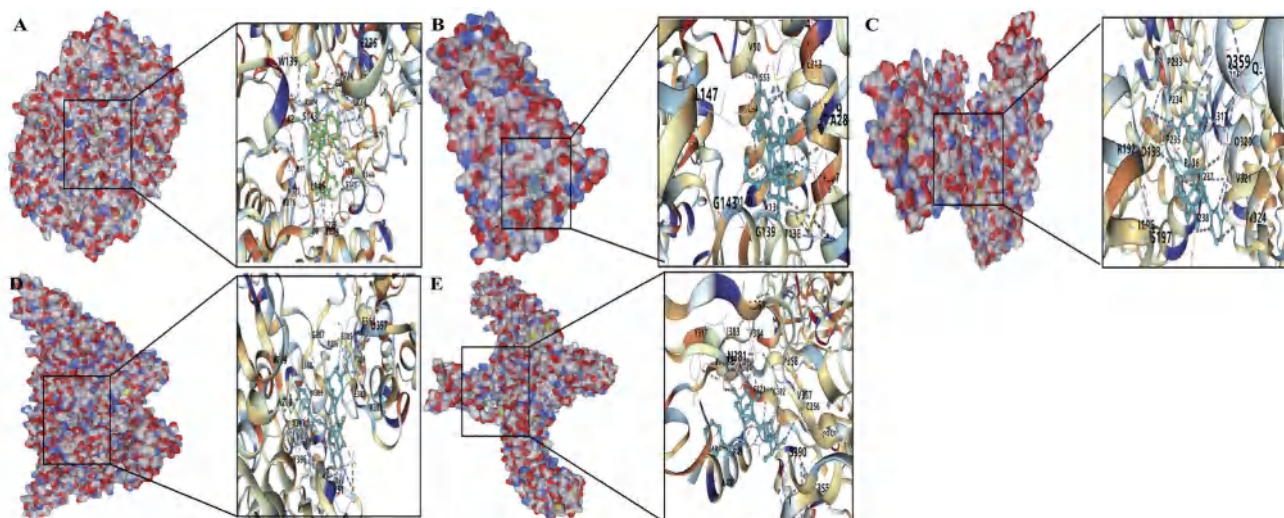


图2 白芍总苷与5个核心作用靶点分子对接模式图

Fig 2 Docking model of TGP with the 5 core target molecules

A ~ E. 依次为 HMOX1、TP53、PPARG、HSPA5、PTGS2 与 TGP 的对接 (A ~ E. HMOX1、TP53、PPARG、HSPA5、PTGS2 docking with TGP)

近正常水平 (与 Control 组比较, 差异无统计学意义,  $P > 0.05$ ), 见图 3。白芍总苷在不同浓度下均显著降低 *PARP1*、*HSPA5* 和 *PTGS2* 的 mRNA 表达, 白芍总苷在  $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时下降最为明显, 与 I/R 组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 见图 4。

**2.6.4 Western blot 检测** 在各组处理结束后, 提取细胞总蛋白, 使用 BCA 法进行蛋白定量。将等量蛋白样品通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 并转移

至 PVDF 膜上。随后, 使用针对 *PARP1*、*HSPA5* 和 *PTGS2* 的特异性一抗以及 HRP 标记的二抗进行孵育。通过 ECL 化学发光法显影并在成像系统上检测蛋白信号强度。使用 Image J 软件定量各组蛋白的相对表达水平。结果显示, *PARP1*、*HSPA5* 和 *PTGS2* 的蛋白在 I/R 组的表达均显著高于对照组 ( $P < 0.001$ ); 在 I/R + TGP 组 ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , TGP) 中, 三者的表达虽仍显著高于对照组 (*PARP1*:  $P = 0.014$ ;



表 1 白芍总苷与 11 个核心作用靶点分子对接的结合能  
Tab 1 Binding affinities of TGP with the 11 core target molecules

| 白芍总苷 | 靶点     | 结合能 / ( kJ · mol <sup>-1</sup> ) | 结合位点                                |
|------|--------|----------------------------------|-------------------------------------|
| TGP  | HMOX1  | — 36.401                         | S143 和 L145、W139 和 F142、Q374 和 N375 |
|      | TP53   | — 23.430                         | G143 和 G139、L147 和 L134             |
|      | PPARG  | — 35.564                         | P234 和 P235、Q359 和 D193             |
|      | HSPA5  | — 39.748                         | Y396 和 Y299、N389 和 A392             |
|      | PTGS2  | — 39.330                         | N381 和 N370、Y317 和 I383             |
|      | NFE2L2 | — 27.196                         | N71 和 H70、C52 和 H54、F55 和 T152      |
|      | IL6    | — 30.125                         | R878 和 K907、L877 和 I879、H862 和 S864 |
|      | PTEN   | — 38.493                         | S52 和 S53、K54 和 R171                |
|      | RELA   | — 33.054                         | H266 和 K265、R288 和 E291             |
|      | TGFB1  | — 32.635                         | N238 和 H283、C282 和 A281             |
|      | PARP1  | — 48.116                         | N13 和 Q12、A11 和 L9                  |

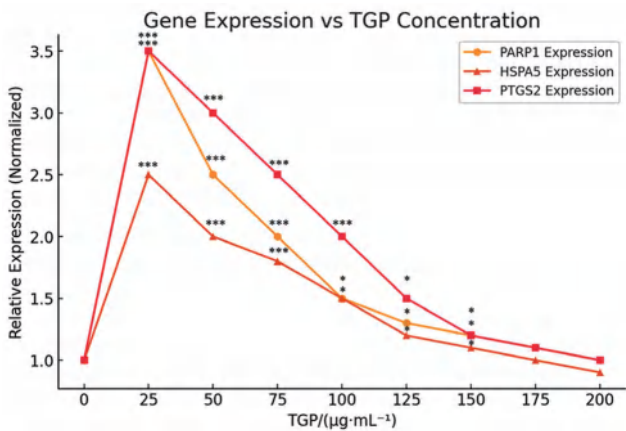


图 3 白芍总苷对 PARP1、HSPA5 和 PTGS2 蛋白表达的剂量反应曲线

Fig 3 Dose-response curve of TGP on PARP1, HSPA5, and PTGS2 protein expression

注：与对照组比较，\* $P < 0.05$ ，\*\*\* $P < 0.001$ 。  
Note: Compared with the control group, \* $P < 0.05$ ，\*\*\* $P < 0.001$ .

HSPA5:  $P = 0.012$ ; PTGS2:  $P = 0.030$ ), 但均显著低于 I/R 组 (PARP1:  $P = 0.024$ ; HSPA5:  $P = 0.034$ ; PTGS2:  $P = 0.017$ )。结果表明,  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  TGP

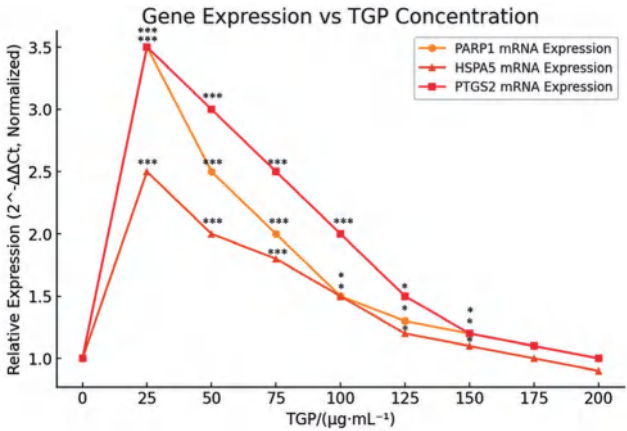


图 4 白芍总苷对 PARP1、HSPA5 和 PTGS2 mRNA 表达的剂量反应曲线

Fig 4 Dose-response curve of TGP on PARP1, HSPA5, and PTGS2 mRNA expression

注：与对照组比较，\* $P < 0.05$ ，\*\*\* $P < 0.001$ 。  
Note: Compared with the control group, \* $P < 0.05$ ，\*\*\* $P < 0.001$ .

可显著抑制 I/R 中 PARP1、HSPA5 和 PTGS2 蛋白表达 (见图 5)。

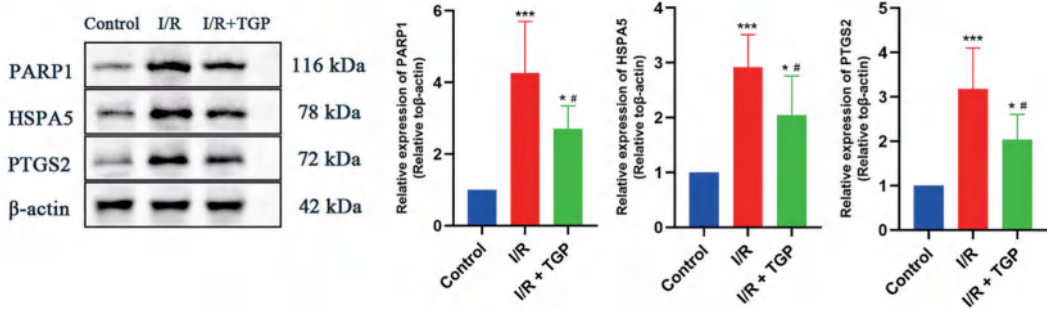


图 5 各组细胞中 PARP1、HSPA5 和 PTGS2 蛋白的表达量

Fig 5 Expression levels of PARP1, HSPA5, and PTGS2 proteins in cells of each group

注：与正常对照组比较，\* $P < 0.05$ ，\*\*\* $P < 0.001$ ；与 I/R 组比较，\* $P < 0.05$ 。  
Note: Compared with the control group, \* $P < 0.05$ ，\*\*\* $P < 0.001$ ；compared with the I/R group, \* $P < 0.05$ .

**2.6.5 RT-PCR 检测** 从细胞样本中提取总 RNA (使用 TRIzol 试剂), 并用 PrimeScript RT reagent 试剂盒反转录为 cDNA。RT-PCR 反应采用 SYBR Premix Ex

Taq II 进行扩增, 使用 LightCycler 480 II 系统检测 PARP1、HSPA5 和 PTGS2 基因的表达情况。所有数据均使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法进行相对定量, 以  $\beta$ -actin 为内参



基因, 确保基因表达分析的准确性和可靠性。引物序列见表 2。结果显示, *PARP1*、*HSPA5* 和 *PTGS2* 的表达在 I/R 组均显著高于对照组 ( $P < 0.001$ ); 在 I/R + TGP 组 ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , TGP) 中, 三者的表达虽仍显著高于对照组 ( $P < 0.001$ ), 但均显著低于 I/R 组 ( $P < 0.001$ )。结果表明, 白芍总苷可显著抑制 I/R 中 *PARP1*、*HSPA5* 和 *PTGS2* mRNA 的表达 (见图 6)。

表 2 引物序列  
Tab 2 Primer sequences

| 基因名称           | 引物序列 (5'-3')                         | 产物长度 / bp |
|----------------|--------------------------------------|-----------|
| <i>PARP1</i>   | Forward 5'-AGTCTTCGGCTTTGCGAGAG-3'   | 150       |
|                | Reverse 5'-TGGTGTCCGACTCTCTTCGT-3'   |           |
| <i>HSPA5</i>   | Forward 5'-TGGACCTGCTCGACTACGAC-3'   | 180       |
|                | Reverse 5'-AGCAGGACCATGGTGGATAA-3'   |           |
| <i>PTGS2</i>   | Forward 5'-CCTTCTCCTGTGCCTGATGA-3'   | 200       |
|                | Reverse 5'-GGATTGGAACAGCAAGGAGC-3'   |           |
| $\beta$ -actin | Forward 5'-CACCATTGGCAATGAGCGGTTC-3' | 150       |
|                | Reverse 5'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT-3' |           |

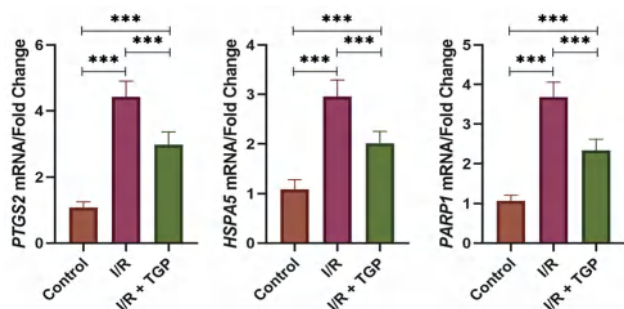


图 6 白芍总苷对细胞中 *PARP1*、*HSPA5* 和 *PTGS2* mRNA 表达量的影响 (\*\*\*)  $P < 0.001$

Fig 6 Effect of TGP on the mRNA expression levels of *PARP1*, *HSPA5*, and *PTGS2* in cells of each group (\*\*\*)  $P < 0.001$

**2.6.6 统计分析** 实验数据使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行分析, 所有结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 显著性差异通过 Tukey's 检验进行多重比较校正。 $P < 0.05$  认为差异有统计学意义, 所有统计检验均为双侧检验。

### 3 讨论

I/R 损伤对社会和健康的危害性极大, 常导致肠坏死、多器官功能衰竭, 具有高死亡率和高发病率。尽管现代医学在治疗方法上有所进步, 但早期诊断和及时干预仍是改善预后的关键 [20]。

本研究获得了 11 个白芍总苷调控铁死亡改善 I/R 的核心作用靶点, 分别为 HMOX1、TP53、PPARG、HSPA5、PTGS2、NFE2L2、IL6、PTEN、RELA、TGFB1 和 PARP1。分子对接结果显示, 白芍总苷能与 11 个核心作用靶点高效结合, 结构稳定。同时通过体外细胞实验, 验证了白芍总苷可显

著抑制 I/R 中 PARP1、HSPA5 和 PTGS2 的 mRNA 和蛋白表达。在 I/R 损伤中, 热休克蛋白家族 A 成员 5 (HSPA5) 通过调节内质网应激反应, 减轻氧化应激和炎症反应, 发挥关键的保护作用 [21]。异甘草苷通过抑制缺氧诱导因子 1- $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) 通路, 减少了铁死亡, 从而下调了前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2) 的表达, 减轻了 I/R 引起的急性肺损伤 [22]。研究表明, ADP-核糖聚合酶 1 (PARP1) 可以显著减少 I/R 引起的组织损伤和炎症反应。通过减少氧化应激和炎症介质的释放, PARP1 抑制剂在减轻 I/R 引起的损伤中发挥了保护作用 [23]。

在本研究中, 白芍总苷调控铁死亡改善 I/R 的关键核心通路为细胞对缺氧的响应、跨膜调控、对激素的响应、尿激肽 II 介导的信号传导和脂质与动脉粥样硬化。研究表明, 白芍总苷对 I/R 损伤具有保护作用, 其机制包括调节细胞对缺氧的响应。具体来说, 白芍总苷通过影响 Nrf2/HO-1 和 NLRP3 炎症小体等通路, 减少炎症和细胞死亡, 这些通路在细胞应对缺氧和再灌注损伤中起关键作用。研究表明, 白芍总苷通过增强细胞防御机制来缓解 I/R 引起的损伤 [24]。白芍总苷通过缓解钙超载和调节 GSK-3 $\beta$  磷酸化来保护心肌细胞免受缺氧/复氧损伤, 表明其在跨膜信号传导中的关键作用 [25]。在脑缺血再灌注模型中, 白芍总苷被发现能够恢复血脑屏障的完整性, 减少神经元损伤。这一发现进一步支持了白芍总苷在跨膜调控中的作用, 因为血脑屏障的功能依赖于紧密连接蛋白的跨膜定位和调控 [26]。白芍总苷的作用不仅限于直接的抗炎和抗凋亡效果, 还包括通过调节激素相关通路来发挥保护作用。研究表明白芍总苷通过调节 Smad7-TGF- $\beta$  信号通路来减轻炎症反应, 这与激素的调控密切相关 [27]。白芍总苷通过调节脂质代谢和抗动脉粥样硬化, 显著改善 I/R 损伤。研究表明, 白芍总苷能通过抗氧化、抗炎和改善血流动力学等机制, 减轻 I/R 引起的组织损伤和功能障碍 [28]。已报道文献中没有直接提到尿激肽 II 介导的信号传导在白芍总苷保护 I/R 损伤过程中的具体作用, 有待进一步研究。铁死亡作为一种铁依赖性细胞死亡形式, 已被证实多种疾病的发生中起重要作用。研究表明, 白芍总苷通过调节铁代谢相关因子, 如 HMOX1 和 NFE2L2, 可能在铁死亡过程中发挥调控作用, 作用机制可能包括增强抗氧化酶活性、减少细胞内铁离子积累及调节脂质过氧化, 从而减轻由铁死亡引起的细胞损伤。在 I/R 损伤中, 白芍总苷可能通过调控铁死亡来缓解肠道损伤并改善功能。鉴于其对铁死亡的调控作用, 白芍总苷在治疗 I/R

损伤及铁死亡相关疾病(如神经退行性疾病、肿瘤和心血管疾病)方面具有潜在的临床应用前景。

总之,本研究筛选出 11 个白芍总苷调控铁死亡以改善 I/R 损伤的核心靶点。同时通过体外细胞实验,验证了白芍总苷可通过抑制 PARP1、HSPA5 和 PTGS2 的 mRNA 和蛋白表达,来改善 I/R 损伤。本研究为白芍总苷在 I/R 治疗中的应用提供了重要的理论依据和科学支持。

## 参考文献

- [1] 张伟,王迎斌,张晶玉,等. 虾青素调节自噬对肠缺血再灌注损伤大鼠认知功能的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2024, 40 (5): 836-843.
- [2] 景伟馨,张贻颀,潘锐,等. 线粒体 DNA 介导先天免疫反应在肠缺血再灌注损伤中的研究进展[J]. 医学研究杂志, 2024, 53 (2): 160-163, 177.
- [3] Katada K, Takagi T, Iida T, et al. Role and potential mechanism of heme oxygenase-1 in intestinal ischemia-reperfusion injury[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11 (3): 559-572.
- [4] 车轩,郭依然,赵国杰,等. 白芍总苷对肠缺血再灌注大鼠 Cajal 间质细胞线粒体的保护作用研究[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2022, 28 (5): 690-694.
- [5] Shao ZC, Sun WK, Deng QQ, et al. Identification of key lncRNAs in gout under copper death and iron death mechanisms: a study based on ceRNA network analysis and random forest algorithm[J]. *Mol Bioecenol*, 2025, 67 (3): 996-1013.
- [6] Xiong W, Shu XL, Huang L, et al. Bioinformatics analysis and experimental validation of differential genes and pathways in bone nonunions[J]. *Biochem Genet*, 2024, 62 (6): 4494-4517.
- [7] 张晶玉,王一涵,李珺,等. 自噬促进大鼠肠缺血再灌注损伤的细胞铁死亡[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2023, 28 (1): 36-41.
- [8] Fang SS, Dong L, Liu L, et al. HERB: a high-throughput experiment-and reference-guided database of traditional Chinese medicine[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49 (D1): D1197-D1206.
- [9] Keiser MJ, Roth BL, Armbruster BN, et al. Relating protein pharmacology by ligand chemistry[J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25 (2): 197-206.
- [10] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47 (W1): W357-W364.
- [11] Huang L, Xie DL, Yu YR, et al. TCMID 2.0: a comprehensive resource for TCM[J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46 (D1): D1117-D1120.
- [12] Ru JL, Li P, Wang JN, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13-18.
- [13] Rebhan M, Chalifa-Caspi V, Prilusky J, et al. GeneCards: integrating information about genes, proteins and diseases[J]. *Trends Genet*, 1997, 13 (4): 163.
- [14] Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene expression omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30 (1): 207-210.
- [15] Hamosh A, Scott AF, Amberger JS, et al. Online Mendelian inheritance in man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33 (Database issue): D514-D517.
- [16] Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM, et al. Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2012, 92 (4): 414-417.
- [17] Chen X, Kang R, Kroemer G, et al. Broadening horizons: the role of ferroptosis in cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18 (5): 280-296.
- [18] Zhou YY, Zhou B, Pache L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets[J]. *Nat Commun*, 2019, 10 (1): 1523-1532.
- [19] Yang J, Jiang YH, Zhou X, et al. Material basis and molecular mechanisms of Chaihuang Qingyi Huoxue granule in the treatment of acute pancreatitis based on network pharmacology and molecular docking-based strategy[J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1353695.
- [20] Li GY, Wang S, Fan Z. Oxidative stress in intestinal ischemia-reperfusion[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2022, 8: 750731.
- [21] Zhu L, Lian WY, Yao ZW, et al. Integrated analysis of ferroptosis and immunity-related genes associated with intestinal ischemia/reperfusion injury[J]. *J Inflamm Res*, 2022, 15: 2397-2411.
- [22] Zhou ZY, Wei W, Xiong J, et al. Isoliquiritin apioside relieves intestinal ischemia/reperfusion-induced acute lung injury by blocking HIF-1 $\alpha$ -mediated ferroptosis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 108: 108852.
- [23] Elrod J, Kiwit A, Lenz M, et al. Midgut volvulus adds a murine, neutrophil-driven model of septic condition to the experimental toolbox[J]. *Cells*, 2023, 12 (3): 366-378.
- [24] 姜卫星,索成云,王亚博. 白芍总苷调节 RhoA/ROCK1 信号通路对大鼠肝缺血再灌注损伤的影响[J]. 现代药物与临床, 2024, 39 (6): 1375-1383.
- [25] Yan XY, Huang YH. Mechanism of total glucosides of paeony in hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte pyroptosis[J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2021, 53 (6): 643-653.
- [26] Li LY, Ma L, Dong WL. Total glucosides of paeony (*Paeonia lactiflora*) alleviates blood-brain barrier disruption and cerebral ischemia/reperfusion injury in rats via suppressing inflammation and apoptosis[J]. *Pharmazie*, 2020, 75 (5): 208-212.
- [27] Jin YZ, Zhang AC. Total glucosides of paeony ameliorates oxidative stress, apoptosis and inflammatory response by regulating the Smad7-TGF- $\beta$  pathway in allergic rhinitis[J]. *Mol Med Rep*, 2022, 25 (3): 83.
- [28] Vollmar B, Menger MD. Intestinal ischemia/reperfusion: microcirculatory pathology and functional consequences[J]. *Langenbecks Arch Surg*, 2011, 396 (1): 13-29.

(收稿日期: 2024-10-21; 修回日期: 2025-02-12)

# 左氧氟沙星对小鼠他克莫司血药浓度与肠道菌群的影响

张淑婷<sup>1,2</sup>, 钱敏燕<sup>1,2</sup>, 徐草梅<sup>1,2</sup>, 王莉英<sup>1</sup>, 胡楠<sup>1\*</sup> (1. 苏州大学附属第三医院/常州市第一人民医院药学部, 江苏 常州 213003; 2. 苏州大学药学院, 江苏 苏州 215000)

**摘要:** **目的** 研究左氧氟沙星对他克莫司血药浓度与肠道菌群的影响。**方法** 小鼠分为他克莫司组 (TAC)、他克莫司与左氧氟沙星合用组 (TAC + LEV), 每组 8 只, 连续灌胃给药 7 d。测定小鼠在 2 h 与 12 h 的他克莫司血药浓度, 采用 16S rRNA 基因测序检测小鼠粪便肠道菌群。**结果** 与左氧氟沙星合用后他克莫司血药浓度降低, 左氧氟沙星改变了肠道菌群的组成和丰度, TAC + LEV 组门水平上的 Cyanobacteria、Desulfobacterota、Patescibacteria、unclassified\_k\_\_norank\_d\_\_Bacteria 等菌门的相对丰度较 TAC 组降低 ( $P < 0.05$ ); 属水平上的 *Erysipelatoclostridium*、*Turicibacter*、*Coriobacteriaceae\_UCG-002* 等菌属的相对丰度较 TAC 组升高 ( $P < 0.05$ ), 而 *Dubosiella*、*norank\_f\_\_norank\_o\_\_Gastranaerophilales*、*Rikenellaceae\_RC9\_gut\_group* 等菌属的相对丰度较 TAC 组降低 ( $P < 0.05$ )。**结论** 合用左氧氟沙星会影响他克莫司的浓度, 可能与其影响肠道菌群改变有关。

**关键词:** 他克莫司; 左氧氟沙星; 血药浓度; 肠道菌群

中图分类号: R965, Q939 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)08-2232-06  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.013

## Effect of levofloxacin on tacrolimus blood concentration and gut microbiota in mice

ZHANG Shu-ting<sup>1,2</sup>, QIAN Min-yan<sup>1,2</sup>, XU Cao-mei<sup>1,2</sup>, WANG Li-ying<sup>1</sup>, HU Nan<sup>1\*</sup> (1. Department of Pharmacy, the Third Affiliated Hospital of Soochow University/Changzhou First People's Hospital, Changzhou Jiangsu 213003; 2. College of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Suzhou Jiangsu 215000)

**Abstract: Objective** To determine the effects of levofloxacin on tacrolimus blood concentration and gut microbiota. **Methods** Mice were divided into a tacrolimus group (TAC) and a tacrolimus combined with levofloxacin group (TAC + LEV), with 8 mice in each group, and were given corresponding drugs via gavage for 7 consecutive days. The 2 h and 12 h blood concentrations of tacrolimus were measured, and the gut microbiota in the mouse feces was analyzed with 16S rRNA gene sequencing. **Results** The tacrolimus blood concentration decreased after the combination of tacrolimus and levofloxacin. Levofloxacin altered the composition and abundance of the gut microbiota. At the phylum level, the relative abundance of Cyanobacteria, Desulfobacterota, Patescibacteria, and unclassified\_k\_\_norank\_d\_\_Bacteria was lower in the TAC + LEV group than that of the TAC group ( $P < 0.05$ ). At the genus level, the relative abundance of *Erysipelatoclostridium*, *Turicibacter*, and *Coriobacteriaceae\_UCG-002* increased in the TAC + LEV group compared with that of the TAC group ( $P < 0.05$ ), while *Dubosiella*, *norank\_f\_\_norank\_o\_\_Gastranaerophilales*, and *Rikenellaceae\_RC9\_gut\_group* decreased in the TAC + LEV group compared with that of the TAC group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Combination use of levofloxacin may affect tacrolimus concentration, possibly due to its impact on changes in the gut microbiota.

**Key words:** tacrolimus; levofloxacin; blood concentration; gut microbiota

**基金项目:** 常州市科技基础设施建设计划 - 常州市临床药学重点实验室 (No.CM20223005); 2022 年常州市第九批科技计划项目 (No. CJ20229033)。

**作者简介:** 张淑婷, 女, 在读硕士研究生, 主要从事临床药学研究, email: zhangshutt@163.com \*通信作者: 胡楠, 女, 主任药师, 主要从事药代动力学与临床药学研究, email: hn\_324@163.com



他克莫司 (tacrolimus, TAC) 是器官移植中广泛使用的免疫抑制剂, 通过抑制 T 细胞活化来预防移植排斥, 其血药浓度对于移植患者的治疗效果和安全性至关重要。然而, 他克莫司在临床使用时具有个体差异大、治疗窗窄的特点, 药代动力学特性易受多种因素的影响包括药物相互作用和肠道菌群改变<sup>[1]</sup>。

左氧氟沙星 (levofloxacin, LEV) 是一种喹诺酮类抗菌药物, 其抗菌谱广, 口服吸收好, 常用于治疗各种细菌感染, 通过抑制细菌 DNA 旋转酶和拓扑异构酶 IV 发挥作用, 对肠杆菌、沙门氏菌、变形杆菌具有较强的抗菌作用<sup>[2]</sup>。

他克莫司的血药浓度会受到多种药物的影响<sup>[1]</sup>。临床上喹诺酮类抗菌药物与他克莫司合用时发现他克莫司血药浓度会发生改变, 但结论尚未统一。有报道称, 左氧氟沙星与他克莫司合用对他克莫司血药浓度有影响<sup>[3]</sup>; 也有文献报道, 他克莫司浓度与喹诺酮类药物没有显著相关性<sup>[4]</sup>。因此, 建议在他克莫司与左氧氟沙星联合使用的情况下, 需要密切监测他克莫司的血药浓度。另外, 关于喹诺酮类药物与他克莫司相互作用机制的研究较少。他克莫司代谢和吸收易受到肠道菌群的影响<sup>[5-6]</sup>。而左氧氟沙星对肠道菌群具有调节作用, 会显著降低肠道菌群的多样性与丰度<sup>[7]</sup>。因此, 本文通过动物实验探究左氧氟沙星联合用药对他克莫司血药浓度和肠道菌群的影响, 为临床上联合用药提供参考, 并为优化移植患者的治疗方案提供指导。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

6~8 周龄的雄性 C57BL/6 小鼠 (SPF 级) 16 只, 体重 20~22 g [常州卡文斯实验动物有限公司 (中国常州), 许可证号: SCXK (苏) 2021-0013]。饲养条件为室温 22~25℃, 相对湿度 45%~60%, 12 h 交替照明, 自由饮水采食。适应性喂养一周后, 用于后续实验。本研究经常州市第一人民医院伦理委员会审查批准 (批件号: 2022070)。

### 1.2 试剂和仪器

他克莫司 (纯度: 98%, 批号: P-JH210329, 深圳大力水手生物科技有限公司); 左氧氟沙星针 (规格: 2 mL/0.1 g, 批号: 22031191, 扬子江药业集团有限公司)。Triple Quad 4500MD 三重四极杆串联质谱仪, Jasper 高效液相色谱系统 (美国 SCIEX 公司); 5417R 低温高速离心机 (德国

Eppendorf 公司); Vortex-Genie2 涡旋振荡仪 (美国 Scientific Industries 公司); BT25S 电子分析天平 (德国 Sartorius 公司); Milli-Q 纯水仪 (美国 Merck 公司)。

## 2 方法

### 2.1 实验动物分组

将 C57BL/6 小鼠根据体重随机分为两组, TAC 组和 TAC + LEV 组, 每组 8 只。TAC 组小鼠每日一次灌胃给予 10 mg·kg<sup>-1</sup> 的他克莫司, 连续给药 7 d; TAC + LEV 组小鼠每日一次灌胃给予 100 mg·kg<sup>-1</sup> 的左氧氟沙星, 30 min 后灌胃给予 10 mg·kg<sup>-1</sup> 的他克莫司, 连续 7 d。定期称量小鼠的体重。给药 7 d 后, 小鼠眼眶取血, 测定他克莫司的 C<sub>2h</sub> (2 h 的血药浓度点) 和 C<sub>12h</sub> (12 h 的血药浓度点)。

### 2.2 粪便的采集

在第 7 日给药前收集小鼠粪便 2~5 颗, 并置于无菌管中, 收集过程中需做好无菌措施, 收集到粪便后立即放在干冰中保存, 后置于 -80℃ 冰箱, 所有样本均由一位实验人员收集。

### 2.3 肠道菌群多样性分析

将粪便样品送至上海美吉生物医药科技有限公司进行测序工作, 随后在美吉生物在线云平台上进行数据处理与分析, 比对数据库为 Silva (Release138 <http://www.arb-silva.de>),  $\alpha$  多样性指数组间差异检验采用 Wilcoxon rank-sum test, 物种差异分析采用 Kruskal-Wallis 秩和检验。

### 2.4 统计学分析

所用的数据采用均值 ± 标准差表示, 采用 SPSS 26.0 (芝加哥, 美国) 软件进行数据统计分析。对于正态分布连续变量, 两组间比较采用 Student's *t* 检验, 非正态分布变量采用 Mann-Whitney *U* 检验。采用 Spearman 相关分析对肠道菌群进行分析。*P* < 0.05 认为差异具有统计学意义, 绘图采用 GraphPad Prism 9.2.0 软件。

## 3 结果

### 3.1 他克莫司和左氧氟沙星合用对小鼠体重的影响

与 TAC 组相比, 给药第 3 日时 TAC + LEV 组的体重有下降趋势; 给药第 7 日时两组体重差异有统计学意义 (*P* < 0.05) (见图 1)。

### 3.2 他克莫司和左氧氟沙星合用对小鼠他克莫司血药浓度的影响

TAC 组他克莫司的 C<sub>2h</sub> 为 (11.08 ± 4.22) ng·mL<sup>-1</sup>, TAC + LEV 组他克莫司的 C<sub>2h</sub> 为 (3.70 ± 1.39) ng·mL<sup>-1</sup>, 与 TAC 组相比, TAC + LEV 组降低了

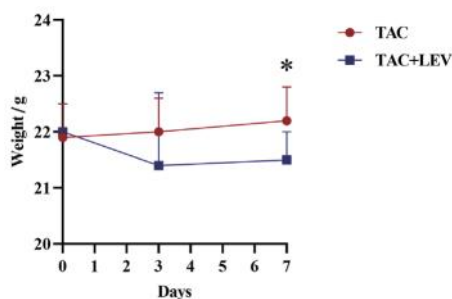
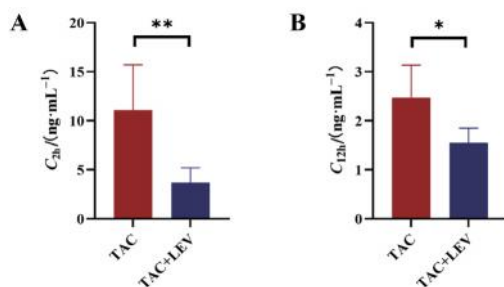


图1 各组小鼠体重变化

Fig 1 Changes in body weight of mice in each group

注: 与 TAC 组比较, \* $P < 0.05$ 。Note: Compared with the TAC group, \* $P < 0.05$ .

66.6% ( $P < 0.01$ ) (见图 2A)。TAC 组他克莫司的  $C_{12h}$  为  $(2.48 \pm 0.57) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , TAC + LEV 组他克莫司的  $C_{12h}$  为  $(1.55 \pm 0.26) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 与 TAC 组相比, TAC + LEV 组降低了 37.5% ( $P < 0.05$ ) (见图 2B)。

图2 各组小鼠 TAC 的  $C_{2h}$  (A)、 $C_{12h}$  (B) 变化Fig 2 Changes in  $C_{2h}$  (A) and  $C_{12h}$  (B) of tacrolimus in mice in each group注: 与 TAC 组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。Note: Compared with the TAC group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

### 3.3 他克莫司和左氧氟沙星合用对小鼠肠道菌群的影响

在操作分类单元 (OTUs) 水平上对样品的物种多样性进行了评价。The Good's coverage 对观察到的 OTUs 覆盖率为  $(99.97 \pm 0.00)\%$ , 表明群落的采样接近完整。

Alpha 多样性指数可评估肠道菌群的多样性和丰富度, 本研究以 Ace (Abundance-based Coverage Estimator)、Chao1、Shannon、Simpson 指数为标准, 进行差异分析。如表 1 所示, 与 TAC 组相比, TAC + LEV 组 Ace、Chao1、Shannon 指数呈下降趋势, 且两组差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ ), 提示左氧氟沙星对小鼠肠道菌群丰富度和均匀度有显著影响。

同时观测到稀疏曲线显示出清晰的渐近线, 表明测序深度基本覆盖样本中所有物种, 同时显示本研究中各组稀释曲线趋于平缓, 当前测序量可

以满足分析需求 (见图 3A)。在属水平, TAC 组和 TAC + LEV 组存在 52 个共有的 OTUs, 与  $\alpha$  多样性指数变化相同的是, TAC 组中存在 33 个特异的 OTUs, 而 TAC + LEV 组中仅有 2 个特异的 OTUs (见图 3B)。PCoA 分析提示两组间肠道菌群存在明显差异, 左氧氟沙星诱导小鼠肠道菌群的组成发生改变 (见图 3C)。通过 LEfSe 分析 ( $\text{LDA} > 3$ ) 进一步鉴定 TAC 组和 TAC + LEV 组在不同分类学水平上有显著差异的类群。结果所示, *g\_Dubosiella*、*f\_Rikenellaceae*、*p\_Cyanobacteria*、*c\_Vampirivibrionia*、*o\_Gastranaerophilales* 等在 TAC 组显著富集, 而 *g\_Erysipelatoclostridium*、*f\_Erysipelatoclostridiaceae*、*g\_Turicibacter*、*f\_Atopobiaceae*、*g\_Coriobacteriaceae\_UCG-002*、*g\_Enterobacter* 等在 TAC + LEV 组显著富集 (见图 3D)。

在门水平, Bacteroidota、Firmicutes、Actinobacteriota 是总峰度为前 3 的主要优势菌门 (见图 4A)。与 TAC 组相比, TAC + LEV 组的 Cyanobacteria、Desulfobacterota、Patescibacteria、unclassified\_k\_norank\_d\_Bacteria 的相对丰度降低 (见图 4B)。

分析 TAC 组、TAC + LEV 组小鼠粪便样本属水平相对丰度排名前 50 种的菌群, 绘制物种丰度聚类热图, 结果显示两组小鼠的肠道菌群存在差异, 联合给药后会显著影响小鼠的肠道菌群构成 (见图 5A)。在属水平, 与 TAC 组相比, TAC + LEV 组的 *Erysipelatoclostridium*、*Turicibacter*、*Coriobacteriaceae\_UCG-002*、*Eubacterium\_fissicatena\_group*、*norank\_f\_Eubacterium\_coprostanoligenes\_group*、*Enterobacter* 的相对丰度显著增加, 而 *Dubosiella*、*norank\_f\_norank\_o\_Gastranaerophilales*、*Rikenellaceae\_RC9\_gut\_group*、*norank\_f\_norank\_o\_RF39* 的相对丰度显著降低 (见图 5B)。

## 4 讨论

本研究探讨了左氧氟沙星对他克莫司血药浓度以及小鼠肠道菌群的影响。结果表明, 他克莫司与左氧氟沙星联合用药后使他克莫司的血药浓度显著降低, 并显著影响小鼠肠道菌群的多样性。

他克莫司会受到多种药物的影响<sup>[1]</sup>, 在临床上发现他克莫司与喹诺酮类抗菌药物联合使用会对他克莫司血药浓度有影响<sup>[3-4]</sup>, 但尚未有统一结论。Federico 等<sup>[3]</sup>报道了 1 例 43 岁女性使用左氧氟沙星后, 他克莫司谷浓度水平持续升高、曲线下面积 (AUC) 增加 25%, 但其机制尚不明确。然而, Renton 等<sup>[4]</sup>发现他克莫司浓度、AUC 与喹诺酮类药物没有显著相关性。本课题组前期研究发

表 1 组间  $\alpha$  多样性指数比较  
Tab 1  $\alpha$  diversity index between the two groups

| 组别          | Ace 指数      | Chao1 指数   | Shannon 指数 | Simpson 指数 |
|-------------|-------------|------------|------------|------------|
| TAC 组       | 228.20±9.31 | 228.85±9.4 | 3.54±0.15  | 0.06±0.02  |
| TAC + LEV 组 | 89.88±9.55  | 88.16±9.98 | 2.45±0.28  | 0.18±0.06  |
| P           | < 0.001     | < 0.001    | < 0.001    | < 0.01     |

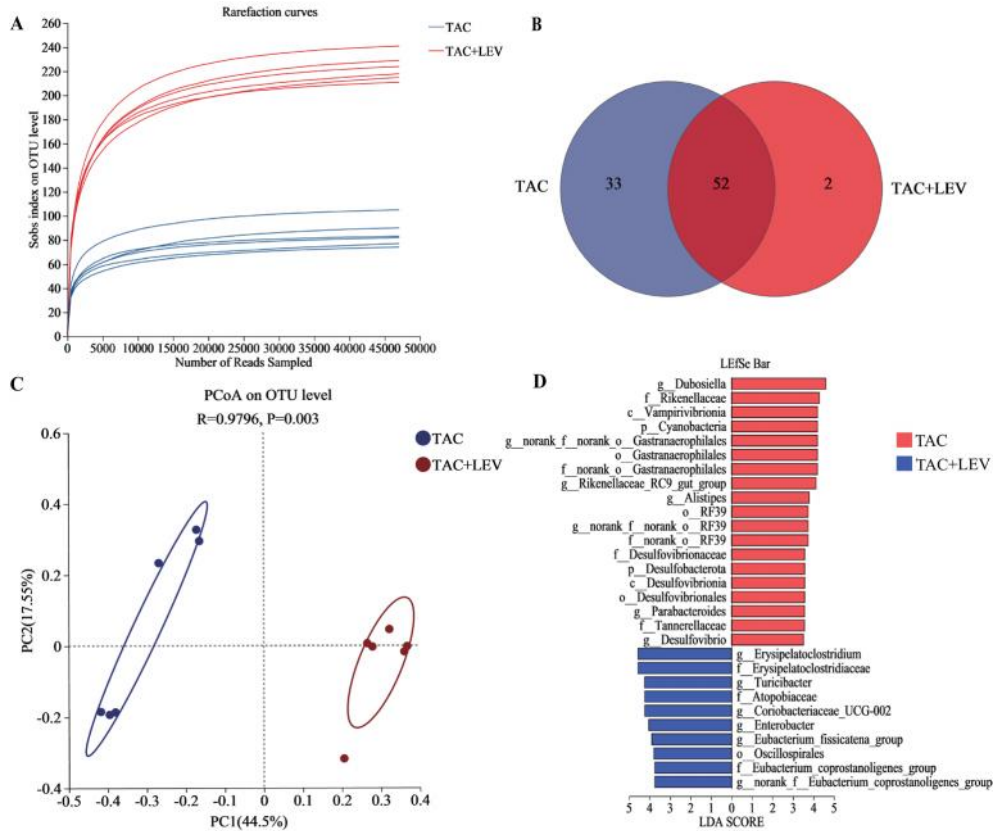


图 3 左氧氟沙星和他克莫司合用对小鼠属水平肠道菌群结构的影响  
Fig 3 Effect of levofloxacin and tacrolimus combined therapy on the gut microbiota composition at the genus level in mice  
A. Sobs 稀疏曲线 (Sobs rarefaction curve) ; B. Venn 图 (Venn diagram) ; C. 基于 OUT 丰度加权的肠道微生物群的 PCoA 分析 (PCoA analysis of gut microbiota based on OUT abundance weighting) ; D. 肠道微生物的 LDA 值分布柱状图 (Bar plot of LDA scores for gut microbiota)

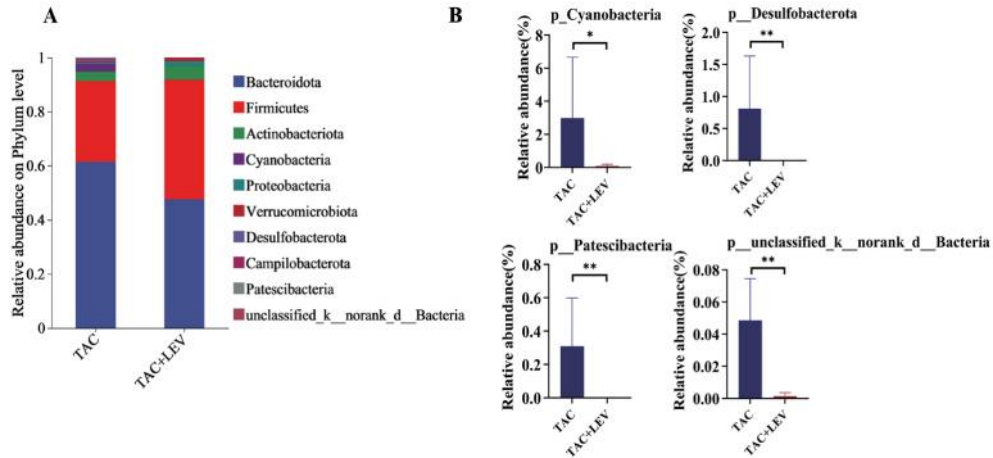


图 4 左氧氟沙星和他克莫司合用对小鼠门水平肠道菌群结构的影响 (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ )  
Fig 4 Effect of levofloxacin and tacrolimus combined therapy on the gut microbiota composition at the phylum level in mice (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ )  
A. 肠道菌群门水平相对丰度 (the relative abundance of gut microbiota at the phylum level) ; B. 肠道菌群的相对丰度在门水平上的差异 (the differences in the relative abundance of gut microbiota at the phylum level)



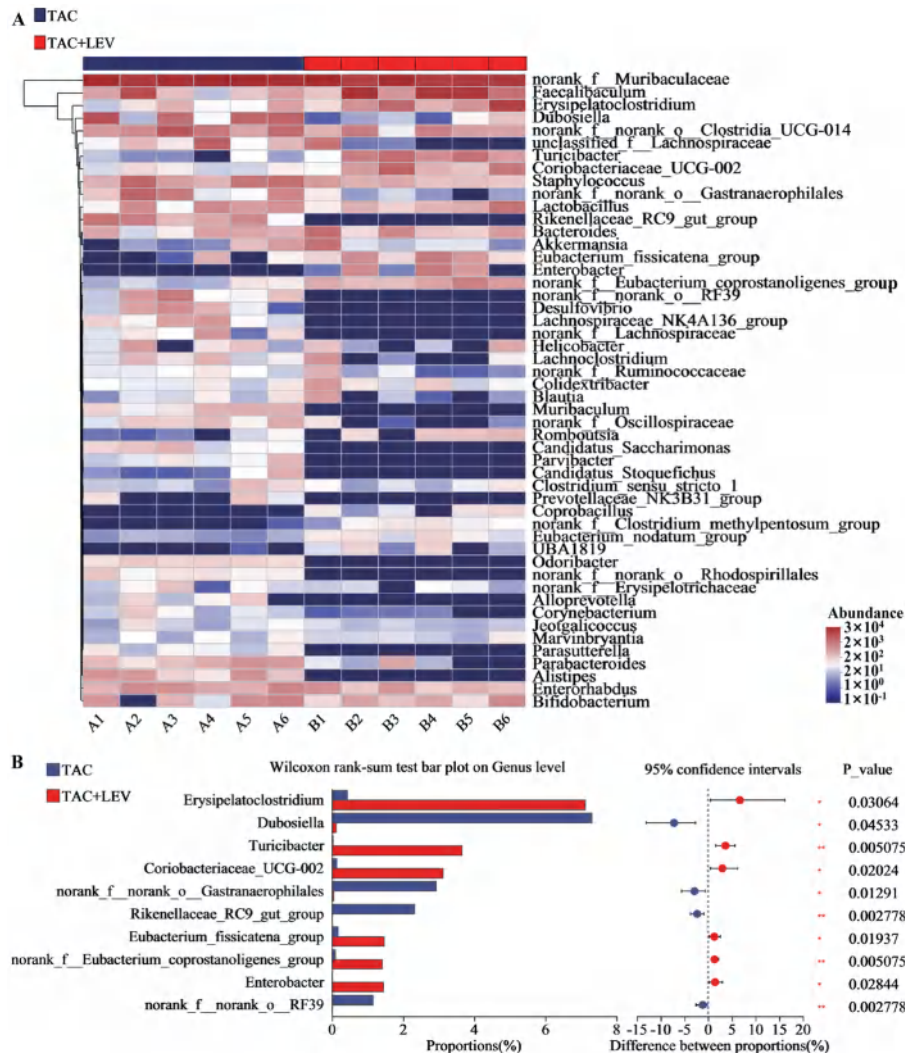


图 5 左氧氟沙星和他克莫司合用对小鼠属水平肠道菌群结构的影响 (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ )

Fig 5 Effect of levofloxacin and tacrolimus combination therapy on the gut microbiota compositions at the genus level in mice (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ )

A. 属水平丰度排名前 50 种菌群物种丰度聚类热图 (cluster heat map of species abundance of the top 50 floras at the genus level); B. 两组小鼠在属水平肠道菌群相对丰度差异性分析 (analysis of the difference in the relative abundance of intestinal flora between the two groups of mice at the genus level)

现在肾移植患者中左氧氟沙星的使用与他克莫司血药浓度、肾移植后糖尿病 (PTDM) 存在一定关系<sup>[8]</sup>, 提示左氧氟沙星可能影响他克莫司的血药浓度, 进而导致 PTDM 的发生。关于喹诺酮类药物与他克莫司相互作用的研究较少, 本研究通过动物实验探究左氧氟沙星联合用药对他克莫司血药浓度和肠道菌群的影响, 结果显示与左氧氟沙星联合用药后, 他克莫司的血药浓度显著降低, 动物实验结果与临床结果不一致, 这种差异可能与研究设计、实验方法以及研究对象的不同有关, 动物与人之间存在种属差异, 以及临床研究中可能存在的混杂因素 (如用药时间、个体差异、肠道菌群变化等) 导致结果的不同。针对这一矛盾, 即抗菌药物、肠道菌群、免疫抑制剂三者之间的相互影响如何, 还需更进一步的研究。

肠道菌群在药物代谢中的作用日益受到关注<sup>[9]</sup>, 尤其是对于口服药物的吸收、转运和代谢具有重要影响, 肠道菌群可能是影响药物浓度变化的一个因素。此外, 使用抗菌药物后有腹泻发生的概率<sup>[10]</sup>, 临床上发现腹泻会改变他克莫司血药浓度<sup>[11-12]</sup>, 而腹泻通常伴随着肠道菌群的改变<sup>[13]</sup>, 提示腹泻及肠道菌群改变是影响他克莫司血药浓度的重要因素。有研究发现肠道菌群对药物代谢的影响被认为是他克莫司药代动力学变异性的因素之一, 也是影响他克莫司血药浓度水平的因素<sup>[14-15]</sup>。关于喹诺酮类药物改变肠道菌群组成及丰度的研究较少。有研究报道了环丙沙星、左氧氟沙星给药后小鼠肠道微生物群和炎症细胞因子会发生改变<sup>[7, 16-17]</sup>。Gu 等<sup>[7]</sup>结果显示左氧氟沙星能够降低小鼠肠道微生物群的多样性及丰度, 改变群落组成, Bacteroidota、

Firmicutes、Actinobacteriota 是主要优势菌门，与本研究结果一致。另外本研究结果显示，门水平上的 Cyanobacteria、Desulfobacterota、Patescibacteria、unclassified\_k\_norank\_d\_Bacteria 等的相对丰度较他克莫司组降低；属水平上的 *Erysipelatoclostridium*、*Turicibacter*、*Coriobacteriaceae\_UCG-002* 等的相对丰度较他克莫司组增加，而 *Dubosiella*、*norank\_f\_norank\_o\_Gastranaerophilales*、*Rikenellaceae\_RC9\_gut\_group* 等的相对丰度较他克莫司组降低。他克莫司与左氧氟沙星合用显著影响小鼠肠道菌群的多样性，左氧氟沙星改变了肠道菌群的组成、相对丰度。这些菌群的变化可能与他克莫司的血药浓度改变有关，具体机制还有待进一步研究。

## 5 结论

综上所述，小鼠实验表明合用左氧氟沙星会影响他克莫司的浓度，可能与其影响肠道菌群改变有关，然而，动物模型与临床实际存在差异。本研究为这一领域提供了初步的观察结果，旨在为临床联合用药提供参考，并为进一步研究抗菌药物与免疫抑制剂相互作用提供理论依据。

## 参考文献

- [1] 唐霄, 张翠欣, 王伟霞. 他克莫司的药代动力学特点及其影响因素新进展 [J]. 天津药学, 2019, 31 (3): 63-68.
- [2] 邢铁清, 杨震华, 王文娟. 盐酸左氧氟沙星氯化钠注射液引起的不良反应分析 [J]. 中国药物与临床, 2017, 17 (6): 916-918.
- [3] Federico S, Carrano R, Capone D, et al. Pharmacokinetic interaction between levofloxacin and ciclosporin or tacrolimus in kidney transplant recipients: ciclosporin, tacrolimus and levofloxacin in renal transplantation [J]. Clin Pharmacokinet, 2006, 45 (2): 169-175.
- [4] Renton KW, Crocker JF, Mclellan H, et al. A comparison of the pharmacokinetics of tacrolimus and microemulsified cyclosporin in paediatric renal transplant recipients [J]. Eur J Clin Pharmacol, 2004, 60 (6): 421-426.
- [5] Salvadori M, Rosso G. Update on the reciprocal interference between immunosuppressive therapy and gut microbiota after kidney transplantation [J]. World J Transplant, 2024, 14 (1): 90194.
- [6] 周锦屏, 张蕊, 刘亚妮, 等. 肠道菌群与免疫抑制剂

- 相互作用研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40 (22): 2377-2381.
- [7] Gu SL, Gong YW, Zhang JY, et al. Effect of the short-term use of fluoroquinolone and  $\beta$ -lactam antibiotics on mouse gut microbiota [J]. Infect Drug Resist, 2020, 13: 4547-4558.
- [8] Jiang ZW, Xu CM, Hou H, et al. Does antibiotic use increase the risk of post-transplantation diabetes mellitus? a retrospective study of renal transplant patients [J]. Ann Transplant, 2024, 29: e943282.
- [9] Erny D, Dokalis N, Mezö C, et al. Microbiota-derived acetate enables the metabolic fitness of the brain innate immune system during health and disease [J]. Cell Metab, 2021, 33 (11): 2260-2276. e7.
- [10] Capurso L, Koch M. Side effects of antibiotic: diarrhea and *Clostridium difficile* infection [J]. Recent Prog Med, 2021, 112 (1): 4-26.
- [11] Nakamura A, Amada N, Haga I, et al. Effects of elevated tacrolimus trough levels in association with infectious enteritis on graft function in renal transplant recipients [J]. Transplant Proc, 2014, 46 (2): 592-594.
- [12] Sato K, Amadan N, Sato T, et al. Severe elevations of FK506 blood concentration due to diarrhea in renal transplant recipients [J]. Clin Transplant, 2004, 18 (5): 585-590.
- [13] Zhu J, Sun Y, Ma LY, et al. Comparative analysis of fecal microbiota between diarrhea and non-diarrhea piglets reveals biomarkers of gut microbiota associated with diarrhea [J]. Anim Nutr, 2024, 19: 401-410.
- [14] Degraeve AL, Haufroid V, Lorient A, et al. Gut microbiome modulates tacrolimus pharmacokinetics through the transcriptional regulation of ABCB1 [J]. Microbiome, 2023, 11 (1): 138.
- [15] Mohamed ME, Saqr A, Staley C, et al. Pharmacomicrobiomics: immunosuppressive drugs and microbiome interactions in transplantation [J]. Transplantation, 2024, 108 (9): 1895-1910.
- [16] Wang CF, Zhao L, Xu J, et al. Trace antibiotic exposure affects murine gut microbiota and metabolism [J]. Sci Total Environ, 2024, 955: 177033.
- [17] Gao W, Liu XY, Zhang SB, et al. Alterations in gut microbiota and inflammatory cytokines after administration of antibiotics in mice [J]. Microbiol Spectr, 2024, 12 (8): e0309523.

(收稿日期: 2025-01-02; 修回日期: 2025-03-05)

# 麻杏石甘汤对脂多糖诱导的Ⅱ型肺泡上皮细胞炎症损伤的影响

陆桥<sup>1</sup>, 陈垣<sup>1</sup>, 黄九林<sup>2</sup>, 杨慧<sup>1</sup>, 唐梓涵<sup>1</sup>, 钱娟<sup>1</sup>, 杨帆<sup>1</sup>, 明瑞<sup>1</sup>, 黄树林<sup>1\*</sup> (1. 安康市中医医院, 陕西 安康 725000; 2. 秦巴中药资源开发与应用陕西高校青年创新团队, 陕西 安康 725000)

**摘要:** **目的** 观察麻杏石甘汤 (MXSG) 含药血清对脂多糖 (LPS) 诱导的Ⅱ型肺泡上皮细胞 (AECⅡ) 炎症损伤的影响, 探究 MXSG 治疗肺炎的机制。 **方法** 用 20 只 SD 大鼠制备含药血清, 体外采用  $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 LPS 诱导 AECⅡ 细胞, 构建 AECⅡ 细胞炎症损伤模型。细胞分为对照组, 模型组, MXSG 低、中、高含药血清组。采用 CCK-8 法检测各组 AECⅡ 细胞活力; 流式细胞术检测各组 AECⅡ 细胞凋亡率; qRT-PCR 法检测各组 AECⅡ 细胞中 *p38 MAPK*、*NF-κB* 和 *NLRP3* mRNA 表达; Western blot 法检测各组 AECⅡ 细胞中 p-p38MAPK、p38 MAPK、p-NF-κB、NF-κB、NLRP3 蛋白表达。 **结果** 与对照组相比, 模型组 AECⅡ 细胞存活率降低、凋亡率增加; 与模型组相比, MXSG 不同剂量的含药血清均能显著增加 AECⅡ 细胞的存活率, 降低凋亡率 ( $P < 0.01$ )。 *p38 MAPK*、*NF-κB* 和 *NLRP3* mRNA 表达水平以及 p-p38MAPK、p-NF-κB 和 NLRP3 蛋白表达明显下调 ( $P < 0.01$ )。 **结论** MXSG 能够通过下调 p38 MAPK/NF-κB/NLRP3 信号通路的表达, 降低炎症损伤 AECⅡ 细胞的凋亡率, 达到有效改善急性肺炎的目的。

**关键词:** 麻杏石甘汤; 含药血清; 急性肺炎; Ⅱ型肺泡上皮细胞; p38 MAPK/NF-κB/NLRP3 通路  
**中图分类号:** R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)08-2238-06  
**doi:**10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.014

## Effect of Mxing Shigan decoction on lipopolysaccharide-induced inflammatory injury of type Ⅱ alveolar epithelial cells

LU Qiao<sup>1</sup>, CHEN Yuan<sup>1</sup>, HUANG Jiu-lin<sup>2</sup>, YANG Hui<sup>1</sup>, TANG Zi-han<sup>1</sup>, QIAN Juan<sup>1</sup>, YANG Fan<sup>1</sup>, MING Rui<sup>1</sup>, HUANG Shu-lin<sup>1\*</sup> (1. *Ankang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Ankang Shaanxi 725000*; 2. *The Youth Innovation Team of Shaanxi Universities of Development and Utilization of Qinba Chinese Medicine Resources, Ankang Shaanxi 725000*)

**Abstract: Objective** To determine the effect of Mxing Shigan decoction (MXSG) in the serum on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory injury in type Ⅱ alveolar epithelial cells (AECⅡ) and explore the mechanism of MXSG in treating pneumonia. **Methods** Twenty SD rats were used to prepare drug-containing serum. In vitro, LPS ( $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) was used to induce AEC cells to establish the inflammation injury model. The cells were divided into a control group, a model group, MXSG drug-containing serum low-dose group, medium-dose group, and high-dose group. Cell viability was assessed with the CCK-8 assay in all groups. The apoptosis rates of AECⅡ were determined by flow cytometry; qRT-PCR was used to measure the mRNA expression of *p38 MAPK*, *NF-κB*, and *NLRP3* in the AECⅡ; Western blot was conducted to detect the protein expression of phosphorylated p38 MAPK (p-p38 MAPK), p38 MAPK, phosphorylated NF-κB (p-NF-κB), NF-κB, and NLRP3 in the AECⅡ cells. **Results** Compared with the control group, the model group exhibited decreased AECⅡ viability and increased apoptosis rates. Compared with the model group, various concentrations of MXSG drug-containing serum significantly increased the survival rate of

**基金项目:** 陕西省中医药管理局项目 (No.ZYJXG-L23014)。

**作者简介:** 陆桥, 男, 主要从事儿童肺系疾病及感染性疾病方面的研究, email: 278177939@qq.com \* **通信作者:** 黄树林, 男, 主要从事儿童肺系疾病及感染性疾病方面的研究, email: 1185637207@qq.com



AEC II and reduced their apoptosis rates ( $P < 0.01$ ). The mRNA expression levels of *p38 MAPK*, *NF- $\kappa$ B*, and *NLRP3*, as well as the protein expressions of p-p38 MAPK, p-NF- $\kappa$ B, and NLRP3, were markedly down regulated ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** MXSG can effectively reduce the apoptosis rate of injury AEC II by downregulating the expression of p38 MAPK/NF- $\kappa$ B/NLRP3 signaling pathway to improve acute pneumonia.

**Key words:** Maxing Shigan decoction; drug-containing serum; acute pneumonia; AEC II; p38 MAPK/NF- $\kappa$ B/NLRP3 pathway

急性肺炎 (acute pneumonia, AP) 是一种多发的呼吸道疾病, 患者以 0 ~ 5 岁的婴幼儿为主, 主要表现为发病迅速, 症状重, 并发症多, 容易造成呼吸系统和循环系统衰竭, 一旦发展为重症肺炎, 会严重危害患儿的生命, 甚至造成死亡<sup>[1]</sup>。临床上认为该疾病主要由细菌、病毒微生物等导致的感染引起, 也认为有一部分患者是因为理化性、免疫性或变态反应性因素而导致发病<sup>[2]</sup>。麻杏石甘汤 (MXSG) 首载于张仲景的《伤寒论》, 是由麻黄、苦杏仁、甘草和石膏四味中药组成的经典方剂, 具有辛凉宣泄、清肺平喘的功效, 主要用于治疗外感风邪、邪热壅肺证。在临床上 MXSG 现常用于治疗呼吸道相关疾病, 包括上呼吸道感染、急性支气管炎、肺炎、慢性阻塞性肺疾病和支气管哮喘等疾病<sup>[3-5]</sup>, 疗效显著<sup>[6-8]</sup>。MXSG 对于肺炎的治疗效果确切, 但其具体的作用机制有待进一步研究。

p38 MAPK 作为 MAPK 信号家族中调控炎症反应的最主要成员, 在 AP 的发病进程中能够促进炎症反应的发展。研究表明, 在 AP 过程中, p38 MAPK 磷酸化能够调控下游转录因子, 促进白细胞介素 (IL) -6、IL-1 $\beta$  和肿瘤坏死因子 (TNF) - $\alpha$  等炎症因子的分泌, 进一步诱导炎症反应<sup>[9-10]</sup>。同时, 核因子 (NF) - $\kappa$ B 作为炎症相关的核内的转录因子, 在 AP 发病过程中也能够引起大量炎症因子的释放<sup>[11]</sup>, 随着炎症因子分泌增多, 激活 NLRP3 炎症小体, 使 Caspase-1 活化, 从而切割 pro-IL-1 $\beta$  和 pro-IL-18 产生有活性的 IL-1 $\beta$  和 IL-18, 进一步放大炎症反应。NLRP3 炎症小体激活后释放的细胞因子反过来又能激活 NF- $\kappa$ B 和 p38 MAPK, 形成正反馈, 使炎症持续增强和扩大<sup>[12]</sup>。因此, 本研究拟通过脂多糖 (LPS) 诱导 II 型肺泡上皮细胞 (AEC II) 炎症模型, 探究 MXSG 含药血清对 LPS 诱导的 AEC II 细胞炎症损伤的分子机制, 为 MXSG 的开发提供研究基础, 为治疗 AP 提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 细胞株

AEC II 细胞 (武汉普诺赛生命科技有限公司, 货号: CP-R003)。

### 1.2 动物

SPF 级 SD 大鼠 20 只, 雄性, 6 ~ 8 周, 体重 (200 $\pm$ 2) g [辽宁长生生物技术股份有限公司, 动物许可证号: No.SCXK (辽) 2023-0001]。大鼠饲养环境, 温度 25 $^{\circ}$ C, 湿度 50%, 12 h 昼夜节律, 饲料和饮水充足。本研究通过陕西中医药大学动物伦理委员会批准 (伦理审查号: SYXY-2023051001)。

### 1.3 试剂

麻黄 (批号: 202309171)、苦杏仁 (批号: 20238152)、甘草 (批号: 20240167)、石膏均购买于陕西兴盛德药物有限公司, 上述药材均由安康学院黄九林教授鉴定。LPS (批号: 297-473-0, Sigma 公司), CCK-8 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒 (上海惠凌生物技术有限公司), 胎牛血清 (批号: A5669801, 浙江天杭生物科技股份有限公司), BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (赛默飞世尔科技公司), 磷酸酶抑制剂 (批号: MB12707-1)、RIPA 裂解液 (批号: MA0151) (大连美仑生物技术有限公司), p38 MAPK、p-p38 MAPK、p-NF- $\kappa$ B p65、NF- $\kappa$ B p65 抗体、NLRP3、 $\beta$ -actin (武汉博士德生物工程有限公司), ABScript III RT Master Mix for qPCR (with gDNA Removal) 试剂盒、2 $\times$ Universal SYBR Green Fast qPCR Mix 试剂盒 (武汉爱博泰克)。

### 1.4 仪器

凝胶成像分析系统 (美国 Azure Biosystems 公司), 超声清洗仪 (昆山市超声仪器有限公司), 恒温金属混匀仪 (杭州米欧仪器有限公司), 智能数显磁力加热搅拌器、水平摇床 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司), Real-Time PCR 系统 (杭州晶格科学仪器有限公司), 微量移液器 (赛多利斯科学仪器北京有限公司), 倒置显微镜 (麦克奥迪实业集团有限公司), 酶标仪 (杭州奥盛仪器有

限公司), 旋转蒸发仪 (东京理化), 低速离心机 (大龙兴创实验仪器北京股份有限公司)。

2 方法与结果

2.1 MXSG 的制备

按比例称取麻黄、苦杏仁、甘草、石膏共 300 g, 加入 8 倍量的蒸馏水, 浸泡 0.5 h 后加热回流提取两次, 每次 1.5 h, 合并两次滤液, 浓缩至质量浓度为  $1\text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 保存至  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。

2.2 MXSG 含药血清制备

将 20 只 SPF 级雄性 SD 大鼠适应性喂养 7 d 后, 随机分为 4 组: 空白组、MXSG 低剂量组、MXSG 中剂量组、MXSG 高剂量组, 每组 5 只, 其中空白组灌胃给予 0.9% 氯化钠溶液, MXSG 低、中、高剂量分别以  $2$ 、 $4$ 、 $6\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  (临床给药量的 1、2、3 倍量) 灌胃给药。共给药 7 d, 每日灌胃 2 次。在末次给药 2 h 后腹主动脉取血, 离心收集大鼠血清, 置于  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴 30 min 灭活, 保存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用。

2.3 细胞分组及药物干预

AEC II 细胞复苏状态良好后, 将 AEC II 细胞

分为 5 组, 对照组、模型组、MXSG 低剂量含药血清组、MXSG 中剂量含药血清组、MXSG 高剂量含药血清组。其中除对照组外, 其余各组分别给予  $1\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 LPS 刺激 4 h, 建立体外 AP 模型<sup>[13]</sup>。对照组和模型组用含对照组大鼠血清的培养基培养细胞, MXSG 低、中、高剂量组分别加入对应的含药血清培养 (含药血清量为总培养体系的 10%), 处理 24 h 后, 收集各组细胞进行后续实验。

2.4 CCK-8 实验检测含药血清对 AEC II 细胞增殖率的影响

按“2.3”项下方法分组细胞后, 于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  条件下培养 24 h; 待细胞完全贴壁后进行给药处理, 继续培养 24 h 后, 每孔加入  $10\text{ }\mu\text{L}$  CCK-8 试剂, 培养 2 h 后, 使用酶标仪在  $450\text{ nm}$  处检测每孔的吸光度值。结果表明, 与对照组相比, 模型组 AEC II 细胞存活率显著降低 ( $P < 0.001$ ), 细胞数量显著减少。与模型组相比, MXSG 含药血清各组均能提高 AEC II 细胞存活率 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ), 细胞数量显著增加, 在给药组中, MXSG 高剂量含药血清组治疗效果最好 (见图 1 及表 1)。

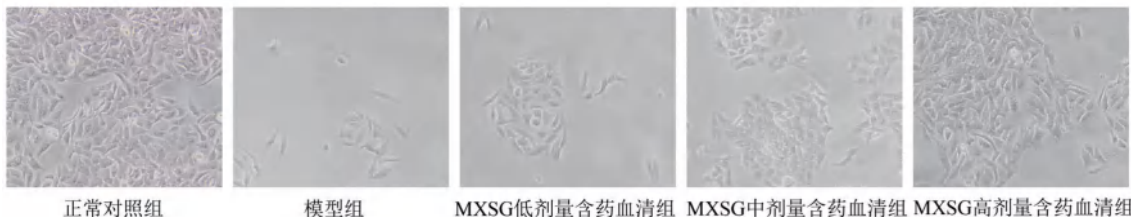


图 1 MXSG 含药血清对 LPS 损伤 AEC II 细胞数量的影响 ( $\times 10$ )

Fig 1 Effect of MXSG drug-containing serum on the number of LPS-damaged AEC II cells ( $\times 10$ )

表 1 MXSG 含药血清对 LPS 刺激下 AEC II 细胞存活率的影响  
( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )  
Tab 1 Effect of MXSG drug-containing serum on the survival rate of AEC II cells stimulated by LPS ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

| 组别            | AEC II 细胞存活率/%         |
|---------------|------------------------|
| 对照组           | $100.00 \pm 0.00$      |
| 模型组           | $70.01 \pm 0.35^{###}$ |
| MXSG 低剂量含药血清组 | $73.82 \pm 1.12^{**}$  |
| MXSG 中剂量含药血清组 | $80.22 \pm 0.87^{***}$ |
| MXSG 高剂量含药血清组 | $89.56 \pm 0.77^{***}$ |

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,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ .

2.5 流式细胞术检测 AEC II 细胞凋亡率

按“2.3”项下方法分组细胞后, 按凋亡试剂盒说明书操作后收集各组 AEC II 细胞, 于流式细胞仪检测各组 AEC II 细胞的凋亡率。结果表明,

与对照组相比, 模型组 AEC II 细胞的凋亡率显著增加 ( $P < 0.001$ ), 与模型组相比, MXSG 含药血清各组均能降低 AEC II 细胞凋亡率 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ), MXSG 高剂量含药血清组效果最好 (见图 2 及表 2)。

2.6 qRT-PCR 检测 AEC II 细胞中  $p38\text{ MAPK}$ 、 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 、 $\text{NLRP3}$  mRNA 的表达水平

实验分组和细胞铺板、培养同“2.3”项下方法, 收集细胞并加入 TRIzol 试剂将细胞完全裂解, 室温静置 5 min, 加入氯仿  $200\text{ }\mu\text{L}$ , 涡旋 20 s 后再于室温静置 5 min,  $12\text{ }000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min, 将上清液转移至 EP 管中并加入异丙醇  $0.5\text{ mL}$ , 混匀, 室温静置 10 min, 使用 Prime Script RT reagent Kit 反转录试剂盒将总 RNA 进行反转录, 引物序列 (见表 3)。PCR 反应条件:  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 60 s,  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性 15 s,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  15 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 循环 42 次, 并于

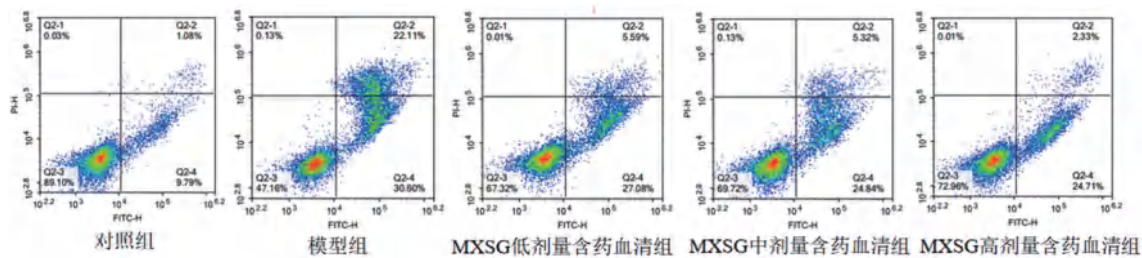


图2 MXSG 含药血清对 LPS 损伤 AEC II 细胞凋亡的影响  
Fig 2 Effect of MXSG drug-containing serum on the apoptosis of AEC II stimulated by LPS

表 2 MXSG 含药血清对 LPS 刺激下 AEC II 细胞凋亡的影响  
( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )  
Tab 2 Effect of MXSG drug-containing serum on the apoptosis of AEC II cells stimulated by LPS ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

| 组别            | AEC II 细胞凋亡率 / %            |
|---------------|-----------------------------|
| 对照组           | 9.13 ± 0.8                  |
| 模型组           | 53.99 ± 0.35 <sup>###</sup> |
| MXSG 低剂量含药血清组 | 33.18 ± 1.12 <sup>**</sup>  |
| MXSG 中剂量含药血清组 | 30.78 ± 0.87 <sup>***</sup> |
| MXSG 高剂量含药血清组 | 27.44 ± 0.77 <sup>***</sup> |

注：与对照组比较，<sup>###</sup> $P < 0.001$ ；与模型组比较，<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ，<sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ 。

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

72℃条件下延伸 10 min。最后均采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  计算 AEC II 细胞中 *p38 MAPK*、*NF-κB*、*NLRP3* mRNA 的相对表达量。结果表明，与对照组相比，模型

组 *p38 MAPK*、*NF-κB* 和 *NLRP3* mRNA 的表达显著增加 ( $P < 0.001$ )。与模型组相比，MXSG 含药血清各组均能降低 AEC II 细胞组 *p38 MAPK*、*NF-κB* 和 *NLRP3* mRNA 的表达 ( $P < 0.05$ )。在给药组中，MXSG 含药血清高剂量组治疗效果最好 (见图 3)。

| 表 3 各基因所用的引物列表<br>Tab 3 Primer sequence of genes |                                                                               |
|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| 基因                                               | 引物序列                                                                          |
| <i>p38 MAPK</i>                                  | Forward: 5'-ACACGGACAGGATTGACAGA-3'<br>Reverse: 5'-GGACATCTAAGGGCATCACA-3'    |
| <i>NF-κB</i>                                     | Forward: 5'-CAATGACATTTACACACGCAG-3'<br>Reverse: 5'-AGATGGAGGAGGTCTCGCAG-3'   |
| <i>NLRP3</i>                                     | Forward: 5'-TGGCAGTGTCTTAGCTGGTTG-3'<br>Reverse: 5'-GCGAGCACAGAATTAATACGAC-3' |
| <i>β-actin</i>                                   | Forward: 5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3'<br>Reverse: 5'-TCTCAGCTGTGGTGGTGAAG-3'    |

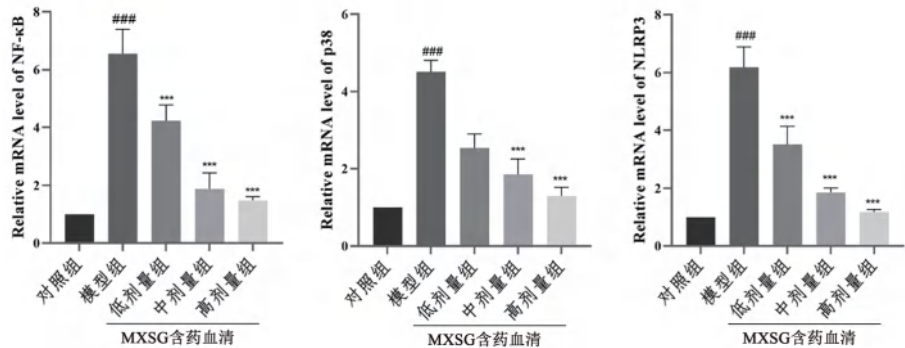


图3 MXSG 含药血清对 LPS 刺激下 AEC II 细胞 *p38 MAPK*、*NF-κB*、*NLRP3* mRNA 表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )  
Fig 3 Effect of *p38 MAPK*, *NF-κB* and *NLRP3* mRNA expression in AEC II cells stimulated by LPS in MXSG drug-containing serum ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

注：与对照组比较，<sup>###</sup> $P < 0.001$ ；与模型组比较，<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ，<sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ 。  
Note: Compared with the control group, <sup>###</sup> $P < 0.001$ ; compared with the model group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ .

### 2.7 Western blot 检测 AEC II 细胞 p-p38MAPK、p38MAPK、p-NF-κB、NF-κB、NLRP3 蛋白的表达水平

实验分组和细胞铺板、培养同“2.3”项下方法。弃掉培养皿中培养基，加入细胞裂解液，于冰上裂解 30 min，在  $12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min，取上清液，BCA 测定蛋白浓度。蛋白变性、制胶、上样、电泳、转膜，脱脂牛奶封闭 1 h，一抗孵育，抗

体浓度分别为 p-p38 MAPK (1 : 300)、p38 MAPK (1 : 300)、p-NF-κB p65 (1 : 500)、NF-κB p65 (1 : 500)、NLRP3 (1 : 1000)、GAPDH (1 : 1000)，4℃过夜，洗膜 5 次，随后加入二抗室温孵育 2 h (1 : 2000)，洗膜 5 次，加 ECL 曝光液曝光拍照。用 Image J 软件分析各个蛋白的条带灰度值。与对照组相比，模型组 p-p38MAPK/p38 MAPK、p-NF-κB/NF-κB、NLRP3 的表达显著增加 ( $P < 0.05$ )。



与模型组相比, MXSG 含药血清各组均能降低 AEC II 细胞组 p-p38MAPK/p38 MAPK、p-NF- $\kappa$ B/

NF- $\kappa$ B、NLRP3 的表达 ( $P < 0.05$ ), 且 MXSG 高剂量含药血清组效果最好 (见图 4)。

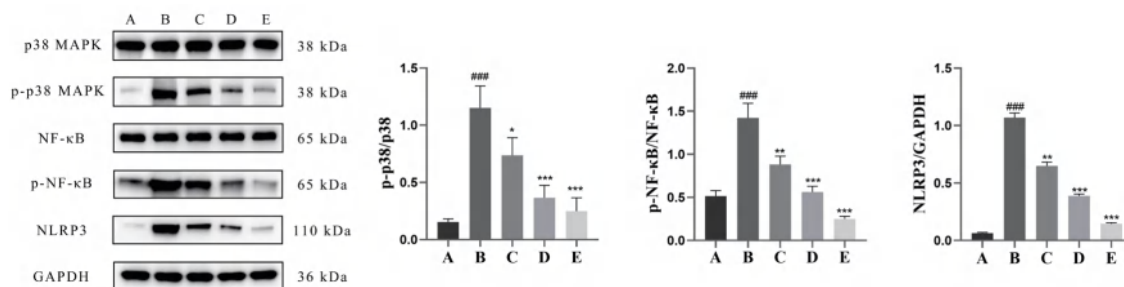


图 4 MXSG 含药血清对 AEC II 细胞 p38 MAPK、p-p38 MAPK、NF- $\kappa$ B、p-NF- $\kappa$ B、NLRP3 蛋白表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig 4 Effect of MXSG drug-containing serum on protein expression levels of p38 MAPK, p-p38 MAPK, NF- $\kappa$ B, p-NF- $\kappa$ B and NLRP3 in AEC II cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

A. 对照组 (normal control group); B. 模型组 (model group); C. MXSG 低剂量含药血清组 (MXSG low-dose drug-containing serum group); D. MXSG 中剂量含药血清组 (MXSG medium-dose drug-containing serum group); E. MXSG 高剂量含药血清组 (MXSG high-dose drug-containing serum group)

注: 与正常对照组比较, <sup>###</sup> $P < 0.001$ ; 与模型组比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ 。

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

### 3 讨论

AP 作为一种呼吸道疾病, 临床多表现为发热、咳嗽、咳痰、喘息等, 不仅造成小儿身体的伤害, 严重时还可造成死亡<sup>[14]</sup>。目前多项研究表明, 多种病原体感染会导致患儿肺泡出现炎症改变或炎症细胞浸润, 进而引起肺组织的损伤<sup>[15-16]</sup>。而 AP 常与微生物 (如内毒素) 的炎症刺激有关, LPS 作为内毒素的主要成分, 在体内外可引起炎症因子高表达, 且常用于制备小动物感染性损伤模型, 如肺炎模型被用来研究药物抗炎作用<sup>[17]</sup>。

中医理论认为, MXSG 方中以麻黄为君药, 其性温, 擅长发汗散寒、宣肺平喘; 石膏辛甘大寒, 主要用于清泄肺热、生津止渴。两药相伍使用, 一主宣肺, 一主清肺, 既清肺中风热, 又清肺中郁热。苦杏仁降气止咳平喘, 与麻黄配伍则宣降相因, 与石膏配伍则肃清协同; 甘草补益脾气, 调和诸药, 以防石膏寒凉伤中<sup>[18]</sup>。近年来, 临床诸多医师在理论上, 辨证施治, 在呼吸系统疾病治疗中广泛应用 MXSG。现代药理学研究表明, MXSG 中单味中药如麻黄、石膏、杏仁等中包含麻黄碱、伪麻黄碱、硫酸钙以及苦杏仁苷等多种成分, 具有持久有效缓解支气管痉挛、抑制支气管神经、镇静支气管平滑肌、祛痰镇咳等不同作用, 可抗过敏、抗炎、降低支气管通透性等作用, 对 AP、上呼吸道感染等呼吸系统疾病具有良好效果<sup>[19]</sup>。同时, 本文研究中发现 MXSG 能够提高 LPS 损伤的 AEC II 细胞存活率, 降低其凋亡率。

p38 MAPK 作为 MAPK 家族重要成员, 其信号通路在氧化应激和炎症调控中居于核心地位。研究表明, 该通路通过促进 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等炎症因子生成, 并与 NF- $\kappa$ B 形成级联调控网络——p38 MAPK 不仅作为 NF- $\kappa$ B 的上游激活剂促进其核转位, 还能通过增强 NF- $\kappa$ B 转录活性加剧炎症反应。这一病理机制与急性肺损伤 (ALI) 的发生发展密切相关。ALI 的典型病理特征包括肺泡上皮细胞损伤、中性粒细胞浸润及促炎因子风暴, 而持续活化的 p38 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路正是驱动肺部过度炎症反应的关键分子事件。在正常情况下, NF- $\kappa$ B 以非活性状态与 I $\kappa$ B 结合存在于细胞质中, 给予 LPS 刺激能够增加 p38 MAPK 的磷酸化, 导致 NF- $\kappa$ B 活化并以 p65 活性形式易位到细胞核中, 增加促炎细胞因子的过度表达和炎症反应的发生<sup>[20]</sup>。而抑制 p38 MAPK 能够缓解肺缺血再灌注损伤, 可能是治疗 ALI 的有效方法<sup>[21]</sup>, 并且使用 NF- $\kappa$ B 抑制剂改善炎症, 进而预防 LPS 诱导的 ALI<sup>[22]</sup>。抑制 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路可以减少肺部炎症和血管重塑, 减轻 LPS 诱导的 ALI<sup>[23]</sup>。本研究结果表明, LPS 诱导 AEC II 细胞后, p38 MAPK 和 NF- $\kappa$ B mRNA 表达水平升高, 并且 p-p38 MAPK 和 p-NF- $\kappa$ B 蛋白表达显著升高, 表明 LPS 刺激能够从基因水平激活 p38 MAPK 和 NF- $\kappa$ B 的转录, 进而引起 p38 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路蛋白变化。给予 MXSG 含药血清干预后 p38 MAPK 和 NF- $\kappa$ B 磷酸化均显著减少, 说明 MXSG 能够通过抑制 p38 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路改善 ALI。

综上所述, MXSG 可能是通过提高 AEC II

细胞的存活率,降低 AEC II 细胞的凋亡率,下调 p38 MAPK、NF- $\kappa$ B、NLRP3 mRNA 及蛋白的表达水平,进而改善 AP,这为 MXSG 治疗肺炎的入血成分研究提供了基础。

## 参考文献

- [1] 张峰. 小儿肺炎并发症的诊治 [J]. 中国社区医师, 2018, 34 (21): 61, 63.
- [2] 赵淑萍. 中药麻杏石甘汤在急性肺炎治疗中的应用效果研究 [J]. 北方药学, 2019, 16 (4): 27-28.
- [3] 郝欧美, 李莹, 杨钦惠, 等. 麻杏石甘汤对流感病毒肺炎小鼠肺组织 NLRP3、IFITM3 的影响 [J]. 时珍国医国药, 2024, 35 (14): 3113-3119.
- [4] 左华, 钱卫东. 麻杏石甘汤对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺组织 STAT4、STAT6 蛋白表达的影响 [J]. 海南医学院学报, 2019, 25 (12): 892-895, 900.
- [5] 姜山, 时爽, 单万亭, 等. 基于网络药理学和分子对接法探索麻杏石甘汤治疗新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 活性化合物的研究 [J]. 中国药理学通报, 2020, 36 (9): 1309-1316.
- [6] Wang C, Cao B, Liu QQ, et al. Oseltamivir compared with the Chinese traditional therapy Maxingshigan-Yinqiaosan in the treatment of H1N1 influenza: a randomized trial [J]. *Ann Intern Med*, 2011, 155 (4): 217-225.
- [7] 韩晶岩. 麻杏石甘汤改善肺间质水肿、注射用益气复脉 (冻干) 改善休克脱证的作用机理 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2020, 22 (2): 248-256.
- [8] 杨栋强, 康谊, 丁岗强, 等. 麻杏石甘汤在急性病毒性上呼吸道感染中的应用效果 [J]. 光明中医, 2021, 36 (3): 379-381.
- [9] Zhou X, Zhang YC, Lu KQ, et al. The role of p38 mitogen-activated protein kinase-mediated f-actin in the acupuncture-induced mitigation of inflammatory pain in arthritic rats [J]. *Brain Sci*, 2024, 14 (4): 380.
- [10] 杨亚丽, 田荣, 袁茵, 等. FoxO1/p38 MAPK 信号通路在 LPS 致急性肺损伤中的作用研究 [J]. 中国药理学通报, 2023, 39 (1): 36-42.
- [11] 刘丹丹, 曹纲, 张琦, 等. 三叶青黄酮经 p38MAPK 和 NF- $\kappa$ B 途径抑制老年小鼠急性肺损伤 [J]. 中国药理学通报, 2015, 31 (12): 1725-1730.
- [12] Shin JN, Rao L, Sha Y, et al. p38 MAPK activity is required to prevent hyperactivation of NLRP3 inflammasome [J]. *J Immunol*, 2021, 207 (2): 661-670.
- [13] 贾亚杰, 齐馨馨, 魏玉, 等. 槐定碱对脂多糖诱导的肺泡上皮细胞损伤的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40 (12): 1739-1743.
- [14] Goodman D, Crocker ME, Pervaiz F, et al. Challenges in the diagnosis of paediatric pneumonia in intervention field trials: recommendations from a pneumonia field trial working group [J]. *Lancet Respir Med*, 2019, 7 (12): 1068-1083.
- [15] Moynihan K M, Mcgarvey T, Barlow A, et al. Testing for common respiratory viruses in children admitted to pediatric intensive care: epidemiology and outcomes [J]. *Pediatr Crit Care Med*, 2020, 21 (6): E333-E341.
- [16] Shan MR, Zhou SN, Fu CN, et al. Vitamin B<sub>6</sub> inhibits macrophage activation to prevent lipopolysaccharide-induced acute pneumonia in mice [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24 (5): 3139-3148.
- [17] Liu J, Chang GJ, Huang J, et al. Sodium butyrate inhibits the inflammation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by regulating the toll-like receptor 4/nuclear factor  $\kappa$ B signaling pathway [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67 (6): 1674-1682.
- [18] 王丽军, 郝哲, 段立鸣, 等. 麻杏石甘汤临床应用近况 [J]. 河南中医, 2024, 44 (7): 1000-1005.
- [19] 马艳丽. 137 例小儿肺炎临床特点与中医病机因素相关性分析与研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2014.
- [20] Fang CH, He ML, Li D, et al. YTHDF2 mediates LPS-induced osteoclastogenesis and inflammatory response via the NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways [J]. *Cell Signal*, 2021, 85 (9): 110060.
- [21] Wang TT, Liu CX, Pan LH, et al. Inhibition of p38 MAPK mitigates lung ischemia reperfusion injury by reducing blood-air barrier hyperpermeability [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11 (11): 569251.
- [22] Yu YY, Li XQ, Hu WP, et al. Self-developed NF- $\kappa$ B inhibitor 270 protects against LPS-induced acute kidney injury and lung injury through improving inflammation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 147: 112615.
- [23] Hong HW, Lou SY, Zheng FL, et al. Hydnocarpin D attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via MAPK/NF- $\kappa$ B and Keap1/Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Phyto-medicine*, 2022, 101: 154143.

(收稿日期: 2024-11-05; 修回日期: 2024-12-20)

## 基于 HPLC-FT-ICR-MS 的荷丹片化学成分研究

金凤<sup>1</sup>, 靳彤<sup>2</sup>, 刘烁<sup>2</sup>, 张雨萌<sup>2</sup>, 王娜<sup>1</sup>, 赵春杰<sup>2\*</sup> (1. 秦皇岛市第一医院药学部, 河北 秦皇岛 066000; 2. 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

**摘要:** **目的** 基于 HPLC-FT-ICR-MS 技术对荷丹片的化学成分进行分析与鉴定。**方法** HPLC-FT-ICR-MS 分析采用 Universil XB C<sub>18</sub> 色谱柱 (150 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水 (A) - 乙腈 (B), 进行梯度洗脱; 应用电喷雾离子 (ESI) 源, 以全扫描方式分别在正离子和负离子模式下采集数据; 根据质谱信息并结合对照品、相关文献及内部数据库, 分析并鉴定荷丹片中醇溶性化学成分。**结果** 从荷丹片中共鉴定出 125 种醇溶性成分包括 48 种黄酮类、22 种有机酸类、19 种醌类、14 种生物碱类、7 种三萜类、6 种香豆素类及 9 种其他类化学成分。**结论** 建立了荷丹片 HPLC-FT-ICR-MS 的分离鉴定方法, 为该药的质量控制和药效物质基础研究提供科学依据。

**关键词:** 荷丹片; HPLC-FT-ICR-MS; 化学成分; 成分鉴定; 质量控制

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)08-2244-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.015

## Chemical compositions of Hedan tablets based on HPLC-FT-ICR-MS

JIN Feng<sup>1</sup>, JIN Tong<sup>2</sup>, LIU Shuo<sup>2</sup>, ZHANG Yu-meng<sup>2</sup>, WANG Na<sup>1</sup>, ZHAO Chun-jie<sup>2\*</sup> (1. Department of Pharmacy, First Hospital of Qinhuangdao, Qinhuangdao Hebei 066000; 2. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016)

**Abstract: Objective** To identify the chemical compositions of Hedan tablets by HPLC-FT-ICR-MS. **Methods** HPLC-FT-ICR-MS was performed on a Universil XB C<sub>18</sub> chromatographic column (150 mm×2.1 mm, 1.8 μm). The mobile phase was 0.1% formic acid solution (A) -acetonitrile (B) solution with gradient elution. The fragment information for the full scan was collected in both positive and negative ionization modes with the electrospray ionization (ESI) source. We identified the alcohol soluble chemical compositions in Hedan tablets with the mass spectrometry information, reference to standards, relevant literatures and internal databases. **Results** Totally 125 alcohol-soluble components were identified from Hedan tablets, including 48 flavoids, 22 organic acids, 19 quinones, 14 alkaloids, 7 triterpenoids, 6 coumarins and 9 other types of chemical compositions. **Conclusion** The separation and identification of Hedan tablets by HPLC-FT-ICR-MS provide a reference for their quality control and pharmacodynamic basis.

**Key words:** Hedan tablet; HPLC-FT-ICR-MS; chemical composition; ingredient identification; quality control

荷丹片是名医杨济生的著名方剂, 具有化痰降浊、活血化瘀、减肥清脂、清热解毒之功效, 临床中常被用于治疗血脂异常等疾病<sup>[1]</sup>。荷丹片疗效确切, 价廉易得, 有很广阔的应用前景。荷丹片是由荷叶、丹参、山楂、番泻叶、补骨脂 (盐炒) 等五味中药组成的中药复方制剂, 收载

于 2020 版《中国药典》, 内科泻下剂中的通腑降浊药中, 用于高脂血症属痰浊挟瘀证候者。目前, 关于荷丹片的研究多集中在临床疗效方面, 对其有效成分分析的文章较少。有研究表明, 荷丹片联合苯扎贝特、辛伐他汀等西药治疗高脂血症相较于单独使用西药治疗, 疗效更好, 且不良反应

**基金项目:** 秦皇岛市科学技术研究与发展计划项目 (No.201902A103)。

**作者简介:** 金凤, 女, 主管药师, 主要从事药物分析及治疗药物监测研究, email: 1261691606@qq.com \*通信作者: 赵春杰, 男, 博士研究生导师, 主要从事体内药物分析及中西新药开发研究, email: zcjiljj@sina.com



更少,大大提升了用药有效性和安全性<sup>[2-3]</sup>。本文通过高效液相色谱-傅里叶变换离子回旋共振质谱(HPLC-FT-ICR-MS)方法,精确分析荷丹片中的有效成分。希望通过分析、鉴定以及参考相关文献,获得荷丹片的有效成分,为临床应用提供更多的证据支持。

荷叶分离出的主要成分包括黄酮类、生物碱类、多糖类及挥发性物质,其中黄酮类物质较多,具有抗氧化作用并对肠道菌群调节有利。生物碱类物质具有一定的血管松弛作用;多糖等物质表现出抗氧化等生物活性<sup>[4]</sup>。丹参含有多种活性成分,包括二萜类、丹酚酸类、挥发油类、多糖类、含氮类、黄酮类、甾体类、菲醌类等<sup>[5]</sup>;番泻叶的主要成分包括二蒽醌、蒽醌及其衍生物,黄酮及其苷类,糖类,挥发油,单萜、倍半萜及苯丙素类等,具有泻热通便的功效<sup>[6]</sup>。而荷丹片中的成分可能只是多种成分的总和,也可能是各成分之间相互作用,形成新的有效成分,因此对荷丹片的成分进行综合性分析尤为重要,能够帮助获得更精准的数据。

吴佳妮等<sup>[7]</sup>采用UHPLC法测定荷丹片中莲碱的含量;赵莉等<sup>[8]</sup>采用HPLC法同时测定荷丹片中8种指标成分的含量;陈昊等<sup>[9]</sup>采用HPLC-TOF-MS法鉴定了荷丹片中的33种化学成分。但截至目前,对荷丹片的质量控制及药效基础研究尚不全面,有必要对其整体化学成分进行深入研究及鉴定。基于此,本研究采用HPLC-FT-ICR-MS技术对荷丹片中醇溶性化学成分进行快速分析鉴定,更广泛、更全面地反映荷丹片的整体化学物质信息,以期为该药的质量控制、药效物质基础及作用机制的深入研究提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),Bruker Solarix 7.0T 超高分辨四极杆串联傅里叶变换质谱仪、Bruker Compass-Hystar 液质联用工作站(德国 Bruker 公司),BSA124S 电子天平(德国 Sartorius 公司),XS205 电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司),ZDHW 电热套(北京中兴伟业仪器有限公司),TGL-16G 型离心机(上海安亭科学仪器厂),KQ-100DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 试药

纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司),甲醇(色谱纯,天津市康科德科技有限公司),乙腈、甲酸(质谱纯,美国 Fisher 公司),乙酸乙酯(色谱纯,山东禹王实业有限公司),无水硫酸钠(分

析纯,天津博迪化工股份有限公司)。

丹参素对照品(批号:F10IB206826, HPLC  $\geq$  98%)、荷叶碱对照品(批号:T25S11Z125833, HPLC  $\geq$  98%)(上海源叶生物科技有限公司),丹酚酸 B 对照品(批号:C14737506, HPLC  $\geq$  98%,上海麦克林生化科技股份有限公司),槲皮素对照品(批号:100081-201610)、异补骨脂素对照品(批号:110715-201318)、丹参酮 II A 对照品(批号:110766-201520)(HPLC  $\geq$  99%,中国食品药品检定研究院),荷丹片(规格:0.73 g $\times$ 24 片,批号:20211201,南昌济顺制药有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 HPLC-FT-ICR-MS 条件

**2.1.1 色谱条件** Universil XB C<sub>18</sub> 色谱柱(150 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8  $\mu$ m);流动相为 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0 $\sim$ 3 min, 90% $\sim$ 85%A, 3 $\sim$ 18 min, 85% $\sim$ 74%A, 18 $\sim$ 28 min, 74% $\sim$ 40%A, 28 $\sim$ 33 min, 40% $\sim$ 0%A, 33 $\sim$ 50 min, 0%A);流速为 0.15 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>;柱温为 35 $^{\circ}$ C;进样量为 2  $\mu$ L。

**2.1.2 质谱条件** 电喷雾离子源(ESI),以全扫描方式分别在正离子和负离子模式下采集数据,扫描范围: $m/z$  100 $\sim$ 1000 Da;仪器参数如下:雾化气体压力(N<sub>2</sub>)为 4.0 bar;脱溶剂气温度为 200 $^{\circ}$ C;脱溶剂气流速为 8 L $\cdot$ min<sup>-1</sup>;离子富集时间为 0.15 s;毛细管电压为 4.5 kV;离子飞行时间为 0.6 ms;碰撞气为氩气(Ar);二级质谱的碰撞能范围为 10 $\sim$ 30 eV。

### 2.2 供试品溶液的制备

取荷丹片,去糖衣,研成细粉,混匀。取样品粉末约 1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 乙醇 25 mL,密塞,称重,超声处理 30 min(700 W, 70 kHz),冷却后称重,用 50% 乙醇补足失重,摇匀,于 13 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清液于 4 $^{\circ}$ C 下冷却结晶 3 h,将上清液经 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

### 2.3 混合对照品溶液的制备

精密称取丹参素、荷叶碱、丹酚酸 B、槲皮素、异补骨脂素、丹参酮 II A 对照品适量,加入 50% 乙醇溶解,制得各对照品质量浓度约为 50  $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液,过滤,即得。

### 2.4 数据处理

通过在 CNKI、Web of Science 等网站上查找数据及文献,建立荷叶、丹参、山楂、番泻叶、盐补骨脂所含化学成分的内部数据库。根据质谱测量到的精确分子质量,使用 Data Analysis 4.4 软件拟合分子式,选择一级准分子离子峰质荷比实

测值与理论值误差小于 2 ppm ( $\times 10^{-6}$ ) 的分子,并结合其二级质谱信息、内部数据库或对照品的相关信息,鉴定荷丹片中的醇溶性化学成分。

3 结果

将荷丹片醇提取供试品溶液按“2.1”项下色谱和质谱条件进行 HPLC-FT-ICR-MS 分析,分别得到正、负离子模式下的基峰色谱图(BPC),见图 1。结果从荷丹片中共鉴定出 125 种醇溶性成分,

见表 1,包括 48 种黄酮类、22 种有机酸类、19 种醌类、14 种生物碱类、7 种三萜类、6 种香豆素类及 9 种其他类化学成分。根据对照品的保留时间、分子量及碎片离子准确鉴定出其中 6 种成分,即丹参素、荷叶碱、丹酚酸 B、槲皮素、异补骨脂素、丹参酮 II A。其他化学成分通过其精确分子量、二级质谱信息、内部数据库及相关文献推测。

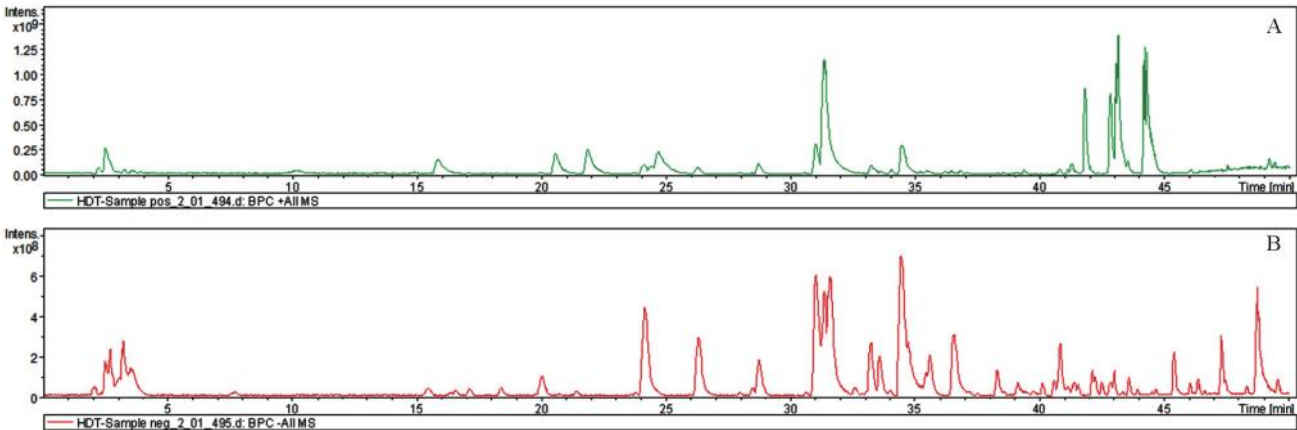


图 1 荷丹片正(A)、负(B)离子模式下的基峰色谱图

Fig 1 Base peak ion chromatograms of Hedan tablets in positive (A) and negative (B) ion modes

表 1 正负离子模式下荷丹片的化学成分分析

Tab 1 Identification of compounds in Hedan tablets under positive and negative ion mode

| No. | $t_R$ / min | 化合物名称                          | 类别  | 化学式                  | 理论值<br>( $m/z$ ) | 测得值<br>( $m/z$ ) | 误差 /<br>( $\times 10^{-6}$ ) | 离子<br>模式  | 二级碎片离子 ( $m/z$ )                                 | 来源    |
|-----|-------------|--------------------------------|-----|----------------------|------------------|------------------|------------------------------|-----------|--------------------------------------------------|-------|
| 1   | 2.65        | 山梨醇                            | 其他  | $C_6H_{14}O_6$       | 181.0718         | 181.0718         | - 0.38                       | $[M-H]^-$ | 119.0341, 101.0234, 89.0238                      | SZ    |
| 2   | 2.67        | 乳糖                             | 其他  | $C_{12}H_{22}O_{11}$ | 341.1093         | 341.1089         | - 1.06                       | $[M-H]^-$ | 179.0474, 161.0117                               | HY    |
| 3   | 2.81        | 奎宁酸                            | 有机酸 | $C_7H_{12}O_6$       | 191.0562         | 191.0561         | - 0.47                       | $[M-H]^-$ | 173.0464, 155.0348, 129.0193, 111.0085           | HY、SZ |
| 4   | 3.20        | 腺苷                             | 生物碱 | $C_{10}H_{13}N_5O$   | 268.1039         | 268.1040         | 0.47                         | $[M+H]^+$ | 136.0615, 119.0349, 79.0241                      | HY    |
| 5   | 3.27        | 柠檬酸                            | 有机酸 | $C_6H_8O_7$          | 191.0197         | 191.0197         | 0.22                         | $[M-H]^-$ | 173.0078, 154.9971, 128.0636, 111.0095           | HY、SZ |
| 6   | 7.73        | 咖啡酸                            | 有机酸 | $C_9H_8O_4$          | 179.0349         | 179.0350         | 0.46                         | $[M-H]^-$ | 135.0456, 107.0485                               | SZ    |
| 7   | 7.74        | 丹参素                            | 有机酸 | $C_9H_{10}O_5$       | 197.0455         | 197.0456         | 0.44                         | $[M-H]^-$ | 179.0351, 153.0453, 135.0452, 123.0431, 2.9939   | DS    |
| 8   | 9.76        | 去甲乌药碱                          | 生物碱 | $C_{16}H_{17}NO_3$   | 272.1278         | 272.1281         | 1.30                         | $[M+H]^+$ | 255.0885, 237.0771, 209.0839, 143.0364           | HY    |
| 9   | 11.19       | N- 新绿原酸                        | 有机酸 | $C_{16}H_{18}O_9$    | 353.0877         | 353.0878         | 0.28                         | $[M-H]^-$ | 191.0571, 179.0359, 161.0236, 135.0455           | SZ    |
| 10  | 13.06       | 原花青素 B1                        | 黄酮类 | $C_{30}H_{26}O_{12}$ | 577.1351         | 577.1352         | 0.02                         | $[M-H]^-$ | 425.0870, 407.0758, 289.0684, 255.0271, 125.0236 | HY、SZ |
| 11  | 14.51       | 盾叶夹竹桃苷                         | 其他  | $C_{15}H_{20}O_8$    | 327.1085         | 327.1085         | 0.10                         | $[M-H]^-$ | 165.0554, 121.0658, 59.0138                      | HY    |
| 12  | 14.93       | N- 甲基异衡州乌药碱                    | 生物碱 | $C_{18}H_{21}NO_3$   | 300.1591         | 300.1594         | 1.17                         | $[M+H]^+$ | 269.1045, 237.0781, 209.0843, 192.0884, 175.0766 | HY    |
| 13  | 15.43       | 表儿茶素                           | 黄酮类 | $C_{15}H_{14}O_6$    | 291.0859         | 291.0863         | 1.29                         | $[M+H]^+$ | 147.0438, 139.0387, 123.0438                     | HY    |
| 14  | 15.59       | 原荷叶碱                           | 生物碱 | $C_{19}H_{21}NO_3$   | 312.1590         | 312.1594         | 1.38                         | $[M+H]^+$ | 283.1251, 269.1086, 251.0980, 254.0873, 225.1851 | HY    |
| 15  | 15.91       | 异衡州乌药碱                         | 生物碱 | $C_{17}H_{19}NO_3$   | 286.1434         | 286.1438         | 1.24                         | $[M+H]^+$ | 269.1034, 254.0791, 237.0765, 143.0492           | HY    |
| 16  | 16.10       | N- 甲基衡州乌药碱                     | 生物碱 | $C_{18}H_{21}NO_3$   | 300.1590         | 300.1594         | 1.27                         | $[M+H]^+$ | 269.1024, 237.0758, 209.0801, 192.0843, 175.0603 | HY    |
| 17  | 16.41       | 绿原酸                            | 有机酸 | $C_{16}H_{18}O_9$    | 353.0877         | 353.0878         | 0.30                         | $[M-H]^-$ | 192.0593, 179.0341, 161.0243, 127.0383           | SZ    |
| 18  | 16.99       | 牡荆素                            | 黄酮类 | $C_{21}H_{20}O_{10}$ | 431.0984         | 431.0984         | - 0.11                       | $[M-H]^-$ | 311.0566, 283.0613, 269.0460, 161.0246, 117.0339 | SZ    |
| 19  | 17.94       | 隐绿原酸                           | 有机酸 | $C_{16}H_{18}O_9$    | 353.0877         | 353.0878         | 0.23                         | $[M-H]^-$ | 191.0583, 173.0468, 155.0347, 135.0452           | SZ    |
| 20  | 18.45       | 4- 甲基苯磷二酚 -O-<br>O- 乙酸         | 有机酸 | $C_{11}H_{12}O_6$    | 239.0560         | 239.0561         | 0.42                         | $[M-H]^-$ | 179.0335, 177.0553, 133.0642, 107.0506           | SZ    |
| 21  | 20.61       | 亚美罂粟碱                          | 生物碱 | $C_{19}H_{23}NO_3$   | 314.1747         | 314.1751         | 1.18                         | $[M+H]^+$ | 283.1173, 252.0985, 237.0906, 206.1132, 189.1039 | HY    |
| 22  | 21.27       | (Z) -4', 6- 二氢丹参<br>酮 -6- 葡萄糖苷 | 黄酮类 | $C_{21}H_{20}O_9$    | 417.1173         | 417.1180         | 1.82                         | $[M+H]^+$ | 255.0656, 137.0258                               | BGZ   |
| 23  | 21.74       | 二氢槲皮素 -7-O- 鼠李<br>糖苷           | 黄酮类 | $C_{21}H_{22}O_{11}$ | 449.1092         | 449.1089         | - 0.47                       | $[M-H]^-$ | 287.0560, 259.0607, 125.0241                     | HY    |
| 24  | 21.92       | N- 去甲基亚美罂粟碱                    | 生物碱 | $C_{18}H_{21}NO_3$   | 300.1591         | 300.1594         | 1.16                         | $[M+H]^+$ | 283.1179, 268.1095, 237.0763, 209.0789, 192.0861 | HY    |

续表 1

| No. | $t_R$ / min | 化合物名称                               | 类别  | 化学式                                             | 理论值<br>( $m/z$ ) | 测得值<br>( $m/z$ ) | 误差 /<br>( $\times 10^{-6}$ ) | 离子<br>模式           | 二级碎片离子 ( $m/z$ )                                           | 来源     |
|-----|-------------|-------------------------------------|-----|-------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------------------|--------------------|------------------------------------------------------------|--------|
| 25  | 22.72       | 大黄素甲醚-8- <i>O</i> - $\beta$ -D-葡萄糖苷 | 醌类  | C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub> | 445.1140         | 445.1140         | - 0.05                       | [M-H] <sup>-</sup> | 283.0615, 240.0423                                         | FXY    |
| 26  | 23.92       | 牡荆素-4"- <i>O</i> -葡萄糖苷              | 黄酮类 | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub> | 593.1509         | 593.1512         | 0.52                         | [M-H] <sup>-</sup> | 413.0861, 311.0542, 293.0436                               | SZ     |
| 27  | 24.18       | 补骨脂苷                                | 香豆素 | C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>  | 365.0877         | 365.0878         | 0.43                         | [M-H] <sup>-</sup> | 203.0347, 159.0446, 130.0424, 119.0336, 102.0476           | BGZ    |
| 28  | 24.70       | <i>O</i> -去甲基荷叶碱                    | 生物碱 | C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>2</sub> | 282.1486         | 282.1489         | 1.10                         | [M+H] <sup>+</sup> | 265.1237, 250.0987, 235.0774, 191.0877                     | HY     |
| 29  | 25.05       | 衡州乌药碱                               | 生物碱 | C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub> | 286.1434         | 286.1438         | 1.25                         | [M+H] <sup>+</sup> | 269.1034, 54.0933, 237.0772, 209.0817, 178.0718            | HY     |
| 30  | 25.94       | 大豆苷                                 | 黄酮类 | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>  | 417.1173         | 417.1180         | 1.81                         | [M+H] <sup>+</sup> | 297.0701, 255.0668, 227.0724, 199.0758, 137.0257, 119.0496 | BGZ    |
| 31  | 25.97       | 2-肉桂酰-1-没食子酰葡萄糖                     | 其他  | C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> | 461.1090         | 461.1089         | - 0.04                       | [M-H] <sup>-</sup> | 331.0664, 299.0551                                         | FXY    |
| 32  | 26.32       | 异补骨脂苷                               | 香豆素 | C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>  | 365.0876         | 365.0878         | 0.46                         | [M-H] <sup>-</sup> | 337.0574, 203.0345, 159.0448, 130.0423, 102.0474           | BGZ    |
| 33  | 27.97       | 异夏佛托苷                               | 黄酮类 | C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub> | 563.1406         | 563.1406         | 0.11                         | [M-H] <sup>-</sup> | 431.1016, 413.0852, 341.0664, 311.0556, 283.0617, 105.0366 | FXY    |
| 34  | 29.01       | 6-羟基山柰酚-3, 6-二葡萄糖苷                  | 黄酮类 | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub> | 625.1410         | 625.1410         | 0.08                         | [M-H] <sup>-</sup> | 463.1136, 439.0678, 301.2310                               | FXY    |
| 35  | 29.38       | 紫草酸                                 | 有机酸 | C <sub>27</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub> | 537.1039         | 537.1039         | - 0.13                       | [M-H] <sup>-</sup> | 383.0796, 313.0716, 295.0581, 197.0462                     | DS     |
| 36  | 30.09       | 异牡荆素                                | 黄酮类 | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub> | 431.0986         | 431.0984         | - 0.47                       | [M-H] <sup>-</sup> | 311.0546, 293.0475, 283.0591, 269.1130                     | SZ     |
| 37  | 30.21       | 丹酚酸 H                               | 有机酸 | C <sub>27</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub> | 537.1039         | 537.1039         | - 0.05                       | [M-H] <sup>-</sup> | 339.0518, 321.0422, 295.0603, 185.0237                     | DS     |
| 38  | 31.02       | 金丝桃苷                                | 黄酮类 | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub> | 463.0881         | 463.0882         | 0.26                         | [M-H] <sup>-</sup> | 300.0271, 271.0256, 255.0302, 151.0025                     | SZ     |
| 39  | 31.02       | 堪非醇 3- <i>O</i> -桑布双糖苷              | 黄酮类 | C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>15</sub> | 581.1490         | 581.1501         | 1.93                         | [M+H] <sup>+</sup> | 287.0542, 73.0283                                          | HY     |
| 40  | 31.18       | 木犀草苷                                | 黄酮类 | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub> | 449.1071         | 449.1078         | 1.57                         | [M+H] <sup>+</sup> | 287.0543, 153.0179                                         | HY     |
| 41  | 31.26       | 芦丁                                  | 黄酮类 | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub> | 609.1463         | 609.1461         | - 0.25                       | [M-H] <sup>-</sup> | 300.0274, 271.0248, 255.0389, 151.0036                     | HY、FXY |
| 42  | 31.34       | 异槲皮苷                                | 黄酮类 | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub> | 463.0880         | 463.0882         | 0.41                         | [M-H] <sup>-</sup> | 300.0271, 271.0252, 255.0305                               | SZ     |
| 43  | 31.37       | 莲心碱                                 | 生物碱 | C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>2</sub> | 296.1643         | 296.1645         | 0.83                         | [M+H] <sup>+</sup> | 266.0653, 265.1217, 250.0981, 235.0758, 219.0805, 191.0873 | HY     |
| 44  | 31.49       | 莲碱                                  | 生物碱 | C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>2</sub> | 280.1331         | 280.1332         | 0.40                         | [M+H] <sup>+</sup> | 265.1226, 249.0836, 219.0724, 191.0778                     | HY     |
| 45  | 31.52       | <i>N</i> -去甲基荷叶碱                    | 生物碱 | C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>2</sub> | 282.1487         | 282.1489         | 0.59                         | [M+H] <sup>+</sup> | 265.1226, 251.1088, 236.0831, 208.0889, 191.0877           | HY     |
| 46  | 31.57       | 3, 5-二- <i>O</i> -没食子酰莽草酸           | 其他  | C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>13</sub> | 477.0675         | 477.0675         | - 0.09                       | [M-H] <sup>-</sup> | 289.0382, 263.0584, 169.0152, 137.0254                     | SZ     |
| 47  | 31.78       | 番荔枝碱                                | 生物碱 | C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>2</sub> | 266.1173         | 266.1176         | 0.81                         | [M+H] <sup>+</sup> | 249.0915, 219.0803, 191.0851                               | HY     |
| 48  | 31.81       | 异迷迭香酸苷                              | 有机酸 | C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> O <sub>13</sub> | 521.1302         | 521.1301         | - 0.30                       | [M-H] <sup>-</sup> | 135.0451, 161.0247, 179.0343, 359.0760                     | DS     |
| 49  | 32.59       | 丹酚酸 D                               | 有机酸 | C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub> | 417.0827         | 417.0827         | 0.11                         | [M-H] <sup>-</sup> | 373.0921, 197.0452, 193.0501, 179.0356, 135.0455, 72.9931  | DS     |
| 50  | 32.68       | 山柰酚-7- <i>O</i> -葡萄糖苷               | 黄酮类 | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub> | 449.1072         | 449.1078         | 1.48                         | [M+H] <sup>+</sup> | 409.1735, 287.0483, 181.0427                               | HY     |
| 51  | 32.76       | 丹酚酸 E                               | 有机酸 | C <sub>36</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub> | 717.1458         | 717.1461         | 0.38                         | [M-H] <sup>-</sup> | 519.0931, 321.0402, 295.0610, 185.0231                     | DS     |
| 52  | 33.16       | 芹菜素                                 | 黄酮类 | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>  | 269.0455         | 269.0456         | 0.02                         | [M-H] <sup>-</sup> | 241.0483, 151.0037, 117.03441, 107.0296                    | HY     |
| 53  | 33.22       | 水仙苷                                 | 黄酮类 | C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub> | 623.1615         | 623.1618         | 0.37                         | [M-H] <sup>-</sup> | 501.9907, 315.0509, 299.0186, 271.0241, 243.0300           | HY     |
| 54  | 33.26       | 紫云英苷                                | 黄酮类 | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub> | 447.0930         | 447.0933         | 0.55                         | [M-H] <sup>-</sup> | 447.0933, 284.0325, 255.0291, 227.0295, 151.0225           | HY     |
| 55  | 33.48       | 异鼠李素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷              | 黄酮类 | C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub> | 477.1040         | 477.1039         | - 0.26                       | [M-H] <sup>-</sup> | 413.3511, 314.2466, 206.9684                               | FXY    |
| 56  | 33.51       | 高车前苷                                | 黄酮类 | C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> | 463.1228         | 463.1235         | 1.50                         | [M+H] <sup>+</sup> | 409.0926, 353.1013, 301.0701, 286.0466, 258.0517           | HY     |
| 57  | 33.59       | 丹酚酸 A                               | 有机酸 | C <sub>26</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub> | 493.1139         | 493.1140         | 0.25                         | [M-H] <sup>-</sup> | 295.0618, 197.0451, 269.0833, 185.0247                     | DS     |
| 58  | 33.62       | 迷迭香酸                                | 有机酸 | C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>  | 359.0772         | 359.0772         | 0.21                         | [M-H] <sup>-</sup> | 197.0451, 179.0352, 161.0248, 135.0451, 72.9932            | DS     |
| 59  | 34.01       | 丁香酚葡萄糖苷                             | 其他  | C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>  | 407.1348         | 407.1348         | - 0.10                       | [M-H] <sup>-</sup> | 345.0599, 287.0883, 245.0831                               | FXY    |
| 60  | 34.59       | 丹酚酸 B                               | 有机酸 | C <sub>36</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub> | 717.1471         | 717.1461         | - 1.35                       | [M-H] <sup>-</sup> | 519.0931, 339.0487, 321.0396, 295.0619, 185.0423           | DS     |
| 61  | 35.20       | 山柰酚-3, 5-双葡萄糖苷                      | 黄酮类 | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub> | 609.1461         | 609.1461         | - 0.03                       | [M-H] <sup>-</sup> | 285.0401                                                   | FXY、HY |
| 62  | 35.56       | 丹酚酸 L                               | 有机酸 | C <sub>36</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub> | 717.1458         | 717.1461         | 0.40                         | [M-H] <sup>-</sup> | 519.0935, 185.0428, 109.0290                               | DS     |



续表 1

| No. | $t_R$ /<br>min | 化合物名称             | 类别  | 化学式                                             | 理论值<br>( $m/z$ ) | 测得值<br>( $m/z$ ) | 误差 /<br>( $\times 10^{-6}$ ) | 离子<br>模式           | 二级碎片离子 ( $m/z$ )                                           | 来源         |
|-----|----------------|-------------------|-----|-------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------------------|--------------------|------------------------------------------------------------|------------|
| 63  | 35.62          | 大黄酚               | 醌类  | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>  | 253.0507         | 253.0506         | -0.29                        | [M-H] <sup>-</sup> | 255.0535, 210.0651, 197.0580, 181.0615                     | FXY        |
| 64  | 35.62          | 7, 4'-二羟基黄酮       | 黄酮类 | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>  | 255.0650         | 255.0652         | 0.69                         | [M+H] <sup>+</sup> | 137.0247                                                   | BGZ        |
| 65  | 35.76          | 9"-丹酚酸 B 甲基酯      | 有机酸 | C <sub>37</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub> | 731.1611         | 731.1618         | 0.88                         | [M-H] <sup>-</sup> | 533.1061                                                   | DS         |
| 66  | 35.84          | 异丹酚酸 C            | 有机酸 | C <sub>26</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub> | 491.0982         | 491.0984         | 0.37                         | [M-H] <sup>-</sup> | 311.0557, 295.0592, 197.0453                               | DS         |
| 67  | 36.46          | 黄芪异黄烷苷            | 黄酮类 | C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>10</sub> | 463.1611         | 463.1610         | -0.18                        | [M-H] <sup>-</sup> | 301.0715, 165.0199, 135.0450                               | HY         |
| 68  | 36.47          | 补骨脂素              | 香豆素 | C <sub>11</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>   | 187.0388         | 187.0390         | 0.79                         | [M+H] <sup>+</sup> | 159.0443, 143.0487, 131.0488, 115.0546, 103.0547           | BGZ        |
| 69  | 36.55          | 槲皮素               | 黄酮类 | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>  | 301.0353         | 301.0354         | 0.29                         | [M-H] <sup>-</sup> | 273.0401, 178.9987, 151.0033, 107.0133                     | SZ、<br>FXY |
| 70  | 36.63          | 双羟异补骨脂定           | 香豆素 | C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>  | 369.0966         | 369.0969         | 0.79                         | [M+H] <sup>+</sup> | 351.0863, 309.0742, 297.0397, 281.0801, 269.0448, 165.0533 | BGZ        |
| 71  | 36.82          | 假荆芥属苷             | 黄酮类 | C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub> | 477.1039         | 477.1039         | -0.09                        | [M-H] <sup>-</sup> | 269.0452, 135.0086                                         | BGZ        |
| 72  | 36.82          | 木犀草素              | 黄酮类 | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>  | 285.0405         | 285.0405         | -0.16                        | [M-H] <sup>-</sup> | 257.0451, 229.0506, 151.0036, 133.0293, 107.0138           | HY         |
| 73  | 37.10          | 异补骨脂素             | 香豆素 | C <sub>11</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>   | 187.0389         | 187.0390         | 0.57                         | [M+H] <sup>+</sup> | 279.1008, 261.0914, 233.0963, 205.1026, 190.0781           | BGZ        |
| 74  | 37.82          | 香叶木素 7-O-β-D-葡萄糖苷 | 黄酮类 | C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> | 463.1232         | 463.1235         | 0.59                         | [M+H] <sup>+</sup> | 301.0701, 286.0465, 258.0522                               | HY         |
| 75  | 37.85          | 芦荟大黄素             | 醌类  | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>  | 269.0455         | 269.0456         | 0.04                         | [M-H] <sup>-</sup> | 249.1183, 240.1913, 226.0268, 113.0601                     | FXY        |
| 76  | 38.01          | 丹酚酸 C             | 有机酸 | C <sub>26</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub> | 491.0984         | 491.0984         | -0.09                        | [M-H] <sup>-</sup> | 311.0524, 293.0440, 265.0492, 185.0231, 135.0456           | DS         |
| 77  | 38.30          | 山柰酚               | 黄酮类 | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>  | 285.0404         | 285.0405         | 0.18                         | [M-H] <sup>-</sup> | 239.0361, 229.0517, 167.0514, 165.0171                     | FXY、<br>HY |
| 78  | 38.30          | 异黄酮 C             | 黄酮类 | C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>  | 355.1174         | 355.1176         | 0.49                         | [M+H] <sup>+</sup> | 337.1071, 283.0626, 227.0698, 211.0412, 161.0269           | BGZ        |
| 79  | 38.39          | 山豆根酮 A7           | 黄酮类 | C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>  | 341.1381         | 341.1384         | 0.70                         | [M+H] <sup>+</sup> | 323.1257, 203.0709, 161.0287, 149.0251, 137.0285, 93.0354  | BGZ        |
| 80  | 38.54          | 泽兰黄酮              | 黄酮类 | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>  | 317.0655         | 317.0656         | 0.26                         | [M+H] <sup>+</sup> | 302.0415, 243.0652, 183.0288, 153.0383                     | HY         |
| 81  | 38.59          | 异戊烯基黄酮 D          | 黄酮类 | C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>  | 341.1382         | 341.1384         | 0.48                         | [M+H] <sup>+</sup> | 221.0815, 203.0727, 149.0253, 147.0456, 137.0241           | BGZ        |
| 82  | 38.73          | 补骨脂醇              | 黄酮类 | C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>  | 339.1225         | 339.1227         | 0.68                         | [M+H] <sup>+</sup> | 303.1018, 238.1747, 210.1753, 169.1225, 137.0236, 126.0451 | BGZ        |
| 83  | 39.22          | 丹参酸甲酯             | 醌类  | C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>  | 339.1225         | 339.1227         | 0.58                         | [M+H] <sup>+</sup> | 279.1012, 261.0907, 233.0956                               | DS         |
| 84  | 39.29          | 丹参酚醌 I            | 醌类  | C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>  | 313.1433         | 313.1434         | 0.37                         | [M+H] <sup>+</sup> | 295.0968, 277.0867                                         | DS         |
| 85  | 39.69          | 岭南槐醇 D            | 黄酮类 | C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>  | 357.1331         | 357.1333         | 0.60                         | [M+H] <sup>+</sup> | 285.0751, 183.0288, 165.0184, 147.0459, 137.0240, 119.0502 | BGZ        |
| 86  | 39.90          | 山柰素               | 黄酮类 | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>  | 299.0562         | 299.0561         | -0.39                        | [M-H] <sup>-</sup> | 255.1892, 211.1744, 135.1036                               | FXY        |
| 87  | 40.12          | 异补骨脂黄酮            | 黄酮类 | C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>  | 325.1435         | 325.1434         | -0.05                        | [M+H] <sup>+</sup> | 149.0263, 147.0431, 121.0294, 93.0341, 65.0397             | BGZ        |
| 88  | 40.56          | 补骨脂黄酮 A           | 其他  | C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>  | 341.1382         | 341.1384         | 0.31                         | [M+H] <sup>+</sup> | 295.0617, 167.0342, 149.0246, 147.0453, 121.0296, 119.0497 | BGZ        |
| 89  | 40.70          | 补骨脂甲素             | 黄酮类 | C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>  | 325.1434         | 325.1434         | 0.20                         | [M+H] <sup>+</sup> | 181.0691, 165.0747, 147.0483, 137.0275, 121.0327, 119.0531 | BGZ        |
| 90  | 40.80          | 新补骨脂异黄酮           | 黄酮类 | C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>  | 323.1277         | 323.1278         | 0.35                         | [M+H] <sup>+</sup> | 255.0658, 239.2363, 137.5640, 69.0716                      | BGZ        |
| 91  | 40.85          | 羟基丹参酮 II A        | 醌类  | C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>  | 311.1277         | 311.1278         | 0.18                         | [M+H] <sup>+</sup> | 293.1138, 283.1348, 265.1273                               | DS         |
| 92  | 40.91          | 查耳酮 B             | 黄酮类 | C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>  | 341.1383         | 341.1384         | 0.18                         | [M+H] <sup>+</sup> | 165.0240, 137.0295                                         | BGZ        |
| 93  | 40.92          | 青桐醇               | 其他  | C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>  | 325.1083         | 325.1082         | -0.32                        | [M-H] <sup>-</sup> | 281.1186, 201.1113                                         | DS         |
| 94  | 41.04          | 丹参酮 II B          | 醌类  | C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>  | 311.1277         | 311.1278         | 0.17                         | [M+H] <sup>+</sup> | 293.0916, 265.0890, 252.1141, 235.0601, 219.0761           | DS         |
| 95  | 41.08          | 异新补骨脂异黄酮          | 黄酮类 | C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>  | 323.1278         | 323.1278         | -0.05                        | [M+H] <sup>+</sup> | 267.0691, 239.0748, 195.0484, 165.0741, 137.0260           | BGZ        |
| 96  | 41.13          | 异隐丹参酮             | 醌类  | C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub>  | 297.1485         | 297.1485         | -0.03                        | [M+H] <sup>+</sup> | 279.1383, 269.1545, 253.1581, 223.1113, 195.1179           | DS         |
| 97  | 41.34          | 新隐丹参酮             | 醌类  | C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>  | 313.1446         | 313.1445         | -0.28                        | [M-H] <sup>-</sup> | 295.1338, 269.1554, 255.1385                               | DS         |
| 98  | 41.39          | 补骨脂异黄酮            | 黄酮类 | C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>  | 321.1121         | 321.1121         | 0.25                         | [M+H] <sup>+</sup> | 293.0822, 263.0674, 135.0096                               | BGZ        |
| 99  | 41.40          | 大黄酸               | 醌类  | C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>   | 283.0249         | 283.0248         | -0.14                        | [M-H] <sup>-</sup> | 257.0451, 239.1873, 211.1715, 183.0443, 137.0882           | FXY        |
| 100 | 41.46          | 丹参新醌 A            | 醌类  | C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>  | 295.0977         | 295.0976         | -0.28                        | [M-H] <sup>-</sup> | 277.0876, 265.0865, 249.0921, 237.0916                     | DS         |
| 101 | 41.48          | 补骨脂色烯查耳酮          | 黄酮类 | C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>  | 323.1278         | 323.1278         | 0.04                         | [M+H] <sup>+</sup> | 203.0742, 175.0785, 147.0480, 119.0526                     | BGZ        |
| 102 | 41.72          | 补骨脂查尔酮            | 黄酮类 | C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>  | 325.1434         | 325.1434         | 0.07                         | [M+H] <sup>+</sup> | 307.1363, 283.0794, 147.0503                               | BGZ        |
| 103 | 41.83          | 二氢丹参酮 I           | 醌类  | C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>  | 279.1016         | 279.1016         | -0.13                        | [M+H] <sup>+</sup> | 261.0906, 251.1052, 233.0953, 169.0648                     | DS         |
| 104 | 41.93          | 阿江榄仁酸             | 三萜类 | C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>5</sub>  | 487.3433         | 487.3429         | -0.79                        | [M-H] <sup>-</sup> | 469.4837                                                   | SZ         |

续表 1

| No. | $t_R$ / min | 化合物名称      | 类别  | 化学式               | 理论值<br>( $m/z$ ) | 测得值<br>( $m/z$ ) | 误差 /<br>( $\times 10^{-6}$ ) | 离子<br>模式  | 二级碎片离子 ( $m/z$ )                                 | 来源    |
|-----|-------------|------------|-----|-------------------|------------------|------------------|------------------------------|-----------|--------------------------------------------------|-------|
| 105 | 42.09       | 补骨脂乙素      | 黄酮类 | $C_{20}H_{20}O_4$ | 325.1433         | 325.1434         | 0.30                         | $[M+H]^+$ | 251.0701, 205.0641, 195.0804, 149.0253, 121.0306 | BGZ   |
| 106 | 42.19       | 补骨脂定       | 香豆素 | $C_{20}H_{16}O_5$ | 337.1070         | 337.1071         | 0.05                         | $[M+H]^+$ | 281.0493, 253.0545, 209.0642                     | BGZ   |
| 107 | 42.27       | 补骨脂二氢黄酮甲醚  | 黄酮类 | $C_{21}H_{22}O_4$ | 339.1592         | 339.1591         | -0.27                        | $[M+H]^+$ | 219.1064, 151.0438, 147.0483, 119.0538           | BGZ   |
| 108 | 42.34       | 丹参新醌 B     | 醌类  | $C_{18}H_{16}O_3$ | 281.1172         | 281.1172         | 0.07                         | $[M+H]^+$ | 263.1006, 258.0803, 235.1065, 207.1075           | DS    |
| 109 | 42.55       | 染料木素       | 黄酮类 | $C_{15}H_{10}O_5$ | 269.0456         | 269.0456         | -0.08                        | $[M-H]^-$ | 225.0566, 151.0024, 117.0338                     | BGZ   |
| 110 | 42.68       | 委陵菜酸       | 三萜类 | $C_{30}H_{48}O_5$ | 487.3431         | 487.3429         | -0.50                        | $[M-H]^-$ | 469.3212, 441.3364, 423.3265, 393.3173           | SZ    |
| 111 | 42.69       | 积雪草酸       | 三萜类 | $C_{30}H_{48}O_5$ | 489.3574         | 489.3575         | 0.04                         | $[M+H]^+$ | 471.3479, 407.3296, 107.0854                     | HY    |
| 112 | 42.83       | 丹参酮 I      | 醌类  | $C_{18}H_{12}O_3$ | 277.0861         | 277.0859         | -0.63                        | $[M+H]^+$ | 262.0644, 249.0904, 221.0964, 193.1016           | DS    |
| 113 | 43.03       | 次苷酸查耳酮     | 黄酮类 | $C_{25}H_{26}O_4$ | 391.1904         | 391.1904         | -0.14                        | $[M+H]^+$ | 293.0806, 267.0638, 239.0711, 199.0731, 137.0246 | BGZ   |
| 114 | 43.09       | 隐丹参酮       | 醌类  | $C_{19}H_{20}O_3$ | 297.1487         | 297.1485         | -0.56                        | $[M+H]^+$ | 279.1377, 251.1426, 237.0905, 209.0956           | DS    |
| 115 | 43.43       | 去氢丹参新酮     | 醌类  | $C_{19}H_{20}O_2$ | 281.1536         | 281.1536         | 0.02                         | $[M+H]^+$ | 266.1292, 253.1584, 234.9211                     | DS    |
| 116 | 43.52       | 1, 2-二氢丹参醌 | 醌类  | $C_{18}H_{14}O_3$ | 279.1015         | 279.1016         | 0.11                         | $[M+H]^+$ | 251.0657, 236.1451                               | DS    |
| 117 | 44.07       | 坡模酸        | 三萜类 | $C_{30}H_{48}O_4$ | 471.3481         | 471.3480         | -0.22                        | $[M-H]^-$ | 453.3343, 409.3441                               | SZ    |
| 118 | 44.20       | 丹参新酮       | 醌类  | $C_{19}H_{22}O_2$ | 283.1695         | 283.1693         | -0.85                        | $[M+H]^+$ | 265.1583, 241.1211, 237.1636                     | DS    |
| 119 | 44.24       | 丹参酮 II A   | 醌类  | $C_{19}H_{18}O_3$ | 295.1330         | 295.1329         | -0.52                        | $[M+H]^+$ | 280.1095, 277.1227, 249.1271, 234.1038, 206.1092 | DS    |
| 120 | 44.33       | 山楂酸        | 三萜类 | $C_{30}H_{48}O_4$ | 471.3482         | 471.3480         | -0.38                        | $[M-H]^-$ | 453.3394, 423.3264, 405.3162, 393.3163           | SZ    |
| 121 | 44.65       | 补骨脂酚       | 其他  | $C_{18}H_{24}O$   | 255.1755         | 255.1754         | -0.15                        | $[M-H]^-$ | 199.1308, 185.1143                               | BGZ   |
| 122 | 44.70       | 科罗索酸       | 三萜类 | $C_{30}H_{48}O_4$ | 471.3482         | 471.3480         | -0.49                        | $[M-H]^-$ | 453.3335, 427.3567, 393.3146                     | HY、SZ |
| 123 | 47.29       | 齐墩果酸       | 三萜类 | $C_{30}H_{48}O_3$ | 455.3533         | 455.3531         | -0.46                        | $[M-H]^-$ | 409.4510, 407.3324, 391.2548, 247.2836           | SZ    |
| 124 | 47.30       | 亚油酸        | 有机酸 | $C_{18}H_{32}O_2$ | 279.2328         | 279.2330         | 0.41                         | $[M-H]^-$ | 261.2006, 221.2003, 219.4005, 175.0001           | SZ    |
| 125 | 48.95       | 油酸         | 有机酸 | $C_{18}H_{34}O_2$ | 281.2486         | 281.2486         | 0.13                         | $[M-H]^-$ | 265.0755, 157.0928, 118.0771, 97.4634            | DS    |

注 (Note): HY. 荷叶 (lotus leaf); DS. 丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge); SZ. 山楂 (Hawthorn); FX. 番泻叶 (*Senna Folium*); BGZ. 补骨脂 (*Psoralea fructus*).

### 3.1 黄酮类

黄酮类化合物具有多种药理活性, 如抗炎、抗氧化和免疫调节等<sup>[10]</sup>。本研究在荷丹片中共鉴定出 48 种黄酮及其苷类成分, 主要来源于药材荷叶和补骨脂。该类化合物的裂解途径通常为

$CH_3$ 、 $CO$ 、 $H_2O$  和  $CO_2$  等中性分子的丢失以及 C 环发生逆狄尔斯-阿尔德反应 (RDA) 等。基于上述特征, 推测化合物 **30** 为大豆苷, 其可能的裂解途径见图 2。其余黄酮类成分通过比较准确分子量和裂解规律及相关文献进行鉴定<sup>[11-14]</sup>。

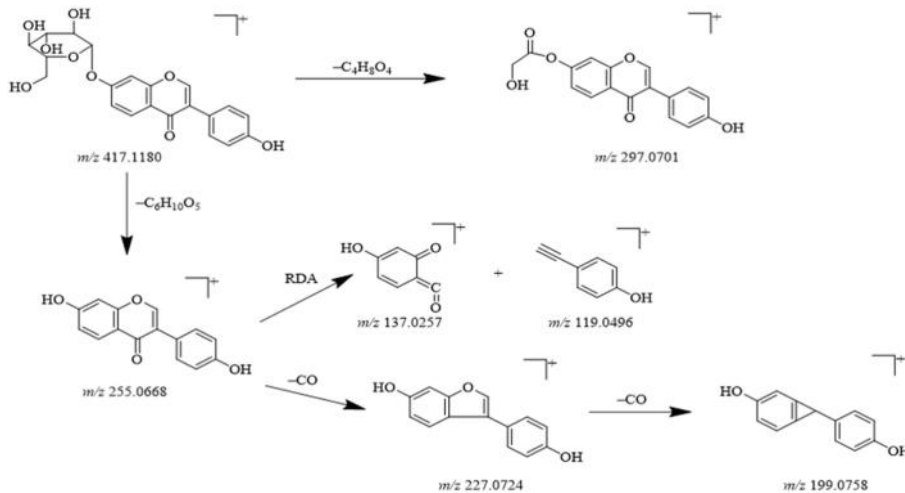


图 2 大豆苷的质谱裂解途径

Fig 2 MS fragmentation pathways of daidzin

### 3.2 有机酸类

共鉴定出 22 种有机酸类成分, 主要来源于药材丹参。该类化合物通常在负离子模式的响应较好, 在碰撞下易丢失  $CO$ 、 $H_2O$  和  $CO_2$  等中性分子以及丢失丹参素  $[M-H-198]^-$  和咖啡酸  $[M-H-180]^-$  特征

碎片离子。根据上述碎片离子, 并通过与对照品比较, 鉴定化合物 **60** 为丹酚酸 B, 其可能的裂解途径见图 3。其余有机酸类成分通过比较准确分子量和裂解规律及相关文献进行鉴定<sup>[15-17]</sup>。

### 3.3 醌类

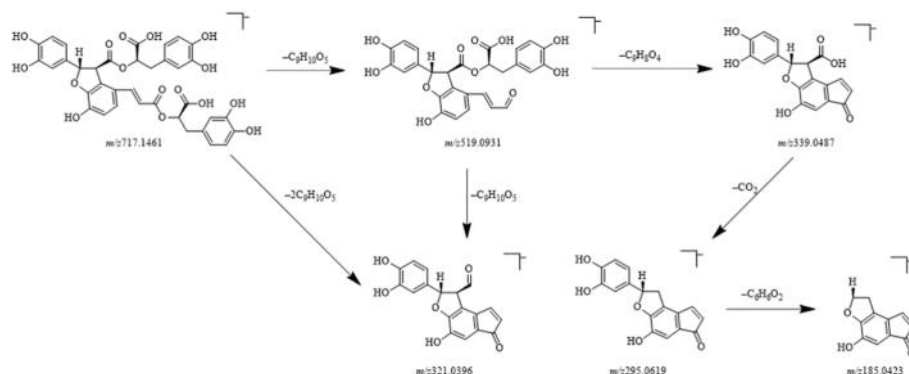


图3 丹酚酸 B 的质谱裂解途径

Fig 3 MS fragmentation pathway of salvianolic acid B

本研究在荷丹片中共鉴定出 19 种醌类成分，主要来源于药材丹参。该类化合物在 ESI 电离条件下易失去 CHO、CH<sub>3</sub>、CO 及 H<sub>2</sub>O 等中性碎片，通过与文献比对<sup>[18]</sup>，推测化合物 **63** 为大黄酚，其可能的裂解途径见图 4。其余醌类成分通过比较准确分子量、裂解规律及相关文献进行鉴定<sup>[19-22]</sup>。

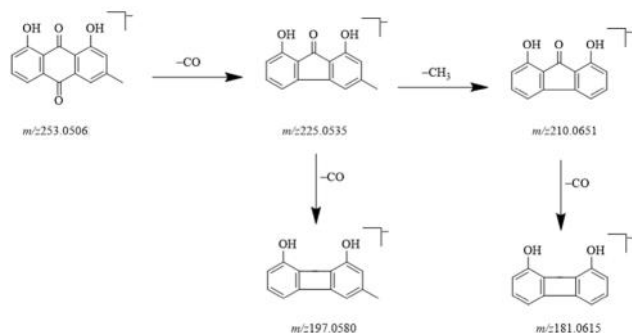


图4 大黄酚的质谱裂解途径

Fig 4 MS fragmentation pathways of chrysophanic acid

### 3.4 生物碱类

在荷丹片中共鉴定出 14 种生物碱类成分，主要来源于药材荷叶。该类化合物通常在正离子模式的响应较好，二级质谱碎片离子多是以 N<sup>+</sup> 为中心发生裂解，丢失 CH<sub>3</sub>、CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub> 等中性碎片，进而再失去 1 分子羰基。经分析和对照品比对，鉴定化合物 **43** 为莲心碱，其可能的裂解途径见图 5。其余生物碱类成分通过比较准确分子量、裂解规律及相关文献进行鉴定<sup>[23-25]</sup>。

### 3.5 三萜类

在荷丹片中共鉴定出 7 种三萜类成分，主要来源于药材山楂。三萜类化合物常以游离或与糖结合成酯或苷的形式存在，当 C 环内有双键时，一般都有较特征的 RDA 裂解反应，同时也容易丢失侧链上的基团，如羟基、羰基、甲基等。基于上述特征，推测该化合物 **123** 为齐墩果酸，其可

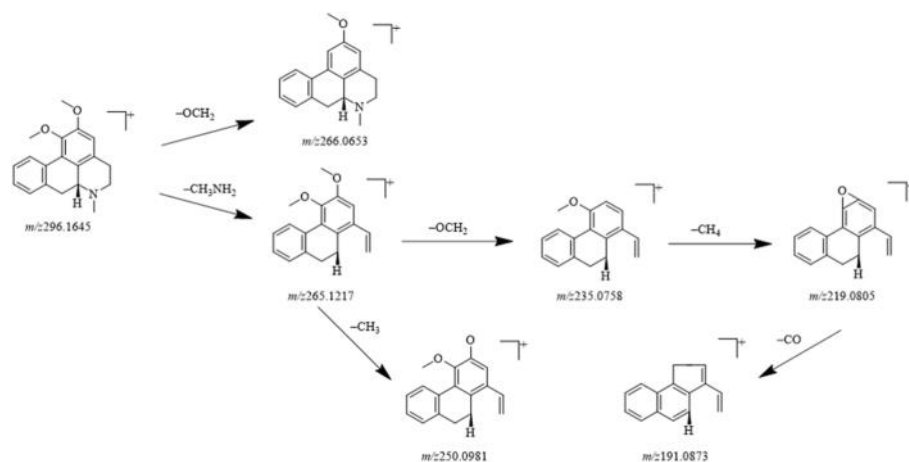


图5 荷叶碱的质谱裂解途径

Fig 5 MS fragmentation pathway of nuciferine

能的裂解途径见图 6。其余三萜类成分通过比较准确分子量、裂解规律及相关文献进行鉴定<sup>[26-28]</sup>。

### 3.6 香豆素类

本研究在荷丹片中共鉴定出 6 种香豆素类成

分，主要来源于药材补骨脂。该类化合物在裂解过程中其内酯环易失去 CO<sub>2</sub>、CO 等中性小分子，推测化合物 **68** 为补骨脂素，其可能的裂解途径见图 7。其余香豆素类成分通过比较准确分子量、



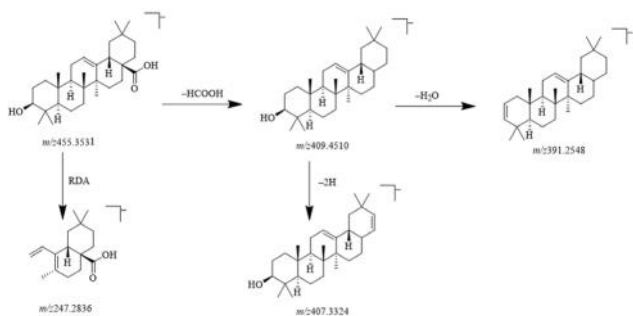


图 6 齐墩果酸的质谱裂解途径

Fig 6 MS fragmentation pathways of oleanic acid

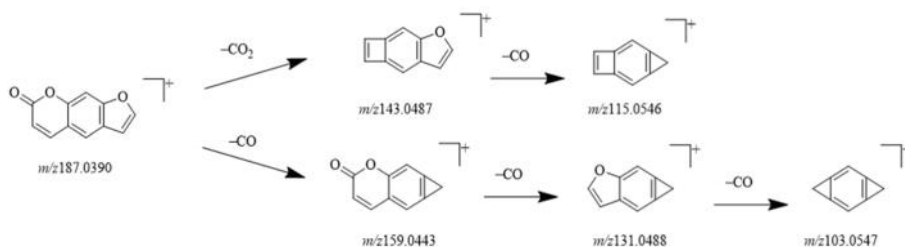


图 7 补骨脂素的质谱裂解途径

Fig 7 MS fragmentation pathways of psoralen

影响,结果发现,提取溶剂选择 50% 的乙醇、提取时间选择 30 min、超声频率选择 70 kHz 时提取效果最佳,色谱峰数目较多,有利于醇溶性成分的测定。其次分别考察了 0.1% 甲酸水-乙腈和 0.1% 甲酸水-甲醇等流动相系统,结果发现当使用 0.1% 甲酸水-甲醇时,柱压略高且色谱图基线漂移;当使用 0.1% 甲酸水-乙腈时,柱压正常、分离度较好、基线平稳且响应值较高,因而选定 0.1% 甲酸水-乙腈为流动相。

本研究采用具有极高分辨率、准确度和灵敏度的 HPLC-FT-ICR 在正、负离子模式下对荷丹片的醇溶性成分进行定性分析,共鉴定出 125 种化合物,对各质谱峰进行归属,并分析了不同类型化合物的裂解规律。在以上成分中,黄酮类、生物碱类、香豆素化合物主要来源于药材荷叶和补骨脂,其中紫云英苷、补骨脂乙素、芹菜素、补骨脂素、荷叶碱等具有抗肥胖、抗动脉硬化、保护心血管和调节脂质代谢等作用<sup>[30-34]</sup>;有机酸类、醌类化合物主要来源于药材丹参,其中丹参素、绿原酸、大黄酚、丹参酮 II A 等具有改善血脂异常、降糖、降脂、降总胆固醇等药理活性<sup>[35-38]</sup>;三萜类化合物主要来源于山楂,其中齐墩果酸、山楂酸等具有抗高血压及抗炎等生物活性<sup>[39-40]</sup>。本研究所鉴定出的不同种类、不同来源的活性成分,以协同作用实现多成分、多靶点、多通路的治疗效果,共同发挥活血化瘀、降脂抗炎的作用。

综上,本研究基于 HPLC-FT-ICR-MS 技术快

裂解规律及相关文献进行鉴定<sup>[29]</sup>。

### 3.7 其他类

此外,在荷丹片中还鉴别出了鞣质类、酚类等 9 种化合物,主要来源于药材补骨脂和山楂。

## 4 讨论

本研究前期分别考察了提取溶剂(25%、50%、75%、100% 的乙醇及 25%、50%、75%、100% 的甲醇)、超声提取时间(20、30、40 min)、超声提取频率(50、60、70 kHz)对荷丹片提取及测定的

速、准确、全面、有效地表征了荷丹片的化学成分,可为药效物质基础、药理作用机制、质量控制等方面提供参考。

## 参考文献

- [1] 冉清智,陈恒文,李傲霜.荷丹片治疗血脂异常的研究进展[J].中西医结合心脑血管病杂志,2023,21(19):3544-3549.
- [2] 史小映.荷丹片联合苯扎贝特治疗高脂血症的临床研究[J].现代药物与临床,2018,33(12):3175-3178.
- [3] 高菲.荷丹片联合辛伐他汀治疗高脂血症临床疗效[J].天津药学,2016,28(2):41-42.
- [4] 涂宗财,寇玉,王辉,等.荷叶多糖的超声波辅助提取和抗氧化活性[J].食品科学,2013,34(16):108-112.
- [5] 廖江龙,范子祥,孟秋月,等.丹参活性成分抗肿瘤分子机制研究进展[J].中草药,2024,55(18):6402-6415.
- [6] 孟彦彬,鲁翔宇.番泻叶化学成分与药理研究进展[J].承德医学院学报,2023,40(4):333-336.
- [7] 吴佳妮,邓仕任,陈晓霞,等.荷丹片中莲碱的 UHPLC 测定方法研究[J].辽宁化工,2023,52(3):450-452,456.
- [8] 赵莉,唐生安.HPLC 法同时测定荷丹片中 8 种指标成分[J].中草药,2013,44(16):2257-2260.
- [9] 陈昊,刘畅,李燕,等.用 HPLC-TOF-MS 法分析荷丹片的化学成分[J].药学服务与研究,2011,11(6):439-443.
- [10] 詹斯文,关小羽,黄丽华,等.基于 PLC-Q-TOF-MS 技术的活血消癭片化学成分分析[J].武汉理工大学学报,2023,45(3):1-11.
- [11] 郭忠会,郑雪莹,梁洁,等.UPLC-Q-TOF/MS 技术结合 UNIFI 平台快速鉴定鸡骨草化学成分[J].中国药房,2022,33(23):2852-2857,2863.
- [12] Sun XY, Xue SJ, Cui YX, et al. Characterization and

- identification of chemical constituents in Corni Fructus and effect of storage using UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS [J]. Food Res Int, 2023, 164: 112330.
- [13] 陈剑, 吴昊, 刘润花, 等. 基于 UPLC-QE-Orbitrap-MS 技术分析乌灵胶囊的化学成分 [J]. 中药材, 2022, 45 (3): 639-646.
- [14] Jiang XL, Zhu Y, Ma GF, et al. Qualitative and quantitative analysis of major components of Renshen-Yangrong pill by UPLC-LTQ/Orbitrap/MS and UPLC-MS/MS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2023, 227: 115276.
- [15] 张薇, 李楚源, 王德勤, 等. 心脉安的 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 定性分析和 UHPLC-QTRAP-MS/MS 含量测定 [J]. 中草药, 2023, 54 (6): 1743-1756.
- [16] 史静超, 张淑蓉, 柴智, 等. 基于 UPLC-QE-Orbitrap-MS 技术的芪蛭降糖胶囊化学成分分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27 (16): 116-123.
- [17] Liu AH, Guo H, Ye M, et al. Detection, characterization and identification of phenolic acids in Danshen using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2007, 1161 (1-2): 170-182.
- [18] 曹瑞, 窦志华, 倪丽丽, 等. HPLC 指纹图谱、Q-TOF/MS 定性及多成分定量相结合的大黄饮片质量评价研究 [J]. 中草药, 2019, 50 (5): 1100-1110.
- [19] 杨琳, 宋海英, 刘剑刚, 等. 基于 LC-MS 技术快速鉴定冠心丹参滴丸的主要成分和入血成分 [J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43 (22): 2484-2490.
- [20] 刘灿黄, 章泽恒, 汪辉, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 法定性分析丹膝颗粒的化学成分 [J]. 药品评价, 2022, 19 (4): 201-209.
- [21] Tian XH, Zhang H, Wang S, et al. A new strategy based on acid-alkali complexation for rapidly and accurately fishing phytochemicals in *Sennae Folium* [J]. Chin Herb Med, 2020, 12 (2): 188-194.
- [22] 杨娜, 黄玮, 单兰兰, 等. UPLC-Q-TOF/MS 结合数据后处理快速分类及鉴定丹参成分 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30 (10): 2408-2412.
- [23] Xiao J, Song NN, Lu T, et al. Rapid characterization of TCM Qianjinteng by UPLC-QTOF-MS and its application in the evaluation of three species of *Stephania* [J]. J Pharm Biomed Anal, 2018, 156: 284-296.
- [24] Jiang YP, Liu R, Liu M, et al. An integrated strategy to rapidly characterize non-targeted benzyloquinoline alkaloids from *Plumula nelumbinis* ethanol extract using UHPLC/Q-orbitrap HRMS [J]. Int J Mass Spectrom, 2018, 432: 26-35.
- [25] 郑宇皓, 张丽艳, 彭政忠, 等. 基于 UHPLC-Q-TOF-MS 技术快速分析二冬汤基准样品中的化学成分 [J]. 中药材, 2023, 46 (3): 664-669.
- [26] 周永刚, 刘畅, 毛飞, 等. 荷叶化学成分的 HPLC-TOF/MS 分析 [J]. 药学实践杂志, 2011, 29 (5): 342-346.
- [27] 宁素云, 孟美黛, 王鹏, 等. 基于 UHPLC-Q Exactive-Orbitrap-MS 法的山楂不同部位化学成分分析 [J]. 广州化工, 2021, 49 (13): 97-101.
- [28] 郑伟, 周茗, 王双艳, 等. 不同来源山楂叶化学成分比较分析 [J]. 药学学报, 2021, 56 (12): 3526-3539.
- [29] 胡万弟, 王诗雨, 徐翱昌, 等. 基于 UHPLC-Q-TOF-MS 技术的中药补骨脂化学成分表征与鉴定 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48 (11): 2989-2999.
- [30] 张赟彬, 缪存铅, 崔俭杰. 吹扫/捕集-热脱附气质联用法对荷叶挥发油成分的对比如分析 [J]. 化学学报, 2009, 67 (20): 2368-2374.
- [31] 张莹, 吕惠子. 补骨脂的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2020, 7 (30): 195.
- [32] 付海洋, 姜良勇, 齐亚军, 等. 芹菜素药理作用的研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2020, 47 (10): 787-792, 797.
- [33] 鲁亚奇, 张晓, 王金金, 等. 补骨脂化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25 (3): 180-189.
- [34] 陈畅, 谢永艳, 黄丽萍. 荷叶碱药理作用的研究进展 [J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37 (4): 619-624.
- [35] 王稳, 王继燕, 杨艳丽. 丹参素药理作用的研究进展 [J]. 菏泽医学专科学校学报, 2023, 35 (1): 76-79.
- [36] 严永旺, 肖兰, 周旭, 等. 绿原酸的药理作用及药用研发对策 [J]. 中国药房, 2017, 28 (19): 2729-2732.
- [37] 胡云芝, 李军民, 鲁之中, 等. 大黄酚对高脂饮食诱导的幼龄大鼠非酒精性脂肪肝的调节作用 [J]. 免疫学杂志, 2018, 34 (10): 869-874.
- [38] 陈雨萌, 李倩, 刘维海, 等. 丹参活性成分治疗心血管疾病的药理作用、临床应用及不良反应研究进展 [J]. 药学研究, 2023, 42 (12): 1028-1034.
- [39] 万晓莉. 齐墩果酸药理作用的研究进展 [J]. 黔南民族医学学报, 2023, 36 (1): 73-75.
- [40] 李宣, 何迎春, 周芳亮. 山楂酸药理作用及其机制的研究进展 [J]. 中国现代医学杂志, 2021, 31 (8): 49-53.

(收稿日期: 2024-10-01; 修回日期: 2024-12-05)

# 基于结块强度研究薏苡仁配方颗粒干法制粒工艺

吴贞澳<sup>1</sup>, 杨凌宇<sup>2</sup>, 张爱玲<sup>3</sup>, 饶小勇<sup>1, 3</sup>, 刘微<sup>1, 3</sup>, 朱丽芳<sup>4</sup>, 刘勇<sup>5</sup>, 罗晓健<sup>1, 3\*</sup> (1.江西中医药大学, 南昌 330004; 2.江中药业股份有限公司, 南昌 330096; 3.中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006; 4.深圳市社会福利服务指导中心医院, 广东 深圳 518038; 5.江西一方天江药业有限公司, 南昌 415001)

**摘要:** **目的** 确定薏苡仁配方颗粒最优处方及干法制粒成型工艺。**方法** 以索式提取法测定脂肪油含量; 以粉体结块强度、颗粒成型率、脆碎度、溶化性、堆密度、休止角为指标, 通过单因素试验确定填充剂的种类以及比例; 采用正交设计试验, 优选干法制粒时的填充剂用量及工艺参数。**结果** 薏苡仁浸膏粉含有  $(1.87 \pm 0.01)\%$  的脂肪油; 优化后的制粒工艺为: 填充剂比例  $\beta$ -环糊精: 麦芽糊精 = 2 : 1, 填充剂用量 40%, 辊轮压力 100 bar, 辊轮转速  $3.8 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。**结论** 脂肪油是影响颗粒成型率的重要因素之一, 优选的干法制粒工艺稳定可行, 颗粒得率高, 流动性好, 硬度适中, 可为薏苡仁配方颗粒的生产提供参考。

**关键词:** 薏苡仁; 结块强度; 配方颗粒; 干法制粒; 处方工艺

中图分类号: R283

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)08-2253-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.016

## Dry granulation of Coicis Semen formula granules based on caking strength

WU Zhen-ao<sup>1</sup>, YANG Ling-yu<sup>2</sup>, ZHANG Ai-ling<sup>3</sup>, RAO Xiao-yong<sup>1, 3</sup>, LIU Wei<sup>1, 3</sup>, ZHU Li-fang<sup>4</sup>, LIU Yong<sup>5</sup>, LUO Xiao-jian<sup>1, 3\*</sup> (1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004; 2. Jiangzhong Pharmaceutical Co., Ltd., Nanchang 330096; 3. National Engineering Research Center for Manufacturing Technology of Solid Preparation of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006; 4. Shenzhen Social Welfare Service Guidance Center Hospital, Shenzhen Guangdong 518038; 5. Jiangxi Yifang Tianjiang Pharmaceutical Co., Ltd., Nanchang 415001)

**Abstract: Objective** To determine the optimal formula for Coicis Semen formula granules. **Methods** The content of fatty oil was determined by Soxhlet extraction. Single factor experiments were conducted to determine the type and proportion of excipients based on indicators such as powder caking strength, particle forming rate, friability, solubility, bulk density, and angle of repose; orthogonal test was used to optimize the addition of excipients and technology parameters in the dry granulation. **Results** Coicis Semen extract powder contained  $(1.87 \pm 0.01)\%$  fatty oil. The optimized granulation included: filler ratio ( $\beta$ -CD : maltodextrin) = 2 : 1, excipients dosage 40%, roller pressure 100 bar, and roller speed  $3.8 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ . **Conclusion** Fatty oil is an important factor affecting the particle forming rate. The optimized dry granulation is stable and feasible, with high particle yield, good flowability, and moderate hardness, providing reference for the production of Coicis Semen formula granules.

**Key words:** Coicis Semen; caking strength; formula granule; dry granulation; formula technology

中药配方颗粒是以中医药理论为指导, 单味中药饮片经提取、浓缩、干燥、制粒等工艺制成供临床调剂使用的颗粒剂, 性味、归经、功效与原中药

饮片一致, 具有服用方便、易于调剂和携带的特点<sup>[1-2]</sup>。与湿法制粒相比, 辊压法干法制粒的工艺相对简单、药物可避免湿和热的影响、能耗低, 是

**基金项目:** 江西省重点研发计划项目 (No.S2021ZPYFB0258); 国家药品监督管理局药物制剂技术与评价重点实验室开放项目 (No.2023TREDP01)。

**作者简介:** 吴贞澳, 男, 硕士, 主要从事中药药剂学研究, email: 1329754364@qq.com \* **通信作者:** 罗晓健, 男, 教授, 主要从事中药制剂工艺与中药固体制剂研究, email: luoxj98@126.com



配方颗粒生产中常用的方法。中药成分复杂,有两类浸膏粉的干法制粒具有很大挑战性。一类是富含小分子糖与有机酸的浸膏粉,其易吸湿、黏性大,制粒时易黏轮,条带得率低,如山茱萸等<sup>[3]</sup>;另一类是富含脂肪油的浸膏粉,其黏性小,干法制粒时难以形成条带,颗粒得率低,如薏苡仁等。目前,许多研究集中于如何解决干法制粒时的黏轮问题,例如添加润滑剂、玻璃化转变温度较高的填充剂、降低辊轮表面温度等<sup>[4-5]</sup>,但关于富含脂肪油的配方颗粒制备工艺研究鲜有报道。

薏苡仁 [*Coix lacryma-jobi* L.var.*ma-yuen* (Roman.) Stapf] 为果实种子类药材,具有利水消肿、健脾祛湿、舒筋除痹、清热排脓等功效。本文采用溶剂提取法测定薏苡仁提取物中总脂肪油的含量,利用质构仪测定其结块强度,并结合颗粒成型率、脆碎度等指标,经单因素试验筛选填充剂种类等关键影响因素,再由正交试验方法优化干法制粒工艺参数,确定薏苡仁配方颗粒干法制粒最佳工艺。

## 1 材料

BT120 干法制粒机(德国 Alexanderwerk),电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械厂),ML3002E/02 型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),JZ-7 和 JL-A3 型粉体性质测定仪(成都新粉体公司),TA.HD PLUS 质构仪(STab Micro Systems),Mastersizer 3000 型激光粒度测定仪(英国马尔文仪器有限公司),FT-2000SE 脆碎度测定仪(天津天大天发科技有限公司)。

微晶纤维素(MCC)、可溶性淀粉、糊精、 $\beta$ -环糊精( $\beta$ -CD)、羟丙甲纤维素 E3(HPMC-E3)、聚维酮 k30(PVP k30)(安徽山河药用辅料股份有限公司),乳糖(DMV-Fonterra Excipients GmbH & Co. KG),麦芽糊精 DE15(吉林中粮生化能源销售有限公司),薏苡仁浸膏粉(江西一方制药有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 指标测定

**2.1.1 粉体结块强度** 粉末的结块性可用于评估当粉末受到压力的情况下,粉体应力改变的趋势和结块的强弱程度。采用质构仪中的 Powder Flow Analyser 程序搭配直径为 23 mm 的探头进行试验。试验分为预搅拌和正式搅拌两部分,首先使用搅拌桨对样品进行 2 次预搅拌,促使粉末均一,随后进行 5 次正式压缩搅拌,压缩力为 750 g,搅拌速度为  $10 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ ,模拟样品结块过程,搅拌桨向下压缩,粉体受力逐渐结块。第 5 次压缩结束,结块已经成型;然后搅拌桨按设定程式

向上提升剪切打碎固结的粉末并测量剪切结块粉末所需要的功,即为结块强度( $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ),结块强度由仪器内部算法自动给出。

**2.1.2 粉体粒子大小** 用激光粒度仪测定样品的  $D_{10}$ 、 $D_{50}$  和  $D_{90}$ ,以  $D_{90}$  表征样品的粒子大小,平行 3 份,取平均值。

**2.1.3 颗粒成型率** 投入粉末质量( $m_1$ ),称取能通过 1 号筛和不能通过 5 号筛颗粒的质量( $m_2$ ),计算颗粒成型率(%). 颗粒成型率(%) =  $m_2/m_1 \times 100\%$ 。

**2.1.4 颗粒脆碎度** 称取通过 2 号筛,未通过 3 号筛的颗粒 10 g,精密称定质量( $m_1$ ),置于脆碎度测定仪中,加入玻璃辊珠 200 个,  $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  旋转 4 min,旋转完毕后取出颗粒,过 3 号筛,称定未通过 3 号筛的颗粒质量( $m_2$ ),计算脆碎度(%),重复 3 次<sup>[6]</sup>。颗粒脆碎度(%) =  $(m_1 - m_2)/m_1 \times 100\%$ 。

**2.1.5 颗粒堆密度** 称取 3 g 颗粒置于 10 mL 的量筒中,读取体积( $V$ ),称取颗粒重量( $m$ ),计算堆密度( $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ),重复 3 次,求平均值。堆密度(%) =  $m/V \times 100\%$ 。

**2.1.6 颗粒休止角** 采用固定漏斗法,从一锥度为  $60^\circ$  的漏斗中落至下方水平金属板上,形成一个圆锥体样,记录圆锥半径( $r$ )、圆锥体高度( $h$ )、计算样品的休止角( $\theta$ ),重复 3 次,求平均值。 $\tan \theta = 2h/r$ 。

**2.1.7 颗粒溶化性** 按照《中药配方颗粒国家药品标准》溶化性检查法检查。称取颗粒 10 g,加热水 200 mL(加热煮沸),搅拌 5 min,立即观察,应全部溶化或轻微浑浊,不得有焦屑或异物。

### 2.2 浸膏粉总脂肪油含量

取薏苡仁浸膏粉适量,精密称定质量( $m_1$ ),置索氏提取器滤纸筒中,在圆底烧瓶中加入石油醚( $60 \sim 90^\circ\text{C}$ ),加热回流提取(5 h)直至脂肪油提尽,收集提取液,置已恒重的蒸发皿(质量为  $m_2$ )中,在水浴上低温蒸干,在  $100^\circ\text{C}$  干燥 1 h,移置干燥器中,冷却 30 min,精密称定质量( $m_3$ ),计算样品的脂肪油含量,重复 3 次,求平均值。脂肪油含量(%) =  $(m_3 - m_2)/m_1 \times 100\%$ 。

### 2.3 颗粒制备

干压条件:采用菱形纹理辊轮,辊轮直径 120 mm、宽 20 mm,液压压力 80 bar,使用螺杆负反馈系统控制辊轮间距为 1.5 mm,辊轮转速为  $2.8 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,送料速度  $18.7 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,整粒频率 30 Hz,整粒 20 目。在环境温度为  $20^\circ\text{C}$ ,环境相对湿

度为 (30±5) %。将混合均匀的粉末用干法制粒机压成条带, 每份粉末质量 300 g; 经破碎机破碎, 收集过 1 号筛至 5 号筛间的颗粒, 测定“2.1”项下指标。

2.4 薏苡仁浸膏粉脱脂前后性质对比制备

取脱脂前后的薏苡仁浸膏粉, 按“2.2”项下方法制备颗粒, 测定各指标。由表 1 可知, 脱脂

后薏苡仁浸膏粉堆密度提高, 粒径增加, 休止角减少, 结块强度明显提升, 在不添加填充剂的情况下可制成颗粒, 但颗粒脆碎度较大, 说明脂肪油是影响颗粒成型的主要原因之一, 因此, 选择合适填充剂对颗粒成型非常必要。

表 1 薏苡仁浸膏粉脱脂前后粉体学性质对比 (n = 3)

Tab 1 Properties of *Coicis Semen* extract powder before and after the defatting (n = 3)

| 浸膏粉 | 脂肪油含量 / % | 结块强度 / (g · cm <sup>-3</sup> ) | D <sub>90</sub> / μm | 堆密度 / (g · cm <sup>-3</sup> ) | 休止角 / °    | 溶化性  | 成型率 / % | 脆碎度 / %    |
|-----|-----------|--------------------------------|----------------------|-------------------------------|------------|------|---------|------------|
| 未脱脂 | 1.87±0.01 | 67.43±2.20                     | 104.26±0.53          | 0.27±0.00                     | 46.13±0.21 | 部分未溶 | /       | /          |
| 脱脂  | /         | 223.36±3.13                    | 115.83±0.36          | 0.35±0.01                     | 43.54±0.17 | 部分未溶 | 45.32   | 49.17±0.58 |

2.5 单因素试验

2.5.1 填充剂筛选 按表 2 分别称取各辅料, 与薏苡仁浸膏粉按质量 1 : 1 混匀, 按“2.3”项下方法制备颗粒, 测定各指标。由表 2 可知, 含 MCC、可溶性淀粉、糊精、HPMC 的颗粒溶化性较差。β-CD 对粉体结块强度的改善效果最优, 除乳糖外, 颗粒

成型率和脆碎度大小与结块强度大小次序一致。

上述结果表明, β-CD 是薏苡仁颗粒的最佳填充剂, 其缺点是价格较高。麦芽糊精和乳糖也可选择, 但部分患者可能出现乳糖不耐受。选择 β-CD 和价格低廉的麦芽糊精合用, 期望能改善制粒效果, 降低生产成本。

表 2 填充剂种类对薏苡仁干法制粒的影响 (n = 3)

Tab 2 Effect of different excipients on the dry granulation of *Coicis Semen* (n = 3)

| 样品      | 结块强度 / (g · cm <sup>-3</sup> ) | 成型率 / % | 脆碎度 / %    | 堆密度 / (g · cm <sup>-3</sup> ) | 休止角 / °    | 溶化性  |
|---------|--------------------------------|---------|------------|-------------------------------|------------|------|
| MCC     | 381.61±3.61                    | 71.69   | 31.28±0.41 | 0.64±0.02                     | 41.83±0.26 | 部分未溶 |
| 乳糖      | 387.89±9.78                    | 75.63   | 31.91±0.36 | 0.65±0.01                     | 41.38±0.27 | 溶化   |
| 可溶性淀粉   | 212.88±3.22                    | 45.83   | 49.76±0.21 | 0.71±0.01                     | 45.85±0.22 | 部分未溶 |
| 糊精      | 309.21±3.44                    | 47.36   | 39.58±0.25 | 0.69±0.01                     | 44.29±0.21 | 部分未溶 |
| 麦芽糊精    | 417.96±3.55                    | 73.21   | 20.61±0.33 | 0.62±0.01                     | 40.31±0.15 | 溶化   |
| β-CD    | 425.48±4.57                    | 87.24   | 15.13±0.57 | 0.63±0.01                     | 40.60±0.10 | 溶化   |
| HPMC    | 335.19±4.25                    | 55.13   | 37.94±0.61 | 0.71±0.02                     | 45.32±0.15 | 部分未溶 |
| PVP k30 | 352.54±4.00                    | 64.23   | 34.20±0.39 | 0.66±0.01                     | 41.26±0.24 | 溶化   |

2.5.2 β-CD 和麦芽糊精的最佳比例 按表 3 填充剂比例和“2.3”项下方法制备薏苡仁颗粒 (薏苡仁浸膏粉:填充剂为 1 : 1), 测定各项指标。结果 β-CD 与麦

芽糊精比例为 1 : 1 的粉体指标和颗粒指标不理想, 而其他比例的各项指标间比较接近, 考虑成本, 故确定填充剂中 β-CD 与麦芽糊精的比例为 2 : 1。

表 3 β-CD 与麦芽糊精的不同比例对薏苡仁干法制粒的影响 (n = 3)

Tab 3 Effect of different ratios of β-CD and maltodextrin on the dry granulation of *Coicis Semen* (n = 3)

| β-CD : 麦芽糊精 | 结块强度 / (g · cm <sup>-3</sup> ) | 成型率 / % | 脆碎度 / %    | 堆密度 / (g · cm <sup>-3</sup> ) | 休止角 / °    | 溶化性 |
|-------------|--------------------------------|---------|------------|-------------------------------|------------|-----|
| 1 : 1       | 386.35±3.25                    | 76.34   | 18.35±0.46 | 0.61±0.01                     | 41.50±0.05 | 溶化  |
| 2 : 1       | 420.83±2.81                    | 83.21   | 13.46±0.27 | 0.58±0.01                     | 40.96±0.57 | 溶化  |
| 3 : 1       | 425.69±3.56                    | 84.36   | 13.38±0.53 | 0.58±0.01                     | 40.11±0.53 | 溶化  |
| 4 : 1       | 428.13±2.31                    | 85.14   | 13.22±0.34 | 0.57±0.00                     | 39.89±0.80 | 溶化  |

2.5.3 浸膏粉与填充剂的比例筛选 按表 4 浸膏粉与填充剂比例称取物料, 制备薏苡仁颗粒, 测定各项指标。发现随着填充剂的比例增大, 结块强度、成型

率逐渐减小, 脆碎度则反之, 当填充剂含量为 40%、30% 各指标差别不明显, 故选择 30% 为填充剂比例。

表 4 填充剂用量对薏苡仁干法制粒的影响 (n = 3)

Tab 4 Effect of amount of excipients on the dry granulation of *Coicis Semen* (n = 3)

| 填充剂用量 / % | 结块强度 / (g · cm <sup>-3</sup> ) | 成型率 / % | 脆碎度 / %    | 堆密度 / (g · cm <sup>-3</sup> ) | 休止角 / °    | 溶化性 |
|-----------|--------------------------------|---------|------------|-------------------------------|------------|-----|
| 40        | 400.96±5.88                    | 79.61   | 22.59±0.65 | 0.55±0.02                     | 40.79±0.93 | 溶化  |
| 30        | 390.88±3.08                    | 78.87   | 23.46±0.44 | 0.56±0.01                     | 40.89±0.82 | 溶化  |
| 20        | 342.11±2.39                    | 64.48   | 28.71±0.51 | 0.67±0.00                     | 47.82±0.76 | 溶化  |

**2.5.4 粉体结块强度与颗粒指标的相关性分析** 采用 Pearson 相关性分析方法, 将单因素试验中粉体结块强度数据与颗粒的指标进行相关性分析, 结果见表 5。可见粉体结块强度与颗粒成型率成正相关性 ( $P < 0.01$ ), 说明结块强度较高的粉末干压时

可以得到更多的颗粒。粉体结块强度与颗粒的脆碎度、堆密度、休止角均成负相关性 ( $P < 0.01$ ), 提示结块强度较高的粉末制成的颗粒具有较大的堆密度、流动性和强度。

表 5 薏苡仁粉体与颗粒参数的相关性  
Tab 5 Correlation between *Coicis Semen* extract powder and particle indicators

| 参数   | 结块强度      | 成型率       | 脆碎度     | 堆密度     | 休止角 |
|------|-----------|-----------|---------|---------|-----|
| 结块强度 | 1         |           |         |         |     |
| 成型率  | 0.893**   | 1         |         |         |     |
| 脆碎度  | - 0.904** | - 0.939** | 1       |         |     |
| 堆密度  | - 0.687** | - 0.766** | 0.737** | 1       |     |
| 休止角  | - 0.823** | - 0.768** | 0.724** | 0.649** | 1   |

注 (Note): \*\* $P < 0.01$  (双尾) (two tailed)。

**2.5.5 辊轮压力考察** 按表 6 中的压力制备薏苡仁颗粒, 测定各项指标。结果显示, 当压力增大时, 颗粒成型率增加且颗粒脆碎度下降, 原因是辊轮压力增加, 粒子易发生塑性变形, 结合得更加牢固<sup>[7]</sup>。压力

在 80 ~ 100 bar, 成型率以及脆碎度变化不明显, 原因是辊轮压力存在临界点, 在临界点以下时, 颗粒成型率随压力增大而显著增加, 脆碎度则显著减少, 超过临界点后成型率缓慢增加、脆碎度则缓慢减少<sup>[8]</sup>。

表 6 辊轮压力对薏苡仁干法制粒的影响 ( $n = 3$ )  
Tab 6 Effect of roller pressure on the dry granulation of *Coicis Semen* ( $n = 3$ )

| 辊轮压力 /bar | 成型率 /% | 脆碎度 /%       | 堆密度 / ( $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ) | 休止角 /°       | 溶化性 |
|-----------|--------|--------------|-------------------------------------------|--------------|-----|
| 20        | 13.59  | 87.36 ± 0.64 | 0.67 ± 0.01                               | 46.32 ± 0.31 | 溶化  |
| 40        | 38.76  | 67.62 ± 0.34 | 0.65 ± 0.01                               | 44.50 ± 0.68 | 溶化  |
| 60        | 67.53  | 43.61 ± 0.51 | 0.58 ± 0.01                               | 42.13 ± 0.53 | 溶化  |
| 80        | 78.87  | 23.46 ± 0.26 | 0.56 ± 0.01                               | 40.59 ± 0.82 | 溶化  |
| 100       | 79.44  | 22.13 ± 0.42 | 0.55 ± 0.01                               | 40.58 ± 0.53 | 溶化  |

**2.5.6 辊轮转速考察** 按表 7 中的辊轮转速制备薏苡仁颗粒, 测定各项指标。结果显示, 当辊轮转速加快时, 颗粒成型率逐渐减少, 脆碎度逐渐增加, 当辊轮转速增加至  $6.8 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  时, 颗粒

脆碎度达到 48.88%。其主要原因是随着辊轮转速的增大, 物料在辊轮间受压时间减少, 粉体粒子塑性变形或破碎不充分, 导致颗粒结构松散<sup>[9]</sup>。

表 7 辊轮转速对薏苡仁干法制粒的影响 ( $n = 3$ )  
Tab 7 Effect of roller speed on the dry granulation of *Coicis Semen* ( $n = 3$ )

| 辊轮转速 / ( $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ ) | 成型率 /% | 脆碎度 /%       | 堆密度 / ( $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ) | 休止角 /°       | 溶化性 |
|---------------------------------------------|--------|--------------|-------------------------------------------|--------------|-----|
| 2.8                                         | 78.87  | 23.46 ± 0.26 | 0.56 ± 0.01                               | 40.59 ± 0.82 | 溶化  |
| 3.8                                         | 72.96  | 23.79 ± 0.67 | 0.57 ± 0.00                               | 40.67 ± 0.00 | 溶化  |
| 4.8                                         | 67.36  | 25.47 ± 0.14 | 0.58 ± 0.00                               | 41.12 ± 1.47 | 溶化  |
| 5.8                                         | 59.50  | 28.26 ± 0.26 | 0.60 ± 0.00                               | 42.53 ± 0.47 | 溶化  |
| 6.8                                         | 43.15  | 48.88 ± 0.19 | 0.63 ± 0.00                               | 44.00 ± 0.17 | 溶化  |

**2.6 配方颗粒处方、制备工艺优化**

**2.6.1 正交试验设计** 根据单因素试验考察结果, 选取填充剂用量 (A)、辊轮压力 (B)、辊轮转速 (C) 为考察因素, 按  $L_9 (3^4)$  表进行试验设计, 以结块强度、颗粒成型率、脆碎度为综合评分评价指标 (各指标的权重为 0.3、0.4、0.3, 综合评分 = 结块强度 / 最大结块强度 × 0.3 + 成型率 / 最大成型率 × 0.4 - 脆碎度 / 最大脆碎度 × 0.3), 试验因素

水平见表 8, 结果和数据统计分析见表 9、10。

由表 9 直观分析得知, 3 个因素的影响大小顺序: 填充剂用量 > 辊轮压力 > 辊轮转速; 由表 10 方差分析结果表明, 因素 A 和 B 对制粒工艺有显著影响 ( $P < 0.05$ ), 考虑到薏苡仁提取物性质的波动性以及生产效率, 确定最佳工艺为  $A_3B_3C_2$ , 即填充剂用量 40%、辊轮压力 100 bar、辊轮转速  $3.8 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

**2.6.2 验证试验** 按最佳工艺条件进行 3 次验证试



表 8 薏苡仁配方颗粒干法制粒工艺正交试验因素水平  
Tab 8 Factor and level of the orthogonal test for the dry granulation of Coicis Semen formula granules

| 水平 | A. 填充剂用量 /% | B. 辊轮压力 /bar | C. 辊轮转速 / (r·min <sup>-1</sup> ) |
|----|-------------|--------------|----------------------------------|
| 1  | 20          | 60           | 2.8                              |
| 2  | 30          | 80           | 3.8                              |
| 3  | 40          | 100          | 4.8                              |

表 9 薏苡仁配方颗粒干法制粒工艺正交试验结果  
Tab 9 Orthogonal test for the dry granulation of Coicis Semen formula granules

| No.            | A     | B     | C     | D (空 结块强度 成型 脆碎 综合<br>白) / (g·cm <sup>-3</sup> ) 率 /% 度 /% 评分 |
|----------------|-------|-------|-------|---------------------------------------------------------------|
| 1              | 1     | 1     | 1     | 1 358.69 58.84 45.75 0.23                                     |
| 2              | 1     | 2     | 2     | 2 379.36 65.78 32.95 0.36                                     |
| 3              | 1     | 3     | 3     | 3 373.36 64.94 32.66 0.36                                     |
| 4              | 2     | 1     | 2     | 3 387.69 68.65 32.98 0.38                                     |
| 5              | 2     | 2     | 3     | 1 411.69 75.28 29.03 0.46                                     |
| 6              | 2     | 3     | 1     | 2 419.89 77.79 19.89 0.53                                     |
| 7              | 3     | 1     | 3     | 2 410.89 72.29 26.80 0.46                                     |
| 8              | 3     | 2     | 1     | 3 423.14 78.98 20.48 0.54                                     |
| 9              | 3     | 3     | 2     | 1 431.62 83.54 16.69 0.59                                     |
| K <sub>1</sub> | 0.317 | 0.356 | 0.434 | 0.426                                                         |
| K <sub>2</sub> | 0.457 | 0.452 | 0.445 | 0.451                                                         |
| K <sub>3</sub> | 0.528 | 0.494 | 0.423 | 0.425                                                         |
| R              | 0.212 | 0.137 | 0.011 | 0.025                                                         |

表 10 方差分析  
Tab 10 Variance analysis

| 因素 | 离差平方和 | 自由度 | 均方    | F 值    | 显著性    |
|----|-------|-----|-------|--------|--------|
| A  | 0.070 | 2   | 0.035 | 54.856 | < 0.05 |
| B  | 0.030 | 2   | 0.015 | 23.455 | < 0.05 |
| C  | 0.001 | 2   | 0.000 | 0.583  | > 0.05 |
| D  | 0.001 | 2   | 0.001 | 1.000  | > 0.05 |
| 误差 | 0.011 | 2   |       |        |        |

验,从表 11 结果可知,颗粒的成型率较高,硬度适中,3 批样品的各项指标差异性小,并且发现压制坯片时,未见黏轮,坯片产出连续完整,颗粒色泽均一,溶化性良好。与传统湿法制粒相比,无需润湿剂的使用,避免了湿和热对药物性质的影响,适合大规模生产,表明该制粒工艺稳定可行。

表 11 验证试验结果  
Tab 11 Verification test

| 试验号   | 结块强度 / (g·cm <sup>-3</sup> ) | 成型率 /% | 脆碎度 /% | 综合评分 |
|-------|------------------------------|--------|--------|------|
| 1     | 430.59                       | 83.32  | 17.21  | 0.59 |
| 2     | 431.83                       | 82.66  | 17.05  | 0.58 |
| 3     | 429.36                       | 81.70  | 16.94  | 0.57 |
| 平均值   | 430.59                       | 82.56  | 17.07  | 0.58 |
| RSD/% | 1.2                          | 0.99   | 0.80   | 1.0  |

图 1 左侧为未经处方以及制粒工艺优化的薏

苡仁浸膏粉经辊压后无法制成条带,仅为细粉;右侧为按最佳工艺条件成功制备的薏苡仁颗粒。



图 1 薏苡仁配方颗粒成型前后对比  
Fig 1 Coicis Semen formula granules before and after the molding

2.7 数据处理

采用 Excel 2010 汇总和处理数据;采用 Origin 2021 对正交试验数据进行方差与极差分析,采用 IBM SPSS Statistics 21 进行相关性分析,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

3 讨论

干法制粒压制过程是在压力作用下,粒子经过重排、变形、破碎、黏结形成条带<sup>[10-11]</sup>。而薏苡仁提取物黏结性差,难以形成条带。主要原因是由于薏苡仁提取物中含有 1.8% 左右油脂性成分,该成分以不饱和脂肪酸的三酰甘油形式存在<sup>[12-13]</sup>,此类化合物在粒子表面可形成润滑膜,明显降低粒子间的黏聚力和摩擦力,即使在较高的辊压力时,也难以形成坯片<sup>[14-15]</sup>。 $\beta$ -CD 是一种优秀的填充剂,能够较好地提高固体制剂的抗张强度以及降低材料的屈服压力<sup>[16]</sup>,其变形机制主要为塑性形变;麦芽糊精价格低廉,在固体制剂成型时具有较好的黏性和压缩成型性<sup>[17]</sup>;MCC 具有较长的纤维素分子链通过氢键作用形成结晶结构,水分子难以进入<sup>[18]</sup>,影响颗粒的溶化性,因此不作考虑。试验结果表明,以  $\beta$ -环糊精与麦芽糊精(2:1)为填充剂,经过正交试验优化工艺参数,能够明显提高颗粒成型率、降低生产成本。另外,试验发现干法制粒时不加润滑剂,压制过程流畅,没有出现黏轮现象。

粉末结块是食品以及药品行业普遍存在的现象,是自由流动的粉末由于自身的性质以及外界施加的机械条件而形成块状物质,这与粉末在制剂过程中通过受力压缩形成固体制剂的原理相似。结块强度是对粒子黏聚能力的量化指标,理想的结块强度试验可以提供粉末在受力时的黏聚程度和强度<sup>[19]</sup>。干法制粒与粉末的黏聚力有着密切的联系,通常测量粉末黏聚力的试验有压缩试验、剪切试验、拉伸试验等<sup>[20]</sup>。本研究采用质构仪中

的 Powder Flow Analyser 程序, 利用测试中提供的结块强度指标量化干法制粒前粉体的黏聚力。采用 Pearson 相关性检验方法, 发现结块强度与颗粒成型率成正相关, 与脆碎度、休止角、堆密度成负相关, 提示结块强度可能是表征富含油脂浸膏粉性质的有用指标, 对于处方、工艺筛选和预测具有潜在应用前景, 值得进一步研究。

本文以薏苡仁中药浸膏粉为模型, 针对富含油脂的中药浸膏粉在干法制粒过程中遇到的颗粒成型率低这一难点, 对颗粒制备过程中涉及的填充剂的种类和用量以及工艺参数进行筛选和优化, 应用该研究优化后的最优处方及工艺参数可以明显提高颗粒成型率, 并采用结块强度表征中药浸膏粉的黏聚力, 从而对此类中药配方颗粒生产过程控制提供思路与方法, 帮助建立中药配方颗粒共性技术, 实现富含油脂的配方颗粒干法制粒生产过程的可控性、连续性、高效性。

## 参考文献

- [1] 朱佩佩, 李耿, 杨洪军. 中药配方颗粒趋势分析与监管策略的思考[J]. 中国中药杂志, 2024, 49 (15): 4249-4260.
- [2] 岳佑淞, 张璐, 王艳丽, 等. 中药配方颗粒汤剂与传统汤剂对比研究进展与有关问题分析[J]. 医药导报, 2023, 42 (7): 1033-1038.
- [3] 姚瑞雯, 张爱玲, 鲁铁, 等. 温度对中药浸膏粉吸湿动力学的影响[J]. 中草药, 2024, 55 (19): 6546-6554.
- [4] 刘慧, 罗晓健, 何雁, 等. 麦芽糊精对党参喷干粉吸湿特性及热力学性质的影响[J]. 中国中药杂志, 2024, 49 (6): 1540-1548.
- [5] Mahmah O, Adams MJ, Omar CS, et al. Roller compaction: ribbon splitting and sticking[J]. Int J Pharm, 2019, 559: 156-172.
- [6] 刘巧丽, 罗晓健, 梁红波, 等. 中药浸膏粉与填充剂共混物的玻璃化转变温度对巨安神制剂干法制粒的影响[J]. 中国试验方剂学杂志, 2017, 23 (13): 13-17.
- [7] Wang LF, Zhao LJ, Hong YL, et al. Attribute transmission and effects of diluents and granulation liquids on granule properties and table quality for high shear wet granulation and table process[J]. Int J Pharm, 2023, 642: 123177.
- [8] 郭成杰, 鲜洁晨, 胡佳亮, 等. 基于特征属性相似性的疏风解毒胶囊安慰剂干法制粒工艺研究[J]. 中国新药杂志, 2021, 30 (22): 2098-2104.
- [9] 张青铃, 罗友华, 许光辉, 等. 干法制粒工艺在中药口服固体制剂制备中的应用[J]. 中国现代中药, 2020, 22 (5): 827-834.
- [10] Mollan MJ, Celik M. The effects of humidity and storage time on the behavior of maltodextrins for direct compression[J]. Int J Pharm, 1995, 114 (1): 23-32.
- [11] Al Asady RB, Hounsflow MJ, Salman AD. Roller compaction: the effect of plastic deformation of primary particles with wide range of mechanical properties[J]. Drug Deliv Transl Res, 2018, 8 (6): 1615-1634.
- [12] 吴静雨, 陈晓凡, 徐万爱, 等. 薏苡仁活性成分研究进展[J]. 中国中药杂志, 2024, 49 (6): 1474-1484.
- [13] 马振中, 李晓琦, 黄萌萌, 等. 不同产地薏苡仁药材中甘油三酯和脂肪酸含量测定及其质量评价[J]. 中草药, 2020, 51 (1): 210-215.
- [14] Pan L, Lian JL, Wu YL, et al. Tribological properties of polyaromatic organics as lubricating grease[J]. Wear, 2024, 548-549: 205378.
- [15] Tian HX, Zheng XX, Hu D, et al. Research progress on chemical components and quality control of coix seed[J]. Guizhou Agric Sci, 2017, 45 (7): 82-87.
- [16] Xi XJ, Zhu YG, Tong YP, et al. Assessment of the genetic diversity of different Job's tears (*Coix lacryma-jobi* L.) accessions and the active composition and anticancer effect of its seed oil[J]. PLoS One, 2016, 11 (4): e0153269.
- [17] Pande GS, Shangraw RF. Characterization of  $\beta$ -cyclodextrin for direct compression table[J]. Int J Pharm, 1994, 101 (1-2): 71-80.
- [18] Tarchoun AF, Trache D, Klapptke TM. Microcrystalline cellulose from posidonia oceanica brown algae: extraction and characterization[J]. Int J Biol Macromol, 2019, 138: 837-845.
- [19] Ghosal S, Indira TN, Bhattacharya S. Agglomeration of a model food powder: effect of maltodextrin and gum Arabic dispersions on flow behavior and compacted mass[J]. J Food Eng, 2010, 96 (2): 222-228.
- [20] 李延华, 王伟军, 郭亮, 等. 食品粉末颗粒间的相互作用及结块行为的研究进展[J]. 中国粮油学报, 2019, 34 (3): 126-132.

(收稿日期: 2024-11-08; 修回日期: 2025-01-15)

# 紫草素通过 FOXA2-SIRT1 信号轴抑制心肌细胞焦亡的研究

童中艺<sup>1,4</sup>, 汪柯<sup>1</sup>, 郭涛<sup>2\*</sup>, 刘艳娟<sup>3</sup> (1. 中南大学湘雅二医院病理科, 长沙 410011; 2. 中南大学湘雅二医院急诊医学科, 长沙 410011; 3. 湖南省人民医院急救研究所, 长沙 410119; 4. 湖南省肿瘤致病基因检测与诊断临床医学研究中心, 长沙 410011)

**摘要:** **目的** 探讨紫草素在脂多糖 (LPS) 与三磷酸腺苷 (ATP) 所致心肌细胞焦亡中的作用及机制。**方法** 采用 Western blot 检测 FOXA2、NLRP3、p20、SIRT1 蛋白表达水平, 免疫荧光检测 FOXA2 核移位情况。采用 ELISA 检测细胞上清液中炎症因子白细胞介素 (IL)-18、IL-1 $\beta$  的水平。采用 CHIP-PCR、荧光素酶报告基因实验检测 FOXA2 与 SIRT1 相互作用。**结果** 在 LPS 加 ATP 刺激的 H9c2 细胞模型中, FOXA2 mRNA 及 FOXA2 蛋白水平下调, 细胞核内分布减少, 紫草素可上调和激活 FOXA2, 从而逆转 LPS 的上述作用。FOXA2 siRNA 转染心肌细胞可阻断紫草素对 LPS 所致心肌细胞炎症及焦亡的保护作用, 削弱其对 NLRP3 炎症小体活化的抑制作用, 过表达 SIRT1 质粒后可以恢复紫草素的抗炎和抗焦亡作用。CHIP 实验发现 FOXA2 可直接与 SIRT1 启动子结合, 荧光素酶报告基因分析证实紫草素可以增强 FOXA2 对 SIRT1 基因的转录活性。**结论** 紫草素抑制 LPS 所致心肌细胞焦亡, 可能与激活 FOXA2-SIRT1 信号轴有关。

**关键词:** 紫草素; FOXA2; SIRT1; 焦亡

**中图分类号:** R285.5

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-2981(2025)08-2259-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.017

## Inhibitory effect of shikonin on the pyroptosis of cardiomyocytes via the FOXA2-SIRT1 signaling axis

TONG Zhong-yi<sup>1,4</sup>, WANG Ke<sup>1</sup>, GUO Tao<sup>2\*</sup>, LIU Yan-juan<sup>3</sup> (1. Department of Pathology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011; 2. Department of Emergency, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011; 3. Emergency Research Institute, Hunan Provincial People's Hospital, Changsha 410119; 4. Hunan Clinical Medical Research Center for Cancer Pathogenic Genes Testing and Diagnosis, Changsha 410011)

**Abstract: Objective** To determine the role and mechanism of shikonin in lipopolysaccharide (LPS) and adenosine triphosphate (ATP)-induced cardiomyocyte pyroptosis. **Methods** Western blot was used to detect the expression levels of FOXA2, NLRP3, p20, and SIRT1. Immunofluorescence was utilized to investigate the nuclear translocation of FOXA2. The levels of inflammatory cytokines IL-18 and IL-1 $\beta$  in cell supernatants were measured by ELISA. The interaction between FOXA2 and SIRT1 was detected using CHIP-PCR and luciferase reporter assays. **Results** In the H9c2 cell model stimulated by LPS and ATP, the expression of FOXA2 at the mRNA and FOXA2 protein levels and its nuclear translocation were decreased. In contrast, shikonin reversed these changes. Furthermore, FOXA2 siRNA blocked the protective effect of shikonin on LPS-induced cardiomyocyte inflammation and pyroptosis and weakened its inhibitory effect on the activation of NLRP3 inflammasome. However, these effects of shikonin could be restored after the overexpression of SIRT1 plasmid. Further CHIP-PCR found that FOXA2 directly bound the FOXA2-binding element region of the SIRT1 promoter. The luciferase reporter gene analysis found that shikonin enhanced the transcription activity of FOXA2 when binding the SIRT1 gene. **Conclusion** Shikonin inhibits LPS and ATP-induced cardiomyocyte pyroptosis, which may be related to the activation of FOXA2-SIRT1 signaling axis.

**Key words:** shikonin; FOXA2; SIRT1; cardiomyocyte pyroptosis

**基金项目:** 湖南省自然科学基金 (No. 2022JJ30807); 湖南省自然科学基金 (No. 2024JJ5478); 长沙市自然科学基金 (No. kq2403083)。

**作者简介:** 童中艺, 女, 博士研究生, 副主任技师, 主要从事脓毒症病理生理学机制研究, email: zhongyitong@csu.edu.cn \*通信作者:

郭涛, 男, 副主任医师, 主要从事脓毒症的转化医学研究, email: guotao17@csu.edu.cn



脓毒症是宿主对感染反应失调引起的危及生命的器官功能障碍,严重者可进展为休克而死亡,其致死率居全球首位<sup>[1]</sup>。脓毒症心肌损伤是脓毒症常见并发症,可导致心功能不全,表现为射血分数和左室短轴缩短率降低等<sup>[2-3]</sup>。脓毒症心肌损伤的病理生理机制极其复杂,且无特异性治疗措施。焦亡是细胞内炎症小体复合物通过一系列反应激活 Gasdermin 家族蛋白,破坏细胞膜完整性并释放细胞炎性物质、诱发炎症反应的死亡形式<sup>[4]</sup>。许多研究表明,细胞焦亡参与调控脓毒症心肌损伤的发生发展<sup>[5]</sup>。因此,寻找精准调控心肌细胞焦亡的药物有望成为减轻脓毒症心肌损伤的新策略。

紫草素(shikonin, SHI)是中药紫草的主要活性成分,具有抗血管生成、抗炎症、抗糖酵解等多重生物特性<sup>[6]</sup>。大量研究表明,紫草素在癌症、神经炎症、骨关节炎、肥厚性瘢痕和子宫内膜异位等疾病治疗中发挥保护作用<sup>[7-9]</sup>。本课题组前期研究发现紫草素能够提高脓毒症小鼠生存率,并改善预后,其作用机制与调控沉默信息调节因子 1(silent information regulator 1, SIRT1)抑制心肌细胞炎症小体活化有关,但紫草素调控 SIRT1 的分子机制尚未阐明<sup>[10]</sup>。本研究旨在从细胞层面深入探究紫草素对脓毒症心肌损伤所引发的 SIRT1 表达变化的分子调控机制,为紫草素在脓毒症治疗领域的临床应用奠定坚实的理论基础。

叉头框蛋白 A2(forkhead Box A2, FOXA2)是叉头框蛋白家族成员之一,为机体重要转录因子,参与调控胚胎发育、糖类及脂质等物质代谢、细胞增殖、分化及肿瘤的发生和转移等重要生物学过程<sup>[11-12]</sup>。但其是否调控 SIRT1 参与脓毒症心肌细胞焦亡的发生发展目前未见研究报道。笔者前期通过 hTF(human transcription factor)预测软件发现小鼠 *SIRT1* 基因启动子区存在 33 个转录因子的结合位点,其中 FOXA2 为启动 *SIRT1* 转录的重要转录因子。本研究通过干预 FOXA2 与 SIRT1 的表达水平,旨在明确紫草素是否通过转录因子 FOXA2 调控 SIRT1 的表达,从而减轻脓毒症引起的心肌损伤。

## 1 材料

### 1.1 细胞株

H9c2 细胞(中国科学院上海细胞库)。

### 1.2 试剂

脂多糖(LPS)(纯度 $\geq 97\%$ )、三磷酸腺苷(ATP)(纯度 $\geq 99\%$ )(Sigma-Aldrich);紫草素(纯度 $\geq 98\%$ , Sigma 公司);磷酸盐缓冲液(PBS,自行配制);DMEM 培养基、澳洲胎牛血清、二甲基亚砜、ECL 超敏发光液(美国 Gibco 公司);BCA

蛋白定量试剂盒(北京鼎国公司);CCK8 试剂盒(武汉三鹰生物技术公司);PcDNA 3.1 质粒、pRL-TK、*FOXA2* 组成活化型质粒、报告基因质粒及突变质粒(上海吉凯公司);*SIRT1* siRNA(广州锐博公司);质粒提取试剂盒(美国 Omega 公司);Dual-Luciferase Reporter Assay 试剂盒(美国 Promega 公司);*FOXA2*、*SIRT1*、*NLRP3*、Caspase-1 单克隆抗体(美国 CST 公司);GAPDH 单克隆抗体(武汉艾美捷科技有限公司)。白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )和白细胞介素-18(IL-18)ELISA 检测试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

### 1.3 仪器

CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo 公司);超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);超速离心机、低温高速台式离心机(德国 Eppendorf 公司);倒置相差显微镜、荧光显微镜(日本 Olympus 公司);PowerPac Basic 型电泳仪、Trans-Blot Turbo 型全能蛋白转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);Omega Lum C 化学发光成像系统(美国 Aplegen 公司);GloMax 化学发光检测系统(美国 Promega 公司);ELx800 光吸收酶标仪、荧光酶标仪(美国 BioTek 公司)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

H9c2 细胞用 DMEM 培养液(含 10% 胎牛血清与 1% 双抗)于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。待细胞生长至对数生长期、融合度为 80% 时传代或铺板。

### 2.2 实验分组

将对数生长期 H9c2 细胞按以下处理进行分组:

① 正常对照组(Control):常规培养;② LPS + ATP 组:2  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  LPS 与 5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ATP 处理 24 h;③ 紫草素治疗组(LPS + ATP + SHI 组):5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  紫草素预处理 2 h 后再采用 2  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  LPS 与 5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ATP 处理 24 h;④ *FOXA2* siRNA 组(LPS + ATP + SHI + si-*FOXA2* 组):在 LPS 加 ATP,紫草素处理的基础上,转染 *FOXA2* siRNA 48 h 后再采用 2  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  LPS 与 5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ATP 处理 24 h;⑤ *FOXA2* siRNA + *SIRT1* OE 组(LPS + ATP + SHI + si-*FOXA2* + OE-*SIRT1* 组):在 LPS 加 ATP,紫草素处理的基础上,转染 *FOXA2* siRNA 24 h 后再转染 *SIRT1* 过表达质粒,24 h 后再采用 2  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  LPS 与 5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ATP 处理 24 h。

### 2.3 CCK8 检测

① 将对数生长期 H9c2 细胞接种于 96 孔板,过夜培养后给药处理,紫草素使用浓度分别为 0(溶剂对照组 Control)、1.25、2.5、5 及 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。给药 24 h 后每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK8 试剂,培养箱孵育 3

h 后, 全功能微孔板检测仪检测光密度值 (*OD*) 值。  
② 对于 LPS + ATP 处理组, H9c2 细胞接种 96 孔板, 过夜培养后给药处理, 紫草素使用浓度分别为 0 (溶剂对照组 Control), 1.25、2.5 及 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。按前述方法处理并检测 *OD* 值。使用酶标仪测定波长 490 nm 处的吸光度 (*A*) 值, 并据此计算细胞存活率。细胞存活率 = (样品 *A* 值 - 校正孔 *A* 值) / (空白组 *A* 值 - 校正孔 *A* 值)  $\times 100\%$ 。

2.4 siRNA 转染

将对数生长期 H9c2 细胞以  $1 \times 10^6$  个 / 孔接种至 6 孔板, 按照“2.2”项下不同分组处理, 转染步骤按锐博转染说明书操作。首先往 120  $\mu\text{L}$  1X ribo FECT CP buffer 中加入 5  $\mu\text{L}$  20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  FOXA2 siRNA 储存液, 上下颠倒使其充分混匀。加入 12  $\mu\text{L}$  ribo FECT CP reagent 轻轻吹打混匀, 室温孵育 15 min 制备转染复合物。将上述复合物逐滴加入 6 孔板中继续培养。

2.5 蛋白质免疫印记 (Western blot)

将对数生长期 H9c2 细胞以  $1 \times 10^6$  个 / 孔接种至 6 孔板, 按照“2.2”项下不同分组处理后, 用 PBS 清洗 3 次, RIPA 裂解液裂解细胞, BCA 试剂盒定量分析蛋白含量。将蛋白煮沸变性, 取 30  $\mu\text{g}$  总蛋白进行 SDS-PAGE 分离, 转膜, 5% 脱脂奶粉封闭, 洗膜。加入一抗 (1 : 1000 稀释) 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。TBST 清洗 3 次后, 加入二抗 (1 : 5000 稀释) 室温孵育 1 h。TBST 清洗 3 次后, 加入 ECL 发光液后成像采集, 以 GAPDH 作为内参, 分析目的蛋白的相对表达情况。

2.6 qRT-PCR

将对数生长期 H9c2 细胞以  $1 \times 10^6$  个 / 孔接种至 6 孔板, 按照“2.2”项下不同分组处理后, 采用 PBS 清洗 3 次, 加入 Trizol 溶剂提取细胞总 RNA, 并将其反转录成 cDNA 后进行 PCR 扩增实验。PCR 引物如表 1 所示。

表 1 引物序列  
Tab 1 Primer sequences

| 基因             | 正向引物 (5' -3')         | 反向引物 (5' -3')          |
|----------------|-----------------------|------------------------|
| FOXA2          | CGACTGGAGCAGCTACTACGC | ATGTGTTTCATGCCATTCATCC |
| $\beta$ -actin | AAGTGTGACGTTGACATCCG  | TCTGCATCCTGTTCAGCAATG  |

2.7 酶联免疫吸附实验 (ELISA)

将对数生长期 H9c2 细胞以  $1 \times 10^6$  个 / 孔接种至 6 孔板, 按照“2.2”项下不同分组处理后收集细胞上清液保存于 -80  $^{\circ}\text{C}$  备用。ELISA 检测培养上清液中 IL-1 $\beta$  和 IL-18。所有操作严格按说明书步骤进行。

2.8 染色质免疫共沉淀 (CHIP-PCR)

将对数生长期 H9c2 细胞以  $1 \times 10^6$  个 / 孔接种至 6 孔板, 按照“2.2”项不同分组处理后加 1% 甲醛 (交联剂) 处理 10 min 并收集细胞, 超声破碎, 加入目的蛋白抗体让其与靶蛋白 -DNA 复合物相互结合, 加入 Protein A 使其结合抗体 -靶蛋白 -DNA 复合物并沉淀, 清洗沉淀下来的复合物, 解交联, 纯化富集的 DNA 片段并采用 PCR 分析目的基因。

2.9 双荧光素酶报告基因

将对数生长期 H9c2 细胞接种于 24 孔板中培养 24 h (80% 融合度), 将构建好的 SIRT1 突变质粒 (SIRT1-mutant 1: -665 ~ -654 bp, TCCGTGTG-CAGG; SIRT1-mutant 2: -1739 ~ -1728 bp, ACT-GCTGGCGTG) 或野生质粒 (SIRT1-WT: -665 ~ -654 bp, GAATGTTTACTT; -1739 ~ -1728 bp, CAGTATTTATTT) 与 FOXA2 表达质粒共转染至 H9c2 细胞, 5%CO<sub>2</sub>、37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中继续培养 24 h (80% 融合度), 收集蛋白并用于荧光素酶检测。加入底物, 测定荧光素酶活性, 并计算相对荧光强度。

2.10 细胞免疫荧光法

将对数生长期 H9c2 细胞接种至细胞爬片, 按照不同分组处理后 4% 多聚甲醛固定 20 min。PBS 清洗 3 次, 0.2% Triton X-100 处理 5 min 后再次用 PBS 清洗 3 次。5% 牛血清白蛋白 (BSA) 封闭 1 h。加入 FOXA2 一抗 (1 : 250 稀释) 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。PBS 清洗 3 次, 加入荧光二抗 (1 : 100 稀释) 避光孵育 1 h。DAPI 染核, 避光孵育 5 min。滴入封片剂封片。荧光显微镜观察 FOXA2 入核情况。

2.11 统计学分析

所有数据用 SPSS 25.0 和 GraphPad Prism 10 软件绘制。计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 根据方差齐性, 两组样本间比较用独立样本 *t* 检验或 Mann-Whitney *U* 检验, 多组间比较用单因素方差分析, 组间两两比较用 Turkey *H* 检验。 *P* < 0.05 认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不同剂量紫草素对 H9c2 细胞毒性效应的影响

分别采用不同浓度紫草素处理心肌细胞, 结果显示: 与 Control 组相比, 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的紫草素降低了细胞存活率 (见图 1A)。随后, 建立了 LPS + ATP 诱导的心肌细胞损伤模型, 并给予不同浓度紫草素处理, 结果显示: 与 Control 组相比, LPS + ATP 组心肌细胞生存率下降。分别给予不同浓度紫草素处理细胞后, 细胞存活率明显上升, 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  紫草素处理效果最为明显 (见图 1B)。



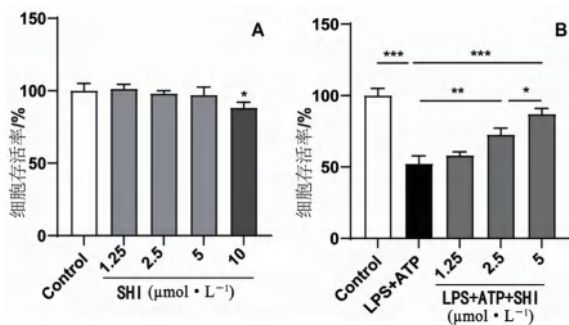


图1 不同浓度紫草素对细胞存活率的影响 ( $n = 3$ ,  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ )

Fig 1 Influence of different concentrations of shikonin on cell survival rate ( $n = 3$ ,  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ )

### 3.2 紫草素对 H9c2 细胞中 FOXA2 表达与核移位的影响

与 Control 组相比, LPS + ATP 组 FOXA2 mRNA 及 FOXA2 蛋白水平明显下降, 差异具有统计学意义, 而 SHI 单独处理组上述结果无改变。与 LPS + ATP 组相比, LPS + ATP + SHI 组 FOXA2 mRNA 及 FOXA2 蛋白表达水平明显上调 (见图 2A、2B)。免疫荧光结果显示, 与 Control 组相比, LPS + ATP 组 FOXA2 胞核分布减少, 胞质分布增加, 而 SHI 处理组 FOXA2 核分布无明显改变; 与 LPS + ATP 组相比, LPS + ATP + SHI 组胞核分布增加, 胞质分布减少 (见图 2C)。

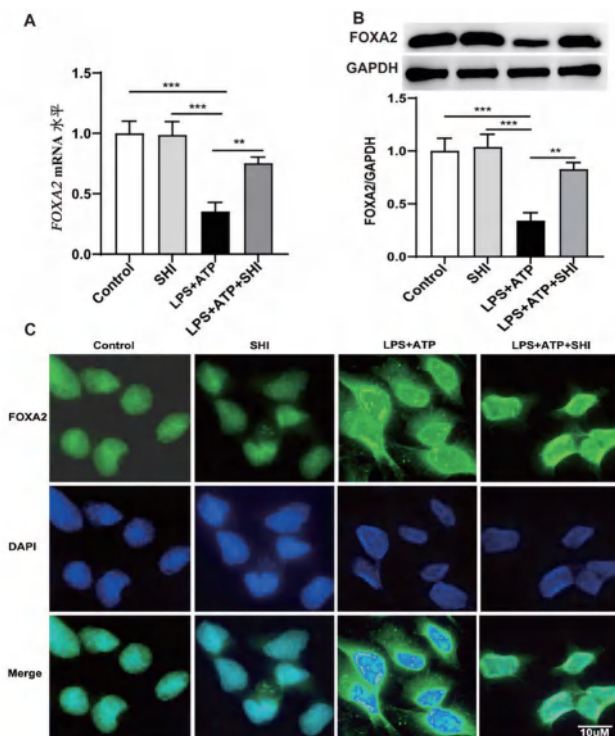


图2 紫草素对 H9c2 细胞中 FOXA2 表达与核移位的影响 ( $n = 3$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ )

Fig 2 Influence of shikonin on the expression and nuclear translocation of FOXA2 in H9c2 cells ( $n = 3$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ )

### 3.3 紫草素通过 FOXA2-SIRT1 轴抑制焦亡相关炎症因子的释放

与 Control 组相比, LPS + ATP 组 FOXA2 表达显著降低, IL-1 $\beta$ 、IL-18 释放增加; 与 LPS + ATP 组相比, LPS + ATP + SHI 组 FOXA2 表达明显上升 (见图 3A、3B), IL-1 $\beta$ 、IL-18 释放减少; 与 LPS + ATP + SHI 组相比, LPS + ATP + SHI + si-FOXA2 组 FOXA2 表达进行性降低, IL-1 $\beta$ 、IL-18 释放持续增加; 与 LPS + ATP + SHI + FOXA2 siRNA 组相比, LPS + ATP + SHI + si-FOXA2 + OE-SIRT1 组 IL-1 $\beta$ 、IL-18 含量减少, FOXA2 变化差异无统计学意义 (见图 3)。

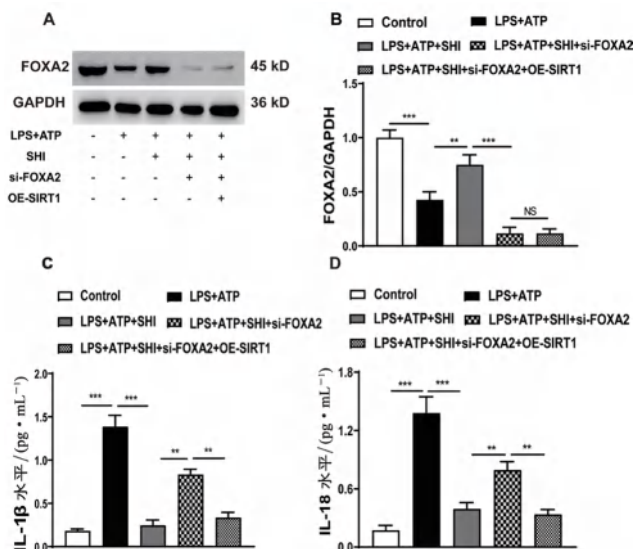


图3 紫草素通过 FOXA2-SIRT1 轴抑制心肌细胞焦亡 ( $n = 3$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ )

Fig 3 Shikonin inhibits pyroptosis of cardiomyocytes through the FOXA2-SIRT1 axis ( $n = 3$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ )

### 3.4 紫草素通过 FOXA2-SIRT1 轴抑制焦亡相关蛋白的表达

与 Control 组相比, LPS + ATP 组 SIRT1 表达水平显著降低, NLRP3 与 Caspase-1 活化片段 p20 表达水平明显升高, Caspase-1 活性增强; 与 LPS + ATP 组相比, LPS + ATP + SHI 组 SIRT1 蛋白水平明显增加, NLRP3 与 p20 表达减少, Caspase-1 活性减弱; 与 LPS + ATP + SHI 组相比, LPS + ATP + SHI + si-FOXA2 组上述指标变化趋势与 LPS + ATP 组一致; 与 LPS + ATP + SHI + si-FOXA2 组相比, LPS + ATP + SHI + si-FOXA2 + OE-SIRT1 组 SIRT1 蛋白水平显著增加, NLRP3 与 p20 表达减少 (见图 4A), Caspase-1 活性减弱 (见图 4B)。

3.5 CHIP-PCR 检测 FOXA2 与 SIRT1 的相互作用  
与 Control 组相比, LPS 组心肌细胞中 FOXA2 蛋白沉淀量明显下降, 免疫共沉淀复合物中 SIRT1-



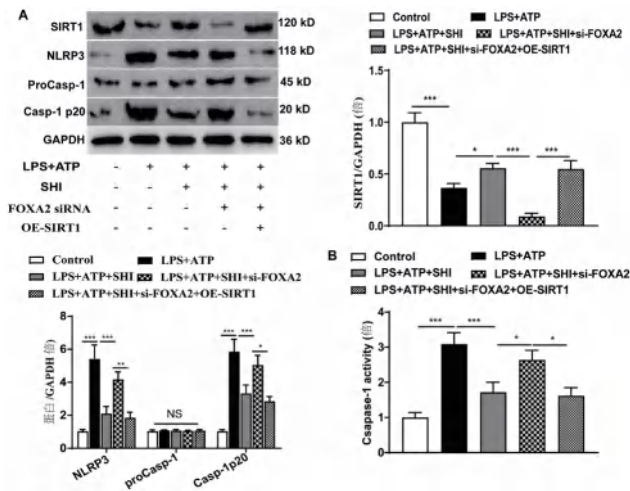


图 4 紫草素通过 FOXA2-SIRT1 轴抑制焦亡相关蛋白的表达 ( $n = 3$ ,  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ )

Fig 4 Shikonin inhibits the expression of pyroptosis-related proteins through the FOXA2-SIRT1 axis ( $n = 3$ ,  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ )

注 (Note): proCasp-1, proCaspase-1; Casp-1 p20, Caspase-1/p20 (cleaved caspase 1)。

DNA 沉淀量明显下降。经紫草素处理后心肌细胞中 FOXA2 蛋白沉淀量明显上升, 免疫共沉淀复合物中 *SIRT1*-DNA 沉淀量明显上升。经转染 *FOXA2* siRNA 质粒后, 心肌细胞中 FOXA2 蛋白沉淀量再次下降 (见图 5A), *SIRT1* DNA 量也明显下降 (见图 5B)。提示 LPS 刺激下紫草素能促进 FOXA2 与 *SIRT1* 相互结合。

### 3.6 双荧光素酶报告基因检测 FOXA2 转录活性

与 Control 相比, LPS 加 ATP 组荧光酶素报告基因活性明显降低, 而紫草素预处理组 (LPS + ATP + SHI) 荧光酶素报告基因活性明显升高。而在上述条件下转染 *SIRT1*-mutant 1 质粒后, 荧光酶素报告基因活性明显下降。而转染 *SIRT1*-mutant 2 质粒则荧光酶素报告基因活性无明显下降 (见图 6)。以上结果提示, FOXA2 是紫草素上调 *SIRT1* 表达的重要转录因子, 其与 *SIRT1* 基因启动子的结合位点是 -665 ~ -654 bp 区域。

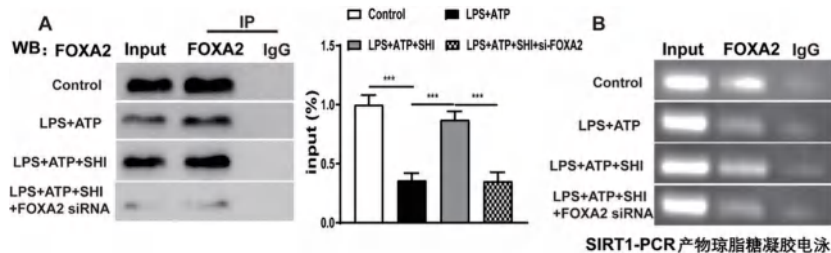


图 5 CHIP-PCR 检测 FOXA2 与 *SIRT1* 的相互作用 ( $n = 4$ ,  $^{***}P < 0.001$ )

Fig 5 Detection of the interaction between FOXA2 and *SIRT1* by CHIP-PCR ( $n = 4$ ,  $^{***}P < 0.001$ )

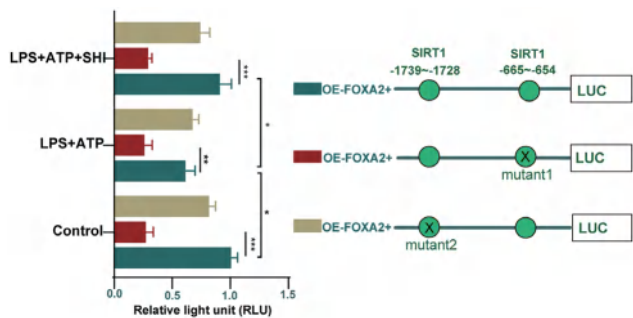


图 6 双荧光素酶报告基因检测 FOXA2 转录活性 ( $n = 4$ ,  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ )

Fig 6 FOXA2 transcriptional activity by dual-luciferase reporter gene ( $n = 4$ ,  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ )

## 4 讨论

近些年, 紫草素作为中草药紫草的有效成分, 在免疫相关性疾病、脓毒症及肿瘤中的作用逐渐被发现。在炎性肠病、类风湿关节炎等免疫相关性疾病中, 紫草素能够抑制核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 和转录激活因子 3 (STAT3) 信号通路, 减少 IL-1 $\beta$ 、IL-6、干扰素  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 和肿瘤坏

死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的表达, 重建疾病状态下的免疫平衡, 缓解临床症状, 发挥免疫调节与疾病治疗作用<sup>[13-14]</sup>。本课题组前期研究发现紫草素能够抑制心肌细胞 NLRP3 炎症小体活化主要依赖于 SIRT1。NLRP3 炎症小体活化是细胞焦亡的重要过程, 细胞表面模式识别受体感受刺激并激活 NF- $\kappa$ B 信号, 诱导 NLRP3、pro-IL-1 $\beta$  与 pro-IL-18 转录, 剪切 Caspase-1 酶原为有活性的 Caspase-1 (p20), 切割 GSDMD 进一步转运到质膜内部形成膜孔介导焦亡<sup>[15]</sup>。本研究发现紫草素能够抑制 LPS 与 ATP 处理的 H9c2 细胞中 NLRP3 与 p20 的表达, 然而, 脓毒症过程中引起心肌损伤的炎性细胞因子主要来源于免疫细胞激活。有研究报道紫草素可抑制 LPS 刺激的小鼠骨髓巨噬细胞 NLRP3 的激活, 减轻炎症因子 IL-1 $\beta$  与 IL-18 的释放, 从而提高脓毒症小鼠的生存率<sup>[16]</sup>。基于以上, 笔者推测紫草素对脓毒症心肌损伤除其直接保护作用外, 还可通过调节免疫功能发挥间接保护作用。

SIRT1 作为乙酰化酶沉默信息调节因子 2 同源物家族的重要成员,参与了葡萄糖和脂质代谢、细胞凋亡、炎症反应、抗氧化应激及抗衰老等多种生物学功能<sup>[1, 17]</sup>。有研究发现,脓毒症心肌病的动物模型心肌组织中 SIRT1 的蛋白表达及活性明显下降,上调 SIRT1 蛋白表达和活性,可以抑制心脏炎症反应及组织凋亡,改善脓毒症小鼠心脏功能<sup>[18-20]</sup>。本课题组前期研究表明紫草素可以上调 SIRT1 的表达而抑制 NLRP3 炎症小体的激活,进一步减轻心肌细胞的炎症和凋亡<sup>[10]</sup>。然而,紫草素如何调控 SIRT1 的机制尚未阐明。生物信息学预测软件可以辅助研究人员处理、分析和解释生物学数据,从而揭示生物学系统的结构和功能。CHIP 和报告基因实验结果进一步揭示,LPS 刺激下紫草素上调和激活转录因子 FOXA2,后者与 *SIRT1* 基因启动子(−665 ~ −654 bp)区域结合,从转录水平上调 *SIRT1* 基因的表达,进而对 LPS 所致的心肌损伤发挥保护作用。

FOXA2 是 FOX 家族的重要成员之一,亦为机体重要转录因子,可与其靶基因启动子区结合启动靶基因转录。FOXA2 广泛表达于大多数组织与细胞中,参与调控胚胎发育、糖脂代谢、炎症反应及细胞衰老等多种生物学功能<sup>[11]</sup>。研究显示,FOXA2 过表达可以启动 *SCGB1A1* 转录,减轻 IL-13 所致支气管上皮细胞损伤<sup>[21]</sup>。在缺氧-复氧诱导的 H9c2 细胞损伤模型中,上调 FOXA2 蛋白可与丝氨酸苏氨酸激酶 3 (receptor interacting serine threonine kinase 3, RIPK3) 作用,减轻缺氧-复氧所致心肌细胞坏死<sup>[22]</sup>。上述结果提示 FOXA2 在多种疾病中发挥重要作用,但其在心肌细胞焦亡与脓毒症心肌损伤中的作用并不清楚。本研究采用 LPS 与 ATP 刺激构建脓毒症心肌细胞损伤与焦亡模型,并采用 Western blot 与 PCR 检测 FOXA2 的表达,发现 LPS 与 ATP 刺激后 FOXA2 表达显著降低,FOXA2 从胞核向胞质移位,而紫草素能逆转 FOXA2 的上述病理改变。目前,紫草素激活转录因子 FOXA2 的分子机制尚不清楚,究其原因考虑与紫草素抑制 MAPK 信号通路有关,而该信号通路的激活可以上调 FOXA2 的蛋白表达并激活其转录功能,间接使转录因子 FOXA2 激活<sup>[23-24]</sup>。

综上所述,本研究发现紫草素能抑制 LPS 与 ATP 处理所致心肌细胞焦亡相关分子表达,该作用与其激活 FOXA2-SIRT1 信号轴有关。本研究可为紫草素抗脓毒症心肌细胞损伤提供实验基础及理论依据。

## 参考文献

- [1] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3) [J]. JAMA, 2016, 315 (8): 801-810.
- [2] Daulasim A, Vieillard-Baron A, Geri G. Hemodynamic clinical phenotyping in septic shock [J]. Curr Opin Crit Care, 2021, 27 (3): 290-297.
- [3] 李雪珍,甘伟妮,周开焕,等. 脓毒症心肌抑制患者血流动力学、器官功能及临床预后观察研究 [J]. 岭南急诊医学杂志, 2024, 29 (3): 215-217, 222.
- [4] Li SS, Sun YM, Song MM, et al. NLRP3/caspase-1/GSDMD-mediated pyroptosis exerts a crucial role in astrocyte pathological injury in mouse model of depression [J]. JCI Insight, 2021, 6 (23): e146852.
- [5] 文日,张铁凝,杨妮,等. 细胞焦亡在脓毒症心肌抑制中的作用研究进展 [J]. 中国当代儿科杂志, 2024, 26 (7): 774-781.
- [6] Aadújar I, Ríos JL, Giner RM, et al. Pharmacological properties of shikonin-a review of literature since 2002 [J]. Planta Med, 2013, 79 (18): 1685-1697.
- [7] Sun Q, Gong T, Liu ML, et al. Shikonin, a naphthalene ingredient: therapeutic actions, pharmacokinetics, toxicology, clinical trials and pharmaceutical researches [J]. Phytomedicine, 2022, 94: 153805.
- [8] Deng XW, Chen Q, Qiang JL, et al. Development of a porcine full-thickness burn hypertrophic scar model and investigation of the effects of shikonin on hypertrophic scar remediation [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 590.
- [9] Yuan DP, Gu L, Long J, et al. Shikonin reduces endometriosis by inhibiting RANTES secretion and mononuclear macrophage chemotaxis [J]. Exp Ther Med, 2014, 7 (3): 685-690.
- [10] Guo T, Jiang ZB, Tong ZY, et al. Shikonin ameliorates LPS-induced cardiac dysfunction by SIRT1-dependent inhibition of NLRP3 inflammasome [J]. Front Physiol, 2020, 11: 570441.
- [11] Kaestner KH. The FoxA factors in organogenesis and differentiation [J]. Curr Opin Genet Dev, 2010, 20 (5): 527-532.
- [12] Liu Y, Ao X, Jia Y, et al. The FOXO family of transcription factors: key molecular players in gastric cancer [J]. J Mol Med (Berl), 2022, 100 (7): 997-1015.
- [13] Andújar I, Ríos JL, Giner RM, et al. Beneficial effect of shikonin on experimental colitis induced by dextran sulfate sodium in BALB/c mice [J]. Evid Based Complement Altern Med, 2012, 2012: 271606.
- [14] Kim YO, Hong SJ, Yim SV. The efficacy of shikonin on cartilage protection in a mouse model of rheumatoid arthritis [J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2010, 14 (4): 199-204.
- [15] 李琪,浦东,王思思,等. 羟基积雪草苷通过抑制 NF- $\kappa$ B/NLRP3 细胞焦亡通路缓解间质性膀胱炎 [J]. 中南药学, 2024, 22 (6): 1571-1576.
- [16] Xie M, Yu Y, Kang R, et al. PKM2-dependent glycolysis promotes NLRP3 and AIM2 inflammasome activation [J]. Nat Commun, 2016, 7: 13280.
- [17] 宋荣华,许文灿,傅玉才. SIRT1 与糖尿病 [J]. 广东医

- 学, 2010, 31 (20): 2717-2719.
- [18] Smith LM, Yoza BK, Hoth JJ, et al. SIRT1 mediates septic cardiomyopathy in a murine model of polymicrobial sepsis [J]. Shock, 2020, 54 (1): 96-101.
- [19] Wang RZ, Xu YR, Zhang W, et al. Inhibiting miR-22 alleviates cardiac dysfunction by regulating Sirt1 in septic cardiomyopathy [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 650666.
- [20] Peng K, Yang FY, Qiu CM, et al. Rosmarinic acid protects against lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction via activating Sirt1/PGC-1 $\alpha$  pathway to alleviate mitochondrial impairment [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2023, 50 (3): 218-227.
- [21] Zhu LX, An LL, Ran D, et al. The club cell marker SCGB1A1 downstream of FOXA2 is reduced in asthma [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2019, 60 (6): 695-704.
- [22] Gao XQ, Liu CY, Zhang YH, et al. The circRNA CNEACR regulates necroptosis of cardiomyocytes through FOXA2 suppression [J]. Cell Death Differ, 2022, 29 (3): 527-539.
- [23] Liu CF, He LH, Wang JX, et al. Anti-angiogenic effect of shikonin in rheumatoid arthritis by downregulating PI3K/AKT and MAPKs signaling pathways [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 260: 113039.
- [24] Du CL, Lu JC, Zhou L, et al. MAPK/FOXA2-mediated cigarette smoke-induced squamous metaplasia of bronchial epithelial cells [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2017, 12: 3341-3351.

(收稿日期: 2025-02-25; 修回日期: 2025-06-19)

## 基于 JAK/STAT 信号通路探讨泻白散外治对玫瑰痤疮小鼠的作用及机制

赵艺凡<sup>1</sup>, 何金穗<sup>1</sup>, 刘雪英<sup>2\*</sup>, 王庆伟<sup>1, 3\*</sup> (1.陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046; 2.空军军医大学药学院, 西安 710032; 3.西安秦皇医院, 西安 710600)

**摘要:** **目的** 基于 JAK/STAT (Janus 激酶/信号传导及转录激活因子) 信号通路, 探讨泻白散外治对玫瑰痤疮小鼠的作用及机制。**方法** 将雌性 BALB/c 小鼠随机分为正常组, 模型组, 空白基质组, 他克莫司组 and 泻白散乳剂高、中、低剂量组, 每组 12 只。除正常组外, 其余各组背部皮内注射 40  $\mu$ L 抗菌肽 LL-37 构建玫瑰痤疮小鼠模型 (每 12 h 注射 1 次, 共 4 次), 正常组同时间注射相同剂量、相同次数的磷酸盐缓冲液溶液。造模成功后给药组在背部皮损部位分别涂抹相应治疗药物, 2 次  $\cdot$  d<sup>-1</sup>, 每次 0.5 g, 连续 10 d。观察小鼠背部皮肤, 进行红斑评分和红斑面积测定; 苏木精-伊红 (HE) 染色观察皮肤组织病理变化; 甲苯胺蓝染色检测皮肤组织中肥大细胞的数量; ELISA 试剂盒检测皮肤组织中的肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6 (IL-6) 水平; Western blot 法检测皮肤组织中 Toll 样受体-2 (TLR-2)、干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、磷酸化-Janus 激酶 2 (p-JAK2)、Janus 激酶 2 (JAK2)、磷酸化-信号传导及转录激活因子 1 (p-STAT1)、信号传导及转录激活因子 1 (STAT1)、磷酸化-信号传导及转录激活因子 3 (p-STAT3)、信号传导及转录激活因子 3 (STAT3) 蛋白的表达。**结果** 与正常组相比, 模型组小鼠背部皮损部位红斑评分升高、红斑面积增加, 皮肤组织病理损伤严重, 肥大细胞数量增加, TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平升高, TLR-2、IFN- $\gamma$ 、p-JAK2/JAK2、p-STAT1/STAT1 及 p-STAT3/STAT3 蛋白表达升高 ( $P < 0.001$ ); 与模型组相比, 泻白散乳剂高、中、低剂量组小鼠背部皮损部位红斑评分降低、红斑面积减少, 皮肤组织病理损伤减轻, 肥大细胞数量减少, TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平降低, TLR-2、IFN- $\gamma$ 、p-JAK2/JAK2、p-STAT1/STAT1 及 p-STAT3/STAT3 蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )。**结论** 泻白散乳剂可通过下调 TLR-2、IFN- $\gamma$  的表达而抑制 JAK/STAT 信号通路的激活, 改善小鼠玫瑰痤疮样皮损。

**关键词:** 泻白散乳剂; 外治; 玫瑰痤疮; JAK/STAT 信号通路

**中图分类号:** R285.5

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-2981(2025)08-2265-07

**doi:** 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.018

**基金项目:** 陕西省 2021 年创新能力支持计划 (No.2021GCZX-07 号); 陕西省秦创原“科学家+工程师”队伍建设 (No.2023KXJ-080 号)。

**作者简介:** 赵艺凡, 女, 硕士研究生, 主要从事中药药理学研究, email: 3319094770@qq.com \***通信作者:** 王庆伟, 男, 主任药师, 主要从事药物代谢动力学及药理学研究, email: wqwlxy@163.com; 刘雪英, 女, 副教授, 主要从事药物代谢动力学及药理学研究, email: xylu0427@163.com



## Exploration on the effect and mechanism of external application of Xiebai powder for rosacea mice based on JAK/STAT signaling pathway

ZHAO Yi-fan<sup>1</sup>, HE Jin-sui<sup>1</sup>, LIU Xue-ying<sup>2\*</sup>, WANG Qing-wei<sup>1, 3\*</sup> (1. Department of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712046; 2. Department of Pharmacy, Air Force Medical University, Xi'an 710032; 3. Xi'an Qinhuang Hospital, Xi'an 710600)

**Abstract: Objective** To determine the effect and mechanism of the external application of Xiebai powder on rosacea mice based on the JAK/STAT (Janus kinase/signal transduction and activator of transcription) signaling pathway. **Methods** Female BALB/c mice were randomly divided into a normal group, a model group, a blank matrix group, a tacrolimus group and Xiebai powder emulsion groups of different doses (high, medium, and low dose), with 12 mice in each group. Except for the normal group, mice of the other groups were given 40  $\mu$ L antimicrobial peptide LL-37 via intradermal injection in the back to construct a rosacea model (injected once every 12 h, 4 times in total). The normal group received phosphate buffered saline solution at the same dose and frequency. After the successful modeling, 0.5 g of corresponding therapeutic drugs were applied to mouse dorsal skin lesions in the treatment groups, twice daily, for 10 consecutive days. Observation on the back skin of mice, erythema scoring and erythema area measurement were carried out. The pathological changes of skin tissue were observed by Hematoxylin-eosin (HE) staining and the number of mast cells was detected by Toluidine blue staining. ELISA kits were used to detect the tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) levels in skin tissue. Western blot method was used to detect protein expressions of Toll-like receptor-2 (TLR-2), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), phosphorylated-Janus kinase 2 (p-JAK2), Janus kinase 2 (JAK2), phosphorylated-signal transduction and activator of transcription 1 (p-STAT1), signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1), phosphorylated-signal transduction and activator of transcription 3 (p-STAT3), and signal transduction and activator of transcription 3 (STAT3) in skin tissues. **Results** It was found that compared with the normal group, there were elevated erythema scores, increased area of erythema, aggravated pathological damage of skin tissue, increased number of mast cells, raised levels of TNF- $\alpha$  and IL-6, and increased protein expressions of TLR-2, IFN- $\gamma$ , p-JAK2/JAK2, p-STAT1/STAT1 and p-STAT3/STAT3 in the dorsal skin lesions of the model group ( $P < 0.001$ ). Compared with the model group, Xiebai powder emulsion groups with different concentrations had decreased scores of erythema in the dorsal skin lesions, declined area of erythema, relieved pathological damage of skin tissue, fewer mast cells, decreased TNF- $\alpha$  and IL-6, and lower protein expression of TLR-2, IFN- $\gamma$ , p-JAK2/JAK2, p-STAT1/STAT1, and p-STAT3/STAT3 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ). **Conclusion** Xiebai powder emulsion can inhibit the activation of JAK/STAT signaling pathways by downregulation of TLR-2 and IFN- $\gamma$  to improve rosacea-like lesions in mice.

**Key words:** Xiebai powder emulsion; external treatment; rosacea; JAK/STAT signaling pathway

玫瑰痤疮 (rosacea) 是一种好发于面部中央的慢性炎症性皮肤病, 全球患病率约 5.46%, 临床特征包括阵发性潮红、持续性红斑、丘疹、脓疱、毛细血管扩张及鼻赘形成等<sup>[1-2]</sup>。研究表明, 免疫系统 (固有免疫、适应性免疫) 失调、神经血管功能紊乱及毛囊蠕形螨感染均参与了玫瑰痤疮的炎症反应, 其中免疫炎症反应的异常激活是核心病理环节<sup>[3-4]</sup>。

研究发现, JAK/STAT (Janus 激酶 / 信号传导

及转录激活因子) 信号通路的异常激活与多种免疫性炎症性皮肤病的发生发展密切相关。特别是在皮肤屏障功能受损的玫瑰痤疮病变中, 该信号通路相关基因显著富集, 提示其可能成为潜在治疗靶点<sup>[5]</sup>。泻白散源自《小儿药证直诀》, 由桑白皮、地骨皮和甘草组成, 能清泻肺热、凉血解毒、止咳平喘。现代药理研究证实, 泻白散具有解热、抗炎、抗病原微生物、祛痰止咳等作用<sup>[6]</sup>, 然而,

其对玫瑰痤疮的治疗作用及机制尚未阐明。本研究采用抗菌肽 LL-37 构建玫瑰痤疮小鼠模型,探讨泻白散外治对 JAK/STAT 信号通路的调控作用及机制,以期为其临床应用及制剂开发提供参考。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

SPF 级健康雌性 BALB/c 小鼠 84 只,体重  $(20 \pm 2)$  g [空军军医大学实验动物中心,生产许可证号: SYXK (陕)-2019-001]。小鼠分笼饲养,环境温度  $(22 \pm 2)$  °C,相对湿度  $(50 \pm 10)$  %, 12 h 光照/12 h 黑暗循环,适应性饲养 1 周后开始实验。实验方案经空军军医大学实验动物中心福利与伦理委员会审核并批准 [伦理批件号: IACUC-20230655]。

### 1.2 试药

桑白皮、地骨皮、甘草购自陕西兴盛德药业有限公司,经陕西中医药大学中药鉴定教研室颜永刚教授鉴定,桑白皮为桑科植物桑 (*Morus alba* L.) 的干燥根皮;地骨皮为茄科植物枸杞 (*Lycium chinense* Mill.) 的干燥根皮;甘草为豆科植物甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) 的干燥根及根茎。

抗菌肽 LL-37 (批号: HY-P1222, MCE 公司);苏木精 (Sigma 公司);伊红 Y (水溶性)(国药集团);甲苯胺蓝染色液 (Servicebio 公司);肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 试剂盒、白细胞介素-6 (IL-6) 试剂盒 (武汉贝茵莱生物科技有限公司);GAPDH 抗体、Toll 样受体-2 (TLR-2) 抗体、干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 抗体、磷酸化-信号传导及转录激活因子 1 (p-STAT1) 抗体、信号传导及转录激活因子 1 (STAT1) 抗体 (Proteintect 公司);磷酸化-Janus 激酶 2 (p-JAK2) 抗体、Janus 激酶 2 (JAK2) 抗体、磷酸化-信号传导及转录激活因子 3 (p-STAT3) 抗体、信号传导及转录激活因子 3 (STAT3) 抗体 (Affinty 公司);HRP 标记羊抗小鼠二抗、HRP 标记羊抗兔二抗 (北京中杉金桥生物技术有限公司)。

### 1.3 仪器

HD325C 型轮转式切片病理切片机 (湖北惠达仪器有限公司);XSP63XDV 型显微镜 (上海光学仪器一厂有限公司);IX71 型倒置显微镜 (OLYMPUS);AMR-100 型酶标分析仪 (杭州奥盛仪器有限公司);一体式化学发光成像仪 (ChemiScope 5300 Pro, CLINX 公司)。

## 2 方法

### 2.1 泻白散乳剂的制备

根据预实验结果,相当于 20% 生药量的泻白散乳剂对玫瑰痤疮小鼠疗效最显著,故设定泻白散乳剂高、中、低剂量分别为 20%、10% 和 5%。取桑

白皮饮片 500 g,地骨皮饮片 500 g,甘草饮片 50 g,置于 10 L 圆底烧瓶中,加入 8 倍量 75% 乙醇加热回流提取,每次 1.5 h,提取 3 次。合并提取液,滤过,滤液经旋转蒸发仪减压浓缩并回收乙醇,得到泻白散浸膏 0.168 kg,每克浸膏相当于生药 6.25 g。以制备 100 g 相当于 20% 生药量的泻白散乳剂为例:取浸膏 3.2 g (相当于生药 20 g),按照处方比例加入甘油 4 g 和丁二醇 2 g 作为助溶剂,搅拌均匀后依次加入透明质酸保湿剂 0.35 g、Delta 乳化剂 1 g、油相辛酸/癩酸三酰甘油 (GCTT) 0.75 g、角鲨烷 0.75 g,边搅拌边加热至 80 °C,至所有物料全部溶解,补足纯水至 100 g,搅拌均匀后  $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  乳化均质 25 min,密闭降温至室温,即得相当于 20% 生药量的泻白散乳剂。

同法制备相当于 10% 和 5% 生药量的泻白散乳剂;空白基质不加浸膏。

### 2.2 玫瑰痤疮小鼠模型的构建<sup>[7]</sup>及分组给药

健康 BALB/c 雌性小鼠 84 只,适应性饲养 1 周后剔除背部毛发。24 h 后,随机选取 72 只小鼠,背部皮内注射 40  $\mu\text{L}$  抗菌肽 LL-37 ( $320 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),每 12 h 注射 1 次,共 4 次,构建玫瑰痤疮小鼠模型。取 12 只同批次小鼠作为正常组,同时间注射相同剂量、相同次数的磷酸盐缓冲液 (PBS)。末次注射 12 h 后,观察到注射 LL-37 抗菌肽的小鼠背部出现红斑,说明造模成功。将造模成功的小鼠随机分为模型组,空白基质组,他克莫司组和泻白散乳剂高、中、低剂量组,每组 12 只。正常组和模型组不予干预,空白基质组于皮损处涂抹空白基质,他克莫司组于皮损处涂抹 0.1% 的他克莫司软膏,泻白散乳剂高、中、低剂量组分别于皮损处涂抹相当于 20%、10%、5% 生药量的泻白散乳剂,2 次  $\cdot \text{d}^{-1}$ ,每次 0.5 g,连续 10 d。

### 2.3 小鼠背部皮肤红斑评分及红斑面积测定

末次治疗结束 12 h 后,观察小鼠背部皮肤并拍照记录,根据红斑评分和红斑面积评估小鼠玫瑰痤疮样皮损的严重程度。红斑评分标准:无红斑为 0 分,红斑隐约可见为 1 分,淡红斑为 2 分,红斑明显且清晰为 3 分,红斑颜色深且边界清晰为 4 分。利用 Image J 软件分析测量红斑面积。

### 2.4 取材

玫瑰痤疮样皮损评估结束后,处死所有小鼠并剪取背部皮肤组织,分为两份,一份置于 4% 多聚甲醛中固定,用于 HE 或甲苯胺蓝染色;另一份冻存于  $-80$  °C,用于 ELISA 法及 Western blot 法检测。

### 2.5 HE 染色观察皮肤组织病理变化

取固定于 4% 多聚甲醛中的皮肤组织,经脱

水、石蜡包埋后,切片(厚度 5  $\mu\text{m}$ ),进行 HE 染色。在光学显微镜下观察皮肤组织的病理学特征,包括皮肤组织厚度变化及炎性细胞浸润情况。

## 2.6 甲苯胺蓝染色检测皮肤组织肥大细胞数量

取固定于 4% 多聚甲醛中的皮肤组织,经脱水、石蜡包埋后,切片(厚度 5  $\mu\text{m}$ ),进行甲苯胺蓝染色。在光学显微镜下随机选取 5 个视野,观察并计数肥大细胞数目。

## 2.7 ELISA 试剂盒检测皮肤组织 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平

取冻存的皮肤组织,加入预冷 PBS 匀浆,4  $^{\circ}\text{C}$ 、4000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,取上清液,按照试剂盒说明书操作,检测上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的水平。

## 2.8 Western blot 法检测皮肤组织中各蛋白表达

取冻存的皮肤组织,加入裂解液,冰浴匀浆后于 4  $^{\circ}\text{C}$  摇动 2 h。4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 20 min,取上清液进行蛋白定量。调整蛋白量后,经 SDS-PAGE 电泳分离蛋白、转膜、封闭,加一抗 TLR-2 (1:1000)、IFN- $\gamma$  (1:1000)、p-JAK2 (1:1000)、JAK2 (1:1000)、p-STAT1 (1:1000)、STAT1 (1:5000)、p-STAT3 (1:1000)、STAT3 (1:2000)、GAPDH (1:5000),4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,TBST 冲洗 3 次,加二抗 (1:5000),37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h, TBST 冲洗 3 次,加入适量的 ECL 发光液,利用一体式化学发光仪成像,采用 Image J 软件进行蛋白条带定量分析。

## 2.9 统计分析

采用 Graph Pad Prism 8.0.2 软件进行统计分析,所有数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA),多重比较采用 Sidak 法校正,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

# 3 结果

## 3.1 泻白散乳剂对小鼠背部皮肤红斑评分及红斑面积的影响

正常组小鼠背部注射部位未见皮损,模型组小鼠背部注射部位出现水肿及坏死结痂的红斑,红斑评分升高、红斑面积增加 ( $P < 0.001$ );与模型组相比,他克莫司组及泻白散乳剂高、中、低剂量组小鼠背部注射部位皮损均有不同程度的减轻,红斑评分降低、红斑面积减少 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ),详见图 1。

## 3.2 泻白散乳剂对小鼠背部皮肤组织病理变化的影响

正常组小鼠皮肤组织结构完整,表皮、真皮及皮下组织层次清晰,胶原纤维分布均匀,炎性细胞浸润不明显;与正常组相比,模型组小鼠皮肤组织显著增厚,炎性细胞浸润增多;与模型组相比,他克莫司组及泻白散乳剂高、中、低剂量组小鼠皮肤组织厚度显著减小,炎性细胞浸润减少(见图 2)。

## 3.3 泻白散乳剂对小鼠背部皮肤组织肥大细胞数量的影响

与正常组相比,模型组小鼠皮肤组织肥大细胞数量增加 ( $P < 0.001$ );与模型组相比,他克莫司组及泻白散乳剂高、中、低剂量组皮肤组织肥大细胞数量减少 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )(见图 3)。

## 3.4 泻白散乳剂对小鼠背部皮肤组织 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平的影响

与正常组相比,模型组小鼠皮肤组织 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平升高 ( $P < 0.001$ ),与模型组相比,他克莫司组及泻白散乳剂高、中、低剂量组 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )(见图 4)。

## 3.5 泻白散乳剂对小鼠背部皮肤组织中各蛋白表达的影响

与正常组相比,模型组小鼠皮肤组织 TLR-2、IFN- $\gamma$ 、p-JAK2/JAK2、p-STAT1/STAT1 和 p-STAT3/STAT3 蛋白表达升高 ( $P < 0.001$ );与模型组相比,他克莫司组及泻白散乳剂高、中、低剂量组 TLR-2、IFN- $\gamma$ 、p-JAK2/JAK2、p-STAT1/STAT1 和 p-STAT3/STAT3 蛋白表达降低 ( $P < 0.001$ )(见图 5)。

# 4 讨论

美国玫瑰痤疮协会根据临床特征将玫瑰痤疮分为红斑毛细血管扩张型(最常见)、丘疹脓疱型、鼻赘型和眼型<sup>[8]</sup>。目前主要采用抗菌药物、免疫抑制剂及糖皮质激素等药物治疗,但存在一定的不良反应。近年来,中医药因其多途径、多靶点等优势,在皮肤病治疗中广泛应用。中医称本病为“酒渣鼻”,认为其多因肺经郁热,血热上蒸面部所致。余土根教授<sup>[9]</sup>提出以清肺热为治则,采用余氏枇杷汤加减治疗红斑毛细血管扩张型玫瑰痤疮,临床疗效显著。

泻白散属清热剂,方中桑白皮为君药,甘寒入肺,功擅清泻肺热、止咳平喘;地骨皮为臣药,甘寒性淡,归肺、肾经,长于泻肺中伏火,凉血除蒸;甘草为佐药,甘平,归心、肺、脾、胃经,兼具清热解毒、补脾益气、祛痰止咳、调和诸药之功。全方共奏清泻肺热、凉血解毒、止咳平喘之效。临床可用于治疗玫瑰痤疮、银屑病等具有热象之病<sup>[10]</sup>。现代研究表明,泻白散可通过下调 JAK2 和 STAT3 蛋白的磷酸化,抑制脂多糖 (LPS) 诱导的巨噬细胞炎症反应,提示其通过调控 JAK/STAT 信号通路发挥抗炎作用<sup>[11]</sup>。桑白皮提取物可降低肺炎支原体小鼠肺组织中 IL-6 和 IFN- $\gamma$  水平,减轻免疫炎症反应<sup>[12]</sup>,其水煎液还可下调肺热证小鼠肺组织中 TLR-2 的 mRNA 及蛋白



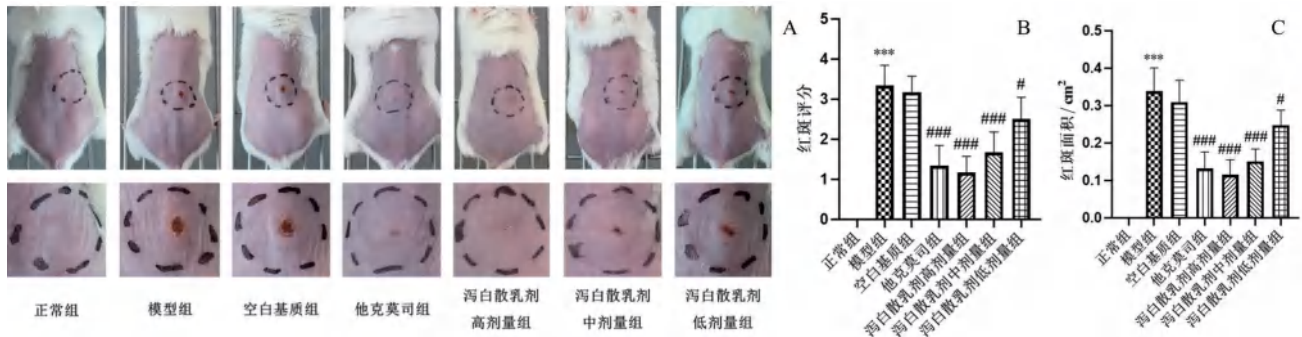


图 1 泻白散乳剂对小鼠背部皮肤外观特征 (A)、红斑评分 (B) 及红斑面积的影响 (C) ( $n = 6$ )

Fig 1 Effect of Xiebai powder emulsion on the appearance characteristics (A), erythema score (B), and erythema area (C) of the back skin of mice ( $n = 6$ )

注 (Note): 与正常组比,  $***P < 0.001$ ; 与模型组比,  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{###}P < 0.001$  (Compared with the normal group,  $***P < 0.001$ ; compared with the model group,  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{###}P < 0.001$ ).

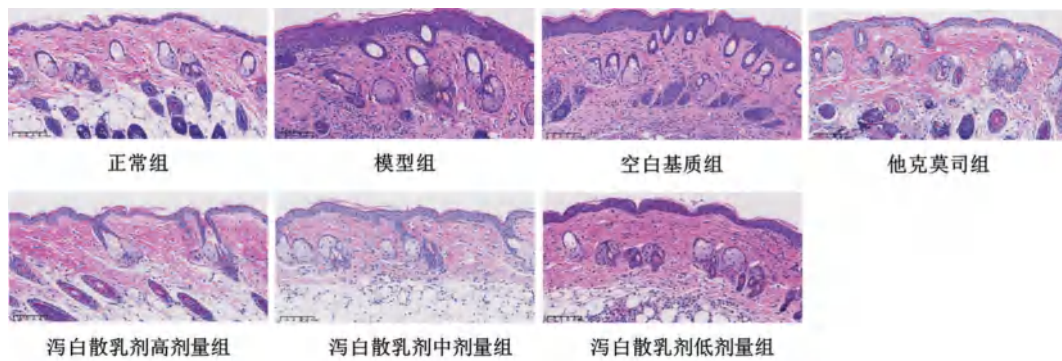


图 2 泻白散乳剂对小鼠背部皮肤组织病理变化的影响 (×200)

Fig 2 Effect of Xiebai powder emulsion on the pathological changes in the skin tissue of the back of mice (×200)

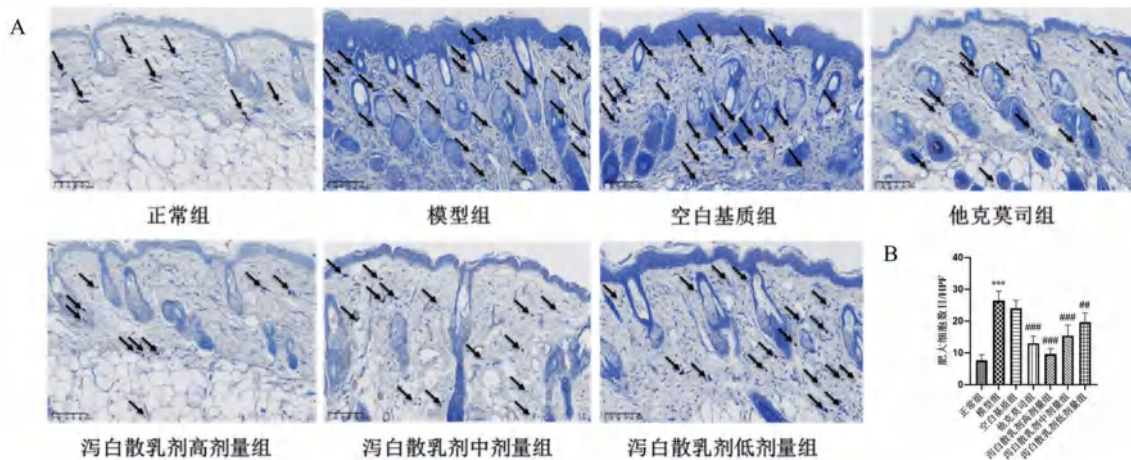


图 3 泻白散乳剂对小鼠背部皮肤组织肥大细胞数量的影响

Fig 3 Effect of Xiebai powder emulsion on the number of mast cells in the skin tissue of the back of mice

A. 甲苯胺蓝染色结果 (Toluidine blue staining results), ×200; B. 肥大细胞数量定量分析 (quantitative analysis of mast cell number)

注 (Note): 与正常组比,  $***P < 0.001$ ; 与模型组比,  $^{\#}P < 0.01$ ,  $^{###}P < 0.001$  (Compared with the normal group,  $***P < 0.001$ ; compared with the model group,  $^{\#}P < 0.01$ ,  $^{###}P < 0.001$ ).

表达,降低  $TNF-\alpha$  和  $IL-1\beta$  水平,缓解肺损伤<sup>[13]</sup>。地骨皮乙醇提取物能够抑制烫伤小鼠的炎症反应,促进皮肤修复<sup>[14]</sup>。研究发现,甘草的主要活性成分甘草酸可通过抑制 JAK1、JAK2 及 STAT1 磷酸化,阻断  $IFN-\gamma$  介导的 JAK/STAT1 信号通路活化,从而降低 HaCaT 细胞中 CXCL10 的表达<sup>[15]</sup>。此外,

桑皮苷 A 和地骨皮甲素作为桑白皮和地骨皮的主要活性成分,均可通过抑制  $TNF-\alpha$  和  $IL-6$  的表达来减轻实验动物的炎症症状<sup>[16-17]</sup>。LL-37 是玫瑰痤疮最关键的致病因子,可活化肥大细胞,释放炎症因子  $TNF-\alpha$  和  $IL-6$ <sup>[18]</sup>。本实验通过测定玫瑰痤疮小鼠皮肤组织中  $TNF-\alpha$  和  $IL-6$  的含量,发现泻

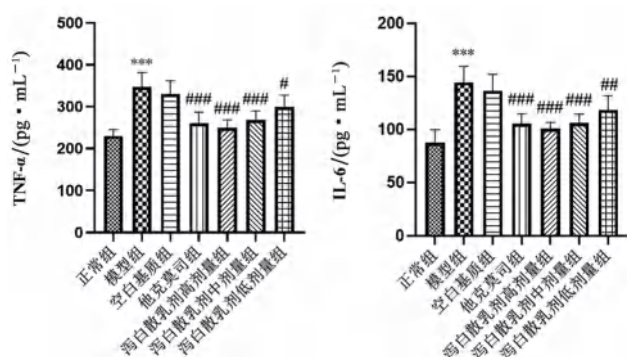


图 4 泻白散乳剂对小鼠背部皮肤组织 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Fig 4 Effect of Xiebai powder emulsion on the levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 in the skin tissue of the back of mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

注 (Note): 与正常组比, \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组比, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  (Compared with the normal group, \*\*\* $P < 0.001$ ; compared with the model group, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ ).

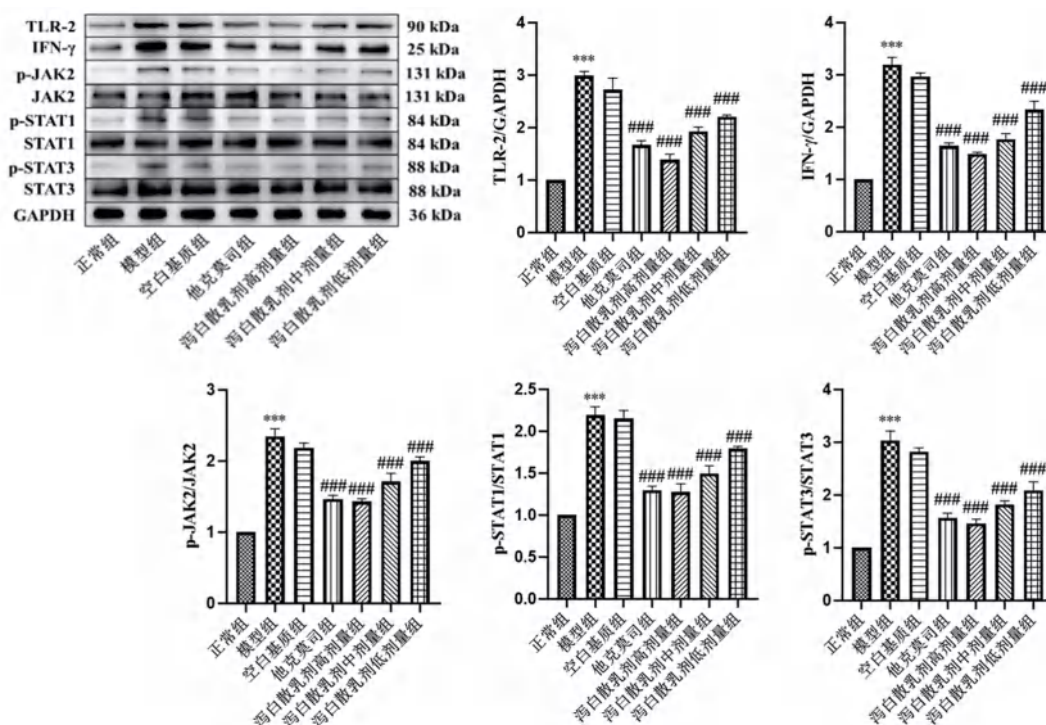


图 5 泻白散乳剂对小鼠背部皮肤组织 TLR-2、IFN- $\gamma$ 、p-JAK2/JAK2、p-STAT1/STAT1 及 p-STAT3/STAT3 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig 5 Effect of Xiebai powder emulsion on the protein expressions of TLR-2, IFN- $\gamma$ , p-JAK2/JAK2, p-STAT1/STAT1, and p-STAT3/STAT3 in the skin tissue of the back of mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

注 (Note): 与正常组比, \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组比, ### $P < 0.001$  (Compared with the normal group, \*\*\* $P < 0.001$ ; compared with the model group, ### $P < 0.001$ ).

反应<sup>[21]</sup>。本实验通过 Western blot 法检测发现, 不同剂量的泻白散乳剂可不同程度地抑制玫瑰痤疮小鼠皮肤组织中的 TLR-2、IFN- $\gamma$ 、p-JAK2/JAK2、p-STAT1/STAT1 和 p-STAT3/STAT3 蛋白表达。

综上, 泻白散乳剂可减轻小鼠玫瑰痤疮样皮损, 可能通过下调 TLR-2、IFN- $\gamma$  表达, 抑制 JAK/STAT 信号通路激活, 降低 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水

白散乳剂可有效调控这两种炎症因子的水平, 改善炎症损伤。

本实验进一步检测了 TLR-2、IFN- $\gamma$  蛋白表达及 JAK/STAT 信号通路关键蛋白磷酸化水平, 以探讨泻白散乳剂调控玫瑰痤疮小鼠免疫炎症反应的作用机制。基于玫瑰痤疮病理, 本课题组提出 JAK/STAT 信号通路可能参与其发展的两种机制: 在固有免疫方面, 微生物、紫外线或外界刺激可诱导角质形成细胞高表达 TLR-2<sup>[19]</sup>。TLR-2 可激活 JAK/STAT3 信号通路, 促进基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 生成及激肽释放酶 5 活化, 最终促使 cathelicidin 转化为抗菌肽 LL-37, 引发皮肤红斑与毛细血管扩张<sup>[20]</sup>。在适应性免疫方面, TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  和 IL-6 等细胞因子表达升高, 亦可激活 JAK/STAT 通路, 上调 STAT1 和 p-STAT1 表达, 加重皮肤炎症

平。本研究主要从免疫炎症角度探讨其作用机制, 其他机制尚需进一步研究证实。

泻白散乳剂作为一种基于传统中药的外用制剂, 具有多途径、多靶点的作用特点, 在玫瑰痤疮治疗中展现出显著临床潜力。未来可结合不同疗法以增强疗效、减少不良反应: 如与免疫调节剂联合治疗红斑毛细血管扩张型玫瑰痤疮, 与抗菌药物联



合治疗丘疹脓疱型玫瑰痤疮,配合激光或光动力治疗鼻赘型玫瑰痤疮,亦可能辅助治疗眼型玫瑰痤疮。相信随着研究的深入和临床验证,泻白散乳剂有望成为玫瑰痤疮治疗的重要手段之一。

## 参考文献

- [1] Qiu YM, Yang P, Zhao XY, et al. Successful treatment of rosacea by trephination combined with photodynamic therapy: a case report [J]. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2025, 51: 104470.
- [2] Nguyen C, Kuceki G, Birdsall M, et al. Rosacea: practical guidance and challenges for clinical management [J]. Clin Cosmet Investig Dermatol, 2024, 17: 175-190.
- [3] 王一冲. 超分子水杨酸联合强脉冲光治疗玫瑰痤疮的疗效观察 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2023.
- [4] 欧阳语嫣. 阿司匹林治疗玫瑰痤疮的作用机制研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2021.
- [5] Wang YL, Wang B, Huang YX, et al. Multi-transcriptomic analysis and experimental validation implicate a central role of STAT3 in skin barrier dysfunction induced aggravation of rosacea [J]. J Inflamm Res, 2022, 15: 2141-2156.
- [6] 赵晖, 任耀全. 小议泻白散 [J]. 中国社区医师, 2009, 11 (24): 152.
- [7] Luo YL, Nan ML, Dong RC, et al. Rosacea treatment with mussel adhesive protein delivered via microneedling: in vivo and clinical studies [J]. J Cosmet Dermatol, 2024, 23 (5): 1654-1662.
- [8] Stefanou E, Gkentsidi T, Spyridis I, et al. Dermoscopic spectrum of rosacea [J]. JEADV Clin Pract, 2022, 1 (1): 38-44.
- [9] 张兵兵, 余土根. 余土根教授治疗酒渣鼻临床经验 [J]. 浙江中医药大学学报, 2016, 40 (4): 286-287.
- [10] 廖梦玲, 高子平. 论泻白散在皮肤病治疗中的应用 [J]. 亚太传统医药, 2021, 17 (3): 209-211.
- [11] 赵桢熠. 经典名方泻白散抗 LPS 诱导肺炎的作用机制和药效物质基础研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2024.
- [12] 岑凯莹, 王海颖. 鱼腥草、地龙、桑白皮提取物对肺炎支原体感染小鼠模型 IL-6 和 IFN- $\gamma$  表达的影响 [J]. 中国中医急症, 2018, 27 (7): 1140-1143.
- [13] 杨萍, 金素安, 车立娟, 等. 4 种归肺经中药对肺热证小鼠 TLR2, NF- $\kappa$ B 表达变化的研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39 (17): 3359-3362.
- [14] 叶田园, 李志勇, 李彦文, 等. 地骨皮提取物对热损伤大鼠皮肤成纤维细胞的保护作用 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26 (11): 2641-2643.
- [15] 徐漫远, 闵仲生, 魏跃钢. 甘草酸通过 JAK/STAT1 通路抑制 IFN- $\gamma$  诱导 HaCaT 细胞 CXCL10 的产生 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2018, 34 (8): 708-713.
- [16] 刘一涵. 桑白皮化学成分、提取工艺及质量控制研究 [D]. 吉首: 吉首大学, 2020.
- [17] 徐东川, 刘瑾, 李晓晶, 等. 泻白散大鼠体内入血成分研究 [J]. 中国药房, 2022, 33 (1): 38-45.
- [18] 胡敏. 云南地区玫瑰痤疮患者生活与睡眠质量及焦虑状况的调查研究 [D]. 昆明: 昆明医科大学, 2022.
- [19] Ahn CS, Huang WW. Rosacea pathogenesis [J]. Dermatol clin, 2018, 36 (2): 81-86.
- [20] Zhang T, Liu X, Zhang L, et al. Treatment of rosacea with upadacitinib and abrocitinib: case report and review of evidence for Janus kinase inhibition in rosacea [J]. Front Immunol, 2024, 15: 1416004.
- [21] Sun R, Fan HP, Liu JY, et al. The treatment of Tofacitinib for rosacea through the inhibition of the JAK/STAT signaling pathway [J]. Arch Dermatol Res, 2024, 316 (8): 566.

(收稿日期: 2025-02-01; 修回日期: 2025-05-23)



## 茛菪宁对盐酸异丙肾上腺素诱导的小鼠心肌肥厚的保护作用及机制

王志华<sup>1</sup>, 初雨萌<sup>2</sup>, 张媛<sup>1</sup>, 姚芳<sup>1\*</sup> (1. 内蒙古自治区妇幼保健院, 呼和浩特 010020; 2. 内蒙古医科大学, 呼和浩特 010059)

**摘要:** **目的** 研究茛菪宁对盐酸异丙肾上腺素 (ISO) 诱导的小鼠心肌肥厚的改善作用并初步探究其作用机制。 **方法** 通过腹腔注射 ISO 构建小鼠心肌肥厚模型。超声心动图评估心功能; HE 染色观察心脏组织病理学改变; qRT-PCR 法检测心肌肥厚标志物 *ANP*、*BNP*、*TGFβ1* 和 *Coll III* 的 mRNA 水平; Western blot 法检测心脏 MAPK 信号通路蛋白水平。 **结果** 与对照组相比, 模型组小鼠左室射血分数 (EF%)、左室缩短分数 (FS%)、舒张末期左室后壁厚度 (LVPWd)、收缩末期左室后壁厚度 (LVPWs) 显著降低, 左室舒张末期直径 (LVIDd)、左室收缩末期直径 (LVIDs)、心脏质量/体质量比值 (HM/BM) 显著增加; 心肌肥厚标志物 *ANP*、*BNP*、*TGFβ1* 和 *Coll III* 的 mRNA 水平显著增加, MAPK 的蛋白表达显著增加。茛菪宁预处理后, 显著抑制了 ISO 诱导的上述效应。 **结论** 茛菪宁可能通过抑制 MAPK 信号通路改善 ISO 诱导的小鼠心肌肥厚, 可作为干预心肌肥厚发生发展的一种潜在药物。

**关键词:** 茛菪宁; 盐酸异丙肾上腺素; 心肌肥厚; MAPK

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)08-2272-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.019

## Protective effect and mechanism of piperlonguminine on myocardial hypertrophy induced by isoproterenol hydrochloride in mice

WANG Zhi-hua<sup>1</sup>, CHU Yu-meng<sup>2</sup>, ZHANG Ai<sup>1</sup>, YAO Fang<sup>1\*</sup> (1. Maternal and Child Health Hospital of Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot 010020; 2. Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059)

**Abstract: Objective** To determine the therapeutic effect of piperlonguminine on isoprenaline (ISO)-induced cardiac hypertrophy in mice and its potential mechanism. **Methods** The mouse model with myocardial hypertrophy was established through intraperitoneal injection of ISO. Echocardiography was performed to assess the cardiac function in mice. HE staining was used to examine the pathological changes in the heart tissues. The levels of hypertrophic markers *ANP*, *BNP*, *TGFβ1* and *Coll III* mRNA were determined by real time PCR, while the protein level of MAPK signaling pathway in the heart were determined by Western blot. **Results** The mice treated with ISO for 14 d obviously showed ejection fraction (EF%), fractional shortening (FS%), left ventricular posterior wall thickness at end-diastole (LVPWd) and left ventricular posterior wall thickness at end-systole (LVPWs), but increased left ventricular internal diameter at end-diastole (LVIDd), left ventricular internal diameter at end-systole (LVIDs) and heart weight/body weight (HW/BW) in the model group. ISO treatment increased the levels of hypertrophic markers *ANP*, *BNP*, *TGFβ1*, and *Coll III* mRNA and the MAPK expression. Pretreatment with piperlonguminine in mice greatly alleviated the above mentioned effects induced by ISO. **Conclusion** Piperlonguminine may ameliorate ISO-induced cardiac hypertrophy in mice by inhibiting the MAPK signaling pathway. Piperlonguminine may serve as a potential therapeutic agent for intervening the onset and progression of cardiac hypertrophy.

**Key words:** piperlonguminine; isoprenaline; cardiac hypertrophy; mitogen-activated protein kinase

**基金项目:** 内蒙古自治区卫生健康委员会基金 (No.202201147)。

**作者简介:** 王志华, 女, 主管药师, 主要从事药学和药理学研究, email: wzh842585295@163.com \*通信作者: 姚芳, 女, 主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事药学和药理学研究, email: 29658882@qq.com

心力衰竭是一种常见的难治性心血管疾病，病理性心肌肥厚是导致心力衰竭的主要原因<sup>[1]</sup>。病理性心肌肥厚涉及许多信号通路，例如丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）、降钙素-活化 T 细胞的核因子（NFAT）和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶（AKT）信号通路，MAPK 被认为是调控心肌肥厚的重要信号通路<sup>[2-4]</sup>。

茛菪宁（piperlonguminine, GBN）是茛菪果实中发现的主要生物碱，已被证明具有多种生物活性，包括抗肿瘤、抗高血脂、抗肾纤维化和抗炎等特性<sup>[5-6]</sup>。多项研究发现 GBN 对 MAPK 信号通路有重要的调控作用，例如 GBN 能够降低 p38、细胞外调节激酶（ERK1/2）和 c-JunN 末端激酶（JNK）的磷酸化，对抗内皮细胞蛋白 C 受体的脱落<sup>[7]</sup>；GBN 通过促进活性氧（ROS）的生成、调节自噬、调控 p38/Akt/mTOR 信号通路，发挥抗肿瘤作用<sup>[8]</sup>。此外，GBN 在心血管疾病的预防和治疗方面显示出良好的效果，例如 GBN 可能通过抑制 NF-κB 和 MAPK 信号通路，减轻血脑屏障破坏来保护大脑免受缺血性脑损伤<sup>[9]</sup>；能够激活醛脱氢酶降低脂醛浓度保护心脏，从而改善心脏缺血/再灌注事件中产生的细胞损伤<sup>[10]</sup>。然而，GBN 对心肌肥厚的作用及心肌 MAPK 信号通路的影响目前尚不明确。基于此，本研究旨在探索 GBN 能否改善异丙肾上腺素（isoproterenol, ISO）诱导的心肌肥厚并探讨其对心肌 MAPK 信号通路的影响，为临床开发治疗心肌肥厚的中草药提供理论依据。

1 材料

1.1 实验动物

40 只 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠，体重 23 ~ 26 g [北京华阜康生物科技公司，生产许可证号：SCXK（京）2019-0008]。饲养在清洁级动物房中，适应性喂养一周后再进行实验。动物实验伦理许可证号为 No. [2021] 伦理第 [112-1] 号。

1.2 试剂

ISO（Sigma 公司）；GBN（有效成分含量 98%，成都普思生物科技股份有限公司，批号：5950-12-9）；PrimeScript RT 试剂盒（Takara）；p38 抗体、p-p38 抗体、ERK 抗体、p-ERK 抗体、JNK 抗体、p-JNK 抗体、GAPDH 抗体（Abcam 公司）。

1.3 仪器

Vevo 2100 型小动物超声仪（加拿大 VisualSonics 公司）；ND-2000 分光光度计（Thermo Fisher）；Roche LightCycler 96 实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）仪（Hoffmann-La Roche Ltd）；Bio-Rad ChemiDoc Touch 化学发光凝胶成像系统（Biorad）。

2 方法

2.1 实验分组与处理

40 只 C57BL/6 小鼠随机分为 4 组，每组 10 只。GBN 溶解在 1 mL 的二甲基亚砜（DMSO）中，配成工作液。将 ISO 和 GBN 工作液分别溶于无菌生理盐水中。实验设置：① 对照组（Control 组），每日腹腔注射等量无菌生理盐水；② GBN 组，每日腹腔注射 GBN 10 mg/（kg·d）<sup>[11]</sup>；③ ISO 组，每日腹腔注射 ISO 15 mg/（kg·d）；④ ISO + GBN 组，腹腔注射 GBN 10 mg/（kg·d）、ISO 15 mg/（kg·d）。各组小鼠均连续给药 14 d。

2.2 超声心动图测量和评估左心室功能

给药 14 d 后进行超声心动图检查，测量并计算左室射血分数（EF%）、左室缩短分数（FS%）、左室舒张末期直径（LVIDd）、左室收缩末期直径（LVIDs）、舒张末期左室后壁厚度（LVPWd）、收缩末期左室后壁厚度（LVPWs）。在完成心脏功能检测后，小鼠称重后麻醉固定，迅速取出心脏称重，计算心脏质量/体质量比值（HM/BM）。

2.3 心肌组织 HE 染色

从小鼠体内分离心脏，甲醛固定过夜，将组织包埋在石蜡块中，制备组织切片进行常规的 HE 染色并在光学显微镜下评估心脏组织学变化。

2.4 qRT-PCR 测定心肌肥厚标志物的表达

使用 TRIzol 试剂提取心脏组织总 RNA。使用 PrimeScript RT 试剂盒进行逆转录反应。实时 qRT-PCR 在 ABI Prism 7900 系统上进行。将靶基因 *ANP*、*BNP*、*TGFβ1*、*Coll III* 的 mRNA 表达标准化为 *GAPDH* 的内源表达，并表示为相对于对照的倍数变化。使用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法进行分析。本研究用于扩增的引物序列见表 1，由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

表 1 qRT-PCR 检测小鼠心肌肥厚标志物基因的引物序列  
Tab 1 Primer sequences of mouse cardiac hypertrophy marker genes by qRT-PCR

| 靶基因      | 引物序列（5' -3'）                  |
|----------|-------------------------------|
| ANP      | 上游引物：TGGGCTTCTTCCTCGTCTTG     |
|          | 下游引物：TCTAGCAGGTTCTTGAAATCCATC |
| BNP      | 上游引物：GCTGCTGGAGCTGATAAGAGAA   |
|          | 下游引物：CGATCCGGTCTATCTTGTGCC    |
| TGFβ1    | 上游引物：TCTACAACCAACACAACCCGG    |
|          | 下游引物：GAGCGCACAATCATGTTGGAC    |
| Coll III | 上游引物：GTCAGCTGGATAGCGACA       |
|          | 下游引物：GAAGCACAGGA GCAGGTGTAGA  |
| GAPDH    | 上游引物：CCTCGTCCCGTAGACAAAATG    |
|          | 下游引物：TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT    |

2.5 Western blot 测定各组心脏组织的 p38、p-p38、ERK、p-ERK、JNK、p-JNK 蛋白表达水平

通过 Western blot 分析测量小鼠心脏组织的磷酸化蛋白和总蛋白含量。等量的蛋白质（20 μg）经

10% ~ 15% 梯度的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳分离后, 转移到硝酸纤维素膜上。膜用含有 Tween-20 和 5% 牛血清白蛋白的 Tris 缓冲盐水在室温下封闭 2 h, 加入稀释度的一抗 (1:1000) 在 4℃ 下孵育过夜, 然后与二抗 (1:5000) 孵育, 检测目标蛋白, 利用超敏 ECL 化学发光试剂盒和化学发光凝胶成像系统将免疫印记可视化, 利用 Image J 软件对免疫印记进行灰度分析。

## 2.6 统计学方法

数据采用平均值  $\pm$  标准误差 ( $\bar{x} \pm SE$ ) 表示。使用 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计分析。使用单因素方差分析确定统计显著性。  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 GBN 对 ISO 所致的心肌肥厚小鼠的心功能的影响

如图 1 和图 2 所示, 与 Control 组相比, ISO 组小鼠的 EF% 和 FS% 显著降低, 但 ISO + GBN 组改善了这种降低。此外, 与 Control 组相比, ISO 组小鼠的 LVIDd (mm) 和 LVIDs (mm) 显著增加, 而 GBN 在一定程度上减轻了 ISO 诱导的心肌肥厚小鼠

LVIDd 和 LVIDs 的增加; 与 Control 组相比, ISO 组小鼠的 LVPWd (mm) 和 LVPWs (mm) 显著降低, 而 GBN 在一定程度上减轻了 ISO 诱导的心肌肥厚小鼠 LVPWd 和 LVPWs 的降低。此外, 与 Control 组相比, ISO 组小鼠的 HW/BW 显著升高, ISO + GBN 组显著改善了这种升高。

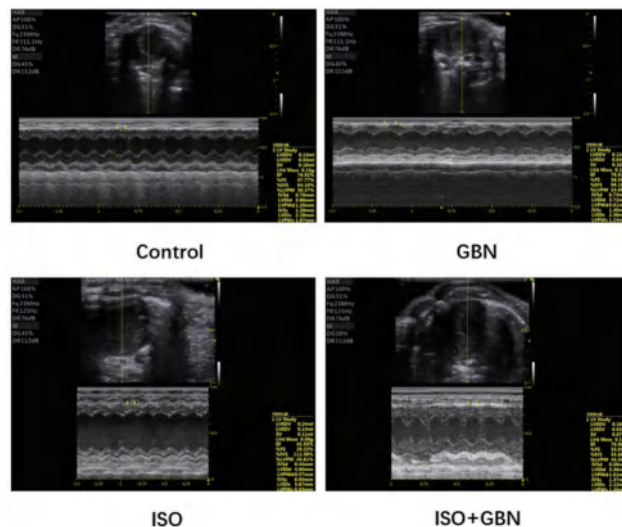


图 1 各组小鼠心脏超声模式图 ( $n = 6$ )

Fig 1 Cardiac ultrasound patterns of each mouse group ( $n = 6$ )

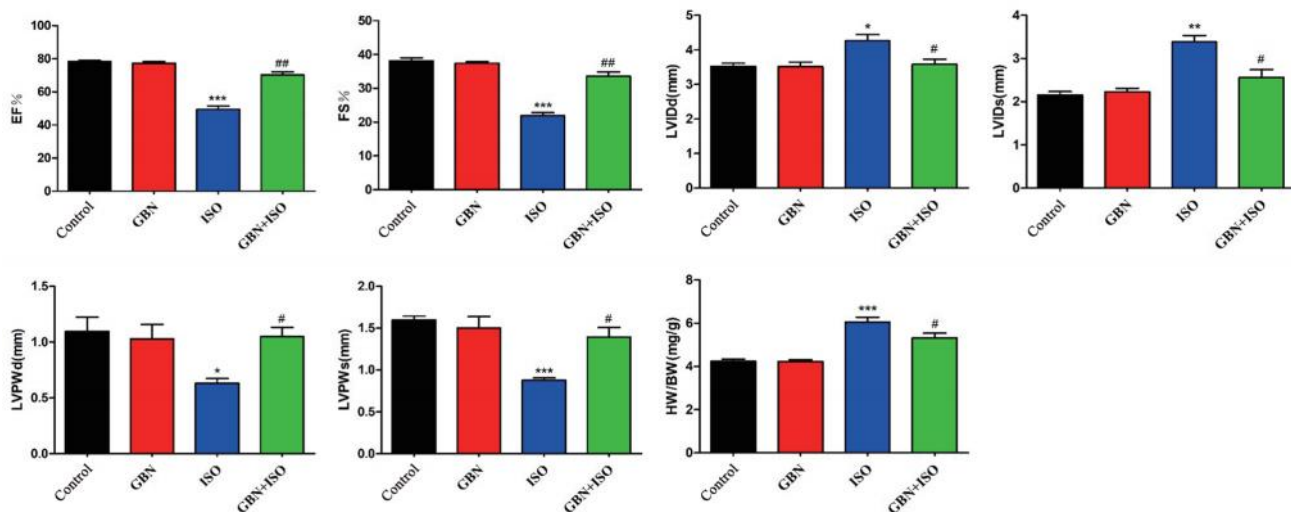


图 2 茛菪宁对 ISO 诱导的心肌肥厚小鼠心功能的影响

Fig 2 Effect of piperlonguminine on the cardiac function in mice with ISO-induced cardiac hypertrophy

注: 与 Control 组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; 与 ISO 组相比, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the Control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; compared with the ISO group, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ 。

### 3.2 GBN 对 ISO 所致的心肌组织病理学变化的影响

如图 3A 所示, Control 组小鼠心脏大小正常, ISO 组小鼠心脏肥大, ISO + GBN 组小鼠心脏大小与对照组接近。如图 3B 所示, 在  $\times 200$  显微镜下观察 HE 组织病理学改变, 结果显示, Control 组的心脏组织表现出正常的组织学结构, 心肌细胞排列整齐, 形态规则, 大小均一, 周围无炎症细胞浸润, 组织中没有观察到病理改变。相比之

下, ISO 组细胞发生了明显的形态变化, 左室心肌细胞出现肥大, 细胞形态不规则, 排列紊乱, 细胞核有明显皱缩现象, 周围有炎症细胞浸润。在 GBN 的干预下, 模型组的病理学变化得到了改善, 细胞排列较整齐, 形态较规则, 肥大细胞减少, 仅有少数炎症细胞浸润。

3.3 GBN 对 ANP、BNP、TGF $\beta$ 1 和 Coll III 的 mRNA 表达水平的影响



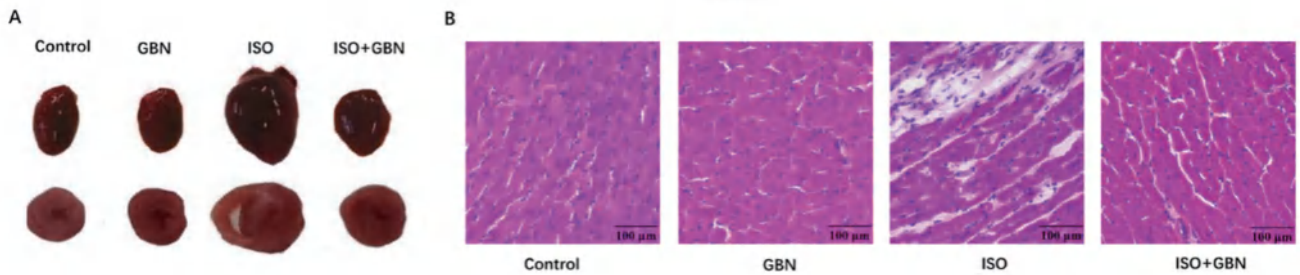


图 3 茛菪宁对 ISO 诱导的心肌肥厚小鼠心脏组织病理学变化的影响

Fig 3 Effect of piperlonguminine on the cardiac histopathological changes in mice with ISO-induced cardiac hypertrophy

利用 qRT-PCR 法检测心肌肥厚标志物心房钠尿肽 (ANP) 和脑钠尿肽 (BNP) 的 mRNA 表达水平。与 Control 组相比, ISO 组表达水平显著升高, 而在 GBN 的预处理下, ANP 和 BNP 的 mRNA 表达水平显著下调。除了心肌细胞肥大, 心肌肥厚的另一个重要病理表现是心肌间质

纤维化增加, 因此, 本研究检测了心肌纤维化相关标志物转化生长因子- $\beta 1$  ( $TGF\beta 1$ ) 和 III 型溶胶原 ( $Coll III$ ) 的 mRNA 表达水平, 与 Control 组相比, ISO 组表达水平显著升高, 而在 GBN 的预处理下,  $TGF\beta 1$  和  $Coll III$  的表达水平显著下调。结果如图 4 所示。

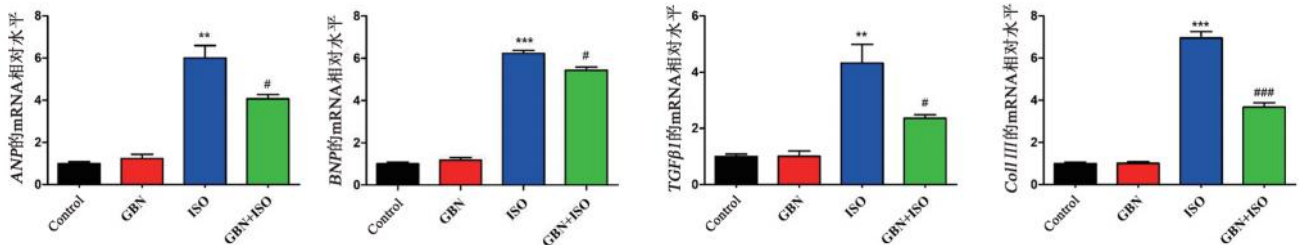


图 4 茛菪宁对 ISO 诱导的心肌肥厚小鼠心肌肥厚标志物 mRNA 表达的影响

Fig 4 Effect of piperlonguminine on the mRNA expression of cardiac hypertrophy markers in mice with ISO-induced cardiac hypertrophy

注: 与 Control 组相比, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; 与 ISO 组相比, # $P < 0.05$ , ### $P < 0.001$ 。

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

### 3.4 GBN 对 ISO 诱导的心肌肥厚小鼠心脏 MAPK 信号通路的影响

为了研究 GBN 的抗心肌肥厚机制, 本研究检测了 MAPK 主要亚家族 p38、细胞外信号调节激酶 (ERK) 和 c-JunN-末端激酶/应激活化蛋白激酶 (JNK) 及其磷酸化 p-p38、p-ERK、p-JNK 的蛋白表

达水平。结果显示 ISO 组 p-p38/p38、p-ERK/ERK、p-JNK/JNK 的蛋白表达水平较 Control 组显著升高。而 GBN 的干预显著降低了 p-p38/p38、p-ERK/ERK、p-JNK/JNK 的蛋白表达水平。表明 GBN 能显著降低 ISO 诱导的 MAPK 亚家族蛋白磷酸化。结果如图 5 所示。

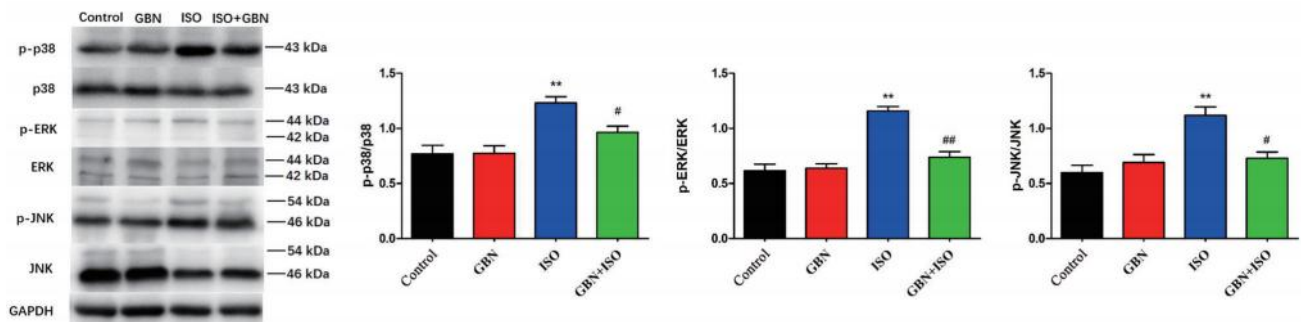


图 5 茛菪宁对 ISO 诱导的心肌肥厚小鼠心肌组织 p38、ERK、JNK 蛋白磷酸化水平的影响

Fig 5 Effect of piperlonguminine on the phosphorylation levels of p38, ERK, and JNK proteins in the myocardial tissue of mice with ISO-induced cardiac hypertrophy

注: 与 Control 组相比, \*\* $P < 0.01$ ; 与 ISO 组相比, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the Control group, \*\* $P < 0.01$ ; compared with the ISO group, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ .

#### 4 讨论与结论

心肌肥厚是心血管疾病发生发展的独立危险因素<sup>[12]</sup>。临床研究表明,少数药物如钙通道阻滞剂、血管紧张素Ⅱ受体阻滞剂、血管紧张素转换酶抑制剂等在预防和改善心肌肥厚方面可能有有益作用<sup>[13]</sup>。但这些药物均为降压药,不适用于基线血压较低的患者。因此,需要进一步开发出能够有效治疗心肌肥厚的药物来更好地控制临床心肌肥厚的发展。

本研究发现 GBN 能抑制 ISO 引起的心肌肥厚。通过检测小鼠的心功能、心脏组织病理学、心肌肥厚相关标志物以及心肌纤维化相关标志物的 mRNA 表达,显示 GBN 改善了 ISO 所致的小鼠心肌肥厚病理变化。

MAPK 信号通路在心肌肥厚的发生和进展中发挥着至关重要的作用。MAPK 亚家族主要包括 p38、JNK、ERK,其能够被各种细胞外和细胞内信号激活,调节多种细胞过程,如增殖、分化、细胞存活和凋亡<sup>[14-15]</sup>。MAPK 信号通路的激活是细胞内磷酸化级联反应的最终步骤<sup>[16]</sup>。MAPK 亚家族中的每一种磷酸化,在心脏肥厚中具有重要的作用。例如 ERK1/2 磷酸化通常与促进肥大生长相关,而 p38 和 JNK 磷酸化通常与应激反应和细胞凋亡相关<sup>[17]</sup>。此外,MAPK 信号传导的长期激活会导致不良重塑、纤维化,并最终导致心力衰竭。例如,研究表明 p38 的持续激活与心脏细胞凋亡和纤维化增加有关,从而导致代偿性肥大向心力衰竭的转变<sup>[17]</sup>。总之,MAPK 信号通路是心肌肥厚的核心信号通路,它的激活能导致肥大基因的表达并导致心脏组织重塑。因此挖掘影响 MAPK 信号通路的抗心肌肥厚药物,可能为临床开发预防或逆转病理性心肌肥厚的药物提供有价值的参考。

既往研究表明,GBN 可以通过抑制 MAPK 发挥抗炎、抗肿瘤等作用<sup>[7, 9]</sup>。本研究首次发现 GBN 抑制了心肌肥厚小鼠心肌 MAPK 家族 p38、ERK、JNK 蛋白的磷酸化,提示其可能通过抑制 MAPK 信号通路改善 ISO 所致小鼠心肌肥厚。本研究结果表明,GBN 可作为一种治疗心肌肥厚的潜在药物。

#### 参考文献

[1] Gu J, Qiu M, Lu Y, et al. Piperlongumine attenuates angiotensin-Ⅱ-induced cardiac hypertrophy and fibrosis by inhibiting Akt-FoxO1 signalling [J]. *Phytomedicine*, 2021, 82:

153461.

- [2] Shimizu I, Minamino T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 97: 245-262.
- [3] Chen QM, Maltagliati AJ. Nrf2 at the heart of oxidative stress and cardiac protection [J]. *Physiol Genomics*, 2018, 50 (2): 77-97.
- [4] Narasimhan M, Rajasekaran NS. Exercise, Nrf2 and antioxidant signaling in cardiac aging [J]. *Front Physiol*, 2016, 7: 241.
- [5] Zhou L, Wu HK, Gao XY, et al. Piperlongumine attenuates renal fibrosis by inhibiting TRPC6 [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 313: 116561.
- [6] Hu Q, Tao R, Hu YX, et al. Effects of piperlongumine on lung injury in severe acute pancreatitis via the TLR4/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Eur J Histochem*, 2023, 67 (2): 3639.
- [7] Ku SK, Kim JA, Bae JS. Piperlongumine downregulates endothelial protein C receptor shedding in vitro and in vivo [J]. *Inflammation*, 2014, 37 (2): 435-442.
- [8] Zhu P, Qian JQ, Xu ZY, et al. Piperlongumine and piperine analogues as TrxR inhibitors that promote ROS and autophagy and regulate p38 and Akt/mTOR signaling [J]. *J Nat Prod*, 2020, 83 (10): 3041-3049.
- [9] Yang TS, Sun SX, Wang TG, et al. Piperlongumine is neuroprotective in experimental rat stroke [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 23 (2): 447-451.
- [10] Yoval-Sánchez B, Calleja LF, de la Luz Hernández-Esquivel M, et al. Piperlongumine a new mitochondrial aldehyde dehydrogenase activator protects the heart from ischemia/reperfusion injury [J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2020, 1864 (11): 129684.
- [11] Luo N, Zhang L, Xiu CM, et al. Piperlongumine, a piperlongum-derived amide alkaloid, protects mice from ovariectomy-induced osteoporosis by inhibiting osteoclastogenesis via suppression of p38 and JNK signaling [J]. *Food Funct*, 2024, 15 (4): 2154-2169.
- [12] Gradman AH, Alfayoumi F. From left ventricular hypertrophy to congestive heart failure: management of hypertensive heart disease [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2006, 48 (5): 326-341.
- [13] Jiang QS, Huang XN, Yang GZ, et al. Inhibitory effect of ginsenoside Rb<sub>1</sub> on calcineurin signal pathway in cardiomyocyte hypertrophy induced by prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28 (8): 1149-1154.
- [14] Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases [J]. *MMBR*, 2011, 75 (1): 50-83.
- [15] Kciuk M, Gielecińska A, Budzinska A, et al. Metastasis and MAPK pathways [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (7): 3847.
- [16] 余元勋, 鲍远程. 中国疾病信号通路靶向治疗学 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2013.
- [17] Kubin T, Cetinkaya A, Kubin N, et al. The MEK/ERK module is reprogrammed in remodeling adult cardiomyocytes [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (17): 6348.

(收稿日期: 2024-11-04; 修回日期: 2025-02-05)

# 基于化学成分 - 活性的白毛银露梅产地干燥加工方法研究

崔小敏, 陈志永, 张红, 鲁文静, 任慧, 胡静, 陈娟\* (陕西省中医药研究院, 西安 710003)

**摘要:** **目的** 考察不同干燥加工方法对白毛银露梅化学成分和体外降糖活性的影响, 优选白毛银露梅适宜的干燥加工方法。**方法** 分别采用自然阴干、炒干、晒干、不同温度 (40、60、80 °C) 热风烘干、100 °C 蒸汽杀青处理后 60 °C 热风烘干 (杀青时长分别为 60、120、180 s) 的方法对白毛银露梅鲜品进行干燥加工。以不同干燥方法处理的样品的感官审评分数、总黄酮和总酚含量、5 种特征化学成分含量 (仙鹤草素、异槲皮苷、鞣花酸、槲皮苷和篇蓄苷) 以及  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性为评价指标, 采用熵权 -TOPSIS 法综合评价白毛银露梅不同干燥加工方法的优劣。**结果** 100 °C 蒸汽杀青 180 s 后 60 °C 热风烘干的白毛银露梅综合品质最佳, 其次是炒干, 40 °C 热风直接烘干处理的样品综合品质相对最低。**结论** 本研究为白毛银露梅资源的合理开发利用提供了科学依据。

**关键词:** 白毛银露梅; 干燥方法; 化学成分;  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性; 熵权 -TOPSIS

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)08-2277-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.020

## Origin drying methods for *Dasiphora mandshurica* (Maxim.) Juz. based on chemical compositions and activity

CUI Xiao-min, CHEN Zhi-yong, ZHANG Hong, LU Wen-jing, REN Hui, HU Jing, CHEN Juan\* (Shaanxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710003)

**Abstract: Objective** To determine the effect of different drying methods on the chemical composition and in vitro hypoglycemic activity of *Dasiphora mandshurica* (Maxim.) Juz. to select the most suitable origin drying methods. **Methods** Fresh materials were dried with the following methods: natural shade-drying, stir-frying, sun-drying, and hot-air drying at different temperatures (40, 60, and 80 °C), and steam fixation at 100 °C for 60, 120, or 180 s followed by hot-air drying at 60 °C. The different drying methods for *Dasiphora mandshurica* were comprehensively evaluated with the entropy weight-TOPSIS method. The sensory evaluation scores, total flavonoid content, total phenolic content, contents of five characteristic chemical components (agrimoniin, isoquercitrin, ellagic acid, quercitrin, and avicularin), and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity served as evaluation indicators. **Results** Samples treated with steam fixation at 100 °C for 180 seconds followed by hot-air drying at 60 °C showed the best comprehensive quality, followed by stir-fried samples. Samples processed by 40 °C hot-air drying showed relatively lower comprehensive quality. **Conclusion** This study provides a scientific basis for the development and utilization of *Dasiphora mandshurica* resources.

**Key words:** *Dasiphora mandshurica* (Maxim.) Juz.; drying method; chemical composition;  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity; entropy weight-TOPSIS

白毛银露梅 [*Dasiphora mandshurica* (Maxim.) Juz.] 为蔷薇科金露梅属珍稀植物<sup>[1]</sup>, 野生于秦岭

**基金项目:** 陕西省重点研发计划一般项目 (No.2025SF-YBXM-258, 2025SF-YBXM-476, 2025SF-YBXM-259); 陕西省中医药管理局“双链融合”中青年科研创新团队 (No. 2022-SLRH-YQ-003); 陕西重点研发计划项目 (No. 2024SF2-GJHX-52); 陕西省中医药管理局科研项目 (No. SZY-KJCYC-2025-JC-051); 西安市科技计划医学研究一般项目 (No. 24YXYJ0167)。

**作者简介:** 崔小敏, 女, 副研究员, 主要从事中药质量控制与活性成分方面的研究, email: cuixiaomin406@163.com \*通信作者: 陈娟, 女, 助理研究员, 主要从事中药资源开发与利用方面的研究, email: chenjuan\_2007jie@163.com



太白山 3000 m 高寒草甸区, 年生长期仅 3 个月 (6 ~ 8 月), 是兼具药用与保健价值的药食同源植物。作为“药王茶”代茶饮的应用历史悠久,《太白山草》记载其性平味甘, 具有清暑热、健脾胃、调经明目等功效<sup>[2]</sup>。现代研究证实, 白毛银露梅富含黄酮、多酚及挥发油等活性成分<sup>[3]</sup>, 具有抗氧化、调节免疫及改善代谢综合征等作用, 在糖尿病、心血管疾病防治及亚健康调理方面展现出独特价值。

$\alpha$ -葡萄糖苷酶是调控餐后血糖水平的关键酶, 其抑制剂可通过延缓碳水化合物的消化吸收, 有效控制血糖升高, 已成为 2 型糖尿病治疗的重要靶点<sup>[4]</sup>。白毛银露梅近年来多用于防治糖尿病等代谢综合征相关病症<sup>[5-6]</sup>, 其富含的黄酮类和多酚类成分已被证实具有潜在的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性<sup>[7-8]</sup>。因此, 测定该活性不仅可评估其降糖潜力, 还可为优化加工工艺提供依据。

白毛银露梅每年的采收期恰逢太白山多雨季节, 传统的自然阴干和晒干法受限于气候多变、干燥效率低等问题, 存在耗时长、有效成分易流失等缺点。现有研究多集中于化学成分解析, 产地干燥加工方法研究严重滞后, 直接影响白毛银露梅质量稳定性与产业化发展。基于此, 本研究采用不同干燥方法对白毛银露梅鲜品进行加工处理, 以感官审评分数、总黄酮和总酚含量、5 种特征化学成分含量 (仙鹤草素、异槲皮苷、鞣花酸、槲皮苷和蒽薹苷) 及  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性为综合考察指标, 根据熵权 - 逼近理想解排序法 (TOPSIS) 模型<sup>[9]</sup>, 优选白毛银露梅的适宜产地干燥加工方法, 以期为该植物资源的合理开发利用提供理论依据和技术支撑, 推动秦岭特色植物资源的可持续利用。

## 1 材料

LC-2010A 型高效液相色谱仪 (配置 UV 紫外检测器和 LC Solution 工作站, 日本岛津), 1530 型酶标仪 (美国 Thermo Scientific), KQ-400DE 型超声波清洗机 (昆山市超声仪器有限公司), 101 型电热鼓风干燥箱 (北京市永光明医疗仪器有限公司), 电子分析天平 (北京赛多利斯天平有限公司,  $d = 0.1 \text{ mg}$ ;  $d = 0.01 \text{ mg}$ )。

$\alpha$ -葡萄糖苷酶来源于酿酒酵母 (编号: G5003, Type I) (美国 Sigma-Aldrich 公司)。底物对硝基苯基  $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷 (批号: M1101, 纯度  $\geq 99.0\%$ , 上海圻明生物科技有限公司)。福林酚试剂 (批号: 21010501, 纯度: 99.13%)、蒽薹

苷 (批号: 21010501) (成都普菲德生物技术有限公司); 芦丁 (批号: MUST-22022507)、没食子酸 (批号 MUST-21030805)、异槲皮苷 (批号: MUST-21041613) (成都曼思特生物科技有限公司); 仙鹤草素 (批号: 230418, 成都植标化纯生物技术有限公司); 鞣花酸 (批号: HR1827W1)、槲皮苷 (批号: HR1232W12) (宝鸡辰光生物科技有限公司), 以上对照品纯度均  $\geq 98\%$ ; 甲醇为色谱纯 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), 水为娃哈哈纯净水, 其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 不同干燥方式的样品制备

取白毛银露梅叶、花和嫩枝鲜品, 挑出并弃掉其中混入的异物和杂质, 称取 9 份, 每份取约 50 g, 分别用自然阴干 (D1)、炒干 (D2)、晒干 (D3)、80 °C 热风烘干 (D4)、60 °C 热风烘干 (D5)、40 °C 热风烘干 (D6)、100 °C 蒸汽杀青 180 s 后 60 °C 热风烘干 (D7)、100 °C 蒸汽杀青 120 s 后 60 °C 热风烘干 (D8)、100 °C 蒸汽杀青 60 s 后 60 °C 热风烘干 (D9)。干燥时样品的铺展厚度约为 1 cm, 干燥至含水量  $\leq 11.0\%$  时停止。

### 2.2 提取物的制备

将干燥后的样品粉碎过三号筛 (50 目), 每份称取约 5.0 g, 置于 250 mL 圆底烧瓶中, 加入 75% 甲醇 100 mL, 加热回流 30 min, 提取 2 次, 合并滤液, 40 °C 减压浓缩, 挥去有机溶剂, 冷冻干燥成提取物冻干粉, 置于干燥器中密封保存备用。

### 2.3 感官审评

参照 GB/T 23776—2018《茶叶感官审评方法》, 称取 3.0 g 白毛银露梅不同干燥方法处理的样品, 加入 150 mL 沸水并加盖冲泡 4 min。邀请 5 名专业人员依次审评各供试样品的外形、汤色、香气、滋味和叶底, 并进行打分, 满分为 100 分。综合评分权重分别为 25% (外形)、10% (汤色)、25% (香气)、30% (滋味) 和 10% (叶底)。

### 2.4 总酚含量测定

采用福林酚法测定样品总酚含量<sup>[10]</sup>。取样品提取物约 10 mg, 精密称定, 加入 75% 甲醇 4 mL, 超声使其溶解, 用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔有机滤膜滤过, 取续滤液用 75% 甲醇溶液稀释 25 倍, 制成约 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的样品溶液。在 96 孔板中, 将 20  $\mu\text{L}$  样品溶液与 40  $\mu\text{L}$  福林酚试剂 (25%) 混合, 振荡 30 s, 室温反应 5 min 后, 向每孔中加入 140  $\mu\text{L}$  碳酸钠溶液 (700  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 振荡 30 s。将微孔板盖起来, 40 °C 黑暗孵育 30 min, 用酶标仪

在 765 nm 波长下测定吸光度值。

根据没食子酸 (10、25、50、100、200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 的标准曲线, 结果以每 100 g 提取物中没食子酸当量表示。所有试验均重复 3 次。测得芦丁标准曲线为  $Y = 0.0048X + 0.0684$ , 结果如表 1 所示, 100℃ 蒸汽杀青 180 s 后烘干和炒干的样品总酚含量相对最高, 每 100 g 提取物中的总酚分别为  $(52.14 \pm 1.51)$  g 和  $(51.55 \pm 2.17)$  g。

## 2.5 总黄酮含量测定

采用硝酸铝比色法测定总黄酮含量<sup>[11]</sup>。取提取物粉末约 10 mg, 精密称定, 加入 75% 甲醇 4 mL, 超声使样品溶解, 用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔有机滤膜滤过, 取续滤液用 75% 甲醇溶液稀释 25 倍, 制成约 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的样品溶液。取 60  $\mu\text{L}$  样品溶液与 20  $\mu\text{L}$  亚硝酸钠 (50  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 混合在 96 孔板中, 静置 6 min。向每孔中加入 20  $\mu\text{L}$  硝酸铝 (100  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 室温孵育 6 min 后, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  氢氧化钠溶液 (40  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 振荡 30 s, 使其充分混合。将微孔板盖起来, 室温黑暗孵育 30 min, 用酶标仪在 510 nm 波长下测定吸光度值。所有试验均重复 3 次。

根据芦丁 (5、10、25、50、100、200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 的标准曲线, 结果以每 100 g 提取物中的芦丁当量表示。测得芦丁标准曲线为  $Y = 0.0018X + 0.0484$ , 由表 1 可知, 100℃ 蒸汽杀青 180 s 后烘干的样品总黄酮含量最高, 每 100 g 提取物中的芦丁当量为  $(48.60 \pm 1.99)$  g。

## 2.6 白毛银露梅 5 种特征性成分的含量测定

供试品溶液制备和色谱条件参考本课题组之前的研究<sup>[12]</sup>。取白毛银露梅样品粉碎, 过 50 目筛。取不同干燥方式的样品粉末约 0.2 g, 精密称定, 置 100 mL 锥形瓶中, 加入 75% 甲醇 25 mL, 超声处理 45 min, 放冷, 补足失重, 摇匀, 用 0.22  $\mu\text{m}$  微孔有机滤膜滤过, 即得供试品溶液。精密称取仙鹤草素、异槲皮苷、鞣花酸、槲皮苷、篇蓄苷对照品适量, 加入甲醇制成质量浓度依次为 162.00、7.92、14.20、9.09、15.75  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的混合对照品储备液。色谱柱采用 Agilent Poroshell 120 SB- $\text{C}_{18}$  色谱柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 2.7  $\mu\text{m}$ ), 以乙腈-甲醇-0.1% 磷酸水溶液为流动相, 三相梯度洗脱 (0~60 min: 3%~40% 乙腈, 1%~5% 甲醇; 60~90 min: 40%~55% 乙腈, 5%~12% 甲醇), 流速为 0.5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 检测波长为 254 nm, 柱温为 25℃, 进样量为 10  $\mu\text{L}$ 。对照品溶液和供试品溶液的 HPLC 图见图 1。

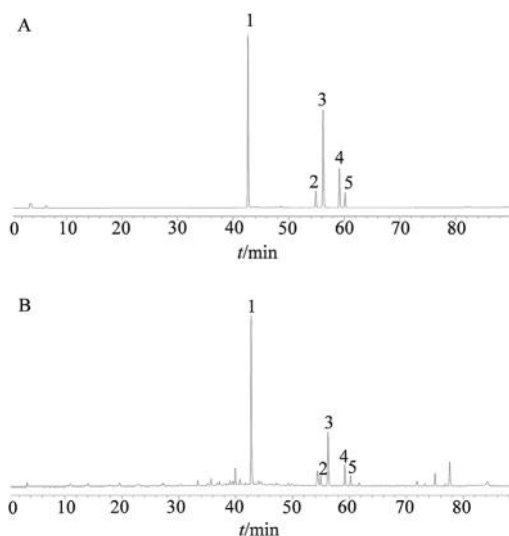


图 1 混合对照品溶液 (A) 和供试品溶液 (B) 的 HPLC 图

Fig 1 HPLC chromatograms of the mixed reference solution (A) and sample solution (B)

1. 仙鹤草素 (agrimoniin); 2. 异槲皮苷 (isoquercitrin); 3. 鞣花酸 (ellagic acid); 4. 槲皮苷 (quercitrin); 5. 篇蓄苷 (avicularin)

样品中仙鹤草素、异槲皮苷、鞣花酸、槲皮苷、篇蓄苷的含量测定结果见表 1 和图 2。结果表明, 蒸汽杀青 180 s 后 60℃ 烘干样品的仙鹤草素、鞣花酸、槲皮苷、总酚和总黄酮含量最高, 炒干的样品中篇蓄苷含量最高, 异槲皮苷在蒸汽杀青 180 s 后 60℃ 烘干和炒干的样品含量相对最高, 含量均为 0.96  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

## 2.7 白毛银露梅体外 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性测定<sup>[13]</sup>

取药材提取物约 10 mg, 精密称定, 加入 75% 甲醇 4 mL, 超声使样品溶解, 用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔有机滤膜滤过, 取续滤液用缓冲液稀释 25 倍, 制成约 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的样品母液, 采用缓冲液稀释成质量浓度分别为 1、5、10、25、50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  系列样品溶液。取 50  $\mu\text{L}$  不同样品溶液与 100  $\mu\text{L}$  0.25  $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶 (溶解于 0.1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 6.9 的磷酸盐缓冲液中) 于 96 孔板上混匀, 室温反应 10 min 后加入 50  $\mu\text{L}$  5.0  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (溶解于 0.1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 6.9 的磷酸盐缓冲液) 的 4-硝基苯基- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷溶液, 室温反应 10 min 后, 采用酶标仪在 405 nm 处测定吸光度值。根据下列公式计算抑制率:

$$\text{抑制率}(\%) = [1 - (A_s - A_1) / (A_b - A_2)] \times 100\%$$

式中  $A_s$  为测定样品溶液的吸光度,  $A_b$  为空白对照的吸光度 (用缓冲液代替样品),  $A_1$  为样品和 4-硝基苯基- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷背景吸光度 (用缓冲液代替酶),  $A_2$  为样品的背景吸光度 (用样品溶剂代替



样品，用缓冲液代替酶）。所有测定平行 3 次。

采用 Probit 分析模型计算  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 值。分析结果见表 1 和

图 2。结果白毛银露梅在蒸汽杀青 180 s 的样品中  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性最好 ( $IC_{50}$  为  $8.43 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )，其次是炒干样品 ( $IC_{50}$  为  $8.96 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。

表 1 白毛银露梅感官审评分数、化学成分含量和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性测定结果

| Tab 1 Sensory evaluation scores, chemical composition content, and $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of <i>Dasiphora mandshurica</i> |            |                                               |                                               |                                              |                                              |                                              |                                              |                                        |                                                                |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| 干燥方<br>法                                                                                                                                     | 感官审评<br>分数 | 仙鹤草素 /<br>( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) | 异槲皮苷 /<br>( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) | 鞣花酸 /<br>( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) | 槲皮苷 /<br>( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) | 扁蓄苷 /<br>( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) | 总黄酮 /<br>( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) | 总酚 /<br>( $\text{g} / 100 \text{ g}$ ) | $\alpha$ -糖苷酶抑制<br>活性 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) |
| D1                                                                                                                                           | 85.5±2.8   | 104.90±1.12                                   | 0.89±0.02                                     | 1.96±0.03                                    | 2.34±0.02                                    | 0.86±0.01                                    | 40.89±1.56                                   | 50.89±1.23                             | 9.29±0.41                                                      |
| D2                                                                                                                                           | 82.3±3.9   | 104.81±0.98                                   | 0.96±0.02                                     | 2.35±0.05                                    | 2.02±0.03                                    | 1.09±0.02                                    | 45.95±1.48                                   | 51.55±2.17                             | 8.96±0.23                                                      |
| D3                                                                                                                                           | 83.7±4.7   | 98.63±0.79                                    | 0.86±0.01                                     | 2.14±0.03                                    | 2.16±0.02                                    | 0.74±0.01                                    | 30.90±1.46                                   | 36.29±1.09                             | 10.72±0.40                                                     |
| D4                                                                                                                                           | 85.6±3.6   | 64.57±0.23                                    | 0.92±0.01                                     | 1.49±0.02                                    | 2.35±0.03                                    | 0.79±0.01                                    | 37.76±1.43                                   | 42.69±2.67                             | 12.02±0.29                                                     |
| D5                                                                                                                                           | 81.9±4.8   | 90.15±0.44                                    | 0.94±0.02                                     | 1.73±0.02                                    | 2.41±0.02                                    | 0.83±0.01                                    | 38.14±1.52                                   | 43.88±1.54                             | 10.94±0.10                                                     |
| D6                                                                                                                                           | 85.0±3.7   | 78.38±0.56                                    | 0.86±0.02                                     | 1.55±0.01                                    | 2.11±0.01                                    | 0.68±0.01                                    | 38.13±1.76                                   | 43.48±1.77                             | 13.40±0.57                                                     |
| D7                                                                                                                                           | 85.1±4.6   | 107.29±0.64                                   | 0.96±0.01                                     | 2.51±0.03                                    | 2.65±0.01                                    | 1.00±0.02                                    | 48.60±1.99                                   | 52.14±1.51                             | 8.43±0.38                                                      |
| D8                                                                                                                                           | 84.7±4.2   | 102.84±0.28                                   | 0.91±0.01                                     | 2.16±0.03                                    | 2.35±0.02                                    | 0.91±0.02                                    | 41.52±1.95                                   | 46.12±1.84                             | 9.26±0.32                                                      |
| D9                                                                                                                                           | 84.7±4.3   | 89.11±1.25                                    | 0.95±0.02                                     | 1.87±0.02                                    | 2.48±0.02                                    | 0.94±0.01                                    | 38.58±1.58                                   | 42.21±0.65                             | 10.37±0.41                                                     |

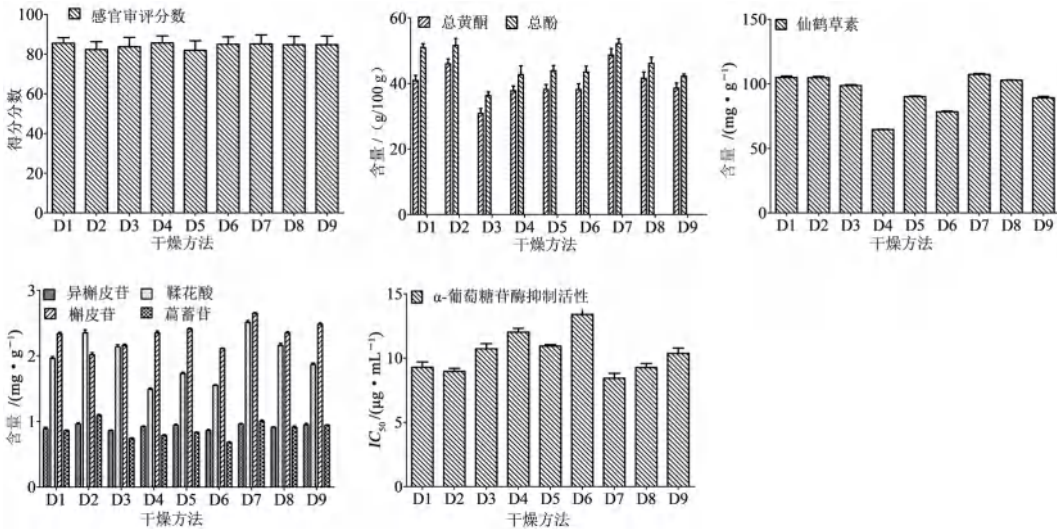


图 2 白毛银露梅感官审评分数、化学成分含量和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性柱状图

Fig 2 Bar chart of the sensory evaluation scores, chemical composition content, and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of *Dasiphora mandshurica*

2.8 熵权 -TOPSIS 法评价不同干燥方法的白毛银露梅品质<sup>[14-15]</sup>

2.8.1 熵权法计算权重 设有  $m$  个样品，每个样品的  $n$  个测定结果作为评价指标，构建不同干燥方式处理的白毛银露梅质量评价矩阵  $X_{ij}$  ( $i = 1, 2, \dots, m; j = 1, 2, \dots, n$ ; 本研究中  $m = 9, n = 9$ )。9 个测量指标中感官审评分数、总酚、总黄酮、仙鹤草素、异槲皮苷、鞣花酸、槲皮苷、扁蓄苷的含量均为正向指标 (数值越大越好)， $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性  $IC_{50}$  为负向指标 (数值越小越好)。采用极差法根据公式 (1) 和 (2) 对原始矩阵正向化和标准化。分别应用公式 (3) ~ (6) 计算第  $j$  项指标下第  $i$  个对象的值占该指标的比重  $P_{ij}$ 、第  $j$  项指标熵值  $E_j$ 、差异系数  $G_j$  和权重  $W_j$ 。

正向指标:  $Z_{ij} = \frac{X_{ij} - X_j^{\min}}{X_j^{\max} - X_j^{\min}}$  (1)

负向指标:  $Z_{ij} = \frac{X_j^{\max} - X_{ij}}{X_j^{\max} - X_j^{\min}}$  (2)

$P_{ij} = Z_{ij} / \sum_{i=1}^n Z_{ij}, (j=1, 2, \dots, m)$  (3)

$E_j = -\frac{1}{\ln n} \sum_{i=1}^n P_{ij} \ln P_{ij}, (j=1, 2, \dots, m)$  (4)

$G_j = 1 - E_j$  (5)

$W_j = G_j / \sum_{j=1}^m G_j$  (6)

$E_j$  反映指标的离散程度,  $E_j$  越大, 指标的离散程度越小,  $W_j$  越小。根据熵权法得到各评价指标的权重系数见表 2。表 2 中异槲皮苷、鞣花酸、扁蓄苷、槲皮苷等权重较高, 表明其对综合评价结果有相对重要的影响。

2.8.2 TOPSIS 法计算相对贴近度 将标准化矩



表 2 熵权法各指标权重

| 指标                  | 熵值    | 差异系数  | 权重    | 排序 |
|---------------------|-------|-------|-------|----|
| 感官审评分数              | 0.902 | 0.098 | 0.106 | 5  |
| 仙鹤草素                | 0.925 | 0.075 | 0.082 | 9  |
| 异槲皮苷                | 0.856 | 0.144 | 0.156 | 1  |
| 鞣花酸                 | 0.867 | 0.133 | 0.144 | 2  |
| 槲皮苷                 | 0.891 | 0.109 | 0.119 | 4  |
| 扁蓄苷                 | 0.888 | 0.112 | 0.122 | 3  |
| 总黄酮                 | 0.918 | 0.082 | 0.089 | 7  |
| 总酚                  | 0.913 | 0.087 | 0.094 | 6  |
| $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性 | 0.919 | 0.081 | 0.088 | 8  |

阵  $Z$  每列与对应的权重相乘后得到加权标准化矩阵。正理想解  $Z_j^+$  由加权标准化矩阵中每列元素的最大值组成，负理想解  $Z_j^-$  由每列元素的最小值组成，即按公式  $Z_j^+ = \max(Z_{ij})$  或  $Z_j^- = \min(Z_{ij})$  计算得到。使用欧氏距离（公式 7 和 8）计算每个样品与正理想解  $D_i^+$  和负理想解  $D_i^-$  的距离。使用负理想解距离（公式 9）计算相对贴近度  $C$  并排序。相对贴近度在 0 ~ 1，越大表示离负理想解越远，样品综合品质就越好。

$$D_i^+ = \sqrt{\sum_{j=1}^m (Z_j^+ - Z_{ij})^2} \quad (7)$$

$$D_i^- = \sqrt{\sum_{j=1}^m (Z_j^- - Z_{ij})^2} \quad (8)$$

$$C_i = D_i^- / (D_i^+ + D_i^-) \quad (9)$$

采用 TOPSIS 排序法得到不同干燥方式处理的白毛银露梅综合评价结果见表 3 和图 3。由图 3 可以更加直观地看出不同干燥方式处理的白毛银露梅综合评价结果：100℃蒸汽杀青 180 s 后 60℃热风烘干>炒干>100℃蒸汽杀青 120 s 后 60℃热风烘干>100℃蒸汽杀青 60 s 后 60℃热风烘干>自然阴干>60℃热风烘干>80℃热风烘干>晒干>40℃热风烘干。结果表明，180 s 蒸汽杀青后烘干的样品综合品质最佳，炒干的样品次之，40℃热风烘干制得的样品综合品质最低。

表 3 不同干燥方法的白毛银露梅 TOPSIS 评价结果

| 编号 | 正理想解距离 $D^+$ | 负理想解距离 $D^-$ | 相对贴近度 $C$ | 排序 |
|----|--------------|--------------|-----------|----|
| D1 | 0.167        | 0.212        | 0.560     | 5  |
| D2 | 0.154        | 0.283        | 0.647     | 2  |
| D3 | 0.261        | 0.137        | 0.344     | 8  |
| D4 | 0.230        | 0.168        | 0.422     | 7  |
| D5 | 0.202        | 0.178        | 0.469     | 6  |
| D6 | 0.291        | 0.110        | 0.275     | 9  |
| D7 | 0.030        | 0.329        | 0.916     | 1  |
| D8 | 0.134        | 0.217        | 0.617     | 3  |
| D9 | 0.143        | 0.224        | 0.610     | 4  |

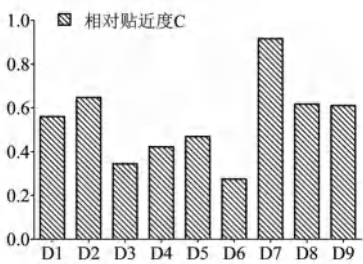


图 3 不同干燥方法的白毛银露梅 TOPSIS 评价结果  
Fig 3 TOPSIS evaluation of *Dasiphora mandshurica* processed by different drying methods

**2.8.3 成分含量 - 活性关联分析** 本研究采用偏最小二乘判别分析（PLS-DA）对 9 个干燥样品中的化学成分（仙鹤草素、异槲皮苷、鞣花酸、槲皮苷、扁蓄苷、总黄酮和总酚）含量和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性进行了相关性分析，以各样品的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性  $1/IC_{50}$  为因变量（ $Y$ ），以各组化学成分含量为自变量（ $X$ ）进行拟合，该模型累计解释能力参数  $R^2X$  和  $R^2Y$  分别为 0.766 和 0.952，预测能力参数  $Q^2$  为 0.878，均大于 0.5，说明所建立的模型稳定可靠，预测能力强。白毛银露梅化学成分与  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性相关系数结果见图 4。结果表明，所有化学成分均与  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性成正相关，其中仙鹤草素和鞣花酸的含量与  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性的相关系数相对最高，表明其对样品的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性发挥主要的贡献作用。而蒸汽杀青 180 s 后 60℃热风烘干的样品中这两种化学成分的含量相较于其他样品均为最高，进一步证明了所优选干燥方法的合理性。

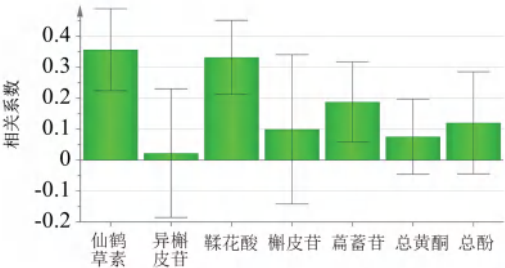


图 4 白毛银露梅化学成分与  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性相关系数  
Fig 4 Correlation coefficients between chemical composition of *Dasiphora mandshurica* and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity

3 讨论

本研究采用自然阴干、炒干、晒干、不同温度热风烘干（40、60、80℃）以及 100℃蒸汽杀青预处理后 60℃热风烘干（杀青时长分别为 60、120、180 s）9 种方法对白毛银露梅鲜品进行干燥加工处理。通过酶标仪测定各组样品总酚、总黄酮含量及  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性，同时采用 HPLC-UV 法定

量分析仙鹤草素、异槲皮苷、鞣花酸、槲皮苷和蒽薹苷 5 种特征成分的含量。基于上述化学和活性指标逐个对不同干燥方式处理的样品进行质量对比,发现采用各不同指标的评价结果存在差异,难以直接判定最优干燥方法。但可以明显看出,经过高温杀青处理的样品在多数测定指标中表现优于未经高温处理的样品。

为解决多指标评价结果不一致问题,本研究引入熵权-TOPSIS 组合模型。熵权法基于信息熵理论构建判断矩阵,通过计算指标熵值确定权重:信息熵值越小表征指标离散程度越大,相应权重越高。该方法克服了传统主观赋权法(如层次分析法)的人为偏差,客观反映指标实际贡献度。TOPSIS 法则通过计算评价对象与理想解的贴近度进行排序,其优势在于完整保留原始数据信息,并能精确量化不同方案间的优劣差距<sup>[16]</sup>。本研究首先通过熵权法确定各指标的客观权重,构建加权决策矩阵后应用 TOPSIS 法进行综合排序,最终优选出蒸汽杀青 180 s 后 60℃热风烘干为白毛银露梅综合品质最佳的产地干燥加工方法。

多酚氧化酶和过氧化物酶等氧化还原酶广泛存在于自然界植物中,主要催化酚类等活性物质的氧化反应,其作用具有显著的“双刃剑”特性:一方面在植物抗病防御中发挥保护功能,另一方面在植物采收后贮藏或加工过程中可能导致活性成分破坏和品质劣化<sup>[17-18]</sup>。在鲜品的热风干燥过程中,这些酶的活性会发生显著变化,进而影响多酚、黄酮类活性成分的含量。当干燥温度较低时,适宜的温度条件可能会激活相关酶系,加速活性成分的代谢与分解,导致其含量降低、功能丧失。因此,在本研究中,采用直接热风干燥制得的样品中酚酸、黄酮类成分含量相对较低,其中 40℃热风干燥处理的样品综合品质最低。而高温干燥可通过使酶失活,有效减少黄酮类等成分的分解。在药材干燥过程中,采用高温蒸汽处理或者炒制能够迅速终止新鲜物料内部酶的活性,从而最大化地保留药材中黄酮、多酚等活性成分的含量。因此经过蒸汽杀青和炒干处理的白毛银露梅样品,其综合品质相对较高。

## 参考文献

[1] 中国科学院植物研究所. i Plant. cn 植物智: 中国植物 + 物种信息系统 [DB/OL]. (2022-07-21) [2025-03-13]. <http://www.iplant.cn/>.

- [2] 胡玉丽, 王婉莹, 李旻辉, 等. 药王茶的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28 (2): 236-241.
- [3] 崔小敏, 万兆新, 任慧, 等. 基于 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术的白毛银露梅化学成分研究 [J]. 中药材, 2020, 43 (8): 1901-1906.
- [4] 方鹏霞, 武晓玉, 段文达, 等. 作用于糖尿病效应靶点的中药及活性成分研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35 (12): 2183-2191.
- [5] 侯丹, 魏冰星, 穆毅. 适于亚健康人群的复方养生保健茶剂: CN 104782835 B [P]. 2017-11-17.
- [6] 曹公义, 曹建华, 曹建平. 一种白毛银露梅保健茶及其制备方法和应用: CN 105028849 B [P]. 2018-11-13.
- [7] 赵盈, 於天, 郑志刚, 等. 多酚在植物中的分布及其生物活性研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54 (17): 5825-5832.
- [8] Grochowski DM, Skalicka-Woźniak K, Orhan IE, et al. A comprehensive review of agrimoniin [J]. Ann N Y Acad Sci, 2017, 1401 (1): 166-180.
- [9] 田芳, 张英, 吴孟华, 等. HPLC 特征图谱结合多模式识别及熵权 TOPSIS 法不同基原蒲黄药材质量评价 [J]. 中草药, 2025, 56 (4): 1377-1384.
- [10] 姜世豪, 孙小晶, 李丹丹, 等. 干燥方式对山楂总黄酮含量及抗氧化性质的影响 [J]. 食品工业科技, 2025, 46 (1): 121-129.
- [11] 孙涛, 裴青青, 安衍茹, 等. 窝儿七不同提取物中总黄酮总酚含量及其抗氧化活性的研究 [J]. 陕西中医, 2019, 40 (3): 402-406.
- [12] 崔小敏, 张红, 任慧, 等. 基于 HPLC 指纹图谱和多指标含量测定的白毛银露梅质量评价 [DB/OL]. 辽宁中医杂志. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1128.R.20241216.0921.084.html>.
- [13] Al-Romaima A, Hu G, Wang Y, et al. Identification of new diterpenoids from the pulp of coffea arabica and their  $\alpha$ -glucosidase inhibition activity [J]. J Agric Food Chem, 2024, 72 (3): 1683-1694.
- [14] 丁曼, 毛艳, 赵学佳, 等. 基于指纹图谱和一测多评联合化学计量学及熵权 TOPSIS 法对顶羽菊药材质量评价 [J]. 中草药, 2024, 55 (16): 5627-5638.
- [15] 乔培, 李治光, 郭灵燕, 等. 基于熵权-TOPSIS 法评价干燥方法对陈皮浸膏粉的质量影响 [J]. 中药材, 2024, 47 (1): 69-74.
- [16] 蒋学华. 药物现代评价方法 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2023.
- [17] 王馨雨, 杨绿竹, 王婷, 等. 植物多酚氧化酶的生理功能、分离纯化及酶促褐变控制的研究进展 [J]. 食品科学, 2020, 41 (9): 222-237.
- [18] 锁博海, 辛嘉英, 宋增武, 等. 过氧化物酶在食品分子及其胶体体系修饰中的应用进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15 (2): 11-18.

(收稿日期: 2025-03-13; 修回日期: 2025-05-20)

# 通心络通过调控蛋白组中 Wnt 信号通路缓解过氧化氢诱导的 H9c2 心肌细胞损伤

张维<sup>1</sup>, 程诺<sup>2</sup>, 曹辉<sup>1</sup>, 王允吉<sup>1</sup>, 沈洁<sup>1</sup>, 管春<sup>2</sup>, 王聪<sup>2</sup>, 张引兰<sup>1\*</sup> (1. 南京中医药大学附属南京医院, 南京市第二医院药学部, 南京 210003; 2. 中国药科大学多靶标天然药物全国重点实验室, 南京 211198)

**摘要:** **目的** 在心力衰竭细胞模型中, 考察通心络对 H9c2 心肌细胞损伤的保护功能, 并探究其作用机制。 **方法** 通过血管紧张素 II (Ang II)、过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、氧气和葡萄糖剥夺 (OGD) 等, 在 H9c2 心肌细胞系中构建心力衰竭模型。用通心络 (TXL) 处理模型细胞, 通过 CCK8、流式细胞分析等方法, 考察细胞凋亡情况。通过蛋白质组分析技术检测 TXL 治疗前后心肌细胞蛋白表达谱的变化, 并通过 qRT-PCR、Western blot 等实验对关键信号通路进行验证。 **结果** Ang II、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、OGD 均能有效导致 H9c2 细胞发生凋亡, TXL 能够恢复细胞活性, 减少细胞凋亡。通过蛋白质组分析发现, 200 μg · mL<sup>-1</sup> TXL 处理的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 H9c2 细胞模型中, Wnt 信号通路变化显著, 并使用 qRT-PCR 和 Western blot 对 CTNNB1、AXIN2、C-MyC、CCND1 以及 Catenin Beta 1、Axin2、Wnt1、Wnt3a 等 Wnt 通路的分子进行验证, 确认了 TXL 对上述分子的表达具有促进作用。 **结论** 在三种不同的心力衰竭细胞模型中, TXL 均能逆转细胞活性的下降和细胞凋亡的增加。在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 H9c2 细胞模型中, 200 μg · mL<sup>-1</sup> TXL 改变了细胞的蛋白表达谱, 其中对 Wnt 信号通路影响最为显著, 从而缓解心肌细胞的损伤。

**关键词:** 心力衰竭; H9c2 细胞系; 通心络; 蛋白组学; Wnt 信号通路

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)08-2283-07  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.021

## Protection of Tongxinluo on hydrogen peroxide-induced H9c2 myocardial cell injury by regulating Wnt signal in proteomic atlas

ZHANG Wei<sup>1</sup>, CHENG Nuo<sup>2</sup>, CAO Hui<sup>1</sup>, WANG Yun-ji<sup>1</sup>, SHEN Jie<sup>1</sup>, GUAN Chun<sup>2</sup>, WANG Cong<sup>2</sup>, ZHANG Yin-lan<sup>1\*</sup> (1. Department of Pharmacy, The Second Hospital of Nanjing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210003; 2. State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198)

**Abstract: Objective** To determine the protection of Tongxinluo (TXL) on H9c2 myocardial cell injury and its mechanism. **Methods** The heart failure cell model was constructed in H9c2 with angiotensin II (Ang II), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), and oxygen and glucose deprivation (OGD). The cell model was treated with TXL. The cell apoptosis was determined with CCK8 and flow cytometry. Before and after TXL treatment, changes of protein expression profiles in the heart failure cell model were detected with protein mass spectrometry analysis, and the key signaling pathways were validated with qRT-PCR and Western blot. **Results** Ang II, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and OGD effectively induced the apoptosis of H9c2 cells, and TXL restored cellular activity and reduced cell apoptosis. Proteomic analysis revealed that, in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced H9c2 cell model treated with 200 μg · mL<sup>-1</sup> TXL, changes in the Wnt signaling pathway were significant. qRT-PCR and Western blot were used to validate Wnt pathway molecules including CTNNB1, AXIN2, C-MyC, CCND1, Catenin Beta 1, Axin2, Wnt1, and Wnt3a. This confirmed that TXL promoted the expression of the aforementioned molecules. **Conclusion**

**基金项目:** 重庆市自然科学基金面上项目 (No.CSTB2023NSCQMSX0607)。

**作者简介:** 张维, 女, 药师, 主要从事心血管临床药学研究, email: zhwei9090@163.com \*通信作者: 张引兰, 女, 副主任药师, 主要从事临床药学研究, email: zhangyan2006zy@163.com



TXL may consistently restore the decline in cellular activity and attenuate the increase in cell apoptosis in three different heart failure cell models. In the H9c2 heart failure model induced by  $H_2O_2$ , TXL ( $200 \mu g \cdot mL^{-1}$ ) alters the protein expression profile of the cells, with a significant impact on the Wnt signaling pathway, thereby alleviating the injury to myocardial cells.

**Key words:** heart failure; H9c2 cell line; Tongxinluo; proteomics; Wnt signaling pathway

心力衰竭是一种常见的心血管疾病，多见于老年人群，通常因心肌细胞的渐进性丧失、氧化应激、缺血等因素导致心肌细胞凋亡，心脏泵血功能受损，无法满足身体组织正常的供血需求<sup>[1-2]</sup>。全球心力衰竭患者多达 4000 万例，其中约 50% 的患者在治疗后 5 年内死亡，其病死率甚至高于胃肠道相关肿瘤<sup>[3-4]</sup>。心力衰竭给患者及其家属带来了巨大的医疗及经济负担，严重影响了患者的生活质量和生存预期<sup>[5]</sup>。

随着医疗技术的进步，中医药治疗心脑血管疾病表现出了良好的临床效果，在临床上应用越来越广泛<sup>[6]</sup>。心力衰竭主要表现为憋喘、心慌、胸闷、水肿，在中医上归属于喘证、心悸、胸痹，治疗原则为活血化瘀、益气温阳。通心络（Tongxinluo, TXL）胶囊是我国吴以岭院士带领团队自主研发的一种中成药，由人参、水蛭等成分组成，常用于治疗冠心病引起的心绞痛，具有较好的活血化瘀、通络止痛的作用，符合心力衰竭的治疗原则<sup>[6-8]</sup>。在冠心病的相关研究中，该药物已被证实可有效减轻氧化应激反应<sup>[9-10]</sup>。

基于此背景，本研究尝试在多种因素导致的心力衰竭细胞模型中考察 TXL 对心肌细胞的保护作用，并通过蛋白组学分析，探究 TXL 缓解心肌细胞损伤的分子机制，以期 TXL 在心力衰竭临床治疗中的应用提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 细胞株

H9c2 大鼠源心肌细胞系（上海 ATCC 细胞库）。

### 1.2 试剂

TXL（规格：每粒装 0.26 g，以岭药业）；DMEM 基础培养基（批号：319006028）、青霉素、链霉素（批号：450-201-EL）、Trypsin/EDTA（批号：325-043-EL）（南京维森特生物技术有限公司）；磷酸盐缓冲液（PBS，批号：MA0015-Apr-23H，大连美伦生物技术有限公司）；血管紧张素 II（Ang II，批号：HY-13948）、磷酸酶抑制剂 Cocktail（批号：HY-K0022）、蛋白酶抑制剂 Cocktail（批号：HY-K0010）、Cell Counting Kit-8（CCK8，批号：HY-K0301）（美

国 MCE 公司）；过氧化氢（ $H_2O_2$ ，上海阿达玛斯试剂有限公司，批号：7722-84-1）；无糖 DMEM 基础培养基（澳睿赛生物，批号：ORCPM0280）；二甲亚砜（DMSO，北京索莱宝科技有限公司，批号：10N0317）；ECL 发光液（Thermo Fisher Scientific 公司，批号：WP20005）；双染细胞凋亡检测试剂盒（批号：A213-002）、新型 RNA 提取试剂盒（批号：R701-02-AA）、Taq Pro Universal SYBR q-PCR 荧光定量预混液（批号：Q712-02）、q-PCR HiscriptQ 反转录预混液（批号：R122-01）（南京诺唯赞生物科技股份有限公司）；无 RNA 酶水（南京福麦斯生物技术有限公司，批号：FMS-WB034）；RIPA 裂解液（碧云天生物技术，批号：P0013C）；Catenin Beta 1、Axin2、Wnt1 抗体（武汉三鹰生物技术有限公司，货号分别为 51067-2-AP、20540-1-AP、27935-1-AP）；Wnt3a 抗体、兔二抗、鼠二抗（美国 CST 公司，货号分别为 2721、7074、7076）； $\beta$ -actin 抗体（武汉爱博泰克生物科技股份有限公司，货号为 AC006）。

### 1.3 仪器

细胞操作超净台（苏州安泰空气技术有限公司）；高压蒸汽灭菌锅（深圳致微生物技术有限公司）；恒温水浴锅、二氧化碳培养箱、三气培养箱、高速离心机、Nano Drop 分光光度计（美国 Thermo Fisher Scientific）；金属浴恒温器（北京奥盛创新科技有限公司）；低速离心机（美国 Sigma-Aldrich）；PCR 扩增仪、Viia7-384 实时荧光定量 PCR（美国 Applied Biosystems）；M3 多功能酶标仪（美国 Molecular Devices）；垂直电泳仪、Trans-Blot Turbo 型全能型蛋白转膜仪（美国 Bio-Rad Laboratories）；全自动化学发光图像系统（上海天能科技有限公司）；倒置显微镜、正置显微镜（日本 Nikon 株式会社）；流式细胞仪（美国 Becton, Dickinson and Company）；Tims TOF Pro（德国 Bruker Corporation）。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

H9c2 细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中，于 5%CO<sub>2</sub>、37℃ 的条件下培养，常规消

化、传代,取对数生长期的细胞用于实验。

## 2.2 构建心力衰竭细胞模型

当 H9c2 细胞处于对数生长期时,对照组继续正常培养,三种心力衰竭细胞模型造模处理如下:①使用 Ang II ( $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 处理细胞,  $37^\circ\text{C}$  孵育 24 h,模拟因心肌细胞渐进性丧失导致的心力衰竭。②使用  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 处理细胞,  $37^\circ\text{C}$  孵育 4 h,模拟因氧化应激导致的心力衰竭。③将培养基换成无血清和无葡萄糖的 DMEM,并将细胞转移到  $37^\circ\text{C}$  下含有 95% $\text{N}_2$  和 5% $\text{CO}_2$  的培养箱中,孵育 3 h,模拟因缺血导致的心力衰竭。

## 2.3 TXL 超微粉溶液的制备

称取 0.1 g TXL 超微粉,溶于 100 mL 培养基中,超声 30 min 促溶,5000 g 离心 10 min 收集上清液,用  $0.22 \mu\text{m}$  微孔滤器过滤除菌,即得母液。将所有沉淀于  $60^\circ\text{C}$  加热烘干,计算实际溶于培养基的药物质量。

## 2.4 CCK8 实验检测细胞活力

分别使用 100、200、400  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  质量浓度的 TXL 超微粉溶液处理“2.2”项下的造模组细胞,  $37^\circ\text{C}$  孵育 48 h,作为不同浓度的给药组。分别向对照组、造模组、给药组细胞中加入 10  $\mu\text{L}$  CCK8 溶液,  $37^\circ\text{C}$  孵育 2 h,使用酶标仪检测细胞在波长为 450 nm 处的吸光度值,并绘制增殖曲线。

## 2.5 流式细胞分析检测细胞凋亡率

使用 400  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  TXL 超微粉溶液处理“2.2”项下的造模组细胞,  $37^\circ\text{C}$  孵育 48 h,作为给药组。分别收集对照组、造模组、给药组细胞,加 1 mL 预冷的 PBS, 1500  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 3 min,清洗两遍。加入 Annexin V-FITC 和 7AAD 避光孵育 10 min。采用 Beckman Coulter Cytoflex S 流式细胞分析仪进行检测,并使用 FlowJo 软件分析数据集。细胞凋亡率(%) = 早期细胞的凋亡比率 + 晚期细胞的凋亡比率。

## 2.6 蛋白质组学考察细胞蛋白谱的变化

使用  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理细胞,  $37^\circ\text{C}$  孵育 4 h,作为造模组。使用 200  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  TXL 超微粉溶液处理造模组细胞,  $37^\circ\text{C}$  孵育 48 h,作为给药组。分别收集造模组、给药组的细胞团,通过预处理获得样品。将 1  $\mu\text{L}$  样品装载到 Thermo C18 PepMap100 预柱 ( $300 \mu\text{m} \times 5 \text{ mm}$ ) 上,并在 Thermo Acclaim PepMap RSLC 分析柱 ( $75 \mu\text{m} \times 15 \text{ cm}$ ) 上洗脱。流动相 A (0.1% 甲酸水溶液) 和流动相 B (0.1% 甲酸乙腈溶液)。流速为  $0.3 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。液相

梯度洗脱 (0 ~ 7 min, 8% → 2%B; 7 ~ 55 min, 12% → 30%B; 55 ~ 65 min, 30% → 40%B; 65 ~ 68 min, 40% → 95%B; 68 ~ 80 min, 95%B)。然后在 Tims TOF Pro 蛋白质组质谱仪上以数据依赖的方式分析肽。肽序列是通过将蛋白质数据库 UniProt 与 SEQUEST HT 算法获得的片段模式进行匹配来确定的。随后使用 Proteome Discoverer 2.1 软件进行蛋白质鉴定和串联质谱标签 (TMT) 定量。

## 2.7 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测细胞中 Wnt 通路相关基因的表达

采用 Freezol 法提取细胞总 RNA,按照反转录试剂盒说明书反转录成 cDNA,进行 qRT-PCR 反应。CTNNB1: 正向引物为 AAAGCG-GCTGTTAGTCACTGG, 反向引物为 CGAGT-CATTGCATACTGTCCAT; AXIN2: 正向引物为 CAACACCAGGCGGAACGAA, 反向引物为 GCCAATAAGGAGTGTAAGGACT; C-Myc: 正向引物为 GGCTCCTGGCAAAAGGTCA, 反向引物为 CTGCGTAGTTGTGCTGATGT; CCND1: 正向引物为 GCTGCGAAGTGGAACCATC, 反向引物为 CCTCCTTCTGCACACATTTGAA; 18S: 正向引物为 CAGCCACCCGAGATTGAGCA, 反向引物为 TAGTAGCGACGGGCGGTGTG。反应条件: 以 18S 为内参基因,采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法计算基因相对表达量。

## 2.8 Western blot 检测细胞中 Wnt 通路相关蛋白的表达

收集细胞并用 RIPA 裂解 30 min,  $4^\circ\text{C}$  条件下 14 000 g 离心 15 min 以提取蛋白,取上清液,BCA 试剂盒测定蛋白浓度。利用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白样品,随后将蛋白条带转至 PVDF 膜。将蛋白膜用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,分别加入 Catenin Beta 1 兔抗 (1:1000)、Axin2 兔抗 (1:1000)、Wnt1 兔抗 (1:1000)、Wnt3a 兔抗 (1:1000),  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜。加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗,室温孵育 1 h。加入化学发光液,于暗室中曝光。 $\beta$ -actin 兔抗 (1:15 000) 作为上样对照。

## 2.9 统计学分析

应用 GraphPad Prism 9.0 统计软件对数据进行分析。实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,实验组和对照组之间的比较采用独立样本  $t$  检验,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 3 结果



### 3.1 TXL 对心力衰竭 H9c2 细胞模型的作用

**3.1.1 TXL 对 Ang II 诱导的心力衰竭 H9c2 细胞模型的作用** 使用 Ang II 处理 H9c2 细胞 24 h, 通过 CCK8 考察对照组 (Control) 和 Ang II 处理组 (Ang II) 的细胞活力 (见图 1A), 发现 Ang II 处理后, H9c2 细胞活力明显下降。通过流式细胞分析发现, Ang II 处理后 (Model) 凋亡细胞占比显著增加 (见图 1B、1C), 说明 Ang II 处理成功模拟了因心肌细胞渐进性丧失导致的心力衰竭模型。随后, 使用不同质量浓度的 TXL 处理 Ang II 诱导的 H9c2 细胞, 通过 CCK8 考察细胞活力 (见图 1D), 发现中、高质量浓度的 TXL ( $200$ 、 $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 处理后, 从 24 h 起, 受抑制的细胞活性即有显著恢复, 且持续至 48 h。通过流式细胞分析进一步验证  $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  质量浓度下的 TXL 对 Ang II 处理后的细胞 (Model 组和 TXL Treated 组) 的保护作用 (见图 1B、1C), 发现细胞凋亡率下降。以上结果说明, TXL 对 Ang II 诱导的心力衰竭 H9c2 细胞模型有保护作用, 且在质量浓度为  $200$ 、 $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, 保护效果最为显著。

**3.1.2 TXL 对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的心力衰竭 H9c2 细胞模型的作用** 使用  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理 H9c2 细胞 4 h, 通过 CCK8 考察对照组 (Control) 和  $\text{H}_2\text{O}_2$  造模组 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 的细胞活力 (见图 2A), 发现  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理后, H9c2 细胞活力显著下降。通过流式细胞分析发现  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理后, Model 组凋亡细胞比例上升 (见图 2B、2C), 说明  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理成功构建了因氧化应激导致的心力衰竭模型。随后, H9c2 使用不同质量浓度的 TXL 处理细胞, 并通过 CCK8 对细胞活力进行考察 (见图 2D)。低质量浓度的 TXL 即能有效抑制细胞活力的下降, 而中、高质量浓度的 TXL 处理细胞后细胞活力进一步恢复, 且 48 h 时高质量浓度 TXL 对模型细胞的活力恢复效果达到最大。最后, 通过流式细胞分析, 进一步证明了高质量浓度下的 TXL 对  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理后的细胞 (Model 组和 TXL Treated 组) 的保护作用 (见图 2B、2C)。

**3.1.3 TXL 对 OGD 诱导的心力衰竭 H9c2 细胞模型有保护作用** 通过 CCK8 考察对照组 (Control) 和 OGD 处理组 (OGD) 的细胞活力 (见图 3A), 发现 24 h 时, 细胞活力受到显著抑制。通过流式细胞分析发现 OGD 处理组 (Model) 在 24 h 时显著增加了细胞凋亡率 (见图 3B、3C), 说明 OGD 成功构建了该种心力衰竭细胞模型。之后, 使用不同质量浓度的 TXL 处理 OGD 诱导的细胞, 通

过 CCK8 考察细胞活力 (见图 3D), 发现低质量浓度的 TXL 对模型细胞的活力没有明显影响, 并且中、高质量浓度的 TXL 处理细胞后, 也并未立刻表现出拯救功能, 仅在 48 h 时对受抑制的细胞活性有恢复。之后通过流式细胞分析, 进一步考察高质量浓度下的 TXL 对细胞 (Model 组和 TXL Treated 组) 的保护作用 (见图 3B、3C), 发现其显著抑制了细胞的凋亡。

综上所述, Ang II、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、OGD 均能成功构建 H9c2 细胞的心力衰竭细胞模型, 且 TXL 对这三种模型细胞均有一定程度的保护作用, 其中  $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 TXL 对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的细胞模型的恢复效果最为显著。

### 3.2 TXL 调控 H9c2 细胞 $\text{H}_2\text{O}_2$ 模型蛋白表达谱中的 Wnt 通路

**3.2.1 TXL 对  $\text{H}_2\text{O}_2$  构建的心力衰竭 H9c2 模型细胞蛋白表达的影响** 前期研究发现,  $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 TXL 对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的细胞模型的恢复效果最为显著。因此, 提取该细胞模型在接受  $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 TXL 处理前后的总蛋白, 进行蛋白质谱检测, 绘制给药组 vs 造模组的细胞总蛋白表达变化火山图 (见图 4)。

在 TXL 处理后, 模型细胞的蛋白表达发生了剧烈变化。有 255 种蛋白发生了 2 倍以上的显著高表达 ( $\text{Fold Change} > 2$ ,  $P < 0.05$ ), 另有 217 种蛋白的表达量降低了 50% 以上 ( $\text{Fold Change} < 0.5$ ,  $P < 0.05$ ), 说明 TXL 对模型细胞的蛋白表达产生了显著的影响。

**3.2.2 TXL 调控  $\text{H}_2\text{O}_2$  构建的心力衰竭 H9c2 模型细胞的 Wnt 通路** 通过生物信息学分析方法, 将 TXL 处理后具有显著表达差异 ( $\text{Fold Change} > 2$  或  $\text{Fold Change} < 0.5$ ,  $P < 0.05$ ) 的蛋白组分进行 GO 富集分析, 绘制 GO 富集气泡图 (见图 5)。

根据 GO 富集项目可知, TXL 处理后, 肽链运输、糖类代谢、蛋白水解、活性氧代谢、脂质稳态等通路受到影响, 说明 TXL 调控了模型细胞的能量、物质相关的通路。此外, 对 Wnt 信号通路的调控最为显著 ( $\text{Rich Factor} = 0.6954$ ,  $\text{Gene Number} = 644$ ,  $P = 7.41 \times 10^{-51}$ ), 而 Wnt 信号在炎症过程、氧化应激和许多癌症中上调, 激活多种炎症因子的表达<sup>[11-12]</sup>, 因此推测, 在  $\text{H}_2\text{O}_2$  构建的 H9c2 细胞模型中, Wnt 信号通路被激活, 使细胞发生应激; 而 TXL 则通过抑制 Wnt 信号通路, 从而对细胞发挥保护作用。

为了验证上述猜想, 在 TXL 处理前后, 分别提取造模组 ( $\text{H}_2\text{O}_2$  Model) 和给药组 (TXL Treated)



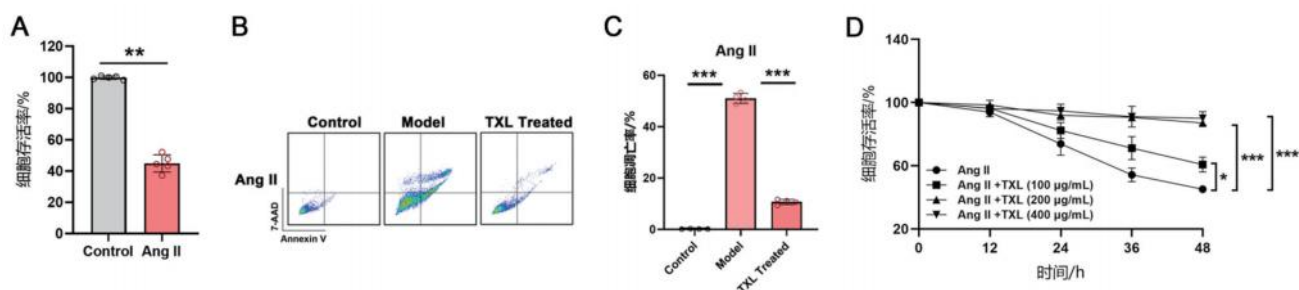


图1 TXL对Ang II诱导的心力衰竭H9c2细胞模型的影响

Fig 1 Effect of TXL on heart failure H9c2 cell model induced by Ang II

注: A. Ang II处理后H9c2细胞的细胞活力 ( $n = 5$ ,  $^{**}P < 0.01$ ); B、C. Ang II以及TXL处理后H9c2细胞的凋亡情况 ( $n = 4$ ,  $^{***}P < 0.001$ ); D. Ang II以及TXL处理后H9c2细胞的细胞活力 ( $n = 6$ ,  $^{*}P < 0.05$ ,  $^{***}P < 0.001$ ).

Note: A. Cell viability of H9c2 modeled by Ang II ( $n = 5$ ,  $^{**}P < 0.01$ ); B, C. Apoptosis rate of H9c2 modeled by Ang II and treated by TXL ( $n = 4$ ,  $^{***}P < 0.001$ ); D. Cell viability of H9c2 modeled by Ang II and treated with TXL ( $n = 6$ ,  $^{*}P < 0.05$ ,  $^{***}P < 0.001$ ).

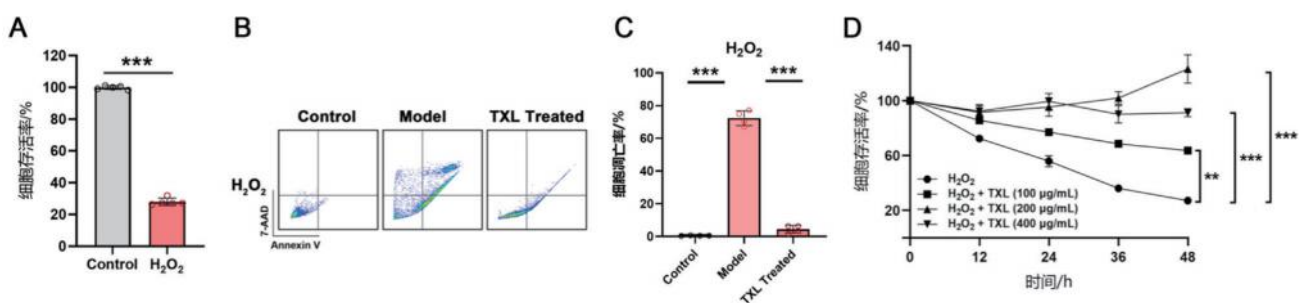

 图2 TXL对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的心力衰竭H9c2细胞模型的影响

 Fig 2 Effect of TXL on heart failure H9c2 cell model induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

注: A. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理后H9c2细胞的细胞活力 ( $n = 5$ ,  $^{***}P < 0.001$ ); B、C. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>以及TXL处理后H9c2细胞的凋亡情况 ( $n = 4$ ,  $^{***}P < 0.001$ ); D. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>以及TXL处理后H9c2细胞的细胞活力 ( $n = 6$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ ).

Note: A. Cell viability of H9c2 modeled by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $n = 5$ ,  $^{***}P < 0.001$ ); B, C. Apoptosis rate of H9c2 modeled by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and treated by TXL ( $n = 4$ ,  $^{***}P < 0.001$ ); D. Cell viability of H9c2 modeled by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and treated with TXL ( $n = 6$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ ).

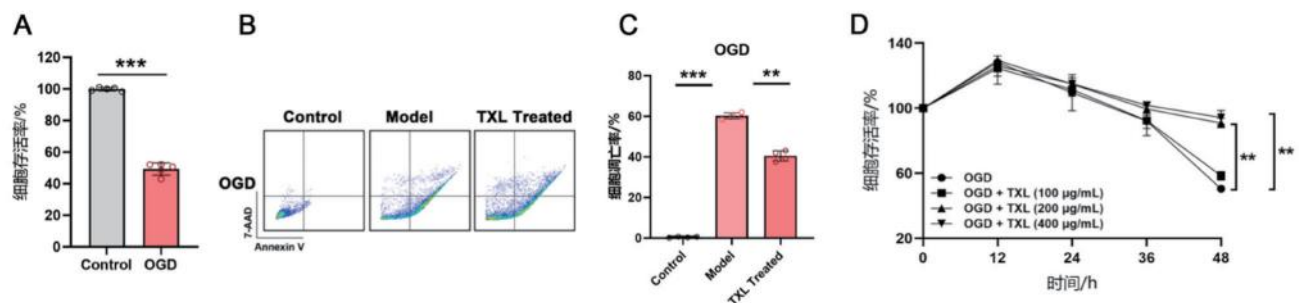


图3 TXL对OGD诱导的心力衰竭H9c2细胞模型的影响

Fig 3 Effect of TXL on heart failure H9c2 cell model induced by OGD

注: A. OGD处理后H9c2细胞的细胞活力 ( $n = 5$ ,  $^{***}P < 0.001$ ); B、C. OGD以及TXL处理后H9c2细胞的凋亡情况 ( $n = 4$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ ); D. OGD以及TXL处理后H9c2细胞的细胞活力 ( $n = 6$ ,  $^{**}P < 0.01$ ).

Note: A. Cell viability of H9c2 modeled by OGD ( $n = 5$ ,  $^{***}P < 0.001$ ); B, C. Apoptosis rate of H9c2 modeled by OGD and treated by TXL ( $n = 4$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ ); D. Cell viability of H9c2 modeled by OGD and treated with TXL ( $n = 6$ ,  $^{**}P < 0.01$ ).

细胞的总RNA和总蛋白,通过qRT-PCR和Western blot对Wnt通路相关基因和蛋白的表达进行表征(见图6)。结果表明,在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>造模后,CTNNB1、AXIN2、C-Myc、CCND1等Wnt通路相关基因的表达均显著上调,Catenin Beta 1、Axin2、Wnt1、Wnt3a等相关蛋白的表达也明显升高,说明Wnt信号通路被激活。而在给予TXL处理后,高表达的

Wnt通路相关基因和蛋白均受不同程度的抑制,表明TXL能够抑制Wnt信号通路,从而对细胞发挥保护作用。

综上所述,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理激活了H9c2细胞中的Wnt信号通路,诱发细胞的氧化应激,从而成功构建心力衰竭的细胞模型。TXL能够抑制H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>激活的Wnt通路,从而对细胞发挥保护作用。

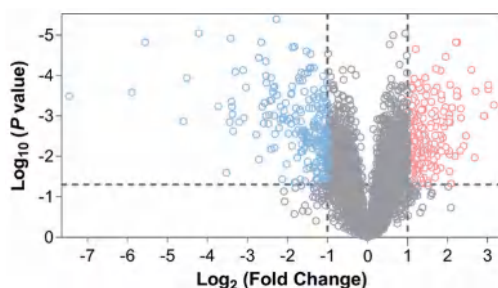


图4 给药组 vs 造模组细胞总蛋白表达变化火山图 ( $\text{H}_2\text{O}_2$  model +  $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  TXL /  $\text{H}_2\text{O}_2$  model)

Fig 4 Volcanic plot of total protein changes in H9c2 cells treated group vs model group ( $\text{H}_2\text{O}_2$  model +  $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  TXL /  $\text{H}_2\text{O}_2$  model)

#### 4 讨论

2016年,中国中西医结合学会发表的《中西医结合诊断和治疗慢性心力衰竭专家共识》指出,心力衰竭属本虚标实之证,病机可用

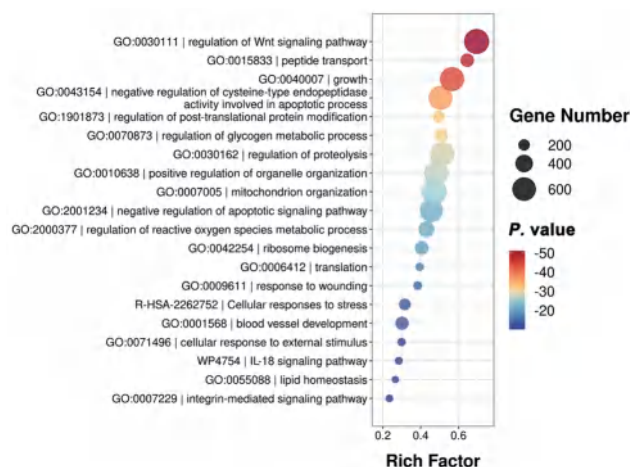


图5  $\text{H}_2\text{O}_2$  构建的心力衰竭 H9c2 模型细胞接受  $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  TXL 处理前后的差异表达蛋白的 GO 富集气泡图

Fig 5 GO enrichment bubble plot of differentially expressed proteins in H9c2 cells induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$  and treated before/after with  $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  TXL

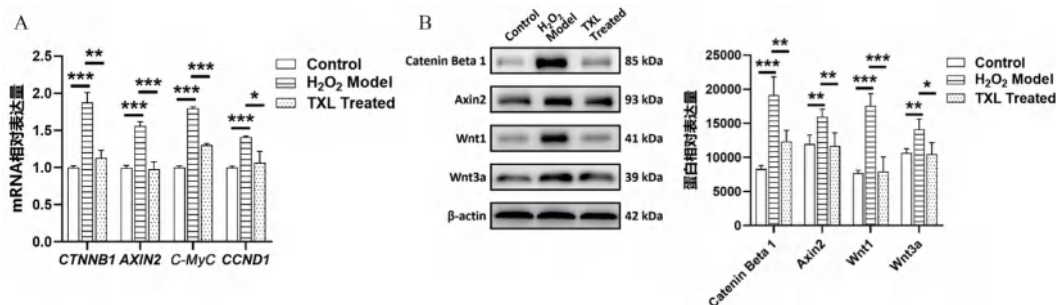


图6  $\text{H}_2\text{O}_2$  构建的心力衰竭 H9c2 模型细胞接受  $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  TXL 处理前后的 Wnt 通路相关基因 (A) 和蛋白 (B) 的表达 ( $n = 4$ ,  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ )

Fig 6 Expression of Wnt pathway related genes (A) and proteins (B) in H9c2 cells induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$  and treated before/after with  $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  TXL ( $n = 4$ ,  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ )

“虚”“瘀”“水”概括<sup>[13]</sup>。而在临床上,心力衰竭通常由心肌细胞的渐进性丧失、氧化应激、缺血等多种因素引起。为了反映 TXL 在临床使用的普适性规律,本研究通过 Ang II、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、OGD 等多种方法在 H9c2 细胞中诱导心力衰竭模型,并使用不同剂量的 TXL 进行治疗干预。Ang II 能够与心肌细胞上的 AT1 受体结合,激活细胞内 JAK/STAT 等信号通路,激发氧化应激与炎症,导致心肌细胞肥大、损伤,降低其顺应性<sup>[14]</sup>。 $\text{H}_2\text{O}_2$  则能够通过氧化应激、钙调控紊乱、炎症等多途径损伤心肌细胞,最终导致心力衰竭<sup>[15]</sup>。OGD 通过能量耗竭和氧化应激,直接破坏心肌结构与功能<sup>[16]</sup>。本课题组通过实验证明 TXL 对这三种模型细胞均有不同程度的保护效果,为通心络的临床应用提供了更为全面的依据,并且其中  $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 TXL 对  $\text{H}_2\text{O}_2$  模拟的因氧化应激导致的心力衰竭模型的恢复效果最为显著。

为了探究 TXL 保护  $\text{H}_2\text{O}_2$  心力衰竭模型细

胞的具体作用机制,使用蛋白组学结合生物信息学分析以及随后的机制验证,通过表征 Wnt/ $\beta$ -catenin 调控因子 Axin2 及其编码基因 *AXIN2*, Wnt 信号通路核心蛋白组分 Wnt1、Wnt3a 和 Catenin Beta 1, 以及  $\beta$ -catenin 核移位后所启动的 *C-MyC*、*CCND1* 基因<sup>[17-18]</sup>, 发现  $\text{H}_2\text{O}_2$  激活了 H9c2 细胞中 Wnt 信号通路,导致细胞发生凋亡;TXL 处理后,细胞内蛋白表达谱发生剧烈变化,Wnt 信号受到了显著抑制,并且可能因此而改变了细胞对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的反应性,使得细胞在受到  $\text{H}_2\text{O}_2$  刺激后,激活适应性信号通路,细胞活力得以升高。多项研究表明,Wnt 信号在炎症过程、氧化应激等过程中被激活,促进肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 12 (IL-12)、白细胞介素 23 (IL-23) 等炎症因子的表达<sup>[11-12, 19]</sup>。此外,有研究发现,心力衰竭患者的循环 Wnt5a 水平升高<sup>[20]</sup>,且较高的血浆 Wnt5a 水平与右心室充盈压升高和右心室射血分数降低有关<sup>[21]</sup>,说明 Wnt

信号与心肌损伤、心力衰竭密切相关,其在心力衰竭过程中会被激活,诱导心肌细胞的炎症与凋亡<sup>[22-23]</sup>。本研究发现 TXL 能够显著抑制心力衰竭 H9c2 模型细胞中 Wnt 信号通路的激活,对细胞发挥保护作用。

总之,本研究证明了 TXL 在细胞模型中能够缓解多种因素导致的心力衰竭,并且在  $200\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的质量浓度下,通过抑制 Wnt 信号通路,显著恢复了  $\text{H}_2\text{O}_2$  导致的心肌细胞损伤,进一步揭示了 TXL 保护心肌细胞的作用机制,从而为 TXL 在心力衰竭临床治疗中的应用提供了重要的理论依据。

### 参考文献

- [1] Campbell P, Rutten FH, Lee MM, et al. Heart failure with preserved ejection fraction: everything the clinician needs to know [J]. *Lancet*, 2024, 403 (10431): 1083-1092.
- [2] Khan MS, Shahid I, Bennis A, et al. Global epidemiology of heart failure [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2024, 21 (10): 717-734.
- [3] Stewart S, MacIntyre K, Hole DJ, et al. More 'malignant' than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure [J]. *Eur J Heart Fail*, 2001, 3 (3): 315-322.
- [4] Redfield MM, Borlaug BA. Heart failure with preserved ejection fraction: a review [J]. *JAMA*, 2023, 329 (10): 827-838.
- [5] Wang H, Chai K, Du MH, et al. Prevalence and incidence of heart failure among urban patients in China: a national population-based analysis [J]. *Circ Heart Fail*, 2021, 14 (10): e008406.
- [6] 霍勇, 吴宗贵, 林谦. 通心络防治冠心病临床应用中国专家共识 [J]. *中国介入心脏病学杂志*, 2024, 32 (4): 181-190.
- [7] 魏佳明, 刘承鑫, 李雅, 等. 基于数据挖掘与网络药理学的慢性心力衰竭中医证型, 用药规律及相关药理分析 [J]. *天然产物研究与开发*, 2023, 35 (1): 139-150.
- [8] 蔡婷婷. 通心络胶囊在老年慢性心力衰竭患者中的效果 [J]. *中外医学研究*, 2023, 21 (31): 13-17.
- [9] 中华医学会, 中华医学学会杂志社, 中华医学学会全科医学分会, 等. 慢性心力衰竭基层诊疗指南 (2019 年) [J]. *中华全科医师杂志*, 2019, 18 (10): 936-947.
- [10] 李勇军, 李翔, 唐一锋, 等. 老年慢性心力衰竭患者血清 8-羟基脱氧鸟苷和锰超氧化物歧化酶水平与认知功能障碍的相关性研究 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2023, 25 (1): 89-91.
- [11] Vallée A, Lecarpentier Y. Crosstalk between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the canonical WNT/ $\beta$ -catenin pathway in chronic inflammation and oxidative stress during carcinogenesis [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 745.
- [12] Armstrong A, Mandala A, Malhotra M, et al. Canonical Wnt signaling in the pathology of iron overload-induced oxidative stress and age-related diseases [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 7163326.
- [13] 陈可冀, 吴宗贵, 朱明军, 等. 慢性心力衰竭中西医结合诊疗专家共识 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2016, 36 (2): 133-141.
- [14] Ye SJ, Luo W, Khan ZA, et al. Celastrol attenuates angiotensin II-induced cardiac remodeling by targeting STAT3 [J]. *Circ Res*, 2020, 126 (8): 1007-1023.
- [15] Luo P, Zhang W. MicroRNA-423-5p mediates  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced apoptosis in cardiomyocytes through O-GlcNAc transferase [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14 (1): 857-864.
- [16] Wan SY, Cui ZK, Wu LL, et al. Ginsenoside Rd promotes omentin secretion in adipose through TBK1-AMPK to improve mitochondrial biogenesis via WNT5A/ $\text{Ca}^{2+}$  pathways in heart failure [J]. *Redox Biol*, 2023, 60: 102610.
- [17] Liu JQ, Xiao Q, Xiao JN, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7 (1): 3.
- [18] Nusse R, Clevers H. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities [J]. *Cell*, 2017, 169 (6): 985-999.
- [19] Di Bartolomeo L, Vaccaro F, Irrera N, et al. Wnt signaling pathways: from inflammation to non-melanoma skin cancers [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (2): 1575.
- [20] Abraitte A, Vinge LE, Askevold ET, et al. Wnt5a is elevated in heart failure and affects cardiac fibroblast function [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2017, 95 (7): 767-777.
- [21] Abraitte A, Lunde IG, Askevold ET, et al. Wnt5a is associated with right ventricular dysfunction and adverse outcome in dilated cardiomyopathy [J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 3490.
- [22] Stylianidis V, Hermans KCM, Blankesteijn WM. Wnt signaling in cardiac remodeling and heart failure [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2017, 243: 371-393.
- [23] Akoumianakis I, Polkinghorne M, Antoniadis C. Non-canonical WNT signalling in cardiovascular disease: mechanisms and therapeutic implications [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2022, 19 (12): 783-797.

(收稿日期: 2025-02-21; 修回日期: 2025-04-23)



# 基于 PI3K/AKT 信号通路探讨氧化小檗碱和小檗胺对心肌细胞的保护作用

努尔比耶·努尔艾合麦提<sup>1, 2, 3, 4</sup>, 地力乎马·地力木拉提<sup>1, 2, 3, 4</sup>, 阿乐哈尔·拜山<sup>1, 2, 3, 4</sup>, 阿丽菲耶·艾克拜尔<sup>1, 2, 3, 4</sup>, 依帕尔古丽·帕尔哈提<sup>1, 2, 3, 4</sup>, 周文婷<sup>1, 2, 3, 4\*</sup> (1. 新疆医科大学药学院药理学教研室, 乌鲁木齐 830000; 2. 新疆天然药物活性组分与释药技术重点实验室, 乌鲁木齐 830000; 3. 新疆生物药械重点实验室, 乌鲁木齐 830000; 4. 新疆及中亚特色医药资源教育部工程研究中心, 乌鲁木齐 830000)

**摘要:** **目的** 探讨氧化小檗碱和小檗胺对阿霉素诱导心肌细胞损伤的潜在保护作用机制。**方法** 从 TCMSP、SwissTargetPrediction、GeneCards 和 OMIM 数据库中分别筛选氧化小檗碱、小檗胺作用靶点及心肌损伤基因, 通过 STRING 数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络, 使用韦恩数据取交集基因, 对交集基因进行基因本体分析 (GO 分析) 及京都基因和基因组百科全书信号通路富集分析 (KEGG 分析)。H9c2 心肌细胞分别用氧化小檗碱和小檗胺处理, CCK-8 法检测细胞存活率, 划痕实验检测细胞迁移率, 酶标法检测氧化应激指标, 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 PI3K/AKT 表达。**结果** 网络药理学分析发现氧化小檗碱和小檗胺靶点共 195 个, 疾病相关基因 228 个, 共同靶点 15 个; PPI 结果筛选出来的核心靶点有 HSP90AA1、ABL1、MAPK8; KEGG 分析涉及磷脂酰肌醇 3-激酶/Akt 信号通路、ErbB 信号通路、脂质与动脉粥样硬化等信号通路; 分子对接结果显示氧化小檗碱和小檗胺与核心靶蛋白 HSP90AA1、ABL1、MAPK8 均能稳定对接; 体外实验结果显示, 与模型组相比较, 氧化小檗碱和小檗胺组的细胞存活率及细胞迁移率显著升高 ( $P < 0.05$ ); Western blot 结果显示, 与模型组相比较, 氧化小檗碱和小檗胺组的 p-PI3K、p-AKT 蛋白表达下降 ( $P < 0.05$ )。**结论** 氧化小檗碱和小檗胺对心肌细胞具有一定的保护作用, 作用机制可能与调节 PI3K/AKT 信号通路有关。

**关键词:** 氧化小檗碱; 小檗胺; 心肌损伤; PI3K/AKT 信号通路

**中图分类号:** R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)08-2290-08  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.022

## Protective effect of oxyberberine and berbamine on cardiomyocytes based on PI3K/AKT signaling pathway

Nuerbiye Nueraihema<sup>1, 2, 3, 4</sup>, Dilihuma Dilimulati<sup>1, 2, 3, 4</sup>, Alehaer Baishan<sup>1, 2, 3, 4</sup>, Ailifeiye Aikebaier<sup>1, 2, 3, 4</sup>, Yipaerguli Paerhati<sup>1, 2, 3, 4</sup>, ZHOU Wen-ting<sup>1, 2, 3, 4\*</sup> (1. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000; 2. Xinjiang Key Laboratory of Natural Medicine Active Components and Drug Release Technology, Urumqi 830000; 3. Xinjiang Key Laboratory of Biopharmaceuticals and Medical Devices, Urumqi 830000; 4. Engineering Research Center of Xinjiang and Central Asian Medicinal Resources, Ministry of Education, Urumqi 830000)

**Abstract: Objective** To determine the potential mechanism of protective effect of oxyberberine and berbamine on the damage of cardiomyocytes induced by adriamycin. **Methods** We screened the action targets of oxyberberine and berbamine, as well as genes related to myocardial injury from TCMSP, SwissTargetPrediction, GeneCards and OMIM databases respectively. A protein-protein interaction (PPI) network was established through the STRING database, and the intersecting genes obtained with the Venny database. Conduct Gene Ontology and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes enrichment analyses were conducted on the intersecting genes. H9c2 cardiomyocytes were treated with

**基金项目:** 新疆维吾尔自治区“天山英才”青年科技拔尖人才培养项目 (No.2022TSYCCX0035)。

**作者简介:** 努尔比耶·努尔艾合麦提, 女, 硕士研究生, 主要从事心血管药理学研究, email: nurbiye@stu.xjmu.edu.cn \*通信作者: 周文婷, 女, 博士, 教授, 主要从事心血管药理学研究, email: zwt@xjmu.edu.cn

oxyberberine and berberamine respectively. The cell viability was detected by the CCK-8 method, the cell migration rate by the scratch test, the oxidative stress indexes by the microplate reader method, and the expression of PI3K/AKT by Western blot. **Results** Network pharmacology analysis found a total of 195 targets for oxyberberine and berberamine, 228 disease-related genes, and 15 common targets. The core targets screened out by the PPI included *HSP90AA1*, *ABL1*, and *MAPK8*. The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes enrichment analysis was involved in signaling pathways such as the PI3K/AKT signaling pathway, the ErbB signaling pathway, and the lipid and atherosclerosis signaling pathway. The molecular docking showed that both oxyberberine and berberamine stably docked with the core target proteins HSP90AA1, ABL1, and MAPK8. The in vitro experiments showed that the cell viability and cell migration rate in both oxyberberine and berberamine groups increased significantly ( $P < 0.05$ ). Western blot analysis showed that, compared with the model group, the expressions of p-PI3K and p-AKT proteins in both oxyberberine and berberamine groups decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Oxyberberine and berberamine can protect cardiomyocytes, whose mechanism of action may be related to the regulation of the PI3K/AKT signaling pathway.

**Key words:** oxyberberine; berberamine; myocardial injury; PI3K/AKT signaling pathway

心血管疾病是全球范围内导致死亡和致残的主要原因之一<sup>[1]</sup>,其中心肌细胞的损伤和功能障碍是多种心脏疾病(如心肌梗死、心力衰竭等)的核心病理机制<sup>[2]</sup>。因此,探索具有心肌保护作用的天然活性成分已成为当前研究的热点之一。氧化小檗碱(oxyberberine, OBB)作为一种关键的天然化合物,在生物学和医学领域受到广泛关注。已有研究表明,氧化小檗碱能够通过对 Keap1/Nrf2/NF- $\kappa$ B 信号通路的调节,发挥显著的抗炎和抗氧化应激作用<sup>[3]</sup>,氧化小檗碱还能作为新型血红素加氧酶-1(HO-1)激动剂,激活 HO-1 的表达,进而对肝脏细胞起到保护作用,具有特异的保肝作用<sup>[4]</sup>。小檗胺(berberamine, BBM)是存在于小檗属植物中的一种双苄基异喹啉类生物碱<sup>[5]</sup>,具有抗感染<sup>[6]</sup>、抗肿瘤<sup>[7]</sup>、抗氧化<sup>[8]</sup>、抗炎<sup>[9]</sup>、心脏保护等<sup>[10]</sup>多种药理学作用,小檗胺在动物模型中表现抗心肌梗死作用,机制与保护线粒体功能有关。

PI3K/AKT 信号通路是调控细胞存活、增殖和凋亡的关键通路,其通过调节促凋亡蛋白(如 Bax、Caspase-3)和抗凋亡蛋白(如 Bcl-2)的表达,从而减轻心肌细胞损伤<sup>[11]</sup>。多项研究证实,天然药物成分可通过调节 PI3K/AKT 通路来发挥心肌保护作用<sup>[12]</sup>。但是氧化小檗碱和小檗胺是否通过调节 PI3K/AKT 通路发挥心脏保护的机制尚未见报道,因此本研究拟探讨氧化小檗碱和小檗胺对心肌细胞的保护作用,为进一步阐明氧化小檗碱和小檗胺心血管系统药理活性物质基础及作用机制提供实验基础。

## 1 材料

### 1.1 试剂

大鼠心肌细胞(H9c2)(由梓杉生物公司提供,货号:STCC30008G);氧化小檗碱、小檗胺(纯度高于 98%,由本课题组前期实验制备完成);阿霉素(货号:S17092,上海源叶生物科技有限公司);磷酸盐缓冲液(PBS)、DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、青链霉素混合液(武汉赛维尔生物科技有限公司);CCK-8 试剂盒、丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)(南京建成公司);总超氧化物歧化酶(T-SOD)测定试剂盒(Elabscience 公司);BCA 蛋白定量检测试剂盒(白鲨生物科技有限公司);超敏 ECL 化学发光试剂盒、SDS-PAGE 凝胶试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司);p-PI3K 抗体、p-Akt 抗体、PI3K 抗体、AKT 抗体(亲科生物科技有限公司)。

### 1.2 仪器

Thermo Scientific HERAfreeze TMHLE30086V 型-80℃实验室冰箱、GO1510 型 Multiskan 酶标仪(美国 Thermo 公司);MCO-18AIC 型 CO<sub>2</sub> 培养箱、MCO-18AIC 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(日本 SANYO 公司);ZP-400 型台式恒温振荡器(苏州培英实验设备有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 网络药理学分析

**2.1.1 氧化小檗碱、小檗胺和阿霉素心脏毒性靶点的预测** 分别以“氧化小檗碱(oxyberberine, OBB)、小檗胺(berberamine, BBM)”为关键词在 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库中查找氧化小檗碱和小檗胺的 CAS 号和 SMILES 号,并输入到 TCMSP (<https://www.tcm->



sp-e.com/) 和 SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 数据库检索氧化小檗碱和小檗胺的药物靶点, 合并后删除重复项获得药物作用靶点。以“doxorubicin-induced cardiotoxicity”为关键词通过 GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 和 OMIM (<https://omim.org/>) 检索疾病相关基因, 筛选标准为 Score 值大于 0.3, 合并后删除重复项, 获得疾病作用靶点。将药物作用靶点

和疾病作用靶点导入到 Cytoscape 3.9.1 中制作药物-疾病靶点网络图, 将药物基因和疾病基因导入 Venny 2.1.0 检索药物和疾病交集基因。通过预测找到对应的 195 个药物靶点和 228 个疾病相关靶点。使用 Cytoscape 3.9.1 构建药物-疾病靶点网络图 (见图 1), 再将所得药物靶点和疾病靶点使用 Venny 2.1.0 数据库取药物-疾病靶点交集基因, 发现 15 个基因在药物和疾病中共同存在。

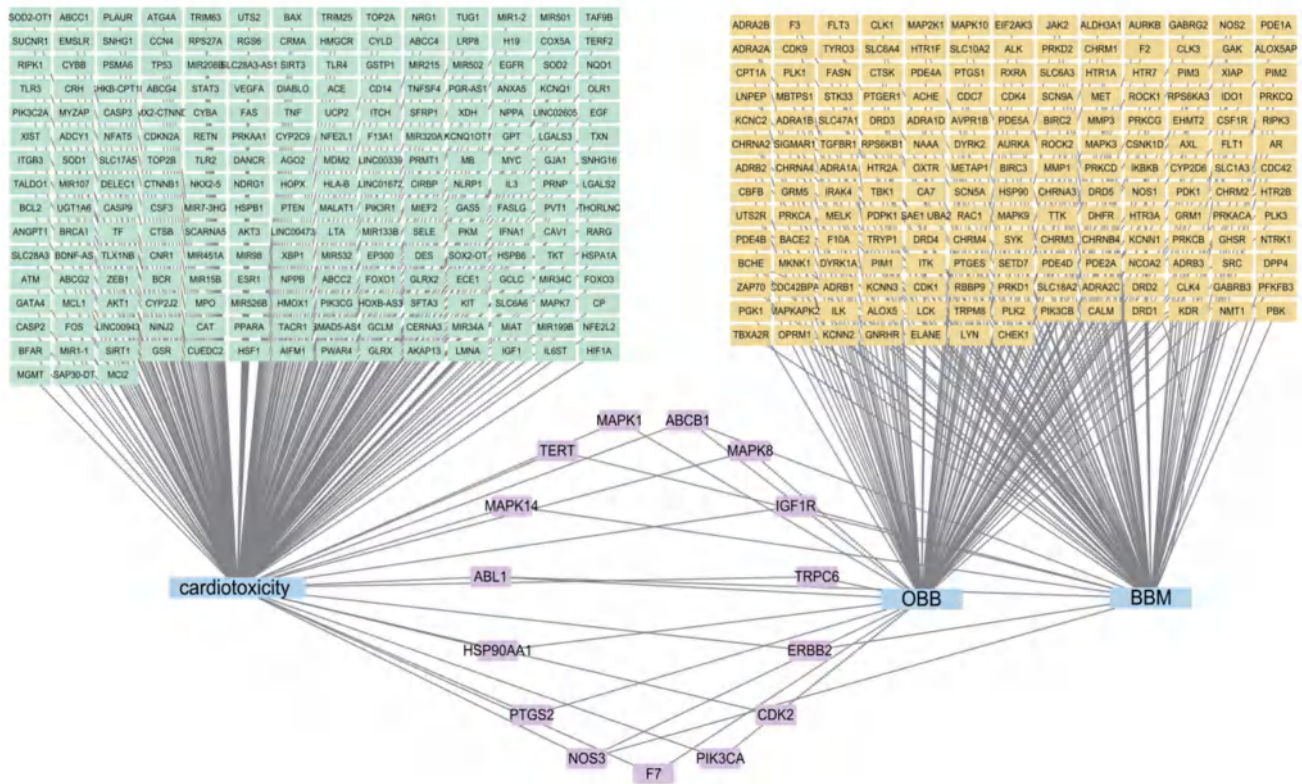


图 1 氧化小檗碱及小檗胺-阿霉素心脏毒性靶点网络图

Fig 1 Oxyberberine and berbamine-doxorubicin-induced cardiotoxicity target network diagram

**2.1.2 制作蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络图** 将交集基因导入 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org>), 设置置信度  $\geq 0.4$ , 物种限定为“Homo sapiens”, 隐藏游离节点, 其余参数保持默认值进行检索, 构建 PPI 网络模型。下载 PPI 结果 (tsv 格式文件) 并导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行可视化。PPI 网络图中共有 15 个节点, 51 条边。节点的颜色越深, 面积越大, 其节点度值越大。结果导入到 Cytoscape 3.9.1 可视化, 度值最大的 10 个基因见表 1。

**2.1.3 基因本体分析 (GO 分析) 及京都基因和基因组百科全书信号通路富集分析 (KEGG 分析)** 对交集基因进行了 GO 注释和 KEGG 途径富集分析, 使用 DAVID 数据库 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) 在线工具对  $P < 0.05$  的富集 GO 和 KEGG 途径进行分析并用气泡图进行可视化。通过 DAVID 数据库分析

表 1 PPI 网络中度值最高的 10 个基因  
Tab 1 Top 10 genes with the highest degree values in the PPI network

| 序号 | 基因名      | 度值 | 序号 | 基因名   | 度值 |
|----|----------|----|----|-------|----|
| 1  | HSP90AA1 | 12 | 6  | PTGS2 | 9  |
| 2  | ABL1     | 10 | 7  | ERBB2 | 9  |
| 3  | MAPK8    | 10 | 8  | IGF1R | 8  |
| 4  | MAPK14   | 9  | 9  | CDK2  | 7  |
| 5  | PIK3CA   | 9  | 10 | MAPK1 | 6  |

13 个共同基因的 GO 和 KEGG 富集分析, 获得 120 个条目, 其中生物过程 (BP) 有 85 个, 细胞组分 (CC) 有 15 个, 分子功能 (MF) 有 20 个, 每种类别分别选取前 10 个进行可视化, 并绘制出 GO 富集分析条形图。结果 (见图 2A) 显示 BP 主要集中在磷酸化, 细胞对应激的反应, 肽基丝氨酸磷酸化, 胰岛素样生长因子受体信号通路等; CC 主要集中在细胞质, 质膜, 核质, 线粒体, 细胞核周区, 核, 髓鞘等; MF 主要集中在三磷酸腺苷 (ATP) 结合, 蛋



白丝氨酸激酶活性, 蛋白丝氨酸 / 苏氨酸激酶活性, 蛋白酪氨酸激酶活性, 蛋白质结合等。KEGG 分析得到 108 个信号通路, 选择前 13 条通路作为氧化小檗碱和小檗胺保护心肌细胞损伤的重要通路进行可

视化 (见图 2B), 其中通路主要集中在 PI3K/AKT 信号通路, ErbB 信号通路, 脂质与动脉粥样硬化等信号通路, 提示氧化小檗碱和小檗胺可能通过上述通路干预阿霉素引起的心肌细胞损伤。

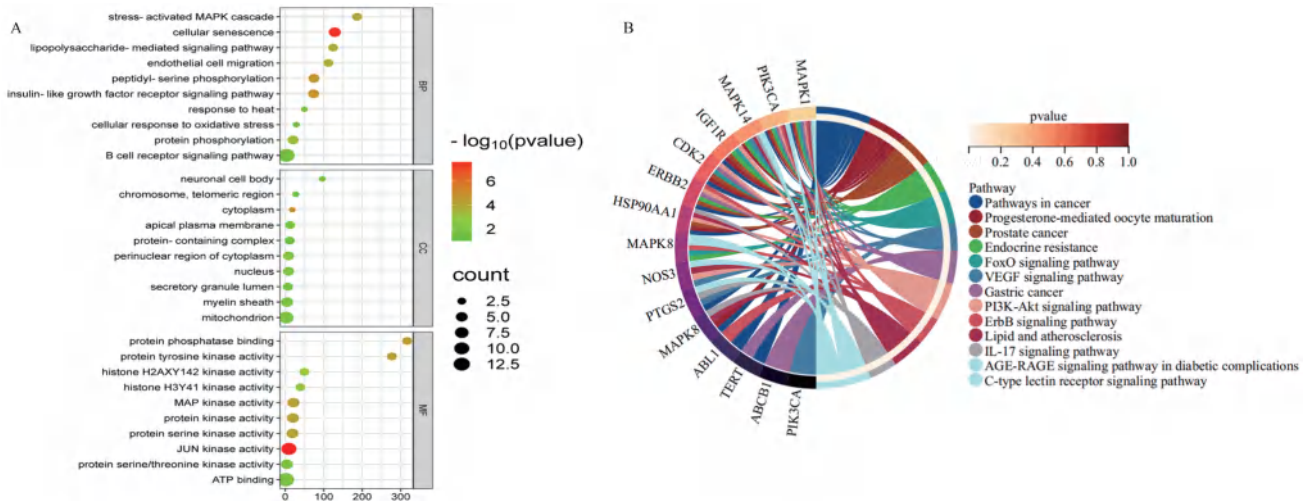


图 2 氧化小檗碱和小檗胺与阿霉素心脏毒性的 GO 功能富集分析 (A) 及 KEGG 通路富集分析 (B)

Fig 2 GO functional enrichment analysis (A) and KEGG pathway enrichment analysis (B) for oxyberberine, berbamine and cardiotoxicity

**2.1.4 分子对接** 从 PDB 蛋白质数据库 (<http://www.pdb.org/>) 下载氧化小檗碱和小檗胺候选蛋白靶标的晶体结构, 并使用 Autodock 工具 1.5.6 软件进行修饰。3 个靶点分别是 HSP90AA1 (PDB ID: 5h22)、ABL1 (PDB ID: 5a99)、MAPK8 (PDB ID: 4i7f); 这些靶标包括配体和水的去除、氢添加以及氨基酸优化和修补。文件以 pdbqt 格式保存。结果以 MOL2 格式保存。化合物被导入到 Autodock tools 1.5.6 中, 所有弹性键默认可旋转并以 pdbqt 格式保存, 作为对接配体。Autodock Vina 1.1.2 用于对接, 而 Discovery Studio 3.5 用于可视化对接结果。对度值前三的核心基因进行分子对接, 结果显示与氧化小檗碱和小檗胺的对接结合能均小于 -10 kJ/mol, 说明氧化小檗碱和小檗胺与预测的作用靶点的构象能量低, 具有较稳定的结合活性。对接结合能见表 2, 分子对接见图 3。

2.2 体外实验

**2.2.1 CCK-8 法测定最佳药物浓度及阿霉素浓度** 将制备好的 H9c2 细胞悬液 (5000 个细胞 / 孔) 接种到 96 孔板, 每孔约 100  $\mu\text{L}$  细胞, 分别加入不同浓度的氧化小檗碱 (1.25、2.5、5、10、20、40、80、160  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、小檗胺 (1.25、2.5、5、10、20、40、80、160  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和阿霉素 (0.1、0.25、0.5、1、2、4、8、16  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 每组设置 3 个平行复孔, 作用 24 h 后弃掉细胞悬液, 加 100  $\mu\text{L}$  PBS 洗涤一次后每孔加入 100  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液, 继续培养 2 h, 待明显显色后用多功能酶标仪检测 450 nm 波长处各

表 2 氧化小檗碱和小檗胺小分子和蛋白分子对接结合能  
Tab 2 Docking binding energies of oxyberberine and berbamine small molecules and protein molecules

| 靶点       | 结合能 / ( $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) |      |
|----------|---------------------------------------------|------|
|          | 氧化小檗碱                                       | 小檗胺  |
| HSP90AA1 | -6.5                                        | -7.2 |
| ABL1     | -7.7                                        | -8.9 |
| MAPK8    | -6.4                                        | -7.5 |

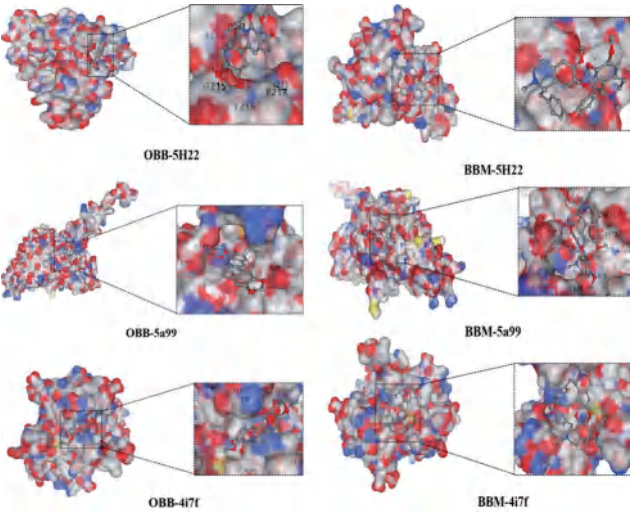


图 3 氧化小檗碱和小檗胺与 HSP90AA1、ABL1、MAPK8 的分子对接示意图

Fig 3 Molecular docking diagrams of oxyberberine and berbamine with HSP90AA1, ABL1 and MAPK8

孔的吸光度值 (OD) 值。除正常对照组外, 每组给药的同时加入阿霉素 1  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  共同孵育 24 h 后用 CCK-8 法测定细胞活力。

结果显示,随着阿霉素剂量增加心肌细胞活力逐渐降低,当阿霉素质量浓度为  $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时细胞活力最接近 50% ( $P<0.01$ , 见图 4A)。与对照组比较,氧化小檗碱和小檗胺随着剂量增加细胞活力呈下降趋势(见图 4B 及 4C)。用  $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  阿

霉素刺激和不同质量浓度的氧化小檗碱和小檗胺共同培养心肌细胞 24 h 后,结果显示(见表 3),与模型组比较,氧化小檗碱  $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时对心肌细胞的保护作用最大 ( $P<0.01$ ),小檗胺  $1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时对心肌细胞的保护作用最大 ( $P<0.01$ )。

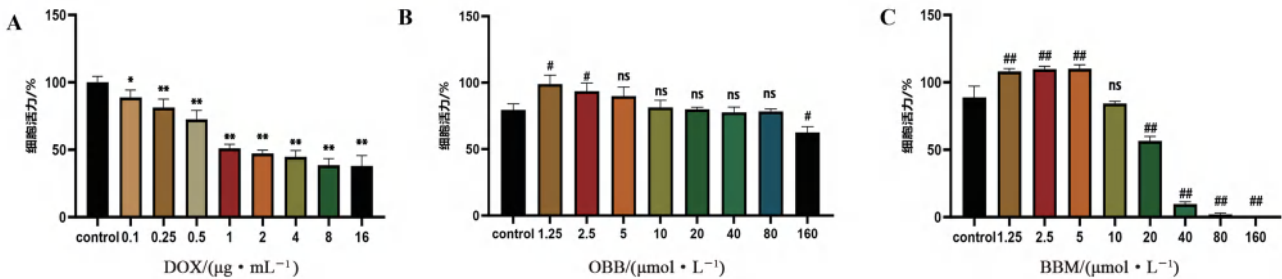


图 4 阿霉素、氧化小檗碱及小檗胺对 H9c2 细胞活力的影响 ( $n=3$ )  
Fig 4 Effect of DOX, oxyberberine, and berbamine on H9c2 cell viability ( $n=3$ )

注:与正常对照组比较,  $^{\#}P<0.05$ ,  $^{\#\#}P<0.01$ 。  
Note: Compared with the blank control group,  $^{\#}P<0.05$ ,  $^{\#\#}P<0.01$ .

表 3 氧化小檗碱和小檗胺对阿霉素诱导 H9c2 细胞损伤的影响 ( $n=3$ )  
Tab 3 Effect of oxyberberine and berbamine on adriamycin-induced H9c2 cell damage ( $n=3$ )

| 组别     | 浓度 / ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | 细胞存活率 / %            | 组别    | 浓度 / ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | 细胞存活率 / %             |
|--------|--------------------------------------------|----------------------|-------|--------------------------------------------|-----------------------|
| 正常对照组  |                                            | $72.73\pm0.68$       | 正常对照组 |                                            | $78.89\pm3.59$        |
| 模型组    |                                            | $57.7\pm2.19^{\#\#}$ | 模型组   |                                            | $32.89\pm1.96^{\#\#}$ |
| 氧化小檗碱组 | 0.5                                        | $72.19\pm1.85^{**}$  | 小檗胺组  | 0.125                                      | $67.55\pm3.45^{**}$   |
|        | 1                                          | $75.37\pm1.92^{**}$  |       | 0.25                                       | $70.42\pm3.51^{**}$   |
|        | 1.25                                       | $88.51\pm2.97^{**}$  |       | 0.5                                        | $72.64\pm5.01^{**}$   |
|        | 2.5                                        | $89.58\pm0.6^{**}$   |       | 1                                          | $78.83\pm1.84^{**}$   |
|        | 5                                          | $95.93\pm0.65^{**}$  |       | 1.25                                       | $63.41\pm2.26^{**}$   |
|        | 10                                         | $100.04\pm2.8^{**}$  |       | 2.5                                        | $62.34\pm3.8^{**}$    |
|        | 20                                         | $84.67\pm1.85^{**}$  |       | 5                                          | $49.61\pm5.16^{**}$   |
|        | 40                                         | $85.65\pm1.2^{**}$   |       |                                            |                       |

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

**2.2.2 细胞迁移测定** 取对数生长期 H9c2 细胞按 50 万个 / 孔接种在 6 孔板,按照实验分组加入不同质量浓度的氧化小檗碱和小檗胺,对照孔加入 2 mL 完全培养基,放入  $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h,观察细胞密度,长到 80% 时使用  $10\text{ }\mu\text{L}$  枪头垂直着底部背面横线画三条直线,将 6 孔板置于倒置显微镜下,选定观察部位,观察愈合的情况,拍照,对比实验组和对照组 0 h 和 24 h 愈合面积,计算迁移率。结果显示,与对照组相比较,24 h 时氧化小檗碱  $2.5$ 、 $5$ 、 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组迁移率均显著升高;24 h 时小檗胺  $0.25$ 、 $0.5$ 、 $1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组迁移率均显著升高(见表 4)。因此选择氧化小檗碱  $2.5$ 、 $5$ 、 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  及小檗胺  $0.25$ 、 $0.5$ 、 $1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  作为低、中、高剂量进行后续研究。

**2.2.3 SOD、MDA、NO 检测** 将细胞制成细胞悬液接种到 6 孔板中,在  $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  的条件下孵

育细胞。待细胞贴壁后给予氧化小檗碱,小檗胺和阿霉素共孵育 24 h。结束培养后取细胞培养上清液,按试剂盒说明书检测并计算细胞培养上清液中的 NO 含量、MDA 含量和 SOD 活力水平。结果见表 5 和 6,与正常对照组比较,模型组 MDA、NO 含量水平显著升高 ( $P<0.05$ ),SOD 活力水平显著降低 ( $P<0.05$ );与模型组比较,氧化小檗碱和小檗胺低、中、高剂量组心肌细胞内的 NO、MDA 水平显著下降, SOD 活力水平显著升高 ( $P<0.01$ )。

**2.2.4 Western blot 检测** 细胞中 p-PI3K, p-AKT 蛋白表达情况 使用预冷的 RIPA 裂解液从药物处理 24 h 后的各组 H9c2 细胞中提取总蛋白。通过 BCA 法检测蛋白浓度后,每组取定量蛋白进行 SDS-PAGE。随后进行转膜操作,并使用脱脂奶粉进行封闭处理。分别加入目的蛋白  $\beta$ -actin、PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT 的一抗,  $4^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,  $1\times\text{TBST}$  洗膜 3 次,每次 6 min,室温环境下,二抗孵育 1 h

表 4 氧化小檗碱和小檗胺对 H9c2 细胞迁移的影响 (n = 3)  
Tab 4 Effect of oxyberberine and berbamine on the migration of H9c2 cells (n = 3)

| 组别     | 浓度 / (μmol · L <sup>-1</sup> ) | 细胞迁移率 / %                   | 组别   | 浓度 / (μmol · L <sup>-1</sup> ) | 细胞迁移率 / %                  |
|--------|--------------------------------|-----------------------------|------|--------------------------------|----------------------------|
| 正常对照组  |                                | 36.86 ± 3.27                | 对照组  |                                | 94.09 ± 1.62               |
| 氧化小檗碱组 | 1.25                           | 36.46 ± 0.54                | 小檗胺组 | 0.125                          | 96.84 ± 2.37               |
|        | 2.5                            | 43.89 ± 3.08                |      | 0.25                           | 106.08 ± 5.35 <sup>#</sup> |
|        | 5                              | 45.33 ± 2.88 <sup>#</sup>   |      | 0.5                            | 101.31 ± 2.45 <sup>#</sup> |
|        | 10                             | 52.57 ± 3.87 <sup>###</sup> |      | 1                              | 102.65 ± 4.22 <sup>#</sup> |
|        | 20                             | 43.54 ± 2.23 <sup>#</sup>   |      | 2                              | 86.72 ± 4.79               |

注：与对照组比较，<sup>#</sup>*P* < 0.05，<sup>###</sup>*P* < 0.01。  
Note: Compared with the normal control group, <sup>#</sup>*P* < 0.05, <sup>###</sup>*P* < 0.01.

表 5 氧化小檗碱对 H9c2 细胞血清 NO、MDA 水平和 SOD 活力的影响 (n = 3)  
Tab 5 Effect of oxyberberine on serum NO and MDA levels and SOD activity in H9c2 cells (n = 3)

| 组别     | 浓度 / (μmol · L <sup>-1</sup> ) | NO 含量 / (μmol · L <sup>-1</sup> ) | MDA 含量 / (nmol · mL <sup>-1</sup> ) | SOD 活力 / (U · mL <sup>-1</sup> ) |
|--------|--------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| 正常对照组  |                                | 53.17 ± 1.15                      | 0.63 ± 0.03                         | 17.85 ± 1.76                     |
| 模型组    |                                | 68.16 ± 11.04 <sup>#</sup>        | 0.78 ± 0.02 <sup>###</sup>          | 13.39 ± 1.11 <sup>#</sup>        |
| 氧化小檗碱组 | 2.5                            | 50.59 ± 4.42 <sup>*</sup>         | 0.41 ± 0.02 <sup>**</sup>           | 16.12 ± 2.09 <sup>ns</sup>       |
|        | 5                              | 47.03 ± 2.42 <sup>**</sup>        | 0.36 ± 0.05 <sup>**</sup>           | 15.05 ± 0.77 <sup>ns</sup>       |
|        | 10                             | 44.31 ± 1.11 <sup>**</sup>        | 0.23 ± 0.05 <sup>**</sup>           | 20 ± 1.7 <sup>**</sup>           |

注：与对照组比较，<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 normal 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 6 小檗胺对 H9c2 细胞血清 NO、MDA 水平和 SOD 活力的影响 (n = 3)  
Tab 6 Effect of berbamine on serum NO and MDA levels and SOD activity in H9c2 cells (n = 3)

| 组别    | 浓度 / (μmol · L <sup>-1</sup> ) | NO 含量 / (μmol · L <sup>-1</sup> ) | MDA 含量 / (nmol · mL <sup>-1</sup> ) | SOD 活力 / (U · mL <sup>-1</sup> ) |
|-------|--------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| 正常对照组 |                                | 53.17 ± 1.15                      | 0.63 ± 0.03                         | 14.83 ± 0.12                     |
| 模型组   |                                | 68.16 ± 11.04 <sup>#</sup>        | 0.78 ± 0.02 <sup>###</sup>          | 7.56 ± 0.48 <sup>#</sup>         |
| 小檗胺组  | 0.25                           | 55.06 ± 2.59                      | 0.48 ± 0.1 <sup>**</sup>            | 8.37 ± 0.23 <sup>**</sup>        |
|       | 0.5                            | 48.46 ± 4.64 <sup>*</sup>         | 0.3 ± 0.08 <sup>**</sup>            | 10.05 ± 0.26 <sup>**</sup>       |
|       | 1                              | 55.8 ± 3.96                       | 0.22 ± 0.05 <sup>**</sup>           | 9.76 ± 0.21 <sup>**</sup>        |

注：与对照组比较，<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 normal 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.

后 1×TBST 洗膜 3 次，每次 6 min，滴加 ECL 发光显色液显色，运用 Image J 软件对条带灰度值进行精确定量分析。结果如图 5 所示，与正常对照组比较，模型组细胞中 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白水平升高，p-PI3K/PI3K 和 p-AKT/AKT 比值显著升高；与模型组相比，加入氧化小檗碱和小檗胺后，细胞中 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白水平降低，p-PI3K/PI3K 和 p-AKT/AKT 比值显著下降。

2.3 统计学处理方法

使用 GraphPad Prism 10 统计分析软件对实验数据进行 *t* 检验，统计数据的表达用均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ )，以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 讨论

近年来心血管疾病的患病率在不断地上升，已成为全球范围内严重威胁人类健康的公共卫生问题<sup>[13]</sup>。研究发现心血管疾病的发生发展与炎症<sup>[14]</sup>、氧化应激<sup>[15]</sup>密切相关。心肌作为心脏实现收缩与舒张活动的关键功能基础，其状态与心脏泵血功能之间存在着极为紧密的联系<sup>[16]</sup>，虽然心血管系统药物<sup>[17]</sup>、钠离子-葡萄糖 2 型共转运体 (sodium-

glucose cotransporter 2, SGLT2) 抑制剂等<sup>[18]</sup>对心肌细胞具有一定保护作用，但在用药成本及不良反应方面还存在一定局限性。因此，寻找具有保护及增强心肌性能的天然药物成为一种新的研究思路。氧化小檗碱和小檗胺是重要的天然化合物，具有抗氧化、抗炎等药理作用，但对于心肌细胞的保护作用机制的研究尚未报道，因此为探讨氧化小檗碱和小檗胺通过对心肌细胞损伤的保护进而改善心血管疾病，本文先使用网络药理学分析发现 *HSP90AA1*、*ABL1*、*MAPK8* 是氧化小檗碱及小檗胺预防心肌细胞损伤的潜在关键基因。热休克蛋白 90α (HSP90AA1) 作为 HSP90 蛋白家族的关键成员，在细胞的生命活动中扮演着不可或缺的角色。有研究表明，在心脏成纤维细胞中，HSP90AA1 能够与转化生长因子-β (TGF-β) 特异性结合，进而有效抑制心肌细胞的纤维化。ABL1 在心脏发育以及心肌细胞稳态维持方面发挥着广泛且关键的作用。研究揭示，在阿霉素诱导的心脏疾病进程中，ABL1 扮演着极为重要的角色<sup>[19]</sup>，这暗示着 ABL1 可能成为改善此类心脏疾病治疗策略的关键分子靶点。丝裂原活化蛋白激酶 8



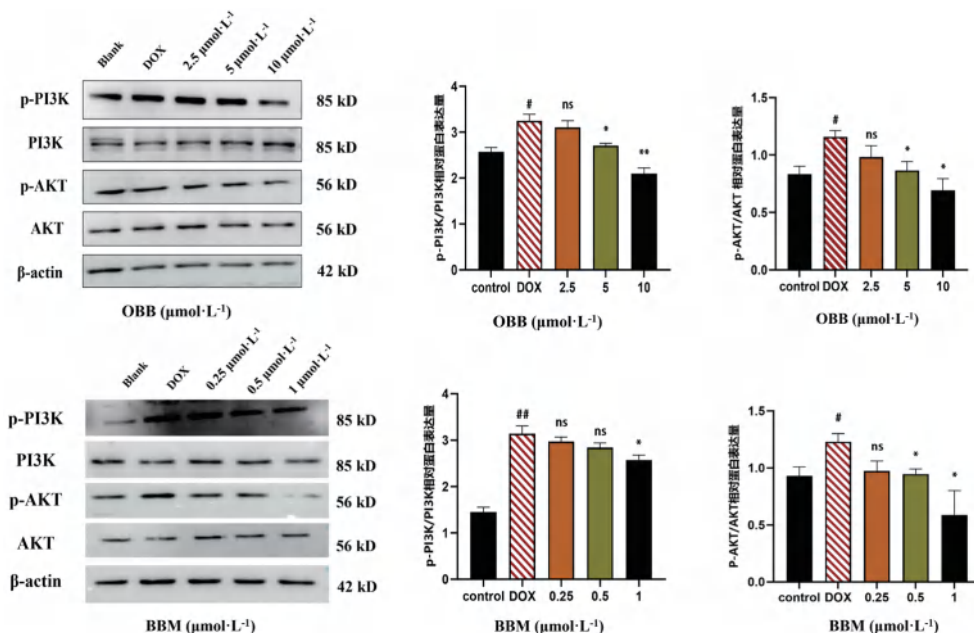


图5 氧化小檗碱和小檗胺对 H9c2 细胞中 PI3K/AKT 信号通路蛋白表达水平的影响 ( $n = 3$ )

Fig 5 Effect of oxyberberine and berbamine on the expression levels of proteins in the PI3K/AKT signaling pathway in H9c2 cells ( $n = 3$ )

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

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

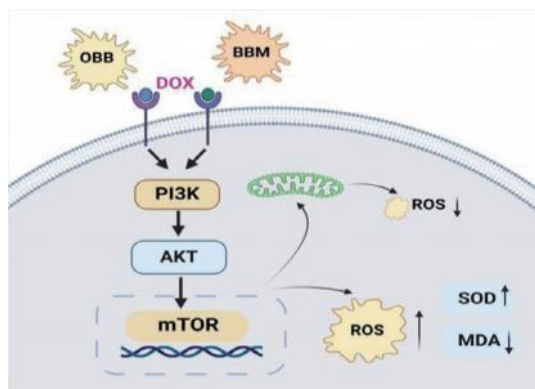


图6 PI3K/AKT 信号通路机制图

Fig 6 Mechanism diagram of the PI3K/AKT signaling pathway

(MAPK8) 隶属 MAPK 家族，参与多种重要的生理反应，包括炎症反应、细胞分化、细胞增殖以及细胞死亡等<sup>[20]</sup>。在心肌损伤的病理状态下，MAPK8 的表达水平会出现异常升高，这一现象提示 MAPK8 有可能成为治疗心肌损伤的潜在关键靶点<sup>[21]</sup>。

通过 KEGG 富集分析预测发现 PI3K/AKT 信号通路是氧化小檗碱和小檗胺干预阿霉素诱导心肌细胞损伤的重要通路。在阿霉素诱导心肌细胞损伤过程中，氧化应激反应受到复杂信号通路的调控，其中 PI3K/AKT 是一条受到广泛关注的信号通路。PI3K/AKT 通路在各种病理或应激刺激下（如炎症、缺血、缺氧和氧化应激等）被激活<sup>[22]</sup>，在细胞生长、增殖、迁移等生理过程中扮演关键角色。当 PI3K 被激活后，会进一步激活 AKT。被激活的 AKT 通过 mTOR 途径调节细胞自噬，清除受损的线粒体等产生活性氧 (ROS)

的细胞器<sup>[23]</sup>，这些作用最终减少体内 ROS 过度积累，抑制氧化应激的发生，从而对心肌细胞起到保护作用<sup>[24]</sup>。HSP90AA1 作为一种分子伴侣，在心脏受到应急刺激时，能稳定关键蛋白的结构和功能，减少细胞损伤，而且 HSP90AA1 能与 AKT 等蛋白结合，激活下游抗凋亡信号通路，减少心肌细胞的凋亡，对心脏起到保护作用<sup>[25]</sup>。氧化应激反应的特征是 ROS 大量生成并造成组织氧化损伤，增加氧化产物 MDA 的生成及抗氧化酶 SOD 的消耗<sup>[26]</sup>。当 AKT 过度激活时会抑制自噬，从而导致受损细胞器积累，产生更多的 ROS。当心肌细胞受到损伤时细胞抗氧化能力减弱，导致细胞中 MDA、NO 含量增加，SOD 活力降低<sup>[27]</sup>。体外实验结果显示，氧化小檗碱和小檗胺可显著降低 NO 含量与 MDA 含量，同时显著提高 SOD 活力，这些作用可能跟调节 PI3K/AKT 信号通路有关。

综上所述，本研究发现，氧化小檗碱和小檗胺可能通过 PI3K/AKT 信号通路和 HSP90AA1、ABL1、MAPK8 这 3 个关键基因，影响氧化应激过程，减轻过氧化引起的心肌损伤，从而发挥心肌细胞的保护作用。但是本研究也存在不足之处，首先，本研究没有对关键基因进行实验验证，其次，H9c2 细胞模型虽在心肌研究中有应用，但存在局限性，其与原代心肌细胞生物学特性有差异，且无法模拟体内复杂环境。因此，未来研究需在原代心肌细胞或动物模型中验证相关结论，以提升研究成果的可靠性与临床转化价值。

## 参考文献

- [1] Ramachandra CJA, Hernandez-Resendiz S, Crespo-Avilan GE, et al. Mitochondria in acute myocardial infarction and cardioprotection [J]. *EBioMedicine*, 2020, 57: 102884.
- [2] Kologrivova I, Shtatolkina M, Suslova T, et al. Cells of the immune system in cardiac remodeling: main players in resolution of inflammation and repair after myocardial infarction [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 664457.
- [3] Li CL, Liu MG, Deng L, et al. Oxyberberine ameliorates TNBS-induced colitis in rats through suppressing inflammation and oxidative stress via Keap1/Nrf2/NF- $\kappa$ B signaling pathways [J]. *Phytomedicine*, 2023, 116: 154899.
- [4] Chen TT, Li QG, Ai GX, et al. Enhancing hepatoprotective action: oxyberberine amorphous solid dispersion system targeting TLR4 [J]. *Sci Rep*, 2024, 14 (1): 14924.
- [5] 董文婷, 尚福军, 郭锦, 等. 小檗胺对糖尿病心肌病心肌损伤的保护作用及其机制 [J]. *山西医科大学学报*, 2021, 52 (9): 1135-1142.
- [6] Cloherty APM, Rader AG, Patel KS, et al. Berbamine suppresses intestinal SARS-CoV-2 infection via a BNIP3-dependent autophagy blockade [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2023, 12 (1): 2195020.
- [7] Zhao WL, Jiang YQ, Jia XP, et al. Berbamine inhibits the biological activities of prostate cancer cells by modulating the ROS/NF- $\kappa$ B axis [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2023, 23 (14): 1626-1633.
- [8] Sharma A, Anand SK, Singh N, et al. Berbamine induced AMPK activation regulates mTOR/SREBP-1c axis and Nrf2/ARE pathway to allay lipid accumulation and oxidative stress in steatotic HepG2 cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 882: 173244.
- [9] Tang WW, Ma JZ, Chen KD, et al. Berbamine ameliorates DSS-induced colitis by inhibiting peptidyl-arginine deiminase 4-dependent neutrophil extracellular traps formation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 975: 176634.
- [10] Saranya S, Baskaran R, Poornima P, et al. Berbamine ameliorates isoproterenol-induced myocardial infarction by inhibiting mitochondrial dysfunction and apoptosis in rats [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120 (3): 3101-3113.
- [11] 李夏, 王元博, 王超臣, 等. 基于网络药理学和实验验证探究养心开窍开心散类方补心汤调控 PI3K/AKT 信号通路保护心脏的机制 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47 (21): 5916-5925.
- [12] 张希贤, 孙俊杰, 刘清雅. 人参皂苷 Rg<sub>2</sub> 调控 PI3K/AKT/mTOR 信号通路对急性心肌梗死后心脏保护作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31 (10): 185-193.
- [13] Ajoolabady A, Chiong M, Lavandero S, et al. Mitophagy in cardiovascular diseases: molecular mechanisms, pathogenesis, and treatment [J]. *Trends Mol Med*, 2022, 28 (10): 836-849.
- [14] Liberale L, Badimon L, Montecucco F, et al. Inflammation, aging, and cardiovascular disease: JACC review topic of the week [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2022, 79 (8): 837-847.
- [15] Chang X, Zhang T, Zhang WJ, et al. Natural drugs as a treatment strategy for cardiovascular disease through the regulation of oxidative stress [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 5430407.
- [16] 余春燕, 朱坤, 黄建安, 等. 茶多酚对心肌保护作用的研究进展 [J]. *食品科学*, 2022, 43 (3): 296-305.
- [17] 徐启耀, 张梅. 甲状腺激素通过 Sirtuins 影响线粒体心肌保护作用的研究进展 [J]. *天津医药*, 2017, 45 (1): 108-112.
- [18] 孙丹册, 陈康, 宋康兴. 钠离子-葡萄糖 2 型共转运体抑制剂心肌保护作用研究进展 [J]. *中国医刊*, 2020, 55 (8): 844-847.
- [19] Borlak J, Ciribilli Y, Bisio A, et al. The Abl1 tyrosine kinase is a key player in doxorubicin-induced cardiomyopathy and its p53/p73 cell death mediated signaling differs in atrial and ventricular cardiomyocytes [J]. *J Transl Med*, 2024, 22 (1): 845.
- [20] Zhang YX, Zhang JH, Sun ZY, et al. MAPK8 and CAPN1 as potential biomarkers of intervertebral disc degeneration overlapping immune infiltration, autophagy, and ceRNA [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1188774.
- [21] Guo YM, Li N. Network toxicology and molecular docking to investigate the non-acetylcholinesterase mechanisms and targets of cardiotoxicity injury induced by organophosphorus pesticides [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2024, 103 (41): e39963.
- [22] 谭彩, 刘建和, 袁恒佑, 等. 柴胡三参胶囊对阿霉素心血管毒性小鼠 PI3K-Akt 通路表达及相关凋亡蛋白的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2024, 44 (10): 2471-2477.
- [23] Kma L, Baruah TJ. The interplay of ROS and the PI3K/AKT pathway in autophagy regulation [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2022, 69 (1): 248-264.
- [24] 卢文君, 廖奕华, 刘昕禹, 等. 利拉鲁肽调控 PI3K/AKT 通路对急性心肌梗死大鼠心肌损伤的影响 [J]. *贵州医科大学学报*, 2025, 50 (2): 247-253.
- [25] Li J, Guo YX, Yang Y, et al. Preconditioning with acteoside ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury by targeting HSP90AA1 and the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2025, 31 (3): 77.
- [26] 武春莲, 邓翠东, 吴俊才. 当归补血汤通过 PI3K/AKT 通路减轻老年心肌梗死大鼠心肌损害的实验研究 [J]. *中国中医急症*, 2023, 32 (5): 781-785, 805.
- [27] Zhong ZL, Tian YQ, Luo XM, et al. Extracellular vesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against DOX-induced heart failure through the miR-100-5p/NOX4 pathway [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 703241.

(收稿日期: 2025-02-05; 修回日期: 2025-05-11)

# 共载多种生物酶的金属离子配位纳米粒的制备及其体外抗肿瘤作用研究

黎绫<sup>1</sup>, 廖艳<sup>2</sup>, 刘治芳<sup>1</sup>, 肖兰<sup>1\*</sup> (1. 长沙卫生职业学院, 长沙 410605; 2. 中南大学湘雅药学院, 长沙 410013)

**摘要:** **目的** 制备并表征共载葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶的金属离子配位纳米粒 (GCTF NPs), 并对其体外抗肿瘤作用进行研究。**方法** 采用一步法制备 GCTF NPs, 透射电镜观察纳米粒的形态; 纳米粒径和电位分析仪测定其粒径及电位; 通过测量不同分散体系中纳米粒粒径变化考察其稳定性, 激光辐照法考察光热转换性能, 底物反应法测定酶活性; 细胞成像微孔板检测系统分析其细胞摄取情况, CCK-8 法和 Annexin V/PI 双染法分别考察纳米粒对人乳腺癌 MBA-MD-231 细胞的抑制及促凋亡作用。**结果** 制备的 GCTF NPs 平均粒径和 Zeta 电位分别为  $(150.4 \pm 7.1)$  nm 和  $-(32.9 \pm 0.46)$  mV, 透射电镜结果显示纳米配位聚合物分散性较好, 分布较为均匀, 粒子呈不规则串联形结构。GCTF NPs 在不同分散介质中稳定性良好, 在 808 nm 激光照射下可显著升温, 对反应底物表现出良好的酶活性。体外细胞实验结果显示, GCTF NPs 能被 MBA-MD-231 细胞大量摄取, 显著抑制肿瘤细胞增殖并诱导细胞凋亡, 在 808 nm 激光照射下, 细胞存活率显著降低, 抗肿瘤活性进一步增强。**结论** 本研究制备的 GCTF NPs, 制备方法简单环保, 结合酶介导的饥饿治疗和纳米粒的光热治疗双重治疗作用, 具有良好的抗肿瘤活性。

**关键词:** 光热治疗; 饥饿治疗; 葡萄糖氧化酶; 过氧化氢酶; 抗肿瘤

中图分类号: R94, R96 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)08-2298-06  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.023

## Preparation of metal ion coordination nanoparticles co-loaded with various biological enzymes and their in vitro antitumor effect

LI Ling<sup>1</sup>, LIAO Yan<sup>2</sup>, LIU Zhi-fang<sup>1</sup>, XIAO Lan<sup>1\*</sup> (1. Changsha Health Vocational College, Changsha 410605; 2. Xiangya School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410013)

**Abstract: Objective** To prepare and characterize metal ion coordination nanoparticles co-loaded with glucose oxidase and catalase (GCTF NPs), and to determine their in vitro antitumor effects. **Methods** GCTF NPs were prepared by a one-step method, and the morphology of the nanoparticles was observed by transmission electron microscopy. The nanoparticle size and Zeta potential were measured. The stability was evaluated by monitoring size changes in different dispersion media; the photothermal conversion efficiency was tested under 808 nm laser irradiation; and the enzyme activity was quantified through substrate reaction assays. Cell imaging microplate detection system was used to determine their cellular uptake, and CCK-8 method and Annexin V/PI double staining method were used to measure the inhibitory and pro-apoptotic effect of the nanoparticles on human breast cancer MBA-MD-231 cells. **Results** The prepared GCTF NPs had an average particle size and Zeta potential of  $(150.4 \pm 7.1)$  nm and  $-(32.9 \pm 0.46)$  mV, respectively. Transmission electron microscopy results showed that the metal ion coordination polymers were dispersed well and uniformly distributed, with an irregular chain-like structure. GCTF NPs were stable in different dispersion media and markedly increased in temperature under 808 nm laser irradiation, demonstrating good enzymatic activity

**基金项目:** 湖南省教育厅科学研究优秀青年项目 (No.22B1114); 湖南省教育厅科学研究优秀青年项目 (No.23B1137)。

**作者简介:** 黎绫, 女, 讲师, 主要从事新剂型新制剂的研发与评价, email: lilong733@126.com \*通信作者: 肖兰, 女, 教授, 主要从事药品工艺研发与质量控制方面的研究, email: 670258452@qq.com



towards the reaction substrate. The in vitro cell experiments showed that GCTF NPs were taken up largely by MBA-MD-231 cells, thus effectively killing the tumor cells and inducing cell apoptosis. Under 808 nm laser irradiation, the cell survival rate was significantly reduced, and the anti-tumor activity was further enhanced. **Conclusion** Preparation of GCTF NPs is simple and environmentally friendly. The combination of enzyme-mediated starvation therapy and photothermal therapy of nanoparticles shows good antitumor activity.

**Key words:** photothermal therapy; starvation therapy; glucose oxidase; catalase; antitumor effect

近年来,光热治疗(photothermal therapy, PTT)以其高效低毒特性,已成为极具潜力的肿瘤治疗方案<sup>[1-2]</sup>。利用近红外光(near-infrared, NIR)将光热材料吸收的光能转化为热能,在不损伤正常组织的前提下,达到杀灭肿瘤细胞的目的。此外,PTT还可以联合化疗、光动力治疗、基因治疗和免疫治疗协同治疗肿瘤<sup>[3-6]</sup>。单宁酸(tannic acid, TA)是一种从天然植物中提取的多酚,含有邻苯三酚基团,可以和铁离子配位螯合,在基质表面形成金属-多酚网络结构(TA-Fe),并具有出色的光热转换效率<sup>[7-8]</sup>。

饥饿治疗是通过阻断对肿瘤组织的血液和葡萄糖等营养物质的供应以抑制肿瘤生长的新型治疗模式<sup>[9]</sup>。葡萄糖氧化酶(GOx)在有氧环境下可以催化葡萄糖降解,生成葡萄糖酸和过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>),切断肿瘤区的营养和能量供给,达到“饿死”肿瘤细胞的目的<sup>[10]</sup>。GOx的催化需要氧气参与,而大多数实体瘤由于肿瘤细胞的快速增殖和血管畸形而处于乏氧状态,不利于维持GOx的高效催化反应。过氧化氢酶(CAT)能特异性地催化H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>生成水与氧气,将CAT与GOx整合在同一纳米体系中,CAT以GOx催化葡萄糖生成的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>为底物,生成水与氧气,形成自供氧体系从而不断耗竭葡萄糖,增强饥饿治疗效应。但生物酶的体内递送存在以下问题:生理环境下不稳定性,体内半衰期短。基于TA的生物黏附特性,利用铁离子与TA的共价配位作用,将GOx和CAT共同包载于核心,可保护酶暴露于生理环境中,减少酶的降解,从而最大限度地发挥药效。

本课题设计结合PTT和饥饿治疗的双重优势,构建基于配位键结合的TA-Fe纳米粒包载GOx和CAT(GCTF NPs),并对其理化性质表征。以MBA-MD-231(M231)人乳腺癌细胞为模型并结合808 nm激光照射,对纳米粒的抗肿瘤活性进行研究。

## 1 材料

### 1.1 仪器

BT224S型电子天平(德国Sartorius公司);MINI4-UVF纯水机(湖南科尔顿水务有限公司);

TGL16M台式高速冷冻离心机(长沙英泰仪器有限公司);Nano-ZS90纳米粒径、Zeta电位分析仪(英国马尔文仪器有限公司);Infinite M200 PRO多功能酶标仪(奥地利TECAN公司);JPBJ-609L型便携式溶解氧仪、PHS-3E型pH计(中国INESA科学仪器有限公司);808 nm激光仪(北京榜首科技有限公司);Titan G2 60-300透射电子显微镜(美国FEI公司);Cytation 5细胞成像微孔板检测系统(美国BioTek公司)。

### 1.2 试剂

GOx、CAT(上海阿拉丁生物化学科技有限公司);葡萄糖(国药集团化学试剂有限公司);人乳腺癌MBA-MD-231(M231)细胞(由中南大学湘雅药学院赠予);胎牛血清(FBS)(美国Gibco公司),DMEM、CCK-8(美国Apexbio公司),RPMI-1640、Annexin V-FITC凋亡试剂盒(美国Apexbio公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 GCTF NPs的制备

在8 mL纯水中分别加入80 μL TA(10 mg·mL<sup>-1</sup>),20 μL GOx(8 mg·mL<sup>-1</sup>)及20 μL CAT(8 mg·mL<sup>-1</sup>),室温条件下以500 r·min<sup>-1</sup>搅拌,在搅拌的同时逐滴加入40 μL FeCl<sub>3</sub>溶液(10 mg·mL<sup>-1</sup>),室温搅拌1 h。随后以15 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min,超纯水洗涤1次,复溶于1 mL超纯水中,4℃保存备用。

同法制备TA-Fe NPs、CAT NPs、GOx NPs。

### 2.2 纳米粒的表征

**2.2.1 微观形态** 将TA-Fe NPs、CAT NPs、GOx NPs、GCTF NPs分别分散于超纯水中,取适量溶液分别滴加至铜网上,放入电热鼓风干燥箱下烘干,重复此操作3次,置于透射电镜(TEM)下观察样品的形态。如图1所示,制备的纳米配位聚合物分散性较好,分布较为均匀,粒子呈不规则串联形结构。

**2.2.2 粒径及Zeta电位表征** 将TA-Fe NPs、CAT NPs、GOx NPs、GCTF NPs分别分散于超纯水中,各取1 mL于样品池中,测定纳米粒粒径及表

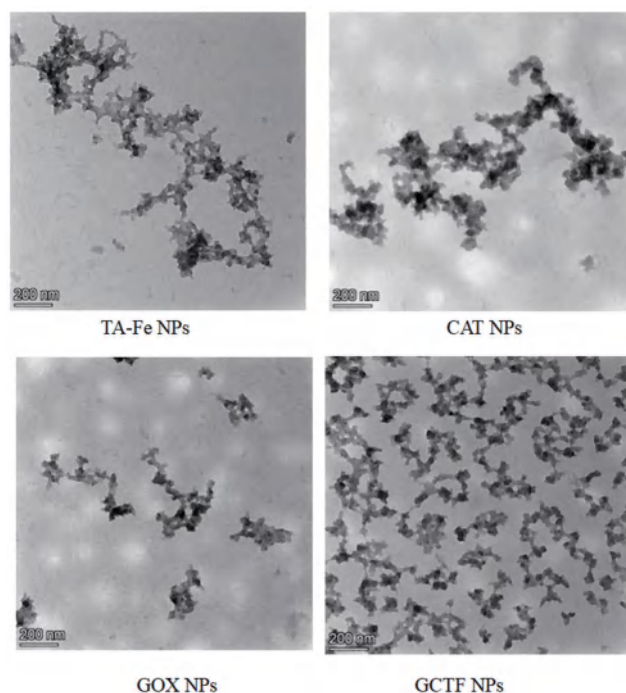


图1 纳米粒的透射电镜图

Fig 1 Transmission electron microscope of nanoparticles

面电位。测得 TA-Fe NPs 粒径为  $(116.7 \pm 5.2)$  nm, Zeta 电位为  $-(17.5 \pm 1.3)$  mV; CAT NPs 粒径为  $(148.7 \pm 5.6)$  nm, Zeta 电位为  $-(22.2 \pm 0.12)$  mV; GOx NPs 粒径为  $(149.5 \pm 5.2)$  nm, Zeta 电位为  $-(26.8 \pm 0.40)$  mV; GCTF NPs 粒径为  $(150.4 \pm 7.1)$  nm, PDI 为  $(0.072 \pm 0.028)$ , Zeta 电位为  $-(32.9 \pm 0.46)$  mV, 粒径分布与电位如图 2 所示, 结果表明所制备的纳米粒粒径分布窄。

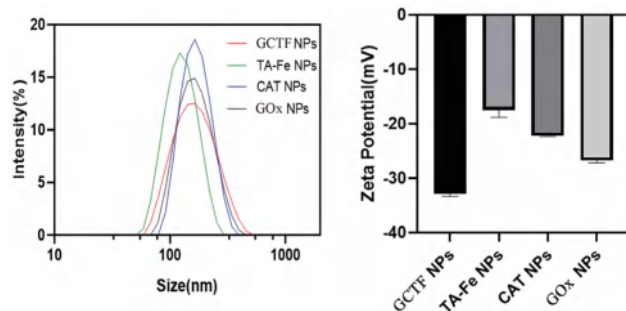


图2 纳米粒的粒径分布图及电位图

Fig 2 Size distribution and Zeta potential of nanoparticles

**2.2.3 稳定性考察** 将 GCTF NPs 分别分散于超纯水、DMEM 完全培养基 (含有 10% FBS) 和 PBS ( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 中, 于 0、6、12、24、48 h 取样品测定粒径大小以考察纳米制剂在生理温度、近生理条件下的稳定性, 结果见图 3。完全培养基中血清蛋白与纳米粒子结合, 使得测得粒径比水和 PBS 中测得的粒径更大。纳米粒在超纯水、完全培养基或 PBS 下 48 h 内粒径均无明显降低或

增加的趋势, 表明粒子可在体循环中保持结构稳定, 可避免结构发生崩解或药物提前泄漏的情况。由此证明 TA-Fe 外壳可维持纳米粒的高稳定性, 在体内不易水解, 也可有效维持纳米粒的结构。

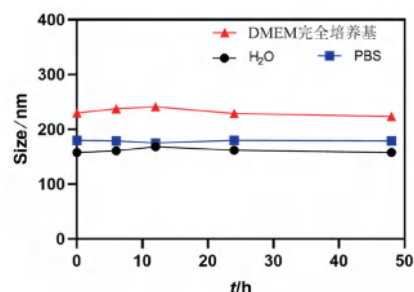


图3 不同介质对 GCTF NPs 的稳定性的影响

Fig 3 Influence of different media on the stability of GCTF NPs

## 2.3 GCTF NPs 的体外活性研究

**2.3.1 光热转换性能考察** 将 TA-Fe NPs、CAT NPs、GOx NPs、GCTF NPs 分别分散于超纯水中, 配制成  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液, 置于石英比色皿中, 808 nm 激光 ( $2 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) 持续照射 7 min, 每隔 15 s 检测一次实时温度, 以温度值  $T$  为纵坐标, 时间  $t$  为横坐标作图, 得到不同浓度的纳米粒溶液在 10 min 内的升高温度曲线, 结果如图 4 所示: 相较于纯水而言, 各种纳米粒均有光照射升温的作用, GOx NPs、GCTF NPs 纳米粒升温效果最好。由此证明 GCTF NPs 具有良好的光热转换性能。

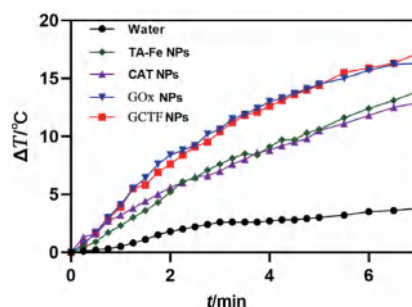


图4 纳米粒的热效应曲线

Fig 4 Photothermal heating curves of nanoparticles

**2.3.2 CAT NPs、GCTF NPs 的 CAT 活性** 将 CAT NPs、GCTF NPs 分别分散于超纯水中, 配制成  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液, 同时配制  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 CAT 溶液, 在  $\text{H}_2\text{O}_2$  底物存在条件下 ( $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 采用溶解氧仪于各个时间点测量 CAT、CAT NPs、GCTF NPs ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 溶液中溶解  $\text{O}_2$  的含量, 结果见图 5。

由 CAT 的作用机制可知, CAT 可以催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  产生  $\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{O}_2$ , 从而使溶液中氧含量增加, 通过便携式溶解氧仪可以测定 CAT 溶液和  $\text{H}_2\text{O}_2$  反应后的氧气浓度变化, 证明 CAT 的酶活性。如图 5 所

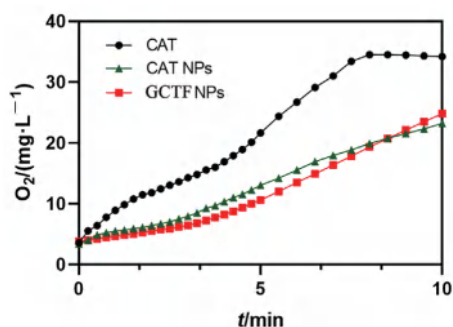


图5  $\text{H}_2\text{O}_2$  对 CAT、CAT NPs、GCTF NPs 溶液中的含氧量的影响  
Fig 5 Influence of  $\text{H}_2\text{O}_2$  on the  $\text{O}_2$  concentration in solutions of CAT, CAT NPs and GCTF NPs

示, CAT NPs、GCTF NPs 的产氧能力虽然较 CAT 溶液稍弱, 但仍具有较强的产氧能力, 证明 CAT NPs、GCTF NPs 粒子中包载了 CAT, 且不影响 CAT 的酶活性。

**2.3.3 GCTF NPs 的 GOx 活性** 将 GCTF NPs 分散于超纯水中, 配制成  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液, 在葡萄糖底物存在 ( $100 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和不存在条件下采用 pH 计实时监测 GCTF NPs ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 溶液的 pH 值, 结果见图 6。

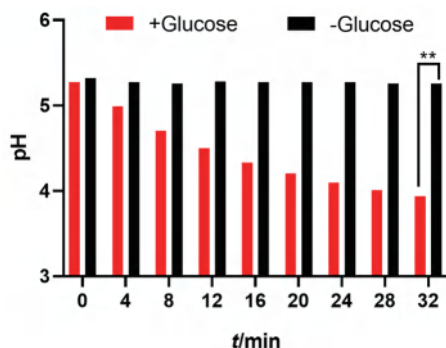


图6 葡萄糖对 GCTF NPs 溶液 pH 值的影响 (\*\* $P < 0.01$ )  
Fig 6 Influence of glucose on the pH value of GCTF NPs solution (\*\* $P < 0.01$ )

由 GOx 的作用机制可知, GOx 以葡萄糖为反应底物生成  $\text{H}_2\text{O}_2$  和葡萄糖酸, pH 计可以测定 GOx 和葡萄糖溶液反应后的溶液酸度变化。GCTF NPs 未加葡萄糖时 pH 值几乎无变化, 加入葡萄糖 32 min 后 pH 下降明显 ( $P < 0.01$ ), 表明催化底物生成葡萄糖酸。实验结果证明纳米粒中包载了 GOx, 且具有催化活性。

## 2.4 GCTF NPs 的细胞毒性

将 TA-Fe NPs、CAT NPs、GOx NPs、GCTF NPs 纳米粒, 使用完全培养基复溶, 配制质量浓度为  $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (以纳米粒计) 的样品溶液。采用 CCK-8 法进行细胞毒性评价。将 M231 细胞以  $5 \times 10^3$  个/孔的密度接种于 96 孔板中, 孵育过夜。孵育结束后, 弃去培养基, 适量 PBS ( $10 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7.4) 洗

涤 2 次。设置 6 组实验即阴性对照组 (PBS), TA-Fe NPs、CAT NPs、GOx NPs、GCTF NPs、GCTF NPs + Laser, 孔内分别加入  $100 \mu\text{L}$  样品溶液或 PBS, 孵育 24 h (其中 GCTF NPs + Laser 组在给药后 4 h 每孔激光照射 5 min, 再继续培养 20 h)。然后弃去原有的培养基, 用 PBS 洗涤 3 次, 每组均加入  $100 \mu\text{L}$  含有 10% CCK-8 的完全培养基,  $37^\circ\text{C}$  孵育 2 h。用酶标仪检测各孔在 490 nm 处的光密度 (OD) 值, 计算细胞活力。计算公式如下:

细胞活力 = (样品 OD 值 - 空白 OD 值) / (阴性对照 OD 值 - 空白 OD 值)  $\times 100\%$  (公式 1), 空白 OD 值为空白孔 CCK-8 的 OD 值, 结果见图 7。

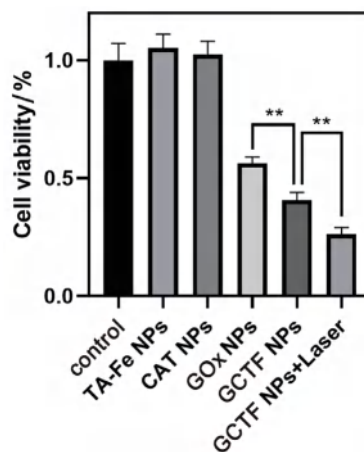


图7 不同给药组对 M231 的细胞毒性 ( $n = 6$ , \*\* $P < 0.01$ )  
Fig 7 Cell viability of different drug-loaded nanoparticles by M231 cells ( $n = 6$ , \*\* $P < 0.01$ )

由图 7 可知, 干预细胞 24 h 后, TA-Fe NPs 和 CAT NPs 对细胞毒性很小, 生物相容性好, 无明显细胞毒性。而 GOx NPs、GCTF NPs 对细胞毒性较大, 激光照射后毒性更大。在 GOx 作用下, GOx NPs 发挥饥饿治疗作用, 对肿瘤细胞具有一定的杀伤力, GCTF NPs 组对细胞的杀伤力强于 GOx NPs 组 ( $P < 0.01$ ), 证明 CAT 的存在有助于葡萄糖氧化酶发挥催化活性。与 GOx NPs 组相比, 在 808 nm 激光照射作用下, GCTF NPs + Laser 细胞杀伤作用进一步增强 ( $P < 0.01$ ), 证明在光热作用和饥饿治疗联合作用下能进一步提高抗肿瘤效果。

## 2.5 细胞摄取实验

按“2.1”项下方法制备 GCTF NPs, 其中 GOx 和 CAT 两种酶替换成荧光素标记牛血清白蛋白 (FITC-BSA)。完全培养基复溶, 至质量浓度为  $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。M231 细胞以  $2 \times 10^4$  个/孔的密度接种于 24 孔板中, 孵育 24 h 后, 弃去培养基, 适量 PBS ( $10 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7.4) 洗涤 2 次。加入  $0.5 \text{mL}$   $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 GCTF NPs, 分别孵育 2 h



与 4 h 后, 弃去培养基, 适量 PBS 洗涤细胞 3 次。加入适量 4% 多聚甲醛固定 15 min, DAPI 染核 8 min, PBS 轻柔洗涤 3 次后, 加入少量 PBS, 细胞成像微孔板检测系统下观察, 结果见图 8。

图中显示蓝色荧光表示细胞核被染色。绿色荧光为荧光素标记的纳米粒, 绿色荧光越强, 摄入纳米粒越多。随着孵育时间延长, 进入细胞的纳米粒增加。

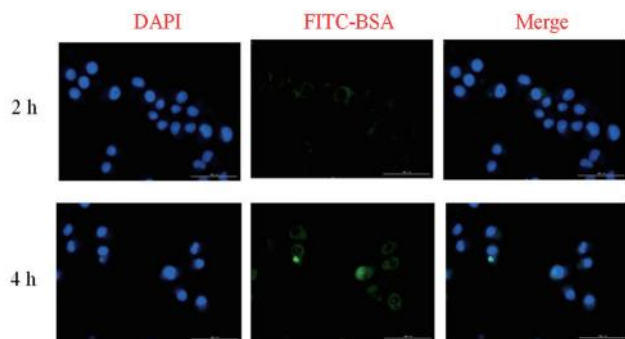


图 8 GCTF NPs 孵育 2 h 与 4 h 后 M231 细胞摄取结果

Fig 8 Uptake of M231 cells after incubation with GCTF NPs for 2 h and 4 h

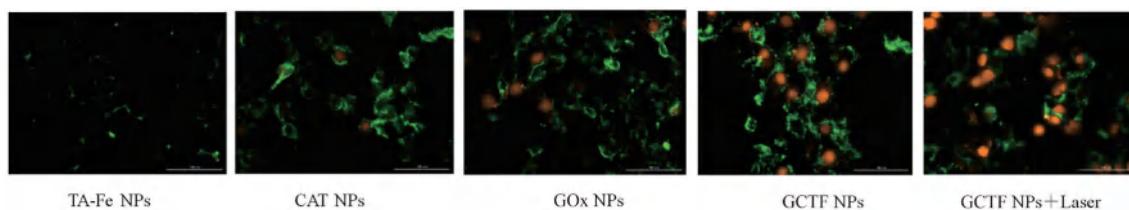


图 9 不同给药组对 M231 细胞的活死细胞染色结果的影响

Fig 9 Live-dead cell staining results of different drug-loaded nanoparticles by M231 cells

## 2.7 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行分析, 数据以平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。采用  $t$  检验来比较两组之间的数据差异。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 讨论

本课题采用一步法制备 TA-Fe 金属离子配位纳米粒, 该反应体系在水溶液中数分钟内即可完成, 制备过程绿色简单, 无需加热处理、特殊设备、有机溶剂或其他化学添加剂。该体系对多种固体表面的黏附特性使其具备强大的包载能力, 能在 GOx 和 CAT 表面形成纳米网络结构。纳米粒外壳对酶的保护作用, 显著提高了其生理稳定性, 为载酶纳米体系的开发提供了新思路。

在光热转换性能考察实验中, 各种纳米粒均有光照射升温的作用, GOx NPs、GCTF NPs 纳米粒升温效果最好, 即有葡萄糖氧化酶存在时其光热转换性能强于 TA-Fe 纳米粒, 这可能与 GOx

## 2.6 活死细胞染色检测

M231 细胞以  $2 \times 10^4$  个/孔的密度接种于 24 孔板, 孵育 24 h。孵育结束后, 弃去培养基, 适量 PBS ( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7.4) 洗涤 2 次。设置 6 组实验即空白对照 PBS、TA-Fe NPs、CAT NPs、GOx NPs、GCTF NPs、GCTF NPs + Laser, 孔内分别加入 0.5 mL 质量浓度为  $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的样品溶液或 PBS, 孵育 24 h (其中 GCTF NPs + Laser 组在给药 4 h 后每孔激光照射 5 min, 再继续培养 20 h) 孵育结束后, 用适量 PBS 洗涤细胞 3 次。加入 500  $\mu\text{L}$  结合缓冲液后, 每孔各加入 5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 和 5  $\mu\text{L}$  碘化丙啶轻轻混匀, 室温避光进行孵育, 10 ~ 20 min 后细胞成像微孔板检测系统下观察。

如图 9 所示, 经过 24 h 的孵育之后, TA-Fe NPs 仅有早期凋亡细胞, CAT NPs 组极少量晚期凋亡细胞, GOx NPs、GCTF NPs 和 GCTF NPs + Laser 组的红色区域逐渐增多, 显示晚期凋亡和坏死细胞逐渐增多。该结果与细胞毒性实验结果一致。

与纳米粒结合后质量吸光系数增加<sup>[11]</sup>, 吸光能力变强, 光热效应增强有关。

高温可诱导肿瘤细胞中热休克蛋白表达异常上调, 从而抑制细胞凋亡, 是细胞产生耐热性的重要机制<sup>[12-13]</sup>。三磷酸腺苷 (ATP) 作为生物体中最重要的直接能源, 对细胞生长和蛋白质合成至关重要, 切断能量供应可能抑制热休克蛋白表达。饥饿治疗通过切断肿瘤区的营养和能量供给, 可能降低肿瘤细胞的耐热性。联合应用饥饿治疗和光热治疗, 既能实现双模式联合协同治疗, 同时还能逆转肿瘤细胞的耐热性, 提高治疗效果, 其协同增效的分子机制及体内药效学实验有待进一步深入研究。

## 参考文献

- [1] Yang XY, Luo ZQ, Fang D, et al. Hollow copper sulfide nanocubes loaded with Pt (IV) complexes for cancer multimodal therapy [J]. Langmuir, 2024, 40 (43): 22875-22886.

- [2] 陈宁, 黄权华, 李婷, 等. 用于肿瘤光热治疗的卟啉菁绿纳米粒的构建与评价[J]. 中南药学, 2021, 19(10): 2036-2042.
- [3] 何祥, 荆慧. 基于纳米医学的光热治疗在肿瘤治疗中的研究进展[J]. 中国肿瘤临床, 2022, 49(8): 422-427.
- [4] Shang TY, Yu XY, Han SS, et al. Nanomedicine-based tumor photothermal therapy synergized immunotherapy[J]. Biomater Sci, 2020, 8(19): 5241-5259.
- [5] Li XS, Lovell JF, Yoon J, et al. Clinical development and potential of photothermal and photodynamic therapies for cancer[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2020, 17(11): 657-674.
- [6] Lima-Sousa R, Alves CG, Melo BL, et al. Injectable hydrogels for the delivery of nanomaterials for cancer combinatorial photothermal therapy[J]. Biomater Sci, 2023, 11(18): 6082-6108.
- [7] Liu T, Zhang MK, Liu WL, et al. Metal ion/tannic acid assembly as a versatile photothermal platform in engineering multimodal nanotheranostics for advanced applications[J]. Acs Nano, 2018, 12(4): 3917-3927.
- [8] 胥芷灵, 贾永艳, 祝侠丽, 等. 金属-多酚网络在肿瘤诊疗中的研究进展[J]. 中国肿瘤, 2022, 31(6): 463-472.
- [9] 李健宜, 佟丹丹, 林俊生. 恶性肿瘤饥饿疗法研究现状[J]. 浙江大学学报(医学版), 2022, 51(2): 241-250.
- [10] He T, Xu H, Zhang YF, et al. Glucose oxidase-instructed traceable self-oxygenation/hyperthermia dually enhanced cancer starvation therapy[J]. Theranostics, 2020, 10(4): 1544-1554.
- [11] Chen Q, Shan XR, Shi SQ, et al. Tumor microenvironment-responsive polydopamine-based core/shell nano-platform for synergetic theranostics[J]. J Mater Chem B, 2020, 8(18): 4056-4066.
- [12] Sun R, Wang YQ, Sun Q, et al. Mmp-2 responsive gold nanorods loaded with Hsp-70 siRNA for enhanced photothermal tumor therapy[J]. Mol Pharm, 2024, 21(11): 5455-5468.
- [13] Wang ZH, Li SW, Zhang M, et al. Laser-triggered small interfering RNA releasing gold nanoshells against heat shock protein for sensitized photothermal therapy[J]. Adv Sci (Weinh), 2017, 4(2): 1600327.

(收稿日期: 2024-11-13; 修回日期: 2025-01-15)

## 基于清肺排毒汤煎煮汤剂质量评价的相对密度 95% 预测区间模型研究

郑琼芳<sup>1</sup>, 闫斌<sup>2\*</sup>, 赵伟<sup>1</sup>, 陈树和<sup>2\*</sup> (1. 湖北中医药大学药学院, 武汉 430065; 2. 湖北省中医院/湖北中医药大学附属医院/湖北省中医药研究院, 武汉 430061)

**摘要:** **目的** 建立清肺排毒汤煎煮汤剂相对密度 95% 预测区间的线性回归模型。**方法** 通过 21 种单味中药饮片煎煮的出膏率与相对密度, 建立清肺排毒汤水煎液相对密度 95% 预测区间的线性回归模型, 通过模型预测相对密度的理论区间, 并通过测定 10 批次清肺排毒汤日处方量与 3 批次 7 倍处方量煎煮汤剂的相对密度, 验证实测相对密度是否在模型预测的相对密度区间内。**结果** 以 21 种单味中药饮片煎煮的参数建立清肺排毒汤相对密度 95% 预测区间线性回归模型为  $Y_{\text{QFPDD}} = [(1.0228 - 1) \times 500/V + 1 \sim (1.0344 - 1) \times 500/V + 1]$ , 10 批次每日处方量及 3 批次 7 倍每日处方量的实测相对密度均在模型预测的相对范围内, 表明建立的模型得到验证。**结论** 本研究建立的相对密度 95% 预测区间的线性回归模型可用于清肺排毒汤水煎液相对密度的预测, 为中药复方汤剂尤其是日处方剂量较大的中药复方汤剂的煎煮质量评价与质量控制提供了重要的参考依据。

**关键词:** 清肺排毒汤; 煎煮; 质量评价; 相对密度; 出膏率

**中图分类号:** R932, R283.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)08-2303-05  
**doi:**10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.024

**基金项目:** 湖北省自然科学基金项目 (No.2020CFB438); 国家重点研发计划-中医药现代化研究重点专项 (No.2017YFC1703400); 陈树和全国老药工传承工作室建设项目 (国中医药人教函〔2024〕255 号)。

**作者简介:** 郑琼芳, 女, 硕士研究生, 主要从事中药质量控制与分析, email: zhengqiongfang3030@163.com \*通信作者: 陈树和, 男, 主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事医院中药制剂研发、中药饮片质量控制研究, email: chenshuhe606@163.com; 闫斌, 男, 主管药师, 主要从事医院中药制剂的研发, email: 15271817652@139.com

## The 95% prediction interval model of relative density based on the quality evaluation of Qingfei Paidu decoction

ZHENG Qiong-fang<sup>1</sup>, YAN Bin<sup>2\*</sup>, ZHAO Wei<sup>1</sup>, CHEN Shu-he<sup>2\*</sup> (1. School of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065; 2. Hubei Hospital of Traditional Chinese Medicine/Affiliated Hospital of Hubei University of Chinese Medicine/Hubei Institute of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061)

**Abstract: Objective** To establish a linear regression model to predict the interval of 95% relative density of Qingfei Paidu decoction. **Methods** A linear regression model was established to predict the Qingfei Paidu decoction by the yield rate and relative density of 21 single Chinese medicine pieces. The theoretical interval of relative density was predicted. The relative density of 10 batches of Qingfei Paidu decoction daily prescriptions and 3 batches of decoction with 7 times of daily prescription volume was measured to verify whether the measured relative density fell within the model range. **Results** The linear regression model of 95% prediction interval for the relative density of Qingfei Paidu decoction was established with the parameters of decocting 21 single Chinese medicine pieces:  $Y_{QFPDD} = [(1.0228 - 1) \times 500/V + 1 \sim (1.0344 - 1) \times 500/V + 1]$ . The measured relative density of 10 batches of daily prescriptions and 3 batches of 7 times of daily prescriptions all fell within the relative range predicted by the model, indicating the necessity of model verification. **Conclusion** The linear 95% prediction interval for relative density model can be used to predict the density of Qingfei Paidu decoction in liquid phase, which provides an important reference for the quality evaluation and control of traditional Chinese medicine compound decoction, especially those with large daily prescription dose.

**Key words:** Qingfei Paidu decoction; decoction; quality evaluation; relative density; yielding rate

中药汤剂因具有疗效显著、制备成本低、适用范围广等特点而深受临床医师和患者青睐,随着人们对中医名医、名方、名药的热衷,中医药的医疗服务需求稳步提升,逐步提高中药汤剂的产能,对稳步提升中药饮片的应用具有积极意义。然而,中药汤剂作为一种特殊的药品,却缺乏质量控制的检验标准或规范,国家药品监督管理部门暂未发布其质量控制与检验的相关文件。国务院办公厅要求全面加强对药品监管能力的建设,医疗机构应提高药品检验检测能力。因此,制订中药汤剂质量检测标准对中药汤剂临床应用的安全性、有效性具有积极意义。

清肺排毒汤(QFPDD)为《伤寒杂病论》<sup>[1]</sup>中治疗由寒邪引起的外感病的多个方剂优化组合而成,临床疗效显著,处方中有 21 种中药饮片,其每日处方量的中药饮片使用量近 200 g,接近临床使用的最大推荐剂量 240 g,其煎煮质量可能会受到煎煮时间、火候、加水量等诸多因素的影响<sup>[2-5]</sup>。清肺排毒汤处方药味数量多、使用饮片量大,研究其汤剂煎煮的质量控制具有一定的代表性。因此,建立一种精准、快速、客观的清肺

排毒汤煎煮质量的评价方法,制定其质量检验的标准,对于中药汤剂的临床应用具有重要的参考价值。本研究通过清肺排毒汤的煎煮质量控制的方法与指标的选择,建立其相对密度 95% 预测区间线性回归模型,为制定中药汤剂的质量检验标准或规范提供试验依据。

### 1 材料

#### 1.1 试药

20 种中药饮片均购自河北仁心药业有限公司,每种中药饮片 10 个批次,饮片质量均符合 2020 年版《中国药典》<sup>[6]</sup>标准,3 个批次生姜药材购自农贸市场(用时切厚片),所有批次中药饮片经湖北省中医院陈树和主任药师鉴定为正品。

#### 1.2 仪器

AU-120L 型高精度密度测定仪( $d = 0.001 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 杭州金迈仪器有限公司); DHG-9146A 型鼓风干燥箱(上海习仁科学仪器有限公司); ME204E 型万分之一电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司); ZNHW 智能恒温电热套(1 L、5 L)(天津工兴实验室仪器有限公司)。

### 2 方法与结果



**2.1 测定单味中药煎煮的吸水率、得液量、相对密度、出膏率**

**2.1.1 测定单味中药饮片煎煮的一煎吸水率、二煎吸水率** 选取清肺排毒汤处方中 21 种中药饮片进行煎煮试验, 每种饮片称取 50 g 置于 1000 mL 圆底烧瓶中, 置于智能恒温电热套中进行回流煎煮, 一煎加水量为饮片重量的 7 倍, 二煎加水量为饮片重量的 6 倍, 浸泡 30 min 后, 除生石膏先煎 30 min, 其他中药饮片一煎 30 min, 二煎 20 min; 生姜煎煮前切厚片, 苦杏仁捣碎后煎煮; 滤过后测定滤液体积, 分别计算一煎吸水率和二煎吸水率, 吸水率计算见公式 1<sup>[7-9]</sup>:

$$\text{煎煮吸水率}(\%) = (\text{加水量} - \text{滤液体积}) / \text{饮片重量} \times 100\% \quad (1)$$

**2.1.2 测定单味中药饮片煎煮的得液量、相对密度、出膏率** 以“2.1.1”项下测得的单味中药饮片的煎煮吸水率数据为基础, 再次进行煎煮试验, 将煎煮的药液用于测定得液量、相对密度、出膏率等参数。

以中药汤剂每日服用剂量 500 mL (分两次服用, 每次 250 mL) 进行计算, 要求一煎得液量和二煎得液量均为 250 mL, 饮片加水量见公式 2, 合并两次煎煮的药液, 在  $(80 \pm 1)^\circ\text{C}$  测定得液量和用高精度密度测定仪测定相对密度, 并在  $(80 \pm 1)^\circ\text{C}$  精密量取药液 25 mL, 置已干燥至恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干后, 于烘箱中  $105^\circ\text{C}$  再干燥 3 h, 随后移至干燥器中, 室温放置 30 min 后迅速精密称定, 以饮片重量计算出膏率, 饮片出膏率计算见公式 3, 饮片出膏计算见公式 4<sup>[7-9]</sup>。

$$\text{一煎(或二煎)加水量}(\text{mL}) = \text{一煎(或二煎)吸水率} \times \text{饮片重量} + 250 \text{ mL} \quad (2)$$

$$\text{出膏率}(\%) = \text{干膏重} / \text{饮片重量} \times 100\% \quad (3)$$

$$\text{出膏量} = \text{干膏重} \times 50 / \text{单味饮片取样量} \quad (4)$$

**2.1.3 校正相对密度** 得液量的理论值为 500 mL, 实际测定的得液量并非均为 500 mL, 因此, 为了减少得液量的差异对测定相对密度的影响, 需将得液量统一校正为 500 mL, 将测定的相对密度按照公式转化为校正的相对密度, 校正相对密度的计算见公式 5<sup>[7-9]</sup>, 公式中得液量、相对密度为实际测得值, “500”为校正的得液量为 500 mL, “1”为在  $(80 \pm 1)^\circ\text{C}$  密度仪测定水的相对密度为 1 (校正值)。

$$\text{校正的相对密度} = [\text{得液量} \times \text{相对密度} - (\text{得液量} - 500) \times 1] / 500 \quad (5)$$

21 种中药饮片煎煮测定的一煎吸水率、二煎

吸水率、出膏量结果见图 1 ~ 3, 其中校正的相对密度由测定的相对密度按照公式 5 进行校正得出, 具体品种以出膏率由小到大进行排序。21 种中药饮片吸水率 (一煎和二煎) 的测定结果与戴丽莉等<sup>[10]</sup>研究结论基本一致, 具有可重复性和参考价值, 可作为基础数据应用于后期智能煎药机信息平台的研发。

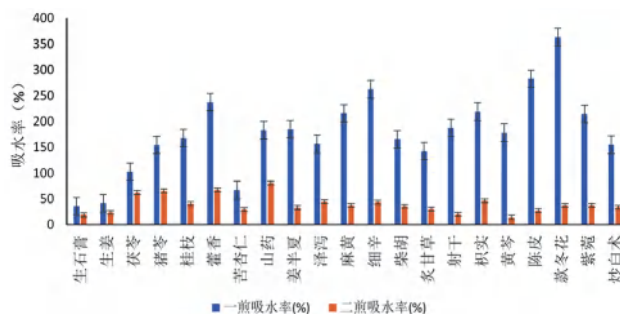


图 1 21 种中药一煎、二煎吸水率结果 ( $n = 10$ )

Fig 1 Water absorption rate of 21 traditional Chinese medicine decoctions ( $n = 10$ )

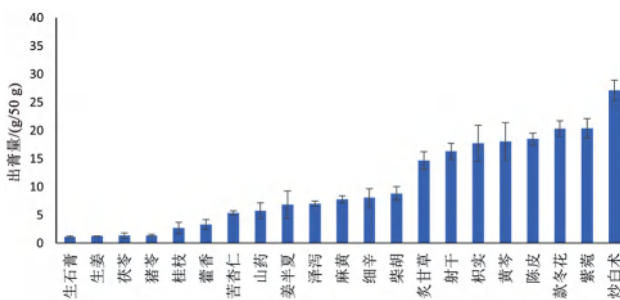


图 2 21 种中药出膏量结果 ( $n = 10$ )

Fig 2 Paste-forming yield of 21 traditional Chinese medicine decoctions ( $n = 10$ )

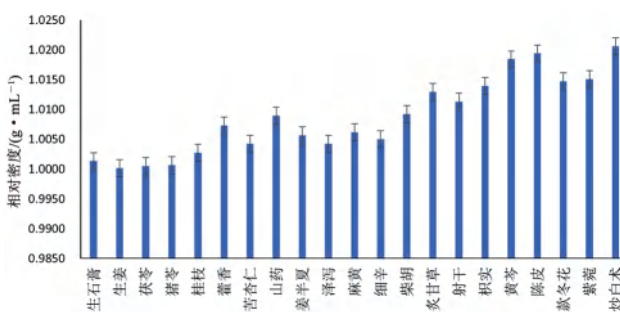


图 3 21 种中药相对密度结果图 ( $n = 10$ )

Fig 3 Relative density of 21 traditional Chinese medicine decoctions ( $n = 10$ )

**2.2 建立相对密度预测区间的数学模型**

**2.2.1 建立单味中药煎煮校正的相对密度对出膏率的直线回归方程** 按最小二乘法求得校正的相对密度 ( $Y$ ) 对平均出膏量 ( $\%$ ,  $X$ ) 的直线回归方程为  $Y = 7.83 \times 10^{-4}X + 1.0007$  (方程 1), 相关系数 ( $r$ ) 为 0.9447, 线性范围为 1.09% ~ 27.07%。

**2.2.2 直线回归方程的假设检验** 为了检验方程 1 是

否对总体的直线回归方程存在回归系数 $\beta \neq 0$ 的可能,需要对直线回归方程进行假设检验,采用 SPSS 20 软件 (IBM SPSS statistics 20) 对校正的相对密度进行方差分析,得到  $F = 156.524$ ,查临界值表  $F_{0.05/1, 19} = 4.38$ ,得  $P < 0.01$ ,按  $\alpha = 0.05$  水准,接受回归系数  $\beta \neq 0$ ,认为校正的相对密度与出膏率之间有直线关系,线性关系显著,总体直线回归方程成立。

**2.2.3 清肺排毒汤水煎液线性回归模型的 95% 预测区间的建立** 结合 21 种单味中药饮片煎煮相对密度对出膏率的线性回归方程,推测该方程也适用于清肺排毒汤水煎液中相对密度对出膏率的回归关系,即清肺排毒汤相对密度见式 6,  $Y_{\text{QFPDD}}$  为清肺排毒汤的相对密度,  $X_{\text{QFPDD}}$  为复方煎煮后的出膏量,即清肺排毒汤中每种饮片的出膏重量之和,计算方程见式 7,方程中  $X_1, X_2, X_3 \cdots X_n$  代表不同中药的出膏率,  $W_1, W_2, W_3 \cdots W_n$  代表不同饮片的取样量。依据式 2、式 3 从而进一步求得  $Y_{\text{QFPDD}}$  的计算方程见式 8,式 4 计算得到的  $Y_{\text{QFPDD}}$  为煎煮体积为 500 mL 时,预测清肺排毒汤煎煮相对密度理论值,为了达到对给定的复方煎煮相对密度预测的目的,需要对  $Y_{\text{QFPDD}}$  进行预测区间,复方汤剂相对密度的预测区间的方法参照文献<sup>[10-11]</sup>“线性回归模型的置信区间与预测区间”,推导出复方汤剂相对密度预测区间的方程见式 9,在本试验中,  $Y_0 = Y_{\text{QFPDD}}$ ,  $n = 21$ ,当  $\alpha = 0.05$ ,  $\nu = 19$ ,查  $t$  界值表见式 10,对于清肺排毒汤,其相对密度 95% 的预测区间  $Y_{\text{QFPDD}}$  预测为:  $Y_{\text{QFPDD}} = (7.83 \times 10^{-4} X_{\text{QFPDD}} + 1.00073) \pm 2.093 \times 2.195 \times 10^{-3} \times 1.2541$ ,当  $X_{\text{QFPDD}}$  为 35.6022 时,清肺排毒汤水煎液的每剂得液量为 500 mL 时,  $Y_{\text{QFPDD}}$  预测 =  $1.0286 \pm 0.0058$  (95% 置信区间预测相对密度区间 1),每剂处方量煎煮汤剂的得液量为 500 mL,测定相对密度测定温度为  $(80 \pm 1)^\circ\text{C}$  时,其相对密度 95% 预测区间为  $1.0286 \pm 0.0058$  (预测区间 2),即  $1.0228 \sim 1.0344$ ;当得液量为其他体积  $V$  (mL) 时,校正的相对密度见式 11;则校正的线性回归模型的 95% 预测区间见预测区间 2。

$$Y_{\text{QFPDD}} = 7.83 \times 10^{-4} X_{\text{QFPDD}} + 1.00073 \quad (\text{式 } 6)$$

$$Y_{\text{QFPDD}} = X_1 W_1 + X_2 W_2 + X_3 W_3 + \cdots + X_n W_n \quad (\text{式 } 7)$$

$$Y_{\text{QFPDD}} = 7.83 \times 10^{-4} \times (X_1 W_1 + X_2 W_2 + X_3 W_3 + \cdots + X_n W_n) + 1.00073 \quad (\text{式 } 8)$$

$$Y_{\text{QFPDD}} = Y_0 \pm t_{\alpha/2, \nu} S_{Y_0} \quad (\text{式 } 9)$$

$$t_{0.05/2, 19} = 2.093, S_{Y_0} = \frac{\sqrt{S_{\text{残}}/(n-2)}}{\sqrt{1+1/n+(X-\bar{X})^2/\sum_{i=1}^n (X_i-\bar{X})^2}} \times 35.602, \sqrt{S_{\text{残}}/(n-2)} = 0.002195 \quad (\text{式 } 10)$$

$$Y_{\text{QFPDD}} = (\text{实测值} - 1) \times 500/V + 1 \quad (\text{式 } 11)$$

$$Y_{\text{QFPDD}} = [(1.0228 - 1) \times 500/V + 1 \sim (1.0344 - 1) \times 500/V + 1] \quad (\text{预测区间 } 2)$$

**2.3 预测区间 2 的理论值与实测值的验证**

**2.3.1 清肺排毒汤的煎煮** 依据 21 种中药饮片的平均一煎吸水率、平均二煎吸水率的数据及每种中药饮片的处方用量,计算清肺排毒汤一倍处方量的吸水量为 327 mL,二煎吸水量为 79 mL。分别称取清肺排毒汤处方中 1 倍处方量的饮片,共 10 份,随机编号为 S1 ~ S10。依据 S1 ~ S3 处方饮片的组成进行中试放大 7 倍,另称取 7 倍处方量的中药饮片,同法进行煎煮,煎煮水煎液的编号依次为 7S1、7S2、7S3,中药饮片批次依次分别同 S1、S2、S3。

取上述饮片,分别进行煎煮,其中 S1 ~ S10 的一煎加水量为 700 mL,二煎加水量为 600 mL,按“2.1.1”项下方法进行煎煮,合并煎煮液定容至 600 mL;编号依次为 7S1、7S2、7S3 的一煎加水量分别为 4500、4200、4000 mL,二煎加水量为 3500、3200、3000 mL。

表 1 以日处方量的水煎液 600 mL 的相对密度的实测值与理论值  
Tab 1 Measured and theoretical values of the relative density of 600 mL of aqueous decoction of daily prescribed amount

| 编号  | 得液量/mL | 实测值<br>[(80±1)℃] | 理论值区间         | 结论   |
|-----|--------|------------------|---------------|------|
| S1  | 600    | 1.021            | 1.019 ~ 1.028 | 符合规定 |
| S2  | 600    | 1.025            | 1.019 ~ 1.028 | 符合规定 |
| S3  | 600    | 1.026            | 1.019 ~ 1.028 | 符合规定 |
| S4  | 600    | 1.028            | 1.019 ~ 1.028 | 符合规定 |
| S5  | 600    | 1.028            | 1.019 ~ 1.028 | 符合规定 |
| S6  | 600    | 1.026            | 1.019 ~ 1.028 | 符合规定 |
| S7  | 600    | 1.026            | 1.019 ~ 1.028 | 符合规定 |
| S8  | 600    | 1.028            | 1.019 ~ 1.028 | 符合规定 |
| S9  | 600    | 1.028            | 1.019 ~ 1.028 | 符合规定 |
| S10 | 600    | 1.025            | 1.019 ~ 1.028 | 符合规定 |

表 2 以 7 倍处方量的水煎液 600 mL 的相对密度的实测值与理论值  
Tab 2 Measured and theoretical values of the relative density of the relative density of 600 mL of aqueous decoction of 7 times the prescribed quantity

| 编号  | 得液量/mL | 实测值<br>[(80±1)℃] | 校正值   | 理论值区间         | 结论   |
|-----|--------|------------------|-------|---------------|------|
| 7S1 | 4550   | 1.021            | 1.022 | 1.019 ~ 1.028 | 符合规定 |
| 7S2 | 3850   | 1.022            | 1.020 | 1.019 ~ 1.028 | 符合规定 |
| 7S3 | 3460   | 1.030            | 1.025 | 1.019 ~ 1.028 | 符合规定 |

验证结果表明,10 批次每日处方量及 3 批次 7 倍每日处方量的实测相对密度,均在相对密度 95% 预测区间线性回归模型预测的范围之内,模型预测的相对密度得到验证。

**3 讨论**

本研究中在进行得液量的测定、相对密度的测定、出膏率的测定时,药液取样的温度均为 $(80\pm 1)^{\circ}\text{C}$ ,主要与以下两个因素有关:① $(80\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 与后期研发的智能煎药机在线检测相对密度的温度比较接近,在此温度下测定相对密度的结果及推导预测相对密度的数学模型比较符合后期的实际应用条件;②假设按照 2015 年版《中国药典》<sup>[12]</sup> 四部(相对密度测定法 0601)的方法在 $20^{\circ}\text{C}$ 测定相对密度,再换算至实际测定温度下的相对密度,可能会由于煎煮汤剂中所含的油脂类成分或其他因素影响相对密度测定,导致进一步扩大测定结果的误差,因此选择测定温度为 $(80\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 比较符合实际测定相对密度的条件。

在 $Y = 7.83 \times 10^{-4}X + 1.0007$ (方程 1),回归系数 $b = 7.83 \times 10^{-4}$ ,截距 $a = 1.0007$ ,相关系数 $r = 0.9447$ ,决定系数 $R^2 = 0.8924$ ,表明出膏量中可解释校正的相对密度变异性的 89.24%,另外 10.76%的变异不能用出膏量来解释,可能与以下两个因素有关:①本试验中相对密度测定的方法为“国家标准 GB-T 4472—2011 化工产品密度、相对密度的测定标准”<sup>[13]</sup>中的静水力学称量法,采用的原理为阿基米德原理浮力法,由于本研究中的部分中药饮片含油脂类成分,油脂类成分会影响相对密度的测定,导致测定相对密度的结果偏小;②药液在水浴蒸干和在 $105^{\circ}\text{C}$ 烘干过程中,部分挥发性成分的丢失,导致出膏率的结果偏小。

在 7S1、7S2、7S3 的煎煮过程中,考察了不同加水量对相对密度的影响,主要是由于依据 21 种单味中药饮片煎煮的吸水率数据,加的水不能全部没过饮片,因此加大了饮片的煎煮所用的水量。

本研究建立的相对密度 95% 预测区间的线性回归模型可用于清肺排毒汤水煎液相对密度的预

测,为中药复方汤剂尤其是日处方剂量较大的中药复方汤剂的煎煮质量评价与质量控制提供了重要的参考依据。

## 参考文献

- [1] 樊锐敏. 中药煎煮方法在《伤寒论》中的体现[J]. 中医研究, 2018, 31(9): 6-8.
- [2] 陈士林, 刘安, 李琦, 等. 中药饮片标准汤剂研究策略[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(8): 1367.
- [3] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB-T15038—2006. 葡萄酒果酒通用分析方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [4] 刘瑞新, 施钧瀚, 张璐, 等. 中药汤剂改革和中药配方颗粒研究的新思路[J]. 中医学报, 2014, 29(189): 239-241.
- [5] 陈树和, 闫斌, 陈洪燕, 等. 中药复方汤剂煎煮质量评价数学模型研究[J]. 医药导报, 2020, 39(7): 943-948.
- [6] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020.
- [7] 闫斌, 陈洪燕, 孙婉瑾, 等. 基于果实种子类中药煎煮质量评价的数学模型研究[J]. 医药导报, 2020, 39(7): 959-964.
- [8] 朱田密, 陈树和, 闫斌, 等. 25 种动物和矿物类中药饮片水煎液密度与出膏率相关性研究[J]. 医药导报, 2020, 39(7): 970-974.
- [9] 周从辉, 陈洪燕, 朱田密, 等. 根及根茎类中药汤剂相对密度监测在中药煎煮质量评价中的应用[J]. 医药导报, 2020, 39(7): 965-969.
- [10] 戴丽莉. 煎药机制备中药汤剂加液量数学模型及工艺参数优化的研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2016.
- [11] 张林泉. 线性回归模型的置信区间与预测区间应用分析[J]. 吉林大学学报(自然科学版), 2013, 34(6): 15-18.
- [12] 中国药典 2015 年版. 四部[S]. 2015: 79-81.
- [13] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB-T 4472—2011. 化工产品密度、相对密度的测定标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.

(收稿日期: 2024-10-11; 修回日期: 2024-12-11)



## 2 株实验鼠源金黄色葡萄球菌的耐药性与致病性特征分析

夏志强, 徐子易, 张泽辉, 梁喜才, 吴运谱\*, 王春田\* (辽宁中医药大学, 沈阳 110847)

**摘要:** **目的** 探究实验动物源金黄色葡萄球菌的耐药性和致病性特征。**方法** 对屏障环境下大鼠和小鼠的肠段内容物进行细菌分离, 通过革兰氏染色、细菌 *16S rDNA* 基因分析等方法对病原菌进行鉴定, 通过药敏实验、毒力基因检测、溶血活力检测和致病力检测对分离得到的 2 株金黄色葡萄球菌进行生物学特性分析。**结果** 分离鉴定得到大鼠源和小鼠源金黄色葡萄球菌各 1 株, 分别命名为 SR9 和 SM4; 药敏实验表明, 菌株 SR9 对  $\beta$ -内酰胺类和四环素类抗菌药物具有一定的耐药性, 菌株 SM4 对大环内酯类、林可胺类、酰胺醇类抗菌药物具有耐药性; 毒力基因检测显示, 在菌株 SR9 中检测出 8 个毒力基因, 在菌株 SM4 中检测出 12 个毒力基因, 菌株 SM4 携带更多的毒力基因; 小鼠致病性实验表明, 菌株 SR9 对小鼠具有更高的致病力, 菌株 SM4 的致病力与标准株 ATCC29213 接近。**结论** 本研究对从 SPF 级 SD 大鼠和昆明系小鼠肠道内容物中分离出的 2 株金黄色葡萄球菌进行了鉴定, 并对其进行了耐药性与致病性特征分析, 可为实验动物病原菌的防控和实验动物的质量控制提供参考。

**关键词:** 金黄色葡萄球菌; 耐药性; 毒力基因; 毒力

中图分类号: R378.1, R446.5 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)08-2308-07  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.025

### Drug resistance and pathogenicity of two strains of experimental murine *Staphylococcus aureus*

XIA Zhi-qiang, XU Zi-yi, ZHANG Ze-hui, LIANG Xi-cai, WU Yun-pu\*, WANG Chun-tian\* (Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847)

**Abstract: Objective** To determine the antibiotic resistance and pathogenicity of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) derived from experimental animals. **Methods** The intestinal contents of rats and mice in barrier environment were isolated by bacteria, and the pathogens were identified by gram staining and bacterial *16S rDNA* gene analysis. The biological characteristics of the two strains of *S. aureus* were analyzed by drug susceptibility test, virulence gene detection, hemolytic activity detection and pathogenicity detection. **Results** One strain of *S. aureus* from rats and one strain from mice were isolated and identified, named SR9 and SM4. The drug sensitivity test indicated that strain SR9 had certain resistance against  $\beta$ -lactam and tetracycline antibiotics, while strain SM4 was resistant to macrolide, lincosamide and amphenicol antibiotics. Virulence gene detection showed that 8 virulence genes were detected in strain SR9, while 12 virulence genes were detected in strain SM4 with higher virulence. The pathogenicity of strain SR9 was higher in mice, and that of strain SM4 was close to that of standard strain ATCC29213. **Conclusion** Two strains of *S. aureus* isolated from the intestinal contents of SPF-grade SD rats and Kunming mice are identified, and the drug resistance and pathogenicity of the two strains are analyzed, providing a reference for the prevention and control of pathogenic bacteria in experimental animals and their quality control.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*; drug resistance; virulence gene; virulence

**基金项目:** 辽宁中医药大学高层次人才引进科研启动基金 (No.2020LZY001); 辽宁省科技计划项目 - 民生科技计划 (No.2021JH2/10300032); 辽宁省教育厅基本科研项目 (No.JYTMS20231836)。

**作者简介:** 夏志强, 男, 硕士, 主要从事实验动物学研究, email: xia414540@163.com \*通信作者: 吴运谱, 男, 副教授, 主要从事实验动物的微生物与寄生虫研究, email: davie2001878@163.com; 王春田, 男, 教授, 主要从事实验动物学研究, email: 13998825918@163.com

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, SA) 是一种广泛存在于环境中的革兰氏阳性条件性致病菌, 可导致人和动物的多种疾病, 如组织感染、肺炎和败血症等<sup>[1-2]</sup>。SA 感染宿主的难易取决于其能否有效地逃避宿主的防御。SA 通过产生溶血毒素、肠毒素、透明质酸酶、血浆凝固酶和免疫逃逸相关蛋白等多种毒力因子, 在感染的不同阶段破坏宿主免疫机制, 协助自身逃避免疫防御和侵入宿主细胞, 形成强致病性<sup>[3-4]</sup>。随着抗菌药物的大量使用, 细菌耐药问题变得日渐严重, 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 等耐药菌株相继出现, 对临床和食品安全造成极大困扰。由 SA 诱发的感染已成为世界范围内最常见的细菌病因之一, 患病动物可出现化脓性感染和菌血症, 重症者甚至死亡<sup>[5-6]</sup>。除家畜、野生动物外, 实验动物也是 SA 的主要易感动物之一, 在小鼠、大鼠、豚鼠、家兔等实验动物的体表、呼吸道、消化道等部位及屏障环境中也能检测到 SA<sup>[5]</sup>。SA 是威胁动物实验操作者和公共卫生安全的一个风险因素<sup>[7]</sup>。

根据国家标准 GB 14922—2022《实验动物微生物、寄生虫学等级及监测》要求, SA 被列为 SPF 级小鼠、大鼠、地鼠和家兔等实验动物必要时检测和排除的病原菌<sup>[8]</sup>。在实验动物免疫力低下、受到应激等情况下, SA 可导致睾丸炎、乳腺炎、肺炎等疾病, 降低实验动物的繁殖性能, 影响动物实验结果的可靠性和准确性<sup>[9-10]</sup>。更为严重的是, 作为人畜共患病, 屏障环境中 SA 的流行会导致实验动物从业人员发生职业暴露, 并存在传播扩散隐患, 从而危害公共卫生安全。

本研究拟分析从辽宁中医药大学实验动物中心小鼠、大鼠肠道内容物中检测分离出的 2 株 SA 的耐药性和致病性等生物学性状, 以期为 SA 在实验动物中的流行情况提供可靠的数据支持, 并为实验动物行业防治 SA 感染提供一定的理论依据。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

随机抽取 40 只昆明系小鼠 (SPF 级) 和 40 只 SD 大鼠 (SPF 级), 均饲养于辽宁中医药大学实验动物中心, 每只鼠采样频率为 1 次, 盲肠肠段样本重复 3 次。实验动物饲养期间自由饮水, 饲喂维持性饲料。小鼠和大鼠所处饲养环境湿度相对恒定, 温度控制在 22 ~ 25 °C, 所有操作均按照辽宁中医药大学实验动物伦理审查委员会管

理规范进行, 伦理号: 21000062024095。本研究在辽宁中医药大学实验动物中心进行。

### 1.2 实验菌株

SA 标准株 ATCC29213 由辽宁中医药大学实验动物学实验室保存并提供; 用于菌株分离的样品为实验鼠 (昆明系小鼠、SD 大鼠) 的肠道内容物。

### 1.3 试剂与仪器

依据参考文献<sup>[11-12]</sup>设计并合成 SA 毒力基因扩增引物 (见表 1), 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司代为合成。甘露醇氯化钠培养基、TSA 培养基和 LB 肉汤培养基 (北京索莱宝科技有限公司), 细菌基因组提取试剂盒、琼脂糖 (上海生工生物工程股份有限公司), 核酸染料 (北京兰杰柯科技有限公司), 无菌脱纤维绵羊血 (济南百博生物技术股份有限公司), PCR 仪 (上海伯乐生命医学产品有限公司), 酶标仪 (上海闪谱生物科技有限公司), 恒温培养振荡器 (天津欧诺仪器股份有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 菌株的分离培养与鉴定

**2.1.1 菌株分离培养及形态学观察** 采用无菌接种环蘸取实验鼠盲肠内容物<sup>[13]</sup>, 溶解于 1 mL pH 7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 中, 倍比稀释后涂布于甘露醇氯化钠固体培养基上, 置于 37 °C 培养箱中培养 24 h 后, 挑取疑似单菌落接种于 TSA 固体培养基上纯化, 37 °C 培养 24 h, 随后挑取单个菌落接种于 LB 肉汤培养基中 37 °C 培养 24 h, 再将浑浊的菌悬液划线接种于甘露醇氯化钠固体培养基上, 挑取单菌落进行革兰氏染色, 将革兰氏染色阳性菌株编号、冻存备用。

经分离培养和革兰氏染色, 镜下分离株细菌呈球状, 染色脱色后为紫色, 证明分离获得的细菌为革兰氏阳性球菌 (以小鼠源菌株为例, 见图 1)。通过革兰氏染色方法共确定革兰氏阳性球菌 21 株, 其中从大鼠体内分离获得 10 株革兰氏阳性球菌, 编号为 SR1 ~ SR10; 在小鼠体内获得 11 株革兰氏阳性球菌, 编号为 SM1 ~ SM11。

**2.1.2 菌株 PCR 鉴定及系统进化树分析** 将“2.1.1”项下革兰氏染色阳性菌株微量接种于 3 mL LB 肉汤培养基中, 以 180 r·min<sup>-1</sup> 振荡培养 18 h。将所获菌悬液 5000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 收集菌体沉淀。使用溶菌酶裂解菌体, 使用细菌基因组提取试剂盒提取细菌基因组 DNA, 以之为模板进行 16S rDNA 基因 PCR 扩增 (引物序列见表 1), 取 5 μL 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳 (电泳条件为恒

表 1 毒力基因引物信息

Tab 1 Primer information for virulence genes

| 基因          | 引物序列 (5' → 3')                | 退火温<br>度 /℃ | 产物长<br>度 /bp |
|-------------|-------------------------------|-------------|--------------|
| <i>16S</i>  | F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG       | 60          | 1465         |
| <i>rDNA</i> | R: GGTTACCTTGTTACGACTT        |             |              |
| <i>nuc</i>  | F: GCGATTGATGGTGATACGGTT      | 55          | 279          |
|             | R: AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC   |             |              |
| <i>hla</i>  | F: TGCCGCAGATTCTGATATTAA      | 58          | 845          |
|             | R: TTTCTGAAGAACGATCTGTCCA     |             |              |
| <i>hly</i>  | F: GCGGTTGTGGATTTCGATAAT      | 52          | 524          |
|             | R: GGCTTTGATTGGGTAATGATC      |             |              |
| <i>hld</i>  | F: GGGATGGCTTAATAACTCATACTT   | 52          | 236          |
|             | R: CAGAGATGTGATGGAAAATAGTTGA  |             |              |
| <i>fmbA</i> | F: CAGTAGAAGAAAATGGGAATTCAG   | 60          | 151          |
|             | R: TGCTGGTTGTGCAGTTTGTG       |             |              |
| <i>fmbB</i> | F: GTAACAGCTAATGGTCAATTGATACT | 53          | 524          |
|             | R: CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTC  |             |              |
| <i>clfA</i> | F: CAAAATCCAGCACAAACAGGA      | 55          | 229          |
|             | R: TGAAACATTTTCCGCATTTG       |             |              |
| <i>clfB</i> | F: CACTTACTTTACCGCTACTTTC     | 53          | 945          |
|             | R: AACGAGCAATACCACTACAACAG    |             |              |
| <i>sea</i>  | F: GCCCTAACGTGGACAACAAGT      | 58          | 344          |
|             | R: TTGTTTGGTGTAACACCCGC       |             |              |
| <i>seb</i>  | F: TGCAGGCATCATGTCATACCA      | 55          | 300          |
|             | R: TCGCATCAAACGACAAACGAA      |             |              |
| <i>pvl</i>  | F: GTCGTTAGGAATAATCACTCC      | 52          | 491          |
|             | R: CCTGTTGATGGACCACTATTAA     |             |              |
| <i>icaA</i> | F: CTTGCTGGCGCAGTCAATAC       | 56          | 178          |
|             | R: CCAACATCCAACACATGGCA       |             |              |
| <i>icaC</i> | F: CTTGGGTATTGACGCACTT        | 55          | 209          |
|             | R: GCAATATCATGCCGACACCT       |             |              |
| <i>icaD</i> | F: CGCTATATCGTGTGTCTTTTGGA    | 55          | 164          |
|             | R: TCGCGAAAATGCCCATAGTT       |             |              |
| <i>coa</i>  | F: ATAGAGATGCTGGTACAGG        | 58          | 676          |
|             | R: GCTTCCGATTGTTTCGATGC       |             |              |

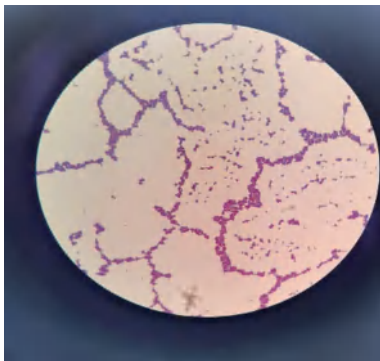


图 1 小鼠源球菌的革兰氏染色显微镜观察结果

Fig 1 Microscopic observation of gram staining of *Staphylococcus* from mice

压 90 V、时间 60 min)，部分基因序列电泳结果见图 2。将目的片段大小约为 1600 bp 的 PCR 产物送

往生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序。

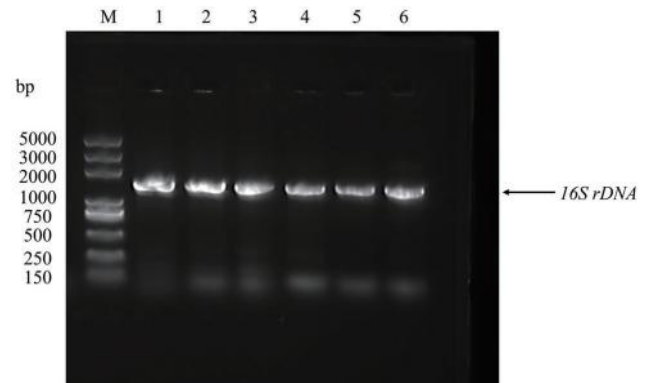


图 2 小鼠源革兰氏阳性球菌部分菌株 *16S rDNA* 序列的 PCR 扩增结果  
Fig 2 PCR of *16S rDNA* sequence of some strains of gram-positive micrococcus from mice

注 (Note): M.5000 bp DNA Marker; 1 ~ 6. 部分菌株 *16S rDNA* 序列 (partial *16S rDNA* sequences of some strains)。

将所获 *16S rDNA* 基因的测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST (Basic local alignment search tool, 基本局部比对搜索工具) 比对, 判断每株菌的种属; 应用 MEGA 7.0 软件以 NJ (Neighbor-Joining, 邻接法) 法构建菌株的 *16S rDNA* 基因系统进化树, 并使用 iTOL (<http://itol.embl.de/>) 在线软件对进化树进行可视化。菌种鉴定结果表明, 在小鼠体内分离的菌株全部归属于葡萄球菌属, 包含 1 株 SA (编号为 SM4); 在大鼠体内分离的革兰氏阳性球菌包括肠球菌属和葡萄球菌属的细菌, 包含 1 株 SA (编号为 SR9)。菌种鉴定结果见表 2, 进化树见图 3。

## 2.2 鼠源 SA 耐药性分析

根据抗微生物药物敏感性实验执行标准 (CLSI) [14] 的要求, 采用肉汤微量稀释法测定 15 种抗菌药物对标准株 ATCC29213、2 个 SA 分离株的最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 值, 以评估分离株的耐药性。15 种药物分别用 MH (B) 培养基, 倍比稀释为 0.125 ~ 64  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  10 个浓度, 加入微孔板的前 10 列, 其中第 11 列为阴性对照 MH (B) 培养基、第 12 列为阳性对照 ATCC29213 稀释菌液; 向各个孔加入待测菌液 100  $\mu\text{L}$ , 混匀, 加盖。37℃ 静置培养 24 h 后, 观察微孔板中细菌是否产生沉淀, 以完全抑制细菌生长的最小药物浓度作为抗菌药物的 MIC。

在完成药敏实验的 24 h 后读值, 并将 15 种抗菌药物对 SA 的 MIC 值绘制成热图, 进一步比较来自小鼠的菌株 SM4 和来自大鼠的菌株 SR9 耐药性的异同。研究发现, 小鼠源菌株 SM4 对大环内酯类、林可胺类、酰胺醇类抗菌药物具有耐药性; 大鼠源菌株 SR9 对  $\beta$ -内酰胺类和四环



表 2 21 株革兰氏阳性球菌的种属鉴定结果  
Tab 2 Species identification of 21 gram-positive cocci

| 序号 | 菌株名  | 种属                                  | 中文名     |
|----|------|-------------------------------------|---------|
| 1  | SR1  | <i>Enterococcus faecium</i>         | 屎肠球菌    |
| 2  | SR2  | <i>Enterococcus faecium</i>         | 屎肠球菌    |
| 3  | SR3  | <i>Enterococcus faecium</i>         | 屎肠球菌    |
| 4  | SR4  | <i>Enterococcus faecalis</i>        | 粪肠球菌    |
| 5  | SR5  | <i>Enterococcus faecalis</i>        | 粪肠球菌    |
| 6  | SR6  | <i>Staphylococcus sciuri</i>        | 松鼠葡萄球菌  |
| 7  | SR7  | <i>Staphylococcus lentus</i>        | 缓慢葡萄球菌  |
| 8  | SR8  | <i>Enterococcus hirae</i>           | 海氏肠球菌   |
| 9  | SR9  | <i>Staphylococcus aureus</i>        | 金黄色葡萄球菌 |
| 10 | SR10 | <i>Enterococcus faecium</i>         | 屎肠球菌    |
| 11 | SM1  | <i>Staphylococcus carnosus</i>      | 肉葡萄球菌   |
| 12 | SM2  | <i>Staphylococcus lentus</i>        | 缓慢葡萄球菌  |
| 13 | SM3  | <i>Staphylococcus carnosus</i>      | 肉葡萄球菌   |
| 14 | SM4  | <i>Staphylococcus aureus</i>        | 金黄色葡萄球菌 |
| 15 | SM5  | <i>Staphylococcus nepalensis</i>    | 尼泊尔葡萄球菌 |
| 16 | SM6  | <i>Staphylococcus lentus</i>        | 缓慢葡萄球菌  |
| 17 | SM7  | <i>Staphylococcus lentus</i>        | 缓慢葡萄球菌  |
| 18 | SM8  | <i>Staphylococcus lentus</i>        | 缓慢葡萄球菌  |
| 19 | SM9  | <i>Staphylococcus xylosus</i>       | 木葡萄球菌   |
| 20 | SM10 | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | 腐生葡萄球菌  |
| 21 | SM11 | <i>Staphylococcus lentus</i>        | 缓慢葡萄球菌  |

素类抗菌药物具有一定的耐药性（见图 4）。说明 2 株 SA 均具有一定程度的耐药性，且不同来源的 SA 可能具有不同的耐药性。

2.3 鼠源 SA 毒力基因筛查

对分离株携带毒力基因如耐热核酸酶基因（*nuclease*, *nuc*）、溶血素基因（*hemolysins*, *hla*、*hly*、*hld*）、纤连结合蛋白基因（*fibronectin-binding protein*, *fmbA*、*fmbB*）、凝集因子基因（*clumping factor A/B*, *clfA*、*clfB*）、肠毒素基因（*enterotoxins*, *sea*、*seb*）、杀白细胞素基因（*Panton-Valentine leukocidin*, *pvl*）、细胞间黏附素基因（*polysaccharide intercellular adhesin*, *icaA*、*icaC*、*icaD*）、凝固酶基因（*coagulase*, *coa*）进行 PCR 检测，产物经电泳后进行凝胶成像。

结果表明，在菌株 SR9 中检测出 8 个毒力基因，在菌株 SM4 中检测出 12 个毒力基因，菌株 SM4 携带更多的毒力基因（见表 3）。2 株 SA 毒力基因携带情况存在差异，尽管两种分离株均携带 *nuc* 基因、溶血素基因（*hla*、*hly*、*hld*）和凝集因子基因（*clfA*、*clfB*），但小鼠源菌株 SM4 还携带细胞间黏附素基因（*icaA*、*icaC*、*icaD*）及凝固酶基因（*coa*）和一种肠毒素基因 *sea*，大鼠源菌株 SR9 则携带基因 *fmbB*，而 SM4、SR9 和 ATCC29213 均未检测到基因 *pvl* 和 *seb* 的表达。

2.4 小鼠感染实验

取“2.1.2”项下确认的 2 个 SA 分离株，使用  $5 \times 10^8$  CFU · mL<sup>-1</sup> 的菌悬液，对小鼠展开腹腔感染实验。将满足实验要求的 24 只 4 周龄昆明系雄性小鼠随机分成 4 组，包括 3 个实验组和 1 个模拟注射损伤的对照组，每组 6 只。实验组的小鼠分别腹腔注射不同菌株的菌悬液（SM4、SR9 及 ATCC29213），注射 0.5 mL 浓度为  $1 \times 10^9$  CFU · mL<sup>-1</sup> 的菌悬液，对照组小鼠腹腔注射等体积生理盐水，继续饲养 96 h，期间每隔 12 h 观察小鼠存活状态，根据每组小鼠的存活率绘制生存曲线，分析不同菌株的致病性。

结果表明，模拟注射损伤对照组小鼠在 96 h 内的存活率为 100%，表明注射操作不会影响小鼠的存活。标准株 ATCC29213 和分离株 SM4 感染小鼠后，96 h 小鼠存活率均为 66.67%，分离株 SR9 感染小鼠的存活率为 33.33%，为感染 SM4 菌株或感染标准株菌株小鼠存活率的一半，表明 SR9 菌株的致病性强于 ATCC29213 和 SM4，而 ATCC29213 和 SM4 的致病力相近，结果见图 5。

2.5 溶血能力检测

依据孙茂等<sup>[15]</sup>的溶血性检测实验方法，将标准株 ATCC29213 及分离株 SM4、SR9 分别在 TSA 固体培养基上划线，挑取单菌落，接种于 LB 肉汤培养基中，培养 24 h。将上述菌液按照 1 : 100 比例稀释后于恒温摇床中 37℃、200 r · min<sup>-1</sup> 振荡培养 24 h。抽取 10 mL 样品，12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 5 min，收集上清液。溶血反应体系包括：100 μL 上清液、875 μL 的 PBS 和 25 μL 的无菌脱纤维绵羊血。在 37℃ 下孵育 1 h 后，4000 r · min<sup>-1</sup> 离心 3 min，观察不同菌株的溶血情况并收集上清液，测定在 543 nm 处的吸光度并拍照。分别以 PBS 和蒸馏水替代上清液，设定为阴性或阳性对照。

结果表明，小鼠源菌株 SM4 溶血活性显著低于 SR9 菌株和标准株 ATCC29213（*P* < 0.05），而大鼠源菌株 SR9 溶血活性显著高于 SM4 菌株和标准株 ATCC29213（*P* < 0.05），如图 6 所示。说明来自大鼠的 SA 具有更高的溶血活性。所有菌株与阴性对照组和阳性对照组均差异显著（*P* < 0.05）。

2.6 统计学方法

用 GraphPad Prism 软件进行统计学分析及图像展示。数据以平均值 ± 标准差展示，组间差异分析采用单因素方差分析方法，*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 讨论

SA 检出率受动物种类及实验环境影响<sup>[16]</sup>。

表 3 2 株鼠源 SA 毒力基因表达情况

Tab 3 Virulence gene expression of two strains of murine *S.aureus*

| 组别          | SM4 | SR9 | ATCC29213 |
|-------------|-----|-----|-----------|
| <i>nuc</i>  | +   | +   | +         |
| <i>hla</i>  | +   | +   | +         |
| <i>hly</i>  | +   | +   | +         |
| <i>hld</i>  | +   | +   | +         |
| <i>fmbA</i> | +   | +   | +         |
| <i>fmbB</i> | —   | +   | —         |
| <i>clfA</i> | +   | +   | +         |
| <i>clfB</i> | +   | +   | +         |
| <i>coa</i>  | +   | —   | +         |
| <i>icaA</i> | +   | —   | +         |
| <i>icaC</i> | +   | —   | +         |
| <i>icaD</i> | +   | —   | +         |
| <i>pvl</i>  | —   | —   | —         |
| <i>sea</i>  | +   | —   | +         |
| <i>seb</i>  | —   | —   | —         |

注：“+”表示基因表达，“—”表示基因不表达或未检出。

Note: “+” indicates that the gene is expressed, “—” indicates that the gene is not expressed or not detected.

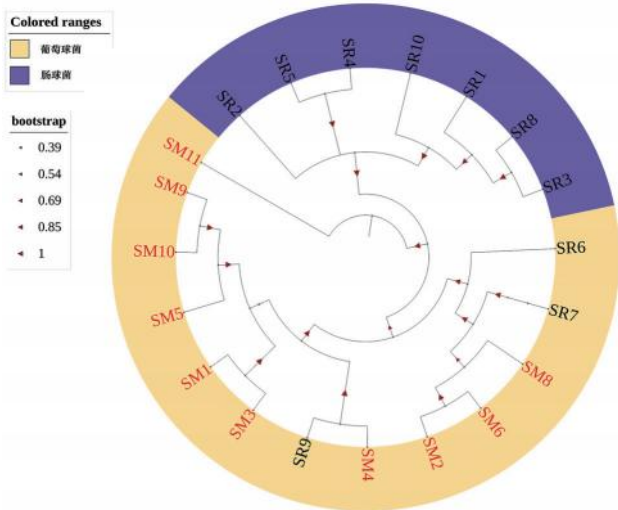


图 3 21 株革兰氏阳性球菌的进化树分析

Fig 3 Evolution tree of 21 gram-positive cocci

注：紫色阴影表示肠球菌属，黄色阴影表示葡萄球菌属；黑色字体表示菌株分离自大鼠，红色字体表示菌株分离自小鼠。

Note: The purple indicates *Enterococcus* and the yellow indicates *Staphylococcus*. The black font indicates that the strain was isolated from rats, while the red indicates that the strain was isolated from mouse.

SA 虽是 SPF 级实验动物中常见的污染菌，但其低检出率为正常现象<sup>[17-18]</sup>。在菌株分离培养实验中，部分菌株难以分离导致数量较少，虽会影响后续实验分析，但其结果仍具有一定的代表性<sup>[19-20]</sup>。本研究从 SPF 级大鼠、小鼠中分离出 2 株 SA（检出率为 2.5%），并开展后续耐药性与致病性分析，亦可为实验动物源 SA 的微生物学特

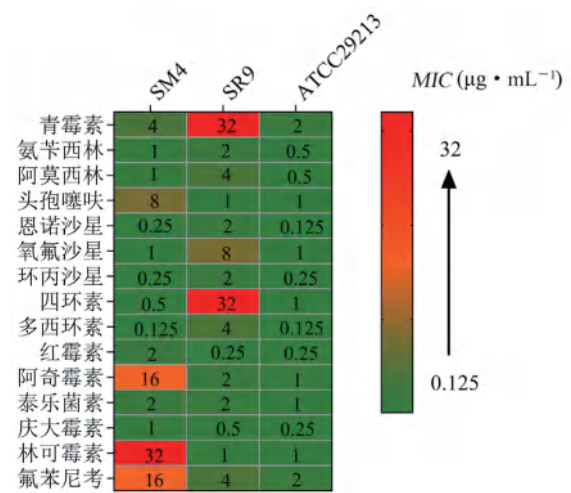


图 4 15 种抗菌药物对 2 株鼠源 SA MIC 的热图

Fig 4 Heatmap of 15 antibacterial drugs against 2 strains of murine *S. aureus* MIC

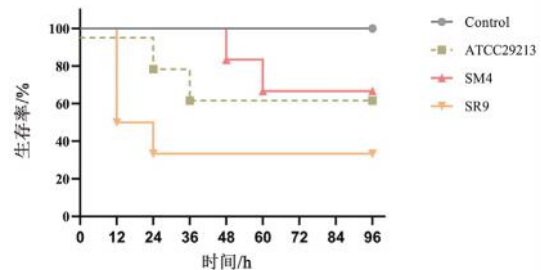


图 5 腹腔接种 SA 后小鼠生存率结果

Fig 5 Survival rate of mice after intraperitoneal inoculation with *S.aureus*

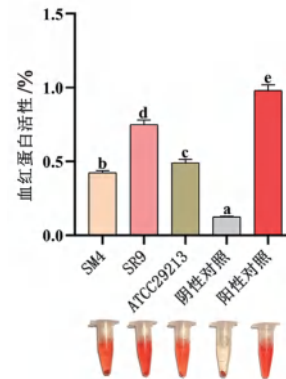


图 6 2 株 SA 溶血能力检测结果

Fig 6 Hemolytic ability of the two strains of *S.aureus*

注：不同字母间表示有显著差异 ( $P < 0.05$ )。

Note: Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

征研究提供一定数据支撑。

近年来，抗菌药物滥用导致多重耐药 SA 菌株的出现，不仅严重威胁公共健康，同样也威胁着实验动物的饲养和管理，导致安全隐患<sup>[21-22]</sup>。SA 可通过产生  $\beta$ -内酰胺酶破坏  $\beta$ -内酰胺类抗菌药物的抗菌活性；编码产生特异性结合蛋白、降低细胞膜通透性、分泌胞外多糖等物质，从而增强自身侵袭能力和耐药性<sup>[23-26]</sup>。本研究测定了 2

株鼠源 SA 对 15 种常见抗菌药物的耐药性,并以标准株 ATCC29213 为参照,发现 2 个分离株均对青霉素、氨苄西林、阿莫西林、四环素等抗菌药物具有一定的耐药性,这与其他研究成果相似<sup>[27-28]</sup>。但小鼠源 SA 对大环内酯类、林可胺类、酰胺醇类抗菌药物具有耐药性,而大鼠源 SA 对  $\beta$ -内酰胺类和四环素类抗菌药物具有一定的耐药性,说明不同来源的 SA 耐药性可能存在差异,谢艳斌<sup>[29]</sup>对不同来源 SA 的耐药性分析结果也证实了这一点。因此,笔者建议在实验动物管理中,要注意区分动物种类,参考药敏实验结果制定合理的从业人员感染风险防控方案。

SA 会导致人类和动物多种疾病的发生,主要与毒素介导的毒力、侵袭力和耐药性有关<sup>[30]</sup>。SA 具有多种毒力因子,其中耐热核酸酶 (*nuc*) 可破坏宿主细胞的核酸,协助扩散;纤连蛋白结合蛋白 (*fmbA*、*fmbB*)、凝集因子 (*clfA*、*clfB*) 与细胞间黏附素 (*icaA*、*icaC*、*IcaD*) 的表达可增强 SA 的黏附能力,促进细菌在组织中的定植;杀白细胞毒素 (*pvl*) 能够破坏细胞溶解活性并且引发不同类型细胞的裂解,使细菌逃避宿主的免疫清除;溶血素 (*hla*、*hly*、*hld*)、肠毒素 (*sea*、*seb*) 等能够破坏细胞膜的完整性,引发炎症反应,造成感染。上述毒力因子均由对应的毒力基因表达,而不同来源的 SA 毒力基因表达不尽相同<sup>[31]</sup>。本研究共检测了 15 种相关毒力基因,发现 2 株 SA 均具有 *nuc*、*fmbA*、溶血素和凝集因子基因,而小鼠源菌株 SM4 表达 *sea*、*coa* 和细胞间黏附素,表明 SM4 菌株对宿主细胞结构和功能可能更具破坏力,并通过合成胞外多糖黏附素获得更强的黏附能力,对外界环境的抵抗力更强。以上检测结果与文献<sup>[32-33]</sup>的研究结果部分相同,证实了来源不同的 SA 毒力基因表达存在差异。提示我们要密切监测实验动物中 SA 的流行情况和毒力基因表型。

SA 的溶血能力大小和动物攻毒效果被作为毒力特性的相关依据<sup>[34-37]</sup>。本研究进一步验证 2 株 SA 的毒力区别时发现,菌株 SR9 感染小鼠后存活率最低,且溶血能力更强,说明菌株 SR9 比菌株 SM4 和标准株 ATCC29213 毒性更强,但在毒力基因检测中,菌株 SR9 的毒力基因数量要少于菌株 SM4,这说明毒力基因数量与毒性之间并不是绝对正相关的。细菌毒力基因表达调控具有复杂性,实际致病力受环境诱导的基因表达水平<sup>[38]</sup>、关键毒力基因表达<sup>[39]</sup>、毒力基因的突变位

点及突变方式<sup>[40]</sup>等因素的影响。从溶血性角度来看,溶血素是 SA 的重要致病因子,其与致病能力有较强相关性<sup>[41]</sup>。本研究在两种菌株中均检出溶血素基因表达,但 SR9 菌株表现出更强的溶血活性,推测与其较高的基因表达水平相关,并最终导致菌株 SR9 毒性更强,具体致病力差异的分子机制还有待后续研究。

综上所述,通过分析和比对 2 株鼠源的 SA 耐药性和致病性特点,证明来自不同种类鼠的 SA 其生物学特性不同,为实验动物源 SA 的防控及对实验动物行业从业人员感染的治疗提供了一定的参考依据。

## 参考文献

- [1] Du X, Larsen J, Li M, et al. *Staphylococcus epidermidis* clones express *Staphylococcus aureus*-type wall teichoic acid to shift from a commensal to pathogen lifestyle [J]. Nat Microbiol, 2021, 6 (6): 757-768.
- [2] 田洪亮, 徐刘溢, 彭练慈, 等. 金黄色葡萄球菌病防治研究进展 [J]. 微生物学报, 2023, 63 (12): 4441-4450.
- [3] 吉星, 李俊, 王冉, 等. 金黄色葡萄球菌毒力调控及减毒药物研究进展 [J]. 畜牧兽医学报, 2025, 56 (4): 1594-1607.
- [4] Cheung GYC, Bae JS, Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus* [J]. Virulence, 2021, 12 (1): 547-569.
- [5] 吴运谱, 张泽辉, 崔子寅, 等. 金黄色葡萄球菌对实验动物的感染及其分子分型方法比较 [J]. 实验动物科学, 2024, 41 (3): 85-89.
- [6] Borg MA, Camilleri L. What is driving the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in europe? [J]. Microb Drug Resist, 2021, 27 (7): 889-894.
- [7] Soge OO, No D, Michael KE, et al. Transmission of MDR MRSA between primates, their environment and personnel at a United States primate centre [J]. J Antimicrob Chemother, 2016, 71 (10): 2798-2803.
- [8] 国家市场监督管理总局; 国家标准化管理委员会. 实验动物微生物、寄生虫学等级及监测 [S]. 2019.
- [9] 姚继英, 董文凤, 杨玮, 等. 实验动物金黄色葡萄球菌 PCR 检测方法的建立和应用 [J]. 实验技术与管理, 2023, 40 (11): 91-96.
- [10] Cohen TS, Takahashi V, Bonnell J, et al. *Staphylococcus aureus* drives expansion of low-density neutrophils in diabetic mice [J]. J Clin Invest, 2019, 129 (5): 2133-2144.
- [11] 张蕾, 王曼, 何辉, 等. 不同地区致奶牛乳房炎金葡萄毒力因子的分布 [J]. 上海交通大学学报 (农业科学版), 2019, 37 (2): 30-36.
- [12] 邢俏. 沈阳地区宠物源金黄色葡萄球菌分离株毒力基因检测及耐药性分析 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2022.
- [13] 石伟雄, 高飞, 苏磊. 2 株 SPF 级实验小鼠病原细菌的分离、鉴定及其基因组特征分析 [J]. 微生物学通报,



- 2025, 52 (2): 859-874.
- [14] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [S]. VET06 Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria Isolated From Animals. 1st Edition. Twenty-Second Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, 2017.
- [15] 孙茂, 何学文, 邓嘉强, 等. 亚抑菌质量浓度的百里香酚对金黄色葡萄球菌  $\alpha$ -溶血素表达的影响 [J]. 云南农业大学学报 (自然科学), 2019, 34 (3): 414-419.
- [16] 魏杰, 黄健, 刘文菊, 等. 2017—2019 年北京地区实验动物质量抽检结果分析 [J]. 实验动物科学, 2021, 38 (5): 19-27, 58.
- [17] 冯育芳, 邢进, 付瑞, 等. 实验动物金黄色葡萄球菌的实验室检测能力验证结果评价 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24 (2): 195-198.
- [18] 刘丽达, 刘丽, 黄伟峰, 等. SD 大鼠肠道菌群多样性对金黄色葡萄球菌检出率影响的探析 [J]. 寄生虫病与感染性疾病, 2022, 20 (2): 89-93, 98.
- [19] 石伟雄, 高飞, 苏磊. 2 株 SPF 级实验小鼠病原细菌的分离、鉴定及其基因组特征分析 [J]. 微生物学通报, 2025, 52 (2): 859-874.
- [20] 刘志杰, 杨少华, 贾烈宏, 等. 羊源性金黄色葡萄球菌的分离鉴定和耐药性分析 [J]. 中国兽医科学, 2024, 54 (12): 1609-1616.
- [21] Guo YL, Song GH, Sun ML, et al. Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus* [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10: 107-118.
- [22] 张杰, 谢星星, 范小冬, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌血流感染危险因素的系统评价 [J]. 药物评价研究, 2023, 46 (10): 2243-2250.
- [23] 汪宗林, 陈建荣, 尤忠毓, 等. 金黄色葡萄球菌生物被膜形成与耐药机制的研究进展 [J]. 生物工程学报, 2024, 40 (7): 2038-2051.
- [24] Kong C, Neoh H, Nathan S. Targeting *Staphylococcus aureus* toxins: a potential form of anti-virulence therapy [J]. Toxins, 2016, 8 (3): 72-93.
- [25] Jenul C, Horswill AR. Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence [J]. Microbiol Spectr, 2019, 7 (2): 10.
- [26] 何兴丽, 王昭元, 周佩瑶, 等. 奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌免疫逃避机制研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2024, 51 (2): 748-758.
- [27] 李昶, 刘莎莎. 腹泻兔病原菌的分离鉴定及耐药性检测 [J]. 动物医学进展, 2021, 42 (4): 141-144.
- [28] 陈飞, 张鑫, 武香露, 等. 2023 年重庆市沙坪坝区金黄色葡萄球菌分离株分子特征分析 [J]. 寄生虫病与感染性疾病, 2025, 23 (2): 90-97.
- [29] 谢艳斌. 不同来源金黄色葡萄球菌的分布特征及耐药性分析 [J]. 检验医学与临床, 2018, 15 (20): 3082-3084.
- [30] Carfora V, Caprioli A, Marri N, et al. Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in central Italy [J]. Int Dairy J, 2015, 42: 12-15.
- [31] Liao GH, Wu ZH, Lv JF, et al. Investigation of clonal diversity, virulence genes, and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* recovered from raw cow milk in southern Xinjiang, China [J]. Folia Microbiol, 2022, 67 (2): 245-252.
- [32] 殷雪勤, 于诗筠, 吕琴, 等. 长春部分地区犬猫源葡萄球菌的高通量测序分析 [J]. 中国兽医学报, 2024, 44 (1): 113-120.
- [33] 王笑笑, 马小娟, 胡嘉莘, 等. 新疆阿克苏地区羊源耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的分离鉴定及毒力基因与耐药性分析 [J]. 中国预防兽医学报, 2024, 46 (5): 484-491.
- [34] Zheng JX, Shang YP, Wu Y, et al. Diclazuril inhibits biofilm formation and hemolysis of *Staphylococcus aureus* [J]. ACS Infect Dis, 2021, 7 (6): 1690-1701.
- [35] Shi C, Liu X, Chen YY, et al. Inhibitory effects of citral on the production of virulence factors in *Staphylococcus aureus* and its potential application in meat preservation [J]. Int J Food Microbiol, 2024, 413: 110581.
- [36] 黄少隆, 张翠惠, 黄冬枚, 等. 山豆根对金黄色葡萄球菌毒力表达的影响 [J]. 检验医学与临床, 2022, 19 (20): 2803-2807.
- [37] 邢国锋, 党乙凡, 赵耀, 等. 唾液乳杆菌无细胞上清液对金黄色葡萄球菌溶血活性的抑制作用研究 [J]. 中国畜牧兽医, 2025, 52 (4): 1884-1894.
- [38] Gao XQ, Gao GG, Zheng WF, et al. PARylation of 14-3-3 proteins controls the virulence of *Magnaporthe oryzae* [J]. Nat Commun, 2024, 15 (1): 8047-8047.
- [39] Asgari B, Burke RJ, Quigley LB, et al. Identification of virulence genes associated with pathogenicity of translocating *Escherichia coli* with special reference to the type 6 secretion system [J]. Microorganisms, 2024, 12 (9): 1851.
- [40] 贾丽, 朱僧, 雷斯瑀, 等. 猪链球菌 2 型毒力相关基因在分离株中的分布与突变研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2018, 40 (1): 50-54.
- [41] 徐晓群, 王欢, 吕火焯. 金黄色葡萄球菌溶血素的研究进展 [J]. 中国微生态学杂志, 2017, 29 (6): 720-724, 730.

(收稿日期: 2025-03-25; 修回日期: 2025-05-29)

## 药师处方审核培训与胜任力专题

### 【编者按】

处方审核是药师运用专业知识与实践技能，对医师处方进行合法性、规范性和适宜性把关的核心药学服务。药师作为处方审核工作的“第一责任人”，其专业能力直接关系到医疗质量和患者安全。如何系统性、标准化赋能药师，量化评估其岗位胜任力，并验证培训成效，是当前亟待破解的难题。本专题聚焦湖南省药学会的突破性实践——处方审核 PHARMD 培训模式，深入剖析这一创新模式的构建路径、科学验证方法与成效。本系列研究通过构建胜任力评价模型定义能力“标尺”，以数据驱动验证模式成效，以闭环反馈驱动持续优化。本专栏旨在为全国医疗机构和药学组织提供理论参考和实践策略，为提升药师处方审核能力提供可落地的标杆方案，最终赋能药师，筑牢临床合理用药的基石。

### 【主持人简介】



张毕奎，药理学博士，临床药学、生物医药工程博士研究生导师。中南大学湘雅二医院药学部主任，中南大学第二临床学院临床药学教研室主任，主要从事新药新制剂体内评价、治疗药物监测（TDM）研究和抗肿瘤药物心脏损伤机制及防治策略研究。兼任中国药学会第 24、25 届理事会理事，中国药学会医院药专业委员会副主任委员；中国药理学会治疗药物监测（TDM）研究专业委员会常务委员；湖南省药学会理事长等；《中南药学》杂志副主编，《中国医院药学杂志》《药物不良反应杂志》《中国药房》等杂志编委。获国家自然科学基金、湖南省自然科学基金等课题 10 余项。已发表学术论文 200 余篇，其中 SCI 论文 80 余篇。获部、省级科技成果奖 5 项。主编《临床药学概论》《药物毒理学》等教材和专著 8 部。

## 湖南省药学会处方审核 PHARMD 培训模式的实践与效果分析

刘丽华<sup>1</sup>，邓紫薇<sup>2</sup>，周菊香<sup>3</sup>，张超<sup>4</sup>，李献忠<sup>4</sup>，朱运贵<sup>4\*</sup>，李焕德<sup>5\*</sup>（1. 长沙市第三医院 湖南大学附属长沙医院，长沙 410015；2. 湖南医药学院总医院，湖南 怀化 418000；3. 邵阳市中心医院，湖南 邵阳 422000；4. 湖南省药学会，长沙 410011；5. 中南大学湘雅二医院，长沙 410011）

**摘要：**目的 分析湖南省药学会处方审核 PHARMD 培训模式的实践效果，为进一步提升审方药师岗位胜任力提供参考。**方法** 构建实践导向-混合平台-基层可及-认证严格-多级协作-数据驱动的处方审核培训模式。采用自行设计的问卷对参与培训的学员进行返岗后现状、培训效果与满意度调查。**结果** 共收集有效问卷 1050 份。受访药师中男性 240 名（22.9%），女性 810 名（77.1%）；30～39 岁年龄段占 43.6%。返岗后 62.8% 的学员对其他调剂药师进行了处方审核培训，52.5% 的学员参与处方审核规则的维护。培训后识别处方错误并进行处方干预的频率提升最明显。多因素分析显示，性别、处方审核专岗设置情况是培训效果的影响因素（ $P < 0.001$ ）。培训效果评分与满意度评分具有相关性（ $P < 0.001$ ）。**结论** 处方审核 PHARMD 培训模式效果显著，学员满意度高。根据性别以及处方审核岗位设置情况进行针对性分层培训有望提升培训效果。

**关键词：**处方审核；PHARMD 模式；满意度

**中图分类号：**R95

**文献标识码：**A

**文章编号：**1672-2981(2025)08-2315-06

**doi:**10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.026

**作者简介：**刘丽华，女，主任药师，主要从事临床药学实践与研究，email: lihua-liu@cssdsyy.com \* **通信作者：**朱运贵，男，副主任药师，主要从事医院药学及临床药学研究，email: zhuyugu@163.com；李焕德，男，教授，博士研究生导师，主要从事临床药学研究，email: lihuande1953@126.com

## Effectiveness of PHARMD training model by Hunan Pharmaceutical Association

LIU Li-hua<sup>1</sup>, DENG Zi-wei<sup>2</sup>, ZHOU Ju-xiang<sup>3</sup>, ZHANG Chao<sup>4</sup>, LI Xian-zhong<sup>4</sup>, ZHU Yun-gui<sup>4\*</sup>, LI Huan-de<sup>5\*</sup> (1. *The Third Hospital of Changsha, The Affiliated Changsha Hospital of Hunan University, Changsha 410015*; 2. *Hunan University of Medicine General Hospital, Huaihua Hunan 418000*; 3. *Central Hospital of Shaoyang, Shaoyang Hunan 422000*; 4. *Hunan Pharmaceutical Association, Changsha 410011*; 5. *The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011*)

**Abstract: Objective** To determine the effectiveness of PHARMD prescription review training model implemented by Hunan Pharmaceutical Association, to enhance the competence of pharmacists in prescription review. **Methods** A prescription review training model was developed, characterized by practice-oriented, hybrid platform, accessible training, rigorous certification, multi-level collaboration, data-driven optimization. A self-designed questionnaire was used to obtain data on post-training practices, training outcomes, and satisfaction among participants. **Results** Totally 1050 valid questionnaires were collected. Participants included 240 (22.9%) males and 810 (77.1%) females, with 43.6% aged 30 ~ 39 years. After the training, 62.8% of the trainees offered prescription review training to other dispensing pharmacists, and 52.5% were involved in improvement of prescription review rules. The frequency of identifying prescription errors and intervention was greatly improved after the training. Multivariate analysis revealed that gender and the establishment of dedicated prescription review positions significantly influenced the training effectiveness ( $P < 0.001$ ). Significant correlation between the training effectiveness and satisfaction was found ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** The PHARMD prescription review training model effectively enhances hospital pharmacists' prescription review capabilities. Tailoring training programs based on gender and the establishment of prescription review positions enhance the training effectiveness.

**Key words:** prescription review; PHARMD model; satisfaction

处方审核是保障患者用药安全、提升临床合理用药水平的核心环节。近年来,国家卫生健康委员会相继颁布《医疗机构处方审核规范》《关于加强医疗机构药事管理促进合理用药的意见》等政策文件,明确药师是处方审核工作的“第一责任人”,要加大处方审核力度<sup>[1-2]</sup>。研究表明,处方前置审核能提高用药合理性,改善患者临床结局,降低治疗成本<sup>[3]</sup>。在基层医疗机构,处方审核与反馈干预机制可有效降低处方错误<sup>[4]</sup>。然而,我国医疗机构处方前置审核工作仍面临审方药师能力不足以及医师药师沟通不畅等问题<sup>[5-6]</sup>,亟需通过培训来提高医院药师的专业技术能力。

当前我国医疗机构审方药师培养体系面临挑战:一方面,传统培训模式多呈现理论化特征,缺乏系统性课程设计与实践操作,导致药师实际解决问题的能力不足;另一方面,基层医疗机构药师专业水平参差不齐<sup>[7]</sup>,培训资源分布不均衡,基层药师获取优质培训机会相对较少,难以适应复杂多变的临床用药场景。为切实提升药师审方

能力,湖南省药学会自 2019 年开始探索处方审核 PHARMD (practice-oriented, hybrid platform, accessible training, rigorous certification, multi-level collaboration, data-driven) 培训模式,即实践导向-混合平台-基层可及-认证严格-多级协作-数据驱动模式。本文通过分析 PHARMD 培训模式的实践与效果,以期为审方药师规范化培训提供参考,为推动药学服务高质量发展提供新的思路和方法。

### 1 方法

#### 1.1 PHARMD 模式的构建

在湖南省卫生健康委员会的领导下,湖南省药学会和湖南省药师技能培训中心自 2019 年开始对湖南省医院药师处方审核培训进行探索,构建审方药师 PHARMD 培训模式。PHARMD 模式的目标是夯实专业知识储备,系统训练审方思维,全面提升药师技能,具体包括以下 6 个层面。

**1.1.1 实践导向** 以实践为导向设置培训课程,包括职业精神和法律法规、通科审核要点、专科审核要点和审方实操 4 个模块,共 60 个学时。采用



基于真实处方案例、以问题为导向 (problem-based learning, PBL) 的教学方法, 强调实战性与场景化。

**1.1.2 混合平台** 培训方式为线上+线下混合式教学模式, 线上培训依托湖南药事服务网在线学习平台, 线下培训采取全脱产集中授课。在线学习平台包括“三基”习题、审方练习、模拟考核等功能, 支持碎片化及个性化学习。

**1.1.3 基层可及** 培训地点下沉至地市级, 向乡镇卫生院、社区卫生服务中心的药师倾斜, 通过“培训送上门”为基层药师提供更多的学习机会和资源支持。

**1.1.4 认证严格** 师资队伍由湖南省药学会选拔并统一管理, 需提前进行课程试讲, 由专家组根据现场评分结果确认授课师资。学员考核管理严格, 通过出勤率、理论考试、审方作业、小组审方赛、团队作业多环节不同权重占比进行考核。

**1.1.5 多级协作** 省市县各级药学会通过上下联动机制, 推动审方技能实训。依托湖南省卫生健康委员会的行政指导优势, 形成行政管理与学术支持协同发力的长效机制。

**1.1.6 数据驱动** 利用数据驱动实现培训质量持续改进, 采用问卷调查收集学员的学习需求和培训效果, 为培训内容和培训方式的调整提供依据。

**1.2 问卷调查**

采用自行设计的问卷对 2019 年 1 月至 2024 年 12 月参与湖南省处方审核培训的学员进行返岗后现状、培训效果与满意度调查。从培训后处方审核效率、处方干预频率、医疗机构处方合格率、处方点评能力、用药咨询能力、团队协作能力、文献检索及质量评价能力 7 个项目评价培训效果。调查学员对培训内容、培训形式、教学师资、组织管理、培训教材、考核体系的满意度。运用 Likert 5 级计分法对培训效果和满意度进行分析, 各条目计 1~5 分, 得分越高代表能力提升幅度越明显或满意度越高。通过问卷星二维码发放问卷收集数据。为确保回收问卷质量, 调查结束后双人交叉核对, 并剔除无效问卷。剔除标准为: 作答时间 < 3 min; 两个重复问题回答不一致。

**1.3 统计学方法**

使用 SPSS 22.0 进行统计分析。定性资料采用频数和百分比表示, 定量资料以均数 ± 标准差表示。通过独立样本 *t* 检验、单因素方差分析和多元线性回归分析探讨培训效果的影响因素。对培训满意度总体得分与培训效果总体得分进行 Pearson 相关性分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 PHARMD 培训模式的应用**

PHARMD 模式从 2019 年至 2025 年 6 年时间共开设培训 26 期, 累计培训学员 2612 名, 结业 2587 名, 分布在全湖南省 14 个地州市, 122 个县市区。

**2.2 调查对象的一般资料**

共收集有效问卷 1050 份。受访药师中男性 240 名 (22.9%), 女性 810 名 (77.1%); 30~39 岁年龄段 (43.6%) 占比最高。三级、二级及一级医疗机构学员分别为 586 名 (55.8%), 316 名 (30.1%) 和 148 名 (14.1%)。以本科学历居多, 748 人 (71.2%); 职称多为主管药师及以上, 近 1/3 的受访者工作年限在 20 年以上。有 79.7% 受访者未参加过临床药师培训。被调查药师中, 有 55.5% 所在医院设置兼职处方审核岗位; 处方审核形式以人工审核居多 (52.1%) (见表 1)。

| 表 1 受访药师的基本资料 (n = 1050)                                   |          |     |        |
|------------------------------------------------------------|----------|-----|--------|
| Tab 1 Basic information of surveyed pharmacists (n = 1050) |          |     |        |
|                                                            | 项目       | 人数  | 构成比 /% |
| 性别                                                         | 男        | 240 | 22.9   |
|                                                            | 女        | 810 | 77.1   |
| 年龄 / 岁                                                     | < 30     | 143 | 13.6   |
|                                                            | 30 ~ 39  | 458 | 43.6   |
|                                                            | 40 ~ 49  | 359 | 34.2   |
|                                                            | ≥ 50     | 90  | 8.6    |
| 医院等级                                                       | 三级医疗机构   | 586 | 55.8   |
|                                                            | 二级医疗机构   | 316 | 30.1   |
|                                                            | 一级医疗机构   | 148 | 14.1   |
| 学历                                                         | 中专       | 21  | 2.0    |
|                                                            | 大专       | 178 | 17.0   |
|                                                            | 本科       | 748 | 71.2   |
|                                                            | 硕士及以上    | 103 | 9.8    |
| 职称                                                         | 无        | 15  | 1.4    |
|                                                            | 药士       | 36  | 3.4    |
|                                                            | 药师       | 242 | 23.0   |
|                                                            | 主管药师     | 510 | 48.6   |
|                                                            | 副主任药师    | 219 | 20.9   |
| 工作年限 / 年                                                   | 主任药师     | 28  | 2.7    |
|                                                            | ≤ 5      | 106 | 10.1   |
|                                                            | 6 ~ 10   | 220 | 21.0   |
|                                                            | 11 ~ 15  | 282 | 26.9   |
|                                                            | 15 ~ 20  | 100 | 9.5    |
| 是否参加临床药师培训                                                 | > 20     | 342 | 32.6   |
|                                                            | 否        | 837 | 79.7   |
|                                                            | 半年通科     | 70  | 6.7    |
|                                                            | 一年制      | 143 | 13.6   |
| 是否设置处方审核专岗                                                 | 专职处方审核   | 288 | 27.4   |
|                                                            | 兼职处方审核   | 583 | 55.5   |
|                                                            | 未设置      | 179 | 17.0   |
| 所在医院处方审核形式                                                 | 审方软件审核   | 23  | 2.2    |
|                                                            | 软件结合人工审核 | 480 | 45.7   |
|                                                            | 人工审核     | 547 | 52.1   |

2.3 培训学员的返岗现状

对结业学员的返岗现状调查结果显示, 67.0% 的学员培训后从事处方审核相关工作; 在审方时更容易被识别出来的前三位问题依次是适应证问题、规范性问题和用量问题; 培训后最常用于日常工作

的技能是处方审核和调配技能、患者用药咨询和处方点评技能。62.8% 的受访者培训返岗后对其他调剂药师进行了处方审核培训, 52.5% 参与处方审核规则的维护, 22.2% 进行了科普讲座 (见表 2)。

表 2 培训返岗工作现状 (n = 1050)

Tab 2 Post-training work status of surveyed pharmacists (n = 1050)

| 项目              | 内容                   | 人数 ( <i>n</i> )            | 百分比 /% |      |
|-----------------|----------------------|----------------------------|--------|------|
| 返岗后是否从事审方相关工作   | 是                    | 704                        | 67.0   |      |
|                 | 否                    | 346                        | 33.0   |      |
| 在审方时更容易被识别出来的问题 | 适应证问题                | 906                        | 86.3   |      |
|                 | 规范性问题                | 901                        | 85.8   |      |
|                 | 用量问题                 | 795                        | 75.7   |      |
|                 | 用法问题                 | 784                        | 74.7   |      |
|                 | 合法性问题                | 620                        | 59.0   |      |
|                 | 配伍禁忌问题               | 566                        | 53.9   |      |
|                 | 药物相互作用问题             | 501                        | 47.7   |      |
|                 | 疗程问题                 | 415                        | 39.5   |      |
|                 | 溶媒选择问题               | 380                        | 36.2   |      |
|                 | 遇到难以解决的处方审核问题首先采用的方法 | 自行上网搜索答案（如检索数据库或者利用人工智能解决） | 730    | 69.5 |
| 求助本院高年资药师       |                      | 148                        | 14.1   |      |
| 网络求助其他高年资药师     |                      | 103                        | 9.8    |      |
| 求助教科书           |                      | 56                         | 5.3    |      |
| 求助本院高年资医师       |                      | 13                         | 1.2    |      |
| 最常用于日常工作的技能     | 处方审核和调配技能            | 955                        | 91.0   |      |
|                 | 患者用药咨询               | 751                        | 71.5   |      |
|                 | 处方点评                 | 721                        | 68.7   |      |
|                 | 患者用药教育               | 692                        | 65.9   |      |
|                 | 与医师沟通调整治疗方案          | 598                        | 57.0   |      |
|                 | 用药评估与不良反应识别          | 453                        | 43.1   |      |
|                 | 慢病管理                 | 375                        | 35.7   |      |
|                 | 循证文献查询               | 366                        | 34.9   |      |
|                 | 药品管理及法规              | 355                        | 33.8   |      |
|                 | 针对院内医务人员进行培训         | 246                        | 23.4   |      |
|                 | 中成药管理                | 233                        | 22.2   |      |
|                 | 返岗后在处方审核方面所做的工作      | 对其他调剂药师进行处方审核培训            | 659    | 62.8 |
|                 |                      | 处方审核规则的维护                  | 551    | 52.5 |
|                 |                      | 对其他医务人员进行合理用药培训            | 427    | 40.7 |
| 审核规则的制定         |                      | 281                        | 26.8   |      |
| 返岗后科研与科普工作      | 无                    | 662                        | 63.0   |      |
|                 | 进行科普讲座               | 233                        | 22.2   |      |
|                 | 发表科普文章               | 115                        | 11.0   |      |
|                 | 参加科普竞赛               | 113                        | 10.8   |      |
|                 | 发布科普视频或参与科普著作编写      | 74                         | 7.0    |      |
|                 | 申请科研课题               | 47                         | 4.5    |      |
|                 | 申请科普课题               | 46                         | 4.4    |      |
|                 | 发表科研文章               | 45                         | 4.3    |      |

2.4 培训效果和满意度评估

培训效果分析显示, 识别处方错误并进行干预的频率提升最明显, 随后依次是处方点评能力、处方审核工作效率、用药咨询能力、团队协作能力和医疗机构处方合格率, 文献检索及质量评价能力提升幅度最小 (见表 3)。培训学员对教学师资满意度评分最高, 随后依次为组织管理、培训教材、考核

体系、培训内容和培训形式 (见表 4)。

2.5 培训效果影响因素分析

以培训效果总分为因变量, 性别、年龄、学历、职称、工作年限、是否参加过临床药师培训、所在医院等级、处方审核专岗设置情况及处方审核形式为自变量, 进行独立样本 *t* 检验和单因素方差分析。结果显示, 性别、是否参加过临床药师培训、处方

表 3 处方审核培训的效果 (n = 1050)  
Tab 3 Effectiveness of prescription review training among surveyed pharmacists (n = 1050)

| 项目             | 分值         |
|----------------|------------|
| 识别处方错误并进行干预的频率 | 3.82±0.89  |
| 处方点评能力         | 3.70±0.85  |
| 处方审核工作效率       | 3.64±0.87  |
| 用药咨询能力         | 3.63±0.87  |
| 团队协作能力         | 3.57±0.92  |
| 医疗机构处方合格率      | 3.57±0.95  |
| 文献检索及质量评价能力    | 3.37±0.99  |
| 总分             | 25.30±5.42 |

表 4 受访药师的培训满意度评分 (n = 1050)  
Tab 4 Training satisfaction ratings of surveyed pharmacists (n = 1050)

| 项目   | 分值        |
|------|-----------|
| 教学师资 | 4.60±0.54 |
| 组织管理 | 4.55±0.58 |
| 培训教材 | 4.55±0.58 |
| 考核体系 | 4.54±0.57 |
| 培训内容 | 4.52±0.58 |
| 培训形式 | 4.50±0.61 |

表 5 处方审核培训效果的多因素分析  
Tab 5 Multivariate analysis of the effectiveness of prescription review training

| 变量          | $\beta$ | SE    | $\beta'$ | t       | P       |
|-------------|---------|-------|----------|---------|---------|
| 常量          | 30.669  | 1.138 |          | 26.950  | < 0.001 |
| 性别          | - 1.420 | 0.386 | - 0.110  | - 3.680 | < 0.001 |
| 是否参加过临床药师培训 | 0.737   | 0.401 | 0.055    | 1.836   | 0.067   |
| 处方审核专岗      | - 1.878 | 0.269 | - 0.228  | - 6.987 | < 0.001 |
| 处方审核形式      | - 0.072 | 0.324 | - 0.007  | - 0.223 | 0.823   |

务能力欠缺,接受继续教育机会偏少等问题,成为基层医疗机构开展药学服务的瓶颈<sup>[9]</sup>。研究表明,前置审方干预的成功率与药师受教育程度相关<sup>[10]</sup>。因此通过规范、系统、科学的培训体系培养专业化的审方药师具有重要意义:一方面,培训可提升药师的专业知识和实践技能,使其掌握处方审核的关键要素、方法和标准;另一方面,培训也有助于提升药师在医疗团队中的作用和价值。

3.2 审方药师 PHARMD 培训模式的创新点

目前国内学者对于审方药师的培训模式做了有益探索,如审培一体化模式<sup>[11]</sup>、“1 + X”网格化模式<sup>[12]</sup>、“实战型”审方药师培养模式<sup>[13]</sup>、全医嘱审核培训体系<sup>[14]</sup>等。本文提出了一种创新的处方审核药师培训模式——PHARMD 模式。该模式具有以下创新点:①通过实践导向的培训设计,紧密结合临床实际案例,提高培训内容的实用性和针对性,使药师能够将所学知识和技能直接应用于工作实践;②借助混合平台的培训方式,整合线上线下资源,满足不同药师的学习需求和时间安排;③注重基层

审核专岗设置情况及处方审核形式对培训效果有影响 ( $P < 0.05$ )。其中男性培训效果总分高于女性,接受过临床药师培训者高于未接受过培训者。以培训效果总分为因变量,将单因素分析有统计学意义的变量纳入多元线性回归分析。结果显示,性别(男 = 1,女 = 2)、处方审核专岗设置情况(专职处方审核 = 1,兼职处方审核 = 2,未设置 = 3)是处方审核培训效果的影响因素,见表 5。

3 讨论

3.1 提高药师处方审核能力的意义

随着医疗改革的不断深入和药学服务模式的转型升级,处方审核工作的重要性日益凸显。处方审核是保障患者用药安全、有效、经济的关键环节,也是药师参与临床合理用药、提升药学服务质量的重要途径。一项对全国二级和三级医院的调查发现,样本医院处方前置审核的开展率仅为 42.7%,主要原因在于缺乏电子审方系统及药师的规模和能力不足<sup>[8]</sup>。基层医疗机构存在药师配备不足,服

可及性,将优质培训资源向基层倾斜,解决基层药师人才培养需求;④实施严格的认证机制,制定统一的考核标准,确保培训质量;⑤加强多级协作,促进合作与交流,形成培训合力,共同推动药师处方审核能力的提升;⑥利用数据驱动了解药师的学习需求和培训效果,实现培训的持续改进和优化。

3.3 学员返岗现状及 PHARMD 培训模式的效果和满意度

对学员返岗后现状进行调查,发现 67% 的学员结业后从事处方审核相关工作,这表明培训内容 与岗位需求具有较高契合度。培训后日常使用率高的技能包括处方审核和调配、患者用药咨询、处方点评和患者用药教育技能,表明 PHARMD 审方培训模式不仅提升处方审核能力,也较为系统、全面地提升了培训学员的药学服务能力。有 62.8% 的受访者培训返岗后对其他调剂药师进行了处方审核培训、40.7% 对其他医务人员进行了合理用药培训,52.5% 参与了审核规则的维护。培训学员成为医疗机构内部培训者,说明其专业



能力获得认可,这种同行培训的“辐射效应”可进一步提升合理用药水平。学员培训后参与处方前置审核规则的建立和完善,可提高处方审核效率,降低不合理处方比例,节约患者医疗费用<sup>[15-16]</sup>。

从培训效果看,学员返岗后识别处方错误并进行处方干预的频率提升最明显、处方审核工作效率和医疗机构处方合格率均有提升,但文献检索及质量评价能力提升幅度最小。学员返岗后处方错误识别与干预频率提升可能得益于培训中的案例模拟与情境演练等实战教学方法。国外文献报道通过讲授式讲座、实践研讨和模拟式教学进行处方审核培训,有效提升了药学生的处方分析知识水平、自信心及实际应用能力<sup>[17]</sup>。学员文献检索及质量评价能力提升较小,可能与该项技能需长期积累与实践相关;提示对于审方药师文献检索相关技能的培训需与日常工作场景更加深度融合,通过线上学习社群(如微信群专业论坛)进一步构建“培训-实践”的长效支持机制。本研究发现,培训效果评分与满意度评分具有相关性,提示学员的主观体验与学习成效存在关联。这一关联可能与教学设计的适配性相关,在培训内容契合学员需求、教学方法注重互动与实践时,学员既感受到较高的参与满意度,又能有效内化知识与技能。

### 3.4 培训效果影响因素

多因素分析发现,性别以及处方审核专岗设置是处方审核培训效果的影响因素。国外研究发现,男性和女性药学生的职业需求具有显著差异<sup>[18]</sup>。此外,一项对住院医师的调查发现,女性对自我保护的担忧更明显,有可能影响反馈寻求动机的产生<sup>[19]</sup>。男性自我保护的心理防御弱于女性,更倾向于主动寻求反馈,可能有利于提高处方培训效果。本研究结果提示后续培训需分层施策,分析不同性别药师的培训需求差异,提供良好的反馈环境。所在医疗机构设置处方审核专/兼职岗位的学员,其培训效果更优;该结果提示医疗机构缺乏处方审核专岗位职责划分时,药师易陷入“多任务并行”状态,难以专注实践审方技能,且机构内部缺乏配套的质控流程与激励机制,导致培训成果难以落地。

### 参考文献

- [1] 国家卫生健康委员会办公厅国家中医药管理局办公室中央军委后勤保障部办公厅. 关于印发医疗机构处方审核规范的通知[EB/OL]. (2018-07-10) [2025-03-30]. <http://www.nhc.gov.cn/zyygj/s7659/201807/de5c7c9116b547af819f825b53741173.shtml>.
- [2] 国家卫生健康委教育部财政部人力资源社会保障部国家医保局国家药监局. 关于印发加强医疗机构药事管理促进合理用药的意见的通知[EB/OL]. (2020-02-26) [2025-03-30]. <http://www.nhc.gov.cn/zyygj/s7659/202002/ea3b96d1ac094c47a1fc39cf00f3960e.shtml>.
- [3] Fan XC, Chen DX, Bao SW, et al. Prospective prescription review system correlated with more rational PPI medication use, better clinical outcomes and reduced PPI costs: experience from a retrospective cohort study [J]. BMC Health Serv Res, 2023, 23 (1): 1014.
- [4] Lim WY, Hss AS, Ng LM, et al. The impact of a prescription review and prescriber feedback system on prescribing practices in primary care clinics: a cluster randomised trial [J]. BMC Fam Pract, 2018, 19 (1): 120.
- [5] 李汶睿, 李頔, 赵春景, 等. 我国医疗机构处方前置审核开展的现状分析 [J]. 中国药房, 2021, 32 (5): 524-529.
- [6] 马旖旎, 史天陆. 药师处方审核工作质量的再评价 [J]. 医药导报, 2019, 38 (2): 252-256.
- [7] 牟景丽, 刘金萍. 基层医院药师规范化培训的现状与展望 [J]. 中华医学教育探索杂志, 2018, 17 (10): 1077-1080.
- [8] 卞婧, 魏丽艳, 邵晓楠, 等. 国内医院处方审核与点评开展情况及分析 [J]. 中国医院, 2020, 24 (2): 8-11.
- [9] 周大勇, 郭尚林, 刘爱娜, 等. 基层医疗机构药事管理的调研及药师技能提升工作的开展 [J]. 药学服务与研究, 2020, 20 (6): 474-477.
- [10] Wen Q, Yang C, Deng BJ, et al. Characterization of children's prospective prescription review and exploration of factors influencing the success of interventions [J]. Ther Adv Drug Saf, 2025, 16: 20420986241311448.
- [11] 李爱国, 杨宏图, 常翠, 等. 审培一体化的医院处方前置审核药师培养模式实践 [J]. 中国药业, 2022, 31 (5): 19-22.
- [12] 马旖旎, 张哲毅, 邓晓媚, 等. “1+X”网格化模式在审方药师药学服务胜任力培养中的应用和实践 [J]. 安徽医药, 2025, 29 (1): 200-205.
- [13] 翁琰, 刘尹, 王明明, 等. “实战型”审方药师培养新模式的构建与应用 [J]. 解放军药学学报, 2024, 37 (2): 126-129.
- [14] 连玉菲, 杨玉鹏, 尚清, 等. 应用态势分析法创建全医属审核药师培训体系的实践 [J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41 (4): 412-418.
- [15] 吴国丽, 卢晓林, 王荟. SWOT 分析儿童专科医院门诊处方前置审核规则库建设的应用与成效 [J]. 中南药学, 2023, 21 (12): 3345-3349.
- [16] 邢晓敏, 李祥鹏, 王心怡, 等. 基于循证证据的麻醉科处方前置审核规则精细化设置及效果评价 [J]. 中国药房, 2024, 35 (14): 1690-1695.
- [17] Atayee RS, Awdishu L, Namba J. Using simulation to improve first-year pharmacy students' ability to identify medication errors involving the top 100 prescription medications [J]. Am J Pharm Educ, 2016, 80 (5): 86.
- [18] Abdelhadi NN, Al-Meanazel A, Al-Halaseh LK, et al. Pharmacy students' motivations, satisfaction, and future career plans: a cross-sectional study exploring gender differences [J]. PLoS One, 2025, 20 (3): e0317896.
- [19] Bose MM, Gijssels WH. Why supervisors should promote feedback-seeking behaviour in medical residency [J]. Med Teach, 2013, 35 (11): e1573-1583.

(收稿日期: 2025-03-30; 修回日期: 2025-04-20)

# 基于因子分析法的医院药师处方审核专业胜任力评价模型构建及现状调查

邓紫薇<sup>1</sup>, 刘丽华<sup>2</sup>, 周菊香<sup>3</sup>, 李献忠<sup>4</sup>, 张超<sup>4</sup>, 朱运贵<sup>4\*</sup>, 李焕德<sup>5\*</sup> (1. 湖南医药学院总医院, 湖南 怀化 418000; 2. 长沙市第三医院 湖南大学附属长沙医院, 长沙 410005; 3. 邵阳市中心医院, 湖南 邵阳 422000; 4. 湖南省药学会, 长沙 410005; 5. 中南大学湘雅二医院, 长沙 410005)

**摘要:** **目的** 为建立处方审核专业胜任力评价模型以及明确今后培训方向、培训重点以及政策制定提供参考与借鉴。**方法** 结合文献并采用德尔菲法初步提取初始指标, 对湖南省 14 个地市州接受处方审核培训的 1050 名药师进行问卷调查, 采用因子分析构建并验证模型。采用 SPSS 26.0 进行数据描述统计分析和检验。比较不同级别医疗机构、不同岗位以及不同地区药师的自评得分。**结果** 构建包含 3 个一级指标(基本知识及职业技能、内驱力、科研教学能力), 16 个二级指标的评价模型, 验证性因子分析结果显示: 该模型拟合优度 ( $GFI = 0.850$ ,  $CFI = 0.905$ ,  $NFI = 0.898$ ) 和信效度 (Cronbach's  $\alpha$  系数均大于 0.8) 良好。三级医疗机构自评分高于一、二级医疗机构 ( $P$  均  $< 0.01$ )。人数最庞大的西药调剂药师 ( $n = 508$ , 占比 48.381%) 自评分比临床药师、药品采购岗位、处方审核岗位要低 ( $P$  均  $< 0.01$ )。长沙和湘潭药师自评分相对较高, 张家界药师自评分相对较低。**结论** 构建医疗机构药师处方审核专业胜任力评价模型具有良好的科学性、适用性。同时, 下一步培训重点应进一步扩大各市州一、二级医疗机构、调剂药师的培训范围, 全面提升药师处方审核能力。

**关键词:** 医院药师; 处方审核; 专业胜任力; 因子分析法; 现状调查

中图分类号: R95

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)08-2321-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.027

## Factor analysis-based competence assessment model for hospital pharmacists' prescription review

DENG Zi-wei<sup>1</sup>, LIU Li-hua<sup>2</sup>, ZHOU Ju-xiang<sup>3</sup>, LI Xian-zhong<sup>4</sup>, ZHANG Chao<sup>4</sup>, ZHU Yun-gui<sup>4\*</sup>, LI Huan-de<sup>4\*</sup> (1. Hunan University of Medicine General Hospital, Huaihua Hunan 418000; 2. The Third Hospital of Changsha, The Affiliated Changsha Hospital of Hunan University, Changsha 410005; 3. The Central Hospital of Shaoyang, Shaoyang Hunan 422000; 4. Hunan Pharmaceutical Association, Changsha 410005; 5. The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410005)

**Abstract: Objective** To evaluate the competence of prescription review and offer insights for future training directions, focuses, and policy making. **Methods** Initial indicators were collected through literature review and the Delphi method. A questionnaire survey was conducted among 1050 pharmacists from 14 cities and prefectures in Hunan Province who had received prescription review training. Factor analysis was used to validate the model. SPSS 26.0 was used for descriptive statistical analysis and testing. Self-assessment scores of pharmacists from different levels of healthcare institutions, positions, and regions were compared. **Results** An evaluation model comprising 3 primary indicators (basic knowledge and professional skills, intrinsic motivation, and teaching/research capabilities) and 16 secondary indicators was developed. Confirmatory factor analysis demonstrated good model fit ( $GFI = 0.850$ ,  $CFI = 0.905$ , and  $NFI = 0.898$ ) and reliability/validity (Cronbach's  $\alpha$  coefficients all  $> 0.8$ ).

**基金项目:** 湖南省自然科学基金 (No.2023JJ50447, No.2023JJ50448, No.2024JJ7349); 湖南医药学院 2025 年教学改革研究项目。

**作者简介:** 邓紫薇, 女, 副主任药师, 主要从事临床药学研究, email: 5705388@qq.com \***通信作者:** 朱运贵, 男, 副主任药师, 主要从事医院药学及临床药学研究, email: zhuyugu@163.com; 李焕德, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事临床药学研究, email: lihuande1953@126.com

Self-assessment scores of pharmacists from tertiary hospitals were higher than those in primary and secondary hospitals ( $P < 0.01$ ). Dispensing pharmacists ( $n = 508, 48.381\%$ ), the largest subgroup, had lower scores as compared with those of clinical pharmacists, drug procurement staff, and prescription review pharmacists ( $P < 0.01$ ). Pharmacists in Changsha and Xiangtan reported relatively higher self-assessment scores, while those in Zhangjiajie scored lower. **Conclusion** The established evaluation model for pharmacists' prescription review competence is valid and feasible. Future training efforts should prioritize expanding coverage to primary/secondary healthcare institutions and dispensing pharmacists across all regions.

**Key words:** hospital pharmacist; prescription review; professional competence; factor analysis; current status

2018 年, 国家卫生健康委员会、国家中医药管理局、中央军委后勤保障部三部门联合制定了《医疗机构处方审核规范》<sup>[1]</sup>, 明确药师是处方审核工作的“第一责任人”。同时, 从医疗服务供给角度来看, 药师是维护民众健康不可或缺的重要医务人员, 是参与临床药物治疗、保障合理用药、实现民众安全、有效、经济用药目标的重要成员<sup>[2]</sup>。因此, 提高药师处方审核专业胜任力是保障患者安全用药非常重要的一环。

湖南省药学会积极响应国家的号召, 从 2019 年至 2025 年共开设线下培训 26 期, 累计培训学员 2612 名, 结业 2587 名, 分布在全湖南省 14 个地市州各等级医疗机构。每次培训为期近两个月, 采取 PHARMD 培训模式进行 (即 P. 实践导向; H. 混合平台: 线上模拟+线下实操; A. 基层可及; R. 认证严格: 师资严审, 保障培训专业性; M. 多级协作: 联动各级资源, 构建协同培训网络; D. 数据驱动: 分析行为数据, 持续优化教学闭环) 综合训练。近几年, 我国从理论到实践层面关于药师岗位胜任力的评价研究逐渐增多, 但对象以临床药师及医院药师居多<sup>[3-8]</sup>, 专门针对药师处方审核能力的评价缺乏。2017 年, 中国药师协会发布了《药师药学服务胜任力评价指标 (试行)》<sup>[9]</sup>, 对医疗机构药学服务行为与能力进行了规范, 目前国内发表的审方药师能力评价模式的文献较少, 主要是借助此规范进行评价<sup>[10]</sup>, 由于该评价指标适用于所有药师, 专门针对处方审核专业能力则存在评价内容过宽, 部分评价指标未被涵盖。本研究拟从医疗机构药师处方审核专业能力角度出发, 借助因子分析法<sup>[11-13]</sup>, 以《药师药学服务胜任力评价标准 (试行)》中的指标为参考, 尝试构建药师处方审核专业能力胜任力评价标准体系, 并对湖南省药学会 5 年来接受处方审核培训的药师进行现状调查, 为后续培训方向、培训重点以及政策制定提供依据。

## 1 对象与方法

### 1.1 调查方法

本研究为横断面研究, 采用方便抽样的方法, 以 2019 年 1 月至 2024 年 12 月参加湖南省处方审核培训的药学专业技术人员为调查对象。采用问卷星的形式以微信平台进行手机推送, 问卷题项之前设有统一的指导语。为保证数据质量, 结合问卷条目数量及一般作答填写速度, 本研究将作答时间  $< 3 \text{ min}$  (问卷涉及培训效果、满意度及培训现状, 共有 60 道题), 两个重复问题回答不一致的问卷判定为无效问卷, 予以剔除。

### 1.2 问卷设计

**1.2.1 胜任力指标的初步提取** 通过文献分析发现尚缺乏针对审方药师岗位胜任力相关的研究, 故提取所有与药师岗位胜任力相关的文献进行汇总、分析, 以初步提取评价指标。

通过对药师药学服务能力相关学术文献、《评价标准》等内容的梳理、总结和借鉴, 制定调查问卷, 包括以下内容: 第一部分为调查者的一般人口学资料, 内容包括性别、年龄、学历、工作所在地区、医院等级、职称等; 第二部分的设计包括 3 个一级指标和 16 个二级指标进行自评, 具体分为: 按 Likert 评分的方法赋以 1~5 的分值 (5 分=非常强或非常熟练, 4 分=强或熟练, 3 分=一般, 2 分=弱或不太熟练, 1 分=非常弱或不熟练)。

**1.2.2 胜任力指标的归纳与调整** 研究小组围绕研究主题制定专家函询问卷, 对初步提取的指标进行归纳、调整, 确立医院药师处方审核专业胜任力指标。函询问卷包括研究介绍、填写说明、专家基本信息、胜任力指标函询表四部分。其中, 函询表的各项指标由专家按照 Likert 5 级评分法评分, 从“非常不赞同、不赞同、不确定、赞同、非常赞同”分别赋值 1~5 分, 并允许专家在问卷所设的意见栏中填写增加的、删除的或其他具体修改意见。

本次研究共进行两轮专家函询, 对两轮专家函



询的问卷可靠性进行评价,具体指标包括<sup>[14]</sup>:①专家积极系数,用于衡量专家的积极性,以问卷的回收率及提意见率表示,有效回收率大于 70% 则表明专家积极性高;②肯德尔协调系数(Kendall's W),用于反映专家意见的协调程度,取值范围 0~1,越接近 1 说明专家的协调程度越高。

**1.3 处方审核专业胜任力模型构建及权重设定**  
首先,结合函询结果编制“医院药师处方审核专业胜任力测评问卷”,对专家函询后的确立的结果进行进一步验证。最终调查问卷包含两部分内容,第一部分为药师基本信息,第二部分为胜任力的测评指标,要求药师对各项指标进行自评分。其次,进行探索因子分析,根据分析结果构建胜任力模型。最后,进行验证性因子分析和信度、效度分析,对所建模型进行验证。

在一级指标内部进行主成分分析<sup>[14]</sup>,得到二级指标权重和主成分得分,汇总到一级指标,计算总的主成分得分。

得分计算公式为:权重得分=赋值得分×权重×10。

**1.4 质量控制**  
发放调查问卷前分别挑选了不同地区、不同级别、不同职称共 56 名药师进行预调研,根据预调研结果修改完善问卷,删除信度较低的题目,在问卷中设置必填项,避免空白问卷或个别选项遗漏的情况,受访者可根据最后留下的联系方式咨询一切存在疑问之处。

**1.5 统计与分析方法**  
通过问卷星平台生成数据并导出,通过 Excel 2020 和 SPSS 26.0 统计学软件进行统计及探索性因子分析,运用 SPSSAU 在线软件进行验证性因子分析。采用描述统计分析调查对象基本信息;采用 Cronbach's  $\alpha$  检验调查问卷的信度,Cronbach's  $\alpha$  系数>0.8 说明信度高;采用 KMO 值和 Bartlett's 球形检验指标检验问卷的效度(KMO 值>0.6 可进行效度分析,>0.8 表示效度高)。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

**2.1 受访者的基本情况**  
本研究累计回收问卷 1086 份,其中有效问卷 1050 份,有效回收率为 96.68%,信度检验:Cronbach's  $\alpha$  值为:0.946,KMO 值为 0.951,表明药师处方审核专业胜任力评价指标信效度较好。1050 名受访者中,女性居多,占 77.143%;30~39 岁人员占比 43.619%;本科及以上学历占比为 81.048%;中级职称所占比例接近 50%,为 48.571%;西药调剂岗位占比最大,为 48.381%;三级医疗机构占比

最高,为 55.810%;调查人员在湖南省 14 个地市州均有分布,详见表 1。

表 1 受访药师的基本资料(n=1050)  
Tab 1 Basic information of surveyed pharmacists (n=1050)

| 项目         | 人数  | 构成比/%  | 项目         | 人数  | 构成比/%  |
|------------|-----|--------|------------|-----|--------|
| 性别         |     |        | 大专         | 178 | 16.952 |
| 男          | 240 | 22.857 | 本科         | 748 | 71.238 |
| 女          | 810 | 77.143 | 硕士及以上      | 103 | 9.810  |
| 年龄/岁       |     |        | 职称         |     |        |
| <30        | 143 | 13.619 | 无          | 15  | 1.429  |
| 30~39      | 458 | 43.619 | 药士         | 36  | 3.429  |
| 40~49      | 359 | 34.190 | 药师         | 242 | 23.048 |
| ≥50        | 90  | 8.571  | 主管药师       | 510 | 48.571 |
| 所在地区       |     |        | 副主任药师      | 219 | 20.857 |
| 长沙市        | 77  | 7.333  | 主任药师       | 28  | 2.667  |
| 株洲市        | 73  | 6.952  | 工作年限       |     |        |
| 湘潭市        | 36  | 3.428  | ≤5年        | 106 | 10.095 |
| 衡阳市        | 65  | 6.191  | 6~10年      | 220 | 20.952 |
| 邵阳市        | 93  | 8.857  | 11~15年     | 282 | 26.857 |
| 岳阳市        | 56  | 5.333  | 15~20年     | 100 | 9.524  |
| 常德市        | 66  | 6.286  | 20年以上      | 342 | 32.571 |
| 张家界市       | 75  | 7.143  | 岗位         |     |        |
| 益阳市        | 143 | 13.619 | 药品采购供应     | 122 | 11.619 |
| 郴州市        | 61  | 5.801  | 中药调剂       | 76  | 7.238  |
| 永州市        | 54  | 5.143  | 西药调剂       | 508 | 48.381 |
| 怀化市        | 99  | 9.429  | 临床药学       | 190 | 18.095 |
| 娄底市        | 75  | 7.143  | 处方审核       | 61  | 5.810  |
| 湘西土家族苗族自治州 | 77  | 7.333  | 静脉配置中心     | 40  | 3.810  |
| 医院等级       |     |        | 医院制剂       | 12  | 1.143  |
| 三级医疗机构     | 586 | 55.810 | 其他         | 41  | 3.905  |
| 二级医疗机构     | 316 | 30.095 | 是否参加临床药师培训 |     |        |
| 一级医疗机构     | 148 | 14.095 | 否          | 837 | 79.714 |
| 学历         |     |        | 半年通科       | 70  | 6.667  |
| 中专         | 21  | 2.000  | 一年制        | 143 | 13.619 |

**2.2 评价指标探索**  
**2.2.1 函询专家可靠性分析** 本研究共纳入函询专家 26 名,博士研究生 4 人,硕士研究生 10 人,本科 11 人,本科以下 1 人;高级职称 19 人;工作年限 10~20 年 7 人,20 年以上 15 人,10 年以下 4 人。对上述专家进行两轮函询,均发出问卷 26 份,两轮均全部收回,有效回收率为 100%,分别有 12 人及 5 人进行提出修改意见,两轮函询提意见率为 46.154% 及 20.833%,表明专家的积极性均较高<sup>[15]</sup>。第一、二轮专家函询的总体 Kendall's W 值分别为 0.106 及 0.114 (P<0.05)。通过两轮函询后,有 4 名专家提出将具体的基本知识与相应技能进行整合,即将一级指标合并为“基本知识与职业技能”,2 名专家建议增设“教学能力”的提问,2 名专家建议增设“专业认可度”的提问,1 名专家建议增设对“医保、集采政策了解程度的提问”,经研究小组讨论后,合并并修改一级指标 3

项，二级指标 17 项。

2.2.2 处方审核专业胜任力模型构建及检验

① 模型构建：本研究采用探索性因子分析来判断各指标维度以及相应条目是否需要进行调整。因子分析是一种从变量群中提取共性因子的统计技术，具体步骤包括：首先判断是否适宜进行因子分析，判断标准为 KMO 值  $> 0.6$ ；其次，判断因子与题项的对应关系，因子载荷系数绝对值应大于  $0.4^{[16]}$ ；再次，结合因子与题项的对应关系对因子进行命名。

经检验，本研究的 KMO 值为 0.951，样本分布的 Bartlett 球形检验  $\chi^2 = 12\,174.030$ ， $P < 0.05$ ，说明适宜进行因子分析。对 17 项二级指标进行因子提取，对因子载荷矩阵进行旋转后提取特征根  $> 1$  的因子，最终确定出 3 个公因子，其特征值分别为 56.06、8.277、5.997，因子方差贡献率分别为 31.379%、23.610%、15.350%，累计方差贡献率为 70.339%，其中一项二级指标“医保、集采政策了解程度”因特征根  $< 1.0$  被删除。根据对应条目内容，将 3 个公因子依次命名为基本知识及职业技能、内驱力、科研教学能力（具体指标见表 2），最终确定了医院药师处方审核专业胜任力指标体系，包括一级指标 3 项，二级指标 16 项。

表 2 医院药师处方审核专业胜任力指标的探索性因子分析结果  
Tab 2 Exploratory factor analysis of indicators for prescription review competence of hospital pharmacists

| 二级指标      | 公因子 1 (基本知识及职业技能) | 公因子 2 (内驱力) | 公因子 3 (科研教学能力) |
|-----------|-------------------|-------------|----------------|
| 药物治疗评价能力  | 0.783             |             |                |
| 循证应用能力    | 0.767             |             |                |
| 掌握药物治疗学知识 | 0.757             |             |                |
| 归纳总结能力    | 0.748             |             |                |
| 药物治疗管理能力  | 0.741             |             |                |
| 解决问题能力    | 0.717             |             |                |
| 掌握药理学知识   | 0.645             |             |                |
| 学习发展能力    | 0.626             |             |                |
| 处方调剂能力    | 0.695             |             |                |
| 同理心       |                   | 0.844       |                |
| 沟通协调能力    |                   | 0.712       |                |
| 成就感       |                   | 0.692       |                |
| 专业认可度     |                   | 0.653       |                |
| 科研能力      |                   |             | 0.809          |
| 科普传播能力    |                   |             | 0.798          |
| 教学能力      |                   |             | 0.672          |

② 模型检验：验证性因子分析结果显示，模型  $\chi^2$  为 1254.574，自由度为 12.433，近似误差均方根 (RMSEA) 为 0.104，均方根残差 (root mean square residual, RMR) 为 0.028，拟合优度指数 (goodness of fit index, GFI) 为 0.850，比较拟合指

数 (comparative fit index, CFI) 为 0.905，标准拟合指数 (normed fit index, NFI) 为 0.898，提示模型的拟合程度较好。同时，3 个一级指标的组合信度 (CR 值) 为 0.937、0.840、0.842，平均方差抽取量 (average variance extracted, AVE) 为 0.624、0.569、0.641，说明模型的聚合度较好。进一步的信度分析结果显示，模型的总 Cronbach'  $\alpha$  系数为 0.946，基本知识及职业技能、内驱力、科研教学能力 3 个一级指标维度的 Cronbach'  $\alpha$  系数分别为 0.935、0.841、0.836，均大于 0.8，说明模型可靠性较好<sup>[17]</sup>。

2.2.3 权重计算 结果显示，一级指标中，基本知识及职业技能的权重最大 (79.7%)，其次是内驱力 (11.8%) 及科研教学能力 (8.5%)，具体见表 3。

2.3 医疗机构药师处方审核专业胜任力现状

调研结果显示，基本知识及职业技能中权重得分排名前 2 位的是掌握药物治疗学知识的能力及解决问题的能力；内驱力中权重得分排名前 2 位的是沟通协调能力及专业认可度；科研教学能力中排名靠前的是科普传播能力及教学能力。

2.3.1 不同等级医疗机构药师专业胜任力评价

三级医疗机构在基本知识及职业技能、内驱力、科研教学及综合能力方面自评分均高于一、二级医疗机构 ( $P$  值均  $< 0.01$ )，但一、二级医疗机构自评分在上述四个方面无显著差异 ( $P$  值分别为 0.830、0.404、0.191、0.736)，具体见表 4。

2.3.2 不同岗位药师专业胜任力评价 工作在不同岗位的药师其处方审核专业能力均有差异 ( $P$  值均  $< 0.01$ )，根据多重比较结果显示，临床药师在基本知识及职业技能自评分最高，但是仅与西药调剂岗位存在显著性差异 ( $P$  值  $< 0.01$ )，与其他岗位无显著性差异 ( $P$  值  $> 0.05$ )；静脉配置中心岗位药师在科研教学方面自评分最高，但是与临床药师岗位无显著性差异 ( $P$  值  $> 0.05$ )。综合能力方面临床药师自评分最高，与中药调剂 ( $P = 0.034$ ) 及西药调剂岗位 ( $P < 0.001$ ) 存在显著性差异，与其他岗位无显著性差异 ( $P$  值  $> 0.05$ )；内驱力方面药品采购岗位自评分最高。所有的岗位中人数最多的是西药调剂岗位，其基本知识及职业技能方面低于临床药学、药品采购供应岗位 ( $P$  值均  $< 0.01$ )，在内驱力方面低于临床药学、药品采购岗位、专职处方审核岗位 ( $P < 0.01$ 、 $< 0.01$ 、0.029)，在科研教学方面及综合能力方面低于临床药学、药品采购岗位 ( $P$  值均  $< 0.01$ )，但与其他岗位自评分差异无统计学意义 (具体情况见表 5)。

2.3.3 不同地区药师专业胜任力评价 由于此前处方审核培训在全省 14 个地市州均开设了为期

表 3 处方审核药师岗位胜任力评价指标体系及权重得分

Tab 3 Evaluation index system and weight scores for pharmacists' prescription review competence

| 一级指标 / 权重         | 二级指标 / 权重           | 题项                                                                                                                     | 平均权重得分      |
|-------------------|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| 基本知识及职业技能 (79.7%) | 药物治疗评价能力 (7.85%)    | 您认为您是否具备药物治疗评价能力 (对药物的安全性、有效性以及经济性进行评价, 制定适当的治疗方案, 促进临床合理用药的能力)                                                        | 2.517±0.918 |
|                   | 循证应用能力 (7.38%)      | 您认为您是否具备将循证医学证据运用于处方审核的能力                                                                                              | 2.399±0.537 |
|                   | 掌握药物治疗学知识能力 (7.84%) | 您认为您是否具备药物治疗学知识的掌握 (指掌握药学专业知识和临床药物治疗学知识, 参与和配合临床药物治疗) 的能力                                                              | 2.618±0.554 |
|                   | 归纳总结能力 (7.45%)      | 您认为您是否具备采集与分析信息能力, 如通过传媒、会议等多种形式, 快速获取大量信息并进行归纳总结                                                                      | 2.458±0.539 |
|                   | 药物治疗管理能力 (7.48%)    | 您认为您是否具备药物治疗管理能力 [在药物使用过程中, 通过对用药不良反应及疗效、治疗药物监测 (TDM) 结合各种实验室检查数据给予干预性意见以及患者教育, 并适时跟进、分析、协调沟通和统筹规划, 尽可能使患者获得最佳治疗效果的能力] | 2.362±0.596 |
|                   | 解决问题能力 (7.64%)      | 您认为您是否具备发现、分析和解决药物相关 (如药物治疗、药物配制、药品管理等) 问题的能力                                                                          | 2.596±0.519 |
|                   | 掌握药理学计算知识能力 (6.54%) | 您是否能掌握药物所需要的剂量、浓度、单位转换、疗程等, 可针对特殊人群如儿童、老年人、妊娠期及哺乳期妇女、肾功能不全人群快速进行剂量计算                                                   | 2.207±0.528 |
|                   | 学习发展能力 (6.92%)      | 您认为您是否具备不断学习、提高技能, 通过汲取自己或他人的经验教训、科研成果等, 获得有利于未来发展的能力                                                                  | 2.431±0.485 |
|                   | 处方调剂能力 (5.49%)      | 您认为您是否具备处方调剂能力 (指认真审核处方, 准确调配药品, 并进行用药交代与指导, 开展处方点评工作)                                                                 | 2.063±0.366 |
|                   | 同理心 (3.72%)         | 您认为您是否具备同理心 (指能够站在对方立场设身处地思考问题, 能够认真倾听、换位思考、表达尊重、情绪自控, 理解他人的立场和感受)                                                     | 1.438±0.237 |
| 内驱力 (11.8%)       | 沟通协调 (5.55%)        | 您认为您是否具备沟通协调能力                                                                                                         | 2.042±0.371 |
|                   | 成就感 (5.52%)         | 您认为您是否具备获得感 (有强烈的追求工作成功的愿望, 挑战自我, 关注自身职业生涯的发展, 追求事业的成功和卓越)                                                             | 1.854±0.371 |
|                   | 专业认可度 (5.53%)       | 您认为您专业能力被认可度的情况如何                                                                                                      | 1.955±0.344 |
|                   | 科研能力 (5.11%)        | 您认为您是否具备科研能力 (申报科研课题或撰写科研论文)                                                                                           | 1.329±0.454 |
|                   | 科普传播能力 (5.40%)      | 您认为您是否具备科普传播能力 (如撰写科普文章、拍摄科普视频或编制科普图册等)                                                                                | 1.628±0.428 |
| 科研教学能力 (8.5%)     | 教学能力 (5.11%)        | 您认为您是否具备带教学生的能力                                                                                                        | 1.664±0.402 |

表 4 不同级别医院药师处方审核岗位胜任力结果 (n = 1050)

Tab 4 Prescription review competence outcomes of pharmacists in different hospitals (n = 1050)

| 地区   | 基本知识及职业技能 |       |        | 内驱力   |       |       | 科研教学能力 |       |        | 综合能力   |       |        |
|------|-----------|-------|--------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|
|      | 权重得分      | 标准差   | P      | 权重得分  | 标准差   | P     | 权重得分   | 标准差   | P      | 权重得分   | 标准差   | P      |
| 三级医院 | 22.223    | 3.891 | < 0.01 | 7.409 | 1.113 | 0.001 | 16.313 | 6.915 | < 0.01 | 19.973 | 3.676 | < 0.01 |
| 二级医院 | 21.303    | 3.579 |        | 7.140 | 1.004 |       | 13.486 | 6.099 |        | 18.968 | 3.328 |        |
| 一级医院 | 21.008    | 4.177 |        | 7.228 | 1.159 |       | 12.324 | 6.772 |        | 18.644 | 3.769 |        |

近 2 个月的线下培训班, 故参与调研的药师分布在 14 个地市州。根据结果显示, 各地市州在基本知识及职业技能方面差异无统计学意义 ( $P = 0.081$ ), 其中湘潭药师自评分高于株洲、邵阳、常德、张家界、益阳、永州 ( $P$  均  $< 0.05$ ), 长沙药师自评分高于张家界及益阳 ( $P$  均  $< 0.05$ ), 但长沙与湘潭之间差异无统计学意义 ( $P = 0.179$ )。内驱力方面各地州市差异存在统计学意义 ( $P = 0.001$ ), 长沙、湘潭高于除了郴州、娄底以外其他 10 个地市州 ( $P$  均  $< 0.05$ ), 但长沙与湘潭之间差异无统计学意义 ( $P = 0.380$ )。科研教学能力方面各地州市差异存在统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 其中长沙、湘潭、衡阳评分高于其他地市州 ( $P$  均  $< 0.05$ )。综合能力方面各地州市差异存在统计学意义 ( $P = 0.028$ ), 其中长

沙、湘潭评分高于除衡阳、岳阳、怀化、娄底、湘西自治州以外的 7 个地市州 ( $P$  均  $< 0.05$ ), 长沙与湘潭综合能力评分差异无统计学意义 ( $P = 0.235$ )。张家界在基本知识及职业技能、科研教学及综合评分相对较低 (见表 6)。

3 讨论

3.1 评价指标探索

目前, 药师药学服务胜任力主要参考 2017 年由中国药师协会牵头制定的《药师药学服务胜任力评价标准 (试行)》版本, 该版本涉及药学工作各方面, 对于处方审核专业能力的评价不够精准。故本研究在该评价标准的版本之上, 成立专门研究小组制定了《医疗机构药师处方审核专业胜任力的评价标准》, 结合文献并通过两轮专家函询以及最终的调查问卷确定了所有的评价指



表 5 不同岗位药师处方审核胜任力结果 (n = 1050)

Tab 5 Prescription review competence outcomes of pharmacists in different positions (n = 1050)

| 岗位     | 基本知识与技能 |       |        | 内驱力   |       |        | 科研教学能力 |       |        | 综合能力   |       |       |
|--------|---------|-------|--------|-------|-------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|-------|
|        | 权重得分    | 标准差   | P      | 权重得分  | 标准差   | P      | 权重得分   | 标准差   | P      | 权重得分   | 标准差   | P     |
| 药品采购供应 | 22.645  | 3.507 | < 0.01 | 7.559 | 0.960 | < 0.01 | 16.677 | 6.494 | < 0.01 | 20.359 | 3.216 | 0.003 |
| 中药调剂   | 21.797  | 3.863 |        | 7.257 | 0.980 |        | 14.085 | 5.963 |        | 19.426 | 3.516 |       |
| 西药调剂   | 21.003  | 3.607 |        | 7.136 | 1.047 |        | 13.665 | 6.175 |        | 18.743 | 3.346 |       |
| 临床药学   | 22.932  | 4.353 |        | 7.548 | 1.192 |        | 16.711 | 8.183 |        | 20.586 | 4.150 |       |
| 处方审核   | 22.687  | 4.256 |        | 7.457 | 1.237 |        | 15.341 | 7.781 |        | 20.266 | 4.062 |       |
| 静脉配制中心 | 22.219  | 3.808 |        | 7.403 | 1.159 |        | 16.739 | 7.379 |        | 20.005 | 3.678 |       |
| 医院制剂   | 21.305  | 3.251 |        | 6.946 | 1.182 |        | 12.960 | 4.456 |        | 18.901 | 3.037 |       |
| 药事管理   | 21.970  | 3.651 |        | 7.526 | 1.207 |        | 14.613 | 4.842 |        | 19.641 | 3.288 |       |
| 其他     | 21.777  | 3.801 |        | 7.105 | 1.082 |        | 15.484 | 7.120 |        | 19.511 | 3.661 |       |

表 6 14 个市州药师处方审核岗位胜任力结果 (n = 1050)

Tab 6 Prescription review competence outcomes of pharmacists from 14 cities/prefectures (n = 1050)

| 地区         | 基本知识与技能 |       |       | 内驱力   |       |       | 科研教学能力 |       |        | 综合能力   |       |       |
|------------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|--------|-------|-------|
|            | 权重得分    | 标准差   | P     | 权重得分  | 标准差   | P     | 权重得分   | 标准差   | P      | 权重得分   | 标准差   | P     |
| 长沙市        | 22.413  | 3.866 | 0.081 | 7.580 | 1.068 | 0.001 | 17.140 | 6.627 | < 0.01 | 20.214 | 3.627 | 0.028 |
| 株洲市        | 21.033  | 3.865 |       | 6.990 | 1.114 |       | 13.488 | 7.083 |        | 18.735 | 3.622 |       |
| 湘潭市        | 23.419  | 4.443 |       | 7.772 | 1.142 |       | 17.626 | 7.569 |        | 21.080 | 4.197 |       |
| 衡阳市        | 22.166  | 3.213 |       | 7.275 | 1.035 |       | 16.284 | 5.780 |        | 19.909 | 3.027 |       |
| 邵阳市        | 21.483  | 3.592 |       | 7.286 | 1.024 |       | 14.669 | 6.181 |        | 19.228 | 3.401 |       |
| 岳阳市        | 21.906  | 3.402 |       | 7.313 | 1.108 |       | 14.678 | 6.359 |        | 19.570 | 3.220 |       |
| 常德市        | 21.689  | 4.348 |       | 7.296 | 1.016 |       | 15.031 | 6.494 |        | 19.425 | 3.951 |       |
| 张家界市       | 20.950  | 4.104 |       | 7.007 | 1.142 |       | 12.879 | 6.356 |        | 18.619 | 3.714 |       |
| 益阳市        | 21.244  | 3.787 |       | 7.215 | 1.029 |       | 13.164 | 6.748 |        | 18.902 | 3.471 |       |
| 郴州市        | 21.849  | 4.115 |       | 7.550 | 1.031 |       | 14.899 | 7.376 |        | 19.571 | 3.910 |       |
| 永州市        | 21.541  | 4.080 |       | 7.255 | 1.222 |       | 15.253 | 7.953 |        | 19.321 | 3.961 |       |
| 怀化市        | 22.030  | 3.883 |       | 7.246 | 1.142 |       | 15.232 | 7.339 |        | 19.708 | 3.691 |       |
| 娄底市        | 22.047  | 3.915 |       | 7.614 | 1.078 |       | 15.452 | 6.704 |        | 19.783 | 3.610 |       |
| 湘西土家族苗族自治州 | 22.208  | 3.727 |       | 7.181 | 1.091 |       | 15.303 | 6.594 |        | 19.848 | 3.514 |       |

标,删除了原评价标准中关于职业道德部分,对专业知识和专业技能进行了合并,并增加了针对性更强的条目,如循证能力、调剂能力、被认可度、科研教学能力等。根据因子分析理论模型并结合实际情况提取了 3 个公因子,构建了基本知识及职业技能、内驱力、科研教学能力为一级指标,相应评价条目为二级指标的评价体系。同时又采用验证性因子分析法对该模型进行了验证。模型整体及各一级指标的 Cronbach's  $\alpha$  系数均大于 0.80,模型验证性因子分析的 GFI、CFI、NFI 分别为 0.850、0.905、0.898,提示模型拟合度和可靠性均较好。此外,本研究应用主成分分析法得出各评价指标的权重分值,也可以为该评价指标的实际应用奠定基础。

3.2 医疗机构药师处方审核专业胜任力现状

在基本知识与职业技能方面,处方调剂能力总体得分 [(2.063±0.366) 分] 最低,该能力侧重于处方审核、用药交代及处方点评的综合性工作,得分较低可能与基层药师工作负荷大,机械化操作多,缺乏系统审核培训相关<sup>[8]</sup>。在内驱力方面,同理心总体得分最低 [(1.438±0.237) 分],该能

力侧重于是否能站在患者立场上设身处地思考问题,理解他人的立场和感受,得分较低可能涉及药师与患者直接沟通机会较少有关(如西药调剂岗位以流程性工作为主),需加强“以病人为中心”的服务理念<sup>[18]</sup>。在科研教学方面,科研能力得分最低 [(1.329±0.454) 分],该能力指申报科研课题或撰写科研论文的能力,得分较低从侧面反映基层药师在实际工作中一方面对于科研的需求有限,所占权重也较低,另一方面科研能力属于进一步的延伸能力,提升方面难度更大。提示我们今后的培训应在处方审核的基础上,加强用药交代及处方点评能力、沟通交流、科研能力方面的课程设计。

在不同等级医疗机构中,三级医疗机构药师在各方面能力自评分高于一、二级医疗机构,其原因可能与三级医院药师接受过更多的在职培训,其处方审核任务更复杂,同时三级医院药师有更强的职业自信有关<sup>[18]</sup>。但一、二级医疗机构自评分无显著性差异。在参与调研的药师中,一级医疗机构药师仅 148 人(占比 14.095%),二级医疗机构药师 316 人(占 30.095%),人数偏少,

各方面能力尚待提高,故下一步处方审核培训应以覆盖一、二级医疗机构药师为主。

在不同岗位药师中,临床药师各方面能力自评评分较高,与近年来国家不断加强临床药理学学科建设的各项举措是分不开的<sup>[19-20]</sup>。西药调剂岗位是实施处方审核最重要的岗位,同时也是人数最庞大的岗位,故强化调剂岗位药师能力提升对于患者用药安全的保障作用更为突出。

在全省 14 个地州市中,长沙、湘潭两个市的各方面能力自评评分较高,原因可能在于参与调研的药师主要分布在三级医疗机构,且这两个市属于经济发达地区,其三级医疗机构实力较强,其药师能力相对更强。自评评分相对较低的是张家界,主要原因可能与处方审核培训班开班时间是 2024 年末在张家界进行的专项培训,其中乡镇基层医疗机构及民营医院人数占培训班总人数的 75% 以上,虽然自评评分较低,但是这意味着最基层医疗机构药师对于提升自身能力的主动性在逐渐提高,有着重大的战略意义。

#### 4 局限性

本研究尚存在一定的局限性:调查问卷主要面向接受处方审核培训后的药师发放,尚缺少对其他医务人员及患者的调研,且参与研究的药师全部为医疗机构的药师,尚无社会药房的药师,目前湖南省药学会已启动针对社会药房药师的培训,后续的研究中可考虑增加该部分人群。

#### 5 结论与建议

在不同的岗位,不同等级的医院,药师可能从事不一样的工作,但处方审核是药师的基本功,以处方审核能力为切入口,评估药师现行专业胜任力是可行的。现有学习/培训体系有待进一步改进,下一步需加强各市州一、二级基层医疗机构药师以及医疗机构内调剂药师的培训,甚至需要政府部门推动医联体与医共体的联动,加强上级医院对下级医院药师的指导,完善医共体内区域审方中心的建立,进一步提升基层医疗机构药师处方审核能力,以更好地促进药师专业胜任力的提升。

#### 参考文献

- [1] 国家卫生健康委员会办公厅,国家中医药管理局办公室,中央军委后勤保障部办公厅.关于印发医疗机构处方审核规范的通知[J].中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会公报,2018(7):35-38.
- [2] 林平,甄健存,卢晓阳,等.处方审核标准制订与解析[J].医药导报,2022,41(11):1627-1631.
- [3] 汪永忠,李颖,刘剑,等.360 度考评法在中药临床药师岗位胜任力评价中的探索[J].中国中医药现代远程教育,

- 2023,21(22):156-159.
- [4] 李建容,谭安军,易珍奎,等.岗位胜任力视角下三级医院临床药师评价指标体系构建[J].重庆医学,2024,53(13):2070-2073.
- [5] 董瑞,陈侠李.基于德尔菲法的临床药师岗位胜任力评价指标体系研究[J].中国药物与临床,2024,24(15):1000-1005.
- [6] 李嘉琪,王佳琦,盛梦迪,等.基于内容分析法的临床药师岗位胜任力指标构建[J].中国药师,2024,27(2):325-335.
- [7] 闫存玲,邢玥.基于因子分析和模糊综合评价法的医院[J].中国药房,2022,33(2):240-243.
- [8] 郑明琳,胡晨吉,王瑾,等.某院调剂药师岗位胜任能力与继续教育培训现状调查与分析[J].中国药业,2022,31(14):39-43.
- [9] 中国药师协会.药师药学服务胜任力评价标准(试行)[J].中国合理用药探索,2017,14(9):1-2.
- [10] 马旖旎,张哲弢,邓晓媚,等.“1+X”网格化模式在审方药师药学服务胜任力培养中的应用和实践[J].安徽医药,2025,29(1):200-205.
- [11] 张志院,刘万芳.基于冰山模型及双螺旋模型构建医疗护理员培训师胜任力评价指标体系[J].护理研究,2023,37(4):691-696.
- [12] Desselle SP, Carter S, Lucas C. A call for further study and use of transformational leadership in pharmacy education and practice: hope and reinvigoration [J]. Res Social Adm Pharm, 2025, 21(1): 67-70.
- [13] 龚法妹,李华萍,陈楚.基于冰山模型构建社区护士老年常见慢性病护理胜任力评价指标体系[J].循证护理,2025,11(3):507-513.
- [14] Terry DR, Peck B, Hills D, et al. The pharmacy community apgar questionnaire: a modified delphi technique to develop a rural pharmacist recruitment and retention tool [J]. Rural Remote Health, 2022, 22(4): 7347.
- [15] 沈明辉,刘洋,毛云鹏,等.基层医疗卫生机构服务能力评价指标体系构建与应用-基于主成分分析法[J].卫生经济研究,2023,11(40):39-43.
- [16] Crafford L, Kusurkar R, Bronkhorst E, et al. Understanding of healthcare professionals towards the roles and competencies of clinical pharmacists in South Africa [J]. BMC Health Serv Res, 2023, 23(1): 290.
- [17] 郭建飞,韩晟,陈敬,等.药品注册专员岗位胜任力评价指标体系的构建[J].中国药房,2021,32(9):1045-1050.
- [18] 魏春燕,陈沁敏,安静,等.基于药学服务胜任力标准转化的药师胜任力现状和需求调查[J].中国药学杂志,2023,58(13):1236-1244.
- [19] 国家卫生健康委员会,国家中医药管理局.关于加快药学服务高质量发展的意见[EB/OL].国卫发〔2018〕45号.(2018-11-21)[2023-03-14].[http://www.gov.cn/gongbao/content/2019/content\\_5380378.htm](http://www.gov.cn/gongbao/content/2019/content_5380378.htm).
- [20] 中国医院协会.《医疗机构药事管理与药学服务》九项团体标准[EB/OL].(2022-12-20)[2023-03-14].[http://www.cha.org.cn/site/content/a\\_fa2d1bd90bd19ac2dfa0bc027fbc19.html](http://www.cha.org.cn/site/content/a_fa2d1bd90bd19ac2dfa0bc027fbc19.html).

(收稿日期:2025-03-18;修回日期:2025-05-27)

# 药师岗位与湖南省处方审核培训满意度的 Logistic 回归分析

周菊香<sup>1</sup>, 邓紫薇<sup>2</sup>, 刘丽华<sup>3</sup>, 朱运贵<sup>4</sup>, 李献忠<sup>4</sup>, 张超<sup>4</sup>, 李艳飞<sup>1\*</sup>, 李焕德<sup>5\*</sup> (1.邵阳市中心医院, 湖南 邵阳 422000; 2.湖南医药学院总医院, 湖南 怀化 418000; 3.长沙市第三医院 湖南大学附属长沙医院, 长沙 410005; 4.湖南省药学会, 长沙 410005; 5.中南大学湘雅二医院, 长沙 410005)

**摘要:** **目的** 调查湖南省处方审核培训药师满意度并分析其影响因素, 提出改进策略与建议。**方法** 以 2019 年 1 月至 2024 年 12 月参加湖南省处方审核培训的药学专业技术人员为调查对象。采用匿名自填问卷的方式进行调查。调查内容包括学员的基本信息和培训满意度等。对所有满意度评分进行赋分并相加作为因变量, 所有药师的基本情况及其参加处方审核培训的必要性作为自变量, 利用 Logistic 回归分析影响满意度的因素。**结果** 用满意度总分的平均值作为截点值将药师分为高分组和低分组。对药师的基本资料和参加培训的必要性与总体满意度进行单因素及多因素 Logistic 回归分析。模型 1 调整了协变量年龄、性别, 模型 2 调整了协变量年龄、性别、取得临床药师培训证情况、医院等级, 药师所在岗位中药调剂、西药调剂、临床药学与培训总体满意度稳定相关 ( $P < 0.05$ ), 模型 2 对应的  $P$  值分别为 0.043、0.038、0.024。其他岗位与培训总体满意度均不相关 ( $P > 0.05$ )。**结论** 验证了现行培训体系的基础合理性, 更指明通过“稳共性、强特色”的策略, 可在现有成果上进一步释放岗位潜能, 实现培训效率与满意度的双重跃升。

**关键词:** 药师岗位; 处方审核; 培训满意度; Logistic 回归

中图分类号: R95 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)08-2328-06  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.028

## Logistic regression of pharmacist position and satisfaction with prescription review training in Hunan

ZHOU Ju-xiang<sup>1</sup>, DENG Zi-wei<sup>2</sup>, LIU Li-hua<sup>3</sup>, ZHU Yun-gui<sup>4</sup>, LI Xian-zhong<sup>4</sup>, ZHANG Chao<sup>4</sup>, LI Yan-fei<sup>1\*</sup>, LI Huan-de<sup>5\*</sup> (1. The Central Hospital of Shaoyang, Shaoyang Hunan 422000; 2. Hunan University of Medicine General Hospital, Huaihua Hunan 418000; 3. The Third Hospital of Changsha, The Affiliated Changsha Hospital of Hunan University, Changsha 410005; 4. Hunan Pharmaceutical Association, Changsha 410005; 5. The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410005)

**Abstract: Objective** To determine the satisfaction levels and influencing factors among pharmacists in prescription review training in Hunan, and to propose improvement strategies and recommendations. **Methods** Pharmacists who engaged in prescription review training in Hunan between January 2019 and December 2024 were chosen. An anonymous, self-administered questionnaire was used for data collection. The survey included trainee demographic information and training satisfaction. Satisfaction scores were computed and compiled as dependent variables, while the demographic information of the surveyed pharmacists and the necessity of attending such training served as independent variables. Logistic regression was used to pinpoint factors affecting the satisfaction level. **Results** The mean satisfaction score was used as the threshold to group pharmacists into high and low satisfaction categories. Univariate and multivariate logistic regression analyses were conducted

**基金项目:** 湖南省自然科学基金资助项目 (No.2023JJ50252)。

**作者简介:** 周菊香, 女, 副主任药师, 主要从事临床药学研究, email: juxiang2011@126.com \*通信作者: 李艳飞, 女, 主任药师, 主要从事临床药学研究, email: 250488983@qq.com; 李焕德, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事临床药学研究, email: lihuande1953@126.com



to assess the relationship between pharmacists' demographic information, necessity of training, and overall satisfaction. In Model 1 age and gender were adjusted, while in Model 2 pharmacist training certification status and hospital level were adjusted. Pharmacists' position in traditional Chinese medicine dispensing, Western medicine dispensing, and clinical pharmacy showed consistent positive correlations with the overall training satisfaction ( $P < 0.05$ ), with corresponding  $P$ -values of 0.043, 0.038, and 0.024 in Model 2, respectively. Other positions did not show a significant correlation with the overall training satisfaction ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The existing training system is rational and basically satisfactory. By strengthening basics and featuring characteristics, the potential of various positions can be further released, thus enhancing training efficiency and satisfaction.

**Key words:** pharmacist position; prescription review; training satisfaction; Logistic regression

处方审核是医院药师的基本职责,是保障患者用药安全的重要途径<sup>[1]</sup>。2018年11月,国家卫生健康委发布《关于加快药学服务高质量发展的意见》,提出探索建立医疗联合体内的药学服务标准或规范,并强调要加强处方审核。目前,多项研究表明<sup>[2-4]</sup>处方审核工作有助于优化处方质量、提升用药合理性、助力医疗事业安全发展进程。本研究以湖南省参加处方审核培训的药师为研究对象,调查湖南省处方审核培训药师满意度,分析其影响因素,提出改进策略与建议。

## 1 对象和方法

### 1.1 调查方法

问卷调查采用网络填写的方式,采用方便抽样的方法,以2019年1月至2024年12月参加湖南省处方审核培训的药学专业技术人员为调查对象。共计1086人参与本次调查,经审核,剔除有逻辑错误和填写不完整问卷36份,最终得到有效问卷1050份,有效回收率为96.7%。

### 1.2 问卷设计

通过中国知网(CNKI)、万方等数据库收集药师处方审核及培训、药师问卷调查等文献资料,结合湖南省处方审核培训的实际情况设计了《湖南省处方审核培训调查问卷(学员)》,研究小组围绕研究主题制定了进行两轮专家函询。采用匿名自填问卷的方式进行调查。调查内容包括学员的基本信息、培训结束后效果评价、审方药师岗位胜任力调查、培训现状和培训满意度调查、下一步培训需求等。

### 1.3 统计学方法

通过问卷星平台生成数据并导出,正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,采用 $t$ 检验;计数资料以相对构成比(%)或率(%)表示,采用 $\chi^2$ 检验;不服从正态分布的计量资料以中位数(四分位数) $[M(P_{25}, P_{75})]$ 表示,采用Mann-Whitney  $U$ 检验。分类变量描述为例数和百

分比(%) , 组间比较采用 Fisher 精确检验。

对所有满意度评分进行赋分并相加,根据满意度总分的分布情况,把满意度总分的平均值作为截点把药师分为二分类变量高分组和低分组作为因变量<sup>[5]</sup>。所有调查药师的基本情况 & 参加处方审核培训班的必要性作为自变量,利用 Logistic 回归分析影响满意度的因素。如果存在以下标准之一,则调整潜在的混杂因素:①基于文献的混杂因素;②单变量分析中 $P < 0.1$ ;③协变量筛选中的效应值变化 $> 10\%$ 。本研究所有分析使用统计软件包 R (<http://www.R-project.org>, R Foundation) 和风锐免费统计软件 1.9 版进行所有分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 满意度赋值

对处方审核培训内容、形式、师资、教材、组织管理及课程安排、考核体系开展了满意度调查,将满意度按等级分为非常不满意、不满意、一般、满意、非常满意分别对应1、2、3、4、5进行赋值,满意度总分为所有满意度调查评分之和。由满意度总分分布(见图1)可以得出满意度总分为非正态分布。

### 2.2 调查药师基本情况

满意度总分的平均值作为截点值将药师分为高分组、低分组。收集了1050名药师的基本资料及满意度情况,30~39岁和40~49岁的人群占比分别为43.6%、34.2%。药师中女性居多,占77.1%;收集的调查地区其中益阳市人数最多为142名,占比为13.5%;三级医疗机构占比最高,为55.8%;所在岗位西药调剂岗位占比最大,为48.4%;本科学历占比最高,为71.2%;工作年限大于20年的药师有32.6%;调查药师的职称主管药师的占比最高,为48.6%;没有取得临床药师培训证的人占有79.7%,具体见表1。80.9%的药师认为非常有必要参加处方审核培训班。同

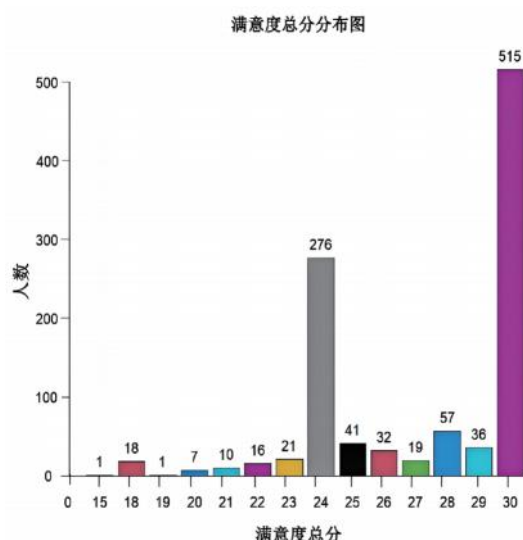


图 1 满意度总分分布图

Fig 1 Distribution of total satisfaction score

时对方审核培训内容、形式、师资、教材、组织管理及课程安排、考核体系开展了满意度调查,其中对方审核培训师资“非常满意”的学员占比最高,为 62.5%,具体见表 2。

### 2.3 影响药师培训总体满意度的单因素 Logistic 回归分析

对药师的基本资料和参加培训的必要性与总体满意度进行单因素 Logistic 回归分析。分析结果提示药师所在岗位中药调剂、西药调剂、临床药学与培训总体满意度相关 ( $P < 0.05$ ),对应的  $P$  值分别为 0.035、0.025、0.002。药师其他的基本资料及参加培训的必要性与总体满意度不相关,具体见表 3。

### 2.4 药师所在岗位与总体满意度的多因素 Logistic 回归分析

模型 1 调整了协变量年龄、性别后,药师所在岗位中药调剂、西药调剂、临床药学与培训总体满意度稳定相关 ( $P < 0.05$ ),对应的  $P$  值分别为 0.041、0.020、0.001。模型 2 调整了协变量年龄、性别、取得临床药师培训证情况、医院等级后,药师所在岗位中药调剂、西药调剂、临床药学与培训总体满意度仍然稳定相关 ( $P < 0.05$ ),对应的  $P$  值分别为 0.043、0.038、0.024。其他岗位与培训总体满意度不相关 ( $P > 0.05$ ),具体结果见表 4。

## 3 讨论

### 3.1 岗位差异对满意度的影响

处方前置审核是医院处方管理的一项重要内容<sup>[6]</sup>,依照《处方管理办法》以及三级医院评审条款规定:药师应对处方用药的适宜性进行审核。目前许多医院已经开展了处方审核,药师的主要工作不再局限于单纯的调配药品方面,处方审核

的价值已凸显出来。药师在做好常规工作的基础上,也越来越重视处方审核工作。本研究设计的调查问卷,收集了培训药师的基本信息并结合培训的实际情况进行满意度调查。结果显示,中药调剂、西药调剂、临床药学与处方培训满意度稳定相关。这不仅提示满意度可能与药师日常工作内容密切相关,还显示了培训药师对湖南省处方审核培训的肯定评价。

目前中成药及中药制剂在临床用药中占据重要的地位,但是在使用中存在一系列的问题<sup>[7]</sup>。研究表明中药处方审核在相关科室已经提高了中成药及中药制剂的合理使用<sup>[8-9]</sup>。湖南省处方审核培训的内容涉及中药和中成药的合理使用,此项培训内容是中药调剂岗位药师的迫切需求和工作必需。我们调查分析发现中药调剂岗位与处方审核满意度稳定相关,进一步说明湖南省处方审核培训的内容合理,兼顾了中西药处方审核。目前处方审核很大一部分药物仍为西药,很多处方审核的任务由西药调剂人员承担。因此西药调剂药师主动调整工作方式,增强药学专业实践能力,提升药师审核处方的能力。西药调剂岗位的药师与处方审核满意度稳定相关表明了对处方审核培训的肯定评价。研究发现,在对住院患者处方管理中,实施临床药师审核干预,可提升处方合理性<sup>[10-11]</sup>。临床药师对方审核知识的需求日益增加。且临床药师在日常查房、会诊、用药教育、药学科门诊中均会涉及药物处方审核的相关知识点。因此,虽然临床药学岗位药师参与调查的人数没有西药调剂多,但是仍然与处方审核满意度稳定相关。在专业需求上处方审核岗位的药师与处方审核的关联性最高,但是并没有得到其与处方审核满意度稳定相关的结果。可能与湖南省医疗机构目前成立独立处方审核部门的医院及只从事处方审核工作的专职人员不多有关,收集到专职从事处方审核的药师只有 40 人。静脉配置中心、医院制剂、血药浓度监测/基因检测和其他的岗位药师人员也没有得到其与处方审核满意度相关的结果,这可能与从事的工作内容对方审核的需求及关联性相对较小。

### 3.2 影响处方审核满意度的潜在混杂因素

处方审核满意度的具体内容为培训内容、培训的形式、培训的师资、培训教材、培训组织管理及课程安排、培训考核体系。有研究表明职称级别越高、参加工作时间越长、学历越高、年龄越高的卫生技术人员对于部分满意度指标评价也越低,尤其是培训内容、培训过程指标<sup>[12-13]</sup>。而不同性别卫生技术人员对医学教育培训满意度评

表 1 调查药师的基本资料及满意度情况 [n(%)]  
Tab 1 Basic information of surveyed pharmacists [n(%)]

|             | 变量          | 总人数 (n = 1050) | 高分组 (n = 442) | 低分组 (n = 608) |
|-------------|-------------|----------------|---------------|---------------|
| 年龄 / 岁      | < 30        | 143 (13.6)     | 64 (14.5)     | 79 (13.0)     |
|             | 30 ~ 39     | 458 (43.6)     | 171 (38.7)    | 287 (47.2)    |
|             | 40 ~ 49     | 359 (34.2)     | 161 (36.4)    | 198 (32.6)    |
|             | 50 ~ 60     | 89 (8.5)       | 46 (10.4)     | 43 (7.1)      |
|             | > 60        | 1 (0.1)        | 0.0 (0.0)     | 1 (0.2)       |
| 性别          | 男           | 240 (22.9)     | 93 (21)       | 147 (24.2)    |
|             | 女           | 810 (77.1)     | 349 (79)      | 461 (75.8)    |
| 地区          | 长沙市         | 78 (7.4)       | 34 (7.7)      | 44 (7.2)      |
|             | 株洲市         | 75 (7.1)       | 36 (8.1)      | 39 (6.4)      |
|             | 湘潭市         | 37 (3.5)       | 17 (3.8)      | 20 (3.3)      |
|             | 衡阳市         | 67 (6.4)       | 32 (7.2)      | 35 (5.8)      |
|             | 邵阳市         | 93 (8.9)       | 45 (10.2)     | 48 (7.9)      |
|             | 岳阳市         | 57 (5.4)       | 22 (5)        | 35 (5.8)      |
|             | 常德市         | 66 (6.3)       | 32 (7.2)      | 34 (5.6)      |
|             | 张家界市        | 67 (6.4)       | 28 (6.3)      | 39 (6.4)      |
|             | 益阳市         | 142 (13.5)     | 46 (10.4)     | 96 (15.8)     |
|             | 郴州市         | 63 (6.0)       | 26 (5.9)      | 37 (6.1)      |
|             | 永州市         | 55 (5.2)       | 22 (5)        | 33 (5.4)      |
|             | 怀化市         | 100 (9.5)      | 41 (9.3)      | 59 (9.7)      |
|             | 娄底市         | 72 (6.9)       | 24 (5.4)      | 48 (7.9)      |
|             | 湘西土家族苗族自治州  | 78 (7.4)       | 37 (8.4)      | 41 (6.7)      |
| 医院等级        | 三级医疗机构      | 586 (55.8)     | 257 (58.1)    | 329 (54.1)    |
|             | 二级医疗机构      | 316 (30.1)     | 131 (29.6)    | 185 (30.4)    |
|             | 一级医疗机构      | 148 (14.1)     | 54 (12.2)     | 94 (15.5)     |
| 所在的岗位       | 药品采购供应      | 122 (11.6)     | 38 (8.6)      | 84 (13.8)     |
|             | 中药调剂        | 76 (7.2)       | 35 (7.9)      | 41 (6.7)      |
|             | 西药调剂        | 508 (48.4)     | 215 (48.6)    | 293 (48.2)    |
|             | 临床药学        | 190 (18.1)     | 94 (21.3)     | 96 (15.8)     |
|             | 处方审核        | 61 (5.8)       | 26 (5.9)      | 35 (5.8)      |
|             | 静脉配置中心      | 40 (3.8)       | 15 (3.4)      | 25 (4.1)      |
|             | 医院制剂        | 12 (1.1)       | 3 (0.7)       | 9 (1.5)       |
|             | 血药浓度监测或基因检测 | 18 (1.7)       | 6 (1.4)       | 12 (2.0)      |
|             | 其他          | 23 (2.2)       | 10 (2.3)      | 13 (2.1)      |
|             | 中专          | 21 (2.0)       | 8 (1.8)       | 13 (2.1)      |
| 文化程度        | 大专          | 178 (17.0)     | 80 (18.1)     | 98 (16.1)     |
|             | 本科          | 748 (71.2)     | 301 (68.1)    | 447 (73.5)    |
|             | 硕士          | 100 (9.5)      | 51 (11.5)     | 49 (8.1)      |
|             | 博士          | 3 (0.3)        | 2 (0.5)       | 1 (0.2)       |
|             | < 5         | 106 (10.1)     | 44 (10)       | 62 (10.2)     |
| 工作年限 / 年    | 6 ~ 10      | 220 (21.0)     | 95 (21.5)     | 125 (20.6)    |
|             | 11 ~ 15     | 282 (26.9)     | 105 (23.8)    | 177 (29.1)    |
|             | 16 ~ 20     | 100 (9.5)      | 42 (9.5)      | 58 (9.5)      |
|             | > 20        | 342 (32.6)     | 156 (35.3)    | 186 (30.6)    |
| 职称          | 无           | 15 (1.4)       | 7 (1.6)       | 8 (1.3)       |
|             | 药士          | 36 (3.4)       | 13 (2.9)      | 23 (3.8)      |
|             | 药师          | 242 (23.0)     | 92 (20.8)     | 150 (24.7)    |
|             | 主管药师        | 510 (48.6)     | 220 (49.8)    | 290 (47.7)    |
|             | 副主任药师       | 219 (20.9)     | 97 (21.9)     | 122 (20.1)    |
|             | 主任药师        | 28 (2.7)       | 13 (2.9)      | 15 (2.5)      |
| 取得临床药师培训证情况 | 否           | 837 (79.7)     | 340 (76.9)    | 497 (81.7)    |
|             | 半年通科        | 70 (6.7)       | 33 (7.5)      | 37 (6.1)      |
|             | 一年制         | 143 (13.6)     | 69 (15.6)     | 74 (12.2)     |



表 2 药师对处方审核的满意度 [n(%)]

Tab 2 Pharmacists' satisfaction regarding prescription verification [n(%)]

| 变量         | 总人数<br>( <i>n</i> = 1050) | 高分组<br>( <i>n</i> = 442) | 低分组<br>( <i>n</i> = 608) |
|------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 参加处方审核培    |                           |                          |                          |
| 非常没有必要     | 1 (0.1)                   | 1 (0.2)                  | 0.0 (0.0)                |
| 训班的必要性中立   | 10 (1.0)                  | 8 (1.8)                  | 2 (0.3)                  |
| 有必要        | 190 (18.1)                | 150 (33.9)               | 40 (6.6)                 |
| 非常有必要      | 849 (80.9)                | 283 (64)                 | 566 (93.1)               |
| 培训内容       |                           |                          |                          |
| 不满意        | 1 (0.1)                   | 1 (0.2)                  | 0.0 (0.0)                |
| 一般         | 45 (4.3)                  | 44 (10)                  | 1 (0.2)                  |
| 满意         | 416 (39.6)                | 366 (82.8)               | 50 (8.2)                 |
| 非常满意       | 588 (56.0)                | 31 (7)                   | 557 (91.6)               |
| 培训形式       |                           |                          |                          |
| 非常不满意      | 1 (0.1)                   | 1 (0.2)                  | 0.0 (0.0)                |
| 不满意        | 1 (0.1)                   | 1 (0.2)                  | 0.0 (0.0)                |
| 一般         | 53 (5.0)                  | 53 (12)                  | 0.0 (0.0)                |
| 满意         | 408 (38.9)                | 364 (82.4)               | 44 (7.2)                 |
| 非常满意       | 587 (55.9)                | 23 (5.2)                 | 564 (92.8)               |
| 培训师资       |                           |                          |                          |
| 不满意        | 1 (0.1)                   | 1 (0.2)                  | 0.0 (0.0)                |
| 一般         | 23 (2.2)                  | 23 (5.2)                 | 0.0 (0.0)                |
| 满意         | 370 (35.2)                | 363 (82.1)               | 7 (1.2)                  |
| 非常满意       | 656 (62.5)                | 55 (12.4)                | 601 (98.8)               |
| 培训教材       |                           |                          |                          |
| 不满意        | 1 (0.1)                   | 1 (0.2)                  | 0.0 (0.0)                |
| 一般         | 44 (4.2)                  | 43 (9.7)                 | 1 (0.2)                  |
| 满意         | 379 (36.1)                | 366 (82.8)               | 13 (2.1)                 |
| 非常满意       | 626 (59.6)                | 32 (7.2)                 | 594 (97.7)               |
| 培训组织管理及不满意 | 2 (0.2)                   | 2 (0.5)                  | 0.0 (0.0)                |
| 课程安排       |                           |                          |                          |
| 一般         | 38 (3.6)                  | 38 (8.6)                 | 0.0 (0.0)                |
| 满意         | 386 (36.8)                | 375 (84.8)               | 11 (1.8)                 |
| 非常满意       | 624 (59.4)                | 27 (6.1)                 | 597 (98.2)               |
| 培训考核体系     |                           |                          |                          |
| 一般         | 38 (3.6)                  | 38 (8.6)                 | 0.0 (0.0)                |
| 满意         | 410 (39.0)                | 389 (88)                 | 21 (3.5)                 |
| 非常满意       | 602 (57.3)                | 15 (3.4)                 | 587 (96.5)               |
| 满意度总分      | 27.3±3.2                  | 23.8±1.8                 | 29.8±0.6                 |

价中，女性明显高于男性，因此本研究在调整协变量时考虑了年龄、性别。取得临床药师培训证在单变量分析中  $P < 0.1$ ，符合协变量筛选的原则，因此在模型 2 中纳入了协变量。在研究结果中药师的年龄、性别、所在地区、医院等级、文化程度、工作年限、职称和是否取得临床药师培训证的情况与处方审核满意度均没有相关性。这可能与处方审核满意度更聚焦于药学专业及岗位从事内容相关，而并非药师的个人标签。我们收集的人群均是药师群体，经过多期湖南省处方审核培训，医院药师覆盖面广，处方审核培训的普及面广，这与卫生技术人员有所差异，因此这可能也是我们没有得到相关性结果的原因。表明药师对于处方审核培训的需求并没有因为年龄，工作年限等其他因素而减少。

综上所述，湖南省药师在不同岗位中药调剂、西药调剂、临床药学中对处方审核培训的总体满

表 3 影响总体满意度的单因素 Logistic 回归分析

Tab 3 Univariate Logistic regression analysis of factors affecting the overall satisfaction

| 变量         | OR_95CI                   | P     |
|------------|---------------------------|-------|
| 年龄 / 岁     |                           |       |
| < 30       | 1 ( Ref )                 |       |
| 30 ~ 39    | 1.36 (0.93 ~ 1.99)        | 0.113 |
| 40 ~ 49    | 1 (0.67 ~ 1.47)           | 0.985 |
| 50 ~ 60    | 0.76 (0.45 ~ 1.29)        | 0.304 |
| > 60       | 232 233.41 (0.0 ~ 297.89) | 0.970 |
| 性别         |                           |       |
| 男          | 1 ( Ref )                 |       |
| 女          | 0.84 (0.62 ~ 1.12)        | 0.232 |
| 地区         |                           |       |
| 长沙市        | 1 ( Ref )                 |       |
| 株洲市        | 0.84 (0.44 ~ 1.58)        | 0.584 |
| 湘潭市        | 0.91 (0.41 ~ 2)           | 0.812 |
| 衡阳市        | 0.85 (0.44 ~ 1.63)        | 0.615 |
| 邵阳市        | 0.82 (0.45 ~ 1.51)        | 0.531 |
| 岳阳市        | 1.23 (0.61 ~ 2.47)        | 0.561 |
| 常德市        | 0.82 (0.43 ~ 1.59)        | 0.557 |
| 张家界市       | 1.08 (0.56 ~ 2.08)        | 0.827 |
| 益阳市        | 1.61 (0.91 ~ 2.85)        | 0.100 |
| 郴州市        | 1.1 (0.56 ~ 2.15)         | 0.782 |
| 永州市        | 1.16 (0.58 ~ 2.34)        | 0.680 |
| 怀化市        | 1.11 (0.61 ~ 2.02)        | 0.728 |
| 娄底市        | 1.55 (0.8 ~ 3)            | 0.199 |
| 湘西土家族苗族自治州 | 0.86 (0.46 ~ 1.61)        | 0.630 |
| 医院等级       |                           |       |
| 三级医疗机构     | 1 ( Ref )                 |       |
| 二级医疗机构     | 1.1 (0.84 ~ 1.46)         | 0.487 |
| 一级医疗机构     | 1.36 (0.94 ~ 1.97)        | 0.106 |
| 所在的岗位      |                           |       |
| 药品采购供应     | 1 ( Ref )                 |       |
| 中药调剂       | 0.53 (0.29 ~ 0.96)        | 0.035 |
| 西药调剂       | 0.62 (0.4 ~ 0.94)         | 0.025 |
| 临床药学       | 0.46 (0.29 ~ 0.74)        | 0.002 |
| 处方审核       | 0.61 (0.32 ~ 1.15)        | 0.126 |
| 静脉配置中心     | 0.75 (0.36 ~ 1.59)        | 0.458 |
| 医院制剂       | 1.36 (0.35 ~ 5.3)         | 0.660 |
| 血药浓度监测     | 0.9 (0.32 ~ 2.59)         | 0.852 |
| 或基因检测      |                           |       |
| 其他         | 0.59 (0.24 ~ 1.46)        | 0.252 |
| 文化程度       |                           |       |
| 中专         | 1 ( Ref )                 |       |
| 大专         | 0.75 (0.3 ~ 1.91)         | 0.551 |
| 本科         | 0.91 (0.37 ~ 2.23)        | 0.843 |
| 硕士         | 0.59 (0.23 ~ 1.55)        | 0.285 |
| 博士         | 0.31 (0.02 ~ 3.97)        | 0.366 |
| 工作年限 / 年   |                           |       |
| < 5        | 1 ( Ref )                 |       |
| 6 ~ 10     | 0.93 (0.58 ~ 1.49)        | 0.775 |
| 11 ~ 15    | 1.2 (0.76 ~ 1.89)         | 0.441 |
| 16 ~ 20    | 0.98 (0.56 ~ 1.71)        | 0.943 |
| > 20       | 0.85 (0.54 ~ 1.32)        | 0.458 |
| 职称         |                           |       |
| 无          | 1 ( Ref )                 |       |
| 药士         | 1.55 (0.46 ~ 5.25)        | 0.483 |
| 药师         | 1.43 (0.5 ~ 4.06)         | 0.506 |
| 主管药师       | 1.15 (0.41 ~ 3.23)        | 0.786 |
| 副主任药师      | 1.1 (0.39 ~ 3.14)         | 0.858 |
| 主任药师       | 1.01 (0.29 ~ 3.55)        | 0.988 |
| 取得临床药师     |                           |       |
| 否          | 1 ( Ref )                 |       |
| 培训证情况      |                           |       |
| 半年通科       | 0.77 (0.47 ~ 1.25)        | 0.288 |
| 一年制        | 0.73 (0.51 ~ 1.05)        | 0.088 |
| 参加处方审核     |                           |       |
| 非常没有必要     | 1 ( Ref )                 |       |
| 培训班的必      |                           |       |
| 中立         | 71665.78 (0.0 ~ 286.22)   | 0.973 |
| 要有必要       | 76443.5 (0.0 ~ 286.56)    | 0.972 |
| 非常有必要      | 573326.24 (0.0 ~ 286.17)  | 0.967 |

表 4 药师所在岗位与总体满意度的多因素 Logistic 回归分析  
Tab 4 Multivariate Logistic regression analysis of the association between pharmacists' positions and the overall satisfaction level

| 变量                 | 人数   | 未调整的模型             |       | 模型 1               |       | 模型 2               |       |
|--------------------|------|--------------------|-------|--------------------|-------|--------------------|-------|
|                    |      | OR_95CI            | P 值   | OR_95CI            | P 值   | OR_95CI            | P 值   |
| 药品采购供应             | 122  | 1 (Ref)            |       | 1 (Ref)            |       | 1 (Ref)            |       |
| 中药调剂               | 76   | 0.53 (0.29 ~ 0.96) | 0.035 | 0.54 (0.3 ~ 0.98)  | 0.041 | 0.54 (0.29 ~ 0.98) | 0.043 |
| 西药调剂               | 508  | 0.62 (0.4 ~ 0.94)  | 0.025 | 0.60 (0.39 ~ 0.92) | 0.020 | 0.63 (0.41 ~ 0.98) | 0.038 |
| 临床药学               | 190  | 0.46 (0.29 ~ 0.74) | 0.002 | 0.44 (0.27 ~ 0.72) | 0.001 | 0.54 (0.32 ~ 0.92) | 0.024 |
| 处方审核               | 61   | 0.61 (0.32 ~ 1.15) | 0.126 | 0.63 (0.33 ~ 1.19) | 0.151 | 0.62 (0.32 ~ 1.17) | 0.142 |
| 静脉配置中心             | 40   | 0.75 (0.36 ~ 1.59) | 0.458 | 0.75 (0.35 ~ 1.58) | 0.443 | 0.85 (0.39 ~ 1.82) | 0.673 |
| 医院制剂               | 12   | 1.36 (0.35 ~ 5.3)  | 0.660 | 1.27 (0.32 ~ 4.97) | 0.736 | 1.39 (0.35 ~ 5.5)  | 0.640 |
| 血药浓度监测 / 基因检测      | 18   | 0.90 (0.32 ~ 2.59) | 0.852 | 1.05 (0.36 ~ 3.04) | 0.933 | 1.16 (0.4 ~ 3.37)  | 0.792 |
| 其他                 | 23   | 0.59 (0.24 ~ 1.46) | 0.252 | 0.57 (0.23 ~ 1.42) | 0.224 | 0.57 (0.23 ~ 1.42) | 0.228 |
| Trend.test (趋势性检验) | 1050 | 0.97 (0.9 ~ 1.05)  | 0.466 | 0.97 (0.9 ~ 1.05)  | 0.496 | 0.99 (0.92 ~ 1.07) | 0.822 |

意度呈现稳定的相关性。这一结果凸显了当前培训体系在基础框架构建与共性需求响应上的显著成效。具体而言：

① 共性化设计保障基础质量：通过统一师资选拔、标准化课程体系及实践案例库建设，成功满足了药师群体对知识实用性、教学专业性等核心诉求，为不同岗位提供了可靠的能力提升基础；② 优化了升级的坚实基础，体现了湖南审方培训体系的特色：稳定的满意度结果为未来深化分岗定制化培训提供了可扩展的底层架构，既能降低改革成本，又能加速精准化升级课程。同时这一结果也揭示了培训资源分配与政策设计未因岗位差异而产生明显偏向性，体现了医疗培训体系的公平覆盖，尤其在基层药师能力建设上发挥了关键作用，但是精准化不够，其他岗位契合度稍差，这也是需要进一步改进的地方。

总之，调查分析不仅验证了现行培训体系的基础合理性，更指明通过“稳共性、强特色”的策略，可在现有成果上进一步释放岗位潜能，实现在培训效率与满意度的双重跃升。

参考文献

[1] 林平, 甄健存, 卢晓阳, 等. 处方审核标准制订与解析[J]. 医药导报, 2022, 41 (11): 1627-1631.  
[2] 肖冬梅, 姚国强, 吴思萍. 临床药师对不合理肠外营养医嘱的干预效果分析[J]. 中国当代医药, 2021, 28 (13):

176-178.  
[3] 刘惠, 张立, 董玉慈. 临床药师审核与干预对门诊处方合理性的影响[J]. 医药前沿, 2024, 16 (6): 134-136.  
[4] 周丹丹. 门诊药师处方审核情况探讨[J]. 中国处方药, 2019, 17 (6): 49-50.  
[5] 王晓晓, 陶立元, 裴敏玥, 等. 连续变量转换为分类变量的几种方法[J]. 中华儿科杂志, 2022, 60 (5): 420.  
[6] 王欣, 仇叶龙, 李小莹, 等. 应用信息技术实现医嘱前置审核[J]. 中国病案, 2017, 18 (12): 54-56.  
[7] 覃丽秋. 中成药处方分析在临床药学服务中的应用价值研究[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2020, 8 (7): 173, 177.  
[8] 喻立, 黄京京. 中成药处方审核在神经内科老年患者合理用药管理中的运用[J]. 中医药管理杂志, 2022, 30 (15): 139-141.  
[9] 张小燕, 郭和坚, 陈巧巧, 等. 实施处方前置审核系统促进中成药临床用药合理性[J]. 中医药管理杂志, 2023, 31 (10): 63-65.  
[10] 何艳, 吴广杰, 王璐, 等. 应用 PDCA 法践行临床药师主导的抗菌药物联合用药管理[J]. 医药导报, 2022, 41 (4): 588-592.  
[11] 谢海雄. 临床药师通过药师工作站进行医嘱审核及干预效果分析[J]. 海峡药学, 2019, 31 (3): 235-237.  
[12] 朱丽丽, 王子泽, 周淑芳, 等. 卫生技术人员继续医学教育培训现状与满意度评价[J]. 中国继续医学教育, 2024, 16 (20): 146-150.  
[13] 张贤尉, 吴佳琪, 陈一鸣, 等. 临床药师参与急诊药房审方药师在岗规范化培训工作模式的建立与实践[J]. 中南药学, 2019, 17 (8): 1341-1345.

(收稿日期: 2025-04-06; 修回日期: 2025-05-08)

## 中药抗结直肠癌研究进展专题

### 【编者按】

结直肠癌 (CRC) 作为消化道高发恶性肿瘤, 其发病机制复杂, 涉及年龄、性别、代谢异常 (如肥胖、糖尿病)、生活方式、遗传易感性、肠道菌群失调及癌前病变等多种因素。当前临床应用的 CRC 治疗药物仍面临毒性显著或疗效有限的挑战, 而传统中药及其活性成分凭借多靶点调控和低毒性的独特优势, 在抗肿瘤领域展现出广阔前景。近年来, 中药抗 CRC 研究取得显著进展, 相关成果不断涌现。本专题系统综述了具有抗 CRC 活性的中药及中药来源小分子的最新研究进展, 重点关注其作用机制与潜在应用价值。其中, 我们特别报道了人参滴丸通过抑制乳酸代谢和抗氧化应激途径调控 CRC 细胞活力的创新发现, 为中药抗肿瘤研究提供了新的科学依据。期望本专题能为国内同行梳理研究脉络, 启发科研思路, 推动中药抗肿瘤领域的深入探索与转化应用。

### 【主持人简介】



于海洋, 天津市政协常委, 天津中医药大学教授, 博士研究生导师, 博士后合作导师, 国家级青年人才项目获得者; 组分中药国家重点实验室/现代中医药海河实验室中药抗肿瘤药理团队 PI, 天津市中药药理学重点实验室副主任; 天津市中医肿瘤研究所副所长; 世中联网络药理学专委会常委、中华中医药学会中药实验药理分会常委、中国药学会临床中药学专委会委员、中华中医药学会青年委员会委员; 《中南药学》《中草药》《药物评价研究》《天津中医药大学学报》杂志编委, *AHM*、*CJNM* 等杂志青年编委。

在 *NC*、*J Hematol Oncol* 等 SCI 期刊上发表学术论文 50 余篇, 入选 2023、2024 年度“全球前 2% 顶尖科学家榜单”; 申请发明专利 10 项, 授权 6 项; 主持国家级项目 6 项、省部级项目多项; 入选天津市海外高层次人才、天津市“中青年科技创新领军人才”、天津市“特聘教授青年学者”等; 获得省部级科技进步奖一等奖 1 项、二等奖 3 项; 获得中华中医药学会“中青年创新人才奖”、天津中医药大学“杰出人才奖”等。

## 人参滴丸对结直肠癌细胞抗乳酸及抗氧化能力的影响

韩笑<sup>1</sup>, 杨中天<sup>1</sup>, 李依昕<sup>1</sup>, 王朝阳<sup>2</sup>, 王越<sup>2</sup>, 于洪海<sup>2</sup>, 于海洋<sup>1\*</sup> (1. 天津中医药大学组分中药国家重点实验室, 天津 301617; 2. 力神药业有限公司, 吉林 通化 134000)

**摘要:** **目的** 通过研究人参滴丸在结直肠癌细胞中的抗乳酸、抗氧化作用, 初步揭示人参滴丸对结直肠癌细胞增殖的抑制作用。**方法** 体外培养人结直肠癌细胞系 SW480、HCT116, 通过 MTT 实验探究不同剂量的人参滴丸对结直肠癌细胞活力的影响; 克隆形成实验评估人参滴丸对细胞克隆能力的影响; 细胞划痕实验、Transwell 实验及 Western blot 实验探究人参滴丸对结直肠癌细胞迁移侵袭能力的影响; 试剂盒检测人参滴丸对结直肠癌细胞乳酸浓度、葡萄糖消耗量、三磷酸腺苷 (ATP) 水平、乳酸脱氢酶 (LDH) 酶活力、总抗氧化能力、超氧化物歧化酶 (SOD) 酶活性及丙二醛 (MDA) 含量的影响; 流式细胞术检测人参滴丸处理前后细胞内活性氧 (ROS) 水平变化。**结果** MTT 实验结果表明人参滴丸对结直肠癌细胞 SW480 及 HCT116 的生存活力均有抑制作用; 克隆形成实验显示人参滴丸明显抑制结直肠癌细胞的克隆能力; 细胞划痕实验、Transwell 实验及 Western blot 实验结果表明人参滴丸对结直肠癌细胞迁移侵袭能力具有抑制作用; 人参滴丸可以降低细胞乳酸浓度、葡萄糖消耗、ATP 生成、LDH 酶活力及 MDA 含量, 同时降低 ROS 水平, 提高抗氧化能力及 SOD 酶活性。**结论** 人参滴丸可以通过抗乳酸、抗氧化等作用影响结直肠癌细胞的增殖能力。

**关键词:** 人参滴丸; 糖酵解; 氧化应激; 结直肠癌

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)08-2334-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.029

作者简介: 韩笑, 女, 在读博士研究生, 主要从事中药药理学研究, email: 736037943@qq.com \*通信作者: 于海洋, 男, 教授, 主要从事中药抗肿瘤作用机制研究, email: hyyu@tjutcm.edu.cn



## Effect of ginseng drops on anti-lactic acid and antioxidant capacity of colorectal cancer cells

HAN Xiao<sup>1</sup>, YANG Zhong-tian<sup>1</sup>, LI Yi-xin<sup>1</sup>, WANG Chao-yang<sup>2</sup>, WANG Yue<sup>2</sup>, YU Hong-hai<sup>2</sup>, YU Hai-yang<sup>1\*</sup> (1. State Key Laboratory of Component-Based Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617; 2. Lishen Pharmaceutical Co., Ltd., Tonghua Jilin 134000)

**Abstract: Objective** To preliminarily determine the inhibition of ginseng drops on the proliferation of colorectal cancer cells by studying the anti-lactic acid and antioxidant effect of ginseng drops. **Methods** Human colorectal cancer cell lines SW480 and HCT116 were cultured in vitro, and the effects of different doses of ginseng drops on the viability of colorectal cancer cells were determined by MTT assay. The impact of ginseng drops on the clonogenic ability of the cells was measured by clone formation assay. The effect of ginseng drops on the migration and invasion ability of colorectal cancer cells was determined by wound healing assay, Transwell assay and Western blot. The effects of ginseng drops on the lactic acid concentration of colorectal cancer cells, glucose consumption, adenosine triphosphate level, lactate dehydrogenase enzyme activity, total antioxidant capacity, superoxide dismutase enzyme activity and malondialdehyde content were determined with kits. The changes in intracellular reactive oxygen species levels before and after the ginseng drop treatment were detected by flow cytometry. **Results** MTT assay showed that ginseng drops inhibited the viability of colorectal cancer cells SW480 and HCT116. Clone formation assay showed that ginseng drops obviously inhibited the clonogenic ability of colorectal cancer cells. Wound healing assay, Transwell assay and Western blot showed that ginseng drops inhibited the migration and invasion of colorectal cancer cells. Ginseng drops reduced the lactate concentration, glucose consumption, adenosine triphosphate production, lactate dehydrogenase enzyme activity and malondialdehyde content of cells, and at the same time reduced reactive oxygen species level, improved antioxidant capacity and superoxide dismutase enzyme activity. **Conclusion** Ginseng drops can inhibit the proliferation of colorectal cancer cells through anti-lactic acid and antioxidant effect.

**Key words:** ginseng drop; glycolysis; oxidative stress; colorectal cancer

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是一种普遍存在的恶性胃肠道肿瘤。2022 年国家癌症中心数据显示, 结直肠癌在各癌症死亡率中排名第四, 在癌症新发率中排名第二, 且结直肠癌死亡率有逐年上涨的趋势, 已成为严重危害我国人民生命健康的重要因素之一。发生远端转移结直肠癌患者的 5 年生存率不足 20%<sup>[1]</sup>。目前, 针对结直肠癌的治疗干预措施主要包括手术切除、全身化疗、局部放疗和免疫治疗等。但均伴随着一定的缺点, 包括耐药性、骨髓抑制和胃肠道反应, 且这些治疗未能充分解决与结直肠癌相关的高临床发病率和死亡率问题。

中医药在治疗肿瘤方面有着独特优势, 大量实践表明中医药参与肿瘤治疗可以起增效减毒, 提高患者生活质量, 降低治疗费用等作用<sup>[2]</sup>。人参因具有抗氧化、抗炎、抗糖尿病及化学预防和辅助治疗潜力而被频繁使用<sup>[3]</sup>。其中, 人参皂苷作为人参所特有的主要活性药理成分, 具有包括抗乳酸、抗炎、抗阿尔

茨海默病和抗过敏等许多药理活性<sup>[4-6]</sup>。本文研究对象粒子参 (人参滴丸) 是由人参中的有效成分浓缩制备成的小微分子高含量剂型。能量代谢重编程一直被认为是癌症的标志之一<sup>[7]</sup>, 即在氧气充沛的情况下, 肿瘤细胞还是通过有氧糖酵解而不是氧化磷酸化来代谢葡萄糖, 称为“Warburg 效应”<sup>[8-9]</sup>。葡萄糖这种代谢方式可快速产生三磷酸腺苷 (ATP)、维持氧化还原稳态及为生物大分子合成提供前体来促进肿瘤发生发展<sup>[10]</sup>。本文将通过检测人参滴丸对 SW480、HCT116 细胞乳酸代谢水平、葡萄糖摄取、ATP 生成初步评估其对肿瘤代谢的影响, 初步阐明人参滴丸抑制结肠癌细胞系增殖与转移的可能原因。由于肿瘤代谢重编程伴随活性氧 (ROS) 的产生以及抗氧化体系的激活, ROS 含量过高会导致氧化损伤甚至细胞死亡, 且已有研究表明, 人参中的有效成分能够通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路, 增强细胞的抗氧化能力, 减轻氧化应激引起的损伤, 抑制肿瘤细胞的增

殖<sup>[11-12]</sup>。因此本文将进一步评估人参滴丸对 SW480、HCT116 细胞抗氧化能力的影响,为结直肠癌的预防提供更有效的治疗选择。

## 1 材料

### 1.1 试药

粒子参(人参滴丸)[规格:3 g/瓶,批号:20240901,力神药业(吉林)有限公司],3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)(美国 Sigma 公司),RIPA 裂解液(北京索莱宝科技有限公司),兔抗  $\beta$ -actin 抗体、兔抗乳酸脱氢酶 A(LDHA)抗体、山羊抗兔二抗(武汉爱博泰克生物科技有限公司),逆转录试剂盒、qRT-PCR 试剂盒(康为世纪生物科技有限公司),ATP 试剂盒、乳酸测试盒、超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所),乳酸脱氢酶(LDH)活性检测试剂盒、总抗氧化能力(T-AOC)检测试剂盒、丙二醛(MDA)含量检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司),DCFH-DA(亚科因生物技术有限公司)。

### 1.2 仪器

Axioscope 5 蔡司显微镜(德国 Carl Zeiss 公司),Heracell VIOS 160i 二氧化碳培养箱、Sorvall ST 16R 低温高速离心机、MuATiskan MK3 酶标仪、Attune NxT 流式细胞仪(美国 Thermo Fisher 科技有限公司),移液器(德国 Eppendorf 公司),CFX 96 实时荧光定量 PCR、Criterion 电泳槽、Trans-Blot 转印槽、ChemiDoc 化学发光凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

### 1.3 细胞

人结直肠癌 SW480 和 HCT116 细胞(中国科学院细胞资源中心)。

## 2 方法

### 2.1 实验药物的制备

取人参滴丸研碎并用磷酸盐缓冲液(PBS)溶解为  $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的母液,使用  $0.22 \mu\text{m}$  微孔滤膜过滤,使用时用相应空白培养基配制成  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的人参滴丸药液,  $4^\circ\text{C}$  冰箱储存备用。

### 2.2 细胞培养

人结直肠癌 SW480、HCT116 细胞培养在含有 10% 胎牛血清(FBS)和 1% 双抗的 DMEM 高糖培养基中,置于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的潮湿培养箱内。

### 2.3 MTT 分析法检测细胞增殖活力

将 SW480 和 HCT116 细胞以 5000 个/孔的密度接种到 96 孔细胞培养板中培养 24 h 后,分别加入质量浓度为 0、25、50、100、200、300、400、500  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  人参滴丸的培养液,继续培养 48 h。每孔加入稀释后的 20  $\mu\text{L}$  MTT ( $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 孵育

4 h 后更换为二甲基亚砜(DMSO),待结晶溶解后 490 nm 波长下测定吸光度值,并计算细胞存活率。

### 2.4 克隆形成实验检测细胞增殖能力

将 SW480、HCT116 细胞按 1000 个/孔的密度接种到 6 孔板上培养 24 h,使用 0、100、200  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的人参滴丸处理,2 d 更换一次培养基,培养 14 d。当培养皿中出现肉眼可见的克隆球时终止培养。PBS 清洗,用预冷的 4% 多聚甲醛固定,结晶紫染色,蒸馏水清洗至背景干净,拍照统计细胞集落数,使用 Image J 软件量化每组细胞克隆数量。

### 2.5 细胞划痕实验检测迁移能力

将细胞调整浓度至  $5 \times 10^5$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ ,将细胞吹匀后接种至 6 孔板中,然后将其放入细胞培养箱。待细胞融合度达 70% ~ 80% 时,使用 10  $\mu\text{L}$  枪头在每孔中贴底划线,PBS 洗涤并加入 2 mL PBS,在光学显微镜( $\times 5$ )下进行拍照,结束后弃去 PBS,加入新配制的含药培养基继续孵育 48 h。PBS 洗涤后再加入 1 mL PBS,在光学显微镜( $\times 5$ )下找到对应位置进行拍照,并使用 Image J 软件对细胞划痕进行量化。

### 2.6 Transwell 实验检测侵袭能力

将细胞计数并用空白培养基稀释成每孔  $2 \times 10^4$  个细胞,接种至 Transwell 上室,下室加入 500  $\mu\text{L}$  含 20% FBS 的完全培养基。人参滴丸干预 48 h 后,固定细胞并用结晶紫染色,干棉花轻轻擦去上室内侧残留细胞,显微镜下观察拍照,计算各组跨孔迁移的细胞数量并作数据分析图。

### 2.7 Western blot 检测蛋白表达

将结直肠癌细胞 SW480、HCT116 分别给予终质量浓度为 0、100、200  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的人参滴丸处理 48 h 后,RIPA 强裂解液裂解细胞,离心后取上清液并用 BCA 试剂盒定量。进行 SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭。加入 N-cadherin (1 : 1000)、E-cadherin (1 : 1000)、LDHA (1 : 1000)、 $\beta$ -actin (1 : 1000) 一抗  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜,对应二抗室温孵育 1 h 后,PBST 洗涤,加入 ECL 显影液成像。

### 2.8 细胞外乳酸、葡萄糖消耗量测定

用终质量浓度为 0、100、200  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的人参滴丸处理 SW480、HCT116 细胞 48 h 后,收集细胞上清液。按照说明书操作,计算乳酸含量及葡萄糖消耗量。

### 2.9 细胞 ATP、LDH、SOD 及 MDA 测定

用终质量浓度为 0、100、200  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的人参滴丸处理 SW480、HCT116 细胞 48 h 后,收集细胞。按照说明书操作测定 ATP、MDA 水平及 LDH、SOD 酶活力。按照蛋白浓度计算 ATP、

MDA 水平及 LDH、SOD 酶活力。

2.10 qRT-PCR 检测细胞 LDHA 的 mRNA 表达

将结直肠癌细胞 SW480、HCT116 分别给予终质量浓度为 0、100、200  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的人参滴丸处

理 48 h，收集各组细胞，提取 RNA、质检、反转录、扩增。对原始数据 CT 值进行分析，获得  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  值。以 LDHA/ $\beta$ -actin 值表示 LDHA 的 mRNA 相对表达量，引物序列如表 1 所示。

表 1 引物序列  
Tab 1 Primer sequence

| 引物名称           | 正向引物 (5'-3')              | 反向引物 (5'-3')             |
|----------------|---------------------------|--------------------------|
| LDHA           | GAGCAGTGGAAGGAGGT         | TGGTGGAATGGGATG          |
| $\beta$ -actin | CCACGAAACTACCTTCAACTCCATC | AGTGATCTCCTTCTGCATCCTGTC |

2.11 T-AOC 检测总抗氧化能力

将终质量浓度为 0、100、200  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的人参滴丸处理 SW480、HCT116 细胞 48 h 后，收集细胞于离心管中。加入适量预冷的提取液，超声破碎细胞，按照说明书配制反应体系，按照细胞数量计算总体抗氧化能力。

2.12 ROS 测定检测活性氧水平

结直肠癌细胞经过人参滴丸处理 48 h 后，用终质量浓度 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 DCFH-DA 无血清培养基 37℃ 孵育 30 min，孵育结束后 1500  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min，PBS 洗涤 3 次。最后加入 200  $\mu\text{L}$  PBS 混匀后上机检测。流式细胞仪检测，用 FlowJoTMv10.6.1 流式细胞分析软件分析结果。

2.13 统计学分析

所有实验重复 3 次及以上，采用 Graphpad Prism 6 分析软件对数据进行处理，结果表示为  $\bar{x} \pm s$ ，多组采用 one-way ANOVA，两组采用 *t* 检验分析样本之间的比较。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 人参滴丸对结直肠癌细胞生存率的影响

实验结果表明，相较于空白组 (0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )，结直肠癌细胞经 25、50、100、200、300、400、500  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  人参滴丸处理 48 h 后，细胞存活率随药物浓度增加而下降 (见图 1A)，提示人参滴丸可以抑制结直肠癌细胞的生长。根据人参滴丸浓度对两种结直肠癌细胞活性的影响，本文分别

选取 100、200  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  质量浓度作为后续实验的条件，检测不同浓度人参滴丸处理后对 SW480 和 HCT116 细胞克隆增殖的影响，结果如图 1B 所示，与空白组 (0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 相比，给药组细胞克隆数明显减少，单个细胞群落也更小。这表明人参滴丸可明显抑制结直肠癌细胞的克隆形成能力，而且抑制作用随着人参滴丸浓度增大而增强。

3.2 人参滴丸对结直肠癌细胞迁移及侵袭能力的影响

由图 2 可知，相较于空白组 (0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )，结直肠癌细胞经 100、200  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  人参滴丸处理 48 h 后，结直肠癌细胞迁移数均显著下降，提示人参滴丸可以降低结直肠癌细胞迁移率。相较于空白组 (0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )，经 100、200  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  人参滴丸分别处理 48 h 后，结直肠癌细胞穿过 Transwell 小室的细胞数目明显下调，提示人参滴丸可以降低结直肠癌细胞侵袭能力 (见图 3A)。同时借助 Western blot 实验验证了人参滴丸对转移标志性蛋白 N-cadherin、E-cadherin 表达水平的影响，结果显示，相较于空白组 (0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )，人参滴丸能显著下调 N-cadherin 的蛋白表达水平并上调 E-cadherin 的蛋白表达水平 (见图 3B)。

3.3 人参滴丸对结直肠癌细胞糖酵解的影响

相较于空白组 (0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )，给药组结直肠癌细胞葡萄糖消耗量、乳酸和 ATP 生成随药物浓度增加而下降，并具有一定剂量依赖性，结果见表 2。

表 2 人参滴丸对 SW480 细胞及 HCT116 细胞葡萄糖摄取、乳酸生成和 ATP 生成的影响

Tab 2 Effect of ginseng drops on glucose uptake, lactate production and ATP production of SW480 cells and HCT116 cells

| 组别                                             | SW480 细胞                              |                                       |                                             | HCT116 细胞                             |                                       |                                             |
|------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------|
|                                                | 葡萄糖消耗量 /                              | 乳酸 /                                  | ATP /                                       | 葡萄糖消耗量 /                              | 乳酸生成 /                                | ATP /                                       |
|                                                | ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | ( $\mu\text{mol} \cdot \text{gprot}^{-1}$ ) | ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | ( $\mu\text{mol} \cdot \text{gprot}^{-1}$ ) |
| 人参滴丸 (0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )   | 5.62±0.23                             | 4.83±0.42                             | 63.71±10.59                                 | 6.24±0.19                             | 6.37±0.36                             | 65.76±6.52                                  |
| 人参滴丸 (100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | 4.49±0.20*                            | 3.79±0.25*                            | 24.31±2.64*                                 | 4.93±0.37*                            | 5.26±0.19*                            | 35.00±3.31*                                 |
| 人参滴丸 (200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | 3.51±0.49**                           | 2.73±0.31**                           | 5.11±3.14**                                 | 3.66±0.42**                           | 4.34±0.11**                           | 15.76±8.20**                                |

注：与 0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  组比较，\* $P < 0.05$ ；与 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  组比较，\*\* $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the ginseng drops (0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) group, \* $P < 0.05$ ; compared with the ginseng drops (100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) group, \*\* $P < 0.05$ .



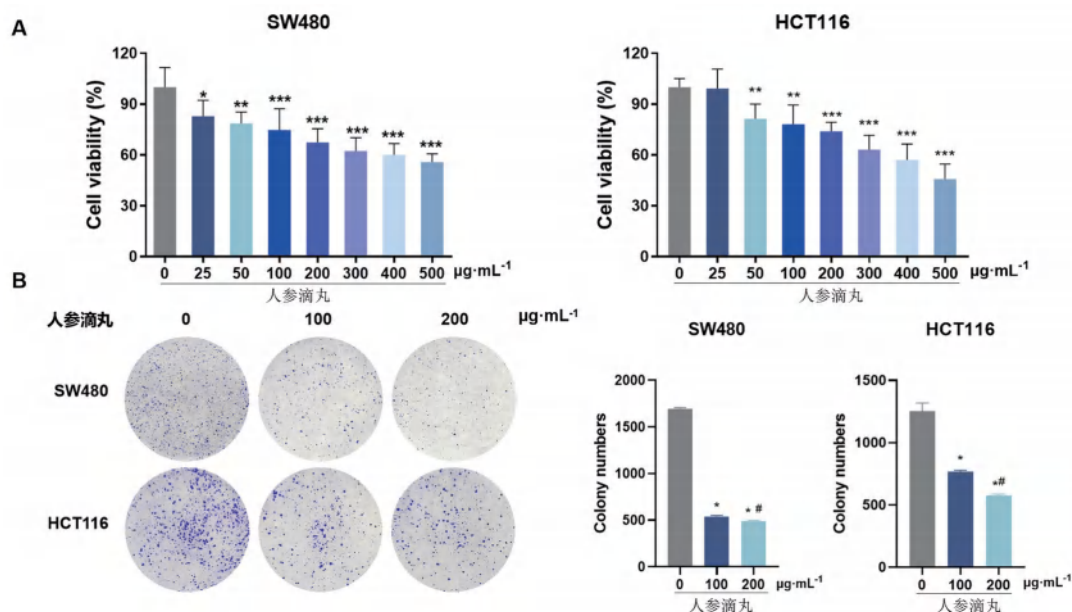


图 1 不同浓度人参滴丸对 SW480、HCT116 细胞存活率、细胞克隆形成能力的影响

Fig 1 Impact of varying concentrations of ginseng drops on the survival rate and clone formation ability of SW480 and HCT116 cells

注：与人参滴丸 ( $0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 组比较,  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ ; 与人参滴丸 ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 组比较,  $^{\#}P < 0.05$ 。

Note: Compared with the ginseng drops ( $0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) group,  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ ; compared with the ginseng drops ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) group,  $^{\#}P < 0.05$ 。

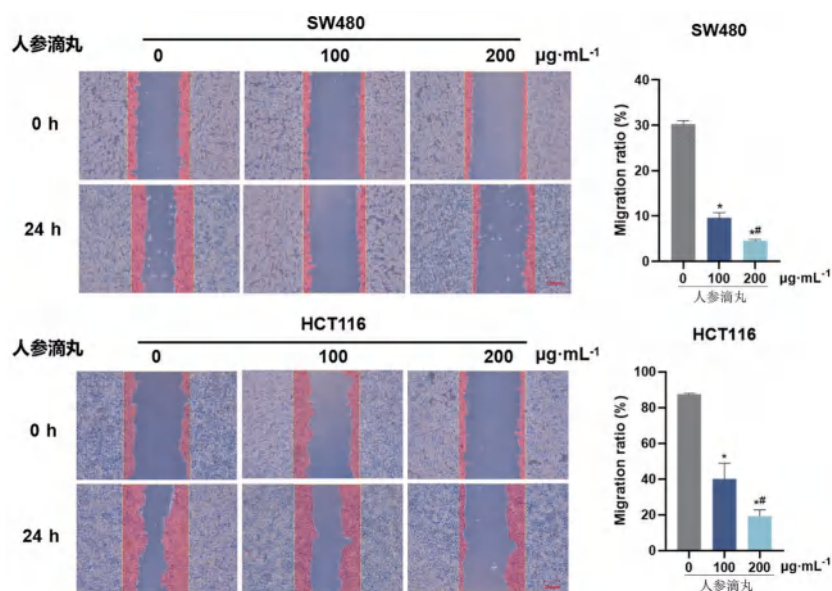


图 2 人参滴丸对 SW480、HCT116 细胞迁移率的影响

Fig 2 Effect of ginseng drops on the migration rate of SW480 and HCT116 cells

注：与人参滴丸 ( $0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 组比较,  $^*P < 0.05$ ; 与人参滴丸 ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 组比较,  $^{\#}P < 0.05$ 。

Note: Compared with the ginseng drops ( $0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) group,  $^*P < 0.05$ ; compared with the ginseng drops ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) group,  $^{\#}P < 0.05$ 。

### 3.4 人参滴丸对结直肠癌细胞 LDH 酶活性及 LDHA 表达的影响

使用  $0$ 、 $100$ 、 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的人参滴丸处理细胞  $48 \text{ h}$  后, 细胞内 LDH 酶活性明显下调, 结果如图 4A; qRT-PCR 及 Western blot 结果显示, 相较于空白组 ( $0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 给药组 LDHA mRNA 和蛋白表达均随药物浓度增加而下降, 提示人参滴丸可以抑制 LDHA 的表达, 结果如图 4B、4C 所示。

### 3.5 人参滴丸对结直肠癌细胞中 T-AOC 及 ROS 的影响

与空白组相比, 给药组 HCT116 和 SW480 细胞中的 T-AOC 显著上升, 见图 5A, 表明人参滴丸可增强结直肠癌细胞内的抗氧化能力, 且抗氧能力随浓度增大而增加。SW480 及 HCT116 细胞中 ROS 的丰度情况见图 5B, 结果显示人参滴丸以剂量依赖的方式降低 SW480 及 HCT116 细胞中 ROS 水平。

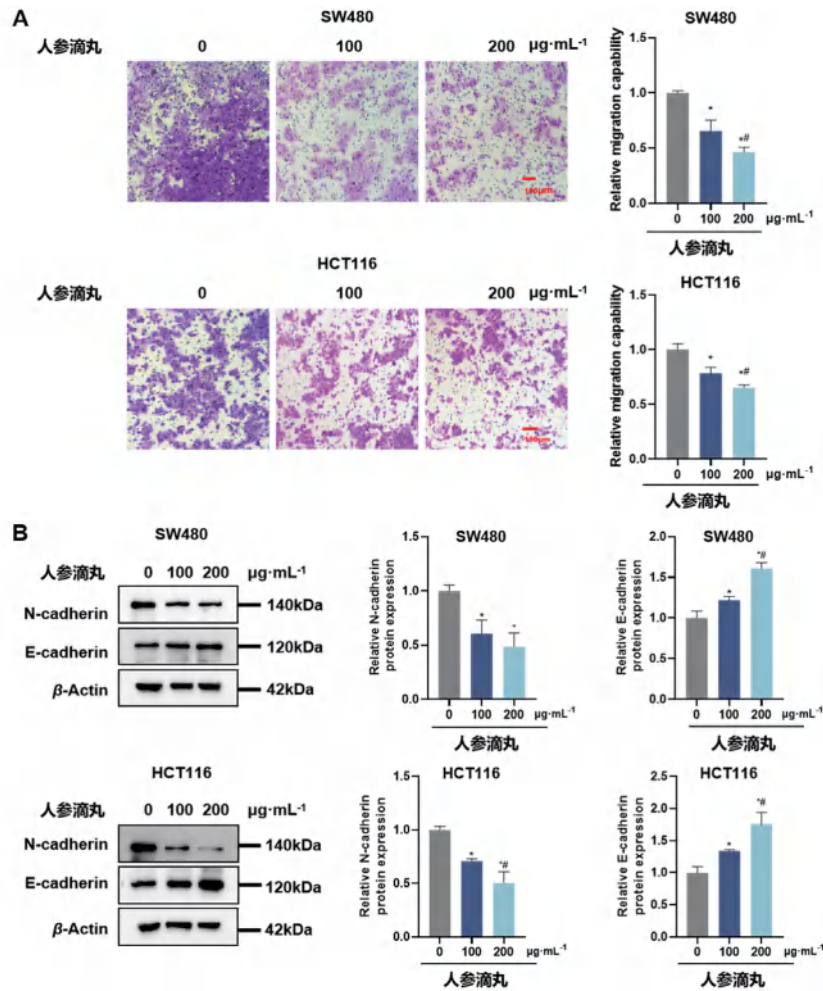


图3 人参滴丸对 SW480、HCT116 细胞侵袭能力及转移相关蛋白表达的影响

Fig 3 Effect of ginseng drops on the invasion ability and expression of metastasis-related proteins in SW480 and HCT116 cells

注：与人参滴丸 ( $0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 组比较,  $^*P < 0.05$ ; 与人参滴丸 ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 组比较,  $^{\#}P < 0.05$ 。

Note: Compared with the ginseng drops ( $0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) group,  $^*P < 0.05$ ; compared with the ginseng drops ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) group,  $^{\#}P < 0.05$ .

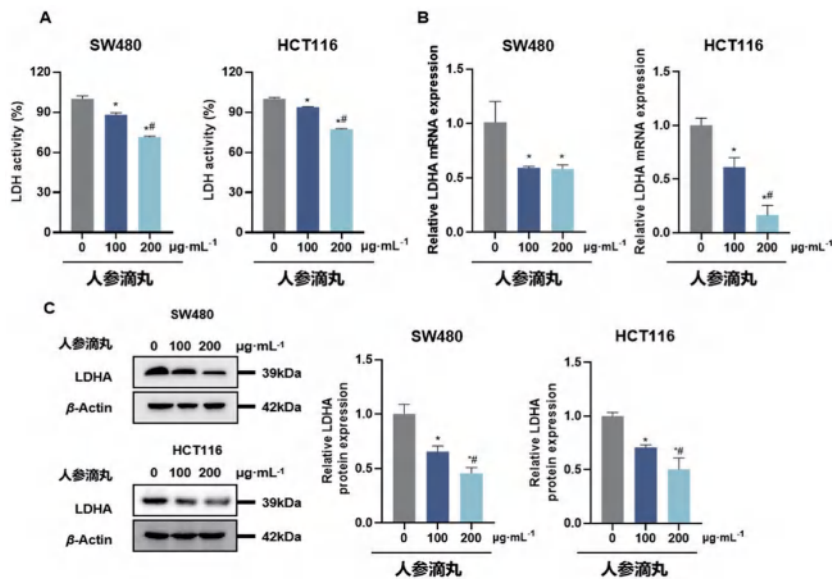


图4 人参滴丸对 SW480、HCT116 细胞 LDH 酶活性及 LDHA 表达的影响

Fig 4 Effect of ginseng drops on LDH content and LDHA expression in SW480 and HCT116 cells

注：与人参滴丸 ( $0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 组比较,  $^*P < 0.05$ ; 与人参滴丸 ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 组比较,  $^{\#}P < 0.05$ 。

Note: Compared with the ginseng drops ( $0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) group,  $^*P < 0.05$ ; compared with the ginseng drops ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) group,  $^{\#}P < 0.05$ .

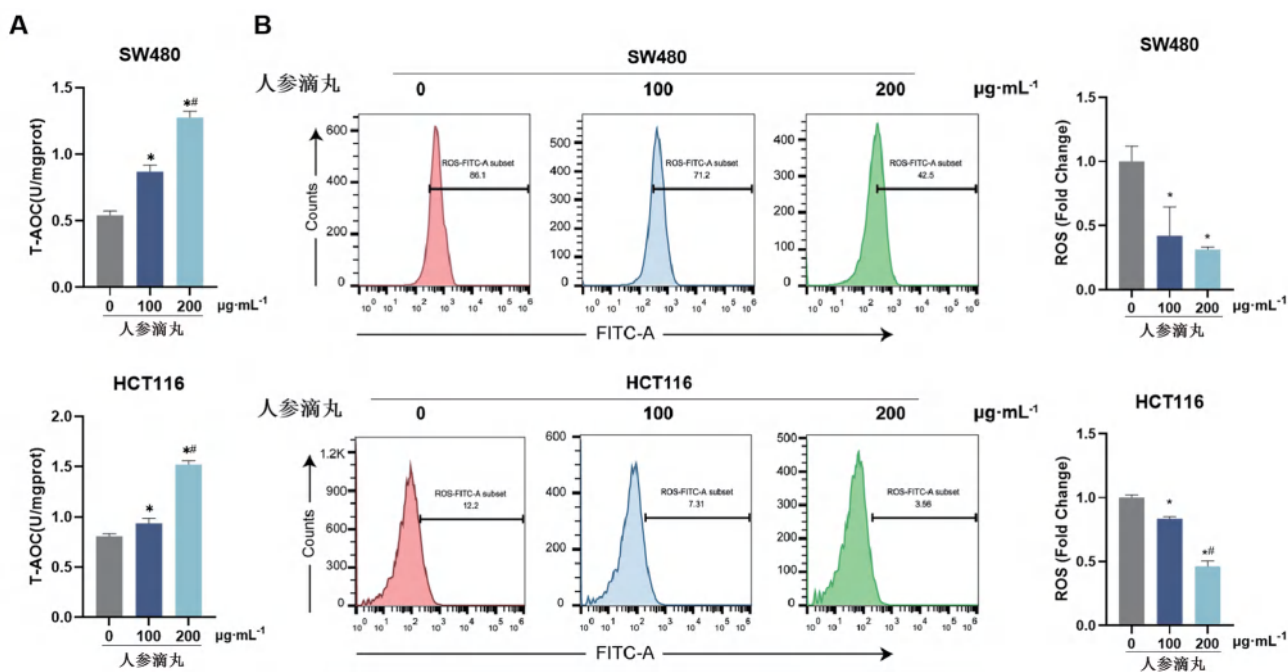


图5 不同浓度人参滴丸对 SW480、HCT116 细胞总抗氧化能力及 ROS 水平的影响

Fig 5 Effect of different concentrations of ginseng drops on total antioxidant capacity and ROS levels in HCT116 and SW480 cells

注：与 0 组比较， $^*P < 0.05$ ；与 100 组比较， $^{\#}P < 0.05$ 。

Note: Compared with the ginseng drops (0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) group,  $^*P < 0.05$ ; compared with the ginseng drops (100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) group,  $^{\#}P < 0.05$ .

### 3.6 人参滴丸对结直肠癌细胞中 SOD 及 MDA 水平的影响

与空白组 (0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 相比，结直肠癌

SW480、HCT116 细胞在不同浓度人参滴丸干预 48 h 后，SOD 活性明显上升 (见图 6A)，MDA 水平出现明显下调 (见图 6B)。

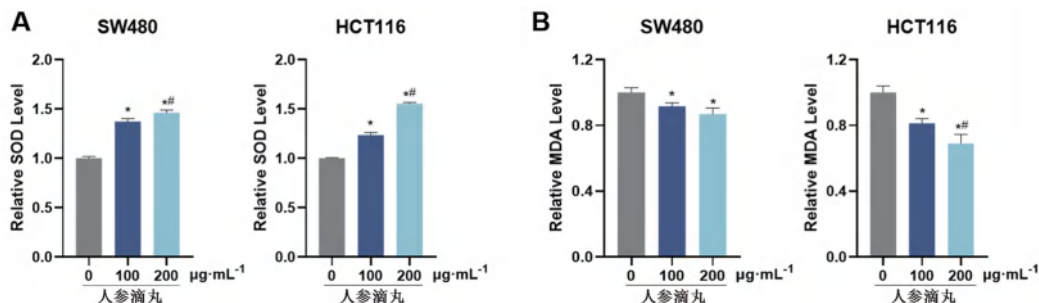


图6 人参滴丸对结直肠癌 SW480、HCT116 细胞 SOD 活性及 MDA 水平的影响

Fig 6 Effect of ginseng drops on SOD activity and MDA level of colorectal cancer SW480 and HCT116 cells

注：与 0 组比较， $^*P < 0.05$ ；与 100 组比较， $^{\#}P < 0.05$ 。

Note: Compared with the ginseng drops (0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) group,  $^*P < 0.05$ ; compared with the ginseng drops (100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) group,  $^{\#}P < 0.05$ .

## 4 结论

本研究首先通过 MTT 实验验证了人参滴丸对人结直肠癌细胞 SW480、HCT116 生存活力的抑制作用，并选取了 100、200  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  人参滴丸进行后续实验。接下来通过克隆形成实验验证了人参滴丸对结直肠癌细胞的克隆能力的影响，说明人参滴丸能有效抑制结直肠癌细胞的克隆形成能力。肿瘤具有转移、复发和耐药等恶性特点是使得肿瘤患者死亡率一直居高不下的主要原因<sup>[11, 13]</sup>。因此通过划痕实验、Transwell 实验及 Western blot 实验评估了人参滴丸对结直肠癌细胞转移与侵袭能力的影

响，结果表明相较于空白组，人参滴丸可以显著抑制给药组细胞迁移率及侵袭能力。

已有研究显示，肿瘤细胞的侵袭迁移与有氧糖酵解产生的乳酸不断积累密切相关<sup>[14]</sup>。通过测定肿瘤细胞乳酸水平、葡萄糖消耗量和 ATP 水平，可初步判断肿瘤细胞糖酵解情况。因此，检测了给予人参滴丸后 SW480 及 HCT116 细胞系胞外葡萄糖消耗量、乳酸含量和胞内 ATP 水平的变化，两个结直肠癌细胞系葡萄糖消耗量、乳酸水平和 ATP 水平都出现了显著降低，初步判断人参滴丸对于结直肠癌细胞的糖酵解水平具有一定的抑制作用。LDH 可催化



丙酮酸还原为乳酸,通过增加乳酸的产生、加速糖酵解、调节 ROS 的产生等促进肿瘤的恶性进展<sup>[15-19]</sup>,抑制 LDH 活性则可以降低肿瘤细胞的浸润和迁移潜力<sup>[20]</sup>。在对结直肠癌细胞加以不同浓度人参滴丸进行处理后,LDH 活力测试结果表明给药后两种结直肠癌细胞 LDH 酶活力均显著下降,且糖酵解中负责将丙酮酸转化为乳酸的 LDHA 的表达明显下降,推测人参滴丸通过减少细胞中 LDH 活性干扰糖酵解途径,进而抑制结直肠癌细胞增殖与迁移能力。Warburg 效应导致线粒体氧化还原电位的改变,最终改变 ROS 的产生,过量的 ROS 会破坏细胞膜和核酸,ROS 不足则会抑制细胞增殖<sup>[21-22]</sup>。因此,探究肿瘤有氧糖酵解与 ROS 水平之间的平衡关系,寻找两者相关分子之间的串扰具有重要意义。本研究发现经人参滴丸处理后,HCT116 和 SW480 细胞中的 T-AOC 呈现显著的增加趋势,且 ROS 明显下降。作为评价氧化应激抗氧化能力的 SOD 活性显著上升、氧化能力指标 MDA 水平明显下调,这表明人参滴丸可以提高结肠癌细胞对氧化应激的应对能力,减少 ROS 的产生进而抑制结肠癌细胞生长。综上所述,人参滴丸在结直肠癌细胞中展现出了显著的抗乳酸、抗氧化能力及抑制肿瘤生长和增殖的效果。

## 参考文献

- [1] Han BF, Zheng RS, Zeng HM, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022 [J]. JNCC, 2024, 4 (1): 47-53.
- [2] Xiang YN, Guo ZM, Zhu PF, et al. Traditional Chinese medicine as a cancer treatment: modern perspectives of ancient but advanced science [J]. Cancer Med, 2019, 8 (5): 1958-1975.
- [3] Choi KT. Botanical characteristics, pharmacological effects and medicinal components of Korean Panax ginseng C A Meyer [J]. Acta Pharmacol Sin, 2008, 29 (9): 1109-1118.
- [4] Park EK, Choo MK, Kim EJ, et al. Antiallergic activity of ginsenoside Rh<sub>2</sub> [J]. Biol Pharm Bull, 2003, 26 (11): 1581-1584.
- [5] Nag SA, Qin JJ, Wang W, et al. Ginsenosides as anticancer agents: in vitro and in vivo activities, structure-activity relationships, and molecular mechanisms of action [J]. Front Pharmacol, 2012, 28 (3): 25.
- [6] Shi J, Xue W, Zhao WJ, et al. Pharmacokinetics and dopamine/acetylcholine releasing effects of ginsenoside Re in hippocampus and mPFC of freely moving rats [J]. Acta Pharmacol Sin, 2013, 34 (2): 214-220.
- [7] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. Cell, 2011, 144 (5): 646-674.
- [8] Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation [J]. Science, 2009, 324 (5930): 1029-1033.
- [9] Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism [J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11 (2): 85-95.
- [10] Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth [J]. Nature, 2008, 452 (7184): 230-233.
- [11] Wang LN, Zhang YX, Song ZM, et al. Ginsenosides: a potential natural medicine to protect the lungs from lung cancer and inflammatory lung disease [J]. Food Funct, 2023, 14 (20): 9137-9166.
- [12] Lee CK, Park KK, Chung AS, et al. Ginsenoside Rg<sub>3</sub> enhances the chemosensitivity of tumors to cisplatin by reducing the basal level of nuclear factor erythroid 2-related factor 2-mediated heme oxygenase-1/NAD (P) H quinone oxidoreductase-1 and prevents normal tissue damage by scavenging cisplatin-induced intracellular reactive oxygen species [J]. Food Chem Toxicol, 2012, 50 (7): 2565-2574.
- [13] Gerstberger S, Jiang QW, Ganesh K. Metastasis [J]. Cell, 2023, 186 (8): 1564-1579.
- [14] Baumann F, Leukel P, Doerfelt A, et al. Lactate promotes glioma migration by TGF-beta2-dependent regulation of matrix metalloproteinase-2 [J]. Neuro Oncol, 2009, 11 (4): 368-380.
- [15] Martínez-Reyes I, Chandel NS. Cancer metabolism: looking forward [J]. Nat Rev Cancer, 2021, 21 (10): 669-680.
- [16] Semenza GL. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations [J]. J Clin Invest, 2013, 123 (9): 3664-3671.
- [17] Li J, Zhang Q, Guan YP, et al. Circular RNA circ-VAMP3 promotes aerobic glycolysis and proliferation by regulating LDHA in renal cell carcinoma [J]. Cell Death Dis, 2022, 13 (5): 443.
- [18] Hou XK, Shi XL, Zhang W, et al. LDHA induces EMT gene transcription and regulates autophagy to promote the metastasis and tumorigenesis of papillary thyroid carcinoma [J]. Cell Death Dis, 2021, 12 (4): 347.
- [19] Brand A, Singer K, Koehl GE, et al. LDHA-associated lactic acid production blunts tumor immunosurveillance by T and NK cells [J]. Cell Metab, 2016, 24 (5): 657-671.
- [20] Li L, Kang L, Zhao W, et al. miR-30a-5p suppresses breast tumor growth and metastasis through inhibition of LDHA-mediated Warburg effect [J]. Cancer Lett, 2017, 1 (400): 89-98.
- [21] Weinberg F, Hamanaka R, Wheaton WW, et al. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107 (19): 8788-8793.
- [22] Locasale JW, Cantley LC. Metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth [J]. Cell Metab, 2011, 14 (4): 443-451.

(收稿日期: 2024-11-05; 修回日期: 2024-12-20)

# 天然产物来源的有效成分抗结肠炎相关结直肠癌的作用及机制的研究进展

黄家彦, 韩笑, 刘彩艳, 周世月, 蒲位凌, 于海洋\* (天津中医药大学中医药研究院, 天津 300190)

**摘要:** 结直肠癌 (CRC) 作为全球第三大常见肿瘤, 每年影响了数百万人的生命安全。肠道不可控炎症作为结直肠癌发病的独立因素也严重影响着炎症肠病 (IBD) 患者的生活质量和生命健康。通过控制肠道炎症来阻止结肠炎相关结直肠癌 (CAC) 的发生是一条行之有效的途径。目前对于炎症肠病的治疗药物主要包括抗炎药物、免疫抑制剂以及生物制剂。这些药物的安全性及生物利用度限制了它们的临床使用, 患者获益有限。因此寻找新的有效性好、不良反应少的治疗药物越来越紧迫。天然产物作为新药开发的重要来源途径之一, 已有几千年的使用历史, 具有丰富的治疗经验, 且大多毒性较小。本文就具有抗结肠炎相关结直肠癌潜力的天然产物来源的有效成分及其作用机制进行综述。

**关键词:** 结直肠癌; 结肠炎相关结直肠癌; 炎症肠病; 天然产物

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)08-2342-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.030

## Research progress in the role and mechanism of natural source active ingredients for colitis associated colorectal cancer

HUANG Jia-yan, HAN Xiao, LIU Cai-yan, ZHOU Shi-yue, PU Wei-ling, YU Hai-yang\* (*Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300190*)

**Abstract:** Colorectal cancer, as the third most common tumor in the world, affects the lives of millions of people every year. Uncontrollable intestinal inflammation, as an independent factor in the pathogenesis of colorectal cancer, also seriously affects the quality of life and health of patients with inflammatory bowel disease. Preventing the development of colitis-associated colorectal cancer by controlling the intestinal inflammation is effective. Current treatments for inflammatory bowel disease drugs, mainly include anti-inflammatory drugs, immunosuppressive agents, and biological agents. The safety and bioavailability of these drugs limit their clinical use and patient benefit is also limited. Therefore, it is urgent to find new therapeutic drugs with good efficacy and fewer side effects. As an important source of new drug development, natural products have been used for thousands of years, with rich treatment experience and little or no toxicity. This article reviewed the active ingredients of natural sources for potential colitis-associated colorectal cancer treatment and their mechanism of action.

**Key words:** colorectal cancer; colitis associated colorectal cancer; inflammatory bowel disease; natural product

结直肠癌 (CRC) 是世界上第三大高发肿瘤和第二大肿瘤致死因素<sup>[1]</sup>。流行病学研究显示, 据统计 2022 年全球有 192 万例新发 CRC 病例和 90 万例 CRC 死亡病例, 占全球癌症发病率的 9.6% (总计 2000 万例新发病例) 和所有癌症死亡 (总计 960 万

例死亡) 的 9.3%<sup>[2]</sup>。中国和美国是 CRC 新发病例数量最多的两个国家。中国的 CRC 新发病例和死亡人数方面排名世界第一, 其发病率的不断攀升给人类的生命健康带来了巨大挑战。

CRC 是常见的消化道恶性肿瘤疾病之一, 可由

**基金项目:** 国家重点研发计划 (No.2021YFE0203100)。

**作者简介:** 黄家彦, 男, 在读硕士研究生, 主要从事中药有效成分抗肿瘤研究, email: huangjiayan1127@163.com \*通信作者: 于海洋, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药抗肿瘤分子药理研究工作, email: yuhaiyang19830116@hotmail.com

包括年龄、性别、肥胖、糖尿病、生活方式、遗传因素、肠道微生物群状态和癌前病变在内的多种因素引发<sup>[3]</sup>。其中散发性 CRC 是 CRC 最重要的一个遗传亚型, 占有 CRC 患者 80% 以上。除此之外, 由一部分炎症肠病 (IBD) (10% ~ 15%) 发展来的 CRC, 称为结肠炎相关结直肠癌 (CAC), 与没有 IBD 病史的患者相比, CAC 患者预后更差<sup>[4]</sup>。在 CAC 形成之前, 通常有很长一段时间的 IBD 过程。IBD 期间, 慢性炎症通过多种机制促进 CAC 的发育, 包括氧化应激、DNA 损伤、异常免疫反应和肠道微生物群的干扰等<sup>[5]</sup>。在 IBD 中, 癌变的发生是一个渐进的多步骤过程, 在慢性炎症和氧化损伤背景下, 组织的无异型增生逐渐进展到低度异型增生再到高度异型增生, 最终形成肿瘤<sup>[6]</sup>, CAC 的这种“炎症-非典型增生-癌序列”与散发性 CRC 的“正常-腺瘤-腺癌序列”不同, CAC 的发病机制涉及在炎症环境中持续刺激上皮细胞增殖的过程, 炎症在 CAC 的发生发展中起着核心作用<sup>[5, 7]</sup>。CRC 是 IBD 最具破坏性的并发症之一。越来越多的研究表明, 结合抗炎治疗并加强监测可以降低 IBD 患者 CAC 的发病率<sup>[8-9]</sup>。

目前对于 IBD 治疗主要以抗炎药物和免疫抑制剂来控制炎症<sup>[10]</sup>。治疗 IBD 的一些成功的药物包括阿达木单抗、英夫利昔单抗、维多珠单抗和托伐菌素, 它们通过靶向特定的免疫成分抑制肠道的炎症反应。然而, 这些药物和其他免疫调节药物仅在部分患者中表现出较好的疗效, 且通常伴随着多种严重的不良反应, 包括严重的感染和癌症发生的风险<sup>[10]</sup>。5-氨基水杨酸 (5-ASA) 和糖皮质激素等药物通过抑制炎症反应被广泛用于治疗溃疡性结肠炎 (UC), 但患者对于 5-ASA 治疗的不依从率高达 41%, 并且治疗后易复发<sup>[11]</sup>。天然产物作为新药开发的重要来源, 近年来涌现出很多具有良好药理活性的有效成分, 它们具有毒性小、易获取的优点。天然产物已经具有数千年的使用历史, 拥有丰富的疾病治疗经验。本文就目前发现具有抗 CAC 潜力的天然产物来源的有效成分及其作用机制进行综述。

## 1 具有潜在抗 CAC 作用的天然产物及其作用机制

### 1.1 天然产物来源的有效成分通过调节肠道微生物群抑制 CAC 的发生

人体肠道中有多种微生物, 与肠细胞形成共生系统, 维持肠道环境<sup>[12]</sup>。肠道微生物群的生态失调会导致肠道炎症的发生。不仅如此, 肠道微生物群的失调也被公认为参与或加重肠道肿瘤的发生发展。Richard 等<sup>[13]</sup>研究显示在 CAC 患者中, 厚壁菌和拟杆菌呈下降趋势。在散发性结肠癌患者中表现为拟杆菌减少, 岩藻菌数量明显增加, 而其他

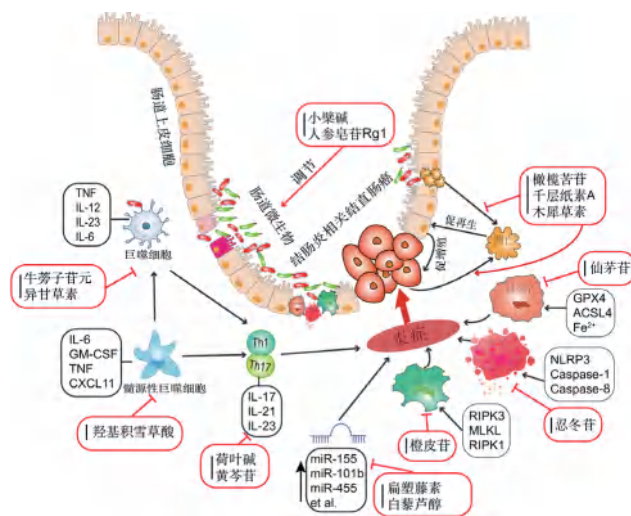


图 1 天然产物来源的活性成分抑制 CAC 进展的作用机制

Fig 1 Mechanism of action of active ingredients from natural products to inhibit CAC progression

种类的细菌和真菌没有表现出差异。这表明了微生物菌群在 CAC 发展过程中的重要作用。

小檗碱 (berberine) 是一种季铵离子异喹啉生物碱<sup>[14]</sup>。Yan 等<sup>[15]</sup>的研究发现小檗碱可以缓解偶氮甲烷 (AOM) / 葡聚糖硫酸钠 (DSS) 诱导的小鼠肠道屏障的损伤从而减少肠道微生物的侵袭, 还可以通过上调产生短链脂肪酸的细菌以及降低致病菌的含量来抑制炎症和 CRC 的发展。小檗碱通过重塑肠道菌群组成抑制了磷酸化核因子  $\kappa$ B (p-NF- $\kappa$ B) / 磷酸化信号传导与转录激活因子 3 (p-STAT3) 途径的激活从而抑制 CAC 的进展。人参皂苷 Rg<sub>1</sub> (ginsenoside Rg<sub>1</sub>) 是中药人参中的生物活性成分<sup>[16]</sup>。Cheng 等<sup>[17]</sup>发现给予小鼠人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 治疗可以逆转由 DSS 导致的肠道微生物群的失衡。此外, 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 还可以对肠道微生物群的各种代谢途径进行调节, 主要通过增加色氨酸代谢物的水平进而影响肠道微生物的色氨酸代谢来缓解肠道炎症。

### 1.2 天然产物来源的有效成分通过调节肠道内细胞程序性死亡 (PCD) 抑制 CAC 的发生

PCD 广泛存在于不同生物体中, 是由基因决定的细胞主动的有序的死亡方式<sup>[18]</sup>。PCD 途径主要包括细胞凋亡、程序坏死、焦亡和铁死亡, 它们在体内平衡、宿主对病原体的防御、癌症和一系列其他病理学中发挥重要作用<sup>[18]</sup>。不同肠道上皮细胞的死亡失调在 IBD 患者和结肠炎的临床前模型中都很常见, 在 IBD 患者的组织中能够检测到肠上皮细胞死亡水平的升高<sup>[19]</sup>。细胞死亡引起上皮屏障缺陷以及随后的免疫反应失调会导致促炎细胞因子和趋化因子过量产生, 进而影响肠道炎症的进展<sup>[20]</sup>。



**1.2.1 通过调节细胞凋亡抑制 CAC** 细胞凋亡可以维持正常的结肠上皮细胞稳态,在哺乳动物大肠中,上皮细胞由结肠隐窝的干细胞产生,结肠隐窝结构受隐窝顶部凋亡和底部细胞增殖的影响<sup>[21]</sup>,细胞凋亡的失衡会导致结肠上皮细胞稳态的失衡,结肠上皮细胞的异常清理会导致肠道癌症的发生。

橄榄苦苷(oleuropein)是橄榄叶提取物中的主要酚类物质之一<sup>[22]</sup>。研究发现橄榄苦苷可以通过抑制肠道炎症因子的产生在乙酸诱导的大鼠溃疡性结肠炎中发挥保护作用<sup>[23]</sup>。橄榄苦苷治疗组的大鼠肠道组织中促凋亡基因 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)表达降低,抗凋亡基因 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)上调,这表明橄榄苦苷可以抑制肠道细胞的异常凋亡来缓解炎症。木犀草素(luteolin)是一种常见的类黄酮。研究发现<sup>[24]</sup>木犀草素能够减轻 DSS 诱导的小鼠结肠炎相关症状,其主要机制是通过抑制 c-Jun 氨基端激酶(JNK)1/2、磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)信号通路、NF- $\kappa$ B 和 STAT3 通路发挥抗炎、抗凋亡和抗自噬作用以恢复结肠稳态<sup>[24]</sup>。千层纸素(aoroxylin A)是黄芩中的活性成分,Yang 等<sup>[25]</sup>发现在小鼠 CAC 模型中,千层纸素 A 主要通过抑制 STAT3 的磷酸化以及抑制 Bcl-2 和细胞周期蛋白 D(Cyclin D)的表达发挥对肠道的保护作用,同时给予千层纸素 A 后 Bax 的表达水平也明显升高,该研究表明千层纸素 A 主要通过白细胞介素(IL)-6/STAT3 信号轴诱导肠组织内肿瘤细胞的凋亡从而抑制结肠炎相关的癌变。

**1.2.2 通过抑制细胞坏死抑制 CAC** 坏死性凋亡是肠上皮细胞死亡的另外一种死亡形式,这种死亡形式主要由受体相互作用蛋白(RIP)介导,坏死细胞的细胞膜的完整性被破坏,胞内物质发生泄漏,导致与损伤相关模式分子的释放,如 IL-1 $\beta$  和高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)<sup>[26]</sup>。这些炎症因子会引起肠道的剧烈炎症反应。之前的研究已经证明细胞坏死在人类 IBD、实验性结肠炎模型和 CAC 模型的进展中都扮演着重要角色<sup>[27-28]</sup>。

橙皮素(hesperetin)是主要来自柑橘类水果的类黄酮<sup>[29]</sup>。Zhang 等<sup>[30]</sup>的研究显示橙皮素可以增加肠道组织闭合小带蛋白-1(ZO-1)、闭合蛋白(occludin)和黏蛋白-2(MUC-2)的表达,降低肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、IL-6、IL-18、HMGB1 和 IL-1 $\beta$  的表达发挥肠道保护作用,进一步研究发现橙皮素降低了 RIPK3 和混合激酶样蛋白(MLKL)这两个坏死途径的关键蛋白的表达,表明橙皮素可以通过抑制 RIPK3/MLKL 坏死信号通路来改善

DSS 诱导的肠道炎症。橙皮素的抗炎作用可以维持肠道屏障的稳态,对于持续炎症刺激造成的肠道组织癌变具有抑制作用。

**1.2.3 通过抑制细胞焦亡抑制 CAC** 焦亡是一种炎性的 PCD 模式,当焦亡发生时细胞会膨胀破裂释放出大量炎症因子来诱导炎症损伤<sup>[31]</sup>。与正常受试者相比,IBD 患者结肠黏膜中焦亡效应分子消皮素(GSDM)D 和 GSDME 的蛋白质水平显著增加<sup>[32-33]</sup>。同时在 AOM/DSS 诱导的小鼠 CAC 模型中发现 GSDME 诱导的焦亡可以增加小肠上皮细胞 HMGB1 的释放从而促进 CAC 的进展<sup>[34]</sup>,抑制焦亡水平可以缓解肠道的炎症持续状态。

忍冬苷(lonicerin)是从药用植物金银花中分离的类黄酮苷,其花芽在历史上被东南亚地区用来治疗炎症和传染性疾病<sup>[35]</sup>。有研究表明忍冬苷可以减轻脂多糖(LPS)和三磷酸腺苷(ATP)诱导的骨髓巨噬细胞的焦亡,体内模型显示忍冬苷可以缓解 DSS 引起的小鼠肠道炎症<sup>[36]</sup>。其具体机制是通过直接与 zeste 基因增强子人类同源物 2(EZH2)结合,促进 EZH2 介导的组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸三甲基化(H3K27me3)来促进自噬相关基因-5(Atg5)的表达,进而导致自噬增强,加速自噬溶酶体介导的 NLRP3 降解,从而抑制炎症小体的组装和激活。阻止细胞焦亡的发生以及随后炎症因子的释放,缓解肠道炎症。

**1.2.4 通过抑制细胞铁死亡抑制 CAC** 铁死亡是近年来被发现的一种新的细胞死亡类型,主要表现在线粒体萎缩、线粒体膜的浓缩和线粒体嵴的减少<sup>[37-38]</sup>。铁离子的过度积累和异常脂质过氧化所释放的活性氧(ROS)的增加在触发铁死亡中起着至关重要的作用<sup>[37]</sup>。此外,谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)的下调和前列腺素内过氧化物合酶 2(PTGS2)mRNA 水平的升高是铁死亡的关键特征<sup>[39]</sup>。在人类 UC 患者、实验性 UC 和 CAC 模型小鼠的肠组织中均发现了铁死亡的存在<sup>[40-41]</sup>,表明铁死亡在肠道炎症发展为癌症的过程中发挥着重要作用。

仙茅苷(curculigoside)是从仙茅中提取的酚苷类成分。Wang 等<sup>[42]</sup>发现在 DSS 处理的小鼠肠道组织中发现了铁超载、谷胱甘肽消耗、ROS 和丙二醛的产生,同时超氧化物歧化酶(SOD)和 GPX4 的表达降低。肠道内细胞的异常铁死亡导致 CAC 的发生<sup>[41]</sup>。给予 AOM/DSS 造模后的小鼠仙茅苷治疗后,模型小鼠的这些症状得到缓解,同时在体外诱导的大鼠肠道上皮细胞 IEC-6 铁死亡模型中发现仙茅苷可以提高 IEC-6 细胞对硒的敏感性,促进 GPX4 的转录水平<sup>[42]</sup>,阻止肠上皮细胞的进一步死亡。这些发现表明仙茅苷可以通过诱导

GPX4 的表达来对抗肠道炎症中的铁死亡, 进而避免进一步的肠道癌症的发生。

### 1.3 天然产物来源的有效成分通过调节 MicroRNA 的表达来抑制 CAC 的发生

MicroRNA (miRNA) 是含 19 ~ 25 个核苷酸大小的短 RNA 分子, 可调节下游基因的转录后翻译<sup>[43]</sup>。在 IBD 的进展过程中, 许多的 miRNA 表达发生变化并调节相关抑癌基因和原癌基因的表达, 通过影响肠道内的稳态来发挥其促癌变作用。许多研究证明 CAC 与炎症引发的 miRNA 异常表达有关。Chen 等<sup>[44]</sup>使用 AOM/DSS 诱导的 CAC 小鼠模型来探索 CAC 前期 miRNA 的异位表达, 发现 miR-31-5p、miR-223-3p 和 let-7f-5p 在肠道发育不良的发展过程中失调。这些 miRNA 的表达在持续性肠道炎症中发生改变, 并调节其靶基因的表达, 在肠道稳态失衡中扮演着重要角色。如何通过药物手段调节 miRNA 的表达避免进一步的炎症恶化和肠道癌变值得进一步研究。

扁塑藤素 (pristimerin) 是从卫矛科植物中分离的天然三萜类化合物<sup>[45]</sup>。Tian 等<sup>[45]</sup>发现给予 DSS 造模的小鼠腹腔注射扁塑藤素治疗, 其可以通过抑制肠道内 miRNA-155 的表达并抑制 NF- $\kappa$ B 通路, 缓解小鼠的肠道炎症症状。白藜芦醇 (resveratrol) 是一种天然存在的二苯乙烯类化合物<sup>[46]</sup>。白藜芦醇的抗小鼠 UC 作用在之前的研究中已被证实<sup>[47]</sup>。在此基础上, 另外一项研究研究了白藜芦醇对 CAC 模型小鼠的治疗作用, 结果表明给予白藜芦醇干预后, 其显著逆转了 DSS 对 Apc<sup>Min/+</sup>小鼠肠系膜淋巴结中特异性炎性 CD8<sup>+</sup>T 细胞、CD4<sup>+</sup>T 细胞、自然杀伤 T 细胞、B 细胞和髓源性抑制细胞 (MDSCs) 数量的影响<sup>[46]</sup>。miRNA 微阵列分析显示, 白藜芦醇主要通过调控 miRNA-101b 和 miRNA-455 的表达来抑制肠道炎症的发生和肿瘤的发展。这些研究结果揭示了来源于天然产物的有效成分可以通过靶向 miRNA 来缓解肠道炎症以及抑制 CAC, 未来需要开发更多靶向 miRNA 的小分子药物为临床用药提供更多选择。

### 1.4 天然产物来源的有效成分通过调节肠道免疫来抑制 CAC 的发生

肠道是人类免疫系统中最大的组成部分<sup>[48]</sup>。肠道免疫和稳态由肠道内丰富的先天免疫细胞和适应性免疫细胞、黏液相关的淋巴组织和肠道内的共生微生物共同调节<sup>[49]</sup>。骨髓细胞和淋巴细胞大量浸润到肠组织中是 IBD 的主要病理特征。树突状细胞 (DC) 和巨噬细胞感知入侵的微生物并调节促炎性淋巴细胞的分化, 淋巴细胞进一步将骨髓细胞募集到局部肠组织中<sup>[50]</sup>。这些骨髓细胞

在促进 IBD 向 CAC 的转化中起着重要作用。如何通过药物调节患者的肠道免疫状态以恢复肠道稳态是一个有效的治疗手段。

**1.4.1 通过调节 Th17 细胞抑制 CAC** Th17 细胞是能分泌 IL-17 等促炎因子并表达视黄酸相关孤儿受体  $\gamma$ t (ROR $\gamma$ t) CD4<sup>+</sup>T 的一类细胞, 在炎症相关疾病和癌症中具有重要作用<sup>[51-52]</sup>。IBD 患者外周血中 Th17 细胞比例增加, IBD 患者处于炎症的黏膜中与 Th17 相关的各种细胞因子也显著增加。研究表明转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 信号传导能促进 Th17 细胞产生 IL-22, 从而促进体内肠道肿瘤发生<sup>[53]</sup>, 表明了 Th17 细胞在炎症相关的癌症进展中的重要作用。

荷叶碱 (nuciferine) 是荷叶中的一种阿朴啡型生物碱<sup>[54]</sup>。研究发现荷叶碱对 DSS 诱导的结肠炎症具有保护作用, 荷叶碱可以恢复模型小鼠 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>的比例以及调整 Th17/调节性 T 细胞 (Treg) 细胞的比例来缓解肠道炎症<sup>[55]</sup>。黄芩苷 (baicalin) 是从黄芩中分离出的一类主要的类黄酮, 主要位于黄芩根中<sup>[56]</sup>。在三硝基苯磺酸 (TNBS) 诱导的小鼠 UC 模型中, 给予模型小鼠黄芩苷可显著下调 Th17 细胞的数量以及 Th17 相关细胞因子 (IL-17 和 IL-6) 和 ROR $\gamma$ t 的水平, 而 Treg 细胞数量增加。黄芩苷通过调节 TNBS 诱导的 UC 中 Th17/Treg 细胞的比例来抑制肠道炎症的进一步发展<sup>[57]</sup>。

**1.4.2 通过调节 MDSCs 抑制 CAC** MDSCs 是骨髓祖细胞和未成熟骨髓细胞的异质性群体<sup>[58]</sup>。在 IBD 和 CAC 中, MDSCs 大量浸润到肠道组织和肿瘤微环境中。当肠道处于炎症状态时, MDSCs 在肠组织中被招募和激活, 这些细胞抑制了 T 细胞释放的  $\gamma$  干扰素 (IFN- $\gamma$ )<sup>[59]</sup>。活化的 MDSCs 抑制 DC 的抗原摄取和处理以及随后的 CD4T 细胞增殖和活化, 导致细菌渗透部位致病细菌清除不足, 引起持续的炎症刺激<sup>[60-61]</sup>。这些导致了炎症反应向慢性炎症进展, 而持续的慢性炎症又为肿瘤的起始创造了适宜的环境。在 IBD 期间, 过量 MDSCs 衍生的 ROS 也可能通过损害肠道上皮细胞的 DNA 来促进从慢性炎症到异型增生的转变<sup>[62]</sup>。MDSCs 在慢性炎症的进程和 CAC 的起始过程中起到了重要的作用。

羟基积雪草酸 (madecassic acid) 是从伞形科植物积雪草中分离得到的三萜类化合物<sup>[63]</sup>。AOM/DSS 构建的小鼠 CAC 模型中, 羟基积雪草酸的干预减少了 CAC 小鼠结肠组织中 MDSCs 的数量, 并改善了抗肿瘤免疫反应。在 CAC 小鼠肿瘤微环境中活化的  $\gamma$ DT17 细胞群体与 MDSCs 和肿瘤的数量以及肿瘤负荷成正相关。羟基积雪草酸可以通过抑制  $\gamma$ DT17 细胞的活化和相关趋化因子的表达来阻



止 MDSCs 的迁移<sup>[63]</sup>，从而抑制肠道 CAC 的进展。

**1.4.3 通过调节巨噬细胞抑制 CAC** 巨噬细胞对于不同刺激具有不同的极化状态，可以分化为 M1 型巨噬细胞和 M2 型巨噬细胞<sup>[64]</sup>。在肿瘤发生发展过程中起促进作用的一类巨噬细胞被称为肿瘤相关巨噬细胞 (TAM)<sup>[65]</sup>。在肿瘤的进展中，大多数 TAM 被认为具有促进肿瘤血管生成的 M2 表型，并促进肿瘤细胞侵袭和转移<sup>[64]</sup>。然而，大多数确诊的肿瘤促进细胞因子是 M1 型相关的细胞因子，如 IL-6。所以简单的 M1 和 M2 的分型可能不足以完全概括 TAM 在体内的可塑性和分化状态，这与人体内复杂的免疫微环境有关。尽管如此，过多的巨噬细胞浸润已经被发现对 UC 和 CRC 的进展起到促进作用。多项临床研究表明，与正常人相比，UC 和 CRC 患者的结直肠组织具有更多的巨噬细胞浸润并且与疾病严重程度成正相关<sup>[66-67]</sup>。

牛蒡子苷元 (arctigenin) 是从牛蒡子中提取的木脂素类成分<sup>[68]</sup>。牛蒡子苷元通过抑制 Th1 和 Th17 细胞反应，可显著改善 DSS 诱导的小鼠结肠炎<sup>[69]</sup>。在 AOM/DSS 模型小鼠中，牛蒡子苷元可以阻止结肠炎的进展，并防止 CRC 的发生。牛蒡子苷元通过抑制巨噬细胞肉碱棕榈酰基转移酶 1 的表达，降低  $\alpha$ -微管蛋白的乙酰化，破坏 NLRP3 复合物的形成，从而使 NLRP3 炎症小体失活，改善小鼠 CAC<sup>[68]</sup>。异甘草素 (isoliquiritigenin) 是一种来自甘草的膳食类黄酮，可以通过抑制巨噬细胞中前列腺素 E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 和 IL-6 的产生来发挥抗炎作用<sup>[70]</sup>。在此基础上，Zhao 等<sup>[71]</sup>发现异甘草素通过减少 PGE2 和 IL-6 的表达，阻碍 PGE2 和 IL-6 相互作用所引起的 M2 型巨噬细胞极化以抑制 AOM/DSS 诱导的小鼠肠道肿瘤的生长。

2 小结与讨论

CRC 作为全球第三大高发肿瘤，已经成为威胁人类生命健康的疾病。而 CAC 作为 CRC 患者中一类特殊的分型也严重威胁了 IBD 患者的生活质量和生命安全。持续不可控制的肠道炎症是 CAC 发病的重要原因，如何缓解或者抑制 IBD 患者肠道内持续性的炎症反应是阻止 CAC 发生的有效手段。目前临床上用于缓解 IBD 的药物存在各种不良反应，并不能使患者的治疗最大化获益。天然产物得益于丰富的化学成分和靶点的多样性在疾病治疗过程中发挥着不可替代的作用。如源于天然产物的单体紫杉醇，是第一个从植物中提取出来用于癌症患者化疗的药物，临床上仍然能够看到紫杉醇的使用；喜树碱也是从植物中提取出来的抗肿瘤药物，其类似物拓扑替康和伊立替康在临床的抗肿瘤治疗得到了很好的应用。同样，很多来源于天然产物的单体被发现在 IBD 和 CAC 小鼠模型中具有很好的抗炎和抑制 CAC 进展的作用。本文主要讨论了肠道微生物、细胞死亡方式、肠道 miRNA 的表达异常和肠道免疫失调四个方面引起肠道炎症反应和引发不可逆的 CAC 的机制以及目前有关作用于这些靶点通路和相关免疫细胞的天然产物的研究。随着越来越多的单体被发现，从天然产物中寻找可以有效抑制 IBD 和 CAC 的治疗药物表现出了广阔的前景和希望。我们对已报道具有抗 CAC 作用的天然产物 (见表 1) 及其化学结构 (见图 2) 进行了汇总。尽管如此，目前能够进入临床的药物并不多见。我们也期望随着研究的进一步深入，更多的天然产物被发现，更多来源于天然产物的中药单体能够进入临床，为临床患者带来更大的获益。

表 1 抑制 CAC 的天然产物及其作用机制

Tab 1 Natural products inhibiting CAC and their mechanism of action

| 编号 | 中文名称                 | 英文名称                        | 来源                                    | 机制                            | 参考文献     |
|----|----------------------|-----------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|----------|
| 1  | 小檗碱                  | berberine                   | <i>Coptis chinensis</i>               | 重塑肠道菌群组成                      | [15, 72] |
| 2  | 人参皂苷 Rg <sub>1</sub> | ginsenoside Rg <sub>1</sub> | <i>Panax ginseng</i> C. A. Mey.       | 调节肠菌代谢                        | [16]     |
| 3  | 橄榄苦苷                 | oleuropein                  | <i>Olea europaea</i> L.               | 抑制肠道细胞凋亡                      | [23]     |
| 4  | 木犀草素                 | luteolin                    | <i>Pteris multifida</i> Poir          | 刺激结肠抗炎、抗凋亡、抗自噬                | [24, 73] |
| 5  | 千层纸素 A               | oroxylin A                  | <i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi | 促进肠道肿瘤细胞凋亡                    | [25]     |
| 6  | 橙皮素                  | hesperetin                  | <i>Citrus aurantium</i>               | 抑制肠道组织的异常坏死                   | [30, 74] |
| 7  | 忍冬苷                  | lonicerin                   | <i>Lonicera japonica</i> Thunb.       | 抑制巨噬细胞异常焦亡                    | [36]     |
| 8  | 仙茅苷                  | curculigoside               | <i>Curculigo orchoides</i> Gaertn.    | 抑制肠道细胞的异常铁死亡                  | [42]     |
| 9  | 扁蒴藤素                 | pristimerin                 | <i>Celastraceae</i>                   | 抑制 miRNA-155 的表达              | [75]     |
| 10 | 白藜芦醇                 | resveratrol                 | <i>Vitis vinifera</i> L.              | 调控 miRNA-101b 和 miRNA-455 的表达 | [46, 76] |
| 11 | 荷叶碱                  | nuciferine                  | <i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn.       | 平衡 17/Treg 细胞的比例              | [55]     |
| 12 | 黄芩苷                  | baicalin                    | <i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi | 平衡 17/Treg 细胞的比例              | [57, 77] |
| 13 | 羟基积雪草酸               | madecassic acid             | <i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.    | 抑制 MDSCs 的迁移                  | [63, 78] |
| 14 | 牛蒡子苷元                | arctigenin                  | <i>Arctium lappa</i> L.               | 抑制巨噬细胞 NLRP3 的活化              | [68, 79] |
| 15 | 异甘草素                 | isoliquiritigenin           | <i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.   | 抑制巨噬细胞向 M2 型极化                | [71, 80] |



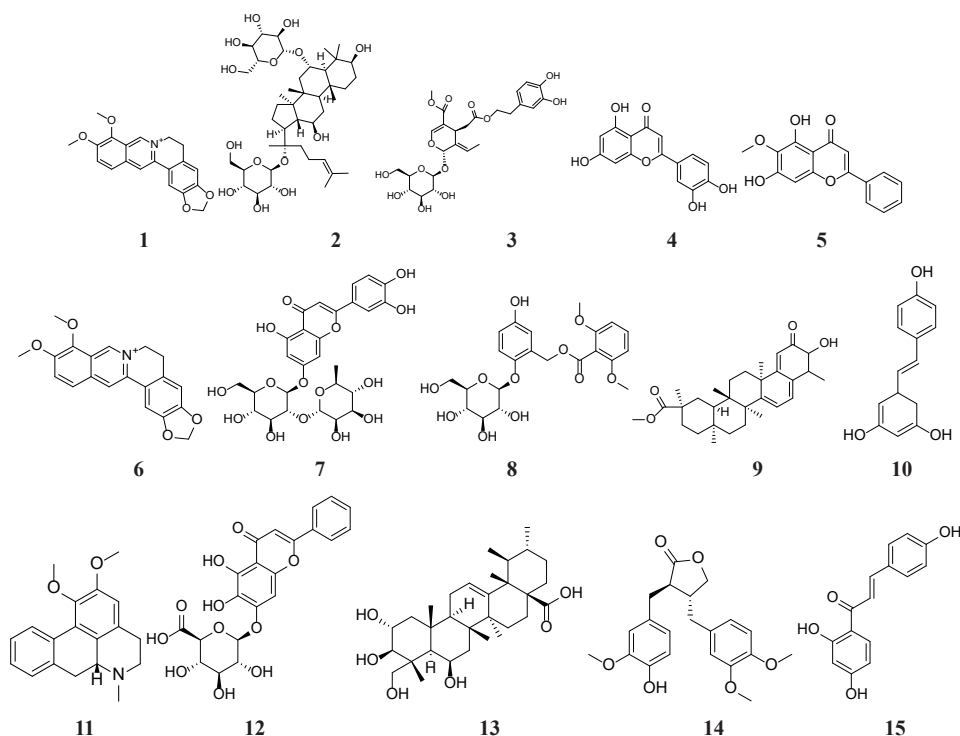


图 2 抑制 CAC 的天然产物的化学结构

Fig 2 Chemical structure of natural products that inhibit CAC

## 参考文献

- [1] Siegel RL, Kratzer TB., Giaquinto, et al. Cancer statistics, 2025 [J]. CA Cancer J Clin, 2025, 75 (1): 10-45.
- [2] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74 (3): 229-263.
- [3] Yang Y, Han ZH, Li X, et al. Epidemiology and risk factors of colorectal cancer in China [J]. Chin J Cancer Res, 2020, 32 (6): 729-741.
- [4] Andersen NN, Jess T. Has the risk of colorectal cancer in inflammatory bowel disease decreased [J]. World J Gastroenterol, 2013, 19 (43): 7561-7568.
- [5] Nagao-Kitamoto H, Kitamoto S, Kamada N. Inflammatory bowel disease and carcinogenesis [J]. Cancer Metastasis Rev, 2022, 41 (2): 301-316.
- [6] Baker KT, Salk JJ, Brentnall TA, et al. Precancer in ulcerative colitis: the role of the field effect and its clinical implications [J]. Carcinogenesis, 2018, 39 (1): 11-20.
- [7] Grivennikov SI. Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia [J]. Semin Immunopathol, 2013, 35 (2): 229-244.
- [8] Jess T, Simonsen J, Jørgensen KT, et al. Decreasing risk of colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease over 30 years [J]. Gastroenterology, 2012, 143 (2): 375-381.
- [9] Castaño-Milla C, Chaparro M, Gisbert JP. Systematic review with meta-analysis: the declining risk of colorectal cancer in ulcerative colitis [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2014, 39 (7): 645-659.
- [10] Van der Lelie D, Oka A, Taghavi S, et al. Rationally designed bacterial consortia to treat chronic immune-mediated colitis and restore intestinal homeostasis [J]. Nat Commun, 2021, 12 (1): 3105.
- [11] Ballester MP, Marti-Aguado D, Fullana M, et al. Impact and risk factors of non-adherence to 5-aminosalicylates in quiescent ulcerative colitis evaluated by an electronic management system [J]. Int J Colorectal Dis, 2019, 34 (6): 1053-1059.
- [12] Dai ZJ, Zhang JQ, Wu Q, et al. The role of microbiota in the development of colorectal cancer [J]. Int J Cancer, 2019, 145 (8): 2032-2041.
- [13] Richard ML, Liguori G, Lamas B, et al. Mucosa-associated microbiota dysbiosis in colitis associated cancer [J]. Gut Microbes, 2018, 9 (2): 131-142.
- [14] Chen HT, Zhang F, Li RR, et al. Berberine regulates fecal metabolites to ameliorate 5-fluorouracil induced intestinal mucositis through modulating gut microbiota [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 124: 109829.
- [15] Yan SH, Chang JY, Hao XH, et al. Berberine regulates short-chain fatty acid metabolism and alleviates the colitis-associated colorectal tumorigenesis through remodeling intestinal flora [J]. Phytomedicine, 2022, 102: 154217.
- [16] Zhu G, Wang HN, Wang TC, et al. Ginsenoside Rg1 attenuates the inflammatory response in DSS-induced mice colitis [J]. Int Immunopharmacol, 2017, 50: 1-5.
- [17] Cheng H, Liu J, Zhang DD, et al. Ginsenoside Rg1 alleviates acute ulcerative colitis by modulating gut microbiota and microbial tryptophan metabolism [J]. Front Immunol, 2022, 13: 817600.
- [18] Bedoui S, Herold MJ, Strasser A. Emerging connectivity of

- programmed cell death pathways and its physiological implications [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21 (11): 678-695.
- [19] Iwamoto M, Koji T, Makiyama K, et al. Apoptosis of crypt epithelial cells in ulcerative colitis [J]. *J Pathol*, 1996, 180 (2): 152-159.
- [20] Yilmaz B, Juillerat P, Øyås O, et al. Microbial network disturbances in relapsing refractory Crohn's disease [J]. *Nat Med*, 2019, 25 (2): 323-336.
- [21] López-Posadas R, Neurath MF, Atreya I. Molecular pathways driving disease-specific alterations of intestinal epithelial cells [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74 (5): 803-826.
- [22] Vezza T, Algieri F, Rodríguez-Nogales A, et al. Immunomodulatory properties of *Olea europaea* leaf extract in intestinal inflammation [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2017, 61 (10): 28731213.
- [23] Motawea MH, Abd Elmaksoud HA, Elharif MG, et al. Evaluation of anti-inflammatory and antioxidant profile of oleuropein in experimentally induced ulcerative colitis [J]. *Int J Mol Cell Med*, 2020, 9 (3): 224-233.
- [24] Vukelić I, Detel D, Batičić L, et al. Luteolin ameliorates experimental colitis in mice through ERK-mediated suppression of inflammation, apoptosis and autophagy [J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 145: 111680.
- [25] Yang X, Zhang F, Wang Y, et al. Oroxylin A inhibits colitis-associated carcinogenesis through modulating the IL-6/STAT3 signaling pathway [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2013, 19 (9): 1990-2000.
- [26] Patankar JV, Müller TM, Kantham S, et al. E-type prostanoïd receptor 4 drives resolution of intestinal inflammation by blocking epithelial necroptosis [J]. *Nat Cell Biol*, 2021, 23 (7): 796-807.
- [27] Liu Q, Du PY, Zhu Y, et al. Thioredoxin reductase 3 suppression promotes colitis and carcinogenesis via activating pyroptosis and necrosis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79 (2): 106.
- [28] Lehle AS, Farin HF, Marquardt B, et al. Intestinal inflammation and dysregulated immunity in patients with inherited caspase-8 deficiency [J]. *Gastroenterology*, 2019, 156 (1): 275-278.
- [29] Shirzad M, Heidarian E, Beshkar P, et al. Biological effects of hesperetin on interleukin-6/phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3 pathway signaling in prostate cancer PC3 cells [J]. *Pharmacognosy Res*, 2017, 9 (2): 188-194.
- [30] Zhang JX, Lei HB, Hu X, et al. Hesperetin ameliorates DSS-induced colitis by maintaining the epithelial barrier via blocking RIPK3/MLKL necroptosis signaling [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 873: 172992.
- [31] Duprez L, Wirawan E, Vanden Berghe T, et al. Major cell death pathways at a glance [J]. *Microbes Infect*, 2009, 11 (13): 1050-1062.
- [32] Bulek K, Zhao J, Liao Y, et al. Epithelial-derived gasdermin D mediates nonlytic IL-1 $\beta$  release during experimental colitis [J]. *J Clin Invest*, 2020, 130 (8): 4218-4234.
- [33] Rogers C, Fernandes-Alnemri T, Mayes L, et al. Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14128.
- [34] Tan G, Huang CY, Chen JY, et al. HMGB1 released from GSDME-mediated pyroptotic epithelial cells participates in the tumorigenesis of colitis-associated colorectal cancer through the ERK1/2 pathway [J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13 (1): 149.
- [35] Shang XF, Pan H, Li MX, et al. *Lonicera japonica* Thunb.: ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 138 (1): 1-21.
- [36] Lv Q, Xing Y, Liu J, et al. Lonicerin targets EZH2 to alleviate ulcerative colitis by autophagy-mediated NLRP3 inflammasome inactivation [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11 (9): 2880-2899.
- [37] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149 (5): 1060-1072.
- [38] Xie Y, Hou W, Song X, et al. Ferroptosis: process and function [J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23 (3): 369-379.
- [39] Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4 [J]. *Cell*, 2014, 156 (1-2): 317-331.
- [40] Xu MY, Tao J, Yang YD, et al. Ferroptosis involves in intestinal epithelial cell death in ulcerative colitis [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11 (2): 86.
- [41] Zhang XL, Li WW, Ma YM, et al. High-fat diet aggravates colitis-associated carcinogenesis by evading ferroptosis in the ER stress-mediated pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 177: 156-166.
- [42] Wang SJ, Liu W, Wang J, et al. Curculigoside inhibits ferroptosis in ulcerative colitis through the induction of GPX4 [J]. *Life Sci*, 2020, 259: 118356.
- [43] Lu TX, Rothenberg ME. MicroRNA [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141 (4): 1202-1207.
- [44] Chen G, Feng Y, Li XZ, et al. Post-transcriptional gene regulation in colitis associated cancer [J]. *Front Genet*, 2019, 10: 585.
- [45] Tian MX, Peng S, Wang SS, et al. Pristimerin reduces dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by inhibiting microRNA-155 [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 94: 107491.
- [46] Altamemi I, Murphy EA, Catroppo JF, et al. Role of microRNAs in resveratrol-mediated mitigation of colitis-associated tumorigenesis in *Apc<sup>Min/+</sup>* mice [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2014, 350 (1): 99-109.
- [47] Singh UP, Singh NP, Busbee B, et al. Alternative medicines as emerging therapies for inflammatory bowel diseases [J]. *Int Rev Immunol*, 2012, 31 (1): 66-84.
- [48] Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14 (10): 667-685.
- [49] Gomaa EZ. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2020, 113 (12): 2019-2040.
- [50] Segal AW. Studies on patients establish Crohn's disease as a manifestation of impaired innate immunity [J]. *J Intern Med*, 2019, 286 (4): 373-388.

- [51] Zhu DW, Tian J, Wu XY, et al. G-MDSC-derived exosomes attenuate collagen-induced arthritis by impairing Th1 and Th17 cell responses [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019, 1865 (12): 165540.
- [52] Zhao HK, Wu L, Yan GF, et al. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6 (1): 263.
- [53] Perez LG, Kempski J, McGee HM, et al. TGF- $\beta$  signaling in Th17 cells promotes IL-22 production and colitis-associated colon cancer [J]. *Nat Commun*, 2020, 11: 2608.
- [54] Zhang C, Deng JJ, Liu D, et al. Nuciferine inhibits proinflammatory cytokines via the PPARs in LPS-induced RAW264.7 Cells [J]. *Molecules*, 2018, 23 (10): E2723.
- [55] Zhu YL, Zhao Q, Huang Q, et al. Nuciferine regulates immune function and gut microbiota in DSS-induced ulcerative colitis [J]. *Front Vet Sci*, 2022, 9: 939377.
- [56] Ikemoto S, Sugimura K, Yoshida N, et al. Antitumor effects of *Scutellariae radix* and its components baicalein, baicalin, and wogonin on bladder cancer cell lines [J]. *Urology*, 2000, 55 (6): 951-955.
- [57] Zou Y, Dai SX, Chi HG, et al. Baicalin attenuates TNBS-induced colitis in rats by modulating the Th17/Treg paradigm [J]. *Arch Pharm Res*, 2015, 38 (10): 1873-1887.
- [58] Zhu YZZ, Cao SY. Unraveling the complexities of myeloid-derived suppressor cells in inflammatory bowel disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26 (7): 3291.
- [59] Wang YG, Ding YX, Deng YJ, et al. Role of myeloid-derived suppressor cells in the promotion and immunotherapy of colitis-associated cancer [J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8 (2): e000609.
- [60] Neut C, Bulois P, Desreumaux P, et al. Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease [J]. *Am J Gastroenterol*, 2002, 97 (4): 939-946.
- [61] Packey CD, Sartor RB. Interplay of commensal and pathogenic bacteria, genetic mutations, and immunoregulatory defects in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases [J]. *J Intern Med*, 2008, 263 (6): 597-606.
- [62] De BO, Sanchez-Moral L, Cortés M, et al. ZEB1 promotes inflammation and progression towards inflammation-driven carcinoma through repression of the DNA repair glycosylase MPG in epithelial cells [J]. *Gut*, 2019, 68 (12): 2129-2141.
- [63] Yun XM, Zhang Q, Fang YL, et al. Madecassic acid alleviates colitis-associated colorectal cancer by blocking the recruitment of myeloid-derived suppressor cells via the inhibition of IL-17 expression in  $\gamma\delta$ T17 cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2022, 202: 115138.
- [64] Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer [J]. *Cell*, 2010, 140 (6): 883-899.
- [65] Galdiero MR, Marone G, Mantovani A. Cancer inflammation and cytokines [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018, 10 (8): a028662.
- [66] Keller DS, Windsor A, Cohen R, et al. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: review of the evidence [J]. *Tech Coloproctol*, 2019, 23 (1): 3-13.
- [67] Shah SC, Itzkowitz SH. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: mechanisms and management [J]. *Gastroenterology*, 2022, 162 (3): 715-730.
- [68] Qiao SM, Lv CJ, Tao Y, et al. Arctigenin disrupts NLRP3 inflammasome assembly in colonic macrophages via downregulating fatty acid oxidation to prevent colitis-associated cancer [J]. *Cancer Lett*, 2020, 491: 162-179.
- [69] Wu X, Dou YN, Yang YY, et al. Arctigenin exerts anti-colitis efficacy through inhibiting the differentiation of Th1 and Th17 cells via an mTORC1-dependent pathway [J]. *Biochem Pharmacol*, 2015, 96 (4): 323-336.
- [70] Kim JY, Park SJ, Yun KJ, et al. Isoliquiritigenin isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the attenuation of NF- $\kappa$ B in RAW 264.7 macrophages [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 584 (1): 175-184.
- [71] Zhao HX, Zhang XH, Chen XW, et al. Isoliquiritigenin, a flavonoid from licorice, blocks M2 macrophage polarization in colitis-associated tumorigenesis through downregulating PGE2 and IL-6 [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, 279 (3): 311-321.
- [72] Chen HT, Zhang F, Zhang J, et al. A holistic view of berberine inhibiting intestinal carcinogenesis in conventional mice based on microbiome-metabolomics analysis [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 588079.
- [73] Li BL, Zhao DY, Du PL, et al. Luteolin alleviates ulcerative colitis through SHP-1/STAT3 pathway [J]. *Inflamm Res*, 2021, 70 (6): 705-717.
- [74] He W, Liu MY, Li YM, et al. Flavonoids from *Citrus aurantium* ameliorate TNBS-induced ulcerative colitis through protecting colonic mucus layer integrity [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 857: 172456.
- [75] Park JH, Kim JK. Pristimerin, a naturally occurring triterpenoid, attenuates tumorigenesis in experimental colitis-associated colon cancer [J]. *Phytomedicine*, 2018, 42: 164-171.
- [76] Pan HH, Zhou XX, Ma YY, et al. Resveratrol alleviates intestinal mucosal barrier dysfunction in dextran sulfate sodium-induced colitis mice by enhancing autophagy [J]. *World J Gastroenterol*, 2020, 26 (33): 4945-4959.
- [77] Yang BL, Bai HR, Sa YL, et al. Inhibiting EMT, stemness and cell cycle involved in baicalin-induced growth inhibition and apoptosis in colorectal cancer cells [J]. *J Cancer*, 2020, 11 (8): 2303-2317.
- [78] Yun XM, Fang YL, Lv CJ, et al. Inhibition of the activation of  $\gamma\delta$ T17 cells through PPAR $\gamma$ -PTEN/Akt/GSK3 $\beta$ /NFAT pathway contributes to the anti-colitis effect of madecassic acid [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11 (9): 752.
- [79] Han YH, Kee JY, Kim DS, et al. Arctigenin inhibits lung metastasis of colorectal cancer by regulating cell viability and metastatic phenotypes [J]. *Molecules*, 2016, 21 (9): E1135.
- [80] Choi YH, Bae JK, Chae HS, et al. Isoliquiritigenin ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis through the inhibition of MAPK pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 31: 223-232.

(收稿日期: 2023-09-02; 修回日期: 2024-02-02)



## 综述

# 磷酸二酯酶 4 抑制剂在治疗帕金森病中的研究进展

钟佳宏<sup>1</sup>, 余玺辉<sup>2</sup>, 练昌林<sup>3</sup>, 林卓苗<sup>1\*</sup> (1. 梅州市人民医院临床药理学, 广东 梅州 514031; 2. 汕头大学医学院第二附属医院药理学, 广东 汕头 515000; 3. 广东省人民医院急诊科, 广州 510000)

**摘要:** 帕金森病 (PD) 的发病率呈逐年上升趋势, 患者会出现静止性震颤、运动迟缓等运动症状及嗅觉障碍等非运动症状。最新的研究表明磷酸二酯酶 4 (PDE4) 在 PD 的病理机制中起重要作用。PDE4 是机体内调节细胞内环磷酸腺苷酸 (cAMP) 的关键酶, 而 cAMP 是介导细胞死亡和神经传递等细胞活动的关键第二信使, 其与神经退行性疾病密切相关。本文综述了 PDE4 的结构及分布, 总结了 PDE4 对 PD 中氧化应激及线粒体功能障碍、自噬、凋亡、铁死亡、内质网应激、cAMP 信号传导通路的调控作用, 阐述了 PDE4 抑制剂用于 PD 治疗的挑战及改进策略, 旨在为后续靶向 PDE4 的药物研发及 PD 的预防与治疗研究提供参考。

**关键词:** 帕金森病; 神经损伤; PDE4 抑制剂; 药物靶点; 神经保护

中图分类号: R742.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)08-2350-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.031

## Research progress in phosphodiesterase 4 inhibitors for Parkinson's disease

ZHONG Jia-hong<sup>1</sup>, YU Xi-hui<sup>2</sup>, LIAN Chang-lin<sup>3</sup>, LIN Zhuo-miao<sup>1\*</sup> (1. Department of Clinical Pharmacy, Meizhou People's Hospital, Meizhou Guangdong 514031; 2. Department of Pharmacy, The Second Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Shantou Guangdong 515000; 3. Department of Emergency, Guangdong People's Hospital, Guangzhou 510000)

**Abstract:** The incidence of Parkinson's disease (PD) is increasing year by year. Patients afflicted with this condition typically exhibit motor symptoms such as resting tremor and bradykinesia, along with non-motor symptoms like olfactory disorders. Recent research has shown that phosphodiesterase 4 (PDE4) plays a crucial role in the pathological mechanism of PD. PDE4 represents the crucial enzyme in the body responsible for regulating intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP). This cAMP serves as a pivotal second messenger that mediates various cellular activities, including cell death and neurotransmission, and is closely intertwined with neurodegenerative diseases. This paper reviewed the structure and distribution of PDE4, summarized the regulatory effects of PDE4 on oxidative stress, mitochondrial dysfunction, autophagy, apoptosis, ferroptosis, endoplasmic reticulum stress and cAMP signal transduction pathways in PD, and elaborated the challenges and improvement strategies for PDE4 inhibitors for PD. Moreover, the paper also discussed possible challenges and improvement strategies for PDE4 inhibitors in the treatment of PD. The review provided references for the subsequent research on drugs targeting PDE4 and prevention and treatment of PD.

**Key words:** Parkinson's disease; neurologic damage; PDE4 inhibitor; drug target; neuroprotection

**基金项目:** 国家自然科学基金 (No.82301436); 广东省基础与应用基础研究基金联合基金 (No.2023A151511199); 梅州市社会发展科技计划项目 (No.2023B05, No.2023B06)。

**作者简介:** 钟佳宏, 男, 博士, 主要从事神经退行性疾病的病理机制及药物发现研究, email: zhongjiahong@mzrmyy.com \*通信作者: 林卓苗, 女, 博士, 主要从事神经系统及心血管临床药理学研究, email: linzhuomiao@mzrmyy.com

神经退行性疾病是一类神经元功能逐渐丧失的疾病,包括帕金森病(Parkinson's disease, PD)、阿尔茨海默病、亨廷顿病及肌萎缩侧索硬化症等,其特征为不同神经元亚型在机体衰老时呈进行性丢失。PD 发病率随着人口老龄化而增长,针对 PD 的新药研发却进展缓慢。PD 现有的治疗药物主要以拟多巴胺类药物为主,但都存在最佳治疗时期短及不良反应严重的问题<sup>[1]</sup>。磷酸二酯酶 4 (phosphodiesterase 4, PDE4) 在机体内发挥催化细胞内环磷酸腺苷酸(cAMP)水解的作用,也是中枢神经系统中分布最丰富的磷酸二酯酶(PDEs)。PDE4 与 cAMP 平衡的打破是导致 PD 的因素之一,通过药物抑制 PDE4 可稳定细胞内 cAMP 的水平并改善 PD 症状<sup>[2]</sup>。虽然已有研究证明 PDE4 抑制剂在 PD 中起神经保护作用<sup>[3]</sup>,但目前国内外尚无批准用于治疗 PD 的 PDE4 抑制剂。本文综述了 PDE4 抑制剂在 PD 中的作用以及其在保护多巴胺能神经元中的潜在机制,总结了 PDE4 抑制剂用于治疗 PD 的挑战及改进策略,为开发 PDE4 抑制剂作为 PD 的治疗策略提供方向。

## 1 PDE4 的结构与分布

PDEs 共有 11 个家族(PDE1~PDE11),PDE4 可选择性地降解细胞内 cAMP,它包含 4 种亚型(PDE4A、PDE4B、PDE4C、PDE4D)<sup>[4]</sup>。PDE4 结构的 N 端区域起调控细胞内信号的作用,其包含上游保守区域 1 (UCR1) 和 UCR2 两个保守区域<sup>[5]</sup>,UCR1 与 UCR2 经链接区域 1 (LR1) 相连。PDE4 按照 UCR 的不同划分为长、短、超短、Dead-short 亚型<sup>[6]</sup>。长亚型包含 UCR1 和 UCR2,短亚型包含 UCR2,超短亚型包含缩短的 UCR2<sup>[7]</sup>,而 Dead-short 亚型缺失了部分催化结构域。PDE4 的调控由蛋白激酶 A (PKA) 和细胞外调节激酶 (ERK) 磷酸化决定。UCR1 的 PKA 磷酸化位点可激活 PKA 酶,其起局部调节 cAMP 水平的作用。ERK 能够磷酸化 PDE4 的所有亚型,其对 PDE4 活性的影响取决于 UCR1 是否存在<sup>[8]</sup>,PDE4 家族的结构见图 1。

PDE4 在脑、免疫细胞、炎性细胞、小胶质细胞、心脏、肺和睾丸中均有表达,并且在纹状体、海马、皮层和小脑中含量丰富。PDE4A、PDE4B、PDE4D 均广泛分布于脑内,PDE4C 则仅存于大脑部分区域<sup>[3]</sup>。研究表明 PDE4A 主要调节情绪、焦虑与记忆,PDE4B 主要调控应激反应和认知功能,PDE4C 主要在外周发挥调控功能,PDE4D 主要调控学习、记忆功能,同时还能对抑郁行为产生影响<sup>[9]</sup>。

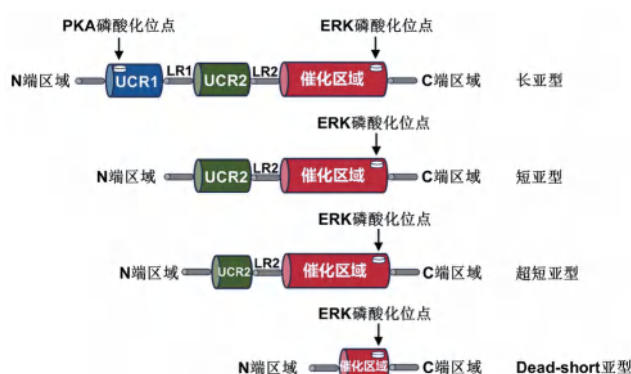


图 1 PDE4 家族的结构示意图

Fig 1 Schematic diagram of the structure of the PDE4 family

## 2 抑制 PDE4 治疗 PD 的分子机制

### 2.1 抑制 PDE4 对氧化应激及线粒体功能障碍的作用

尽管 PD 病因未完全阐明,但氧化应激与线粒体功能障碍对触发神经元损伤具有重要作用,被认为是 PD 发生发展的关键因素之一<sup>[10]</sup>,PD 患者的尸检结果中也能观察到黑质致密部的基础氧化应激水平显著高于正常人<sup>[11]</sup>。PDE4 抑制剂上调 cAMP 水平以激活 PKA 和 cAMP 直接激活的交换蛋白 (Epac) 途径,激活的 PKA 使环磷酸腺苷效应元件结合蛋白 (CREB) Ser133 位点磷酸化并增加其活性,激活的 Epac 促使 Akt 蛋白在 Ser473 位点发生磷酸化,进而增强其活性。上述变化能够减少多巴胺能神经元的凋亡,从而改善 PD 症状<sup>[12]</sup>。PDE4 抑制剂可减轻疾病模型小鼠细胞线粒体膜电位的降低,使其维持较高水平<sup>[13]</sup>,细胞实验也证实 PDE4 抑制剂可以减轻 PD 造模细胞线粒体膜电位的降低,减少细胞内活性氧 (ROS) 的产生从而起到保护细胞的作用<sup>[14]</sup>。文献报道 PDE4 抑制剂 FCPR03 可使脑缺血模型中线粒体膜电位及 ROS 水平恢复正常<sup>[15]</sup>。Roflupram 是一种选择性 PDE4 抑制剂,其在  $\alpha$ -synuclein 过表达的细胞中能够通过减轻线粒体损伤来发挥保护作用<sup>[16]</sup>。Roflupram 在 1-甲基-4-苯基-吡啶离子 (MPP<sup>+</sup>) 处理的 SH-SY5Y 细胞中可以显著减轻线粒体损伤及减少 ROS 的产生,并且能够修复损伤线粒体的形态<sup>[3]</sup>。此外,Roflupram 能够增加 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (MPTP) 造模小鼠纹状体和中脑黑质中 CREB 的磷酸化和过氧化物酶体增殖物激活受体- $\gamma$  共激活因子-1 (PGC-1 $\alpha$ ) 的表达,恢复线粒体的功能<sup>[3]</sup>。更多的研究则显示 PDE4 抑制剂 FCPR16 可以通过激活腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 来增强细胞自噬,进而使暴露于 MPP<sup>+</sup> 的 SH-SY5Y 细

胞的线粒体膜电位恢复<sup>[2]</sup>。FCPR16 可以显著抑制暴露于 MPP<sup>+</sup> 的 SH-SY5Y 细胞内的 ROS 积累,阻止线粒体膜电位下降并降低丙二醛表达,从而在 PD 体外模型中发挥神经保护作用<sup>[14]</sup>。

## 2.2 抑制 PDE4 对自噬的作用

自噬作为一种重要的细胞内降解途径在维持细胞内蛋白质和受损细胞器的有效周转中起着关键作用,其可能参与了包括 PD 在内的多种神经退行性疾病的发生<sup>[17]</sup>。研究表明自噬受损对  $\alpha$ -synuclein 聚集、多巴胺能神经元凋亡和神经炎症等病理过程发挥关键作用<sup>[18]</sup>。自噬调节基因 *BECN1* 和转录因子 EB (TFEB) 的表达增加具有神经保护作用,各种自噬调节剂,如雷帕霉素、海藻糖、溶酶体调节剂和其他小分子自噬诱导剂在 PD 实验模型中显示出神经保护作用<sup>[19]</sup>。病理状态的不溶性  $\alpha$ -synuclein 的降解及清除需要激活细胞自噬来完成<sup>[20]</sup>。帕金蛋白 (Parkin) 是一种存在于细胞质和线粒体中的 E3 泛素连接酶,其活性及功能丧失或基因突变会引起毒性蛋白 (包括不溶性  $\alpha$ -synuclein) 的积聚进而导致多巴胺能神经元发生凋亡,因此调控 Parkin 的活性及功能可以发挥抗 PD 作用<sup>[21]</sup>。PDE4 抑制剂可通过 PKA/p38 MAPK 途径调控 Parkin 活性,进而减轻  $\alpha$ -synuclein 诱导的细胞毒性并发挥抗 PD 作用<sup>[16]</sup>。PDE4 的抑制能够增强脂多糖 (LPS) 处理的 BV-2 细胞的自噬及增强 LPS 造模小鼠的自噬,进而减轻了炎症并抑制了白细胞介素 (IL)-1 $\beta$  的产生,显著减轻了神经元的丢失并起到抗神经损伤作用<sup>[22]</sup>。MPP<sup>+</sup> 处理的 SH-SY5Y 细胞中 p62 发生积累表明自噬过程显著受阻, PDE4 抑制剂 FCPR16 可以呈浓度依赖性增加 LC3-II 的表达,其可以通过增加 AMPK 的活性来增强细胞自噬进而增加异常蛋白的清除,减轻神经凋亡进而发挥抗 PD 作用<sup>[2]</sup>。

## 2.3 抑制 PDE4 对凋亡的作用

PD 中细胞凋亡被认为是导致神经元死亡的主要机制之一<sup>[23]</sup>, Bax 和 Bad 蛋白参与促凋亡过程,而 Bcl-2 参与抗凋亡过程<sup>[24]</sup>,线粒体介导的内在凋亡途径是 PD 发生发展的关键因素<sup>[25]</sup>。ROS 的产生可通过激活半胱天冬酶 (caspase) 3 和 9 来引起细胞色素 C 的释放和三磷酸腺苷 (ATP) 的消耗,进而激活 caspase 并引发级联反应,最终导致细胞死亡<sup>[26]</sup>。PD 还与外源性凋亡通路有关, Fas 和肿瘤坏死因子受体 1 (TNFR1) 等死亡受体通过募集 caspase-8 来激活下游的 caspase-3 等细胞效应并进

一步促进细胞凋亡<sup>[27]</sup>。上述内在和外在通路的融合凸显了 PD 细胞凋亡信号的复杂性, PI3K/AKT 通路均可触发神经保护和细胞存活效应,而 PD 中该通路的破坏会导致 Akt 活性降低,导致细胞凋亡增加<sup>[28]</sup>。Akt 信号传导的下游靶点涵盖 Bcl-2、Bax 和 caspase-3,当 Bcl-2 过表达时, MPTP 诱导的细胞凋亡受到抑制<sup>[29]</sup>。PDE4 抑制剂 FCPR16 通过增加 AMPK 的磷酸化对 MPP<sup>+</sup> 诱导的 SH-SY5Y 细胞发挥抗凋亡作用<sup>[2]</sup>, Roflupram 则可以抑制 PDE4 进而在 PD 体外模型中发挥抗凋亡作用<sup>[16]</sup>。Roflumilast 抑制 PDE4 后能够调控神经毒素损伤的神经元中 caspase 3/7 的表达从而抑制人类皮质神经元的早期凋亡。PDE4 抑制剂 FCPR03 可减轻氧糖剥夺诱导的 HT-22 细胞和皮质神经元的凋亡<sup>[30]</sup>。白藜芦醇可通过上调 PI3K/AKT 信号通路来发挥神经保护作用进而减缓 PD 进展<sup>[28]</sup>。神经元凋亡致多巴胺能神经元大量丢失是 PD 病理机制的关键组成,抗凋亡及靶向凋亡通路来防治 PD 在近些年来受到大量关注。

## 2.4 抑制 PDE4 对内质网应激 (ERS) 的作用

PD 发病过程中 ERS 是错误折叠蛋白或其聚集物大量堆积的重要因素。与非 PD 的对照组相比, PD 患者和 PD 模型小鼠脑组织的内质网中存在更多的  $\alpha$ -synuclein<sup>[1]</sup>。ERS 抑制剂 salubrinal 可以显著减轻 A53T 转基因小鼠和  $\alpha$ -synuclein 过表达大鼠的多巴胺能神经元损伤<sup>[31]</sup>。越来越多的研究表明,自噬与 ERS 的相互作用在 PD 发病过程中发挥重要作用<sup>[32]</sup>。肝细胞发生 ERS 是酒精性肝病的致病因素之一, Roflupram 可以通过抑制 PDE4 活性来减轻 ERS 进而减轻乙醇诱导的脂肪肝变性和损伤,抑制 PDE4 可能是治疗酒精性肝病的有效方法<sup>[33]</sup>。PDE4B 在脊髓损伤后急性炎症反应及恢复过程中起关键作用,其缺失可减轻 ERS 和神经炎症,改善肠道菌群失调和内毒素血症,并促进运动功能恢复<sup>[34]</sup>。Roflupram 抑制 PDE4 的活性能够激活 GSK3 $\beta$ /Nrf-2 信号通路并抑制 IRE1 $\alpha$ /TRAF2/JNK 通路来减轻神经元的 ERS,最终减轻脑缺血再灌注介导的损伤<sup>[35]</sup>。PDE4 抑制剂 FCPR03 通过激活 Nrf-2/HO-1 信号通路来抑制氧糖剥夺模型细胞内 ERS,进而发挥神经保护作用<sup>[30]</sup>。氧化应激、炎症及自噬等多个生理病理反应在 PD 疾病进程中扮演重要角色,而 ERS 均不同程度地介导了上述过程,因此有理由相信 ERS 在 PD 发病及疾病进展中发挥关键作用。

## 2.5 抑制 PDE4 调控 cAMP 信号通路



cAMP 信号的失调与癌症、糖尿病和神经系统疾病等多种疾病有关,其传导的持续时间和幅度受到 PDEs 的调控<sup>[36]</sup>。PD 患者脑内存在 cAMP-PKA 转导信号失调、磷酸化 CREB 错误定位等病理过程,其脑组织的黑质多巴胺能神经元中能观察到病理磷酸化 CREB 颗粒积聚,表明 PKA 介导促生存基因的转录过程受阻<sup>[37]</sup>。多巴胺 D1 类受体可激活 Gs 亚基及腺苷酸环化酶并上调 cAMP-PKA 信号通路,多巴胺 D2 类受体能抑制 Gi 亚基与腺苷酸环化酶并下调 cAMP-PKA 信号通路<sup>[38]</sup>。脑内酪氨酸羟化酶 (TH) 的磷酸化可调控多巴胺能神经元末梢的活动并提高多巴胺含量,而 Rolipram 可增加 TH 磷酸化水平并改善 PD 模型小鼠的运动障碍<sup>[39]</sup>。Rolipram 可通过上调 cAMP-PKA 信号通路、激活腺苷 A2A 受体、增加多巴胺等过程来减少神经元丢失<sup>[40]</sup>。Rolipram 还能通过促进 PKA 底物磷酸化、上调多巴胺 D1 受体-cAMP-PKA 信号通路来增加脑内多巴胺能神经元存活<sup>[41]</sup>。部分 PD 患者在服用左旋多巴后会产生运动失调的不良反应,其中 40% 的患者服用 Rolipram 后相关症状能够得到改善<sup>[42]</sup>。

体外研究发现 cAMP 与 Epac 有很强的结合亲和力和,Epac 可以激活 PI3K 和蛋白激酶 B (Akt),Akt 的激活和随后对糖原合成酶激酶 3 (GSK-3) 的抑制可刺激多巴胺受体并诱发信号级联反应。PD 发病过程中 GSK-3 的激活会导致多巴胺能神经细胞中 caspase-3 的表达上调,进而诱导多巴胺能神经元凋亡<sup>[43]</sup>。6-羟基多巴胺 (6-OHDA) 诱导的小鼠中能观察到 PI3K-Akt 信号传导水平的降低<sup>[44]</sup>,而 PI3K-Akt-FoxO3a 通路的破坏会诱导氧化应激的增强并加快 PD 的疾病进程<sup>[45]</sup>。Roflumilast 对 PDE4 的抑制可以通过激活 cAMP-PKA 和 Epac-Akt 通路来减轻一氧化氮诱导的细胞死亡<sup>[46]</sup>。FCPR16 抑制 PDE4 后能够上调 Epac-Akt 通路进而发挥抗凋亡作用<sup>[14]</sup>。

## 2.6 抑制 PDE4 调控 MAPK 信号通路

丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) / 细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 通路在记忆和突触可塑性中起重要作用,ERK1/2 通过磷酸化 CREB 来增强脑源性神经营养因子 (BDNF) 的转录并在 PD 中发挥神经保护作用<sup>[47]</sup>。SN4741 细胞中  $\alpha$ -synuclein 的过表达会激活 p38 MAPK 进而导致 Parkin 在 Ser131 位点磷酸化<sup>[48]</sup>。抑制 p38 MAPK 可减少动力蛋白相关蛋白 1 (DRP1) 介导的线粒体分裂,从而改善线粒体功能障碍并减缓 PD 的疾病进程<sup>[49]</sup>。PDE4 在过

表达  $\alpha$ -synuclein 的 SH-SY5Y 细胞中通过 PKA-p38 MAPK-Parkin 途径促进  $\alpha$ -synuclein 诱导的细胞毒性,Roflupram 可通过 PKA-p38 MAPK-Parkin 途径来发挥抗神经损伤作用<sup>[16]</sup>。抑制 PDE4 可调控 PKA-p38 MAPK 信号级联反应,有助于在 PD 中发挥神经保护作用。

## 2.7 抑制 PDE4 调控铁死亡

PD 患者普遍存在铁水平升高情况,机体所处环境铁含量高以及铁的高摄入均为 PD 发病率升高的危险因素<sup>[50]</sup>。Deferiprone 等铁螯合剂能够减少 PD 患者体内的铁含量从而改善运动障碍。铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 可减少 MPTP 造模小鼠脑内的多巴胺能神经元死亡。铁螯合剂 M30 及 VK-28 均对 PD 模型小鼠发挥神经保护作用<sup>[51]</sup>。PDE4B 的敲低可减轻氧化应激,减少乳酸脱氢酶释放,下调  $\text{Fe}^{2+}$  含量和核受体共激活因子 4 的表达。Roflumilast 能够增加谷胱甘肽、铁转运蛋白和铁蛋白重链 1 的水平,进而上调谷胱甘肽过氧化物酶 4 的水平。通过抑制 PDE4 来减轻细胞内铁死亡已被证实为一种抗神经系统疾病的新机制<sup>[52]</sup>。

综上所述,抑制 PDE4 治疗 PD 的分子机制包括对氧化应激及线粒体功能障碍、自噬、凋亡、内质网应激、铁死亡等过程及 cAMP 信号传导通路发挥调控作用,其作用机制见图 2。

## 3 PDE4 抑制剂的药物开发及研究

### 3.1 PDE4 抑制剂治疗 PD 的临床研究

PDE4 抑制剂用于治疗退行性疾病的临床前及临床研究极大地增强了其在临床治疗方面的潜力,但 PD 有效药物的开发仍存在较大挑战。在一项随机、安慰剂对照研究<sup>[53]</sup>中首次使用 PDE4 抑制剂 Rolipram 发现其并不能改善 PD 患者的运动症状,且对无轻度认知障碍的特发性 PD 患者可能无效。已有的临床研究通过多模态磁共振成像及正电子发射断层扫描发现 PDE4 表达的升高和 PD 患者过度日间嗜睡的严重程度存在关联,提示 PDE4 在 PD 患者过度日间嗜睡的病理环节中发挥作用<sup>[53]</sup>。ClinicalTrials.gov 网站中尚未有 PDE4 抑制剂药物通过治疗 PD 的临床试验,然而有一款 PDE1 抑制剂药物 ITI-214 已经完成了 PD 的临床试验 (NCT03257046)<sup>[54]</sup>,但是其 I / II 期研究的结果并未公开。PDE1 抑制剂 Len-rispodu 已进入治疗 PD 的 II 期临床试验 (NCT05766813)<sup>[55]</sup>。开发具有治疗 PD 潜力的新型 PDE4 抑制剂需要更多的研究和临床试验。

### 3.2 减少 PDE4 抑制剂不良反应的策略

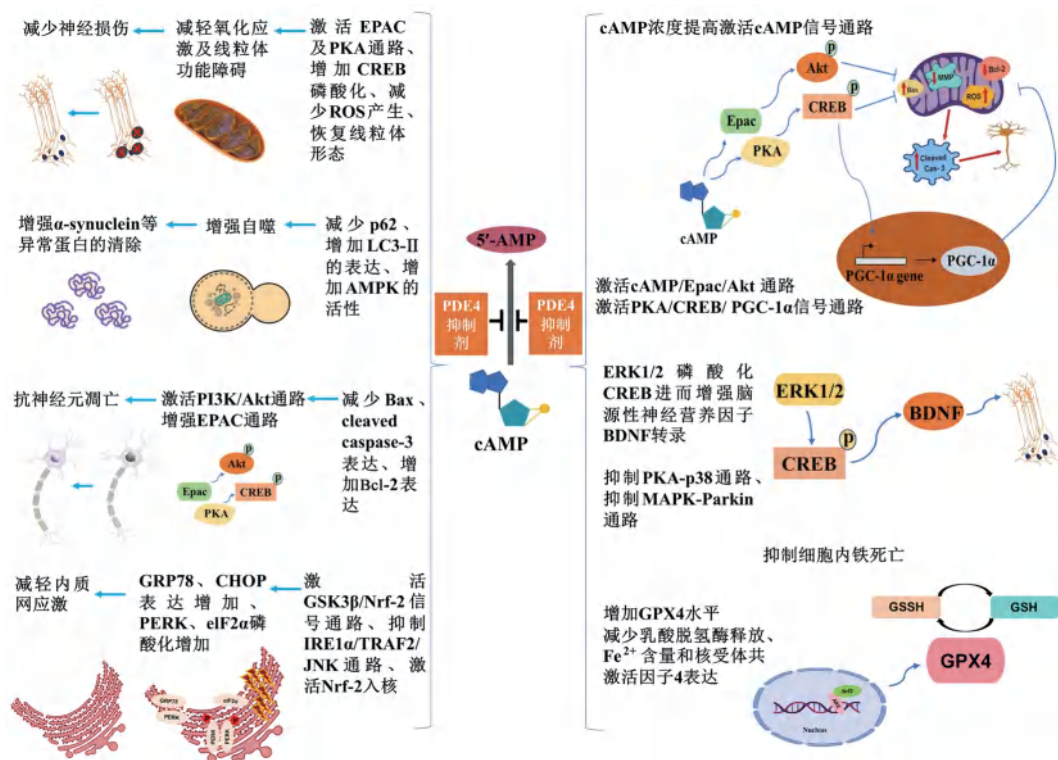


图2 抑制 PDE4 治疗 PD 的分子机制图

Fig 2 Molecular mechanism of treating PD through inhibiting PDE4

现有的 PDE4 抑制剂易引发恶心、呕吐等严重胃肠道不良反应，极大地限制了其在临床中的应用。PDE4 不同的亚型在特定的组织、细胞类型和细胞内定位中具有不同的表达模式，因此开发针对特定亚型的 PDE4 抑制剂有助于通过选择性抑制特定亚型来减少不良反应<sup>[56]</sup>。PDE4 抑制剂发生不良反应的重要原因是非特异性 PDE4 抑制剂与酶的高亲和力和位点（HPDE4）的结合亲和力强进而导致 cAMP 水平升高<sup>[57]</sup>。PDE4D 的同种异体调节剂 D159687 能改善创伤性脑损伤大鼠模型的学习与记忆损伤，且未引发呕吐等不良反应。在小鼠麻醉实验中同样发现 D159687 不会引起小鼠的呕吐反应<sup>[58]</sup>。PDE4 抑制剂的组织选择性调节聚焦于与 PD 病理相关大脑的特定区域，通过减少脱靶效应来降低不良反应。相比于 Rolipram，很多新开发的新型 PDE4 抑制剂对 PDE4 特定亚型具有高亲和力，从而减轻了致呕吐作用。FCPR16 在  $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量下抑制 PDE4 时未诱发比格犬呕吐，显示其有降低致呕吐作用的潜能，但上述作用的具体机制尚不明确<sup>[13]</sup>。FCPR16 对 PDE4B 的选择性约为 Rolipram 的 600 倍，对 PDE4D 的选择性约为其 1111 倍<sup>[59]</sup>。PDE4 抑制剂 FCPR03 在  $0.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的剂量下抑制 LPS 诱导的小胶质细胞中肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、一氧化氮合酶 (iNOS) 和环氧合酶-2 (COX-2) 的产生，并且在 180 min 内没

有引起比格犬呕吐<sup>[60]</sup>。FCPR03 通过结构优化生成了两种新型氨基苯基酮结构化合物 (9C 和 9H)，它们具有高效价、与 Rolipram 相当的活性、更高的生物利用度、低致凝性和改善的血脑屏障渗透性，还可以改善阿尔茨海默病小鼠的记忆和认知功能障碍<sup>[60]</sup>。FCPR03 和 FCPR16 虽对神经退行性疾病具有很好的治疗作用，但口服生物利用度均较低。 $\alpha$ -山竹苷与山酮支架的结构优化促成强效 PDE4 抑制剂 4e 的开发，其对 PDE4D2 的  $IC_{50}$  为  $17 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。与 Rolipram 相比，PDE4 抑制剂 4e 在血管性痴呆模型中有潜在的治疗作用，且在  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量时未诱发比格犬呕吐<sup>[61]</sup>。因此，结构优化技术可用于开发 PDE4 亚型特异性抑制剂，通过选择具有所需物理化学特性的骨架化合物来提高口服生物利用度及减少不良反应。

### 3.3 提高 PDE4 抑制剂治疗 PD 疗效的策略

口服因其方便、患者偏好、成本效益高且易于大规模生产等特点成为 PDE4 抑制剂最普遍的给药方式<sup>[62]</sup>。新开发的给药技术可以克服口服 PDE4 抑制剂不能通过血脑屏障的缺点，这些技术包括微粉化、纳米化、共结晶、固体脂质纳米颗粒、微乳液、自乳化药物传递系统、自微乳化药物传递系统和脂质体等。部分 PDE4 抑制剂凭借对 PDE4 亚型的亲和力的不同来提供更安全的药理学特征<sup>[63]</sup>。高剂量的 Roflumilast 与环氧酶抑制剂联用可减轻腹



泻等不良反应, PDE4 抑制剂与甲氧氯普胺、昂丹司琼等止吐药联用可改善恶心、呕吐等相关不良反应<sup>[64]</sup>。目前尚不明确甲氧氯普胺与 PDE4 抑制剂联合给药能否抑制呕吐相关不良反应及体温过低, 但甲氧氯普胺、昂丹司琼等与 PDE4 抑制剂(如 Roflumilast)联合使用可能会破坏药物代谢并失去 Roflumilast 的治疗作用<sup>[65]</sup>。PDE4 抑制剂需要更好的血脑屏障通透性及脑特异性递送能力来减少外周抑制相关的不良反应, 如 Roflumilast 已被证明可以改善认知能力并提供抗神经损伤能力。

#### 4 总结与展望

现有的 PD 治疗方法仅能暂时缓解患者症状, 难以有效地阻止多巴胺能神经元的大量丢失。PDE4 在脑内分布广泛且表达丰富<sup>[66]</sup>, 为其调控多巴胺能相关信号通路奠定了基础。PDE4 抑制剂用于治疗 PD 的临床研究尚无定论, 大多数 PDE4 抑制剂对 PDE4 亚型不具有特异性, 严重的不良反应导致 Rolipram 等药物在临床试验中失败。针对 PDE4 靶点开发特异性变构抑制剂能够靶向病理相关受体亚型, 减少脱靶效应和生理中断。开发纳米载体等新技术的特异性给药方式及血脑屏障的高透过性可以提高药物疗效及安全性并实现脑靶向递送, 增加口服生物可利用性同时减少外周暴露。此外, 研究 PDE4 抑制剂在机体内的消除调控、联合治疗和抑制剂-抗体偶联物也有助于药物克服不良反应。对 PDE4 在 PD 病理生理中的作用进行深入研究同样非常重要, 深入研究其在机体内的生理作用、药理学和药代动力学。基于这篇综述我们认为抑制 PDE4 正成为 PD 的一种潜在治疗策略, 在现有 PD 药物的临床局限性下这一策略显得尤为重要。

#### 参考文献

- [1] Bellucci A, Navarria L, Zaltieri M, et al. Induction of the unfolded protein response by alpha-synuclein in experimental models of Parkinson's disease [J]. *J Neurochem*, 2011, 116 (4): 588-605.
- [2] Zhong JH, Xie JF, Xiao J, et al. Inhibition of PDE4 by FCPR16 induces AMPK-dependent autophagy and confers neuroprotection in SH-SY5Y cells and neurons exposed to MPP<sup>+</sup>-induced oxidative insult [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 135: 87-101.
- [3] Zhong JH, Dong WL, Qin YY, et al. Roflupram exerts neuroprotection via activation of CREB/PGC-1 alpha signalling in experimental models of Parkinson's disease [J]. *Br J Pharmacol*, 2020, 177 (10): 2333-2350.
- [4] Fu Q, Wang Y, Yan C, et al. Phosphodiesterase in heart and vessels: from physiology to diseases [J]. *Physiol Rev*, 2024, 104 (2): 765-834.
- [5] Donders Z, Skorupska IJ, Willems E, et al. Beyond PDE4 inhibition: a comprehensive review on downstream cAMP signaling in the central nervous system [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 177: 117009.
- [6] Paes D, Schepers M, Rombaut B, et al. The molecular biology of phosphodiesterase 4 enzymes as pharmacological targets: an interplay of isoforms, conformational states, and inhibitors [J]. *Pharmacol Rev*, 2021, 73 (3): 1016-1049.
- [7] Schick MA, Schlegel N. Clinical implication of phosphodiesterase-4-inhibition [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (3): 1209.
- [8] Francis SH, Blount MA, Corbin JD. Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions [J]. *Physiol Rev*, 2011, 91 (2): 651-690.
- [9] Lakics V, Karran EH, Boess FG. Quantitative comparison of phosphodiesterase mRNA distribution in human brain and peripheral tissues [J]. *Neuropharmacology*, 2010, 59 (6): 367-374.
- [10] Jiang TF, Sun Q, Chen SD. Oxidative stress: a major pathogenesis and potential therapeutic target of antioxidative agents in Parkinson's disease and Alzheimer's disease [J]. *Prog Neurobiol*, 2016, 147: 1-19.
- [11] McNaught KS, Jenner P. Extracellular accumulation of nitric oxide, hydrogen peroxide, and glutamate in astrocytic cultures following glutathione depletion, complex I inhibition, and/or lipopolysaccharide-induced activation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2000, 60 (7): 979-988.
- [12] Garcia-Morales V, Luaces-Regueira M, Campos-Toimil M. The cAMP effectors PKA and Epac activate endothelial NO synthase through PI3K/AKT pathway in human endothelial cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2017, 145: 94-101.
- [13] Chen JJ, Yu H, Zhong JH, et al. The phosphodiesterase-4 inhibitor, FCPR16, attenuates ischemia-reperfusion injury in rats subjected to middle cerebral artery occlusion and reperfusion [J]. *Brain Res Bull*, 2018, 137: 98-106.
- [14] Zhong JH, Yu H, Huang C, et al. Inhibition of phosphodiesterase 4 by FCPR16 protects SH-SY5Y cells against MPP<sup>+</sup>-induced decline of mitochondrial membrane potential and oxidative stress [J]. *Redox Biol*, 2018, 16: 47-58.
- [15] Xu BT, Wang TT, Xiao J, et al. FCPR03, a novel phosphodiesterase 4 inhibitor, alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury through activation of the AKT/GSK3beta/beta-catenin signaling pathway [J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 163: 234-249.
- [16] Zhong JH, Li MF, Xu JP, et al. Roflupram attenuates alpha-synuclein-induced cytotoxicity and promotes the mitochondrial translocation of Parkin in SH-SY5Y cells overexpressing A53T mutant alpha-synuclein [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2022, 436: 115859.



- [17] Hou X, Watzlawik JO, Fiesel FC, et al. Autophagy in Parkinson's disease [J]. *J Mol Biol*, 2020, 432 (8): 2651-2672.
- [18] Nechushtai L, Frenkel D, Pinkas-Kramarski R. Autophagy in Parkinson's disease [J]. *Biomolecules*, 2023, 13 (10): 1435.
- [19] Erekat NS. Autophagy and its association with genetic mutations in Parkinson disease [J]. *Med Sci Monit*, 2022, 28: e938519.
- [20] Cerri S, Blandini F. Role of autophagy in Parkinson's disease [J]. *Curr Med Chem*, 2019, 26 (20): 3702-3718.
- [21] Barazzuol L, Giamogante F, Brini M, et al. PINK1/Parkin mediated mitophagy,  $\text{Ca}^{2+}$  signalling, and ER-mitochondria contacts in Parkinson's disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (5): 1772.
- [22] You TT, Cheng YF, Zhong JH, et al. Roflupram, a phosphodiesterase 4 inhibitor, suppresses inflammasome activation through autophagy in microglial cells [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2017, 8 (11): 2381-2392.
- [23] Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, et al. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies [J]. *Aging (Albany NY)*, 2016, 8 (4): 603-619.
- [24] Bonni A, Brunet A, West AE, et al. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and-independent mechanisms [J]. *Science*, 1999, 286 (5443): 1358-1362.
- [25] Yang L, Matthews RT, Schulz JB, et al. 1-Methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine neurotoxicity is attenuated in mice overexpressing Bcl-2 [J]. *J Neurosci*, 1998, 18 (20): 8145-8152.
- [26] Kelley N, Jeltema D, Duan Y, et al. The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (13): 3328.
- [27] Timmons S, Coakley MF, Moloney AM, et al. Akt signal transduction dysfunction in Parkinson's disease [J]. *Neurosci Lett*, 2009, 467 (1): 30-35.
- [28] Huang NQ, Zhang Y, Chen MJ, et al. Resveratrol delays 6-hydroxydopamine-induced apoptosis by activating the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Exp Gerontol*, 2019, 124: 110653.
- [29] Lu XL, Zhao CH, Yao XL, et al. Quercetin attenuates high fructose feeding-induced atherosclerosis by suppressing inflammation and apoptosis via ROS-regulated PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 85: 658-671.
- [30] Xu BT, Qin YY, Li D, et al. Inhibition of PDE4 protects neurons against oxygen-glucose deprivation-induced endoplasmic reticulum stress through activation of the Nrf-2/HO-1 pathway [J]. *Redox Biol*, 2020, 28: 101342.
- [31] Colla E, Coune P, Liu Y, et al. Endoplasmic reticulum stress is important for the manifestations of alpha-synucleinopathy in vivo [J]. *J Neurosci*, 2012, 32 (10): 3306-3320.
- [32] Mercado G, Valdes P, Hetz C. An ERcentric view of Parkinson's disease [J]. *Trends Mol Med*, 2013, 19 (3): 165-175.
- [33] Rodriguez WE, Wahlang B, Wang Y, et al. Phosphodiesterase 4 inhibition as a therapeutic target for alcoholic liver disease: from bedside to bench [J]. *Hepatology*, 2019, 70 (6): 1958-1971.
- [34] Myers SA, Gobejishvili L, Saraswat OS, et al. Following spinal cord injury, PDE4B drives an acute, local inflammatory response and a chronic, systemic response exacerbated by gut dysbiosis and endotoxemia [J]. *Neurobiol Dis*, 2019, 124: 353-363.
- [35] Xu BT, Xu JP, Cai NB, et al. Roflumilast prevents ischemic stroke-induced neuronal damage by restricting GSK-3beta-mediated oxidative stress and IRE1alpha/TRAFF2/JNK pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 163: 281-296.
- [36] Zhang T, Luu M, Dolga AM, et al. The old second messenger cAMP teams up with novel cell death mechanisms: potential translational therapeutic benefit for Alzheimer's disease and Parkinson's disease [J]. *Front Physiol*, 2023, 14: 1207280.
- [37] Chalovich EM, Zhu JH, Caltagarone J, et al. Functional repression of cAMP response element in 6-hydroxydopamine-treated neuronal cells [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281 (26): 17870-17881.
- [38] Surmeier DJ, Ding J, Day M, et al. D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons [J]. *Trends Neurosci*, 2007, 30 (5): 228-235.
- [39] Dunkley PR, Bobrovskaya L, Graham ME, et al. Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences [J]. *J Neurochem*, 2004, 91 (5): 1025-1043.
- [40] Nishi A, Kuroiwa M, Miller DB, et al. Distinct roles of PDE4 and PDE10A in the regulation of cAMP/PKA signaling in the striatum [J]. *J Neurosci*, 2008, 28 (42): 10460-10471.
- [41] Kuroiwa M, Snyder GL, Shuto T, et al. Phosphodiesterase 4 inhibition enhances the dopamine D1 receptor/PKA/DARPP-32 signaling cascade in frontal cortex [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2012, 219 (4): 1065-1079.
- [42] Casacchia M, Meco G, Castellana F, et al. Therapeutic use of a selective cAMP phosphodiesterase inhibitor (Rolipram) in Parkinson's disease [J]. *Pharmacol Res Commun*, 1983, 15 (3): 329-334.
- [43] Ahmed MB, Alghamdi A, Islam SU, et al. cAMP signaling in cancer: a PKA-CREB and EPAC-centric approach [J]. *Cells*, 2022, 11 (13): 2020.
- [44] Yan TX, Sun YY, Gong GW, et al. The neuroprotective effect of schisandrol A on 6-OHDA-induced PD mice may be related to PI3K/AKT and IKK/IkappaBalpha/NF-kappaB pathway [J]. *Exp Gerontol*, 2019, 128: 110743.
- [45] Jia Y, Mo SJ, Feng QQ, et al. EPO-dependent activation

- of PI3K/AKT/FoxO3a signalling mediates neuroprotection in in vitro and in vivo models of Parkinson's disease [J]. *J Mol Neurosci*, 2014, 53 (1): 117-124.
- [46] Kwak HJ, Park KM, Choi HE, et al. PDE4 inhibitor, roflumilast protects cardiomyocytes against NO-induced apoptosis via activation of PKA and Epac dual pathways [J]. *Cell Signal*, 2008, 20 (5): 803-814.
- [47] Bilge SS, Gunaydin C, Onger ME, et al. Neuroprotective action of agmatine in rotenone-induced model of Parkinson's disease: role of BDNF/cREB and ERK pathway [J]. *Behav Brain Res*, 2020, 392: 112692.
- [48] Chen JL, Ren YX, Gui C, et al. Phosphorylation of Parkin at serine 131 by p38 MAPK promotes mitochondrial dysfunction and neuronal death in mutant A53T alpha-synuclein model of Parkinson's disease [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9 (6): 700.
- [49] Gui C, Ren YX, Chen JL, et al. p38 MAPK-DRP1 signaling is involved in mitochondrial dysfunction and cell death in mutant A53T alpha-synuclein model of Parkinson's disease [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020, 388: 114874.
- [50] Yan HF, Zou T, Tuo QZ, et al. Ferroptosis: mechanisms and links with diseases [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6 (1): 49.
- [51] Song N, Xie JX. Iron, dopamine, and alpha-synuclein interactions in at-risk dopaminergic neurons in Parkinson's disease [J]. *Neurosci Bull*, 2018, 34 (2): 382-384.
- [52] Chen KC, Xu BT, Long L, et al. Inhibition of phosphodiesterase 4 suppresses neuronal ferroptosis after cerebral ischemia/reperfusion [J]. *Mol Neurobiol*, 2025, 62 (3): 3376-3395.
- [53] Wilson H, Pagano G, Niccolini F, et al. The role of phosphodiesterase 4 in excessive daytime sleepiness in Parkinson's disease [J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2020, 77: 163-169.
- [54] Samidurai A, Xi L, Das A, et al. Role of phosphodiesterase 1 in the pathophysiology of diseases and potential therapeutic opportunities [J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 226: 107858.
- [55] Bondarev AD, Attwood MM, Jonsson J, et al. Recent developments of phosphodiesterase inhibitors: clinical trials, emerging indications and novel molecules [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1057083.
- [56] Crocetti L, Floresta G, Cilibrizzi A, et al. An overview of PDE4 inhibitors in clinical trials: 2010 to early 2022 [J]. *Molecules*, 2022, 27 (15): 4964.
- [57] Jeon YH, Heo YS, Kim CM, et al. Phosphodiesterase: overview of protein structures, potential therapeutic applications and recent progress in drug development [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62 (11): 1198-1220.
- [58] Blednov YA, Da CA, Mason S, et al. Selective PDE4B and PDE4D inhibitors produce distinct behavioral responses to ethanol and GABAergic drugs in mice [J]. *Neuropharmacology*, 2023, 231: 109508.
- [59] Zhou ZZ, Ge BC, Zhong QP, et al. Development of highly potent phosphodiesterase 4 inhibitors with anti-neuroinflammation potential: design, synthesis, and structure-activity relationship study of catecholamides bearing aromatic rings [J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 124: 372-379.
- [60] Zou ZQ, Chen JJ, Feng HF, et al. Novel phosphodiesterase 4 inhibitor FCPR03 alleviates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation by regulation of the cAMP/PKA/CREB signaling pathway and NF-kappaB inhibition [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2017, 362 (1): 67-77.
- [61] Liang JH, Huang YY, Zhou Q, et al. Discovery and optimization of alpha-mangostin derivatives as novel PDE4 inhibitors for the treatment of vascular dementia [J]. *J Med Chem*, 2020, 63 (6): 3370-3380.
- [62] Correia AC, Monteiro AR, Silva R, et al. Lipid nanoparticles strategies to modify pharmacokinetics of central nervous system targeting drugs: crossing or circumventing the blood-brain barrier (BBB) to manage neurological disorders [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 189: 114485.
- [63] Larsen J, Lambert M, Pettersson H, et al. Discovery and early clinical development of isobutyl 1-[8-methoxy-5-(1-oxo-3H-isobenzofuran-5-yl)]-[1, 2, 4]triazolo[1, 5-a]pyridin-2-yl]cyclopropanecarboxylate (LEO 39652), a novel "Dual-Soft" PDE4 inhibitor for topical treatment of atopic dermatitis [J]. *J Med Chem*, 2020, 63 (23): 14502-14521.
- [64] Peter D, Goggel R, Colbatzky F, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 prevents adverse effects induced by phosphodiesterase type 4 inhibitors in rats [J]. *Br J Pharmacol*, 2011, 162 (2): 415-427.
- [65] Nelissen E, van Goethem NP, Bonassoli VT, et al. Validation of the xylazine/ketamine anesthesia test as a predictor of the emetic potential of pharmacological compounds in rats [J]. *Neurosci Lett*, 2019, 699: 41-46.
- [66] Nishi A, Snyder GL. Advanced research on dopamine signaling to develop drugs for the treatment of mental disorders: biochemical and behavioral profiles of phosphodiesterase inhibition in dopaminergic neurotransmission [J]. *J Pharmacol Sci*, 2010, 114 (1): 6-16.

(收稿日期: 2024-10-13; 修回日期: 2024-12-08)

# 槲皮素在年龄相关性黄斑变性中的作用机制及其纳米制剂研究进展

王子恒, 刘娟, 杨玉畅, 易丽莎, 朱倩, 史文娟, 倪健\*, 曲昌海\* (北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

**摘要:** 槲皮素是一种广泛存在于各种蔬菜、水果和中草药中的黄酮醇和多酚类化合物, 具有抗氧化、抗炎、抗菌、预防和治疗心脑血管疾病等多种生物活性。近年来, 其针对年龄相关性黄斑变性的潜在治疗作用引发关注, 本文综述了槲皮素在年龄相关性黄斑变性中可能的作用机制及其纳米制剂的研究情况, 发现其可能通过抑制炎症反应、清除活性氧、阻断病理性血管生成、调节细胞自噬、抑制铁死亡及减轻视网膜纤维化瘢痕形成等途径, 干预黄斑变性的核心病理环节。槲皮素纳米制剂具有增强药物溶解性、提高生物利用度及稳定性, 实现靶向递送与控释功能等优势, 为眼底递药系统的建立提供了借鉴。

**关键词:** 槲皮素; 黄斑变性; 作用机制; 纳米制剂

**中图分类号:** R285.5, R943

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-2981(2025)08-2358-08

**doi:**10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.032

## Research progress in the mechanism of quercetin in age-related macular degeneration and its nano-formulations

WANG Zi-heng, LIU Juan, YANG Yu-chang, YI Li-sha, ZHU Qian, SHI Wen-juan, NI Jian\*, QU Chang-hai\* (School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488)

**Abstract:** Quercetin is a flavonol and polyphenolic compound widely found in various vegetables, fruits and Chinese herbal medicine. It exhibits multiple biological activities, including antioxidant, anti-inflammatory, and antibacterial activities, as well as effects in the prevention and treatment of cardiovascular and cerebrovascular diseases. In recent years, its potential therapeutic effect on age-related macular degeneration has attracted much attention. This review summarized the multifaceted mechanism of quercetin in age-related macular degeneration and the research progress in quercetin nanoparticles. Emerging evidence suggests that quercetin intervenes in the core pathological processes of age-related macular degeneration by inhibiting inflammatory responses, scavenging reactive oxygen species, blocking pathological angiogenesis, modulating autophagy, suppressing ferroptosis, and attenuating retinal fibrosis scar formation. Nanoformulation technologies enhanced targeted drug delivery to the retina, prolonged drug residence time and mitigated systemic adverse effects. Quercetin nano-formulations have the advantages of enhancing drug solubility, improving bioavailability and stability, and achieving targeted delivery and controlled-release functions, providing a reference for the establishment of ocular drug delivery systems.

**Key words:** quercetin; age-related macular degeneration; mechanism of action; nano-formulation

槲皮素 (quercetin) 是一种黄酮醇类和多酚类化合物, 具有抗氧化、抗炎、抗菌等多种生物活性, 广泛存在于蔬菜水果、花卉等植物中, 是对人体有益的膳食纤维, 2010 年美国食品药品监督管理局

(FDA) 将天然产物中加工生产的槲皮素作为 GRAS (公认安全) 物质, 在心血管疾病、糖尿病、神经退行性疾病、消化性溃疡、关节炎等疾病中广泛应用<sup>[1]</sup>。年龄相关性黄斑变性 (age-related macular

**基金项目:** 北京市自然科学基金面上项目 (No.7202123)。

**作者简介:** 王子恒, 男, 硕士研究生, 主要从事药物制剂递药系统研究, email: ziheng0189@163.com \*通信作者: 倪健, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药新剂型与新技术研究, email: 602054@bucm.edu.cn; 曲昌海, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事药物制剂新技术及递药系统研究, email: quchanghai@bucm.edu.cn



degeneration, AMD) 是一种神经退行性疾病, 为我国仅次于白内障和青光眼的第三大致盲元凶, 临床上分为干性和湿性两种类型 (dAMD 和 wAMD)。当前的研究认为 dAMD 的发病机制包括氧化应激介导的视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞死亡以及随后视网膜光感受器细胞的死亡<sup>[2]</sup>, 而 wAMD 又以脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 形成出血性脱离为主要特征, 年龄、环境、遗传、氧化应激、脂质代谢、免疫反应等多种因素共同参与疾病的发生发展过程<sup>[3]</sup>。由于黄斑变性的发病机制至今不能完全明确, 而人工合成药往往只能针对一条途径发挥作用, 存在一定概率的临床无应答, 因此寻找能够通过多途径改善或治疗黄斑变性的天然药物并通过现代制剂手段提高其生物利用度是当前需要着重考虑的问题。纳米药物递送系统近年来发展迅速, 凭借良好的生物相容性、可降解性、低毒性和稳定性的特点, 在增加药物溶解性、改善药物体内分布、提高药物靶向性和生物利用度等方面发挥独特的优势<sup>[4]</sup>, 被广泛应用于多个领域, 尤其是在肿瘤靶向治疗中发挥了重要作用。当前纳米药物递送系统已经成为制药领域的研究热点, 具有广阔的应用前景和巨大的发展潜力。

近年来的一些研究表明, 槲皮素可能通过多种途径对 AMD 发挥治疗作用, 然而由于眼部结构的特殊性, 眼底药物递送仍然面临较大困难。临床常见的眼底给药手段依然为球周注射或玻璃体后注射等侵入性给药方式<sup>[5]</sup>, 而长效微球的设计, 使得球周注射给药后药物的释放周期显著延长, 大大降低了给药频率, 减少了侵入式给药所带来的眼部创伤<sup>[6]</sup>。随着眼部微环境研究的逐渐深入, 新的递药通路和靶点的出现, 为新型递药系统的设计提供了思路, 也为更便捷的眼底递药提供了可能。本文综述了近年来槲皮素在 AMD 治疗中的相关报道, 并对槲皮素纳米制剂的研究进行了总结, 以期为槲皮素眼底递药系统的设计及用于 AMD 的研究提供思路和参考。

## 1 槲皮素用于 AMD 治疗的作用机制

### 1.1 抗炎

临床研究表明, wAMD 患者眼内白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素  $\beta$  (IL- $\beta$ ) 和肿瘤坏死因子 (TNF) 水平分别较正常眼睛分别显著升高 10 倍、3 倍和 3 倍<sup>[7]</sup>, 这种慢性炎症反应与黄斑区解剖结构异常密切相关, 表现为黄斑水肿及黄斑中心凹厚度增加。wAMD 治疗时多关注新生血管渗漏引发的继发性炎症级联反应, 而 dAMD 治疗使用的补体 C3 抑制剂、免疫球蛋白 G1 单克隆抗体 Tesidolumab 均属于抗炎药物<sup>[8]</sup>。上述证据提示, 炎症与 AMD 密切相关。

槲皮素作为天然黄酮醇类化合物, 其抗炎特性在眼部疾病中得到广泛关注。Cao 等<sup>[9]</sup>通过生物信息

学筛选临床治疗黄斑变性中药方剂的有效成分并确定潜在治疗靶点, 发现槲皮素、木犀草素、柚皮素、常春藤皂苷元等四种活性成分, 与炎症反应关键蛋白 IL-6、TNF、血管内皮生长因子 A (VEGFA) 和丝裂原活化蛋白激酶 3 (MAPK3) 具有良好的亲和力, 并通过实验验证了槲皮素在 RPE 细胞中具有显著抗炎作用。进一步的动物实验表明 250 mg/(kg·d) 的槲皮素灌胃可下调葡萄膜炎大鼠眼组织 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平<sup>[10]</sup>, 同时发现  $\beta$ -catenin、AXIN2、T 细胞因子 (TCF) 等 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路中相关蛋白的表达被抑制。Zou 等<sup>[11]</sup>认为小胶质细胞介导的神经炎症是 AMD 光感受器损伤的关键驱动因素, 通过静脉注射 30 mg·kg<sup>-1</sup> 槲皮素, 观察到视网膜炎症小鼠视网膜组织中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-6 释放减少, 并诱导小胶质细胞由促炎 M1 型到抗炎 M2 型转化, 该效应可能与 ERK/STAT3 通路抑制有关。Ho 等<sup>[12]</sup>发现, 口服 100 mg·kg<sup>-1</sup> 槲皮素可减轻脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠视网膜炎症 (降低视网膜厚度、减少粒细胞浸润), 其抗炎作用可能通过 NF- $\kappa$ B 通路实现; 进一步研究显示, 槲皮素可通过 MAPK/NF- $\kappa$ B 通路协同抑制 ARPE-19 细胞中 IL-1 $\beta$  诱导的炎症因子产生<sup>[13]</sup>, 而炎症因子 TNF- $\alpha$  的下调则可以激活 RPE 细胞中细胞间黏附分子 -1 (ICAM-1) 和基质金属蛋白酶 -9 (MMP-9) 的抗炎特性<sup>[14]</sup>。

### 1.2 改善脂质代谢紊乱与抗氧化

随着年龄增长, 细胞抗氧化能力下降, 氧化应激加剧导致视网膜细胞凋亡增加, 这是 AMD 多见于中老年人群的重要原因<sup>[15]</sup>。黄斑区因代谢旺盛、耗氧量高, RPE 细胞代谢废物堆积引发脂质代谢紊乱及活性氧 (ROS) 蓄积, 进一步损伤视网膜<sup>[16]</sup>。槲皮素作为强效多酚类抗氧化剂, 可有效缓解氧化应激相关损伤。

研究证实, 100 mg·kg<sup>-1</sup> 槲皮素静脉注射可通过调节 Nrf2-PGC-1 $\alpha$ -Sirt1 通路, 影响超氧化物歧化酶 (SOD) 乙酰化, 降低碘酸钠 (NaIO<sub>3</sub>) 诱导的小鼠视网膜损伤模型中的氧化应激指标 [如提高过氧化氢酶 (CAT) 和谷胱甘肽 (GSH) 水平], 从而缓解氧化应激<sup>[17]</sup>。进一步验证发现, 在 Nrf2 基因敲除的 AMD 小鼠模型中, 槲皮素无法恢复 SOD 和 CAT 的活性, 仅在未敲除基因的小鼠中降低 ROS 和丙二醛 (MDA) 含量, 表明槲皮素的抗氧化作用依赖于 Nrf2 信号通路的激活<sup>[17-18]</sup>, 可以通过 Nrf2/Keap1/ARE 通路保护视网膜免受光损伤<sup>[19]</sup>。此外, 在氧化应激介导的细胞凋亡过程中, 研究发现 50 mg·kg<sup>-1</sup> 槲皮素腹腔注射可改善糖尿病大鼠视网膜组织结构, 降低细胞凋亡关键蛋白 Bax 和 p53 蛋白表达, 同时提高 Bcl-2 蛋白表达<sup>[20]</sup>。另一项研究表明, 槲皮素可能通过 p38/MAPK 信号通路抑制视网膜细胞凋亡<sup>[21]</sup>。这些研究共同表明, 槲皮素通过多条信号通路发挥

抗氧化和抗凋亡作用,对视网膜具有保护作用。

### 1.3 抑制血管新生

wAMD 是以脉络膜/视网膜新生血管出血为典型特征,通常病势进展迅速,造成视力急剧下降甚至失明,在 AMD 致盲患者中的占比超过 80%。而临床上对于 AMD 的防治主要针对脉络膜/视网膜新生血管,即通过玻璃体注射雷珠单抗、贝伐珠单抗、康柏西普等抗血管内皮生长因子(VEGF)药物进行治疗,也被认为是标准治疗方案<sup>[22]</sup>。VEGF 是一种分泌型内皮特异性丝裂原,是血管生成和血管通透性的关键调节因子<sup>[23]</sup>,研究表明 VEGF 的高表达与视网膜炎症反应成正相关,两者联合作用下促成血管新生及出血性渗漏,引发严重的视力损害<sup>[7]</sup>。

近年来,有研究发现槲皮素存在较好的抗血管新生的活性。网络药理学和分子对接技术显示归芍地黄汤关键成分中槲皮素与 wAMD 关键蛋白中的 VEGFA 结合能力最好;随后动物实验验证了槲皮素能够抑制 CNV 的发展,p38 MAPK、VEGF、TNF- $\alpha$  可能参与 MAPK 信号通路调节<sup>[24]</sup>。体外实验表明,10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  槲皮素即可显著抑制人视网膜血管内皮细胞 HRCECs 的增殖、迁移和管腔的形成,同时可通过 AKT 信号通路抑制 VEGF 和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的表达<sup>[25]</sup>,此外,在高糖环境下槲皮素还可以以时间-浓度依赖性降低细胞中 VEGF 和 ICAM-1 的表达,延缓新生血管的发病进程<sup>[26]</sup>。

### 1.4 调节自噬

尽管 VEGF 是血管新生的主要治疗靶点,但治疗过程中仍存在 30% 的患者对抗 VEGF 药物无应答,因此认为视网膜血管新生应该存在其他作用机制<sup>[27]</sup>。研究表明,异常自噬可能导致降解代谢废物能力下降而损伤细胞,并在特定条件下促进血管生成。高糖环境可以增加视网膜自噬相关蛋白表达、细胞迁移和血管腔形成,表明自噬参与高糖诱导的视网膜新生血管形成<sup>[28]</sup>。在 RF/6A 细胞研究中,槲皮素可剂量依赖性地抑制高糖刺激下的细胞增殖、迁移和管腔形成,并降低自噬标志物 LC3 和 Beclin-1 的表达<sup>[29]</sup>,其作用与自噬抑制剂 3-MA 相似<sup>[27]</sup>。

衰老的细胞自我净化能力降低,容易造成代谢废物的异常积累,表现出脂褐素沉积、玻璃膜疣的形成,对此有研究认为增强细胞自噬水平、清除衰老和相关病变细胞是防治 AMD 的一个重要思路<sup>[30]</sup>。Terao 等<sup>[31]</sup>研究发现,胆固醇的积累会促进光感受器的衰老和视网膜变性,而在联合槲皮素和达沙替尼后,衰老的细胞被选择性消除,同时改善了实验小鼠的视觉功能,减轻视网膜色素上皮中的脂质积累和 Bruch 膜增厚,这个过程与细胞自噬水平的增强有关。不仅如此,Wang 等<sup>[32]</sup>在玻璃体内注射槲皮素和达沙替尼后,观察到体内衰老 RPE 细胞丰度降低,

因此可以认为衰老细胞的清除能抑制病理性新生血管的形成。自噬的激活还可以一定程度上逆转过氧化氢造成的视网膜细胞活力下降,上调 Occludin、Claudin-1、Beclin-1、LC3-II,下调 p62 蛋白的表达,对氧化应激损伤发挥防护作用,槲皮素在这个过程中发挥重要作用<sup>[33]</sup>。因此,增强自噬、清除衰老和病变细胞也是槲皮素防治 AMD 的重要途径之一。

### 1.5 抑制铁死亡

AMD 是一种神经退行性病变,与视网膜细胞功能丢失、死亡关系密切,但引起细胞死亡的机制仍未完全明晰。铁死亡是一种新型的调节细胞死亡的方式,特征是脂质过氧化物的铁依赖性积累,过量的铁可以通过 Fenton 反应导致 ROS 和氧化应激的形成,促进细胞凋亡<sup>[34]</sup>。有研究指出老年人及 AMD 患者视网膜中铁含量明显增加<sup>[2]</sup>,谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)的抗氧化作用以及溶质载体家族 7 成员 11(SLC7A11)调节的谷氨酸-胱氨酸转运在铁死亡调控中发挥重要作用<sup>[2]</sup>。由此认为铁死亡可能是 AMD 重要的发病机制。

网络药理学分析显示,槲皮素是芪黄颗粒中与 AMD 铁死亡靶点关联最密切的化合物<sup>[35]</sup>。实验证实,槲皮素可以通过抑制促炎因子以剂量依赖性方式保护 RPE 细胞免受氧化损伤和细胞衰老,并减少了 dAMD 小鼠模型中 RPE 沉积物和 Bruch 膜厚度。而另一项关于干眼的研究明确了槲皮素在抑制铁死亡过程中的作用,槲皮素能上调高渗诱导的干眼细胞模型中铁死亡关键调控基因 GPX4、FSP1、DHODH 的表达,抑制铁死亡<sup>[36]</sup>,这为槲皮素抑制铁死亡从而延缓 AMD 发病带来了启发,但有待进一步的研究。

### 1.6 减轻视网膜下纤维化瘢痕

视网膜下纤维化瘢痕的出现是 wAMD 晚期具有侵袭性的病变特征,纤维化则代表患者新生血管的伤口正发生愈合反应。但在视网膜下纤维化发生时,视网膜光感受器、脉络膜毛细血管层的结构都会遭到破坏<sup>[37]</sup>。槲皮素在眼部疾病中抗纤维化的研究最初是针对眼表疾病的,王涛等<sup>[38]</sup>等发现槲皮素以时间-剂量依赖方式抑制人 Tenon 囊成纤维细胞增殖,50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时即有细胞收缩,胞核固缩等凋亡特征,100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时细胞的增殖几乎完全被抑制。槲皮素眼膏(规格:200 mg/20 g)可有效控制兔眼压并减轻结膜下瘢痕化,其机制与抑制 TGF- $\beta$  及其受体表达相关<sup>[39]</sup>。进一步研究显示,25 ~ 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  槲皮素可阻断 TGF- $\beta$ 1 介导的 RPE 细胞上皮-间充质转化(EMT),通过调节 Smad2/3 磷酸化抑制细胞增殖、迁移及胶原分泌<sup>[40]</sup>。Gao 等<sup>[41]</sup>证实槲皮素与达沙替尼联用可通过选择性清除衰老细胞,增强抗纤维化效果,但其具体作用机制仍需深入探索。



1.7 其他

槲皮素可能通过抑制细胞凋亡改善视网膜缺血再灌注损伤。研究表明,黄斑变性作为神经退行性病变,与视网膜神经细胞退化密切相关,而视网膜缺血再灌注可能通过眼内压升高诱导神经节细胞退化,进而引发黄斑变性。于雯等<sup>[42]</sup>采用腹腔注射槲皮素(50 mg/kg,每日1次,建模前连续7 d)干预大鼠视网膜缺血再灌注损伤模型,发现其可能通过下调Caspase-3表达抑制细胞凋亡,从而改善视网膜缺血再灌注损伤。

槲皮素可以通过多种机制发挥对视神经细胞和视网膜细胞的保护作用。程钰等<sup>[43]</sup>发现,槲皮素抑制JNK/p38 MAPK信号通路,对N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)诱导损伤的视网膜神经节细胞存在保护作用。此外,有研究发现槲皮素可以抑制NaIO<sub>3</sub>诱导的ROS产生,通过下调Bax、裂解的Caspase-3和PARP的表达,利用PI3K/AKT信号通路保护ARPE-19细胞免受NaIO<sub>3</sub>引起的细胞凋亡<sup>[44]</sup>。

关于槲皮素在黄斑变性治疗中的作用通路总结见表1。

表 1 槲皮素在黄斑变性治疗中的作用通路

Tab 1 Pathways of action of quercetin in the treatment of macular degeneration

| 类别               | 实验材料及药物用量                                              | 涉及通路                          | 检测指标及变化                                                                                                                            | 文献      |
|------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 抗炎               | SD大鼠灌胃 250 mg/(kg·d)                                   | Wnt/ $\beta$ -catenin 通路      | TNF- $\alpha$ 、IL-6 $\downarrow$ ; $\beta$ -catenin、MYC、AXIN2、TCF $\downarrow$                                                     | [10]    |
|                  | ARPE-19 细胞 100 $\mu$ mol·L <sup>-1</sup>               | MEK1/2-ERK1/2 通路              | ICAM-1、MMP-9 $\downarrow$ ; ERK1/2 磷酸化 $\downarrow$                                                                                | [14]    |
|                  |                                                        | PKC $\delta$ -JNK1/2-c-Jun 通路 | PKC $\delta$ 、JNK1/2、c-Jun 磷酸化、AP-1-Luc $\downarrow$                                                                               | [14]    |
|                  |                                                        | NF- $\kappa$ B 通路             | NF- $\kappa$ B (p65) $\downarrow$                                                                                                  | [14]    |
|                  | C57BL/6J 小鼠腹腔注射 30 mg/(kg·d)                           | ERK/STAT3 通路                  | 小胶质细胞 M1 型转 M2 型 $\uparrow$ ; CD16、iNOS、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 $\downarrow$ ; CD206、Arg1、IL-10 $\uparrow$               | [11]    |
| 改善脂质代谢<br>紊乱与抗氧化 | 小鼠灌胃 1、10、100 mg·kg <sup>-1</sup>                      | NF- $\kappa$ B 通路             | NF- $\kappa$ B、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ $\downarrow$                                                                            | [12]    |
|                  | ARPE-19 细胞 2.5 ~ 20 $\mu$ mol·L <sup>-1</sup>          | NF- $\kappa$ B 通路             | ICAM-1、sICAM-1、IL-6、IL-8、MCP-1 $\downarrow$                                                                                        | [13]    |
|                  | BALB/c 小鼠静脉注射 100 mg·kg <sup>-1</sup>                  | Nrf2-PGC-1 $\alpha$ -Sirt1 通路 | ROS、MDA $\downarrow$ ; GSH $\uparrow$ ; p-Nrf2、HO-1、Sirt1、PGC-1 $\alpha$ $\downarrow$                                              | [17]    |
|                  | ARPE-19 细胞 0 ~ 20 $\mu$ mol·L <sup>-1</sup>            | 自噬相关通路                        | Bcl-2 $\uparrow$ ; LC3B-II、p62、Beclin-1 $\downarrow$                                                                               | [17]    |
|                  | 昆明鼠灌胃 200 mg/(kg·d) 连续 30 d                            | Nrf2/Keap1/ARE                | ROS、MDA $\downarrow$ ; SOD、GSH-Px、CAT $\uparrow$ 、Nrf2 $\uparrow$ ; Keap1、NQO-1、GCL $\downarrow$                                   | [19]    |
| 抑制血管新生           | CD-1 小鼠腹腔注射 100 mg·kg <sup>-1</sup> 连续 8 周             | p38/ MAPK                     | SOD $\uparrow$ ; 8-OHdG、MDA $\downarrow$ ; TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ $\downarrow$ ; p38 MAPK $\downarrow$ 、Bcl-2 $\uparrow$ | [21]    |
|                  | BN 大鼠灌胃 (含槲皮素复方药物) 11.13 g/(kg·d)                      | MAPK 通路                       | p38MAPK、VEGF、TNF- $\alpha$ $\downarrow$                                                                                            | [24]    |
|                  | 人视网膜血管内皮细胞 (HRCECs) 10 $\mu$ mol·L <sup>-1</sup>       | AKT 通路                        | VEGF、bFGF $\downarrow$ ; ICAM-1、p-AKT $\downarrow$                                                                                 | [25-26] |
| 调节自噬             | 视网膜 / 脉络膜结合的细胞系 RF/6A 100 $\mu$ mol·L <sup>-1</sup>    | 自噬相关通路                        | LC3、Beclin-1 $\downarrow$                                                                                                          | [28-29] |
| 抑制铁死亡            | 角膜上皮 HCE-2 31.25、62.50、125.00 $\mu$ g·mL <sup>-1</sup> | 铁死亡相关通路                       | GPX4、FSP1、DHODH $\uparrow$                                                                                                         | [36]    |
| 减轻视网膜下<br>纤维化瘢痕  | ARPE-19 细胞 25 和 50 $\mu$ mol·L <sup>-1</sup>           | TGF- $\beta$ 通路               | I 型胶原蛋白 $\downarrow$ ; N-钙黏合素和 $\alpha$ -SMA $\downarrow$                                                                          | [40]    |
|                  |                                                        | SMAD 通路                       | Smad2/3 磷酸化 $\downarrow$                                                                                                           | [40]    |
| 减轻视网膜缺血<br>再灌注损伤 | SD 大鼠腹腔注射 50 mg/(kg·d) 连续 7 d                          | Caspase 相关蛋白                  | Caspase-3 $\downarrow$                                                                                                             | [42]    |
| 视网膜保护            | 视网膜神经节细胞 RGC-5 1、10、100 $\mu$ mol·L <sup>-1</sup>      | JNK/p38 MAPK 通路               | JNK、p38 MAPK $\downarrow$                                                                                                          | [43]    |
| 细胞凋亡             | ARPE-19 0 ~ 20 $\mu$ mol·L <sup>-1</sup>               | PI3K/AKT 通路                   | Bax、Caspase-3、PARP $\downarrow$ ; PI3K、pAKT $\downarrow$ ; Bcl-2 $\uparrow$                                                        | [44]    |

2 用于眼部疾病的槲皮素纳米制剂的研究概况

槲皮素虽然具备较好的生物活性,但存在水溶性较差、性质不稳定、膜通透性差、半衰期短等不足,导致其生物利用度低,因此在临床上的应用受到了限制<sup>[45]</sup>。近年来,一些新型纳米制剂(见图1)由于能延长药物在眼部的停留时间或者缓释减少给药次数以克服传统剂型的缺点,为槲皮素眼底递送系统的建立提供了借鉴。

2.1 纳米颗粒(NPs)

NPs分为有机(天然聚合物材料如壳聚糖、明胶、海藻酸钠、透明质酸等)、无机(金属及其氧化

物NPs,碳基NPs如富勒烯、石墨烯、碳纳米管等)和生物NPs(病毒样颗粒、白蛋白、外泌体等)<sup>[46]</sup>。当限制尺寸在100 nm以内时的单一材料形成的实心或空心颗粒,则称为纳米粒。

Wang等<sup>[47]</sup>利用N-琥珀酰基修饰壳聚糖以提高水溶性,采用离子凝胶法制备槲皮素纳米颗粒,制剂粒径为358.7 nm,药物包封率达80.12%,修饰后的壳聚糖纳米颗粒表面羧基在低pH值下被质子化造成颗粒收缩,从而限制槲皮素的释放,pH值为7.4时,羧基的拉伸和去质子化使纳米颗粒发生膨胀导致槲皮素的持续释放。壳聚糖以其良好抗氧化特



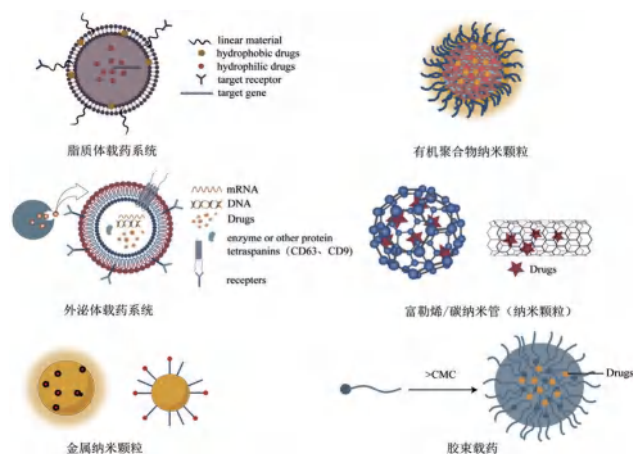


图 1 常见药物递送载体示意图(用 Adobe Illustrator 2024 绘制)

Fig 1 Schematic representation of common drug-delivery vectors (drawn by Adobe Illustrator 2024)

性和可生物降解性在眼科制剂领域已有相关探索,研究证实脉络膜上腔植入壳聚糖对眼部组织无刺激性<sup>[48]</sup>,且玻璃体 pH 值约为 7.5,该环境利于壳聚糖包载药物的持续释放。

无机纳米材料具有磁性、高渗透性和较小的尺寸,也是携带药物穿过体内生理屏障的良好工具,一些金属/金属氧化物纳米粒子如纳米银载体本身具有良好的抗菌效果<sup>[49]</sup>或抗氧化效果,因而在药物制剂中受到关注<sup>[50]</sup>。当前已有利用氧化铈<sup>[51]</sup>、介孔二氧化硅<sup>[52]</sup>、氧化石墨烯<sup>[53]</sup>作为槲皮素的递送载体,用于抗肿瘤相关研究,然而该类材料在眼内注射安全性尚未得到充分论证。

外泌体是由生物体内多种类型的细胞分泌的细胞外囊泡之一,其直径为 30 ~ 150 nm,是生物体内一种天然信号传递信使,其自身具备生物活性如抗氧化、抗炎等,可以与药物协同增效,还可以根据需要在外泌体表面进行工程化修饰,因而近年来外泌体作为药物递送载体研究较为广泛<sup>[54]</sup>。北京朝阳医院眼科陶勇团队利用间充质干细胞外泌体搭载抗 VEGF 抗体,实现了眼底靶向新生血管治疗<sup>[7]</sup>,为外泌体在眼底疾病治疗中的应用提供了重要证据。天然产物如槲皮素具有多种生物活性,或可利用外泌体载药技术实现眼底递送。

## 2.2 脂质纳米载体

脂质纳米载体是以脂质为主要成分构建的纳米载体,属于纳米颗粒的一个子类。脂质体是第一代脂质纳米载体,由磷脂分子自发聚集形成的封闭囊泡,由一个或多个同心脂质双层组成,能够封装亲脂性和亲水性化合物,从而运输多种药物<sup>[55]</sup>。林敏等<sup>[56]</sup>构建了亲水性药物多柔比星和疏水性药物槲皮素的共递送脂质体,对视网膜母细胞瘤存在抑制效果,降低上皮间质转化相关通路蛋白 Vimentin 和  $\alpha$ -SMA 表达水平,从细胞层面提供了槲皮素脂

质体用于眼底病治疗的证据。耿燕等<sup>[57]</sup>采用高压均质法构建的槲皮素脂质体经大鼠灌胃后,可以降低视网膜组织中蛋白质非酶糖基化产物,从而对糖尿病视网膜病变有控制作用。所获得的槲皮素脂质体粒径为 145 nm,载药量约  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,包封率达 92%,具有良好的制剂学特征,但口服药物普遍存在生物利用度不高的问题。槲皮素脂质体注射剂的安全性在治疗大鼠肝脏缺血再灌注方面得到了验证<sup>[55]</sup>,上述关于眼底病的探究或可在经安全性评价后开发相应的局部眼用制剂。

固体脂质纳米粒(solid lipid nanoparticles, SLNs)通过固态脂质基质有效解决了传统脂质体存在的稳定性问题。有研究者成功开发了搭载贝伐珠单抗的 SLNs 制剂,该制剂经注射后能够有效抑制大鼠视网膜新生血管的形成<sup>[58]</sup>,实现药物在眼后段的精准递送。Li 等<sup>[59]</sup>构建了一种槲皮素与 microRNA-150 共载阳离子固体脂质纳米粒,可以有效进入人脐静脉内皮细胞 HUVEC,两者协同作用于血管增生相关通路,为 AMD 治疗提供思路。研究证实该制剂在眼内注射后未引发显著炎症或视网膜毒性,充分展现了 SLNs 在眼底药物递送领域的显著优势以及天然药物槲皮素在眼底病治疗中的应用潜力。

纳米结构脂质载体(nanostructured lipid carrier, NLCs)是第二代脂质纳米载体,由固体脂质和液体脂质的混合物经表面活性剂乳化后形成的纳米粒,具有更好的胶体稳定性和持续的药物释放行为。Mishra 等<sup>[60]</sup>开发的槲皮素 NLCs 在干眼治疗中得到应用,制剂本身粒径 93 nm,载药量约 43%,具有 90 d 的储存稳定性,其角膜渗透性约为游离药物的 2.5 倍,眼表滞留时间约提高 2.88 倍,在眼表炎症治疗上发挥作用。然而该种类型制剂能否用于眼底病治疗需要进一步研究,有研究设计了装载阿达木单抗的 NLCs 滴眼剂,并成功用于视网膜色素变性的靶向治疗<sup>[61]</sup>,提供了一种非侵入式的治疗方案,可为槲皮素的递送提供借鉴。

## 2.3 纳米胶束

胶束是两亲性嵌段共聚物在溶液中自组装形成,其形成依赖于共聚物分子中亲水链和疏水链的相互作用,具有疏水核心和亲水外壳,使一些疏水药物很好地分散到疏水核心中心<sup>[55]</sup>。Natesan 等<sup>[62]</sup>采用离子凝胶法制备了以聚乙二醇(PEG)修饰的壳聚糖纳米颗粒,形成了具有核壳结构的胶束,用于槲皮素和白藜芦醇的共递送,载体材料阳离子聚电解质的性质与带负电的角膜上皮表面产生强静电相互作用,有助于延长负载药物的递送时间。使用家兔滴眼给药观察到制剂可以有效降低眼内压,给青光眼提供了一种无创式的治疗方案。当前眼底病治

疗多以局部注射为主, Nguyen 等<sup>[63]</sup>对包裹白藜芦醇的聚己内酯纳米粒子进行氨分解, 然后与羧基端终止的转录激活因子和二甲双胍形成酰胺键, 构建出一种新型纳米胶束, 单次玻璃体注射后可有效改善视网膜通透性(增加约 15 倍), 持续 56 d 抑制黄斑变性视网膜异常血管的生长, 为槲皮素等具有优良活性的天然产物眼后段递送提供参考。

#### 2.4 纳米乳/纳米混悬剂

Mahadev 等<sup>[64]</sup>使用油酸乙酯、吐温 20 等超声辅助构建了槲皮素纳米乳, 优化工艺后的制剂呈球形, 将药物包载率提高到 87.04%, 粒径在 125.51 nm, 液滴之间吸引力小有助于抵抗重力分离和液滴聚集, 在动力学上保持了稳定性。且该制剂受物理化学变化影响较小, 具有比单用槲皮素更好的口服生物利用度。超声辅助构建的槲皮素纳米乳提供了一种操作便捷, 高效递送药物的方法, 然而纳米乳一般需要过量的表面活性剂和其他载药量极低的辅料, 长时间使用是否存在潜在损伤尚未充分论证。为此 Li 等<sup>[65]</sup>利用大豆卵磷脂为稳定剂开发了尺寸为 200 nm 的槲皮素纳米混悬剂, 提供了一种制备纯药物纳米制剂的方法, 并且创新性地装载了 II 期代谢抑制剂(胡椒碱或油酸钠), 通过对比发现, 加入代谢抑制剂的槲皮素混悬液药物释放速度减慢, 起到缓释效果, 将口服生物利用度从溶液状态下的 3.61% 提高到 23.58%。除了口服制剂之外, Moghimipour 等<sup>[66]</sup>设计了系列槲皮素眼用微乳剂, 提高了药物的角膜渗透性, 具有良好的理化性质和稳定性。尽管纳米乳剂和纳米混悬剂理论上可以用于眼内注射, 但注射用槲皮素纳米乳剂和混悬剂尚待进一步研究。

#### 2.5 其他

徐新荣等<sup>[67]</sup>采用溶剂挥发法制备了槲皮素磷脂复合物固体分散体。尽管固体分散体通常不被归类为纳米制剂范畴, 但其通过分子级分散机制显著改善了药物的溶解特性与溶出动力学。在视网膜氧化损伤小鼠模型中, 经口给予槲皮素 400 mg/(kg·d)(灌胃给药, 每日 1 次, 持续 3 个月)后, 组织学评估显示该制剂可有效修复视网膜结构异常, 并在 AMD 病理模型中展现出明确的视网膜保护效应。纳米晶技术为提升槲皮素生物利用度提供了创新解决方案, 通过微流控技术制备的纳米晶体系, 实现了药物粒径向纳米尺度的精准调控。该制剂表现出优异的物理稳定性, 其体外溶出速率较原料药提升 10 倍, 验证了纳米化策略在突破难溶性药物口服吸收瓶颈方面的显著优势<sup>[68]</sup>。原位凝胶作为智能给药系统的代表, 其独特之处在于给药后能在生理条件下发生溶胶-凝胶相转变, 形成非化学交联的半固体基质。当与纳米技术耦合时, 所构建的纳米结构原位凝胶系统展现出多重功能特性: 既可通过纳米载体

增强药物溶解度与化学稳定性, 又能实现药物在眼表的智能控释, 更重要的是, 该体系可有效清除角膜上皮细胞内过量产生的 ROS, 为氧化应激相关眼病的治疗提供了新型递药平台<sup>[69]</sup>。

### 3 结语

尽管槲皮素治疗黄斑变性的机制研究多限于细胞和动物实验, 临床转化证据尚不充分, 但其展现的多效性活性, 为突破现有治疗局限提供了基于天然产物的创新干预方向。此类活性优良的天然产物可以利用当前纳米技术实现缓释或者靶向递送, 但纳米制剂眼底转化及天然产物眼底递送仍面临较大困难, 如何利用纳米制剂优势提高眼底靶向性和生物利用度, 如何降低药物的全身吸收和不良反应, 如何实现药物稳定持续释放等都有待进一步研究验证。

AMD 在发病时多种机制交互作用, 目前尚不能完全阐释清楚其发病机制, 这为临床治疗带来了巨大挑战。玻璃体内注射抗 VEGF 药物作为当前西医治疗 AMD 的标准方案, 但仍然存在 30% 患者无应答, 且药物生物利用度低, 需要频繁注射, 给患者带来负担, 部分患者产生药物抗性及眼底纤维化。天然产物往往具备多通路多靶点治疗优势, 白藜芦醇、姜黄素、黄芩苷、槲皮素等单体可针对黄斑变性部分病理机制发挥作用, 为防治眼底病提供了思路, 即结合现代制剂技术, 将活性优良的天然产物精准递送至眼底, 从而提升治疗效果。利用纳米载体技术搭载具有明确生物活性的天然产物, 已成为中药新制剂研发的重要方向。眼用新制剂的开发高度依赖于纳米载体技术的性能突破, 通过将天然药物活性分子与智能纳米递送系统深度融合, 不仅为突破传统中药制剂的局限性提供了新路径, 更为开发高效、安全的眼科创新药物奠定了技术基础。

### 参考文献

- [1] Mirza MA, Mahmood S, Hilles AR, et al. Quercetin as a therapeutic product: evaluation of its pharmacological action and clinical applications—a review [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2023, 16 (11): 1631.
- [2] Zhao TT, Guo XJ, Sun Y. Iron accumulation and lipid peroxidation in the aging retina: implication of ferroptosis in age-related macular degeneration [J]. *Aging Dis*, 2021, 12 (2): 529-551.
- [3] Pugazhendhi A, Hubbell M, Jairam P, et al. Neovascular macular degeneration: a review of etiology, risk factors, and recent advances in research and therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (3): 1170.
- [4] Patra JK, Das G, Fraceto LF, et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects [J]. *Nanobiotechnology*, 2018, 16 (1): 71.
- [5] Li SD, Chen LB, Fu Y. Nanotechnology-based ocular drug delivery systems: recent advances and future prospects [J]. *Na-*



- nobiotecnology, 2023, 21 (1): 232.
- [6] Bao H, Tian Y, Wang HX, et al. Exosome-loaded degradable polymeric microcapsules for the treatment of vitreoretinal diseases [J]. *Nat Biomed Eng*, 2023, 8 (11): 232.
  - [7] Tian Y, Zhang F, Qiu YF, et al. Reduction of choroidal neovascularization via cleavable VEGF antibodies conjugated to exosomes derived from regulatory T cells [J]. *Nat Biomed Eng*, 2021, 5 (9): 968-982.
  - [8] 邵毅, 温佳怡, 令倩. 年龄相关性黄斑变性诊断与治疗规范: 2022 年英国皇家眼科医学会指南解读 [J]. *眼科新进展*, 2023, 43 (2): 85-88.
  - [9] Cao YQ, Li XY, Tchiveleket GM, et al. Bioinformatical and biochemical analyses on the protective role of traditional Chinese medicine against age-related macular degeneration [J]. *Curr Eye Res*, 2022, 47 (10): 1450-1462.
  - [10] 罗孟雄, 毕亦飞, 王象鹏. 基于 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路探讨槲皮素对自身免疫性葡萄膜炎大鼠的影响机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28 (16): 204-212.
  - [11] Zou Y, Jiang JL, Li YQ, et al. Quercetin regulates microglia M1/M2 polarization and alleviates retinal inflammation via ERK/STAT3 pathway [J]. *Inflammation*, 2024, 47 (5): 1616-1633.
  - [12] Ho TY, Lo HY, Liu IC, et al. The protective effect of quercetin on retinal inflammation in mice: the involvement of tumor necrosis factor/nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathways [J]. *Food Funct*, 2020, 11 (9): 8150-8160.
  - [13] Cheng SC, Huang WC, JH SP, et al. Quercetin inhibits the production of IL-1 $\beta$ -induced inflammatory cytokines and chemokines in ARPE-19 cells via the MAPK and NF- $\kappa$ B signaling pathways [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (12): 2957.
  - [14] Cheng SC, Wu YH, Huang WC, et al. Anti-inflammatory property of quercetin through downregulation of ICAM-1 and MMP-9 in TNF- $\alpha$ -activated retinal pigment epithelial cells [J]. *Cytokine*, 2019, 116: 48-60.
  - [15] 陈雄, 陈惠媚, 汤钰, 等. 氧化应激在年龄相关性眼病中的作用机制研究进展 [J]. *疑难病杂志*, 2024, 23 (6): 764-768.
  - [16] 黄华发, 刘东成, 秦波. 铁死亡在年龄相关性黄斑变性中的调控机制研究进展 [J]. *眼科新进展*, 2023, 43 (11): 914-919.
  - [17] Hsu MY, Hsiao YP, Lin YT, et al. Quercetin alleviates the accumulation of superoxide in sodium iodate-induced retinal autophagy by regulating mitochondrial reactive oxygen species homeostasis through enhanced deacetyl-SOD2 via the Nrf2-PGC-1 $\alpha$ -Sirt1 pathway [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10 (7): 1125.
  - [18] Shao Y, Yu HT, Yang Y, et al. A solid dispersion of quercetin shows enhanced Nrf2 activation and protective effects against oxidative injury in a mouse model of dry age-related macular degeneration [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 1479571.
  - [19] 陈婷妍, 周洋. 基于 Nrf2/Keap1/ARE 通路研究槲皮素对小鼠年龄相关性黄斑变性的保护作用 [J]. *国际眼科杂志*, 2020, 20 (7): 1132-1138.
  - [20] 王冬艳, 彭建明, 季琰, 等. 槲皮素对糖尿病大鼠视网膜病变的抗氧化作用及其机制 [J]. *实用医药杂志*, 2021, 38 (4): 341-343, 385.
  - [21] 朱素华, 张曼, 徐圣秋. 槲皮素对糖尿病视网膜膜病变小鼠氧化应激损伤和炎症反应的影响 [J]. *药学与临床研究*, 2023, 31 (1): 48-52.
  - [22] 陈进强, 李慧丽, 王辉武. 年龄相关性黄斑变性中医治疗进展 [J]. *中国中医眼科杂志*, 2021, 31 (4): 294-296, 308.
  - [23] Ratnapriya R, Chew EY. Age-related macular degeneration-clinical review and genetics update [J]. *Clin Genet*, 2013, 84 (2): 160-166.
  - [24] 石楠楠, 曹明芳, 李婧, 等. GEO 芯片联合网络药理学和分子对接探讨归芍地黄汤治疗新生血管性年龄相关性黄斑变性的作用机制及实验验证 [J]. *现代药物与临床*, 2023, 38 (6): 1321-1334.
  - [25] 桂志鹏, 周宇宁, 胡月, 等. 槲皮素对血管内皮细胞的作用及其机制研究 [J]. *中国口腔颌面外科杂志*, 2018, 16 (5): 385-390.
  - [26] 朱琦鸿. 槲皮素对高糖环境下 HRCECs 的增殖和 VEGF、ICAM-1 表达的影响 [D]. 衡阳: 南华大学, 2017.
  - [27] Li R, Tian J, Du JH, et al. Manipulation of autophagy: a novel potential therapeutic strategy for retinal neovascularization [J]. *BMC Ophthalmol*, 2018, 18 (1): 110.
  - [28] Du JH, Li X, Li R, et al. Role of autophagy in angiogenesis induced by a high-glucose condition in RF/6A cells [J]. *Ophthalmologica*, 2017, 237 (2): 85-95.
  - [29] 李小珩, 李蓉, 朱巧平. 槲皮素对高糖诱导的脉络膜和视网膜细胞血管生成的影响及其与细胞自噬的关系 [J]. *山西医科大学学报*, 2019, 50 (12): 1732-1737.
  - [30] 郑艺煌, 赖佳钰, 曹俊昌, 等. mTOR 自噬相关途径在年龄相关性黄斑变性中的作用及中、西医药物干预进展 [J]. *中国中医眼科杂志*, 2023, 33 (7): 679-683.
  - [31] Terao R, Sohn BS, Yamamoto T, et al. Cholesterol accumulation promotes photoreceptor senescence and retinal degeneration [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2024, 65 (10): 29.
  - [32] Wang YH, Tseng YL, Chen KY, et al. Dasatinib plus quercetin alleviates choroid neovascularization by reducing the cellular senescence burden in the RPE-choroid [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2023, 64 (12): 39.
  - [33] Li DL, Mao L, Gu Q, et al. Quercetin protects retina external barrier from oxidative stress injury by promoting autophagy [J]. *Cutan Ocul Toxicol*, 2021, 40 (1): 7-13.
  - [34] Liu DC, Liu ZL, Liao HX, et al. Ferroptosis as a potential therapeutic target for age-related macular degeneration [J]. *Drug Discov Today*, 2024, 29 (4): 103920.
  - [35] Wang L, Zhang CY, Pang L, et al. Integrated network pharmacology and experimental validation to explore the potential pharmacological mechanism of Qihuang granule and its main ingredients in regulating ferroptosis in AMD [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2023, 23 (1): 420.
  - [36] 王佳娣, 安百平, 刘悦, 等. 槲皮素介导铁死亡途径对高渗刺激诱导的干眼细胞模型的保护作用 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2024, 40 (4): 529-533.
  - [37] Spaide RF, Jaffe GJ, Sarraf D, et al. Consensus nomenclature for reporting neovascular age-related macular degeneration data: consensus on neovascular age-related macular degeneration nomenclature study group [J]. *Ophthalmology*, 2020, 127 (5): 616-636.
  - [38] 王涛, 李冰晴, 王津津, 等. CCK-8 检测法研究槲皮素对



- 人 Tenon 囊成纤维细胞的抑制作用[J]. 眼科新进展, 2007, 27 (8): 576-580.
- [39] 罗莉莎. 槲皮素在兔眼滤过术后抗瘢痕作用的实验研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2007.
- [40] 刘畅, 蔡雯婷, 苏途, 等. 槲皮素对转化生长因子 $\beta 1$ 介导的视网膜色素上皮细胞上皮-间质转化过程的影响[J]. 眼科新进展, 2021, 41 (7): 638-642.
- [41] Gao FR, Wang L, Wu BX, et al. Elimination of senescent cells inhibits epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells[J]. *Exp Eye Res*, 2022, 223: 109207.
- [42] 于雯, 陈肖君, 肖正霞, 等. 槲皮素腹腔注射对大鼠视网膜缺血再灌注损伤的影响及其机制[J]. 山东医药, 2023, 63 (29): 31-35.
- [43] 程钰, 王亮, 田莹, 等. 槲皮素对 *N*-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 诱导损伤的视网膜神经节细胞的保护作用及其机制[J]. 眼科新进展, 2019, 39 (12): 1120-1124.
- [44] Chang YY, Lee YJ, Hsu MY, et al. Protective effect of quercetin on sodium iodate-induced retinal apoptosis through the reactive oxygen species-mediated mitochondrion-dependent pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (8): 4056.
- [45] 李阳杰, 姜亚玲, 刘秋伟, 等. 槲皮素衍生物的生物活性研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2021, 56 (3): 175-180.
- [46] Mariano A, Bigioni I, Marchetti M, et al. Repositioned natural compounds and nanoformulations: a promising combination to counteract cell damage and inflammation in respiratory viral infections[J]. *Molecules*, 2023, 28 (10): 4045.
- [47] Wang LC, Fu RR, Meng Y, et al. pH sensitive quercetin nanoparticles ameliorate DSS-induced colitis in mice by colon-specific delivery[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2024, 68 (2): e2300051.
- [48] 何瑶, 赖梦琴, 李翔, 等. 载 siRNA 的眼用三甲基壳聚糖修饰纳米粒的制备及其跨角膜作用评价[J]. 中国新药杂志, 2022, 31 (13): 1315-1321.
- [49] Sharma R, Basist P, Alhalmi A, et al. Synthesis of quercetin-loaded silver nanoparticles and assessing their anti-bacterial potential[J]. *Micromachines (Basel)*, 2023, 14 (12): 2154.
- [50] Tomou EM, Papakyriakopoulou P, Saitani EM, et al. Recent advances in nanoformulations for quercetin delivery[J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15 (6): 1656.
- [51] 许为东, 杨丽, 陈晨, 等. 纳米氧化铈负载槲皮素引起人肝癌细胞自噬阻断[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2022, 38 (11): 1538-1546.
- [52] Alkahtani S, Alarifi S, Aljarba NH, et al. Mesoporous SBA-15 silica-loaded nano-formulation of quercetin: a probable radio-sensitizer for lung carcinoma[J]. *Dose Response*, 2022, 20 (1): 15593258211050532.
- [53] Liao RM, Zhang Y, Mao WW. Functionalized graphene oxide NPs as a nanocarrier for drug delivery system in quercetin/lurbinectedin as dual sensitive therapeutics for A549 lung cancer treatment[J]. *Heliyon*, 2024, 10 (11): e31212.
- [54] Chen Z, Xiong M, Tian JQ, et al. Encapsulation and assessment of therapeutic cargo in engineered exosomes: a systematic review[J]. *Nanobiotechnology*, 2024, 22 (1): 18.
- [55] Ferreira-Silva M, Faria-Silva C, Carvalheiro MC, et al. Quercetin liposomal nanoformulation for ischemia and reperfusion injury treatment[J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14 (1): 104.
- [56] 林敏, 刘秀梅, 冯年平, 等. 脂质体共递送槲皮素与多柔比星通过调控上皮间质转化过程抑制视网膜母细胞瘤的研究[J]. 中国中药杂志, 2024, 49 (13): 3515-3525.
- [57] 耿燕, 薛丽丽, 刘超, 等. 脂质体槲皮素对糖尿病大鼠视网膜糖基化终产物生成及受体表达的影响[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2010, 4 (12): 2421-2425.
- [58] Apaolaza PS, Del Pozo-Rodríguez AD, Torrecilla J, et al. Solid lipid nanoparticle-based vectors intended for the treatment of X-linked juvenile retinoschisis by gene therapy: in vivo approaches in *Rslh*-deficient mouse model[J]. *Control Release*, 2015, 217: 273-283.
- [59] Li W, Chen L, Gu ZW, et al. Co-delivery of microRNA-150 and quercetin by lipid nanoparticles (LNPs) for the targeted treatment of age-related macular degeneration (AMD)[J]. *Control Release*, 2023, 355: 358-370.
- [60] Mishra A, Halder J, Saha I, et al. Quercetin loaded biogenic squalene nano-lipid carriers for the treatment of dry eye syndrome[J]. *Int J Pharm*, 2025, 674: 125457.
- [61] Velasco S, Gallego I, Olivares-González L, et al. Noninvasive ocular delivery of adalimumab-loaded nanostructured lipid carriers for targeted retinitis pigmentosa therapy[J]. *Biomed Pharmacother*, 2025, 185: 117962.
- [62] Natesan S, Pandian S, Ponnusamy C, et al. Co-encapsulated resveratrol and quercetin in chitosan and peg modified chitosan nanoparticles: for efficient intra ocular pressure reduction[J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 104 (Pt B): 1837-1845.
- [63] Nguyen DD, Luo LJ, Yang CJ, et al. Highly retina-permeating and long-acting resveratrol/metformin nanotherapeutics for enhanced treatment of macular degeneration[J]. *ACS Nano*, 2023, 17 (1): 168-183.
- [64] Mahadev M, Nandini HS, Ramu R, et al. Fabrication and evaluation of quercetin nanoemulsion: a delivery system with improved bioavailability and therapeutic efficacy in diabetes mellitus[J]. *Pharmaceutics (Basel)*, 2022, 15 (1): 70.
- [65] Li HW, Li MZ, Fu JX, et al. Enhancement of oral bioavailability of quercetin by metabolic inhibitory nanosuspensions compared to conventional nanosuspensions[J]. *Drug Deliv*, 2021, 28 (1): 1226-1236.
- [66] Moghimipour E, Farsimadan N, Salimi A. Ocular delivery of quercetin using microemulsion system: design, characterization, and Ex-vivo transcorneal permeation[J]. *Iran J Pharm Res*, 2022, 21 (1): e127486.
- [67] 徐新荣, 于海涛, 李敏, 等. 槲皮素磷脂复合物固体分散体增强对氧化损伤小鼠视网膜的保护作用[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36 (4): 775-778.
- [68] 郑光艳, 吴文丽, 刘泽梅, 等. 微流控技术制备槲皮素纳米晶及其大鼠体内药动学研究[J]. 中国医药工业杂志, 2024, 55 (4): 519-526.
- [69] Chittasupho C, Junmahasathien T, Chalermmongkol J, et al. Suppression of intracellular reactive oxygen species in human corneal epithelial cells via the combination of quercetin nanoparticles and epigallocatechin gallate and in situ thermosensitive gel formulation for ocular drug delivery[J]. *Pharmaceutics (Basel)*, 2021, 14 (7): 679.

(收稿日期: 2025-03-19; 修回日期: 2025-06-18)

# 姜黄素及其相关化合物的抗病毒作用研究进展

李淼, 黄兴振\* (广西医科大学药学院, 南宁 530021)

**摘要:** 由于人类病毒相关性疾病的发病率和病毒耐药率不断增加, 以及缺乏可行的治疗替代方案 (包括植物衍生策略), 病毒性疾病的治疗已成为影响人类健康的重要挑战。姜黄素是一种从姜黄中提取的生物活性化合物, 大量研究表明, 姜黄素具有广泛的抗微生物活性, 可限制不同细菌和病毒的复制。本文就姜黄素及其相关化合物的抗病毒作用研究进行综述, 以期今后的新药研发及抗病毒治疗提供参考。

**关键词:** 姜黄素; 朊毒体; RNA 病毒; DNA 病毒; 抗病毒作用

**中图分类号:** R282

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-2981(2025)08-2366-09

**doi:**10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.033

## Research progress in antiviral effect of curcumin and its related compounds

LI Miao, HUANG Xing-zhen\* (College of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021)

**Abstract:** Treatment of viral diseases has become a medical challenge because of the increasing incidence and resistance rate of human viral pathogens, as well as the lack of viable treatment alternatives, including plant-derived strategies. Curcumin is a bioactive compound extracted from turmeric. Numerous studies have shown that curcumin has many antimicrobial activities, which can limit the replication of different bacteria and viruses. This review summarized the research into the antiviral effects of curcumin and its related compounds in recent years to provide references for future drug development and antiviral therapy.

**Key words:** curcumin; prion; RNA virus; DNA virus; antiviral effect

近年来, 病毒感染在全球肆虐, 被认为是现代社会最普遍、最具破坏性的健康问题之一, 也是导致人类死亡的主要原因之一。植物、动物和微生物等来源的天然产物在治疗传染病方面表现出疗效显著, 不良反应少, 协同作用强, 且具备克服耐药性的潜力, 中药研发的抗微生物药物正受到越来越多的关注。姜黄素因其广泛的生物学和药理学特性成为现阶段的研究热点之一, 本文综述了姜黄素及其相关化合物的抗病毒作用的研究现状。

### 1 姜黄素的化学结构及其理化性质

姜黄素是从姜黄和其他姜科植物根茎中提取出的主要活性化合物, 其系统化学名为 (1E, 6E)-1, 7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1, 6-庚二烯-3, 5-二酮, 化学式为  $C_{21}H_{20}O_6$ , 黄色晶体, 熔点为 183℃, 味微苦。姜黄素是姜黄粗提取物中含量最高的化合物, 含量为 60%~70%, 其次是去甲氧基姜黄素 (20%~30%), 及双去

甲氧基姜黄素 (10%~15%)。姜黄素是一种疏水性分子, 在常温状态下几乎不溶于水, 但可溶于极性和非极性有机溶剂以及碱或极酸性溶剂。姜黄素可表现出酮-烯醇互变异构现象, 具体取决于溶液的酸度。在酸性和中性介质中, 酮形式占主导地位, 颜色呈现为红棕色; 而在碱性介质中, 它以烯醇形式存在, 并呈现为亮黄色。

### 2 姜黄素及其相关化合物对朊毒体的作用

朊病毒病是由朊粒蛋白 (prion protein, PrP) 错误折叠为致病性自增殖构象引起的, 其发病机制主要是细胞型朊粒蛋白 (cellular prion protein, PrP<sup>c</sup>) 转化为病理型朊粒蛋白 (scrapie prion protein, PrP<sup>sc</sup>), 导致快速发作的中枢神经系统退化性病变甚至死亡。目前尚无可治疗或预防朊病毒疾病的药物, 消除内源性 PrP<sup>sc</sup> 可阻止朊病毒病的进展<sup>[1]</sup>。

$\beta$ -淀粉样蛋白肽 ( $\beta$ -AP) 的病理聚集是多种神经系统疾病的标志, 包括阿尔茨海默病和朊病毒病<sup>[2]</sup>。姜黄素是  $\beta$ -AP 聚集抑制剂, 能分解预

作者简介: 李淼, 女, 副主任药师, 主要从事医院药学研究, email: 396854994@qq.com \*通信作者: 黄兴振, 男, 副教授, 主要从事药剂学研究, email: 215997143@qq.com

先形成的  $\beta$ -AP 和淀粉样蛋白斑块, 从而预防或延迟神经退行性疾病的发生<sup>[3]</sup>。

杨文静等<sup>[4]</sup>研究表明, 姜黄素能浓度依赖性地下调朊病毒感染细胞模型 SMB-S15 细胞中一氧化氮 (NO) 和谷氨酸的表达, 同时上调乙酰胆碱 (ACh) 的表达。通过调节 AKT/CREB/BDNF 信号通路, 姜黄素提升了细胞的抗氧化能力, 减轻了朊病毒感染引起的神经细胞损伤。Riemer 等<sup>[5]</sup>测试了姜黄素、氨苯砜、布洛芬、美金刚和米诺环素等五种药物对小鼠脑朊病毒感染的治疗效果。结果显示, 接受低剂量姜黄素和美金刚治疗的小鼠, 其感染后的存活时间显著长于未治疗的对照组, 表明低剂量姜黄素可能对朊病毒感染有潜在的治疗作用。Caughey 等<sup>[6]</sup>研究发现, 姜黄素能有效抑制朊病毒感染的神经母细胞瘤细胞中 PrP<sup>Sc</sup> 的聚集, 并阻止 PrP<sup>C</sup> 向 PrP<sup>Sc</sup> 的转化。姜黄素毒性较低, 且可穿透血脑屏障, 这表明姜黄素可能是治疗由朊病毒引起的传染性海绵状脑病 (TSE) 的潜在有效药物之一。

### 3 姜黄素及其相关化合物对 RNA 病毒的作用

#### 3.1 对基孔肯雅病毒 (CHIKV) 的作用

CHIKV 是一种通过蚊子传播的 RNA 病毒, 能够引发严重的肌肉骨骼疾病, 表现为发烧、持续性关节痛和肌肉痛等症状。近年来, 该病毒重新成为全球健康威胁, 从非洲蔓延至亚洲和美洲, 导致数百万人受到大规模疫情的影响。尽管对 CHIKV 的发病机制已经研究了 50 多年, 但目前仍无治愈方法<sup>[7-8]</sup>。

Sengupta 等<sup>[9]</sup>研究了姜黄素在缓解和预防 CHIKV 诱导的急性和慢性关节炎小鼠模型中的作用。研究表明, CHIKV 感染前给予姜黄素  $2000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  或感染后给予  $1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  姜黄素, 能改善受感染小鼠的疼痛阈值、运动行为, 并减少足部肿胀, 从而显著缓解关节疼痛。此外, 与未接受治疗的空白对照组相比, 姜黄素治疗组模型小鼠的蛋白多糖损失和软骨侵蚀减少, 国际骨关节炎研究协会 (OARSI) 和组织学切片标准化显微关节炎评分 (SMASH) 评分较低, 且膝关节内侧股骨髁和内侧胫骨平台区域的 II 型胶原蛋白强度增加了 1 ~ 2 倍。Mounce 等<sup>[10]</sup>发现  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的姜黄素不会影响正常细胞活力, 却能显著抑制 CHIKV。进一步研究表明, 姜黄素不影响病毒 RNA 的完整性, 但通过剂量依赖性方式干扰病毒包膜与宿主细胞的结合, 展现出良好的抗病毒活性。

#### 3.2 对登革热病毒 (DENV) 的作用

登革热由 DENV 引起, 目前已在近 100 个国

家流行, 每年报告约 4 亿例, 导致 22 000 人死亡。世界卫生组织 (WHO) 将登革热列为 2019 年全球十大健康威胁之一<sup>[11-12]</sup>。Balasubramanian 等<sup>[13]</sup>合成了四种姜黄素类似物, 并测试了其体外对 DENV 的抗病毒活性。结果显示, 姜黄素是病毒蛋白酶的弱抑制剂, 而姜黄素类似物在蚀斑测定中表现出更强的抑制作用。进一步的分析表明, 其机制是通过抑制 DENV 相关的乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC) 和脂肪酸合酶 (FASN) 的表达, 从而阻止病毒进入细胞并复制。

黄病毒 [DENV 和寨卡病毒 (ZIKV)] 编码了一种独特的双组分 NS2B-NS3 蛋白酶, 该酶对病毒成熟和感染至关重要。Lim 等<sup>[14]</sup>首次通过核磁共振和分子对接技术发现, 姜黄素与 DENV NS2B-NS3 蛋白酶中的一个非活性位点空腔结合, 导致 C 末端 NS2B 的  $\beta$ -发夹结构展开或移位, 从而破坏其活性构象, 影响 NS2B-NS3 蛋白酶的活性。

#### 3.3 对冠状病毒 SARS-CoV-2 的作用

2019 年新型冠状病毒感染 (COVID-19) 大流行由严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (SARS-CoV-2) 引起, 该病毒的持续传播至今仍令全球卫生工作者和社会面临严峻挑战, 但治疗选择有限。

Zhang 等<sup>[15]</sup>研究发现, 严重 SARS-CoV-2 感染与线粒体功能障碍密切相关, 线粒体功能障碍生物标志物与感染患者的疾病进展、代谢和免疫变化有关。姜黄素可减轻 SARS-CoV-2 S1 蛋白引起的线粒体膜电位损伤, 并降低活性氧 (ROS) 水平, 从而通过保护线粒体功能, 在预防严重 COVID-19 方面具有潜在作用。

Kishimoto 等<sup>[16]</sup>开发了一种高吸收率的姜黄素口服制剂, 并评估其对无症状或轻度症状 COVID-19 患者病情进展的抑制作用。结果显示, 服用姜黄素制剂的患者主要终点事件 (体温  $\geq 37.5^\circ\text{C}$  和经皮氧饱和度  $< 96\%$ ) 明显少于安慰剂组, 且使用退热药的频率和血压变化率也显著低于安慰剂组。

SARS-CoV-2 会影响神经元细胞, 引起记忆丧失、嗅觉丧失和脑部炎症等多种症状。Nicoliche 等<sup>[17]</sup>研究了姜黄素及姜黄素类似物 (Me08 和 Me23) 在 SARS-CoV-2 感染的 SH-SY5Y 细胞中的抗病毒、抗炎和抗氧化作用。研究表明, Me23 显著降低了质膜相关跨膜丝氨酸蛋白酶 2 (TMPRSS2) 和跨膜丝氨酸蛋白酶 11D (TMPRSS11D) 的基因表达, 从而减轻 SARS-CoV-2 引起的 ROS 水平升高。此外, Me23 通过上调 *Nrf2* 基因表达, 恢复 SARS-CoV-2 感染后醌氧化还原酶 1 (NQO1) 的活性, 展现出抗氧化作用。姜黄素和姜黄素类似物均显示出降低促炎



细胞因子 [如白细胞介素 (IL)-6、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和 IL-17] 的能力, 而 Me08 则特异性地降低了  $\gamma$  干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 水平。结果表明, 姜黄素和姜黄素类似物可以作为减轻 COVID-19 影响的潜在药物, 特别是在中枢神经系统受累的情况下。

### 3.4 对甲型流感病毒 (IAV) 的作用

流感病毒是由分段的负链 RNA 基因组编码的包膜病毒, 属于正黏病毒科 RNA 病毒。分为甲 (A)、乙 (B)、丙 (C) 三型, 其中人流感主要是 IAV 和乙型流感病毒引起的。IAV 经常发生抗原变异, 可以进一步分为 H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>、H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>、H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>、H<sub>7</sub>N<sub>9</sub> 等亚型。严重的流感病毒感染会诱发强烈的宿主防御反应和过度的炎症反应, 导致急性肺损伤、多器官衰竭和高死亡率<sup>[18]</sup>。

Nittayananta 等<sup>[19]</sup>开发了一种含姜黄素的口鼻膜喷雾剂, 并通过空斑减数试验在体外评估了其对 SARS-CoV-2、IAV 和乙型流感病毒的抗病毒活性, 以及其对黏膜先天免疫和炎症细胞因子的影响。结果显示, 含姜黄素的薄膜喷雾剂能够抑制 SARS-CoV-2 和流感病毒的生长, 维持正常细胞活力, 显著诱导口腔角质形成细胞分泌抗菌肽 LL-37 及人  $\alpha$ -防御素 5 (HD-5)、IL-6 和 TNF- $\alpha$ , 并降低人  $\beta$ -防御素 2 (hBD2) 的水平。该喷雾剂通过抑制病毒与血管紧张素转化酶 2 (ACE-2) 受体的结合并增强黏膜先天免疫来抑制感染。

Lai 等<sup>[20]</sup>通过建立三维定量构效关系模型, 预测了姜黄素及姜黄素衍生物对流感病毒的神经氨酸酶 (NA) 的抑制作用。结果表明, 姜黄素衍生物能直接影响 H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> 感染的肺上皮 (MDCK) 细胞中的病毒颗粒, 减少 H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> 诱导的 NA 活性, 下调核蛋白表达, 调节 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IFN- $\gamma$  的分泌。实验结果显示姜黄素对病毒复制的抑制作用最好, 其次是去甲基姜黄素、四甲基姜黄素、双脱甲氧基姜黄素, 二氢姜黄素抑制作用较弱。而四甲基姜黄素和双脱甲氧基姜黄素对 NA 的抑制作用最强, 其次是姜黄素、二氢姜黄素和脱甲基姜黄素。

Richart 等<sup>[21]</sup>比较了姜黄素及其结构类似物单乙酰姜黄素 (MAC) 对 IAV 的抗病毒活性, 结果显示 MAC 的抑制效果与姜黄素相似, 甚至优于姜黄素。两种化合物都轻微降低病毒 NA 的活性, 而 MAC 还能有效抑制 Akt 磷酸化, 表现出明显的抗病毒作用。当 MAC 与姜黄素联合治疗使用时, 对 IAV 的抑制作用显著增强, 表明两者联合使用可协同抑制抗 IAV 感染的效果。

Dai 等<sup>[22]</sup>通过小鼠模型发现, 姜黄素能够抑制 IAV 诱导的氧化应激, 增加核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)、血红素氧合酶 1 (HO-1)、醌氧化还

原酶 1 (NQO1)、谷胱甘肽 S 转移酶 A3 (GSTA3) 和干扰素  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) 的产生, 并抑制 IAV 诱导的 TLR2/4/7、Akt、p38/JNK MAPK 和 NF- $\kappa$ B 信号通路。姜黄素显著提高了小鼠的存活率, 降低了肺指数、炎性细胞因子和肺 IAV 滴度, 最终改善了 IAV 感染后的肺部组织的病理学表现。Xu 等<sup>[23]</sup>发现, IAV 感染激活了巨噬细胞中的核因子 (NF)- $\kappa$ B, 显著增加了促炎细胞因子的产生。姜黄素通过促进 I $\kappa$ B $\alpha$  中  $\kappa$  轻多肽基因增强子的表达, 并抑制 NF- $\kappa$ B p65 从细胞质向细胞核的易位, 抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路。姜黄素以剂量依赖性方式下调促炎细胞因子的产生, 减轻了流感病毒感染引起的巨噬细胞活化和肺部炎症。

### 3.5 对 ZIKV 的作用

ZIKV 属黄病毒科, 是一种单股正链 RNA 病毒, 具有母婴传播、性传播和蚊媒传播能力。自 2007 年以来, 它成为全球关注的健康问题, 主要通过母体传播, 导致胎儿小头畸形和神经元缺陷, 并可引发成人神经系统并发症。目前尚无预防或治疗该病毒感染的疫苗或药物<sup>[24]</sup>。

Pacho 等<sup>[25]</sup>将姜黄素封装在聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒中, 制成聚乳酸-羟基乙酸-姜黄素 (PLGA-CUR), 并在 Vero 细胞中测定了其抗 ZIKV 的活性。结果显示, PLGA-CUR 制剂比游离姜黄素更有效地抑制 Vero 细胞的 ZIKV 感染, 证明了 PLGA 纳米粒载姜黄素的抗病毒活性。

Obłozza 等<sup>[26]</sup>把姜黄素和 4-乙烯基苯磺酸钠制成水溶性姜黄素聚合物, 并研究其抗 ZIKV 活性。研究表明, 该聚合物具有优异的稳定性和生物利用度, 能够直接与 ZIKV 颗粒相互作用, 阻止其附着在宿主细胞上, 从而阻碍感染过程。Kim 等<sup>[27]</sup>整合了来自公开数据库的计算机信息, 确定了姜黄素对 ZIKV 的分子靶点, 并通过蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 进一步检查了姜黄素和 ZIKV 的共同靶点, 发现 TP53、AKT1、PTEN 和 TNF 基因是姜黄素抗 ZIKV 的主要靶点。进一步的体外实验发现, 姜黄素在 12.5 ~ 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的浓度下表现出显著的阻断 ZIKV 附着作用, 表明姜黄素在病毒感染早期, 特别是在病毒附着阶段具有抗病毒活性。

### 3.6 对柯萨奇病毒 B3 (CVB3) 的作用

急性肝衰竭是 CVB3 感染的一种危及生命的并发症, 可能进一步恶化为弥散性血管内凝血病。急性肝衰竭引起肝酶、炎性细胞因子和趋化因子显著升高, 导致局部和全身炎症加剧。Lin 等<sup>[28]</sup>研究了姜黄素对 CVB3 诱导的肝炎的抗病毒和抗炎作用。体外研究表明, 姜黄素降低了病毒蛋白

和滴度水平,增加了肝细胞活力,提升了感染细胞中 HO-1 蛋白水平,并降低了裂解的 caspase-3 蛋白和编码 CXC 趋化因子 10 基因的 mRNA 的水平。体内研究表明,姜黄素能够提高小鼠的存活率和临床评分,降低 CVB3 感染期间肝脏中的病毒滴度及 IFN- $\gamma$  和其诱导的单核因子的水平,血清中 IL-8 的水平也显著降低。这些结果表明姜黄素在体外和体内均具有抗 CVB3 感染的作用。

### 3.7 对日本脑炎病毒 (JEV) 的作用

JEV 是东南亚和澳大利亚病毒性脑炎的主要病因,每年导致约 68 000 例脑炎患者和 13 600 ~ 20 400 例死亡病例。目前还没有针对 JEV 感染的特异性抗病毒药物。Maurya 等<sup>[29]</sup>通过分子对接、细胞病变效应 (CPE) 抑制测定、蛋白免疫印迹和间接免疫荧光测定等研究了姜黄素的抗病毒活性。结果显示,JEV 的 NS5 蛋白是姜黄素的主要靶标。体外实验结果表明,姜黄素通过降低 JEV 诱导的 CPE [ $IC_{50} = (5.90 \pm 0.44) \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ ] 以及减少 NS5 蛋白、IL-6、AKT1、TNF- $\alpha$  和 PTGS2 的表达,表现出对 JEV 的抑制作用。Chen 等<sup>[30]</sup>通过温和的热解诱导聚合和碳化,合成了姜黄素碳量子点 (Cur-CQDs),使其具有更高的水溶性和更低的细胞毒性,并研究了其对 JEV 的抗病毒活性。结果发现,Cur-CQDs 可有效地与 JEV 的 E 蛋白结合,阻止病毒进入宿主细胞,展现出良好的抗 JEV 活性。

### 3.8 对人类免疫缺陷病毒 (HIV) 的作用

尽管联合抗反转录病毒疗法取得了显著成效,但 HIV 变异迅速使得开发特定疫苗和治疗药物极为困难。因此,获得性免疫缺陷综合征仍然是全球公共卫生问题之一。研究发现,姜黄素通过抑制 HIV 蛋白酶和整合酶,抑制 *HIV1-LTR* 基因、炎症因子 [如白细胞介素、TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B、环氧合酶-2 (COX-2)] 以及相关的各种激酶 (如酪氨酸激酶、PAK1、MAPK、PKC、CDK 等) 的 Tat 反式激活,展现出良好的抗 HIV 活性。姜黄素还可增强常规治疗药物的疗效,并降低其不良反应<sup>[31-32]</sup>。

Feng 等<sup>[33]</sup>评估了姜黄素在体外对 HIV 的抑制作用,并探讨了其治疗机制。研究发现,姜黄素在体外的抗 HIV 活性优于齐多夫定,当姜黄素浓度为  $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,能够抑制 50% 的 p24 抗原 ( $257.3 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。细胞实验表明,姜黄素通过诱导转录因子 FOXP3 下调趋化因子 CCR5 表达,从而抑制 HIV-1 感染。Godse 等<sup>[34]</sup>使用小鼠模型研究了姜黄素对抗反转录病毒药物艾维格韦 (EVG) 血脑屏障穿透率以及 HIV 引起的

神经系统损害所导致的氧化应激和炎症反应的影响,发现 EVG 治疗中添加姜黄素 ( $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 可导致模型小鼠促炎细胞因子 (IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-18) 和趋化因子 (RANTES、MCP-1) 显著减少,增加大脑中 EVG 浓度并抑制 HIV 病毒复制。为克服姜黄素水溶性差、生物利用度低的缺点,Ebrahimi 等<sup>[35]</sup>将姜黄素和柠檬酸-聚乙二醇制成姜黄素-树枝状大分子缀合物,并研究了该缀合物的抗 HIV 活性。发现合成的姜黄素-树枝状大分子缀合物具有极高的水溶性,与姜黄素相比,其对细胞的渗透性增加了 20% ~ 80%。姜黄素在  $12 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $60 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$  下的 HIV 增殖抑制率分别为 50% 和 90%,在远低于细胞半数中毒浓度 ( $CC_{50}$ ) ( $300 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 下表现出对 HIV-1 显著的抑制作用。

### 3.9 对肠道病毒 71 型 (EV71) 的作用

EV71 是一种正义单链 RNA 病毒,属于小核糖核酸病毒科。EV71 感染可导致从手足口病到无菌性脑膜炎、共济失调和急性横贯性脊髓炎等神经病理状况的多种疾病。

Huang 等<sup>[36]</sup>研究了姜黄素对肠道病毒的抗病毒活性,证明姜黄素可抑制病毒翻译并增加宿主细胞活力,在肠上皮细胞中具有抗 EV71 活性。其抗病毒活性与病毒结合、吸附或病毒 IRES 活性的改变无关,主要通过减少肠上皮细胞中特定酪氨酸残基的磷酸化,发挥蛋白激酶 C $\delta$  (PKC $\delta$ ) 抑制剂的作用,抑制 EV71 的复制。Qin 等<sup>[37]</sup>研究发现,在感染了 EV71 的 Vero 细胞中,姜黄素减少了病毒感染诱导的 ROS 的产生,降低蛋白酶体的活性,增加 p53 和 p21 蛋白的积累,减少了 GBF1 和 PI4KB 的表达。姜黄素在病毒感染的早期表现出抗凋亡活性,显著抑制病毒 RNA 的合成、病毒蛋白的表达和病毒复制。Wang 等<sup>[38]</sup>研究了姜黄素与 IFN- $\alpha$  在人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞中对 EV71 的协同抑制作用。结果表明,姜黄素仅轻微抑制 EV71 增殖,不影响病毒附着和内化。然而,姜黄素可恢复 IFN- $\alpha$  介导的 IRES 活性,与 IFN- $\alpha$  合用显著抑制了 EV71 复制。此外,姜黄素通过抑制 SH-SY5Y 细胞中泛素-蛋白酶体系统引起的 IFNAR1 减少,增强了 IFN- $\alpha$  的抗 EV71 活性。明是非等<sup>[39]</sup>通过腹腔注射 EV71BJ 毒株建立了重症手足口病大鼠模型,研究了姜黄素对重症手足口病模型大鼠的作用。结果显示,姜黄素可显著升高 EV71BJ 毒株感染大鼠的体重,降低其肌肉组织病毒载量以及血浆 D-二聚体、神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 和神经肽 Y (NPY) 水平,表明姜黄素对重症手足口病大鼠有治疗效果。



## 4 姜黄素及其相关化合物对 DNA 病毒的作用

### 4.1 对乙型肝炎病毒 (HBV) 的作用

根除 HBV 引发的慢性乙型肝炎 (CHB) 是临床实践的重要目标, 而增强 I 型干扰素 (IFN-I) 的抗 HBV 活性是实现 CHB 功能性治愈的关键策略<sup>[40]</sup>。Wei 等<sup>[41]</sup>研究了 IFN- $\alpha$  和去甲氧基姜黄素联合治疗对 HepG2 细胞中 HBV 复制的影响, 并探讨了其潜在机制。研究发现, HBV 诱导了 I 型干扰素受体 1 (IFNAR1) 蛋白的下调, 单独使用 IFN- $\alpha$  无法完全抑制 HBV 复制。然而, 加入低剂量的去甲氧基姜黄素可与 IFN- $\alpha$  产生显著的协同作用, 通过提高  $\alpha$ B- 晶状体蛋白 (CRYAB) 的水平, 协调 CRYAB 与 E3 泛素连接酶配体蛋白  $\beta$ -Trcp 之间的相互作用, 阻止泛素化介导的 IFNAR1 降解, 从而增强 IFN- $\alpha$  抗 HBV 活性。

Subramanian 等<sup>[42]</sup>首次探讨了姜黄素分子的吡啶类似物在体外对抗 HBV 阳性肝细胞癌 (HCC) 细胞的作用, 发现吡啶姜黄素可诱导细胞凋亡, 对 Hep3B 细胞具有抗增殖作用。吡啶姜黄素可与 PI3K 发生相互作用, 导致基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 表达下调, 使 MMP-9 活性总体降低, 以时间和剂量依赖性方式抑制细胞迁移。Teng 等<sup>[43]</sup>通过使用 HBx 和 *pre-S2* 突变的转基因小鼠模型, 评估了姜黄素对 HBV 相关 HCC 的化学预防作用。结果表明, 姜黄素显著抑制了转基因模型小鼠 HCC 的形成, 减少了脂质积累和白细胞浸润, 降低了总肿瘤体积, 并改善了肝脏组织病理学。此外, 姜黄素可明显抑制过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) 的活化以及 NF- $\kappa$ B 释放, 减轻机体炎症反应。Hesari 等<sup>[44]</sup>研究表明, 姜黄素可以激活 PPAR- $\gamma$ , 抑制细胞外调节蛋白激酶 (ERK), 增加细胞谷胱甘肽 (GSH) 含量, 抑制 Toll 样受体 4 基因的表达, 进而下调肝星状细胞 NF- $\kappa$ B。姜黄素通过调节过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  辅激活子 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) 的水平, 抑制 HBV 的基因的表达。季楠等<sup>[45]</sup>通过大鼠乙型肝炎病毒性肝炎模型研究发现, 姜黄素能抑制肝脏组织中 HBV-DNA、TGF- $\beta$ 、Smad2、p-Smad2、Smad3 和 p-Smad3 的表达, 促进 PPAR- $\gamma$ 、c-Ski 的表达, 从而改善乙型肝炎病毒性肝炎模型大鼠肝组织损伤, 降低肝功能损伤的相关指标和炎症因子的水平, 表现出显著的抗纤维化的作用。

### 4.2 对人巨细胞病毒 (HCMV) 的作用

HCMV 是一种广泛存在的  $\beta$ - 疱疹病毒。在免疫功能正常的个体中, 原发性 HCMV 感染和随后的再激活通常不会产生症状, 并能够被免疫系统有效控制。然而, 在免疫功能不成熟的新生

儿或胎儿中, HCMV 是引起先天性感染的主要病毒, 可导致死产或多种神经后遗症<sup>[46]</sup>。

丁香等<sup>[47]</sup>用细胞实验研究了姜黄素对 HCMV 的作用, 发现 HCMV 感染细胞 5 d 后, 细胞出现明显的 CPE, 斑块数量随时间增加。而姜黄素预处理组以剂量依赖性方式减少了 CPE, 显著抑制了 HCMV DNA 拷贝数, 并下调 HCMV 蛋白表达水平。结果提示姜黄素可能通过抑制 HCMV DNA 的复制, 下调 HCMV 不同序列蛋白的表达水平发挥抗 HCMV 活性作用。贾阳杰等<sup>[48]</sup>通过细胞实验研究了姜黄素对 HCMV 感染细胞后细胞凋亡的影响, 发现姜黄素能够对抗 HCMV 感染引起的细胞凋亡作用, 可使 HCMV 感染早期诱导的抗凋亡作用和 HCMV 感染晚期诱导的促凋亡作用减弱。Lv 等<sup>[49]</sup>研究了姜黄素对 HCMV 感染 Balb/c 模型小鼠的保护作用。结果显示, 姜黄素治疗降低了小鼠 HCMV IgM 水平和 HCMV DNA 载量, 减少了血清中的谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT)、肌酸激酶 (CK) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 水平, 同时减少了 TNF- $\alpha$  和 IL-6 生成。同时, 姜黄素还抑制了丙二醛 (MDA) 含量, 并上调了超氧化物歧化酶 (SOD) 和 GSH 水平, 表明姜黄素可能通过其抗炎和抗氧化作用保护 BALB/c 小鼠免受 HCMV 感染。同时姜黄素还可以降低 HCMV 早期抗原 (IEA) 和 UL83A 表达以及 IL-6 和 TNF- $\alpha$  分泌, 并使 HCMV 感染的细胞增殖恢复到正常水平<sup>[50]</sup>。该课题组还研究了姜黄素在体内和体外对感染 HCMV 时的抗动脉粥样硬化 (AS) 活性及作用机制。结果表明, 姜黄素抑制 HCMV 复制和增殖, 减少细胞内 ROS 过度产生, 减少炎症细胞因子的释放, 下调 HMGB1-TLRs-NF- $\kappa$ B 信号传导的水平, 并降低血清低密度胆固醇 (LDL-C)、总胆固醇 (TC) 和三酰甘油 (TG) 水平, 显著减少主动脉中动脉粥样硬化斑块的形成, 减少肝脏中的脂质沉积和心脏、肺和肾脏的炎症损伤<sup>[51]</sup>。

### 4.3 对单纯疱疹病毒 (HSV) 的作用

HSV 是一种大型 DNA 病毒, 拥有 152 kb 的线性双链基因组。HSV-1 通常引起儿童口腔病变, 而 HSV-2 与生殖器病变有关。HSV 通过其衣壳与宿主细胞融合进入细胞后, 进行潜伏和裂解复制<sup>[52]</sup>。Flores 等<sup>[53]</sup>在 Vero 细胞中研究了姜黄素对 HSV-1 和 HSV-2 的作用。分析姜黄素的最大无细胞毒性浓度后, 用 30  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  姜黄素处理 HSV-1 和 HSV-2 感染的 Vero 细胞, 发现姜黄素干扰了病毒对宿主细胞的吸附, 从而抑制了 HSV-1 和 HSV-2 的组装, 降低了病毒的感染能力。Šudomová 等<sup>[54]</sup>研究发现, 姜黄素可破坏 HSV-1 和 HSV-2 转录激活蛋白 VP16



介导的 RNA 聚合酶 II 向 *IE* 基因启动子移动, 抑制转录因子 NF- $\kappa$ B 中组蛋白乙酰转移酶 p300/CBP 的活性, 从而阻碍病毒的复制和基因表达。

#### 4.4 对 EB 病毒 (EBV) 的作用

EBV 是人类  $\gamma$  疱疹病毒家族的成员, 是一种双链 DNA 病毒, 95% 以上的成人可能携带。它是传染性单核细胞增多症的病原体, 并与鼻咽癌、儿童淋巴瘤的发生有密切关系, 被列为可能致癌的人类肿瘤病毒之一<sup>[55]</sup>。

研究发现, 在 EBV 阳性鼻咽癌 (NPC) 细胞中, 姜黄素能够抑制其增殖, 促进细胞凋亡, 诱导细胞周期阻滞, 从而抑制肿瘤的发生和发展<sup>[56]</sup>。Liu 等<sup>[57]</sup>研究了姜黄素对 EBV 阳性 NPC 细胞增殖、周期阻滞和凋亡的影响。结果显示, 姜黄素有效地降低了 EBV 阳性 NPC 细胞的活力, 诱导 HONE1 和 HK1-EBV 细胞周期停滞。此外, 姜黄素通过线粒体和死亡受体介导的途径促进 NPC 细胞凋亡, 降低了 HONE1 和 HK1-EBV 细胞中 EBNA1 的表达, 并通过泛素-蛋白酶体途径诱导 EBNA1 降解。在 HONE1 和 HK1-EBV 细胞中, 姜黄素可抑制 EBV 潜伏和裂解复制, 在体外对 NPC 发挥抗肿瘤作用。Cheragh 等<sup>[58]</sup>研究了树突状体纳米姜黄素 (DNC) 对淋巴母细胞样细胞系 (LCL) 细胞转化和 EBV 裂解周期的潜在作用。发现树突状体纳米姜黄素呈剂量依赖性方式抑制 LCL 的增殖, 与对照相比,  $30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 DNC 显著抑制 LCL 中的细胞转化, 并显著降低病毒裂解基因 (如

*BZLF1*、*Zta*、*BHRF1* 和 *BRLF1*) 的表达。结果表明, DNC 降低了病毒裂解周期基因的表达, 并诱导细胞凋亡, 最终阻止了 LCL 的产生。

#### 5 结语

天然产物在新药研发中一直发挥着重要作用, 是大量先导化合物的主要来源。随着 COVID-19 等病毒性疾 病全球蔓延及现有抗病毒药物的耐药性产生, 寻求有效的治疗药物及方法已成为全球医疗保健领域的首要关注点。

姜黄素被称为“高效天然化合物”, 具有广泛的化学活性及药理作用, 姜黄素及其相关化合物化学结构和研究方案见图 1 和表 1。现越来越多的研究证明其有显著的抗病毒活性且无毒或毒性极低, 但是姜黄素的肠-肝代谢不明显, 稳定性低, 快速的全身清除以及疏水性和低溶解度等, 导致其生物利用度极低, 限制了其在临床上的应用。为了克服这些缺点, 研究者开发了几种具有增强功效的纳米颗粒化合物, 通过纳米颗粒 (如脂质体或胶束) 和基质制剂 (如水凝胶和纳米乳液) 提高了姜黄素的吸收率和 / 或生物利用度。尽管大量研究已揭示了姜黄素抗病毒的多种分子和细胞机制, 但其中一些机制尚不明确, 这限制了其临床应用, 仍需进一步的体内和临床研究。随着姜黄素研究的不断深入, 有理由相信, 其在抗病毒领域及抗病毒新药研发中必将有着广阔的应用前景, 同时也体现出中医药在现代医疗体系中的重要作用。

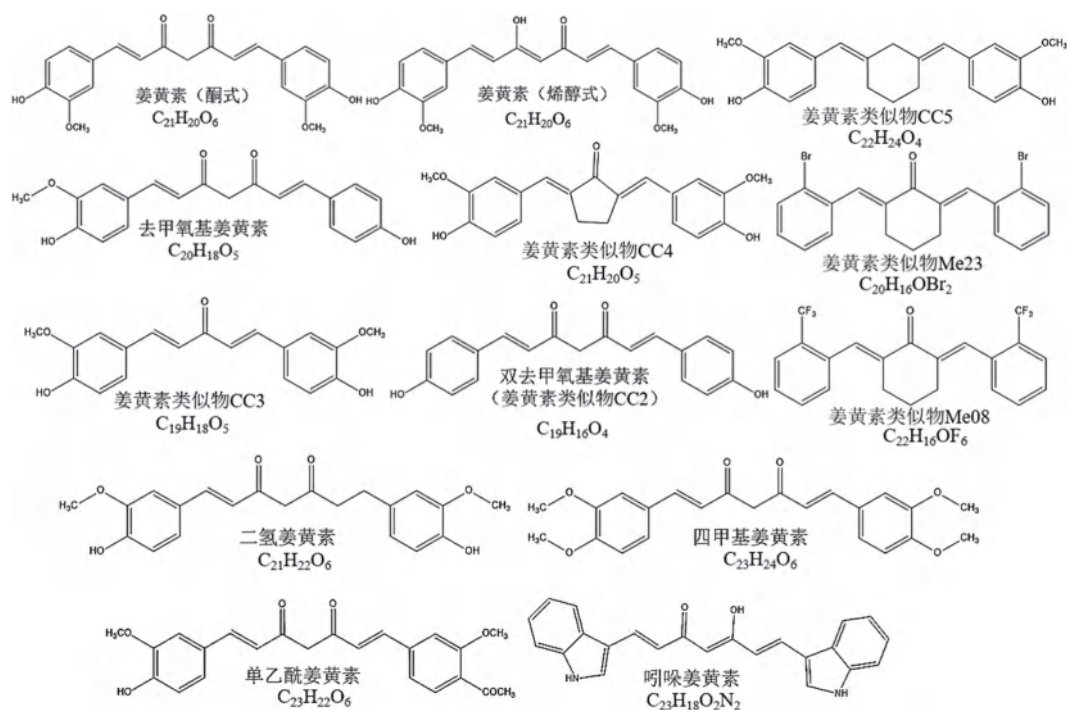


图 1 姜黄素及其类似物的化学结构

Fig 1 Chemical structure of curcumin and curcuminoids

表 1 姜黄素及其相关化合物对 RNA/DNA 病毒的抗病毒活性研究  
Tab 1 Antiviral activity of curcumin and its related compounds against RNA/DNA viruses

| 化合物        | 浓度 / 剂量                                                          | 病毒         | 方法                     | 作用机制                                        | 参考文献 |
|------------|------------------------------------------------------------------|------------|------------------------|---------------------------------------------|------|
| 姜黄素        | 感染前 2000 mg · kg <sup>-1</sup><br>感染后 1000 mg · kg <sup>-1</sup> | CHIKV      | 小鼠模型                   | 减少蛋白多糖损失和软骨侵蚀                               | [9]  |
| 姜黄素        | 5 μmol · L <sup>-1</sup>                                         | CHIKV      | 细胞培养                   | 干扰病毒包膜与宿主细胞结合                               | [10] |
| 姜黄素类似物     | 5 μmol · L <sup>-1</sup>                                         | DENV       | 蚀斑实验、RT-qPCR           | 阻止病毒进入细胞并复制                                 | [13] |
| 姜黄素        | ND (未提及)                                                         | DENV       | 核磁共振和分子对接技术            | 影响 NS2B-NS3 蛋白酶的活性                          | [14] |
| 姜黄素        | ND (未提及)                                                         | SARS-CoV-2 | GSEA 富集分析、KEGG 富集分析    | 减轻线粒体膜电位损伤                                  | [15] |
| 姜黄素        | 360 mg, 2 次 · d <sup>-1</sup>                                    | SARS-CoV-2 | 临床双盲试验                 | 抑制轻度症状患者病情进展                                | [16] |
| 姜黄素及姜黄素类似物 | 14 ~ 90 μg · mL <sup>-1</sup>                                    | SARS-CoV-2 | 细胞培养                   | 抗炎和抗氧化                                      | [17] |
| 姜黄素        | 6.3 ~ 12.5 μg · mL <sup>-1</sup>                                 | IAV        | 细胞培养、空斑减数试验            | 抑制病毒与 ACE-2 受体的结合并增强黏膜先天免疫                  | [19] |
| 姜黄素及姜黄素衍生物 | 25 ~ 100 mg · kg <sup>-1</sup>                                   | IAV        | 小鼠模型、三维定量构效关系模型        | 抑制 NA 活性、增强免疫功能                             | [20] |
| 姜黄素及单乙酰姜黄素 | 30 μmol · L <sup>-1</sup>                                        | IAV        | 细胞培养、空斑减数试验            | 抑制 Akt 磷酸化, 降低病毒在细胞中的复制                     | [21] |
| 姜黄素        | 25 μg · mL <sup>-1</sup>                                         | IAV        | 小鼠模型、细胞培养              | 抑制 IAV 诱导的氧化应激                              | [22] |
| 姜黄素        | 10 ~ 80 μmol · L <sup>-1</sup>                                   | IAV        | 细胞培养                   | 减少促炎因子产生                                    | [23] |
| 姜黄素纳米粒     | 10 μmol · L <sup>-1</sup>                                        | ZIKV       | 细胞培养、产量减少试验            | 直接抑制 ZIKV 感染                                | [25] |
| 姜黄素聚合物     | 100 μmol · L <sup>-1</sup>                                       | ZIKV       | 细胞培养、RT-qPCR           | 阻止病毒附着                                      | [26] |
| 姜黄素        | 12.5 ~ 50 μmol · L <sup>-1</sup>                                 | ZIKV       | 细胞培养、空斑减数试验            | 阻断 ZIKV 附着                                  | [27] |
| 姜黄素        | 50 mg · kg <sup>-1</sup>                                         | CVB3       | 小鼠模型、蛋白免疫印迹            | 免疫调节                                        | [28] |
| 姜黄素        | 5.9 μmol · L <sup>-1</sup>                                       | JEV        | CPE 抑制实验、蛋白免疫印迹、间接免疫荧光 | 减少 NS5 蛋白表达                                 | [29] |
| 姜黄素碳量子点    | 10 μg · mL <sup>-1</sup>                                         | JEV        | 细胞培养、空斑减数试验            | 阻止病毒进入宿主细胞                                  | [30] |
| 姜黄素        | 0 ~ 40 μmol · L <sup>-1</sup>                                    | HIV        | 细胞培养、RT-qPCR           | 下调趋化因子 CCR5 表达                              | [33] |
| 姜黄素        | 20 mg · kg <sup>-1</sup>                                         | HIV        | 细胞培养、酶联免疫吸附测定          | 增加颅内艾维格韦药物浓度                                | [34] |
| 姜黄素缀合物     | 12 ~ 60 μmol · L <sup>-1</sup>                                   | HIV        | 细胞培养、流式细胞术             | 抑制 HIV 病毒复制                                 | [35] |
| 姜黄素        | 10 μmol · L <sup>-1</sup>                                        | EV71       | 细胞培养、RT-qPCR           | 减少肠上皮细胞中酪氨酸残基的磷酸化                           | [36] |
| 姜黄素        | 40 μmol · L <sup>-1</sup>                                        | EV71       | 细胞培养、RT-qPCR           | 降低蛋白酶体的活性, 减少 GBF1 和 PI4KB 的表达              | [37] |
| 姜黄素        | 5 ~ 20 μmol · L <sup>-1</sup>                                    | EV71       | 细胞培养、蛋白免疫印迹            | 恢复 IFN-α 介导的 ISRE 活性                        | [38] |
| 姜黄素        | 5 ~ 10 mg · kg <sup>-1</sup>                                     | EV71       | 大鼠模型                   | 降低肌肉组织病毒载量及血浆 D-二聚体、NSE、NPY 水平              | [39] |
| 去甲氧基姜黄素    | 5 μmol · L <sup>-1</sup>                                         | HBV        | 酶联免疫吸附测定、RT-qPCR       | 增强 IFN-α 抗 HBV 活性                           | [41] |
| 吡啶姜黄素      | 20 μmol · L <sup>-1</sup>                                        | HBV        | 细胞培养、蛋白免疫印迹            | 诱导细胞凋亡, 抑制细胞迁移                              | [42] |
| 姜黄素        | 150 mg · kg <sup>-1</sup>                                        | HBV        | 小鼠模型                   | 抑制 PPAR-γ 的活化以及 NF-κB 释放                    | [43] |
| 姜黄素        | 20 mg · kg <sup>-1</sup>                                         | HBV        | 大鼠模型、QF-PCR            | 上调 PPAR-γ、c-Ski 的表达, 抑制 TGF-β/Smads 信号通路的活化 | [45] |
| 姜黄素        | 5 ~ 20 μmol · L <sup>-1</sup>                                    | HCMV       | 蚀斑实验、蛋白免疫印迹            | 抑制病毒的复制和下调不同时期蛋白的表达水平                       | [47] |
| 姜黄素        | 0.2 ~ 0.8 μg · mL <sup>-1</sup>                                  | HCMV       | 细胞培养、流式细胞术             | 减弱感染早期诱导的抗凋亡作用和感染晚期诱导的促凋亡作用                 | [48] |
| 姜黄素        | 12.5 ~ 50 mg · kg <sup>-1</sup>                                  | HCMV       | 小鼠模型、QF-PCR            | 抗炎和抗氧化                                      | [49] |
| 姜黄素        | 0.5 ~ 2 μmol · L <sup>-1</sup>                                   | HCMV       | 酶联免疫吸附测定、PCR           | 减少炎性细胞因子释放, 降低血清 LDL-C、TC 和 TG 水平           | [51] |
| 姜黄素        | 0 ~ 100 μmol · L <sup>-1</sup>                                   | HSV        | 细胞培养                   | 干扰病毒对宿主细胞的吸附                                | [53] |
| 姜黄素        | 5 ~ 10 μmol · L <sup>-1</sup>                                    | EBV        | QF-PCR、流式细胞术           | 抑制 EBV 潜伏和裂解复制, 降低 EBNA1 表达                 | [57] |
| 纳米姜黄素      | 30 μg · mL <sup>-1</sup>                                         | EBV        | QF-PCR、流式细胞术           | 诱导细胞凋亡                                      | [58] |

参考文献

[1] Neumann EN, Bertozzi TM, Wu E, et al. Brainwide silencing of prion protein by AAV-mediated delivery of an engineered compact epigenetic editor [J]. Science, 2024, 384 (6703): ado7082.

[2] Gautieri A, Beeg M, Gobbi M, et al. The Anti-amyloidogenic action of doxycycline: a molecular dynamics study on the interaction with Aβ42 [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20 (18): 4641.

- [3] Doytchinova I, Atanasova M, Salamanova E, et al. Curcumin inhibits the primary nucleation of amyloid-beta peptide: a molecular dynamics study [J]. *Biomolecules*, 2020, 10 (9): 1323.
- [4] 杨文静, 赵晓燕, 刘淑娇, 等. 姜黄素通过调节 AKT/CREB/BDNF 通路缓解朊病毒感染的神经细胞损伤 [J]. *病毒学报*, 2023, 39 (5): 1243-1252.
- [5] Riemer C, Burwinkel M, Schwarz A, et al. Evaluation of drugs for treatment of prion infections of the central nervous system [J]. *J Gen Virol*, 2008, 89 (Pt 2): 594-597.
- [6] Caughey B, Raymond LD, Raymond GJ, et al. Inhibition of protease-resistant prion protein accumulation in vitro by curcumin [J]. *J Virol*, 2003, 77 (9): 5499-5502.
- [7] Freppel W, Silva LA, Stapleford KA, et al. Pathogenicity and virulence of chikungunya virus [J]. *Virulence*, 2024, 15 (1): 2396484.
- [8] Kovacicova K, van Hemert MJ. Small-molecule inhibitors of chikungunya virus: mechanisms of action and antiviral drug resistance [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2020, 64 (12): e01788-01808.
- [9] Sengupta S, Tripathi A. Evaluation of analgesic and prophylactic activity of curcumin against chikungunya-infected acute/chronic arthralgic mice [J]. *J Med Virol*, 2023, 95 (3): e28661.
- [10] Mounce BC, Cesaro T, Carrau L, et al. Curcumin inhibits Zika and chikungunya virus infection by inhibiting cell binding [J]. *Antiviral Res*, 2017, 142: 148-157.
- [11] Liu YM, Wang MM, Yu N, et al. Trends and insights in dengue virus research globally: a bibliometric analysis (1995—2023) [J]. *J Transl Med*, 2024, 22 (1): 818.
- [12] Chauhan N, Gaur KK, Asuru TR, et al. Dengue virus: pathogenesis and potential for small molecule inhibitors [J]. *Biosci Rep*, 2024, 44 (8): BSR20240134.
- [13] Balasubramanian A, Pilankatta R, Teramoto T, et al. Inhibition of dengue virus by curcuminoids [J]. *Antiviral Res*, 2019, 162: 71-78.
- [14] Lim L, Dang M, Roy A, et al. Curcumin allosterically inhibits the dengue NS2B-NS3 protease by disrupting its active conformation [J]. *ACS Omega*, 2020, 5 (40): 25677-25686.
- [15] Zhang LH, Li YH, Hu WT, et al. Computational identification of mitochondrial dysfunction biomarkers in severe SARS-CoV-2 infection: facilitating therapeutic applications of phytomedicine [J]. *Phytomedicine*, 2024, 131: 155784.
- [16] Kishimoto A, Komiyama M, Wada H, et al. Efficacy of highly bioavailable oral curcumin in asymptomatic or mild COVID-19 patients: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial [J]. *J Health Popul Nutr*, 2024, 43 (1): 93.
- [17] Nicoliche T, Bartolomeo CS, Lemes R, et al. Antiviral, anti-inflammatory and antioxidant effects of curcumin and curcuminoids in SH-SY5Y cells infected by SARS-CoV-2 [J]. *Sci Rep*, 2024, 14 (1): 10696.
- [18] Uyeki TM, Hui DS, Zambon M, et al. Influenza [J]. *Lancet*, 2022, 400 (10353): 693-706.
- [19] Nittayananta W, Lerdsamran H, Chutiwitoonchai N, et al. A novel film spray containing curcumin inhibits SARS-CoV-2 and influenza virus infection and enhances mucosal immunity [J]. *Virol J*, 2024, 21 (1): 26.
- [20] Lai YN, Yan YW, Liao SH, et al. 3D-quantitative structure-activity relationship and antiviral effects of curcumin derivatives as potent inhibitors of influenza H1N1 neuraminidase [J]. *Arch Pharm Res*, 2020, 43 (5): 489-502.
- [21] Richart SM, Li YL, Mizushima Y, et al. Synergic effect of curcumin and its structural analogue (Monoacetylcurcumin) on anti-influenza virus infection [J]. *J Food Drug Anal*, 2018, 26 (3): 1015-1023.
- [22] Dai JP, Gu LM, Su Y, et al. Inhibition of curcumin on influenza A virus infection and influenzal pneumonia via oxidative stress, TLR2/4, p38/JNK MAPK and NF- $\kappa$ B pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 54: 177-187.
- [23] Xu YM, Liu L. Curcumin alleviates macrophage activation and lung inflammation induced by influenza virus infection through inhibiting the NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Influenza Other Respir Viruses*, 2017, 11 (5): 457-463.
- [24] Kim N, Choi H, Kim U, et al. Sustained microglial activation promotes synaptic loss and neuronal dysfunction after recovery from ZIKV infection [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25 (17): 9451.
- [25] Pachon MN, Pagni EN, Díaz Sierra JB, et al. Antiviral activity against Zika virus of a new formulation of curcumin in poly lactic-co-glycolic acid nanoparticles [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2021, 73 (3): 357-365.
- [26] Obłozá M, Milewska A, Botwina P, et al. Curcumin-poly (sodium 4-styrenesulfonate) conjugates as potent Zika virus entry inhibitors [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2024, 16 (5): 5426-5437.
- [27] Kim M, Choi H, Kim YB. Therapeutic targets and biological mechanisms of action of curcumin against Zika virus: in silico and in vitro analyses [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 904: 174144.
- [28] Lin YJ, Wang LC, Tsai HP, et al. Antiviral and immunoregulatory effects of curcumin on coxsackievirus B3-infected hepatitis [J]. *Virus Res*, 2023, 336: 199203.
- [29] Maurya VK, Kumar S, Ansari S, et al. Antiviral and anti-inflammatory activity of natural compounds against Japanese encephalitis virus via inhibition of NS5 protein and regulation of key immune and inflammatory signaling pathways [J]. *J Med Virol*, 2023, 95 (3): e28675.
- [30] Chen HH, Lin CJ, Anand A, et al. Development of antiviral carbon quantum dots that target the Japanese encephalitis virus envelope protein [J]. *J Biol Chem*, 2022, 298 (6): 101957.
- [31] Prasad S, Tyagi AK. Curcumin and its analogues: a potential natural compound against HIV infection and AIDS [J]. *Food Funct*, 2015, 6 (11): 3412-3419.
- [32] Ali A, Banerjee AC. Curcumin inhibits HIV-1 by promoting Tat protein degradation [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 27539.
- [33] Feng L, Lu WH, Li QY, et al. Curcuma longa induces the transcription factor FOXP3 to downregulate human chemokine CCR5 expression and inhibit HIV-1 infection [J]. *Am J Chin*



- Med, 2023, 51 (5): 1189-1209.
- [34] Godse S, Zhou L, Sinha N, et al. Curcumin enhances elvitegravir concentration and alleviates oxidative stress and inflammatory response [J]. *Sci Rep*, 2023, 13 (1): 19864.
- [35] Ebrahimi S, Sadeghizadeh M, Aghasadeghi MR, et al. Inhibition of HIV-1 infection with curcumin conjugated PEG-citrate dendrimer: a new nano formulation [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2024, 24 (1): 350.
- [36] Huang HI, Chio CC, Lin JY. Inhibition of EV71 by curcumin in intestinal epithelial cells [J]. *PLoS One*, 2018, 13 (1): e0191617.
- [37] Qin Y, Lin LX, Chen Y, et al. Curcumin inhibits the replication of enterovirus 71 in vitro [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2014, 4 (4): 284-294.
- [38] Wang YF, Dan KN, Xue XL, et al. Curcumin assists anti-EV71 activity of IFN- $\alpha$  by inhibiting IFNAR1 reduction in SH-SY5Y cells [J]. *Gut Pathog*, 2022, 14 (1): 8.
- [39] 明是非, 康秉南, 程建敏. 姜黄素对重症手足口病模型大鼠的作用研究 [J]. *中医学报*, 2022, 37 (292): 1928-1933.
- [40] Wang YP, Guo LL, Shi JG, et al. Interferon stimulated immune profile changes in a humanized mouse model of HBV infection [J]. *Nat Commun*, 2023, 14 (1): 7393.
- [41] Wei JL, Deng XH, Dai WY, et al. Desmethoxycurcumin aids IFN $\alpha$ 's anti-HBV activity by antagonising CRYAB reduction and stabilising IFNAR1 protein [J]. *J Drug Target*, 2023, 31 (9): 976-985.
- [42] Subramanian S, Pajaniradje S, Tumdam R, et al. Indole curcumin combats metastatic HBV-positive hepatocellular carcinoma by inhibiting cell proliferation, migration, and matrix metalloproteinase-9 activity [J]. *J Cancer Res Ther*, 2023, 19 (2): 265-272.
- [43] Teng CF, Yu CH, Chang HY, et al. Chemopreventive effect of phytosomal curcumin on hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma in a transgenic mouse model [J]. *Sci Rep*, 2019, 9 (1): 10338.
- [44] Hesari A, Ghasemi F, Salarinia R, et al. Effects of curcumin on NF- $\kappa$ B, AP-1, and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in hepatitis B virus infection [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119 (10): 7898-7904.
- [45] 季楠, 马娟, 陈克研, 等. 姜黄素通过上调 PPAR $\gamma$ /c-Ski 信号通路在大鼠乙型肝炎病毒性肝炎模型中发挥保护作用 [J]. *解剖科学进展*, 2021, 27 (3): 358-361, 366.
- [46] Mihalić A, Železnjak J, Lisnić B, et al. Immune surveillance of cytomegalovirus in tissues [J]. *Cell Mol Immunol*, 2024, 21 (9): 959-981.
- [47] 丁香, 岳冀蓉, 董碧蓉, 等. 姜黄素抗人巨细胞病毒感染的体外实验研究 [J]. *生物医学工程学杂志*, 2022, 39 (6): 1158-1164.
- [48] 贾阳杰, 吕亚丽, 刘丽宏. 姜黄素对人巨细胞病毒感染人胚肺成纤维细胞后细胞凋亡的影响 [J]. *中国医药导报*, 2018, 15 (34): 4-22.
- [49] Lv YL, Lei N, Wang D, et al. Protective effect of curcumin against cytomegalovirus infection in Balb/c mice [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2014, 37 (3): 1140-1147.
- [50] Lv YL, An ZL, Chen H, et al. Mechanism of curcumin resistance to human cytomegalovirus in HELF cells [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14: 284.
- [51] Lv YL, Jia YJ, Wan ZR, et al. Curcumin inhibits the formation of atherosclerosis in ApoE $^{-/-}$  mice by suppressing cytomegalovirus activity in endothelial cells [J]. *Life Sci*, 2020, 257: 117658.
- [52] Sucharita S, Krishnagopal A, van Drunen Littel-van den Hurk S. Comprehensive analysis of the tegument proteins involved in capsid transport and virion morphogenesis of alpha, beta and gamma herpesviruses [J]. *Viruses*, 2023, 15 (10): 2058.
- [53] Flores DJ, Lee LH, Adams SD. Inhibition of curcumin treated herpes simplex virus 1 and 2 in vero cells [J]. *Adv Microbiol*, 2016, 6 (4): 276-287.
- [54] Šudomová M, Hassan S. Nutraceutical curcumin with promising protection against herpesvirus infections and their associated inflammation: mechanisms and pathways [J]. *Microorganisms*, 2021, 9 (2): 292.
- [55] Andrei G, Trompet E, Snoeck R. Novel therapeutics for epstein-barr virus [J]. *Molecules*, 2019, 24 (5): 997.
- [56] Unlu A, Nayir E, Dogukan KM, et al. Curcumin (Turmeric) and cancer [J]. *J Buon*, 2016, 21 (5): 1050-1060.
- [57] Liu LM, Yang JM, Ji WG, et al. Curcumin inhibits proliferation of epstein-barr virus-associated human nasopharyngeal carcinoma cells by inhibiting EBV nuclear antigen 1 expression [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 8592921.
- [58] Cheragh M, Sadeghizadeh M, Pouriayevali MH, et al. Dendrosomal nanocurcumin prevents EBV-associated cell transformation by targeting the lytic cycle genes of the Epstein-Barr virus in the generation of lymphoblastoid cell line [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2023, 26 (10): 1220-1226.

(收稿日期: 2024-10-13; 修回日期: 2024-11-27)

# 风轮菜化学成分和药理活性研究进展

陈小兵, 袁章林, 黄小琼, 黄丽芸, 郭森辉, 欧阳熙林\* (赣南卫生健康职业学院药学院, 江西 赣州 341000)

**摘要:** 风轮菜 [*Clinopodium chinense* (Benth.) O. Kuntze] 为唇形科风轮菜属一种多年生草本植物, 具有凉血止血之功效, 临床上主要用于止血。本文系统地总结了过去十年间, 风轮菜在化学成分和药理活性等方面的研究进展。从成分上看, 风轮菜含有萜类及其皂苷、黄酮、木质素、苯丙素等 91 种次生代谢物, 还有大量的挥发油。这些化合物或提取物展示出广泛的药理活性, 包括止血、抗心肌细胞损伤、保护心血管、抗炎镇痛、抗肿瘤等。因此, 风轮菜作为民间药物用于治疗多种疾病具有广泛的药效物质基础, 是药物开发的重要原料。风轮菜药材的质量评价主要以黄酮、皂苷作为检测评估指标。然而, 关于风轮菜中萜类与黄酮等活性成分的作用机制、毒性, 以及活性成分之间可能存在的协同作用仍有待确定。

**关键词:** 风轮菜; 止血活性; 植物化学; 质量控制; 毒性

中图分类号: R283

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)08-2375-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.034

## Progress in chemical compositions and pharmacological activity of *Clinopodium chinense*

CHEN Xiao-bing, YUAN Zhang-lin, HUANG Xiao-qiong, HUANG Li-yun, GUO Sen-hui, OUYANG Xi-lin\* (Department of Pharmacy, Gannan Health Vocational College, Ganzhou Jiangxi 341000)

**Abstract:** *Clinopodium chinense* (Benth.) O. Kuntze, a perennial herb of the genus *Clinopodium* in the Lamiaceae family, has therapeutic effects of cooling the blood and stopping bleeding. This paper summarizes the progress in the chemical composition and pharmacological activity of *Clinopodium chinense* over the past decade. *Clinopodium chinense* contains 91 secondary metabolites, including terpenoids and their saponins, flavonoids, lignans, phenylpropanoids, and essential oil. Crude extracts and compounds exhibit many pharmacological activities, including hemostasis, anti-myocardial cell injury and cardiovascular protection, anti-inflammatory and analgesic, and anti-tumor effects. Therefore, *Clinopodium chinense* is used as folk medicine for various diseases, has various biologically active pharmacodynamic material bases, and is an important raw material in drug development. Flavonoids and saponins are mainly used as detection and evaluation indices in the quality evaluation of *Clinopodium chinense*. However, the action mechanism, toxicity, and possible synergistic effects of terpenoids and flavonoids from *Clinopodium chinense* remain unclear.

**Key words:** *Clinopodium chinense*; hemostatic activity; phytochemistry; quality control; toxicity

风轮菜 [*Clinopodium chinense* (Benth.) O. Kuntze] 为唇形科多年生草本, 广泛分布于亚洲和欧洲, 在我国常见于山东、浙江、江苏、安徽、江西、福建、台湾、湖南、湖北、广东、广西及云南东北部。风轮

菜多生长于湿润肥沃的林缘、溪边或河谷草原, 茎基部匍匐生根, 上部上升, 多分枝, 高可达 1 m, 四菱形, 具细条纹, 花期在 4~5 月, 果期在 5~6 月。小坚果深褐色, 长圆形 / 卵圆形, 光滑或有印记。气

**基金项目:** 江西省教育厅科学技术研究项目 (No. GJJ217101); 江西省中医药管理局科技计划项目 (No. 2021A332)。

**作者简介:** 陈小兵, 男, 副教授, 主要从事药物化学研究, email: baihrwg11@163.com \* **通信作者:** 欧阳熙林, 男, 教授, 主要从事天然药物化学及其活性筛选研究, email: oyxl-xg@163.com

微香, 味涩、微苦。风轮菜中富含各种药理活性化合物, 包括萜类、苯丙素类、黄酮类、多酚和脂肪酸<sup>[1]</sup>。长期以来, 风轮菜作为民间药物用于预防和治疗各种疾病, 具有止血、活血、收缩子宫、抗菌、抗炎、免疫调节、降血糖、内皮细胞保护、抗肿瘤及抗氧化等作用, 特别是被证明对心血管系统具有良好的作用。本文以“风轮菜”或“*Clinopodium chinense*”为关键词检索 Elsevier、Wiley、Springer、Taylor & Francis、中国知网、维普、万方等各种搜索引擎或数据库, 检索国内外近十年 (2015—2024 年) 有关风轮菜的出版物, 总结了风轮菜的植物化学和活性研究成果, 结论为未来研究风轮菜提供方向, 也为开发风轮菜成药物提供参考。

## 1 风轮菜化学成分

2015—2024 年十年期间, 风轮菜中已报道 91 种化合物, 包括 42 种萜类、24 种黄酮类、15 种苯丙烷类和 10 种其他类型化合物 (见表 1)<sup>[2-13]</sup>。此外, 还从精油中鉴定了大量的挥发性成分, 包括胡椒酮、佛手酚等。不过, 在此期间, 前期一

些分离的化合物如萘醌、脂肪酸等没有学者关注。

### 1.1 萜类

从风轮菜中分离并鉴定得到了 42 种萜类化合物, 主要为五环三萜类, 其中新化合物 21 个 (见表 1)。萜类构型主要有齐墩果烷型、乌苏烷型、羽扇豆烷型、柴胡皂苷型 (含有 13, 28- 氧环) 等骨架。其中, 糖单元主要是葡萄糖、岩藻糖、鼠李糖, 其连接数量一般是 2 ~ 3 个。除三萜外, clinopoditerpene E (42) 是一个二萜类化合物。值得一提的是, 化合物 40 和 41 是同时具有黄酮骨架的三萜化合物。不过, 皂苷的命名方式混乱, 分离得到的同一类化合物没有从结构的相似性上命名, 如化合物 26 ~ 28 结构不一致, 分别叫断血流皂苷 G, H, D。后来, 其他学者又改用罗马数字标识, 如化合物 1 ~ 5 命名为断血流皂苷 VIII ~ XI<sup>[2]</sup> (见图 1)。另外, 柴胡中的特征活性成分柴胡皂苷 A (化合物 33, saikosaponin a, 文献误写成 sakosaponin a) 在风轮菜中含量较高, 常用于药材质量评价<sup>[3]</sup>。

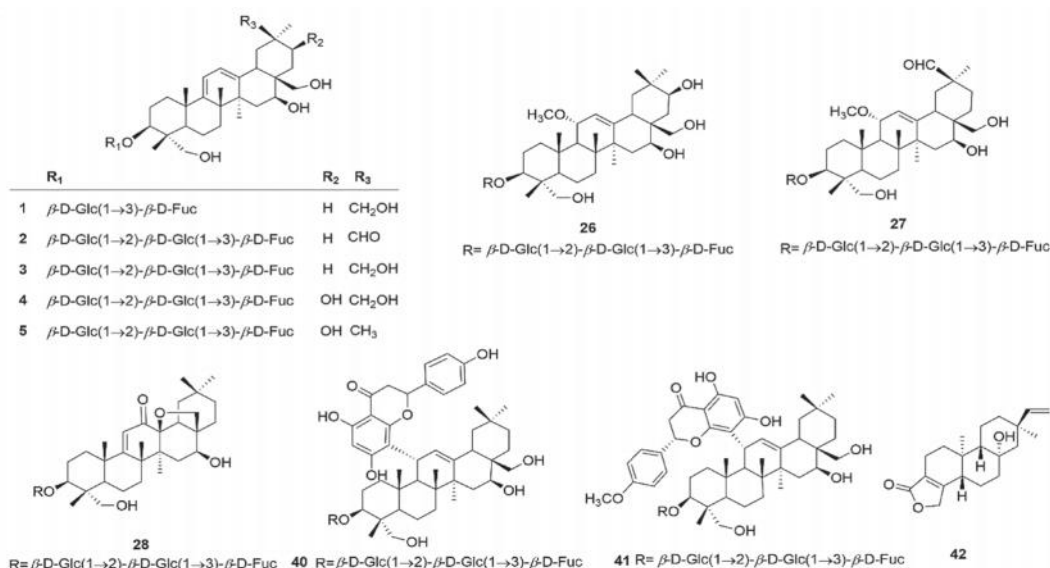


图 1 风轮菜中部分萜类化合物结构

Fig 1 Structures of some terpenoids in *Clinopodium chinense*

### 1.2 黄酮类

从风轮菜中鉴定出 24 种黄酮类化合物。根据苷元的结构, 主要为黄酮 (43 ~ 55)、二氢黄酮 (56 ~ 63)、黄酮醇 (64 ~ 66) 三大类。化合物 44、57、60 和 65 来源于槲皮素, 而化合物 43、45 ~ 56、58、59、61 ~ 64、66 来源于山柰酚。值得注意的是, 有文献错误地将人工产物木犀草素-7-O-葡萄糖醛酸苷正丁醇酯 (luteolin 7-O- $\beta$ -D-glucuronide butyl ester, 51) 写成了 apigenin-7-O- $\beta$ -D-pyranglycuronate butyl ester<sup>[12]</sup>。

### 1.3 苯丙烷类

风轮菜中苯丙烷类化合物主要包括苯丙酸、木质素和香豆素。徐明杰等<sup>[5]</sup>从风轮菜中分离出 4 种木质素 67 ~ 70, 同时还有邻二醇类苯丙素 75 和香豆素化合物 77。Zeng 等<sup>[11]</sup>鉴定了 3 种苯丙酸酯 71 ~ 73、3 种不饱和苯丙酸或酯 78 ~ 80。王凌天等<sup>[12]</sup>也发现了 3 种有机酸 74、79 以及 81。

### 1.4 其他成分

此外, 从风轮菜中还鉴定了 10 种化合物 (见图 2): 82、83<sup>[12]</sup>、84<sup>[5]</sup>、85<sup>[13]</sup>、86 ~ 90、91<sup>[10]</sup>。其中, 化合物 88 和 89 是一对对映异构体。



表 1 风轮菜分离鉴定的化合物名称

Tab 1 Compounds isolated and identified from *Clinopodium chinense*

| 编号  | 名称                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 编号  | 名称                                                                                                                    |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1*  | 断血流皂苷 VIII <sup>[2]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 46  | 芹菜素 -7- <i>O</i> -葡萄糖苷 <sup>[12]</sup>                                                                                |
| 2*  | 断血流皂苷 IX <sup>[2]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 47  | 芹菜素 -7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷 <sup>[12]</sup>                                                                              |
| 3*  | 断血流皂苷 X <sup>[2]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 48  | 羊红膻酯 <sup>[12]</sup>                                                                                                  |
| 4*  | 断血流皂苷 XI <sup>[2]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 49  | 芹菜素 -7- <i>O</i> -芸香糖苷 <sup>[12]</sup>                                                                                |
| 5   | 16 $\beta$ , 21 $\beta$ , 23, 28-tetrahydroxyoleana-9 (11), 12 (13) -diene-3-yl- $\beta$ -D-glucopyranosyl- (1 $\rightarrow$ 2) ]- $\beta$ -D-glucopyranosyl- (1 $\rightarrow$ 3) ]- $\beta$ -D-fucopyranoside <sup>[2]</sup>                                                                                    | 50  | 木犀草素 -4'- <i>O</i> -葡萄糖苷 <sup>[12]</sup>                                                                              |
| 6*  | 断血流皂苷 VII <sup>[2]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 51  | 木犀草素 -7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷正丁醇酯 <sup>[12]</sup>                                                                         |
| 7   | 柴胡皂苷 G <sup>[2]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 52  | 木犀草素 -7- <i>O</i> -芸香糖苷 <sup>[12]</sup>                                                                               |
| 8   | 16 $\beta$ , 23, 28-trihydroxyoleana-9 (11), 12 (13) -dien-3-yl- $\beta$ -D-glucopyranosyl- (1 $\rightarrow$ 2) ]- $\beta$ -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 3) ]- $\beta$ -D-fucopyranoside <sup>[2]</sup>                                                                                                     | 53  | 木犀草素 -7- <i>O</i> -新橙皮糖苷 <sup>[12]</sup>                                                                              |
| 9*  | 断血流皂苷 XII <sup>[2]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 54  | 金合欢素 <sup>[12]</sup>                                                                                                  |
| 10  | 16 $\beta$ , 23, 28-trihydroxyoleana-9 (11), 12 (13) -diene-3-yl- $\beta$ -D-glucopyranosyl- (1 $\rightarrow$ 4) - $\beta$ -D-glucopyranosyl- (1 $\rightarrow$ 6) - $\beta$ -D-glucopyranosyl- (1 $\rightarrow$ 3) ]- $\beta$ -D-glucopyranosyl- (1 $\rightarrow$ 2) ]- $\beta$ -D-fucopyranoside <sup>[2]</sup> | 55  | 金合欢素 -7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷 <sup>[12]</sup>                                                                             |
| 11  | 柴胡皂苷元 A <sup>[4]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 56  | 柚皮素 <sup>[11-12]</sup>                                                                                                |
| 12  | 前柴胡皂苷 A <sup>[4]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 57  | 圣草酚 <sup>[11]</sup>                                                                                                   |
| 13* | 风轮菜皂苷 F <sup>[5]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 58  | 异樱花素 <sup>[11-12]</sup>                                                                                               |
| 14* | 风轮菜皂苷 G <sup>[5]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 59  | 香蜂草苷 <sup>[11-12]</sup>                                                                                               |
| 15* | 风轮菜皂苷 E <sup>[6]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 60  | 橙皮苷 <sup>[11-12]</sup>                                                                                                |
| 16  | 醉鱼草皂苷 IV b <sup>[4]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 61  | 江户樱花苷 <sup>[12]</sup>                                                                                                 |
| 17* | 风轮菜皂苷 D <sup>[4]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 62  | 柚皮素 -7- <i>O</i> -芸香糖苷 <sup>[12]</sup>                                                                                |
| 18  | 11 $\alpha$ , 16 $\beta$ , 23, 28-tetrahydroxyolean-12-en-3 $\beta$ -yl- $\beta$ -D-glucopyranosyl- (1 $\rightarrow$ 2) ]- $\beta$ -D-glucopyranosyl- (1 $\rightarrow$ 3) ]- $\beta$ -D-fucopyranoside <sup>[4]</sup>                                                                                            | 63  | 异樱花苷 <sup>[12]</sup>                                                                                                  |
| 19* | clinopoditerpene B <sup>[7]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                | 64  | 山柰酚 <sup>[12]</sup>                                                                                                   |
| 20* | clinopoditerpene C <sup>[7]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                | 65  | 槲皮素 <sup>[12]</sup>                                                                                                   |
| 21  | clinopoditerpene D <sup>[6]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                | 66  | 山柰酚 -3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-鼠李糖苷 <sup>[12]</sup>                                                                   |
| 22  | perovskiaditerpenoside B <sup>[6]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                          | 67  | 异落叶松脂素 <sup>[5]</sup>                                                                                                 |
| 23  | 3 $\beta$ -hydroxy-12- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranosyl-8, 11, 13-abietatrien-7-one <sup>[6]</sup>                                                                                                                                                                                                           | 68  | 桉树脂酚 <sup>[5]</sup>                                                                                                   |
| 24  | 12- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranosyl-3, 11, 16-trihydroxyabieta-8, 11, 13-triene <sup>[6]</sup>                                                                                                                                                                                                              | 69  | 8-羟基-7'-表松脂醇 <sup>[5]</sup>                                                                                           |
| 25  | cussoracoside A <sup>[6]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 70  | 三角叶凤毛菊木脂素 A <sup>[5]</sup>                                                                                            |
| 26  | 断血流皂苷 G <sup>[6]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 71  | 迷迭香酸乙酯 <sup>[11]</sup>                                                                                                |
| 27* | 断血流皂苷 H <sup>[8]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 72  | 紫草酸 <sup>[11]</sup>                                                                                                   |
| 28* | 断血流皂苷 D <sup>[4]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 73  | ethyl (2 <i>R</i> ) -3- (3, 4-dihydroxyphenyl) -2-hydroxypropionate <sup>[11]</sup>                                   |
| 29  | 风轮菜皂苷 X VI <sup>[2]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 74  | 对羟基桂皮酸 <sup>[12]</sup>                                                                                                |
| 30  | 风轮菜皂苷 X X <sup>[2]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 75  | 4-hydroxyl-3-methoxyphenyl-1-propane-1, 2-diol <sup>[5]</sup>                                                         |
| 31  | 风轮菜皂苷 X IX <sup>[2]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 76  | 柳叶柴胡酚 <sup>[5]</sup>                                                                                                  |
| 32  | 柴胡皂苷元 F <sup>[4]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 77  | 异嗟皮啉 <sup>[5]</sup>                                                                                                   |
| 33  | 柴胡皂苷 A <sup>[5]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 78  | ethyl (2 <i>E</i> ) -3- (3, 4-dihydroxyphenyl) prop-2-enoate <sup>[11]</sup>                                          |
| 34  | 醉鱼草皂苷 IV <sup>[2, 4]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 79  | 咖啡酸 <sup>[11-12]</sup>                                                                                                |
| 35* | clinopoursaponin A <sup>[2]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                | 80  | ethyl (2 <i>E</i> ) -3- (2, 3, 4-trihydroxyphenyl) prop-2-enoate <sup>[11]</sup>                                      |
| 36* | clinopoursaponin B <sup>[2]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                | 81  | cis-3-[2-[1- (3, 4-dihydroxyphenyl) -1-hydroxymethyl]-1, 3-benzodioxol-5-yl]- (E) -2-propenoic acid <sup>[12]</sup>   |
| 37* | clinopoursaponin C <sup>[2]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                | 82  | 甲基富马酸 <sup>[12]</sup>                                                                                                 |
| 38* | clinopoursaponin D <sup>[2]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                | 83  | gentisic acid 5- <i>O</i> - $\beta$ -D- (6'-salicylyl) -glucopyranoside <sup>[12]</sup>                               |
| 39  | 醉鱼草皂苷 IV a <sup>[4, 6]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 84  | blumenol A <sup>[5]</sup>                                                                                             |
| 40* | clinoposide G <sup>[9]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 85  | tournefoliac acid B <sup>[13]</sup>                                                                                   |
| 41* | clinoposide H <sup>[9]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 86* | chinense A <sup>[10]</sup>                                                                                            |
| 42* | clinopoditerpene E <sup>[10]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                               | 87* | chinense B <sup>[10]</sup>                                                                                            |
| 43  | 芹菜素 <sup>[11-12]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 88* | (E) -6-[9 <i>R</i> - ( $\beta$ -D-glucopyranosyloxy) butylidene]-1, 1, 5-trimethyl-4-cyclohexen-3-one <sup>[10]</sup> |
| 44  | 木犀草素 <sup>[11-12]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 89  | (E) -6-[9 <i>S</i> - ( $\beta$ -D-glucopyranosyloxy) butylidene]-1, 1, 5-trimethyl-4-cyclohexen-3-one <sup>[10]</sup> |
| 45  | 蒙花苷 <sup>[11-12]</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 90  | blumenol C 9- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranoside <sup>[10]</sup>                                                   |
|     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 91  | (6 <i>R</i> , 9 <i>R</i> ) -3-oxo- $\alpha$ -ionol-9- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranoside <sup>[10]</sup>           |

注：化合物 1 ~ 42 为萜类，43 ~ 66 为黄酮类，67 ~ 81 为苯丙烷类，82 ~ 91 归为其他类；\* 为新化合物。

Note: Compounds 1 ~ 42 are terpenes, 43 ~ 66 are flavonoids, 67 ~ 81 are phenylpropanoids, and 82 ~ 91 are classified as others. \* means new compounds.

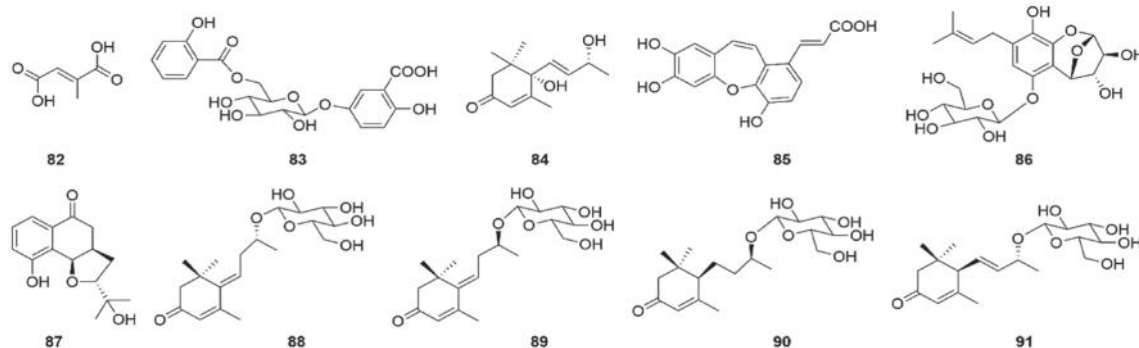


图2 风轮菜中其他化合物的结构

Fig 2 Structures of other compounds in *Clinopodium chinense*

## 1.5 精油

挥发油中含有许多天然香料物质,可用于食品、制药等领域<sup>[14]</sup>。GC-MS联用法结合计算机检索是分析鉴定挥发油的重要手段。Li等<sup>[15]</sup>采用GC-MS联用技术分析了风轮菜挥发油,共鉴定出35个化合物,占总精油的99.18%,主要成分为桉油烯醇(18.54%)、胡椒酮(18.9%)、石竹烯(12.04%)、乙酸龙脑酯(8.14%)、氧化石竹烯(4.19%)、胡椒

烯酮(4.09%)和香芹酚(4.01%),并从精油中分离纯化乙酸龙脑酯、石竹烯和胡椒酮。

## 2 药理活性

基于风轮菜丰富的化学成分,其药理活性研究也不断深入。近年来,风轮菜活性研究主要在止血、抗心肌细胞损伤和心血管保护、抗炎镇痛、抗肿瘤等(见图3)。

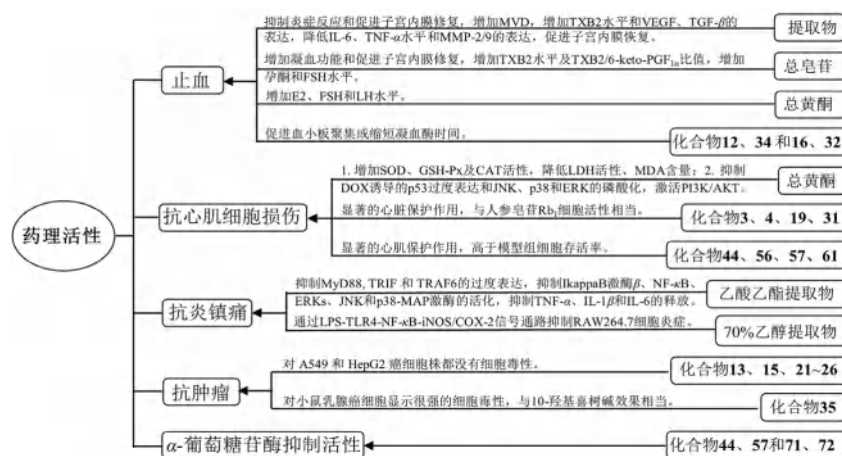


图3 风轮菜药理活性总概图

Fig 3 Schematic diagram of pharmacological activity in *Clinopodium chinense*

## 2.1 止血作用

风轮菜和灯笼草 [*C. polycephalum* (Vaniot) C. Y. Wu et Hsuan] 被《中国药典》的多个版本中作为断血流收载,主要作用是止血。风轮菜主要通过促进血小板黏附,缩短血浆复钙时间,缩短出血时间,减少出血量<sup>[16]</sup>。Li等<sup>[17]</sup>发现风轮菜提取物可抑制炎症反应和促进子宫内修复,增加微血管密度(MVD),增加血栓素B2(TXB2)水平和血管内皮生长因子(VEGF)、转化生长因子-β(TGF-β)的表达,降低白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)水平和基质金属蛋白酶(MMP-2/9)的表达,促进子宫内修复。研究还发现,总皂苷成分增加凝血功能和促进子宫内修复,显著增加TXB2水平及TXB2/6-keto-PGF<sub>1α</sub>比值,增加孕酮

和尿促卵泡激素(FSH)水平;总黄酮成分显著增加雌二醇(E<sub>2</sub>)、FSH和黄体生成激素(LH)水平,侧重于调节雌激素水平和减轻炎症反应,但它们均能明显减少子宫出血量,减轻子宫内病理损伤及升高子宫内组织微血管密度。总提取物治疗作用最佳,提示风轮菜治疗子宫异常出血可能是黄酮和皂苷成分协同作用的结果<sup>[18]</sup>。Qi等<sup>[19]</sup>进一步发现减少子宫出血的主要成分是化合物16、33、43、56和60。风轮菜中化合物12和34能显著促进血小板聚集,半数有效浓度(EC<sub>50</sub>)值分别为53.4和12.2 μmol·L<sup>-1</sup>。此外,醉鱼草皂苷IV b(16)和柴胡皂苷元F(32)能缩短凝血酶时间<sup>[4]</sup>。

## 2.2 抗心肌细胞损伤和心血管保护作用

风轮菜总黄酮有很好的抗心肌细胞损伤和心血

管保护作用,能显著增加超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)及过氧化氢酶(CAT)活性,降低乳酸脱氢酶(LDH)活性、丙二醛(MDA)含量,对缺氧/复氧诱导的H9c2心肌细胞损伤具有保护作用<sup>[20]</sup>。风轮菜总黄酮还能抑制阿霉素(DOX)诱导的p53过度表达和氨基末端激酶(JNK)、p38和细胞外调节蛋白激酶(ERK)的磷酸化,激活磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(AKT)通路<sup>[21]</sup>。Zhang等<sup>[22]</sup>研究证实风轮菜总黄酮能降低血清心肌酶和心肌细胞凋亡指数,改善心率和空泡化,通过诱导AKT磷酸化,激活核因子E2相关因子2(Nrf2)/血红素加氧酶-1(HO-1)信号通路,增加HO-1的表达,并增强Nrf2的核转位,从而保护心肌损伤,增强细胞抗氧化防御能力。此外,风轮菜总黄酮联合miR-702-5p抑制物可显著降低p21、Caspase-3表达水平,提高细胞存活率,降低细胞凋亡率,降低MDA含量和LDH活性,增强CAT、SOD活性,抑制miR-702-5p表达和细胞凋亡和氧化应激反应,保护心肌细胞免受缺氧/复氧引起的损伤<sup>[23]</sup>。因此,风轮菜总黄酮可能通过阻断氧化应激介导心脏保护。

Zhu等<sup>[2]</sup>证实从风轮菜中的萜类化合物**3**、**4**和**31**表现出显著的心脏保护作用,50.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时的H9c2细胞活力分别为(78.46 $\pm$ 1.47)%、(80.77 $\pm$ 2.30)%和(79.55 $\pm$ 1.85)%,高于模型组的细胞活力,与人参皂苷Rb<sub>1</sub>作用效果相当。风轮菜中化合物**19**在12.5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时的细胞活力为(73.7 $\pm$ 3.9)%,揭示化合物**19**对过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)诱导的H9c2细胞凋亡具有心脏保护作用<sup>[7]</sup>。另外,他们还从风轮菜发现两种新的黄酮类-三萜皂苷类(化合物**40**和**41**)能显著抑制H9c2细胞缺氧/复氧诱导的损伤和凋亡,提高线粒体膜电位和抗氧化酶活性,降低炎症细胞因子水平和p65的蛋白质水平,并增加了细胞核中Nrf2的水平<sup>[9]</sup>。

除上述萜类外,风轮菜中的黄酮类化合物**61**,有显著的心肌保护作用,在25.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 下的H9c2细胞存活率为(84.25 $\pm$ 7.36)%,显著高于模型组细胞存活率(62.12 $\pm$ 6.18)%<sup>[12]</sup>。文献报道风轮菜中黄酮成分**44**、**56**、**57**具有保护血管内皮作用,显著改善高糖诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVECs)损伤<sup>[11]</sup>。苯丙素类成分**73**、**75**、**71**和**72**也有很强的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性。此外,化合物**85**显著改善了离体大鼠心脏的血流动力学参数,通过调节SOD、CAT和GSH-Px等抗氧化酶活性来抑制氧化应激,增强PI3K和AKT的磷酸化,抑制C/EBP同源蛋白(CHOP)和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶12(caspase-12)的表达,降低JNK的磷酸化水平,增加Bcl-2/Bax的比例,从而抑制心肌细胞凋亡,是一种有前景的治疗缺血性心

血管疾病的潜在药物<sup>[13]</sup>。

### 2.3 抗炎镇痛活性

风轮菜乙酸乙酯提取物显著抑制棕榈酸诱导的HUVECs中Toll样受体4(TLR4)的表达,导致抑制下游适应蛋白MyD88、TRIF和TRAF6的过度表达,并抑制IkappaB激酶(IKK)、核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)、ERKs、JNK和p38-MAPK的活化,以及TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6的释放。因此,风轮菜可以通过TLR4介导的NF- $\kappa$ B和MAPK通路抑制内皮细胞炎症<sup>[24]</sup>。

Wang等<sup>[25]</sup>用网络药理学分析揭示风轮菜可通过LPS-TLR4-NF- $\kappa$ B-iNOS/COX-2信号通路抑制RAW264.7细胞的炎症,体内实验证明,风轮菜能显著减轻炎症病理特征,增加体重和结肠长度,减少疾病活动指数和氧化损伤,并介导NO、PGE<sub>2</sub>、IL-6、IL-10和TNF- $\alpha$ 的表达。此外,结肠代谢组学分析显示,风轮菜可以恢复溃疡性结肠炎小鼠中异常的内源性代谢产物水平。因此,风轮菜通过减少系统炎症和调节代谢来缓解溃疡性结肠炎。

### 2.4 抗肿瘤活性

Zhu等<sup>[2]</sup>研究发现风轮菜的三萜皂苷中,在C-11有羰基、C-3连葡萄糖的化合物**35**对小鼠乳腺癌细胞的毒性很强[半数抑制浓度( $IC_{50}$ )=7.4  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ],与阳性对照10-羟基喜树碱作用效果相当( $IC_{50}$ =7.6  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。Qu等<sup>[6]</sup>研究发现8种萜类化合物对A549和HepG2癌细胞株都没有细胞毒性,而化合物**15**、**22**、**23**、**24**、**25**有改善HepG2胰岛素抵抗的作用。

### 2.5 其他

风轮菜中的黄酮成分**44**、**57**以及苯丙素成分**71**、**72**是有效的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂,也是抗糖尿病药物的潜在先导化合物<sup>[11]</sup>。此外,风轮菜对变形杆菌、金黄色葡萄球菌、产气杆菌等具有良好的抑制效果,石油醚部位对几种细菌的最低抑菌浓度均为0.0625  $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,而变形杆菌对其提取物的敏感性最强,但提取物对于藤黄八叠球菌和黑曲霉没有抑制作用<sup>[26]</sup>。

## 3 总结与展望

本文总结了十年间风轮菜化学成分和药理活性方面的最新研究成果。活性成分涉及萜类及其皂苷、黄酮类化合物和苯丙烷类成分。药理活性研究主要集中在止血、心血管保护、心肌细胞保护、抗炎镇痛、抗菌、抗肿瘤等方面,但其生物活性的机制尚未完全阐明。精油对嗜卷书虱有熏蒸毒性,具有开发天然杀虫剂或熏蒸剂的潜力<sup>[15]</sup>,但需进一步研究以评估它们对人的毒副作用。另外,风轮菜药代动力学研究仅定量分析黄酮<sup>[3]</sup>以及醉鱼草皂苷IVb皂苷<sup>[27]</sup>。《中国药典》以醉鱼草皂苷IVb作为对照品,用薄层色谱鉴定药材,缺乏含量测定的



方法。目前文献多以黄酮的定量测定结合 HPLC 或者 UPLC-Q-TOF-MS 指纹图谱的定性分析评估药材质量<sup>[19, 28]</sup>。从药材质量控制和药代动力学研究而言,与现阶段成分和活性研究紧密相关。然而,萜类作为一类重要活性成分,很多活性效果或机制尚不明确。因此,关于风轮菜的研究有望在活性成分,特别是皂苷类成分中开展,深入探讨皂苷、黄酮类成分的活性、协同效果和作用机制,并通过药代动力学发现药效成分,基于药效成分建立风轮菜药材质量评价体系。这些研究成果将促进以风轮菜止血药物的开发奠定坚实的基础。

## 参考文献

- [1] 刘遥,刘丽敏,熊远根,等.风轮菜属植物研究进展[J].中国中药杂志,2020,45(18):4349-4357.
- [2] Zhu YD, Hong JY, Bao FD, et al. Triterpenoid saponins from *Clinopodium chinense* (Benth.) O. Kuntze and their biological activity[J]. Arch Pharm Res, 2018, 41(12): 1117-1130.
- [3] Li LL, Huang Q, Wang MM, et al. Simultaneous determination of five compounds of *Clinopodium chinense* in rat plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study[J]. Lat Am J Pharm, 2019, 38(6): 1143-1152.
- [4] Zeng B, Liu GD, Zhang BB, et al. A new triterpenoid saponin from *Clinopodium chinense* (Benth.) O. Kuntze[J]. Nat Prod Res, 2016, 30(9): 1001-1008.
- [5] 徐明杰,伍一炜,赵迪,等.风轮菜地上部分 2 个新的齐墩果烷型三萜皂苷[J].中国现代中药,2022,24(8):1447-1455.
- [6] Qu LX, Liu YQ, Wang Y, et al. Diterpenoid and triterpenoid glycosides from *Clinopodium chinense* [J]. Nat Prod Res, 2021, 35(1): 25-33.
- [7] Zhu YD, Zhang JY, Li PF, et al. Two new abietane diterpenoid glycosides from *Clinopodium chinense* [J]. Nat Prod Res, 2016, 30(9): 1075-1080.
- [8] 王扬,何乐毅凡,李龙宇,等.风轮菜地上部分 1 个新的三萜皂苷[J].中国现代中药,2020,22(10):1596-1606.
- [9] Zhu YD, Chen RC, Wang H, et al. Two new flavonoid-triterpene saponin meroterpenoids from *Clinopodium chinense* and their protective effects against anoxia/reoxygenation-induced apoptosis in H9c2 cells[J]. Fitoterapia, 2018, 128: 180-186.
- [10] Shen MY, Zheng CW, Hao ZJ, et al. Undescribed compounds from *Clinopodium chinense* (Benth.) O. Kuntze and their coagulation activity studies[J]. Fitoterapia, 2024, 172: 105736.
- [11] Zeng B, Chen K, Du P, et al. Phenolic compounds from *Clinopodium chinense* (Benth.) O. Kuntze and their inhibitory effects on  $\alpha$ -glucosidase and vascular endothelial cells injury[J]. Chem Biodivers, 2016, 13(5): 596-601.
- [12] 王凌天,孙忠浩,钟明亮,等.风轮菜酚酸类化学成分研究[J].中国中药杂志,2017,42(13):2510-2517.
- [13] Yu YL, Xing N, Xu XD, et al. Tournefoliac acid B, derived from *Clinopodium chinense* (Benth.) Kuntze, protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting endoplasmic reticulum stress-regulated apoptosis via PI3K/AKT pathways[J]. Phytomedicine, 2019, 52: 178-186.
- [14] 秦正龙,冯长君.细风轮菜挥发油的定量结构-色谱保留关系[J].江苏农业科学,2015,43(5):283-284.
- [15] Li HY, Liu XC, Chen XB, et al. Chemical composition and insecticidal activities of the essential oil of *Clinopodium chinense* (Benth.) Kuntze aerial parts against *Liposcelis bostrychophila* Badonnel[J]. J Food Prot, 2015, 78(10): 1870-1874.
- [16] 白少云,李梦婷,曹子琴,等.断血流提取物的体内外止血性能评价[J].山西医科大学学报,2022,53(12):1590-1593.
- [17] Li LL, Huang Q, Duan XC, et al. Protective effect of *Clinopodium chinense* (Benth.) O. Kuntze against abnormal uterine bleeding in female rats[J]. J Pharmacol Sci, 2020, 143(1):1-8.
- [18] 李丽丽,黄琪,彭代银,等.风轮菜总提取物、总皂苷和总黄酮对子宫异常出血大鼠抗炎止血作用机制研究[J].中国中药杂志,2022,47(12):3372-3379.
- [19] Qi JJ, Zhang QQ, Li LL, et al. Spectrum-effect relationship between UPLC-Q-TOF-MS fingerprint and anti-AUB effect of *Clinopodium chinense* (Benth.) O. Kuntze[J]. J Pharmaceut Biomed, 2022, 217: 114828.
- [20] 邢娜,张海晶,舒尊鹏,等.风轮菜总黄酮不同极性部位的抗氧化作用研究[J].世界中医药,2015,10(8):1169-1172.
- [21] Chen RC, Xu XD, Liu XZ, et al. Total flavonoids from *Clinopodium chinense* (Benth.) O. Ktze protect against doxorubicin-induced cardiotoxicity in vitro and in vivo[J]. Evid-Based Compl Alt, 2015, 2015: 72565.
- [22] Zhang HJ, Chen RC, Sun GB, et al. Protective effects of total flavonoids from *Clinopodium chinense* (Benth.) O. Ktze on myocardial injury in vivo and in vitro via regulation of Akt/Nrf2/HO-1 pathway[J]. Phytomedicine, 2018, 40: 88-97.
- [23] 张宁,马竞,武国利.风轮菜总黄酮联合 miR-702-5p 抑制物对缺氧/复氧诱导的心肌细胞损伤的影响[J].实用药物与临床,2021,24(1):23-28.
- [24] Shi XJ, Wang SS, Luan HL, et al. *Clinopodium chinense* attenuates palmitic acid-induced vascular endothelial inflammation and insulin resistance through TLR4-mediated NF- $\kappa$ B and MAPK pathways[J]. Am J Chinese Med, 2019, 47(1): 97-117.
- [25] Wang YM, Shao ZT, Song C, et al. *Clinopodium chinense* Kuntze ameliorates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice by reducing systematic inflammation and regulating metabolism[J]. J Ethnopharmacol, 2023, 309: 116330.
- [26] 高建有,蔡郭,廖婕,等.民间草药风轮菜和雀儿舌头提取物的抑菌作用[J].湖南农业科学,2019,(2):7-10.
- [27] 宋翔,陈卫东,王雷,等.超高效液相色谱-串联质谱法测定大鼠血浆中断血流皂苷 A 的浓度[J].中南药学,2020,18(4):572-576.
- [28] 田京歌,周娟娟,倪倩,等.断血流 HPLC 特征图谱的建立及 3 种成分的含量测定[J].西北药学杂志,2022,37(1):12-17.

(收稿日期:2024-10-14;修回日期:2024-11-20)

# 中药单体抗类风湿关节炎作用机制研究进展

罗照勇, 李玉珊, 李森浩\* (南阳医学高等专科学校, 河南 南阳 473000)

**摘要:** 类风湿关节炎是一种慢性全身性自身免疫性疾病, 其以滑膜炎症、关节细胞浸润为特征, 导致关节进行性破坏和骨质侵蚀, 并与肺部疾病、类风湿性结节在内的许多并发症有关, 可能对患者生活质量产生悲观影响。目前该病的治疗方法包括常规药物、小分子药物和生物抗风湿药物, 因疗效低、毒副作用高、缺乏选择性和安全性等受到限制。中药作为我国疗效确切的传统药物, 其单体成分在抗类风湿关节炎方面的研究取得了显著的研究成果, 本文综述了目前相关的研究进展, 以期对类风湿关节炎的临床治疗提供新的思路和方法。

**关键词:** 类风湿关节炎; 中药单体; 作用机制

**中图分类号:** R283

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-2981(2025)08-2381-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.035

## Mechanism of anti-rheumatoid arthritis by traditional Chinese medicine monomers

LUO Zhao-yong, LI Yu-shan, LI Sen-hao\* (Nanyang Medical College, Nanyang Henan 473000)

**Abstract:** Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic systemic autoimmune disease characterized by synovial inflammation and cellular infiltration of the joints, leading to progressive joint destruction and bone erosion. It is also associated with various complications, including pulmonary diseases and rheumatoid nodules, potentially having a pessimistic impact on patients' quality of life. Currently, therapeutic interventions for this condition encompass conventional pharmaceuticals, small-molecule entities, and biological disease-modifying anti-rheumatic drugs. However, their clinical application is constrained by limitations, such as suboptimal efficacy, significant toxicity, insufficient selectivity, and safety concern. Traditional Chinese medicine, as a well-established traditional therapeutic modality with demonstrated efficacy in China, has witnessed substantial advancements in the research of monomeric constituents targeting RA. This article summarized the current research progress in this domain, to introduce novel perspectives and therapeutic strategies for RA management.

**Key words:** rheumatoid arthritis; traditional Chinese medicine monomer; mechanism of action

类风湿关节炎 (RA) 是一种自身免疫性炎症性疾病, 主要表现为持续性的滑膜炎症和关节软骨损伤<sup>[1]</sup>。该病患病率较高, 全球为 0.5% ~ 1.0%, 我国患病率为 0.3% ~ 0.4%, 主要患病年龄为 40 ~ 60 岁, 其中女性高发, 患病率约为男性的 3 倍<sup>[2]</sup>。该病导致关节软骨的渐进性破坏, 病情严重者可出现关节僵硬、关节畸形、关节强直, 甚至关节脱位, 致残率极高, 若未及时进行诊断治疗患者将丧失劳动能力, 给社会造成巨大的经济负担。药物治疗主要包括非甾体抗炎药、慢作用抗风湿药、免疫抑制剂、生物制剂和植物

药等, 这些药物在治疗 RA 的同时有较大的毒副作用, 会对人的身体造成疾病以外的安全隐患。中药作为我国传统药物, 历史悠久, 疗效确切, 在治疗 RA 方面显示出良好效果, 人们期待在中药中找出疗效确切, 毒副作用低的有效成分并阐明其作用机制以更好地治疗此疾病。

### 1 中药单体活性成分

中药疗效确切, 历史悠久, 在治疗 RA 方面效果突出且毒副作用较低, 深受临床患者欢迎。随着科学技术手段的发展, 在中药体内分离的单体化合物在治疗 RA 方面展现出了独特的潜力。

**基金项目:** 南阳医学高等专科学校 2022 年度科学研究基金项目 (No. 2022ZRKX011)。

**作者简介:** 罗照勇, 男, 硕士, 主要从事天然药物抗炎活性成分研究, email: 3278158625@qq.com \*通信作者: 李森浩, 男, 副教授, 主要从事药物分析研究, email: 190011470@qq.com

这些化合物通常来源于药用植物的次生代谢产物，如萜类成分雷公藤甲素、穿心莲内酯、冬凌草甲素、青蒿琥酯、白桦酸、京尼平苷等；黄酮类成分姜黄素、芹菜素、槲皮素、金雀异黄素等；生物碱类成分粉防己碱、苦参碱、苯甲酰乌头原碱、青藤碱、小檗碱等；皂苷类成分薯蓣皂苷、人参皂苷 CK 等，酚类成分白藜芦醇、香豆素类瑞香素等，萘醌类成分紫草素等。

2 中药单体抗 RA 作用机制

2.1 抑制炎症因子表达

RA 有多种炎症细胞因子，如肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 (IL)、基质金属蛋白酶 (MMP)、前列腺素 E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)、一氧化氮 (NO) 等<sup>[3]</sup>。炎症细胞因子刺激关节中的破坏性基质，导致关节结构损伤，最终造成患者运动功能下降和残疾等<sup>[4]</sup>。多种中药单体能够降低 RA 动物模型体内

炎症因子水平，姜黄素 200 mg · kg<sup>-1</sup> 可抑制胶原诱导性关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 大鼠体内 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、MMP-1 和 MMP-3 等促炎细胞因子水平的升高，其机制可能与通过 mTOR 途径减轻 CIA 诱导的炎症有关<sup>[5]</sup>。穿心莲内酯在体内外实验中均可显著降低 IL-1 $\beta$  和 IL-6 的产生，其机制可能与调节 p38 MAPK 和 ERK-1/2 信号通路有关<sup>[6]</sup>。粉防己碱能减轻 RA 大鼠的病理表现，其作用机制可能与减少炎症因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-6 的释放，抑制免疫器官和降低环氧化酶 2 (COX-2) 蛋白表达有关<sup>[7]</sup>。苦参碱能显著抑制炎症反应和滑膜组织破坏，降低 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-17A、MMP-2、MMP-3 和 MMP-9 的表达水平<sup>[8]</sup>。有研究发现，苯甲酰乌头原碱可以降低 IL-1 $\beta$  诱导的人滑膜 SW982 细胞中 IL-6 和 IL-8 的表达水平<sup>[9]</sup>。中药单体抑制 RA 炎症因子表达作用机制如表 1 所示。

表 1 中药单体抑制 RA 炎症因子表达作用机制

| Tab 1 Mechanisms of traditional Chinese medicine monomers inhibit the expression of inflammatory factors in rheumatoid arthritis |      |               |                                                                                                                                                                     |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 中药单体                                                                                                                             | 化学成分 | 细胞 / 动物模型     | 作用机制                                                                                                                                                                | 文献  |
| 姜黄素                                                                                                                              | 黄酮类  | CIA 大鼠        | 通过 mTOR 通路抑制 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、MMP-1 和 MMP-3 等促炎细胞因子水平的升高                                                                                                | [5] |
| 穿心莲内酯                                                                                                                            | 二萜内酯 | RA-SFs CIA 小鼠 | 通过 p38 MAPK 与 ERK1/2 信号通路降低 p38 MAPK 与 ERK1/2 磷酸化水平                                                                                                                 | [6] |
| 粉防己碱                                                                                                                             | 生物碱  | CIA 大鼠        | 抑制免疫器官、下调 COX-2 蛋白和降低炎症因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 和 IL-6 的表达                                                                                                    | [7] |
| 苦参碱                                                                                                                              | 生物碱  | CIA 大鼠        | 通过 NF- $\kappa$ B 通路降低 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-17A、MMP-2、MMP-3 和 MMP-9 的表达水平；下调 CIA 大鼠滑膜组织中 p-I $\kappa$ B、COX-2 和 iNOS 的表达，上调 I $\kappa$ B 的表达水平 | [8] |
| 苯甲酰乌头原碱                                                                                                                          | 生物碱  | 人滑膜 SW982 细胞  | 通过 MAPK、Akt 和 NF- $\kappa$ B 通路抑制 IL-6 和 IL-8 的表达水平                                                                                                                 | [9] |

2.2 作用关节软骨和抑制骨破坏

RA 是一种多关节疾病，炎症过程的特征是炎性细胞渗入关节，导致滑膜细胞增殖和软骨破坏。在 RA 中，破骨细胞在滑膜组织中聚集，并与破骨细胞因子 (RANKL) 及其同源受体 RANK 在软骨侵蚀部位中被激活从而导致骨破坏，而骨保护素 (OPG) 则会竞争性地干扰这一系统，从而介导关节骨吸收与骨破坏<sup>[10-11]</sup>。雷公藤甲素能够通过促进 IL-10 和转化生长因子  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 的分泌，增强其对破骨细胞分化和骨吸收的抑制作用<sup>[12]</sup>，通过调节 RANKL/

RANK/OPG 信号通路抑制破骨细胞形成和减少骨破坏来改善 CIA 小鼠疾病情况<sup>[13]</sup>。青藤碱能显著抑制类风湿滑膜成纤维细胞 (RASFs) 分泌 IL-6 和 IL-33，抑制 RASFs 产生活性氧 (reactive oxygen species, ROS)，从而介导骨破坏发挥保护作用，其机制可能是通过激活 p62<sup>Thr269/Ser272</sup>-Keap1-Nrf2 并诱导 HO-1 蛋白的表达来介导抗 RA 作用<sup>[14]</sup>。青蒿琥酯能剂量依赖性地增加 *Foxp3* 基因的表达水平，从而减少 CIA 大鼠的骨和软骨侵蚀，改善 RA 的病变<sup>[15]</sup>。中药单体作用 RA 关节软骨与抑制骨破坏作用机制如表 2 所示。

表 2 中药单体作用 RA 关节软骨与抑制骨破坏作用机制

| Tab 2 Mechanisms of traditional Chinese medicine monomers on articular cartilage and inhibition of bone destruction in rheumatoid arthritis |        |           |                                                                                                                                         |         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 中药单体                                                                                                                                        | 化学成分   | 细胞 / 动物模型 | 作用机制                                                                                                                                    | 文献      |
| 雷公藤甲素                                                                                                                                       | 环氧二萜内酯 | 小鼠骨髓细胞    | 上调 IL-10 和 TGF- $\beta$ 1，抑制破骨细胞分化和骨吸收；降低 RANKL 和 RANK 的表达，增加骨保护素的 mRNA 和蛋白水平，降低 RANKL/OPG 的比例来抑制骨破坏                                    | [12-13] |
| 青藤碱                                                                                                                                         | 生物碱    | RASFs     | 降低 IL-6、IL-33、ROS 的表达水平；通过磷酸化 p62 (Ser351) 干扰 Keap1 和 Nrf2 的相互作用，促进 Keap1 降解和 Nrf2 积累，最终磷酸化 p62 (Thr269/Ser272) 并诱导 HO-1 表达，从而介导抗 RA 作用 | [14]    |
| 青蒿琥酯                                                                                                                                        | 倍半萜酯类  | CIA 大鼠    | 上调 <i>Foxp3</i> 基因表达水平                                                                                                                  | [15]    |

2.3 抑制 RA-FLS 增殖

成纤维样滑膜细胞 (FLS) 是介导关节破坏的重要细胞。RA-FLS 的异常增殖可导致滑膜增生

和炎性细胞浸润，加重 RA 的疾病破坏性，其分泌的炎症因子可导致关节损伤，这些因子又反作用于 RA-FLS 推动其扩散导致滑膜增生，因此抑



制 RA-FLS 增殖可考虑作为抗 RA 作用途径。青藤碱可通过 ERK/Egr-1 信号通路降低佐剂性关节炎 (adjuvant-induced-arthritis, AIA) 大鼠 RA-FLS 中 ERK1/2 的磷酸化和  $\alpha 7$  烟碱型乙酰胆碱受体 ( $\alpha 7$ nAChR) 的表达水平来抑制 RA-FLS 细胞增

殖<sup>[16]</sup>。白藜芦醇通过激活沉默的 SIRT1/Nrf2 信号通路抑制 FLS 的增殖从而发挥抗 RA 疗效<sup>[17]</sup>。京尼平苷可显著抑制 AIA 大鼠 FLS 的增殖, 机制可能与 JNK、ERK1/2 和 p38 的协同作用有关<sup>[18]</sup>。中药单体抑制 RA-FLS 增殖作用机制如表 3 所示。

表 3 中药单体抑制 RA-FLS 增殖作用机制

| Tab 3 Mechanisms underlying the inhibitory effects of traditional Chinese medicine monomers on the proliferation of RA-FLS |       |                  |                                                                                                  |      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 中药单体                                                                                                                       | 化学成分  | 细胞 / 动物模型        | 作用机制                                                                                             | 文献   |
| 青藤碱                                                                                                                        | 生物碱   | AIA 大鼠<br>RA-FLS | 通过 ERK/Egr-1 信号通路抑制 TNF- $\alpha$ 诱导的 FLS 增殖, 降低 ERK1/2 的磷酸化及 Egr-1、 $\alpha 7$ nAChR 蛋白的表达      | [16] |
| 白藜芦醇                                                                                                                       | 酚类    | AIA 大鼠           | 激活 SIRT1/ Nrf2 信号通路抑制 ROS 的产生和 FLS 的增殖                                                           | [17] |
| 京尼平苷                                                                                                                       | 环烯醚萜苷 | AIA 大鼠           | 降低 IFN- $\gamma$ 和 IL-17 的表达, 增加 IL-4 和 TGF- $\beta 1$ 的表达水平, 并降低 p-JNK、p-ERK1/2 和 p-p38 蛋白的表达水平 | [18] |

2.4 诱导 RA-FLS 凋亡

细胞凋亡是细胞为了抵抗外界刺激, 维持内部环境稳态而独立有序的死亡, 由一系列特定基因激活、表达和调控<sup>[19]</sup>。当滑膜成纤维细胞具有稳定的激活时, 凋亡缺陷, 开始于肿瘤样的异常增殖和转化, 表现出类似的攻击和黏附特征<sup>[20-21]</sup>。此外, RA-FLS 会增加 MMP 的表达, 降解软骨细胞外基质, 阻断关节软骨营养供应, 进而导致关节炎症细胞浸润<sup>[22]</sup>。FLS 的凋亡缺陷可导致滑膜增生、血管翳形成和炎症细胞浸润, 导致关节破坏和关节畸形, 并最终导致关节功能丧失。因此, 如何有效地促进 FLS 细胞凋亡, 抑

制滑膜增生, 对于 RA 的治疗具有重要的临床意义。苦参碱通过下调 RA-FLS 中 *Bcl-2* 基因, 上调 *Bax* 和 *caspase-3* 基因表达水平, 证实了其诱导 RA-FLS 细胞凋亡的作用<sup>[23]</sup>。芹菜素可通过激活 *caspase-3* 和 *caspase-7* 蛋白诱导 MH7A 细胞凋亡以及激活 ERK1/2 相关通路抑制 ROS 的产生和细胞增殖<sup>[24]</sup>。穿心莲内酯可显著降低人 RA-FLS 中 *Bcl-2/Bax* 蛋白的比值, 诱导 RA-FLS 凋亡, 同时促进线粒体细胞色素 C (cyt-C) 的释放和 *caspase-3* 蛋白的激活<sup>[25]</sup>。中药单体诱导 RA-FLS 凋亡作用机制见表 4。

表 4 中药单体诱导 RA-FLS 凋亡作用机制

| Tab 4 Mechanisms of traditional Chinese medicine monomers inducing RA-FLS apoptosis |      |           |                                                                                                                                                              |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 中药单体                                                                                | 化学成分 | 细胞 / 动物模型 | 作用机制                                                                                                                                                         | 参考文献 |
| 苦参碱                                                                                 | 生物碱  | CIA 大鼠    | 抑制 FLS 增殖, 阻滞细胞于 G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> 期, 下调 <i>Bcl-2</i> , 上调 <i>Bax</i> 和 <i>caspase-3</i> 的 mRNA 表达水平; 通过 JAK/STAT 降低了 JAK2、STAT1 和 STAT3 蛋白的磷酸化 | [23] |
| 芹菜素                                                                                 | 黄酮类  | MH7A 细胞   | 通过调控 <i>caspase-3</i> 和 <i>caspase-7</i> 蛋白和 ERK1/2 的激活从而介导 MH7A 细胞 ROS 产生和诱导细胞凋亡                                                                            | [24] |
| 穿心莲内酯                                                                               | 二萜内酯 | RA-FLS    | 上调 cyt-C、 <i>caspase-3</i> 、 <i>Bax</i> , 降低 <i>Bcl-2</i> 蛋白的表达水平                                                                                            | [25] |

2.5 抑制 RA-FLS 迁移和侵袭

RA 的临床特征常表现为关节软骨和骨的侵袭破坏, 具有慢性、进行性和侵袭性等特点。RA-FLS 产生炎症细胞因子, 黏附细胞外基质, 分泌 MMP, 迁移侵袭至关节软骨, 造成软骨侵蚀和骨破坏。槲皮素通过调节 miR-146a/GATA6 途径来抑制 FLS 的迁移和侵袭<sup>[26]</sup>。青蒿琥酯通过 PDK-1 通路抑制 MMP-2 和 MMP-9 的产生, 明显抑制 RA-

FLS 的迁移和侵袭, 并呈剂量依赖性<sup>[27]</sup>。已有证据表明白桦酸可通过 NF- $\kappa$ B 信号通路抑制炎症因子的分泌从而发挥抗 RA 作用<sup>[28]</sup>。另有研究表明白桦酸通过调控 Akt/NF- $\kappa$ B 信号通路的激活发挥抑制 RA-FLS 侵袭和迁移作用, 同时能够通过 NF- $\kappa$ B 通路抑制 RA-FLS 的迁移和侵袭以及炎症因子的分泌<sup>[29-30]</sup>。中药单体抑制 RA-FLS 迁移和侵袭作用机制如表 5 所示。

表 5 中药单体抑制 RA-FLS 迁移和侵袭作用机制

| Tab 5 Mechanism of action of traditional Chinese medicine monomers in inhibiting migration and invasion of RA-FLS |       |                  |                                                                                                                                                                                                                                                 |         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 中药单体                                                                                                              | 化学成分  | 细胞 / 动物模型        | 作用机制                                                                                                                                                                                                                                            | 文献      |
| 槲皮素                                                                                                               | 黄酮类   | RA-FLS           | 调节 miR-146a/GATA6 通路来抑制 FLS 的迁移和侵袭                                                                                                                                                                                                              | [26]    |
| 青蒿琥酯                                                                                                              | 倍半萜酯类 | RA-FLS           | 通过抑制 PDK-1 通路抑制 RA-FLS 的迁移和侵袭以及 MMP-2 和 MMP-9 的表达                                                                                                                                                                                               | [27]    |
| 白桦酸                                                                                                               | 五环三萜类 | CIA 大鼠<br>RA-FLS | 降低 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B-p65、IKK $\alpha$ 、IKK $\beta$ 、VEGF 和 TGF- $\beta$ 的表达水平; 通过 Akt/NF- $\kappa$ B 通路抑制 RA-FLS 的迁移和侵袭; 下调 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 和 IL-17A mRNA 表达和抑制 TNF- $\alpha$ 诱导的 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活 | [28-30] |

2.6 调节细胞免疫

RA 作为一种自身免疫性疾病，其发病机制与免疫细胞关系密切。CD4<sup>+</sup>T 细胞在 RA 发病机制中发挥重要作用，根据其功能、细胞表面标记物和主要转录因子可被分为不同的种类，如 Th1、Th2、Th3、Treg、Th17、Th19、Th22 等 Th 细胞亚群。当树突状细胞等抗原呈递细胞（APCs）呈递抗原时，CD4<sup>+</sup>T 细胞会出现异常活化，表现为 Th1/Th2 和 Th17/Treg 失衡，并迁移到滑膜，通过分泌细胞因子或与其他细胞接触诱导巨噬细胞和 B 细胞的激活和分化<sup>[31-32]</sup>。在 RA 患者体内，CD4<sup>+</sup>T 细胞可以通过与其他细胞接触来激活巨噬细胞，并产生促炎细胞因子如 TNF、IL-1、IL-6 等，从而促进骨和软骨破坏<sup>[33]</sup>。Th1 细胞主要产生 Th1 类细胞因子 IL-2、TNF-β 和 γ 干扰素（IFN-γ）。Th2 细胞主要产生 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 和 IL-13。正常情况下，机体中 Th1/Th2 细胞处于相对平衡的状态，一旦这种平衡状态被打破，很可能造成免疫疾病的发生，如 RA。在自身免疫性和炎症性疾病中，与 CD4<sup>+</sup>T 细胞谱系相关的转录因子，如 *T-bet*、*GATA3*、*ROR*

和 *Foxp3* 分别是 Th1、Th2、Th17 和 Treg 细胞的主要转录调节因子经常发生失调导致 Th1/Th2 细胞之间的平衡被打破<sup>[34]</sup>。已有研究发现在 RA 患者的血清和滑膜液中，TNF-α、IL-1β、IFN-γ、IL-6 水平升高，结果表明患者受累关节存在局部 Th1 型免疫反应，同时伴有 Th1/Th2 型免疫反应失衡<sup>[35]</sup>。

苦参碱通过抑制 NF-κB 信号通路降低 Th1 型细胞因子水平，提高 Th2 型细胞因子水平，从而调节 Th1 型和 Th2 型细胞因子的平衡发挥抗 RA 疗效<sup>[36]</sup>。薯蓣皂苷可调节 CIA 小鼠 Th17 的免疫应答，降低中性粒细胞比例发挥抗关节炎作用<sup>[37]</sup>。青蒿琥酯通过调节细胞免疫应答，诱导 Th17 介导的细胞凋亡来调节 Th17/Treg 平衡达到抗 RA 的目的<sup>[38]</sup>。人参皂苷 CK 是从五加科植物人参中分离得到的人参皂苷的体内活性代谢物，已被证实具有抗肿瘤和抗炎作用<sup>[39-40]</sup>，能够以 β-arrestin1-AP2 依赖的方式触发 IgD-BCR 内化来抑制 B 细胞的活化，从而减轻 CIA 小鼠的严重程度<sup>[41]</sup>；还可以抑制 CIA 小鼠免疫细胞的功能，包括巨噬细胞极化和吞噬功能<sup>[42]</sup>。中药单体调节 RA 细胞免疫作用机制如表 6 所示。

表 6 中药单体调节 RA 细胞免疫作用机制

| Tab 6 Mechanisms of traditional Chinese medicine monomers regulating cellular immunity in rheumatoid arthritis |       |           |                                                                                                                                                                          |         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 中药单体                                                                                                           | 化学成分  | 细胞 / 动物模型 | 作用机制                                                                                                                                                                     | 文献      |
| 苦参碱                                                                                                            | 生物碱   | CIA 大鼠    | 通过抑制 NF-κB 信号通路降低 Th1 型细胞因子 IFN-γ、TNF-α、L-1β，增加 Th2 型细胞因子 IL-4、IL-10 的表达水平                                                                                               | [36]    |
| 薯蓣皂苷                                                                                                           | 皂苷类   | CIA 小鼠    | 抑制 CD4 T 细胞向 Th17 细胞的分化，减少 IL-17A 的产生；降低 Th17 细胞应答，降低中性粒细胞比例                                                                                                             | [37]    |
| 青蒿琥酯                                                                                                           | 倍半萜酯类 | CIA 大鼠    | 降低 Th17 细胞水平，增加 Treg 细胞水平，调节 Th17/Treg 平衡                                                                                                                                | [38]    |
| 人参皂苷 CK                                                                                                        | 皂苷类   | CIA 小鼠    | 通过以 β-arrestin1-AP2 依赖的方式触发 IgD-BCR 内化来抑制 B 细胞的活化从而改善 CIA 小鼠症状；抑制 CIA 小鼠 β-arrestin2、Gαi、TLR4 和 NF-κB 的过度表达，增加 Gas 的表达，促进巨噬细胞 TLR4-Gas 结合，抑制 TLR4-Gαi 结合，降低 M1/M2 巨噬细胞比例 | [41-42] |

2.7 抑制血管生成

血管生成是 RA 的病理特征之一，为病灶组织提供氧气和营养物质，并将免疫细胞募集到炎症部位，介导 RA 的发生发展。血管前期严重的炎症阶段和血管生长高度增加的血管期阶段，维持着 RA 患者的关节炎症和免疫反应。血管内皮生长因子（VEGF）是血管生成过程中的关键细胞因子，能强烈诱导内皮细胞的活化和增殖并在 RA 滑膜组织中高度表达。有研究表明，在 RA 患者的滑膜液和血清中 VEGF 与滑膜炎的严重程度成正相关，在用常规改善疾病的抗风湿药物 c-DMARD 和 b-DMARD 治疗后进行随访采血，发现在 b-DMARD 使用者中，只有血清 VEGF 很好地代表了治疗反应，而 C-反应蛋白（CRP）无论治疗结果如何都非特异性下降，这表明血清 VEGF 的水平在显示治疗反应方面可能比 CRP 更有价值<sup>[43]</sup>。中药单体在抑制 RA 血管生成方面表现出较好的效果。金雀异黄素通过 JAK2/STAT3

通路抑制 IL-6 诱导的 MH7A 细胞 VEGF 表达和血管生成<sup>[44]</sup>。另有研究发现，其可抑制 CIA 小鼠 VEGF 的表达，并阻断滑膜组织的血管生成<sup>[45]</sup>。紫草素通过阻断 PI3K/AKT 和 MAPKs 信号通路发挥抗 RA 血管生成作用，减少 CIA 大鼠关节滑膜组织中的未成熟血管的形成<sup>[46]</sup>。雷公藤甲素可通过 PI3K/AKT 途径抑制 AIA 大鼠的血管生成<sup>[47]</sup>。青藤碱通过抑制血管生成减轻 CIA 小鼠的 RA 的发病程度<sup>[48]</sup>。中药单体抑制 RA 血管生成作用机制如表 7 所示。

2.8 影响细胞自噬

细胞自噬是降解细胞质成分以提供额外能量的一种重要的细胞机制，它通过降解细胞内的病原体、受损的细胞器和蛋白质聚集体来发挥保护作用<sup>[49]</sup>。在 RA 患者体内，自噬往往是失调的，它参与多种免疫和非免疫细胞的成熟、存活和增殖，通过影响淋巴细胞的发育、存活和增殖，调节免疫反应，并可能与 RA-FLS 的凋亡抵抗、破骨细胞



表 7 中药单体抑制 RA 血管生成作用机制

| Tab 7 Mechanisms of traditional Chinese medicine monomers inhibiting angiogenesis in rheumatoid arthritis |        |                              |                                                                                                                                              |         |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 中药单体                                                                                                      | 化学成分   | 细胞 / 动物模型                    | 作用机制                                                                                                                                         | 文献      |
| 金雀异黄素                                                                                                     | 异黄酮衍生物 | MH7A 细胞; EA.hy926 细胞; CIA 小鼠 | 抑制 IL-6 和 VEGF 的表达和 STAT3 的细胞核转位, 通过 JAK2/STAT3 通路抑制 IL-6 诱导的 VEGF 表达和血管生成; 抑制 CIA 小鼠滑膜组织中 VEGF 表达                                           | [44-45] |
| 紫草素                                                                                                       | 萘醌类    | CIA 大鼠                       | 通过阻断 PI3K/AKT 和 MAPKs 信号通路降低 VEGF、VEGFR2、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、PDGE 和 TGF- $\beta$ 的表达; 下调 PI3K 和 Akt 蛋白的表达水平, 同时上调 PTEN 的蛋白和 mRNA 水平 | [46]    |
| 雷公藤甲素                                                                                                     | 环氧二萜内酯 | AIA 大鼠                       | 通过 PI3K/AKT 通路发挥抗 RA 作用, 同时抑制 VEGFA 和 C1QTNF3 的 mRNA 表达水平                                                                                    | [47]    |
| 青藤碱                                                                                                       | 生物碱    | CIA 小鼠                       | 通过 HIF-1 $\alpha$ -VEGF-ANG-1 信号通路抑制 CIA 小鼠血管生成                                                                                              | [48]    |

形成, 骨和软骨破坏有关, 在 RA 发病机制中起着关键作用<sup>[50]</sup>。冬凌草甲素显著降低人 RA-FLS 中 GFP-LC3 的点状数量, 下调 RA-FLS 中 ATG5 和 Beclin1 的自噬蛋白水平, 从而发挥抗 RA 作用<sup>[51]</sup>。瑞香素通过抑制自噬信号通路, 下调自噬相关蛋白 LC3- II/LC3- I 的表达发挥抗 RA 效果<sup>[52]</sup>。小檗碱作用 AIA 大鼠的 RA-FLS 后, 通过抑制自噬相

关蛋白 ATG5、Beclin-1 和 LC3- II 的表达水平, 抑制 PI3K/AKT 信号介导 RA-FLS 细胞自噬<sup>[53]</sup>。雷公藤甲素能浓度依赖性地降低 MH7A 细胞的 LC3 融合蛋白点数、Beclin1 蛋白表达和 LC3- II/LC3- I 比值, 表明其能够抑制 MH7A 细胞的自噬<sup>[54]</sup>。中药单体影响 RA 细胞自噬作用机制如表 8 所示。

表 8 中药单体影响 RA 细胞自噬作用机制

| Tab 8 Mechanisms of traditional Chinese medicine monomers affecting cells autophagy in rheumatoid arthritis |        |           |                                                                                             |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 中药单体                                                                                                        | 化学成分   | 细胞 / 动物模型 | 作用机制                                                                                        | 文献   |
| 冬凌草甲素                                                                                                       | 萜类     | RA-FLS    | 上调 Bax 和 caspase-3 蛋白表达水平, 下调 IL-1 $\beta$ 表达水平以及降低 ATG5、Beclin1 自噬蛋白表达水平 GFP-LC3 的点状数量     | [51] |
| 瑞香素                                                                                                         | 香豆素类   | CIA 大鼠    | 下调 PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制 CIA 大鼠 RA-FLS 增殖, 抑制自噬蛋白 ATG-5、Beclin-1 和 LC3- II/LC3- I 的表达        | [52] |
| 小檗碱                                                                                                         | 生物碱    | AIA 大鼠    | 抑制 ATG5、Beclin-1 和 LC3- II 自噬蛋白的表达水平和诱导 CHOP 表达, 同时通过 PI3K/AKT 信号介导 AIA-FLS 细胞自噬            | [53] |
| 雷公藤甲素                                                                                                       | 环氧二萜内酯 | MH7A 细胞   | 增加 p-Akt/Akt 比值, 抑制 PI3K/AKT 信号通路激活; 下调 MH7A 细胞的 LC3 融合蛋白点数、Beclin1 蛋白表达和 LC3- II/LC3- I 比值 | [54] |

3 总结与展望

RA 是一种慢性炎症性疾病, 其特征是炎症细胞浸润、滑膜增生、血管翳形成和骨破坏等。目前, 临床使用的抗 RA 药物因严重的不良反应而受到限制。非甾体抗炎药和糖皮质激素可以非常有效地缓解 RA 患者的疼痛和僵硬, 但不减缓疾病进展。改善疾病的抗风湿药 (DMARDs) 虽然能够减轻疾病的严重程度, 但是其价格昂贵, 并且往往伴随有严重的胃肠道反应和肝肾功能破坏<sup>[55]</sup>。本文探讨了具有抗 RA 活性的中药单体化合物, 并总结了相关作用机制, 其可能是通过降低炎性细胞因子的表达来减轻炎症, 通过抑制软骨细胞的增殖和促进软骨细胞的凋亡来减轻滑膜组织的增生, 以及通过抑制软骨细胞的降解来防止骨关节的损伤等, 详情见图 1。

大量的研究报道主要集中在萜类、黄酮类和生物碱类化合物, 提示萜类、黄酮类和生物碱类成分或许是中药发挥疗效的关键成分, 如何通过更先进的分离技术挖掘其更多有效的单体成分可能会成为未来时期的一个工作方向。其中, 一些单体化合物能够通过多靶点, 多途径发挥共同的治疗作用, 如

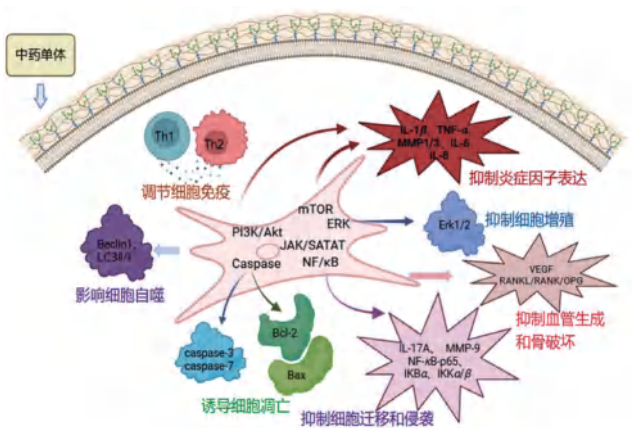


图 1 中药单体抗类风湿关节炎作用机制图  
Fig 1 Mechanisms of anti-rheumatoid arthritis action of traditional Chinese medicine monomers

雷公藤甲素、穿心莲内酯、青藤碱、苦参碱, 青蒿琥酯等。在这些单体化合物中, 雷公藤甲素展现出显著的抗炎、抗血管生成等生物活性, 且已有多个雷公藤甲素衍生物步入临床研究的进程。有临床研究表明, 穿心莲内酯可以降低 RA 患者皮质醇水平, 能在一定程度上缓解患者的应激反应状态, 对于 RA



患者有治疗作用, 这表明穿心莲内酯可能对 RA 具有潜在的辅助治疗效果<sup>[56]</sup>。这些单体成分在抗 RA 方面显示出良好的应用前景, 今后如何利用靶标识别、成分分离等技术, 寻找能与相关信号通路或其上下游分子靶点直接结合的中药单体化合物, 对明确其药效机制、深化 RA 发病机制认识及促进新药研发至关重要。然而, 目前还存在一些问题需要解决, 如何利用先进科学技术手段从中药中分离出更多的活性成分, 明确治疗 RA 的有效物质及作用机制, 并以中医药理论为指导, 探讨不同活性成分、不同提取方式和中药方剂治疗 RA 的临床疗效等。

## 参考文献

- [1] Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2016, 388 (10055): 2023-2038.
- [2] Tobón GJ, Youinou P, Saraux A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: rheumatoid arthritis [J]. *Autoimmun Rev*, 2010, 35 (1): 10-14.
- [3] Yang CL, Or TC, Ho MH, et al. Scientific basis of botanical medicine as alternative remedies for rheumatoid arthritis [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2013, 44 (3): 284-300.
- [4] Zhang CH. Flare-up of cytokines in rheumatoid arthritis and their role in triggering depression: shared common function and their possible applications in treatment (review) [J]. *Biomed Rep*, 2021, 14 (1): 16.
- [5] Dai QD, Zhou D, Xu LP, et al. Curcumin alleviates rheumatoid arthritis-induced inflammation and synovial hyperplasia by targeting mTOR pathway in rats [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 4095-4105.
- [6] Li ZZ, Tan JP, Wang LL, et al. Andrographolide benefits rheumatoid arthritis via inhibiting MAPK pathways [J]. *Inflammation*, 2017, 40 (5): 1599-1605.
- [7] Li X, Wu ZX, He B, et al. Tetrandrine alleviates symptoms of rheumatoid arthritis in rats by regulating the expression of cyclooxygenase-2 and inflammatory factors [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16 (3): 2670-2676.
- [8] Pu J, Fang FF, Li XQ, et al. Matrine exerts a strong anti-arthritis effect on type II collagen-induced arthritis in rats by inhibiting inflammatory responses [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17 (9): 1410.
- [9] Yu HH, Li M, Li YB, et al. Benzoylaconitine inhibits production of IL-6 and IL-8 via MAPK, Akt, NF- $\kappa$ B signaling in IL-1 $\beta$ -induced human synovial cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2020, 43 (2): 334-339.
- [10] Niedermeier M, Pap T, Korb A. Therapeutic opportunities in fibroblasts in inflammatory arthritis [J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2010, 24 (4): 527-540.
- [11] Romas E, Sims NA, Hards DK, et al. Osteoprotegerin reduces osteoclast numbers and prevents bone erosion in collagen-induced arthritis [J]. *Am J Pathol*, 2002, 161 (4): 1419-1427.
- [12] Xu HH, Zhao HY, Lu C, et al. Triptolide inhibits osteoclast differentiation and bone resorption in vitro via enhancing the production of IL-10 and TGF- $\beta$ 1 by regulatory T cells [J]. *Mediators Inflamm*, 2016, 2016: 8048170.
- [13] Liu CF, Zhang YQ, Kong XY, et al. Triptolide prevents bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis by targeting RANKL/RANK/OPG signal pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 626038.
- [14] Liao KS, Su XH, Lei KW, et al. Sinomenine protects bone from destruction to ameliorate arthritis via activating p62<sup>Thr269/Ser272</sup>-Keap1-Nrf2 feedback loop [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 135: 111195.
- [15] Zhu MY, Lin D, Liu J, et al. Artesunate interfere in modulation of Foxp3 expression in synovial cells in collagen-induced arthritis rats [J]. *Chin J Integr Med*, 2016. doi: 10.1007/s11655-016-2611-1.
- [16] Yi L, Lyn YJ, Peng C, et al. Sinomenine inhibits fibroblast-like synoviocyte proliferation by regulating  $\alpha$ 7nAChR expression via ERK/Egr-1 pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 56: 65-70.
- [17] Wang GY, Xie XX, Yuan LL, et al. Resveratrol ameliorates rheumatoid arthritis via activation of SIRT1-Nrf2 signaling pathway [J]. *Biofactors*, 2020, 46 (3): 441-453.
- [18] Li F, Dai MM, Wu H, et al. Immunosuppressive effect of geniposide on mitogen-activated protein kinase signalling pathway and their cross-talk in fibroblast-like synoviocytes of adjuvant arthritis rats [J]. *Molecules*, 2018, 23 (1): 91.
- [19] Kaczanowski S. Apoptosis: its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging [J]. *Phys Biol*, 2016, 13 (3): 031001.
- [20] McInnes IB, Schett G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2017, 389 (10086): 2328-2337.
- [21] Mor A, Abramson SB, Pillinger MH. The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction [J]. *Clin Immunol*, 2005, 115 (2): 118-128.
- [22] Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis [J]. *Immunol Rev*, 2010, 233 (1): 233-255.
- [23] Yang YS, Dong QM, Li RH. Matrine induces the apoptosis of fibroblast-like synoviocytes derived from rats with collagen-induced arthritis by suppressing the activation of the JAK/STAT signaling pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39 (2): 307-316.
- [24] Shin GC, Kim C, Lee JM, et al. Apigenin-induced apoptosis is mediated by reactive oxygen species and activation of ERK1/2 in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes [J]. *Chem Biol Interact*, 2009, 182 (1): 29-36.
- [25] Yan J, Chen Y, He C, et al. Andrographolide induces cell cycle arrest and apoptosis in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2012, 28 (1): 47-56.
- [26] Zhao JY, Chen B, Peng XD, et al. Quercetin suppresses migration and invasion by targeting miR-146a/GATA6 axis in fibroblast-like synoviocytes of rheumatoid arthritis [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2020, 42 (3): 221-227.
- [27] Ma JD, Jing J, Wang JW, et al. A novel function of artesunate on inhibiting migration and invasion of fibroblast-like synov-

- iocytes from rheumatoid arthritis patients [J]. *Arthritis Res Ther*, 2019, 21 (1): 153.
- [28] Liu K, Wang JY, Zhang L, et al. Effects of betulinic acid on synovial inflammation in rats with collagen-induced arthritis [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2020, 34: 2058738420945078.
- [29] Wang J, Zhao Q. Betulinic acid inhibits cell proliferation, migration, and inflammatory response in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120 (2): 2151-2158.
- [30] Li N, Gong ZH, Li XJ, et al. Betulinic acid inhibits the migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 67: 186-193.
- [31] Geng LN, Qiang CX, Zhang X, et al. CCR9<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells are associated with disease activity in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2024, 103 (16): e37803.
- [32] Mai YP, Yu XT, Gao T, et al. Autoantigenic peptide and immunomodulator codelivery system for rheumatoid arthritis treatment by reestablishing immune tolerance [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2024, 16: 20119-20131.
- [33] Zhang DW, Jiang W, Yu Y, et al. Trichinella spiralis paramyosin alleviates collagen-induced arthritis in mice by modulating CD4 T cell differentiation [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25 (12): 6706.
- [34] Mirlekar B. Co-expression of master transcription factors determines CD4 T cell plasticity and functions in auto-inflammatory diseases [J]. *Immunol Lett*, 2020, 222: 58-66.
- [35] Moroz LA, Talako TM, Potapnev MP, et al. Dichotomy of local Th1-and systemic Th2/Th3-dependent types of immune response in rheumatoid arthritis [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2019, 167 (1): 69-73.
- [36] Niu YJ, Dong QM, Li RH. Matrine regulates Th1/Th2 cytokine responses in rheumatoid arthritis by attenuating the NF- $\kappa$ B signaling [J]. *Cell Biol Int*, 2017, 41 (6): 611-621.
- [37] Cao YJ, Xu Y, Liu B, et al. Dioscin, a steroidal saponin isolated from dioscorea nipponica, attenuates collagen-induced arthritis by inhibiting Th17 cell response [J]. *Am J Chin Med*, 2019, 47 (2): 423-437.
- [38] Liu J, Hong XZ, Lin D, et al. Artesunate influences Th17/Treg lymphocyte balance by modulating Treg apoptosis and Th17 proliferation in a murine model of rheumatoid arthritis [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13 (5): 2267-2273.
- [39] Oh JM, Kim E, Chun S. Ginsenoside compound K induces ros-mediated apoptosis and autophagic inhibition in human neuroblastoma cells in vitro and in vivo [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (17): 4279.
- [40] Zhou LP, Chen LL, Wang YQ, et al. Impact of NR1I2, adenosine triphosphate-binding cassette transporters genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of ginsenoside compound K in healthy Chinese volunteers [J]. *J Ginseng Res*, 2019, 43 (3): 460-474.
- [41] Zhang M, Hu SS, Tao J, et al. Ginsenoside compound-K inhibits the activity of B cells through inducing IgD-B cell receptor endocytosis in mice with collagen-induced arthritis [J]. *Inflammopharmacology*, 2019, 27 (4): 845-856.
- [42] Wang R, Zhang M, Hu SS, et al. Ginsenoside metabolite compound-K regulates macrophage function through inhibition of  $\beta$ -arrestin2 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 115: 108909.
- [43] Kim JW, Kong JS, Lee S, et al. Angiogenic cytokines can reflect the synovitis severity and treatment response to biologics in rheumatoid arthritis [J]. *Exp Mol Med*, 2020, 52 (5): 843-853.
- [44] Cheng WX, Huang H, Chen JH, et al. Genistein inhibits angiogenesis developed during rheumatoid arthritis through the IL-6/JAK2/STAT3/VEGF signalling pathway [J]. *J Orthop Translat*, 2020, 22: 92-100.
- [45] Hu YP, Li JC, Qin L, et al. Study in treatment of collagen-induced arthritis in DBA/1 mice model by genistein [J]. *Curr Pharm Des*, 2016, 22 (46): 6975-6981.
- [46] Liu CF, He LH, Wang JX, et al. Anti-angiogenic effect of Shikonin in rheumatoid arthritis by downregulating PI3K/AKT and MAPKs signaling pathways [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 260: 113039.
- [47] Zou Y, Hu WF. Investigation of gene expression profiles in a rat adjuvant arthritis model suggests an effective role of triptolide via PI3K-AKT signaling [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17 (5): 3999-4006.
- [48] Feng ZT, Yang T, Hou XQ, et al. Sinomenine mitigates collagen-induced arthritis mice by inhibiting angiogenesis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 113: 108759.
- [49] Karami J, Masoumi M, Khorramdelazad H, et al. Role of autophagy in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: latest evidence and therapeutic approaches [J]. *Life Sci*, 2020, 254: 117734.
- [50] Vomero M, Barbati C, Colasanti T, et al. Autophagy and rheumatoid arthritis: current knowledges and future perspectives [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1577.
- [51] He SD, Huang SG, Zhu HJ, et al. Oridonin suppresses autophagy and survival in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. *Pharm Biol*, 2020, 58 (1): 146-151.
- [52] Deng HM, Zheng M, Hu ZL, et al. Effects of daphnetin on the autophagy signaling pathway of fibroblast-like synoviocytes in rats with collagen-induced arthritis (CIA) induced by TNF- $\alpha$  [J]. *Cytokine*, 2020, 127: 154952.
- [53] Dinesh P, Rasool M. Berberine mitigates IL-21/IL-21R mediated autophagic influx in fibroblast-like synoviocytes and regulates Th17/Treg imbalance in rheumatoid arthritis [J]. *Apoptosis*, 2019, 24 (7-8): 644-661.
- [54] Xie CM, Jiang J, Liu JP, et al. Triptolide suppresses human synoviocyte MH7A cells mobility and maintains redox balance by inhibiting autophagy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 115: 108911.
- [55] Ben Mrid R, Bouchmaa N, Ainani H, et al. Anti-rheumatoid drugs advancements: new insights into the molecular treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 151: 113126.
- [56] 徐红. 穿心莲内酯对类风湿关节炎患者皮质醇水平影响的临床研究 [D]. 昆明: 昆明医科大学, 2017.

(收稿日期: 2024-10-11; 修回日期: 2024-12-11)

# 酸枣仁抗失眠活性成分及其作用机制研究进展

井泽, 李先娜, 杨波\* (黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

**摘要:** 酸枣仁为鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的干燥成熟种子, 具有养心补肝、宁心安神、敛汗生津的功效, 在中医中被广泛用于治疗失眠。酸枣仁中的主要活性成分集中在皂苷类、黄酮类、生物碱类、脂肪酸类等物质, 如酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B、斯皮诺素、白桦脂酸等, 均具有抗失眠作用。现代药理学研究表明, 酸枣仁及其活性成分可能通过调节肠道菌群、下丘脑-垂体-肾上腺轴、神经递质、炎症因子等作用机制发挥抗失眠作用。本文通过检索近年来国内外相关文献, 对酸枣仁抗失眠活性成分进行筛选, 综述了酸枣仁抗失眠活性成分及其抗失眠作用机制, 以期为抗失眠药物的开发提供参考, 助力中医药在失眠领域的广泛应用。

**关键词:** 酸枣仁; 失眠; 活性成分; 作用机制

**中图分类号:** R283, R285 **文献标识码:** A  
**doi:**10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.036

**文章编号:** 1672-2981(2025)08-2388-07

## Research progress in anti-insomnia active compounds of *Ziziphi Spinosae Semen* and related mechanisms

JING Ze, LI Xian-na, YANG Bo\* (Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040)

**Abstract:** *Ziziphi Spinosae Semen*, the dried mature seeds of *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou, rich in nutrients with health benefits, including nourishing the heart and the liver, calming the mind, and promoting sweat gland function. They are widely used for insomnia. The main active ingredients in jujube seeds included saponins, flavonoids, alkaloids, and fatty acids, such as jujuboside A, jujuboside B, spinosin, and betulinic acid, which all have anti-insomnia effects. Modern pharmacological studies suggest that *Ziziphi Spinosae Semen* and their active ingredients may exert their anti-insomnia effects through regulating the gut microbiome, the hypothalamus-pituitary-adrenal axis, neurotransmitter levels, and inflammatory factors. This article reviewed the anti-insomnia active ingredients and mechanism of *Ziziphi Spinosae Semen* by searching recent literature at home and abroad, providing reference for the development of anti-insomnia drugs and promoting the widespread use of traditional Chinese medicine for insomnia.

**Key words:** *Ziziphi Spinosae Semen*; insomnia; active ingredient; mechanism of action

失眠, 全称睡眠障碍性失眠, 俗称“不寐”或“夜不安眠”。从中医上讲, 失眠是一种由心神失养或不安而导致无法获得正常睡眠的疾病<sup>[1]</sup>。随着生活压力的增大, 失眠发病率不断上升, 22%~35%的人存在这个问题, 并且这个比例每年都在增加<sup>[2]</sup>。失眠的症状主要表现为夜晚入睡困难、夜间频繁醒来、早醒难以入睡及醒后

易感疲倦和记忆力难以集中等。短期失眠会导致白天功能下降和生活质量下降, 长期失眠会显著增加心血管疾病、糖尿病等慢性疾病的风险, 且可能引发记忆力减退、免疫力下降等并发症, 严重影响生命质量和预期寿命。目前临床上治疗失眠的药物主要包括苯二氮草类药物和非苯二氮草类药物, 这些药物长期疗效有限, 且都有一定的

**基金项目:** 中国博士后科学基金第 17 批特别资助 (No. 2024T170257); 黑龙江省自然科学基金面上项目 (No. D200846); 黑龙江省自然科学基金联合引导项目 (No. LH2023H069)。

**作者简介:** 井泽, 女, 硕士研究生, 主要从事中药药效物质基础及质量标准研究, email: 1360112751@qq.com \*通信作者: 杨波, 男, 副研究员, 硕士研究生导师, 主要从事中药药效物质基础及质量标准研究, email: 56024955@qq.com



不良反应，会引起记忆损伤、成瘾、呼吸抑制、运动障碍等<sup>[3]</sup>。因此，迫切需要安全有效、不良反应少、毒副作用小的抗失眠药物。

中医药在改善睡眠方面已有悠久历史，其具有多方位、多成分、多途径、整体调节、辨证论治、作用温和、安全可靠、可通过多靶点实现协同作用等优势，已成为治疗失眠的关键手段<sup>[4]</sup>。酸枣仁，为鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的干燥成熟种子，秋末冬初采收成熟果实，除去果肉和核壳，收集种子，晒干<sup>[5]</sup>。酸枣仁化学成分多样，主要有皂苷类、生物碱类、黄酮类、多糖类及挥发油类等<sup>[6]</sup>，其味甘、酸、平，归心、肝、胆经，具有养心补肝、宁心安神、敛汗生津的功效，在中医中多用于治疗虚烦不眠、惊悸多梦<sup>[7]</sup>，为治疗失眠症的首选中药。现代医学认为酸枣仁对中枢神经系统有良好的镇静催眠效果，能降低失眠复发率，提高睡眠质量。本文通过检索酸枣仁国内外近年来相关文献，筛选并归纳酸枣仁治疗失眠的重要活性成分以及其抗失眠的多种作用机制，旨在为酸枣仁的开发应用以及新失眠药物的开发提供参考。

## 1 酸枣仁的化学成分组成及抗失眠活性成分筛选

酸枣仁主要分布在长江流域以北的广大地区。

酸枣仁化学成分组成多样，主要包括黄酮类、皂苷类、生物碱类、脂肪酸类、多糖类、氨基酸类及挥发油类等<sup>[8]</sup>。截至目前，基于 TCM-Database@Taiwan 数据库 (<http://tcm.cmu.edu.tw/>)、SymMap 数据库 (<http://www.sxmap.org/>) 等分析平台及相关文献检索，共筛选出 150 余种酸枣仁化学成分。进一步通过中药系统药理学数据库和分析平台 (TCMSP, <https://old.tcmsp-e.com/>)，检索酸枣仁相关化学成分，以常规筛选标准口服生物利用度 (OB)  $\geq 30\%$  以及类药性 (DL)  $\geq 0.18$  进行初步筛选，再结合中国知网 (<https://www.cnki.net/>)、PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) 等文献检索网站，以“酸枣仁 (Ziziphi Spinosae Semen/Suanzaoren)”“化学成分 (chemical composition)”“活性成分 (active ingredient)”“成分分析 (component analysis)”，以及“失眠症 (insomnia)”为关键词检索，最终筛选出 14 个酸枣仁治疗失眠潜在的活性成分，主要集中在皂苷类、黄酮类、生物碱类、脂肪酸类等物质。酸枣仁抗失眠主要化学成分为酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B、山柰酚-3-O-芸香糖苷、乌药碱、木兰花碱、N-去甲荷叶碱、白桦脂酸、棕榈酸、斯皮诺素、当药黄素、芫花素等，化学成分复杂多样，多类成分共同发挥抗失眠作用。酸枣仁抗失眠主要活性成分化学结构见图 1。

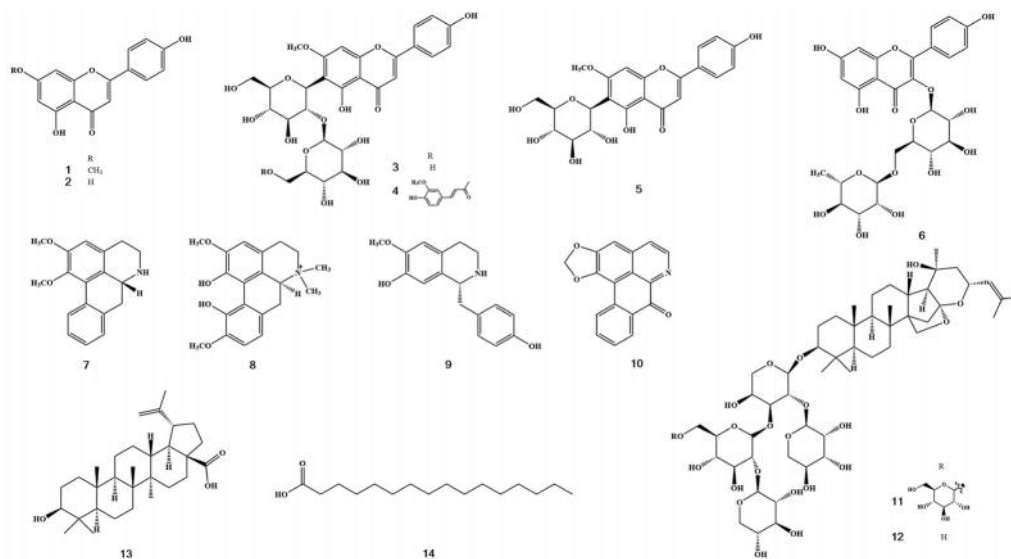


图 1 酸枣仁抗失眠主要活性成分的化学结构

Fig 1 Chemical structures of the main anti-insomnia active components from Ziziphi Spinosae Semen

## 2 酸枣仁及其活性成分治疗失眠症的机制研究

现代医学认为失眠的发病机制复杂多样，目前认为与肠道菌群失衡、下丘脑-垂体-肾上腺轴 (HPA) 轴紊乱、中枢神经递质水平紊乱、炎症因子水平紊乱有关。研究发现，酸枣仁及其活性成

分能有效改善失眠情况，其作用机制主要通过调节肠道菌群回归正常水平，恢复肠道微环境稳态、纠正 HPA 轴失衡、调节中枢神经递质水平、炎症细胞因子水平来延长睡眠时间，提高睡眠质量。

### 2.1 调节肠道菌群

大脑和肠道之间存在联系,具体是指中枢神经系统和肠道之间的双向信号传递通路,称为脑肠轴。肠道菌群可以通过激活脑肠轴影响调节睡眠的神经、内分泌和免疫途径<sup>[9]</sup>。一方面,一些肠道菌群有助于神经递质的合成,如 5-羟色胺(5-HT)、多巴胺(DA)等,这些神经递质通过血脑屏障或迷走神经直接或间接地影响中枢神经系统,从而调节睡眠;另一方面,肠道菌群与肠道相互作用后能够释放细胞因子和趋化因子,这些细胞因子和趋化因子能作用于特定的免疫细胞和神经系统,从而调节睡眠<sup>[10]</sup>。肠道菌群紊乱可能是导致失眠的机制之一<sup>[11]</sup>。研究发现,酸枣仁皂苷 A、B 可以显著提高失眠患者肠道菌群多样性,在门水平上回调占主要丰度的肠道菌群,如厚壁菌门、变形菌门、放线菌门等,在属水平上将异常水平肠道菌群回调至正常水平;且酸枣仁皂苷及其转化产物能够减少小鼠自主活动,延长戊巴比妥钠阈剂量的小鼠睡眠时间,减少小鼠睡眠潜伏期<sup>[12]</sup>。Qiao 等<sup>[13]</sup>基于脑肠轴对失眠大鼠模型谷氨酸  $\gamma$ -氨基丁酸-谷氨酰胺(GLU/GABA-GLN)代谢循环和肠道菌群进行研究,发现模型组大鼠肠道中梭状芽孢杆菌的相对丰度显著增加,海马中 GLU R1 mRNA 的表达也显著增加,得出肠道菌群可以通过脑肠轴调节神经递质受体的表达来影响睡眠;当给予酸枣仁后发现给药组可调节失眠大鼠肠道菌群结构,上调肠道有益菌相对丰度,下调致病菌相对丰度,恢复肠道微环境稳态从而调节睡眠。Wang 等<sup>[14]</sup>对酸枣仁皂苷 A 的镇静催眠作用进行研究,发现酸枣仁皂苷 A 通过调节 GABA 受体亚基 mRNA 的表达和下调肠黏膜系统 GABA 和 GLU 受体相关促炎因子的合成和分泌,并通过血液循环系统传递到大脑,促进脑组织星形胶质细胞向小胶质细胞和内皮细胞传递一系列细胞因子信号,进而调节失眠。何灵等<sup>[15]</sup>从节律生物钟基因水平、肠道菌群、脑代谢组学等多角度对炒酸枣仁治疗失眠小鼠模型进行研究,发现炒酸枣仁可能通过调控乳酸杆菌属促进肠道内合成 5-HT,从而调节睡眠;且还发现炒酸枣仁可以通过增加梭状芽孢杆菌属、乳酸杆菌属、罗氏菌属等有益菌的生长,从而增加短链脂肪酸(如乙酸、丁酸)的产生,进一步调控体内氨基酸代谢通路以及昼夜节律基因的表达来维持宿主昼夜节律稳态。综上所述,酸枣仁及其活性成分能通过调节肠道微生物群及其代谢物,上调有益菌属丰度,下调致病菌属丰

度,参与中枢神经系统、免疫系统的调节,从而发挥改善失眠的作用。

## 2.2 调节 HPA 轴

HPA 轴是神经内分泌系统的一个组成部分,能通过神经-内分泌-免疫网络引起脑功能改变,其功能障碍可导致睡眠和觉醒机制的异常,引起失眠以及其他神经系统疾病<sup>[16]</sup>。在正常机体中,下丘脑室旁核(PVN)分泌促肾上腺皮质激素释放激素(CRH),CRH 作用于垂体前叶的 CRH 受体,导致垂体释放促肾上腺皮质激素(ACTH),ACTH 会作用于肾上腺皮质,导致皮质醇(CORT)的产生与释放,CORT 对 PVN 和垂体前叶进行负反馈调节来控制 CRH 或 ACTH 的合成和释放<sup>[17]</sup>。有研究表明,失眠会增加 HPA 轴的活动,当 HPA 轴活动被增加时会促进睡眠碎片化,会引起 CRH、ACTH、CORT 的周期水平升高<sup>[18]</sup>。Zhu 等<sup>[19]</sup>建立对氯苯丙氨酸(PCPA)失眠小鼠模型,在给予酸枣仁油后失眠小鼠水平和垂直活动均下降,小鼠海马组织损伤有所减轻,血清 CRH、CORT 水平均显著降低。花玥等<sup>[20]</sup>对失眠模型大鼠 HPA 轴功能进行研究,使用酸枣仁醇提物进行干预,发现酸枣仁醇提物可以纠正 HPA 轴功能紊乱,不同程度地改善 HPA 轴相关组织下丘脑、垂体、肾上腺的病理改变,显著降低 HPA 轴相关激素 CRH、ACTH、CORT 的水平,发挥抗失眠作用;且还能降低失眠大鼠血清中白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的表达,缓解由失眠引起的机体炎症反应,同时降低促炎因子对 HPA 轴激素释放作用。有研究表明,Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>共转运体 1(NKCC1)和 K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>共转运体 2(KCC2)表达的改变可以通过影响 CRH,提高 CORT 水平促进 HPA 轴激活,进而导致失眠<sup>[21]</sup>。王婷婷等<sup>[22]</sup>使用酸枣仁干预由戊巴比妥钠阈下剂量诱导的失眠小鼠,发现酸枣仁可以提高失眠小鼠睡眠发生率,显著延长睡眠时间,缩短睡眠潜伏期;降低失眠小鼠垂体中 ACTH 的表达,升高脑组织中 KCC2 mRNA 的表达,降低 NKCC1 mRNA 的表达,从而达到促眠效果,作用机制可能与调控 KCC2、NKCC1 基因表达,抑制 HPA 轴激活有关。胡金颖等<sup>[23]</sup>研究发现酸枣仁中斯皮诺素显著延长失眠小鼠睡眠时间,缩短睡眠潜伏期;酸枣仁总黄酮能通过激活 HPA 轴相关组织下丘脑室旁核 cAMP-PKA-CREB 信号通路,抑制脑组织 c-fos 基因表达和神经细胞凋亡,起到保护脑神经从而缓解失眠的作用。综上所述,酸枣仁及其活性成分能通过纠正 HPA 轴紊乱,抑制 HPA 轴过度激活,



使 HPA 轴相关激素回归正常水平从而改善失眠。

### 2.3 调节中枢神经递质水平

睡眠受多种神经递质控制, 主要包括单胺类神经递质 [如去甲肾上腺素 (NE)、5-HT、DA 等] 和氨基酸类神经递质 [如 GLU 和 GABA 等]<sup>[24]</sup>。DA、NE 作为兴奋性神经递质在促进觉醒过程中发挥关键作用<sup>[25]</sup>, DA 神经元主要通过脑干等位置来促进觉醒时间的延长, NE 的主要合成位点在蓝斑, 其神经元中的蓝斑核系统能够有效促进慢波睡眠<sup>[26]</sup>, 5-HT 主要集中在中脑中缝背核中, 是维持睡眠的关键因素。5-HT 的升高会使 NE 的合成释放减少, 从而使睡眠正常<sup>[27]</sup>。GLU 是 GLN 在谷氨酰胺酶的作用下, 在中枢神经系统中产生的一种兴奋性神经递质, GLU 在突触空间释放, 与受体结合, 具有兴奋作用; GABA 是中枢神经系统中的一种抑制性神经递质, 在谷氨酸脱羧酶 (GAD) 的作用下被 GLU 脱羧<sup>[13]</sup>, GABA 作用于  $\gamma$ -氨基丁酸 A 型 (GABAA) 受体, 激活  $\text{Cl}^-$  通道, 增加  $\text{Cl}^-$  在神经细胞膜上的通透性,  $\text{Cl}^-$  沿浓度梯度进入细胞, 细胞膜负电位增加, 去极化困难, 导致兴奋性降低, 产生镇静催眠作用<sup>[28]</sup>。GLU/GABA 稳态对中枢兴奋性神经元起到抑制作用, 对保持睡眠具有重要作用。Wang 等<sup>[29]</sup>研究发现酸枣仁中斯皮诺素能够拮抗 5-HT<sub>1A</sub> 型 1 亚类受体 (5-HT<sub>1A</sub> 受体), 提高 5-HT 含量, 从而显著增强由戊巴比妥钠诱导的失眠大鼠的睡眠情况, 缩短失眠大鼠睡眠潜伏期, 延长总睡眠时间。Sun 等<sup>[30]</sup>研究发现酸枣仁中白桦脂酸能够显著提高失眠小鼠酪蛋白水平, 调节脑内神经递质, 增强大脑中 GABA 合成, 促进 GABA 受体表达, 降低 GLU 和 NE 表达水平, 且还能下调炎症因子 IL-1 $\beta$  表达, 抑制氧化应激作用, 从而缓解失眠。Xiao 等<sup>[31]</sup>研究发现酸枣仁皂苷能够升高失眠大鼠大脑中 5-HT 和 GABA 的水平, 诱导 GABAAR 基因表达水平升高, 降低失眠大鼠脑中 NE 和 GLU 水平, 增加失眠大鼠总睡眠时间, 从而缓解失眠。Dong 等<sup>[32]</sup>研究发现酸枣仁可以提高失眠小鼠下丘脑 5-HT 和 5-HT<sub>1A</sub> 受体蛋白 (5-HTR<sub>1A</sub>) 的含量, 下调 DA、NE 的含量, 提高血清中 GABA 的水平, 使 GLU/GABA 比值降低, 改善了失眠小鼠下丘脑的组织病理学, 具有改善睡眠的作用。有研究表明, 酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B、棕榈酸、木兰花碱、N-去甲荷叶碱、白桦脂酸均能在与 5-HT 能突触和 GABA 能突触相关的通路中发挥神经保护作用<sup>[33]</sup>; 酸枣仁皂苷 A 能调节海马神经元 GABAA 受体亚

单位的表达, 通过调节 GLU 介导的兴奋信号通路来抑制失眠大鼠海马兴奋状态<sup>[34]</sup>; 酸枣仁皂苷 B 可以上调 GABAA 受体的表达, 增加  $\text{Cl}^-$  通道开放的频率, 产生催眠作用<sup>[35]</sup>。综上所述, 酸枣仁及其活性成分能调节脑内神经递质含量, 提高抑制类神经递质含量, 降低兴奋性神经递质含量, 使神经递质水平回归正常, 从而改善失眠。

### 2.4 调节炎症细胞因子

睡眠对中枢神经系统以及免疫系统具有动态调节作用。当睡眠受到干扰时, 调节免疫系统的效应系统会发生变化, 从而导致炎症反应异常增加<sup>[36]</sup>。失眠会激活炎症信号通路, 如核因子  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ )、活化蛋白 -1 (AP-1) 和信号传导及转录激活因子 (STAT) 家族蛋白等<sup>[37]</sup>, 还会提高编码促炎因子水平的 mRNA 水平, 并增加 Toll 样受体 4 刺激的单核细胞产生的 IL-6 和肿瘤坏死因子 (TNF)<sup>[38]</sup>。在夜间正常睡眠情况下, 与睡眠相关的 TH1 细胞型免疫反应发生转变, T 细胞表达的  $\gamma$  干扰素 (IFN- $\gamma$ )、IL-2、TNF 等增多<sup>[39]</sup>, 表达的抗炎细胞因子 IL-4、IL-6、IL-10 等减少<sup>[40]</sup>。失眠会导致 T 细胞产生的 IFN- $\gamma$ 、IL-2 减少, 向 TH2 型细胞因子活性转移, IL-4、IL-6、IL-10 增多<sup>[41]</sup>。有研究表明, HPA 轴中的 CORT 也可诱导 IFN- $\gamma$ 、IL-2 等的产生减少<sup>[42]</sup>。吴东南等<sup>[43]</sup>研究发现酸枣仁可通过抑制睡眠剥夺大鼠海马中神经炎症 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的 mRNA 以及蛋白表达水平, 减轻睡眠剥夺大鼠海马神经损伤, 使睡眠剥夺大鼠海马 CA3 区神经元排列规则, 细胞周围间隙缩短, 尼氏体丰富, 从而改善失眠情况。赵翠等<sup>[44]</sup>对睡眠剥夺大鼠免疫功能进行研究, 发现酸枣仁提取物能通过升高 T 淋巴细胞活性, 升高 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞比例, 降低 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞比例以及升高 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞比值调节 T 淋巴细胞亚群平衡, 能抑制睡眠剥夺大鼠血清中炎症因子的释放, 如 IL-6、TNF- $\alpha$  等, 改善了睡眠剥夺大鼠的免疫功能紊乱, 从而改善失眠情况。张亚茹<sup>[45]</sup>对昼夜节律紊乱模型小鼠进行研究, 发现酸枣仁皂苷能作用于 IL-6/STAT3 信号通路, 抑制 IL-6/STAT3 蛋白表达以及抑制血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  的表达, 促进 T 淋巴细胞增殖, 调节昼夜节律紊乱, 减轻小鼠炎症反应, 改善小鼠体液免疫功能, 从而改善小鼠失眠。陈倩倩等<sup>[46]</sup>研究发现酸枣仁可通过作用于 TNF- $\alpha$ 、胱天蛋白酶 3 (CASP3)、蛋白激酶 B (AKT1) 等靶点调节炎症信号通路 TNF 信号通路, 显著降低 TNF- $\alpha$  和 CASP3 的含量, 提高 AKT1 蛋白在脑组



织中的表达水平，降低炎症反应，抑制细胞凋亡，恢复海马组织病理损伤，从而显著缩短失眠模型小鼠睡眠潜伏期，延长睡眠持续期，达到治疗失眠的效果。综上所述，酸枣仁及其活性成分能通过调节炎症因子水平，抑制过多炎症因子释放，降低炎症

反应从而改善失眠。

酸枣仁具有抗失眠作用，能够有效改善失眠症状。通过以上归纳总结，明确了酸枣仁及其活性成分抗失眠的作用机制，汇总情况见图 2。酸枣仁抗失眠主要活性成分见表 1。

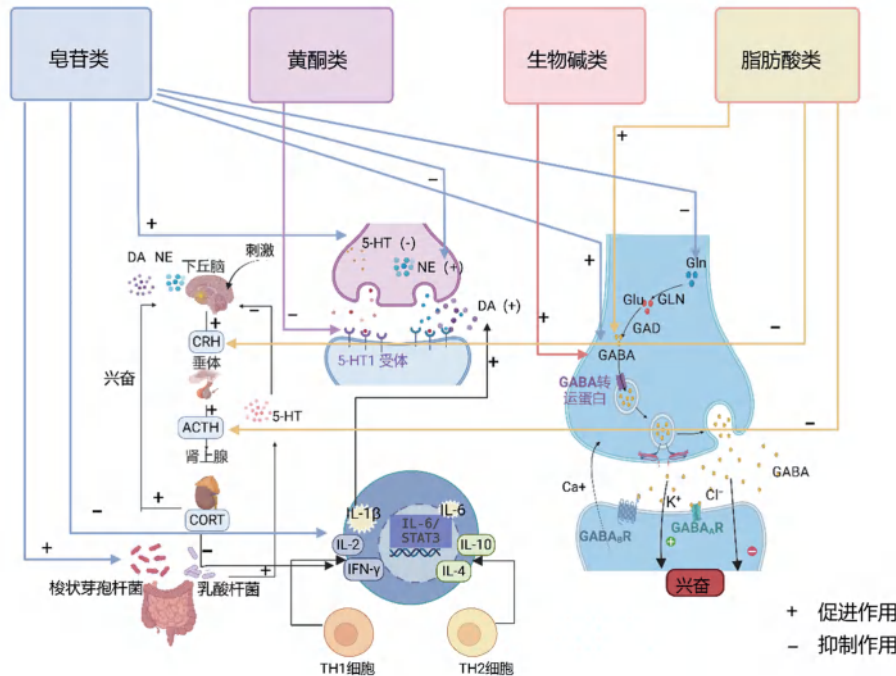


图 2 酸枣仁及其活性成分抗失眠作用机制图

Fig 2 Diagram of the anti-insomnia mechanism of Ziziphi Spinosae Semen and its active components

表 1 酸枣仁抗失眠主要活性成分

Tab 1 Anti-insomnia active components of Ziziphi Spinosae Semen

| 编号 | 中文名称         | 英文名称                        | 成分类型 | 文献           |
|----|--------------|-----------------------------|------|--------------|
| 1  | 芫花素          | genkwanin                   | 黄酮类  | [47]         |
| 2  | 芹菜素          | apigenin                    | 黄酮类  | [47]         |
| 3  | 斯皮诺素         | spinosin                    | 黄酮类  | [10, 29]     |
| 4  | 6"-阿魏酰斯皮诺素   | 6"-O-acetylspinosinolactone | 黄酮类  | [48]         |
| 5  | 当药黄素         | swertisin                   | 黄酮类  | [49]         |
| 6  | 山柰酚-3-O-芸香糖苷 | nicotiflorin                | 黄酮类  | [33]         |
| 7  | N-去甲荷叶碱      | N-nornuciferine             | 生物碱类 | [33]         |
| 8  | 木兰花碱         | magnoflorine                | 生物碱类 | [33]         |
| 9  | 乌药碱          | coclaurine                  | 生物碱类 | [33]         |
| 10 | 鹅掌楸叶碱        | liriodenine                 | 生物碱类 | [33]         |
| 11 | 酸枣仁皂苷 A      | jujuboside A                | 皂苷类  | [10, 12, 33] |
| 12 | 酸枣仁皂苷 B      | jujuboside B                | 皂苷类  | [10, 12, 33] |
| 13 | 白桦脂酸         | betulinic acid              | 三萜类  | [20, 33]     |
| 14 | 棕榈酸          | palmitic acid               | 脂肪酸类 | [33]         |

3 结语与展望

失眠是一种常见的睡眠障碍，是多种高危疾病的潜在发生因素，如何预防和治疗失眠具有重要的现实意义。酸枣仁作为中医首选治疗失眠的

中药，具有疗效持久、回弹小、远期疗效显著、毒副作用少等特点而备受关注<sup>[50]</sup>。本文借助网络药理学理论及相关数据库、分析平台，结合酸枣仁相关文献对其抗失眠活性成分进行筛选，发现酸枣仁抗失眠活性成分复杂多样，可通过多靶点、多种途径协同发挥抗失眠作用，肯定了酸枣仁及其活性成分治疗失眠的可行性，以及具有显著的抗失眠优势及开发价值。酸枣仁抗失眠活性成分集中在皂苷类、黄酮类、生物碱类、脂肪酸类，通过对酸枣仁相关文献梳理并归纳，综述了酸枣仁及其活性成分在治疗失眠中的作用机制：通过调节肠道菌群紊乱，使肠道菌群回调至正常水平；通过纠正 HPA 轴过度激活；通过调节神经递质水平紊乱，降低过高水平的兴奋性神经递质，升高过低水平的抑制性神经递质；通过调节炎症因子水平紊乱，使炎症因子回归正常水平。

已有大量研究资料表明酸枣仁具有良好的抗失眠作用，其中皂苷类成分、黄酮类成分是其镇静安神最为重要的有效成分。酸枣仁中总皂苷类与苯丙胺协同发挥对中枢神经系统的抑制作用，总黄酮类与戊巴比妥钠协同发挥抗失眠作用<sup>[51]</sup>。

但是酸枣仁中各种成分的相互作用以及其活性成分是否能够透过血脑屏障被有效吸收从而达到抗失眠效果以及深层次的分子作用机制还未被阐明, 仍然是需要被解决的问题。因此, 未来可以进一步研究酸枣仁发挥抗失眠作用的多种有效成分及其相互作用以及从细胞、动物多角度深入挖掘酸枣仁发挥抗失眠作用的分子机制。本文通过揭示酸枣仁及其各类活性成分通过多途径发挥抗失眠作用, 提示酸枣仁中的抗失眠活性成分也极具开发成新的抗失眠药物的潜力, 为酸枣仁的深度开发以及抗失眠新药物开发提供参考, 为中医药在抗失眠领域高质量发展、创新助力。

## 参考文献

- [1] 陈旭. 酸枣仁治疗失眠症的研究进展 [J]. 基层中医药, 2024, 3 (8): 99-103.
- [2] Araújo T, Jarrin DC, Leanza Y, et al. Qualitative studies of insomnia: current state of knowledge in the field [J]. Sleep Med Rev, 2017, 31: 58-69.
- [3] de Mendonça FMR, de Mendonça GPRR, Souza LC, et al. Benzodiazepines and sleep architecture: a systematic review [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2023, 22 (2): 172-179.
- [4] 孙敏燕, 郑琴, 魏韶峰, 等. 基于“五脏一体观”探讨中医药治疗阿尔茨海默病的机制研究进展 [J]. 辽宁中医杂志, 2025, 52 (7): 199-208, 225.
- [5] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 382-384.
- [6] Yan Y, Li Q, DU HZ, et al. Determination of five neurotransmitters in the rat brain for the study of the hypnotic effects of Ziziphi Spinosae Semen aqueous extract on insomnia rat model by UPLC-MS/MS [J]. Chin J Nat Med, 2019, 17 (7): 551-560.
- [7] 李舒琪, 孙慧珠, 苏建, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定酸枣仁中 11 个成分的含量 [J]. 中药材, 2024, 47 (9): 2272-2277.
- [8] 甘家霞, 李豆豆, 苏金瑞, 等. 酸枣仁产业现状和发展建议 [J]. 中国现代中药, 2024, 26 (8): 1332-1336.
- [9] Zhu XQ, Han Y, Du J, et al. Microbiota-gut-brain axis and the central nervous system [J]. Oncotarget, 2017, 8 (32): 53829-53838.
- [10] Ren HQ, Kong XP, Zhang Y, et al. The therapeutic potential of Ziziphi Spinosae Semen and Polygalae Radix in insomnia management: insights from gut microbiota and serum metabolomics techniques [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 330: 118255.
- [11] Cryan JF, O' Riordan KJ, Cowan CSM, et al. The microbiota-gut-brain axis [J]. Physiol Rev, 2019, 99 (4): 1877-2013.
- [12] 崔小芳. 酸枣仁总皂苷的肠道菌群体外代谢转化研究 [D]. 太原: 山西中医药大学, 2020.
- [13] Qiao T, Wang Y, Liang K, et al. Effects of the Radix Ginseng and Semen Ziziphi Spinosae drug pair on the GLU/GABA-GLN metabolic cycle and the intestinal microflora of insomniac rats based on the brain-gut axis [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 1094507.
- [14] Wang XX, Ma GI, Xie JB, et al. Influence of JuA in evoking communication changes between the small intestines and brain tissues of rats and the GABAA and GABAB receptor transcription levels of hippocampal neurons [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 159: 215-223.
- [15] 何灵, 张圣美, 陶宇, 等. 基于代谢组学与肠道菌群探讨炒酸枣仁治疗睡眠-觉醒昼夜节律障碍小鼠模型的作用机制 [J]. 中草药, 2024, 55 (18): 6208-6225.
- [16] 李京儒, 赵晋莹, 孙巧悦, 等. 近 10 年电针疗法治疗慢性失眠的机制概况 [J]. 时珍国医国药, 2024, 35 (9): 2235-2238.
- [17] Buckley TM, Schatzberg AF. On the interactions of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and sleep: normal HPA axis activity and circadian rhythm, exemplary sleep disorders [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90 (5): 3106-3114.
- [18] Schüssler P, Kluge M, Gamringer W, et al. Corticotropin-releasing hormone induces depression-like changes of sleep electroencephalogram in healthy women [J]. Psychoneuroendocrinology, 2016, 74: 302-307.
- [19] Zhu J, Zhang HN, Wu JK, et al. A low n-6/n-3 PUFA ratio and high level of dietary  $\alpha$ -linolenic acid improves sleep behavior in mice with insomnia [J]. J Food Sci Technol, 2024, 61 (12): 2377-2387.
- [20] 花玥, 郭盛, 朱悦, 等. 酸枣仁对失眠大鼠 HPA 轴功能的干预作用研究 [J]. 中国现代中药, 2022, 24 (12): 2400-2407.
- [21] O' Toole KK, Hooper A, Wakefield S, et al. Seizure-induced disinhibition of the HPA axis increases seizure susceptibility [J]. Epilepsy Res, 2014, 108 (1): 29-43.
- [22] 王婷婷, 郝蕾, 王芮, 等. 酸枣仁-延胡索配伍对肝郁型失眠小鼠的作用及机制研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32 (5): 619-626.
- [23] 胡金颖, 代立霞, 张丹参, 等. 酸枣仁中黄酮类物质药理作用研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2021, 35 (10): 785-786.
- [24] Szabadi E. Selective targets for arousal-modifying drugs: implications for the treatment of sleep disorders [J]. Drug Discov Today, 2014, 19 (5): 701-708.
- [25] Li BM, Sun Q, Ding FF, et al. Anti-seizure effects of norepinephrine-induced free fatty acid release [J]. Cell Metab, 2025, 37 (1): 223-238. e5.
- [26] 杜泽鹏, 郑秦妮, 张喜武, 等. 黄连阿胶汤治疗失眠的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30 (21): 279-288.
- [27] 康丽杰, 许二平, 丁娜娜, 等. 归脾汤治疗失眠的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40 (12): 64-69.
- [28] Yamatsu A, Yamashita Y, Pandharipande T, et al. Effect of oral  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) administration on

- sleep and its absorption in humans [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2016, 25 (2): 547-551.
- [29] Wang LE, Cui XY, Cui SY, et al. Potentiating effect of spinosin, a C-glycoside flavonoid of *Semen Ziziphi Spinosae*, on pentobarbital-induced sleep may be related to post-synaptic 5-HT (1A) receptors [J]. *Phytomedicine*, 2010, 17 (6): 404-409.
- [30] Sun MZ, Li MN, Cui XW, et al. Terpenoids derived from *Semen Ziziphi Spinosae* oil enhance sleep by modulating neurotransmitter signaling in mice [J]. *Heliyon*, 2024, 10 (5): e26979.
- [31] Xiao HB, Wang YS, Luo ZF, et al. SZSJ protects against insomnia by a decrease in ADMA level and an improvement in DDAH production in sleep-deprived rats [J]. *Life Sci*, 2018, 209: 97-102.
- [32] Dong YJ, Jiang NH, Zhan LH, et al. Soporific effect of modified Suanzaoren decoction on mice models of insomnia by regulating Orexin-A and HPA axis homeostasis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 143: 112141.
- [33] Bian ZH, Zhang WM, Tang JY, et al. Mechanisms underlying the action of *Ziziphi Spinosae Semen* in the treatment of insomnia: a study involving network pharmacology and experimental validation [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 752211.
- [34] You ZL, Xia Q, Liang FR, et al. Effects on the expression of GABAA receptor subunits by jujuboside A treatment in rat hippocampal neurons [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 128 (2): 419-423.
- [35] Song PP, Zhang Y, Ma GJ, et al. Gastrointestinal absorption and metabolic dynamics of Jujuboside A, a saponin derived from the seed of *Ziziphus jujuba* [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65 (38): 8331-8339.
- [36] Irwin MR. Sleep and inflammation: partners in sickness and in health [J]. *Nat Rev Immunol*, 2019, 19 (11): 702-715.
- [37] Irwin MR, Opp MR. Sleep health: reciprocal regulation of sleep and innate immunity [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2017, 42 (1): 129-155.
- [38] Wright KP Jr, Drake AL, Frey DJ, et al. Influence of sleep deprivation and circadian misalignment on cortisol, inflammatory markers, and cytokine balance [J]. *Brain Behav Immun*, 2015, 47: 24-34.
- [39] Redwine L, Dang J, Hall M, et al. Disordered sleep, nocturnal cytokines, and immunity in alcoholics [J]. *Psychosom Med*, 2003, 65 (1): 75-85.
- [40] Lange T, Dimitrov S, Fehm HL, et al. Shift of monocyte function toward cellular immunity during sleep [J]. *Arch Intern Med*, 2006, 166 (16): 1695-1700.
- [41] Lange T, Dimitrov S, Fehm HL, et al. Sleep-like concentrations of growth hormone and cortisol modulate type1 and type2 in-vitro cytokine production in human T cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2006, 6 (2): 216-225.
- [42] Lange T, Dimitrov S, Born J. Effects of sleep and circadian rhythm on the human immune system [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1193: 48-59.
- [43] 吴东南, 刘玲, 郭丽珍, 等. 酸枣仁汤抑制神经炎症减轻睡眠剥夺大鼠海马神经损伤的研究 [J]. *湖北中医药大学学报*, 2021, 23 (1): 10-14.
- [44] 赵翠, 张颖, 王璐, 等. 酸枣仁提取物对睡眠剥夺大鼠免疫功能的影响 [J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36 (16): 1941-1945.
- [45] 张亚茹. 酸枣仁皂苷调节昼夜节律紊乱对肺癌的调节作用 [D]. 郑州: 河南大学, 2023.
- [46] 陈倩倩, 徐佳祺, 王长江. 基于网络药理学和分子对接探讨“酸枣仁-石菖蒲”药对改善小鼠失眠的机制 [J]. *中国现代应用药学*, 2023, 40 (14): 1917-1925.
- [47] Yan Y, Liu JX, Zhang M, et al. A strategy to explore the quality markers of *Ziziphi Spinosae semen* by combining metabolic in vivo study with network pharmacology [J]. *Biomed Chromatogr*, 2023, 37 (1): e5530.
- [48] Fan LL, Gu CW, Jiang Y, et al. Screening of different chemical components of sedative and hypnotic effects of *Ziziphi Spinosae Semen* before and after frying and determination of the Q-Marker [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2022, 1207: 123349.
- [49] Wang LX, Liu FX, Li WX, et al. Study on the composition and mechanism of Santiao Decoction in treating insomnia based on UPLC and network pharmacology and molecular docking technology [J]. *Comb Chem High Throughput Screen*. doi: 10.2174/1386207326666230426093326.
- [50] Zhao XW, Hou T, Zhou H, et al. Multi-effective components and their target mechanism of *Ziziphi Spinosae Semen* in the treatment of insomnia [J]. *Fitoterapia*, 2023, 171: 105712.
- [51] 张野. 酸枣仁中镇静安神有效部位及其成型工艺研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2013.

(收稿日期: 2024-12-27; 修回日期: 2025-03-18)



## 药物分析与检验

## 超高效液相色谱-质谱联用技术评价更年宁中人参投料情况

蒋芦荻, 杨琰, 刘亚楠, 王海波\*, 李海燕, 王晓燕 (河南省药品医疗器械检验院, 国家药品监督管理局中药材及饮片质量控制重点实验室, 郑州 450018)

**摘要:** 目的 建立 UPLC-MS/MS 法同时测定更年宁中拟人参皂苷  $F_{11}$ 、人参皂苷  $Rg_1$ 、人参皂苷  $Re$ 、人参皂苷  $Rf$  和人参皂苷  $Rb_1$  共 5 个成分的含量, 拟定拟人参皂苷  $F_{11}$  含量限度和人参皂苷类成分含量限度, 评价更年宁中西洋参掺伪情况和人参投料质量。方法 采用 Thermo Fisher Hypersil GOLD VANQUISH  $C_{18}$  色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.9  $\mu$ m), 以乙腈-四氢呋喃-20 mmol·L<sup>-1</sup> 甲酸铵溶液 (22.5:2.5:75) 为流动相, 流速为 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量为 5  $\mu$ L; 电喷雾离子源 (ESI), 负离子检测, 多反应监测模式 (MRM) 进行定量分析。结果 拟人参皂苷  $F_{11}$ 、人参皂苷  $Rg_1$ 、人参皂苷  $Re$ 、人参皂苷  $Rf$  和人参皂苷  $Rb_1$  的线性范围分别为 5.7~1431、96.2~3846、99.0~3960、10.4~2592、97.0~3882  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>, 线性相关系数  $r$  均  $\geq 0.9994$ ; 平均回收率 ( $n=6$ ) 在 97.6%~101.7%,  $RSD$  在 1.5%~2.6%。44 批次更年宁样品中, 有 9 批次未检出拟人参皂苷  $F_{11}$ , 其余 35 批次含量范围为 0.4~52.1  $\mu$ g·g<sup>-1</sup>; 有 3 批次未检出人参皂苷  $Rf$ , 其余 41 批次含量范围为 0.4~25.9  $\mu$ g·g<sup>-1</sup>; 人参皂苷  $Rg_1$ 、人参皂苷  $Re$  和人参皂苷  $Rb_1$  的含量分别为 3.0~32.5、7.7~181.8、4.2~83.2  $\mu$ g·g<sup>-1</sup>。35 批次样品不符合拟订限度, 其中, 26 批次样品拟人参皂苷  $F_{11}$  含量超出拟订限度, 提示存在以西洋参掺伪人参投料的情况; 其余 9 批次样品未检出西洋参掺伪投料, 但人参皂苷类成分含量低于拟订限度, 提示存在以劣质人参投料或少投料的情况。结论 所建立的方法专属性强、准确可靠, 可用于更年宁中人参的质量评价。  
**关键词:** 更年宁; 人参; 西洋参; 掺伪; 质量评价; 拟人参皂苷  $F_{11}$ ; 人参皂苷  
**中图分类号:** R927, R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)08-2395-07  
**doi:**10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.037

Quality evaluation of *Panax ginseng* in Gengnianning by UPLC-MS/MS

JIANG Lu-di, YANG Yan, LIU Ya-nan, WANG Hai-bo\*, LI Hai-yan, WANG Xiao-yan (Henan Institute for Drug and Medical Device Inspection, State Drug Administration Key Laboratory of Quality Control of Chinese Herbal Medicines and Decoction Pieces, Zhengzhou 450018)

**Abstract: Objective** To determine 5 components (pseudo-ginsenoside  $F_{11}$ , ginsenoside  $Rg_1$ , ginsenoside  $Re$ , ginsenoside  $Rf$ , and ginsenoside  $Rb_1$ ) in Gengnianning by UPLC-MS/MS and propose the limits of pseudo-ginsenoside  $F_{11}$  and ginsenosides, to evaluate the quality of *Panax ginseng* in Gengnianning. **Methods** UPLC was performed on Thermo Fisher Hypersil GOLD VANQUISH  $C_{18}$  column (100 mm×2.1 mm, 1.9  $\mu$ m) with acetonitrile-tetrahydrofuran-20 mmol·L<sup>-1</sup> ammonium formate (22.5:2.5:75) as the mobile phase at 0.3 mL·min<sup>-1</sup>. The injection volume was 5  $\mu$ L. Detection was conducted on a triple quadrupole mass spectrometer in a negative ion mode with an electrospray ion source (ESI). Multiple reaction monitoring (MRM) mode was used. **Results** The calibration curves were linear within 5.7~1431, 96.2~3846, 99.0~3960, 10.4~2592, and 97.0~3882  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> for pseudo-ginsenoside  $F_{11}$ , ginsenoside  $Rg_1$ , ginsenoside  $Re$ , ginsenoside  $Rf$ , and ginsenoside  $Rb_1$ , respectively. All the 5 components

**基金项目:** 2022 年国家药品抽检计划 (中央补助地方经费项目) (No.41); 河南省市场监督管理局科技计划项目 (No.2023sj61); 中国药品监管科学行动计划第二批重点项目 (No.NMPAJGKX-2023-029)。

**作者简介:** 蒋芦荻, 女, 主管中药师, 主要从事中药质量控制研究, email: jiangludi\_52@163.com \*通信作者: 王海波, 男, 主任药师, 主要从事中药质量控制研究, email: gnn2022gc@163.com

showed good linearity ( $r \geq 0.9994$ ). The average recoveries ( $n = 6$ ) were at 97.6% ~ 101.7% with RSDs within 1.5% ~ 2.6%. Totally 9 of the 44 batches samples failed to detect pseudo-ginsenoside  $F_{11}$ , and the content of the rest 35 batches ranged 0.4 ~ 52.1  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ . Ginsenoside Rf was not detected in 3 batches, and the content of the other 41 batches ranged 0.4 ~ 25.9  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ . The content of ginsenoside  $R_{g1}$ , ginsenoside Re and ginsenoside  $R_{b1}$  was 3.0 ~ 32.5, 7.7 ~ 181.8, and 4.2 ~ 83.2  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ . Totally 35 sample batches did not comply with the proposed limits. Totally 26 batches of samples exceeded the proposed limit of pseudo-ginsenoside  $F_{11}$  indicating adulteration with *Panax quinquefolium*. The remaining 9 batches were not adulterated with *Panax quinquefolium*, while the content of ginsenosides was lower than the proposed limit, suggesting inferior *Panax ginseng* or low feeding of *Panax ginseng*. **Conclusion** The established method is specific, accurate and reliable, which can be used to detect the *Panax quinquefolium* in Gengnianning and control the quality of *Panax ginseng* in Gengnianning.

**Key words:** Gengnianning; *Panax ginseng*; *Panax quinquefolium*; adulteration; quality evaluation; pseudo-ginsenoside  $F_{11}$ ; ginsenoside

人参为五加科植物人参 *Panax ginseng* C.A. Mey 的干燥根和根茎, 性微温, 具有大补元气、复脉固脱、补脾益肺等功效<sup>[1-2]</sup>。西洋参为五加科植物西洋参 *Panax quinquefolium* L. 的干燥根, 性凉, 具有补气养阴、清热生津的功效<sup>[3]</sup>。人参与西洋参为同科同属药材, 外观性状相似; 人参与西洋参所含化学成分相似, 且西洋参中人参皂苷 Re 与 人参皂苷  $R_{b1}$  的含量远高于人参<sup>[4-5]</sup>; 西洋参生长周期较人参短, 种植成本低。近年来, 多有西洋参或其边角料冒充人参进行含人参制剂投料生产的情况<sup>[6-10]</sup>。代谢组学研究表明, 人参可使机体氨基酸代谢、脂和脂肪酸代谢等能量代谢水平升高, 西洋参则使机体代谢处于较低水平, 氨基酸代谢异常<sup>[11-12]</sup>。两者药效不同, 西洋参掺伪人参投料, 影响药品疗效, 有用药安全风险。

更年宁由柴胡、黄芩、人参等 22 味中药组成, 具有疏肝解郁、益气养血、健脾安神的功效。现行质量标准收载于《卫生部药品标准》中药成方制剂第六册, 标准中缺乏人参的质量控制项目<sup>[13]</sup>。更年宁处方组成复杂, 且人参仅占处方量的 0.98%, 高效液相色谱法难以对此基质复杂、待测成分含量低的体系进行分析, 故本研究采用了专属性强、灵敏度高的 UPLC-MS/MS 技术对更年宁中人参投料情况进行评价。《中国药典》2020 年版一部收载的人参及含人参制剂的质量标准中, 含量测定项以人参皂苷  $R_{g1}$ 、人参皂苷 Re 和 人参皂苷  $R_{b1}$  为指标成分, 三者可作为更年宁中人参投料质量的评价指标。西洋参特征性成分为拟人参皂苷  $F_{11}$ <sup>[14]</sup>, 人参特征性成分为人参皂苷 Rf<sup>[4-5]</sup>, 两者可分别作为西洋参掺伪和人参投料与否的评价指标。本研究建立了同时测定更年宁中拟人参皂苷  $F_{11}$ 、人参皂苷  $R_{g1}$ 、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rf 和 人参皂苷  $R_{b1}$  共 5 个成分含量的方法。从西洋参掺伪检查和人参投料质量评价两个方面, 对更年宁中

人参投料情况进行全面分析, 为人参在中药制剂投料掺伪及减量等问题的监管提供技术支持。

## 1 仪器与试剂

Thermo Fisher TSQ Altis 三重四极杆液相色谱-质谱联用仪; Mettler XPE205 电子天平 (十万分之一, Mettler Toledo 公司); KQ-300DA 型数控超声波清洗仪 (昆山市超声仪器有限公司, 超声功率: 300 W, 频率: 40 kHz)。

对照品拟人参皂苷  $F_{11}$  (批号: 110841-202209, 含量以 99.5% 计)、人参皂苷 Rf (批号: 111719-201806, 含量以 100% 计)、人参皂苷  $R_{g1}$  (批号: 110703-202235, 含量以 98.5% 计)、人参皂苷 Re (批号: 110754-202129, 含量以 96.0% 计)、人参皂苷  $R_{b1}$  (批号: 110704-202230, 含量以 95.1% 计) 及对照药材人参 (批号: 120917-201712)、西洋参 (批号: 120997-201810) (中国食品药品检定研究院)。甲醇 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司), 乙腈 (色谱纯, 默克), 四氢呋喃 (色谱纯, 科密欧化学试剂有限公司), 甲酸铵 (质谱级, 赛默飞), 实验用水为 Milli-Q 系统制备。

更年宁 44 批次 (5 家生产企业) 均为 2022 年国家药品抽检样品, 均为水蜜丸; 收集到人参样品 4 批、西洋参样品 10 批, 分别经河南省药品医疗器械检验院刘亚楠副主任中药师鉴定为五加科植物人参 *Panax ginseng* C.A. Mey. 的干燥根、五加科植物西洋参 *Panax quinquefolium* L. 的干燥根; 阴性样品为自制缺人参药味的更年宁 1 批。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱-质谱条件

采用 Thermo Fisher Hypersil GOLD VANQUISH  $C_{18}$  色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.9  $\mu\text{m}$ ), 以乙腈-四氢呋喃-20 mmol · L<sup>-1</sup> 甲酸铵溶液 (22.5 : 2.5 : 75)

为流动相，流速为  $0.3\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ，进样量为  $5\text{ }\mu\text{L}$ 。

采用电喷雾离子源 (ESI)，负离子扫描，多反应监测 (MRM) 模式，离子喷雾电压  $2500\text{ V}$ ，鞘气  $50\text{ Arb}$ ，辅助气  $10\text{ Arb}$ ，蒸发温度  $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，离子传输管温度  $325\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。各化合物质谱参数见表 1，5 个待测成分及阴性样品溶液的总离子流图见图 1。

表 1 各化合物色谱及质谱测定参数

Tab 1 Chromatographic and mass spectral parameters of components

| 成分                    | 保留时间 /min | 母离子 $m/z$ | 子离子 $m/z$          | 碰撞能量 /eV |
|-----------------------|-----------|-----------|--------------------|----------|
| 拟人参皂苷 $\text{F}_{11}$ | 10.83     | 845.5     | 799.4 <sup>*</sup> | 25       |
|                       |           | 845.5     | 653.4              | 35       |
| 人参皂苷 $\text{Rg}_1$    | 2.68      | 845.5     | 799.4 <sup>*</sup> | 25       |
|                       |           | 845.5     | 637.4              | 33       |
| 人参皂苷 $\text{Re}$      | 2.74      | 945.5     | 637.4              | 43       |
|                       |           | 945.5     | 475.3 <sup>*</sup> | 55       |
| 人参皂苷 $\text{Rf}$      | 13.40     | 845.5     | 799.4 <sup>*</sup> | 18       |
|                       |           | 845.5     | 637.3              | 38       |
|                       |           | 845.5     | 475.3              | 45       |
| 人参皂苷 $\text{Rb}_1$    | 19.21     | 1107.6    | 945.5 <sup>*</sup> | 47       |
|                       |           | 1107.6    | 783.4              | 58       |

注 (Note): <sup>\*</sup> 定量离子对 (quantitative ion pairs)。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品储备液 分别取拟人参皂苷  $\text{F}_{11}$ 、人参皂苷  $\text{Rg}_1$ 、人参皂苷  $\text{Re}$ 、人参皂苷  $\text{Rf}$  和人参皂苷  $\text{Rb}_1$  对照品适量，精密称定，加甲醇制成每  $1\text{ mL}$  各含  $200\text{ }\mu\text{g}$  的对照品储备液。

2.2.2 供试品溶液 取本品适量，研碎，取约  $1.0\text{ g}$ ，

精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入  $50\%$  甲醇  $25\text{ mL}$ ，密塞，称定重量，超声处理 (功率  $300\text{ W}$ ，频率  $40\text{ kHz}$ )  $30\text{ min}$ ，放冷，再称定重量，用  $50\%$  甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.2.3 西洋参药材溶液 取西洋参药材约  $0.5\text{ g}$ ，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入  $50\%$  甲醇  $25\text{ mL}$ ，按“2.2.2”项下方法制备，精密吸取续滤液  $1\text{ mL}$ ，置  $50\text{ mL}$  量瓶中，用  $50\%$  甲醇稀释至刻度，摇匀，即得。

2.2.4 人参药材溶液 取人参药材约  $0.5\text{ g}$ ，精密称定，按“2.2.3”项下方法制备，即得。

2.2.5 阴性样品溶液 取缺人参的阴性样品，按“2.2.2”项下方法制备，即得。

2.3 方法学研究

2.3.1 线性关系考察及定量限测定 分别精密量取“2.2.1”项下各对照品储备液适量，以甲醇配制系列浓度 ( $n = 5$ ) 混合对照品溶液，按“2.1”项下条件进样测定，以进样浓度 ( $X$ ,  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 为横坐标，峰面积积分值 ( $Y$ ) 为纵坐标对各成分进行线性回归，5 个成分的线性范围、回归方程、相关系数见表 2，各成分在各自浓度范围内与峰面积线性关系良好。将混合对照品溶液稀释至不同浓度，进样测定，以信噪比  $3 : 1$  时的对照品质量浓度为各分析物的检测限 (LOD)， $10 : 1$  时的对照品质量浓度为各分析物的定量限 (LOQ)，结果见表 2。

表 2 5 个成分的回归方程、线性范围、LOD 及 LOQ

Tab 2 Linearity, regression equation, LOD and LOQ of 5 components

| 成分                    | 线性方程                 | $r$    | 线性范围 / ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | 检测限 / ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | 定量限 / ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) |
|-----------------------|----------------------|--------|---------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|
| 拟人参皂苷 $\text{F}_{11}$ | $Y = 389X + 2559$    | 0.9999 | $5.7 \sim 1431$                             | 2.10                                       | 5.7                                        |
| 人参皂苷 $\text{Rg}_1$    | $Y = 190.5X - 679.1$ | 0.9994 | $96.2 \sim 3846$                            | 0.96                                       | 2.9                                        |
| 人参皂苷 $\text{Re}$      | $Y = 29.02X - 238.1$ | 0.9999 | $99.0 \sim 3960$                            | 0.99                                       | 3.0                                        |
| 人参皂苷 $\text{Rf}$      | $Y = 294.4X + 355.2$ | 0.9999 | $10.4 \sim 2592$                            | 1.00                                       | 3.1                                        |
| 人参皂苷 $\text{Rb}_1$    | $Y = 90.03X - 87.36$ | 0.9997 | $97.0 \sim 3882$                            | 0.97                                       | 2.9                                        |

2.3.2 精密度试验 取拟人参皂苷  $\text{F}_{11}$ 、人参皂苷  $\text{Rg}_1$ 、人参皂苷  $\text{Re}$ 、人参皂苷  $\text{Rf}$ 、人参皂苷  $\text{Rb}_1$  质量浓度分别为  $57.2$ 、 $384.6$ 、 $396.0$ 、 $103.7$ 、 $388.2\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的混合对照品溶液，连续进样 6 次，结果 5 个成分峰面积的  $RSD$  分别为  $0.12\%$ 、 $1.6\%$ 、 $1.0\%$ 、 $1.0\%$ 、 $1.2\%$ ，表明仪器的精密度良好。

2.3.3 重复性试验 分别精密称取同一更年宁样品 (批号: 210201) 6 份，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下条件进样测定，测得拟人参皂苷  $\text{F}_{11}$ 、人参皂苷  $\text{Rg}_1$ 、人参皂苷  $\text{Re}$ 、人参皂苷  $\text{Rf}$ 、人参皂苷  $\text{Rb}_1$  的平均含量分别为  $44.9$ 、 $19.4$ 、 $132.5$ 、 $4.0$ 、 $81.5\text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ， $RSD$  分别为  $1.5\%$ 、 $2.8\%$ 、 $2.7\%$ 、 $1.2\%$ 、 $1.1\%$ ，表明本方法的重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 取“2.3.3”项下供试品溶液，

分别于  $0$ 、 $2$ 、 $4$ 、 $8$ 、 $12$ 、 $24\text{ h}$  按“2.1”项下条件进样，测定峰面积，结果拟人参皂苷  $\text{F}_{11}$ 、人参皂苷  $\text{Rg}_1$ 、人参皂苷  $\text{Re}$ 、人参皂苷  $\text{Rf}$ 、人参皂苷  $\text{Rb}_1$  峰面积的  $RSD$  分别为  $2.1\%$ 、 $2.0\%$ 、 $2.3\%$ 、 $2.0\%$ 、 $2.0\%$ ，表明供试品溶液在  $24\text{ h}$  内稳定性良好。

2.3.5 回收试验 精密称取已测知 5 个成分含量的更年宁样品 (批号: 21030536) 粉末  $0.5\text{ g}$  共 6 份，分别精密加入拟人参皂苷  $\text{F}_{11}$ 、人参皂苷  $\text{Rg}_1$ 、人参皂苷  $\text{Re}$ 、人参皂苷  $\text{Rf}$ 、人参皂苷  $\text{Rb}_1$  质量浓度分别为  $227.9$ 、 $576.8$ 、 $990.7$ 、 $622.2$ 、 $776.4\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的混合对照品溶液  $25\text{ mL}$ ，按“2.2.2”项下方法平行制备供试品溶液，进样测定，结果拟人参皂苷  $\text{F}_{11}$ 、人参皂苷  $\text{Rg}_1$ 、人参皂苷  $\text{Re}$ 、人参皂苷  $\text{Rf}$ 、人参皂苷  $\text{Rb}_1$  的平均回收率分别为  $99.1\%$ 、 $97.6\%$ 、 $101.7\%$ 、 $99.7\%$ 、



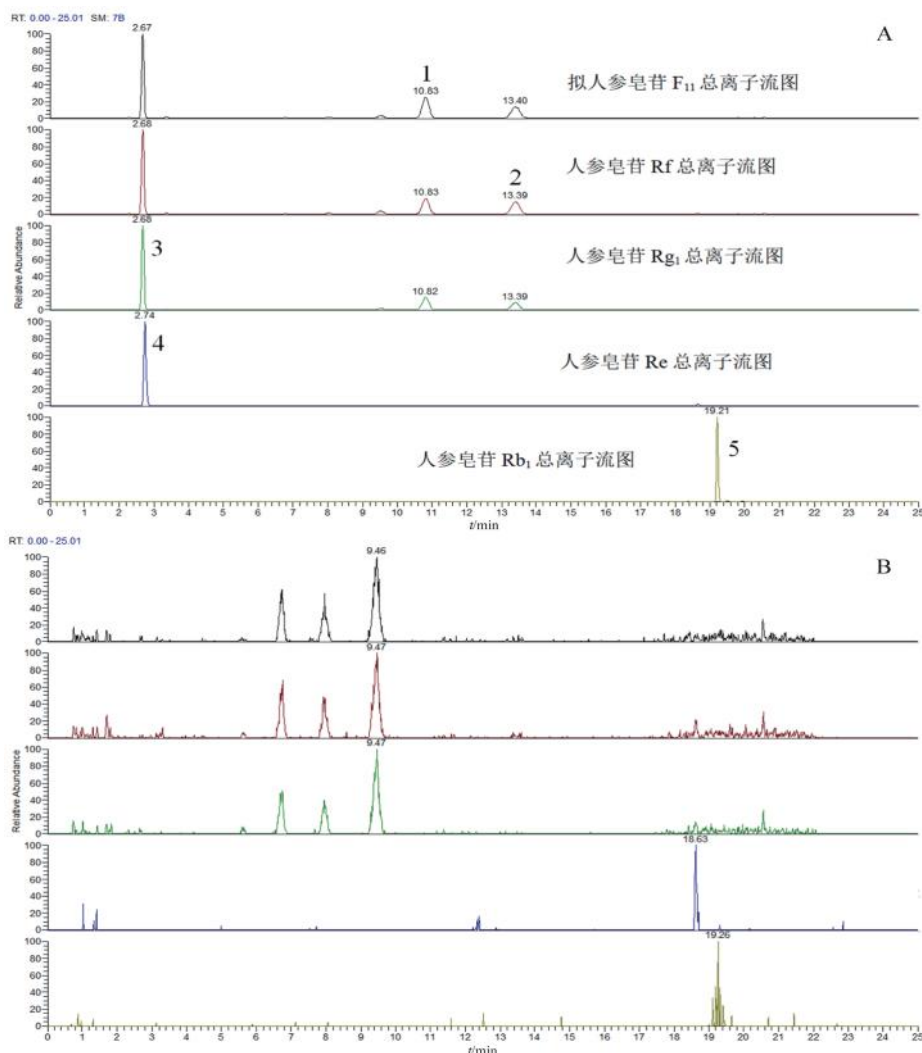


图 1 5 个待测成分 (A) 和阴性样品溶液 (B) 的总离子流图

Fig 1 Total ion chromatogram of 5 investigated components (A) and negative sample solution (B)

1. 拟人参皂苷 F<sub>11</sub> (pseudo-ginsenoside F<sub>11</sub>); 2. 人参皂苷 Rf (ginsenoside Rf); 3. 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> (ginsenoside Rg<sub>1</sub>); 4. 人参皂苷 Re (ginsenoside Re); 5. 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> (ginsenoside Rb<sub>1</sub>)

98.9%, RSD 分别为 1.6%、2.0%、2.3%、1.5%、2.6%。

**2.3.6 西洋参掺伪检查的专属性考察** 取对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液, 依照“2.1”项下条件进行检测, 结果显示, 阴性样品溶液中特征离子对均未检出, 阴性样品无干扰。拟人参皂苷 F<sub>11</sub> 色谱峰保留时间为 10.8 min, 其 MRM 提取离子流图见图 2。

## 2.4 限度拟订

**2.4.1 拟人参皂苷 F<sub>11</sub> 限度拟订** 对 11 批西洋参药材和 5 批人参药材进行拟人参皂苷 F<sub>11</sub> 含量测定, 结果见表 3。

11 批西洋参药材中拟人参皂苷 F<sub>11</sub> 含量平均值为 2622.3  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。为进一步明确西洋参中拟人参皂苷 F<sub>11</sub> 的含量, 本研究进行文献调研, 以“西洋参”“拟人参皂苷 F<sub>11</sub>”为关键词, 检索中国知网近 5 年的相关文献, 收集 3 篇文献<sup>[15-17]</sup>共 52 批西洋参药材数据, 西洋参中拟人参皂苷 F<sub>11</sub> 含量范围为

550 ~ 4960  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ , 平均含量约为 2000  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。考虑上述数据检测方法不同, 未与自测结果合并计算。本研究以自测的 11 批西洋参中拟人参皂苷 F<sub>11</sub> 含量平均值为参考, 拟订更年宁中西洋参掺伪检查的限度。《中国药典》2020 年版四部通则“0212 药材和饮片检定通则”中规定药屑杂质通常不得过 3%, 考虑质谱仪器的检测误差及人参中可能存在的极微量拟人参皂苷 F<sub>11</sub> 的情况, 拟订西洋参的检出比例不得超过 10%<sup>[3-7]</sup>。按处方折算更年宁中拟人参皂苷 F<sub>11</sub> 限度, 应不得过 2.6  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

**2.4.2 人参皂苷类成分限度拟订** 根据《国家药品标准工作手册》中药标准中药成方制剂含量限定的确定要求, 原粉入药的转移率一般要求在 70% 以上<sup>[18]</sup>。参考《中国药典》2020 年版一部“人参”项下规定, 拟订更年宁中人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 和人参皂苷 Re 的总量不得少于 17.9  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ , 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 的含

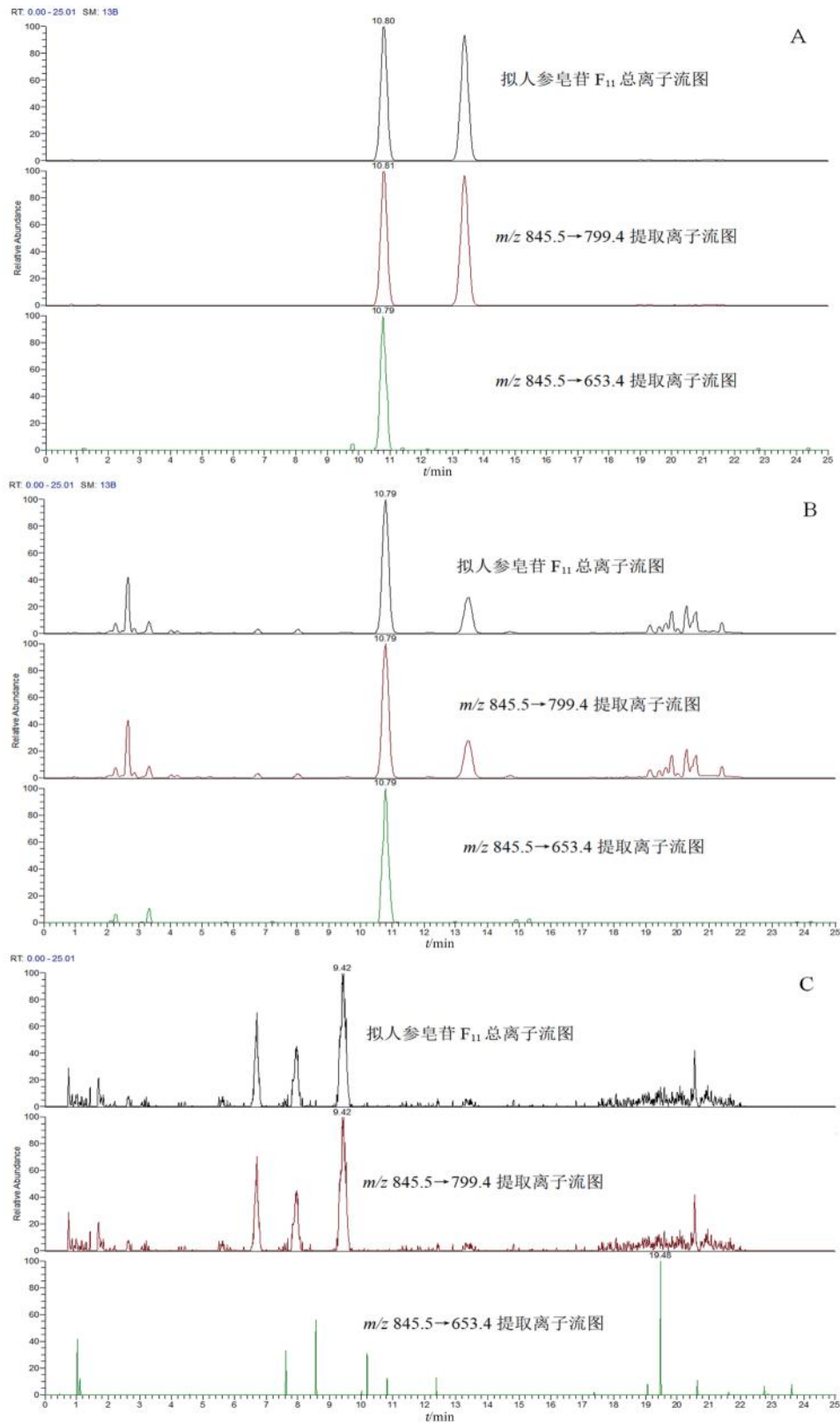


图2 对照品溶液 (A)、供试品溶液 (B) 和阴性样品溶液 (C) 的 MRM 提取离子流图

Fig 2 Extraction MRM chromatogram of reference solution (A), sample solution (B) and negative sample solution (C)

量不得少于  $11.9 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

人参皂苷 Rf 是人参的特征性成分, 研究发现, 掺伪西洋参的样品, 人参皂苷 Rf 较低或未检出。本研究拟订人参皂苷 Rf 限度, 以人参皂苷 R<sub>g1</sub> 和

人参皂苷 Re 的总量、人参皂苷 R<sub>b1</sub> 含量, 以及拟人参皂苷 F<sub>11</sub> 检查全部符合拟订限度的样品为参考 (共 9 批), 以其人参皂苷 Rf 含量平均值的 70% 计, 拟订更年宁中人参皂苷 Rf 不得少于  $13.8 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

表 3 自收集药材中拟人参皂苷  $F_{11}$  的测定结果 ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $n = 2$ )  
Tab 3 Contents of pseudo-ginsenoside  $F_{11}$  in *Panax ginseng* and *Panax quinquefolium* ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $n = 2$ )

| 名称  | 编号 | 产地/收集地 | 拟人参皂苷 $F_{11}$ |
|-----|----|--------|----------------|
| 西洋参 | 1  | 加拿大温哥华 | 2611           |
|     | 2  | 加拿大温哥华 | 2397           |
|     | 3  | 加拿大魁北克 | 2242           |
|     | 4  | 加拿大魁北克 | 2053           |
|     | 5  | 北京怀柔   | 2742           |
|     | 6  | 北京怀柔   | 2538           |
|     | 7  | 吉林通化   | 2832           |
|     | 8  | 吉林通化   | 2475           |
|     | 9  | 吉林白山   | 3161           |
|     | 10 | 吉林白山   | 2938           |
| 人参  | 11 | 中检院    | 2856           |
|     | 1  | 吉林白山   | /              |
|     | 2  | 吉林白山   | /              |
|     | 3  | 吉林抚松   | /              |
|     | 4  | 吉林集安   | /              |
|     | 5  | 中检院    | /              |

注 (Note): “/” 表示低于检测限 (“/” means below the detection limit)。

2.5 样品测定

取 44 批更年宁样品各 2 份, 分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项下条件进样测定, 以随行标准曲线计算含量, 结果见表 4。

2.6 结果分析

44 批样品中, 35 批样品的指标性成分不符合拟订限度。其中, 26 批样品拟人参皂苷  $F_{11}$  含量超出拟订限度, 提示存在以西洋参掺伪人参投料的情况; 其余 9 批样品的拟人参皂苷  $F_{11}$  含量未检出, 但人参皂苷  $R_f$  含量和/或人参皂苷  $R_{b_1}$  含量和/或人参皂苷  $R_{g_1}$  与 人参皂苷  $R_e$  总量低于拟订限度, 提示存在以劣质人参投料或少投料的情况。不符合拟订限度的样品均来自企业 B 和企业 C。

企业 B 人参投料情况: 3 批样品 (批号分别为 210401、210601、210602) 拟人参皂苷  $F_{11}$  含量较高, 未检出人参特征性成分人参皂苷  $R_f$ , 提示完全以西洋参代替人参投料; 2 批样品 (批号分别为 210201、210202) 拟人参皂苷  $F_{11}$  含量较高, 人参皂苷  $R_f$  含量较低, 提示投料大量西洋参代替人参; 3 批样品 (批号分别为 211001、211201、220201) 未检出西洋参掺伪, 但人参皂苷  $R_{b_1}$  含量低于拟订限度, 存在用劣质人参投料或少投料的情况。

企业 C 人参投料情况: 21 批样品中拟人参皂苷  $F_{11}$  含量超出拟订限度, 提示该企业以西洋参掺伪人参投料情况严重。其余批次人参皂苷类成分含量低于拟订限度, 提示用劣质人参投料或少投料。

西洋参药材中人参皂苷  $R_e$  与 人参皂苷  $R_{b_1}$  的含量远高于人参<sup>[4-5]</sup>, 若制剂中掺伪西洋参, 两者含量将高于正品人参投料的样品。本研究发现,

更年宁中拟人参皂苷  $F_{11}$  含量与 人参皂苷  $R_e$ 、人参皂苷  $R_{b_1}$  的含量趋势基本一致, 与文献研究结论一致。更年宁中西洋参掺伪人参的检查结果与人参质量评价结果相互印证, 两方法相结合可全面评价更年宁中人参投料情况。

表 4 更年宁中 5 个成分的含量测定结果 ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $n = 2$ )  
Tab 4 Contents of 5 components in Gengnianning ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $n = 2$ )

| 企业 | 批号       | 拟人参皂苷 $F_{11}$ | 人参皂苷 $R_{g_1}$ | 人参皂苷 $R_e$ | 人参皂苷 $R_f$ | 人参皂苷 $R_{b_1}$ | 人参皂苷 $R_{g_1} + \text{人参皂苷 } R_e$ |
|----|----------|----------------|----------------|------------|------------|----------------|-----------------------------------|
| A  | 21030536 | /              | 27.3           | 54.5       | 25.9       | 35.2           | 81.8                              |
| A  | 21033791 | /              | 26.5           | 48.7       | 23.2       | 31.4           | 75.2                              |
| B  | 210201   | 44.9           | 19.4           | 132.5      | 4.0        | 81.5           | 151.9                             |
| B  | 210202   | 46.3           | 20.1           | 142.7      | 4.2        | 82.1           | 162.8                             |
| B  | 210401   | 52.1           | 20.7           | 181.8      | /          | 83.2           | 202.5                             |
| B  | 210601   | 40.7           | 17.2           | 143.0      | /          | 65.1           | 160.2                             |
| B  | 210602   | 39.8           | 16.2           | 140.6      | /          | 69.6           | 156.8                             |
| B  | 211001   | 0.4            | 22.8           | 22.4       | 16.1       | 8.9            | 45.2                              |
| B  | 211201   | /              | 14.4           | 17.1       | 13.9       | 6.5            | 31.5                              |
| B  | 220201   | /              | 14.0           | 14.9       | 14.1       | 5.9            | 28.9                              |
| C  | 210415   | 0.9            | 14.9           | 19.0       | 7.7        | 9.4            | 33.9                              |
| C  | 200405   | 5.6            | 3.0            | 7.7        | 2.8        | 4.2            | 10.7                              |
| C  | 200610   | 6.3            | 3.2            | 9.5        | 1.4        | 5.1            | 12.7                              |
| C  | 200807   | 12.0           | 4.9            | 33.3       | 0.5        | 18.2           | 38.2                              |
| C  | 201013   | 11.2           | 6.7            | 33.5       | 1.8        | 18.0           | 40.2                              |
| C  | 201203   | 12.2           | 7.5            | 38.2       | 1.9        | 21.8           | 45.7                              |
| C  | 201209   | 10.2           | 6.5            | 30.6       | 1.7        | 17.3           | 37.1                              |
| C  | 201210   | 10.7           | 7.0            | 34.8       | 1.9        | 16.5           | 41.8                              |
| C  | 201215   | 1.9            | 10.1           | 18.0       | 5.0        | 6.9            | 28.1                              |
| C  | 210202   | 2.5            | 11.8           | 18.2       | 5.8        | 8.6            | 30.0                              |
| C  | 210413   | 0.8            | 10.9           | 13.6       | 6.8        | 7.0            | 24.5                              |
| C  | 210414   | 0.8            | 14.6           | 15.7       | 8.0        | 9.1            | 30.3                              |
| C  | 210601   | 0.4            | 17.0           | 17.4       | 9.0        | 9.3            | 34.4                              |
| C  | 210801   | 4.2            | 19.4           | 31.4       | 10.8       | 13.6           | 50.8                              |
| C  | 210802   | 3.0            | 20.1           | 26.7       | 11.1       | 13.0           | 46.8                              |
| C  | 210804   | 2.8            | 19.6           | 26.1       | 10.1       | 12.4           | 45.7                              |
| C  | 210805   | 6.4            | 13.2           | 35.8       | 9.3        | 14.2           | 49.0                              |
| C  | 210806   | 6.9            | 18.7           | 32.4       | 8.1        | 17.2           | 51.1                              |
| C  | 210808   | 7.0            | 18.6           | 35.2       | 7.9        | 16.7           | 53.8                              |
| C  | 211001   | 7.2            | 14.4           | 26.5       | 6.6        | 15.1           | 40.9                              |
| C  | 211003   | 6.2            | 9.0            | 16.0       | 4.9        | 7.6            | 25.0                              |
| C  | 211006   | 7.5            | 18.3           | 32.9       | 8.0        | 18.1           | 51.2                              |
| C  | 211008   | 20.5           | 9.6            | 62.9       | 0.4        | 50.7           | 72.5                              |
| C  | 211009   | 22.4           | 10.6           | 88.0       | 0.6        | 58.2           | 98.6                              |
| C  | 211205   | 22.6           | 10.7           | 80.0       | 0.5        | 57.8           | 90.7                              |
| C  | 220104   | 22.8           | 11.2           | 83.5       | 0.7        | 59.8           | 94.7                              |
| C  | 220105   | 21.4           | 11.7           | 90.3       | 0.7        | 59.8           | 102.0                             |
| D  | 200702   | /              | 26.1           | 32.5       | 18.3       | 16.0           | 58.6                              |
| D  | 200703   | /              | 21.8           | 23.7       | 16.6       | 16.0           | 45.5                              |
| D  | 201201   | /              | 25.0           | 37.9       | 18.5       | 15.9           | 62.9                              |
| D  | 201202   | /              | 23.6           | 31.9       | 17.0       | 16.0           | 55.5                              |
| D  | 201203   | /              | 22.3           | 27.1       | 16.6       | 16.1           | 49.4                              |
| E  | 191001   | 0.4            | 32.5           | 28.0       | 21.1       | 15.9           | 60.5                              |
| E  | 191002   | 0.7            | 31.1           | 26.0       | 20.9       | 16.0           | 57.1                              |

注 (Note): “/” 表示低于检测限 (“/” means below the detection limit)。



### 3 讨论

#### 3.1 流动相及质谱条件的选择

拟人参皂苷  $F_{11}$  为负离子模式采集, 流动相水相采用  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  甲酸铵溶液增加响应。有机相为乙腈时, 拟人参皂苷  $F_{11}$  和人参皂苷  $R_f$  (同分异构体, 质谱无区分能力) 无法达到基线分离; 经试验考察有机相为乙腈-四氢呋喃 (9:1) 时可使人参皂苷  $F_{11}$  和人参皂苷  $R_f$  基线分离。最终确定的流动相条件为乙腈-四氢呋喃- $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  甲酸铵溶液 (22.5:2.5:75)<sup>[19]</sup>。在质谱分析中, 本研究对各被测成分的质谱参数进行了优化, 人参皂苷成分在负离子模式下有较高的响应和较好的峰形。

#### 3.2 评价更年期宁中人参投料情况

更年期宁现行标准缺乏人参的质量控制, 本研究利用 UPLC-MS/MS 技术建立更年期宁中拟人参皂苷  $F_{11}$  及 4 种人参皂苷成分的含量测定方法。结果, 按拟订限度, 西洋参掺伪人参投料检出率为 59.1%, 人参整体投料不合格率为 79.5%, 西洋参掺伪人参投料情况以及以劣质人参投料或少投料情况普遍。本研究建立的方法对投料人参的质与量均进行了有效控制, 为监管提供技术支持。

#### 3.3 含人参中药制剂的质量标准情况分析

近年来, 常有西洋参掺伪人参的情况, 中药制剂中人参的质控项目缺失, 导致人参掺伪投料、不投料或者少投料的情况存在。国家药品监督管理局已针对 3 个中成药品种 (乌鸡白凤丸、人参养荣丸、消糜栓) 发布拟人参皂苷  $F_{11}$  检查项补充检验方法, 检查西洋参掺伪人参投料。

目前, 制剂中均是以与西洋参的共有成分人参皂苷  $R_{g1}$ 、人参皂苷  $R_e$  和人参皂苷  $R_{b1}$  为人参质控成分, 若存在西洋参掺伪问题, 将造成人参皂苷类成分含量偏高, 难以从根本上对其质量进行控制。本研究发现, 以人参皂苷  $R_f$  为质控指标评价人参投料质量, 更能真实地反映西洋参掺伪情况和人参投料质量。

### 4 结论

本研究建立的检测方法为评价更年期宁等含人参中药制剂中人参投料情况提供技术依据, 打击中药制剂中人参掺伪投料、不投料或者少投料的行为, 在中药市场监管和质量控制方面有较好的应用场景, 可保障消费者的合法权益, 促进中药产业健康发展。

### 参考文献

- [1] 高健, 吕邵娃. 人参化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中医药导报, 2021, 27 (1): 127-130, 137.
- [2] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 8.
- [3] 钟运香, 袁娇, 刘丰惠, 等. 西洋参化学成分、药理作用及质量控制研究进展 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2020, 18 (7): 130-133.
- [4] 刘永利, 雷蓉, 王晓蕾, 等. 基于中药质量标志物的人参、西洋参、三七及相关中成药质量控制方法研究 [J]. 中国药学杂志, 2019, 54 (17): 1402-1410.
- [5] 严华, 张慧秀, 白宗利, 等. 基于特征图谱的人参属药材西洋参、人参、三七的比较 [J]. 世界中医药, 2021, 16 (6): 887-895.
- [6] 赵振霞, 王晓蕾, 雷蓉. UPLC-MS/MS 检测乌鸡白凤丸中非法添加西洋参 [J]. 中国现代应用药学, 2020, 37 (4): 420-424.
- [7] 朱韬, 何颂华, 李丽莉, 等. HPLC-ELSD 法和 UPLC-MS/MS 法评价石斛夜光丸中人参投料掺伪情况 [J]. 中南药学, 2023, 21 (10): 2729-2733.
- [8] 肖小武, 洪挺, 许妍, 等. 参桂鹿茸丸中人参掺伪检查研究 [J]. 中国药事, 2023, 37 (4): 434-442.
- [9] 姚宝林, 王然然, 张森, 等. UPLC-MS/MS 同时检测人参健脾丸和人参归脾丸中非法添加西洋参 [J]. 中国现代中药, 2023, 25 (1): 150-156.
- [10] 穆向荣, 徐兴燕, 焦阳, 等. 基于 HPLC-MS/MS 法的脑灵素制剂中人参掺伪检查研究 [J]. 药学研究, 2022, 41 (8): 521-524, 530.
- [11] 李萌萌, 王一凯, 盛艳华, 等. UPLC-QTOF-MS 非靶向代谢组学技术在人参和西洋参药性差异作用机制研究中的应用 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46 (22): 5930-5935.
- [12] 李萌萌. 基于质谱技术研究人参和西洋参的药性 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2023.
- [13] 卫生部药品标准. 中药成方制剂 [S]. 第 6 册. 1993: 70.
- [14] 李向高, 张连学, 孟祥颖, 等. 西洋参特有成分——拟人参皂苷  $F_{11}$  的分离、鉴定与含量测定 [J]. 吉林农业大学学报, 2005, 27 (6): 645-648.
- [15] 张洋, 蔡广知, 刘小康, 等. 西洋参药材的等级标准及质量评价研究 [J]. 中国药房, 2022, 33 (1): 51-57.
- [16] 严华, 魏锋, 马双成. 基于综合权重分析的西洋参药材等级质量标准研究 [J]. 中国现代中药, 2021, 23 (8): 1363-1373.
- [17] 郭海滨, 张艳萍, 黄婉锋, 等. UPLC-MS/MS 法在西洋参、人参、红参中 3 种人参皂苷的含量研究与应用 [J]. 广东化工, 2024, 51 (16): 184-186, 137.
- [18] 国家药品标准工作手册 [S]. 第四版. 2013: 453.
- [19] 国家药品监督管理局. 药品检验补充检验方法和检验项目批准件. 人参养荣丸中拟人参皂苷  $F_{11}$  检查项补充检验方法 [S]. 2021.

(收稿日期: 2024-10-08; 修回日期: 2024-12-05)

# 雏凤精口服液 HPLC 指纹图谱及多指标成分含量测定方法的建立

刘子夜<sup>1</sup>, 罗毅<sup>1\*</sup>, 张艳欣<sup>2</sup>, 曹桂云<sup>1, 2</sup>, 张荣飞<sup>1, 2</sup>, 齐红<sup>3</sup>, 孟兆青<sup>1\*</sup> (1. 山东宏济堂制药集团股份有限公司, 济南 250100; 2. 济南市中药研究与质量控制重点实验室, 济南 250100; 3. 济南市食品药品检验检测中心, 济南 250102)

**摘要:** **目的** 建立雏凤精口服液 HPLC 指纹图谱, 并同时测定芍药苷、沉香四醇、松果菊苷、异补骨脂素、淫羊藿苷 5 个成分的含量。 **方法** 以松果菊苷为内标物, 建立 15 批次雏凤精口服液 HPLC 指纹图谱。根据指纹图谱共有峰峰面积的测定结果, 先后利用聚类分析 (HCA)、偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA) 和变量重要性投影值 (VIP), 筛选出不同批次雏凤精的质量差异性成分, 并同时测定 5 个成分的含量。 **结果** 15 批雏凤精口服液样品指纹图谱中确定 16 个共有峰, 相似度均大于 0.930。3 种化学模式识别分析将 15 批样品分为两类, 并从标定的共有峰中筛选出 5 个质量标志物。同时对指认出的芍药苷、沉香四醇、松果菊苷、异补骨脂素、淫羊藿苷进行含量测定, 15 批样品的含量测定范围分别为  $45.999 \sim 70.671 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $6.106 \sim 16.971 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $57.825 \sim 218.538 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1.364 \sim 2.929 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $11.949 \sim 18.900 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 且其精密度、重复性、稳定性、线性 ( $r \geq 0.9997$ ) 及加样回收率 ( $97.46\% \sim 99.22\%$ ) 均符合分析要求。 **结论** 该方法稳定可靠, 可为雏凤精口服液的质量控制提供参考。

**关键词:** 雏凤精口服液; HPLC; 指纹图谱; 化学成分

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)08-2402-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.038

## HPLC fingerprint content and determination of multi-index components of Chufengjing oral liquid

LIU Zi-ye<sup>1</sup>, LUO Yi<sup>1\*</sup>, ZHANG Yan-xin<sup>2</sup>, CAO Gui-yun<sup>1, 2</sup>, ZHANG Rong-fei<sup>1, 2</sup>, Qi Hong<sup>3</sup>, MENG Zhao-qing<sup>1\*</sup> (1. Shandong Hongjitang Pharmaceutical Group Co., Ltd., Jinan 250100; 2. Jinan Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Research and Quality Control, Jinan 250100; 3. Jinan Institute for Food and Drug Control, Jinan 250102)

**Abstract: Objective** To establish the HPLC fingerprint of Chufengjing oral liquid, and to determine the content of paeoniflorin, agarotetrol, echinacoside, isopsoralen and icariin. **Methods** Echinacoside was used as the internal standard, and the HPLC fingerprint of 15 batches of Chufengjing oral liquid was established. Based on the measurements of common peaks area of fingerprint spectrum, hierarchical cluster analysis (HCA), partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) and variable importance in projection (VIP) were used to screen out the quality difference components in different batches of Chufengjing oral liquid, while the content of 5 components was determined. **Results** There were 16 common peaks in the fingerprints of 15 batches of samples with similarities of over 0.930. The 15 batches of samples were divided into 2 categories by 3 chemical recognition patterns, and 5 quality markers were selected from the calibrated common peaks. At the same time, the content of paeoniflorin, agarotetrol, echinacoside, isopsoralen and icariin was determined. The content of 15 batches of samples ranged  $45.999 \sim 70.671 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $6.106 \sim 16.971 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $57.825 \sim 218.538 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $1.364 \sim 2.929 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , and  $11.949 \sim 18.900 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,

**基金项目:** 泰山产业领军人才 (2022); 海右产业领军人才 (2022)。

**作者简介:** 刘子夜, 女, 高级工程师, 主要从事中药新药研究及重大品种二次开发, email: 2444605840@qq.com \*通信作者: 罗毅, 女, 高级工程师, 主要从事中药新药研发, email: luoyi19860505@163.com; 孟兆青, 男, 高级工程师, 主要从事中药新药及重大品种二次开发, email: cpummm@163.com

respectively. The precision, repeatability, stability, linearity ( $r \geq 0.9997$ ) and recovery (97.46% ~ 99.22%) of the method were all in accordance with the requirement of analysis. **Conclusion** The method is stable and reliable, and can provide reference for the quality control of Chufengjing oral liquid.

**Key words:** Chufengjing oral liquid; HPLC; fingerprint; chemical constituent

雏凤精口服液来源于民间古方“鸡胎大补精”，是由鸡胎、羊鞭、鹿茸、淫羊藿、人参、补骨脂、当归、黄芪等 20 余味中药加工精制而成的口服液<sup>[1]</sup>，可温补肾阳、补气养血，主要用于肾阳不足、气血两虚所致的腰酸背痛，四肢乏力，头晕耳鸣等<sup>[2]</sup>。药效学表明雏凤精口服液能完全或部分对抗免疫抑制剂的免疫抑制作用，同时对细胞及体液的免疫功能也有一定保护和促进作用<sup>[2-3]</sup>。

本制剂目前按部颁标准中药成分制剂第十六册 WS<sub>3</sub>-B-3119-98 的质量标准执行，仅有性状、鉴别及检查项等定性检测项，无定量检测项，不利于产品质控及批次间稳定的控制<sup>[4-6]</sup>。本试验建立雏凤精口服液 HPLC 指纹图谱方法<sup>[7-10]</sup>，结合化学识别模式进行分析<sup>[11-17]</sup>，并同时测定芍药苷、沉香四醇、松果菊苷、异补骨脂素、淫羊藿苷的含量，为该制剂的质量控制提供数据支持<sup>[18-21]</sup>。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1260 高效液相色谱仪 (安捷伦公司); XS 105 十万分之一型电子天平 (梅特勒-托利多公司); KQ-1000E 医用超声波清洗仪 (昆山市超声仪器有限公司); HH-8 恒温水浴锅 (江苏中大仪器科技有限公司)。

### 1.2 试药

芍药苷 (批号: 110736-202145, 纯度: 94.6%)、沉香四醇 (批号: 111980-201904, 纯度: 98.6%)、异补骨脂素 (批号: 110738-202016, 纯度: 99.4%)、松果菊苷 (批号: 111670-201907, 纯度: 91.6%)、淫羊藿苷 (批号: 110737-202017, 纯度: 98.1%) (中国食品药品检定研究院)。淫羊藿、肉苁蓉 (河北一仁药业有限公司), 补骨脂、覆盆子 (亳州市圣海中药饮片有限公司), 牡丹皮 (河南豫博药业科技有限公司), 沉香 (内蒙古蒙缘堂药业科技有限公司), 白芍 (安徽人民中药饮片有限公司), 鸡胎、羊外肾、羊鞭 (安徽新盛中药饮片有限公司), 狗鞭 (安徽贺林中药饮片有限公司), 鹿茸 (黑龙江鼎元药业股份有限公司), 药材经济南市食品药品检验检测中心主任中药师齐红鉴定为正品。苯甲酸 (湖北永顺鑫医药有限公司), 焦糖浆 (山东宏济堂制药集团股份有限公司)。

甲醇、乙腈为色谱纯, 甲酸、正丁醇为分析纯, 水为超纯水。雏凤精口服液 15 批, 编号 S1 ~ S15 (批号分别为 2103001、2103002、2307003、2307004、2308001、2103003、2104003、2105001、2105002、2207001、2207004、2207005、2207006、2306002、2211006, 规格: 10 mL/支, 山东宏济堂制药集团股份有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱为 Waters Atlantis T3 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇 (A) -0.1% 甲酸 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 20 min, 5%A; 20 ~ 35 min, 5% ~ 25%A; 35 ~ 70 min, 25%A; 70 ~ 130 min, 25% ~ 70%A; 130 ~ 140 min, 70% ~ 95%A); 进样量为 5 μL; 柱温为 25 °C; 流速为 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 检测波长为 250 nm。

### 2.2 溶液制备

**2.2.1 对照品溶液的配制** 分别称取芍药苷、沉香四醇、松果菊苷、异补骨脂素、淫羊藿苷对照品适量, 精密称定, 用甲醇溶解并定容, 制成 76.97、13.45、111.26、2.23、10.78 μg · mL<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 精密量取雏凤精口服液 20 mL, 加水饱和和正丁醇 (每次 20 mL) 振摇提取 3 次, 合并正丁醇液, 蒸干, 用 50% 甲醇溶解并定容至 5 mL, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

**2.2.3 药材溶液的制备** 取单味植物药材按雏凤精口服液的工艺制备处理, 并按“2.2.2”项下方法制备单味药材的供试品溶液。动物药液为 5 味动物药 (鸡胎、羊外肾、羊鞭、狗鞭、鹿茸) 合并按雏凤精口服液的工艺制备方法处理, 并按“2.2.2”项下方法制备为动物药供试品溶液。

### 2.3 HPLC 指纹图谱建立

**2.3.1 精密度试验** 取编号为 S5 的雏凤精口服液样品, 按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 以 11 号峰松果菊苷为参照峰, 经计算 16 个共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 0.22%, 相对峰面积 RSD 均小于 1.6%, 表明仪器精密度良好。



**2.3.2 重复性试验** 取编号为 S5 的雏凤精口服液样品 6 份, 按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 以 11 号峰松果菊苷为参照峰, 经计算 16 个共有峰的相对保留时间  $RSD$  均小于 0.32%, 相对峰面积的  $RSD$  均小于 3.1%, 表明该方法重复性良好。

**2.3.3 稳定性试验** 取编号为 S5 的雏凤精口服液样品, 按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别于 0、3、6、9、12、24、48 h 进样测定。以 11 号峰松果菊苷为参照峰, 经计算 16 个共有峰的相对保留时间  $RSD$  均小于 0.24%, 相对峰面积  $RSD$  均小于 2.3%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

**2.3.4 图谱生成及峰归属** 精密量取编号为 S1 ~ S15 的雏凤精口服液样品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版) 软件进行 15 批数据的处理, 采用多点校正法进行全峰匹配, 时间窗宽度设定为 0.3 min, 用中位数法得到指纹图谱和对照指纹图谱 ( $R$ )<sup>[17, 21]</sup>, 指认出了 16 个共有峰, 并进行了峰归属, 峰 1、2、3 归属动物药, 峰 4 归属焦糖浆, 峰 5、11、12、13 归属肉苁蓉, 峰 6 归属牡丹皮, 峰 7 归属白芍和牡丹皮, 峰 8、14、15 归属补骨脂, 峰 9 归属沉香, 峰 10 归属苯甲酸, 峰 16 归属淫羊藿, 结果见图 1。同时计算相似度, S1 ~ S15 相似度结果分别是 0.939、0.975、0.959、0.979、0.978、0.966、0.958、0.954、0.945、0.979、0.979、0.990、0.976、0.983、0.983, 相似度均大于 0.930 (见图 2)。结果说明 15 批雏凤精口服液样品批次间相似度良好, 质量均一稳定。

取雏凤精口服液样品以及对照品按“2.1”项下色谱条件进行色谱峰指认, 通过比对样品与对照品的保留时间, 共指认出 5 种成分<sup>[21]</sup>, 同时对雏凤精口服液样品、指认出的 5 种对照品以及各自的加标样品进行全波长扫描, 三者的最大吸收波长均一致, 分别为 7 号峰芍药苷、9 号峰沉香四醇、11 号峰松果菊苷、15 号峰异补骨脂素、16 号峰淫羊藿苷, 其中 11 号峰松果菊苷分离度较好, 峰面积较大, 保留时间适中, 峰形稳定, 并且在所有样品中均存在, 故选择其作为参照峰<sup>[21]</sup> (S), 见图 3。

**2.3.5 聚类分析** 通过 SPSS 26.0 软件对 15 批雏凤精口服液样品进行聚类分析, 以 14 个共有峰 (除去 2 个辅料峰) 峰面积为变量, 平方欧氏距离为测量尺度<sup>[21-22]</sup>。当类间距离小于 10 时, 15 批样品可大致分为两类, S7 ~ S9 批次为第一类, S1 ~ S6、S10 ~ S15 批次为第二类, 见图

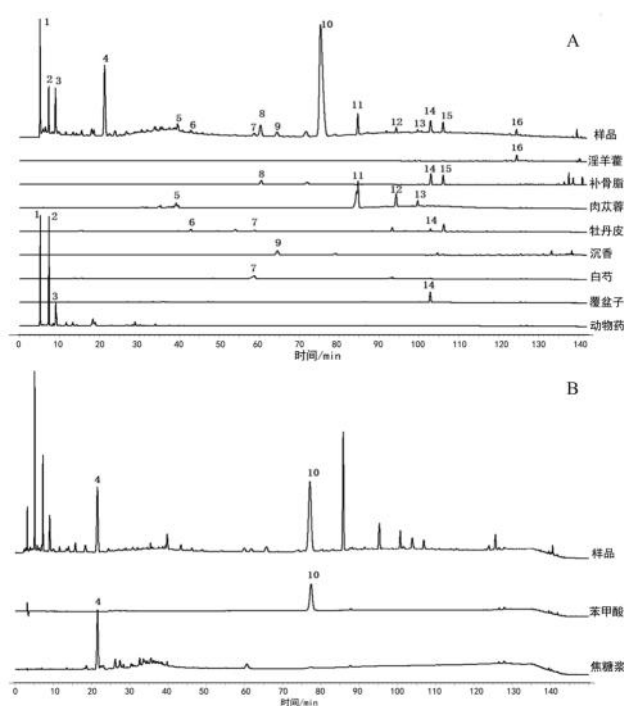


图 1 雏凤精口服液指纹图谱色谱峰归属叠加图

Fig 1 Overlay of chromatographic peaks in the fingerprint of Chufengjing oral liquid

A. 药材峰归属叠加图 (overlay of chromatographic peaks in medicinal materials); B. 辅料峰归属叠加图 (overlay of chromatographic peaks)

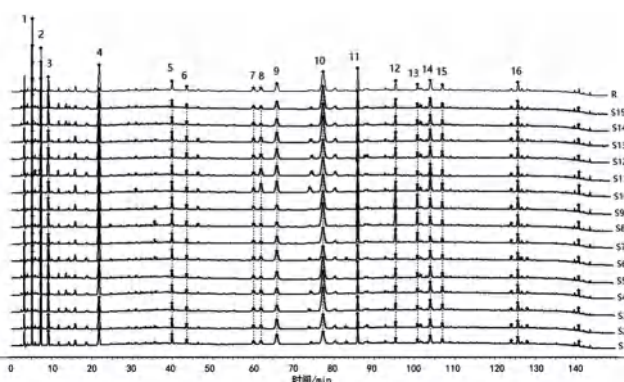


图 2 15 批雏凤精口服液样品指纹图谱叠加图

Fig 2 Overlay of fingerprints of 15 batches of Chufengjing oral liquid

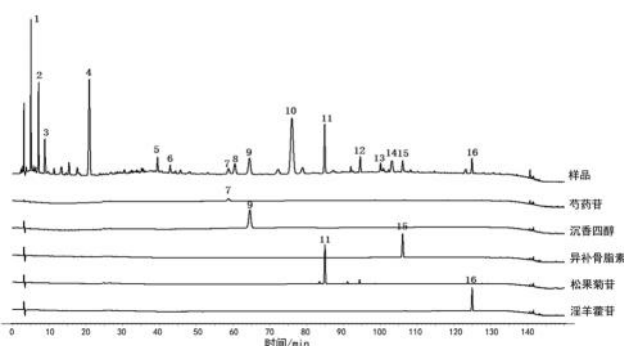


图 3 雏凤精口服液样品指纹图谱与 5 种对照品图谱叠加图

Fig 3 Fingerprint of Chufengjing oral liquid samples and chromatograms overlay chart of 5 reference substances

7. 芍药苷 (paeoniflorin); 9. 沉香四醇 (agarotetrol); 11. 松果菊苷 (echinoside); 15. 异补骨脂素 (isopsoralen); 16. 淫羊藿苷 (icariin)

4. 通过不同批次所使用药材分析发现原因可能是, S7 ~ S9 批次肉苁蓉饮片产地为内蒙古, 而 S1 ~ S6、S10 ~ S15 批次产地为新疆, 肉苁蓉是处方中植物药生药量最高的药材之一, 说明肉苁蓉药材产地的不同对成品质量影响较大, 肉苁蓉的产地选择应是雏凤精口服液质控的关键因素。

当类间距离小于 7 时, 各批次样品可分为三类, S3 ~ S5、S10、S12 ~ S15 批次为第一类, S1 ~ S2、S6、S11 批次为第二类, S7 ~ S9 批次为第三类, 分析原因为第一类产品存放在两年以内, 第二类和第三类除 S11 产品存放在两年以上, 表明不同存放时间对雏凤精口服液的成分含量存在影响。综上, 饮片产地选择及有效期限是影响雏凤精口服液批间差异的两个主要因素, 同时也是其质量控制的关键点, 见图 4。

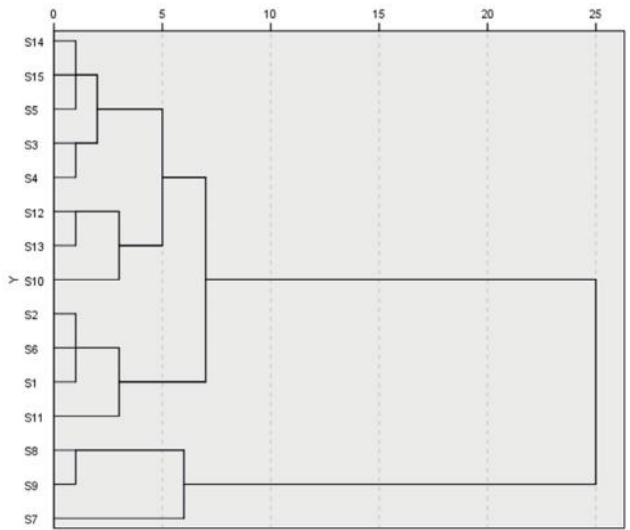


图 4 雏凤精口服液样品聚类分析树状图  
Fig 4 Clustering analysis of Chufengjing oral liquid sample

**2.3.6 偏最小二乘法 - 判别分析 (PLS-DA)**  
通过 SPSS 26.0 软件数据录入, 以 15 批次雏凤精口服液中 14 个共有峰峰面积为变量, 通过 SIMCA14.1 软件进行 PLS-DA 分析<sup>[21]</sup>。通过分析可知, 累计解释能力模型参数  $X$  为 0.649,  $Y$  为 0.968, 预测能力参数  $Q^2$  为 0.903, 均大于 0.5, 说明所建立的模型稳定可靠<sup>[21]</sup>, 可用于区分不同药材产地及存放期限的样品, 见图 5。

再以 VIP 值  $> 1$  为标准筛选主要标志性成分<sup>[21-22]</sup>, 发现有 5 个峰符合要求, 分别为 11 号峰 (松果菊苷)、13 号峰、12 号峰、16 号峰 (淫羊藿苷)、9 号峰 (沉香四醇)。5 个主要标志性成分可作为后期雏凤精口服液质控的指标成分, 见图 6。其中, 松果菊苷为肉苁蓉中的主要化学成分, 结合 “2.3.5” 项下聚类分析结果, 肉苁蓉药材产地是

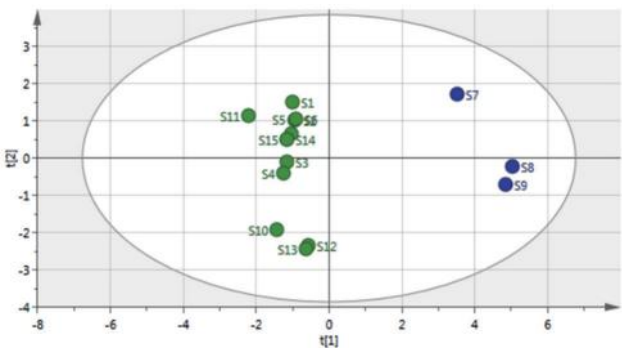


图 5 雏凤精口服液样品 PLS-DA 得分图  
Fig 5 PLS-DA score plot of Chufengjing oral liquid sample

导致雏凤精口服液不同批次分类的主要因素, 说明以松果菊苷作为指标成分选择肉苁蓉药材产地, 是后期控制雏凤精口服液质量的重要因素。

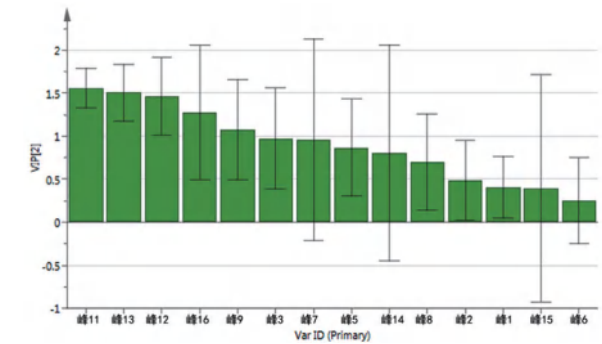


图 6 雏凤精口服液中 14 个共有峰的 VIP 图  
Fig 6 VIP of 14 common peaks of Chufengjing oral liquid sample

**2.4 各成分含量测定**

**2.4.1 线性关系考察** 取 “2.2.1” 项下对照品溶液适量, 用甲醇进行逐级稀释, 得到芍药苷、沉香四醇、松果菊苷、异补骨脂素、淫羊藿苷质量浓度分别为 30.788、61.576、92.364、123.152、153.940  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 5.380、10.760、16.140、21.520、26.900  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 44.504、89.008、133.512、178.016、222.520  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 0.892、1.784、2.676、3.568、4.460  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 4.312、8.624、12.936、17.248、21.560  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的混合对照品溶液, 进样测定。以对照品浓度为横坐标 ( $X$ )、峰面积为纵坐标 ( $Y$ ), 进行线性回归, 可得 5 种成分在各自范围内与峰面积线性关系良好, 结果见表 1。

| 表 1 回归方程、线性范围和相关系数<br>Tab 1 Regressive equation, correlation coefficient and linearity |                        |                                                  |        |
|----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|--------------------------------------------------|--------|
| 成分                                                                                     | 回归方程                   | 线性范围 /<br>( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | $r$    |
| 芍药苷                                                                                    | $Y = 1.3261X - 4.1787$ | 30.788 ~ 153.940                                 | 0.9997 |
| 沉香四醇                                                                                   | $Y = 19.510X - 6.8034$ | 5.380 ~ 26.900                                   | 0.9999 |
| 松果菊苷                                                                                   | $Y = 2.8824X - 4.5224$ | 44.504 ~ 222.520                                 | 0.9999 |
| 异补骨脂素                                                                                  | $Y = 41.144X - 1.7389$ | 0.892 ~ 4.460                                    | 0.9997 |
| 淫羊藿苷                                                                                   | $Y = 8.2136X - 1.8806$ | 4.312 ~ 21.560                                   | 0.9998 |

**2.4.2 精密度试验** 取雏凤精口服液样品适量,按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,进样测定,测得芍药苷、沉香四醇、松果菊苷、异补骨脂素、淫羊藿苷 5 种成分的峰面积 *RSD* 分别为 0.94%、0.60%、1.6%、0.51%、1.3%,表明仪器精密度良好。

**2.4.3 重复性试验** 取同一批次雏凤精口服液样品 6 份,按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,进样测定,测得芍药苷、沉香四醇、松果菊苷、异补骨脂素、淫羊藿苷 5 种成分的含量 *RSD* 分别为 0.47%、0.45%、0.27%、0.14%、0.09%,表明该方法重复性良好。

**2.4.4 稳定性试验** 取雏凤精口服液供试品溶液,分别于 0、3、6、9、12、24、48 h 进样测定,测得

芍药苷、沉香四醇、松果菊苷、异补骨脂素、淫羊藿苷 5 种成分的峰面积 *RSD* 分别为 1.1%、0.62%、1.8%、0.92%、1.1%,表明溶液在 48 h 内稳定性良好。

**2.4.5 加样回收试验** 取已知含量的雏凤精口服液样品 6 份,分别加入适量的 5 种对照品溶液,按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,进样测定,得到芍药苷、沉香四醇、松果菊苷、异补骨脂素、淫羊藿苷的平均加样回收率分别为 99.17%、98.21%、99.22%、98.75%、97.46%,*RSD* 均在 0.53%~1.7%,均符合要求。

**2.4.6 样品含量测定** 取 15 批雏凤精口服液样品的供试品溶液进样测定,分别计算得到 5 种成分的含量,结果见表 2。

表 2 15 批雏凤精口服液样品中 5 个成分的含量测定结果 ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )  
Tab 2 Content of 5 components in 15 batches of Chufengjing oral liquid ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )

| 编号              | 芍药苷                | 沉香四醇               | 松果菊苷                | 异补骨脂素             | 淫羊藿苷               |
|-----------------|--------------------|--------------------|---------------------|-------------------|--------------------|
| S1              | 54.945             | 14.965             | 66.683              | 1.532             | 12.261             |
| S2              | 56.549             | 14.680             | 65.526              | 1.630             | 12.446             |
| S3              | 55.220             | 15.156             | 66.150              | 1.727             | 11.989             |
| S4              | 45.999             | 10.634             | 163.984             | 1.364             | 14.779             |
| S5              | 55.485             | 6.119              | 218.538             | 1.905             | 18.541             |
| S6              | 55.829             | 6.106              | 205.586             | 2.311             | 18.900             |
| S7              | 70.671             | 16.971             | 83.741              | 2.929             | 15.970             |
| S8              | 65.572             | 16.123             | 60.637              | 2.223             | 13.358             |
| S9              | 67.544             | 15.876             | 84.252              | 2.428             | 14.232             |
| S10             | 65.692             | 15.825             | 81.413              | 2.676             | 14.149             |
| S11             | 58.829             | 11.232             | 72.491              | 2.034             | 12.068             |
| S12             | 58.829             | 11.232             | 72.491              | 2.034             | 12.068             |
| S13             | 67.166             | 9.238              | 58.275              | 1.707             | 13.132             |
| S14             | 65.942             | 9.383              | 57.825              | 2.245             | 13.049             |
| S15             | 56.938             | 11.045             | 71.537              | 2.052             | 11.949             |
| $\bar{x} \pm s$ | 60.081 $\pm$ 6.692 | 12.306 $\pm$ 3.622 | 95.275 $\pm$ 53.887 | 2.053 $\pm$ 0.431 | 13.926 $\pm$ 2.273 |

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

本研究采用二极管阵列检测器采集 190~400 nm 波长的色谱图,同时串联蒸发光检测器进行检测,以确保能更全面地检测雏凤精口服液中的化学成分。分析并比较了 205、230、250、270、300、330 nm 等不同检测波长下的色谱图,发现在 250 nm 波长下,色谱峰数量、分离度、响应值等均优于其他波长<sup>[23]</sup>。

通过考察流动相的组成发现甲醇-水系统中各药味成分的色谱峰分离效果较好且较稳定。同时考察了不同品牌不同类型的色谱柱[Waters Atlantis T3、Agilent ZORBAX SB-C18、Kromasil 100-5-C18 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 等],结果

发现色谱峰分离效果均较好,综合选择色谱柱 Waters Atlantis T3 进行测定。

3.2 提取方法的考察

试验前期通过筛选提取溶剂,考察了直接进样、甲醇提取,正丁醇、乙酸乙酯、乙醚萃取对提取效果的影响,结果发现正丁醇萃取方法不仅能保留较多的色谱峰且基线稳定。同时还考察了提取溶剂的用量、提取次数对提取效果的影响,根据试验结果最终选择:精密量取雏凤精口服液 20 mL,加水饱和正丁醇萃取 3 次,每次 20 mL,取正丁醇液,蒸干,残渣用 50% 甲醇溶解定容至 5 mL 的方式制备供试品溶液。

3.3 色谱峰分析

采用十多种对照品对指纹图谱的共有峰进行



指认,同时采用单味药材对色谱峰进行归属,并利用化学模式进行识别分析,经统计分析表明峰 11、峰 13、峰 12、峰 16、峰 9 这 5 个色谱峰可作为鉴别和区分雏凤精口服液的质量标志物<sup>[23]</sup>。指出峰 11 为来自肉苁蓉的松果菊苷、峰 16 为来自淫羊藿的淫羊藿苷和峰 9 为来自沉香的沉香四醇,尽管 12, 13 号峰尚未进行指认,但确认了药味来源为肉苁蓉。

### 3.4 质控指标的选择

雏凤精口服液化学成分复杂,鸡胎为雏凤精口服液的君药,但目前对动物源中药材的鉴定尚存在诸多困难<sup>[24]</sup>,并且动物药中主要药效物质多为蛋白质类、肽类、糖类、脂质类等非特异性成分<sup>[25]</sup>,不宜选作制剂质量控制指标;臣药为淫羊藿、肉苁蓉、补骨脂、沉香等,起温补肾阳、益气固精之效;佐药为牡丹皮、白芍、砂仁、泽泻等,起健脾利水、化湿和胃之效。该研究根据“君、臣、佐、使”中医配伍理论及君臣佐使所含主要活性成分,结合指纹图谱共有峰指认结果<sup>[26]</sup>,选择了淫羊藿苷、松果菊苷、异补骨脂素、沉香四醇、芍药苷作为含量测定指标,其既涵盖了质量标志物所涉及的药味也对臣药补骨脂和佐药白芍也进行了有效控制。

综上,本试验建立了雏凤精口服液 HPLC 指纹图谱,并同时测定芍药苷、沉香四醇、松果菊苷、异补骨脂素、淫羊藿苷的含量,该方法稳定可靠,可较全面地反映该方质量,从药材-中间产品-成品全生产过程中提高产品质量,减少批间差异,使产品更加稳定,同时以上方法可以为其他中成药的质量标准研究提供思路。

### 参考文献

- [1] 张颖,黄玉清,高兆润.雏凤精化学成分研究[J].山东中医杂志,1991,10(2):44.
- [2] 曲钧庆,郑瑞琴,李子荣.雏凤精的药理效应研究[J].泰山医学院学报,1990,11(2):62-68.
- [3] 曲迅,李淑贞,赵温利.雏凤精对小鼠免疫功能的影响[J].泰山医学院学报,1995,11(3):193-196.
- [4] 陈丽华,肖发林,黄诗雨,等.中药质量评价研究思路及创新发展趋势[J].中草药,2021,52(9):2541-2547.
- [5] 王露露,孙倩怡,杨慧海,等.模式识别及其在中药质量评价中的应用[J].中草药,2016,47(23):4282-4288.
- [6] 陈良妮,程雪梅,王琳,等.HPLC 指纹图谱结合模式识别分析评价风湿骨痛胶囊的批间一致性[J].中成药,2021,43(12):3446-3449.

- [7] 王贞丽.中药指纹图谱构建的研究进展[J].实用医药杂志,2014,31(11):1040-1043.
- [8] 赵娟,谢世静,赵兴华,等.中药指纹图谱质控方法研究进展[J].云南中医中药杂志,2020,41(1):82-86.
- [9] 徐妍,杨华蕊,杨永寿,等.中药指纹图谱研究现状及展望[J].世界最新医学信息文摘,2018,18(76):91-94.
- [10] 阳晓雪,李鑫,李雨喜,等.藤茶植物饮料指纹图谱建立及主要成分含量测定[J].中南药学,2024,22(9):2420-2423.
- [11] 于洋,李军,李宝国.化学计量学在中药质量控制研究中的应用[J].中成药,2018,40(5):1139-1142.
- [12] 王博,吴茱萸,裴媛,等.麻石清肺合剂 HPLC 指纹图谱的建立及 7 种成分含量测定[J].中南药学,2024,22(2):509-513.
- [13] 姚新民,谢和兵,朱业锦,等.藏药五味清热汤散的 HPLC 指纹图谱及 5 种成分含量测定方法的研究[J].中南药学,2024,22(5):1323-1328.
- [14] 金唯唯,金华燕,费状丽,等.基于 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别辨析补中益气产品质量标志物[J].中草药,2023,54(7):2114-2126.
- [15] 张鑫,陈衍斌,许刚,等.龙生蛭胶囊的 HPLC 指纹图谱及其化学模式识别研究[J].现代药物与临床,2023,38(3):553-558.
- [16] 韩东,程茜菲,许刚,等.基于 UPLC 指纹图谱结合化学计量学的肝爽颗粒质量评价研究[J].中国药师,2022,25(11):1958-1962,1983.
- [17] 沈丹萍,姜鹏,詹常森.基于 UPLC 指纹图谱和多成分测定的天王补心丸质量控制研究[J].中国中药杂志,2024,49(5):1240-1248.
- [18] 高博闻,任浩蕊,李博艺,等.基于指标性成分含量测定及指纹图谱对蒙药质量控制的研究进展[J].中国药学杂志,2022,57(13):1049-1056.
- [19] 韩洋,曹园.潜阳育阴颗粒 UPLC 指纹图谱和多成分定量方法的建立[J].中国药房,2022,33(20):2481-2486.
- [20] 王凤丽,针涛,魏岚,等.羚羊清肺丸 HPLC 指纹图谱建立及 6 种成分测定[J].中成药,2023,45(6):1781-1787.
- [21] 高紫薇,吴磊,林欣荣,等.强心合剂 HPLC 指纹图谱建立及 11 种成分测定[J].中成药,2023,45(12):3895-3901.
- [22] 张政,冯国双.变量投影重要性分析在自变量筛选中的应用[J].现代预防医学,2012,39(22):5813-5815.
- [23] 于密密,范妙璇,李铮,等.高效液相色谱法指纹图谱结合化学模式识别的小金制剂质量研究[J].世界中医药,2023,18(18):2565-2570.
- [24] 李晶峰,孙佳明,赵润怀.动物源中药材鉴定学发展及面临的问题与挑战[J].中国医院药学杂志,2024,44(8):973-984.
- [25] 刘睿,武文生,朱悦.动物药现代研究方法学与进展[J].南京中医药大学学报,2022,38(10):857-869.
- [26] 李聪聪,赵鹏,秦燕勤,等.淫羊藿苷的药理活性研究进展[J].中医学报,2020,35(4):781-786.

(收稿日期:2024-11-01;修回日期:2024-12-15)

# 离子色谱法测定低分子量肝素钠注射液中的亚硝酸根离子含量

左利民<sup>1</sup>, 唐敬亮<sup>2</sup>, 赵婷<sup>1</sup>, 张俊<sup>2</sup>, 连晓芳<sup>1</sup>, 刘惠一<sup>1</sup>, 肖菁<sup>2\*</sup>, 万顺<sup>3\*</sup> (1. 中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京 100050; 2. 湖南省药品检验检测研究院, 长沙 410001; 3. 湖南中医药大学, 长沙 410208)

**摘要:** **目的** 建立离子色谱法测定低分子量肝素钠注射液中亚硝酸根离子含量。**方法** 采用 Dionex IonPac AS11-HC (4 mm×250 mm) 色谱柱, 保护柱为 Dionex IonPac AG11-HC (4 mm×50 mm), 淋洗液为 0.68% 的乙酸钠溶液, 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测器为安培检测器, 进样量为 25 μL。**结果** 亚硝酸根离子在 1~100 ng·mL<sup>-1</sup> 内与峰面积线性关系良好 ( $r = 0.9991$ ); 检测限为 0.0075 ng; 平均回收率 ( $n = 6$ ) 为 93.49%,  $RSD$  为 2.8%; 精密度和重复性试验结果的  $RSD$  分别为 0.76% 和 2.5%。**结论** 该方法快速简便、专属性强、准确度高, 可用于低分子量肝素钠注射液中亚硝酸根离子的测定。

**关键词:** 离子色谱法; 低分子量肝素钠注射液; 安培检测器; 亚硝酸根离子

中图分类号: R927

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)08-2408-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.039

## Determination of nitrite ion in low molecular weight heparin sodium injection by ion chromatography

ZUO Li-min<sup>1</sup>, TANG Jing-liang<sup>2</sup>, ZHAO Ting<sup>1</sup>, ZHANG Jun<sup>2</sup>, LIAN Xiao-fang<sup>1</sup>, LIU Hui-yi<sup>1</sup>, XIAO Jing<sup>2\*</sup>, WAN Shun<sup>3\*</sup> (1. *Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050*; 2. *Hunan Institute for Drug Control, Changsha 410001*; 3. *Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208*)

**Abstract: Objective** To determine nitrite ion in low molecular weight heparin sodium injection by ion chromatography. **Methods** A Dionex IonPac AS11-HC (4 mm×250 mm) was used, and the protective column was Dionex IonPac AG11-HC (4 mm×50 mm). The eluent was 0.68% sodium acetate solution. The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. An amperometric detector was used with a sample size of 25 μL. **Results** The linear relationship of nitrite ion with the peak area was good at 1~100 ng·mL<sup>-1</sup> ( $r = 0.9991$ ). The detection limit was 0.0075 ng. The average recovery ( $n = 6$ ) was 93.49%, and  $RSD$  was 2.8%.  $RSD$ s of precision and repeatability were 0.76% and 2.5%, respectively. **Conclusion** The method is rapid, simple, specific and accurate, and can be used for the determination of nitrite ion in low molecular weight heparin sodium injection.

**Key words:** ion chromatography; low molecular weight heparin sodium injection; amperometric detector; nitrite ion

肝素是一种高度硫酸化的糖胺聚糖, 作为一类抗凝血药物在临床应用广泛。低分子量肝素是由普通肝素酶解或化学降解得到, 由于其抗血栓作用较肝素的抗凝性质更可控、吸收好, 且具有半衰期长、不良反应少、生物利用度高且不需要

常规监测凝血功能等优点, 近年来其临床的应用不断扩大<sup>[1-2]</sup>。低分子量肝素钠注射液的主要成分为低分子量肝素钠, 通过抑制凝血酶和Xa因子的活性, 减少体内、体外血栓和动静脉血栓的形成<sup>[3]</sup>, 此外, 低分子肝素钠还可以抑制血小板聚

**基金项目:** 湖南省自然科学基金科药联合基金项目 (No. 2022JJ80071); 国家药典委员会 2024 年标准修订课题 (No. 2024H05)。

**作者简介:** 左利民, 男, 助理研究员, 主要从事药物分析及药品质量研究, email: zuolimin@imb.cams.cn \*通信作者: 肖菁, 女, 副主任药师, 主要从事药物分析研究, email: 16275126@qq.com; 万顺, 男, 硕士研究生, 主要从事药品质量研究, email: wanshun6677@163.com

集,进一步降低出血的风险,用于治疗急性深部静脉血栓、不稳定型心绞痛、非 Q 波心肌梗死和预防与手术有关的血栓形成<sup>[4-5]</sup>,在临床上的应用比较广泛。

低分子量肝素钠是从猪小肠黏膜提取的肝素经过亚硝酸解聚的方法制得,在制备过程中会使用亚硝酸进行重氮化反应,工艺中残留的游离亚硝酸盐,进入体内会引起血红蛋白载氧功能下降,在酸性条件下在体内与仲胺发生反应,生成强致癌性物质 N-亚硝基胺<sup>[6-8]</sup>,因此对低分子量肝素钠注射液中亚硝酸根离子控制十分必要。低分子量肝素的原料现行标准为国家药品标准 WS<sub>1</sub>-(X-149)-2005Z,亚硝酸盐采用化学显色法测定,灵敏度较低,存在一定安全风险。本文参考相关文献,建立了离子色谱法测定低分子量肝素钠注射液中亚硝酸根离子的含量,并对国内市场收集的 56 批次样品进行测定,现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

ICS-5000 + 型离子色谱仪(配有等度泵,自动进样器,安培检测器,Chromleon7.2 色谱工作站,美国赛默飞公司),工作电极:玻碳电极,参比电极:银-氯化银电极;十万分之一电子天平(MS105DU 型,瑞士 Mettler-Toledo 公司)。

1.2 试剂

亚硝酸根标准溶液(批号:GSB 04-2839-2011,国家有色金属及电子材料分析测试中心);乙酸钠(分析纯,批号:71183-250G, Sigma-Aldrich);实验用水为自制超纯水。固相萃取小柱(Dionex onGuard II RP,大孔二乙烯苯树脂填料,规格:1.0 cc);低分子量肝素钠注射液共收集 4 家企业(代号 A ~ D)共计 56 批,其中 A 企业样品 17 批, B 企业样品 31 批, C 企业样品 3 批, D 企业样品 5 批。方法验证用样品(批号:1L0432008,规格:5000 IU/0.4 mL, B 企业)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件<sup>[9-11]</sup>

色谱柱: Dionex IonPac AS11-HC 分析柱(4 mm×250 mm), Dionex IonPac AG11-HC 保护柱(4 mm×50 mm);淋洗液: 0.68% 乙酸钠溶液;流速: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>;柱温: 30℃;进样量: 25 μL;检测器: 安培检测器,检测器参数设置见表 1;工作电极: 1 mm 玻碳电极, 1 mil gasket;参比电极: Ag/AgCl 电极;检测波形: 三电位波形,检测室温度: 30℃。

表 1 检测器参数设置表

Tab 1 Detector parameter

| 序号 | 时间 /s  | 电压 /V    | 增益  | 积分  |
|----|--------|----------|-----|-----|
| 1  | 0.0000 | 1.0000   | Off | Off |
| 2  | 0.7000 | 1.0000   | On  | On  |
| 3  | 0.8800 | 1.0000   | Off | Off |
| 4  | 0.8900 | 1.5000   | Off | Off |
| 5  | 0.9400 | 1.5000   | Off | Off |
| 6  | 0.9500 | - 1.5000 | Off | Off |
| 7  | 1.0000 | - 1.5000 | Off | Off |

2.2 溶液制备

2.2.1 空白溶液 取超纯水作为空白溶液,滤过,即得。

2.2.2 亚硝酸根离子系列标准溶液 精密量取亚硝酸根标准溶液适量,用水稀释制成每 1 mL 中分别含亚硝酸根含量为 1、12、36、60、100 ng 的系列标准溶液。

2.2.3 供试品溶液 精密量取低分子量肝素钠注射液 100 μL,加入固相萃取小柱,再加入 900 μL 水进行洗脱,取洗脱液 20 μL,加入 980 μL 的水稀释,混匀,即得。

2.2.4 淋洗液的配制 称取乙酸钠固体 13.6 g,加入 2000 mL 超纯水溶解,混匀,用磷酸调 pH 至 4.3,用 0.22 μm 水膜过滤,超声 10 min 备用。

2.3 系统适用性及专属性试验

精密量取空白溶液、亚硝酸根标准溶液(36 ng·mL<sup>-1</sup>)和供试品溶液各 25 μL,注入离子色谱仪,按“2.1”项下色谱条件进行测定,记录色谱图(见图 1)。结果显示,亚硝酸根离子的理论板数大于 10 000,亚硝酸根离子与相邻离子分离度符合要求,表明该方法专属性良好。

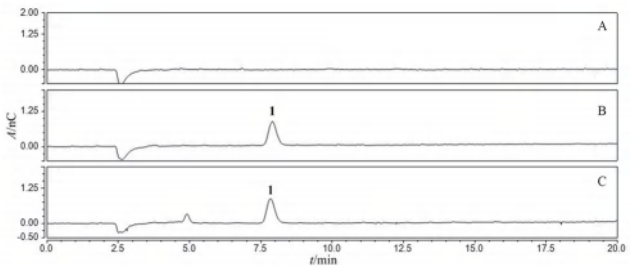


图 1 离子色谱法检测低分子量肝素钠注射液中的亚硝酸根离子色谱图

Fig 1 Chromatogram for nitrite ion detected by ion chromatography in low molecular weight heparin sodium injection

A. 空白溶液 (blank solution); B. 标准溶液 (standard solution); C. 供试品溶液 (sample solution); 1. 亚硝酸根 (nitrite)

2.4 线性关系考察

取“2.2.2”项下亚硝酸根离子系列标准溶液,注入离子色谱仪,记录色谱图,以峰面积为纵坐



标, 质量浓度为横坐标, 绘制标准曲线。结果表明, 在  $1 \sim 100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 亚硝酸根离子的线性回归方程为  $y = 0.004x + 0.028$ ,  $r = 0.9991$ 。

2.5 检测限与定量限试验

取“2.2.2”项下标准系列溶液中最小浓度, 适当调整进样体积, 计算得信噪比约为 3 时, 亚硝酸根离子检测限为  $0.0075 \text{ ng}$ ; 信噪比约为 10 时, 亚硝酸根离子定量限为  $0.0225 \text{ ng}$ 。

2.6 精密度试验

取“2.2.2”下质量浓度为  $36 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的亚硝酸根离子标准溶液, 连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果显示亚硝酸根离子峰面积的  $RSD$  为  $0.76\%$ , 说明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验

取样品 (批号: 1L0432008)  $100 \mu\text{L}$  6 份, 按“2.2.3”项下方法分别制备供试品溶液, 进样测定, 将峰面积代入标准曲线中计算亚硝酸根离子含量, 结果表明, 亚硝酸根离子的含量均值为  $0.000 011\%$ ,  $RSD$  为  $2.5\%$ , 表明方法重复性良好。

2.8 回收试验

精密量取样品 (批号: 1L0432008)  $1.0 \text{ mL}$  置于  $10 \text{ mL}$  量瓶中, 精密加入亚硝酸根浓度为  $400 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  标准溶液  $1.0 \text{ mL}$ , 用水稀释至刻度, 摇匀, 平行制备 6 份。按“2.2.3”项下方法制备溶液, “2.1”项下色谱条件进样分析, 计算平均回收率和  $RSD$ 。结果显示, 亚硝酸根离子的平均回收率为  $93.49\%$ ,  $RSD$  为  $2.8\%$  ( $n = 6$ ), 方法准确度较好。

2.9 稳定性试验

取样品 (批号: 1L0432008) 制备的供试品溶液, 室温放置, 分别于 0、2、4、8、12、24、36 h 进样测定。结果显示, 室温条件下放置 36 h, 亚硝酸根离子峰面积的  $RSD$  为  $2.0\%$ , 溶液稳定性良好。

2.10 样品含量测定

取 56 批低分子量肝素钠注射液样品, 分别按照“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 计算样品中的亚硝酸根离子含量。同时参考 USP44 和 EP11.0 收载的达肝素钠, 以及达肝素钠国家药品标准草案公示稿规定, 设定亚硝酸根的限度为“本品每  $1 \text{ mL}$  中含亚硝酸根离子的量不得过  $0.0005\%$ ”。结果显示, 56 批样品中 15 批样品超出了拟订限度, 其中 A 企业有 13 批样品, D 企业有 2 批样品超出了限度, 见表 2。

3 讨论

3.1 检测器的选择与优化

表 2 低分子量肝素钠注射液中亚硝酸根含量

Tab 2 Content of nitrite ion in low molecular weight heparin sodium injection

| 厂家 | 批号        | 亚硝酸根含量 /% | 厂家 | 批号        | 亚硝酸根含量 /% |
|----|-----------|-----------|----|-----------|-----------|
| A  | 20211202  | 0.000 93  | B  | 1M0152009 | 0.000 024 |
| A  | 20211203  | 0.000 70  | B  | 1M0452008 | 0.000 019 |
| A  | 20211203  | 0.000 67  | B  | 1L0422008 | 0.000 001 |
| A  | 20210901  | 0.000 80  | B  | 1L0412008 | ND        |
| A  | 20211202  | 0.000 91  | B  | 2A0022008 | 0.000 047 |
| A  | 20211204  | 0.000 97  | B  | 1M0142009 | 0.000 058 |
| A  | 20210901  | 0.000 79  | B  | 1L0392008 | ND        |
| A  | 20211202  | 0.000 89  | B  | 1L0122009 | 0.000 023 |
| A  | 20210802  | 0.000 14  | B  | 1M0472008 | 0.000 021 |
| A  | 20210402  | 0.000 14  | B  | 1M0152009 | ND        |
| A  | 20210401  | 0.000 47  | B  | 1M0492008 | 0.000 095 |
| A  | 20220107  | 0.000 46  | B  | 1M0502008 | 0.000 023 |
| A  | 20220103  | 0.000 91  | B  | 1M0452008 | 0.000 030 |
| A  | 20220101  | 0.0012    | B  | 1M0472008 | 0.000 024 |
| A  | 20211105  | 0.0011    | B  | 2A0012008 | 0.000 050 |
| A  | 20220105  | 0.0013    | B  | 1H0352008 | ND        |
| A  | 20220104  | 0.0013    | B  | 2A0022008 | 0.000 042 |
| B  | 1L0412008 | 0.000 001 | B  | 1M0492008 | 0.000 085 |
| B  | 1M0462008 | 0.000 060 | B  | 1M0492008 | 0.000 076 |
| B  | 1M0472008 | 0.000 021 | B  | 1L0432008 | 0.000 011 |
| B  | 1L0432008 | 0.000 005 | C  | 211200301 | 0.000 038 |
| B  | 1L0112009 | ND        | C  | 211100301 | 0.000 059 |
| B  | 1L0442008 | 0.000 023 | C  | 201000203 | 0.000 012 |
| B  | 1M0132009 | 0.000 015 | D  | 211206    | 0.000 52  |
| B  | 1M0462008 | 0.000 028 | D  | 211117    | 0.000 62  |
| B  | 1L0442008 | 0.000 022 | D  | 211205    | 0.000 21  |
| B  | 1H0342008 | ND        | D  | 210903    | 0.000 16  |
| B  | 1H0342008 | 0.000 018 | D  | 210906    | 0.000 082 |

注: ND. 未检出。

Note: ND is not detected.

目前有方法测定达肝素钠中的亚硝酸根时采用电导检测器, 该检测器对亚硝酸根的响应较低, 其检测限仅为  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。国外药典 EP 和 USP 对达肝素钠中亚硝酸根离子进行控制<sup>[12-13]</sup>, 采用安培检测器, 使用  $+1.00 \text{ V}$  的电压, 但基线很不稳定, 且待测成分亚硝酸根的峰形不佳, 导致测定结果的准确度、重复性较差, 且灵敏度不高, 检测限仅为  $0.002 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。本法经过多次试验, 采用安培检测器并对三电位波形进行优化, 可使基线稳定, 且大大改善了亚硝酸根的峰形, 本法的检测限可达到  $0.0075 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 大大提高了分析效率, 可更好地控制本品的质量。

3.2 前处理条件的选择

研究发现, 本品中的亚硝酸根离子含量很

低,且主成分一方面会干扰亚硝酸根的测定,同时高度硫酸化的糖胺聚糖在阴离子交换柱上吸附较强,直接进样后会使其吸附在柱体中,容易损坏离子色谱柱,故研究团队分别采用过醇沉、超滤等手段进行前处理条件优化。经试验后发现,采用醇沉去除部分多糖后,供试品溶液中的亚硝酸根提取不完全,回收率低;采用超滤的方法,无法解除主成分的干扰。本研究经比较发现,采用填充了大孔二乙烯基苯树脂的固相萃取柱过滤的前处理方式,将主成分保留在固相萃取柱上,而亚硝酸根离子流出,这样就可以很好地去除主成分干扰且不会吸附目标待测的阴离子,同时可延长离子色谱柱的寿命。

### 3.3 检测方法的改进

国内现行法定标准采用化学显色法,在低分子量肝素钠原料的供试品中加入氨基苯磺酸- $\alpha$ -萘胺试液 1~2 滴,以“30 s 内不应显紫红色”的方法来控制亚硝酸根的程度。由于该方法灵敏度有限,无法达到良好控制亚硝酸根的目标。参考 EP 和 USP 采用离子色谱法对达肝素钠中亚硝酸根离子进行控制,结合国家药典委员会达肝素钠国家药品标准草案公示稿中亚硝酸盐限度标准,本研究对亚硝酸根离子检测方法进行改进与优化,结果表明建立的方法专属性强,灵敏度高,易于推广。

### 3.4 小结

本文建立了测定低分子量肝素钠注射液中亚硝酸根离子含量的离子色谱法,该方法操作简便,专属性强,准确度高。采用本法测定 56 批次市售品,其中不合格批次为 15 批,占总批次的 26.8%,不合格率较高,建议将亚硝酸根检查

项列入低分子量肝素钠注射液的质量标准中进行严格控制,以促进药品生产企业优化生产工艺,更好地控制产品质量。

### 参考文献

- [1] 侯德坤,李书胜,巩腾飞.低分子肝素的制备技术及临床应用进展[J].山东化工,2020,49(10):52-57.
- [2] 李京,王悦,李颖颖,等.低分子肝素质量标准研究[J].中国药学杂志,2014,49(24):2210-2218.
- [3] 肖菁,王蓉蓉,张俊,等.离子色谱法同时测定低分子量肝素钠注射液中的有机酸和无机阴离子[J].中南药学,2024,22(8):2187-2190.
- [4] 李京,范慧红,徐康森.低分子肝素药用现状及质量标准概况[J].中国生化药物杂志,2004,25(1):53-55.
- [5] 陈思,石靖.低分子肝素类药品的质量控制[J].中国新药杂志,2018,27(3):285-289.
- [6] 张丽萍,李雷刚,马中苏.亚硝酸降解法制备低分子量肝素(LMWH)的工艺参数优化与确定[J].药物分析杂志,2009,29(7):1148-1151.
- [7] 李京,王悦,宋玉娟,等.低分子肝素注射剂质量评价[J].药物分析杂志,2013,33(10):1768-1773.
- [8] 王悦,范慧红.多糖类生化药物的质控策略与质控技术研究进展[J].中国药学杂志,2021,56(1):8-12.
- [9] 韩春霞,梁立娜,范慧红.离子色谱法测定达肝素钠中的亚硝酸根[J].药物分析杂志,2011,31(11):2171-2173.
- [10] 马志华,赵焕荣,李文茂,等.离子色谱法测定那屈肝素钙中亚硝酸根研究[J].亚太传统医药,2013,9(12):56-57.
- [11] 张超,丁建文,管惠娟,等.离子色谱法测定那屈肝素钙中亚硝酸盐含量[J].食品与药品,2014,16(5):338-340.
- [12] EP11.0[S].2023:2460-2461.
- [13] USP-NF2024[S].2023.[https://online.uspnf.com/uspnf/document/1\\_GUID-0748F515-13AB-403C-8643-8BF5EC6F31B7\\_4\\_en-US](https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-0748F515-13AB-403C-8643-8BF5EC6F31B7_4_en-US).

(收稿日期:2024-10-21;修回日期:2024-12-21)

# 离子色谱 - 积分脉冲安培检测法测定木糖醇产品中木糖醇及其他多元醇的含量

粟贵, 谢莹莹\*, 李颖, 周宇 (湖南省药品审核查验中心, 长沙 410014)

**摘要:** **目的** 建立离子色谱 - 积分脉冲安培检测法测定木糖醇产品中木糖醇及其他多元醇含量。**方法** 采用 Dionex CarboPac MA1 保护柱 (50 mm×3 mm) 和 Dionex IonPac AG11-HC 分析柱 (250 mm×3 mm) 为色谱柱; 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量 25 μL; 用标准曲线法定量。**结果** 木糖醇产品中木糖醇、赤藓糖醇、L-阿拉伯糖醇、半乳糖醇、山梨醇、甘露醇在一定质量浓度范围与峰面积呈良好的线性关系 ( $r \geq 0.9998$ ), 回收率良好 (98.84% ~ 100.61%), 供试品溶液、对照品溶液 24 h 内稳定。10 批样品中, 木糖醇含量为 98.65% ~ 100.33%, L-阿拉伯糖醇含量为 0.022% ~ 0.086%, 山梨醇含量为 0.040% ~ 0.051%, 赤藓糖醇含量为 0.006% ~ 0.011%, 半乳糖醇含量为 0.006% ~ 0.012%, 甘露醇均未检出。**结论** 该方法可用于同时测定木糖醇产品中木糖醇及其他多元醇的含量, 为木糖醇产品的质量控制提供参考。

**关键词:** 木糖醇; 赤藓糖醇; L-阿拉伯糖醇; 山梨醇; 半乳糖醇; 甘露醇; 离子色谱 - 积分脉冲安培检测法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)08-2412-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.040

## Determination of xylitol and other polyhydric alcohols in xylitol products by ion chromatography with integral pulse amperometric detection

SU Gui, XIE Ying-ying\*, LI Ying, ZHOU Yu (Hunan Drug Inspection Center, Changsha 410014)

**Abstract: Objective** To determine the content of xylitol and other polyhydric alcohols in xylitol products by ion chromatography with integral pulse amperometric detection, and to evaluate the quality of xylitol products. **Methods** A Dionex CarboPac MA1 guard column (50 mm×3 mm) and a Dionex IonPac AG11-HC analytical column (250 mm×3 mm) was used, the flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, and the injection volume was 25 μL. Standard curves were used for the quantitation. **Results** Good linearity was shown within a certain range of mass concentration for xylitol, erythritol, L-arabinitol, sorbitol, galactitol and mannitol ( $r \geq 0.9998$ ) respectively. The recoveries ranged 98.84% ~ 100.61%. The sample solution and reference solution were stable within 24 h; the xylitol content ranged 98.65% ~ 100.33%, the L-arabinitol content 0.022% ~ 0.086%, the sorbitol content 0.040% ~ 0.051%, the erythritol content 0.006% ~ 0.011%, the mannitol content 0.006% ~ 0.012%, but the galactitol content was not detected in the 10 batches of samples. **Conclusion** The method can be used to determine xylitol and other polyhydric alcohols in xylitol products and help control quality.

**Key words:** xylitol; erythritol; L-arabinitol; sorbitol; galactitol; mannitol; ion chromatography with integral pulse amperometric detection

木糖醇作为药用辅料, 主要用作甜味剂、增塑剂、片剂的填充剂、抗氧剂、渗透压调节剂以及冻干保护剂外, 还可用于注射剂等, 用途十分广泛<sup>[1-2]</sup>; 木糖醇的制备目前常见和大量使用的是

化学加氢法工艺, 具体工艺方法有中和法、离子交换脱酸法和结晶木糖法等, 在原料经酸水解、中和后得到木糖液, 木糖水解液中含有葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、色素、

作者简介: 粟贵, 女, 副主任药师, 主要从事药品、辅料质量控制及新药研究, email: 273340484@qq.com \*通信作者: 谢莹莹, 女, 高级工程师, 主要从事药品、辅料质量控制及新药研究, email: 276468687@qq.com



胶体、5-羟甲基糠醛等许多其他杂质<sup>[3-6]</sup>。这些杂质都有可能随着工艺带入成品中,影响产品的质量,而现行法定标准仅采用气相色谱衍生化法控制木糖醇中阿拉伯糖醇、半乳糖醇、甘露醇和山梨醇,操作烦琐,且并未完全控制糖醇类杂质<sup>[7]</sup>。本文建立了离子色谱-积分脉冲安培检测法测定木糖醇中各糖醇的含量,方法准确,操作简便,可为木糖醇产品质量控制提供科学依据。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Thermo ICS-5000 型离子色谱仪[美国赛默飞世尔有限公司,配置安培检测器(金电极为工作电极,Ag/AgCl 为参比电极,糖四电位波形),工作站为 Chromeleon 7.2]; Mettler Toledo MS105DU 型十万分之一电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司); Milli-Q 超纯水器(Merck Millipore 公司)。

### 1.2 试剂

木糖醇(A企业3批,批号:C118042807、C118042906、C118043002;B企业3批,批号:XCP17032203、XCP17032101、XCP17020402;C企业1批,批号:20160605;D企业1批,批号1601011;E企业1批,批号:150102;F企业1批,批号:20160404);木糖醇对照品(纯度:100%,批号:100463-200902)、山梨醇对照品(纯度:100%,批号:101109-201402)、半乳糖醇对照品(纯度:99.8%,批号:190090-201501)、L-阿拉伯糖醇对照品(纯度:99.6%,批号:190088-201501)、甘露醇对照品(纯度:99.0%,批号:100533-201304)(中国食品药品检定研究院);赤藓糖醇对照品(纯度:100%,批号:982110,来源 LGC 标准品公司);氢氧化钠(NaOH)(优级纯,美国赛默飞世尔有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

采用 Dionex CarboPac MA1 保护柱(50 mm×3 mm)和 CarboPac MA1 分析柱(250 mm×3 mm)为色谱柱;流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>;进样量 25 μL;采集时间 30 min;流动相 0.6 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 溶液。

### 2.2 溶液的配制

**2.2.1 单标储备液** 精密称取木糖醇对照品适量,加水溶解并制成 250 μg·mL<sup>-1</sup> 的对照品储备液;精密称取赤藓糖醇、L-阿拉伯糖醇、山梨醇、半乳糖醇、甘露醇对照品各适量,分别加水溶解并制成含各成分约 500 μg·mL<sup>-1</sup> 的对照品储备液。

**2.2.2 混合对照品储备液** 分别精密量取赤藓糖醇、L-阿拉伯糖醇、山梨醇、半乳糖醇、甘

露醇单标储备液各 5 mL,置同一 50 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得含各成分约 50 μg·mL<sup>-1</sup> 的混合对照品储备液。

**2.2.3 供试品溶液** ①本品约 25 mg,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取上述溶液 1 mL,置 50 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得测定木糖醇含量的供试品溶液(10 μg·mL<sup>-1</sup>);②取本品约 0.25 g,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取上述溶液 1 mL,置 50 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得测定木糖醇中有关物质的供试品溶液(100 μg·mL<sup>-1</sup>)。

### 2.3 专属性试验

精密量取对照品溶液与供试品溶液各 25 μL,注入离子色谱仪,记录色谱图。取试验用水,同法进样测定,进行空白干扰试验,结果水对各成分测定无干扰。对照品溶液、供试品溶液及空白溶液的离子色谱图见图 1。

### 2.4 线性关系的考察

分别精密量取木糖醇对照品储备液 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0 mL 和混合对照品储备液 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 mL,分别置同一 50 mL 量瓶中,即得各线性系列溶液,进样测定,结果见表 1。

表 1 回归方程及线性范围  
Tab 1 Regression equation and linearity

| 成分      | 回归方程                   | <i>r</i> | 线性范围 /<br>(μg·mL <sup>-1</sup> ) |
|---------|------------------------|----------|----------------------------------|
| 木糖醇     | $Y = 6.4411X + 0.6435$ | 0.9998   | 2.5870 ~ 20.6960                 |
| 赤藓糖醇    | $Y = 11.899X + 0.0389$ | 0.9999   | 0.1006 ~ 3.0204                  |
| L-阿拉伯糖醇 | $Y = 8.1385X + 0.0472$ | 0.9999   | 0.1016 ~ 3.0501                  |
| 半乳糖醇    | $Y = 7.0233X + 0.0165$ | 0.9999   | 0.1039 ~ 3.1185                  |
| 山梨醇     | $Y = 6.6021X + 0.0314$ | 0.9999   | 0.0998 ~ 2.9964                  |
| 甘露醇     | $Y = 7.3457X + 0.0086$ | 0.9998   | 0.1085 ~ 3.2551                  |

### 2.5 检测限与定量限

以线性系列溶液中最小浓度溶液进样,适当调整进样体积,计算信噪比约为 3 时木糖醇、赤藓糖醇、L-阿拉伯糖醇、山梨醇、半乳糖醇、甘露醇的检测限分别为 0.0714、0.0789、0.1646、0.0964、0.0998、0.1347 ng,信噪比约为 10 时木糖醇、赤藓糖醇、L-阿拉伯糖醇、山梨醇、半乳糖醇、甘露醇的定量限分别为 0.2382、0.2632、0.5489、0.3213、0.3327、0.4491 ng。

### 2.6 精密度试验

精密量取“2.4”项下对照品溶液(木糖醇、赤藓糖醇、L-阿拉伯糖醇、山梨醇、半乳糖醇、

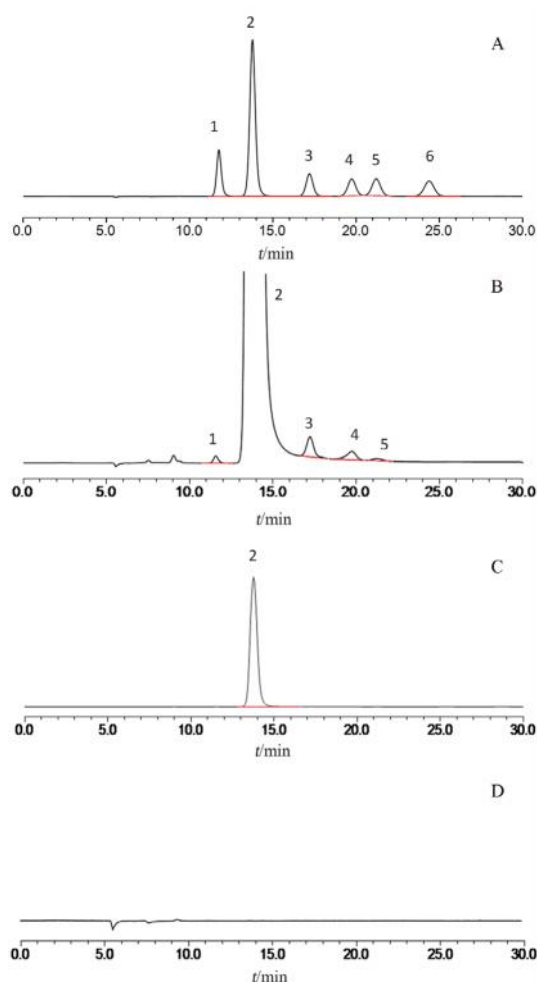


图 1 离子色谱 - 积分脉冲安培检测法测定木糖醇产品中各醇类含量的专属性试验离子色谱图

Fig 1 Specificity test ion chromatograms for determination of polyols in xylitol products by ion chromatography with integrated pulsed amperometric detection (IC-IPAD)

A. 对照品溶液 (reference solution); B. 有关物质供试品溶液 (sample solution for related substances determination); C. 含量测定供试品溶液 (sample solution for content determination); D. 空白溶液 (blank solution); 1. 赤藓糖醇 (erythritol); 2. 木糖醇 (xylitol); 3. L-阿拉伯糖醇 (L-arabinitol); 4. 山梨醇 (sorbitol); 5. 半乳糖醇 (galactitol); 6. 甘露醇 (mannitol)

甘露醇质量浓度分别为 10.3480、1.5102、1.5250、1.4982、1.5592、1.6276  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 25  $\mu\text{L}$  连续进样 6 次, 结果各成分峰面积的  $RSD$  ( $n = 6$ ) 均小于 0.50%, 表明仪器精密度良好。

## 2.7 稳定性考察

取“2.4”项下对照品溶液 (木糖醇、赤藓糖醇、L-阿拉伯糖醇、山梨醇、半乳糖醇、甘露醇分别为 10.3480、1.5102、1.5250、1.4982、1.5592、1.6276  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 和“2.2.3”项下供试品溶液 (100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 在室温 (25  $^{\circ}\text{C}$ ) 放置, 于 0、2、4、8、16、24 h 分别精密量取 25  $\mu\text{L}$ , 注入离子色谱仪,

结果各成分峰面积的  $RSD$  均小于 0.50%, 说明供试品溶液、对照品溶液在制备后 24 h 内稳定。

## 2.8 重复性试验

取本品 (批号: C118042807, 6 种糖醇仅未检出甘露醇) 约 0.25 g, 精密称定, 共 6 份, 分别置于 50 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取上述溶液各 1 mL, 分别置于 50 mL 量瓶中, 再分别精密加入甘露醇质量浓度为 50.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的对照品溶液 0.5 mL, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得 6 份 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  供试品溶液, 用于测定赤藓糖醇、L-阿拉伯糖醇、山梨醇、半乳糖醇、甘露醇; 取上述 6 份 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  供试品溶液, 精密量取各 5 mL, 分别置于 50 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得用于测定样品中木糖醇含量的供试品溶液 (10  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。精密量取各供试品溶液 25  $\mu\text{L}$ , 注入离子色谱仪, 按标准曲线法计算供试品溶液中各糖醇的含量, 结果木糖醇、赤藓糖醇、L-阿拉伯糖醇、山梨醇、半乳糖醇、甘露醇的含量平均值 ( $n = 6$ ) 分别为 100.33%、0.008%、0.060%、0.041%、0.008%、0.503%,  $RSD$  分别为 0.40%、1.1%、4.6%、2.7%、3.3%、2.8%, 表明本法重复性较好。

## 2.9 回收试验

取本品 (批号: C118042807) 约 10、12.5、15 mg, 精密称定, 每组 3 份, 分别置于 50 mL 量瓶中, 分别加入等量的木糖醇对照品, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配制成 80%、100%、120% 3 个浓度水平的加标供试品溶液; 另取本品 (批号: C118042807) 约 0.25 g, 精密称定, 共 6 份, 分别置于 50 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取上述溶液各 1 mL, 分别置于 50 mL 量瓶中, 再分别精密加入混合对照品储备液 0.5 mL, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。精密量取各供试品溶液 25  $\mu\text{L}$ , 注入离子相色谱仪, 按标准曲线法计算样品中各糖醇的回收率。结果木糖醇、赤藓糖醇、L-阿拉伯糖醇、山梨醇、半乳糖醇、甘露醇平均回收率均在 98.84% ~ 100.61%,  $RSD$  均在 0.74% ~ 1.5%, 表明本方法准确度良好。

## 2.10 样品测定

依法测定 10 批木糖醇样品中各糖醇的含量, 结果甘露醇均未检出, 其他结果见表 2。

## 3 讨论

木糖醇现行标准为《中国药典》2020 年版四部, 采用高碘酸钾-硫代硫酸钠滴定法测定木糖醇的含量, 该方法存在显著缺陷, 在实际测定过

表 2 木糖醇样品中木糖醇及其他多元醇的含量测定结果 (%)  
Tab 2 Content of xylitol and other polyhydric alcohols in xylitol samples (%)

| 批号          | 木糖醇    | L- 阿拉伯糖醇 | 山梨醇   | 赤藓糖醇  | 半乳糖醇  |
|-------------|--------|----------|-------|-------|-------|
| C118042807  | 100.33 | 0.064    | 0.045 | 0.008 | 0.008 |
| C118042906  | 99.90  | 0.063    | 0.041 | 0.008 | 0.006 |
| C118043002  | 99.87  | 0.065    | 0.040 | 0.009 | 0.009 |
| XCP17032203 | 100.02 | 0.063    | 0.042 | 0.011 | 0.012 |
| XCP17032101 | 99.15  | 0.071    | 0.046 | 0.009 | 0.010 |
| XCP17020402 | 99.36  | 0.052    | 0.043 | 0.010 | 0.008 |
| 20160605    | 98.84  | 0.022    | 0.042 | 0.011 | 0.012 |
| 1601011     | 98.65  | 0.086    | 0.046 | 0.009 | 0.010 |
| 150102      | 99.38  | 0.030    | 0.043 | 0.010 | 0.008 |
| 20160404    | 98.72  | 0.061    | 0.051 | 0.006 | 0.011 |

程中易受复杂样品基质中其他具有相似化学性质物质的干扰,从而导致测定结果偏离真实值,影响木糖醇含量的精准判定。同时,《中国药典》所规定的木糖醇杂质总量(L-阿拉伯糖醇、半乳糖醇、甘露醇及山梨醇)检测方法为气相色谱法,要求对样品进行衍生化处理,需要精确控制反应温度、时间、试剂用量及反应环境等操作条件,稍有偏差都可能引发衍生化不完全或产生副反应,重复性极差;且整个衍生化反应过程复杂、耗时冗长、检测效率极低<sup>[7]</sup>。此外,该方法的灵敏度有限,对低浓度杂质的检测可能出现漏检或检测不准确的情况,无法满足对木糖醇产品中杂质成分精确检测的需求。因此,建立新的木糖醇含量测定及相关杂质检测方法十分必要<sup>[8]</sup>。

离子色谱-积分脉冲安培检测法作为近年来备受关注的先进仪器分析技术,为解决上述问题提供了有效途径。该方法基于离子交换和安培检测原理,无需对样品进行衍生化处理即可实现对样品中糖类物质的直接分离与测定。本方法考察了Dionex CarboPac PA200和CarboPac MA1两根色谱柱,两者均可用于糖醇分析,但CarboPac MA1分析柱相较于CarboPac PA200电离更弱、出峰较早,保留时间强;同时,考察了流动相0.5、0.6、0.7 mol·L<sup>-1</sup>不同浓度NaOH溶液对分离的影响,结果NaOH浓度过高,则分离不理想;浓度较低,则分析时间较长;在0.6 mol·L<sup>-1</sup>浓度NaOH溶液下,各糖醇均能很好地分离,且进样分析可在30 min内完成<sup>[9-12]</sup>。采用离子色谱-积分脉冲安培检测法测定木糖醇样品中各糖醇的含量,实现了对木糖醇、赤藓糖醇、L-阿拉伯糖醇、山梨醇、半乳糖醇、甘露醇等多种糖醇成分的同步测定。该方法与现行法定标准中“含量测定”“有关物质”项目相比,灵敏度高、精密度好、重现性佳,并且能够准确测定木糖醇

产品中所有糖醇的含量。  
建立的离子色谱-积分脉冲安培检测法测定木糖醇产品中木糖醇及其他多元醇含量,有助于企业对木糖醇产品质量的全面评估,该方法准确,操作简便,为木糖醇产品质量控制提供了科学依据。

参考文献

[1] 罗明生, 高天惠, 侯世祥, 等. 药剂辅料大全 (第二版) [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2006: 866-867.  
[2] 姚静. 药用辅料应用指南 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2011: 205-206.  
[3] 任鸿均. 木糖醇的生产新技术及其应用 [J]. 化工科技市场, 2005 (2): 1-6.  
[4] 朱宏阳, 周剑, 李泳宁, 等. 木糖醇生产的研究进展 [J]. 海峡药学, 2012, 24 (5): 5-7.  
[5] 刘春, 房桂干, 施英乔, 等. 木糖醇的生产技术及应用研究进展 [J]. 林产化学与工业, 2010, 30 (6): 113-118.  
[6] 王关斌, 赵光辉. 木糖醇的生产与发展趋势 [J]. 浙江化工, 2005, 36 (2): 25-26.  
[7] 中国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 618.  
[8] 栗贵, 刘雁鸣, 龙海燕, 等. 离子色谱法测定木糖醇中氯离子、硫酸根离子和磷酸根离子及不同级别产品质量状况的评价 [J]. 中南药学, 2019, 17 (1): 102-104.  
[9] 罗君, 刘毅, 张建玲, 等. 离子色谱-积分脉冲安培检测法测定低聚木糖颗粒中低聚木糖的含量 [J]. 微量元素与健康研究, 2014, 11 (6): 53-54.  
[10] 马甲民, 崔鹤, 李慧新, 等. 离子交换色谱-积分安培检测器测定葡萄酒中天然糖 [J]. 食品科学, 2015, 36 (12): 108-112.  
[11] 沈洁, 周光明, 于露. 离子色谱-脉冲安培检测法测定原桃胶中的多糖含量 [J]. 食品工业科技, 2016, 37 (5): 298-301.  
[12] 王森, 靳贵英, 王彩媚. 离子色谱-积分脉冲安培检测法测定β-环糊精中的有关物质 [J]. 中国药业, 2017, 26 (4): 27-31.

(收稿日期: 2024-11-05; 修回日期: 2024-12-10)



# 基于指纹图谱和含量测定结合化学模式识别评价仙鹤草质量

杨国<sup>1</sup>, 陈洁<sup>2</sup>, 方盈凤<sup>1</sup>, 王俏俏<sup>1</sup>, 季渊博<sup>1</sup>, 邱娟<sup>1</sup>, 杨芳<sup>1</sup>, 李俊<sup>1, 3, 4\*</sup>, 王睿睿<sup>1</sup> (1. 云南中医药大学中药学院, 昆明 650500; 2. 昆明市第三人民医院, 昆明 650200; 3. 云南省民族特色养生理论与健康产品工程研究中心, 昆明 650500; 4. 云南省匡海学专家工作站, 昆明 650500)

**摘要:** **目的** 建立仙鹤草药材的 HPLC 指纹图谱, 结合化学计量学方法分析不同产地与批次仙鹤草药材之间的差异性, 为仙鹤草药材的质量标准提供理论研究基础。**方法** 采用高效液相色谱法建立 20 批不同产地仙鹤草药材的指纹图谱, 进行相似度评价、主成分分析 (PCA)、正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA), 使用 SuperLu 色谱柱 (5  $\mu\text{m}$ , 250 mm $\times$ 4.6 mm), 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ , 流速 1.0 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>, 检测波长 260 nm, 以乙腈-0.1% 乙酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 对仙鹤草药材中 5 个成分进行色谱研究并测定其含量。**结果** 20 批仙鹤草药材共有 16 个共有峰, 指认出其中 5 个成分, 分别为 10 号峰 (牡荆素)、12 号峰 (金丝桃苷)、13 号峰 (异槲皮苷)、14 号峰 (槲皮苷)、16 号峰 (异鼠李素); 20 批仙鹤草药材相似度在 0.729 ~ 0.959, 说明虽然不同产地仙鹤草药材之间存在差异, 但整体质量相似。由主成分分析得到的 5 个主成分, 累计贡献率为 76.262%, 结合 OPLS-DA 筛选了 5 个差异标志物, 依次为 11 号峰、12 号峰 (金丝桃苷)、16 号峰 (异鼠李素)、14 号峰 (槲皮苷)、8 号峰, 推测这 5 个成分是引起不同产地批次仙鹤草的质量差异标志物。牡荆素、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、异鼠李素在 1.225 ~ 12.250、24.550 ~ 196.400、3.850 ~ 30.800、16.400 ~ 131.200、5.200 ~ 41.600  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  与峰面积线性关系良好 ( $R^2 > 0.9987$ ), 平均加样回收率均在 97.80% ~ 103.31%, RSD 值均在 2.4% ~ 7.5%, 表明该方法准确度较好。**结论** 该研究所建立的方法稳定、准确、可靠, 可为后续仙鹤草药材的质量评价提供参考。

**关键词:** 仙鹤草; 指纹图谱; 含量测定; 化学计量学; 质量评价

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)08-2416-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.041

## Quality evaluation of Agrimonia based on fingerprints and content determination combined with chemical pattern recognition

YANG Guo<sup>1</sup>, CHEN Jie<sup>2</sup>, FANG Ying-feng<sup>1</sup>, WANG Qiao-qiao<sup>1</sup>, JI Yuan-bo<sup>1</sup>, QIU Juan<sup>1</sup>, YANG Fang<sup>1</sup>, LI Jun<sup>1, 3, 4\*</sup>, WANG Rui-rui<sup>1</sup> (1. College of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500; 2. Kunming Third People's Hospital, Kunming 650200; 3. Yunnan Engineering Research Center for Special Ethnic Health Theory and Health Products, Kunming 650500; 4. Yunnan Kuang Haixue Workstation, Kunming 650500)

**Abstract: Objective** To establish the high performance liquid chromatography (HPLC) fingerprints of Agrimonia, and analyze the differences in Agrimonia from different origins and batches by combining chemometric analysis, to provide a theoretical basis for the quality standard of Agrimonia. **Methods** The HPLC fingerprints of 20 batches of Agrimonia from different origins were established. We studied the chromatographics of Agrimonia with similarity evaluation, principal component analysis, and orthogonal partial least squares discriminant analysis. SuperLu column (5  $\mu\text{m}$ , 250 mm $\times$ 4.6 mm) was used. The column temperature was 30  $^{\circ}\text{C}$ , the flow rate was 1.0 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>, the

**基金项目:** 云南省匡海学专家工作站 (No.202305AF150029)。

**作者简介:** 杨国, 男, 在读硕士研究生, 主要从事中药药剂学方向的研究, email: yg19980925@163.com \*通信作者: 李俊, 女, 正高级工程师, 硕士研究生导师, 主要从事中药药剂学、现代制药技术研究, email: 411790624@qq.com

detection wavelength was 260 nm, and the acetonitrile-0.1% acetic acid solution served as the mobile phase. **Results** The 20 batches of herbs had 16 common peaks, 5 constituents were recognized: peak 10 (vitexin), peak 12 (hyperoside), peak 13 (isoquercitrin), peak 14 (quercetin), and peak 16 (isorhamnetin). The similarity of the 20 batches of Agrimonia ranged 0.729 ~ 0.959, indicating similar overall quality of the herbs of different origins despite some differences in Agrimonia. The five principal components from the principal component analysis, had a cumulative contribution of 76.262%. Another five difference markers [peak 11, peak 12 (hyperoside), peak 16 (isorhamnetin), peak 14 (quercetin), and peak 8] were screened with orthogonal partial least squares discriminant analysis. Vitexin, hyperoside, isoquercitrin, quercetin and isorhamnetin showed good linearity at 1.225 ~ 12.250, 24.550 ~ 196.400, 3.850 ~ 30.800, 16.400 ~ 131.200, and 5.200 ~ 41.600  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $R^2 > 0.9987$ ). The average recoveries of spiked samples ranged 97.80% ~ 103.31%, and the RSDs were 2.4% ~ 7.5%. **Conclusion** The method is stable, accurate and reliable, which can provide a research basis for the subsequent quality evaluation of Agrimonia.

**Key words:** Agrimonia; fingerprint; content determination; chemometric analysis; quality evaluation

仙鹤草又称龙牙草、脱力草、狼牙草等，为蔷薇科植物龙芽草 *Agrimonia pilosa* Ledeb. 的干燥地上部分。夏、秋两季茎叶茂盛时采割，味苦、涩、平，归心、肝经，具有收敛止血、截疟、止痢、解毒、补虚的功效。研究表明，仙鹤草中含有黄酮类、三萜类、酚酸类、木脂素类、挥发油等化学成分<sup>[1-5]</sup>，而黄酮类成分是其主要有效成分，至今已从中分离得到 30 多种黄酮类天然产物，包括槲皮苷、异槲皮苷、金丝桃苷等化合物。现代药理研究表明，仙鹤草具有镇痛<sup>[6]</sup>、抗炎<sup>[7-8]</sup>、抗氧化<sup>[9-10]</sup>、抗肿瘤<sup>[11-12]</sup>、降糖<sup>[13]</sup>等药理作用。仙鹤草具有较高的临床应用价值，但由于成分复杂，对其有效成分的定量分析鲜见报道，2020 年版《中国药典》仅规定了性状、显微鉴别、薄层鉴别、水分、灰分等质量控制项，尚未建立具体指标成分的专属质量控制方法，难以有效、全面地评价仙鹤草药材质量。

中药指纹图谱是在中药化学成分系统研究基础上建立起来的一种分析方法，可直观地从整体上反映中药中复杂成分的特征性，从而表征中药材的整体特征<sup>[14]</sup>。指纹图谱技术与含量测定的结合能较全面地反映药材质量，因此本文对仙鹤草药材进行指纹图谱研究，结合相似度、主成分分析 (PCA) 及正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 等方法，评价仙鹤草药材质量，为后续仙鹤草药材的研究提供理论参考。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

1200Series 型高效液相色谱仪 (Agilent); BSM120.4 型分析天平 (精度: 万分之一, 上海卓

精电子科技有限公司); EX125ZH 型分析天平 [精度: 十万分之一, 奥斯豪仪器 (常州) 有限公司]; DLX-A8 型分析天平 (精度: 百分之一, 德力西有限公司); SB-5200DT 型超声机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); TST-UPB-20 超纯水机 (石家庄泰斯特仪器设备有限公司)。

### 1.2 试剂

乙腈 (色谱级, 批号: 30Y2403NA, ACS); 超纯水 (实验室自制); 乙酸 (分析级, 上海泰坦科技股份有限公司); 甲醇 (分析级, 四川西陇科学有限公司); 对照品牡荆素 (批号: 20052110, 含量: 98%)、槲皮苷 (批号: DSTDH000601, 含量: 98%)、异槲皮苷 (批号: DSTDY000601, 含量: 98%)、金丝桃苷 (批号: MUST-16102605, 含量: 99.76%)、异鼠李素 (批号: LMT0067-01, 含量: 98%) (成都德斯特有限公司); 收集了云南、四川、湖北、陕西等不同产地的 20 批仙鹤草, 经鉴定为蔷薇科龙牙草 *Agrimonia pilosa* Ledeb. 的干燥地上部分, 药材详细信息见表 1。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

采用 SuperLu 色谱柱 (5  $\mu\text{m}$ , 250 mm $\times$ 4.6 mm), 乙腈 (B) -0.1% 乙酸水溶液 (A) 梯度洗脱 (0 ~ 25 min, 5% ~ 15%B; 25 ~ 60 min, 15% ~ 23%B; 60 ~ 90 min, 23% ~ 45%B), 流速为 1 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>, 检测波长为 260 nm, 柱温为 30  $^{\circ}\text{C}$ , 进样体积为 10  $\mu\text{L}$ 。

### 2.2 供试品溶液配制

精密称取样品编号为 S1 仙鹤草药材粉末 (过

表 1 仙鹤草药材详情  
Tab 1 Details of Agrimonia

| 编号  | 产地   | 批号     | 批次  | 产地    | 批号     |
|-----|------|--------|-----|-------|--------|
| S1  | 云南曲靖 | 240625 | S11 | 河南新乡  | 240704 |
| S2  | 云南大理 | 240626 | S12 | 河南确山  | 240705 |
| S3  | 贵州安顺 | 240627 | S13 | 河南焦作  | 240706 |
| S4  | 重庆市  | 240628 | S14 | 安徽亳州  | 240707 |
| S5  | 广东梅州 | 240629 | S15 | 安徽大别山 | 240708 |
| S6  | 广东清远 | 240630 | S16 | 福建古田  | 240709 |
| S7  | 广西百色 | 240631 | S17 | 福建三明  | 240710 |
| S8  | 广西兴业 | 240701 | S18 | 湖北神农架 | 240711 |
| S9  | 陕西商洛 | 240702 | S19 | 江西九江  | 240712 |
| S10 | 陕西汉中 | 240703 | S20 | 湖南邵阳  | 240713 |

3 号筛) 1 g, 置于 150 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 25 mL70% 甲醇 (pH 5, 乙酸调节), 称定重量, 超声 30 min, 放冷, 补足失重, 摇匀, 过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, 取续滤液即得供试品溶液。

2.3 混合对照品溶液配制

精密称取牡荆素、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、异鼠李素 5 个对照品适量, 置于量瓶中, 加入甲醇溶解, 分别配制含牡荆素 ( $45.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、金丝桃苷 ( $491.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 异槲皮苷 ( $38.50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、槲皮苷 ( $328.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、异鼠李素 ( $104.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的混合对照品储备溶液, 备用。

2.4 指纹图谱的建立及化学计量分析

2.4.1 精密度试验 取编号为 S1 的仙鹤草药材粉末, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 以 14 号峰 (S) 为参照峰, 计算相对峰面积和相对保留时间, 结果显示相对峰面积  $RSD$  值均小于 1.9% ( $n = 6$ ), 相对保留时间  $RSD$  值均小于 1.2%, 表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取编号为 S1 仙鹤草药材粉末, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样测定, 以 14 号峰 (S) 为参照峰, 计算相对峰面积和相对保留时间, 结果显示相对峰面积  $RSD$  值均小于 2.2% ( $n = 8$ ), 相对保留时间  $RSD$  值均小于 0.60%, 表明样品在 24 h 内稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 取编号 S1 仙鹤草药材粉末, 按“2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样, 以 14 号峰 (S) 为参照峰, 计算相对峰面积和相对保留时间, 结果显示相对峰面积  $RSD$  值均小于 2.0% ( $n = 6$ ), 相对保留时间  $RSD$  值均小于 0.74%, 表明该方法重复性良好。

2.4.4 指纹图谱的建立 精密称取 20 批次不同产

地和批次的仙鹤草药材粉末 (S1 ~ S20), 按“2.2”项下方法制备成供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 得到 HPLC 色谱图, 将色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 版) 软件, 以 S1 样品的色谱图作为参照图谱, 采用多点校正进行全谱峰匹配, 建立 20 批仙鹤草药材 HPLC 指纹图谱叠加图谱 (见图 1), 并生成对照图谱 R (见图 2), 对照品图谱见图 3。

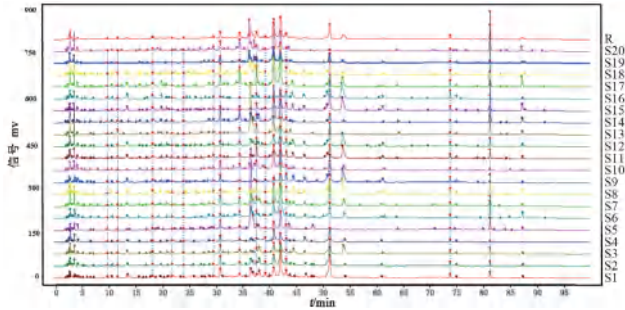


图 1 20 批仙鹤草指纹图谱叠加图

Fig 1 Overlay of the fingerprints of 20 batches of Agrimonia

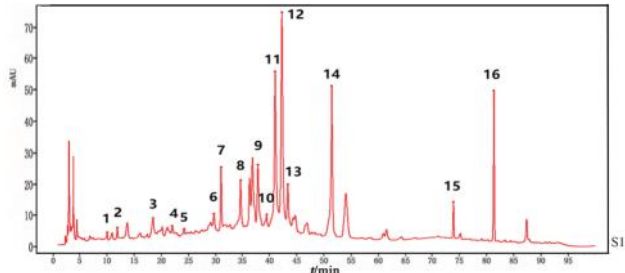


图 2 20 批仙鹤草药材 HPLC 指纹图谱共有模式图

Fig 2 Shared pattern of HPLC fingerprints of 20 batches of Agrimonia

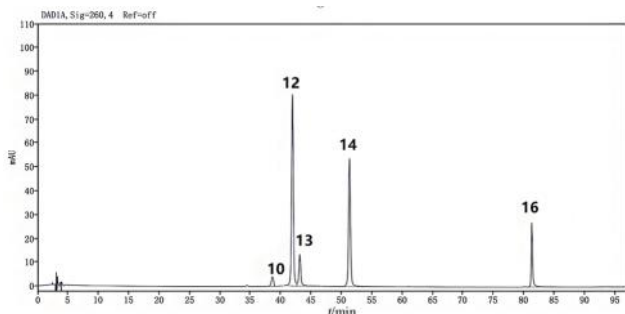


图 3 5 个成分对照品色谱图

Fig 3 Chromatogram of 5 components of the control product

10. 牡荆素 (vitexin); 12. 金丝桃苷 (hyperoside); 13. 异槲皮苷 (isoquercitrin); 14. 槲皮苷 (quercitrin); 16. 异鼠李素 (isorhamnetin)

图谱共标记了 16 个共有峰, 指认出 5 个成分, 分别为 10 号峰 (牡荆素)、12 号峰 (金丝桃苷)、13 号峰 (异槲皮苷)、14 号峰 (槲皮苷)、16 号峰 (异鼠李素)。相似度评价结果显示, 20 批仙鹤草相似度在 0.729 ~ 0.959, 说明不同产地和批次的仙鹤草药材质量之间虽然存在一定差异, 但整体药材质量相似, 结果见表 2。

2.4.5 化学计量学分析



表 2 20 批仙鹤草药材相似度结果  
Tab 2 Similarity of 20 batches of Agrimonia

| 样品 | 相似度   | 样品  | 相似度   | 样品  | 相似度   |
|----|-------|-----|-------|-----|-------|
| S1 | 0.938 | S8  | 0.956 | S15 | 0.815 |
| S2 | 0.953 | S9  | 0.729 | S16 | 0.884 |
| S3 | 0.958 | S10 | 0.940 | S17 | 0.952 |
| S4 | 0.897 | S11 | 0.929 | S18 | 0.917 |
| S5 | 0.854 | S12 | 0.955 | S19 | 0.918 |
| S6 | 0.869 | S13 | 0.880 | S20 | 0.790 |
| S7 | 0.959 | S14 | 0.890 |     |       |

① 主成分分析：将 20 批仙鹤草药材的 16 个共有成分导入 SPSS 27.0 软件进行处理。将原始数据进行标准化处理，然后进行 KMO 和 Bartlett 球形度检验（K）进行因子分析的适应性，结果 KMO 值为 0.357，Sig 值为 0.001，Bartlett 球形度检验（K）结果为 197.244，说明各个指标是相关的，适合因子分析法，并从相关矩阵出发提取了 5 个主成分，结果见表 3。

表 3 仙鹤草药材主成分分析结果  
Tab 3 Principal component analysis of Agrimonia

| 主成分 | 初始特征值 |        |        | 提取载荷平方和 |        |        |
|-----|-------|--------|--------|---------|--------|--------|
|     | 总计    | 方差百分比  | 累计 %   | 总计      | 方差百分比  | 累计 %   |
| 1   | 4.561 | 28.504 | 28.504 | 4.561   | 28.504 | 28.504 |
| 2   | 2.872 | 17.953 | 46.457 | 2.872   | 17.953 | 46.457 |
| 3   | 2.069 | 12.931 | 59.388 | 2.069   | 12.931 | 59.388 |
| 4   | 1.452 | 9.075  | 68.463 | 1.452   | 9.075  | 68.463 |
| 5   | 1.248 | 7.800  | 76.262 | 1.248   | 7.800  | 76.262 |

由表 3 可知，其中特征值 > 1 的主成分有 5 个，累计的方差贡献率为 76.262%，表明提取的 5 个主成分代表了 16 个成分的 76.262%，可以反映测量指标所含的主要信息。同时利用 SIMCA 14.1 软件进行主成分分析，样品分布距离越大，表明药材差异性越大，由图 4 可知 S16 单独为一类，其余可分为一大类。

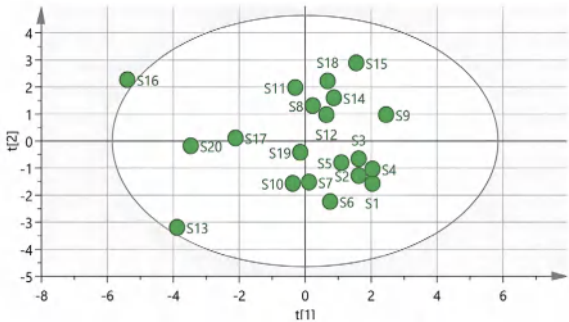


图 4 不同产地和批次的仙鹤草指纹图谱 PCA-X 得分图  
Fig 4 PCA-X scores of the fingerprints of Agrimonia from different origins or batches

② 正交偏最小二乘判别（OPLS-DA）分析：以 HPLC 检测出的 16 个共有峰面积为因变量，不

同产地和批次为自变量进行 OPLS-DA 分析，置换检验图见图 5，其中累计方差  $R^2$  为 0.185，累计交叉有效性  $Q^2$  为 -0.347，说明模型不存在过拟合，该结果可以用于仙鹤草药材的产地分析鉴别。由图 6 可知所有点均落在 95% 置信区间内，表明仙鹤草成分相似，但产地批次明显不一致，分析结果与主成分分析结果一致。

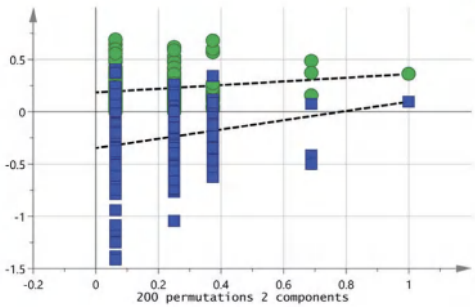


图 5 仙鹤草置换检验图  
Fig 5 Cranberry replacement test of Agrimonia

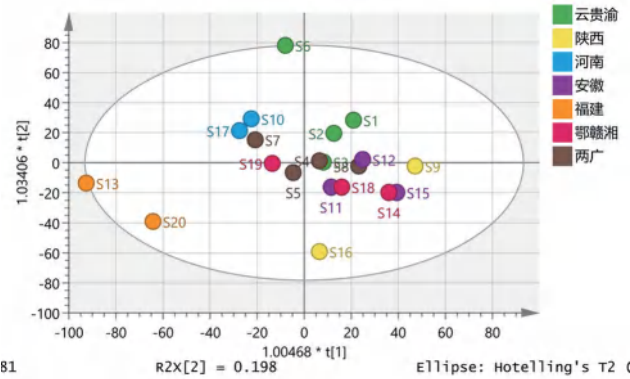


图 6 仙鹤草 OPLS-DA 得分图  
Fig 6 Plot of OPLS-DA scores for Agrimonia

2.5 多成分指标定量分析

2.5.1 线性关系考察 精密吸取“2.3”项下混合对照品溶液储备液，用甲醇稀释定容为 5 个不同质量浓度的混合对照品溶液，依次按“2.1”项下色谱条件进行分析。以对照品质量浓度为横坐标（X），平均峰面积为纵坐标（Y），得到待测成分的线性回归方程和线性范围，相关系数在 0.9987 ~ 0.9996，线性关系良好，结果见表 4。

表 4 5 个成分线性关系考察结果  
Tab 4 Linear relationship of 5 components

| 化合物  | 线性方程                   | 线性范围 /<br>( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | $R^2$  |
|------|------------------------|--------------------------------------------------|--------|
| 牡荆素  | $y = 15.616x + 7.485$  | 1.225 ~ 12.250                                   | 0.9996 |
| 槲皮苷  | $y = 26.393x + 275.72$ | 16.400 ~ 131.200                                 | 0.9989 |
| 异鼠李素 | $y = 31.857x + 79.343$ | 5.200 ~ 41.600                                   | 0.9992 |
| 金丝桃苷 | $y = 24.507x + 321.95$ | 24.550 ~ 196.400                                 | 0.9987 |
| 异槲皮苷 | $y = 24.263x + 53.087$ | 3.850 ~ 30.800                                   | 0.9991 |

2.5.2 精密度考察 取编号 S1 仙鹤草药材粉末，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项

下色谱条件进样测定,重复进样 6 次,计算牡荆素、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、异鼠李素峰面积的 *RSD* 值分别为 1.9%、1.4%、1.8%、1.1%、1.5%,表明仪器精密度良好。

**2.5.3 稳定性试验** 取编号 S1 仙鹤草药材粉末,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,分别于 0、2、4、8、10、12、24 h 进样测定,计算牡荆素、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、异鼠李素峰面积的 *RSD* 值分别为 0.90%、1.2%、1.8%、1.2%、2.2%,表明样品在 24 h 内稳定性良好。

**2.5.4 重复性试验** 取编号 S1 仙鹤草药材粉末,按“2.2”项下方法制备 6 份供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算牡荆素、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、异鼠李素峰面积的 *RSD* 值分别为 1.3%、1.2%、0.90%、0.50%、2.0%,表明该方法重复性良好。

**2.5.5 加样回收试验** 精密称取编号 S1 的仙鹤草样品 0.5 g,按供试品中牡荆素、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、异鼠李素含量的 80%、100%、120% 精密加入相应对照品,按“2.2”项下方法分别平行制备 3 份样品,按“2.1”项下色谱条件进样检测,计算加样回收率,牡荆素、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、异鼠李素平均加样回收率均在 97.80%~103.31%,*RSD* 值均在 2.4%~7.5%。

**2.5.6 样品含量测定** 按“2.2”项下方法制备 20 批仙鹤草供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样检测 5 个成分的含量,结果表明,各个产地仙鹤草 5 个成分含量之间存在较大差异,可能与生长环境和地域有关,含量测定结果见表 5。

3 讨论

本研究考察了水、50% 甲醇、70% 甲醇、甲醇、50% 乙醇、70% 乙醇、乙醇、二氯甲烷、正丁醇、乙酸乙酯等提取溶剂,结果显示当以 70% 甲醇作为提取溶剂时,仙鹤草峰容量较多,各峰响应值较高,故选择 70% 甲醇提取;曾比较了超声提取、回流提取两种方式,发现超声提取优于回流提取,故选择超声提取;考察了不同提取溶剂的 pH 值,最后发现当提取溶剂 pH 5 (乙酸调节) 时,提取效果优于其他 pH 值时的效果,故选择 pH 5 的 70% 甲醇作为提取溶剂。

对仙鹤草进行全波段扫描时,发现在检测波长为 260 nm 时,色谱信息较为丰富,响应值普遍偏高,故选择 260 nm 为检测波长;流动相体系考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸水、乙腈-0.1% 甲酸水、乙腈-0.1% 乙酸水,发现当流动相为乙腈-0.1% 乙酸水洗脱时,基线较

表 5 20 批仙鹤草药材中 5 个成分含量测定结果 ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )  
Tab 5 Content of 5 components in 20 batches of Agrimonia ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )

| 编号  | 牡荆素     | 槲皮苷      | 异鼠李素     | 异槲皮苷    | 金丝桃苷     |
|-----|---------|----------|----------|---------|----------|
| S1  | 295.292 | 1451.984 | 118.203  | 347.205 | 1662.251 |
| S2  | 246.579 | 1175.771 | 84.747   | 179.574 | 1266.764 |
| S3  | 200.223 | 761.728  | 467.768  | 134.892 | 5041.823 |
| S4  | 86.917  | 838.709  | 129.971  | 91.150  | 540.736  |
| S5  | 300.937 | 743.010  | 27.383   | 73.120  | 200.258  |
| S6  | 273.878 | 33.747   | 294.865  | 274.294 | 790.235  |
| S7  | 35.214  | 922.377  | 543.587  | 260.627 | 1671.499 |
| S8  | 219.952 | 1599.814 | 245.400  | 274.758 | 1312.771 |
| S9  | 95.751  | 1540.379 | 26.722   | 475.818 | 236.602  |
| S10 | 86.629  | 499.124  | 1790.435 | 47.891  | 1958.936 |
| S11 | 8.381   | 520.498  | 29.745   | 263.573 | 1806.312 |
| S12 | 240.713 | 434.156  | 22.543   | 86.374  | 1776.200 |
| S13 | 62.041  | 606.794  | 204.453  | 285.390 | 479.008  |
| S14 | 115.481 | 1263.959 | 194.775  | 295.320 | 1033.400 |
| S15 | 14.432  | 91.167   | 42.553   | 281.544 | 211.428  |
| S16 | 588.192 | 264.088  | 1193.612 | 169.371 | 1633.013 |
| S17 | 312.879 | 24.499   | 1138.753 | 63.816  | 866.769  |
| S18 | 10.118  | 1715.624 | 727.122  | 293.454 | 799.667  |
| S19 | 98.654  | 767.346  | 237.636  | 86.827  | 287.661  |
| S20 | 65.468  | 370.271  | 50.319   | 30.763  | 376.299  |

平稳,色谱峰出峰情况较好,无拖尾现象,色谱峰分离程度较好,故选择乙腈-0.1% 乙酸水为流动相条件。

本研究建立了仙鹤草的指纹图谱,并对其 5 个成分进行了含量测定,不同批次与产地之间 20 批仙鹤草药材成分含量存在较大差异,可能与仙鹤草的生长年限、地理条件以及采收时间等有关。20 批仙鹤草样品指纹图谱与对照图谱的相似度为 0.729~0.959,表明不同批次仙鹤草样品质量存在差异,由主成分分析得到的 5 个主成分,其累计贡献率为 76.262%,结合正交偏最小二乘判别分析筛选了 5 个差异标志物,依次为 11 号峰、12 号峰 (金丝桃苷)、16 号峰 (异鼠李素)、14 号峰 (槲皮苷)、8 号峰,推测这几个成分是引起不同产地批次仙鹤草的质量差异标志物。由主成分分析可知,福建古田和陕西汉中的仙鹤草药材质量优于其他产地的。结合以上研究结果,建议仙鹤草药材在进行采收时应尽可能保证药材的完整性,确保药材整体的质量和药效。

黄酮类成分作为仙鹤草中主要研究方向之一,其中抗肿瘤、镇痛抗炎、抗氧化等药效得到了广泛研究,但对其成分的定量检测并不完善,作用机制研究还需进一步加深,对一些难以从仙鹤草中提取分离的有效成分,可采用合成的方法获得<sup>[15]</sup>,以发挥仙鹤草更大的临床应用价值。

## 参考文献

- [1] 张慧兰, 郭文晖, 王旭, 等. 仙鹤草化学成分和药理作用的研究进展及其质量标志物 (Q-Marker) 预测分析 [J]. 中草药, 2023, 54 (16): 5399-5409.
- [2] 张佳, 杨桢楠, 姜建双, 等. 仙鹤草中木脂素类化学成分的研究 [J]. 中草药, 2021, 52 (17): 5176-5184.
- [3] 路芳, 巴晓雨, 何永志. 仙鹤草的化学成分研究 [J]. 中草药, 2012, 43 (5): 851-855.
- [4] 李雅文, 黄兰芳, 梁晟, 等. 仙鹤草挥发油化学成分的气相色谱-质谱分析 [J]. 中南大学学报 (自然科学版), 2007, 38 (3): 502-506.
- [5] 杜成智, 王卉, 冯旭, 等. 不同产地仙鹤草挥发油成分的 GC-MS 分析 [J]. 江苏农业科学, 2014, 42 (4): 253-255.
- [6] 蒙衍强, 唐献兰, 黄健军, 等. 闪提法对仙鹤草止血镇痛作用的影响 [J]. 中成药, 2013, 35 (7): 1560-1562.
- [7] 唐当柱, 徐娅玲, 杨琼英, 等. 仙鹤草正丁醇提取部位抗炎作用及其化学成分研究 [J]. 云南中医中药杂志, 2023, 44 (4): 86-95.
- [8] 胡乔, 孙璇, 杨媛媛, 等. 中药仙鹤草中异香豆素类化合物抗炎活性的 DFT 研究 [J]. 当代化工, 2023, 52 (1): 231-235.
- [9] 康林之, 袁敏, 邵峰, 等. 仙鹤草不同提取物抗疲劳抗氧化及免疫调节作用研究 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27 (5): 1079-1081.
- [10] Liu X, Zhu LC, Tan J, et al. Glucosidase inhibitory activity and antioxidant activity of flavonoid compound and triterpenoid compound from *Agrimonia pilosa* Ledeb [J]. BMC Complementary Altern Med, 2014, 14: 12.
- [11] 彭丽蓉, 彭海燕. 仙鹤草抗癌作用的临床与试验研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37 (7): 3992-3994.
- [12] 程艳刚, 谭金燕, 叶文冲, 等. 基于 Plackett-Burman 设计和 Box-Behnken 响应面法优化仙鹤草总黄酮超声提取工艺及其抗氧化抗肿瘤活性研究 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36 (10): 2414-2419.
- [13] 李丹, 院博, 王亚宁. 仙鹤草干预糖尿病的有效成分及作用机制研究 [J]. 中医研究, 2024, 37 (7): 78-84.
- [14] 范鑫玉, 吉田, 笔雪艳, 等. 中药指纹图谱分类及评价概述 [J]. 黑龙江医药, 2023, 36 (6): 1254-1258.
- [15] 张潇, 毛泽伟, 高慧. 仙鹤草内酯消旋体的合成研究 [J]. 化学通报, 2024, 87 (8): 988-991.

(收稿日期: 2024-10-18; 修回日期: 2024-12-18)

## 不同企业、不同级别聚山梨酯 80 中过氧化物测定及比较研究

周颖<sup>1, 2</sup>, 蒋贇<sup>1, 2\*</sup>, 李昌亮<sup>1, 2</sup>, 刘雁鸣<sup>1, 2\*</sup> (1. 湖南省药品检验检测研究院, 长沙 410001; 2. 国家药品监督管理局药用辅料工程技术研究重点实验室, 长沙 410001)

**摘要:** 目的 考察市场上不同生产企业、不同级别聚山梨酯 80 中过氧化物含量及其影响因素, 为药用辅料的评价和选择提供依据。方法 采用柱前衍生化 HPLC-UV 法测定不同聚山梨酯 80 样品中过氧化物含量, 采用 SPSS 软件对结果进行统计分析; 考察高温、高湿和光照三个因素对聚山梨酯 80 中过氧化物含量的影响。结果 在  $0.4875 \sim 22.75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  内, 过氧化物浓度与峰面积呈良好的线性关系 ( $r = 0.9999$ ), 检测限  $0.01 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 精密度和重复性 RSD 分别为 1.0%、2.7%, 平均回收率为 100.2%, RSD 为 3.0%, 方法的灵敏度高、准确度高。64 批聚山梨酯 80 样品中过氧化物含量在  $15.54 \sim 172.64 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ , 均值  $58.60 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ; 不同生产企业、不同级别、国内外样品中过氧化物的量存在差异; 高温、高湿和光照等因素均使聚山梨酯 80 中过氧化物含量增加, 不同样品稳定性差异较大。结论 柱前衍生化 HPLC-UV 法可用于聚山梨酯 80 中过氧化物的测定和比较, 对产品质量更有区分力, 可用于考察不同生产企业、不同级别样品的质量控制情况, 为药品研发和生产企业选用优质药用辅料, 提高药品的质量、安全性和稳定性提供参考和指导。

**关键词:** 聚山梨酯 80; 过氧化物; 高效液相色谱法

中图分类号: R927

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)08-2421-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.042

**基金项目:** 湖南省自然科学基金-科药联合基金项目 (No.2023JJ60106)。

**作者简介:** 周颖, 女, 副主任药师, 主要从事药品药用辅料研究, email: 519315503@qq.com \*通信作者: 蒋贇, 女, 副研究员, 主要从事药品药用辅料研究, email: jiangyun127@hotmail.com; 刘雁鸣, 女, 主任药师, 主要从事药品药用辅料研究, email: ymlu68@yahoo.com.cn



## Content determination of peroxide in polysorbate 80 from different manufacturers and grades

ZHOU Ying<sup>1,2</sup>, JIANG Yun<sup>1,2\*</sup>, LI Chang-liang<sup>1,2</sup>, LIU Yan-ming<sup>1,2\*</sup> (1. Hunan Institute for Drug Control, Changsha 410001; 2. NMPA Key Laboratory for Pharmaceutical Excipients Engineering Technology Research, Changsha 410001)

**Abstract: Objective** To determine the content of peroxide in polysorbate 80 from different manufacturers and grades in the market and its influencing factors, to help evaluate and select pharmaceutical excipients. **Methods** The content of peroxide in different samples of polysorbate 80 was determined by precolumn derivatization HPLC-UV method. The results were analyzed with SPSS. The effects of high temperature, high humidity and light on the content of peroxide in polysorbate 80 were determined. **Results** Peroxide showed good linearity within  $0.4875 \sim 22.75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $r = 0.9999$ ). The detection limit was  $0.01 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , the *RSDs* of precision and reproducibility were 1.0% and 2.7%. The average recovery was 100.2%, with *RSD* was 3.0%. The sensitivity and accuracy of the method were good. The content of peroxide in the 64 sample batches ranged from  $15.54 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  to  $172.64 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ , with an average of  $58.60 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ . The statistical analysis of the content of peroxide in the sample from different manufacturers, different grades and domestic and foreign sources all showed substantial differences. Factors such as high temperature, high humidity and light exposure all increased the peroxide content in polysorbate 80, and the stability of different samples varied greatly. **Conclusion** The precolumn derivatization HPLC-UV method can be used to determine and compare the content of peroxide in polysorbate 80 from different manufacturers and grades, to assess the quality and guide drug research and production enterprises to select high-quality pharmaceutical excipients.

**Key words:** polysorbate 80; peroxide; HPLC

聚山梨酯 80 系油酸、山梨醇和环氧乙烷聚合而成的聚氧乙烯 20 油酸山梨坦，为多元醇型非离子表面活性剂，作为药用辅料可用作增溶剂、乳化剂和蛋白稳定剂等，常被用作蛋白药物如单克隆抗体的稳定剂，是生物制品中不可替代的重要辅料<sup>[1]</sup>。通过国家药审中心的原辅包登记公示数据库<sup>[2]</sup>查询到不同级别的聚山梨酯 80 和聚山梨酯 80 (II) 关联审评信息共 48 条，其中聚山梨酯 80 共 33 条，涉及 20 家生产企业；聚山梨酯 80 (II) 共 15 条，涉及 10 家生产企业。聚山梨酯 80 主要用于片剂、溶液剂、胶囊、注射剂和凝胶剂，聚山梨酯 80 (II) 主要用于注射剂、生物制剂。查阅文献<sup>[3-4]</sup>和前期向生产企业调研发现，聚山梨酯 80 的生产工艺中可能添加过氧化氢进行脱色，成品中可能残留痕量的过氧化氢。同时，在有氧的情况下，金属或光催化会引发聚山梨酯的不稳定性，导致过氧化物的形成，进而触发聚山梨酯的自氧化，是聚山梨酯 80 中过氧化物的主要来源<sup>[5-6]</sup>。过氧化物会直接影响聚山梨酯

80 的物理化学性质，同时还可能促进药物分子的氧化损伤或药物中基因毒杂质 *N*-亚硝基二甲胺 (NDMA) 的增长<sup>[7]</sup>等，从而影响药物的安全性和稳定性。过氧化物是表征聚山梨酯 80 质量内在差异的重要指标之一，《中国药典》2020 年版四部收载了聚山梨酯 80 和聚山梨酯 80 (II) 的质量标准<sup>[8]</sup>，均设置了过氧化值检查项，系采用滴定分析法，但滴定分析法终点变色不明显，判断受人为因素影响较多，方法灵敏度不高，无法实现微量或痕量检测。过氧化物可与衍生化试剂三苯基膦反应，定量生成氧化三苯基膦，可被高效液相色谱仪在 225 nm 波长下定量测定，从而实现对过氧化物浓度的间接分析<sup>[9-13]</sup>，本次研究基于该原理建立了柱前衍生化 HPLC-UV 法测定聚山梨酯 80 中的过氧化物，以过氧化氢为对照表征过氧化物的量，采用该方法对目前市场上不同生产企业、不同级别聚山梨酯 80 样品中过氧化物含量进行考察并对结果进行比较研究，以期为药品生产企业选择优质的药用辅料提供技术和数据支持。

## 1 仪器与试剂

Agilent 1260 Infinity II 液相色谱仪 (DAD 检测器, 安捷伦科技有限公司); AUW220D 型电子天平 (日本岛津, 精度: 0.01 mg); 水为自制超纯水; 乙腈 (色谱纯, Merck); 三苯基膦 (成都市科隆化学品有限公司, 批号: 2022010401, 纯度: 99.0%); 过氧化氢对照品 (国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20181023, 纯度: 30.95%); 样品聚山梨酯 80 (II) 共 40 批, 来自 5 个生产企业 (企业 A、B、C、D、E), 其中企业 E 为国外生产企业; 样品聚山梨酯 80 共 24 批, 来自 8 个生产企业 (企业 B、C、D、F、G、H、I、J)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

采用 GL Sciences Inertsil ODS-3 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈为流动相 A, 水为流动相 B, 梯度洗脱 (0 min, 40%B; 10 min, 40%B; 10.1 min, 10%B; 16 min, 10%B; 16.1 min, 40%B; 20 min, 40%B); 检测波长为 225 nm, 柱温为 30℃, 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量为 20 μL。

### 2.2 溶液的配制

**2.2.1 三苯基膦溶液** 称取 0.25 g 三苯基膦, 置 50 mL 量瓶中, 用乙腈溶解并稀释至刻度。

**2.2.2 对照品储备液** 精密量取过氧化氢对照品 3.5 mL, 置 100 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液① (10.8325 mg·mL<sup>-1</sup>); 精密量取 1 mL 对照品储备液①置 100 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液② (108.325 μg·mL<sup>-1</sup>); 精密量取 5 mL 对照品储备液②置 100 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液③ (5.416 μg·mL<sup>-1</sup>)。

**2.2.3 对照品溶液** 精密量取对照品储备液② 10 mL, 置 100 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 作为过氧化氢对照品溶液 (10.8325 μg·mL<sup>-1</sup>)。精密量取 3 mL 过氧化氢对照品溶液, 置 10 mL 棕色量瓶中, 加入乙腈 4 mL, 三苯基膦溶液 2 mL, 用水稀释至刻度, 摇匀, 充入氮气后置暗处室温放置 30 min, 进行衍生化反应, 作为对照品溶液 (3.25 μg·mL<sup>-1</sup>)。

**2.2.4 供试品溶液** 取本品约 0.5 g, 精密称定, 置 10 mL 棕色量瓶中, 加入乙腈 4 mL 使溶解, 再加入三苯基膦溶液 2 mL, 用水稀释至刻度, 摇匀, 充入氮气后置暗处室温放置 30 min, 进行衍生化反应, 作为供试品溶液。

### 2.3 线性关系试验

取“2.2.2”项下对照品储备液①, 分别精密量取适量, 用水定量稀释制成 1.625、5.416、10.83、21.66、43.33、54.16、75.83 μg·mL<sup>-1</sup> 的系列对照品溶液。精密量取系列对照品溶液各 3 mL, 按“2.2.3”项下方法进行衍生化反应, 作为系列过氧化氢线性溶液。精密量取 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图。以质量浓度为横坐标 (X), 氧化三苯基膦峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 得线性方程  $Y = 906.52X + 179.81$ ,  $r = 0.9999$ 。结果表明过氧化氢在 0.4875 ~ 22.75 μg·mL<sup>-1</sup> 与峰面积呈良好的线性关系。

### 2.4 定量限与检测限

取 1.625 μg·mL<sup>-1</sup> 对照品溶液加水逐步稀释, 按“2.2.3”项下方法进行衍生化反应, 衍生化结束后进行测定。以其信噪比 (S/N) 为 10:1 时的质量浓度为定量限, 测得过氧化氢定量限为 0.03 μg·mL<sup>-1</sup>, S/N 为 3:1 时的质量浓度为检测限, 测得过氧化氢检测限为 0.01 μg·mL<sup>-1</sup>。

### 2.5 进样精密度试验

精密量取“2.2.3”项下对照品溶液, 注入液相色谱仪, 连续进样 6 次, 记录色谱图, 结果氧化三苯基膦峰面积 RSD 为 1.0%, 表明仪器的精密度良好。

### 2.6 重复性试验

取样品 (批号: 20220403-3) 约 0.5 g, 共 6 份, 按“2.2.4”项下方法制备供试品溶液。分别进样测定, 记录色谱图, 色谱图见图 1。计算得到样品中过氧化物的含量平均值为 57.69 μg·g<sup>-1</sup>, RSD 为 2.7% (n = 6), 表明本方法重复性良好。

### 2.7 溶液的稳定性试验

取供试品溶液 (批号: 20220403-3), 于室温避光条件放置 3 h, 分别于 0、20、40、60、80、100、120、180 min 时进样测定, 测得过氧化物含量 RSD 为 3.5% (n = 8), 供试品溶液在避光条件下放置 3 h 过氧化物略有增长, 建议供试品溶液临用新制, 在 3 h 内进样完毕。

### 2.8 回收试验

取供试品 (批号: 20220403-3) 6 份 (0.26 g), 每组分别精密加入对照品储备液③ 3.0 mL, 按“2.2.4”项下方法制备供试品溶液, 进样测定。计算得平均回收率为 100.2%, RSD 为 3.0% (n = 6), 结果表明本方法准确度高。

### 2.9 样品含量测定

取 10 个生产企业的 64 批次样品, 按“2.2.4”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 以对照品

外标法计算样品中过氧化物的含量。同时采用《中国药典》2020 年四部聚山梨酯 80 质量标准中的过氧化值<sup>[8]</sup>检查方法测定 64 批样品中的过氧化物。结果见表 1、2 及图 2。

表 1 两种方法测定过氧化物含量结果

Tab 1 Content of peroxide by two different methods

| 级别                | 企业 | 批号           | 过氧化物 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )<br>(HPLC 法) | 过氧化值<br>(滴定法) | 级别                | 企业          | 批号           | 过氧化物 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )<br>(HPLC 法) | 过氧化值<br>(滴定法) |
|-------------------|----|--------------|----------------------------------------------------------|---------------|-------------------|-------------|--------------|----------------------------------------------------------|---------------|
| 聚山梨酯<br>80 ( II ) | A  | F119C220301  | 23.10                                                    | 1.0           | 聚山梨酯<br>80 ( II ) | D           | 20220205     | 50.47                                                    | 0.8           |
|                   |    | F119C221101  | 22.34                                                    | 0.9           |                   |             | 20221203     | 80.12                                                    | 3.0           |
|                   |    | F119C230101  | 34.61                                                    | 1.6           |                   |             | 20220501-1   | 30.56                                                    | 1.8           |
|                   | B  | 112920220803 | 136.46                                                   | 4.1           |                   | E           | 20220103     | 45.39                                                    | 1.8           |
|                   |    | C-05-220201  | 132.47                                                   | 2.0           |                   |             | 20220404     | 22.68                                                    | 2.6           |
|                   | C  | C-05-220202  | 125.80                                                   | 2.6           |                   |             | 205355C      | 23.52                                                    | 0.1           |
|                   |    | C-05-220203  | 122.71                                                   | 2.5           |                   |             | 205355B      | 20.65                                                    | 0.3           |
|                   | D  | 20221203     | 17.06                                                    | 1.2           |                   |             | 201354E      | 32.72                                                    | 1.9           |
|                   |    | 20220205     | 45.94                                                    | 0.7           | 聚山梨酯<br>80        | B           | 101720220702 | 122.00                                                   | 4.1           |
|                   |    | 20220404     | 32.98                                                    | 1.1           |                   |             | 101720221101 | 114.21                                                   | 6.2           |
|                   |    | 20220401     | 28.38                                                    | 1.2           |                   |             | 101720220401 | 55.99                                                    | 1.3           |
|                   |    | 20220205     | 28.14                                                    | 1.1           |                   |             | 101720221102 | 81.97                                                    | 1.2           |
|                   |    | 20220502     | 68.55                                                    | 2.3           |                   |             | 101720230101 | 76.50                                                    | 1.5           |
|                   |    | 20220105     | 29.16                                                    | 0.8           |                   |             | 101720230102 | 79.15                                                    | 1.4           |
|                   |    | 20230201     | 22.36                                                    | 1.7           |                   |             | 101720230201 | 89.16                                                    | 2.1           |
|                   |    | 20220204     | 28.49                                                    | 1.0           | C                 | C-01-220301 | C-01-220301  | 57.53                                                    | 1.7           |
|                   |    | 20220305-4   | 15.54                                                    | 0.6           |                   |             | C-01-220302  | 47.32                                                    | 1.7           |
|                   |    | 20220404     | 100.74                                                   | 2.3           |                   |             | C-01-220303  | 50.94                                                    | 1.6           |
|                   |    | 20220205     | 22.61                                                    | 0.5           | D                 | 220701      | 220701       | 115.06                                                   | 4.3           |
|                   |    | 20220303-4   | 18.35                                                    | 0.3           |                   |             | 20220301     | 76.67                                                    | 4.8           |
|                   |    | 20221203     | 27.41                                                    | 1.3           |                   |             | N20230103    | 44.86                                                    | 3.2           |
|                   |    | 20220402-4   | 20.14                                                    | 0.6           |                   |             | N20230104    | 43.57                                                    | 3.9           |
|                   |    | 20230201     | 30.15                                                    | 1.6           |                   |             | N20230106    | 34.94                                                    | 3.8           |
|                   |    | 20230101-2   | 41.46                                                    | 1.3           |                   |             | 20210701     | 81.94                                                    | 2.5           |
|                   |    | 20230201     | 44.67                                                    | 1.8           | F                 | 20220613    | 20220613     | 34.64                                                    | 1.4           |
|                   |    | 20220305-3   | 152.39                                                   | 1.9           |                   |             | 20220501     | 48.30                                                    | 1.5           |
|                   |    | 20220305-3   | 18.49                                                    | 1.0           | H                 | 22042001    | 22042001     | 50.91                                                    | 1.6           |
|                   |    | 20220403-3   | 58.20                                                    | 1.7           |                   |             | 22011101     | 73.06                                                    | 0.7           |
|                   |    | 20220301     | 47.62                                                    | 0.9           | I                 | 20220801    | 20220801     | 172.64                                                   | 7.4           |
|                   |    | 20211203     | 130.13                                                   | 2.1           |                   |             | 20220225     | 81.21                                                    | 3.8           |
|                   |    | 20220502     | 29.78                                                    | 0.8           | J                 | 20220725    | 20220725     | 63.68                                                    | 2.7           |
|                   |    | 20220205     | 22.65                                                    | 0.9           |                   |             | 20221202     | 69.11                                                    | 2.6           |

表 2 两种方法测定过氧化物含量结果统计

Tab 2 Statistics of content of peroxide by different methods

| 方法            | 均值   | 中值   | 标准差  | 全距    | 极小值  | 极大值   |
|---------------|------|------|------|-------|------|-------|
| 过氧化物 (HPLC 法) | 58.6 | 46.6 | 38.7 | 157.1 | 15.5 | 172.6 |
| 过氧化值 (滴定法)    | 1.9  | 1.6  | 1.4  | 7.3   | 0.1  | 7.4   |

《中国药典》2020 年版四部规定过氧化值系指供试品 1 kg 中含有的其氧化力与一定量的氧相当的过氧化物的含量,根据滴定法及过氧化值的计算公式可推导出,当样品中过氧化物含量为  $17 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  时(以过氧化氢计),按照滴定法测定并计算得到的过氧化值为 1。采用 SPSS 软件,对过氧化物含量和过氧化值进行 Pearson 相关性分析,结果在 0.01 级别相关性显著,相关系数为 0.656,表明过氧化物和过氧化值之间有显著的正相关关系。

2.10 不同企业样品中过氧化物含量比较

采用 SPSS 软件及非参数 Kruskal-Wallis H 检验,滴定法测定的不同生产企业样品中过氧化值进行比较,结果  $P$  值为 0.086,差异无统计学意义;对采用 HPLC 法测定的不同生产企业样品中过氧化物的量进行比较, $P$  值为 0.001,差异有统计学意义,即表明采用 HPLC-UV 法测定,不同生产企业样品中的过氧化物含量存在差异。

将 64 批次样品 HPLC 法测定过氧化物结果按企业分类后进行统计分析,结果见表 3;样品批次  $\geq 6$  的生产企业绘制箱式图,结果见图 3。



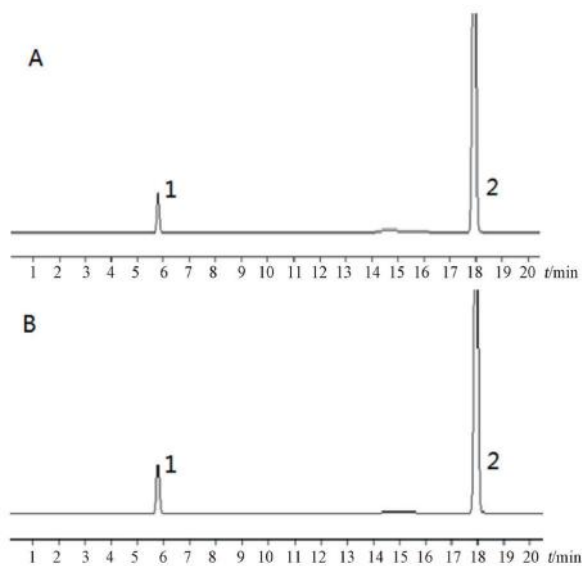


图 1 过氧化物测定 HPLC 色谱图  
Fig 1 HPLC chromatogram of peroxide content determination  
A. 对照溶液 (control solution); B. 供试品溶液 (sample solution);  
1. 氧化三苯基膦 (triphenylphosphine oxide); 2. 三苯基膦 (triphenylphosphine)

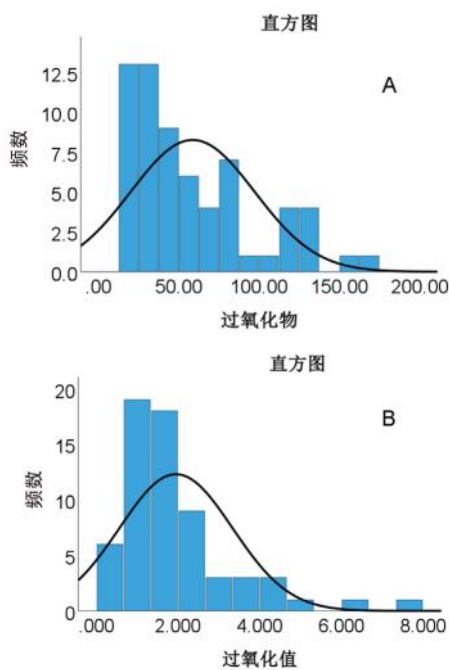


图 2 聚山梨酯 80 中过氧化物频数分布图  
Fig 2 Frequency distribution of peroxide in polysorbate 80

表 3 不同生产企业聚山梨酯 80 中过氧化物测定结果统计  
Tab 3 Content of peroxide in polysorbate 80 from different manufacturers

| 企业 | 批次 | 均值     | 中值     | 标准差   | 全距     | 极小值    | 极大值    |
|----|----|--------|--------|-------|--------|--------|--------|
| A  | 3  | 26.68  | 23.10  | 6.88  | 12.27  | 22.34  | 34.61  |
| B  | 8  | 94.43  | 85.57  | 27.08 | 80.47  | 55.99  | 136.46 |
| C  | 6  | 89.46  | 90.12  | 41.36 | 85.15  | 47.32  | 132.47 |
| D  | 36 | 47.43  | 33.96  | 33.36 | 136.85 | 15.54  | 152.39 |
| E  | 3  | 25.63  | 23.52  | 6.31  | 12.07  | 20.65  | 32.72  |
| F  | 1  | 34.64  | 34.64  | /     | 0.00   | 34.64  | 34.64  |
| G  | 1  | 48.30  | 48.30  | /     | 0.00   | 48.30  | 48.30  |
| H  | 2  | 61.99  | 61.99  | 15.66 | 22.15  | 50.91  | 73.06  |
| I  | 1  | 172.64 | 172.64 | /     | 0.00   | 172.64 | 172.64 |
| J  | 3  | 71.33  | 69.11  | 8.97  | 17.53  | 63.68  | 81.21  |

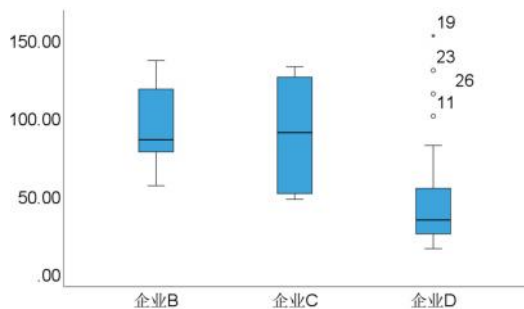


图 3 不同生产企业聚山梨酯 80 中过氧化物测定结果箱式图  
Fig 3 Box figure of the content of peroxide in polysorbate 80 from different manufacturers

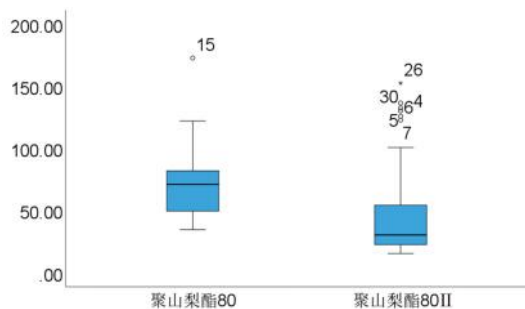


图 4 不同级别聚山梨酯 80 中过氧化物测定结果箱式图  
Fig 4 Box figure of the content of peroxide in polysorbate 80 with different grades

2.11 不同级别样品中过氧化物含量比较

将 64 批次样品 HPLC 法测定过氧化物结果按不同级别分类后进行统计分析, 结果见表 4 及图 4。

2.12 过氧化物影响因素考察

参照《中国药典》2020 年版四部“9001 原

料药物与制剂稳定性试验指导原则”<sup>[8]</sup> 影响因素试验方法, 选取 11 批代表性样品, 分别置于高温、高湿和光照条件下进行影响因素试验, 采用 HPLC 法考察样品中过氧化物含量的变化, 并与 0 d 测定结果进行比较分析, 结果见表 5。

表 4 不同级别聚山梨酯 80 中过氧化物测定结果统计  
Tab 4 Content of peroxide in polysorbate 80 from different grades

| 级别             | 批次 | 均值    | 中值    | 标准差   | 全距     | 极小值   | 极大值    |
|----------------|----|-------|-------|-------|--------|-------|--------|
| 聚山梨酯 80        | 24 | 73.56 | 71.09 | 32.16 | 138.00 | 34.64 | 172.64 |
| 聚山梨酯 80 ( II ) | 40 | 49.62 | 30.36 | 39.81 | 136.85 | 15.54 | 152.39 |

表 5 影响因素试验过氧化物考察结果 ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )  
Tab 5 Content of peroxide under different influencing factors ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )

| 样品自编号 | 影响因素   |        |        |        |        |        |        |        |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|       | 0 d    | 高温     |        |        | 高湿     |        | 光照     |        |
|       |        | 5 d    | 10 d   | 30 d   | 5 d    | 10 d   | 5 d    | 10 d   |
| Y3    | 33.57  | 52.74  | 54.40  | 103.59 | 94.51  | 114.48 | 85.77  | 106.09 |
| Y7    | 74.15  | 88.36  | 102.22 | 139.69 | 157.80 | 178.03 | 149.52 | 167.98 |
| Y13   | 128.41 | 211.51 | 263.95 | 345.59 | 298.30 | 354.25 | 347.12 | 356.89 |
| Y16   | 55.76  | 88.05  | 95.49  | 185.93 | 156.25 | 159.52 | 134.30 | 147.01 |
| Y32   | 42.23  | 43.34  | 45.94  | 67.73  | 72.23  | 103.94 | 75.47  | 97.49  |
| Y37   | 132.27 | 273.51 | 282.62 | 386.21 | 383.51 | 400.82 | 363.85 | 384.34 |
| Y38   | 21.65  | 135.35 | 188.17 | 403.86 | 162.36 | 170.77 | 203.05 | 262.85 |
| Y39   | 33.55  | 111.42 | 183.81 | 422.28 | 156.88 | 185.45 | 217.83 | 260.55 |
| Y41   | 22.80  | 78.67  | 80.86  | 81.26  | 235.41 | 306.62 | 171.41 | 217.75 |
| Y1    | 22.39  | 146.48 | 241.81 | 421.15 | 271.94 | 282.36 | 244.33 | 300.41 |
| Y4    | 17.92  | 106.87 | 134.85 | 327.47 | 111.42 | 131.25 | 149.67 | 236.08 |

3 讨论

3.1 HPLC 法测定过氧化物含量

按照《中国药典》聚山梨酯 80 质量标准中滴定法进行过氧化值测定时发现,空白溶液、供试品溶液在滴定至黄色几乎消失并加淀粉指示液 5 mL 后,溶液颜色变化均不明显,导致后续滴定阶段无法准确判断滴定终点,结果易受主观因素影响,方法灵敏度和准确度欠佳,滴定法过氧化值测定结果的统计分析显示不同企业样品中过氧化值不存在差异,对聚山梨酯 80 样品质量的区分力欠佳。

本次研究参考文献建立了柱前衍生化 HPLC-UV 法测定聚山梨酯 80 中过氧化物的含量,并优化其色谱条件,采用梯度洗脱,增加氧化三苯基膦保留行为的同时加快三苯基膦的洗脱,在该色谱系统中过氧化物与衍生化试剂三苯基膦反应生成的氧化三苯基膦可以被高效液相色谱仪检出和定量,从而实现对过氧化物浓度的间接分析。经对衍生反应时间进行考察,30 min 以后衍生化即基本完全,综合考虑溶剂中氧可能致衍生物继续增长,最终确定衍生时间为 30 min。按照《中国药典》2020 年四部“9101 分析方法验证指导原则”<sup>[8]</sup> 对该方法进行方法学验证,结果表明该方法灵敏度高、准确度高,方法可行。HPLC 法测定能更有效地区分不同聚山梨酯 80 中过氧化物含量高低,较滴定法对样品质量的评价更科学有效,更有区分力。生产企业可参照本文建立的柱前衍生化 HPLC-UV 法制定聚山梨酯 80 中过氧化物检

查的内控标准,以更科学有效地监控本品的质量。

3.2 不同企业、不同级别样品过氧化物含量比较分析

本次研究共收集到 64 批样品, HPLC 法测定过氧化物含量为 15.54 ~ 172.64  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ , 测定数据范围较宽。涉及 9 个不同的生产企业, 其中企业 E 为国外企业, 企业 A 为国内企业, 企业 E 和企业 A 的样品中的过氧化物含量最低, 且批间差异最小; 样品批次大于 6 的生产企业中, 样品批次最多的企业 D 的样品中过氧化物含量较小, 4 批次样品过氧化物含量偏高 (11、19、23、26 号数据), 其他批次批间差异较小; 企业 B 和企业 C 的样品中过氧化物含量均高于过氧化物均值, 且批间差异大。涉及 2 种不同级别样品, 聚山梨酯 80 ( II ) 级样品中过氧化物含量低于聚山梨酯 80 级样品。不同企业、不同级别、国内外样品质量差异较大, 提示各生产企业应关注聚山梨酯 80 中过氧化物的控制。

3.3 样品中过氧化物含量的影响因素

影响因素试验结果显示, 与 0 d 比较, 经高温、高湿和光照条件放置后, 样品中过氧化物含量呈 1.0 ~ 18.8 倍的增长, 且不同样品中过氧化物含量增长程度有差异, 样品 Y32 中过氧化物含量增幅最小, Y1、Y4、Y38 和 Y39 中过氧化物含量增长较快, 其中 Y1、Y38 和 Y39 均为企业 A 的样品, 说明企业 A 样品的稳定性较差。

较高温度、近紫外光、氧气等因素均会引发

聚山梨酯 80 的不稳定性, 产生的高活性的过氧化物, 还会触发其自氧化, 进而产生更多的过氧化物及甲醛、乙醛、甲酸、乙酸等小分子氧化产物杂质, 直接影响其 pH 等物理化学性质。笔者曾采用 SPSS 软件对 64 批聚山梨酯 80 样品中过氧化物含量与甲酸含量、酸碱度测定结果进行了相关性分析, 结果表明, 过氧化物与甲酸在 0.01 级别成显著正相关, 过氧化物与酸碱度在 0.01 级别成显著负相关, 即样品中过氧化物含量越高, 甲酸含量越高, pH 值越小, 由此可见过氧化物含量能体现聚山梨酯 80 的降解情况, 亦是表征聚山梨酯 80 内在质量差异的重要指标之一。

聚山梨酯 80 在高温、高湿和光照条件下均不稳定,《中国药典》聚山梨酯 80 质量标准规定贮藏条件为“遮光, 密封保存”, 不能够完全保证样品的稳定, 建议将贮藏条件修订为“遮光, 密封, 在阴凉干燥处保存”。

### 3.4 研究意义

药用辅料是药物制剂的重要组成部分, 会影响制剂的质量、安全性和有效性, 因此应关注药用辅料本身的安全性以及药物-辅料相互作用及其安全性。聚山梨酯 80 作为增溶剂、乳化剂和蛋白稳定剂广泛应用于药物制剂中, 而聚山梨酯的降解产物有去稳定作用, 降解产生的过氧化物可能会促进活性药物分子的氧化, 或加剧自身的降解, 并产生更多的甲醛、乙醛、甲酸、乙酸等活性小分子杂质, 这些杂质也可能与药物活性成分发生化学反应, 导致药用辅料与药物的化学相容性问题, 从而导致药物应用时的安全性风险。本研究表明, 目前市场上不同级别、不同生产企业、国内外聚山梨酯 80 样品中过氧化物含量有显著差异, 不同样品稳定性差异也较大, 提示企业在药物制剂研发和生产时如选择聚山梨酯 80 作为药用辅料, 有必要对不同来源的聚山梨酯 80 的内在质量进行考察, 将过氧化物作为其关键质量属性进行考察, 选用过氧化物含量更低、质量更好、稳定性更好的聚山梨酯 80, 以保证药品的质量安全。

本研究提供了更科学更有区分力的聚山梨酯 80 中过氧化物的检测方法, 并对不同级别、不同生产企业和国内外的样品进行考察, 为药品研发和生产选用优质药用辅料, 提高药品的质量、安全性和稳定性提供参考。

### 参考文献

- [1] Paul JS, Walter GC, Colin GC. Handbook of Pharmaceutical Excipients [M]. Eighth edition. USA: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2017: 736-741.
- [2] 国家药品监督管理局药品审评中心. 原辅包登记信息 [EB/OL]. (2024-09-12) <https://www.cde.org.cn/main/xxgk/listpage/ba7aed094c29ac31467c0a35463a716e>.
- [3] 程欧, 高鹏, 涂家生, 等. 吐温 80 质量与致敏性关系的研究 [J]. 中国药科大学学报, 2010, 41 (3): 244-247.
- [4] 段金连, 李月, 邱玲, 等. 聚山梨酯 80 及其杂质的研究进展 [J]. 西北药学杂志, 2020, 35 (4): 609-613.
- [5] 郭莎, 李涵涵, 祁志云, 等. 生物制剂中聚山梨醇酯的降解及其对制剂稳定性的影响 [J]. 中国现代应用药学, 2024, 41 (18): 2471-2480.
- [6] 王珏, 江颖, 孙春萌, 等. 蛋白药物中聚山梨酯的降解及潜在风险研究进展 [J]. 药物分析杂志, 2022, 42 (9): 1483-1492.
- [7] 文松松, 牛冲, 刘琦, 等. 盐酸二甲双胍制剂中 N-亚硝胺基因毒杂质的 GC-MS/MS 测定及 N-亚硝胺二甲胺的产生机制解析 [J]. 药物分析杂志, 2022, 42 (8): 1424-1432.
- [8] 中国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 100, 457-460, 480-483, 808-810.
- [9] 彭艳, 刘明雪, 赵小红. 过氧化氢含量测定方法研究进展 [J]. 化学推进剂与高分子材料, 2022, 20 (5): 24-29.
- [10] 郑伟, 孙东方, 孟玉, 等. 高效液相色谱法测定口腔护理产品中过氧化物的研究 [J]. 口腔护理用品工业, 2013, 23 (5): 8-15.
- [11] 刘小娟. 高效液相色谱法直接测定化妆品中的过氧化氢 [J]. 香料香精化妆品, 2019 (6): 36-42.
- [12] 王任, 吴鸳鸯, 程巧鸳, 等. 建立柱前在线自动衍生-高效液相色谱法快速测定染发剂中过氧化氢的含量 [J]. 药物分析杂志, 2019, 39 (6): 24-29.
- [13] 蒋振东, 杨琳, 卢巍, 等. 柱前衍生高效液相色谱法测定聚山梨酯 80 中过氧化氢的含量 [J]. 中国医药工业杂志, 2019, 50 (5): 565-572.

(收稿日期: 2024-10-01; 修回日期: 2024-11-09)



# HPLC-PDA 法同时测定附炎片中 6 种成分的含量

杨寿圆<sup>1,2</sup>, 糕君<sup>3</sup>, 周亚丽<sup>1</sup>, 李小凤<sup>1</sup>, 陈挺<sup>1</sup>, 李帅印<sup>1</sup>, 李喜香<sup>3\*</sup> (1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2. 兰州市第一人民医院, 兰州 730050; 3. 甘肃省中医院, 兰州 730050)

**摘要:** **目的** 建立高效液相色谱法-光电二极管阵列检测器 (HPLC-PDA) 同时测定附炎片中红景天苷、绿原酸、香蒲新苷、连翘酯苷 A、异阿魏酸、菊苣酸的含量。**方法** 采用 Waters Symmetry C18 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 对附炎片的甲醇提取液进行分析。流动相为乙腈-0.2% 磷酸水, 采用梯度洗脱法, 流速为 0.6 ~ 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温为 30℃, 进样量为 10 μL, 检测波长为 220 nm。**结果** 所测 6 种成分在各自线性范围内与峰面积呈良好的线性关系 ( $r$  为 0.9997 ~ 0.9999)。平均加样回收率在 98.79% ~ 100.92%,  $RSD$  均 < 2.0%。红景天苷、绿原酸、香蒲新苷、连翘酯苷 A、异阿魏酸、菊苣酸 6 个成分的含量范围分别为 0.5000 ~ 0.5090、0.8627 ~ 0.8862、0.1533 ~ 0.1610、1.8668 ~ 1.9821、0.6952 ~ 0.6994、0.2653 ~ 0.2795 mg·g<sup>-1</sup>, 其  $RSD$  值分别为 1.9%、1.1%、1.8%、2.1%、0.84%、2.5%。**结论** 所建立的方法操作简便、结果可靠, 适用于附炎片的质量控制。

**关键词:** 附炎片; 高效液相色谱; 红景天苷; 绿原酸; 香蒲新苷; 连翘酯苷 A; 异阿魏酸; 菊苣酸  
**中图分类号:** R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)08-2428-05  
**doi:**10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.043

## Simultaneous determination of 6 components in Fuyan tablets by HPLC-PDA

YANG Shou-yuan<sup>1,2</sup>, ZHUO Jun<sup>3</sup>, ZHOU Ya-li<sup>1</sup>, LI Xiao-feng<sup>1</sup>, CHEN Ting<sup>1</sup>, LI Shuai-yin<sup>1</sup>, LI Xi-xiang<sup>3\*</sup> (1. *Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000*; 2. *The First People's Hospital of Lanzhou, Lanzhou 730050*; 3. *Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050*)

**Abstract: Objective** To determine salidroside, chlorogenic acid, typhaneoside, forsythoside A, 3-hydroxy-4-methoxycinnamic acid and cichoric acid in Fuyan tablets by HPLC-PDA. **Methods** A Waters Symmetry C18 column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used to analyze the methanol extract of Fuyan tablets. The mobile phase was acetonitrile-0.2% phosphoric acid water, with gradient elution. The flow rate was 0.6 ~ 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The column temperature was 30℃, the injection volume was 10 μL, and the detection wavelength was 220 nm. **Results** The 6 components had good linear relationship in their respective ranges ( $r$  at 0.9997 ~ 0.9999). The average recovery ranged 98.79% ~ 100.92%, with the relative standard deviation ( $RSD$ ) less than 2.0%. The content of salidroside, chlorogenic acid, typhaneoside, forsythoside A, 3-hydroxy-4-methoxycinnamic acid and cichoric acid ranged 0.5000 ~ 0.5090, 0.8627 ~ 0.8862, 0.1533 ~ 0.1610, 1.8668 ~ 1.9821, 0.6952 ~ 0.6994, and 0.2653 ~ 0.2795 mg·g<sup>-1</sup>. The  $RSD$  was 1.9%, 1.1%, 1.8%, 2.1%, 0.84%, and 2.5%, respectively. **Conclusion** The method is easy to operate, reproducible and stable, which is suitable for the quality control of Fuyan tablets.

**Key words:** Fuyan tablet; HPLC; salidroside; chlorogenic acid; typhaneoside; forsythoside A; 3-hydroxy-4-methoxycinnamic acid; cichoric acid

**基金项目:** 兰州市科技计划项目 (No.2022-3-34)。

**作者简介:** 杨寿圆, 女, 主管中药师, 主要从事中药炮制与制剂工艺研究, email: 303702327@qq.com \*通信作者: 李喜香, 女, 主任中药师, 主要从事中药炮制与制剂工艺研究, email: lixixiang929@163.com

盆腔炎,也称为盆腔炎性疾病,是常见的妇科疾病,如未及时诊治可引起异位妊娠、不孕症、脏器粘连等严重后果<sup>[1-6]</sup>。对盆腔炎西医临床治疗以抗感染为主,但存在需多药联用且治愈后复发率高的问题。中医从辨证论治的角度出发,在盆腔炎的治疗方面有独特的优势,有研究从“虚、毒、瘀”的角度出发,分析盆腔炎的病因病机,采用健脾益气、化瘀解毒的治疗方法调节免疫、改善循环,明显减少了盆腔炎的复发<sup>[7-11]</sup>。

附炎片是甘肃省中医院的院内制剂,全方由 15 味中药组成,方中金银花、连翘、蒲公英、紫花地丁、大青叶清热解毒;椿皮清热燥湿、收涩止带;鳖甲滋阴潜阳,以防诸多苦寒药伤阴;升麻清热解毒的同时升举阳气;蒲黄、土鳖虫、大血藤、琥珀止血化瘀、止疼;路路通、桔梗、茵陈利湿排脓;全方功能清利下焦湿热、活血通络。

附炎片已在临床使用三十多年,主要用于治疗下焦湿热蕴结、瘀血阻滞的疾病,如湿热蕴结胞脉、赤白带下、盆腔炎、肾盂肾炎、泌尿道感染等,其中对盆腔炎的治疗效果尤其明显,且在多年使用过程中也未发现不良反应。

本研究采取高效液相色谱法-光电二极管阵列检测器(HPLC-PDA)法同时测定附炎片中的红景天苷、绿原酸、香蒲新苷、连翘酯苷 A、异阿魏酸、菊苣酸的含量,以期对附炎片的制剂工艺优化、质量标准提升提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Waters ARC 型高效液相色谱仪配置样品管理器 FTN-R、四元溶剂管理器 -R、2998 PDA 检测器(美国 Waters 公司);98-1-B 型电子调温电热套(天津泰斯特仪器有限公司);电热恒温水浴锅(上海齐欣科学仪器有限公司);干燥箱(上海智城分析仪器制造有限公司);SB-3200DT 型超声波清洗机(宁波新芝生物科技有限公司);中草药粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司);CPDA225D 电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司)。

### 1.2 试药

色谱甲醇(上海麦克林生化科技股份有限公司),乙腈(广东光华科技股份有限公司),分析纯甲醇、磷酸(天津市北辰方正试剂厂),纯净水(娃哈哈饮料有限公司),分析纯乙醇(天津市大茂化学试剂厂)。

6 批附炎片均为自制(批号:20240603、20240705、20240807、20240820、20240911、20240924,规格 0.37g/片)。大血藤(批号:20220601)、金银花(批号:20230601)、路路通(批号:20220301)(甘肃雍和堂药业有限公司);土鳖虫(批号:240226)、大

青叶(批号:221221)(甘肃康乐药业有限公司);茵陈(批号:231204)、蒲公英(批号:230808)(甘肃众翔生物科技有限公司);桔梗(批号:WL231103,江山市万里中药材有限公司);醋鳖甲(批号:231201A)、紫花地丁(批号:240201A)(甘肃陇脉药材有限公司);生蒲黄(批号:220501)、琥珀(批号:230101)、升麻(批号:230901)(安徽庆春堂药业有限公司);椿皮(批号:231203,甘肃冠兰中药饮片有限公司);连翘(批号:24032902,甘肃安泰堂中药饮片有限公司),以上所有饮片均经甘肃省中医院李喜香主任中药师鉴定,琥珀符合《安徽省中药饮片炮制规范》2019 版规定,其余药材均符合 2020 年版《中国药典》规定。对照品绿原酸(批号:A22GB158496,HPLC 纯度 $\geq 98\%$ ,上海源叶生物科技有限公司);对照品菊苣酸(批号:2230927001)、连翘酯苷 A(批号:421G021)、异阿魏酸(批号:0421A025)、香蒲新苷(批号:2230922002)、红景天苷(批号:KFEIT047)(HPLC 纯度均 $\geq 98\%$ ,北京索莱宝科技有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的配制

**2.1.1 混合对照品溶液的制备** 精密称取红景天苷、绿原酸、香蒲新苷、连翘酯苷 A、异阿魏酸、菊苣酸适量,加甲醇制成质量浓度分别为 562.9、211.86、200.78、1385.5、714.55、190.91  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的混合对照品溶液。

**2.1.2 供试品溶液的制备** 取适量附炎片样品,充分研磨后,精密称取 5.000 g,置带塞的锥形瓶中,精密量取甲醇 10 mL,称定其质量。将上述溶液超声处理 30 min 后(功率 250 W,频率 45 kHz),放置 30 min,待其冷却后再用甲醇补足损失质量,摇匀,0.22  $\mu\text{m}$  过滤,取续滤液,将其稀释 10 倍,得供试品溶液。

**2.1.3 阴性样品溶液的制备** 按照处方工艺分别制备缺大血藤、缺金银花、缺蒲黄、缺连翘、缺升麻、缺蒲公英的阴性样品,按照“2.1.2”项下方法制备阴性样品溶液。

### 2.2 色谱条件

Waters Symmetry C18 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相为乙腈-0.2% 磷酸水,梯度洗脱程序、流速见表 1;柱温为 30  $^{\circ}\text{C}$ ;检测波长为 220 nm;进样量为 10  $\mu\text{L}$ 。

### 2.3 方法学考察

**2.3.1 专属性试验** 精密吸取“2.1”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液,进样测定,结果显示 6 种成分无阴性干扰且分离度均大于 1.5,说明该方法专属性良好,结果见图 1。

**2.3.2 线性关系考察** 吸取适量混合对照品溶液,

表 1 HPLC-PDA 法测定附炎片中 6 种成分的梯度洗脱条件

Tab 1 Gradient elution conditions for the determination of six components in Fuyan tablets by HPLC-PDA

| 时间 /min | 流速 / (mL · min <sup>-1</sup> ) | 乙腈 /% | 0.2% 磷酸水 /% |
|---------|--------------------------------|-------|-------------|
| 0       | 1.0                            | 5     | 95          |
| 5       | 1.0                            | 5     | 95          |
| 15      | 1.0                            | 15    | 85          |
| 20      | 0.6                            | 18    | 82          |
| 45      | 0.6                            | 19    | 81          |
| 55      | 1.0                            | 25    | 75          |
| 60      | 1.0                            | 5     | 95          |

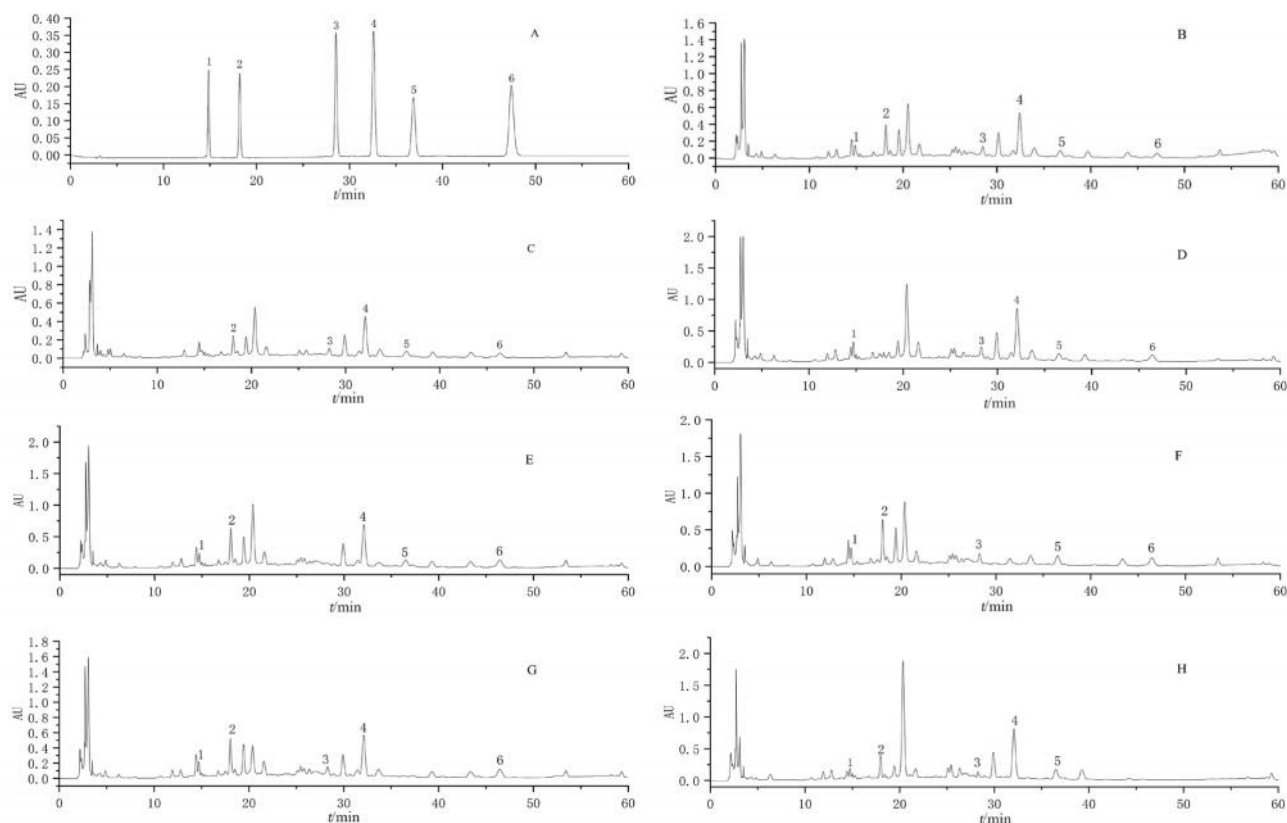


图 1 HPLC-PDA 法测定附炎片中 6 种成分的色谱图

Fig 1 Chromatograms of six components in Fuyan tablets determined by HPLC-PDA

A. 对照品 (reference); B. 供试品 (test sample); C. 缺大血藤阴性样品 (negative sample without *Sargentodoxae caulis*); D. 缺金银花阴性样品 (negative sample without *Lonicerae japonicae flos*); E. 缺蒲黄阴性样品 (negative sample without *Typhae pollen*); F. 缺连翘阴性样品 (negative sample without *Forsythiae fructus*); G. 缺升麻阴性样品 (negative sample without *Cimicifugae rhizoma*); H. 缺蒲公英阴性样品 (negative sample without *Taraxaci herba*); 1. 红景天苷 (salidroside); 2. 绿原酸 (chlorogenic acid); 3. 香蒲新苷 (typhaneoside); 4. 连翘酯苷 A (forsythoside A); 5. 异阿魏酸 (3-hydroxy-4-methoxycinnamic acid); 6. 菊苣酸 (cichoric acid)

结果见表 2, 可见各成分在各自线性范围内与峰面积呈良好的线性关系 ( $r \geq 0.9997$ )。

**2.3.3 精密度试验** 精密量取适量“2.1.1”项下混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 记录峰面积, 测得红景天苷、绿原酸、香蒲新苷、连翘酯苷 A、异阿魏酸、菊苣酸的峰面积  $RSD$  值分别为 0.47%、0.56%、0.91%、0.52%、0.74%、1.1%, 表明仪器精密度良好<sup>[12]</sup>。

**2.3.4 稳定性试验** 取适量“2.1.2”项下供试品溶液, 常温 (20℃) 放置 0、8、16、24、32、48 h 后,

用甲醇逐步稀释, 制成每 1 mL 分别含红景天苷 562.9、281.45、140.73、70.36、35.18  $\mu\text{g}$ , 含绿原酸 211.86、105.93、52.97、26.48、13.24  $\mu\text{g}$ , 含香蒲新苷 200.78、100.36、50.18、25.09、12.55  $\mu\text{g}$ , 含连翘酯苷 A 1385.5、277.1、138.55、69.28、34.64  $\mu\text{g}$ , 含异阿魏酸 714.55、142.91、71.45、35.73、17.86  $\mu\text{g}$ , 含菊苣酸 190.91、95.46、47.73、23.86、11.93  $\mu\text{g}$  的溶液。进样测定, 以对照品的质量 ( $\mu\text{g}$ ) 为横坐标 ( $X$ ), 峰面积积分值为纵坐标 ( $Y$ ), 进行回归分析, 并以信噪比 3:1、10:1 分别测定检测限、定量限,

进样测定, 记录峰面积, 测得红景天苷、绿原酸、香蒲新苷、连翘酯苷 A、异阿魏酸、菊苣酸的峰面积  $RSD$  值分别为 1.4%、1.8%、1.9%、1.1%、0.95%、0.90%, 表明溶液在 24 h 内稳定<sup>[12]</sup>。

**2.3.5 重复性试验** 分别称取 6 份同批次的附炎片 (批号: 20240603), 按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 根据回归方程计算含量, 得红景天苷、绿原酸、香蒲新苷、连翘酯苷 A、异阿魏酸、菊苣酸的平均含量分别为 0.5098、0.8690、



表 2 附炎片中 6 种成分含量测定方法的线性关系考察  
Tab 2 Linear relationships of 6 constituents in Fuyan tablets

| 成分     | 回归方程                                          | <i>r</i> | 线性范围 / (μg · mL <sup>-1</sup> ) | 检测限 / (μg · mL <sup>-1</sup> ) | 定量限 / (μg · mL <sup>-1</sup> ) |
|--------|-----------------------------------------------|----------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 红景天苷   | $Y = 9.731 \times 10^3 X - 1.224 \times 10^4$ | 0.9998   | 35.18 ~ 562.9                   | 0.0761                         | 0.2984                         |
| 绿原酸    | $Y = 2.835 \times 10^4 X + 8.520 \times 10^4$ | 0.9999   | 13.24 ~ 11059.3                 | 0.0613                         | 0.1789                         |
| 香蒲新苷   | $Y = 5.712 \times 10^4 X - 2.680 \times 10^4$ | 0.9999   | 12.55 ~ 200.78                  | 0.0062                         | 0.0283                         |
| 连翘酯苷 A | $Y = 5.535 \times 10^4 X - 2.213 \times 10^5$ | 0.9999   | 34.64 ~ 1385.5                  | 0.1678                         | 0.5809                         |
| 异阿魏酸   | $Y = 3.497 \times 10^4 X - 1.708 \times 10^5$ | 0.9998   | 17.86 ~ 714.55                  | 0.0358                         | 0.1642                         |
| 菊苣酸    | $Y = 3.761 \times 10^4 X - 7.944 \times 10^4$ | 0.9997   | 11.93 ~ 190.91                  | 0.0477                         | 0.1494                         |

0.1585、1.9190、0.7010、0.2764 mg · g<sup>-1</sup>，其 RSD 值分别为 1.9%、1.1%、1.8%、2.1%、0.84%、2.5%，表明该方法重复性良好<sup>[12]</sup>。

**2.3.6 加样回收试验** 精密称取 9 份已知含量的附炎片（批号：20240807），每 3 份为 1 组，每份适量，分别对应加入各成分含量 50%、100%、150% 的对照品溶液，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，进样测定。结果显示，低、中、高浓度组红景

天苷、绿原酸、香蒲新苷、连翘酯苷 A、异阿魏酸、菊苣酸的平均加样回收率均在 98.94% ~ 99.68%，98.94% ~ 100.92%，98.79% ~ 99.59%，98.94% ~ 99.30%，99.95% ~ 100.49%，99.10% ~ 99.71%，RSD 值均小于 2.0%。

**2.3.7 样品含量测定** 取 6 批附炎片样品，每批 3 份，按照“2.1.2”项下的方法制备供试品溶液，进样测定，结果见表 3，各批次各成分含量稳定。

表 3 附炎片中 6 种成分含量测定结果 (mg · g<sup>-1</sup>，*n* = 3)  
Tab 3 Content of 6 constituents in Fuyan tablets (mg · g<sup>-1</sup>，*n* = 3)

| 批号       | 红景天苷   | 绿原酸    | 香蒲新苷   | 连翘酯苷 A | 异阿魏酸   | 菊苣酸    |
|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 20240603 | 0.5090 | 0.8627 | 0.1533 | 1.8668 | 0.6952 | 0.2759 |
| 20240705 | 0.5006 | 0.8788 | 0.1577 | 1.9722 | 0.6987 | 0.2795 |
| 20240807 | 0.5047 | 0.8669 | 0.1610 | 1.9005 | 0.6954 | 0.2653 |
| 20240820 | 0.5000 | 0.8862 | 0.1589 | 1.9608 | 0.6969 | 0.2687 |
| 20240911 | 0.5013 | 0.8784 | 0.1591 | 1.9821 | 0.6994 | 0.2668 |
| 20240924 | 0.5053 | 0.8779 | 0.1580 | 1.8998 | 0.6977 | 0.2685 |
| RSD/%    | 1.9    | 1.1    | 1.8    | 2.1    | 0.84   | 2.5    |

3 讨论

3.1 指标性成分的选择

根据附炎片能清利下焦湿热、活血通络，对湿热蕴结、瘀血阻滞型盆腔炎有良好治疗作用的特点，结合方中发挥主要治疗作用饮片的现代药学研究和 2020 年版《中国药典》对各饮片 HPLC 检测成分的规定选择附炎片的指标性成分。研究表明大血藤被广泛地用于盆腔炎的治疗，其含有的红景天苷具有抗炎镇痛、抗氧化、抗肿瘤等药理作用，是 2020 年版《中国药典》规定的大血藤含量测定的成分之一<sup>[13-15]</sup>；金银花在解热、抗炎、抗菌、抗病毒等方面均有较显著的疗效，绿原酸是其主要有效成分，对溶血性链球菌、铜绿假单胞菌、肺炎球菌、金黄色葡萄球菌等都有抗菌作用<sup>[16-18]</sup>；蒲黄中的香蒲新苷具有显著的镇痛、化瘀、止血功能<sup>[19-20]</sup>；连翘具有抗炎、抗菌、抗病毒作用，其含有的连翘酯苷 A 能抑制炎症反应，减轻组织损伤<sup>[21-22]</sup>；升麻中的异阿魏酸具有抗炎、抗病毒作用<sup>[23-25]</sup>；蒲公英中的菊苣酸具有抗氧化、抗炎作用<sup>[26-27]</sup>。综上，选择大血藤中的红景天苷、金银花中的绿原酸、蒲黄中的香蒲新苷、连翘中的连翘酯苷 A、升麻中的异阿魏酸、蒲公英中的菊苣酸为附

炎片的指标性成分。

3.2 供试品制备条件的考察

提取方式考察加热回流提取和超声提取，发现两者的提取率并无显著区别，但超声提取杂质较少、效率高，且提取所需溶剂量少、成本低；提取溶剂考察 50%、70%、100% 的甲醇和乙醇，结果显示含水的甲醇和乙醇提取液色谱图峰形较差、色谱峰峰高过低，部分成分色谱峰缺失，乙醇提取液色谱图的溶剂峰过多，且分离度差，而以甲醇作为提取溶剂提取效果较好；提取溶剂体积考察 5、10、15 mL 甲醇，结果显示甲醇体积为 5 mL 时，肉眼可见 5.000 g 附炎片样品不能被全部溶解，甲醇体积为 10、15 mL 时，样品全部溶解且所得色谱图无明显差异；提取时间考察了 10、20、30、40、50 min，得出 10、20 min 时提取率较低，30、40 min 时提取效果较好且两者无明显差异，50 min 时杂质较多；提取次数考察 1 次、2 次，发现两者的提取率无明显差别<sup>[28-29]</sup>。故最终选择精密称取 5.000 g 附炎片样品溶于 10 mL 100% 甲醇中 30 min 超声提取 1 次制备供试品溶液。

3.3 色谱条件的考察

在选择流动相时，本研究考察了乙腈 - 水、乙

腈-0.1%磷酸水、乙腈-0.2%磷酸水、甲醇-水、甲醇-0.1%磷酸水、甲醇-0.2%磷酸水,根据试验结果分析发现乙腈-0.2%磷酸水为流动相时,各成分峰形和分离度良好。

在选择柱温时,本试验考察了 25、30 和 35℃ 的柱温,结果显示柱温为 30℃,所得色谱图基线稳定、峰形明显。

本试验在 210 ~ 380 nm 波长范围内对红景天苷、绿原酸、香蒲新苷、连翘酯苷 A、异阿魏酸、菊苣酸进行全波长扫描,得各自最大吸收波长分别为 220、318、254、320、310、240 nm。对同一份供试品溶液考察波长 220、250、320 nm 下的色谱图,结果表明在 320 nm 波长处绿原酸、香蒲新苷、连翘酯苷 A、异阿魏酸、菊苣酸峰形明显、基线稳定,但红景天苷的峰消失,在 250 nm 波长处 6 个成分的峰都在,但在 220 nm 波长处红景天苷峰形更明显、基线稳定,绿原酸、香蒲新苷、连翘酯苷 A、异阿魏酸、菊苣酸面积无明显变化,且各成分阴性无干扰,基线平稳,故最终选择在 220 nm 波长下进行检测。

#### 4 结论

本试验使用 HPLC-PDA 法同时测定附炎片中红景天苷、绿原酸、香蒲新苷、连翘酯苷 A、异阿魏酸、菊苣酸的含量,方法简单可靠。红景天苷、绿原酸、香蒲新苷等成分可能是附炎片中的主要成分,但不能代表真实世界中附炎片中治疗湿热蕴结、瘀血阻滞型盆腔炎的有效成分,后续将继续深入研究,以期选择更具代表性、更多的附炎片标志性成分。

#### 参考文献

- [1] 谢辛,孔北华,段涛.妇产科学[M].北京:人民卫生出版社,2018:251.
- [2] 徐玲华,李亮,金璇.兰溪市赤溪区 520 例农村女性妇科疾病影响因素研究[J].中国预防医学杂志,2020,21(10):1095-1098.
- [3] 田桂花.对 2802 名妇女妇科病普查普治状况分析[J].世界最新医学信息文摘,2019,19(14):221.
- [4] 刘朝晖,廖秦平,耿力,等.治疗单纯性盆腔炎的全国多中心临床疗效研究[J].现代妇产科进展,2013,22(7):534-537.
- [5] 冉江玲,张家兴,赵华叶,等.抗菌药物预防人工流产后感染效果的系统性评价[J].中南药学,2024,22(1):219-226.
- [6] 宋茜茜.盆腔炎性疾病与卵巢肿瘤发生风险相关性的 Meta 分析[D].石家庄:河北医科大学,2021.
- [7] 洗妮.中医药治疗盆腔炎性疾病后遗症的研究进展[J].实用妇科内分泌电子杂志,2020,7(21):6-7.
- [8] 宁雪梅,李天梅,朱梓齐,等.从“虚、毒、瘀”探讨盆腔炎病机及治疗[J].环球中医药,2024,17(5):884-887.
- [9] 王淑敏.艾灸联合桂枝茯苓汤对慢性盆腔炎患者疗效及免疫功能的影响[J].中南药学,2016,14(1):108-109.
- [10] 欧燕,周意园,张泰魏,等.国医大师刘尚义“膜病理论”在盆腔炎性疾病后遗症中的运用[J].中华中医药杂志,2024,39(5):2604-2607.
- [11] 候安敏,王琪.基于 CNKI 的中医治疗盆腔炎文献计量学可视化分析[J].中国医药导刊,2023,25(2):169-174.
- [12] 中国药典 2020 年版.一部[S].2020:481-482.
- [13] 江璠,陈寿珍.大血藤煎剂对慢性盆腔炎大鼠子宫 TGF- $\beta$ /Smads 通路的影响研究[J].北方药学,2022,19(11):6-9,12.
- [14] 任继荣,红藤桂.茯汤治疗慢性盆腔炎的疗效观察及对 CRP、血液流变学、生活质量的影响[J].中国中医药科技,2023,30(1):188-190.
- [15] 严如根,何静,薛晔佳,等.中药灌肠方治疗盆腔炎性疾病后遗症的用药规律研究[J].中成药,2024,46(10):3492-3496.
- [16] 方朝缙,甘力帆,黄醒鹏,等.金银花-连翘药对配方颗粒的 HPLC 指纹图谱建立及多指标成分含量测定研究[J].中南药学,2023,21(6):1612-1620.
- [17] 樊俐慧,吉红玉,兰雨泽,等.金银花量效关系及其临床应用[J].吉林中医药,2019,39(5):597-600.
- [18] 赵氏淳,陶颖,卢艺,等.金银花-蒲公英提取液不同相态主要成分含量测定及其对痤疮丙酸杆菌抑制作用的有效相态筛选[J].中草药,2024,55(18):6167-6173.
- [19] 谢冉,郝单丽,易红,等.生蒲黄标准汤剂质量评价[J].中国中医药信息杂志,2021,28(7):88-93.
- [20] 唐倩男,谢云秀,王晋思,等.HPLC 法测定蒲黄镇痛活性提取物的含量[J].生物化工,2021,7(5):36-39.
- [21] 张博,智雪枝,田兰,等.小儿清咽颗粒中 8 个成分的含量测定及主成分分析[J].中南药学,2023,21(11):3008-3013.
- [22] 邱晓旭,王帅,李天娇,等.基于“质-量”双标的连翘质量分析方法研究[J].药学研究,2024,43(11):1084-1089.
- [23] 张文凤,罗绍东.升麻治疫思想探析[J].长春中医药大学学报,2024,40(1):7-10.
- [24] 余武,丁婵,彭思源,等.基于 HPLC 指纹图谱和一测多评法的升麻饮片质量评价[J].中草药,2024,55(22):7828-7836.
- [25] 谭雄斯.高效液相色谱波长切换法同时测定表实感冒颗粒中 6 种成分的含量[J].中南药学,2020,18(1):89-92.
- [26] 章蕾,姜雨婷,董幼祺.董幼祺应用蒲公英验案举隅[J].山西中医,2024,40(9):35-36.
- [27] 李盛建,王慧,吕磊,等.HPLC-DAD 法同时测定蒲公英配方颗粒中 6 种成分的含量[J].中南药学,2019,17(10):1714-1717.
- [28] 崔旭辉,李喜香,王雪梅,等.HPLC-PDA 法同时测定补肾强筋丸中 5 种成分[J].中成药,2022,44(3):728-731.
- [29] 王建良,李喜香,周亚丽,等.HPLC 同时测定舒筋通络黑膏药 9 个成分含量[J].中国中医药信息杂志,2024,31(3):138-143.

(收稿日期:2025-01-02;修回日期:2025-03-10)

## 医院药学

## 基于多中心真实世界数据构建丙戊酸钠血药浓度预测模型

徐金军<sup>1</sup>, 洪术霞<sup>2\*</sup>, 史金平<sup>2</sup>, 田春艳<sup>2</sup>, 姜琮<sup>1</sup>, 王森<sup>1</sup> (1. 咸宁市中心医院 湖北科技学院附属第一医院药学部, 湖北 咸宁 437100; 2. 西安国际医学中心医院药学部, 西安 710100)

**摘要:** **目的** 基于机器学习算法, 建立丙戊酸钠血清药物浓度范围的预测模型, 指导精准用药。**方法** 收集西安国际医学中心医院、咸宁市中心医院使用丙戊酸钠并进行血药浓度监测的患者信息, 通过 XGBoost、GBDT、AdaBoost、CatBoost、LightGBM、RF、DT、Extra-Tree、LR、BPNN、KNN、SVR 建立丙戊酸钠血清药物浓度范围的预测模型, 比较其预测性能。**结果** 共收集到 770 例血药浓度数据, 以 8 : 2 的比例分为训练队列和测试队列。使用 12 种算法建立了丙戊酸钠血清药物浓度范围预测模型, 其中 GBDT 算法准确率 (训练队列为 0.987, 5 倍交叉验证结果为 0.637; 测试队列为 0.617)、召回率 (训练队列为 0.987, 5 倍交叉验证结果为 0.637; 测试队列为 0.617)、精确率 (训练队列为 0.987, 5 倍交叉验证结果为 0.635; 测试队列为 0.610)、F1 (训练队列为 0.987, 5 倍交叉验证结果为 0.626; 测试队列为 0.593)。在训练队列和 5 倍交叉验证中表现最优, 但在测试队列中排名有所下降。**结论** 本研究建立的丙戊酸钠血清药物浓度范围预测模型性能较好, 有助于个体化精准用药。

**关键词:** 丙戊酸钠; 治疗药物监测; 机器学习; 预测模型

中图分类号: R969.1, R971.6 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)08-2433-06  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.044

## Prediction model for sodium valproate blood concentration based on multicenter real world data

XU Jin-jun<sup>1</sup>, HONG Shu-xia<sup>2\*</sup>, SHI Jin-ping<sup>2</sup>, TIAN Chun-yan<sup>2</sup>, JIANG Qiong<sup>1</sup>, WANG Miao<sup>1</sup>  
(1. Department of Pharmacy, Xianning Central Hospital, The First Affiliated Hospital of Hubei University of Science and Technology, Xianning Hubei 437100; 2. Department of Pharmacy, Xi'an International Medical Center Hospital, Xi'an 710100)

**Abstract: Objective** To establish a prediction model for valproate blood concentration to guide precise use of drugs based on machine learning. **Methods** Clinical data were retrospectively collected from the patients receiving the use of sodium valproate and their blood drug concentrations were monitored at Xi'an International Medical Center Hospital and Xianning Central Hospital. Twelve machine learning algorithms, including extreme gradient boosting (XGBoost), gradient boosting decision tree (GBDT), adaptive boosting (AdaBoost), categorical boosting (CatBoost), light gradient (LightGBM), random forest (RF), decision tree (DT), extremely randomized trees (Extra-Tree), logistic regression (LR), back propagation neural network (BPNN), k-nearest neighbors (KNN), and support vector regression (SVR) were used to establish a prediction model for the serum concentration range of sodium valproate, and their prediction performance was compared. **Results** Totally 770 therapeutic drug monitoring data were collected and divided into a training group and a testing group at 8 : 2. A prediction model for blood

**基金项目:** 西安国际医学中心医院青年课题 (No.2023QN05); 咸宁市中心医院院级科研项目 (No.2022XYB033); 咸宁市自然科学基金项目 (No.2021ZRKX036)。

**作者简介:** 徐金军, 男, 副主任药师, 主要从事医院药学与临床药学工作, email: xu619@sina.com \*通信作者: 洪术霞, 女, 主管药师, 主要从事临床药学工作, email: h15098070933@163.com



drug concentration range of sodium valproate was established with 12 algorithms, among which the GBDT algorithm had the best performance, with accuracy (0.987 in training group; 0.637 in 5-fold cross-validation; and 0.617 in testing group), recall (0.987 in training group; 0.637 in 5-fold cross-validation; and 0.617 in testing group), precision (0.987 in training group; 0.635 in 5-fold cross-validation; and 0.610 in testing group), and F1 score (0.987 in training group; 0.626 in 5-fold cross-validation; and 0.593 in testing group). **Conclusion** The prediction model for serum valproate concentration range in this study has good performance, facilitating personalized and precise drug use.

**Key words:** sodium valproate; therapeutic drug monitoring; machine learning; prediction model

丙戊酸 (valproic acid, VPA) 是一种短链脂肪酸, 可通过抑制  $\gamma$ -氨基丁酸 (GABA) 转氨酶及钠离子和 L 型钙离子通道发挥药理活性, 不仅被广泛用于治疗癫痫发作和双相情感障碍, 还在心血管、糖尿病、肾脏等疾病中发挥作用<sup>[1-2]</sup>。丙戊酸钠的治疗作用和不良反应与其血药浓度有关, 其治疗药物监测范围为  $50 \sim 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[3]</sup>, 丙戊酸钠血药浓度小于  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 可能导致治疗效果不佳, 血药浓度大于  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 可能增加中枢系统毒性与肝毒性等风险, 因此有必要开展丙戊酸钠治疗药物监测<sup>[4-6]</sup>。机器学习 (machine learning, ML) 是人工智能 (artificial intelligence, AI) 的一个分支, 其通过使用算法和统计模型, 使计算机能够结构化地从数据中学习和改进, 同时在新的数据中做出预测或决策, 适宜处理大量的现实数据, 处理缺失值和高维数据, 捕捉变量之间的复杂关系, 近年来被广泛用于医学领域<sup>[7-8]</sup>。Zhu 等<sup>[9]</sup>基于中国人群丙戊酸钠群体药代动力学 (population pharmacokinetics, PPK) 模型的协变量和描述丙戊酸药代动力学的单室模型, 使用蒙特卡洛模拟构建了一个数据集, 开发了极端梯度提升 (extreme gradient boosting, XGBoost) 模型来估计丙戊酸的稳态浓度 ( $C_{ss}$ ), 但缺乏高质量真实世界研究。本研究拟通过多中心真实世界数据, 使用 12 种机器学习方法建立癫痫患者丙戊酸钠血药浓度监测预测模型, 比较其性能, 以辅助临床优化治疗方案。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

本研究对 2019 年 1 月至 2023 年 12 月期间在西安国际医学中心医院和咸宁市中心医院接受丙戊酸钠治疗的癫痫患者进行回顾性分析。纳入标准: 符合癫痫诊断; 至少连续给药 5 d 后测丙戊酸钠血清药物浓度。排除标准: 间断服用丙戊酸钠者; 病例资料不全或无法获取者。本研究根据 CIOMS/WHO 人类健康相关研究国际道德准则 (2016), 研究数据已完全删除患者私密信息, 经西安国际医

学中心医院与咸宁市中心医院伦理委员会批准 (GJYX-KY-2024-006、咸医伦字-K【2024】013 号)。

### 1.2 试药与仪器

丙戊酸钠缓释片 (Sanofi Winthrop Industrie, 规格:  $500 \text{ mg/片}$ ); 丙戊酸钠口服溶液 [赛诺菲 (杭州) 制药有限公司, 规格:  $300 \text{ mL/12 g}$ ]; 丙戊酸钠片 (湖南省湘中制药有限公司, 规格:  $0.2 \text{ g/片}$ ); 注射用丙戊酸钠 (沈阳新马药业, 规格:  $0.4 \text{ g}$ )。

Syva Viva-E 药物浓度分析系统 (Siemens 公司); 丙戊酸检测试剂 (Siemens Healthcare Diagnostics Inc)。

### 1.3 数据提取与处理

从电子病历系统中提取病历信息, 包括年龄、性别、丙戊酸钠血药浓度信息 (同一患者两次血药浓度监测的间隔时间大于 7 d, 可认为是独立数据)、丙戊酸钠的给药剂量及给药途径、合并疾病、实验室生化指标、合并用药 (碳青霉烯类药物、苯巴比妥、苯二氮草类等)。

### 1.4 模型建立

将丙戊酸钠血药浓度值分为不达标组 ( $C_{ss} < 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )、达标组 ( $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \leq C_{ss} \leq 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )、超限组 ( $C_{ss} > 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 通过相关性分析及极端梯度提升树 (extreme gradient boosting, XGBoost) 特征重要性评分筛选模型特征变量, 使用 XGBoost、梯度提升树 (gradient boosting decision tree, GBDT)、自适应提升算法 (adaptive boosting, AdaBoost)、梯度提升类别型特征算法 (categorical boosting, CatBoost)、轻量梯度提升 (light gradient boosting machine, LightGBM)、随机森林 (random forest, RF)、决策树 (decision tree, DT)、极度随机树 (extremely randomized trees, Extra-Tree)、逻辑回归 (logistic regression, LR)、反向传播神经网络 (back propagation neural network, BPNN)、k-近邻算法 (k-nearest neighbors, KNN)、支持向量回归 (support vector regression, SVR) 共计 12 种机器学习

习算法建立预测模型，通过调整正则化参数（L1、L2）防止模型过拟合，通过准确率、召回率、精确率、F1 等指标比较模型性能，选择最优模型进行验证。准确率是预测正确样本占总样本的比例，其值越大模型性能越优；召回率指实际为正样本的结果中，预测为正样本的比例，其值越大模型性能越优；精确率指预测为正样本的结果中，实际为正样本的比例，其值越大模型性能越优；F1 为精确率和召回率的调和平均。

1.5 统计方法

排除整体缺失值 > 25% 的变量，采用 SPSS26 对剩余变量进行数据分析，对于连续变量，如符合正态分布则以平均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，采用方差分析进行比较；不符合正态分布以四分位距 (IQR) 表示，采用秩和检验进行比较；计数资料以  $n(\%)$  表示，采用  $\chi^2$  检验进行比较，以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。以 Spearman 相关性检验分析各变量与丙戊酸钠血药浓度结果的

相关性，以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。以 SPSSPRO (scientific platform serving for statistics professional) 构建机器学习模型，通过准确率、召回率、精确率、F1 等指标比较模型性能。

2 结果

2.1 一般资料

共纳入 532 名患者（西安国际医学中心医院 319 人，咸宁市中心医院 213 人）、770 例次丙戊酸钠血药浓度信息（西安国际医学中心医院 516 例，咸宁市中心医院 254 例）、32 个变量指标（其中镁离子数据缺失大于 25%，被排除在外）。纳入的血药浓度数据中，男性 523 例次，女性 247 例次，中位年龄为 35.00 岁 (IQR 39.75 ~ 65.00)，丙戊酸钠日剂量中位值 1.00 g (IQR 1.00 ~ 1.20)，血药浓度中位值为 69.60 mg · L<sup>-1</sup> (IQR 46.34 ~ 87.99)，按照 8 : 2 的比例分为训练队列和测试队列。两组基线资料如表 1 所示，一般资料比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 1 研究人群的基线特征  
Tab 1 Baseline characteristics of study population

| 指标                                              | 训练队列 ( $n = 616$ )       | 测试队列 ( $n = 154$ )       | $Z/F\chi^2$ | $P$   |
|-------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------|-------|
| 性别 (男)                                          | 415 (67.37%)             | 108 (70.13%)             | 0.431       | 0.512 |
| 年龄 / 年                                          | 53.00 (39.00 ~ 65.00)    | 55.00 (41.75 ~ 66.00)    | 1.273       | 0.203 |
| 丙戊酸钠剂量 / ( $\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$ )     | 1.00 (1.00 ~ 1.20)       | 1.00 (1.00 ~ 1.20)       | — 0.574     | 0.566 |
| 给药途径 (静脉注射) / [ $n(\%)$ ]                       | 94 (15.26%)              | 22 (14.29%)              | 0.091       | 0.762 |
| 癫痫 (原发性癫痫) / [ $n(\%)$ ]                        | 98 (15.91%)              | 27 (17.53%)              | 0.239       | 0.625 |
| 脑梗死 / [ $n(\%)$ ]                               | 97 (15.75%)              | 28 (18.18%)              | 0.537       | 0.464 |
| 冠心病 / [ $n(\%)$ ]                               | 46 (7.47%)               | 18 (11.69%)              | 2.880       | 0.090 |
| 心力衰竭 / [ $n(\%)$ ]                              | 46 (7.47%)               | 19 (12.34%)              | 3.781       | 0.052 |
| 糖尿病 / [ $n(\%)$ ]                               | 82 (13.31%)              | 24 (15.58%)              | 0.536       | 0.464 |
| 高血压 / [ $n(\%)$ ]                               | 223 (36.20%)             | 66 (42.86%)              | 2.328       | 0.127 |
| 贫血 / [ $n(\%)$ ]                                | 232 (37.66%)             | 58 (37.66%)              | 0.000       | 1.000 |
| 总胆红素 / ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  | 8.00 (5.80 ~ 11.46)      | 7.96 (5.60 ~ 11.33)      | 0.267       | 0.789 |
| 直接胆红素 / ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | 3.20 (2.40 ~ 4.55)       | 3.28 (2.57 ~ 4.84)       | 0.803       | 0.442 |
| 间接胆红素 / ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | 4.64 (2.96 ~ 7.41)       | 4.50 (3.18 ~ 6.64)       | — 0.130     | 0.897 |
| 谷丙转氨酶 / ( $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ )      | 17.00 (10.80 ~ 28.00)    | 18.26 (10.00 ~ 27.30)    | 0.210       | 0.834 |
| 谷草转氨酶 / ( $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ )      | 20.00 (14.93 ~ 29.78)    | 20.20 (14.65 ~ 32.18)    | 0.377       | 0.706 |
| 白蛋白 / ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )        | 37.26 ± 5.51             | 37.05 ± 5.36             | 0.188       | 0.665 |
| 血肌酐 / ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )   | 58.95 (45.00 ~ 75.20)    | 59.10 (48.95 ~ 80.33)    | 1.140       | 0.254 |
| 钙离子 / ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )     | 2.18 (2.09 ~ 2.28)       | 2.18 (2.09 ~ 2.26)       | — 0.119     | 0.905 |
| 钠离子 / ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )     | 140.00 (137.00 ~ 142.00) | 140.00 (136.60 ~ 142.00) | 0.462       | 0.644 |
| 钾离子 / ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )     | 3.92 (3.60 ~ 4.29)       | 4.00 (3.70 ~ 4.31)       | 1.631       | 0.103 |
| 白细胞 / ( $\times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$ )     | 6.75 (5.10 ~ 9.64)       | 6.59 (5.49 ~ 9.14)       | — 0.140     | 0.889 |
| 中性粒细胞 / ( $\times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$ )   | 4.49 (2.93 ~ 7.28)       | 4.42 (3.10 ~ 6.99)       | — 0.317     | 0.751 |
| 红细胞 / ( $\times 10^{12} \cdot \text{L}^{-1}$ )  | 4.02 (3.50 ~ 4.47)       | 4.12 (3.37 ~ 4.51)       | 0.513       | 0.608 |
| 血红蛋白 / ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )       | 123.50 (106.25 ~ 138.00) | 123.50 (106.00 ~ 139.00) | 0.121       | 0.904 |
| 碳青霉烯类药物 / [ $n(\%)$ ]                           | 49 (7.95%)               | 16 (10.39%)              | 0.945       | 0.331 |
| 巴比妥类 / [ $n(\%)$ ]                              | 49 (7.95%)               | 14 (9.09%)               | 0.212       | 0.645 |
| 苯二氮革类 / [ $n(\%)$ ]                             | 156 (25.32%)             | 40 (25.97%)              | 0.027       | 0.869 |
| 其他抗癫痫药 / [ $n(\%)$ ]                            | 149 (24.19%)             | 30 (19.48%)              | 1.530       | 0.216 |
| H <sub>2</sub> 受体拮抗剂 / [ $n(\%)$ ]              | 28 (4.55%)               | 8 (5.19%)                | 1.117       | 0.733 |

2.2 特征变量分析

共有 30 个自变量，相关性分析结果显示，合用碳青霉烯类药物、性别、红细胞计数、血肌酐水平、丙戊酸钠剂量、心力衰竭、间接胆红素、钾离子、巴比妥类药物、白蛋白水平、贫血、糖尿病、总胆红素等 13 个自变量与丙戊酸钠血药浓度的相关性差异具有统计学意义，各变量的 XGBoost 重要性评分结果如表 2 所示。

表 2 丙戊酸钠血药浓度预测模型中独立变量的重要性评分和相关性分析

| 指标         | 相关性分析    |          | XGBoost  |
|------------|----------|----------|----------|
|            | <i>r</i> | <i>P</i> | 重要性评分 /% |
| 碳青霉烯类药物    | − 0.323  | < 0.001  | 34.50    |
| 性别 (男 / 女) | − 0.167  | < 0.001  | 9.60     |
| 红细胞计数      | 0.162    | < 0.001  | 7.00     |
| 血肌酐        | 0.121    | 0.003    | 6.50     |
| 丙戊酸钠剂量     | 0.239    | < 0.001  | 6.30     |
| 心力衰竭       | − 0.084  | 0.036    | 6.20     |
| 间接胆红素      | 0.118    | 0.003    | 5.70     |
| 钾离子        | − 0.085  | 0.034    | 5.20     |
| 巴比妥类       | − 0.098  | 0.015    | 4.20     |
| 白蛋白        | 0.172    | < 0.001  | 4.00     |
| 贫血         | − 0.205  | < 0.001  | 3.90     |
| 糖尿病        | − 0.085  | 0.035    | 3.80     |
| 总胆红素       | 0.121    | 0.003    | 3.10     |

2.3 丙戊酸钠血药浓度预测模型的构建

使用筛选的 13 项特征变量，基于 XGBoost、GBDT、AdaBoost、CatBoost、LightGBM、RF、DT、Extra-Tree、LR、BPNN、KNN、SVR 等 12 种机器学习算法建立丙戊酸钠血清药物浓度预测模型，其中 GBDT 模型的性能最优，准确率为 0.987、召回率为 0.987、精确率为 0.987、F1 值为 0.987，结果如表 3 所示。为了进一步巩固模型的性能，使用五倍交叉法验证 12 种模型性能，结果显示，所有模型预测性能均有所下降，其中 GBDT 模型的准确率为 0.637、召回率为 0.637、精确率为 0.635、F1 值为 0.626，结果如表 4 所示。

2.4 丙戊酸钠血药浓度预测模型的验证

使用测试队列对 12 种预测模型进行测试，GBDT 模型测试结果为：准确率为 0.617、召回率为 0.617、精确率为 0.610、F1 值为 0.593，说明构建的 GBDT 模型对丙戊酸钠血药浓度的预测性能较好，与训练队列相符合，模型的测试结果如表 5 所示。

3 讨论

表 3 训练队列中 12 个预测模型的性能

| Tab 3 Performance of 12 prediction models in the training group |       |       |       |       |
|-----------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| 模型                                                              | 准确率   | 召回率   | 精确率   | F1    |
| GBDT                                                            | 0.987 | 0.987 | 0.987 | 0.987 |
| XGBoost                                                         | 0.954 | 0.954 | 0.956 | 0.954 |
| LightGBM                                                        | 0.919 | 0.919 | 0.924 | 0.916 |
| RF                                                              | 0.839 | 0.839 | 0.864 | 0.830 |
| Extra-Tree                                                      | 0.816 | 0.816 | 0.837 | 0.808 |
| DT                                                              | 0.798 | 0.798 | 0.797 | 0.794 |
| CatBoost                                                        | 0.719 | 0.719 | 0.798 | 0.684 |
| AdaBoost                                                        | 0.715 | 0.715 | 0.718 | 0.706 |
| BPNN                                                            | 0.642 | 0.642 | 0.654 | 0.601 |
| LR                                                              | 0.639 | 0.639 | 0.647 | 0.600 |
| KNN                                                             | 0.636 | 0.636 | 0.650 | 0.618 |
| SVR                                                             | 0.265 | 0.265 | 0.373 | 0.237 |

表 4 使用五倍交叉法验证 12 个模型的性能

| Tab 4 Performance of 12 models using 5-fold cross-validation |       |       |       |       |
|--------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| 模型                                                           | 准确率   | 召回率   | 精确率   | F1    |
| GBDT                                                         | 0.637 | 0.637 | 0.635 | 0.626 |
| Extra-Tree                                                   | 0.633 | 0.633 | 0.644 | 0.601 |
| RF                                                           | 0.633 | 0.633 | 0.623 | 0.586 |
| XGBoost                                                      | 0.624 | 0.624 | 0.617 | 0.606 |
| BPNN                                                         | 0.623 | 0.623 | 0.632 | 0.580 |
| CatBoost                                                     | 0.620 | 0.620 | 0.639 | 0.540 |
| LR                                                           | 0.615 | 0.615 | 0.609 | 0.576 |
| LightGBM                                                     | 0.612 | 0.612 | 0.603 | 0.591 |
| DT                                                           | 0.597 | 0.597 | 0.594 | 0.591 |
| AdaBoost                                                     | 0.566 | 0.566 | 0.547 | 0.548 |
| KNN                                                          | 0.467 | 0.467 | 0.415 | 0.434 |
| SVR                                                          | 0.351 | 0.351 | 0.415 | 0.320 |

表 5 测试队列中 12 个预测模型的性能

| Tab 5 Performance of 12 prediction models in the testing group |       |       |       |       |
|----------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| 模型                                                             | 准确率   | 召回率   | 精确率   | F1    |
| Extra-Tree                                                     | 0.630 | 0.630 | 0.640 | 0.602 |
| XGBoost                                                        | 0.623 | 0.623 | 0.618 | 0.598 |
| GBDT                                                           | 0.617 | 0.617 | 0.610 | 0.593 |
| LightGBM                                                       | 0.604 | 0.604 | 0.600 | 0.579 |
| CatBoost                                                       | 0.591 | 0.591 | 0.532 | 0.515 |
| LR                                                             | 0.584 | 0.584 | 0.576 | 0.543 |
| BPNN                                                           | 0.584 | 0.584 | 0.571 | 0.544 |
| RF                                                             | 0.578 | 0.578 | 0.500 | 0.521 |
| DT                                                             | 0.571 | 0.571 | 0.560 | 0.564 |
| AdaBoost                                                       | 0.539 | 0.539 | 0.513 | 0.511 |
| KNN                                                            | 0.468 | 0.468 | 0.438 | 0.435 |
| SVR                                                            | 0.266 | 0.266 | 0.424 | 0.268 |

为了提高丙戊酸钠治疗效果、降低不良反应，多国学者采用非线性混合效应模型方法，建立了丙戊酸钠 PPK 模型，用以指导个体化药物治疗方案<sup>[10-12]</sup>。但 PPK 模型缺乏药物作用机制的解释，并且需要根据给药方式和数据类型选择固定的药



代动力学模型(一室、二室),在实际操作过程中往往受到数据限制<sup>[13-14]</sup>。相比 PPK 模型,机器学习不仅可以通过综合考虑患者生理特征、疾病进程以及药物治疗等准确地预测药物疗效,还可用于处理大数据集与复杂模型的筛选<sup>[15-16]</sup>。此外,相比同类研究仅构建了一种 XGBoost 模型而言,本文通过真实世界数据筛选了更多的特征变量,构建了 12 种预测模型,从而筛选出最优模型,更具有代表性<sup>[9]</sup>。

本研究通过机器学习方法基于多中心真实世界数据构建丙戊酸钠血药浓度多分类预测模型。机器学习是一门涉及概率论、统计学、逼近论、凸分析、算法复杂度理论等多领域的交叉学科,目前广泛应用于医学研究领域。相对于普通回归,机器学习模型的复杂性高、适用范围更广,更适用于处理高维度和非线性问题,泛化能力更强。XGBoost 是集成学习算法中的一种,具有正则化能力、并行处理能力、特征重要性分析及非线性问题处理能力等,广泛地用于机器学习特征变量的提取。本研究基于双中心真实世界数据,采用 XGBoost 算法提取特征变量,并通过 XGBoost、GBDT、AdaBoost、CatBoost、LightGBM、RF、DT、Extra-Tree 等 12 种机器学习算法建立丙戊酸钠血清药物浓度预测模型,其中 GBDT 模型综合效能最优(准确率=0.987,召回率=0.987,精确率=0.987,F1 值=0.987)。对预测模型采用五倍交叉验证及多中心外部数据测试验证,结果准确率为 0.637、0.617,召回率为 0.637、0.617,精确率为 0.635、0.610,F1 值为 0.626、0.593,预测模型显示出良好的预测性能,具有较高的准确度、灵敏度和良好的泛化能力,但是本研究构建的 12 种模型在五倍交叉验证与测试队列验证时准确率、召回率、精确率、F1 均大幅降低,存在过拟合现象,且调整正则化参数(L1、L2),过拟合现象改善不明显,因此在临床应用中存在一定的局限性。

本研究模型特征变量部分已经过其他学者验证<sup>[17-22]</sup>,可靠性较高,模型显示出良好的可解释性。首先,在人口统计信息方面,多篇研究提示年龄、性别、体重及药物剂量是影响丙戊酸钠血清药物浓度的主要因素,可与本文研究相互印证<sup>[17-18]</sup>。其次,胆红素与血肌酐等指标与患者肝肾功能有关,胆红素升高的患者往往肝功能异常,影响丙戊酸钠代谢,血肌酐升高的患者肾功能减退,对丙戊酸钠的清除能力减弱,研究显示,总胆红素、直接胆红素升高是丙戊酸钠浓度

剂量比(CDRV)升高的独立危险因素,提示肝功能障碍可使丙戊酸钠浓度升高,与本文结论一致,但心力衰竭、糖尿病、钾离子水平等影响丙戊酸钠血药浓度值的原因尚不明确<sup>[19]</sup>。最后,药物相互作用也是影响丙戊酸钠血药浓度的因素之一,多项研究显示联合使用碳青霉烯类药物可显著降低丙戊酸钠及其代谢产物的浓度,甚至部分研究将碳青霉烯类药物作为丙戊酸钠过量中毒的解毒剂<sup>[20-21]</sup>,苯巴比妥可通过诱导加速丙戊酸钠代谢,降低其药物浓度<sup>[22]</sup>,本文研究提示联合使用碳青霉烯类药物对丙戊酸钠血药浓度预测模型影响最大,苯巴比妥也可在不同程度上影响丙戊酸钠血药浓度值。

本研究首次发现与正常人群相比,贫血患者的丙戊酸钠血药浓度值显著降低,红细胞计数与血药浓度值成正相关,两者可作为特征变量预测丙戊酸钠血药浓度值。在 616 例训练集数据中 232 例贫血患者丙戊酸钠血药浓度( $62.41 \pm 32.74$ )  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  及达标率(48.28%)均显著低于 384 例非贫血患者血药浓度( $74.14 \pm 29.43$ )  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  与达标率(59.64%)。由于未查询到贫血影响丙戊酸钠血药浓度的机制,笔者猜测其可能通过某种因素,间接影响丙戊酸钠血药浓度,因此分析了贫血与其他变量的关系,发现本文纳入的贫血患者血清白蛋白水平( $34.59 \pm 4.81$ )  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  显著低于非贫血患者( $38.88 \pm 5.28$ )  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,而丙戊酸钠血清蛋白结合率高,低蛋白血症患者血清游离丙戊酸钠增多,清除加快,可能对丙戊酸钠血药浓度产生影响,但仍需进一步研究。

综上所述,本研究依据多中心真实世界的数 据,构建了可预测丙戊酸钠血药浓度范围的机器学习预测模型,模型有良好的准确性、适用性及泛化能力,对于指导临床丙戊酸钠个体化精准用药具有较强的参考价值。尽管如此,研究也有不足,构建模型在测试队列中各项性能均有所下降,可能与本研究未纳入患者的遗传信息作为特征变量且数据量较少有关,因此尚需多中心、大样本量的数据进一步研究、优化。

## 参考文献

- [1] Silva MF, Aires CC, Luis PB, et al. Valproic acid metabolism and its effects on mitochondrial fatty acid oxidation: a review [J]. J Inher Metab Dis, 2008, 31 (2): 205-216.
- [2] Singh D, Gupta S, Verma I, et al. Hidden pharmacological activities of valproic acid: a new insight [J]. Biomed

- Pharmacother, 2021, 142: 112021.
- [3] Reimers A, Berg JA, Burns ML, et al. Reference ranges for antiepileptic drugs revisited: a practical approach to establish national guidelines [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 271-280.
  - [4] Wu JH, Li JY, Jing W, et al. Valproic acid-induced encephalopathy: a review of clinical features, risk factors, diagnosis, and treatment [J]. *Epilepsy Behav*, 2021, 120: 107967.
  - [5] Guo HL, Jing X, Sun JY, et al. Valproic acid and the liver injury in patients with epilepsy: an update [J]. *Curr Pharm Des*, 2019, 25 (3): 343-351.
  - [6] Li RT, Chen ZY, Tang SY, et al. Association of valproic acid and its main metabolites' plasma concentrations with clinical outcomes among epilepsy patients: a 10-year retrospective study based on therapeutic drug monitoring [J]. *Drug Metab Dispos*, 2024, 52 (3): 210-217.
  - [7] Burr T. Pattern recognition and machine learning [J]. *J Am Stat Assoc*, 2008, 103 (482): 886-887.
  - [8] Obermeyer Z, Emanuel EJ. Predicting the future—big data, machine learning, and clinical medicine [J]. *N Engl J Med*, 2016, 375 (13): 1216-1219.
  - [9] Zhu XQ, Zhang M, Wen YG, et al. Machine learning advances the integration of covariates in population pharmacokinetic models: valproic acid as an example [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 994665.
  - [10] Methaneethorn J, Leelakanok N. Predictive ability of published population pharmacokinetic models of valproic acid in thai manic patients [J]. *J Clin Pharm Ther*, 2021, 46 (1): 198-207.
  - [11] Usman M, Shaukat QU, Khokhar MI, et al. Comparative pharmacokinetics of valproic acid among pakistani and South Korean patients: a population pharmacokinetic study [J]. *PLoS One*, 2022, 17 (8): e0272622.
  - [12] Zang YN, Guo W, Dong F, et al. Published population pharmacokinetic models of valproic acid in adult patients: a systematic review and external validation in a Chinese sample of inpatients with bipolar disorder [J]. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2022, 15 (5): 621-635.
  - [13] Wang HJ, Huang LF, Wang JY, et al. Population pharmacokinetic study of vancomycin in Chinese pediatric patients with hematological malignancies [J]. *Pharmacotherapy*, 2020, 40 (12): 1201-1209.
  - [14] Chen CY, Zhou Y, Cui YM, et al. Population pharmacokinetics and dose simulation of oxcarbazepine in Chinese paediatric patients with epilepsy [J]. *J Clin Pharm Ther*, 2019, 44 (2): 300-311.
  - [15] Sibieude E, Khandelwal A, Girard P, et al. Population pharmacokinetic model selection assisted by machine learning [J]. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*, 2022, 49 (2): 257-270.
  - [16] Gerdes H, Casado P, Dokal A, et al. Drug ranking using machine learning systematically predicts the efficacy of anti-cancer drugs [J]. *Nat Commun*, 2021, 12 (1): 1850.
  - [17] Methaneethorn J. A systematic review of population pharmacokinetics of valproic acid [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2018, 84 (5): 816-834.
  - [18] Smith RL, Haslemo T, Refsum H, et al. Impact of age, gender and CYP2C9/2C19 genotypes on dose-adjusted steady-state serum concentrations of valproic acid—a large-scale study based on naturalistic therapeutic drug monitoring data [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2016, 72 (9): 1099-1104.
  - [19] Ma BS, Yang K, Li XP, et al. Factors influencing plasma concentrations of valproic acid in pediatric patients with epilepsy and the clinical significance of CYP2C9 genotypes in personalized valproic acid therapy [J]. *Ther Drug Monit*, 2024, 46 (4): 503-511.
  - [20] Yang XP, Jiang ZW, Jiang Y, et al. Determination of valproic acid and its six metabolites in human serum using LC-MS/MS and application to interaction with carbapenems in epileptic patients [J]. *Biomed Chromatogr*, 2023, 37 (3): e5572.
  - [21] Perković Vukčević N, Mijatović Jovin V, Vuković Ercegović G, et al. Carbapenems as antidotes for the management of acute valproic acid poisoning [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2024, 17 (2): 257.
  - [22] Zaccara G, Perucca E. Interactions between antiepileptic drugs, and between antiepileptic drugs and other drugs [J]. *Epileptic Disord*, 2014, 16 (4): 409-431.

(收稿日期: 2025-03-03; 修回日期: 2025-05-26)

# 基于倾向性评分匹配法分析质子泵抑制剂致白细胞减少的风险因素

潘玉艳<sup>1, 3</sup>, 钱晓丹<sup>2\*</sup> (1. 南京医科大学第三附属医院/常州市第二人民医院临床试验机构, 江苏 常州 213003; 2. 南京医科大学第三附属医院/常州市第二人民医院药学部, 江苏 常州 213003; 3. 徐州医科大学药学院, 江苏 徐州 221004)

**摘要:** **目的** 分析质子泵抑制剂 (PPIs) 致白细胞减少的相关危险因素, 为降低 PPIs 致白细胞减少风险提供依据。 **方法** 采用倾向性评分匹配进行研究, 通过医院信息管理系统提取 2022 年 8 月至 2023 年 8 月在我院使用口服 PPIs 治疗的 2750 例患者为研究对象, 年龄为 18 ~ 80 岁, 根据患者治疗后白细胞减少情况, 将其分为正常组 2610 例, 减少组 140 例。匹配完成后, 分析 PPIs 导致白细胞减少的危险因素。 **结果** 倾向性评分匹配成功 100 对病例, 单因素分析显示, 患者治疗疗程、累积使用量、用药品种、合并结肠癌、合并胃癌、肝功能、肾功能在两组间的差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。Logistics 回归分析结果显示年龄、疗程、累积使用量、肝功能异常为 PPIs 导致白细胞减少的主要危险因素 ( $P < 0.05$ )。 **结论** PPIs 总体安全性高, 白细胞减少是发生率低的不良反应, 临床应对肝功能异常等导致白细胞减少的高危因素重点关注, 早期干预, 保障用药安全。

**关键词:** 倾向性评分匹配; 质子泵抑制剂; 白细胞减少; 危险因素

中图分类号: R969.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)08-2439-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.045

## Risk factors of leukopenia induced by proton pump inhibitors based on propensity score matching

PAN Yu-yan<sup>1, 3</sup>, QIAN Xiao-dan<sup>2\*</sup> (1. Facility of Clinical Trial, The Second People's Hospital of Changzhou, the Third Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Changzhou Jiangsu 213003; 2. Department of Pharmacy, The Second People's Hospital of Changzhou, the Third Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Changzhou Jiangsu 213003; 3. Department of Pharmacy, Xuzhou Medical University, Xuzhou Jiangsu 221004)

**Abstract: Objective** To analyze the risk factors associated with leukopenia induced by proton pump inhibitors (PPIs) and reduce the risk of leukopenia. **Methods** Propensity score matching was used, for 2750 patients aged 18 to 80 treated with PPIs at our hospital between August 2022 and August 2023 from the hospital information system. The patients were divided into two groups based on their post-treatment leukopenia: a normal group (2610 patients) and a leukopenia group (140 patients). Following matching, the risk factors for leukopenia caused by PPIs was analyzed. **Results** Propensity score was successfully matched 100 patient pairs. The univariate analysis showed significant differences ( $P < 0.05$ ) in the treatment course, cumulative dosage, medication type, concomitant colon cancer, concomitant gastric cancer, liver function, and kidney function between both groups. The logistic regression analysis indicated that age, treatment course, cumulative dosage, and abnormal liver function were the primary factors for the PPIs-induced reduction in white blood cell count ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The overall safety profile of PPIs is favorable, with leukopenia being a

基金项目: 2020 年度江苏省药学会 - 恒瑞医院药学基金 (No.H2020040)。

作者简介: 潘玉艳, 女, 主任药师, 主要从事临床药理学和临床试验管理研究, email: panyuyan2000@163.com \*通信作者: 钱晓丹, 女, 副主任药师, 主要从事临床药学工作, email: qianxiaodan@njmu.edu.cn



rare adverse event. Clinical management should focus on high-risk factors, such as abnormal liver function, to minimise the risk of leukopenia and ensure medication safety.

**Key words:** propensity score matching; proton pump inhibitors; leukopenia; risk factor

质子泵抑制剂 (PPIs) 为  $H^+-K^+-ATP$  酶抑制剂, 通过抑制胃酸分泌, 用于消化性溃疡等酸相关疾病的治疗, 具有抑酸作用强、起效时间短、作用时间长等特点<sup>[1-2]</sup>。随着口服雷贝拉唑、奥美拉唑、兰索拉唑等的广泛使用, PPIs 的不良反应发生率增高, 除了一些常见的不良反应如消化系统不适、感染、微量元素缺少、骨质疏松、心肌梗死风险增加等, PPIs 造成的白细胞减少也逐渐被报道。白细胞位于抵御微生物感染的首要防线, 能有效杀死入侵的细菌。如果白细胞减少, 患者发生医院获得性感染的风险增加, 严重时可对患者生命安全造成威胁<sup>[3-4]</sup>。因此, 需要特别关注 PPIs 导致白细胞减少的发生风险。本研究基于倾向性评分匹配 (propensity score matching, PSM) 对该院 PPIs 治疗导致白细胞减少的风险因素进行分析, 可为临床使用该药过程中的安全性监护提供参考。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

采用倾向性评分匹配进行研究, 通过医院信息管理系统提取 2022 年 8 月至 2023 年 8 月在我院使用口服 PPIs 治疗的 2750 例患者为研究对象, 年龄为 18 ~ 80 岁, 根据患者治疗后白细胞减少情况, 将其分为白细胞正常组 2610 例, 减少组 140 例, 该研究经本院伦理委员会审核批准 (批件号: 2023KY214-01)。

纳入标准: 患者均采用 PPIs 治疗; 临床资料完整; 连续治疗 2 个月以上; 以上治疗前 1 个月未服用抗抑郁、抗焦虑等精神类药物; 白细胞减少诊断标准: 白细胞计数  $< 4.0 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 。

排除标准: 妊娠、哺乳期患者; 存在免疫系统疾病; 患有恶性肿瘤; 神经系统存在异常; 患者具有认知功能障碍; 合并其他呼吸系统疾病; 合并感染。

### 1.2 方法

**1.2.1 资料收集** 对所有患者一般资料进行调查, 包括年龄 (18 ~ 40 岁、41 ~ 60 岁、> 60 岁), 合并 2 型糖尿病 (是, 否), 体质量指数 (BMI) ( $< 18 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$ 、 $18 \sim 23 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$ 、 $24 \sim 28 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$ 、 $> 28 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$ ), 吸烟史 (是, 否),

饮酒史 (是, 否), 合并高血压 (是, 否), 病程 ( $< 10$  周、 $10 \sim 30$  周、 $> 30$  周), 性别 (男, 女), 家族史 (是, 否), 合并抑郁症 (是, 否), 疾病类型 (胃食管反流病、胃溃疡、十二指肠溃疡、卓-艾氏综合征), 用药品种 (奥美拉唑、雷贝拉唑、泮托拉唑、兰索拉唑、艾司奥美拉唑), 合并用药 (胃黏膜保护剂、促胃肠动力药物)。

**1.2.2 倾向性评分匹配** 将白细胞正常组 2610 例, 减少组 140 例, 使用 IBM SPSS 20.0 统计软件按照 1:1 配比进行倾向性匹配, 对两组患者的年龄、合并 2 型糖尿病、BMI、吸烟史、饮酒史、合并高血压、病程、性别、家族史、合并抑郁症、疾病类型、用药品种治疗前白细胞低等临床资料进行配对, 以 0.1 作为匹配容差, 差异  $< 0.1$  表示变量均衡。对于成功匹配的病例, 详细采集病史。

### 1.3 统计学处理

使用软件 SPSS 20.0 对数据进行分析, 符合正态分布的计量资料采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 描述, 组间比较采用独立样本  $t$  检验; 若呈非正态分布则采用 Wilcoxon 秩和检验; 计数资料以百分数表示, 组间比较采用  $\chi^2$  检验。多相关变量进行单因素分析, 将结果分析中  $P < 0.05$  的变量作为多因素条件进行 Logistics 回归分析,  $OR$  值  $> 1$  提示该因素可能影响白细胞减少的发生。

## 2 结果

### 2.1 患者白细胞减少的基本情况

在纳入研究的 2750 例患者中, 发生白细胞减少的比例为 5.09% (140/2750)。白细胞计数  $< 4.0 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ , 有 85 例患者白细胞水平低于  $3.0 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 。

### 2.2 倾向性评分匹配

如表 1 所示, 共匹配成功 100 对, 匹配前两组患者年龄、合并 2 型糖尿病、BMI、家族史、用药品种、合并抑郁症对比, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 匹配后年龄、合并 2 型糖尿病、BMI、家族史、合并抑郁症均发生变化, 两组患者差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 用药品种未发生显著变化 ( $P < 0.05$ )。

**2.3 倾向性评分匹配后患者白细胞减少的单因素分析**

表 1 两组患者倾向性评分匹配前、后临床资料对比  
Tab 1 Clinical characteristics before and after propensity score matching

| 变量                          |           | 匹配前 [n (%) ]      |                  |               | 匹配后 [n (%) ]     |                  |             |
|-----------------------------|-----------|-------------------|------------------|---------------|------------------|------------------|-------------|
|                             |           | 正常组<br>(n = 2610) | 减少组<br>(n = 140) | $\chi^2/P$    | 正常组<br>(n = 100) | 减少组<br>(n = 100) | $\chi^2/P$  |
| 年龄 / 岁                      | 18 ~ 40   | 1098 (42.07)      | 33 (23.57)       | 9.130/0.001   | 36 (36.00)       | 30 (30.00)       | 1.840/0.066 |
|                             | 41 ~ 60   | 861 (32.99)       | 27 (19.29)       |               | 33 (33.00)       | 22 (22.00)       |             |
|                             | > 60      | 651 (24.94)       | 80 (57.14)       |               | 31 (31.00)       | 48 (48.00)       |             |
| 合并 2 型糖尿病                   | 是         | 783 (30.00)       | 93 (66.43)       | 7.273/0.001   | 52 (52.00)       | 44 (44.00)       | 1.282/0.258 |
|                             | 否         | 1827 (70.00)      | 47 (33.57)       |               | 48 (48.00)       | 56 (56.00)       |             |
| BMI/( kg · m <sup>2</sup> ) | < 18      | 887 (33.98)       | 15 (10.71)       | 8.119/0.001   | 28 (28.00)       | 25 (25.00)       | 0.047/0.962 |
|                             | 18 ~ 23   | 522 (20.00)       | 22 (15.71)       |               | 23 (23.00)       | 27 (27.00)       |             |
|                             | 24 ~ 28   | 783 (30.00)       | 37 (26.43)       |               | 22 (22.00)       | 24 (24.00)       |             |
|                             | > 28      | 418 (16.02)       | 66 (57.14)       |               | 27 (27.00)       | 24 (24.00)       |             |
| 吸烟史                         | 是         | 1248 (47.82)      | 70 (50.00)       | 0.254/0.614   | 49 (49.00)       | 46 (46.00)       | 0.421/0.674 |
|                             | 否         | 1362 (52.18)      | 70 (50.00)       |               | 51 (51.00)       | 54 (54.00)       |             |
| 饮酒史                         | 是         | 1385 (53.07)      | 77 (55.00)       | 0.200/0.655   | 45 (45.00)       | 40 (40.00)       | 0.801/0.423 |
|                             | 否         | 2610 (46.93)      | 63 (45.00)       |               | 55 (55.00)       | 60 (60.00)       |             |
| 合并高血压                       | 是         | 1200 (45.98)      | 71 (50.71)       | 1.200/0.273   | 50 (50.00)       | 53 (53.00)       | 0.391/0.696 |
|                             | 否         | 1410 (54.02)      | 69 (49.29)       |               | 50 (50.00)       | 47 (47.00)       |             |
| 病程 / 周                      | < 10      | 963 (36.90)       | 50 (35.71)       | 0.028/0.978   | 38 (38.00)       | 30 (30.00)       | 1.134/0.257 |
|                             | 10 ~ 30   | 715 (27.39)       | 42 (30.00)       |               | 39 (39.00)       | 39 (39.00)       |             |
|                             | > 30      | 932 (35.71)       | 48 (34.29)       |               | 23 (23.00)       | 31 (31.00)       |             |
| 性别                          | 男         | 1220 (46.74)      | 65 (46.43)       | 0.005/0.942   | 40 (40.00)       | 50 (50.00)       | 1.002/0.317 |
|                             | 女         | 1390 (53.26)      | 75 (53.57)       |               | 60 (60.00)       | 50 (50.00)       |             |
| 家族史                         | 是         | 850 (32.57)       | 105 (75.00)      | 105.546/0.001 | 58 (58.00)       | 49 (49.00)       | 1.628/0.202 |
|                             | 否         | 1760 (67.43)      | 35 (25.00)       |               | 42 (42.00)       | 51 (51.00)       |             |
| 疾病类型                        | 胃食管反流病    | 518 (19.85)       | 38 (27.14)       | 1.791/0.073   | 27 (27.00)       | 31 (31.00)       | 0.663/0.508 |
|                             | 胃溃疡       | 641 (24.56)       | 30 (21.43)       |               | 25 (25.00)       | 22 (22.00)       |             |
|                             | 十二指肠溃疡    | 705 (27.01)       | 41 (29.29)       |               | 20 (20.00)       | 25 (25.00)       |             |
|                             | 卓 - 艾氏综合征 | 746 (28.58)       | 31 (22.14)       |               | 28 (28.00)       | 22 (22.00)       |             |
| 用药品种                        | 奥美拉唑      | 485 (18.58)       | 53 (37.86)       | 5.655/0.001   | 13 (13.00)       | 45 (45.00)       | 6.536/0.001 |
|                             | 雷贝拉唑      | 512 (19.62)       | 41 (29.29)       |               | 18 (18.00)       | 40 (40.00)       |             |
|                             | 泮托拉唑      | 663 (25.40)       | 19 (13.57)       |               | 19 (19.00)       | 6 (6.00)         |             |
|                             | 兰索拉唑      | 420 (16.09)       | 12 (8.57)        |               | 32 (32.00)       | 4 (4.00)         |             |
|                             | 艾司奥美拉唑    | 530 (20.31)       | 15 (10.71)       |               | 18 (18.00)       | 5 (5.00)         |             |
| 合并抑郁症                       | 是         | 888 (34.02)       | 110 (78.57)      | 114.052/0.001 | 44 (44.00)       | 53 (53.00)       | 1.621/0.203 |
|                             | 否         | 1722 (65.98)      | 30 (21.43)       |               | 56 (56.00)       | 47 (47.00)       |             |
| 合并用药                        | 胃黏膜保护剂    | 1400 (53.64)      | 78 (55.71)       | 0.230/0.632   | 53 (53.00)       | 56 (56.00)       | 0.182/0.670 |
|                             | 促胃肠动力药物   | 1210 (46.36)      | 62 (44.29)       |               | 47 (47.00)       | 44 (44.00)       |             |

PPIs 导致白细胞减少的可能危险因素包括疗程、累积使用量、平均日剂量、用药品种、合并结肠癌、合并胃癌、肝功能异常、肾功能异常，如表 2 所示。

2.4 PPIs 导致白细胞减少的多因素 Logistics 回归分析

如表 3、4 所示，选择单因素分析中  $P < 0.05$  的变量作为自变量赋值，将白细胞减少的发生为因变量（未发生 = 0；发生 = 1），进行多因素

Logistics 回归分析，结果显示年龄、疗程、累积使用量、肝功能异常为 PPIs 导致白细胞减少的主要因素（ $P < 0.05$ ）。

3 讨论

3.1 PPIs 导致白细胞减少现状

PPIs 作为抑酸药物，安全有效，在酸相关疾病的治疗中具有重要作用<sup>[5-6]</sup>。PPIs 包括注射和口服两种剂型，口服给药是患者维持治疗的主要形式，使用时间延长，可使不良反应发生率

表 2 倾向性评分匹配后患者白细胞减少的单因素分析  
Tab 2 Univariate analysis of leukopenia in patients after propensity score matching

| 因素           |         | 正常组 (n = 100) | 减少组 (n = 100) | t/χ <sup>2</sup> /z | P     |
|--------------|---------|---------------|---------------|---------------------|-------|
| 年龄 / 岁       | 18 ~ 60 | 69 (69.00)    | 52 (52.00)    | 6.047               | 0.014 |
|              | > 60    | 31 (31.00)    | 48 (48.00)    |                     |       |
| 疗程 / d       |         | 4.11 ± 0.32   | 6.21 ± 0.73   | 26.347              | 0.001 |
| 累积使用量 / g    |         | 44.28 ± 5.47  | 95.14 ± 10.21 | 43.909              | 0.001 |
| 平均日剂量 / g    |         | 12.76 ± 2.81  | 13.01 ± 2.89  | 0.620               | 0.536 |
| 用药品种 [n (%)] | 奥美拉唑    | 13 (13.00)    | 45 (45.00)    | 6.536               | 0.001 |
|              | 雷贝拉唑    | 18 (18.00)    | 40 (40.00)    |                     |       |
|              | 泮托拉唑    | 19 (19.00)    | 6 (6.00)      |                     |       |
|              | 兰索拉唑    | 32 (32.00)    | 4 (4.00)      |                     |       |
|              | 艾司奥美拉唑  | 18 (18.00)    | 5 (5.00)      |                     |       |
| 合并结肠癌        | 是       | 35 (35.00)    | 70 (70.00)    | 24.561              | 0.001 |
|              | 否       | 65 (65.00)    | 30 (30.00)    |                     |       |
| 合并胃癌         | 是       | 29 (29.00)    | 75 (75.00)    | 42.388              | 0.001 |
|              | 否       | 71 (71.00)    | 25 (25.00)    |                     |       |
| 肝功能异常        | 是       | 37 (37.00)    | 79 (79.00)    | 36.207              | 0.001 |
|              | 否       | 63 (63.00)    | 21 (21.00)    |                     |       |
| 肾功能异常        | 是       | 21 (21.00)    | 68 (68.00)    | 5.249               | 0.001 |
|              | 否       | 79 (79.00)    | 32 (32.00)    |                     |       |

表 3 赋值表  
Tab 3 Assignment

| 自变量   | 赋值                                                |
|-------|---------------------------------------------------|
| 年龄    | 18 ~ 60 = 0, > 60 = 1                             |
| 疗程    | 常量                                                |
| 累积使用量 | 常量                                                |
| 用药品种  | 雷贝拉唑 = 1, 泮托拉唑 = 2, 兰索拉唑 = 3, 埃索美拉唑 = 4, 奥美拉唑 = 5 |
| 合并结肠癌 | 否 = 0, 是 = 1                                      |
| 合并胃癌  | 否 = 0, 是 = 1                                      |
| 肝功能异常 | 否 = 0, 是 = 1                                      |

表 4 PPIs 导致白细胞减少的多因素 Logistics 回归分析  
Tab 4 Multivariate Logistics regression analysis of leukopenia induced by PPIs

| 因素    | β 值   | SE    | Wald (2) | P 值   | OR 值  | 95%CI         |
|-------|-------|-------|----------|-------|-------|---------------|
| 年龄    | 1.485 | 0.458 | 10.513   | 0.021 | 4.415 | 3.499 ~ 5.331 |
| 疗程    | 1.069 | 0.225 | 22.573   | 0.001 | 2.912 | 2.462 ~ 3.363 |
| 累积使用量 | 1.256 | 0.332 | 14.312   | 0.005 | 3.511 | 2.847 ~ 4.175 |
| 用药品种  | 1.562 | 0.552 | 8.007    | 0.238 | 4.768 | 3.664 ~ 5.872 |
| 合并结肠癌 | 1.036 | 0.358 | 5.363    | 0.225 | 1.253 | 0.225 ~ 2.365 |
| 合并胃癌  | 1.336 | 0.852 | 3.225    | 0.362 | 1.115 | 0.625 ~ 2.033 |
| 肝功能异常 | 1.118 | 0.227 | 24.257   | 0.001 | 3.059 | 2.605 ~ 3.513 |

升高, 影响患者恢复<sup>[7-9]</sup>。闫阔等<sup>[10]</sup>报道研究显示, PPIs 治疗后患者白细胞减少率为 3.30%, 但整体发生率不高, 目前缺乏系统研究, 受样本量限制, 未发现 PPIs 致白细胞减少的发生规律。本研究中, PPIs 口服治疗后白细胞减少发生率为

5.09% (140/2750), 提示采用 PPIs 治疗患者具有一定的白细胞减少风险, 故分析相关危险因素较为重要。因使用 PPIs 患者个体差异较大, 对危险因素进行分析前需采用倾向性评分匹配法均衡混杂因素。

3.2 PPIs 导致白细胞减少的危险因素分析

在本研究中, 给药疗程 (OR = 2.912, 95%CI: 2.462 ~ 3.363, P = 0.001) 和累积使用量 (OR = 3.511, 95%CI: 2.847 ~ 4.175, P = 0.005) 为导致白细胞减少的危险因素。患者病程长, 使用口服 PPIs 治疗疗程增加, 累积使用量越大。PPIs 为小分子物质, 在机体内可形成全抗原、半抗原抗体复合物, 药物中成分可与白细胞结合, 介导机体免疫反应, 使细胞受到破坏, 且 PPIs 与代谢产物均可对干细胞造成损伤, 抑制骨髓中白细胞的生成, 导致白细胞减少; 患者病程较长, 需长期使用药物治疗, 对骨髓前体产生直接毒性, 对细胞的增殖产生抑制作用; 患者机体内对具有较多的青霉素相关免疫球蛋白 G 抗体发生免疫介导, 可直接损伤患者体内骨髓细胞, 使白细胞减少<sup>[11]</sup>。Gabutti 等<sup>[12]</sup>报道一例肾移植术后患者服用奥美拉唑 4 个月后出现白细胞减少, 停用奥美拉唑后恢复; Dury 等<sup>[13]</sup>报道一例囊性纤维化患者服用奥美拉唑 4 年出现白细胞减少, 停药恢复后因反流性食管炎使用艾司奥美拉唑治疗再次出现白细胞减少。本研



究中, 倾向性评分匹配后正常组和减少组的病程为  $(4.11 \pm 0.32)$  d 和  $(6.21 \pm 0.73)$  d, 正常组累积使用量为  $(44.28 \pm 5.47)$  g, 减少组累积使用量为  $(95.14 \pm 10.21)$  g, 白细胞减少可能与疗程有关, 也进一步说明了疗程对 PPIs 致白细胞减少的影响的复杂性。患者长期服用 PPIs 治疗, 可使药物的生物利用度升高, 导致机体内累积剂量增加, 促使其特异性结合血小板表面糖蛋白, 引发机体免疫反应, 破坏患者血小板, 损害患者免疫系统, 引发骨髓异质性, 促使白细胞减少<sup>[14]</sup>。

在本研究中, 年龄 > 60 岁也是导致白细胞减少的危险因素之一。匹配前减少组和正常组中大于 > 60 岁患者人数分别为 80、651, 随着年龄的增长, 机体功能逐渐下降, 可影响自身的调节作用, 无法修复相关损伤, 导致炎症反应, 且年龄的增加可使机体内胃部黏膜抵抗力降低, 修复力下降, 增加胃酸对胃黏膜的破坏, 使机体内固有免疫与获得性免疫功能发生改变, 导致患者临床症状反复发作, 影响治疗效果<sup>[15-17]</sup>。

### 3.3 肝功能异常与白细胞减少的关系

PPIs 口服后吸收迅速, 2 ~ 4 h 血药浓度达峰值, 生物利用度在 50% ~ 90%<sup>[18]</sup>。血浆蛋白结合率较高 (> 90%), 在组织中分布较少。在体内均迅速代谢, 血浆半衰期多小于 2 h。主要通过细胞色素 P450 系统 (CYP2C19 和 CYP3A4) 在肝内代谢, 经肾清除。PPIs 导致的肝功能异常, 有研究认为与肝脏 P450 代谢酶相关。药物在机体内代谢异常, 导致药物蓄积, 产生毒性反应, 造血细胞复制中断, 使机体内白细胞减少<sup>[19]</sup>。如果长期使用 PPIs 治疗, 胃液酸度降低, 促使艰难梭菌过度生长, 产生毒素, 抑制细胞色素氧化酶的分泌, 使患者体内谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT)、 $\gamma$ -谷氨酰转移酶 (GGT)、碱性磷酸酶 (ALP)、乳酸脱氢酶 (LDH) 水平升高, 损伤患者肝功能, 机体内肝功能受损, 可导致体内炎症反应加重, 损伤骨髓造血干细胞功能, 影响白细胞的产生, 导致白细胞降低。肝功能异常还可对凝血因子的合成造成影响, 升高患者出血风险, 损伤患者免疫应答, 抑制白细胞的活化, 使白细胞降低<sup>[20]</sup>。由于本研究为回顾性研究, 部分病历资料不全, 单因素分析结果显示, 肝功能异常在两组间的差异具有统计学意义, 可能会对本研究白细胞减少危险因素的分析结果造成影响。

## 4 结论

综上所述, PPIs 导致白细胞减少的影响因素

较多, 临床需多关注白细胞减少的发生风险, 规范使用相关药物, 及时进行处理, 减少白细胞对患者的危害。对于年龄较大、疗程较长、累积使用量较多、肝功能异常的患者, 临床需密切关注患者白细胞减少的发生风险, 早期治疗临床并发症, 控制临床用药疗程, 且白细胞减少后适时停药观察, 规范进行治疗, 防止白细胞的减少。

临床对于使用 PPIs 患者进行回顾性研究时, 白细胞正常组、减少组之间均衡性较差, 混杂因素难排除。倾向性评分匹配根据统计学方法筛选两组患者, 使筛选出患者临床资料处于平衡状态, 保证出现差异的因素为试验因素, 减少临床结果偏倚的发生, 使回顾性研究结果接近于随机对照试验。本文纳入较少样本, 具有一定局限性, 后续应进一步纳入更多的病例, 对导致白细胞减少的因素进行更加深入的研究。

## 参考文献

- [1] Kiecka A, Szczepanik M. Proton pump inhibitor-induced gut dysbiosis and immunomodulation: current knowledge and potential restoration by probiotics [J]. *Pharmacol Rep*, 2023, 75 (4): 791-804.
- [2] Simadibrata DM, Syam AF, Lee YY. A comparison of efficacy and safety of potassium-competitive acid blocker and proton pump inhibitor in gastric acid-related diseases: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2022, 37 (12): 2217-2228.
- [3] Clarke K, Adler N, Agrawal D, et al. Indications for the use of proton pump inhibitors for stress ulcer prophylaxis and peptic ulcer bleeding in hospitalized patients [J]. *Am J Med*, 2022, 135 (3): 313-317.
- [4] Mehta RS, Kochar B, Zhou Z, et al. Association of proton pump inhibitor use with incident dementia and cognitive decline in older adults: a prospective cohort study [J]. *Gastroenterology*, 2023, 165 (3): 564-572.
- [5] Ahn HJ, Lee SR, Choi EK, et al. Protective effect of proton-pump inhibitor against gastrointestinal bleeding in patients receiving oral anticoagulants: a systematic review and meta-analysis [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2022, 88 (11): 4676-4687.
- [6] Zhang PD, Li ZH, Chen PL, et al. Regular proton pump inhibitor use and incident dementia: population-based cohort study [J]. *BMC Med*, 2022, 20 (1): 271.
- [7] Haastrup PF, Jarbøl DE, Thompson W, et al. When does proton pump inhibitor treatment become long term? a scoping review [J]. *BMJ Open Gastroenterol*, 2021, 8 (1): 45-48.
- [8] Butt S, McMullan A, Dawe R, et al. Insights into proton pump inhibitor-induced photosensitivity: an observational study in a tertiary photobiology service [J]. *J R Coll Physi-*

- cians Edinb, 2022, 52 (4): 287-291.
- [9] Carrouel F, Dziadzko M, Grégoire C, et al. Relevance of early management by proton-pump inhibitor in acute upper gastro-intestinal tract disorder: a scoping review [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 167 (9): 11.
- [10] 闫阔, 夏文斌, 杨慧鹃, 等. 质子泵抑制剂致血小板减少症文献分析 [J]. 临床药物治疗杂志, 2022, 20 (4): 72-75.
- [11] 毛娇娇, 潘杰. 质子泵抑制剂致血液系统不良反应的特点及机制分析 [J]. 中国药物警戒, 2019, 16 (2): 119-122.
- [12] Gabutti L, Stoller R, Vogt B. Omeprazole-induced agranulocytosis in a kidney transplant recipients [J]. Nephrol Dial Transplant, 1999, 14 (2): 523-524.
- [13] Dury S, Nardi J, Gozalo C, et al. Agranulocytosis induced by proton pump inhibitors [J]. J Clin Gastroenterol, 2012, 46 (10): 859.
- [14] 王丽, 于文雯, 柳克浩, 等. 长期使用质子泵抑制剂所致不良反应及机制 [J]. 中国药物经济学, 2024, 19 (4): 100-103.
- [15] 夏文彬, 吴海啸, 胡阳, 等. 高剂量甲氨蝶呤治疗骨肉瘤致白细胞降低的风险因素分析 [J]. 中国肿瘤临床, 2021, 48 (20): 1047-1051.
- [16] 韩芙蓉, 李彤, 宋智慧, 等. 耳鼻咽喉头颈外科手术患者质子泵抑制剂预防用药合理性及影响因素 [J]. 临床药物治疗杂志, 2023, 21 (8): 86-89.
- [17] Heimpel H. When should the clinician suspect a drug-induced blood dyscrasia, and how should he proceed? [J]. Eur J Haematol Suppl, 1996, 60 (1): 11-15.
- [18] Philipps RJ, Lee Demler T, Lee C. Omeprazole-induced blood dyscrasia in a clozapine-treated patient [J]. Innov Clin Neurosci, 2012, 9 (9): 14-17.
- [19] Hatelakk JG. Review article: gastric acidity-comparison of esomeprazole with other proton pump inhibitors [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2003, 17 (11): 10.
- [20] 周秀丽, 刘宝生, 宫凯凯, 等. 755 例质子泵抑制剂致新的和严重的药品不良反应报告分析 [J]. 中南药学, 2022, 20 (4): 949-954.

(收稿日期: 2024-10-01; 修回日期: 2025-01-02)

## 基于前置审方系统的门诊麻醉精神药品的信息化建设

陈静静, 张慧丽, 田京辉\*, 徐贞贞, 曹凯, 赵亮 (许昌市中心医院药学部, 河南 许昌 461000)

**摘要:** **目的** 促进医院麻醉精神药品管理的信息化和规范化, 有效提高麻醉精神药品使用的安全性和合理性。 **方法** 基于门诊处方前置审核系统基础规则库, 对某三甲医院麻醉精神药品审方规则进行调整与优化, 包括基础知识库的管理、使用疗程、药品适应证、用法用量、提前取药等项目, 建立标准化的麻醉精神药品取药流程。比较信息化建设前 (2022 年 5 月—7 月) 和建设后 (2023 年 5 月—7 月) 门诊麻醉精神药品处方合理率和退药率的差异, 分析麻醉精神药品信息化建设在门诊药房的应用效果。 **结果** 麻醉精神药品处方合理率由 71.4% 提升至 93.4% ( $\chi^2 = 83.434$ ,  $P < 0.001$ ), 退药率由 0.28% 下降至 0.02% ( $\chi^2 = 23.777$ ,  $P < 0.001$ )。 **结论**

麻醉精神药品审方规则库的信息化建设, 可提高门诊麻醉精神药品的监管水平, 提高窗口药师的审核速率, 增强麻醉精神药品用药的安全性。

**关键词:** 处方前置审核系统; 麻醉精神药品; 规则库; 合理使用

**中图分类号:** R95

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-2981(2025)08-2444-07

**doi:**10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.046

## Information network of out-patient narcotics and psychotropic drugs based on pre-prescription review system

CHEN Jing-jing, ZHANG Hui-li, TIAN Jing-hui\*, XU Zhen-zhen, CAO Kai, ZHAO Liang (Department of Pharmacy, Xuchang Central Hospital, Xuchang Henan 461000)

**基金项目:** 许昌市重点研发与推广专项 (No.20230213068)。

**作者简介:** 陈静静, 女, 副主任药师, 主要从事临床药学工作, email: cjhappy0917@163.com \*通信作者: 田京辉, 男, 副主任药师, 主要从事智慧化药房及信息化技术应用工作, email: tianjinghui65@163.com

**Abstract: Objective** To promote the standardization of the information management of narcotic and psychotropic drugs in hospitals, and to improve the safety and rationality of their use. **Methods** According to the rule base of the outpatient pre-prescription review system, the rules for all narcotic and psychotropic drugs in a major hospital were optimized, including the basic knowledge base management, course of use, drug indications, usage and dosage, and early drug delivery, etc.. Standardized narcotic and psychotropic drug delivery process was established. The difference in irrational prescription and withdrawal rates of narcotic and psychotropic drugs in the outpatient department were compared before (May 2022 to July 2022) and after (May 2023 to July 2023) information network construction. The effect of narcotic and psychotropic drugs informatization network on the outpatient department was analyzed to improve the level of rational drug use. **Results** The qualification rate of narcotic and psychotropic drugs increased from 71.4% to 93.4% ( $\chi^2 = 83.434, P < 0.001$ ), and the withdrawal rate decreased from 0.28% to 0.02% ( $\chi^2 = 23.777, P < 0.001$ ). **Conclusion** The information network establishment of the rule database for narcotic and psychotropic drugs improves the supervision of outpatient narcotic and psychotropic drugs, and the review rate to enhance the safety of narcotic and psychotropic drugs.

**Key words:** pre-prescription review system; narcotic and psychotropic substances; rule base; rational use

麻醉药品和精神药品（简称麻精药品）是我国依据法律规定实行特殊管制的药品，容易产生依赖性、成瘾性，在临床中容易出现滥用的情况<sup>[1]</sup>，若流入非法渠道则会造成严重的社会危害。近年来，国家最高人民检察院先后发布了一批惩治麻精药品失管涉毒犯罪典型案例，并通过制发检察建议等方式推动麻精药品管理专项治理工作。2018 年，国家卫生健康委员会发布的《医疗机构处方审核规范》明确指出：“所有处方均应当经审核通过后方可进入划价收费和调配环节，未经审核通过的处方不得收费和调配”<sup>[2]</sup>。2020 年 9 月 15 日，国家卫健委办公厅发布《关于加强医疗机构麻醉药品和第一类精神药品管理的通知》，提出要提高麻精药品信息化管理水平<sup>[3]</sup>，然而，受经济水平和信息化发展程度的限制，各级医疗机构信息化程度参差不齐，仍有不少医疗机构仍停留在传统管理阶段<sup>[4]</sup>。目前，有部分文献探讨了类似内容，但未涉及麻精药品信息化辅助审方的“假阴性”问题、提前取药管理和特殊人群麻精用药问题等。本文基于处方前置审核系统和医院信息系统（HIS），以麻精药品相关法律法规和循证医学证据为依据，在前置审方系统规则库基础上进行专项规则优化，构建精细化的麻精药品审方规则库，旨在促进医院麻精药品管理的规范化和信息化，提高管理效率，规避流弊风险，有效提高药品使用的合理性。

## 1 方法

### 1.1 数据来源和统计方法

以处方前置审核软件基础数据库为依托，基于商业规则库筛选信息化建设前麻精药品的不合理问题并进行分析，逐步对相关审核规则进行优化，建立麻精药品精细化审核规则库并实施执行。通过临床合理用药系统随机抽取 2022 年 5 月—7 月（信息化建设前）和 2023 年 5 月—7 月（信息化建设后）麻精药品处方各 500 份进行人工点评，并从药房系统获取两个时间段麻精药品的总处方张数和退药处方张数。使用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计学分析，计量资料采用  $t$  检验，计数资料采用  $\chi^2$  检验， $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

### 1.2 前置审方系统规则库的建设方法

商业化的处方前置审核系统是依托说明书、临床数据以及医学知识库搭建起的临床药学决策支持系统，其审核规则库既是系统的核心依据，也是技术难点之一，医疗机构需要根据自身诊疗特点不断维护和更新以适应本医疗机构临床用药的发展和变化。本研究结合门诊麻精药品管理需求，确定通过处方前置审核系统和 HIS 系统需要实现的功能，即基础知识库的管理和用药疗程、超适应证、剂量范围、特殊人群、提前取药、重复用药、权限管理等审查模块的精细化规则二次构建，最终实现门诊标准化的取药流程。

## 2 麻精药品前置审核系统规则库的信息化建设

### 2.1 基础知识库的管理

处方前置审核系统对处方的审核是根据系统配备的知识库规则来判断医师处方的合理性<sup>[5]</sup>，基础规则库包括药品基础信息管理（药品配对、



单位换算、药品属性)和审查规则的管理(超适应证、剂量范围、给药途径等),如果基础知识库不完善或者内容错误,就会导致审核结果出现“假阳性”(合理的处方判定为不合理)或“假阴性”(不合理的处方判定为合理)。因此,需要审方药师对基础规则库逐一进行查看。常见问题及解决方案如下:

① 医院给药单位与合理用药监测系统(PASS)给药单位的换算关系缺失。如酒石酸唑吡坦片的单位换算只有片和mg的转化关系,没有盒与mg的转化关系,一旦医师给药单位选为盒时,合理用药系统不能识别单位,出现假阴性的问题。应结合麻精药品规格与给药单位,完善所有换算关系,可实现传入单位和规则单位不同也能参与审查的效果。

② 药品属性维护错误。如芬太尼透皮贴剂型初始系统数据为“非缓控释剂型”,若根据门诊麻醉药品(其他剂型)关于疗程的审查规则设置,芬太尼透皮贴剂型最多可开出7d用量,此时出现的便是假阳性问题。应对系统数据及时修改。

③ 药品适应证系统数据缺失。如艾司唑仑片的适应证系统数据为灰色或无,系统无法审查药品与适应证的相符性,出现假阴性的适应证审查问题。应依据相关循证医学证据对艾司唑仑的适应证进行逐一维护。

## 2.2 用药疗程的审查规则设置

门诊麻醉、第一类精神药品用药疗程的管理,除哌甲酯缓释片用于注意缺陷与多动障碍时处方时长 $\leq 30$  d,盐酸羟考酮、盐酸吗啡缓释片仅用于疼痛时处方时长 $\leq 7$  d,可待因仅用于咳嗽时处方时长 $\leq 3$  d,设置路径见图1,其他药品用于癌痛患者的时长管控则严格按照《处方管理办法》设置规则:控缓释剂型、注射剂及其他剂型处方时长分别不得超过15、3、7 d,否则系统自动拦截。其次,依据《处方管理办法》对第二类精神药品处方时长的规定,参考医疗机构第二类精神药品管理专家共识<sup>[6]</sup>,结合门诊长期睡眠障碍、焦虑患者的实际需求和疾病本身性质,针对精神心理门诊、心理门诊以及神经内科患者,当适应证包含焦虑、抑郁、双向情感障碍、精神分裂症等适应证时,第二类精神药品口服剂型开具最大时长为4周;当适应证包含癫痫时,苯巴比妥片、氯巴占、吡仑帕奈开具最大时长为4周;其他科室为慢性病患者开具第二类精神药品口服剂型处方,经医师填写正当理由并双签确认后可开具14 d常用量。

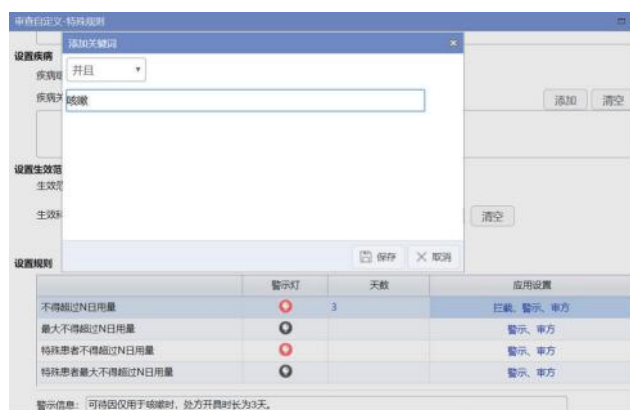


图1 可待因处方时长特殊规则设置

Fig 1 Special rules for codeine prescription duration

注( Note): 当添加关键词仅为咳嗽时, 开具处方时长 $> 3$  d时, 红灯拦截, 医师必须返回修改; 当添加关键词为咳嗽并且肿瘤、癌占位时, 开具处方时长 $> 7$  d时, 红灯拦截, 医师必须返回修改( When the keyword is only cough and the prescription duration exceeds 3 days, the red light indicates modification needed; when the keywords include cough, tumor/cancer occupying space, and the prescription duration exceeds 7 days, a red light implies need for modification ).

## 2.3 超适应证的规则优化

超适应证问题包含适应证不适宜、处方诊断书写不全、遴选的药品不适宜、无适应证用药和无正当理由超说明书用药。麻精药品处方点评发现问题为临床诊断书写不全, 其次为超说明书适应证用药。其中, 超说明书适应证用药涉及主要药物为氯硝西洋。氯硝西洋国内批准适应证主要用于控制各类癫痫, 尤其适用于失神发作、婴儿痉挛症、肌阵挛性发作、运动不能性发作及 Lennox-Gastaut 综合征。当氯硝西洋用于睡眠障碍、焦虑障碍、不宁腿综合征等适应证时, 属于超说明书用药( 具体见表1), 应由临床科室提供相关的循证医学完成超说明书备案后, 再由审方药师完善相关药品的系统适应证并参考相关文献设置剂量范围。

## 2.4 剂量范围问题

2.4.1 频次审方规则的修订与完善 新型镇静催眠药非苯二氮草类药物右佐匹克隆片和酒石酸唑吡坦片说明书推荐仅用于治疗睡眠障碍, 给药频次为 $1 \text{次} \cdot \text{d}^{-1}$ 。对超给药频次的处方直接进行拦截, 医师对给药频次进行修改后方可保存处方。另外, 对于苯二氮草类药物( 包括艾司唑仑、劳拉西洋片、阿普唑仑) 的用药频次进行自定义设置, 当疾病名称包含“焦虑、抑郁、躯体化障碍、双向情感障碍”等关键词时给药频次 $\leq 3 \text{次} \cdot \text{d}^{-1}$ ; 当疾病名称包含“失眠、睡眠障碍”等关键词时给药频次为 $1 \text{次} \cdot \text{d}^{-1}$ , 如果处方给药频次与疾病不符, 审方系统会对医师弹出警示信息( 见图2)。

表 1 氯硝西洋的超说明书具体情况  
Tab 1 Off-label details for clonazepam

| 超说明书用药适应证                           | 证据类型        | 推荐意见 | 超说明书用法用量                                                                            |
|-------------------------------------|-------------|------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 伴或不伴广场恐惧症的惊恐障碍 <sup>[7]</sup>       | FDA 药品说明书   | I 类  | 最大剂量为 4 mg · d <sup>-1</sup> <sup>[7]</sup>                                         |
| 迟发性运动障碍 <sup>[8]</sup>              | 专家共识        | Ⅲ类   | 最大剂量为 4.5 mg · d <sup>-1</sup> <sup>[9]</sup>                                       |
| 强迫症的增效治疗 <sup>[10]</sup>            | 临床指南        | Ⅱ类   | 暂未收集到剂量信息                                                                           |
| 辅助治疗慢性失眠或焦虑障碍型失眠 <sup>[11-12]</sup> | 临床指南 / 专家共识 | Ⅱ类   | 一次 1 ~ 2 mg, 睡前 30 min 内服用 <sup>[11]</sup>                                          |
| 特发性震颤的二线治疗 <sup>[13]</sup>          | 临床指南        | Ⅱ类   | 起始剂量为 0.5 mg · d <sup>-1</sup> , 有效治疗剂量为 1 ~ 6 mg · d <sup>-1</sup> <sup>[13]</sup> |
| 不宁腿综合征 <sup>[14]</sup>              | 临床指南        | Ⅲ类   | 0.5 ~ 4 mg · d <sup>-1</sup> <sup>[14]</sup>                                        |
| 焦虑障碍 <sup>[15]</sup>                | 专家共识        | Ⅲ类   | 对艾滋病相关焦虑, 常用剂量为 2 ~ 6 mg <sup>[16]</sup>                                            |

注: FDA、EMA、循证指南为 I 类推荐(推荐使用); 非循证指南、Meta 分析及系统综述、多中心对照研究为 II 类推荐(大多数情况下推荐使用); 专家共识、随机对照研究、病例对照研究为 III 类推荐(一般情况下推荐使用)。

Note: FDA, EMA, and evidence-based guidelines for class I recommendation (recommended use); non-evidence-based guidelines, meta-analyses and systematic reviews, and multicenter controlled studies are class II recommendations (recommended in most cases). Expert consensus, randomized controlled studies, and case-control studies are category III recommendations (general recommendation).

盐酸羟考酮缓释片、盐酸吗啡缓释片的给药频次为每隔 12 h 按时服用一次, 芬太尼透皮贴可以持续贴用 72 h; 规范给药单位为 mg。为规范以上药物的合理使用, 对给药频次和给药单位进行系统限制, 如果医师给药频次不是 q12h 或 q72h, 给药单位不是 mg, 系统直接进行拦截(见图 3)。

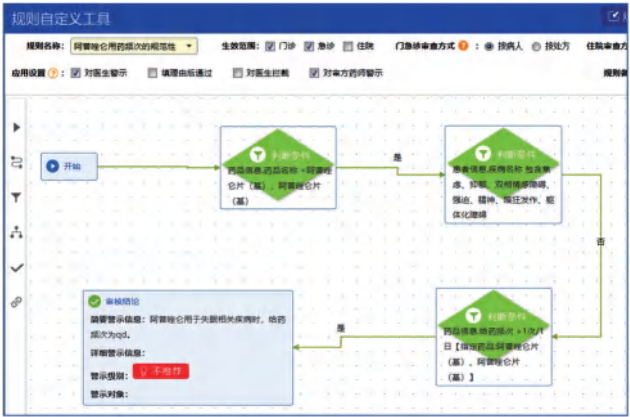


图 2 阿普唑仑不同疾病状态下的用药频次规则设置  
Fig 2 Rules of alprazolam administration frequency for different disease states

2.4.2 超剂量审方规则的修订与完善 麻精药品超剂量使用主要分为两种情况:

- ① 第二类精神药品用于治疗睡眠障碍的超剂量使用, 如酒石酸唑吡坦处方剂量为 20 mg/次, 超出说明书推荐剂量(10 mg/次); 艾司唑仑处方剂量为 4 mg/次, 而说明书用于失眠剂量为 1 ~ 2 mg/次。
- ② 磷酸可待因片超过说明书每次常用量 15 ~ 30 mg。

基于药品说明书和相关循证医学证据对不同类药品设置不同的剂量审方规则: ① 苯二氮卓受体激动剂类药物用于治疗睡眠障碍时, 应遵循个体化原则, 一般从小剂量开始, 若药品说明书或

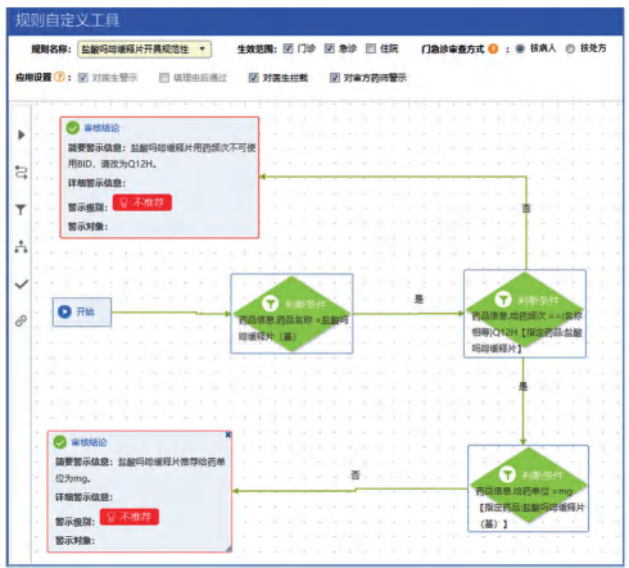


图 3 盐酸吗啡缓释片给药频次与给药单位的规范性设置  
Fig 3 Administration frequency and norms for unit of morphine hydrochloride sustained-release tablets

指南推荐的最大剂量无效, 则需更换药物, 而不是增加剂量, 因为超剂量使用不能增强疗效反而会增加不良反应<sup>[17]</sup>, 因此对第二类精神药品治疗睡眠障碍的超剂量使用采取拦截处理; ② 磷酸可待因片的单次处方剂量超出说明书推荐剂量, 但未超过说明书极量(100 mg/次, 250 mg · d<sup>-1</sup>), 采取双签执行的处置方式。

2.5 特殊人群用药审查规则设置

通过对说明书中特殊人群(儿童、老人以及妊娠哺乳期妇女)用药项目进行筛选, 将不同人群禁用药品进行系统拦截, 具体内容见表 2。如右佐匹克隆片不推荐用于 18 岁以下儿童。通过循证医学证据查询, 目前 FDA 尚未批准任何药物用于治疗儿童失眠, 而美国神经病学学会指南系统回顾表



明,褪黑素能改善睡眠效率、总睡眠时间以及睡眠潜伏期等睡眠问题,故可作为一种补充剂用于治疗儿童失眠<sup>[18]</sup>,因我院无褪黑素,医师可结合临床实际情况选择双签执行。最后将老人超推荐剂量的警示信息具体化,方便临床快速决策给药剂量,如右佐匹克隆用于年龄>65岁以上老人时,系统警示信息为“推荐单次剂量为1~2 mg”,在设置具体规则时,可将警示信息修改为“本药在65岁及65岁以上老人体内的消除时间更长且有更高的药物暴露量,故老人应适当减少剂量,推荐单次剂量为1~2 mg。”

表2 麻精药品禁忌证

Tab 2 Contraindications for narcotic and psychotropic drugs

| 药品                      | 禁忌证                                    |
|-------------------------|----------------------------------------|
| 地西洋注射液(2 mL×10 mg)      | 本品含苯甲醇,禁止用于儿童颅内注射                      |
| 盐酸哌甲酯缓释片<br>(18 mg×15片) | 6岁以下儿童                                 |
| 磷酸可待因片<br>(30 mg×1片)    | 12岁以下儿童禁用;哺乳期妇女禁用;<br>已知为CYP2D6超快代谢者禁用 |
| 酒石酸唑吡坦片                 | 15岁以下儿童,妊娠及哺乳期妇女禁用                     |
| 氯硝西洋片                   | 孕妇、妊娠期妇女、新生儿禁用                         |

## 2.6 提前取药问题及重复用药的审查规则设置

目前,大多数医疗机构HIS不能及时将历史处方传输给审方系统,造成医师开具处方或药师审核处方时无法获取到提前取药的警示信息。患者若在不同诊室或不同时间段重复开具麻精药品会带来麻精药品流弊的风险。应协调前置审方系统与HIS实现历史处方信息共享,医师处方完成开具后,前置审方系统可以对患者历史处方及目前处方进行综合分析并做出合理性的评价,并将不合理结果反馈给医师,包括历次用药的时-量、品规情况等,能使医师在较短的时间内充分了解患者药量变化的趋势,无需再花费较多时间去链接患者的历史就诊病历。此外,审方药师以现有法律法规为准则,对麻精药品的提前取药天数进行设置:门诊麻醉/第一类精神药品可以提前1 d取药;第二类精神药品可以提前2 d取药。

非苯二氮草类药物酒石酸唑吡坦和右佐匹克隆均为苯二氮草 $\alpha_1$ 受体亚型的选择性激动剂,作用机制相同,不建议联合使用<sup>[19]</sup>,系统规则直接对医师设置拦截。考虑到换药过程中的药物交叉使用,苯二氮草类药物阿普唑仑和氯硝西洋的联合使用时采取的双签执行的方式,同时将警示信息具体化。此外,同品种的麻精药品禁止重复开具。

## 2.7 建立麻精药品处方标准取药流程

医师为患者开具处方的同时由前置审方系统实时审核,不合理处方及时弹出警示信息,医师返回修改或提交药师进行审核,合理的处方由医师打印纸质处方并签字。与管理前相比,麻精药品处方的审核由人工转为系统+人工,提高审核的智能化与信息化,减轻窗口药师审核的压力,避免反复与医师或患者沟通不合理问题或退费问题;门诊医师无需手写纸质处方,避免手写错误的同时缩短医师看诊时间;麻精药品的重复开具和提前取药问题由人工干预转为系统拦截,避免医患纠纷(见图4)。

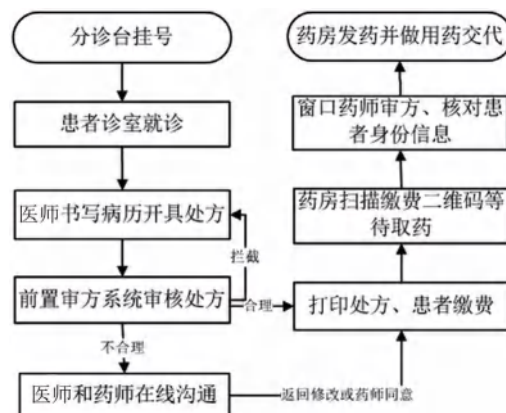


图4 信息化管理后门诊麻精药品的取药流程

Fig 4 Procedure of delivery of narcotics and psychotropic drugs in the outpatient department after informatization management

## 3 麻精药品信息化建设成效

### 3.1 有效提高麻精药品处方合理率

对2022年5月—7月和2023年5月—7月门诊麻精药品处方各500份进行点评,处方合理百分率由71.4%提高到93.4%( $\chi^2 = 83.434$ ,  $P < 0.001$ ),不合理处方类型由常见的6种降低至3种,其中不规范处方、提前取药、重复用药、麻醉药品开具疗程以及部分第二类精神药品剂量范围事前通过系统做了“刚性”拦截,极大程度降低了此类不合理问题的占比,同时为降低超适应证用药的风险,审方药师在线遇到麻精药品超适应证的问题,采取的措施为“必须修改”,故超适应证的问题仅出现在药师不在线时,占比也明显下降(具体见表3)。

### 3.2 有效降低麻精药品处方退药率

信息化建设前,由于医师和患者对麻精药品的不良反应和滥用风险认识不足,导致麻精药品的重复开具和提前取药问题较为突出,待患者缴完费去药房取药时,窗口药师一旦审核出此类问题,就会产生退费现象。通过前置审方系统规则库的调整,同比时间段的退药率由0.28%下降至0.02%( $\chi^2 =$



表 3 麻精处方合理率变化情况  
Tab 3 Changes in the qualified rate of narcotic and psychotropic drugs

| 时间             | 不合理处方 / 张 | 合理处方 / 张 | 处方合理率 / % | 不合理处方问题类型 / 张                                                                    |
|----------------|-----------|----------|-----------|----------------------------------------------------------------------------------|
| 2022 年 5 月—7 月 | 143       | 357      | 71.4      | 重复用药 (32); 处方不规范 (18); 提前取药 (15); 麻精药品未按规定天数开具 (51); 超适应证用药 (45); 精二药品剂量不适宜 (12) |
| 2023 年 5 月—7 月 | 33        | 467      | 93.4      | 苯二氮草类药物之间联用 (7); 精二药品超 7 d (29); 超适应证用药 (8)                                      |

23.777,  $P < 0.001$ ), 因同品种重复开具或提前取药导致的退药现象几乎不存在, 在实际工作中, 系统的升级或药品厂家的更换, 需要对前置审方系统规则及时调整, 否则会出现系统审核的假阴性, 从而导致退药的发生, 具体见表 4。

表 4 麻精药品退药率变化情况  
Tab 4 Changes in withdrawal rates of narcotic and psychotropic drugs

| 时间             | 总处方 / 张 | 退药处方 / 张 | 退药率 / % | 退方问题类型 (张)                                  |
|----------------|---------|----------|---------|---------------------------------------------|
| 2022 年 5 月—7 月 | 8842    | 25       | 0.28    | 麻醉药品提前取药 (8); 麻醉药品超疗程 (5); 精二药品同品种重复开具 (12) |
| 2023 年 5 月—7 月 | 11 429  | 3        | 0.02    | 系统问题产生的退药 (3)                               |

4 讨论

4.1 处方前置审核系统助力麻精药品的合理使用  
在推进门诊前置审核系统的过程中, 审方药师要把规则优化作为一种常态化工作, 在审核警示的同时, 进行循证医学推送, 帮助临床解决问题, 同时提供科学、可靠的药学信息, 将药学服务与审核工作紧密结合。对于麻精药品个体化用药问题复杂的处方, 需要发挥审方药师的主观能动性, 对系统规则库进行及时调整, 并对规则反复精简, 通过信息化手段实现特殊药品的超常预警及源头拦截。从规则优化的效果来看, 前置处方审核支持系统的确起到了积极的正向作用。通过前置审方干预, 提高了麻精药品使用科学性、合理性, 更好地实现“管得住、用得上”的监管目标<sup>[20]</sup>, 实现药品治病救人的目的, 避免药品非法滥用影响社会治安稳定, 才能最大限度地降低患者用药的风险<sup>[21]</sup>。

4.2 假阳性及假阴性问题的发现与处理  
假阳性问题易被发现, 而假阴性问题隐匿性强、危害大, 两者的发生均与系统初始规则库相关。因此, 审方药师要对基础规则库进行认真核查, 特别是药品基础信息的完整性, 应依据药品说明书对药品分类、药品剂型、特殊标记等属性进行逐一审查, 及时完善医院给药单位与 PASS 给药单位的换算关系, 并完成医院给药途径信息与 PASS 给药途径信息的配对<sup>[22]</sup>。此项工作虽然工作量大, 但却是避免假阴性最有效的方法。此外, 审方药师根据调剂药师的处方干预记录和处方点评结果, 对系统问题进行追踪, 及时进行规则的完善或系统的升级。两者相辅相成, 能够显

著提升系统用药合理性审核的精细程度与可扩展性, 最终降低审核结果的假阴性率<sup>[23]</sup>。  
4.3 第二类精神药品的合理使用及替代治疗  
在麻精药品不合理处方筛查中, 发现“睡眠障碍”患者第二类精神药品的超多日用量及重复用药占比较大, 存在较大的用药安全隐患<sup>[24]</sup>。首先, 药师应与医师积极沟通, 帮助患者明确失眠诱因, 采取其他替代治疗方式。如帕金森病 (PD) 患者有失眠症状, 应判断是否与夜间 PD 运动症状加重、夜间剂末现象或抗 PD 药物的不良反应有关<sup>[25]</sup>。其次, 临床医师应对睡眠障碍的患者进行积极宣教, 指导患者养成良好的睡眠习惯, 而不是长期使用处方药来改善睡眠。最后, 抗抑郁药及抗精神病药大多具有镇静催眠作用, 是目前治疗睡眠障碍最常见的超说明书用药选择之一<sup>[26]</sup>。如曲唑酮为 5-羟色胺受体拮抗剂, 具有中枢镇静作用; 米氮平拮抗组胺 H<sub>1</sub> 受体, 长期服用的成瘾性风险较低, 也较少产生跌倒、宿醉等不良反应。

4.4 本文的局限性  
基于前置审方系统的门诊麻精药品信息化建设在提升用药合理性、保障患者安全方面具有重要意义。然而, 受样本量的限制、研究周期相对不足以及单一机构的数据的影响, 可能无法全面反映门诊麻精药品使用情况, 同时, 在其他医疗机构推广此系统也可能面临一些潜在挑战, 如提前取药问题, 不同医疗机构的信息化水平存在差异, HIS 与审方系统的对接可能会面临技术难题, 无法实现历史处方的传输与共享。此外, 随着医疗的发展以及无痛理念的普及, 超大剂量麻醉药

品的使用也呈上升趋势,但该院对单次使用最大剂量并无相关规定。为保障超大剂量麻醉药品合理、规范使用,应参考文献建立超大剂量麻醉药品会诊的信息化管理模式<sup>[27]</sup>,实现从“管得好”到“用得好”的目标。

## 参考文献

- [1] 张旭锋,史香芬,卢晓静,等.基于门诊处方前置审核系统的麻醉药品和精神药品用药规则精细化设置与实施效果评价[J].中国医院药学杂志,2022,42(9):935-939.
- [2] 国卫办医发.关于印发医疗机构处方审核规范的通知[EB/OL].(2018-06-29)[2024-10-10].[http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2018-12/31/content\\_5435182.htm](http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2018-12/31/content_5435182.htm)
- [3] 陈茜,徐圣秋,郑笑笑.精细化门诊急诊麻醉、精神药品处方前置审核规则的设置与实践[J].药学与临床研究,2023,31(5):472-476.
- [4] 中国抗癌协会肿瘤临床药学专业委员会,医疗机构麻醉药品和第一类精神药品信息化管理专家共识编写组.医疗机构麻醉药品和第一类精神药品信息化管理专家共识[J].医药导报,2022,41(1):1-7.
- [5] 廖丽娜,李鑫,左静,等.我院在推进处方前置审核系统运行中存在的问题与对策[J].中国药房,2019,30(5):587-591.
- [6] 《医疗机构第二类精神药品管理专家共识》编写组.医疗机构第二类精神药品管理专家共识[J].中国医院药学杂志,2023,43(6):591-596.
- [7] FDA. Label (2021-02-05)-KLOPIN (Clonazepam Tablet)(Genentech USA, Inc.)[Z].
- [8] 中华医学会精神医学分会精神分裂症协作组.抗精神病药长效针剂治疗精神分裂症的专家共识[J].中华精神科杂志,2020,53(2):99-110.
- [9] Thaker GK, Nguyen JA, Strauss ME, et al. Clonazepam treatment of tardive dyskinesia: a practical GABA-mimetic strategy[J]. Am J Psychiatry, 1990, 147(4): 445-451.
- [10] 中华医学会精神医学分会,《中国强迫症防治指南》编写组.中国强迫症防治指南 2016(精编版)[J].中华精神科杂志,2016,49(6):353-366.
- [11] 中国睡眠研究会.中国失眠症诊断和治疗指南[J].中华医学志,2017,97(24):1844-1856.
- [12] 中华医学会神经病学分会,中华医学会神经病学分会睡眠障碍学组,中华医学会神经病学分会神经心理与行为神经病学学组.中国成人失眠伴抑郁焦虑诊治专家共识[J].中华神经科杂志,2020,53(8):564-574.
- [13] 中华医学会神经病学分会帕金森病及运动障碍学组.原发性震颤的诊断和治疗指南[J].中华神经科杂志,2009,42(8):571-572.
- [14] 中华医学会神经病学分会帕金森病及运动障碍学组.不宁腿综合征的诊断标准和指南[J].中华神经科杂志,2009,42(10):709-711.
- [15] 中华医学会神经病学分会神经心理学与行为神经病学组.综合医院焦虑、抑郁与躯体化症状诊断治疗的专家共识[J].中华神经科杂志,2016,49(12):908-917.
- [16] 中华中医药学会防治艾滋病分会.艾滋病相关焦虑中西医协同治疗专家共识[J].中医学报,2020,35(9):1889-1892.
- [17] 基于循证证据的睡眠障碍超说明书用药处方前置审核[J].中国药房,2022,33(19):2414-2417.
- [18] 唐艺嘉,王紫惊,姜艳蕊,等.孤独症谱系障碍儿童睡眠障碍临床实践相关指南解读[J].中国全科医学,2022,25(21):2563-2568.
- [19] 张清华,金锐,王琨,等.苯二氮草类受体激动剂处方审核规则的及时维护[J].医药导报,2022,41(6):911-915.
- [20] 丁晓虎,沈晓琴,王昱,等.基于闭环管理构建的麻醉药品管理系统在门诊药房的应用[J].医药导报,2016,35(12):1388-1392.
- [21] 谢珊珊,刘松,万瑾瑾,等.药师借助合理用药软件开展门诊处方前置审核的实践及效果[J].中国药房,2021,32(7):876-880.
- [22] 张慧丽,田京辉,曹凯,等.基于信息智能化的处方前置审核系统在某院门诊的应用实践[J].中国合理用药探索,2023,10(20):123-128.
- [23] 费思思,任梓华,王珏,等.审方药师持续修正合理用药规则系统对医嘱审核失误发生率的影响[J].中国现代应用药学,2021,38(19):2437-2440.
- [24] 江海峰,赵敏,刘铁桥,等.镇静催眠药合理使用专家意见[J].中国药物滥用防治杂志,2021,27(2):103-106.
- [25] 上海市中西医结合学会慢性神经系统疾病专业委员会、帕金森病睡眠障碍中西医结合管理专家共识写作组.帕金森病睡眠障碍中西医结合管理专家共识(2021)[J].上海中医药大学学报,2021,35(3):1-6.
- [26] 中华医学会神经病学分会,中华医学会神经病学分会睡眠障碍学组.中国成人失眠诊断与治疗指南:2017版[J].中华神经科杂志,2018,51(5):324-335.
- [27] 蒋梦晴,李旭梅,张慧.信息化闭环管理在超大剂量麻醉药品会诊中的实践[J].中国药房,2022,33(23):2913-2916.

(收稿日期:2024-10-09;修回日期:2024-12-19)

## 中药资源的开发与利用

## 中药润性理论探讨

李彩霞<sup>1, 2, 3</sup>, 宋亚刚<sup>3</sup>, 田硕<sup>3</sup>, 彭孟凡<sup>4</sup>, 刘保松<sup>5</sup>, 苗明三<sup>3\*</sup> (1. 新乡医学院第一附属医院临床药学学部, 河南 新乡 453100; 2. 河南省医学重点学科, 药学其他学科(临床药学), 河南 新乡 453100; 3. 河南中医药大学 国家药品监督管理局中药安全研究与评价重点实验室, 郑州 450046; 4. 黄淮学院, 河南 驻马店 463000; 5. 驻马店市中医院, 河南 驻马店 463000)

**摘要:** 在临床辨证论治及方剂配伍中, 中药间的润燥相济与寒热得宜同等重要。但是截至目前尚未有对中药润性理论的系统探讨, 导致润性概念模糊与混沌。文章围绕润性的概念、确定依据、分类, 通过查阅文献, 对 2020 年版《中国药典》中润药的科别、入药部位、性能等进行归纳总结, 从理论上对润的概念进行阐释, 为中药润性的研究及临床遣方组药提供参考。

**关键词:** 润性; 燥邪; 性味; 归经; 法象思维

**中图分类号:** R285.1, R283 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)08-2451-06  
**doi:**10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.047

传统中药的性能内涵主要包括四气(寒、热、温、凉)、五味(酸、甘、辛、苦、咸)、升降浮沉、毒性等, 这些是中药作用的基本性质和对其特征的高度概况, 对中药的临床应用起关键的指导作用, 但是其中不涉及润/燥的概念<sup>[1]</sup>。然而在中药的临床应用及方剂配伍中, 中药间的润燥相济与寒热得宜同样重要, 是临床遣方组药不可或缺的配伍要领<sup>[2]</sup>。燥与风、寒、暑、湿、火并称为“六邪”, 是致病之外邪。所谓中药的润/燥性能, 即润以祛燥邪、燥以祛湿邪, 反映的是药物对人体阴液变化的影响<sup>[3]</sup>。由此看来, 中医“燥”的概念有两层含义, 即致病之邪与功能的概况, 而中药的润性则多为功能的概况, 因此中药的润性也可以称其为润效。

润/燥性能的产生与中医的病因病机理论联系紧密。唐以前的本草缺乏对中药润/燥性能的描述, 至唐始陈藏器方于《本草拾遗》中首次提出“湿”(后世言之润)、“燥”的理论。此后较长时间内对中药润性一直沿用“湿剂”的描述, 至明代·李时珍在《本草纲目》中首次将“湿剂”改为“润剂”, 并认为甘咸或寒凉的中药其性多润, 而养血药、生津药、益精药、润燥药等均具有润性, 至此中药润性的理论才趋于完善。清·石寿棠非常重视药物的润燥之性, 将药物分为润、燥两类, 并于《医原·用药大要》中论述病有燥湿之异、药有润燥之殊, 其对润的论述进一步促进了中药润性的发展。近代刘

庆林<sup>[2]</sup>亦认为润性是中药的重要特性, 中药润性理论对于完善中药的性能理论具有重要意义, 临床应用时应充分考虑中药润/燥的偏向, 注重药证结合, 有效提高临床疗效。杨敏等<sup>[3]</sup>为明确中药润性理论的历史渊源, 对历代本草文献进行了考证, 考证内容包括中药润性理论的提出、发展与完善历程, 以及润药的性能、临床辨证纲要等。王晓梅<sup>[4]</sup>对“燥”理论的源流进行了全面归纳总结, 其通过辨析历代有关“燥”的相关古籍及文献, 进一步明确了与“燥”相关的概念及内容, 尽管其论述集中于燥邪, 未对中药“燥”湿之功能展开论述, 但燥邪之病证与中药润性相对应, 因此其对燥邪的理论阐述为完善中药润性理论及提高临床辨证论治效率奠定了基础。燥邪作为六邪之一, 其具有涩滞气机、伤阴、与血相结、易于伏留等特点, 因此燥邪所致病症应从“伏燥”论治, 治则以润利气机为主<sup>[4]</sup>, 而中药润性多与通便、止咳、止渴、滋阴等功效结合<sup>[3]</sup>。基于此, 中药的润/燥偏性为临床辨证论治的主要病证禁忌之一, 但是润/燥性能在中药的性能理论中并无进一步论述, 且目前尚未有润性理论的系统探讨。随着中药鲜用的持续深入研究, 鲜药已被明确具有“鲜润”“凉润”的特点, 再次肯定中药润性的重要地位, 但是润性的概念及理论范畴仍比较模糊, 因此有必要对润性理论进行归纳总结。2020 年版《中国药典》一部饮片性味归经

**基金项目:** 国家药品监督管理局中药安全研究与评价重点实验室开放课题 (No.SRETCM2024-02); 河南省医学科技攻关计划项目 (No.LHGJ20240474); 河南省自然科学基金项目 (No. 252300420632)。

**作者简介:** 李彩霞, 女, 博士, 主要从事中药药效物质及机制研究, email: llzndfb@163.com \*通信作者: 苗明三, 男, 教授, 主要从事中药药效物质及机制研究, email: miaomingsan@163.com



项下无润性的记载，但在功能主治中有所体现。本文拟通过构建中药学“润”的性能理论结构，为中药润性与物质基础的相关性研究提供理论依据，进一步完善和丰富润性的理论体系。

1 方法

对 2020 年版《中国药典》中具有润效的中药进行归纳总结。

纳入标准：2020 年版《中国药典》一部中药饮片功能描述中含有润，如“润燥”“润肺”“润肠”“润肤”等功效的中药。

将纳入中药的科别、性味、归经、功效等录入 2016 Excel 中，采用 SPSS 21.0 进行计数和系统聚类分析。

2 结果

2.1 2020 年版《中国药典》润药概况

2020 年版《中国药典》润药以植物药（40 味）为主，还有少量动物药和矿物药（见表 1）。润性植物药主要分布于百合科、葫芦科、蔷薇科和桑科，少量分布于伞形科与菊科（见图 1A）。润性植物药的入药部位主要为种子/种仁、根/根茎/块根（见图 1B）。根据“取象比类”思维，种子/种仁因富含油脂，具有滋润润滑的作用；而根及根茎类中药的生长趋势为向内与向下，因此具有养阴润燥、泻下通便等作用<sup>[5]</sup>。

表 1 2020 年版《中国药典》润药的基本概况

| 类别  | 中药                                                                                                                                                |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 矿物药 | 玄明粉、芒硝                                                                                                                                            |
| 动物药 | 阿胶、哈蟆油、猪胆粉、蜂蜜、珍珠                                                                                                                                  |
| 植物药 | 山麦冬、川贝母、天冬、太子参、火麻仁、玉竹、龙脷叶、平贝母、瓜蒌、瓜蒌子、炒瓜蒌子、亚麻子、百合、百部、当归、肉苁蓉、伊贝母、决明子、麦冬、何首乌、苦杏仁、郁李仁、明党参、罗汉果、知母、柏子仁、胖大海、桃仁、核桃仁、桑叶、桑椹、黄精、甜瓜子、款冬花、紫苏子、紫菀、黑芝麻、锁阳、蓝布正、榧子 |

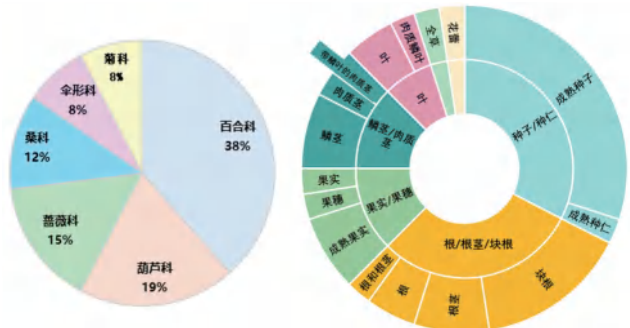


图 1 2020 年版《中国药典》润药（植物）的科别分布（A）及入药部位（B）

2.2 2020 年版《中国药典》润药性味、归经、毒性特点

润药的性味以寒、平、甘、苦为主，仅 1 味润药（苦杏仁）有小毒（见表 2、图 2）。润药主要归肺与大肠经。肺为娇脏主行水，参与调节体内水液代谢，为清虚之体，喜清润而恶燥；大肠主津，同样参与体内水液代谢的调节，肠道失润则大便秘结不通，肺与大肠的功能特质与润药主归肺和大肠经相一致。

表 2 2020 年版《中国药典》润药的性能特点

| 性  | 频数 | 味  | 频数 | 归经 | 频数 | 毒性  | 频数 |
|----|----|----|----|----|----|-----|----|
| 寒  | 14 | 甘  | 40 | 肺  | 33 | 有小毒 | 1  |
| 平  | 13 | 苦  | 16 | 大肠 | 22 |     |    |
| 微寒 | 8  | 微苦 | 7  | 肝  | 14 |     |    |
| 温  | 7  | 咸  | 6  | 胃  | 13 |     |    |
| 微温 | 3  | 辛  | 5  | 心  | 12 |     |    |
| 凉  | 2  | 淡  | 1  | 肾  | 12 |     |    |
|    |    | 涩  | 1  | 脾  | 8  |     |    |
|    |    | 酸  | 1  | 胆  | 1  |     |    |
|    |    |    |    | 小肠 | 1  |     |    |

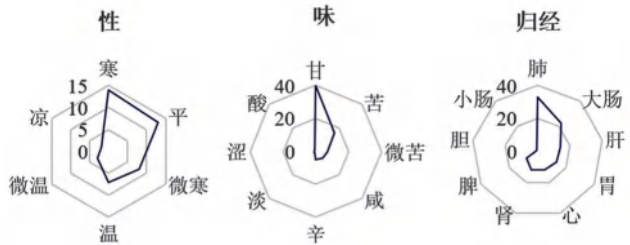


图 2 2020 年版《中国药典》润药的性能直观分析图

2.3 2020 年版《中国药典》润药的功效统计结果  
中药功能以“功能+病/邪、气血津液或脏器”的表达方式为主，如“燥湿”“补气”“明目”等，且主要为四字两词的表达形式。为突出润药的功效特点，将纳入中药的功能逐一拆分为两字的独立单元，即清热解毒拆分为清热、解毒，生津止渴拆分为生津、止渴，以此来归纳总结润药的功效特点（对于“益精血”“补肝肾”等此类三字表述形式不予拆分）。统计结果显示，润药的功能以润肺、通便、润肠、润燥、止咳的功效最为突出，这与润药主归肺和大肠经的特点相一致。统计结果见表 3。

2.4 2020 年版《中国药典》润药的成分特点

《中药大辞典》是一部全面介绍中药学基本知识的著作，收录了数千味中药的名称、性状、成分等信息，具有重要的文献价值。本文对润药的成分特点进行归纳总结时主要参考《中药大辞典》相关词条成分项下内容，《中药大辞典》未收录的中药通过检索文献进行补充。统计结果显示，润药成分以氨基酸/肽/蛋白质/酶、脂肪酸、糖类、甾体类成分（ $n > 20$ ）为主，其次为黄酮类、萜类、有机酸类、挥发油、微量元素等（ $n > 10$ ）。初生代谢产物是中药药性的重要物质基础<sup>[6]</sup>，其中蛋白

表 3 2020 年版《中国药典》润药的功能特点 (n > 2)

| 功能 | 频数 | 功能 | 频数 | 功能    | 频数 | 功能    | 频数 | 功能 | 频数 |
|----|----|----|----|-------|----|-------|----|----|----|
| 润肺 | 21 | 化痰 | 9  | 滑肠    | 5  | 益精(血) | 4  | 下气 | 3  |
| 通便 | 20 | 清热 | 9  | 补血    | 4  | 安神    | 3  | 消痈 | 3  |
| 润肠 | 13 | 养阴 | 9  | 健脾    | 4  | 明目    | 3  | 止痛 | 3  |
| 润燥 | 13 | 解毒 | 8  | 平喘    | 4  | 清肺    | 3  | 滋阴 | 3  |
| 止咳 | 11 | 生津 | 6  | 补肾(阳) | 4  | 清心    | 3  |    |    |

质(氨基酸、肽、酶)、脂肪酸、糖类是润药较为突出的成分。氨基酸类成分多存在于寒性中药中<sup>[7]</sup>, 脂肪酸含量亦与药物的寒性成正比<sup>[8]</sup>, 这与润药以寒性为主的特点相一致。糖类成分是中药甘味的重要组成部分<sup>[9]</sup>, 对应了润药以甘味为主的特点。统计结果见图 3。

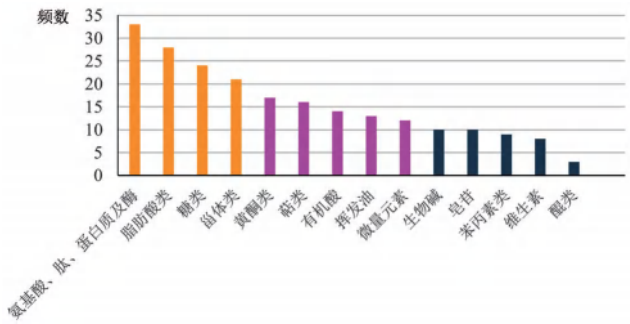


图 3 2020 年版《中国药典》润药的成分特点 (n > 2)

3 中药润性的确定依据

3.1 根据中药的性味确定

润性与中药的甘、苦、寒、平等性味关系密切。甘味中药多质润而长于滋燥, 在正气虚衰之时, 发挥补益、和中、缓急作用<sup>[10]</sup>。性寒, 味甘、苦的知母质润,《本草纲目》曾云: 知母“下则润肾燥而滋阴, 上则清肺金而泻火”, 既可上清肺热、下泻肾火, 又可滋阴保津<sup>[11]</sup>。性大寒、味甘的石膏, 善于清气分之热兼生津止渴; 性微寒, 味甘、微苦的麦

冬, 长于养阴生津润肺; 性寒, 味甘、苦的霜桑叶质轻寒润入肺, 可清泄宣发肺中燥热<sup>[12]</sup>。部分润药如当归、郁李仁、款冬花、紫苏子、紫菀等虽兼有甘、苦、平等性味, 但是辛味较为突出。有学者认为辛味中药的润燥作用不是辛味本身所具有的, 而是通过宣肺气、助肾气, 达到布津润燥、肾之气化的作用。辛润的概念最早见于《素问·脏器法时论篇》, 其云: “肾苦燥, 急食辛以润之, 开腠理, 致津液, 通气也。”此外, 李小龙等<sup>[13]</sup>认为人体阴液不足时, 不能滋润濡养机体、不能制约阳气, 津枯热结, 易化热化燥, 煎熬津液, 成痰成瘀, 发为结节,《本草正义》云此“乃燥热津枯而气结”, 而辛味药物能行能散, 通络攻坚, 令郁结开通, 气液宣行, 故而辛能润燥、散结<sup>[14]</sup>。也有学者认为辛味药含各种挥发油, 辛温芳香, 因质柔含油而润<sup>[15]</sup>。

3.2 根据中药的功能确定

中药寒热性能是相对所治病症的寒热属性而言的, 同样, 中药润性能是相对燥邪而言, 因此中药润性等同于中药所具有的润效。具有润燥、润肺等功效的中药即可确定为其具有润性, 而可以治疗或改善燥证或祛除燥邪的中药, 即使功能中未体现润, 也可以认定其为润药。2020 年版《中国药典》主治项体现中药润性的有北沙参、南沙参、西洋参、天花粉、大皂角、猪牙皂、蓖麻子等。统计结果见表 4。

表 4 2020 年版《中国药典》主治项体现润性的中药

| 中药  | 科别  | 入药部位 | 性味      | 归经    | 功能                 | 主治                                                     |
|-----|-----|------|---------|-------|--------------------|--------------------------------------------------------|
| 北沙参 | 伞形科 | 根    | 甘、微苦、微寒 | 肺、胃经  | 养阴清肺, 益胃生津         | 用于肺热燥咳, 劳嗽痰血, 胃阴不足, 热病津伤, 咽干口渴                         |
| 南沙参 | 桔梗科 | 根    | 甘、微寒    | 肺、胃经  | 养阴清肺, 益胃生津, 化痰, 益气 | 用于肺热燥咳, 阴虚劳嗽, 干咳嗽黏, 胃阴不足, 食少呕吐, 气阴不足, 烦热口干             |
| 西洋参 | 五加科 | 根    | 甘、微苦、凉  | 心、肺、肾 | 补气养阴, 清热生津         | 用于气虚阴亏, 虚热烦倦, 咳喘痰血, 内热消渴, 口燥咽干                         |
| 天花粉 | 葫芦科 | 根    | 甘、微苦、微寒 | 肺、胃经  | 清热泻火, 生津止渴, 消肿排脓   | 用于热病烦渴, 肺热燥咳, 内热消渴, 疮疡肿毒                               |
| 大皂角 | 豆科  | 果实   | 辛、咸、温   | 肺、大肠经 | 祛痰开窍, 散结消肿         | 用于中风口噤, 昏迷不醒, 癫痫痰盛, 关窍不通, 喉痹痰阻, 顽痰喘咳, 咳痰不爽, 大便燥结; 外治痈肿 |
| 猪牙皂 | 豆科  | 不育果实 | 辛、咸、温   | 肺、大肠  | 祛痰开窍, 散结消肿         | 用于中风口噤, 昏迷不醒, 癫痫痰盛, 关窍不通, 喉痹痰阻, 顽痰喘咳, 咯痰不爽, 大便燥结; 外治痈肿 |
| 蓖麻子 | 大戟科 | 种子   | 甘、辛、平   | 大肠、肺经 | 泻下通便, 消肿拔毒         | 用于大便燥结, 痈疽肿毒, 喉痹, 瘰癧                                   |

3.3 根据中药的性状确定

法象思维又称取象比类思维, 是一种非定义性的引导式思维, 取象比类是中医学理论的精华, 是古代自然朴素科学及哲学思想的框架<sup>[16]</sup>。法象思

维是通过宏观认识中药的生物学特征, 如形态、质地、习性、生长环境等特点, 将其与人体乃至疾病的特征相联系, 发掘中药治疗疾病的内在规律及发展变化趋势, 阐述药物作用机制, 从而指导辨证论

治的思维方式<sup>[17]</sup>。如植物刺，有插入、刺破之意，因此认为此类药用部位具有排脓托毒的作用，如皂角刺、白棘刺等<sup>[17]</sup>；“华”，原指草木的花，后引申为华丽、光彩之意，亦作“容貌”之用，以花治华，即利用花的“外象”取其“意象”援物类比治疗颜面皮肤病<sup>[16]</sup>，如牡丹花、人参花、三七花等均有美容养颜护肤的作用<sup>[18-20]</sup>。

**3.3.1 质润多汁有油者其性多润** 《医原·用药大要》云：“病有燥湿，药有润燥，凡体质柔软，有汁有油者皆润，体质干脆，无汁无油者皆燥”，其药物的润燥理论即法象思维的具体体现<sup>[2]</sup>。防风为“风药之润剂”<sup>[21]</sup>，《本草纲目》记载防风“黄色而润者为佳”<sup>[22]</sup>，说明防风的性状与其润性存在密切联系。一般来讲，质润的中药饮片多具有养阴作用，如麦冬、玉竹、黄精等<sup>[23]</sup>。

**3.3.2 鲜药轻清而润** 鲜药作为中药的鲜用形式，其质轻清，临床多采用捣汁/绞汁等方法入药。相较于干品来说，鲜药肉厚多汁，其性多润；鲜药汁更是轻清甘润，能滋阴润燥、宣通郁热、清热解毒、畅调气机，对于热证、血证、表证，及疮痈、毒蛇虫蜇伤等外科热毒证等均有突出疗效<sup>[24-25]</sup>。因此，鲜药的润性主要与中药鲜用形式的质润多汁相关。

**3.3.3 种子/种仁多为润药** 《医林纂要探源》曰：“凡用子用仁，皆有润意”<sup>[26]</sup>，种子/种仁类中药

质润多脂，有润燥滑肠之效。此外，种子/种仁类中药多药性平和，作用和缓，凉而不寒，温而不燥，利而不峻，泻而不猛，因此吴门医派胃阴学说善用种仁治疗中风后便秘<sup>[27]</sup>。

4 润药的分类

4.1 根据性能分类

《医原·用药大要》云：“草木虽微，其气味有阴阳之分，体质有刚柔之别……盖以地之刚柔，即天之阴阳所化，言阴阳而刚柔即在其中”<sup>[28]</sup>。刚者燥，柔者润，体质柔软，有汁有油的药物即为润药，属柔，得春秋冬之气者多，可治燥证<sup>[28]</sup>。润药既可以根据润的强度进行分类，又可以结合中药的性能进行分类。根据润的强度区分有微润、甚润之异，而结合中药的性能进行分类则主要有辛润、温润、寒润、凉润、平润五类，中药配伍应用时以后者分类居多<sup>[29]</sup>。

2020 年版《中国药典》一部饮片寒润中药最多，共计 22 味，以润肺、润燥、清热、化痰、通便、养阴为主；其次为平润中药，共计 13 味，以通便、润肠、润肺、润燥、健脾、养阴、止咳为主；温润中药 10 味，以润肠、通便、止咳、润肺、下气等功效为主；辛润中药共计 5 味，以润肠、通便、下气、止咳、化痰、润肺等功效为主；凉润中药 2 味，以润肺为主。统计结果见表 5。

表 5 2020 年版《中国药典》润性中药

| 类别 | 中药   | 科    | 入药成分/入药部位 | 采收时间      | 性味       | 归经       | 功能                  |
|----|------|------|-----------|-----------|----------|----------|---------------------|
| 寒润 | 玄明粉  | /    | 硫酸钠       | /         | 咸、苦、寒    | 胃、大肠     | 泻下通便，润燥软坚，清火消肿      |
|    | 芒硝   | /    | 含水硫酸钠     | /         | 咸、苦、寒    | 胃、大肠     | 泻下通便，润燥软坚，清火消肿      |
|    | 珍珠   | 珍珠贝科 | 珍珠        | /         | 甘、咸、寒    | 心、肝      | 安神定惊，明目消翳，解毒生肌，润肤祛斑 |
|    | 猪胆粉  | 猪科   | 胆汁        | /         | 苦、寒      | 肝、胆、肺、大肠 | 清热润燥，止咳平喘，解毒        |
|    | 百合   | 百合科  | 干燥肉质鳞叶    | 秋季        | 甘、寒      | 心、肺      | 养阴润肺，清心安神           |
|    | 伊贝母  | 百合科  | 干燥鳞茎      | 5~7 月     | 苦、甘、微寒   | 肺、心      | 清热润肺，化痰止咳           |
|    | 川贝母  | 百合科  | 干燥鳞茎      | 夏、秋或积雪融化后 | 苦、甘、微寒   | 肺、心      | 清热润肺，化痰止咳，散结消痈      |
|    | 平贝母  | 百合科  | 干燥鳞茎      | 春         | 苦、甘、微寒   | 肺、心      | 清热润肺，化痰止咳           |
|    | 山麦冬  | 百合科  | 干燥块根      | 夏初        | 甘、微苦、微寒  | 心、肺、胃    | 养阴生津，润肺清心           |
|    | 麦冬   | 百合科  | 干燥块根      | 夏季        | 甘、微苦、微寒  | 心、肺、胃    | 养阴生津，润肺清心           |
|    | 天冬   | 百合科  | 干燥块根      | 秋、冬       | 甘、苦、寒    | 肺、肾      | 养阴润燥，清肺生津           |
|    | 玉竹   | 百合科  | 干燥根茎      | 秋         | 甘、微寒     | 肺、胃      | 养阴润燥，生津止渴           |
|    | 知母   | 百合科  | 干燥根茎      | 春、秋       | 苦、甘、寒    | 肺、胃、肾    | 清热泻火，滋阴润燥           |
|    | 瓜蒌   | 葫芦科  | 干燥成熟果实    | 秋         | 甘、微苦、寒   | 肺、胃、大肠   | 清热涤痰，宽胸散结，润燥滑肠      |
|    | 瓜蒌子  | 葫芦科  | 干燥成熟种子    | 秋         | 甘、寒      | 肺、胃、大肠   | 润肺化痰，滑肠通便           |
|    | 炒瓜蒌子 | 葫芦科  | 干燥成熟种子    | 秋         | 甘、寒      | 肺、胃、大肠   | 润肺化痰，滑肠通便           |
|    | 甜瓜子  | 葫芦科  | 干燥成熟种子    | 夏、秋       | 甘、寒      | 肺、胃、大肠   | 清肺，润肠，化痰，排脓，疗伤止痛    |
|    | 桑叶   | 桑科   | 干燥叶       | 初霜后       | 甘、苦、寒    | 肺、肝      | 疏散风热，清肺润燥，清肝明目      |
|    | 桑椹   | 桑科   | 干燥果穗      | 4~6 月     | 甘、酸、寒    | 心、肝、肾    | 滋阴补血，生津润燥           |
|    | 决明子  | 豆科   | 干燥成熟种子    | 秋季        | 甘、苦、咸、微寒 | 肝、大肠     | 清热明目，润肠通便           |
|    | 明党参  | 伞形科  | 干燥根       | 4~5 月     | 甘、微苦、微寒  | 肺、脾、肝    | 润肺化痰，养阴和胃，平肝，解毒     |
|    | 胖大海  | 梧桐科  | 干燥成熟种子    |           | 甘、寒      | 肺、大肠     | 清热润肺，利咽开音，滑肠通便      |
| 平润 | 阿胶   | 马科   | 干燥皮/鲜皮    | /         | 甘、平      | 肺、肝、肾    | 补血滋阴，润燥，止血          |



续表 5

| 类别 | 中药  | 科    | 入药成分 / 入药部位 | 采收时间     | 性味       | 归经      | 功能                     |
|----|-----|------|-------------|----------|----------|---------|------------------------|
|    | 哈蟆油 | 蛙科   | 输卵管         | /        | 甘、咸、平    | 肺、肾     | 补肾益精，养阴润肺              |
|    | 蜂蜜  | 蜜蜂科  | 蜜           | 春、秋      | 甘、平      | 肺、脾、大肠  | 补中，润燥，止痛，解毒外用：<br>生肌敛疮 |
| 温润 | 黄精  | 百合科  | 干燥根茎        | 春、秋      | 甘、平      | 脾、肺、肾   | 补气养阴，健脾，润肺，益肾          |
|    | 太子参 | 石竹科  | 干燥块根        | 夏        | 甘、微苦，平   | 肺、脾     | 益气健脾，生津润肺              |
|    | 龙胆叶 | 大戟科  | 干燥叶         | 夏、秋      | 甘、淡、平    | 肺、胃     | 润肺止咳，通便                |
|    | 火麻仁 | 桑科   | 干燥成熟果实      | 秋        | 甘、平      | 脾、胃、大肠  | 润肠通便                   |
|    | 亚麻籽 | 亚麻科  | 干燥成熟种子      | 秋        | 甘、平      | 肺、肝、大肠  | 润燥通便，养血祛风              |
|    | 黑芝麻 | 胡麻科  | 干燥成熟种子      | 秋        | 甘、平      | 肝、肾、大肠  | 补肝肾，益精血，润肠燥            |
|    | 郁李仁 | 蔷薇科  | 干燥成熟种子      | 夏、秋      | 辛、苦、甘、平  | 脾、大肠、小肠 | 润肠通便，下气利水              |
|    | 桃仁  | 蔷薇科  | 干燥成熟种子      | 果实成熟后    | 苦、甘、平    | 心、肝、大肠  | 活血祛瘀，润肠通便，止咳平喘         |
|    | 榧子  | 红豆杉科 | 干燥成熟种子      | 秋        | 甘、平      | 肺、胃、大肠  | 杀虫消积，润肺止咳，润燥通便         |
|    | 柏子仁 | 柏科   | 干燥成熟种仁      | 秋、冬      | 甘、平      | 心、肾、大肠  | 养心安神，润肠通便              |
|    | 百部  | 百部科  | 干燥块根        | 春、秋      | 甘、苦、微温   | 肺       | 润肺下气止咳，杀虫灭虱            |
|    | 当归  | 伞形科  | 干燥根         | 秋末       | 甘、辛、温    | 肝、心、脾   | 补血活血，调经止痛，润肠通便         |
|    | 肉苁蓉 | 列当科  | 干燥带鳞叶的肉质茎   | 春、秋      | 甘、咸、温    | 肾、大肠    | 补肾阳，益精血，润肠通便           |
|    | 何首乌 | 蓼科   | 干燥块根        | 秋、冬      | 苦、甘、涩、微温 | 肝、心、肾   | 解毒，消痈，截疟，润肠通便          |
|    | 苦杏仁 | 蔷薇科  | 干燥成熟种子      | 夏        | 苦，微温。有小毒 | 肺，大肠    | 降气止咳平喘，润肠通便            |
|    | 核桃仁 | 胡桃科  | 干燥成熟种子      | 秋        | 甘、温      | 肾、肺、大肠  | 补肾，温肺，润肠               |
|    | 款冬花 | 菊科   | 干燥花蕾        | 12 月或地冻前 | 辛、微苦、温   | 肺       | 润肺下气，止咳化痰              |
|    | 紫苏子 | 唇形科  | 干燥成熟果实      | 秋        | 辛、温      | 肺       | 降气化痰，止咳平喘，润肠通便         |
|    | 紫菀  | 菊科   | 干燥根和根茎      | 春、秋      | 辛、苦、温    | 肺       | 润肺下气，消痰止咳              |
| 辛润 | 锁阳  | 锁阳科  | 干燥肉质茎       | 春        | 甘、温      | 肝、肾、大肠  | 补肾阳，益精血，润肠通便           |
|    | 当归  | 伞形科  | 干燥根         | 秋末       | 甘、辛、温    | 肝、心、脾   | 补血活血，调经止痛，润肠通便         |
|    | 郁李仁 | 蔷薇科  | 干燥成熟种子      | 夏、秋      | 辛、苦、甘、平  | 脾、大肠、小肠 | 润肠通便，下气利水              |
|    | 紫菀  | 菊科   | 干燥根和根茎      | 春、秋      | 辛、苦、温    | 肺       | 润肺下气，消痰止咳              |
|    | 款冬花 | 菊科   | 干燥花蕾        | 12 月或地冻前 | 辛、微苦、温   | 肺       | 润肺下气，止咳化痰              |
| 凉润 | 紫苏子 | 唇形科  | 干燥成熟果实      | 秋季       | 辛、温      | 肺       | 降气化痰，止咳平喘，润肠通便         |
|    | 罗汉果 | 葫芦科  | 干燥果实        | 秋        | 甘、凉      | 肺、大肠    | 清热润肺，利咽开音，滑肠通便         |
|    | 蓝布正 | 蔷薇科  | 干燥全草        | 夏、秋      | 甘、微苦、凉   | 肝、脾、肺   | 益气健脾，补血养阴，润肺化痰         |

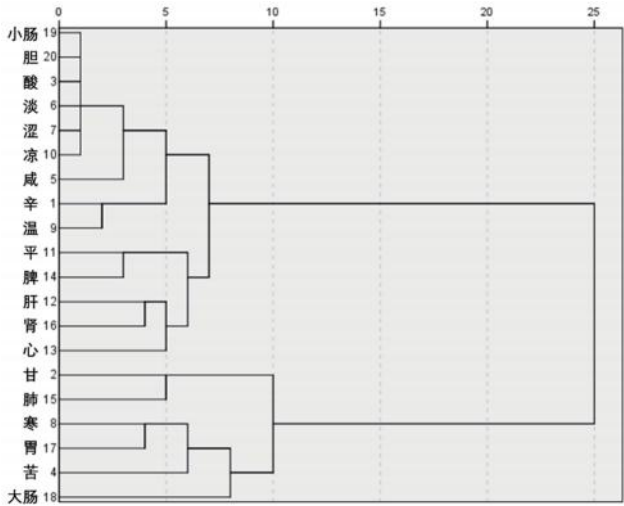


图 4 润性中药系统聚类分析结果

4.2 采用系统聚类分析进行分类

将润性中药的性味归经进行拆分，并将微寒、微温、微苦统一处理为寒、温、苦。使用 SPSS 21.0 统计软件对润性中药的性味归经进行系统聚类分析，采用 Ward 法聚类分析方法分析，树状图显示润性中药的性味归经可聚 2 类、3 类或 4 类，

经过比较综合分析聚 4 类较适宜。第 1 类为：酸、涩、淡、咸，凉，归小肠、胆经；第 2 类为：辛，温；第 3 类为平，归心、肝、肾、脾经；第 4 类为甘、苦，寒，归肺、胃、大肠经。其中第 1 类对应“4.1”项下的凉润中药，第 2 类对应“4.1”项下的辛润与温润中药，第 3 类对应“4.1”项下的平润中药，第 4 类对应“4.1”项下的寒润中药，聚类分析结果与性能分类结果一致。

5 结语

药物本身有寒、热、温、凉之别，作用趋势有升、降、浮、沉之殊，药物性能有刚柔、润燥、敛散、开阖、动静之异<sup>[30]</sup>。其中中药的润性对于燥证、热证、结病等的诊治具有重要意义，但是一直以来中药润性的理论较为分散且不够系统，因此对中药润性理论内涵的探讨可为临床遣方组药提供依据与参考。中药润性研究的第一要义是润性的确定依据，诸多历代医著以药物的性、味作为润性能的依据，如《医学读书记》云“甘润生阴”，《本草备要》云“咸濡润”，一般来说，甘咸或寒凉的药，其性多润。其次是运用法象思维根

据药材质地的柔润、有无汁油、枯燥等性状，确定中药的润性，一般体质柔软、多汁多油者润。此外，中药润燥性能的确定，还须以中医辨证理论为指导，以功用为依据。秦艽和防风均被称为“风药中之润剂”，秦艽为龙胆科植物秦艽、麻花秦艽、粗茎秦艽或小秦艽的干燥根，辛、苦、平，归胃、肝、胆经；防风为伞形科植物防风的干燥根，辛、甘、微温，归膀胱、肝、脾经。两者同为风药之润剂，皆入肝经，但是性能、功效不尽相同，秦艽能外行祛风湿而不伤阴，内达下焦导湿热，风去而润，湿除则补<sup>[31]</sup>；《本草汇言》云：“防风辛温轻散，润泽不燥”，虽偏温而性缓，无助热之虞，能够发散风邪的同时顾护津液<sup>[32]</sup>。由此看来，中药润性的依据不局限于性能、性状，与功能、临床辨证亦有密切联系。

本文围绕中药润性的确定依据、分类，通过检索归纳总结文献及 2020 年版《中国药典》中润药的特点，初步从理论上阐释了中药润性概念。本文尚存在诸多不足之处，未对《中华本草》或《中药大辞典》等收载中药较多的典籍进行深入挖掘，后续工作中应纳入更多的润药对润性与性能、物质基础等进行相关性分析，为中药润性的研究提供依据与参考。

## 参考文献

- [1] 钟赣生, 杨柏灿. 中药学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2021.
- [2] 刘庆林. 中药润燥性能浅探[J]. 国医论坛, 2006, 21(6): 18.
- [3] 杨敏, 陈勇, 张廷模. 中药润燥性能本草考[J]. 成都中医药大学学报, 2011, 34(3): 91-93.
- [4] 王晓梅. 中医学“燥”的理论研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2017.
- [5] 翟胜利. 神奇的中药“形”“质”与人体的密切关联[J]. 首都医药, 2006, 2(3): 39-44.
- [6] 战瑞雪. 基于三维荧光光谱的中药的荧光成分分析及寒热药性模式识别研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2022.
- [7] 林林, 李丽, 赵鹏程, 等. 中药四性研究进展及方法回顾[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(15): 267-272.
- [8] 杨文国, 朱学敏, 吴凤烨, 等. 基于逐步判别法分析辛味中药挥发油“四气”药性、透皮促渗能力和化学成分的相关因素[J]. 中草药, 2019, 50(17): 4219-4224.
- [9] 秦灵鸽, 汤朝晖, 黄勤挽, 等. 基于糖与甘味的关系分析糖在中医领域的功效与应用[J]. 中医药临床杂志, 2024, 36(1): 10-14.
- [10] 杨旭杰, 裴晓华, 董尚朴. 赵炳南论治湿热毒蕴型皮肤病组方高频中药之文献诠释[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(12): 5548-5552.
- [11] 张颖龄, 张广德. 魏子孝善用药对治病经验探析[J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25(4): 115-117.
- [12] 聂君, 周凤, 王昊, 等. 徐基平教授清燥救肺汤加味治疗气阴两虚型肺癌经验[J]. 中国中医药现代远程教育, 2024, 22(11): 56-58, 109.
- [13] 李小龙, 胡齐鸣. 胡齐鸣运用中医药治疗良性甲状腺结节的临床经验[J]. 江西中医药大学学报, 2021, 33(2): 18-20.
- [14] 许徐秀生, 叶丽芳. 温通法论治 2 型糖尿病研究初探[J]. 基层中医药, 2024, 3(5): 69-73.
- [15] 华新振, 刘丛颖, 贺梦媛, 等. 细辛化学成分和药理作用研究进展及其质量标志物(Q-Marker)预测分析[J]. 中草药, 2023, 54(12): 4019-4035.
- [16] 江晓灵, 胡炜圣, 周莹洁, 等. 基于“取象比类”探讨花药在酒渣鼻治疗中的应用[J]. 亚太传统医药, 2023, 19(9): 209-212.
- [17] 郝永龙, 陈美荣, 安然, 等. 基于法象思维分析植物类中药不同部位与药效的关系[J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(1): 398-401.
- [18] 陈媛媛, 潘慧婕, 曾臣红, 等. 三七花总皂苷水凝胶促进大鼠急性皮肤创伤愈合作用研究[J]. 上海中医药杂志, 2016, 50(9): 72-76, 84.
- [19] 曾贝贝, 吕静, 鲁杏茹, 等. 牡丹花酶解肽的理化性质及促进皮肤健康功效[J]. 食品工业科技, 2024, 45(22): 314-321.
- [20] 田雅娟, 李钦青, 杜娟, 等. 人参花软膏对小鼠皮肤光老化的修复作用及其机制研究[J]. 中药药理与临床, 2019, 35(2): 84-88.
- [21] 王怡然, 刘学, 张伟. 从风邪论治过敏性支气管哮喘[J]. 山东中医药大学学报, 2024, 48(2): 161-165.
- [22] 贺方良, 程显隆, 李明华, 等. 基于颜色数字化结合熵权法分析防风色度值与内在成分的相关性[J]. 中药材, 2024, 47(3): 638-646.
- [23] 潘颖宜. 中医临床专业饮片识别课教学效果的探索[J]. 中医教育, 2010, 29(4): 25-27.
- [24] 李彩霞, 余喻先, 宫欢欢, 等. 《中药大辞典》中可鲜用中药特点及应用分析[J]. 中成药, 2023, 45(10): 3498-3502.
- [25] 柳阳, 许二平. 张锡纯临床运用鲜药探析[J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(3): 1301-1304.
- [26] 汪绂. 医林纂要探源[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2015.
- [27] 刘晨欣, 李志云, 崔希鹏, 等. 吴门医派胃阴学说在中风便秘中的运用[J]. 中医药导报, 2023, 29(8): 209-211, 224.
- [28] 袁军. 浅论中药药性之气味厚薄和刚柔润燥[J]. 光明中医, 2010, 25(12): 2326-2327.
- [29] 万金圣. 叶天士辛润通络法应用规律研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2024.
- [30] 陈慧娟, 陈丽云, 严世芸. 略论“中和”思想对中医治疗观的影响[J]. 中医杂志, 2015, 56(23): 2067-2068, 2070.
- [31] 朱冷霏, 赵鲁卿, 张晨晨, 等. 张声生教授运用风药治疗脾胃病经验[J]. 世界中医药, 2023, 18(21): 3094-3097.
- [32] 段佩瑶, 韩捷. 基于“药-证-病”辨证体系探讨运用风药治疗溃疡性结肠炎[J]. 环球中医药, 2024, 17(8): 1615-1619.

(收稿日期: 2024-10-14; 修回日期: 2024-11-26)

## 借鉴美英两国的经验完善我国不同类型 药学专业人才培养体系

熊堉<sup>1, 5</sup>, 杜奋旗<sup>2</sup>, 宁红<sup>1</sup>, 边原<sup>3, 4\*</sup> (1.电子科技大学医学院附属绵阳医院·绵阳市中心医院药学部, 四川 绵阳 621000; 2.盖伊&圣托马斯NHS信托基金会皇家布朗普顿医院, 英国 伦敦; 3.四川省医学科学院·四川省人民医院药学部, 成都 610072; 4.电子科技大学医学院个体化药物治疗四川省重点实验室, 成都 610072; 5.国家卫生健康委核技术医学转化重点实验室, 四川 绵阳 621000)

**摘要:** 随着国家层面将药学服务纳入医疗服务技术规范并实现药学服务项目收费, 药学服务转型发展迎来新的引擎。新时代背景下, 健全我国药学专业人才培养体系, 输送更多高质量复合型药学专业人是面向药学服务转型的关键一招。基于此, 本文借鉴美英两国在专业型/应用型药学博士和药学硕士方面成熟的培养体系, 结合中国的实际情况, 以期为我国药学专业人才培养提供参考和借鉴。

**关键词:** 美国; 英国; 药学博士; 药学硕士; 药学专业人才; 培养体系

**中图分类号:** R95

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-2981(2025)08-2457-07

**doi:**10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.048

## Improve the training system of different types of pharmacy professionals in China by learning from the experience of the United States and the United Kingdom

XIONG Yu<sup>1, 5</sup>, DU Fen-qi<sup>2</sup>, NING Hong<sup>1</sup>, BIAN Yuan<sup>3, 4\*</sup> (1. Department of Pharmacy, Mianyang Central Hospital, School of Medicine of University, Electronic Science and Technology of China, Mianyang Sichuan 621000; 2. Guy's and St Thomas' NHS Foundation Trust Royal Brompton Hospital, London United Kingdom; 3. Department of Pharmacy, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan People's Hospital, Chengdu 610072; 4. Key Laboratory of Individualized Drug Therapy, School of Medicine, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610072; 5. NHC Key Laboratory of Nuclear Surgery Medical Transformation, Mianyang Sichuan 621000)

**Abstract:** With the inclusion of pharmacy services into the technical specifications of medical services at the national level and pharmacy service charges, the transformation and development of pharmacy services ushered in a new engine. In the new era, the key to transformation of pharmacy services lies in improving the training of pharmacy talents and delivering more high-quality compound pharmacy professionals. This paper drew on the mature cultivation system of professional/applied doctor of pharmacy (PharmD) and master of pharmacy (MPharm) in the United States and the United Kingdom, and combined the current situation in China, to provide reference for the cultivation of Chinese pharmacy professionals.

**Key words:** the United States; the United Kingdom; doctor of pharmacy; master of pharmacy; pharmacy professionals; training system

**基金项目:** 2024 年电子科技大学医学院教育教学改革项目 (No.2024092906); 绵阳市中心医院孵化课题 (No.202FH013)。

**作者简介:** 熊堉, 女, 主管药师, 主要从事临床药学方面的研究, email: xiongyu9508@163.com \*通信作者: 边原, 男, 主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事临床药学方面的研究, email: 85778860@qq.com



2023 年 9 月,国家卫生健康委、国家中医药局、国家疾控局三部门联合印发《关于印发全国医疗服务项目技术规范(2023 年版)的通知》,于国家层面首次纳入药师门诊诊察等药学服务收费项目。随着政策的出台,药师将充分发挥自身的专业技术价值,药学服务转型发展也将迎来新的引擎。但是,广大药师如何抓住时代机遇,充分展示药学人员的技术价值是未来药学发展的重要工作之一。根据魏春燕等<sup>[1]</sup>针对四川省各级医疗机构药师进行的调研,90% 以上的药师表达了对药学专业知识、临床专业知识等的需求,说明药师现行胜任力水平与岗位需求存在一定差距,现有的培养体系需要根据实际需求进行改进。目前,药学专业硕士培养已经相对成熟,但是学生毕业后无法直接进行药学服务工作,需进行大约 1 年的药师规范化培训。面对学科快速发展和转型需要,尽快完善和明晰我国药学人才培养体系,是实现药学高质量发展的关键。美国作为专业型/应用型药学博士(doctor of pharmacy, PharmD)的起源地,从提出到发展完善经历了 60 年左右的时间,如今针对应用型药学专业博士已经形成了成熟的培养模式。英国也较早完成了药剂师的转型培养,形成了 5~6 年基于药学硕士(master of pharmacy, MPharm)的药剂师培养路线。基于此,本文借鉴美英两国的培养模式和课程设置,结合我国哲学博士(doctor of philosophy, PhD)成熟的培养经验,探索在我国形成清晰的 PharmD、PhD、MPharm 的药学人才培养体系,以期为我国药学事业的高质量发展提供参考。

## 1 美国 PharmD 培养模式

### 1.1 PharmD 培养途径概述

美国药剂师培养主要有两种途径:一种是通过传统的本科教育,获得 4 年的学士学位之后,申请 PharmD 项目,部分药学院要求申请人必须通过药学院入学考试(pharmacy college admission test, PCAT);另一种是从高中直接入学,进行 6~7 年制的 PharmD 培养,前 2~3 年进行药学预科(Pre-pharmacy)学习,后 4 年进行 PharmD 课程学习(professional years 1~4, PY1~PY4)。在美国教育体系中,除了以上两种经典模式,还有其他自由的组合培养模式,都可以让学生获得 PharmD 学位<sup>[2]</sup>。获得 PharmD 学位后,还需要接受住院医师培训(pharmacy residency program),主要分为两个阶段:研究生培训第 1 年(postgraduate year one, PGY1)和研究生培训第 2 年(postgraduate year two,

PGY2)。因此,在美国成为一名合格的药剂师,一般需要 7~8 年的时间,9~10 年时间也是常态,从美国药学生职业发展规划图(见图 1)可以看出<sup>[3]</sup>,在美国医疗机构从事药剂师职业,需要经过系统的学习,执业资格考试认证,毕业后教育等一系列学习和培训,还要保持终身学习的习惯。

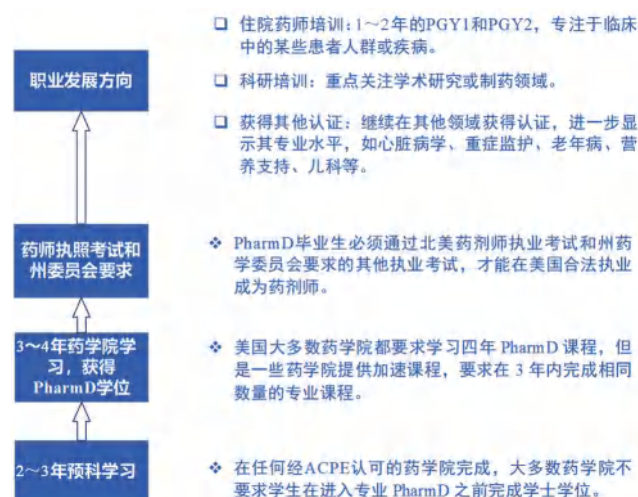


图 1 药学生职业发展规划图

Fig 1 Career development chart for pharmacy students

### 1.2 美国各阶段 PharmD 教育

**1.2.1 高中阶段开始的 Pre-pharmacy 教育** 如果从高中阶段申请 PharmD,需要学习具有一定难度的生物、化学和统计学课程,另外需要学生拥有良好的书面表达和口头交流的能力,具体录取要求可查询药学院官网,一些药学院鼓励或要求申请人在药房或与健康相关的机构(医院、养老院等)有志愿者或工作的相关经历<sup>[4-5]</sup>。Pre-pharmacy 学习并不是一个特定的项目或者专业,它只是对所需学习课程的一个积累。在这期间,你可以是 Pre-pharmacy 学生,也可以是其他任何专业的学生。申请 PharmD 项目唯一的限制因素就是学习科学类课程的数量。因此,许多人会选择科学专业进行学习。尽管不同的学院对课程的要求不一样,但是各药学院也遵循一定的标准制订课程。根据《AACCP 预科课程摘要》,Pre-pharmacy 阶段要求学习的课程包含解剖学、生理学、生物化学、生物学、沟通交流课程、人文学科、微生物学、物理学、心理学、数学、社会科学、统计学等<sup>[6]</sup>。所有申请 PharmD 项目的学生(包括预科生和本科毕业生)均需学习上述相关课程。本科专业的学生如果在两年学习之后,也完成了必需课程的学习,同样可以申请 4 年的 PharmD 项目学习。Pre-pharmacy 学生两年后想要顺利申请 PharmD 需要达到课程平均绩点(grade point average, GPA)要求,并且有些药学院也会

要求通过 PCAT<sup>[4-5]</sup>，具体通过要求各学院略有不同<sup>[7]</sup>。预科完成后，学生也可以自主申请其他的药学院进行 PharmD 专业的学习。

**1.2.2 本科毕业开始的 PharmD 教育** 任何通过 Pre-pharmacy 相关课程的学生都可以申请 4 年的 PharmD 教育，包括已经获得学士学位的本科生<sup>[4]</sup>。一项 AACP 课程变化峰会报告指出，针对 PharmD 的前期课程要求进行调研，发现 85% 的 PharmD 课程都要求有普通生物学、细胞或分子生物学、无机和有机化学、微积分、英语写作等相关知识<sup>[8]</sup>，因此拥有生物学、化学等相关专业背景的学生可能更受欢迎。

**1.2.3 四年制的 PharmD 教育** 根据药剂学教育认证委员会（Accreditation Council for Pharmacy Education, ACPE）颁布的《药学博士专业课程的认证标准和关键要素》[简称“标准 2016”（STANDARDS 2016）]<sup>[9]</sup>规定，PharmD 课程包括传统教学和实践型教学，课程类别主要有以下三类：跨专业教育（interprofessional education, IPE）、高级药学实践前教育（pre-advanced pharmacy practice experience, Pre-APPE）以及高级药学实践教育（advanced pharmacy practice experience, APPE）。

① IPE：2010 年，世界卫生组织（World Health Organization, WHO）将 IPE 定义为发生在两个或两个以上的专业相互了解、相互学习和相互合作，以便进行有效合作和改善健康结局<sup>[10]</sup>。IPE 的目标是

让学生学习如何在跨专业（interprofessional, IP）团队中发挥作用，并将学到的知识、技能和价值观带入未来的实践，作为合作团队的一部分，提供以 IP 患者为中心的护理，并专注于改善患者的治疗结局。IP 团队由具有专业知识、技能、能力的不同医疗专业人员（包括但不限于药剂师、医师、护理人员、营养师等）组成。主要教育形式是与医师、其他专业医疗团队成员一起进行体验式教育，包括与 IP 团队、患者的面对面互动等<sup>[9]</sup>。该部分课程可以在理论教学和 IPPE 部分中引入、加强和实践，并在 APPE 部分展示出这种能力。

② Pre-APPE 教育：该部分的课程主要分为两个部分：理论教育和初级药学实践（introductory pharmacy practice experience, IPPE），为期 3 年。Pre-APPE 课程要求在生物医学、药学、社会学/管理学/行为学和临床科学等学科打下严格的基础，结合 IPPE 阶段的学习内容，培养学生养成自主终身学习的习惯，为后面 APPE 的学习和实践打下坚实的基础。针对理论课程部分，“STANDARDS 2016”给出了 PharmD 理论课程教育必须涵盖的内容（见表 1）<sup>[9]</sup>，各学校据此制订理论课程，确保设计的课程包含了相关学习领域。IPPE 阶段向学生展示了当代美国常见的实践模式，包括探讨患者治疗决策、职业道德以及直接照顾患者的医疗实践。IPPE 的课程安排旨在让学生在开始 APPE 之前清楚地了解美国经典的药学实践主要包含哪些内容。

表 1 PharmD 理论课程涵盖的学科  
Tab 1 Disciplines in the PharmD program

| 科学领域        | 涵盖学科                                                                           |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| 生物医学        | 生物化学、生物统计、人体解剖学、人体机能学、免疫学、医学微生物学、病理学/病理生理学                                     |
| 药学          | 临床化学、即用复方学、药物化学、药物计算、药剂学/生物药剂学、药物基因组学和遗传学、药物（代谢）动力学、药理学、毒理学                    |
| 社会学/管理学/行为学 | 文化意识、伦理学、卫生保健系统、药学发展史、药物经济学、药物流行病学、药法律法规事务、实践管理、专业沟通、专业发展/社会和行为方面的实践、研究设计      |
| 临床科学        | 临床药物代谢动力学、健康信息学、健康信息检索与评估、药物分配分发和管理、天然产品和替代补充疗法、患者评估、患者安全、药物治疗学、公共卫生学、自我护理药物治疗 |

根据“STANDARDS 2016”的标准，IPPE 阶段的实践时长不少于 300 h，并且需要与课程进行整合，其中，至少 150 h 需要在社区和机构卫生系统进行药学实践。模拟实践部分至多 60 h，且不能计入 150 h 的社区和机构卫生系统实践，与模拟实践相关的教学指导也不能计入 300 h IPPE 的学时要求。管理保健药学会（Academy of Managed Care Pharmacy, AMCP），一个由 ACPE 认可的药学教育平台，发布了 IPPE 的实践大纲，列出了基

于学期的 IPPE 教学计划，见表 2<sup>[11]</sup>。

③ APPE 教育：APPE 教育是在成功完成所有 IPPE 和理论课程之后进行的，为期 1 年。它整合、应用、加强和提升了在 Pre-APPE 的课程和实践中所学的知识和技能。APPE 强调临床诊疗实践的连续性，并在门诊（社区/医院门诊服务）和住院（医院/卫生系统）实践中进行急性、慢性和提升健康的患者诊疗服务。该部分的实践时长要求不少于 36 周（1440 h），其中，在每一



表 2 IPPE 轮转安排表 (1 学期)

Tab 2 IPPE rotation schedule (one semester)

| 时间安排         | 任 务                                                          |
|--------------|--------------------------------------------------------------|
| 第 1 ~ 3 周    | 第 1 周: 简介和概述, 全程化患者管理预讲, 观察药房呼叫中心                            |
| 概述           | 第 2 周: 主题讨论 (全程化患者管理介绍), 安排 AMCP 任务, 观摩相关技术人员 (服务范围面覆盖和质量保证) |
|              | 第 3 周: 观摩药剂师, 主题讨论 (分配阅读材料), 布置学期末的最终报告任务                    |
| 第 4 ~ 6 周    | 第 4 周: 专题讨论 (药学与治疗学委员会和处方集), 观摩药剂师, 分配新药评审汇报, 项目计划和时间管理      |
| 核心课程: 药学与治疗学 | 第 5 周: 参加药学与治疗学委员会会议                                         |
| 委员会 / 处方集    | 第 6 周: 新药评审报告, 药物治疗管理的主题讨论, 观摩药房管理者, 中期汇报                    |
| 第 7 ~ 9 周    | 第 7 周: 主题讨论 (分配的阅读任务), 药物治疗管理中心参观, 项目计划和时间管理                 |
| 核心课程: 药物治疗管理 | 第 8 周: 学习患者病历和 SOAP 记录; 主题讨论 (分配的阅读任务)                       |
|              | 第 9 周: 病例回顾报告, 项目计划和时间管理                                     |
| 第 10 ~ 12 周  | 第 10 周: 参加药品质量保证委员会会议, 主题讨论 (分配的阅读任务), 分配相关疾病汇报              |
| 核心课程: 药品质量项目 | 第 11 周: 患者咨询时间, 项目计划和时间管理                                    |
|              | 第 12 周: 汇报相关疾病, 项目计划和时间管理                                    |
| 第 13 ~ 15 周  | 第 13 周: 最终的项目报告呈现                                            |
| 项目汇报         | 第 14 ~ 15 周: 实践活动项目核对和最终评估                                   |

个 APEE 要求的模块中的实践时长不少于 160 h, 大部分的 APEE 实践都是进行直接的患者照护<sup>[9]</sup>。APEE 实践设置包含必修和选修实践环节。必修环节包括以下四个实践场所<sup>[9]</sup>: ① 社区药房; ② 门诊患者护理; ③ 医院/卫生系统药房; ④ 普通内科住院患者护理。选修 APPE 主要有以下几个目的: ① 在专业上更加成熟; ② 拓宽实践的广度和深度; ③ 在各个实践领域进行深入探索。

**1.2.4 药学生毕业后教育** 为了满足药学生的执业需求,在获得 PharmD 学位之后,还需要通过住院药师实习来获得实践经验和进一步教育,即 PGY1 和 PGY2,分别为期 1 年。PGY1 是一系列有组织、有指导、经过美国卫生系统药剂师协会 (American Society of Health-System Pharmacists, ASHP) 认证的课程,建立在学习 PharmD 课程所获得的技能、知识和能力的基础上,根据 ASHP 制订的住院药师规范化培训指导标准,PGY1 主要分为以下三种类型:临床药师培训 (PGY1 pharmacy),社区药师培训 (PGY1 community-based pharmacy) 和综合医疗管理药师培训 (PGY1 managed care pharmacy) [12]。PGY2 也是一系列有组织、有指导、经过 ASHP 认证的过程,建立在 PGY1 基础上,帮助药学生探索感兴趣的特定专业领域,包括药学门诊照护培训,心脏病药学监护培训,临床药物基因组学,重症药理学护理,急诊医学,老年药学,卫生系统药房管理和领导,感染疾病药学,信息学,内科药学,药物研究与调查,药物使用安全与政策,神经药学,肿瘤药学,疼痛管理和姑息治疗,儿科药学,两年药物治疗学

培训 (PGY1 和 PGY2), 药物治疗学 (PGY2), 人口健康管理和数据分析, 精神药学, 实体器官移植药学<sup>[13]</sup>。PGY2 涉及的专业面非常广, 为社会培养了各个方面的药学人才。另外, 需要说明的是, PGY1 和 PGY2 并非获得药师执业资格的必要条件, 但是毕业后开始住院药师规范化培训不仅能帮助药学生很好地从药学生过渡到医疗从业者, 还能提升就业竞争力<sup>[14]</sup>。而且, 住院药 (医) 师培训已经逐渐成为卫生系统从业的必需条件之一。

### 1.3 执业认证

在美国获得执业资格，必须通过两门考试：北美药剂师执照考试（North American Pharmacist Licensure Examination, NAPLEX）和各州药理学考试（Multistate Pharmacy Jurisprudence Examination, MPJE）。NAPLEX 旨在测试作为药剂师为患者作出安全选择的能力<sup>[15]</sup>，而 MPJE 是联邦和各州药理学法律的测试。此外，一些州对执业药剂师还有进一步的要求。获得学位证书后的毕业生即可报名参加考试<sup>[16]</sup>。

#### 1.4 美国 PharmD 管理机构

ACPE 作为一个被美国教育委员会（American Council on Education, ACE）认可的国家级机构，负责认证 PharmD 学位和药学继续教育。自 2011 年起，ACPE 也承担了国际 PharmD 学位的认证和评估。并且，自 2014 年起，与 ASHP 合作，开始对药学技术人员（毕业后）教育和培训项目进行认证。ACPE 的任务是确保和提高药学教育的质量。所有可以培养 PharmD 学生的培养机构都必须经过 ACPE 认证。ACPE 是一个自治和独立的机构，



其董事会由美国药学院协会 (American Association of Colleges of Pharmacy, AACP)、美国药剂师协会 (American Pharmacists Association, APhA) 和全国药学会委员会协会 (National Association of Boards of Pharmacy, NABP) 各三名成员, 以及 ACE 一名成员担任<sup>[9]</sup>。因此, 在 ACPE 的不断探索和改进下, 美国 PharmD 教育体系越来越完善。

## 2 英国 MPharm 培养模式

在博洛尼亚进程, 即欧洲高等教育改革计划的催化下, 前身为英国药师协会 (British Pharmaceutical Society) 的英国药政总局 (General Pharmaceutical Council, GPhC) 自 1924 年起首次批准三年制药学学士学位 (bachelor of pharmacy, BPharm) 作为英国注册药师执业资格的高等教育课程后, 于 1997 年正式将其废止<sup>[17-18]</sup>, 转而采用四年制的 MPharm 作为新的准入标准。自此, MPharm 成了英国药剂师职业的必需学位<sup>[19]</sup>。与美国的 PharmD 课程相较, MPharm 允许高中毕业生直接申请。作为硕士学位教育, 其标准学制为四年全日制授课课程。然而, 近年来课程设计持续革新, 众多大学还增设了包含衔接预科或临床实践的五年制 MPharm 选项。

完成 4~5 年的学习并获得 MPharm 学位后, 学生尚不能直接执业, 还需在 GPhC 认证的医疗机构, 如英国国家医疗服务体系 (National Health Service, NHS) 的医院、私立医院、全科诊所、社区药房或医药工业领域, 进行为期 1 年的临床实践, 即预注册实习培训 (pre-registration training, Pre-reg)。但 Pre-reg 实习机会并非轻易可得, 成为英国注册药剂师需历经严格筛选<sup>[20]</sup>。在 MPharm 学习期间, 学生需参加由英国国家卫生服务局教育处 (Health Education England, part of the NHS) 与 NHS 联合组织的规培药师资格选拔考试 (<https://www.oriel.nhs.uk/web/>), 通过全国统一的选拔考试, 并依据成绩及排名填报志愿, 以争取实习机会<sup>[19-20]</sup>。Pre-reg 实习项目的具体位置和医疗机构的性质对未来职业发展方向有着重大影响, 因此学生需综合考虑过往学习经历、兴趣方向、考试成绩、排名及实习课程设计等因素来作出选择。

在为期 1 年的 Pre-reg 期间, 实习药师需在导师指导下, 以药师助理的身份参与临床工作, 并在第 13、26、39、52 周分别完成四次定期考核。同时, 需根据实习医疗机构的规范化培训标准提交电子学习档案, 记录培训期间的学习心得。只

有圆满完成所有既定考核要求的实习药师, 方有资格参加 GPhC 组织的药剂师执业注册考试<sup>[21]</sup>。

## 3 中国临床药学培养模式

相比之下, 我国临床药学起步较晚, 1987 年, 国家教委批准试办临床药学专业, 1989 年, 原华西医科大学药学院 (现四川大学华西药学院) 首次招收了临床药学五年制本科生<sup>[22]</sup>, 然而 1998 年又由于专业调整取消了临床药学专业, 直到 2006 年, 教育部才恢复临床药学专业设置<sup>[23]</sup>。因此, 我国临床药学发展比美国大约晚了半个世纪。

早在 2011 年, 李焕德教授就临床药学研究与学科发展等问题提出了自己的观点<sup>[24]</sup>, 对临床药学科定位和发展提出了非常深刻的认识, 临床药学需要以科学研究促学科发展, 把握最新发展方向不断寻找新的切入点, 同时, 需要从学科交叉中寻找研究课题。经过二十多年的发展, 药学本科-科学学位药学硕士-科学学位药学博士贯通一体的临床药学 PhD 培养体系已经较为成熟。此外, 我国自 2010 年 1 月设置了 MPharm 专业学位, 其培养目标是面向药物技术转化、生产、流通、使用、监管等职业领域, 培养具备良好的政治思想素质和职业道德素养, 较好掌握药学及相关学科专业知识, 具有较强的技术创新能力和解决问题能力的高层次、应用型药学专业人才。由于 MPharm 的培养体系侧重应用, 不同的培养单位构建了不同的特色多样的课程体系和培养方案, 但针对面向医院的药学专业人才缺乏国家层面的统一的考核标准, MPharm 学生到医院之后仍然无法胜任临床药学等药学服务工作。

基于此, 我国继续探索 PharmD 的培养模式, 北京大学自 2017 年开设了从本科毕业开始的五年制 PharmD 教育和从硕士毕业开始的三年制 PharmD 培养体系<sup>[25]</sup>。北京协和医学院也于 2020 年迎来了首位 PharmD 专业的毕业生<sup>[26]</sup>。2024 年 10 月四川大学华西药学院也获批 PharmD 学位授权点, 成为全国首批自主审核设立的 PharmD 专业学位授权点建设单位<sup>[27]</sup>。根据北京大学的办学理念, PharmD 专业学位培养不仅注重理论与实践的结合, 还强调科研与临床需求的紧密结合, 培养出的学生具备扎实的药学基础理论知识、系统的临床药学实践技能以及较强的科研与创新能力。在这一体系下培养出的 PharmD 毕业生陆续进入就业岗位, 培养成效如何有待进一步验证。

因此, 针对药学人才的培养体系, 我国已经初步形成了与国际接轨的 PhD、PharmD、MPharm

的培养模式,但是,笔者认为针对不同的学位其培养的侧重点应该进行明确。例如,在 Mercer University 明确规定了药学学生的职业规划和学位选择: PharmD 是一个专业的博士学位,为培养有执照的药剂师做准备,药剂师是医疗团队中的药物专家,确保患者获得正确剂量的正确药物,PharmD 毕业生大多在零售药店、医院和其他面向患者的场景中从事一线工作; MPharm 是一个比 PharmD 更注重研究的学位,它为药物发现、研发和科学原理提供了坚实的基础; PhD 是最高研究学位,为在制药等科学研究培养人才,强调独立研究,并以论文的形式发表,促进该领域的进步和发展。由此可见,学生培养与学位规划应该与职业目标高度相关,最适合的学位取决于职业目标。

#### 4 我国临床药学教育发展的建议

对比中、美、英三国的 PhD、PharmD、MPharm 培养体系,我国在药学专业人才培养体系建设方面还有一定的进步空间。虽然我国在机制体制方面已经和国际接轨,但是落实到培养目标、培养方案、考核要求等方面还有待进一步完善,亟须形成具有中国特色的药学专业人才培养体系。例如,在面向应用型药学专业人才培养方面,需要改进和规范实践教学,延长实践学习时间,设置严格的管理和考评制度,把学生培养成能够服务于临床,“懂医精药”的临床药师。在面向科研型药学专业人才培养方面,传统的面向药理学、药物化学、药物分析、药剂学等专业的 PhD 模式已经相对成熟,如何建立具有中国特色的临床药学 PhD 培养模式,可能需要 PharmD 专业勇挑重担,从临床实践中发现有价值的临床问题,继而转化为科学问题,用基础研究的方法进行探索和突破,继而回归临床,解决临床问题。如此,PharmD 专业的培养需要一定的长学制或者有一定基础的优秀的药学人才,尤其是具有交叉背景的人才,因为临床药学作为一门新兴的交叉学科,其研究和实践涉及生物医学科学、社会药学、药物流行病学、行为科学和健康服务研究等多个学科<sup>[28]</sup>。因此,2024 年 4 月,北京师范大学化学学院、北京协和医学院药学院联合招收药学专业本科生,本科阶段以 2(北京师范大学)+2(北京协和医学院)方式由两校共同培养,符合培养要求的毕业生按推免直博的方式由北京师范大学、北京协和医学院录取进入化学或药学相关专业直博生阶段学习。该模式是北京协和医学院首次探索从本科招收学生进行 PharmD 培养,通过引入多学科融合的理念,旨在为医药产业培养高

层次、应用型且具有全球视野的行业领军人才,为药学事业的高质量发展添砖加瓦。

综上,虽然我国临床药学起步较晚,但是相信一定能厚积薄发,探索出一套具有中国特色的临床药学培养制度和体系,从而满足医疗卫生事业发展的需求,进而实现药学专业人员的临床价值和人生价值!

#### 参考文献

- [1] 魏春燕,陈沁敏,安静,等.基于药学服务胜任力标准转化的药师胜任力现状和需求调查[J].中国药学杂志,2023,58(13):1236-1244.
- [2] American Association of Colleges of Pharmacy (AACP). Pharmacy is right for me: pharmacy FAQ [EB/OL]. (2024-01-01) [2024-10-23]. <https://pharmacyforme.org/admissions-faqs/#1577988512303-e2d25e21-9e19>.
- [3] American Association of Colleges of Pharmacy (AACP). Pharmacy is right for me: road map to pharmacy [EB/OL]. (2024-01-01) [2024-10-23]. <https://pharmacyforme.org/why-pharmacy-may-be-right-for-you/road-map-to-pharmacy/>.
- [4] American Association of Colleges of Pharmacy (AACP). pharmacy is right for me: advice for high schoolers interested in pharmacy school [EB/OL]. (2018-02-12) [2024-10-23]. <https://pharmacyforme.org/2018/02/12/advice-high-schoolers-interested-pharmacy-school/>.
- [5] American Association of Colleges of Pharmacy (AACP). 2021-2022 Summary of Course Prerequisites [EB/OL]. (2022-07-18) [2024-10-23]. <https://www.pharmacas.org/sites/default/files/2020-08/Course%20Prerequisite%20Summary%202020%202021>.
- [6] Hall JL, Corelli RL, Dehart R, et al. Trends in pharmacy college admission test requirements and utilization across colleges and schools of pharmacy [J]. Am J Pharm Educ, 2021, 85(3): 179-184.
- [7] American Association of Colleges of Pharmacy (AACP). PharmD Program Structures [EB/OL]. (2022-11-22) [2024-10-23]. <https://www.aacp.org/resource/pharmd-program-structures>.
- [8] Boyce EG, Lawson LA. Preprofessional curriculum in preparation for doctor of pharmacy educational programs [J]. Am J Pharm Educ, 2009, 73(8): 155.
- [9] Accreditation Council for Pharmacy Education (ACPE). Accreditation standards and key elements for the professional program in pharmacy leading to the doctor of pharmacy degree [EB/OL]. (2015-02-02) [2024-10-23]. <https://www.acpe-accredit.org/pdf/Standards2016FINAL>.
- [10] World Health Organization (WHO). Framework for Action on Interprofessional Education & Collaborative Practice [EB/OL]. (2010-09-01) [2024-10-23]. <https://www.who.int/publications/i/item/framework-for-action-on-interprofessional-education-collaborative-practice>.

- [11] Academy of Managed Care Pharmacy (AMCP). How to Develop a Managed Care Pharmacy IPPE/APPE [EB/OL]. (2007-07-01) [2024-10-23]. [http://www.amcp.org/sites/default/files/2019-03/IPPE\\_APPE%20Guide%20062013](http://www.amcp.org/sites/default/files/2019-03/IPPE_APPE%20Guide%20062013).
- [12] American Society of Health-System Pharmacists (ASHP). Accreditation Standards for PGY1 Pharmacy Residencies [EB/OL]. (2023-07-01) [2024-10-23]. <https://www.ashp.org/professional-development/residency-information/residency-program-resources/residency-accreditation/accreditation-standards-for-pgy1-pharmacy-residencies?loginreturnUrl=SSOCheckOnly>.
- [13] American Society of Health-System Pharmacists (ASHP). PGY2 Competence Areas [EB/OL]. (2024-05-12) [2024-10-23]. <https://www.ashp.org/professional-development/residency-information/residency-program-resources/residency-accreditation/pgy2-competence-areas?loginreturnUrl=SSOCheckOnly>.
- [14] American Association of Colleges of Pharmacy (AACP). What is a residency and how do I get one? [EB/OL]. (2024-01-01) [2024-10-23]. <https://www.aacp.com/stunet/compass/residency.AspX>.
- [15] National Association of Boards of Pharmacy (NABP). NAPLEX [EB/OL]. (2021-01-01) [2024-10-23]. <https://nabp.pharmacy/programs/examinations/naplex/>.
- [16] National Association of Boards of Pharmacy (NABP). MPJE [EB/OL]. (2023-10-01) [2024-10-23]. <https://nabp.pharmacy/programs/examinations/mpje/>.
- [17] Mohr F, Redwood T. Practical Pharmacy: the arrangements, apparatus, and manipulations, of the pharmaceutical shop and laboratory [M]. London: Taylor, Walton, and Maberly, 1949: 200-300.
- [18] Gregory JH. Making Medicines: a brief history of pharmacy and pharmaceuticals [J]. N Engl J Med, 2006, 354: 2082-2083.
- [19] General Pharmaceutical Council. Standards for the initial education and training of pharmacists [EB/OL]. (2011-05-01) [2024-10-23]. <https://www.pharmacyregulation.org/news/new-standards-initial-education-and-training-pharmacists-approved>.
- [20] Health Education England (NHS England). England and Wales: Foundation Trainee Pharmacist Recruitment Applicant Handbook For programmes commencing 2025 [EB/OL]. (2024-01-01) [2024-10-23]. [https://London.wte-pharmacy.nhs.uk/dyn/\\_assets/\\_folder4/recruitment/2024\\_nhs\\_England\\_foundation\\_pharmacist\\_recruitment\\_applicant\\_handbook\\_2](https://London.wte-pharmacy.nhs.uk/dyn/_assets/_folder4/recruitment/2024_nhs_England_foundation_pharmacist_recruitment_applicant_handbook_2).
- [21] General Pharmaceutical Council. Foundation training manual 2024/25 [EB/OL]. (2024-07-01) [2024-10-23]. <https://assets.pharmacyregulation.org/files/2024-06/GPhC-%20foundation-training-manual-2024-25>.
- [22] 李芑, 吴蓬, 余辉. 我国临床药学科专业教育的发展 [J]. 中国药学杂志, 1994, 29 (10): 586-589.
- [23] 罗玉晶, 杨悦, 杨静玉, 等. 我国临床药学教育的现状分析 [J]. 中国大学教学, 2017 (5): 89-92.
- [24] 李焕德. 临床药学研究与学科发展 [J]. 中南药学, 2011, 9 (1): 1-3.
- [25] 北京大学药学院药事管理与临床药理学系. 培养轨道 [EB/OL]. (2017-01-01) [2024-10-23]. <http://dpacp.sps.bjmu.edu.cn/rcpy/pygd/index.Htm>.
- [26] 中国医学科学院/北京协和医学院药物研究所. 我校首位临床药学博士生顺利毕业 [EB/OL]. (2020-10-22) [2024-10-23]. <https://www.imm.ac.cn/tz/jyxx/49f7fb4f6b-f4449eb2e13564a409550c.htm>.
- [27] 四川大学华西药学院. 我院获批药学博士专业学位授权点 [EB/OL]. (2024-10-18) [2024-10-23]. <https://pharmacy.scu.edu.cn/info/1150/6658.Htm>.
- [28] Dreischulte T, van den Bemt B, Steurbaut S. European Society of Clinical Pharmacy. European Society of Clinical Pharmacy definition of the term clinical pharmacy and its relationship to pharmaceutical care: a position paper [J]. Int J Clin Pharm, 2022, 44 (4): 837-842.

(收稿日期: 2024-10-29; 修回日期: 2024-12-24)



## 药品不良反应

## 屈螺酮炔雌醇致肾静脉血栓不良反应 1 例

冯占芹, 曲秀君, 曹建英, 石仲歌, 张君\* (潍坊市妇幼保健院药学部, 山东 潍坊 261061)

关键词: 屈螺酮炔雌醇; 口服避孕药; 肾静脉血栓; 药品不良反应

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2025)08-2464-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.049

肾静脉血栓 (renal vein thrombosis, RVT) 是一种相对罕见的疾病, 其特征是肾静脉或其分支中的血栓形成, 常见于肾病综合征、肾脏恶性肿瘤或遗传性血栓<sup>[1]</sup>。口服避孕药的静脉血栓栓塞症 (venous thromboembolism, VTE) 发生率呈增加趋势, 但很少报道孤立性的 RVT<sup>[2]</sup>, 因为 VTE 的发生率在亚洲人群中相对较低<sup>[3]</sup>, 国内仅有 1 例口服屈螺酮炔雌醇致 RVT 的报道<sup>[4]</sup>。屈螺酮炔雌醇属于口服复合避孕药, 本文报道了一例口服屈螺酮炔雌醇发生 RVT 的女性患者的处理情况, 并结合文献分析, 以警示用药风险, 促进临床安全用药。

## 1 病历资料

患者, 女, 24 岁, 身高 160 cm, 体重 70 kg, 体质指数 (BMI)  $27.3 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$ 。因“下腹部疼痛、伴恶心呕吐 1 d”收治入院。用药史: 患者自述入院前 20 d 因“异常子宫出血”一直服用屈螺酮炔雌醇片 (Bayer Weimar GmbH&Co.KG, 每片含屈螺酮 3 mg 和炔雌醇 0.03 mg, 国药准字: H20140972, 批准文号: KTOCT34), 1 片/次, 1 次  $\cdot \text{d}^{-1}$ , 无其他合并用药。否认慢性病史、否认药物及食物过敏史、否认血栓症家族史。

体格检查: 体温  $36.8^\circ\text{C}$ , 心率 98 次  $\cdot \text{min}^{-1}$ , 呼吸 18 次  $\cdot \text{min}^{-1}$ , 血压 123/84 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa)。腹部检查显示左侧背区域自发钝痛、左侧侧面区域轻微的压痛, 伴恶心/呕吐。

诊疗经过: 入院 D2 患者行胃肠镜示慢性胃炎、十二指肠炎, 给予头孢唑肟钠 2 g + 0.9% 氯化钠溶液 (NS) 100 mL ivgtt bid, 奥硝唑注射液 0.5 g + NS 100 mL ivgtt bid, 注射用法莫替丁 20 mg + NS

100 mL ivgtt bid 和瑞巴派特片 0.1 g po tid (餐前口服) 对症治疗 (用药时间: 入院 D2 至出院)。入院 D4 患者腹部疼痛症状未见缓解, 恶心呕吐症状好转, 为进一步检查行下腹部增强 CT 示左侧肾静脉内充盈缺损, 考虑血栓形成, 左肾继发性改变, 补充临床诊断肾梗死、RVT 形成 (左)。患者一直服用屈螺酮炔雌醇片, 无其他合并用药, 考虑屈螺酮炔雌醇片致肾梗死、RVT 的不良反不能排除, 故暂停口服屈螺酮炔雌醇片。给予低分子量肝素钠注射液 5000 IU ih q12h (用药时间: 入院 D4 至出院), 注射用川芎嗪 120 mg + NS 250 mL ivgtt qd (入院 D4 至出院) 和塞来昔布胶囊 200 mg po bid 对症治疗 (入院 D4 至 D6), 尿液分析和人血白蛋白水平平均正常。入院 D6, 经治疗后患者自述腹部疼痛、恶心较前明显减轻。12 d 后患者未再出现腹部疼痛和恶心呕吐症状, 顺利出院。建议患者出院后口服利伐沙班 (15 mg/次, 2 次  $\cdot \text{d}^{-1}$ , 14 d 后改为 20 mg/次, 1 次  $\cdot \text{d}^{-1}$ ) 抗凝治疗, 患者异常子宫出血, 建议出院后中医妇科中药治疗, 6 个月后复诊, 患者自行停用利伐沙班, 下腹部增强 CT 未见异常。

## 2 讨论

## 2.1 关联性评价

根据国家药品不良反应监测中心制定的关联性评价标准, 采用诺氏药品不良反应评估量表<sup>[5]</sup>评定 RVT 与屈螺酮炔雌醇使用的相关性, 评分为 7 分, 详见表 1, “很可能”相关, 推断该药品不良反应 (ADR) 发生很可能由屈螺酮炔雌醇引起。

## 2.2 原因分析

RVT 常见于肾病综合征和肾细胞癌患者。急性 RVT 是一种罕见的疾病, 通常发生在钝性腹部

基金项目: 山东省潍坊市卫生健康委员会科研项目 (No.WFWSJK-2021-198); 青岛市卫生健康委员会 2022 年度医药卫生科研指导项目 (No.2022-WJZD145)。

作者简介: 冯占芹, 女, 主管药师, 主要从事围妊娠期用药评估及不良反应监测方面的研究, email: fzhanqin@163.com \*通信作者: 张君, 女, 副主任药师, 主要从事用药指导及用药监护方面的研究, email: shandongqiuyu@163.com

表 1 诺氏药品不良反应评估量表评分结果

| 相关问题                            | 评分标准 |     |    | 得分  |
|---------------------------------|------|-----|----|-----|
|                                 | 是    | 否   | 未知 |     |
| 1. 该 ADR 先前是否有结论性报告?            | + 1  | 0   | 0  | + 1 |
| 2. 该 ADR 是否在使用可疑药物后发生?          | + 2  | - 1 | 0  | + 2 |
| 3. 该 ADR 是否在停药或应用抗剂得到缓解?        | + 1  | 0   | 0  | + 1 |
| 4. 该 ADR 是否在再次使用可疑药物后重复出现?      | + 2  | - 1 | 0  | 0   |
| 5. 是否存在其他原因能单独引起该 ADR ?         | - 1  | + 2 | 0  | + 2 |
| 6. 该 ADR 是否在应用安慰剂后重复出现?         | - 1  | + 1 | 0  | 0   |
| 7. 药物在血液或其他体液中是否达到毒性浓度?         | + 1  | 0   | 0  | 0   |
| 8. 该 ADR 是否随剂量增加而加重, 或随剂量减少而缓解? | + 1  | 0   | 0  | 0   |
| 9. 患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现过类似反应?     | + 1  | 0   | 0  | 0   |
| 10. 是否存在任何客观证据证实该反应?            | + 1  | 0   | 0  | + 1 |
| 总分值                             |      |     |    | 7   |

注: 总分值≤ 0 分为可疑; 1~4 分为可能; 5~8 分为很可能; ≥ 9 分为肯定。

创伤或肾移植后。口服避孕药的使用通常被视为血栓形成的潜在危险因素, 使用口服避孕药的女性血栓栓塞的风险增加了 3 倍<sup>[6-7]</sup>。本文患者使用屈螺酮炔雌醇是其独立的潜在危险因素, 已有口服避孕药致 RVT 的病例报道<sup>[2, 4, 8-17]</sup>, 故该患者 RVT 很可能与屈螺酮炔雌醇有关。

**2.2.1 药品因素** 屈螺酮炔雌醇属于复方口服避孕药, 每片含屈螺酮 3 mg 和炔雌醇 0.03 mg。本药品主要通过抑制排卵以及改变宫颈黏液, 阻止精子的穿入, 从而达到避孕目的。其导致的不良反应中, 静脉和动脉血栓栓塞事件属于罕见不良反应, RVT 更少见<sup>[6]</sup>。口服避孕药可通过提高血浆纤维蛋白原水平并增加凝血因子Ⅶ和Ⅹ的活性来影响血液, 抗凝血酶活性降低, 从而易形成血栓<sup>[18]</sup>。以“屈螺酮炔雌醇”“口服避孕药”“肾静脉血栓”“不良反应”“drospirenone/ethinylestradiol”“oral contraceptives”“renal vein thrombosis”“adverse drug reactions”为中英文关键词, 检索 PubMed、Web of Science、CNKI、万方、维普等数据库, 检索时限为建库至 2024 年 12 月。经检索和筛选, 最终纳入相关案例报道 12 篇 (12 例)<sup>[2, 4, 8-17]</sup>, 其中国外 11 例, 国内 1 例, 超说明书用药 (月经过多、子宫腺肌瘤/子宫肌瘤、多囊卵巢综合征、月经紊乱) 涉及 4 例 (33.33%)。本患者口服屈螺酮炔雌醇片用于治疗异常子宫出血, 属于超说明书用药, 指南推荐复方口服避孕药可用于异常子宫出血的止血治疗<sup>[19]</sup>, 需要告知患者超说明书用药的风险, 知情同意后方可用药。

**2.2.2 高危因素及个体差异** 口服避孕药致 RVT 的相关不良反应的个案报道 12 例<sup>[2, 4, 8-17]</sup>, 包括本案例报道共 13 例, 均为女性。其中 3 例口服

屈螺酮炔雌醇, 1 例口服炔诺酮三相片, 1 例口服乙炔雌醇/去氧孕烯, 8 例口服避孕药未详细记录。13 例发生静脉血栓 ADR 的患者中, 时间最短的为用药后 5 d, 最长为用药后 10 年, 用药 1 年内发生 RVT 涉及 7 例 (53.85%), 1 年以上涉及 3 例 (23.08%), 另外, 研究表明在使用口服避孕药的第一年, 风险较高<sup>[15]</sup>, 故建议口服避孕药的女性第一年内应加强用药监护。13 例患者中, 左侧 RVT 涉及 8 例 (61.54%), 右侧 RVT 涉及 4 例 (30.77%), 双侧 RVT 涉及 1 例 (7.69%), 故左侧 RVT 常见, 与 Platt 等<sup>[18]</sup>报道一致 (RVT 主要影响左侧)。临床表现主要是腹部疼痛、恶心/呕吐症状, 其中 13 例 (100%) 均出现腹痛, 7 例 (53.85%) 有恶心/呕吐, 故有避孕药口服史患者, 当出现腹痛、恶心/呕吐症状时, 应警惕 RVT 的发生。13 例患者中, 有疾病史 (胰岛素依赖性糖尿病、肾结石、缺铁性贫血、子宫腺肌病、子宫肌瘤、多囊卵巢综合征、月经紊乱) 涉及 7 例 (53.85%), 对于有上述疾病史患者使用口服避孕药应加强用药监护。13 例中亚洲人种涉及 6 例 (46.15%), 高加索人种涉及 3 例 (13.08%), 4 例不详, White 等<sup>[3]</sup>研究表明, 亚洲人种 VTE 发生率明显低于欧洲和北美其他种族的发生率。但基于上述 13 例口服避孕药致 RVT 的病例报道, 口服避孕药致 RVT 在亚洲人种中发生率更高。

该患者 24 岁, BMI 为 27.3 kg·m<sup>-2</sup>, 无慢性病史、无药物及食物过敏史、无吸烟史、无易栓症家族史, 其高危因素可能与口服屈螺酮炔雌醇 (作用机制、超说明书用药) 有关, 提示临床使用口服避孕药均应进一步加强监护, 尤其是口服避孕药的第一年内。

### 3 结论

尽管口服避孕药相关的 RVT 在亚洲人群中是罕见的并发症,但有限的病例表明口服避孕药是 RVT 的独立潜在危险因素。因此,建议口服避孕药的患者,无论年龄和剂量,尤其是合并疾病史和超说明书用药,当患者出现腹部疼痛、恶心呕吐症状时,提醒临床医师应鉴别诊断,不能忽视口服避孕药致 RVT 的风险,并对患者做好相关疾病和用药的宣教。另外,有必要增加在亚洲人群中使用与口服避孕药相关的 RVT 的进一步研究。

### 参考文献

- [1] Pradhan J, Han S, Girishkumar H. A patient with spontaneous bilateral renal vein thrombosis but no risk factors [J]. *Int J Surg Case Rep*, 2023, 104: 107963.
- [2] Chawla L, Sachdeva AS. A rare case of renal vein thrombosis secondary to oral contraceptive pills [J]. *Cureus*, 2024, 16 (4): e1-3.
- [3] White RH, Keenan CR. Effects of race and ethnicity on the incidence of venous thromboembolism [J]. *Thromb Res*, 2009, 123 (4): 11-17.
- [4] 黄慧慧,王祥宇,夏彬凤,等.屈螺酮炔雌醇致青年女性罕见部位静脉血栓形成一例[J].*中国心血管杂志*, 2023, 28 (6): 559-561.
- [5] 贾晓丽,王姬,张荣福,等.脑苷肌肽致吉兰-巴雷综合征 1 例并文献复习[J].*中南药学*, 2025, 23 (3): 858-862.
- [6] 曹莹,韩旭,陈飞,等.1 例长期口服屈螺酮炔雌醇片(II)致下肢深静脉血栓形成的病例分析[J].*中南药学*, 2023, 21 (8): 2258-2260.
- [7] World Health Organization Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. Effect of different progestagens in low oestrogen oral contraceptives on venous thromboembolic disease [J]. *Lancet*, 1995, 346: 1582-1588.
- [8] Slick GL, Schnetzler DE, Kaloyanides GJ. Hypertension, renal vein thrombosis and renal failure (occurring in a patient on an oral contraceptive agent) [J]. *Clin Nephrol*, 1975, 3 (2): 70-74.
- [9] Goldman R, Kettwich D, Woodside J, et al. Mild unilateral proteinuria and renal vein thrombosis associated with oral contraceptive usage [J]. *Am J Kidney Dis*, 1983, 2 (4): 471-473.
- [10] Barre' P, Bishinsky J, Roy D, et al. Successful treatment with streptokinase of renal vein thrombosis associated with oral contraceptive use [J]. *Am J Nephrol*, 1986, 6 (4): 316-320.
- [11] Boehler J, Hauenstein K, Hasler K, et al. Renal vein thrombosis in a dehydrated patient on an oral contraceptive agent [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 1989, 4: 993-995.
- [12] Chan HH, Douketis JD, Nowaczyk MJ. Acute renal vein thrombosis, oral contraceptive use, and hyperhomocysteinemia [J]. *Mayo Clin Proc*, 2001, 76 (2): 212-214.
- [13] Ajmera A, Joshi A, Kamat B, et al. Idiopathic acute renal vein thrombosis in a young healthy woman with no hypercoagulable state taking oral contraceptives [J]. *Am J Med Sci*, 2010, 339 (4): 380-382.
- [14] Iwasaki K, Katsura K, Nakamura R, et al. A case of mesenteric vein thrombosis, portal vein thrombosis and renal vein thrombosis during taking of oral contraceptives [J]. *J Jpn Surg Assoc*, 2012, 73 (3): 753.
- [15] Sasaki Y, Shimabukuro A, Isegawa T, et al. Renal vein thrombosis associated with oral contraception and smoking: a case report from Japan, with literature review [J]. *CEN Case Rep*, 2014, 3: 100-105.
- [16] Miyahara T, Nishino Y, Ozaki M, et al. Renal vein thrombosis occurring in association with oral contraceptives: a case report [J]. *Ann Vasc Dis*, 2023, 16 (2): 131-134.
- [17] Kim HK, Choi HH, Lee JM, et al. Acute renal vein thrombosis, oral contraceptives, and protein S deficiency: a successful catheter-directed thrombolysis [J]. *Ann Vasc Surg*, 2009, 23 (5): e1-4.
- [18] Platt JF, Ellis JH, Rubin JM. Intrarenal arterial Doppler sonography in the detection of renal vein thrombosis of the native kidney [J]. *AJR Am J Roentgenol*, 1994, 162: 1367-1370.
- [19] 中华医学会妇产科学分会妇科内分泌学组.异常子宫出血诊断与治疗指南[J].*中华妇产科杂志*, 2022, 57 (7): 481-490.

(收稿日期: 2025-03-31; 修回日期: 2025-04-16)



# 卡马西平致 *HLA-B\*1502* 基因阴性成年患者发生 Stevens-Johnson 综合征 1 例并文献分析

阮旭<sup>1</sup>, 韩晶晶<sup>2</sup>, 李宇<sup>1</sup>, 陈传涛<sup>1</sup>, 钟晗<sup>3</sup>, 张京莉<sup>1\*</sup> (1.安徽省太和县人民医院/皖南医学院附属太和医院药剂科, 安徽 阜阳 236600; 2.安徽省太和县人民医院/皖南医学院附属太和医院新生儿重症监护室, 安徽 阜阳 236600; 3.上海交通大学医学院附属仁济医院药学部, 上海 200127)

**关键词:** 卡马西平; Stevens-Johnson 综合征; 不良反应

**中图分类号:** R969.3

**文献标识码:** B

**文章编号:** 1672-2981(2025)08-2467-04

**doi:**10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.050

Stevens-Johnson 综合征 (Stevens-Johnson syndrome, SJS) 是一种严重的皮肤-黏膜反应, 中毒性表皮坏死松解症 (toxic epidermal necrolysis, TEN) 是其更为严重的一种形式, 其特征为全身皮肤、口腔、生殖黏膜的坏死及脱落, 绝大多数是由药物引起<sup>[1]</sup>。卡马西平作为临床常用的抗癫痫药物, 广泛用于神经外科术后的癫痫预防<sup>[2]</sup>。近年来研究发现, 卡马西平可导致严重的 SJS, 且与人类白细胞抗原 (HLA) 基因型表达有关, 推荐在使用卡马西平前检查 *HLA-B\*1502* 和 *HLA-A\*1301* 基因型<sup>[3]</sup>, 本文报道了 1 例 *HLA-B\*1502* 基因阴性成人患者在使用卡马西平出现 SJS 的临床特征及治疗方案, 为此类患者临床用药选择及监护提出新启示。

## 1 病历资料

患者, 男, 53 岁, 因“意识不清 1.5 h 余”于 2024 年 4 月 14 日入院, 入院查体: 体温 36.7℃, 心率 85 次·min<sup>-1</sup>, 呼吸频率 16 次·min<sup>-1</sup>, 血压 197/101 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa)。深昏迷, 双侧瞳孔不等大, 对光反射消失, 四肢肌力查体不配合, 肌张力高, 反复抽搐, 双侧巴氏征阴性。予以气管插管, 呼吸机辅助通气。患者既往有高血压病史, 长期服用高血压药物, 血压控制不详, 有脑梗死, 留有右侧肢体活动不利后遗症。否认药物过敏史。实验室检查: 白细胞 (WBC)  $14.21 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ ↑, 中性粒细胞百分比 (NEU%) 63.40%, 血红蛋白 (Hb) 144 g·L<sup>-1</sup>, 血小板 (PLT)  $300 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ , 谷丙转氨酶 (ALT) 115 U·L<sup>-1</sup>↑, 谷草转氨酶 (AST) 52 U·L<sup>-1</sup>。急诊 CT 提示右侧基底节区及额、顶

叶破入脑室, 蛛网膜下腔伴脑疝形成, 右侧侧脑室旁软化灶。入院诊断为基底节出血, 额顶叶出血, 蛛网膜下腔出血, 继发性癫痫。

4 月 14 日患者在全麻下行“脑内血肿清除术+颅骨去骨瓣减压术+脑室钻孔引流术”, 术后给予头孢呋辛 1.5 g ivgtt q8h 抗感染, 丙戊酸钠 0.5 g 静脉泵入 st 控制癫痫, 甘露醇 125 mL ivgtt q6h 降颅压。

4 月 19 日患者反复发热, 最高体温 39℃, 脑脊液生化及常规提示颅内感染, 给予美罗培南 2 g ivgtt q8h 联合万古霉素 1 g ivgtt q12h 抗感染治疗。4 月 25 日查丙戊酸钠血药浓度  $19 \mu g \cdot mL^{-1}$ , 考虑与美罗培南存在相互作用, 将其调整为卡马西平片 0.1 g 鼻饲 bid 控制癫痫。4 月 29 日, 患者自主呼吸功能可, 咳嗽反射存在, 给予停用呼吸机辅助通气, 经气管切开处高流量吸氧, 一般情况好转, 转入神经外科病区继续治疗。

5 月 2 日至 10 日, 患者浅昏迷, 无明显发热, 气切通畅, 无肢体抽搐, 鼻饲流质饮食, 实验室检查 C 反应蛋白 (CRP)  $11.68 mg \cdot L^{-1}$ ↑, WBC  $6.18 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ , ALT  $204 U \cdot L^{-1}$ ↑, AST  $122 U \cdot L^{-1}$ ↑, 停用美罗培南与万古霉素。

5 月 13 日, 患者躯干可见红斑、丘疹, 给予复方倍他米松注射液 1 mL im st, 丙酸氟替卡松乳膏外用 1 FTU bid。5 月 14 日, 患者胸部红疹无明显好转, 蔓延至颈部、腹部。5 月 17 日, 患者口腔黏膜可见糜烂、渗液、面颈部、躯干四肢、外阴生殖器及双侧掌跖部位可见广泛红色斑疹、斑丘疹及丘疱疹, 部分中央可见靶形, 尼氏

**基金项目:** 中华国际医学交流基金会中青年医学研究专项基金课题 (No.Z-2018-35-2003); 吴阶平医学基金会临床科研专项基金课题 (No.320.6750.2020-04-31); 上海市卫生健康委员会科研课题 (No.20194Y0007)。

**作者简介:** 阮旭, 男, 主管药师, 主要从事抗感染药物临床药学方面研究, email: 737577050@qq.com \*通信作者: 张京莉, 女, 主任药师, 主要从事医院药学方面研究, email: 408803436@qq.com

征阳性，皮疹以面颈部及躯干皮疹为著，融合成片，头皮可见红斑、浅黄色软痂。邀请皮肤科及临床药学会诊，考虑卡马西平导致 SJS，建议停用卡马西平，同时给予甲泼尼龙琥珀酸钠 40 mg ivgtt qd，氯雷他定片 10 mg po qd 抗过敏治疗，丙酸氟替卡松乳膏外用皮损处 1 FTU bid，硼酸洗剂外用适量 st，左乙拉西坦口服溶液 5 mL po bid 控制癫痫。筛查 *HLA-B\*15: 02* 基因，嘱其多饮水、促进药物排泄。5 月 21 日，患者 *HLA-B\*15: 02TA* 基因与 *HLA-B\*15: 02TB* 基因皆为野生型，提示 *HLA-B\*15: 02* 基因为阴性，使用卡马西平出现 SJS/TEN 综合征的风险低。

5 月 24 日，患者浅昏迷，双侧瞳孔等大，对光反射迟钝，头颈躯干四肢多处红疹收敛干燥，破溃处结痂脱皮，无发热抽搐，气切通畅，鼻饲流质饮食，二便正常，继续给予上述方案治疗，营养支持及对症处理，加强口腔、皮肤护理。

5 月 28 日，患者皮疹大部分收敛干燥，破溃处均结痂脱皮，皮疹治疗效果满意，进入衰退期，将甲泼尼龙琥珀酸钠调整为 20 mg qd，其余治疗不变。6 月 7 日，患者 SJS 已基本治愈，建议出院休养或康复医学科继续康复治疗。

2 讨论

2.1 不良反应相关性评价

SJS/TEN 是一种严重皮肤不良反应，绝大多数是由药物引起，常见药物包括磺胺类药物、抗癫痫药物、非甾体抗炎药及抗感染药物等<sup>[1]</sup>。患者入院后先后给予头孢呋辛、美罗培南、万古霉素抗感染治疗，丙戊酸钠、卡马西平抗癫痫治疗，分别于 4 月 17 日停用头孢呋辛，4 月 25 日停用丙戊酸钠，5 月 10 日停用美罗培南与万古霉素，此 4 种药物与患者发生 SJS/TEN 的时间不符。5 月 13 日患者服用卡马西平 17 d 后，出现口腔黏膜糜烂、渗液、面颈部、躯干四肢、外阴生殖器及双侧掌跖部位可见广泛红色斑疹、斑丘疹及丘疱疹，融合成片，皮疹以面颈部及躯干皮疹为著，与使用卡马西平具有时间相关性，在停用卡马西平，使用抗过敏药物及激素治疗后好转，卡马西平说明书也提到了罕见不良反应包括 SJS/TEN，这与既往文献报道一致<sup>[4-5]</sup>，根据诺氏药品不良反应评估量表判断为“很可能”，见表 1。

2.2 卡马西平导致 SJS 的可能机制

SJS/TEN 综合征的发病机制尚不完全清楚，目前比较主流的观点认为其发病与药物和遗传背景相关，主要与 HLA 的多态性有关。卡马西平

表 1 诺氏药品不良反应评估量表

| 相关问题                           | 问题打分 |     |    |   | 评分 |
|--------------------------------|------|-----|----|---|----|
|                                | 是    | 否   | 未知 |   |    |
| 1. 该 ADR 先前是否有结论性报告?           | + 1  | 0   | 0  | 0 | 1  |
| 2. 该 ADR 是否在使用可疑药物后发生?         | + 2  | - 1 | 0  | 0 | 2  |
| 3. 该 ADR 是否在停药或应用抗剂得到缓解?       | + 1  | 0   | 0  | 0 | 1  |
| 4. 该 ADR 是否在再次使用可疑药物后重复出现?     | + 2  | - 1 | 0  | 0 | 0  |
| 5. 是否存在其他原因能单独引起该 ADR ?        | - 1  | + 2 | 0  | 0 | 2  |
| 6. 该 ADR 是否在应用安慰剂后重复出现?        | - 1  | + 1 | 0  | 0 | 0  |
| 7. 药物在血液或其他体液中是否达到毒性浓度?        | + 1  | 0   | 0  | 0 | 0  |
| 8. 该 ADR 是否随剂量增加而加重，或随剂量减少而缓解? | + 1  | 0   | 0  | 0 | 0  |
| 9. 患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现过类似反应?    | + 1  | 0   | 0  | 0 | 0  |
| 10. 是否存在任何客观证据证实该反应?           | + 1  | 0   | 0  | 0 | 1  |
| 总分值                            |      |     |    |   | 7  |

注：总分值≥9 为肯定；5~8 为很可能；1~4 为可能；≤0 为可疑。

作为临床中常用的抗癫痫药物，研究发现其发生严重的皮肤不良反应可能与 HLA 的多个基因位点相关。中文以“卡马西平”“中毒性表皮坏死松解症”“Stevens-Johnson 综合征”，英文以“Stevens-Johnson syndrome”“carbamazepine”为关键词检索维普、万方、中国知网、PubMed 数据库，筛选国内外报道的病例及研究，讨论不同种族和地区的基因多态性差异。既往研究发现包括中国汉人、泰国人及马来西亚人在内，*HLA-B\*15: 02* 基因与卡马西平引起 SJS 息息相关<sup>[6-12]</sup>。但韩兆欢等<sup>[13]</sup>报道了 1 例 *HLA-B\*15: 02* 基因阴性的 12 岁儿童患者服用卡马西平后出现了 SJS，许媛媛等<sup>[14]</sup>报道了一例卡马西平导致中国汉人发生 SJS，其 *HLA-B\*15: 02TA* (CC)、*HLA-B\*15: 02TB* (CC)、*HLA-B\*58: 01* (TT、AA) 为阴性，*HLA-A\*31: 01* (AG) 为阳性，这些研究提示中国人在使用卡马西平前也需重视 *HLA-B\*15: 02* 基因阴性患者，同时 *HLA-A\*31: 01* 基因可作为新的检测位点，以预防不良反应的发生。而在欧洲患者人群中，*HLA-A\*31: 01* 基因卡马西平诱导 SJS 常被报道<sup>[15]</sup>。日本最新研究也表明 *HLA-A\*31: 01* 基因筛查可显著降低卡马西平不良反应发生率<sup>[16]</sup>。本例患者在使用卡马西平前未进行有关基因检测，在出现 SJS 后临床药师建议送检 *HLA-B\*15: 02* 与 *HLA-A\*31: 01* 基因，但受实验室基因检测位点限制，仅做了 *HLA-B\*15: 02* 基因位点检测，最终患者在医务人员及时诊断及药物治疗后恢复良好，不同种族和地区的基因多态性差异见表 2。

表 2 不同种族和地区的基因多态性差异

| 序号                 | 年龄 / 岁 | 性别 | 种族和地区 | 研究例数 | 与卡马西平导致 SJS/TEN 的基因型                                                                        |
|--------------------|--------|----|-------|------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 <sup>[6]</sup>   | 56     | 男  | 中国汉族人 | 1    | <i>HLA-B*1502</i> 阳性                                                                        |
| 2 <sup>[7]</sup>   | —      | —  | 中国汉族人 | 8    | 与 <i>HLA-B*1502</i> 密切相关                                                                    |
| 3 <sup>[8]</sup>   | —      | —  | 中国安徽  | 25   | <i>HLA-B*1502</i> 阳性等位基因显著高于对照组                                                             |
| 4 <sup>[9]</sup>   | —      | —  | 泰国    | 48   | <i>HLA-B*1502</i> 预测卡马西平诱发的 SJS/TEN 的敏感性和特异性较高                                              |
| 5 <sup>[10]</sup>  | —      | —  | 马来西亚  | 19   | <i>HLA-B*1502</i> 与 SJS/TEN 具有很强的相关性                                                        |
| 6 <sup>[11]</sup>  | —      | —  | 中国台湾  | 4877 | <i>HLA-B*1502</i> 在预防卡马西平诱发的 SJS/TEN 具有重要意义                                                 |
| 7 <sup>[12]</sup>  | —      | —  | 中国台湾  | 24   | 四分之三 SJS/TEN 患者携带 <i>HLA-B*1502</i> 的患者                                                     |
| 8 <sup>[13]</sup>  | 12     | 男  | 中国江苏  | 1    | <i>HLA-A*3101</i> 、 <i>HLA-B*1502</i> 、 <i>HLA-B*5801</i> 阴性                                |
| 9 <sup>[14]</sup>  | 39     | 女  | 中国北京  | 1    | <i>HLA-A*3101</i> (AG) 阳性, <i>HLA-B*1502TA</i> 、 <i>HLA-B*1502TB</i> 、 <i>HLA-B*5801</i> 阴性 |
| 10 <sup>[15]</sup> | —      | —  | 欧洲    | 65   | <i>HLA-A*3101</i> 等位基因的存在与卡马西平诱导的过敏反应相关                                                     |
| 11 <sup>[16]</sup> | —      | —  | 日本    | 1187 | <i>HLA-A*31: 01</i> 基因筛查显著降低卡马西平不良反应率                                                       |
| 12 (本患者)           | 53     | 男  | 中国安徽  | 1    | <i>HLA-B*1502</i> 阴性                                                                        |

2.3 SJS 的治疗及癫痫替代疗法

目前对于 SJS/TEN 的治疗尚无明确高质量治疗循证医学证据, 首先应停用可疑致病药物, 有研究表明越早停用预后越好<sup>[17]</sup>, 同时密切监测生命体征, 补充适当电解质平衡。对于 SJS/TEN 导致的类似烧伤创面, 皮肤的护理也是治疗中的重要环节, 同时临床上常采用糖皮质激素, 静注人免疫球蛋白、环孢素及肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 拮抗剂作为系统性治疗方案<sup>[18]</sup>。对于癫痫患者可选择其他药物替代治疗药物, 包括左乙拉西坦、丙戊酸钠、拉莫三嗪、托吡酯等。该患者出现 SJS/TEN 后, 临床药师通过查体、询问病史、查阅相关文献指南, 及时识别可疑药物卡马西平, 建议停药。在应用外用药物的同时, 系统性使用糖皮质激素治疗两周后, 患者恢复情况良好, 无其他不适。

3 小结

本文报道了 1 例卡马西平导致 *HLA-B\*15: 02* 基因阴性成年患者发生 SJS 的病例, 提示单独检测 *HLA-B\*15: 02* 基因并不能完全预测所有患者的情况, 这与卡马西平导致严重 SJS/TEN 的 *HLA* 基因多态性具有地区差异及 *HLA* 基因位点密切相关, 即使基因报告结果为低风险, 仍有发生 SJS/TEN 的风险。对于临床使用卡马西平的患者, 应密切观察其服药后的一般情况, 加强不良反应的监测。作为临床药师, 通过血药浓度监测、基因检测、查阅相关文献及指南, 协助临床医师为患者提供个体化的治疗方案, 体现了临床药师的专业价值。

参考文献

[1] 中华医学会皮肤性病学分会药物不良反应研究中心. Stevens-Johnson 综合征 / 中毒性表皮坏死松解症诊疗专家共识 [J]. 中华皮肤科杂志, 2021, 54 (5): 376-381.

[2] Liang SL, Fan X, Chen F, et al. Chinese guideline on the application of anti-seizure medications in the perioperative period of supratentorial craniocerebral surgery [J]. Ther Adv Neurol Disord, 2022, 15: 17562864221114357.

[3] Phillips EJ, Sukasem C, Whirl-Carrillo M, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline for HLA genotype and use of carbamazepine and oxcarbazepine: 2017 Update [J]. Clin Pharmacol Ther, 2018, 103 (4): 574-581.

[4] Al Rajaibi R, Al Rumhi T, Al Abri AM. Carbamazepine-induced Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis overlap treated successfully with oral cyclosporin: case report and literature review [J]. Sultan Qaboos Univ Med J, 2021, 21 (3): 491-494.

[5] Batool S, Voloshyna D, Usama M, et al. The co-existence of agranulocytosis and Stevens-Johnson syndrome (SJS) in carbamazepine therapy: a case report [J]. Cureus, 2022, 14 (9): e28917.

[6] Tangamornsuksan W, Chaiyakunapruk N, Somkrua R, et al. Relationship between the *HLA-B\*1502* allele and carbamazepine-induced Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis: a systematic review and meta-analysis [J]. JAMA Dermatol, 2013, 149 (9): 1025-1032.

[6] 周盛会, 蒯凤林. 卡马西平治疗肿瘤患者神经痛引起 Stevens-Johnson 综合征 1 例 [J]. 甘肃医药, 2024, 43 (1): 37-40.

[7] Wu XT, Hu FY, An DM, et al. Association between carbamazepine-induced cutaneous adverse drug reactions and the *HLA-B\*1502* allele among patients in central China [J]. Epilepsy Behav, 2010, 19 (3): 405-408.

[8] 张祥. MHC 区域 HLA-B 类基因与安徽汉族人群抗癫痫药诱发重症药疹的相关性研究 [D]. 芜湖: 皖南医学院, 2019.

[9] Tassaneeyakul W, Tiamkao S, Jantararoungtong T, et al. Association between *HLA-B\*1502* and carbamazepine-induced severe cutaneous adverse drug reactions in a Thai population [J]. Epilepsia, 2010, 51 (5): 926-930.

[10] Then SM, Rani ZZ, Raymond AA, et al. Frequency of the *HLA-B\*1502* allele contributing to carbamazepine-induced hypersensitivity reactions in a cohort of Malaysian



- epilepsy patient s [J]. Asian Pac J Allergy Immunol, 2011, 29 (3): 290-293.
- [11] Chen P, Lin JJ, Lu CS, et al. Taiwan SJS Consortium. Carbamazepine-induced toxic effects and *HLA-B\*1502* screening in Taiwan [J]. N Engl J Med, 2011, 364 (12): 1126-1133.
- [12] Hsu TJ, Yeh HH, Lee CH, et al. Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in a referral center in Taiwan [J]. Int J Dermatol, 2021, 60 (8): 964-972.
- [13] 韩兆欢, 任玲, 周玄, 等. 卡马西平致 *HLA-B\*1502* 阴性患儿 Stevens-Johnson 综合征 1 例 [J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39 (15): 1607-1608.
- [14] 许媛媛, 孙志琳, 张秀莲, 等. 卡马西平致 *HLA-A\*3101* 基因阳性中国汉族人发生 Stevens-Johnson 综合征 1 例 [J]. 北京大学学报 (医学版), 2023, 55 (4): 755-757.
- [15] McCormack M, Alfirevic A, Bourgeois S, et al. *HLA-A\*3101* and carbamazepine-induced hypersensitivity reactions in Europeans [J]. N Engl J Med, 2011, 364 (12): 1134-1143.
- [16] Mushiroda T, Takahashi Y, Onuma T, et al. Association of *HLA-A\*31: 01* screening with the incidence of carbamazepine-induced cutaneous adverse reactions in a Japanese population [J]. JAMA Neurol, 2018, 75 (7): 842-849.
- [17] Gupta LK, Martin AM, Agarwal N, et al. Guidelines for the management of Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis: an Indian perspective [J]. Indian J Dermatol Venereol Leprol, 2016, 82 (6): 603-625.
- [18] 中华医学会神经外科学分会神经创伤专业组, 中华医学会创伤学分会颅脑创伤专业组. 颅脑创伤后癫痫防治中国专家共识 [J]. 中华神经外科杂志, 2017, 33 (7): 652-654.

(收稿日期: 2024-01-15; 修回日期: 2024-11-10)

## 恩曲替尼致急性肝衰竭 1 例

武会芝<sup>1</sup>, 张桢<sup>1</sup>, 付饶<sup>2\*</sup>, 孙宝<sup>2\*</sup> (1. 浏阳市人民医院药剂科, 湖南 浏阳 410300; 2. 中南大学湘雅二医院药学部, 长沙 410011)

**关键词:** 恩曲替尼; 酪氨酸激酶抑制剂; 急性肝衰竭; 不良反应

**中图分类号:** R969.3

**文献标识码:** B

**文章编号:** 1672-2981(2025)08-2470-03

**doi:** 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.08.051

### 1 病历资料

患者男, 60 岁, 因确诊肺癌 2 年余, 双下肢水肿 1 年, 气促 1 月余, 于 2024 年 2 月 4 日收住中南大学湘雅二医院呼吸与危重症科。患者 2021 年 6 月确诊右肺鳞癌, 行紫杉类、铂类、帕博利珠单抗治疗 3 周期后行手术治疗; 同年 9 月驱动基因检测提示 *ROS1* 突变, 予以塞瑞替尼治疗, 2021 年 12 月改为克唑替尼; 2022 年 3 月复查提示疾病进展后, 加用安罗替尼治疗后, 予以放疗 10 次; 2022 年 7 月再次进展, 一直服用洛拉替尼、安罗替尼至 2024 年 2 月 1 日。患者肺癌术后长期服用瑞舒伐他汀、酒石酸美托洛尔缓释片、利伐沙班、迈之灵片。否认肝炎、结核、疟疾病史, 否认食物、药物过敏史。吸烟史 10 余年, 已戒烟 3 年; 否认饮酒史。

入院体检: 体温 36.4℃, 心率 83 次·min<sup>-1</sup>,

呼吸 19 次·min<sup>-1</sup>, 血压 133/86 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa)。神志清楚, 精神尚可, 查体合作, 问答切题, 全身皮肤黏膜未见黄染, 未检出血点。双肺呼吸音低, 可闻及湿性啰音。双下肢重度水肿, 四肢肌力、肌张力均正常。彩超示三尖瓣反流 (轻度)、主动脉瓣反流 (轻度)、心动过速; 左室收缩功能减退射血分数 [(EF) 40%]。肝多发囊肿, 左肾多发囊肿。左下肢小腿浅静脉内低回声物, 考虑血栓形成; 双下肢皮下软组织水肿; 双下肢深静脉所示节段血流淤滞。实验室检查: 谷丙转氨酶 (ALT) 22 U·L<sup>-1</sup>, 谷草转氨酶 (AST) 28 U·L<sup>-1</sup>, 总蛋白 60.6 g·L<sup>-1</sup>↓, 白蛋白 35.0 g·L<sup>-1</sup>↓, 总胆红素 (TBil) 10.3 μmol·L<sup>-1</sup>; 肌酐 67.0 μmol·L<sup>-1</sup>; 国际标准化比值 (INR) 1.33, 血浆凝血酶时间 (PT) 16.3 s↑, D-二聚体 0.75 μg·mL<sup>-1</sup>↑。入院诊断: 肺恶性肿瘤 (腺癌右中肺纵隔型, 化疗术后后

**基金项目:** 湖南省自然科学基金优秀青年项目 (No.2024JJ4080)。

**作者简介:** 武会芝, 女, 主管药师, 主要从事肿瘤药物临床药学工作, email: WuHuizhi0903@163.com \*通信作者: 孙宝, 男, 副研究员, 主要从事临床药学方面的工作, email: scy\_csu2016@csu.edu.cn; 付饶, 女, 主管药师, 主要从事临床药学方面的工作, email: furao1030500@outlook.com

R2 切除靶向治疗进展，胸壁、胸膜、心包转移，右胸壁肿块放疗后)；慢性心力衰竭；胆囊结石伴胆囊炎；肝囊肿；后天性肾囊肿；紫癜；肺部感染；胸腔积液；肺动脉高压；阵发性心房扑动。

患者入院后予以哌拉西林钠他唑巴坦钠(4.5 g q8h)静脉滴注抗感染，枸橼酸西地那非片(25 mg tid)降肺动脉高压，氨溴索(30 mg bid)化痰，美托洛尔(47.5 mg qd)控制心室率，甲钴胺片(0.5 mg tid)营养神经，同时予以调脂稳斑、利尿、维持电解质平衡等对症支持治疗。患者双下肢水肿情况较前好转。入院第 8 日，患者出现失禁、乱语等情况，不能判断身处何处，血气分析(吸氧 2 L·min<sup>-1</sup>)示：动脉血二氧化碳分压(pCO<sub>2</sub>) 87 mmHg↑，动脉血酸碱度(pH) 7.31↓，实际血浆碳酸氢盐(HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) 43.8 mmol·L<sup>-1</sup>↑，提示二氧化碳(CO<sub>2</sub>)潴留明显加重，考虑肺性脑病可能；入院第 11 日，患者感腹胀、乏力，实验室检查：ALT 420 U·L<sup>-1</sup>↑，AST 709 U·L<sup>-1</sup>↑，白蛋白 35.4 g·L<sup>-1</sup>↓，TBil 102.5 μmol·L<sup>-1</sup>↑。患者肝功能多项指标较入院初期明显升高，影像学检查排除肿瘤肝转移等情况。反复追问病史及用药史，家属诉入院当日自行购入恩曲替尼[Roche Pharma (Schweiz) AG，批号：N2094B01]，并于入院第 2 日起自行服用，每日 600 mg，3 d 后调整为 400 mg·d<sup>-1</sup>，共用药 9 d。患者急性肝功能损伤与服用恩曲替尼密切相关，要求患者立即停止服用恩曲替尼，并予以谷胱甘肽(2.4 g qd)、异甘草酸镁(150 mg qd)、丁二磺酸腺苷蛋氨酸(1 g qd)护肝治疗。患者血氨：99.2 μmol·L<sup>-1</sup>↑，感染科会诊后考虑患者为药物所致急性肝衰竭，建议继续使用丁二磺酸腺苷蛋氨酸退黄，异甘草酸镁护肝，停用谷胱甘肽，改为乙酰半胱氨酸(8 g qd)护肝，予门冬氨酸鸟氨酸(10 g qd)降血氨治疗。入院第 13 日，患者碱性磷酸酶(ALP) 334.0 U·L<sup>-1</sup>↑，ALT 530 U·L<sup>-1</sup>↑，AST 874 U·L<sup>-1</sup>↑，TBil 136.8 μmol·L<sup>-1</sup>↑，INR 9.42↑，PT 74.6 s↑，并出现昏

迷，呼之不应，全身巩膜黄染，指脉氧持续下降至测不出，紧急行床旁气管插管转入重症监护室行进一步诊疗。考虑急性肝衰竭致肝性脑病，患者行床旁血浆置换后，患者 ALT 237 U·L<sup>-1</sup>↑，AST 402 U·L<sup>-1</sup>↑，TBil 43.4 μmol·L<sup>-1</sup>↑，INR 5.21↑，PT 47.1 s↑，较前改善。入院第 15 日(停药第 4 日)，患者突发心率下降，神志昏迷，对光反射无，血压、血氧测不出，患者家属拒绝所有药物治疗，最终患者死亡。

2 讨论

本案例患者 60 岁，无肿瘤肝转移，无肝病病史，无饮酒史。患者既往有洛拉替尼、安罗替尼等用药史，但规律复查肝功能均在正常范围内；服用恩曲替尼治疗前肝功能正常；在恩曲替尼用药后第 9 日后复查肝功能出现 ALT、AST(均大于 5 倍 ULN)及 TBil 明显升高；患者恩曲替尼用药期间虽合并使用了哌拉西林钠他唑巴坦钠、枸橼酸西地那非片等药物，但患者既往治疗过程中有使用过这两类药物，未见明显肝功能损伤情况。考虑患者在短时间内迅速出现黄疸、凝血功能障碍及肝性脑病等临床表现，诊断为药物所致急性肝衰竭，停药后积极护肝治疗，肝功能有好转趋势，但患者病情变化快，停药 4 d 后死亡。患者不良反应的发生与用药具有明显的时间关联性。根据《个例药品不良反应收集和报告指导原则》<sup>[1]</sup>中药品因果关系评判标准，患者急性肝衰竭与恩曲替尼关联性评价为很可能有关；为进一步明确恩曲替尼与患者急性肝衰竭的关联性，根据 Roussel Uclaf 因果关系评估法(RUCAM)评分<sup>[2]</sup>为 7 分(见表 1)，提示恩曲替尼与急性肝衰竭的因果关系为“很可能”。计算 R 值为 3.97，判断该患者肝损伤类型为混合型损伤(2.0 < R < 5.0)。虽然洛拉替尼、安罗替尼也有致肝脏损伤的可能性，但患者在出现症状前已停药，且既往长期用药未出现肝功能损伤等情况，因此，本病例考虑急性肝衰竭与恩曲替尼的关联性更强。

表 1 患者 RUCAM 评估量表得分

| 混合型损伤(R = 3.97) |                                             |    |
|-----------------|---------------------------------------------|----|
| 评分项目            | 患者情况                                        | 得分 |
| 1. 用药至发病时间      | 初次用药从用药开始 9 d 后(5 ~ 90 d 内)发现肝功能损伤          | 2  |
| 2. 病程           | TBil 在峰值与 ULN 之间的变化，180 d 内下降 ≥ 50%         | 2  |
| 3. 危险因素         | 患者无饮酒或妊娠，60 岁(年龄 ≥ 55 岁)                    | 1  |
| 4. 伴随用药         | 患者伴随用药(哌拉西林钠他唑巴坦钠、枸橼酸西地那非等)已知有肝损伤风险，且发病时间相符 | -2 |
| 5. 除外其他肝损伤原因    | 该患者排除组 I 和组 II 中的所有病因                       | 2  |
| 6. 药物既往肝损伤信息    | 恩曲替尼致肝损伤不良反应已在说明书中明确标明                      | 2  |
| 7. 再用药反应        | 患者后续未再使用恩曲替尼                                | 0  |
| 总计              |                                             | 7  |

恩曲替尼是一种具有中枢神经系统活性的酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitors, TKI), 兼具全身和颅内抗肿瘤活性, 主要用于治疗携带神经营养性酪氨酸激酶受体 (NTRK) 基因 1/2/3、*ROS1* 或间变性淋巴瘤激酶 (*ALK*) 基因融合突变的实体肿瘤<sup>[3]</sup>。根据恩曲替尼药品说明书, 其常见的不良反应为疲劳、便秘、味觉障碍、呼吸困难、肌痛及体重增加等, 约 2.1% 的患者出现药物相关的 3~4 级 AST 或 ALT 升高<sup>[4]</sup>。截至 2024 年 8 月, 检索中国知网、万方、PubMed 数据库, 未能检索到国内外有关恩曲替尼致急性肝衰竭的个案报道。

恩曲替尼引起的肝损伤等不良反应可发生在治疗后的任何时期, 中位发生时间为 12 d<sup>[5]</sup>。恩曲替尼致急性肝衰竭的可能机制仍不明确, 有研究报道, 恩曲替尼通过 CYP3A4 和 CYP1A2 等同工酶系进行代谢, 形成潜在毒性代谢产物, 包括醌甲醚和亚胺代谢中间体, 这些代谢产物可能与恩曲替尼的肝脏毒性有关<sup>[6-7]</sup>。Doebele 等<sup>[8]</sup>研究发现, 在 355 名安全性可评估人群中, 大多数不良事件为 1~2 级, 其中 1~2 级 AST 升高 35 例 (占比 10%)、3~4 级 AST 升高 4 例 (占比 1%); 20 例 (占比 6%) 因不良反应致死患者中不涉及肝衰竭。另一研究发现, 210 名接受至少 1 剂恩曲替尼治疗的患者中, 发生 3 级 ALT 升高的患者有 7 例 (占比 3.3%), 且无肝损伤致死病例<sup>[9]</sup>。在对 3 项 I/II 期研究 (ALKA-372-001: EudraCT 2012-000148-88; STARTRK-1: NCT02097810; STARTRK-2: NCT02568267) 的最新数据综合分析 (截至 2022 年 9 月) 中, 55 例可安全性评估的人群中发现 3 级肝衰竭患者 1 例, 未发现 4 级不良反应, 无导致患者发生与治疗相关的死亡情况<sup>[10]</sup>。结合目前的证据来看, 急性肝衰竭是恩曲替尼罕见且严重的不良反应。本例患者既往肝功能正常, 服用恩曲替尼 9 d 后出现肝损伤的前驱症状, 并于短期内病情急剧恶化, 出现急性肝衰竭, 最终死亡, 比较少见。

本例提示, 恩曲替尼可能导致患者出现急性肝衰竭, 可发生于既往无肝病患者, 临床医师及药师应予以关注; 建议使用恩曲替尼的患者都应

在基线时接受肝功能检查, 并在治疗期间定期复查; 另外要加强公众对恩曲替尼的不良反应的认识, 科学用药, 增强安全用药的意识; 要注重早期识别, 并尽早干预, 避免发生严重后果。

## 参考文献

- [1] 国家药品监督管理局. 个例药品不良反应收集和报告指导原则 [EB/OL]. (2018-12-19) [2024-09-27]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/ypggtg/ypqgtgtg/20181221172901438.html>.
- [2] 中国医药生物技术协会药物性肝损伤防治技术专业委员会, 中华医学会肝病学会分会药物性肝病学组. 中国药物性肝损伤诊治指南 (2023 年版) [J]. 中华肝脏病杂志, 2023, 31 (4): 355-384.
- [3] Drilon A, Tan DSW, Lassen UN, et al. Efficacy and safety of larotrectinib in patients with tropomyosin receptor kinase fusion-positive lung cancers [J]. JCO Precis Oncol, 2022, 6: e2100418.
- [4] FDA. Rozlytrek™ (entrectinib) capsules, for oral use [EB/OL]. (2024-01-26) [2024-09-27]. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&ApplNo=212725>.
- [5] Liguori V, Gaio M, Zinzi A, et al. The safety profiles of two first-generation NTRK inhibitors: analysis of individual case safety reports from the FDA adverse event reporting system (FAERS) database [J]. Biomedicine, 2023, 11 (9): 2538.
- [6] Rolfo C, Ruiz R, Giovannetti E, et al. Entrectinib: a potent new TRK, ROS1, and ALK inhibitor [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2015, 24 (11): 1-12.
- [7] Yan M, Li W, Li WB, et al. Metabolic activation of tyrosine kinase inhibitors: recent advance and further clinical practice [J]. Drug Metab Rev, 2023, 55 (1-2): 94-106.
- [8] Doebele RC, Drilon A, Paz-Ares L, et al. Entrectinib in patients with advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumours: integrated analysis of three phase 1-2 trials [J]. Lancet Oncol, 2020, 21 (2): 271-282.
- [9] Dziadziuszko R, Krebs MG, De Braud F, et al. Updated integrated analysis of the efficacy and safety of entrectinib in locally advanced or metastatic ROS1 fusion-positive non-small-cell lung cancer [J]. J Clin Oncol, 2021, 39 (11): 1253-1263.
- [10] Cho BC, Chiu CH, Massarelli E, et al. Updated efficacy and safety of entrectinib in NTRK fusion-positive non-small cell lung cancer [J]. Lung Cancer, 2024, 188: 107442.

(收稿日期: 2024-10-22; 修回日期: 2024-12-13)