

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



ISSN 1672-2981
CN 43-1408/R

中南药学

ZHONGNAN YAOXUE

2025年12月 第23卷 第12期

Volume 23 Number 12 Dec 2025

CENTRAL

SOUTH

PHARMACY

- ◆ 基于模拟酶切和分子对接筛选中华鳖裙边中的血管紧张素转化酶抑制肽
- ◆ 毛囊靶向纳米制剂的制备及离体渗透评价
- ◆ 怀山药资源化学专题
- ◆ 提升难溶性药物口服吸收的脂质递送策略

ISSN 1672-2981



9 771672 298255

12
2025



中国科技核心期刊

(中国科技论文统计源期刊)

收录证书

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

中南药学

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

特颁发此证书。

中国科学技术信息研究所

Institute of Scientific and Technical Information of China

北京复兴路 15 号 100038

www.istic.ac.cn

2024年9月

证书编号: 2023-G599-0867
有效期至: 2025年12月





中南药 学

ZHONGNAN YAOXUE

月刊 2003 年 4 月创刊 第 23 卷 第 12 期 (总第 239 期) 2025 年 12 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: 长沙市芙蓉区韶山北路 39 号

维一星城国际 613-619

出版: 《中南药 学》编辑部

发行: 湖南省报刊发行局

印刷: 长沙昌龙印刷有限公司

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

邮发代号: 42-290

投稿网址: <http://znyx.cbpt.cnki.net>

email: znyxzz2003@vip.163.com

中国标准连续出版物号

ISSN 1672-2981

CN43-1408/R

2025 年版权归《中南药 学》

编辑部所有

目 次

论 著

- (3455) 基于模拟酶切和分子对接筛选中华鳖裙边中的血管紧张素转化酶抑制肽 张新锐, 焦方泽, 张天丰, 等
- (3462) 基于网络药理学探究引火汤改善更年期潮热模型大鼠症状的作用机制研究 付金蕾, 吴东雪, 王堰, 等
- (3470) 基于 QbD 理念的小儿苓音汤颗粒提取工艺设计空间预测 蔡艳丽, 宋信莉, 陈丽, 等
- (3478) 基于转录组学与 PCR 技术的荷叶黄酮部位降血脂作用机制及药效研究 黄蓉, 杨乐怡, 周昶, 等
- (3485) 霍山石斛对糖尿病及糖尿病肝损伤大鼠的治疗作用及机制的初步探究 慕文瑜, 张雪婷, 李金森, 等
- (3494) 两种单克隆抗体组合制剂的强制降解研究 吴纯, 王静, 陈娇瑜, 等
- (3503) 基于网络药理学和实验验证蒲红醒脑益智方治疗血管性痴呆的作用机制 邢婉涛, 唐菊, 杨宇婷, 等
- (3514) 基于 UPLC 指纹图谱及化学模式识别的祛湿消脂颗粒质量评价 陈思迪, 岳凤芹, 孙婉瑾, 等
- (3520) 毛囊靶向纳米制剂的制备及离体渗透评价 包凌云, 冯向阳, 陈千千, 等
- (3528) 新疆一枝蒿不同极性提取物体外抗乙型肝炎病毒作用“谱-效”关系研究 程江南, 丁曼, 蔡晓翠, 等
- (3534) 基于液质联用技术和生物信息学对复方丹参制剂体内外成分与作用特点的初步对比研究 陈斌, 莫尊汇, 颜榕, 等
- (3544) 基于网络药理学和体外实验探究白鲜皮诱导铁死亡致肝损伤机制 贺文杰, 孙慧娟, 邓戈宇, 等
- (3551) 基于 16S rRNA 测序探讨木犀草素致骨折大鼠肠道菌群变化 郑丽, 王慧, 丁一桁, 等
- (3557) 口腔科常用含漱液的适口性评价 张娅, 陈静, 穆长清, 等
- (3564) 氢氯噻嗪低共熔体系的筛选及药效评价 薛莺, 曹烨君, 王一男, 等
- (3570) 加味补中益气汤改善多囊卵巢综合征作用机制的网络药理学分析及实验验证 孙蕾, 申艳朵, 张家乐, 等
- (3578) 基于 UHPLC-MS 的代谢组学技术评价不同产地当归药材质量差异 马琪, 杨泽锋, 张再磊, 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

（3585）人血浆中紫杉醇及 4 种代谢产物 UPLC-MS/MS 分析方法的开发与应用 李三望，李晶晶，谢非凡

（3592）基于指纹图谱和网络药理学预测牛黄解毒胶囊质量标志物 陈琪，李欣茹，冯丽，等

怀山药资源化学专题

（3600）怀山药内生真菌 *Fusarium* sp. L46 的次生代谢产物研究 文春南，葛梦焕，赵莹菲，等

（3605）铁棍山药皮中三个菲类化合物的含量测定 赵小磊，王非凡，赵莹菲，等

综述

（3609）提升难溶性药物口服吸收的脂质递送策略 李小花，胡罗娟，韩思飞

（3621）DNA 糖基化酶与肿瘤药物开发的研究进展 周杰，邓佳丽，刘思思，等

（3629）4 种莲子心生物碱的主要心血管药理作用研究进展 周佳，曾宾宇，寇舒豪，等

（3638）TLR4/NF- κ B 信号通路在神经退行性疾病中的研究进展 夏鋈涛，孙逸，何玲

（3647）“肠 - 皮”轴对皮肤疾病的影响及中药干预作用的研究进展 兰孝东，张喜武，窦金金

（3653）靶向 NAMPT 的抗肿瘤策略的研究进展 段玲雁，张永杰，陈西敬

药物分析与检验

（3661）基于指纹图谱结合化学模式识别技术对 15 个厂家的三黄片进行质量评价 王欣，李婷婷，刘莉，等

（3668）盐小茴香 HPLC 指纹图谱的建立及小茴香炮制前后成分差异分析 王宸，刘梦云，朱静平，等

（3674）LC-MS/MS 法测定盐酸托莫西汀口服溶液中遗传毒性杂质 冯文，王璐，傅萍，等

（3679）UPLC-MS/MS 法同时测定妇康片中 4 种生物碱的含量及其在质量控制中的应用 卢秋梅，王虹，顾利红，等

（3685）红背叶根及其混淆品的鉴别研究 ... 陈家仪，叶伟霞，侯惠婵，等

中药资源开发与利用

（3690）基于稻芽炮制原理及市场调研对《中国药典》稻芽炮制品标准修订的思考 杨超，李千，张海霞，等

（3696）关于按古代经典名方目录管理的中药复方制剂黄酒应用研究探讨 刘思焱，李灿，许文博，等

肖轶雯 谢 诚 徐必学 徐华丽
徐 萍 徐 珽 杨树龙 杨献文
杨星钢 杨志平 叶喜德 于海洋
袁 成 张程亮 张纯刚 张 峻
张 俐 章越凡 赵 娣 赵立波
赵 亮 赵龙山 赵 昕 郑杭生
周 权 朱荣华 邹振兴

青年编委（排名不分先后）

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

编辑：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。

医院药学

- (3701) 剖宫产术后低分子肝素预防血栓的疗效与影响因素研究
..... 温娟清, 熊慧婷, 唐子轩, 等
- (3708) 规范化培训阶段住院医师药学素养认知与评估研究
..... 李炳仪, 宋建飞, 刘超, 等
- (3714) 胰高血糖素样肽 -1 (GLP-1) 受体激动剂治疗 2 型糖尿病卫生技术评估 李鼎, 梁雨薇, 张丽, 等
- (3721) 患者分层评估的药学服务模式在老年慢性阻塞性肺疾病中的效果评价 梅玲, 周后凤, 范玉婷
- (3725) 医疗失效模式与效应分析法降低 PIVAS 药品调配残留率的应用
..... 陈天, 曹迪, 许菲, 等

临床药师在临床

- (3732) 临床药师对 1 例成人 Lemierre's 综合征患者的药学治疗管理实践
..... 李文妍, 肖云峰, 杨宏昕
- (3737) 卡泊芬净治疗新生儿术后念珠菌尿路感染的药学实践及文献复习
..... 曹静, 过晓雯, 赵昕
- (3742) 1 例多西环素联合羟氯喹治疗疑诊惠普尔养障肺部感染的药学监护 时绘绘, 李进, 袁耀辉
- (3746) 米卡芬净治疗光滑念珠菌尿路感染 1 例并文献复习
..... 俞冰芸, 徐小婷, 张鸿博

药品不良反应

- (3750) 1 例多奈哌齐过量导致的胆碱能综合征及文献回顾
..... 刘欢欢, 郭叙喜, 张宇, 等
- (3754) 基于 Vigibase 的阿杜那单抗不良事件的药物警戒研究
..... 黄雨馨, 黎媛媛, 刘丽梅, 等
- (3761) 磷酸奥司他韦致血管神经性水肿 1 例并文献复习
..... 贾东丽, 杨昊煜, 韩利平, 等

药事管理

- (3764) 药品安全风险信号检测方法与世界卫生组织乌普萨拉监测中心应用现状 钟露苗
- (3770) 三维分析框架下我国儿童药研发政策文本分析 ... 胡皓钰, 陈永法
- (3776) 纠正与预防措施来源、管理流程与实施要点及常见问题分析
..... 张平, 林艳君

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*m*A4*326*zh*P*30.0*700*49*2025-12

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 12 December 20 2025

Consultant

ZHOU Hong-hao

Editor-in-Chief

LI Huan-de

Chief of Editorial Department

WU Zhi-juan

Directed by

Hunan Association for Science and Technology

Edited by

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

Tel

(0731) 84895602/82258487

Website of Authors

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

Email

znyxzz2003@vip.163.com

Postal code

42-290

Publish

Editorial Department of Central South Pharmacy

Subscribe

Post office nationwide for subscription please contact the Publishing House of our journal

CONTENTS IN BRIEF

- (3455) Screening of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from *Pelodiscus sinensis* Wiegmann skirt based on simulated enzyme digestion and molecular docking
..... ZHANG Xinrui, JIAO Fangze, ZHANG Tianfeng, et al
- (3462) Mechanism of Yinhuo decoction for menopausal hot flashes in rats based on network pharmacology
..... FU Jinlei, WU Dongxue, WANG Yan, et al
- (3470) Spatial design prediction of the extraction of Xiao' er Lingyin decoction granules based on quality by design
..... CAI Yanli, SONG Xinli, CHEN Li, et al
- (3478) Hypolipidemic mechanism and efficacy of flavonoids from *Nelumbo nucifera* based on transcriptomics and PCR
..... HUANG Rong, YANG Leyi, ZHOU Chang, et al
- (3485) Therapeutic effect and mechanism of *Dendrobium huoshanense* on diabetes and diabetic liver injury in rats based on network pharmacology and molecular docking techniques
..... MU Wenyu, ZHANG Xueting, LI Jinmiao, et al
- (3494) Forced degradation of a combination formula composed of two monoclonal antibodies..... WU Chun, WANG Jing, CHEN Jiaoyu, et al
- (3503) Mechanism of Puhong Xingnao Yizhi formula against vascular dementia based on network pharmacology and experimental verification
..... XING Wantao, TANG Ju, YANG Yuting, et al
- (3514) Quality evaluation of Qushi Xiaozhi granules based on UPLC fingerprints and chemical pattern recognition
..... CHEN Sidi, YUE Fengqin, SUN Wanjin, et al
- (3520) Preparation of follicle-targeted nano-formulations and their ex vivo penetration
..... BAO Lingyun, FENG Xiangyang, CHEN Qianqian, et al
- (3528) Spectrum-effect relationship of *Artemisia rupestris* L. extracts with varying polarities for in vitro anti-HBV activity
..... CHENG Jiangnan, DING Man, CAI Xiaocui, et al
- (3534) A preliminary comparison of in vivo and in vitro components and action characteristics of compound Danshen preparations based on HPLC-MS/MS and bioinformatics CHEN Bin, MO Zunhui, YAN Rong, 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.

- (3544) Mechanism of Dictamn Cortex-induced liver injury via ferroptosis based on network pharmacology and in vitro experiments
..... HE Wenjie, SUN Huijuan, DENG Geyu, et al
- (3552) Impact of luteolin on gut microbiota in rats with fracture based on 16S rRNA sequencing ZHENG Li, WANG Hui, DING Yiheng, et al
- (3557) Evaluation of palatability of gargles commonly used in stomatology department ZHANG Ya, CHEN Jing, MU Changqing, et al
- (3564) Screening of hydrochlorothiazide-based deep eutectic system and pharmacodynamic evaluation..... XUE Ying, CAO Yejun, WANG Yinan, et al
- (3570) Mechanism and experimental verification of Buzhong Yiqi decoction for polycystic ovary syndrome based on network pharmacology
..... SUN Lei, SHEN Yanduo, ZHANG Jiale, et al
- (3578) Metabolomics in identification of *Angelica sinensis* Radix from various sources based on ultra high performance liquid chromatography-mass spectrometry
..... MA Qi, YANG Zefeng, ZHANG Zailei, et al
- (3585) Development and application of a UPLC-MS/MS method for the analysis of paclitaxel and 4 metabolites in human plasma
..... LI Sanwang, LI Jingjing, XIE Feifan
- (3593) Prediction of quality markers for Niu Huang Jiedu capsules based on fingerprint chromatography and network pharmacology
..... CHEN Qi, LI Xinru, FENG Li, et al
- (3600) Secondary metabolites from endophytic fungi *Fusarium* sp. L46 isolated from *Dioscorea opposita* Thunb.
..... WEN Chunnan, GE Menghuan, ZHAO Yingfei, et al
- (3605) Determination of three phenanthrenes in the peels of *Dioscorea opposita* Thunb. cv. Tiegun
..... ZHAO Xiaolei, WANG Feifan, ZHAO Yingfei, et al
- (3609) Lipid delivery strategies to enhance oral absorption of drugs with poor solubility LI Xiaohua, HU Luojuan, HAN Sifei
- (3621) Advances in DNA glycosylases and their therapeutic potential in cancer drug development ZHOU Jie, DENG Jiali, LIU Sisi, et al
- (3629) Research progress on the cardiovascular pharmacological effect of 4 Nelumbinis Plumula alkaloids
..... ZHOU Jia, ZENG Binyu, KOU Shuhao, et al
- (3638) Research progress in the role of TLR4/NF- κ B signaling pathway in neurodegenerative diseases XIA Juntao, SUN Yi, HE Ling
- (3647) Research progress on the effect of gut-skin axis on skin diseases and intervention with Chinese medicine
..... LAN Xiaodong, ZHANG Xiwu, DOU Jinjin
- (3653) Research progress on targeting NAMPT in cancer therapy
..... DUAN Lingyan, ZHANG Yongjie, CHEN Xijing

- (3661) **Quality evaluation of Sanhuang tablets from 15 manufacturers based on chromatographic fingerprints combined with chemometric pattern recognition** WANG Xin, LI Tingting, LIU Li, et al
- (3668) **HPLC fingerprints of salt-processed Foeniculi Fructus and its composition differences before and after the processing**
..... WANG Chen, LIU Mengyun, ZHU Jingping, et al
- (3675) **Determination of genotoxic impurities in atomoxetine hydrochloride oral solution by LC-MS/MS** FENG Wen, WANG Lu, FU Ping, et al
- (3679) **Simultaneous determination of four alkaloids in Fukang tablets by UPLC-MS/MS and their quality control**
..... LU Qiumei, WANG Hong, GU Lihong, et al
- (3685) **Identification of *Alchornea Trewioides* and its adulterants**
..... CHEN Jiayi, YE Weixia, HOU Huichan, et al
- (3690) **Revision of the standard of rice bud products in *Chinese Pharmacopoeia* based on the principle of rice bud processing and market research**
..... YANG Chao, LI Qian, ZHANG Haixia, et al
- (3696) **Role of rice wine in traditional Chinese medicine compound preparations developed from catalogued ancient classical prescriptions**
..... LIU Siyi, LI Can, XU Wenbo, et al
- (3701) **Efficacy and influence factors of low-molecular-weight heparin for thromboprophylaxis after cesarean section**
..... WEN Juanqing, XIONG Huiting, TANG Zixuan, et al
- (3708) **Perception and assessment of pharmacy competency of residents**
..... LI Bingyi, SONG Jianfei, LIU Chao, et al
- (3714) **Health technology assessment of glucagon-like peptide-1 receptor agonists for type 2 diabetes mellitus** LI Ding, LIANG Yuwei, ZHANG Li, et al
- (3721) **Effect of pharmaceutical care model with stratified patient evaluation in elderly patients with chronic obstructive pulmonary disease**
..... MEI Ling, ZHOU Houfeng, FAN Yuting
- (3725) **Healthcare failure mode and effect analysis in reducing drug residue rate during medication dispensing in PIVAS**
..... CHEN Tian, CAO Di, XU Fei, et al
- (3732) **Clinical pharmaceutical care and management for an adult patient with Lemierre's syndrome** LI Wenyang, XIAO Yunfeng, YANG Hongxin
- (3754) **Pharmacovigilance study of adverse events of aducanumab based on Vigibase** HUANG Yuxin, LI Yuanyuan, LIU Limei, et al
- (3764) **Detection methods for drug safety risk signals and current status of World Health Organization Uppsala Monitoring Center** ZHONG Lumiao
- (3770) **Text analysis of research and development policy for China's pediatric drug by a three-dimensional analytical framework**
..... HU Haoyu, CHEN Yongfa
- (3776) **Sources, implementation process, key points and common issues of corrective and preventive actions** ZHANG Ping, LIN Yanjun

论著

基于模拟酶切和分子对接筛选中华鳖裙边中的血管紧张素转化酶抑制肽

张新锐¹, 焦方泽¹, 张天丰¹, 刘华宇¹, 韦绩伟¹, 陈广琛¹, 陈俊^{2, 3}, 廖彭莹^{1*} (1. 广西中医药大学药学院, 南宁 530200; 2. 广西中医药大学, 广西高校中药神经-代谢及免疫药理重点实验室, 南宁 530200; 3. 广西中医药大学教学实验实训中心, 南宁 530200)

摘要: **目的** 从中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) 裙边蛋白质中发现新的血管紧张素转化酶 (ACE) 抑制肽。**方法** 采用 Shotgun 技术鉴定中华鳖裙边蛋白质, 从中随机选择 20 个蛋白质进行模拟酶切, 对模拟酶切产生的肽段进行潜在活性评分及理化性质预测。采用分子对接技术分析活性肽与 ACE 的相互作用, 优选肽段进行固相合成和体外 ACE 抑制活性验证。**结果** 筛选出菠萝蛋白酶为模拟酶切的最适蛋白酶, 从所产生肽段中筛选出 60 条肽段, 其中具有潜在 ACE 抑制活性的肽段共 22 条。分子对接结果显示, 22 条肽段均能与 ACE 紧密结合。合成其中 2 条潜在活性评分最高的新肽 DMKHWPF 和 KDPDMMWDF, 经验证两者均具有体外 ACE 抑制活性, 其半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 $(642.27 \pm 26.04) \mu\text{mol/L}$ 和 $(4.06 \pm 0.20) \mu\text{mol/L}$ 。**结论** 将生物信息学工具与分子对接技术结合, 同时开展实验验证, 能够从随机选择的蛋白质中有效发现新的 ACE 抑制肽。

关键词: 中华鳖裙边; 模拟酶切; 血管紧张素转化酶抑制肽; 分子对接

中图分类号: TS254.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)12-3455-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.001

Screening of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from *Pelodiscus sinensis* Wiegmann skirt based on simulated enzyme digestion and molecular docking

ZHANG Xinrui¹, JIAO Fangze¹, ZHANG Tianfeng¹, LIU Huayu¹, WEI Jiwei¹, CHEN Guangchen¹, CHEN Jun^{2, 3}, LIAO Pengying^{1*} (1. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200; 2. Key Laboratory of Chinese Medicine Neuro-metabolism and Immunopharmacology, of Guangxi Education Commission, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200; 3. Teaching Experiment and Training Centre, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200)

Abstract: **Objective** To identify the new angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from proteins of *Pelodiscus sinensis* Wiegmann skirt. **Methods** The proteins of *Pelodiscus sinensis* Wiegmann skirt were identified by Shotgun method. Subsequently, 20 proteins were randomly chosen for simulated enzymatic digestion, and the potential ACE inhibitory activity scores and physicochemical properties of the peptides were predicted. Molecular docking was then used to determine interactions between potential active peptides and ACEs. Selected peptides were synthesized via solid-phase synthesis and experimentally validated for their in vitro ACE inhibitory activity. **Results** Bromelain was screened out as the optimal

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (No.82560762, No.81960698); 广西中医药大学“桂派中医药传承创新团队”资助项目 (No. 2022A005); 2023 年度广西高校中青年教师科研基础能力提升项目 (No. 2023KY0289); 广西中医药大学 2024 年校级大学生创新创业训练计划 (No. X202410600076); 广西高校中药药理重点实验室资助项目 (No. 05J16074)。

作者简介: 张新锐, 女, 硕士研究生, 主要从事中药化学成分研究, email: 2894473065@qq.com * **通信作者:** 廖彭莹, 女, 教授, 主要从事中药化学研究, email: gxlp@163.com

protease for the simulated enzymatic digestion of the 20 proteins. From the pool of generated peptides, 60 were shortlisted, with 22 peptides demonstrating potential ACE inhibitory activity. The molecular docking showed that all the 22 peptides bound tightly to ACE. Two new peptides with the highest potential activity scores, DMKHWPF and KDPDMMWDF, were synthesized. Both were verified to possess in vitro ACE inhibitory activity, with IC_{50} of $(642.27 \pm 26.04) \mu\text{mol/L}$ and $(4.06 \pm 0.20) \mu\text{mol/L}$, respectively.

Conclusion Combining bioinformatics tools with molecular docking and simultaneous experimental verification help effectively discover novel ACE inhibitory peptides from randomly selected proteins.

Key words: *Pelodiscus sinensis* Wiegmann skirt; virtual enzymatic hydrolysis; angiotensin converting enzyme inhibitory peptide; molecular docking

高血压是血液在流动时对血管壁造成的压力值持续异常增高的现象,临床以血管收缩压/舒张压作为诊断指标^[1]。近年来,我国高血压患病人数持续增多,根据《中国心血管健康与疾病报告 2023》,2020 至 2022 年,我国成人高血压患病率为 31.6%^[2],且患病年龄日趋年轻化,这主要与人们的不良生活方式有关,包括缺乏运动和食用过多加工食品引起的肥胖、过量饮酒和吸烟等^[3]。血管紧张素转化酶(angiotensin converting enzyme, ACE)抑制剂是高血压的一线治疗药物,主要通过抑制 ACE II 的合成,舒张血管、排钠和减少交感神经活动,从而降低血压^[4]。常用 ACE 抑制剂类药物如卡托普利等,在临床应用中常伴随胃肠道反应,引起呕吐、眩晕、头痛等不良反应^[5],因此开发和寻找新的 ACE 抑制剂至关重要。天然蛋白质来源的 ACE 抑制肽具有分子量小、水溶性好、稳定性强、吸收度高、安全无毒等特点,具有良好的应用前景^[6]。

中华鳖(*Pelodiscus sinensis* Wiegmann)为龟鳖目鳖科动物,又名甲鱼,是淡水养殖的重要品种,具有较高的药用和食用价值^[7]。鳖裙边是鳖甲周围的结缔软组织,味道鲜美,胶原蛋白丰富,是最滋补的部分^[8]。研究表明,鳖裙边胶原蛋白具有抗氧化活性,经中性蛋白酶酶解后抗氧化活性显著提升,这与酶解物中含有很多抗氧化的氨基酸有关^[9-10]。

生物信息学工具的融合应用在新的 ACE 抑制肽的筛选中已取得大量成功^[11],前期本课题组采用计算机辅助酶切及多种活性评价软件,结合实验验证,从鳖肉中发现了 1 条新的 ACE 抑制肽^[12],从鳖蛋黄中筛选鉴定了 2 条新的 ACE 抑制肽^[13]。本研究拟进一步验证此研究流程的实用性和有效性,以中华鳖裙边蛋白质为研究对象,采用 Shotgun 技术鉴定其蛋白质组成,从中随机选择 20 条蛋白质进行模拟酶切,对所得肽段进行潜在活性评分及理化性质预测,利用分子对接

技术分析潜在活性肽段与 ACE 之间的相互作用,结合实验验证,挖掘中华鳖裙边蛋白质中蕴含的新的 ACE 抑制肽,以期为 ACE 抑制剂类药物的研究提供更多备选单体,同时加强对鳖裙边食疗保健价值的深入研究。

1 材料

1.1 试药

甲鱼于 2019 年 12 月购于云南玉溪,经广西中医药大学朱意麟实验师鉴定为鳖科动物甲鱼(*Pelodiscus sinensis*),宰杀后取裙边部位切碎、冻干。

马尿酸-组胺酰-亮氨酸(Hippuryl-His-Leu-OH, HHL)、ACE(美国 Sigma 公司);甲醇、乙腈(美国赛默飞世尔科技公司);盐酸、氯化钠(国药集团化学试剂有限公司);硼酸、硼酸钠(西陇科学股份有限公司);蛋白测定试剂盒(美国 Bio-Rad 公司);胰蛋白酶(美国 Promega 公司)。

1.2 仪器

高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);Microcon 离心式过滤器 10 kDa(美国 Millipore 公司);C18 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm)、Acclaim PepMap 100 C18 HPLC 色谱柱(100 μm ×2 cm, nanoViper C18)、EASY-Spray HPLC 色谱柱(75 μm ×10 cm, 3 μm)(美国赛默飞世尔科技公司)。

2 方法

2.1 中华鳖裙边蛋白质鉴定

2.1.1 样品制备 参照 Carrera 等^[14]的方法进行中华鳖裙边蛋白质的提取,取中华鳖裙边加入适量 SDT 裂解液(4% SDS、0.15 mol/L pH 8.0 Tris-HCl 和 0.1 mol/L DTT),转移至预先装有适量石英砂的 2 mL 离心管中,匀浆破碎、超声,沸水浴 10 min, 14 000 g 离心 30 min。取上清液过滤,收集滤液即得样品,采用胰蛋白酶进行消化,再经 Empore SPE Cartridges C18 脱盐后,进行真空离心浓缩,再复溶于 40 μL 0.1% (V/V) 甲酸溶液,待上机分析。

2.1.2 色谱条件 对中华鳖裙边蛋白质进行 LC-MS/MS 分析, 采用纳升级流速 HPLC 液相系统 Easy nLC 进行分离, 依次连接 Acclaim PepMap 100 C18 HPLC 色谱柱及 EASY-Spray HPLC 色谱柱, 流动相 A: 0.1% 甲酸溶液, 流动相 B: 含 0.1% 甲酸的 84% 乙腈溶液, 梯度洗脱 (0 ~ 110 min, 0% ~ 55%B; 110 ~ 115 min, 55% ~ 100%B; 115 ~ 120 min, 100%B), 流速 300 nL/min, 进样量 3 μ L。

2.1.3 质谱条件 使用 Q-Exactive 质谱仪进行分析, 在正离子模式下进行检测, 母离子扫描范围 300 ~ 1800 m/z , 一级质谱分辨率为 70 000 m/z , 注入时间为 10 ms, 动态排除时间为 40.0 s, 二级质谱分辨率为 17 500 m/z , 设置隔离窗口 2 m/z 。多肽和多肽碎片采用数据依赖型扫描程序, 每次全扫描后采集 10 个信号强度最高母离子的二级质谱数据。自动增益控制 (AGC) 目标设置为 3×10^6 , 归一化碰撞能量为 30 eV。

使用 MaxQuant 1.5.3.17 软件对中华鳖裙边蛋白质的质谱原始数据进行检索, 进行鉴定和定量分析, 蛋白数据库为 uniprot_pelodiscus_21021_20220329.fasta。检索参数: enzyme 为 Trypsin; 遗漏酶切位点为 2; 固定修饰 Carbamidomethyl (C), 可变修饰 Oxidation (M)。

2.2 模拟酶切

利用 BIOPEP-UWM (<https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm/>) 的 “Enzyme action” 程序, 选用胃肠主要消化酶 [糜蛋白酶 (EC 3.4.21.1)、胰蛋白酶 (EC 3.4.21.4)、胃蛋白酶 (pH 值 1.3) (EC 3.4.23.1)] 以及 3 种常用的商用蛋白酶 [木瓜蛋白酶 (EC 3.4.22.2)、菠萝蛋白酶 (EC 3.4.22.32) 和碱性蛋白酶 (EC 3.4.21.62)]。分别对随机选择的 20 条蛋白质进行模拟酶切, 根据 ACE 抑制肽理论释放量 (A_E), 优选模拟酶切每种蛋白质的最优蛋白酶。

2.3 肽段生物活性及理化性质预测

将 20 条蛋白质模拟酶切后产生的肽段合并, 利用 BIOPEP-UWM 和 AHTPDB 数据库 (<http://crdd.osdd.net/raghava/ahtpdb/>)^[15] 进行检索, 将未报道的肽段导入 Peptide Ranker 数据库 (<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/>) 进行潜在活性评分, 选择评分不小于 0.5 的肽段进行进一步研究^[16]。

使用 Innovagen 数据库 (<http://www.innovagen.com/>) 对肽段水溶性进行预测, 然后将水溶性好的肽段导入 ToxinPred 数据库 (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred/index.html>)^[17-18] 中进行毒性预测, 将无毒的肽段转化为 SMILE 格式, 使用 ADMET lab (<https://admetmesh.scbdd.com>)^[19], 对

其进行药代动力学性质预测, 以人体肠道吸收 (human intestinal absorption, HIA) 为指标, 筛选出具备良好肠道吸收活性的肽段进行进一步研究。

2.4 蛋白质或肽段潜在 ACE 抑制活性预测

利用 BIOPEP-UWM 的 “Calculations” 程序, 对蛋白质或肽段进行 ACE 抑制活性预测, 选择其中 ACE 抑制肽出现频率 (A 值) 大于 0 的蛋白质或肽段进行研究^[20]。 $A = a/N \times 100$, 式中: a 为蛋白质或肽段序列中 ACE 抑制肽片段的数量, 不包括重复序列; N 为蛋白质或肽段中氨基酸残基的数量。

2.5 分子对接

从 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 中获得 ACE 结构 (PDB ID: 1O86), 使用 PyMol 删除已结合配体与水分子, 对 ACE 结构进行预处理, 将其坐标设置为: center_x = 40.562, center_y = 37.388, center_z = 43.476; size_x = 126, size_y = 126, size_z = 126, 其他参数均采用默认值^[13, 21]。使用 Autodock vina 软件 (<http://vina.scripps.edu>) 进行分子对接, 筛选与 ACE 紧密结合的肽段, 使用 PyMol 软件进行可视化处理。

2.6 ACE 抑制肽的体外合成和活性验证

选择筛选出的肽段中 Peptide Ranker 评分最高、水溶性好、无毒、肠道吸收活性较好、 A 值大于 0 且与 ACE 结合自由能小于 0 kJ/mol 的两条肽段, 进行固相合成。肽段合成委托上海吉尔生化公司进行, 纯度 95%。参照 Liao 等^[12] 方法进行体外 ACE 抑制活性验证, 以 HHL 为底物, 测定生成的马尿酸 (HA) 含量, 据此评价 ACE 抑制活性, 空白溶液为硼酸盐缓冲液 (BBS), ACE 抑制率 (%) = (空白溶液反应后生成的 HA - 样品反应后生成的 HA) / 空白溶液反应后生成的 HA $\times 100\%$ 。

2.7 数据统计与分析

使用 Microsoft Excel 2019 进行数据处理, 使用 Origin 2024 进行作图分析, 活性结果均以至少 3 次独立实验的 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果与分析

3.1 中华鳖裙边蛋白质鉴定结果

从中华鳖裙边中, 共鉴定出 945 条蛋白质, 蛋白质分子量范围较为集中, 分布于 10 ~ 60 kDa。iBAQ 值 (intensity-based absolute quantification) 是基于强度定量法, 用于表征该蛋白质绝对丰度^[22-23]。本研究中 iBAQ 值较高的蛋白质有核心蛋白聚糖 Decorin、I 型胶原蛋白、VI 型胶原蛋白、XII 型胶原蛋白、Lumican、Mimecan、骨膜蛋白、热休克蛋白 B1 相关蛋白 1、转铁蛋白和人血白蛋白等。利用 BIOPEP-UWM 程序评价中华鳖裙边蛋

白质中 ACE 抑制肽段占比整体情况,其中 A 值最大为 0.9811,为 I 型胶原蛋白 $\alpha 1$,值得注意的是 A 值前 20 的蛋白质中有 18 条属于胶原蛋白,结果见表 1。

表 1 A 值前 20 的中华鳖裙边蛋白质
Tab 1 Top 20 *Pelodiscus sinensis* Wiegmann skirt proteins with A values

蛋白质名称	Accession 编号	氨基酸残基数 / 个	A	蛋白质名称	Accession 编号	氨基酸残基数 / 个	A
I 型胶原蛋白 $\alpha 1$ (片段)	S5WCY5	212	0.9811	IV 型胶原蛋白 $\alpha 2$ 链	K7G1H5	1610	0.8298
VIII 型胶原蛋白 $\alpha 2$ 链	K7FUK3	661	0.9546	X VI 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链	K7GFJ6	908	0.8172
IV 型胶原蛋白 $\alpha 5$ 链	K7FLN4	1445	0.9322	XI 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链	K7FL41	1804	0.8093
X X III 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链	K7GFU6	365	0.9151	V 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链	K7GDP6	1859	0.8015
I 型胶原蛋白 $\alpha 2$ 链	K7G8R1	1366	0.8792	III 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链	K7FNA4	1465	0.7945
IV 型胶原蛋白 $\alpha 6$ 链	K7GE53	1692	0.8788	X X VIII 型胶原蛋白 $\alpha 1$	K7F9F2	788	0.7487
X XI 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链	K7G3E4	430	0.8581	X V 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链	K7GJW5	1289	0.7137
I 型 $\alpha 1$ 胶原蛋白	K7FHL1	1444	0.8490	半乳糖素	K7FX67	290	0.7069
VII 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链	K7G400	1173	0.8474	X VII 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链	K7G0V5	1502	0.6884
V 型胶原蛋白 $\alpha 2$ 链	K7GFE1	1464	0.8402	不均一核糖核蛋白 H3	K7FJ53	326	0.6810

3.2 中华鳖裙边 20 条蛋白质的模拟酶切

从中华鳖裙边已鉴定的蛋白质中随机选择 20 条蛋白质,见表 2,其中 A 值最大为 0.5933,最小为 0.2830。分别对 20 条蛋白质进行模拟酶切,预测理论水解度 ($DH_t\%$)、 A_E 和 ACE 抑制肽相对理论释放量 (W)。

以 A_E 为评价指标,筛选每个蛋白质模拟酶

切的最适蛋白酶,结果如表 3 所示,有 13 条蛋白质模拟酶切的最适蛋白酶是菠萝蛋白酶,其余 7 条蛋白质模拟酶切 $DH_t\%$ 最大的是菠萝蛋白酶,但 A_E 和 W 最大的是木瓜蛋白酶。 $DH_t\%$ 代表了酶解的有效性,数值越大表明这种酶的适应性越宽。综上,选择菠萝蛋白酶对这 20 条蛋白质进行模拟酶切。

表 2 从中华鳖裙边已鉴定蛋白质中随机选择的 20 条蛋白质
Tab 2 20 proteins randomly selected from the identified proteins of *Pelodiscus sinensis* Wiegmann skirt

蛋白质名称	Accession 编号	氨基酸残基数 / 个	A	蛋白质名称	Accession 编号	氨基酸残基数 / 个	A
3- 磷酸甘油醛脱氢酶	Q5R2J2	333	0.4775	40S 核糖体蛋白 S6 (片段)	A0PAH1	197	0.5228
溶菌酶 C	Q7LZQ1	131	0.4275	热休克同源蛋白 70	E2JFA5	646	0.4721
L- 乳酸脱氢酶	K7FJW2	333	0.3874	诱导热休克蛋白 70	F5CI36	635	0.4709
L- 乳酸脱氢酶 A 链	Q98SL0	332	0.4036	超氧化物歧化酶 (片段)	G1FAE8	150	0.5933
半胱天冬酶 1	K7F9M9	348	0.4425	肌酸激酶	K7G7R1	381	0.4698
多聚体 IgA 和 IgM 的连接链	K7G1C9	159	0.2830	过氧化氢酶	J9QGW1	528	0.4508
肌酸激酶	A0A0G3FEK6	381	0.4882	核糖体蛋白 S14 (片段)	K4HA21	111	0.3604
肌酸激酶	K7GC08	419	0.4606	异质核糖核蛋白 A0	K7EW75	265	0.5660
细胞色素 C 氧化酶亚基 2	Q6B3D4	228	0.3947	含 14-3-3 结构域蛋白	K7EWQ2	250	0.4120
过氧化物还原酶	A0A6B9RHT1	199	0.4673	组蛋白 H2B	K7F0U0	126	0.4524

3.3 肽段活性、毒性、水溶性以及 HIA 性质预测

去除其中重复的肽段和已经报道的肽段,使用 Peptide Ranker 对肽段进行潜在活性预测,得到评分高于 0.5 的肽段共计 146 条,包含二肽 35 条、三肽 62 条、四肽 20 条、五肽 17 条、六肽 7 条、七肽 2 条、八肽 1 条、九肽 1 条、十肽 1 条。对肽段的氨基酸进行统计分析,发现其 N 端氨基酸, C 端氨基酸以疏水性氨基酸为主,其中 Phe (40 条)、Leu (38 条)、Gly (23 条) 及 Arg (15 条),约占总肽段的 79.45%,见图 1。对其依次进行毒性预测、水溶性预测及 HIA 性质预测,得到无毒、水溶性及 HIA 性质良好的 32 条肽段,见表 4。

3.4 肽段潜在 ACE 抑制活性预测结果

使用 BIOPEP 数据库中“profiles of potential biological activity”模块对 32 条肽进行 ACE 抑制活性预测,分析其所含活性肽段,利用“Calculations”模块计算肽段的 A 值, A 值越高,表明其具备 ACE 抑制活性的潜力就越大。除去已报道的 ACE 抑制肽,共筛选得到 22 条新的具有潜在 ACE 抑制活性的肽,结果见表 5。

3.5 分子对接分析

将 22 条新的具有潜在 ACE 抑制活性的肽段与 ACE 进行分子对接,当结合能小于 0 kJ/mol 时,结合能相对越高,结合越紧密,如表 6 所示,22 条肽与 ACE 的结合能均小于 0 kJ/mol,说明这 22 个肽均能与 ACE 产生较强的作用力。

表 3 从中华鳖裙边中随机选择的 20 条蛋白质的模拟酶切结果

Tab 3 Simulated enzymatic hydrolysis of 20 proteins selected by random from *Pelodiscus sinensis* Wiegmann skirt

Accession 编号	iBAQ	蛋白酶	DH _i %	A _E	W
Q5R2J2	6723.5	菠萝蛋白酶	53.8012	0.0962	0.2075
Q7LZQ1	3213.9	菠萝蛋白酶	41.7910	0.0593	0.1430
K7FJW2	15 861	木瓜蛋白酶	33.3333	0.0437	0.1180
		菠萝蛋白酶	51.1696	0.0350	0.0945
Q98SL0	36 680	菠萝蛋白酶	51.6129	0.0439	0.1137
K7F9M9	818.8	木瓜蛋白酶	39.7759	0.0503	0.1217
		菠萝蛋白酶	52.9412	0.0419	0.1014
K7G1C9	40 238	菠萝蛋白酶	50.0000	0.0307	0.1137
A0A0G3FEK6	274 530	菠萝蛋白酶	46.9388	0.0433	0.0930
K7GC08	2464.2	木瓜蛋白酶	36.7442	0.0510	0.1151
		菠萝蛋白酶	50.0000	0.0371	0.0837
Q6B3D4	1910.4	菠萝蛋白酶	45.0644	0.0556	0.1478
A0A6B9RHT1	13 795	木瓜蛋白酶	35.7843	0.0439	0.0989
		菠萝蛋白酶	48.0392	0.0390	0.0879
A0PAH1	10 458	菠萝蛋白酶	52.4752	0.0837	0.1666
E2JFA5	50 295	菠萝蛋白酶	49.6241	0.0571	0.1272
F5CI36	10 604	菠萝蛋白酶	49.3884	0.0641	0.1433
G1FAE8	6848.9	木瓜蛋白酶	40.5229	0.1039	0.1839
		菠萝蛋白酶	50.3268	0.0909	0.1609
K7G7R1	15 714	木瓜蛋白酶	37.7551	0.0458	0.1011
		菠萝蛋白酶	48.2143	0.0433	0.0956
J9QGW1	1734.1	木瓜蛋白酶	35.9116	0.0551	0.1275
		菠萝蛋白酶	46.2247	0.0441	0.1021
K4HA21	43 003	菠萝蛋白酶	59.8214	0.0442	0.1281
K7EW75	9687.7	菠萝蛋白酶	59.5588	0.0696	0.1275
K7EWQ2	3448.9	菠萝蛋白酶	45.5253	0.0465	0.1188
K7F0U0	459 080	菠萝蛋白酶	51.1628	0.0538	0.1272

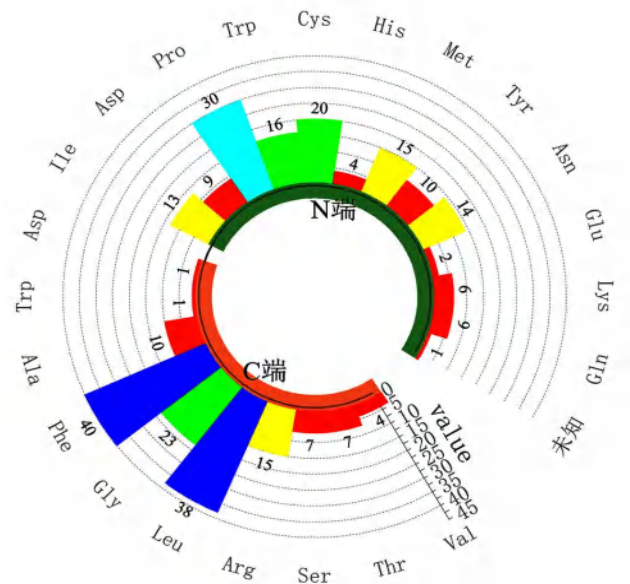


图 1 菠萝蛋白酶模拟酶切获得的肽段 N 端和 C 端氨基酸组成图
Fig 1 Amino acid compositions at N-and C-termini of peptides from bromelain simulated digestion

表 4 肽段筛选结果

Tab 4 Screening results of the peptides

肽段	活性评分	水溶性	毒性	小肠黏膜吸收能力
WIR	0.900 069	好	无毒	+
QWIKG	0.600 450	好	无毒	+
DMKHWP	0.938 591	好	无毒	+
KDPDMMWDF	0.917 301	好	无毒	+
MKF	0.919 277	好	无毒	+
WPHKDHPL	0.806 255	好	无毒	+
WKPG	0.887 507	好	无毒	+
INDPF	0.806 407	好	无毒	+
WEF	0.944 321	好	无毒	+
PDYL	0.657 739	好	无毒	+
IDDF	0.625 281	好	无毒	+
DWV	0.570 841	好	无毒	+
DWPDA	0.739 045	好	无毒	+
DCL	0.689 952	好	无毒	+
WYDNEF	0.775 047	好	无毒	+
DYPDL	0.638 707	好	无毒	+
YDDL	0.657 073	好	无毒	+
NDIF	0.664 278	好	无毒	+
NCPYR	0.822 968	好	无毒	+
DWPDG	0.856 787	好	无毒	+
NDNF	0.614 403	好	无毒	+
IDF	0.766 403	好	无毒	+
ICR	0.683 216	好	无毒	+
MQR	0.540 802	好	无毒	+
CYPD	0.733 631	好	无毒	+
MPDG	0.750 668	好	无毒	+
YCKF	0.891 709	好	无毒	+
PDCML	0.920 724	好	无毒	+
PDKML	0.67 0190	好	无毒	+
NPDHL	0.553 493	好	无毒	+
KQF	0.601 145	好	无毒	+
MDG	0.676 555	好	无毒	+

注：“+”表示该肽段具有良好的肠道吸收。

Note: “+” indicates that the peptide segment has good intestinal absorption.

ACE 的活性位点由 3 个关键活性口袋 (S1、S1’ 和 S2’) 和一个锌结构域组成。其中 S1 口袋包含 3 个关键氨基酸残基, 即 Ala354、Glu384 和 Tyr523; S1’ 口袋有 1 个关键残基 Glu162; S2’ 口袋包括 5 个关键氨基酸残基, 即 Gln281、His353、His513、Tyr520、Lys511; 锌结合结构域包含 3 个残基, 即 His383、His387 和 Glu411^[24]。

选择 Peptide Ranker 评分最高的 2 条肽 DMKHWP、KDPDMMWDF 进行结合点可视化分析, 结果见图 2, 肽 DMKHWP 与 ACE 活性结构域具有 3 个结合位点, ARG-522 2.6 Å、ARG-402 2.1 Å、TYR-394 2.2 Å; 肽 KDPDMMWDF 与 ACE 活

表 5 潜在 ACE 抑制活性肽段
Tab 5 Potential ACE inhibitory peptides

肽段	A 值	潜在 ACE 抑制活性肽段
WIR	0.3333	IR
QWIKG	0.2000	KG
DMKHWPF	0.1429	DM
KDPDMMWDF	0.4444	DF、DM、MM、MW
MKF	0.3333	KF
WPHKDHPL	0.5000	PL、HP、PH、HK
WKPG	0.5000	PG、KP
WEF	0.3333	EF
PDYL	0.5000	YL、DY
DWPDA	0.2000	DA
WYDNEF	0.1667	EF
DYPDL	0.6000	YP、DY、DL
YPDL	0.5000	YP、DL
NDIF	0.2500	IF
DWPDG	0.2000	DG
NDNF	0.2500	NF
IDF	0.3333	DF
CYPD	0.2500	YP
MPDG	0.2500	DG
YCKF	0.2500	KF
NPDHL	0.2000	HL
MDG	0.3333	DG

表 6 肽段与 ACE 活性位点结合数和结合自由能
Tab 6 Number of peptide-ACE binding interactions and binding free energy

肽段	ACE 结合数	结合自由能 / (kJ/mol)
WIR	7	- 8.9
QWIKG	6	- 7.9
DMKHWPF	3	- 8.8
KDPDMMWDF	9	- 8.1
MKF	3	- 6.9
WPHKDHPL	5	- 8.7
WKPG	4	- 7.7
WEF	2	- 8.5
PDYL	3	- 8.2
DWPDA	5	- 6.4
WYDNEF	3	- 8.8
DYPDL	4	- 8.0
YPDL	5	- 7.9
NDIF	8	- 7.2
DWPDG	4	- 7.5
NDNF	10	- 7.4
IDF	7	- 7.4
CYPD	6	- 7.1
MPDG	8	- 7.0
YCKF	8	- 8.3
NPDHL	5	- 7.6
MDG	6	- 5.2

性结构域具有 9 个结合位点, TYR-62 2.5 Å 2.3 Å、ASN-66 2.2 Å 2.6 Å、ASN-70 2.4 Å、SER-355 2.9 Å、ARG-552 1.9 Å 2.2 Å 2.4 Å。

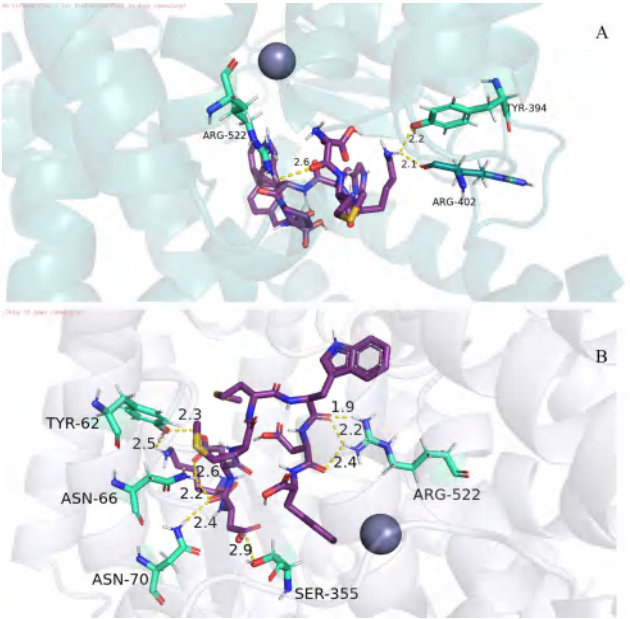


图 2 肽 DMKHWPF (A) 及肽 KDPDMMWDF (B) 与 ACE 活性结构域对接图

Fig 2 Docking diagram of the peptide DMKHWPF (A) and peptide KDPDMMWDF (B) with ACE

3.6 体外 ACE 活性测定结果

将肽 DMKHWPF、KDPDMMWDF 进行固相合成, 测定体外 ACE 抑制活性, 肽 DMKHWPF 的 IC_{50} 值为 $(642.27 \pm 26.04) \mu\text{mol/L}$, 肽 KDPDMMWDF 的 IC_{50} 值为 $(4.06 \pm 0.20) \mu\text{mol/L}$ 。肽 KDPDMMWDF 的 A 值更高, 含有更多的 ACE 抑制活性肽段, 与 ACE 具有更多的结合位点, 其 C 端具有带正电的赖氨酸, 加强了其对 ACE 抑制活性^[25]。在分子对接中, 高结合能的分子更可能具有高活性, 但分子对接仅考虑了蛋白与小分子间的相互作用, 忽略了活性测定的其他影响因素, 因此与活性测定结果不一致。

4 结论与展望

本研究以中华鳖裙边为研究对象, 对其蛋白质组成进行了 Shotgun 分析, 随机选择其中 20 条蛋白质进行模拟酶切, 综合分析 $DH_t\%$ 、 A_E 和 W , 确定菠萝蛋白酶为模拟酶切最适蛋白酶。对经模拟酶切产生的肽段进行活性、毒性、水溶性和 HIA 性质预测, 最终筛选出 32 条肽段, 并预测 22 条新的具有潜在 ACE 抑制活性的肽段。分子对接显示这 22 条肽段均与 ACE 具有较强结合能力。选取其中 2 条 Peptide Ranker 评分最高的肽段 DMKHWPF 和 KDPDMMWDF 进行固相合成及活性验证, 两者均具有体外 ACE 抑制活性, IC_{50} 值

分别为 $(642.27 \pm 26.04) \mu\text{mol/L}$ 和 $(4.06 \pm 0.20) \mu\text{mol/L}$ 。随机选择中华鳖裙边蛋白质经模拟酶切后,可以获得新的 ACE 抑制肽,表明以模拟酶切方法寻找新的活性肽具有较强的可行性,将其与分子对接技术结合,更能有效高效地进行活性肽的筛选分析。本研究筛选出 2 条新的 ACE 抑制活性肽,可为天然来源的 ACE 抑制肽的开发提供参考,同时可为中华鳖裙边蛋白质的资源利用提供有益参考。

参考文献

- [1] 中国高血压防治指南修订委员会, 高血压联盟(中国), 中国医疗保健国际交流促进会高血压病学分会, 等. 中国高血压防治指南(2024 年修订版)[J]. 中华高血压杂志(中英文), 2024, 32(7): 603-700.
- [2] 刘明波, 何新叶, 杨晓红, 等.《中国心血管健康与疾病报告 2023》要点解读[J]. 中国心血管杂志, 2024, 29(4): 305-324.
- [3] Wang JG, Zhang W, Li Y, et al. Hypertension in China: epidemiology and treatment initiatives[J]. Nat Rev Cardiol, 2023, 20(8): 531-545.
- [4] Khurana V, Goswami B. Angiotensin converting enzyme (ACE)[J]. Clin Chim Acta, 2022, 524: 113-122.
- [5] Na Takuathung M, Sakuludomkan W, Khatsri R, et al. Adverse effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors in humans: a systematic review and meta-analysis of 378 randomized controlled trials[J]. Int J Environ Res Public Health, 2022, 19(14): 8373.
- [6] Xiang L, Qiu ZC, Zhao RJ, et al. Advancement and prospects of production, transport, functional activity and structure-activity relationship of food-derived angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2023, 63(10): 1437-1463.
- [7] 廖彭莹, 张天丰, 邓纭宁, 等. 鳖各部位的成分和药理作用研究进展[J]. 中药材, 2024, 47(4): 1053-1061.
- [8] Wang F, Chen Z, Cheng YS, et al. Nutritional evaluation of two strains of Chinese soft-shelled turtle, *Pelodiscus sinensis* [J]. J Food Compos Anal, 2021, 101: 103971.
- [9] 邹烨, 蔡盼盼, 王立, 等. 中华鳖裙边胶原蛋白酶解物在猪肉糜中抗氧化效果[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(5): 1157-1163.
- [10] 张强, 黄鑫, 符安卫, 等. 中华鳖裙边胶原蛋白的提取、鉴定及其理化性质[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(12): 176-182.
- [11] Du Z, Comer J, Li YH. Bioinformatics approaches to discovering food-derived bioactive peptides: reviews and perspectives[J]. Trends Anal Chem, 2023, 162: 117051.
- [12] Liao PY, Liu HY, Sun XQ, et al. A novel ACE inhibitory peptide from *Pelodiscus sinensis* Wiegmann meat water-soluble protein hydrolysate [J]. Amino Acids, 2024, 56(1): 40.
- [13] 刘华宇, 廖彭莹, 张天丰, 等. 鳖蛋黄血管紧张素转化酶抑制肽分离纯化及活性分析[J]. 食品科学, 2025, 46(1): 40-48.
- [14] Carrera M, Pazos M, Aubourg SP, et al. Shotgun proteomics and protein-based bioinformatics for the characterization of food-derived bioactive peptides [J]. Methods Mol Biol, 2021, 2259: 215-223.
- [15] Kumar R, Chaudhary K, Sharma M, et al. AHTPDB: a comprehensive platform for analysis and presentation of antihypertensive peptides [J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43: D956-D962.
- [16] Mooney C, Haslam NJ, Pollastri G, et al. Towards the improved discovery and design of functional peptides: common features of diverse classes permit generalized prediction of bioactivity [J]. PLoS One, 2012, 7(10): e45012.
- [17] Gupta S, Kapoor P, Chaudhary K, et al. In silico approach for predicting toxicity of peptides and proteins [J]. PLoS One, 2013, 8(9): e73957.
- [18] Gupta S, Kapoor P, Chaudhary K, et al. Peptide toxicity prediction [J]. Methods Mol Biol, 2015, 1268: 143-157.
- [19] Dong J, Wang NN, Yao ZJ, et al. ADMETlab: a platform for systematic ADMET evaluation based on a comprehensively collected ADMET database [J]. J Cheminform, 2018, 10(1): 29.
- [20] 陈曦雅, 邵志远, 潘月新, 等. 大黄鱼蛋白中 α -葡萄糖苷酶抑制肽的虚拟筛选[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2024, 41(6): 62-68.
- [21] Chen JB, Yu XD, Chen QZ, et al. Screening and mechanisms of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from rabbit meat proteins: a combined in silico and in vitro study [J]. Food Chem, 2022, 370: 131070.
- [22] 常晋霞, 汪宜, 张帆, 等. 液相色谱-高分辨质谱结合蛋白质组学技术分析曲妥珠单抗耐药胃癌细胞的转录因子[J]. 分析化学, 2019, 47(7): 1035-1049.
- [23] Schwanhäusser B, Busse D, Li N, et al. Global quantification of mammalian gene expression control [J]. Nature, 2011, 473: 337-342.
- [24] Amaya JAG, Cabrera DZ, Matallana AM, et al. In-silico design of new enalapril analogs (ACE inhibitors) using QSAR and molecular docking models [J]. Inform Med Unlocked, 2020, 19: 100336.
- [25] 孙强, 王瑞丹, 黄纪念, 等. 亚临界水制备芝麻 ACE 抑制肽的分离纯化、构效、分子对接[J]. 食品科学, 2023, 44(16): 106-112.

(收稿日期: 2025-03-03; 修回日期: 2025-05-20)

基于网络药理学探究引火汤改善更年期潮热模型大鼠症状的作用机制研究

付金蕾¹, 吴东雪¹, 王堰¹, 刘嘉璐¹, 张忠强¹, 李杨³, 刘建新⁴, 徐红丹^{1, 2*}, 王志刚^{1*} (1. 黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040; 2. 无锡卫生高等职业技术学校药学院, 江苏联院无锡卫生分院, 江苏 无锡 214028; 3. 锦州市妇婴医院, 辽宁 锦州 121000; 4. 湖南医药学院药学院, 湖南 怀化 418000)

摘要: **目的** 基于网络药理学探讨引火汤改善更年期潮热的作用机制。**方法** 利用网络药理学筛选引火汤作用的关键靶点及其通路; 采用双侧卵巢摘除术建立更年期潮热大鼠模型, 通过行为学、组织形态学, ELISA 法以及 Western blot 实验验证引火汤对体温、下丘脑弓状核神经元及激素水平的影响。**结果** 网络药理学预测引火汤通过调控雌激素信号通路、GnRH 信号通路等发挥作用。动物实验显示, 引火汤通过调节下丘脑-垂体-卵巢轴功能, 显著降低模型大鼠体温, 恢复子宫指数与下丘脑弓状核神经元形态, 调节雌二醇、促卵泡激素、促黄体生成素水平, 并调节 GPER1 介导的 KISS1/GPR54/GnRH 通路, 以及对 CREB 和 CaMK II 关键靶点的作用。**结论** 引火汤通过 KISS1/GPR54/GnRH 通路调节下丘脑-垂体-卵巢轴功能, 增加下丘脑弓状核 CaMK II 表达量, 调节雌二醇、促卵泡激素、促黄体生成素水平, 改善更年期潮热症状, 其药效物质基础可能与植物雌激素类成分相关。

关键词: 引火汤; 更年期潮热; 网络药理学; 植物雌激素; 下丘脑-垂体-卵巢轴

中图分类号: R286

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)12-3462-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.002

Mechanism of Yinhuo decoction for menopausal hot flashes in rats based on network pharmacology

FU Jinlei¹, WU Dongxue¹, WANG Yan¹, LIU Jialu¹, ZHANG Zhongqiang¹, LI Yang³, LIU Jianxin⁴, XU Hongdan^{1, 2*}, WANG Zhigang^{1*} (1. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040; 2. Department of Pharmacy, Wuxi Higher Health Vocational Technology School, Wuxi Health Branch of Jiangsu Union Technical Institute, Wuxi Jiangsu 214028; 3. Jinzhou Women and Children's Hospital, Jinzhou Liaoning 121000; 4. School of Pharmacy, Hunan University of Medicine, Huaihua Hunan 418000)

Abstract: Objective To determine the network pharmacology of Yinhuo decoction in ameliorating menopausal hot flashes and related mechanism. **Methods** A rat model of menopausal hot flashes was established by bilateral ovariectomy. The key targets and pathways were screened by network pharmacology. The effects of Yinhuo decoction on the body temperature, neurons in the arcuate hypothalamic nucleus and hormone levels were verified by behavioral, and histomorphometric experiments, ELISA, and Western blot. **Results** The network pharmacology predicted that Yinhuo decoction regulated estrogen signaling pathway and GnRH signaling pathway. Animal experiments showed that the decoction markedly lowered body temperature, restored uterine index and hypothalamic arcuate nucleus neuron morphology, regulated estradiol, follicle stimulating hormone, and luteinizing hormone levels, modulated the GPER1-mediated KISS1/GPR54/GnRH pathway and the effects on

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No.82474101); 无锡市卫生健康“三名”战略人才项目 - 中青年医疗卫生拔尖人才培养计划 (No.BJ2023094)。

作者简介: 付金蕾, 女, 硕士, 主要从事药效物质基础及机制研究, email: fujinlei99@126.com * **通信作者:** 王志刚, 男, 教授, 主要从事药效物质基础及机制研究, email: wangzhigang0513@vip.163.com

the key targets of CREB and CaMK II in the model rat through the regulation of the function of the hypothalamo-pituitary-ovarian axis. **Conclusion** Yinhuo decoction may regulate the function of the hypothalamic-pituitary-ovarian axis through the KISS1/GPR54/GnRH pathway, increase the expression of CaMK II in the arcuate nucleus of the hypothalamus, regulate the levels of estradiol, follicle stimulating hormone and luteinizing hormone, and improve the symptoms of hot flashes in menopause, whose pharmacological material basis may be related to the phytoestrogenic components.

Key words: Yinhuo decoction; menopausal hot flash; network pharmacology; phytoestrogen; hypothalamic-pituitary-ovarian axis

女性在更年期时, 卵巢功能和雌激素水平逐渐下降, 会出现多种生理和心理变化。其中, 潮热是最常见且显著的症状之一, 在上半身的面部、颈部和上胸部最为明显^[1]。更年期妇女潮热的发生率高达 85%^[2], 包括突然的热感和皮肤潮红, 这是由于皮肤血管舒张导致的散热反应, 随后体温会下降^[3]。据统计, 约四分之三的更年期女性都会经历潮热症状, 有些女性的症状甚至可能持续超过 15 年^[4]。因此, 研究更年期女性的健康问题, 尤其是潮热症状, 对于改善更年期女性的生活质量, 提升她们的健康水平, 具有重要的现实意义^[5]。

潮热病因复杂, 目前普遍接受的观点是低雌激素假说。研究证明, 潮热的发生与雌激素水平降低有关。更年期雌激素水平低的女性比雌激素水平高的女性更容易出现潮热^[6]。近年来研究指出, 更年期时女性体内雌激素的显著减少减弱了对下丘脑-垂体-性腺轴的负反馈作用^[7], 这种减弱导致了下丘脑中促性腺激素释放激素 (GnRH) 的分泌量增加, 而 GnRH 的增加又促使下游促黄体生成素 (LH) 和促卵泡激素 (FSH) 的水平升高。这一系列激素变化与更年期女性的生理变化密切相关, 为我们理解更年期相关的生理机制提供了新的视角^[8-9]。

引火汤原方源于陈士铎的《辨证录》, 该方由熟地黄、巴戟天、麦冬、茯苓、北五味子组成, 是滋阴补肾、引火归元的经典名方, 常用于肾中真阴不足, 出现上盛下虚的虚火之象^[10]。引火汤全方用药精当, 可以缓解阴虚火旺导致的诸多症候^[11], 例如严重盗汗、上热下寒、顽固性失眠等。课题组前期研究结果显示, 引火汤可通过增加脑内雌激素水平发挥作用^[12]。引火汤含有的蒽醌类、皂苷类、黄酮类、三萜类等多种成分可以发挥改善更年期潮热症状的作用, 但是改善更年期潮热的作用机制尚不明确。因此, 本实验通过网络药理学寻找引火汤改善更年期潮热症状的关键靶点及机制, 并通过动物实验进行验证, 明确引

火汤改善更年期潮热模型大鼠症状的机制, 以期与研究治疗更年期潮热症状的药物提供参考。

1 材料

1.1 药材

熟地黄、巴戟天、麦冬、茯苓、北五味子均购于北京同仁堂药店 (无锡店), 经黑龙江中医药大学陈孝忠副教授鉴定, 符合 2020 年版《中国药典》标准。

1.2 动物

SPF 级 SD 大鼠 48 只, 雌性, 体重 200 ~ 220 g (13 周龄) [斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 动物许可证号: SCXK (苏) 2022-0006]。大鼠饲养温度 (23±3) °C, 相对湿度 (50±10) %, 12 h 光暗循环, 适应性饲养 1 周, 自由饮水进食。所有实验流程均经黑龙江中医药大学伦理委员会的批准 (批件号: 2024032912)。

1.3 仪器

BX53 型显微镜 (日本 OLYMPUS 公司); TS-20H 型恒温摇床 (上海天呈实验仪器制造有限公司); LT2010S 型高通量组织研磨仪 (上海净信实业发展有限公司); FA2004N 型万分之一电子分析天平 (上海菁海仪器有限公司); HC-3016R 型高速冷冻离心机 (安徽中科中佳科学仪器有限公司); ST-360 型酶标仪 (上海科华实验系统有限公司); Tanon-5200Multi 型一体式化学发光凝胶成像系统 (上海天能科技有限公司)。

1.4 试剂

戊酸雌二醇片 (拜耳医药保健有限公司, 批号: 644A, 规格: 1 mg/片); G1 (美国 MCE 公司, 批号: HY-107216); G36 (美国 APExBIO 公司, 批号: B5707); 苏木精-伊红 (HE) 染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司); FSH、LH、雌二醇 (E₂) ELISA 试剂盒 (FineTest, 批号分别为 ER0960、ER1123、ER1507); Rabbit Anti-GAPDH Rabbit pAb (北京 Bioss 公司, 批号: bs-2188R); KISS1R Rabbit pAb (GpR54, ABclonal, 批号: A2967); 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (H +

L)(Beyotime, 批号: A0208); Rabbit anti-CaMK II polyclonal 抗体 (Absin, 批号: Abs120193); Anti-CREB 抗体 (Abcam, 批号: Ab32515); KISS1 Rb pAb (Wanleibio, 批号: WL02651)

2 方法

2.1 药物制备

熟地黄 15 g、巴戟天 10 g、麦冬 10 g、茯苓 5 g、北五味子 5 g、共计 45 g。加入 8 倍量水, 煎煮 120 min, 收集第一次滤液; 加入等量水, 持续煎煮 1 h, 收集第二次滤液。合并两次滤液, 浓缩为 1 g/mL (以生药量计) 的药液, 冷藏备用。戊酸雌二醇片研末, 与蒸馏水按比例配成质量浓度为 0.25 mg/mL 的溶液。

2.2 模型建立

取 40 只大鼠, 异氟烷吸入麻醉, 酒精消毒并剪开皮肤和肌层, 找到子宫两侧的菜花状卵巢, 将其摘除并注射青霉素钠, 防止感染。假手术组 8 只大鼠异氟烷吸入麻醉, 酒精消毒并剪开皮肤和肌层, 摘取同样大小的脂肪团代替卵巢并注射青霉素钠, 防止感染。摘取大鼠卵巢后第 4~7 日, 每日早晨 9 点采集大鼠阴道分泌物, 进行细胞涂片, 通过 HE 染色判断双侧卵巢摘除术 (OVX) 是否成功^[13]。并在造模前及给药后测量大鼠体温, 大鼠自行进入固定筒中, 其臀部和尾部自然伸出筒外, 使用数字体温计轻贴大鼠尾部皮肤, 腹壁皮肤脱毛处理, 连续 3 次, 计算平均值并记录。

2.3 分组给药

取造模成功的 40 只雌性 SD 大鼠和 8 只假手术组大鼠, 除假手术组外, 其余随机分为模型组、雌二醇组、引火汤组、激动剂 (G1) 组、阻断剂 (G36) 组, 每组 8 只。假手术组与模型组大鼠灌胃同体积生理盐水; 引火汤组大鼠灌胃引火汤药液 4.05 g/kg^[14]; 雌二醇组大鼠灌胃戊酸雌二醇溶液 0.105 mg/kg; G1 组大鼠腹腔注射 G1 溶液 8 μg/mL, G36 组大鼠灌胃引火汤药液, 同时腹腔注射 G36 溶液 10 μg/mL。G1、G36 均溶于 10% 橄榄油中, 腹腔注射按 3.34 mL/kg 剂量给药。每组均连续给药 4 周。

2.4 行为学测试

给药 2 周后, 每 2 周对大鼠进行行为学测试。强迫游泳实验 (FST) 检测各组大鼠的行为状态^[15], 旷场实验 (OFT) 检测各组大鼠在新异环境中自主探究行为^[16]。

2.4.1 强迫游泳实验 强迫游泳具有良好的抑郁预测效力。将大鼠放在有 25℃ 水的圆柱 (41 cm 高 × 33 cm 直径) 中, 水深 30 cm, 大鼠不能用脚触底来支撑自己。大鼠四肢不活动并把头漂浮

于水面定义为不动时间。FST 共进行 6 min, 记录后 4 min 不动时间。

2.4.2 旷场实验 旷场实验检测大鼠的焦虑状态。实验开始前, 大鼠在黑暗环境下适应 5 min。实验开始后将大鼠置于旷场内部, 统计大鼠在 5 min 内的水平运动总距离、平均速度、中央区域活动路程、中央区域活动时间、直立次数。实验结束后, 清除动物气味。

2.5 网络药理学预测

根据课题组前期实验研究基础, 得到引火汤入脑成分共 14 种, 借助 PubChem 和化源网得到成分 sdf 格式, 再利用 SwissTargetPrediction、TCMSP 和 ETCM、UniProt 等多个数据库对入脑成分的靶点进行预测, 将所得的引火汤入脑成分及各个活性成分的靶点汇总, 规范去重整理, 筛选条件大于 MEDIAN, 即得入脑成分和活性成分靶点。登录 GeneCards、DisGeNET、DRUGBANK 数据库, 以 “hot flashes” 为关键词进行检索和筛选, 结果合并后删除重复值。利用 UniProt 蛋白数据库将所得靶点进行统一。利用微生信在线软件作图工具平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>) 进行映射, 得到成分与疾病的共同靶点。将共同靶点导入 STRING, 得到共有靶点蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 网络图, 结果保存为 TSV 格式并导入 Cytoscape 3.7.1 软件, 运用 “Network Analyze” 分析网络拓扑参数, 以节点度值 (degree) 为标准, 提取大于平均度值的关键节点作为引火汤改善潮热的关键靶点。

2.6 样本采集

给药 4 周后, 各组大鼠禁食并麻醉。消毒剪开腹腔, 暴露腹主动脉血管, 采血 4~5 mL, 静置 30~60 min, 3500 r/min 离心 20 min, 分离血清, 置于 -80℃ 冰箱保存。

腹主动脉取血后, 剪开头骨, 迅速剥离出脑组织样本, 切下大鼠子宫称重, 并浸泡于 4% 多聚甲醛中。选取样本, 固定石蜡包埋、切片、染色。最终, 将染色后的切片进行病理形态学分析, 以观察组织的形态变化。

2.7 组织病理学观察

2.7.1 下丘脑弓状核 (ARC) 组织形态学观察 为了观察更年期潮热大鼠 ARC 组织病理学状态, 对大鼠下丘脑进行 HE 染色。脑组织脱水和浸蜡后, 进行包埋, 切片, 厚度为 5 μm, 37℃ 烘干过夜。再进行脱蜡, 脱水, 染色后脱水处理透明, 中性树胶封片。显微镜观察, 图像采集分析, 可以看到神经元形态, 细胞核呈蓝色, 细胞质呈红色。

2.7.2 大鼠子宫病理形态检测 暴露大鼠子宫

(从子宫颈中段切下), 去除其周围脂肪组织, 用电子天平称湿重。HE 染色观察子宫内膜层、子宫肌层、上皮细胞、浆膜层等。

2.7.3 大鼠子宫指数检测 实验后, 分别测量各组大鼠取材前体重及取材后子宫重量, 按照公式计算, 子宫指数 (%) = 子宫湿重 (mg) / 体重 (g) × 100%。

2.8 ELISA 检测大鼠 E₂、FSH、LH 含量

用 ELISA 法测定大鼠 E₂、FSH、LH 含量 ($n = 8$)。取大鼠血清, 按一定比例加入磷酸盐缓冲液 (PBS) 溶液, 4℃、3000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 按上述条件再次离心, 取上清液, 置于冰上, 按照 ELISA 试剂盒说明书操作, 利用酶标仪分别测定吸光度值。

2.9 Western blot 检测下丘脑 ARC 区相关蛋白表达

取冻存脑组织, 研磨后加入 RIPA 裂解液进行裂解, 4℃、12 000 r/min 离心 40 min, 取上清液。BCA 试剂盒进行蛋白定量, SDS-PAGE 电泳, 湿转法将蛋白转移到 PVDF 膜上, 在室温下用封闭液摇床封闭 2 h 后, 加入一抗 (KISS1, 1 : 1000; GPR54, 1 : 1000; GAPDH, 1 : 1000; CaMK II、

CREB、GAPDH, 1 : 1000), 4℃孵育过夜, TBST 洗膜; 加入二抗 (HRP, 1 : 5000), 室温下孵育 2 h, TBST 洗膜, 化学发光法及凝胶图像分析。

2.10 统计学分析

采用 SPSS 25 统计软件对实验数据进行分析。数据结果以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。符合正态分布并且总体符合方差齐性的数据, 利用单因素方差 (One-way ANOVA) 分析处理; 组间两两比较采用 LSD 检验, 方差不齐的数据采用 Tamhane's T2 法进行组间比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 阴道脱落细胞形态观察结果

假手术组大鼠阴道细胞种类及特点随着性周期呈现出动情前期、动情期、动情后期和动情间期的周期性变化。而模型组大鼠阴道细胞的周期性变化消失, 持续处于动情间期, 动情前期多数为有核上皮细胞。动情期多数为无核角化细胞; 动情后期为白细胞伴有较多角化细胞; 动情间期以白细胞为主, 伴有少量上皮细胞^[17], 见图 1。上述结果表明模型建立成功。

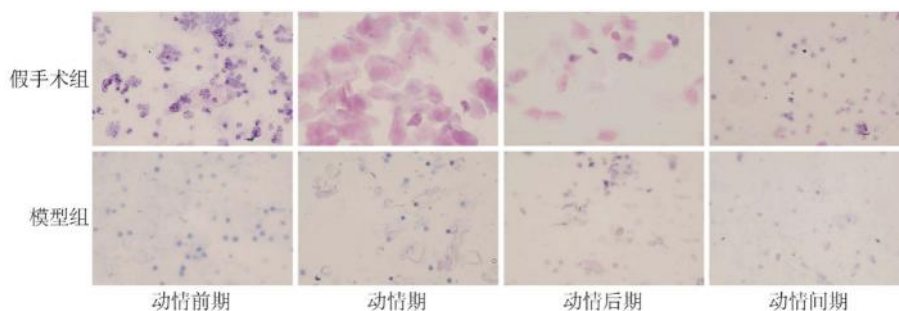


图 1 大鼠各期阴道脱落细胞涂片 (HE, ×400)

Fig 1 Vaginal exfoliated cell smears of rats at various stages of life (HE, ×400)

3.2 行为学结果

各组大鼠强迫游泳的不动时间结果见图 2A, 与假手术组相比, 模型组大鼠不动时间显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 引火汤组、雌二醇组大鼠不动时间减少 ($P < 0.01$)。各组大鼠旷场中

央活动时间结果见图 2B, 与假手术组相比, 模型组大鼠的旷场中央活动时间显著减少 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 引火汤组、雌二醇组大鼠的旷场中央活动时间增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

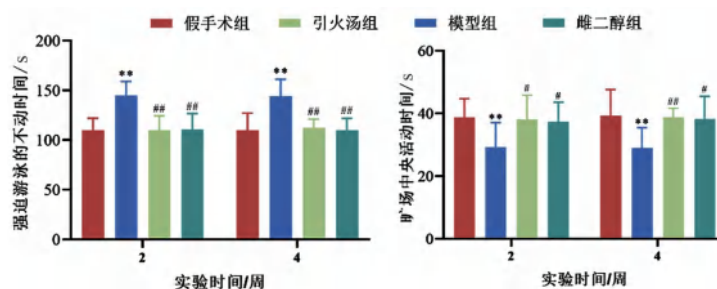


图 2 引火汤对各组大鼠行为学的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig 2 Effect of Yinhuo decoction on the behavioral outcome of rats in all groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

注 (Note): 与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ (Compared with the sham operation group, ** $P < 0.01$; compared with the model group, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$)。

3.3 网络药理学预测引火汤改善更年期潮热的可能机制

检索合并 ETCM、TCMSP、SwissTargetPrediction 和 UniProt 蛋白数据库对引火汤 14 种入脑成分 (见表 1) 进行靶点预测, 将靶点预测结果合并后排除重复值, 得到 165 个入脑成分靶点。与 545 个更年期潮热相关靶点进行比对取交集后, 得到 56 个引火汤入脑成分改善更年期潮热的作用靶点, 见图 3A。将 56 个交集靶标输入 STRING 数据库, 获取蛋白相互作用关系, 共有 56 个节点、336 条相互作用连线构成关联网络, 见图 3B。PPI 关联网络的平均度值为 11.5, 其中有 24 个基因参数在平均值之上, 为引火汤治疗更年期潮热的关键靶点, 主要为白蛋白 (ALB)、前列腺素 G/H 合酶 2 (PTGS2)、原癌基因酪氨酸蛋白激酶 Src (SRC)、雌激素受体蛋白 (ESR1)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG)、表皮生长因子受体 (EGFR) 和环腺苷酸反应元件结合蛋白 1 (CREB1) 等靶点, 提示这些关键靶点可能在引火汤改善更年期潮热症状中发挥关键作用。

表 1 引火汤入脑成分

Tab 1 Brain components of Yinhuo decoction			
序号	名称	序号	名称
A1	(+/-)-樟脑	MD7	甲基麦冬黄烷酮 B
B1	十五烷酸	MD9	甲基麦冬黄烷酮 A
C1	月桂酸	FL4	茯苓酸 A
D1	棕榈酸	FL6	过氧去氢土莫酸
E1	腺苷	BJ14	鸡屎藤次苷
F1	4-异丙基甲苯	BJ19	异嗪皮啶
SD1	桃叶珊瑚苷	SD2	益母草苷

表 2 各组大鼠腹温及尾温比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab 2 Abdominal temperature and tail temperature of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)								
组别	腹温				尾温			
	术前 1 周	给药 2 周	给药 3 周	给药 4 周	术前 1 周	给药 2 周	给药 3 周	给药 4 周
假手术组	37.65 $\pm$ 0.28	37.59 $\pm$ 0.25	37.55 $\pm$ 0.14	37.56 $\pm$ 0.14	30.98 $\pm$ 0.26	30.93 $\pm$ 0.32	30.93 $\pm$ 0.26	30.83 $\pm$ 0.18
模型组	37.64 $\pm$ 0.22	37.93 $\pm$ 0.10**	37.94 $\pm$ 0.21**	37.91 $\pm$ 0.24**	30.9 $\pm$ 0.29	32.38 $\pm$ 0.29**	32.68 $\pm$ 0.21**	32.88 $\pm$ 0.21**
引火汤组	37.61 $\pm$ 0.24	37.63 $\pm$ 0.19 [#]	37.63 $\pm$ 0.14 ^{##}	37.56 $\pm$ 0.19 ^{###}	30.95 $\pm$ 0.17	31.55 $\pm$ 0.35 ^{###}	31.09 $\pm$ 0.26 ^{###}	30.73 $\pm$ 0.39 ^{###}
雌二醇组	37.60 $\pm$ 0.24	37.64 $\pm$ 0.21 [#]	37.64 $\pm$ 0.17 [#]	37.58 $\pm$ 0.15 ^{###}	30.84 $\pm$ 0.18	31.68 $\pm$ 0.25 ^{###}	31.39 $\pm$ 0.28 ^{###}	30.96 $\pm$ 0.39 ^{###}
G1 组	37.62 $\pm$ 0.27	37.65 $\pm$ 0.18 [#]	37.64 $\pm$ 0.14 [#]	37.56 $\pm$ 0.17 ^{###}	30.93 $\pm$ 0.18	31.7 $\pm$ 0.23 ^{###}	31.24 $\pm$ 0.23 ^{###}	30.95 $\pm$ 0.32 ^{###}
G36 组	37.62 $\pm$ 0.23	37.93 $\pm$ 0.10 ^{&}	37.95 $\pm$ 0.22 ^{&&}	37.90 $\pm$ 0.18 ^{&&}	31.01 $\pm$ 0.31	32.11 $\pm$ 0.38 ^{&&}	32.24 $\pm$ 0.35 ^{&&}	32.03 $\pm$ 0.56 ^{&&}

注 (Note): 与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; 与引火汤组比较, [&] $P < 0.05$, ^{&&} $P < 0.01$ (Compared with the sham operation group, ** $P < 0.01$; compared with the model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; compared with the Yinhuo decoction group, [&] $P < 0.05$, ^{&&} $P < 0.01$).

3.5 组织病理学观察结果

3.5.1 引火汤对更年期潮热模型大鼠下丘脑 ARC 区神经元形态的影响 下丘脑 ARC 区置于高倍镜下观察 ($\times 400$) (见图 4), 假手术组细胞神经元细胞数目多, 细胞排列规整; 模型组、G36 组大鼠细胞损伤增多, 细胞数量减少, 细胞整体萎缩、体积变小; 引火汤组、雌二醇组、G1 组大鼠细胞

利用 Metascape 平台对上述 24 个关键节点进行基因富集分析, 从生物学富集分析 (BP) 中共得到 336 个条目, 排名靠前的包括乳腺发育、细胞对类固醇激素刺激的反应、激素介导的信号通路、多种生物生殖过程、多种多细胞生物过程等。细胞组成 (CC) 富集在陷窝、质膜筏、薄膜筏、膜微区、细胞器外膜等 40 个条目。分子功能 (MF) 富集在雌激素反应元件结合、核受体活性、配体激活的转录因子活性、RNA 聚合酶 II 特异性 DNA 结合转录因子结合、三磷酸腺苷酶结合等 40 个条目。按 P 值由小到大的顺序排序, 分别选取 BP、CC、MF 前 10 条通路, 绘制可视化条形图, 结果见图 3C。经 KEGG 富集分析后共得到 51 条信号, 选取排名靠前的 20 个条目进行绘图分析, 见图 3D。富集通路主要为血管内皮生长因子信号通路、雌激素信号通路、催乳素信号通路、内分泌抵抗、松弛素信号通路、GnRH 信号通路等, 提示引火汤改善更年期潮热的作用与体内多个激素分泌信号通路密切相关。

3.4 大鼠体温测定结果

实验结果显示, 给药前 1 周, 各组间腹温及尾温的平均值差异无统计学意义。给药 2 周后, 与假手术组相比, 模型组平均腹温及尾温均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 引火汤组、雌二醇组、G1 组大鼠平均腹温及尾温均降低 ($P < 0.01, P < 0.05$); 与引火汤组相比, G36 组大鼠平均腹温及尾温均升高 ($P < 0.05, P < 0.01$) (见表 2)。

增多, 核深染, 核膜清晰。

3.5.2 引火汤对更年期潮热模型大鼠子宫形态的影响 如图 5 所示, 与假手术组相比, 模型组大鼠子宫呈现显著萎缩变细, 子宫体积变小; 与模型组相比, 引火汤组、雌二醇组、G1 组大鼠子宫内膜略有增厚, 腺体和毛细血管较为增大且增多, 肌层较增厚; 与引火汤组相比, G36 组大鼠子宫

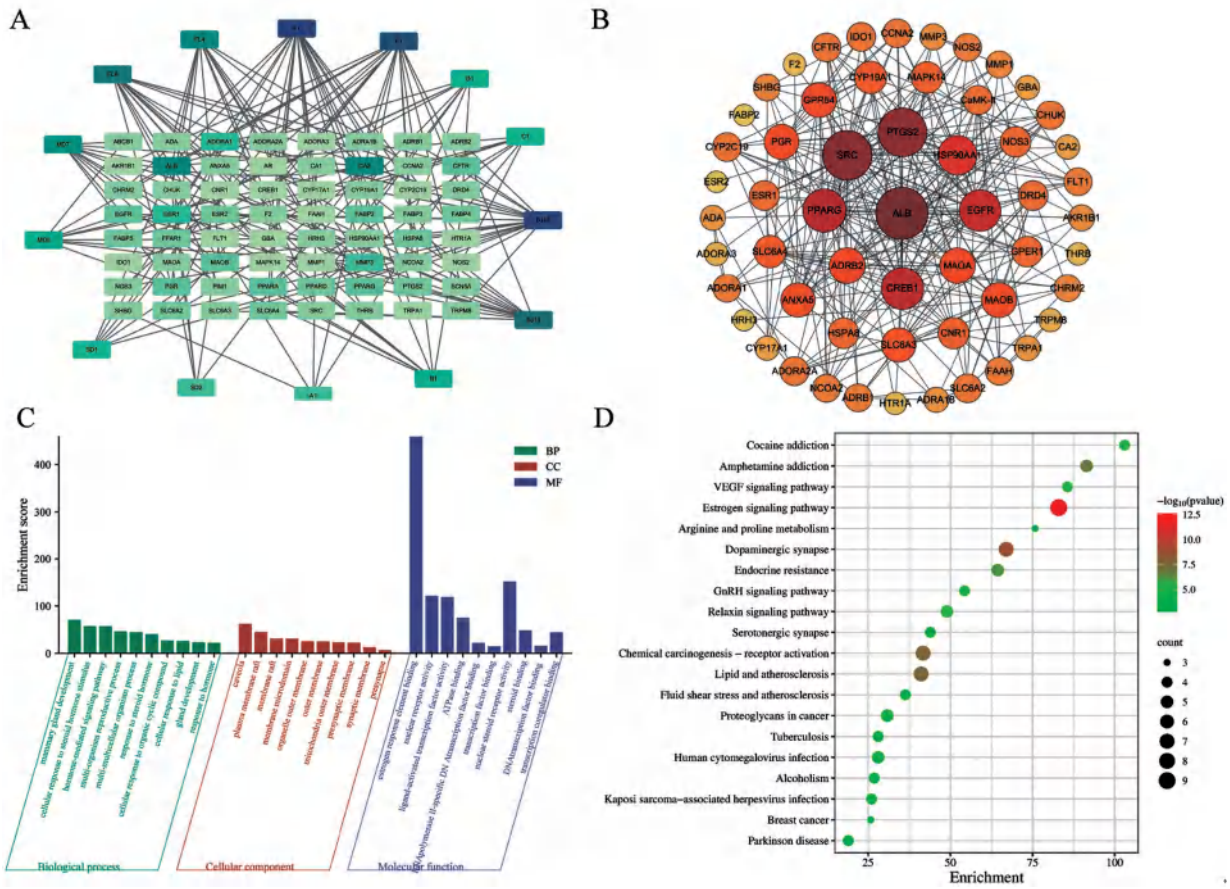


图 3 网络药理学预测引火汤改善更年期潮热的靶点和机制

Fig 3 Network pharmacology predicts the target and mechanism of Yinhuo decoction to ameliorate menopausal hot flashes

A. 引火汤入脑成分-靶点网络图 (Yinhuo decoction into the brain component-target network diagram) ; B. 核心靶点 PPI 网络图 (Core target PPI network diagram) ; C. GO 分析 (GO analysis) ; D. KEGG 富集分析 (KEGG enrichment analysis)

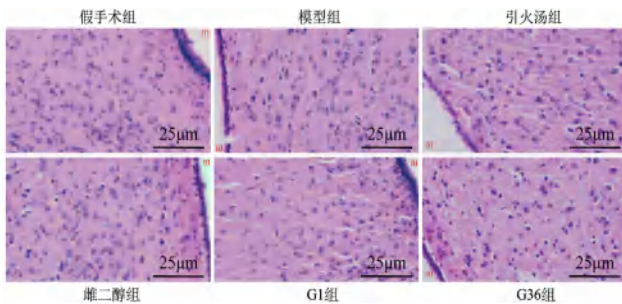


图 4 引火汤对更年期潮热大鼠下丘脑 ARC 区神经元的影响 (HE, ×400)

Fig 4 Effect of Yinhuo decoction on neurons in the ARC area of the hypothalamus in menopausal hot flashes rats (HE, ×400)

注 (Note): III. 第三脑区, 其余区域为 ARC 区 (Brain region III, the rest of the region is the ARC region)。

萎缩, 肌细胞及腺细胞萎缩。

3.5.3 引火汤对更年期潮热模型大鼠子宫湿重及子宫指数的影响 与假手术组相比, 模型组大鼠子宫湿重和子宫指数显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 引火汤组、雌二醇组、G1 组大鼠子宫湿重和子宫指数均有增加 ($P < 0.01$); 与引火汤组相比, G36 组大鼠子宫湿重和子宫指数显著降

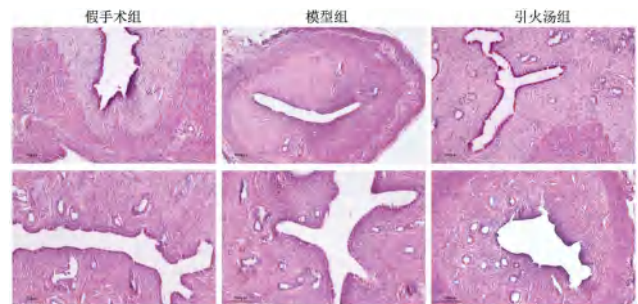


图 5 引火汤对各组大鼠子宫染色的影响 (HE, ×100)

Fig 5 Effect of Yinhuo decoction on uterine staining of rats in each group (HE, ×100)

低 ($P < 0.01$), 见表 3。

3.6 引火汤对更年期潮热模型大鼠血清性激素 FSH、LH、 E_2 的影响

结果如图 6 所示: 与假手术组比较, 模型组 FSH、LH 水平明显升高 ($P < 0.01$), E_2 水平明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 引火汤组、雌二醇组、G1 组 FSH、LH 水平明显下降 ($P < 0.01$), E_2 水平明显升高 ($P < 0.01$); 与引火汤组比较, G36 组 FSH、LH 水平明显升高 ($P < 0.01$), E_2 水

表 3 各组大鼠子宫指数 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Tab 3 Uterine index of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	子宫指数 /%
假手术组	1.5240 $\pm$ 0.1977
模型组	0.7022 $\pm$ 0.3541**
引火汤组	1.3980 $\pm$ 0.3550 ^{##}
雌二醇组	1.3330 $\pm$ 0.1848 ^{##}
G1 组	1.3070 $\pm$ 0.3500 ^{##}
G36 组	0.7247 $\pm$ 0.2688 ^{&&}

注 (Note): 与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{##} $P < 0.01$; 与引火汤组比较, ^{&&} $P < 0.01$ (Compared with the sham operation group, ** $P < 0.01$; compared with the model group, ^{##} $P < 0.01$; compared with the Yinhuo decoction group, ^{&&} $P < 0.01$).

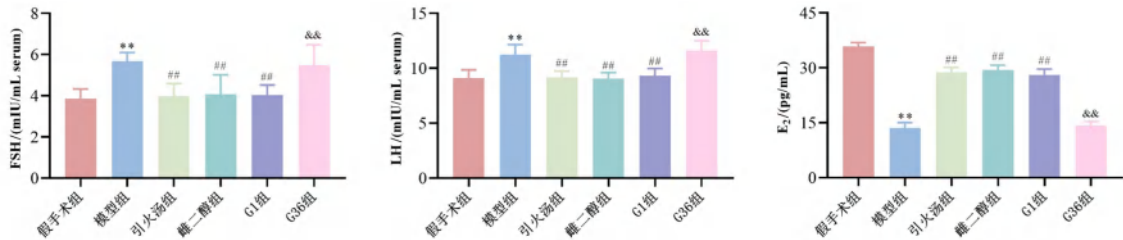


图 6 引火汤对大鼠血清性激素 FSH, LH 和 E_2 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig 6 Effect of Yinhuo decoction on levels of serum sex hormones FSH, LH and E_2 in each group of rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

注 (Note): 与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{##} $P < 0.01$; 与引火汤组比较, ^{&&} $P < 0.01$ (Compared with the sham operation group, ** $P < 0.01$; compared with the model group, ^{##} $P < 0.01$; compared with the Yinhuo decoction group, ^{&&} $P < 0.01$).

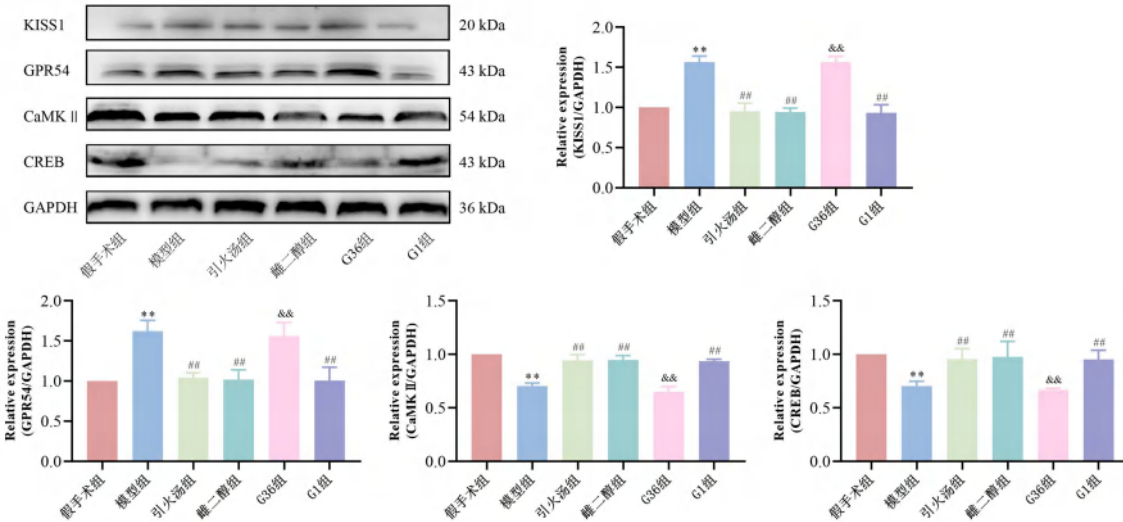


图 7 各组大鼠 ARC 区 KISS1、GPR54、CaMK II 和 CREB 的表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig 7 Expression levels of KISS1, GPR54, CaMKII, and CREB in the ARC region of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

注 (Note): 与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{##} $P < 0.01$; 与引火汤组比较, ^{&&} $P < 0.01$ (Compared with the sham operation group, ** $P < 0.01$; compared with the model group, ^{##} $P < 0.01$; compared with the Yinhuo decoction group, ^{&&} $P < 0.01$).

量下降 ($P < 0.01$).

4 讨论

本研究通过整合网络药理学与动物实验,系统阐述了引火汤改善更年期潮热的潜在作用机制。网络药理学预测表明,引火汤的活性成分(如甲基麦冬二氢黄酮 B、五味子醇甲等)可能通过雌激素信号通路、GnRH 信号通路及血管内皮

平明显降低 ($P < 0.01$).

3.7 引火汤对更年期潮热模型大鼠 ARC 区 KISS1、GPR54、CaMK II 和 CREB 表达的影响

如图 7 所示,以 GAPDH 为内参,对各组大鼠下丘脑 ARC 区 KISS1、GPR54、CaMK II、CREB 蛋白表达进行测定。与假手术组相比,模型组大鼠 KISS1、GPR54 含量升高 ($P < 0.01$),CaMK II、CREB 含量显著减少 ($P < 0.01$);与模型组相比,引火汤组、雌二醇组和 G1 组大鼠 KISS1、GPR54 含量降低 ($P < 0.01$),CaMK II、CREB 含量均增加 ($P < 0.01$);与引火汤组相比,G36 组 KISS1、GPR54 含量上升 ($P < 0.01$),CaMK II、CREB 含

生长因子 (VEGF) 通路发挥作用。KISS1/GPR54 系统是调控 GnRH 脉冲分泌的关键因子,其过度激活可能导致促性腺激素 (FSH、LH) 水平异常升高,进而诱发潮热^[18-19]。引火汤可能通过抑制该通路,恢复 HPOA 轴的负反馈平衡,这与血清 FSH、LH 水平下降的结果一致。

动物实验中,引火汤组子宫指数显著回升,子

宫内膜增厚,提示其具有类雌激素样作用。研究曾认为 E 的受体均为经典的核受体 ($ER\alpha$ 、 $ER\beta$),但越来越多的研究显示, GPER1 可调控快反应细胞信号传导通路^[20-21]。目前,大多数观点认为潮热的主要成因是雌激素水平的降低,课题组前期研究结果显示,引火汤增加脑内雌激素发挥作用与 GPER1 密切相关,现在普遍研究认为潮热的发生与雌激素水平下降有关^[22]。本实验结果表明,模型组、G36 组 E_2 含量升高,血清 FSH、LH 含量下降;引火汤组、雌二醇组、G1 组 E_2 含量升高,血清 FSH、LH 含量下降。与戊酸雌二醇组相比,引火汤对血清 E_2 水平的提升幅度较小,但对 OFT 中央活动时间增加和 FST 不动时间减少的改善效果更为全面。大鼠下丘脑 ARC 区病理学观察,模型组、G36 组大鼠细胞损伤增多,主要表现为细胞数量显著减少,细胞整体萎缩,体积变小。引火汤能够上调更年期潮热模型大鼠下丘脑 CREB 蛋白表达及基因表达,进而下调 KISS1 表达,下调 GnRH 神经元上 KISS1 的特异性受体 GPR54,通过这一机制,可以抑制失衡的 GnRH 神经元的功能,降低 GnRH 脉冲的频率,从而降低 FSH、LH 含量,体现为温度下降。引火汤可明显增加 ARC 区 CaMK II 的表达量,进一步表明引火汤对更年期潮热模型大鼠下丘脑 ARC 区功能和结构损伤可能有保护作用,进而改善更年期潮热模型大鼠的焦虑抑郁状态。这表明引火汤并非单纯依赖外源性雌激素替代,而是通过多成分协同调节神经内分泌网络,兼具生殖系统保护与中枢神经调控的双重优势。

综上所述,引火汤能够有效改善更年期潮热模型大鼠的体温状况、子宫重量和指数、病理组织学形态,调节 E_2 、FSH、LH 含量,并调节 GPER1 介导的 KISS1/GPR54/GnRH 关键通路,以及对 CREB 和 CaMK II 关键靶点的作用,从而达到改善更年期潮热大鼠的症状目的,这些发现为引火汤治疗更年期潮热提供了一种新的策略。

参考文献

- [1] 余欢,薛朝霞,陆谛.星状神经节阻滞治疗更年期潮热的研究进展[J].医学综述,2020,26(12):2391-2395.
- [2] Bansal R, Aggarwal N. Menopausal hot flashes: a concise review[J]. J Midlife Health, 2019, 10(1): 6-13.
- [3] 孙艳荣,杨齐岳,李瑶,等.更年期潮热的单胺类神经递质学说[J].解剖学报,2019,50(6):857-860.
- [4] Nonhormonal management of menopause-associated vasomotor symptoms: 2015 position statement of The North American Menopause Society[J]. Menopause, 2015, 22(11): 1155-1174.
- [5] 张珊珊.清心滋肾汤对围绝经期潮热汗出患者血清神经肽 B、性激素水平影响的研究[D].南京:南京中医药大学,2016.
- [6] Bachmann GA. Vasomotor flushes in menopausal women[J]. Am J Obstet Gynecol, 1999, 180(3Pt2): S312-S316.
- [7] Tataryn IV, Meldrum DR, Lu KH, et al. LH, FSH and skin temperature during the menopausal hot flash[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1979, 49(1): 152-154.
- [8] Uenoyama Y, Inoue N, Nakamura S, et al. Central mechanism controlling pubertal onset in mammals: a triggering role of kisspeptin[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2019, 10: 312.
- [9] Plant TM. The neurobiological mechanism underlying hypothalamic GnRH pulse generation: the role of kisspeptin neurons in the arcuate nucleus[J]. F1000Res, 2019, 8: F1000 Faculty Rev-982.
- [10] 王雨轩,马新宇,张孟娇,等.从“肾为水火之脏”论引火汤引火归元之功[J].实用中医内科杂志,2024,38(9):20-23.
- [11] 李文峰.从心经辨证治疗更年期综合征[J].亚太传统医药,2015,11(9):59-60.
- [12] 张悦,薛慧,周玉,等.引火汤改善 OVX + CUMS 小鼠突触可塑性研究[J].现代中药研究与实践,2024,38(6):14-20.
- [13] 罗晓梅,谢守珍,陈亚琼.围绝经期潮热发病机制[J].生殖医学杂志,2008,17(6):495-498.
- [14] 吴东雪,张悦,张莉莉,等.引火汤改善围绝经期抑郁症大鼠抑郁样行为的网络药理学研究[J].中国临床药理学杂志,2023,39(20):2946-2950.
- [15] Hernández-Hernández OT, Herrera-Pérez JJ, Chavira R, et al. Effects of post-ovariectomy time frame and age on the antidepressant-like actions of estradiol and prolamine in female rats[J]. Horm Behav, 2022, 141: 105154.
- [16] Wang WS, Yang W, Wang FWT, et al. Kunxinling granules alleviate perimenopausal syndrome by supplementing estrogen deficiency[J]. Front Pharmacol, 2025, 16: 1554479.
- [17] Fu XW, Wang H, Gai MC, et al. Integrating network pharmacology with experimental validation to investigate the mechanism of Wuwei Zishen formula in improving perimenopausal syndrome[J]. Am J Transl Res, 2024, 16(6): 2190-2211.
- [18] 骆倩倩,刘冉冉,张冬梅等. Kisspeptin/Kiss1r 系统在多囊卵巢综合症大鼠下丘脑弓状核的表达[J].中国计划生育学杂志,2014,22(5):304-308,313.
- [19] 赵铭宇.五加丹方对去势雌性大鼠下丘脑 Kiss-1/GPR54/GnRH 信号通路影响的研究[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2020.
- [20] Cornil CA, Bournonville Cd. Dual action of neuro-estrogens in the regulation of male sexual behavior[J]. Gen Comp Endocrinol, 2018, 256: 57-62.
- [21] Rudolph LM, Cornil CA, Mittelman-Smith MA, et al. Actions of steroids: new neurotransmitters[J]. J Neurosci, 2016, 36(45): 11449-11458.
- [22] Krajewski-Hall SJ, Blackmore EM, McMinn JR, et al. Estradiol alters body temperature regulation in the female mouse[J]. Temperature (Austin), 2017, 5(1): 56-69.

(收稿日期:2025-03-22;修回日期:2025-05-20)

基于 QbD 理念的小儿苓音汤颗粒提取工艺设计空间预测

蔡艳丽¹, 宋信莉^{1, 2*}, 陈丽¹, 钱舒琪¹, 王世运¹, 王楠¹, 刘竹鑫¹, 徐剑^{1, 2}, 王群^{1, 2} (1. 贵州中医药大学药学院, 贵阳 550025; 2. 国家苗药工程技术研究中心, 贵阳 550025)

摘要: **目的** 研究小儿苓音汤颗粒生产过程中指标成分的量值传递规律, 筛选关键影响因素, 优化其制备工艺。**方法** 采用超高效液相色谱法测定小儿苓音汤颗粒中 4 个指标成分的含量及转移率, 分析各指标成分在提取、浓缩、干燥及制粒等环节的量值传递情况, 寻找影响成分传递的关键环节; 基于质量源于设计 (QbD) 理念, 选择提取次数、提取时间、加水倍量作为提取工艺的关键工艺参数, 并以各指标成分的含量及出膏率作为关键质量属性, 在单因素试验结果的基础上采用 Box-Behnken 响应面试验对提取工艺进行优化, 建立设计空间。**结果** 量值传递规律研究发现, 在浓缩、干燥和制粒 3 个过程中 4 个指标成分的转移率均较高, 而在提取过程中, 除新落新妇昔外, 落新妇昔、野鸢尾黄素和次野鸢尾黄素的含量均显著降低, 转移率较低, 传递较差, 表明提取过程是影响成分传递的关键环节; 基于 QbD 理念构建的最优提取工艺设计空间为: 加水倍量 9.7 ~ 10.1 倍, 提取时间 19.3 ~ 20.3 min, 提取次数 4 次。**结论** 基于 QbD 理念所优化的小儿苓音汤颗粒提取工艺稳定可靠, 可为其后续工业化生产奠定实验基础。

关键词: 小儿苓音汤颗粒; 指标成分; 量值传递规律; 质量源于设计; 工艺优化

中图分类号: R283, R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)12-3470-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.003

Spatial design prediction of the extraction of Xiao'er Lingyin decoction granules based on quality by design

CAI Yanli¹, SONG Xinli^{1, 2*}, CHEN Li¹, QIAN Shuqi¹, WANG Shiyun¹, WANG Nan¹, LIU Zhuxin¹, XU Jian^{1, 2}, WANG Qun^{1, 2} (1. School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025; 2. National Engineering Research Center for Miao Medicine, Guiyang 550025)

Abstract: Objective To determine the quantity transfer rule of the index components in the production of Xiao'er Lingyin decoction granules, screen key influence factors, and optimize the preparation. **Methods** Ultra high performance liquid chromatography was used to determine the content and transfer rate of 4 index components in Xiao'er Lingyin decoction granules. The transfer of each index component in the extraction, concentration, drying and granulation was analyzed, and the key links affecting the transfer of components were found. Based on the quality-by-design (QbD) concept, the number of extraction, extraction time and water addition times were selected as the key parameters of the extraction process, and the content of each index component and the extract rate were taken as the key quality attributes. On the basis of single factor test, Box-Behnken response surface test was used to optimize the extraction to establish the design space. **Results** The transfer rates of the 4 index components were higher in the concentration, drying and granulation, while in the extraction, except for neoastilbin, the content of astilbin, irigenin and irisflorentin were obviously decreased, and the transfer rates were lower. The poor transfer indicated that the extraction was the key step affecting the component transfer. Based on QbD, the optimal extraction included 9.7 ~ 10.1 times water addition, extraction for 19.3 ~ 20.3 min, and 4 extractions. **Conclusion** The optimized

基金项目: 国家自然科学基金 (No.82260770); 贵州中医药大学药用高分子材料研究中心 (贵中医党办发〔2019〕70 号); 贵州省高层次人才创新型人才 (黔科合平台人才-GCC〔2023〕037)。

作者简介: 蔡艳丽, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药及民族药物新制剂及新剂型等方面的研究, email: 15208670026@163.com

***通信作者:** 宋信莉, 女, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药新技术与新剂型等方面的研究, email: 392347047@qq.com

extraction of Xiao'er Lingyin decoction granules based on QbD is stable and reliable, which can lay an experimental foundation for its mass production.

Key words: Xiao'er Lingyin decoction granule; index component; quantity transfer rule; quality by design; process optimization

小儿苓音汤是由贵州中医药大学第二附属医院儿科医师依据临床经验及治疗原则总结而成的经验方,该方由土茯苓、观音草、鸭跖草、射干、薄荷五味药配伍组成,具有清热利咽、消肿散结的功效,适用于外感风热、肺胃蕴热所致的小儿急性咽炎。小儿苓音汤在贵州中医药大学第二附属医院已使用十多年,对小儿急性咽炎的治愈率高达 85%,疗效显著,然而汤剂味苦量大,对于儿童患者来说依从性较差,且对一些急性病症来说往往缓不济急,存在较大的局限性。因此,课题组将其制备成更为便捷的颗粒剂,以满足更多患者的需求,提高临床使用率^[1]。

课题组前期对小儿苓音汤的药效物质基础进行研究,初步确定了其抗小儿急性咽炎的主要活性成分为落新妇苷、新落新妇苷、野鸢尾黄素、次野鸢尾黄素等(待发表),本文拟在此基础上进行小儿苓音汤颗粒制备工艺研究,阐明小儿苓音汤颗粒饮片-提取液-浓缩液-干膏粉-颗粒剂的量值传递规律,寻找关键影响因素,优化工艺参数。

量值传递规律研究通过构建系统、可靠的质量控制体系,揭示量值在传递过程中的变化机制,保障制剂生产各环节主要成分含量和疗效的一致性^[2-3]。而质量源于设计(QbD)理念则以目标产品质量为出发点,通过试验设计和数据分析考察关键质量属性(CQAs)与关键工艺参数(CPPs)之间的关联性,优化关键工艺参数,从设计层面保证药品质量^[4-5]。应用 QbD 理念指导颗粒剂的研发过程,能够从初始阶段减少生产过程中潜在的风险,从而有效保障产品质量的稳定性和可控性^[6]。

因此,本研究通过探索各指标成分在提取、浓缩、干燥及制粒等环节的量值传递情况,寻找 CPPs,并基于 QbD 理念,利用单因素结合 Box-Behnken 试验设计,拟合 CQAs 与 CPPs 的数学模型,建立提取工艺设计空间,从源头保障小儿苓音汤颗粒整体质量。

1 材料

1.1 仪器

超高效液相色谱仪(Agilent 1290,美国 Agilent 公司);旋转蒸发器(RE-52AA,上海亚荣生化仪器厂);万分之一微量分析天平(FA2204,上海精其仪器有限公司);冷冻干燥机(FD-1A-50,北京博医康实验仪器有限公司);数控超声波清洗机(KQ-500DE,昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

土茯苓(批号:20231226,20240311,20240531;产地:湖北);观音草(批号:20231226,20240311,20240531;产地:陕西);鸭跖草(批号:20231226,20240311,20240531;产地:云南);射干(批号:20231226,20240311,20240531;产地:湖北);薄荷(批号:20231226,20240311,20240531;产地:安徽)。药材均购自亳和堂中药饮片有限公司,且经贵州中医药大学吴之坤教授鉴定为正品。

对照品落新妇苷(批号:PS000649,纯度>98.0%)、新落新妇苷(批号:PS010667,纯度>98.0%)、野鸢尾黄素(批号:PS020267,纯度>98.0%)、次野鸢尾黄素(批号:PS000240,纯度>98.0%)(成都普思生物科技股份有限公司)。甲醇(天津市科密欧化学试剂有限公司)、乙腈(Fisher 公司)、甲酸(上海麦克林生化科技股份有限公司),均为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 小儿苓音汤颗粒制备工艺

按处方量称取各味药材,加 10 倍量水浸泡 30 min,煎煮 2 次,每次 20 min,过滤合并滤液,将滤液于-0.08 MPa、70℃条件下旋转蒸发浓缩,浓缩液在-60℃冷冻干燥得干膏粉,最后将干膏粉与适量糊精、65%乙醇混合,经湿法制粒得小儿苓音汤颗粒。

2.2 含量测定方法

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取对照品新落新妇苷、落新妇苷、野鸢尾黄素、次野鸢尾黄素适量,分别置于 10 mL 量瓶中,加 50% 甲醇溶解并定容至刻度,得新落新妇苷、落新妇苷、野鸢尾黄素、次野鸢尾黄素质量浓度分别为 519、555、185、182 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。分别精密吸取上述对照品溶液 2 mL,置于 25 mL 量瓶中,即得混合对照品储备液。

2.2.2 供试品溶液的制备

①单味饮片供试品溶液制备:分别精密称取土茯苓饮片粉末 10.0 g、射干饮片粉末 6.0 g,置于圆底烧瓶中,加入 4 倍量水,放置浸泡 30 min,充分润湿,加热回流 1 h,放冷,提取液过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

②提取液、浓缩液、干膏粉、颗粒供试品溶液制备:精密量取单味饮片提取液、复方提取液及浓

缩液各 2.0 mL，精密称取干膏粉、颗粒各 1.0 g，分别置于 10 mL 量瓶中，加入 50% 甲醇定容至刻度，超声处理 10 min，放冷，滤过，取续滤液，即得。

③ 阴性样品溶液制备：按处方称量除土茯苓、射干以外的其他饮片，同①项下方法制备阴性样品溶液。

2.2.3 色谱条件 Waters ACQUITY UPLC C18 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)，流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 10%B; 10 ~ 15 min, 15%B; 15 ~ 20 min, 18%B; 20 ~ 26 min, 20%B; 26 ~ 28 min, 21%B; 28 ~ 35 min, 22%B; 35 ~ 40 min, 24%B; 40 ~ 43 min, 26%B; 43 ~ 45 min, 28%B; 45 ~ 48 min, 30%B; 48 ~ 50 min, 35%B; 50 ~ 55 min, 65%B; 55 ~ 60 min, 95%B)；柱温为 30 ℃，流速为 0.15 mL·min⁻¹，进样量为 4 μL，检测波长为 286 nm。

2.2.4 方法学考察

① 专属性试验：精密吸取“2.2.1”“2.2.2”项下混合对照品储备液、提取液供试品溶液、阴性样品溶液和空白对照溶液 (50% 甲醇) 各 4 μL，进样测定，得到液相色谱图，见图 1。从图可知，小儿苓音汤中的新落新妇苷、落新妇苷、野鸢尾黄素、次野鸢尾黄素专属性强，阴性色谱图无干扰。

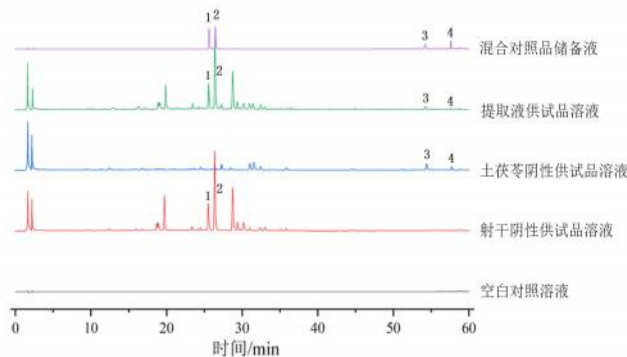


图 1 专属性试验 UPLC 色谱图

Fig 1 UPLC chromatogram of the specificity test

1. 新落新妇苷 (neoastilbin)；2. 落新妇苷 (astilbin)；3. 野鸢尾黄素 (irigenin)；4. 次野鸢尾黄素 (irisflorentin)

② 线性关系考察：精密吸取“2.2.1”项下的混合对照品溶液 1、2、4、6、8 mL，置于 10 mL 量瓶中，加 50% 甲醇定容，进样测定，以质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线并计算线性回归方程，见表 1。结果表明，4 种成分在各自线性范围内与峰面积具有良好的线性关系。

③ 精密度试验：精密吸取同一供试品溶液 4 μL，进样测定，记录峰面积并分别计算各指标性成分含量的 RSD 值，结果新落新妇苷、落新妇苷、野鸢尾黄素、次野鸢尾黄素 RSD 值分别为 1.2%、

表 1 线性关系考察结果

Tab 1 Linear relationship

指标成分	线性方程	r	线性范围 / (μg·mL ⁻¹)
新落新妇苷	$Y = 57.301X - 122.52$	0.9998	4.152 ~ 33.216
落新妇苷	$Y = 58.142X - 98.295$	0.9996	4.44 ~ 35.52
野鸢尾黄素	$Y = 51.971X - 68.209$	0.9997	1.48 ~ 11.84
次野鸢尾黄素	$Y = 49.622X - 8.6512$	0.9999	1.456 ~ 11.648

0.42%、1.5%、0.77%，表明该仪器精密度良好。

④ 稳定性试验：精密吸取同一供试品溶液，分别在室温下存放 0、2、4、8、12、24 h 后，进样测定，记录峰面积，计算各指标性成分含量的 RSD。结果新落新妇苷、落新妇苷、野鸢尾黄素、次野鸢尾黄素的 RSD 值分别为 0.71%、0.77%、2.6%、1.3%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

⑤ 重复性试验：按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，进样测定，记录峰面积，计算指标成分含量的 RSD。新落新妇苷、落新妇苷、野鸢尾黄素、次野鸢尾黄素的 RSD 值分别为 2.5%、1.7%、2.9%、2.7%，表明该方法重复性良好。

⑥ 加样回收试验^[7-8]：分别精密称取新落新妇苷、落新妇苷对照品适量，加 50% 甲醇制成每 1 mL 分别含上述成分 0.901、0.851 mg 的单一对照品储备液；分别精密称取适量野鸢尾黄素、次野鸢尾黄素，加 70% 乙醇制成每 1 mL 分别含上述成分 0.168、0.216 mg 的单一对照品储备液。精密量取 6 份已知各指标成分含量的样品溶液 2.0 mL，置于 10 mL 量瓶中，加入与其中各成分等量的各对照品溶液，加 50% 甲醇定容至刻度，超声处理 10 min，放冷，过 0.22 μm 微孔滤膜，即得加样供试品溶液。按“2.2.3”项下色谱条件进样测定，记录峰面积，并计算供试品溶液中各对照品的总量和对照品的加样回收率。结果新落新妇苷、落新妇苷、野鸢尾黄素、次野鸢尾黄素的平均加样回收率分别为 100.52%、104.66%、98.34%、95.24%，RSD 值分别为 0.93%、0.58%、1.4%、1.8%，均符合 2020 年版《中国药典》四部通则 9101 的规定，表明该方法准确可靠。

2.3 小儿苓音汤颗粒制备工艺中指标性成分的含量测定及量值传递分析

分别精密吸取 3 个批次的各供试品溶液 4 μL，按“2.2.3”项下色谱条件进样分析，计算各供试品溶液中 4 个指标成分的含量及各环节的转移率，并采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)， $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。结果见表 2、3。混合对照品及各样品高效液相色谱图见图 2。

结果显示，在提取液 - 浓缩液、浓缩液 - 干膏

粉、干膏粉-颗粒三个过程中, 4 个指标成分含量均未显著降低, 转移率相对较高; 而在饮片-提取液过程中, 落新妇苷、野鸢尾黄素、次野鸢尾黄素含量显著下降 ($P < 0.05$), 分别降低了 56.83%、46.69%、55.06%, 但新落新妇苷含量却不降反增, 其原因可能是由于新落新妇苷为落新妇苷的同分异构体, 在提取过程中两者发生相互转化, 使得新落新妇苷含量增加^[9-11]。从各环节中指标成分转移率变化情况来看, 提取过程为影响成分传递的关键因素, 因此, 接下来将基于 QbD 理念对其工艺设计空间进行预测, 以保障产品的最终质量。

含量 (w) 计算公式^[12]: $w(\text{饮片})(\%) = \rho \times V_{\text{稀释液}} / m_{\text{称样量}} / 1000 \times 100\%$; $w(\text{提取液或浓缩液})(\%) = \rho \times n \times V_{\text{总样品}} / m_{\text{总饮片}} / 1000 \times 100\%$; $w(\text{干膏粉或颗粒})(\%) = \rho \times V_{\text{稀释液}} / m_{\text{称样量}} \times m_{\text{总样品}} / m_{\text{总饮片}} / 1000 \times 100\%$ 。

式中, ρ . 指标成分密度, $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; V . 体积, mL ; m . 称样量, g ; n . 稀释倍数。

含量下降率 (损耗率) 计算公式^[12]: 饮片-提取液下降率 ($\%$) = $(M_{\text{饮片}} - M_{\text{提取液}}) / M_{\text{饮片}}$

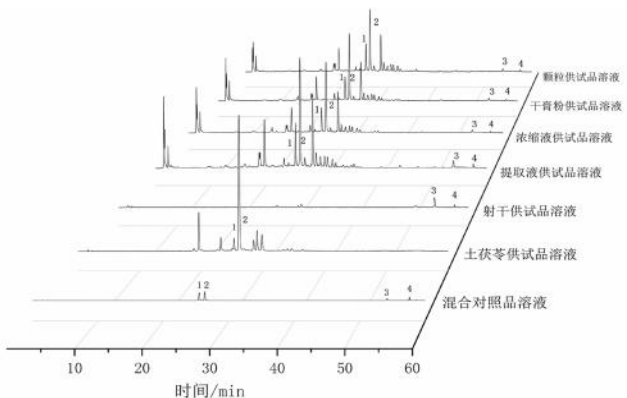


图 2 混合对照品及各样品高效液相色谱图
Fig 2 High performance liquid chromatograms of the mixed reference substances and each sample

1. 新落新妇苷 (neostilbin); 2. 落新妇苷 (astilbin); 3. 野鸢尾黄素 (irigenin); 4. 次野鸢尾黄素 (irisfloreintin)

$\times 100\%$ 。提取液-浓缩液、浓缩液-干膏粉、干膏粉-颗粒转移率以此类推。

转移率计算公式^[13]: 饮片-提取液转移率 ($\%$) = $w_{\text{提取液中指标成分}} / w_{\text{饮片中指标成分}} \times 100\%$ 。提取液-浓缩液、浓缩液-干膏粉、干膏粉-颗粒转移率以此类推。

表 2 小儿苓音汤颗粒制备过程中 4 种指标成分的含量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab 2 Contents of 4 index components in the preparation of Xiao'er Lingyin decoction granules ($\bar{x} \pm s, n = 3$)				
样品	新落新妇苷 /%	落新妇苷 /%	野鸢尾黄素 /%	次野鸢尾黄素 /%
饮片	0.2137 $\pm$ 0.0811	3.4895 $\pm$ 0.3076	0.3433 $\pm$ 0.0536	0.1086 $\pm$ 0.0105
提取液	0.3354 $\pm$ 0.0889	1.5065 $\pm$ 0.0568*	0.1830 $\pm$ 0.0234*	0.0488 $\pm$ 0.0073*
浓缩液	0.2867 $\pm$ 0.0760	1.4790 $\pm$ 0.0491	0.1799 $\pm$ 0.0228	0.0441 $\pm$ 0.0039
干膏粉	0.2278 $\pm$ 0.0726	1.4536 $\pm$ 0.0496	0.1596 $\pm$ 0.0192	0.0391 $\pm$ 0.0024
颗粒	0.1866 $\pm$ 0.0246	1.4347 $\pm$ 0.0533	0.1472 $\pm$ 0.0115	0.0317 $\pm$ 0.0090

注 (Note): 与饮片比较, * $P < 0.05$ (Compared with the decoction pieces, * $P < 0.05$)。

表 3 小儿苓音汤颗粒制备过程中 4 种指标成分的转移率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab 3 Transfer rate of 4 index components in the preparation of Xiao'er Lingyin decoction granules ($\bar{x} \pm s, n = 3$)				
样品	新落新妇苷 /%	落新妇苷 /%	野鸢尾黄素 /%	次野鸢尾黄素 /%
饮片-提取液	183.17 $\pm$ 103.74	43.48 $\pm$ 5.25	53.47 $\pm$ 1.79	45.17 $\pm$ 7.28
提取液-浓缩液	86.53 $\pm$ 13.08	98.19 $\pm$ 0.53*	98.31 $\pm$ 0.32*	90.86 $\pm$ 6.88*
浓缩液-干膏粉	96.27 $\pm$ 30.99	98.29 $\pm$ 1.18	89.05 $\pm$ 8.72	88.86 $\pm$ 4.50
干膏粉-颗粒	86.20 $\pm$ 20.58	98.69 $\pm$ 0.30	92.53 $\pm$ 3.94	80.53 $\pm$ 20.50

注 (Note): 与饮片-提取液比较, * $P < 0.05$ (Compared with the decoction pieces-extraction, * $P < 0.05$)。

2.4 小儿苓音汤颗粒提取工艺设计空间预测

2.4.1 出膏率的测定 精密量取 25 mL 提取液于预先干燥至恒重的蒸发皿内, 水浴挥干后置于 105 °C 烘箱干燥 3 h, 并于干燥器内冷却半小时后精密称定质量, 计算出膏率。出膏率计算公式^[14]: 出膏率 ($\%$) = $(\text{所得干膏重} \times \text{水煎液总体积}) / (\text{药味称样药} \times \text{取样体积}) \times 100\%$ 。

2.4.2 CPPs 和 CQAs 的确定 参考文献^[15-16], 并结合原方提取方式, 选择提取次数、提取时间、加水倍量作为提取工艺的 CPPs, 并以 4 个指标成分 (新落新妇苷、落新妇苷、野鸢尾黄素和次野鸢尾黄素) 的含量及出膏率作为 CQAs。

2.4.3 单因素试验 分别考察加水倍量、提取时间和提取次数三个因素各水平下指标成分含量及出膏率, 采用熵值法计算各指标权重系数并进行综合评分, 为后续响应面设计筛选各影响因素低水平和高水平, 见表 4、图 3。

从图 3A、B 中可以发现, 当加水量为 10 倍, 提取时间为 20 min 时, 各指标综合评分最高, 因此, 后续响应面设计设计中加水量因素的高低水平分别设置为 12 倍及 8 倍, 提取时间因素的高低水平分别设置为 25 min 及 15 min; 从图 3C 中可以看出, 各指标综合评分随着提取次数增加而增加, 1 $\rightarrow$ 4 次增加较明显, 4 $\rightarrow$ 5 次后变化不明显,

因此提取次数以 2 次为低水平，以 4 次为高水平。

表 4 单因素试验各指标权重系数
Tab 4 Weight coefficients of each index in the single-factor experiment

指标	新落新 妇苷	落新妇苷	野鸢尾 黄素	次野鸢 尾黄素	出膏率
加水倍量	0.1824	0.2075	0.1966	0.1374	0.2761
提取时间	0.2024	0.2804	0.1827	0.1458	0.1887
提取次数	0.2098	0.2042	0.1874	0.2066	0.1920

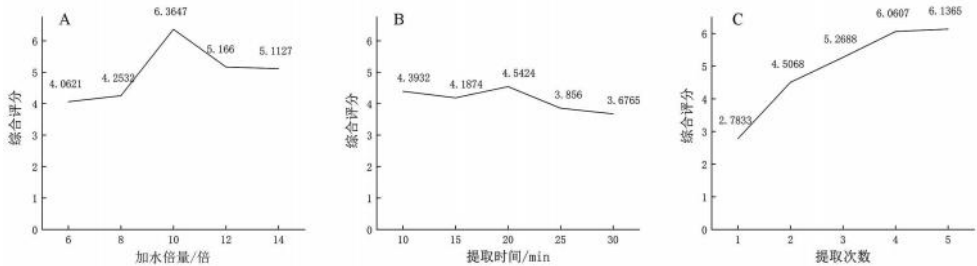


图 3 加水倍量、提取时间、提取次数各水平对指标成分影响程度综合评分折线图

Fig 3 Comprehensive score of the influence degree of each level of water addition ratio, extraction time and extraction frequency on the index components

表 5 小儿芩音汤提取工艺 Box-Behnken 响应面试验设计水平因素表
Tab 5 Factor and level of Box-Behnken response surface experimental design for the extraction process of Xiao'er Lingyin decoction

水平	因素		
	加水倍量 / 倍	提取时间 / min	提取次数 / 次
- 1	8	15	2
0	10	20	3
1	12	25	4

表 6 小儿芩音汤提取工艺 Box-Behnken 响应面试验结果

Tab 6 Box-Behnken response surface for the extraction process of Xiao'er Lingyin decoction

序号	加水量 / 倍	提取时间 / min	提取次数 / 次	新落新妇苷 / %	落新妇苷 / %	野鸢尾黄素 / %	次野鸢尾黄素 / %	出膏率 / %
1	8	15	3	0.3668	1.3108	0.1128	0.0411	19.62
2	12	15	3	0.5653	2.0307	0.2555	0.0716	23.27
3	8	25	3	0.3784	1.0517	0.1137	0.0273	17.92
4	12	25	3	0.3796	1.0580	0.1103	0.0339	21.10
5	8	20	2	0.3034	1.1168	0.0970	0.0270	18.71
6	12	20	2	0.4004	1.4190	0.1389	0.0404	19.77
7	8	20	4	0.5246	1.5315	0.1638	0.0416	21.52
8	12	20	4	0.6253	1.8700	0.2663	0.0688	23.80
9	10	15	2	0.2757	1.1145	0.1503	0.0405	18.61
10	10	25	2	0.3361	1.0768	0.1069	0.0309	16.90
11	10	15	4	0.4996	1.7838	0.2031	0.0604	24.73
12	10	25	4	0.3774	1.2624	0.1202	0.0498	20.15
13	10	20	3	0.4206	1.2690	0.1189	0.0357	22.01
14	10	20	3	0.4153	1.3486	0.1639	0.0459	18.20
15	10	20	3	0.4185	1.4485	0.1385	0.0391	19.87
16	10	20	3	0.3758	1.2765	0.1293	0.0404	19.84
17	10	20	3	0.4430	1.2549	0.1340	0.0440	18.34

$0.0273A^2 - 0.0026B^2 + 0.0557C^2$

$Y_3 = -0.1798 - 0.0133A + 0.0439B - 0.0836C - 0.0037AB + 0.0076AC - 0.0020BC + 0.0041A^2 - 0.0002B^2 + 0.0133C^2$

2.4.4 Box-Behnken 响应面试验设计 在单因素试验的基础上，以 CPPs (A. 加水倍量; B. 提取时间; C. 提取次数) 为考察因素，以 CQAs (Y_1 . 新落新妇苷含量; Y_2 . 落新妇苷含量; Y_3 . 野鸢尾黄素含量; Y_4 . 次野鸢尾黄素含量; Y_5 . 出膏率) 为评价指标，每个影响因素设置三个考察水平，进行 Box-Behnken 响应面试验设计，并按照 Design Expert 13.0 软件设计的试验顺序依次进行相应的试验研究。结果见表 5、6。

2.4.5 模型拟合及分析 使用 Design Expert 13.0 软件内设程序对 $Y_1 \sim Y_5$ 进行拟合，得到回归方程如下，ANOVA 方差分析结果见表 7。

$Y_1 = -0.9378 - 0.1257A + 0.1374B + 0.2715C - 0.0049AB + 0.0005AC - 0.0091BC + 0.0124A^2 - 0.0017B^2 - 0.0008C^2$

$Y_2 = -1.9913 - 0.1170A + 0.3115B + 0.3192C - 0.0178AB + 0.0045AC - 0.0242BC +$

$Y_4 = -0.0030 + 0.0079A + 0.0016B - 0.0221C - 0.0006AB + 0.0017AC - 0.0001BC + 0.0002A^2 + 0.0001B^2 + 0.0027C^2$

$Y_5 = 30.802 - 3.7819A + 0.3156B +$

$$0.6173C - 0.0118AB + 0.1525AC - 0.1435BC + 0.2098A^2 - 0.0005B^2 + 0.459C^2$$

从表 7 中可以看出, 各指标的拟合模型方差 P 值 < 0.05 , 显著; 失拟项 P 值 > 0.05 , 不显著,

表明所建立的模型具有统计学意义, 模型与实际值能较好地拟合。因此, 可以采用该方程来预测新落新妇苷、落新妇苷、野鸢尾黄素、次野鸢尾黄素、出膏率的实际情况。

表 7 小儿苓音汤提取工艺拟合模型的 ANOVA 方差分析结果

Tab 7 ANOVA analysis of the fitting model of the extraction process of Xiao'er Lingyin decoction

来源	Y_1		Y_2		Y_3		Y_4		Y_5	
	F 值	P 值	F 值	P 值	F 值	P 值	F 值	P 值	F 值	P 值
模型	12.0938	0.0017*	11.8342	0.0018*	8.7872	0.0045*	10.0603	0.0030*	4.0511	0.0393*
A	17.2078	0.0043	19.5688	0.0031	21.8902	0.0023	27.6195	0.0012	7.2208	0.0312
B	6.0633	0.0433	33.5937	0.0007	19.9218	0.0029	23.5230	0.0019	7.2114	0.0313
C	55.1158	0.0001	31.0025	0.0008	18.4263	0.0036	30.6053	0.0009	18.3482	0.0036
AB	8.4842	0.0226	10.6739	0.0138	11.6137	0.0113	5.2264	0.0561	0.0309	0.8655
AC	0.0031	0.9580	0.0276	0.8728	2.0028	0.2004	1.7401	0.2284	0.2079	0.6622
BC	7.2655	0.0308	4.9029	0.0625	0.8488	0.3875	0.0091	0.9265	1.1508	0.3190
A^2	9.0133	0.0199	4.1793	0.0796	2.4195	0.1634	0.0873	0.7763	1.6639	0.2390
B^2	6.3692	0.0396	1.5385	0.2562	0.2393	0.6397	0.4467	0.5253	0.0004	0.9841
C^2	0.0022	0.9641	1.0892	0.3303	1.6239	0.2431	1.1003	0.3282	0.4957	0.5041
失拟项	3.2003	0.1455**	2.9403	0.1622**	2.4832	0.1995**	2.5907	0.1906**	0.4296	0.7430**

注 (Note): * 表示 $P < 0.05$ (* indicates $P < 0.05$); ** 表示 $P > 0.05$ (** indicates $P > 0.05$)。

2.5 设计空间 (DS) 的建立、优化及验证

从上述分析结果发现, 3 个考察因素对新落新妇苷、落新妇苷、野鸢尾黄素、次野鸢尾黄素的含量及出膏率的影响均存在交互作用。通过 Design Expert 13.0 软件建立显著影响因素的设计空间, 并绘制响应面图, 见图 4。

从图中可以看出, 5 个指标中提取时间与提取次数、加水倍量与提取次数交互结果的响应面图相比加水倍量与提取时间交互结果的响应面图更陡峭, 交互作用更强, 对 5 个指标影响较大。且图 4 中各指标的等高线在加水倍量方向上分布更密集, 表明加水倍量对 CQAs 的影响较提取时间更为显著; 等高线在提取次数方向上分布较密集, 说明与提取时间相比, 提取次数对 CQAs 的影响更为突出; 等高线在提取次数方向上分布更为集中, 进一步证实提取次数对各指标的影响更为显著, 加水倍量的影响相对较小。综上所述, 各因素对 CQAs 的影响程度排序为: 提取次数 $>$ 加水倍量 $>$ 提取时间。

前期量值传递规律试验数据显示, 在提取过程中, 落新妇苷、野鸢尾黄素、次野鸢尾黄素含量显著降低, 有效成分损失较大。因此, 为应对实际生产过程中可能会出现损耗率过高的现象, 在建立小儿苓音汤颗粒指标成分含量标准范围时, 将各指标的下限值设定为复方样品中指标成分含量的均值, 上限值取指标成分含量均值 $\times$ (损耗率 + 1.3) [16]。据此, 确定 CQAs 的目标范围为: Y_1 0.4180% ~ 0.7814%, Y_2 1.3661% ~ 2.1424%, Y_3 0.1484% ~ 0.2177%, Y_4 0.0434% ~ 0.0674%, Y_5 20.26% ~ 26.33%。基于该目标范围, 筛选满足条件的工艺参数范围, 并对 5 个指标的设计空间取交集, 构建多指标综合设计空

间。鉴于模型预测值可能会与实际值之间存在一定偏差, 可在搜索符合目标的工艺参数范围时引入 $\alpha = 0.05$ 的置信区间, 对设计空间进行优化。使用 Design Expert 13.0 软件中的 Overlay plot 功能对设计空间进行可视化展示, 结果如图 5 所示。

从图中可以看出, 当提取次数为 2 次时, 无论考察因素如何调整, 响应值均无法同时满足 5 个指标的范围要求; 而提取次数为 3 次时, 设计空间较为狭窄。因此, 最终选择提取次数为 4 次。图 5C 中深黄色区域即为符合置信度 95% 的小儿苓音汤提取工艺 DS, 在该范围内所有试验点均满足 CQAs 的目标范围; 浅黄色区域内有 5% 的可能性达不到目标要求; 灰色区域内均无法达到优化目的。从图 C 可以看出所得 DS 范围并不规则, 为方便实际操作, 取红色框内区域作为最佳 DS, 即: 加水倍量 9.7 ~ 10.1 倍, 提取时间 19.3 ~ 20.3 min。

在所建立的 DS 内外各选取一个试验点, 平行 3 次, 进行工艺验证, 结果见表 8。依照该试验点的工艺参数进行试验, 得到空间内处方中新落新妇苷含量均值为 0.4885%、落新妇苷含量均值为 1.6333%、野鸢尾黄素含量均值为 0.1549%、次野鸢尾黄素含量均值为 0.0503%, 出膏率均值为 22.84%, 所得结果均符合前述 CQAs 的目标范围, 而空间外处方中各指标均不符合, 表明在设计空间内操作可保证提取工艺合格。

3 讨论

本研究通过分析小儿苓音汤颗粒中 4 个指标成分 (新落新妇苷、落新妇苷、野鸢尾黄素和次野鸢尾黄素) 在制备过程中的转移率发现, 在浓缩、干燥、制粒 3 个过程中 4 个指标成分的转移率较高 ($>$

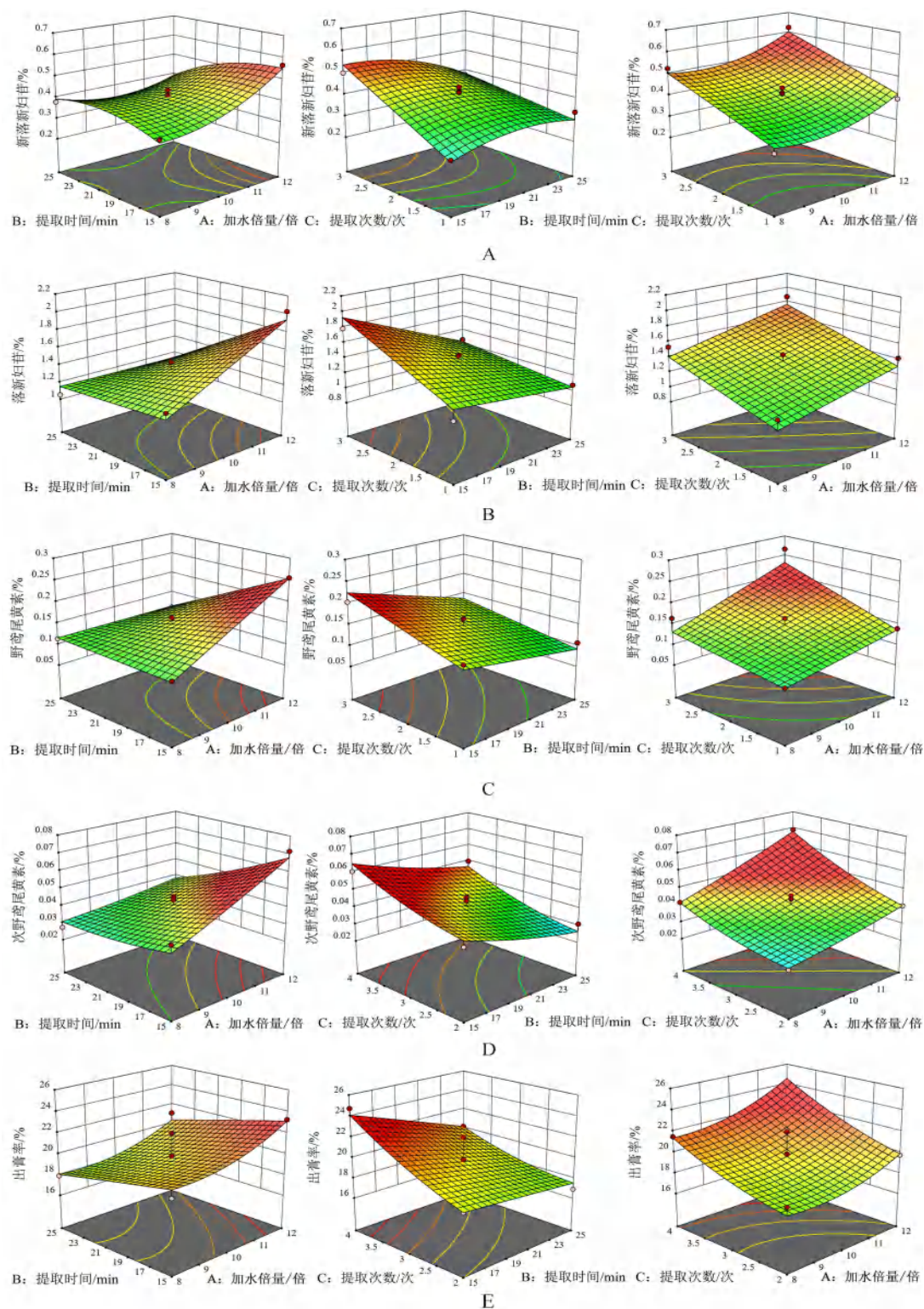


图4 提取时间、加水倍量和提取次数对新落新妇苷(A)、落新妇苷(B)、野鸢尾黄素(C)、次野鸢尾黄素(D)、出膏率(E)影响的交互作用
Fig 4 Interaction effects of extraction time, water addition ratio and extraction frequency on neostilbin (A), astilbin (B), irigenin (C), irisflorentin (D) and ointment yield (E)

80%), 均能够较好地传递, 而在提取过程中, 除新落新妇苷外的3个指标成分含量均显著降低, 传递效果较差, 表明提取过程为影响成分传递的关键环节。因此, 后续实验基于QbD理念, 以提取次数、提取时间、加水倍量作为提取工艺的CPPs, 4

个指标成分含量及出膏率为CQAs, 通过单因素试验结合Box-Behnken响应面法, 拟合CQAs与CPPs之间的数学模型, 探究其多维交互作用, 以确定最优工艺参数范围, 建立小儿芩音汤颗粒提取工艺DS(见图5), 并对DS内选取试验点进行验证, 发

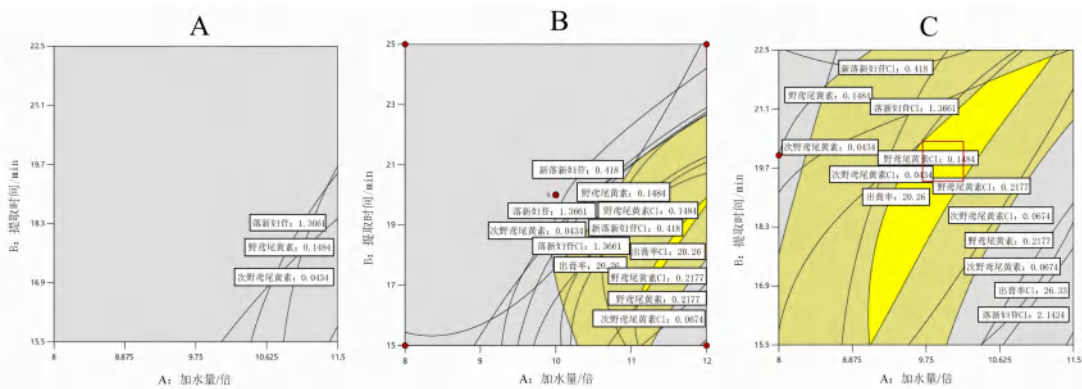


图 5 小儿苓音汤颗粒提取工艺设计空间

Fig 5 Design space of Xiao'er Lingyin decoction granules extraction process

A. 提取 2 次 (extract twice); B. 提取 3 次 (extract 3 times); C. 提取 4 次 (extract 4 times)

表 8 设计空间验证试验点的选取及验证 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab 8 Selection and verification of design space verification test sites ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

试验点	A/倍	B/min	新落新妇甘 /%	落新妇甘 /%	野鸢尾黄素 /%	次野鸢尾黄素 /%	出膏率 /%
空间内	9.5	17	0.4885 ± 0.0426	1.6333 ± 0.1066	0.1549 ± 0.0046	0.0503 ± 0.0057	22.84 ± 1.42
空间外	11	15	0.3849 ± 0.0094	1.2525 ± 0.0326	0.1233 ± 0.0041	0.0389 ± 0.0003	19.18 ± 0.37

现结果均符合 CQAs 的目标范围 (见表 8)。

通过分析指标成分在颗粒制备各阶段的量值传递情况,可以对制备工艺进行相应的调整和优化,确保这些成分能够稳定地传递到最终的制剂产品中。而 QbD 理念则主要是以药物活性成分作为指标,通过 Box-Behnken 响应面设计,以相对较少的试验次数拟合出较为精确的二次多项式模型,明确影响中药提取效果的关键因素及其最佳水平组合,并通过试验设计来评估这些因素的交互作用,更合理地调整提取条件,确定工艺参数范围,从而保证产品质量,降低能源消耗^[17]。本研究基于量值传递规律及 QbD 理念优化小儿苓音汤颗粒关键制备工艺,提升了小儿苓音汤颗粒整体质量,为其工业化生产提供了科学依据,并为中药制剂的工艺优化提供了参考。

参考文献

- [1] 孔令辉,马艳妮,张爱均,等.中药复方颗粒制备工艺质量控制及临床作用研究进展[J].时珍国医国药,2024,35(12):2842-2846.
- [2] 国家药品监督管理局.古代经典名方中药复方制剂及其物质基准申报资料要求(征求意见稿)[EB/OL].(2019-03-22)[2025-01-18].<https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/zhqyj/zhqyjyp/20190327150101694.html>.
- [3] 李小敏,宫贺,梁浩明,等.经典名方当归补血汤中挥发性成分量值传递规律研究[J].药物评价研究,2024,47(9):2017-2025.
- [4] 孙兴,陈旺,阮佳,等.黄芪桂枝五物汤提取工艺的优化[J].中成药,2020,42(10):2723-2729.
- [5] 张燕,崔佳琪,高珣,等.基于关键质量属性与质量源于设计的化学药物质量控制研究进展[J].药物评价研究,2023,46(12):2505-2514.
- [6] 白海菊,崔宏艳,吴佳骏,等.基于质量源于设计理念的藁朴夏苓颗粒的成型工艺研究[J].中药材,2024,47(1):163-167.
- [7] 邹惠亮,王新财,陈柯,等.土茯苓中 8 个成分的含量测定及化学计量学分析[J].中国药房,2024,35(19):2378-2382.
- [8] 宋梦新,闫炳雄,刘茹欣,等.川射干炮制“减毒”的质量标志物变化规律研究[J].中国现代中药,2024,26(12):2082-2091.
- [9] 陈荷莹,刘毅,刘会珍,等.落新妇苷的稳定性及生物活性研究进展[J].世界中医药,2023,18(11):1609-1614.
- [10] 刘丽娟,吴亚运,赵亚,等.落新妇苷的稳定性、药动学及制剂学研究进展[J].中华中医药学刊,2023,41(12):198-202,293.
- [11] Zheng D, Zhang L, Zhang QF. Isomerization of astilbin and its application for preparation of the four stereoisomers from Rhizoma Smilacis Glabrae [J]. J Pharm Biomed Anal, 2018, 155: 202-209.
- [12] 孙叶芬,岳倩侠,杜倩倩,等.基于质量标志物的白芍配方颗粒量值传递规律及工艺优化研究[J].安徽中医药大学学报,2022,41(6):76-82.
- [13] 李小敏,宫贺,梁浩明,等.经典名方当归补血汤中挥发性成分量值传递规律研究[J].药物评价研究,2024,47(9):2017-2025.
- [14] 孙萌,刘雪纯,赵玥瑛,等.Box-Behnken 设计-响应面法优化经典名方散偏汤的提取工艺[J].中南药学,2023,21(2):357-362.
- [15] 丁瑞雪,何雁,田香,等.基于质量源于设计理念的格达-4 味汤提取工艺研究[J].中国中药杂志,2019,44(13):2799-2805.
- [16] 孙萌,刘雪纯,赵玥瑛,等.基于 QbD 理念的散偏汤提取工艺设计空间预测[J].中国现代中药,2024,26(2):348-356.
- [17] 张梅,况刚,张有金,等.基于设计空间法优化北刘寄奴-骨碎补的提取工艺研究[J].中草药,2022,53(8):2341-2347.

(收稿日期:2025-03-18;修回日期:2025-05-28)

基于转录组学与 PCR 技术的荷叶黄酮部位 降血脂作用机制及药效研究

黄蓉¹, 杨乐怡¹, 周昶¹, 蔡园¹, 陈焕¹, 董世芬^{1, 2}, 姜艳艳^{1, 2*} (1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2. 国家中医药管理局“中药经典名方有效物质发现”重点实验室, 北京 102488)

摘要: **目的** 运用转录组学测序 (RNA-Seq) 技术探讨荷叶黄酮部位 (FCN) 对高脂血症小鼠降血脂的药效及作用机制, 并采用 qRT-PCR 方法进行验证。**方法** C57BL/6J 小鼠通过喂养高脂饲料建立高脂血症动物模型, 造模成功后随机分组, 药物干预 28 d 后检测小鼠血浆总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 和低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 水平以及肝脏 TC、TG 水平。RNA-Seq 检测小鼠肝脏组织差异表达基因, 筛选 FCN 治疗高脂血症可能干预的信号通路, 并对其中的核心富集基因进行 qRT-PCR 实验验证。**结果** FCN 可显著降低高脂模型小鼠的肝脏指数, 降低血浆 TC、TG、LDL-C 水平, 升高 HDL-C 水平, 降低肝脏 TC、TG 水平。RNA-Seq 分析得到 51 个共同差异表达基因及 4 条与高脂血症密切相关的通路, 包括初级胆汁酸生物合成通路、转化生长因子- β (TGF- β) 信号通路、氧化磷酸化通路和胆固醇代谢通路。综合分析, 共筛选出 5 个差异基因: 醛酮还原酶家族 1 成员 D1 (*Akr1d1*)、线粒体 ATP 酶合成体 ϵ 亚基 (*Atp5e*)、抑制素 β E (*Inhbe*)、脱氢酶亚单位 3 (*ND3*) 和前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (*Pcsk9*)。qRT-PCR 验证结果显示 FCN 通过 *Akr1d1*、*Pcsk9* 和 *Inhbe* 基因调控影响脂质水平。**结论** FCN 能够显著改善高脂血症小鼠的脂代谢紊乱; 其作用机制与初级胆汁酸生物合成通路、TGF- β 信号通路、氧化磷酸化通路和胆固醇代谢通路密切相关, 通过调控 *Akr1d1*、*Pcsk9* 和 *Inhbe* 基因来抑制高脂血症的发生与发展, 为荷叶降血脂作用机制的深入研究奠定基础。**关键词:** 荷叶; 高脂血症; 脂代谢异常; 转录组测序; qRT-PCR

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)12-3478-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.004

Hypolipidemic mechanism and efficacy of flavonoids from *Nelumbo nucifera* based on transcriptomics and PCR

HUANG Rong¹, YANG Leyi¹, ZHOU Chang¹, CAI Yuan¹, CHEN Huan¹, DONG Shifen^{1, 2}, JIANG Yanyan^{1, 2*} (1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488; 2. Key Laboratory of Exploring Effective Substance in Classic and Famous Prescriptions of Traditional Chinese Medicine, The State Administration of Traditional Chinese Medicine of People's Republic of China, Beijing 102488)

Abstract: Objective To determine the hypolipidemic efficacy and mechanism of flavonoid components of *Nelumbo nucifera* (FCN) in hyperlipidemic mice with transcriptome sequencing (RNA-Seq) technology, and verify the validation by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). **Methods** C57BL/6J mice were given a high-fat diet to establish a hyperlipidemic mouse model. After successful model establishment, the mice were randomly divided. After 28 days of pharmacological intervention, the plasma concentrations of total cholesterol (TC), triglycerides (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), along with hepatic TC and TG levels were measured. RNA-Seq was used to detect differentially expressed genes (DEGs) in mouse liver tissue, screen potential signaling pathways involved in FCN-mediated hyperlipidemia treatment. qRT-PCR was used to further

基金项目: 北京市自然科学基金项目 (No. 7232287)。

作者简介: 黄蓉, 女, 硕士, 主要从事中药复方药效物质基础与质量控制方法研究, email: 2205353796@qq.com *通信作者: 姜艳艳, 女, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药复方药效物质基础与质量控制方法研究, email: jyym1129@163.com

validate key enriched genes. **Results** FCN significantly reduced the liver index, decreased the plasma TC, TG and LDL-C levels, increased HDL-C levels, and decreased liver TC and TG levels in HFD mice. RNA-Seq identified 51 DEGs and 4 key pathways associated with hyperlipidemia, namely primary bile acid biosynthesis pathway, transforming growth factor- β (TGF- β) signaling pathway, oxidative phosphorylation pathway and cholesterol metabolism pathway. Five candidate genes: Aldo-keto reductase family 1 member D1 (*Akr1d1*), ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, epsilon (*Atp5e*), Inhibin subunit beta E (*Inhbe*), NADH dehydrogenase (*ND3*) and Proprotein convertases subtilisin/kexin type 9 (*Pcsk9*) were selected by comprehensive analysis. qRT-PCR validation confirmed that lipid metabolism was influenced by FCN via regulating *Akr1d1*, *Pcsk9*, and *Inhbe* genes. **Conclusion** The flavonoid components of *Nelumbo nucifera* may effectively ameliorate lipid metabolism disorders in hyperlipidemic mice. The mechanism is closely linked to modulation of primary bile acid biosynthesis pathway, TGF- β signaling pathway, oxidative phosphorylation pathway and cholesterol metabolism pathway, and inhibits the occurrence and development of hyperlipidemia by regulating *Akr1d1*, *Pcsk9* and *Inhbe* genes. This study provides a foundation for further exploration of hypolipidemic mechanism of *Nelumbo nucifera*.

Key words: *Nelumbo nucifera*; hyperlipidemia; abnormal lipid metabolism; transcriptome sequencing; qRT-PCR

肥胖、脂肪肝和高脂血症等脂质代谢疾病的患病率在世界范围内迅速增加,严重威胁人类生命健康。高脂血症是指以血浆中一种或多种脂质成分,主要指三酰甘油(TG)和总胆固醇(TC)异常增高为特征的代谢紊乱综合征^[1]。如今,很多中药如荷叶^[2]、山楂^[3]、决明子^[4]等被广泛用于治疗慢性疾病,具有耐药性低、不良反应少等优点。荷叶为睡莲科莲属植物莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 的干燥叶,具有止血利湿、升发清阳的功效,主要用于暑热烦渴、暑湿泄泻、血热吐衄、便血崩漏等症^[5]。临床应用及现代药理学研究表明,荷叶广泛应用于预防或治疗高脂血症等慢性代谢性疾病^[6]。黄酮类化合物作为荷叶的核心活性成分^[7],在预防和治疗高脂血症方面效果显著^[8]。课题组前期研究表明,荷叶中的两种黄酮类化合物,金丝桃苷和槲皮素-3-O- β -D-葡萄糖醛酸苷,能够显著降低血浆中 TC、TG 水平,具有显著的降血脂活性^[9]。然而,以黄酮类化合物为核心的荷叶降血脂的作用机制还有待深入系统探讨。

在前期研究基础上,基于转录组测序及 qRT-PCR 技术,探讨荷叶黄酮部位(FCN)的降脂药效及作用机制。运用高脂血症动物模型进一步明确 FCN 的降血脂药效,采用转录组测序技术从基因水平探寻 FCN 干预后高脂血症小鼠的差异表达基因,并进行 qRT-PCR 验证。本研究为从多个角度、多个层次系统开展荷叶降血脂作用机制研究奠定了基础,并为进一步开发降血脂天然中药产品和临床应用提供了科学依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,体重(20 $\pm$ 2)g [北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2023-0011]。SPF 级高脂饲料由北京斯贝福生物技术有限公司定制,饲料配方为基础饲料添加 20% 蔗糖,15% 猪油,1.2% 胆固醇,0.2% 胆酸钠。实验期间实验环境室温保持在 21~24℃,相对湿度保持在 40%~60%,12 h 明暗交替。动物实验经北京中医药大学动物实验伦理审查委员会批准(No. BUCM-2023101605-4087)。

1.2 试剂

荷叶(批号:20170201,百信缘大药房,产地为湖南),经北京中医药大学张媛教授鉴定为睡莲科植物莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 的干燥叶。甲醇(质谱级)(美国 Thermo Fisher 公司);乙醇(国药集团化学试剂有限公司);甲醇(色谱级)(天津市致远化学试剂有限公司);TC 试剂盒、TG 试剂盒、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)试剂盒、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)试剂盒(南京建成生物工程研究所);辛伐他汀(批号:C17010409,石家庄集团欧意药业有限公司);TRIzol 试剂(美国 Invitrogen 公司);无 RNase 水(韩国 Walgene 公司);安捷伦 RNA 6000 Nano 试剂盒(美国安捷伦公司);DNaseI 试剂[美国 Fermentas(MBI)公司]。

1.3 仪器

Sartorius BT 25S 电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);酶标仪(美国伯腾仪器有限公司);微量移液器(德国 Eppendorf 公司);Sigma3-16P 离心机(德国 Sigma 公司);超低温冰箱、制冰机(日本 Sanyo 公司);KQ-100DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);

百分之一电子天平(上海衡平仪器仪表厂);DS电热三用水浴锅(北京医疗设备厂);SHB-III循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);876-2A型真空干燥箱(上海锦屏仪表有限公司);Thermo高速冷冻离心机、Nano Drop 2000紫外分光光度计(美国 ThermoScientific 公司);匀浆机(德国 IKA 公司);氮吹仪(上海继谱电子科技有限公司);Agilent 2100 Bioanalyzer(美国安捷伦公司);超纯水机(法国 Elix 公司);Illumina Xplus 型高通量转录组测序仪(美国 Illumina 公司);荧光定量 PCR 仪(LC480 II)(瑞士 Roche 公司);普通 PCR 仪(9700)(美国 ABI 公司);板式离心机 TDZ5(上海卢湘仪离心机仪器有限公司)。

2 方法

2.1 样品制备及含量测定

荷叶以 30 倍 70% 乙醇回流提取 2 次,每次 1.5 h,滤过,合并滤液,减压回收溶剂至无醇味,浓缩,减压干燥,得干浸膏。取干浸膏适量,加 70% 乙醇溶解,配制成质量浓度为 14 mg/mL,以药材量计)的上样液,通过 AB-8 型大孔吸附树脂柱(径高比 1:7)进行纯化富集,上样量为 9.595 mg/mL(以干浸膏量计),吸附流速 3 BV/h,先以水洗脱 3 BV 除杂,再以 70% 乙醇洗脱 3 BV,洗脱流速 3 BV/h,收集 70% 乙醇洗脱液,减压回收溶剂,浓缩,减压干燥,得 FCN。

对 FCN 主要黄酮类成分的含量进行了分析^[10]。建立了 FCN 中主要黄酮类成分(芦丁、金丝桃苷、异槲皮素、槲皮素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖醛酸苷、紫云英苷和槲皮素)的高效液相色谱(HPLC)含量测定方法,测定 10 批 FCN 中指标性成分的含量。

2.2 造模、分组及给药

实验前将 36 只小鼠适应性饲养 7 d,称体重并随机取 6 只作为空白组,以正常饲料喂养,其余 30 只用高脂饲料喂养 28 d 后眼眶取血,测定。与空白组相比,造模组测得小鼠血清中 TC 和 TG 含量均显著升高,说明造模成功。将造模组小鼠随机分为 5 组(每组 6 只):模型组,FCN 低、中、高剂量(45.83、91.67、137.50 mg/kg,分别相当于 5 倍成人日用量、10 倍成人日用量及 15 倍成人日用量剂量组),阳性药组(辛伐他汀片,22.75 mg/kg,相当于 15 倍成人日用量)。各给药组小鼠灌胃相应剂量的药物,空白组和模型组灌胃生理盐水,所有灌胃液均按 1 mL/100 g 给予。连续 28 d,给药同时维持高脂饮食,每周称 1 次体重,以便及时调整给药剂量。

2.3 样本的采集和保存

2.3.1 血浆样本 给药 28 d,最后一次给药后,自由饮水,禁食 12 h。各组小鼠称重后腹腔注射戊巴比妥钠麻醉后,摘眼球取血,采集血液,离心

(4000 r/min, 10 min),取上清液分装,于-80℃冰箱保存备用。

2.3.2 肝脏样本 各组小鼠摘眼球取血处死后,剖取肝脏,生理盐水冲洗,滤纸吸干后称重,即得肝脏湿质量,迅速置于液氮中速冻,后转入-80℃冰箱,保存待测。取小鼠肝脏组织 0.1 g,加入 9 倍体积的磷酸盐缓冲液(PBS),冰水浴条件下用匀浆机充分研磨,离心(3000 r/min, 20 min),吸取上清液,得到小鼠 10% 肝匀浆。按照公式 $G(\%) = W_1/W_0 \times 100\%$ 计算小鼠肝脏指数(其中, G 为肝脏指数, W_1 为肝脏湿质量, W_0 为小鼠禁食后体质量)。

2.4 血脂水平测定

根据试剂盒说明书,测定小鼠血浆中 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C 的含量以及小鼠 10% 肝匀浆中 TC、TG 的含量。

2.5 总 RNA 提取与转录组学测序(RNA-Seq)分析

空白组、模型组以及 FCN 高剂量组小鼠肝脏组织样本中随机选取 3 个样本,分别取相同部位 100 mg。采用 TRIzol 试剂,按照其试剂盒说明书方法分别提取空白组、模型组与 FCN 高剂量组 3 组样本中小鼠肝脏组织的总 RNA。采用 RNA 专用琼脂糖电泳法检测提取到的 RNA 样本的降解程度,并检测其中是否存在 DNA 污染。采用 Agilent RNA 6000 nano kit 精确检测 RNA 的完整性,采用 NanoDrop2000 紫外分光光度计检测纯度并进行定量。在完成对 RNA 的质量检测后,富集 mRNA,将 mRNA 打成 reads 短片段,以 mRNA 为模板,用六碱基随机引物逆转录合成 cDNA,并且对 cDNA 进行纯化。纯化后的 cDNA 再进行末端修复、加 A 尾并连接测序接头,最后进行 PCR 富集,得到最终的 cDNA 文库。文库构建完成后,在 Illumina 平台上进行上机测序。

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

对转录组测序的原始数据进行过滤,筛选得到高质量的数据信息;用 DESeq2 软件研究各组之间的差异表达基因,将条件设置为差异倍数(FC) > 1.5,显著性 $P < 0.05$,对 9 个样品的 mRNA 进行差异表达基因的筛选。使用 GO 数据库对所获得基因进行富集分析^[11];再用 KEGG 进行代谢通路的富集分析,从而获取关键通路信息^[12]。

2.7 qRT-PCR 检测基因表达

用 TRIzol 提取肝脏组织总 RNA,检测其浓度和完整性后,按试剂盒说明逆转录成 cDNA。引物序列见表 1。PCR 反应条件:94℃ 30 s; 94℃ 5 s, 60℃ 30 s, 45 个循环;反应完毕,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达量,以对筛选出的关键基因:

醛酮还原酶家族 1 成员 D1 (*Akr1d1*)、线粒体 ATP 酶合成体 ϵ 亚基 (*Atp5e*)、抑制素 β E (*Inhbe*)、脱

氢酶亚单位 3 (*ND3*) 和前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (*Pcsk9*) 表达情况进行验证。

表 1 引物序列
Tab 1 Primer sequences

基因名称	F (5'-3')	R (5'-3')
<i>β-actin</i>	GGCTCCTAGCACCATGAAGA	AGCTCAGTAACAGTCCGCC
<i>Akr1d1</i>	TTCCAAGCTGGAGTAAGGT	GCTCTGCTAATAACTGCCAAT
<i>Atp5e</i>	CTGGACTCAGCTACATCCG	AAGTCTTCTCAGCGTTTCG
<i>Inhbe</i>	CGAGAAAGAAGTTCCTCAAGTA	CCTGTTCTTAGCCTGTATGT
<i>ND3</i>	ATCCCTAACGCTAATTCTAG	TCGAATCCGCATTCATATGGAT
<i>Pcsk9</i>	TGCTCCTGGACCTATACT	GATAGAGGTGTGCTGGTCA

2.8 统计学分析

所有数据均以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析, 两组实验组间比较采用 *t* 检验法分析, 多个实验组间比较采用单因素方差 ANOVA 法分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 Origin 2018 软件对实验数据进行绘图。模型组数据采用归一化法处理。

3 结果

3.1 FCN 中主要黄酮类成分的含量测定

10 批 FCN 中主要黄酮类成分(芦丁、金丝桃苷、异槲皮素、槲皮素-3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖醛酸苷、紫云英苷、槲皮素)的含量范围分别为 0.1141 ~ 0.6765、0.4618 ~ 6.5770、3.4379 ~ 9.3935、7.3575 ~ 36.943、0.4321 ~ 3.2773、0.1804 ~ 1.8320 mg/g。

3.2 造模 28 d 后 C57BL/6J 小鼠血脂的变化

高脂饲料喂养 28 d 后, 造模组小鼠血清 TC、TG 含量均比空白组高 ($P < 0.001$), 说明造模成功, 结果见表 2。

表 2 造模 28 d 后 C57BL/6J 小鼠血清 TC 和 TG 的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Level of serum TC and TG in C57BL/6J mice after 28 days of modeling ($\bar{x} \pm s$)

组别	TC/(mmol/L)	TG/(mmol/L)
空白组	3.597 $\pm$ 0.327	1.005 $\pm$ 0.051
造模组	5.742 $\pm$ 0.651 ^{###}	1.810 $\pm$ 0.343 ^{###}

注: 与空白组相比, ^{###} $P < 0.001$ 。

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

3.3 FCN 对 C57BL/6J 小鼠肝脏质量和肝脏指数的影响

脂代谢紊乱与脂肪肝等疾病密切相关。如图 1 所示, 与空白组比较, 模型组小鼠的肝脏湿质量、肝脏指数均显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$); 与模型组比较, FCN 中、高剂量组和辛伐他汀组小鼠肝脏湿质量与指数均显著降低 ($P < 0.05$ 或 0.01), 表明 FCN 能够改善肝脏的脂肪蓄积和水肿现象。

3.4 FCN 对 C57BL/6J 小鼠血脂水平的影响

如图 2 所示, 与空白组比较, 模型组小鼠血浆 TC、TG、LDL-C 水平均显著升高 ($P < 0.001$),

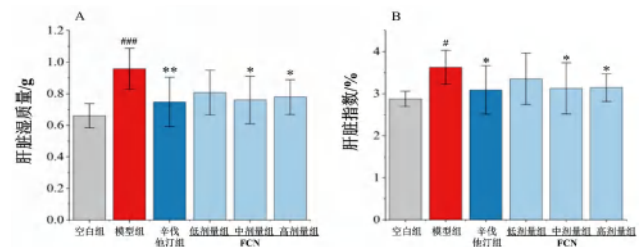


图 1 荷叶黄酮部位对 C57BL/6J 小鼠肝脏湿质量 (A)、肝脏指数 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig 1 Effect of the flavonoid components of *Nelumbo nucifera* on liver weight (A) and liver index (B) in C57BL/6J mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

注: 与空白组相比, [#] $P < 0.05$, ^{###} $P < 0.001$; 与模型组相比, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

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

HDL-C 水平显著降低 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 各给药组小鼠血浆 TC、LDL-C 水平均显著降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$), 辛伐他汀组和高剂量组小鼠血浆 TG 水平显著降低 ($P < 0.01$), 各给药组 HDL-C 水平显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$)。

与空白组相比, 模型组小鼠肝脏组织 TC 和 TG 水平显著增加 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。与模型组相比, 辛伐他汀组和高剂量组小鼠肝脏组织 TC 含量显著降低 ($P < 0.05$); 各给药组小鼠肝脏组织 TG 含量显著降低 ($P < 0.001$), 表明 FCN 能够显著改善脂代谢异常。

3.5 RNA-Seq 分析

3.5.1 测序序列质量评估 共完成 9 个样品[空白组 (KB) 3 个、模型组 (MX) 3 个、FCN 高剂量组 (HY) 3 个]的转录组测序分析。Illumina 测序中碱基正确识别率范围为 99.98% ~ 99.99%, Phred 分值均在 30 以上, 证明碱基判别错误率较低, 测序序列质量符合要求。

3.5.2 基因差异表达分析结果 以 $FC > 1.5$ 、 $P < 0.05$ 为条件筛选差异表达基因 (DEGs), 如图 3 所示, 空白组 vs 模型组筛选后共得到 413 个 DEGs, 其中 180 个基因上调, 233 个基因下调。FCN 给药组 vs 模型组筛选后共得到 620 个

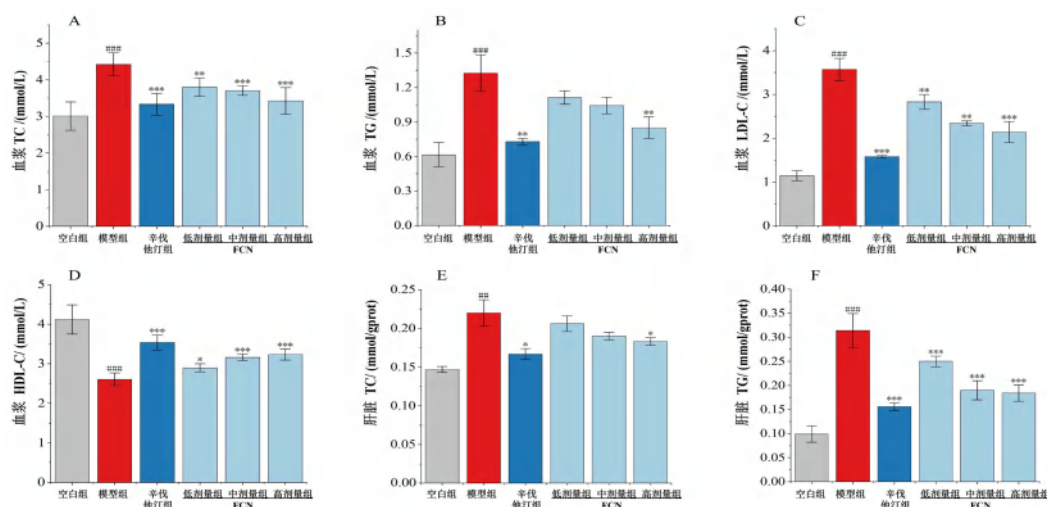


图2 荷叶黄酮部位对 C57BL/6J 小鼠血浆 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 以及肝脏 TC、TG 水平的影响 ($x \pm s$, $n = 6$)

Fig 2 Effect of flavonoid components of *Nelumbo nucifera* on the levels of plasma TC, TG, LDL-C, HDL-C and liver TC, TG of C57BL/6J in mice ($x \pm s$, $n = 6$)

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

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

DEGs, 其中 509 个基因上调, 111 个基因下调。将空白组 vs 模型组筛选到的 413 个 DEGs 和 FCN 给药组 vs 模型组筛选得到的 620 个 DEGs 进一步取交集, 得到 51 个共同的 DEGs。

3.5.3 GO 功能富集分析 根据 P 值排序, 筛选在生物过程、细胞成分和分子功能三种分类中对应 PopHits ≥ 5 的 GO 条目, 选取每个条目对应的一 $\log_{10}P$ 值由大到小排序的前 5 条, 得到 GO 富集分析 top15, 结果如图 4A 所示。结果表明, 与生物过程相关的差异基因主要富集在细胞质翻译、质子动力驱动的线粒体三磷酸腺苷 (ATP) 合成、ATP 生物合成过程、脂质代谢过程等过程; 与细胞成分相关的差异基因主要富集在线粒体内膜、核糖体、细胞质核糖体亚基等; 与分子功能相关的差异基因主要富集在核糖体的结构成分、NADH 脱氢酶活性、极低密度脂蛋白颗粒结合、脂肪结合位点等位点。综上所述, FCN 可能是通过影响多种关键酶的活性, 进而对相关脂质代谢过程进行调节, 发挥降血脂作用。

3.5.4 KEGG 通路富集分析^[13] 筛选对应 PopHits ≥ 5 的条目, 按照每个条目对应的一 $\log_{10}P$ 值由大到小排序, 筛选前 15 条, 得到 KEGG 富集分析前 15, 结果如图 4B 所示。结果表明, 与降血脂作用联系较密切的包括初级胆汁酸生物合成、转化生长因子- β (TGF- β) 信号通路、氧化磷酸化和胆固醇代谢四条通路。

3.6 FCN 对小鼠肝脏 *Akr1d1*、*Pcsk9* 和 *Inhbe* 基因表达的影响

综合差异基因表达分析结果, 筛选参与影响 KEGG 通路富集分析的 4 条通路中的基因与空白组和

FCN 给药组共同显著回调基因中的重合基因, 共筛选出 5 个差异基因 (*Akr1d1*、*Atp5e*、*Inhbe*、*ND3* 和 *Pcsk9*), 用于 qRT-PCR 定量分析。如图 5 所示, 与模型组相比, 空白组的 *Akr1d1*、*Pcsk9* mRNA 表达量显著上调 ($P < 0.01$); *Inhbe* mRNA 表达量显著下调 ($P < 0.01$)。FCN 干预后, 与模型组相比, *Akr1d1* 和 *Pcsk9* mRNA 的表达量显著上调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); *Inhbe* mRNA 表达量显著下调 ($P < 0.01$)。以上结果表明, FCN 主要通过影响 *Akr1d1*、*Pcsk9* 和 *Inhbe* mRNA 的表达发挥降血脂作用。

4 讨论

高脂血症作为一种常见的代谢性疾病^[14], 其发病机制涉及脂质代谢紊乱、炎症反应、氧化应激及肠道菌群失调等多个病理环节^[15]。中药黄酮类成分在降血脂方面展现出独特优势^[16]。荷叶作为常用降脂中药, 其黄酮类成分 (如槲皮素、异鼠李素等) 已被证实可通过多种途径发挥降血脂作用^[17-18], 如抑制胆固醇合成关键酶 (如 HMG-CoA 还原酶)、调节脂蛋白代谢相关基因 (如 *PPAR α* 、*LDLR*)、改善胰岛素抵抗及抗氧化应激等^[19-22]。此外, 荷叶黄酮类成分在调节肠道菌群-肝脏代谢轴方面显示出独特作用, 可通过调控肠道菌群结构 (如增加短链脂肪酸产生菌), 减少内毒素入血, 进而改善肝脏脂质代谢^[23]。黄酮类成分还具有抗氧化和抗炎作用, 可协同减轻高脂血症诱发的血管内皮损伤, 从而在降脂的同时发挥心血管保护作用^[24]。

本研究以荷叶中的黄酮类化合物为研究对象, 系统开展了其降血脂药效及作用机制研究。FCN 干预能显著降低高脂血症小鼠血浆中 TC、TG 和

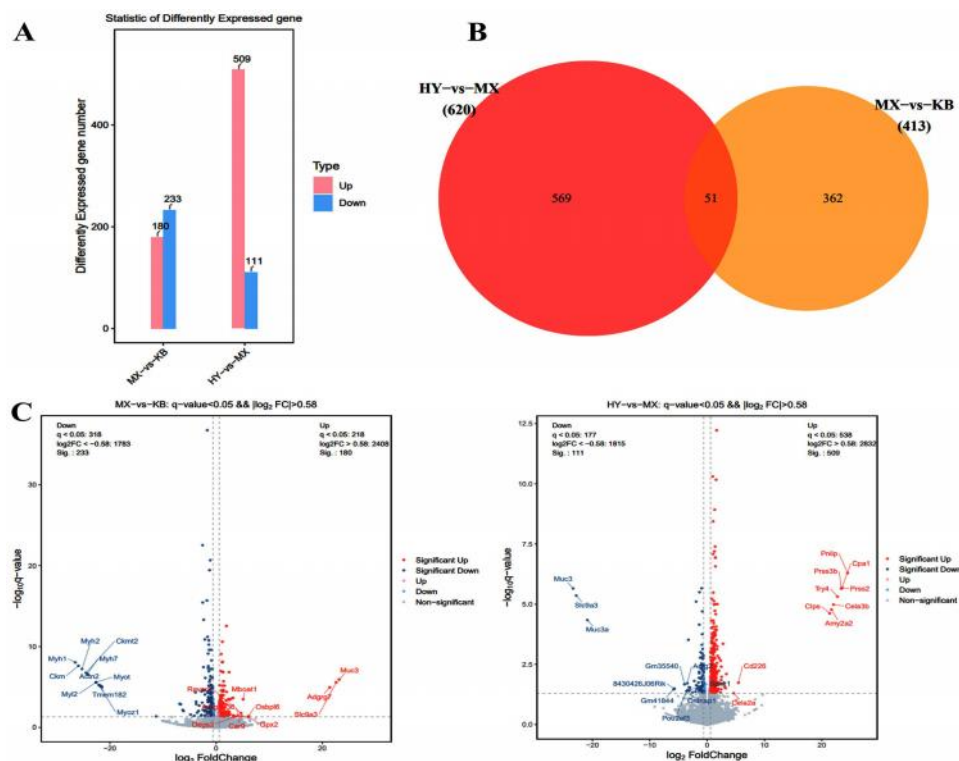


图 3 荷叶黄酮部位干预高脂血症小鼠的差异表达基因统计分析

Fig 3 Differentially expressed genes in mice with hyperlipidemia induced by the flavonoid components of *Nelumbo nucifera*

A、B. 差异表达基因统计图 (differential expression gene statistics map); C. 差异表达基因火山图 (differential expression gene volcano map)

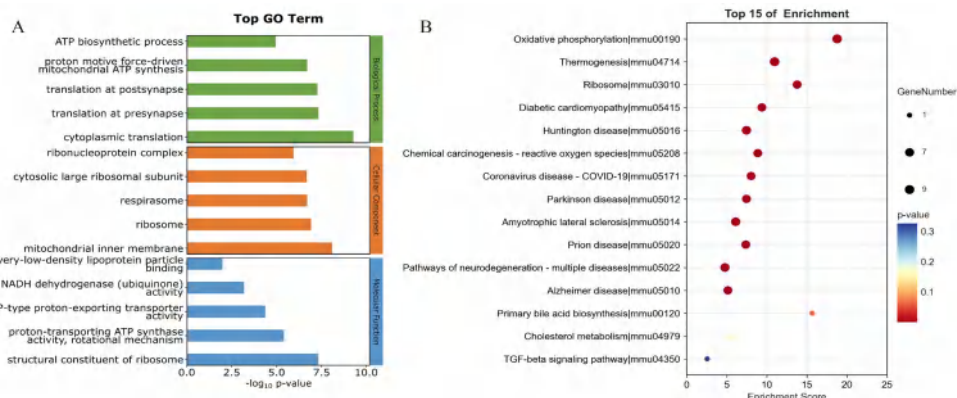


图 4 GO 功能 (A) 和 KEGG 通路富集分析 (B)

Fig 4 GO function (A) and KEGG pathway enrichment analysis (B)

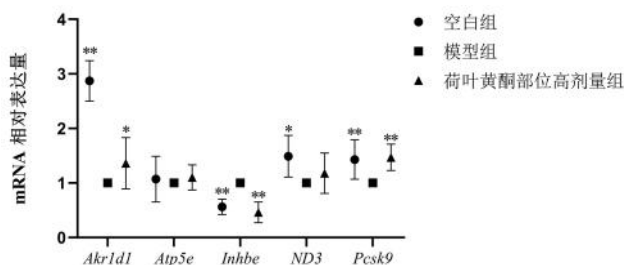


图 5 荷叶黄酮部位对高脂血症模型小鼠肝脏中 mRNA 表达的影响 ($n = 3$)

Fig 5 Effect of the flavonoid components of *Nelumbo nucifera* on mRNA expression in liver of hyperlipidemia model mice ($n = 3$)

注: 与模型组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

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

LDL-C 水平, 升高 HDL-C 水平。RNA-seq 测序结果显示, FCN 干预高脂血症涉及的主要通路有初级胆汁酸生物合成通路、TGF- β 信号通路、氧化磷酸化通路和胆固醇代谢通路。PCR 验证结果显示, FCN 对 *Akrl1d1*、*Pcsk9* 和 *Inhbe* mRNA 的表达具有调控作用。

开展中药作用机制研究, 是从现代科学角度揭示中药如何发挥途径的重要途径, 也是进行中药新药研发的基础和前提。黄酮类成分在多种中药中广泛存在, 药效确切, 作用途径多样^[25-27]。在开展荷叶黄酮类成分治疗高脂血症的作用机制研究中, 我们发现其通过调控多个通路中的多个基因发挥药效。然而药物成分发挥作用的维度较

宽,特别是对于中药来说,其发挥作用的场所除了靶器官,还可能存在于肠道中或间接发挥作用,在微观层面,靶点蛋白也是药物发挥作用的关键“落脚点”。因此,开展作用机制研究需整合蛋白质组学、代谢组学、肠道微生态分析等多种技术^[28-29],还可结合系统生物信息学和 AI 技术等现代方法^[30],全面解析中药,作用机制研究,为中药现代化研究提供新的思路和方法学支撑。

参考文献

- Gaggini M, Gorini F, Vassalle C. Lipids in atherosclerosis: pathophysiology and the role of calculated lipid indices in assessing cardiovascular risk in patients with hyperlipidemia [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 24 (1): 75.
- 江健, 许倩楠, 车莉, 等. 荷叶中生物碱类化合物及其降血脂活性研究 [J]. *中国中药杂志*, 2024, 49 (19): 5238-5243.
- 于蓓蓓, 闫雪生, 孙丹丹. 山楂药理作用及其机制研究进展 [J]. *中南药学*, 2015, 13 (7): 745-748.
- 张茜茜, 曹春然, 李雪梅, 等. 决明子在保健食品中的使用情况分析 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2023, 35 (9): 1265-1271.
- 程婷婷, 原新博, 惠小涵, 等. 荷叶生物碱成分及其调脂机制研究进展 [J]. *中草药*, 2019, 50 (8): 1998-2003.
- Bharathi Priya L, Huang CY, Hu RM, et al. An updated review on pharmacological properties of neferine—a bis-benzylisoquinoline alkaloid from *Nelumbo nucifera* [J]. *J Food Biochem*, 2021, 45 (12): e13986.
- Liu LL, Xiao AP, Zhang Y, et al. Efficient extraction of flavonoids from lotus leaves by ultrasonic-assisted deep eutectic solvent extraction and its evaluation on antioxidant activities [J]. *Separations*, 2023, 10 (2): 65.
- Li M, Qian MQ, Jiang Q, et al. Evidence of flavonoids on disease prevention [J]. *Antioxidants*, 2023, 12 (2): 527.
- Zhang Y, Li LH, Zhang JH, et al. Screening of hypolipidemic active components in Jiang-Zhi-Ning and its preliminary mechanism research based on “active contribution value” study [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 272: 113926.
- Yang LY, Zhou C, Huang R, et al. Study on the chemical characterization and hypolipidemic function of *Nelumbo nucifera* based on its flavonoid components [J]. *Molecules*, 2024, 29 (23): 5798.
- 洗奕宏, 李雅琦, 陈斯琪, 等. 基于 RNA-Seq 技术分析小半夏汤抑制 1-PBG 诱导的大鼠异食癖行为的转录组学特征 [J]. *中药药理与临床*, 2020, 36 (6): 47-52.
- 夏霜莉, 王维, 张冰琳, 等. 天麻总酚抗大鼠脑缺血再灌注损伤的转录组学分析及实验验证 [J]. *中草药*, 2021, 52 (5): 1402-1410.
- Kanehisa M, Araki M, Goto S, et al. KEGG for linking genomes to life and the environment [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 36 (Database): D480-D484.
- 邓远雄, 胡剑卓, 余成烨, 等. 高脂血症大鼠灌胃黄连解毒汤后黄芩苷的药代动力学研究 [J]. *中南药学*, 2020, 18 (12): 1986-1991.
- 郭照, 韩佳琳, 张洁, 等. 中医药治疗糖尿病肾病合并高脂血症的研究进展 [J]. *中医临床研究*, 2024, 16 (25): 144-148.
- Liu B, Yao ZQ, Song L, et al. Vitexin alleviates lipid metabolism disorders and hepatic injury in obese mice through the PI3K/AKT/mTOR/SREBP-1c pathway [J]. *Eur J Med Chem*, 2025, 287: 117379.
- 吴梅, 乔春莹, 叶欢, 等. 二氢槲皮素对高脂饲料联合酒精狂饮小鼠肝脏脂肪蓄积的干预机制 [J]. *中国药理学通报*, 2020, 36 (1): 147-148.
- 马悦, 闫珊, 南晓东, 等. 异鼠李素的心血管药理作用研究进展 [J]. *甘肃科技*, 2020, 36 (19): 158-160.
- Yu ZX, Xu HL, Yu XF, et al. Hypolipidemic effects of total flavonoids extracted from the leaves of *Actinidia kolomikita* in rats fed a high-fat diet [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2017, 20 (10): 1141-1148.
- Yang TT, Zhou WT, Xu WQ, et al. Modulation of gut microbiota and hypoglycemic/hypolipidemic activity of flavonoids from the fruits of *Lycium barbarum* on high-fat diet/streptozotocin-induced type 2 diabetic mice [J]. *Food Funct*, 2022, 13 (21): 11169-11184.
- 王永红, 龙晓莉, 何菲, 等. 槐角总黄酮对高脂血症大鼠降血脂及抗氧化能力的实验研究 [J]. *第四军医大学学报*, 2009, 30 (22): 2677-2681.
- Sun JH, Wang ZD, Chen L, et al. Hypolipidemic effects and preliminary mechanism of chrysanthemum flavonoids, its main components luteolin and luteoloside in hyperlipidemia rats [J]. *Antioxidants*, 2021, 10 (8): 1309.
- Feng JC, Wang J, Bu TT, et al. Structural, in vitro digestion, and fermentation characteristics of lotus leaf flavonoids [J]. *Food Chem*, 2023, 406: 135007.
- 鲍美华, 肖艳, 冷一平, 等. 异鼠李素对氧化型低密度脂蛋白所致内皮细胞凋亡的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18 (6): 445-448.
- 师艳艳, 康少英, 杨武燕, 等. 杜仲总黄酮对腰椎间盘突出症大鼠的抗炎镇痛作用研究 [J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2025, 33 (4): 11-15.
- 郜怡雪, 郭琳, 郎林艳, 等. 蒲公英总黄酮通过调控肠道菌群对小鼠肥胖的抑制作用机制 [J]. *中国药房*, 2025, 36 (3): 293-299.
- 武天琦, 桑希生. 乌梅有效成分对 2 型糖尿病的作用机制及相关研究进展 [J]. *中医药学报*, 2025, 53 (4): 108-113.
- Cui Z, Li CF, Liu W, et al. Scutellarin activates IDH1 to exert antitumor effects in hepatocellular carcinoma progression [J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15 (4): 267.
- Zeng SL, Li SZ, Xiao PT, et al. Citrus polymethoxyflavones attenuate metabolic syndrome by regulating gut microbiome and amino acid metabolism [J]. *Sci Adv*, 2020, 6 (1): eaax6208.
- Ding X, Liu J, Chen XL, et al. Exploring the mechanism of luteolin improving immune and inflammatory responses in systemic sclerosis based on systems biology and cell experiments [J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 138: 112587.

(收稿日期: 2025-03-20; 修回日期: 2025-05-28)

霍山石斛对糖尿病及糖尿病肝损伤大鼠的治疗作用及机制的初步探究

慕文瑜¹, 张雪婷¹, 李金森¹, 解会群^{1, 2}, 金淑湘¹, 彭代银^{1, 2, 3, 4}, 韩岚^{1, 2, 3, 4*} (1.安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2.中药资源保护与开发研究所, 合肥 230012; 3.安徽道地中药材品质提升协同创新中心, 合肥 230012; 4.现代中药安徽省重点实验室, 合肥 230012)

摘要: **目的** 通过药效学分析、霍山石斛组分定性分析、网络药理学和分子对接技术, 初步探讨霍山石斛提取液对糖尿病及糖尿病肝损伤的作用机制。 **方法** 通过注射链脲佐菌素构建糖尿病大鼠模型, 大鼠随机分为正常对照组、模型组、霍山石斛低剂量组、霍山石斛中剂量组、霍山石斛高剂量组和二甲双胍组, 检测肝功能、胰岛素抵抗、炎症指标及氧化应激指标, 并利用 UPLC-Q-Orbitrap-MS 鉴定霍山石斛成分, 结合数据库筛选靶点, 构建“药物-靶点-通路”网络并进行分子对接。 **结果** 霍山石斛提取液可降低模型大鼠血糖、谷草转氨酶、谷丙转氨酶及胰岛素抵抗指数, 减轻肝胰组织损伤, 抑制炎症因子并调节氧化应激平衡。从水提物中共鉴定出 87 种成分, 筛选出糖尿病相关靶点 204 个, 糖尿病肝损伤靶点 556 个。GO 富集显示其作用涉及一氧化氮合成调控、胰岛素信号通路等, KEGG 通路富集到 AGE-RAGE 信号通路等。分子对接证实, 胡萝卜苷、橙皮素、柚皮苷与核心靶点 AKT1、ALB 的结合能均 < -7 kJ/mol。 **结论** 霍山石斛通过多靶点调控 AGE-RAGE 信号通路及 AKT1、ALB 蛋白, 改善血糖、胰岛素抵抗、炎症及氧化应激, 对糖尿病及糖尿病肝损伤发挥治疗作用。但其具体成分及路径仍需进一步验证。 **关键词:** 霍山石斛; 糖尿病; 肝损伤; 成分分析; 网络药理学; 分子对接

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)12-3485-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.005

Therapeutic effect and mechanism of *Dendrobium huoshanense* on diabetes and diabetic liver injury in rats based on network pharmacology and molecular docking techniques

MU Wenyu¹, ZHANG Xueting¹, LI Jinmiao¹, XIE Huiqun^{1, 2}, JIN Shuxiang¹, PENG Daiyin^{1, 2, 3, 4}, HAN Lan^{1, 2, 3, 4*} (1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Institute of Chinese Medicine Resource Protection and Development, Hefei 230012; 3. Anhui Collaborative Innovation Center for Quality Improvement of Genuine Chinese Medicinal Materials, Hefei 230012; 4. Anhui Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Hefei 230012)

Abstract: Objective To preliminarily explore the action mechanism of *Dendrobium huoshanense* extract on diabetes and diabetic liver injury through pharmacodynamic analysis, qualitative analysis of components in *Dendrobium huoshanense*, network pharmacology and molecular docking. **Methods** A diabetic rat model was successfully established by streptozotocin injection. The rats were randomly divided into a normal control group, a model group, a low-dose, a medium-dose, and a high-dose *Dendrobium huoshanense* group, and a metformin group. UPLC-Q-Orbitrap-MS was used to identify components of *Dendrobium huoshanense*, followed by database-driven screening of targets, establishment of a drug-target-pathway network, and molecular docking. **Results** The extract greatly reduced the blood glucose, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase levels, and insulin resistance index in the model rats, alleviated hepato-pancreatic tissue damage, inhibited

基金项目: 安徽省高校科研计划项目团队项目 (No.2022AH010036); 国家中医药管理局高水平中医药重点学科中药资源学 (药用植物学) 建设项目 (No.zyyzdxk-2023095); 安徽省中药科技攻关项目 (No.202303a07020005)。

作者简介: 慕文瑜, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药药理学研究, email: 19862189050@139.com * **通信作者:** 韩岚, 女, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药药理心脑血管研究, email: hanlan56@ahtcm.edu.cn

inflammatory cytokines, and regulated oxidative stress balance. Totally 87 components were identified from the water extract, with 204 diabetes-related targets and 556 diabetic liver injury-related targets being screened out. GO enrichment analysis showed its effects involved biological processes such as positive regulation of nitric oxide biosynthesis and insulin-like growth factor receptor signaling pathway, while KEGG pathway enrichment included the AGE-RAGE signaling pathway. Molecular docking confirmed that active components daucosterol, hesperetin, and naringin had binding energies < -7 kJ/mol with the core targets AKT1 and ALB. **Conclusion** *Dendrobium huoshanense* exerts therapeutic effect on diabetes and diabetic liver injury by multi-target regulation of the AGE-RAGE signaling pathway and proteins AKT1/ALB, improving blood glucose, insulin resistance, inflammation, and oxidative stress. This study provides a potential pharmacological basis for diabetes treatment, though specific components and pathways need further verification.

Key words: *Dendrobium huoshanense*; diabetes mellitus; liver injury; component analysis; network pharmacology; molecular docking

据统计,全球糖尿病(diabetes mellitus, DM)发病率呈上升趋势。糖尿病是一种代谢性疾病,临床症状为“三多一少”,即多饮、多食、多尿、体重减少。糖尿病患者常伴有脂肪、蛋白质代谢异常,长期高血糖可引起多种器官损伤^[1-2]。糖尿病肝损伤是糖尿病的并发症之一,高血糖、氧化应激和炎症反应是造成糖尿病肝损伤的重要因素。研究表明,长期高糖高脂会使机体产生超出自身清除能力的活性氧(ROS),对肝细胞和胰岛 β 细胞造成损伤,导致胰岛素分泌异常,阻碍胰岛素信号,从而造成血糖升高^[3]。而白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等促炎因子,也会损伤肝细胞和胰岛 β 细胞功能,干扰胰岛素信号传导,造成血糖升高^[4]。目前,糖尿病已经成为继心血管疾病和肿瘤之后,危害我国居民健康的第三大疾病。

研究表明,铁皮石斛可以通过改善炎症等途径对糖尿病产生治疗作用^[5-7];金钗石斛可以通过调节炎症和氧化应激,保护糖尿病心肌大鼠的心脏^[8-9];报春石斛可以调节糖尿病肾病大鼠的血脂和血糖,促进糖代谢功能恢复^[10]。霍山石斛(*Dendrobium houshanense* C.Z. Tang et S. J. Cheng, DH)是兰科石斛属多年生草本植物,正式载入2020年版《中国药典》,具有降血糖、抗氧化等多种药理活性^[11-12]。目前,霍山石斛对糖尿病的治疗效果和作用机制仍不清楚,需要进一步研究。

本研究采用苏木精-伊红(HE)染色、酶联免疫分析(ELISA)试剂盒等技术手段,深入剖析霍山石斛提取液对糖尿病及糖尿病肝损伤的治疗机制。通过HE染色直观观察大鼠肝脏组织、胰腺组织的病理形态变化,以酶联免疫分析试剂盒技术精准测定血清中炎症因子、氧化应激指标等关键物质含量,同时辅以网络药理学方法,构建药物-疾病基因靶点网络,筛选霍山石斛提取液活性成分作用靶点并与糖尿病相关靶点取交集,同时

构建蛋白质-蛋白质相互作用网络,初步探索其潜在作用机制与信号通路;结合分子对接技术模拟活性成分与糖尿病靶点蛋白的结合模式,提供成分-靶点互作的结构学依据,为霍山石斛提取液治疗糖尿病及糖尿病肝损伤提供理论与实验依据。

1 材料

1.1 仪器与试剂

霍山石斛(霍山县长冲中药材开发有限公司),由安徽中医药大学俞年军教授鉴定其符合药典标准;快速血糖仪(江苏鱼跃凯立特生物科技有限公司);数字切片扫描仪(匈牙利布达佩斯);正置荧光显微镜(日本尼康);生物组织自动脱水机、包埋机(湖北亚光);Thermo Fisher Ultimate 3000 超高效液相色谱仪、Thermo Scientific Q-Exactive Orbitrap 高分辨率质谱仪(美国 Thermo Fisher 公司);CP2250 分析天平(上海越平科学仪器有限公司);TG16-WS 台式高速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);RE-52AA 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);ST-10N-60A 冷冻干燥机(山东三体仪器有限公司);DL-120D 型超声波清洗器(上海之信仪器有限公司)。

大鼠胰岛素(INS)、乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、还原型谷胱甘肽(GSH)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、谷草转氨酶(AST,货号:JL21297)、谷丙转氨酶(ALT,货号:JL20911)ELISA 试剂盒(上海将来实业股份有限公司)、链脲佐菌素(STZ,货号:CR2402050,赛维尔生物)、二甲双胍(货号:2762300,郑州万通复升药业有限公司)。

1.2 实验动物

8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠(体重 240 ~ 260 g,北京华阜康生物科技股份有限公司,经苏州西山生物科技股份有限公司质量检测),实验单位使用许可证编号 SYXK(皖)2020-001,动物使用许可 SCXX

(京) 2019-008, 伦理编号 AHUCM-rats-2023185。大鼠饲养于室温 20℃、湿度 50%、12 h/12 h 光照周期的 SPF 级动物房, 研究通过本院伦理委员会审批, 严格遵循《实验动物管理条例》。

2 方法

2.1 霍山石斛提取液制备

霍山石斛干条粉碎过 6 号筛, 按粉末: 纯水 = 1: 80 比例, 100℃水浴回流提取 3 次 (每次 1.5 h), 合并滤液后旋转蒸发浓缩, 冷冻干燥得冻干物, 备用^[13]。

2.2 糖尿病模型建立

SD 大鼠适应性饲养 1 周后, 禁食不禁水 24 h, 腹腔注射 50 mg/kg 链脲佐菌素 (STZ) 溶液; 72 h 后检测空腹血糖值 ≥ 16.7 mmol/L 视为造模成功^[14]。

2.3 实验分组与给药

将造模成功大鼠随机分为模型组, 霍山石斛低、中、高剂量组 [0.7、1.4、2.8 g/(kg·d)], 阳性药二甲双胍组 [0.2 g/(kg·d)], 另外正常对照组给予等体积生理盐水, 连续灌胃 28 d。

2.4 大鼠日常记录

从开始给药起, 对大鼠的一般情况进行观察。每周固定时间记录各组大鼠体重变化情况, 用快速血糖仪测量大鼠空腹血糖, 记录各组大鼠每日进食量及饮水量。

2.5 大鼠葡萄糖耐受量测定

给药第 28 日, 各组按照 2 g/kg 的剂量腹腔注射 50% 葡萄糖溶液, 并于注射后 0、30、60、90、120 min 用快速血糖仪测量血糖值, 随后大鼠用 20% 乌拉坦麻醉, 采用腹主动脉取血处死^[15], 用于后期药效检测。

2.6 组织病理观察

取血后立即分离肝、胰组织, 4% 多聚甲醛固定, 经 HE 染色、脱水透明、包埋切片后, 于正置荧光显微镜下观察组织损伤情况。

2.7 血清指标检测

采用 ELISA 试剂盒检测血清胰岛素、MDA、GSH、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量以及 AST、ALT、LDH、SOD 的水平, 计算胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR = 空腹血糖 $\times$ 空腹胰岛素 / 22.5)。

2.8 霍山石斛前处理及 UPLC-Q-Orbitrap-MS 条件

将霍山石斛水提物置于分液漏斗中, 依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇, 在相同的萃取 (振荡、静置分层) 及减压浓缩条件下进行处理, 收集并去除溶剂后, 得到不同极性部位的萃取物。

色谱条件: 色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC-BEH-C18 柱 (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7 μ m, MA, USA)。流动相: 乙腈 (A), 0.1% 甲酸水溶液 (V/V) (B), 梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 10% ~ 28%A; 10 ~ 28 min,

28% ~ 35%A; 28 ~ 36 min, 35% ~ 50%A; 36 ~ 40 min, 50% ~ 67%A; 40 ~ 45 min, 67% ~ 90%A), 柱温为 35℃, 进样量为 2 μ L, 流速为 0.3 mL/min。

质谱条件: 离子源为 H-ESI 源; 鞘气 (N₂) 流速 50 arb; 辅助气 (N₂) 流速 10 arb; 吹扫气 (N₂) 流速 10 arb; 喷雾电压正离子模式 3.5 kV; 负离子模式 2.5 kV; S-lens (离子源透镜电压) 设置为 50; 离子传输管温度设定为 325℃; 汽化室温度设定为 350℃; 扫描模式: 正 / 负离子扫描; 采集方式: 全扫描 / 数据依赖二级扫描 (Full MS/dd-MS²); 扫描范围 m/z : 80 ~ 1200; 分辨率: 一级 60 000, 二级 30 000; 归一化碰撞能 (NCE%): 20、40、60; 自动增益控制 (AGC) 目标设置为标准模式; 离子注入时间 (IT Time) 设置为自动模式。

2.9 网络药理学与分子对接

通过 SwissADME 数据库及实验筛选霍山石斛活性成分, 从 GeneCards 和 OMIM 获取糖尿病及肝损伤靶点, 获取共同靶点, 利用 Cytoscape 3.9.1 构建“药物-成分-靶点-疾病”网络。借助 STRING 数据库可视化分析共同靶点并构建 PPI 网络, 利用 DAVID 完成 GO、KEGG 富集分析, 之后通过 Autodock Vina 1.5.7 分子对接及 PyMOL 可视化三维图验证成分-靶点结合活性。

2.10 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析, 并由 GraphPad Prism 9 进行绘图, 多组独立数据的比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠日常记录

3.1.1 霍山石斛对大鼠体重的影响 如表 1, 与正常对照组比, 模型组体重显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组比, 给药组体重上升 ($P < 0.01$)。

表 1 霍山石斛对大鼠体重的影响 ($n = 6$)

Tab 1 Effect of *Dendrobium huoshanense* on body weight of rats ($n = 6$)

组别	日剂量 / (g/kg)	治疗前 / g	治疗后 / g
正常对照组	—	425.5 $\pm$ 29.00	481.0 $\pm$ 22.02
模型组	—	375.5 $\pm$ 30.10**	292.7 $\pm$ 22.66**
霍山石斛低剂量组	0.7	375.3 $\pm$ 22.84	309.5 $\pm$ 17.87 $\Delta\Delta$
霍山石斛中剂量组	1.4	367.5 $\pm$ 23.60	374.0 $\pm$ 23.36 $\Delta\Delta$
霍山石斛高剂量组	2.8	374.7 $\pm$ 25.09	378.3 $\pm$ 50.02 $\Delta\Delta$
二甲双胍组	0.25	376.2 $\pm$ 32.99	395.7 $\pm$ 38.48 $\Delta\Delta$

注: 与正常对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

Note: Compared with the normal group, ** $P < 0.01$; compared with the model group, $\Delta\Delta P < 0.01$.

3.1.2 霍山石斛对大鼠空腹血糖的影响 如表 2 所示, 与正常对照组相比, 治疗前模型组血糖显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比, 给药组血糖下

降 ($P < 0.01$)。

3.1.3 霍山石斛对大鼠每日饮食、饮水量的影响

如表 3 所示,与正常对照组比,治疗前模型组每日饮食、饮水量均出现显著升高 ($P < 0.01$);治疗后,与模型组比,给药组每日饮食、饮水量下降 ($P < 0.01$)。

3.2 霍山石斛对大鼠各组葡萄糖耐受的影响

如表 4 所示,治疗前模型组空腹血糖显著高于正常组;给予葡萄糖后 30 min 内各组血糖均升高,且 60 ~ 120 min 血糖逐渐下降,霍山石斛高剂量组降幅最显著。

表 2 霍山石斛对大鼠血糖的影响 ($n = 6$)

Tab 2 Effect of *Dendrobium huoshanense* on blood glucose in rats ($n = 6$)

组别	日剂量 / (g/kg)	治疗前 / (mmol/L)	治疗后 / (mmol/L)
正常对照组	—	5.850±0.3354	5.800±0.3162
模型组	—	31.70±1.511**	30.55±2.771**
霍山石斛低剂量组	0.7	31.63±1.980	29.13±1.864 ^{△△}
霍山石斛中剂量组	1.4	32.07±1.346	24.73±2.133 ^{△△}
霍山石斛高剂量组	2.8	31.92±1.458	25.38±2.904 ^{△△}
二甲双胍组	0.25	31.27±1.869	22.02±1.947 ^{△△}

注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,^{△△} $P < 0.01$ 。
Note: Compared with the normal control group,** $P < 0.01$; compared with the model group,^{△△} $P < 0.01$.

表 3 霍山石斛对大鼠每日饮食、饮水量的影响 ($n = 6$)

Tab 3 Effect of *Dendrobium huoshanense* on daily food and water intake in rats ($n = 6$)

组别	日剂量 / (g/kg)	每日饮食量 /g		每日饮水量 /mL	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
正常对照组	—	31.20±0.5715	36.17±0.3858	40.00±3.266	47.33±0.9428
模型组	—	48.20±0.2449**	50.60±2.617**	253.33±36.02**	270.0±21.22**
霍山石斛低剂量组	0.7	47.50±0.8041	43.50±0.5354 ^{△△}	249.33±18.37	183.7±8.731 ^{△△}
霍山石斛中剂量组	1.4	48.67±1.217	42.80±0.5354 ^{△△}	256.7±1.700	163.7±7.364 ^{△△}
霍山石斛高剂量组	2.8	47.90±0.7257	41.87±1.484 ^{△△}	251.7±20.14	125.3±12.47 ^{△△}
二甲双胍组	0.25	47.30±1.296	38.67±0.8731 ^{△△}	253.0±27.31	105.0±8.602 ^{△△}

注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,^{△△} $P < 0.01$ 。
Note: Compared with the normal control group,** $P < 0.01$; compared with the model group,^{△△} $P < 0.01$.

表 4 霍山石斛对大鼠葡萄糖耐受量的影响 (mmol/L, $n = 6$)

Tab 4 Effect of *Dendrobium huoshanense* on glucose tolerance in rats (mmol/L, $n = 6$)

组别	日剂量 / (g/kg)	血糖值				
		0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
正常对照组	—	5.900±0.270	6.900±0.432	7.650±0.340	7.117±0.701	6.200±0.728
模型组	—	29.50±1.422**	30.95±1.261	32.52±0.776	31.30±0.872	30.88±0.795**
霍山石斛低剂量组	0.7	28.45±0.860	29.71±1.392	30.55±1.335	29.95±1.335	28.75±0.741 ^{△△}
霍山石斛中剂量组	1.4	24.77±1.429	27.33±1.532	28.85±1.269	25.82±2.729	24.95±1.977 ^{△△}
霍山石斛高剂量组	2.8	22.87±1.031	25.38±1.348	26.72±1.323	24.93±1.460	23.85±2.077 ^{△△}
二甲双胍组	0.25	19.47±1.193	21.25±1.624	23.28±2.273	20.75±1.295	19.97±1.228 ^{△△}

注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,^{△△} $P < 0.01$ 。
Note: Compared with the normal control group,** $P < 0.01$; compared with the model group,^{△△} $P < 0.01$.

3.3 霍山石斛对大鼠病理结果的影响

与正常对照组相比,模型组大鼠肝细胞大小不均、边缘模糊并伴有脂肪空泡样变(见图 1),胰腺组织弥漫性坏死、细胞间隙增大且有空泡(见图 2)。霍山石斛中、高剂量组及羟苯磺酸钙组肝细胞大小更均匀、肝组织结构清晰,胰腺组织病理损伤改善,细胞坏死减少、间隙缩小。

3.4 霍山石斛对大鼠血清中各相关指标的影响

如图 3 所示,与正常对照组相比,模型组血清 AST、ALT、胰岛素抵抗水平及 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 表达均显著升高 ($P < 0.01$),LDH、MDA 表达升高,SOD、GSH 表达降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较,给予霍山石斛提取液后,随给药浓度增加,血清 AST、ALT、胰岛素抵抗水平及炎症因子表达逐渐降低,SOD、GSH 表达逐渐升

高,LDH、MDA 表达逐渐下降 ($P < 0.01$)。

3.5 霍山石斛水提物萃取组分分析

采用 UPLC-Q-Orbitrap-MS 对霍山石斛水提物萃取组分进行定性分析,石油醚、乙酸乙酯、正丁醇组分在负正离子模式总离子流图见图 4。从样品中鉴定出 87 种化合物,含黄酮类、酚类等多类成分,具体见表 5。

3.6 网络药理学分析

3.6.1 目标靶点基因获取 从 swissADME 数据库筛选霍山石斛有效成分 57 个,获取作用靶基因 691 个;从 GeneCards 和 OMIM 数据库获取糖尿病、糖尿病肝损伤靶基因分别为 1424 个、7029 个,霍山石斛与糖尿病、糖尿病肝损伤的靶点交集分别为 204 个、556 个。

3.6.2 “霍山石斛-疾病-靶点-通路”网络图绘

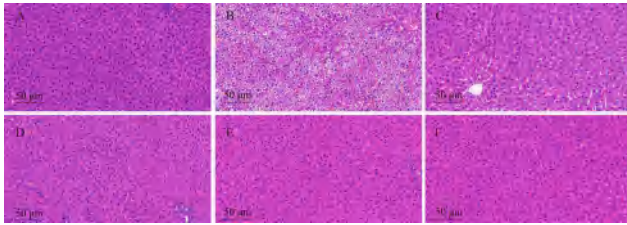


图 1 霍山石斛对大鼠肝脏组织的影响 (标尺为 50 μm)

Fig 1 Effect of *Dendrobium huoshanense* on liver tissue of rats (the scale bar is 50 μm)

A. 正常对照组 (normal control group); B. 模型组 (model group); C. 霍山石斛低剂量组 (low-dose group of *Dendrobium huoshanense*); D. 霍山石斛中剂量组 (medium-dose group of *Dendrobium huoshanense*); E. 霍山石斛高剂量组 (high-dose group of *Dendrobium huoshanense*); F. 二甲双胍组 (metformin group)

制 利用 Cytoscape 3.9.1 构建“活性成分-靶点-疾病-通路”网络: 糖尿病网络中, 粉色为活性成分, 绿色为通路蛋白 (见图 5A); 糖尿病肝损

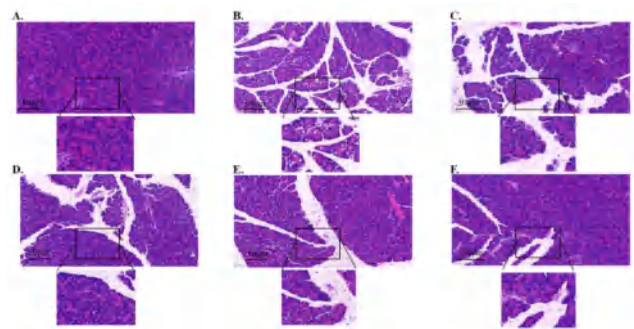


图 2 霍山石斛对大鼠胰腺组织的影响 (标尺为 50 μm)

Fig 2 Effect of *Dendrobium huoshanense* on pancreatic tissue of rats (the scale bar is 50 μm)

A. 正常对照组 (normal control group); B. 模型组 (model group); C. 霍山石斛低剂量组 (low-dose *Dendrobium huoshanense* group); D. 霍山石斛中剂量组 (medium-dose *Dendrobium huoshanense* group); E. 霍山石斛高剂量组 (high-dose *Dendrobium huoshanense* group); F. 二甲双胍组 (metformin group)

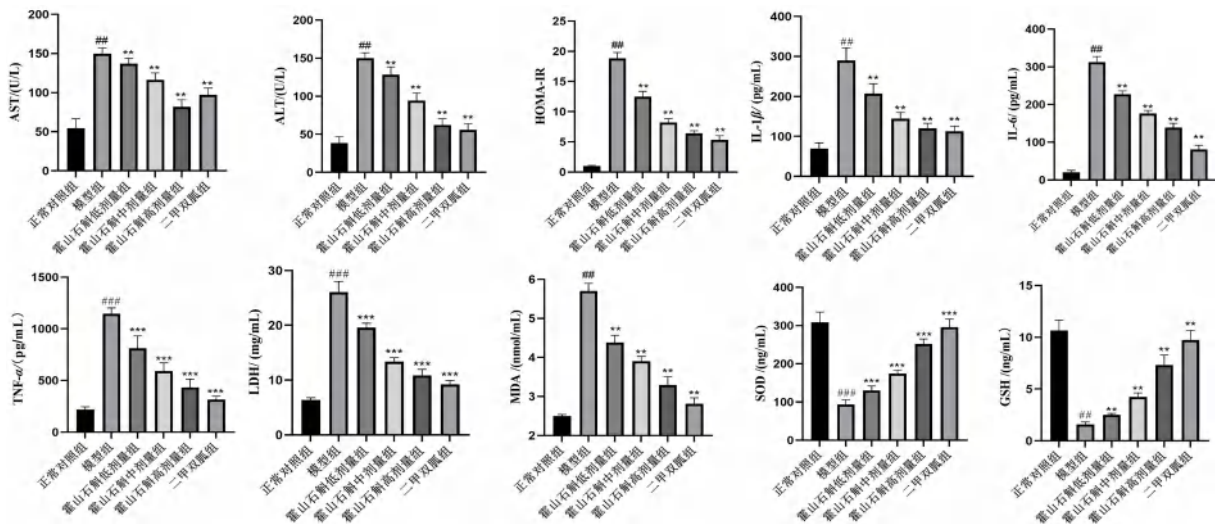


图 3 霍山石斛对大鼠血清中各相关指标的影响

Fig 3 Effect of *Dendrobium huoshanense* on relevant serum indicators in rats

注: 与正常对照组比较, $^{##}P < 0.01$, $^{###}P < 0.001$; 与模型组比较, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ 。

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

伤网络中, 蓝色为通路蛋白, 紫红色为活性成分 (见图 5B), 节点连接的密切程度反映重要性。

3.6.3 PPI网络构建 STRING数据库绘制共有靶点PPI网络: 霍山石斛与糖尿病的 204 个共有靶点网络包含 7654 条连接 (见图 6A); 与糖尿病肝损伤的 556 个共有靶点网络包含 6806 条连接 (见图 6B)。

3.6.4 GO功能和KEGG信号通路富集分析 对糖尿病的 204 个靶点基因进行富集分析: GO富集显示生物学过程涉及一氧化氮生物合成正向调控、胰岛素相关受体信号通路等, 细胞成分包括受体复合体等, 分子功能涵盖类固醇结合等 (见图 7A); KEGG通路富集涉及EGFR耐药性、催乳素信号、AGE-RAGE信号通路等 (见图 8A)。

对糖尿病肝损伤的 556 个靶点基因进行富集

分析: GO富集显示生物学过程包括蛋白质磷酸化、染色质重塑等, 细胞成分涉及质膜等, 分子功能包括组蛋白激酶活性等 (见图 7B); KEGG通路富集涉及癌症相关通路、脂质代谢、AGE-RAGE信号通路等 (见图 8B)。

3.6.5 分子对接 研究表明, AKT1 参与糖代谢调控血糖, 与糖尿病肾病和糖尿病神经病变有着密切联系。白蛋白 (ALB) 作为病情监测指标, 参与氧化应激和炎症反应, 其与糖尿病心血管并发症和糖尿病视网膜病变关系密切。

分子对接显示, 霍山石斛活性成分胡萝卜苷、橙皮素、柚皮苷与核心靶点 AKT1、ALB 的结合能均小于 -7 kJ/mol , 表明活性成分与核心靶点具有良好的结合能力 (见表 6), PyMOL 可视化结果见图 9。

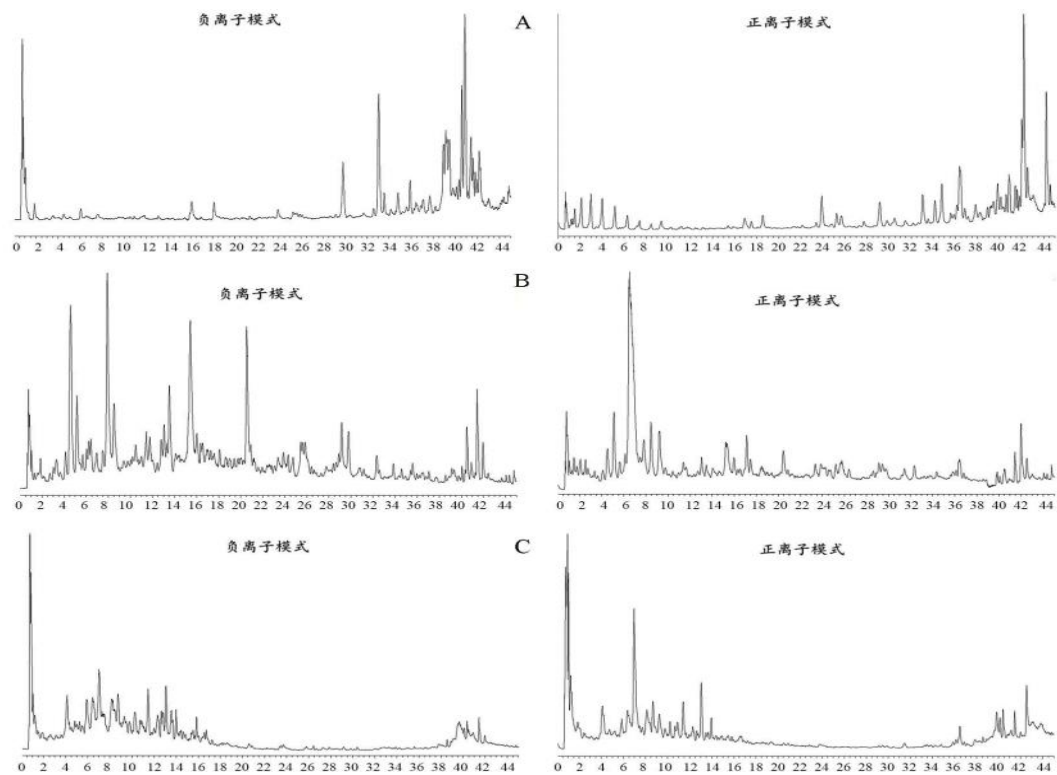


图 4 霍山石斛石油醚 (A)、乙酸乙酯 (B)、正丁醇 (C) 萃取组分正、负离子模式下总离子流

Fig 4 Total ion current of petroleum ether (A), ethyl acetate (B), and *n*-butanol (C) extraction components of *Dendrobium huoshanense* under positive and negative ion modes

表 5 霍山石斛水提物成分

Tab 5 Components of the water extract of *Dendrobium huoshanense*

名称	分子式	种类	名称	分子式	种类
左旋精氨酸	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	氨基酸衍生物	牡荆素	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	黄酮苷类
α 、 α -海藻糖	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	糖类	牡荆素鼠李糖苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	黄酮苷类
苹果酸	C ₄ H ₆ O ₅	羧酸及其衍生物	花旗松素	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	黄酮醇类
尿苷	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	生物碱	异甘草素 -4'-O- 芹糖 (1 → 2) 葡萄糖苷	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	黄酮苷类
D- 来苏糖	CH ₁₀ O ₅	糖类	槲皮素 -3 β -D- 葡萄糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	黄酮苷类
蔗糖	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	糖类	阿魏醛	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	苯丙素类
烟酰胺	C ₆ H ₆ N ₂ O	生物碱	诺卡酮	C ₁₅ H ₂₂ O	萜类化合物
腺苷	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	生物碱	山矾素	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₁	苯丙素类
鸟嘌呤	C ₅ H ₅ N ₅ O	生物碱	水杨酸	C ₇ H ₆ O ₃	羧酸及其衍生物
4- 氧代脯氨酸	C ₅ H ₇ NO ₃	羧酸及其衍生物	异鼠李素 -3-O- 新橙皮糖苷	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	黄酮苷类
柠檬酸	C ₆ H ₈ O ₇	羧酸及其衍生物	异鼠李素	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	黄酮醇类
焦谷氨酸	C ₅ H ₇ NO ₃	羧酸及其衍生物	壬二酸	C ₉ H ₁₆ O ₄	羧酸及其衍生物
正亮氨酸	C ₆ H ₁₃ NO ₂	氨基酸衍生物	柚皮苷	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	黄酮苷类
半乳糖醇	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	糖类	罂粟碱	C ₁₇ H ₁₇ NO ₃	羧酸及其衍生物
没食子酸	C ₇ H ₆ O ₅	羧酸及其衍生物	二氢白藜芦醇	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	酚类
苯丙氨酸	C ₉ H ₁₁ NO ₂	氨基酸衍生物	芒柄花苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	异黄酮类
柠檬酸	C ₅ H ₆ O ₄	羧酸及其衍生物	细叶远志苷 A	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₇	萜类化合物
泛酸	C ₉ H ₁₇ NO ₅	其他类	异甘草素	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	查尔酮类
麦芽酚	C ₆ H ₆ O ₃	酚类	圣草酚	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	二氢黄酮类
D- 色氨酸	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	氨基酸衍生物	木犀草素	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	黄酮醇类
D- 甘露醇	C ₆ H ₁₂ O ₆	糖类	槲皮素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	黄酮醇类
吡啶甲酸	C ₆ H ₅ NO ₂	其他类	柚皮苷	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	二氢黄酮类
绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	苯丙素类	染料木素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	异黄酮类
原儿茶醛	C ₇ H ₆ O ₃	酚类	芹菜素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	黄酮类
龙胆酸	C ₇ H ₆ O ₄	酚类	橙皮素	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	二氢黄酮类
香草酸	C ₈ H ₈ O ₄	羧酸及其衍生物	外消旋橙皮素	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	二氢黄酮类
异香草酸	C ₈ H ₈ O ₄	羧酸及其衍生物	香叶木素	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	黄酮类
红景天苷	C ₁₄ H ₂₀ O ₇	酚类	黄麻脂肪酸 F	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	脂肪酸及其衍生物

续表 1

名称	分子式	种类	名称	分子式	种类
4-羟苯甲醛	C ₇ H ₆ O ₂	其他类	甘薯酮Ⅲ	C ₁₅ H ₁₆ O ₃	联苄类化合物
异荭草素-2	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	黄酮苷类	3, 4'-二羟基-5, 5'-二甲氧基联苄	C ₁₆ H ₁₈ O ₄	联苄类化合物
西伯利亚糖 A1	C ₂₃ H ₃₂ O ₁₅	苯丙素类	诺比列亭	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	黄酮类
β-咔啉生物碱	C ₁₁ H ₈ N ₂	生物碱	川芎嗪 A	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	其他类
异荭草素Ⅲ	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	黄酮苷	3-正丁基苯酚	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	其他类
香草醛	C ₈ H ₈ O ₃	酚类	藜芦内酯	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	其他类
对羟基肉桂酸	C ₉ H ₈ O ₃	酚类	二氢丹参酮 I	C ₁₈ H ₁₄ O ₃	醌类化合物
丁香醛	C ₉ H ₁₀ O ₄	酚类	大黄素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	醌类化合物
丁香酸	C ₉ H ₁₀ O ₅	羧酸及其衍生物	(±)-9, 10-二羟基-12Z-十八碳烯酸	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	脂肪酸及其衍生物
异荭草苷	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	黄酮苷类	9-氧代-十八碳二烯酸	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	脂肪酸及其衍生物
N-乙酰-L-苯丙氨酸	C ₁₁ H ₁₃ NO ₃	氨基酸衍生物	(±)-9-羟基-十八碳二烯酸	C ₁₈ H ₃₂ O ₄	脂肪酸及其衍生物
阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	酚类	隐丹参酮	C ₁₉ H ₂₀ O ₃	醌类化合物
异荭草苷	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	黄酮苷类	α-桐酸	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	脂肪酸及其衍生物
异嗪皮啉	C ₁₁ H ₁₀ O ₅	酚类	(±)-9(10)-环氧-十八碳烯酸甲酯	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	脂肪酸及其衍生物
苦味素	C ₁₅ H ₁₈ O ₇	生物碱	丹参酮Ⅱ A	C ₁₉ H ₁₈ O ₃	萜类化合物
芹菜素苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	黄酮苷类			

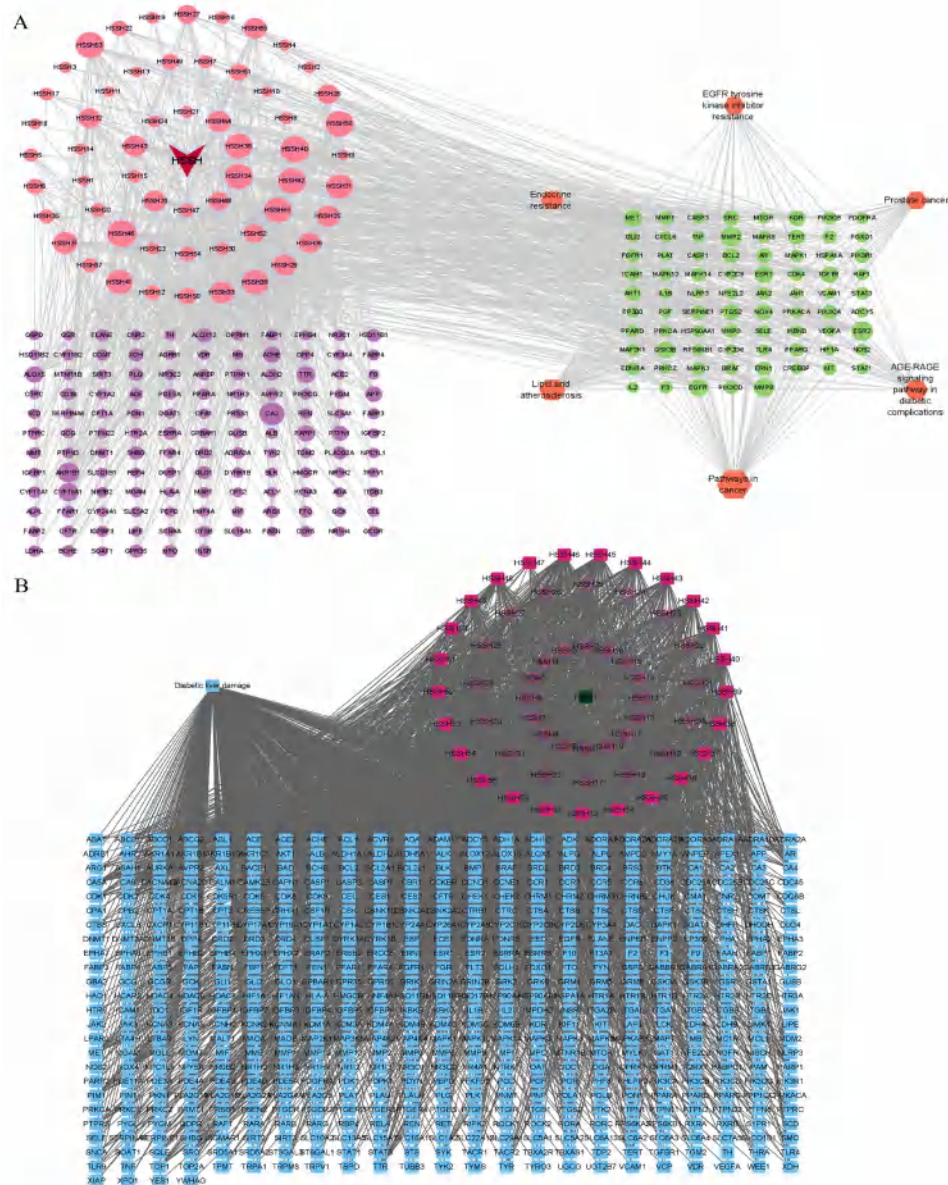


图 5 糖尿病 (A) 和糖尿病肝损伤 (B) 的“霍山石斛-疾病-靶点-通路”网络图

Fig 5 “Dendrobium huoshanense-disease-target-pathway” network diagram of diabetes (A) and diabetic liver injury (B)

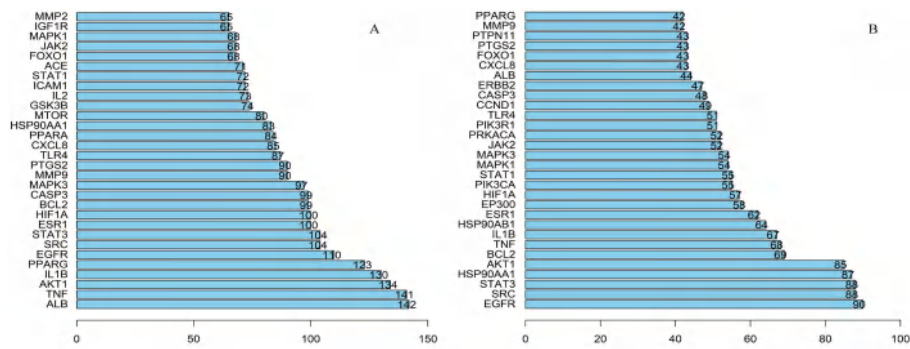


图 6 糖尿病 (A) 和糖尿病肝损伤 (B) 的霍山石斛活性成分与疾病蛋白靶点关联数量柱状图

Fig 6 Bar chart of association counts between active components of *Dendrobium huoshanense* and disease protein targets in diabetes (A) and diabetic liver injury (B)

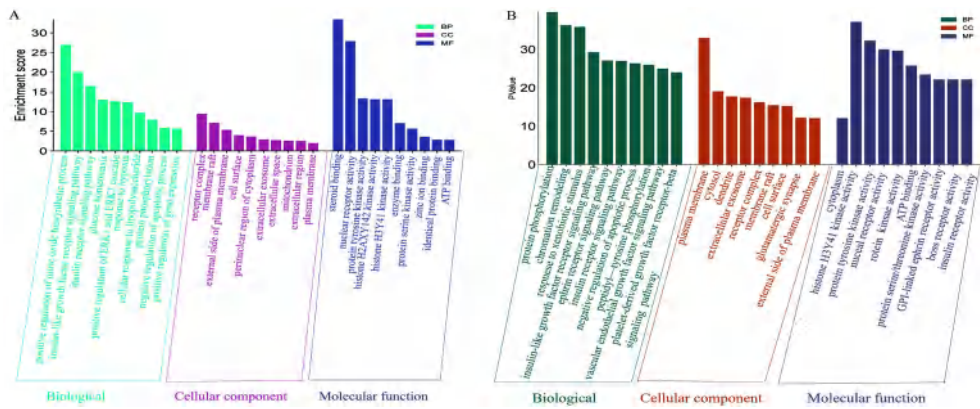


图 7 糖尿病 (A) 和糖尿病肝损伤 (B) 的 GO 功能富集分析

Fig 7 GO functional enrichment analysis of diabetes (A) and diabetic liver injury (B)

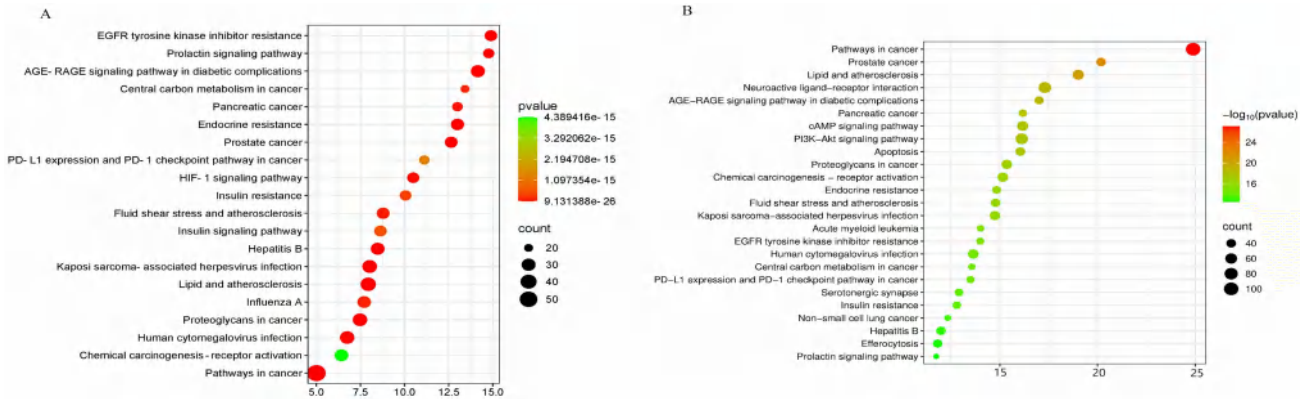


图 8 糖尿病 (A) 和糖尿病肝损伤 (B) 的 KEGG 通路富集分析

Fig 8 KEGG pathway enrichment analysis of diabetes (A) and diabetic liver injury (B)

表 6 核心靶点与活性成分结合能

Tab 6 Binding energies between core targets and active ingredients

活性成分	结合能 / (kJ/mol)	
	AKT1	ALB
胡萝卜苷	- 10.0	- 9.6
橙皮素	- 9.30	- 8.0
柚皮苷	- 11.7	- 9.3

4 讨论

糖尿病是以高血糖为特征, 由多种病因共同引起的一种慢性代谢病。糖尿病常常由于胰岛素不足或胰岛素敏感性降低等引发代谢紊乱, 从而发展成糖尿病肝损伤等各种并发症^[16]。然而, 目

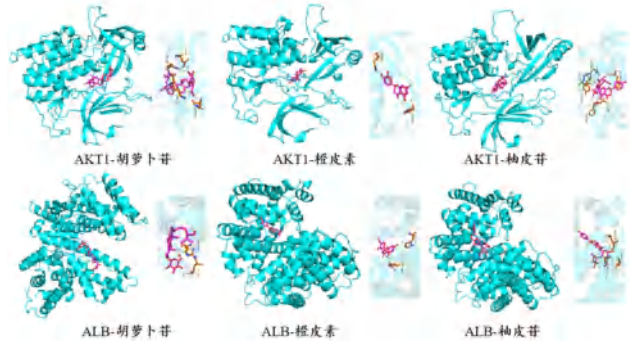


图 9 霍山石斛活性成分与核心靶点结合可视化

Fig 9 Visualization of the binding between active components of *Dendrobium huoshanense* and core targets

前对糖尿病以及糖尿病肝损伤的治疗没有特效药,临床用药不能从根本上治疗糖尿病,所以找到有效药物对治疗糖尿病具有重要意义。有文献报道铁皮石斛、金钗石斛对糖尿病的治疗具有良好的作用^[17-20],然而,霍山石斛对糖尿病及糖尿病肝损伤的治疗效果和作用机制尚不明确。

本研究通过注射 STZ 成功构建糖尿病大鼠模型,模型组大鼠呈现“三多一少”症状,肝胰组织病理显示损伤,血清胰岛素抵抗、炎症因子(IL-1 β 、IL-6、TNF- α)及氧化应激指标(LDH、MDA)异常,证实糖尿病肝损伤造模成功。经 28 d 霍山石斛提取液治疗后,大鼠血糖降低、体重回升,进食饮水减少,血清胰岛素抵抗水平、ALT、AST 下降,肝胰组织损伤减轻,炎症因子及氧化应激指标恢复平衡,显示其对糖尿病及肝损伤的治疗作用。通过 UPLC-Q-Orbitrap-MS 从霍山石斛水提物中鉴定出 87 种成分。网络药理学显示,其与糖尿病、糖尿病肝损伤分别共有 204 个和 556 个靶点,GO 富集涉及一氧化氮合成调控、蛋白质磷酸化等过程,KEGG 通路富集到 AGE-RAGE 信号通路等。分子对接证实,胡萝卜素、橙皮素、柚皮苷与核心靶点 AKT1、ALB 结合能均小于 -7 kJ/mol,表明霍山石斛的活性成分与核心靶点具有良好的结合能力。

综上,霍山石斛通过改善血糖、减少胰岛素抵抗、抑制炎症及氧化应激等方面,达到治疗糖尿病及肝损伤的效果,具体作用机制可能与 AGE-RAGE 等通路及靶向 AKT1、ALB 蛋白有关。本研究为霍山石斛治疗糖尿病及糖尿病肝损伤提供了新方向,但具体成分及作用路径需进一步验证。

参考文献

- [1] Sharma PK, Rajpal N, Upadhyay S, et al. Status of diabetes control and knowledge about diabetes in patients [J]. *Endocrinol Diabetes Nutr*, 2021, 68 (10): 716-727.
- [2] Tancet T. Diabetes: a dynamic disease [J]. *Lancet*, 2017, 389 (10085): 2163.
- [3] 刁亚丽,徐明付. 2 型糖尿病患者慢性并发症临床特点及相关因素 [J]. *当代医学*, 2018, 24 (2): 101-103.
- [4] 曾艺芸,聂雪婷,李振坚,等. 中药石斛黄酮活性成分研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27 (6): 197-206.
- [5] 王璟,董志春,楼丽颖,等. 铁皮石斛粉对 2 型糖尿病患者胰岛功能改善的临床研究 [J]. *新中医*, 2021, 53 (12): 90-93.
- [6] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2020 年版)(下) [J]. *中国实用内科杂志*, 2021, 41 (9): 757-784.
- [7] 刘冬,蒋峰华,唐平易,等. 铁皮石斛对正常白蛋白尿期 2 型糖尿病患者血清 FGF-2 及肾损伤的影响 [J]. *临床合理用药杂志*, 2022, 15 (19): 60-62.
- [8] 张俊青,吴芹,龚其海,等. 金钗石斛生物总碱对脂多糖激活星形胶质细胞产生炎症因子的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2011, 27 (6): 824-827.
- [9] 刘莹莹,武俊紫,李伟,等. 金钗石斛多糖对 2 型糖尿病大鼠心肌组织凋亡相关蛋白的影响 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2018, 16 (18): 2621-2626.
- [10] 樊小宝,丁通,孙燕,等. 石斛碱对糖尿病肾病大 PI3K/Akt/mTOR 信号通路及足细胞功能障碍的影响 [J]. *河北医药*, 2021, 43 (11): 1631-1634, 1639.
- [11] Zha XQ, Deng YY, Li XL, et al. The core structure of a *Dendrobium huoshanense* polysaccharide required for the inhibition of human lens epithelial cell apoptosis [J]. *Carbohydr Polym*, 2017, 155: 252-260.
- [12] Wang HY, Li QM, Yu N J, et al. *Dendrobium huoshanense* polysaccharide regulates hepatic glucose homeostasis and pancreatic β -cell function in type 2 diabetic mice [J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 211: 39-48.
- [13] 桂文琪,方媛,聊晓玉,等. 基于网络药理学和体内实验验证霍山石斛治疗胃溃疡的作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28 (7): 151-161.
- [14] 韩旭,王璇,余芝,等. STZ 制备糖尿病大鼠模型影响因素的研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28 (5): 716-725.
- [15] 代玉亭,陈佳永,胡志华,等. 霍山石斛对脾阴虚型慢性萎缩性胃炎大鼠免疫功能的影响 [J]. *安徽中医药大学学报*, 2024, 43 (2): 67-72.
- [16] Lopes A, Roque, Morgado S, et al. Behavioral sciences in the optimization of pharmacological and non-pharmacological therapy for type 2 diabetes [J]. *Behav Sci*, 2021, 11 (11): 153.
- [17] 李玲,邓晓兰,赵兴兵,等. 铁皮石斛化学成分及药理作用研究进展 [J]. *肿瘤药学*, 2011, 1 (2): 90-94.
- [18] 王治丹,代云飞,罗尚娟,等. 铁皮石斛化学成分及药理作用的研究进展 [J]. *华西药学杂志*, 2022, 37 (4): 472-476.
- [19] 周威,夏杰,孙文博,等. 金钗石斛的化学成分和药理作用研究现状 [J]. *中国新药杂志*, 2017, 26 (22): 2693-2700.
- [20] Zhou JX, ZHANG Y, Li SY, et al. *Dendrobium nobile* Lindl. alkaloids-mediated protection against CCl₄ induced liver mitochondrial oxidative damage is dependent on the activation of Nrf2 signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 129: 110351.

(收稿日期: 2025-03-04; 修回日期: 2025-05-10)

两种单克隆抗体组合制剂的强制降解研究

吴纯^{1, 2}, 王静², 陈娇瑜², 郭双健², 曹玲玲², 苏江涛^{1*} (1. 湖北工业大学, 武汉 430068; 2. 上海君实生物医药科技股份有限公司, 上海 201203)

摘要: **目的** 采用强制降解研究评估由两种单克隆抗体制备的组合制剂是否具有良好的成药性。**方法** 采用氧化、强酸、强碱、高温条件对两种单抗及其组合制剂进行强制降解研究; 通过体积排阻色谱法、阳离子交换色谱法、毛细管电泳-十二烷基硫酸钠法考察理化性质的变化; 酶联免疫吸附试验考察生物学活性的变化, 并在肽段水平上鉴定了氧化、脱酰胺、异构化等翻译后修饰。**结果** 两种单抗在不同处理条件下的降解途径基本一致, 但降解趋势略有差异。与单剂产品相比, 两种单抗在组合制剂中的降解途径及降解趋势无明显变化。**结论** 两种单抗制备成组合制剂在成药性上风险可控, 为组合制剂进一步的药学研究提供足够的数据支持。

关键词: 单克隆抗体; 组合制剂; 强制降解; 翻译后修饰

中图分类号: R917, R927 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)12-3494-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.006

Forced degradation of a combination formula composed of two monoclonal antibodies

WU Chun^{1, 2}, WANG Jing², CHEN Jiaoyu², GUO Shuangjian², CAO Lingling², SU Jiangtao^{1*} (1. Hubei University of Technology, Wuhan 430068; 2. Shanghai Junshi Biosciences Co., Ltd., Shanghai 201203)

Abstract: Objective To evaluate the developability of a combination formulation (co-formulation) composed of two monoclonal antibodies (mAbs) in a forced degradation study. **Methods** Four conditions including oxidation, low pH, high pH, and thermal stress were used to study the forced degradation of two mAbs and their co-formulation. The changes in physicochemical properties were determined by size exclusion chromatography, cation exchange chromatography, and capillary electrophoresis-sodium dodecyl sulfate. The changes in biological activity were monitored by enzyme-linked immunosorbent assay. Post-translational modifications such as oxidation, deamination, and isomerization were identified at the peptide level. **Results** The degradation pathways of the two mAbs were largely consistent under different processing conditions, with slight variations in degradation trends. Compared with the single-dose product, there were no obvious changes in the degradation pathways or trends of the two mAbs in the co-formulation. **Conclusion** The co-formulation composed of the two mAbs presents controllable developability risks, providing sufficient data for further research.

Key words: monoclonal antibody; combination formulation; forced degradation; post-translational modification

组合制剂是指单个制剂中包含一种以上的药物成分, 目的是同时递送多种药物以获得最大的疗效^[1]。组合制剂提高了患者的依从性, 降低了医疗失误率, 降低了药物运输成本, 同时扩大了公司的知识产权^[2-4]。在生物大分子领域, 组合制剂早先

应用于糖尿病^[5], 后续在实体瘤治疗方面也有所应用, 目前获批上市的“Phesgo”就是靶向人表皮生长因子受体-2 (HER2) 阳性乳腺癌的组合制剂^[6]。在病毒治疗领域, 组合制剂可靶向病毒的不同表位来中和病毒, 从而提高药效, 减少耐药性, 已成功

作者简介: 吴纯, 女, 硕士研究生, 主要从事生物与医药研究, email: 1311864632@qq.com *通信作者: 苏江涛, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事新型药物制剂的开发研究, email: jiangtsu@hbut.edu.cn

用于埃博拉病毒和新型冠状病毒感染的治疗^[7-8]。

在单剂产品的制剂开发中,缓冲液和赋形剂均是保证蛋白质稳定性的最优选择,而组合制剂为了保证两种及以上蛋白质均能稳定存在,势必会选择折中的配方,这可能会导致每个混合成分与它们独立的制剂相比变得相对不稳定^[2]。不同蛋白质的相互作用和异质聚合物的形成可能会成为组合制剂稳定性储存的障碍,因此与单剂产品相比,组合制剂的质量控制具有更高的挑战^[9-10]。强制降解研究在药物开发过程中至关重要,它可在短时间内获得药物的可能降解趋势及降解途径^[11-12]。对于组合制剂而言,强制降解研究需要考察每种物质是否表现出

与单剂产品相同的降解途径及降解趋势,这增加了研究的挑战,需要分析方法具有更高的灵敏度或分辨率来区分来自组合制剂中每种物质的信号,以及它们各自的降解产物^[2, 7, 13]。

本文主要研究 mAb1、mAb2 两种单克隆抗体及其组合制剂在强制降解(强酸、强碱、氧化和高温)条件下产生的变化,对处理后的样品进行纯度、活性、一级结构、翻译后修饰等检测(实验整体流程如图 1 所示)。对比 mAb1、mAb2 降解途径的差异,同时考察在组合制剂中 mAb1、mAb2 是否有新变化的产生,进一步评估组合制剂条件下潜在的风险。



图 1 强制降解研究设计示意图

Fig 1 Schematic diagram of forced degradation study design

1 材料

1.1 试药

mAb1、mAb2 及其组合制剂 [mAb1-mAb2 = 1 : 1 (w/w)] 均由内部制备,以制剂缓冲液(含有 20 mmol/L 组氨酸, 230 mmol/L 海藻糖, 0.04% 聚山梨酯 80, pH 5.5)配制成 30 mg/mL 的样品溶液。叔丁基过氧化氢溶液(tBHP)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、2-吗啉乙磺酸(MES)、辣根过氧化物酶偶联的羊抗人 IgG-Fc 特异性抗体、DL-二硫苏糖醇(DTT)、盐酸胍、碘乙酰胺(IAM)、 β -巯基乙醇、N-乙基马来酰亚胺(NEM)(Sigma); 乙酸(湘南尔康制药股份有限公司); 氯化钠(NaCl)(国药集团, 货号: 10019318); L-精氨酸盐酸盐(生工生物工程股份有限公司, 货号: A100877); Recombinant SARS-CoV-2 RBD His tag(上海君实生物医药科技股份有限公司); 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺(Array Bridge); 胰酶(Promega); CE-SDS plus 1 $\times$ 样品缓冲液(Proteinsimple)。

1.2 仪器

HPP410eco 气候实验箱(美国 Mermmert GmbH&Co.KG); HPX-9082 MBE 电热恒温培养箱(上海博迅实业有限公司); e2695 高效液相色谱仪(HPLC)(美国 Waters); Maurice 毛细管电泳仪(美国 Proteinsimple); M5e 多功能酶标仪(美国

Molecular Devices); Vanquish 超高效液相色谱仪(UPLC)、QE 高分辨质谱仪(MS)(美国 Thermo)。

2 方法与结果

2.1 样品制备

① 氧化样品: 用 0.3% 的 tBHP 对样品进行氧化, 避光放置在 25.0 °C、60.0%RH 气候实验箱中, 于 2、4、6 d 后取出, 按 1 : 9 加入制剂缓冲液。

② 强酸样品: 用 0.3 mol/L 乙酸调节样品 pH 至 3.6 $\pm$ 0.1, 避光放置在 25.0 °C、60.0%RH 气候实验箱中, 于 2、4、6 d 后取出, 用 2 mol/L Tris 中和 pH 至 5.5 $\pm$ 0.1。

③ 强碱样品: 用甘氨酸和氢氧化钠(NaOH)混合液 [1 : 1 (w/w)] 调节样品 pH 至 9.7 $\pm$ 0.1, 避光放置在 25.0 °C、60.0%RH 气候实验箱中, 于 2、4、6 d 后取出, 用 1 mol/L 乙酸中和至 pH 5.5 $\pm$ 0.1。

④ 高温样品: 取每管 500 μ L 的样品, 避光放置于 50 °C 电热恒温培养箱中, 于 5、15、25 d 后取出。

2.2 样品检测

2.2.1 体积排阻色谱法(SEC) 用对应流动相将样品稀释至 4.0 mg/mL, 柱温 (25 $\pm$ 3) °C, 进样体积 25 μ L, 等度洗脱, 280 nm 波长下进行检测, 使用峰面积归一化对结果开展定量分析, 分别计算单体、聚体和片段的峰面积百分比。mAb1 及 mAb2 的流动相为 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(PBS), 300

mmol/L NaCl, pH 6.8; 组合制剂的流动相为 50 mmol/L PBS, 300 mmol/L NaCl, 300 mmol/L L-精氨酸盐酸盐, pH 6.8。mAb1 及 mAb2 的色谱柱为 XBridge BEH 200Å SEC (7.8 mm×300 mm, 3.5 μm, 美国 Waters), 组合制剂的色谱柱为 TSKgel G3000SWXL (7.8 mm×300 mm, 5 μm, TOSOH)。

2.2.2 阳离子交换色谱法 (CEX) mAb1 的流动相 A 为 20 mmol/L MES, 流动相 B 为 20 mmol/L MES, 100 mmol/L NaCl, pH 6.2; mAb2 的流动相 A 为 20 mmol/L MES, 流动相 B 为 20 mmol/L MES, 150 mmol/L NaCl, pH 6.5; 组合制剂的流动相 A 为 20 mmol/L MES, 流动相 B 为 20 mmol/L MES, 100 mmol/L NaCl, pH 6.5。mAb1 和组合制剂的色谱柱为 MabPac SCX-10 (4 mm×250 mm, 10 μm, 美国 Thermo), mAb2 的色谱柱为 ProPac WCX-10 (4 mm×250 mm, 10 μm, 美国 Thermo)。用对应流动相 A 将样品稀释至 1.0 mg/mL, 柱温 (30±5) °C, 进样体积 100 μL, 梯度洗脱, 280 nm 波长下进行检测, 使用峰面积归一化对结果开展定量分析, 分别计算酸性峰、主峰和碱性峰的峰面积百分比。

2.2.3 毛细管电泳-十二烷基硫酸钠法 (CE-SDS)

依次加入稀释液、5 μL β-巯基乙醇 [还原 CE (R-CE)] 或 0.25 mol/L NEM [非还原 CE (NR-CE)], 样品至 1.5 mL EP 管中, 使样品终质量浓度为 1.0 mg/mL, 总体积为 100 μL, 混匀; 离心后在 70 °C 加热 15 min (R-CE) 或 5 min (NR-CE), 冷却离心后取 75 μL 样品至 96 孔板, 离心 10 min。使用毛细管电泳仪进行纯度检测, 4.6 kV 进样 20 s, 5.75 kV 分离 30 min (R-CE) 或 40 min (NR-CE)。R-CE 的纯度为轻链 (LC)、重链 (HC) 相对校正峰面积百分比的加和。R-CE 中组合制剂的稀释液为 CE-SDS plus 1× 样品缓冲液, 40 mmol/L PBS, pH 6.5, 其余检测稀释液均为 1% SDS, 40 mmol/L PBS, pH 6.5。

2.2.4 酶联免疫吸附试验-结合法 (Binding ELISA) 使用 PBS 稀释 Recombinant SARS-CoV-2 RBD His tag 至 3.0 μg/mL, 包被 60 min; 加入 2% 脱脂牛奶 (稀释液), 封闭 60 min; 用稀释液稀释检品及对照样品, 起始质量浓度为 40 μg/mL, 4 倍梯度稀释至 9.5 pg/mL, 加入封闭后的 96 孔板中, 孵育 60 min; 加入稀释 5000 倍的辣根过氧化物酶偶联的羊抗人 IgG-Fc 特异性抗体, 孵育 60 min; 加入 0.1 mg/mL 的 TMB, 避光显色 15 min; 加 2 mol/L 的盐酸溶液终止反应。用多功能酶标检测 (检测波长 450 nm, 参比波长 620 nm), 对数据进行四参数回归模型拟合半数效应浓度 (EC_{50}), 用 EC_{50} (对照品)/ EC_{50} (检品)×100 计算相对活性。

2.2.5 分子量 (MV) 检测 采用 UPLC-MS 法测

定样品的分子量, 色谱柱为 BioResolve RP mAb Polyphenyl (2.1 mm×50 mm, 2.7 μm, 美国 Waters)。使用 5 mmol/L Tris-HCl 溶液将样品稀释至 1.0 mg/mL, 进行完整分子量和还原分子量 (100 μL 样品, 加入 5 μL 0.5 mol/L DTT, 37 °C 还原 0.5 h) 的测定, 进样 1 μL。检测时长为 15 min, 模式: 正离子, 母离子扫描范围: 500 ~ 5000 m/z 。采用 BioPharma Finder 软件进行分子量数据的解析。

2.2.6 翻译后修饰 (PTM) 检测 400 μg 样品浓缩干燥后加入 20 μL 蛋白变性还原液 (500 μL 8 mol/L 盐酸胍, 25 μL 1 mol/L Tris-HCl 和 10 μL 0.5 mol/L DTT), 混匀后置于 37 °C 反应 1 h, 冷却后用 1 μL 0.5 mol/L IAM 封闭其自由巯基, 避光 0.5 h, 加入 380 μL 50 mmol/L Tris-HCl 溶液。取 100 μL 处理后的样品, 加 4 μL 1 mg/mL 胰酶 37 °C 酶解 4 h, 加 3 μL 甲酸 (FA) 终止反应, 13 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 采用 ACQUITY UPLC peptide CSH C18 Column 色谱柱 (2.1 mm×150 mm, 1.7 μm, 美国 Waters) 20 μL, 柱温为 60 °C, 流动相 A 为 0.1% FA-0.02% 三氟乙酸 (TFA) 水溶液, 流动相 B 为 0.08% FA-0.02% TFA 乙腈溶液, 梯度洗脱, 进样检测, 采用 BioPharma Finder 软件分析样品的氧化、脱酰胺、异构化等翻译后修饰。

2.3 结果与分析

2.3.1 氧化试验 SEC 结果显示, mAb1 单体含量从 99.8% 下降至 92.6%, 聚体含量从 0.1% 增加至 7.1%, mAb2 和组合制剂无明显变化 (见图 2A)。CEX 结果显示, mAb1 主峰含量从 84.9% 下降至 4.1%, 碱性峰含量从 4.3% 增加至 93.7%; mAb2 主峰含量从 76.0% 下降至 8.6%, 碱性峰含量从 4.7% 增加至 88.2%; 组合制剂主峰含量从 76.2% 下降至 8.8%, 组分 2 (G2) 含量从 8.8% 增加至 39.0%, 组分 3 (G3) 含量从 5.8% 增加至 50.6% (见图 2B 及图 2F ~ 2H)。3 个样品的 CE-SDS 结果均无明显变化 (见图 2C 和图 2D)。Binding ELISA 结果显示, mAb1 的活性在 0 ~ 6 d 内呈趋势性下降, 而 mAb2 和组合制剂在氧化 2 d 时已有明显下降, 4 ~ 6 d 的活性无继续下降趋势 (见图 2E)。分子量数据显示, 3 个样品完整和还原分子量水平均观察到不同程度的氧化修饰 (见图 3)。结合 PTM 数据 (见图 2I), mAb1 在单剂产品及组合制剂中均发生重链 W102 互补决定区 (CDR 区)、重链 M360 以及重链 M430 的氧化修饰, 在组合制剂中还发现重链 W102 (CDR 区) 的双氧化和轻链 W94 (CDR 区) 的氧化修饰; mAb2 在单剂产品及组合制剂中氧化修饰位点一致, 主要为重链 M75、重链 M101 (CDR 区)、重链 M360 以及重链 M430。

mAb1 及 mAb2 无论在单剂产品还是组合制

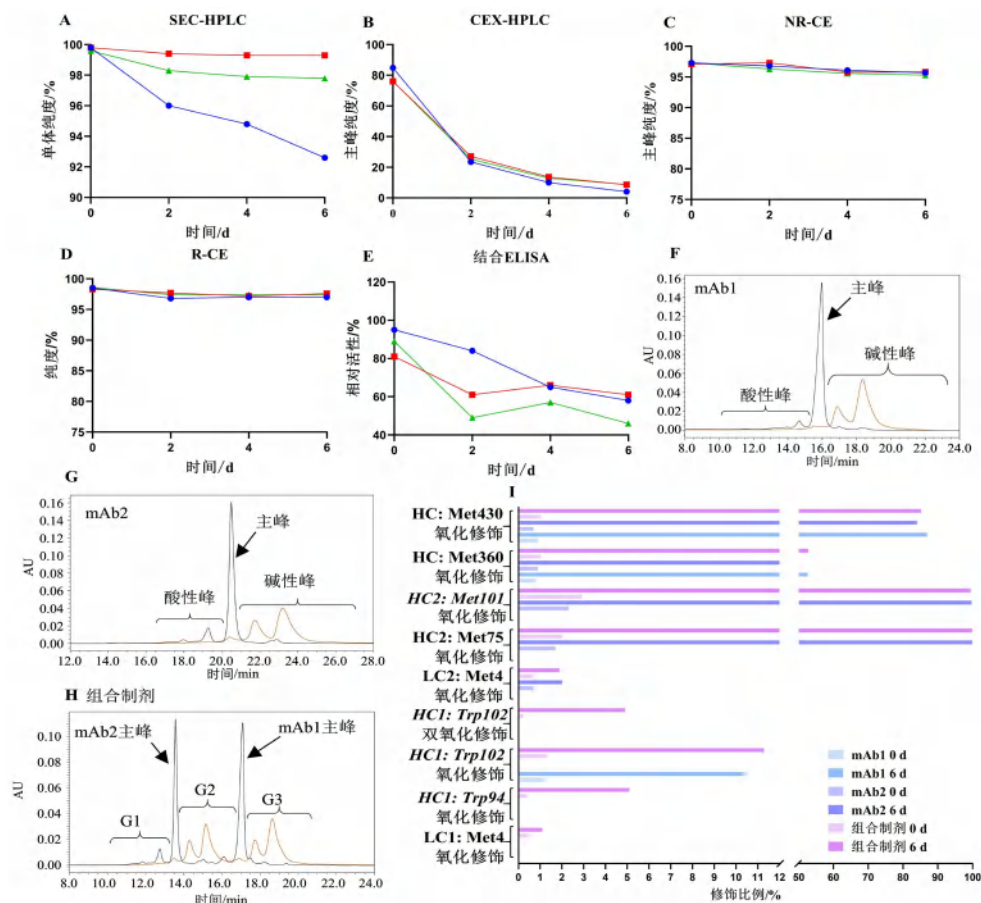


图2 氧化条件处理后样品检测结果

Fig 2 Samples after oxidation treatment

注: A ~ E. 0 ~ 6 d 的趋势图, mAb1 蓝色, mAb2 红色, 组合制剂绿色; F ~ H. CEX 检测图谱, 橙色代表氧化处理 6 d 样品, 黑色代表未处理的样品; I. PTM 结果。

Note: A ~ E. trend charts (0 ~ 6 d, blue for mAb1, red for mAb2, and green for co-formulation); F ~ H. CEX overlay chromatograms (orange: oxidized samples at day 6; black: untreated samples); I. PTM results.

剂中对氧化条件均比较敏感, 多位点发生较高级别的氧化修饰, 且在组合制剂中发生修饰的位点及修饰比例与单剂产品较为接近。

Met 是蛋白质中最容易氧化的氨基酸, 主要氧化产物为甲硫醚亚砜, 其比 Met 残基碱性更强, 导致 CEX 检测中碱性峰含量显著增加^[14-15]。重链 M430 是肽段“SVMHEA”中常见的氧化修饰位点, 其氧化修饰比例通常在 84.0% ~ 86.9%。不同位点的 Met 残基的氧化程度有明显差异, 这主要取决于该位点在溶剂中的暴露程度和在蛋白质三维结构中的位置。比如 mAb2 中的 Met4 位于轻链的 N 末端, 不在 β 折叠的结构中, 受到了蛋白质三维结构的保护, 氧化程度较低; 再如 mAb1 及 mAb2 中的 Met360 位于 CH_2 跟 CH_3 结构域界面附近, 更容易暴露于溶液中, 氧化程度较高^[16-19]。mAb2 重链 Met101 位于 CDR 区, 其在单剂产品中氧化修饰比例从 2.3% 增加至 99.7%, 在组合制剂中氧化修饰比例从 2.9% 增加至 99.4%, 结合 SEC 及 CE-SDS 检测结果可知, Binding ELISA 活性下降是由 CDR 区

的氧化造成, mAb2 及组合制剂在氧化 2 d 后活性未观察到进一步降低, 推测此位点易氧化, 在氧化 2 d 时即达到较高的氧化比例。在组合制剂中, 虽然 mAb1 有两个位于 CDR 区的位点发生了氧化修饰, 分别为重链 W102 (氧化修饰比例从 1.5% 增加至 16.2%) 及轻链 W94 (氧化修饰比例从 0.4% 增加至 5.1%), 但相对于 mAb2 重链 M101 的氧化比例增加幅度而言, mAb1 CDR 区的氧化修饰比例较低, 故组合制剂 Binding ELISA 结果与 mAb2 表现类似。

目前发现的 Trp 的氧化均在 CDR 区, 可能是因为 CDR 区的 Trp 更易暴露在溶剂中。Trp 残基的氧化会减少抗体与 SEC 柱基质的非特异性疏水相互作用^[20], 致使抗体在 SEC 柱上更早地洗脱, 形成一个前肩峰, 故推测 mAb1 SEC 检测结果 (见图 4) 中聚体含量逐渐升高是因为重链 W102 的氧化修饰, 而非分子大小差异。结合 CE-SDS 检测结果可知, Binding ELISA 活性下降也是由于 CDR 区 W102 的氧化修饰所致。SEC 聚体含量和 Binding ELISA 结果在氧化 0 ~ 6 d 内均呈趋势变化, 推测 W102 的氧化程度是逐渐增加的。

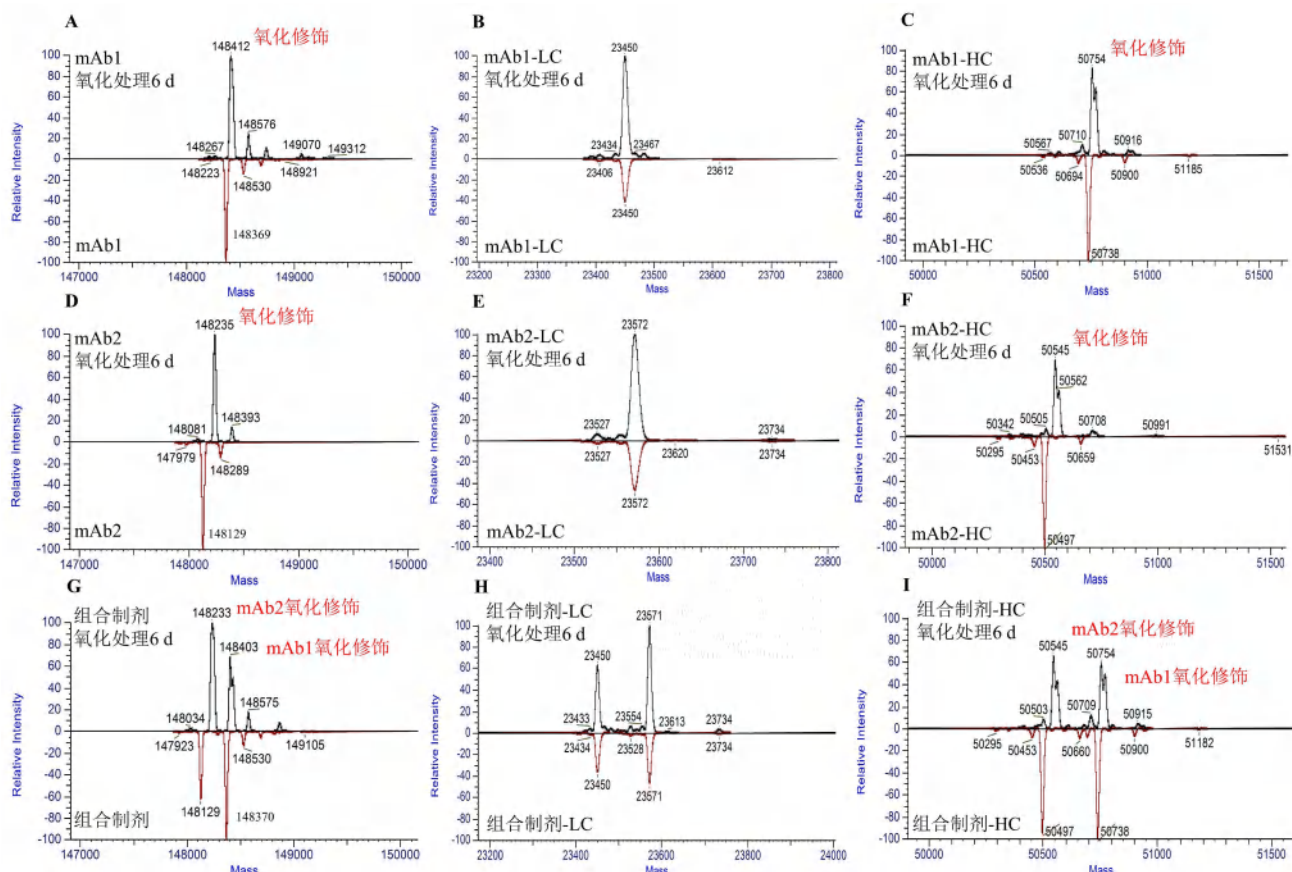


图3 氧化条件下分子量结果(解卷积质谱图)

Fig 3 Deconvoluted mass spectra of samples after oxidative treatment

注: A ~ C (mAb1), D ~ F (mAb2), G ~ I (组合制剂): 未经处理及氧化 6 d 的图谱; A、D、G: 完整分子量; B、E、H: 轻链分子量; C、F、I: 重链分子量。

Note: A ~ C (mAb1), D ~ F (mAb2), G ~ I (co-formulation): untreated vs 6-day oxidized samples; A, D, G: intact MV; B, E, H: LC MV; C, F, I: HC MV.

2.3.2 强酸试验 强酸试验结果显示, 所有的检测指标均无显著变化, mAb1、mAb2 及组合制剂均对强酸条件不敏感。

2.3.3 强碱试验 强碱试验结果显示, 3 个样品的 SEC (见图 5A) 和 Binding ELISA (见图 5E) 结果均无显著变化。在 CEX 检测中, mAb1 的主峰含量从 84.9% 下降至 44.7%, 酸性峰含量从 10.9% 增加至 52.0%; mAb2 的主峰含量从 76.0% 下降至 42.1%, 酸性峰含量从 19.3% 增加至 54.1%, 组合制剂的主峰含量从 76.2% 下降至 43.9%, G1 含量从 9.3% 增加至 25.1%, G2 含量从 8.8% 增加至 28.2% (见图 5B 及图 5F ~ 5H)。结合 PTM 数据 (见图 5I) 可知酸性峰的增加是由重链 N391 的脱酰胺修饰引起^[21], 其修饰比例在 16.2% ~ 17.1%。PTM 数据还显示, 重链 D150 发生了异构化修饰, 修饰比例在 10.4% ~ 11.3%, 由于 N391 及 D150 均不在 CDR 区, 且由于柔性铰链区的存在, Fc 区的修饰不会对 Fab 区产生影响^[14, 22], 故 Binding ELISA 的检测结果显示无明显变化。在 CE-

SDS 检测中观察到强碱处理 6 d R-CE 的纯度检测结果 (见图 5D) 低于 NR-CE (见图 5C) 的现象, 可能是由于轻链和重链之间的二硫键被硫醚键取代, 形成了不可还原的共价键交联产物, 而这种交联反应会随着 pH 的增加而加剧^[23]。

2.3.4 高温试验 高温试验结果显示, SEC 主峰降低幅度在 3.3% ~ 6.3% (见图 6A), NR-CE 主峰降低幅度在 10.6% ~ 19.5% (见图 6C), 其中 mAb2 降低幅度最大, 主要是片段含量增加, 以 mAb2 为例对片段进行分析。综合 mAb2 的 CE-SDS (见图 6C 和图 6D) 及分子量数据 (见图 7 及表 1) 可知, 主要在重链 CDR 区 G103 和 D104 之间发生断裂, 导致片段含量增加, 且 mAb2 在单剂产品及组合制剂中断裂位点一致。CEX 数据显示, 3 个样品主峰纯度均有显著降低, 下降幅度在 32.3% ~ 60.0%, 酸性峰及碱性峰含量均有增加 (见图 6B 及图 6F ~ 6H), 结合 PTM 数据 (见图 6I) 推测 CEX 数据的变化主要是由多种翻译后

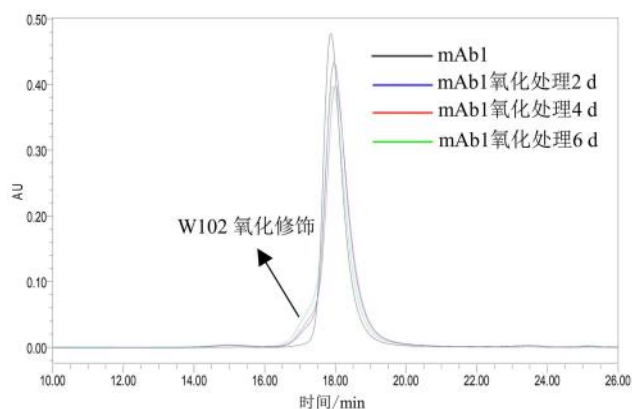


图 4 mAb1 氧化处理条件下 SEC 图谱

Fig 4 SEC overlay chromatograms of mAb1 after oxidative treatment

修饰共同引起,包括脱酰胺修饰、氧化修饰、琥珀酰亚胺修饰和异构化修饰。Binding ELISA 结果显示,仅组合制剂高温 25 d 的样品活性略有下降(见图 6E),结合 PTM 结果,组合制剂 CDR 区的修饰比例共增加了 40.8%,相对于 mAb1 (增加 29.9%) 及 mAb2 (增加 3.8%) 而言变化更大,推测组合制剂活性降低是 CDR 区各种修饰共同作用导致的。在分子量检测中观察到 mAb1 无论在单剂产品还是组合制剂中重链均有减少约 18 Da 的现象,结合 PTM 结果可知,这是重链 Asp62 发生琥珀酰亚胺修饰导致的(见图 7 及 8)。高温可以

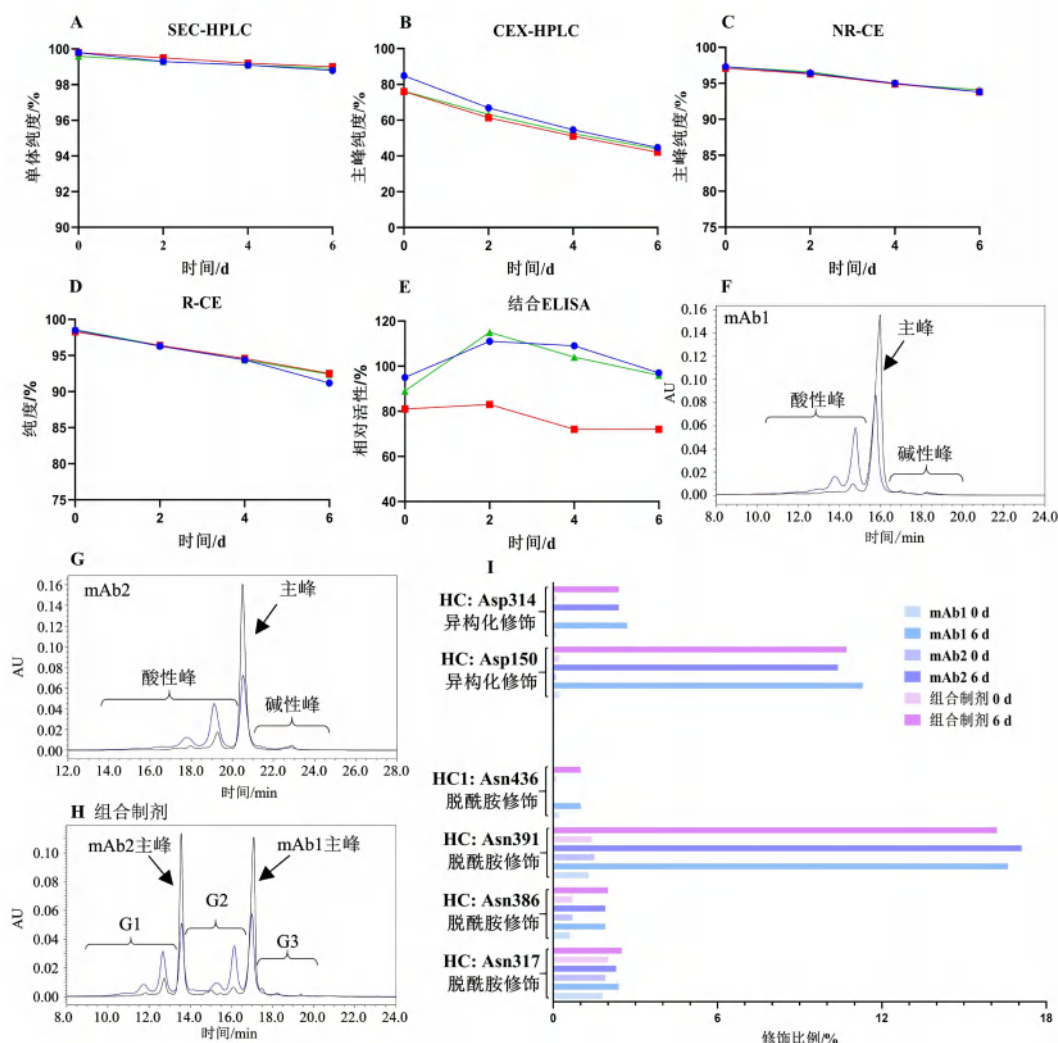


图 5 强碱条件处理后样品检测结果

Fig 5 Samples after high pH treatment

注: A ~ E. 0 ~ 6 d 的趋势图, mAb1 蓝色, mAb2 红色, 组合制剂绿色; F ~ H. CEX 检测图谱, 蓝色代表强碱处理 6 d 的样品, 黑色代表未处理的样品; I. PTM 结果。

Note: A ~ E. trend charts (0 ~ 6 d, mAb1 in blue, mAb2 in red, and the co-formulation in green); F (mAb1), G (mAb2) and H (co-formulation). CEX overlay chromatograms (blue: sample treated with high pH for 6 d; black: untreated sample); I. PTM results.

加速 Asp 的异构化, 从而在微酸性条件下生成异天冬氨酸和反应中间体琥珀酰亚胺^[24-25]。

3 讨论

采用四种不同的强制降解条件对 mAb1、

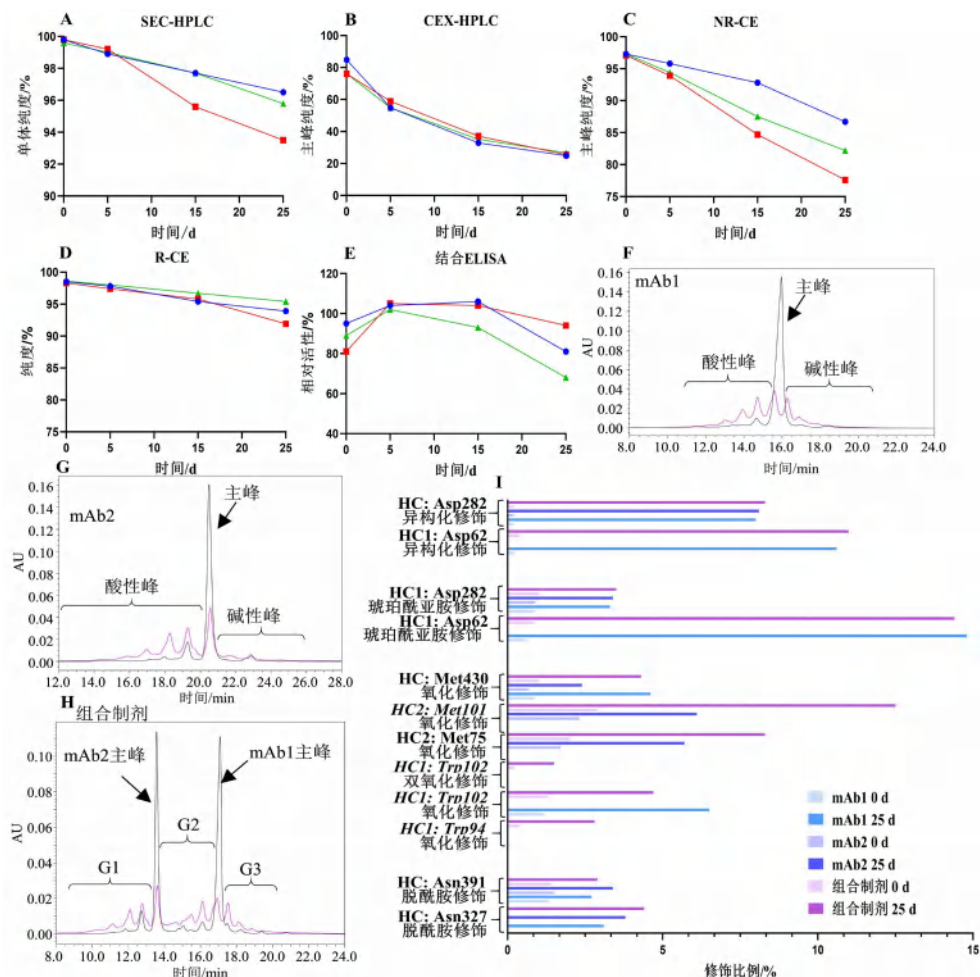


图 6 高温条件处理后样品检测结果

Fig 6 Samples post thermal stress exposure

注: A ~ E. 0 ~ 6 d 的趋势图, mAb1 蓝色, mAb2 红色, 组合制剂绿色; F ~ H. 分别为 mAb1、mAb2、组合制剂的 CEX 检测图谱, 红色代表高温处理 25 d 的样品, 黑色代表未处理的样品; I. PTM 结果。

Note: A ~ E. trend charts (0 ~ 6 d, mAb1 in blue, mAb2 in red, and the co-formulation in green); F (mAb1), G (mAb2) and H (co-formulation). CEX overlay chromatograms (red: sample treated with thermal stress for 25 d, black: untreated sample); I. PTM results.

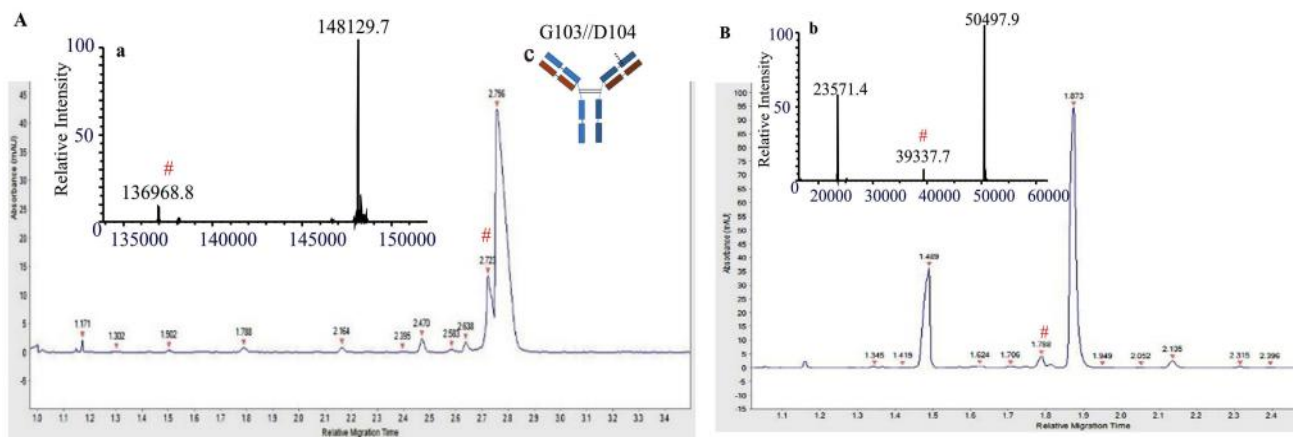


图 7 mAb2 高温 25 d CE-SDS 片段分析

Fig 7 CE-SDS fragment analysis of mAb2 after 25 d of thermal stress

注: A. NR-CE; a. LC-MS 完整分子量; c. mAb2 片段断裂结构示意图; B. R-CE; b. LC-MS 还原分子量; #CE-SDS 上显示的片段与 LC-MS 结果中的分子量相对应。

Note: A. NR-CE; a. LC-MS intact molecular weight; c. schematic diagram of fragment fracture structure; B. R-CE; b. LC-MS reduced molecular weight; #The fragment shown on CE-SDS corresponds to the molecular weight in the LC-MS result.

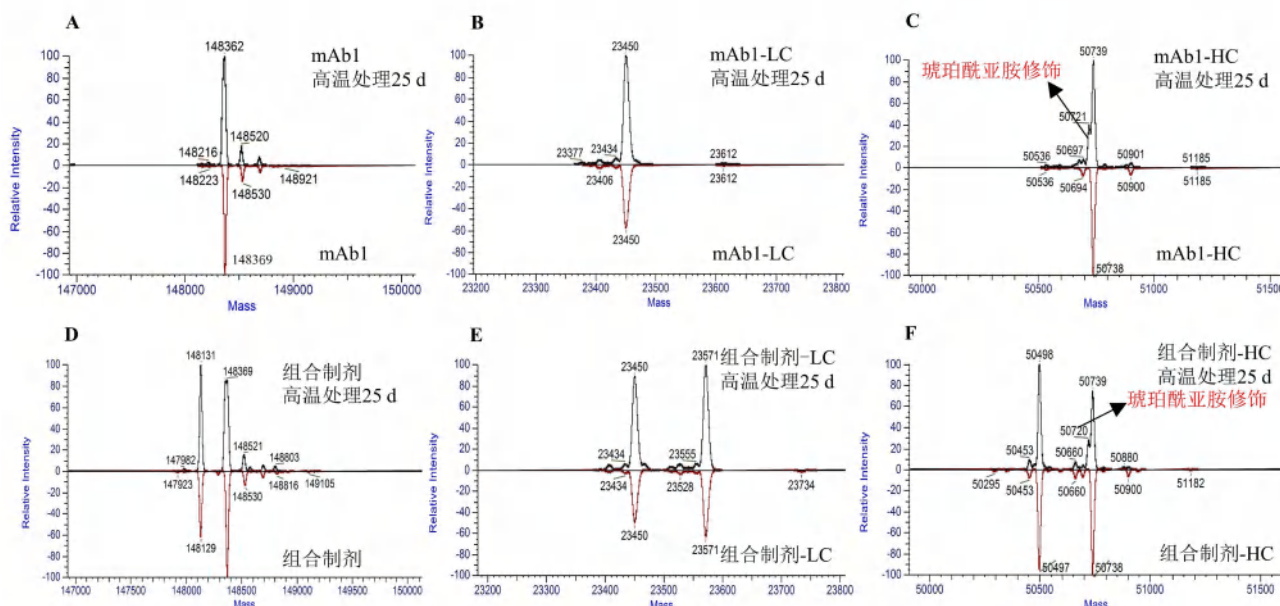


图8 高温条件下分子量结果(解卷积质谱图)

Fig 8 Deconvoluted mass spectra of samples under thermal stress condition

注: A ~ C (mAb1), D ~ F (组合制剂): 未经处理及高温 25 d 的图谱; A、D: 完整分子量; B、E: 轻链分子量; C、F: 重链分子量。

Note: A ~ C (mAb1), D ~ F (co-formulation): untreated and 25-day thermal stress samples; A, D: intact molecular weight; B, E: LC molecular weight; C, F: HC molecular weight.

表1 mAb2 高温 25 d 分子量检测结果

Tab 1 mAb2 molecular weight analysis after 25 d of thermal stress

样品名称	理论分子量 / Da	实测分子量 / Da	偏差 / ($\times 10^{-6}$)
mAb2-完整分子量	148 130.1	148 129.7	- 2.7
mAb2-完整分子量中的片段	136 969.5	136 968.8	- 5.1
mAb2-LC	23 571.9	23 571.4	- 21.2
mAb2-HC	50 497.2	50 497.9	13.9
mAb2-重链中的片段	39 336.6	39 337.7	28.0

mAb2 及组合制剂进行评估, 结果 3 个样品均对氧化、强碱和高温条件较为敏感, 对强酸条件不敏感。mAb1、mAb2 无论是在单剂产品还是组合制剂中, 其降解途径和降解趋势均基本一致, 仅在氧化条件下观察到 mAb1 在组合制剂中发生了单剂产品中不存在的重链 W94 的氧化修饰和重链 W102 的双氧化修饰, 但修饰比例均不高于 5.1%, 可以认为此组合制剂成药性较好, 可进行进一步的药学研究。值得注意的是, 氧化条件导致 CDR 区发生了高比例的氧化修饰, 从而降低了样品的生物学活性, 所以控制氧化修饰是关键质量属性, 这提示我们在工艺优化及样品储存过程中要控制氧气暴露、紫外线照射等易导致氧化的条件, 并开发灵敏的可用于质量控制的分析方法监控氧化修饰水平。高温诱导肽键断裂, 产生了较多的片段, 且高温也会加剧氧化反应, 所以温度控制也至关重要。同时, 本研究所使用的分析方法也

为组合制剂的质量控制提供了参考。

参考文献

- [1] Kim J, Kim YJ, Cao M, et al. Analytical characterization of co-formulated antibodies as combination therapy [J]. MAbs, 2020, 12 (1): 1738691.
- [2] Chauhan VM, Zhang H, Dalby PA, et al. Advancements in the co-formulation of biologic therapeutics [J]. J Control Release, 2020, 327: 397-405.
- [3] Xu C, Khanal S, Pierson NA, et al. Development, validation, and implementation of a robust and quality control-friendly focused peptide mapping method for monitoring oxidation of co-formulated monoclonal antibodies [J]. Anal Bioanal Chem, 2022, 414 (29-30): 8317-8330.
- [4] Krieg D, Winter G, Svilenov HL. It is never too late for a cocktail-development and analytical characterization of fixed-dose antibody combinations [J]. J Pharm Sci, 2022, 111 (8): 2149-2157.
- [5] Minze MG, Chastain LM. Combination therapies in the management of type 2 diabetes: the use of insulin degludec/liraglutide [J]. Ther Clin Risk Manag, 2016, 12: 471-478.
- [6] Gao JJ, Osgood CL, Gong Y, et al. FDA approval summary: pertuzumab, trastuzumab, and hyaluronidase-zzxf injection for subcutaneous use in patients with HER2-positive breast cancer [J]. Clin Cancer Res, 2021, 27 (8): 2126-2129.
- [7] Patel A, Gupta V, Hickey J, et al. Co-formulation of broadly neutralizing antibodies 3BNC117 and PGT121:

- analytical challenges during pre-formulation characterization and storage stability studies [J]. *J Pharm Sci*, 2018, 107 (12): 3032-3046.
- [8] Sivapalasingam S, Kamal M, Slim R, et al. Safety, pharmacokinetics, and immunogenicity of a co-formulated cocktail of three human monoclonal antibodies targeting Ebola virus glycoprotein in healthy adults: a randomized, first-in-human phase I study [J]. *Lancet Infect Dis*, 2018, 18 (8): 884-893.
- [9] Kuhne F, Heinrich K, Winter M, et al. Identification of hetero-aggregates in antibody co-formulations by multi-dimensional liquid chromatography coupled to mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2023, 95 (4): 2203-2212.
- [10] Luo L, Jiang BW, Cao Y, et al. A hydrophobic interaction chromatography method suitable for quantitating individual monoclonal antibodies contained in co-formulated drug products [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, 193: 113703.
- [11] Nowak C, Cheung JK, Dellatore SM, et al. Forced degradation of recombinant monoclonal antibodies: a practical guide [J]. *MAbs*, 2017, 9 (8): 1217-1230.
- [12] Chan CP. Forced degradation studies: current trends and future perspectives for protein-based therapeutics [J]. *Expert Rev Proteomics*, 2016, 13 (7): 651-658.
- [13] Krieg D, Svilenov H, Gitter JH, et al. Overcoming challenges in co-formulation of proteins with contradicting stability profiles-EPO plus G-CSF [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2020, 141: 105073.
- [14] Churnsae C, Gaza-Bulseco G, Sun J, et al. Comparison of methionine oxidation in thermal stability and chemically stressed samples of a fully human monoclonal antibody [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 850 (1-2): 285-294.
- [15] Zhang T, Bourret J, Cano T. Isolation and characterization of therapeutic antibody charge variants using cation exchange displacement chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218 (31): 5079-5086.
- [16] Keck RG. The use of t-butyl hydroperoxide as a probe for methionine oxidation in proteins [J]. *Anal Biochem*, 1996, 236 (1): 56-62.
- [17] Liu H, Gaza-Bulseco G, Zhou L. Mass spectrometry analysis of photo-induced methionine oxidation of a recombinant human monoclonal antibody [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2009, 20 (3): 525-528.
- [18] Liu DJ, Ren D, Huang H, et al. Structure and stability changes of human IgG1 Fc as a consequence of methionine oxidation [J]. *Biochem*, 2008, 47 (18): 5088-5100.
- [19] Sharma VK, Patapoff TW, Kabakoff B, et al. In silico selection of therapeutic antibodies for development: viscosity, clearance, and chemical stability [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111 (52): 18601-18606.
- [20] Yang J, Wang SA, Liu J, et al. Determination of tryptophan oxidation of monoclonal antibody by reversed phase high performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1156 (1): 174-182.
- [21] Liu SL, Madren S, Feng P, et al. Characterization of the acidic species of a monoclonal antibody using free flow electrophoresis fractionation and mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 185: 113217.
- [22] Xu YD, Wang DD, Mason B, et al. Structure, heterogeneity and developability assessment of therapeutic antibodies [J]. *MAbs*, 2019, 11 (2): 1-26.
- [23] Vlasak J, Ionescu R. Heterogeneity of monoclonal antibodies revealed by charge-sensitive methods [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2008, 9 (6): 468-481.
- [24] Chu GC, Chelius D, Xiao G, et al. Accumulation of succinimide in a recombinant monoclonal antibody in mildly acidic buffers under elevated temperatures [J]. *Pharm Res*, 2007, 24 (6): 1145-1156.
- [25] Yu XC, Joe K, Zhang Y, et al. Accurate determination of succinimide degradation products using high fidelity trypsin digestion peptide map analysis [J]. *Anal Chem*, 2011, 83 (15): 5912-5919.

(收稿日期: 2025-03-24; 修回日期: 2025-05-19)

基于网络药理学和实验验证蒲红醒脑益智方 治疗血管性痴呆的作用机制

邢婉涛¹, 唐菊², 杨宇婷¹, 杨娟娟³, 陈亮亮³, 陈博阳¹, 程玥^{1*}, 卫培峰^{1, 3*} (1.陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046; 2.昭通市中医医院, 云南 昭通 657000; 3.陕西中医药大学第二附属医院, 陕西 咸阳 723000)

摘要: **目的** 通过网络药理学及体内外实验探讨蒲红醒脑益智方治疗血管性痴呆 (VD) 的疗效及作用机制。**方法** 利用网络药理学技术获取蒲红醒脑益智方治疗 VD 的核心靶点和信号通路。建立谷氨酸诱导的 VD 细胞模型, 采用流式细胞仪检测细胞凋亡率, 蛋白免疫印迹技术 (Western blot) 检测沉默信息调节因子相关酶 1 (SIRT1)、核因子- κ B (NF- κ B)、肿瘤抑制基因 (p53)、半胱天冬氨酸蛋白酶-3 (caspase-3)、促细胞凋亡蛋白 (Bax) 和 B 淋巴细胞瘤-2 基因 (Bcl-2) 蛋白表达水平。采用双侧颈总动脉结扎法建立 VD 大鼠模型, Morris 水迷宫实验检测认知水平, HE 染色观察海马 CA1 区病理损伤, ELISA 检测炎症因子水平, Western blot 检测 SIRT1、NF- κ B、p53、caspase-3、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平。**结果** 经过筛选, 蒲红醒脑益智方可能通过 TP53 (p53)、Bcl-2、caspase-3、TNF、IL-6 等核心靶点调控 IL-7、PI3K-Akt、NF- κ B、cAMP 等信号通路发挥抗炎、减少神经细胞凋亡的作用。体内外实验结果表明蒲红醒脑益智方能提高 VD 细胞存活率、降低细胞凋亡率, 改善 VD 大鼠认知功能, 改善海马 CA1 病理损伤, 降低海马组织中炎症因子水平, 降低 VD 大鼠海马组织及 VD 细胞模型中 NF- κ B p65、p53、caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平, 上调 SIRT1、Bcl-2 蛋白表达水平。**结论** 蒲红醒脑益智方对 VD 的治疗效果主要体现在抑制海马神经元的凋亡、改善 VD 大鼠的认知功能障碍和海马 CA1 区病理改变、降低海马组织中的炎症因子水平等方面, 其作用机制可能与调控 SIRT1/NF- κ B/p53 信号通路及凋亡相关蛋白的表达有关。

关键词: 血管性痴呆; 蒲红醒脑益智方; 神经保护; 凋亡; 网络药理学

中图分类号: R286

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)12-3503-11

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.007

Mechanism of Puhong Xingnao Yizhi formula against vascular dementia based on network pharmacology and experimental verification

XING Wantao¹, TANG Ju², YANG Yuting¹, YANG Juanjuan³, CHEN Liangliang³, CHEN Boyang¹, CHENG Yue^{1*}, WEI Peifeng^{1, 3*} (1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712046; 2. Zhaotong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhaotong Yunnan 657000; 3. The Second Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 723000)

Abstract: **Objective** To determine the efficacy and mechanism of Puhong Xingnao Yizhi formula against vascular dementia (VD) by network pharmacology and a combination of in vitro and in vivo experiments. **Methods** Network pharmacology was used to identify the core targets and signaling pathways of Puhong Xingnao Yizhi formula for VD. A VD cell model was induced by glutamate. Flow cytometry was used to detect the apoptosis, while Western blot to detect sirtuin-1 (SIRT1), nuclear factor-kappa B (NF- κ B), tumor suppressor gene (p53), cysteinyl aspartate specific proteinase-3

基金项目: 中医药“双链融合”中青年科研创新团队建设项目 (No. 2022-SLRH-YQ-008); 陕西省重点产业链项目 (No. 2021ZDLSF04-11); 咸阳市科技局秦创原中医药产业创新聚集区项目 (No. L2024-0CY-ZYYJJQ-279); 陕西省教育厅自然科学专项项目 (No. 23JK0399)。

作者简介: 邢婉涛, 女, 硕士研究生, 主要从事中药药性理论基础研究, email: 1533625402@qq.com * **通信作者:** 程玥, 女, 高级实验师, 主要从事中药及复方药理作用研究, email: 1197317870@qq.com; 卫培峰, 男, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药新药与中药毒性的临床及实验方面的研究, email: weipeifeng@163.com

(caspase-3), pro-apoptotic protein (BCL2 associated X protein, Bax), and B lymphoblastoma-2 gene (Bcl-2) protein expression levels. Bilateral common carotid artery occlusion helped to establish a rat model of VD. The Morris water maze test was used to assess the cognitive function, HE staining visualize the pathological alterations in the CA1 region of the hippocampus. ELISA was used to measure the levels of inflammatory factors, and Western blot to analyze the expression levels of SIRT1, NF- κ B, p53, caspase-3, Bax, and Bcl-2 proteins. **Results** After the Puhong Xingnao Yizhi formula showed anti-inflammatory effect and reduced neuronal apoptosis by regulating the signaling pathways of IL-7, PI3K-Akt, NF- κ B and cAMP through the core targets, such as TP53 (p53), Bcl-2, Caspase-3, TNF and IL-6. Both in vivo and in vitro experiments demonstrated that Puhong Xingnao Yizhi formula enhanced the survival rate of VD cells, reduced the rate of apoptosis, and improved the cognitive function of VD rats. Furthermore, it ameliorated the pathological damage of hippocampal CA1 regions, and reduced the level of inflammatory factors in the hippocampal tissues, as well as the expression levels of NF- κ B p65, p53, caspase-3 and Bax proteins in both the hippocampal tissues of rats and the VD cell models of VD rats. Finally, it upregulated the expression levels of SIRT1 and Bcl-2 proteins. **Conclusion** Puhong Xingnao Yizhi formula exerts its therapeutic effect on VD primarily by inhibiting the hippocampal neuronal cell apoptosis, improving cognitive dysfunction and pathological changes in the hippocampal CA1 area in VD rats, and reducing inflammatory factor levels in the hippocampal tissues. Its mechanism may involve the regulation of SIRT1/NF- κ B/p53 signaling pathway and apoptosis-related protein expression.

Key words: vascular dementia; Puhong Xingnao Yizhi formula; neuroprotection; apoptosis; network pharmacology

血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 是一种表现为执行功能障碍, 注意力、记忆力、信息处理、复杂活动困难以及思维和行为紊乱的常见痴呆^[1]。主要病理特征是脑血管病变引发脑组织间低灌注, 导致局灶性神经功能受损, 进而出现认知功能障碍或精神障碍^[2]。随着病情进展, 患者可能会完全丧失自理能力, 生活质量严重降低^[3]。在中国, 60 岁及以上痴呆患者约 1507 万, 其中 VD 占 392 万^[4]。该病治疗成本高、预后差^[5-7], 已成为亟待解决的医学和社会问题。

目前, 西医治疗 VD 的主要药物包括胆碱酯酶抑制剂盐酸多奈哌齐、非甾体抗炎药阿司匹林以及非竞争性 N-甲基-D-天冬氨酸受体拮抗剂美金刚等^[1, 8], 但目前的西医治疗效果均不理想。中药复方可多途径、多靶点调节机体的生理、病理进程, 应用前景广阔。因此, 开展中医药防治 VD 相关方药的研究, 对于 VD 的治疗意义重大。

传统中医认为, VD 的基本病机为髓减脑消、神机失用, 病位在脑, 与五脏功能失调关系密切。陕西中医药大学缪峰教授根据此病的病机特点及多年临床经验, 在补肾化痰方的基础上改良后创立了蒲红醒脑益智方, 用于治疗 VD。蒲红醒脑益智方全方由石菖蒲、红花、益智仁等十七味中药材组成。全方调和阴阳, 共奏活血化瘀、醒脑益智之效。基于此, 本研究对蒲红醒脑益智方改善 VD 病理生理

状态的作用及其机制展开进一步探讨。

1 材料

1.1 试药

生地黄、石菖蒲、黄精、淫羊藿、川芎、茯苓、浙贝、制首乌、麦冬、郁金、远志、石斛、附子、红花、乌药、益智仁购于陕西康超康健药业有限公司, 冰片购于陕西中医药大学第二附属医院中药房。上述药材经陕西中医药大学颜永刚教授鉴定, 均符合药典质量标准。盐酸多奈哌齐 (安理申, 批号: 20230424, 规格: 5 mg/片, 陕西中医药大学第二附属医院西药房)。1% 戊巴比妥钠 (上海氟德化工有限公司)。谷氨酸 (Sigma, 批号: 56-86-0, 规格: 100 g)。白细胞介素 (IL)-1 β (H002-1-2)、IL-6 (H007-1-2)、肿瘤坏死因子 (TNF- α) (H052-1-2) 试剂盒 (南京建成生物工程研究)。

1.2 实验细胞

小鼠海马神经元 (HT22 细胞, 批号: 221109, 河南省工业微生物菌种工程技术研究中心)。

培养环境: DMEM 高糖培养基 + 10% 胎牛血清 + 1% 双抗 (青霉素 100 μ g/mL、链霉素 100 μ g/mL), 置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养。

1.3 动物

35 只雄性 SPF 级 SD 大鼠, 用于蒲红醒脑益智方含药血清的制备; 60 只雄性 SPF 级 SD 大鼠, 用于蒲红醒脑益智方的体内实验研究 (伦理批件

号: SUCMDL20230524001)。上述动物均购自成都达硕实验动物有限公司, 许可证号: SCXK(川) 2020-030, 体重 200 ~ 220 g。大鼠饲养环境为室温 20 ~ 25 ℃, 自由饮水进食。

2 方法

2.1 蒲红醒脑益智方有效成分的筛选及靶点预测

通过 TCMSP 数据库检索蒲红醒脑益智方中各药材的有效成分, 筛选条件为口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$, 类药性 (DL) ≥ 0.18 ; 通过 BATMAN-TCM 数据库、TCMIP 数据库及中国知网检索文献中石斛、麦冬、生地黄、远志、制何首乌的化学成分, 再通过 SwissADME 平台以胃肠道吸收 (GI absorption) 为 High 和类药性 (Drug likeness) 大于 5 个 Yes 为条件进行筛选。筛选后的有效成分结合 TCMSP 和 BATMAN-TCM 得到相关靶点。

2.2 VD 疾病靶点的获取

通过 GeneCards、OMIM 和 TTD 数据库检索“vascular dementia”, 得到 VD 相关疾病靶点, 再利用 UniProt 数据库匹配已验证的人类靶点基因名。

2.3 蒲红醒脑益智方治疗 VD 的潜在作用靶点预测

将蒲红醒脑益智方药物靶点与 VD 靶点取交集, 获得蒲红醒脑益智方干预 VD 的潜在作用靶点。

2.4 疾病 - 药物 - 成分 - 靶点网络构建

利用 Cytoscape3.7.2 构建疾病 - 药物 - 成分 - 靶点网络, 并根据 degree 值筛选出核心成分。

2.5 蛋白质相互作用 (PPI) 网络及网络拓扑分析

将上述交集靶点导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>) 中, 将置信度设定为 > 0.4 , 并删除在此网络中无关联的节点, 构建交集靶点蛋白 PPI, 对 PPI 网络进行拓扑分析以筛选关键靶点。

2.6 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析

将所得交集靶点基因输入 Metascape 数据库, 设置物种为“H.sapiens”, 设定 $P < 0.05$, 进行 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析, 分别下载各部分结果。GO 富集分析根据 P 值选择排名前 10 的参数, 绘制 GO 富集分析条形图。KEGG 通路富集分析选择前 20 条信号通路。利用微生信平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 绘制 GO 富集分析条形图和 KEGG 通路富集分析条形图。

2.7 蒲红醒脑益智方水煎液及阳性药的制备

根据人与动物用药等效剂量换算方法, 分别制备蒲红醒脑益智方低剂量 (10.6 g/kg)、中剂量 (21.2 g/kg)、高剂量 (42.4 g/kg) 水煎液。将中药饮片用蒸馏水浸泡 0.5 h 后煎煮 2 次, 合并 2 次药液后浓缩, 密封后 4 ℃ 冷藏备用。阳性药 (盐酸多奈哌齐片) 按照 0.45 g/kg 的给药剂量制备成

混悬液, 密封后于 4 ℃ 冷藏备用。

2.8 蒲红醒脑益智方含药血清的制备

35 只大鼠随机分为 5 组, 每组 7 只: 空白组, 蒲红醒脑益智方低剂量组、中剂量组、高剂量组和阳性药组 (盐酸多奈哌齐)。每日灌胃 1 次, 连续灌胃 7 d。末次灌胃 1 h 后, 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 然后腹主动脉采血。离心分离血清 (3500 r/min, 15 min), 置于 56 ℃ 水浴锅中灭活 30 min。用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后分装, 置于 -80 ℃ 冰箱贮藏备用。

2.9 谷氨酸诱导 HT22 细胞损伤构建 VD 细胞模型的浓度筛选

将细胞接种在 96 孔板内, 每孔 1×10^5 个, 培养 24 h。加入浓度为 1、2.5、5、10、20 以及 40 mmol/L 的谷氨酸溶液 (用完全培养基分别配制), 以不含谷氨酸的完全培养基作为对照组, 将 96 孔板放在培养箱中培养 24 h。采用 CCK-8 法检测细胞存活率, 筛选谷氨酸诱导的 HT22 细胞损伤构建 VD 细胞模型的浓度。

2.10 蒲红醒脑益智方对谷氨酸诱导的 HT22 细胞存活率的影响

实验分组设置为对照组, 模型组 (谷氨酸), 阳性药组 (谷氨酸 + 盐酸多奈哌齐), 蒲红醒脑益智方低剂量组 (谷氨酸 + 蒲红醒脑益智方低剂量含药血清)、中剂量组 (谷氨酸 + 蒲红醒脑益智方中剂量含药血清)、高剂量组 (谷氨酸 + 蒲红醒脑益智方高剂量含药血清)。采用 CCK-8 法检测各组的细胞存活率。

2.11 Annexin V-FITC/PI 双染法检测各组细胞凋亡

收集各组药物处理 24 h 后的细胞, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 2 次, 1000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液。用 1 mL $1 \times$ Binding Buffer 重悬细胞沉淀, 吸取细胞悬液 100 μL (约 1×10^5 个细胞) 于 5 mL 流式管中, 加入 5 μL AnnexinV-FITC 和 5 μL PI 溶液, 轻轻混匀, 在室温 (25 ℃) 下避光孵育 15 min 后加入 400 μL $1 \times$ Binding Buffer 轻轻混匀, 立即上机检测 (1 h 内完成)。

2.12 Western blot 检测各组细胞中 SIRT1/NF- κB p65/p53 信号通路及凋亡相关蛋白的表达水平

收集给药结束后的细胞, 每组加入配制好的裂解液 (裂解液: 蛋白酶抑制剂: 磷酸酶抑制剂 = 100:1:1)。用无菌注射器反复吹打细胞 20 ~ 30 次, 吹打结束后于冰上裂解 30 min 后收集细胞悬液。4 ℃、12 500 r/min 离心 10 min, 收集上清液, -20 ℃ 冷冻保存。BCA 法测定蛋白浓度, 将上述蛋白溶液与 $4 \times$ 上样缓冲液混合, 于 100 ℃ 金属浴中加热 10 min。蛋白样品凝胶电泳后转至 PVDF 膜, 于 5% 脱脂奶粉中封闭 2 h 后, 分别加

入一抗: SIRT1 (1:1000)、NF- κ B p65 (1:1000)、p53 (1:5000)、caspase-3 (1:1000)、Bax (1:5000)、Bcl-2 (1:1000) 和 β -actin (1:1000), 4℃ 冰箱孵育过夜; TBST 洗涤后, 加入二抗 (1:5000), 孵育 1.5 h, 滴加 ECL 显影液于 PVDF 膜上, 上机曝光显影成像, 以 β -actin 为内参, 用 Image J 软件计算灰度值。

2.13 VD 大鼠模型构建及给药

在 60 只大鼠中随机挑选 7 只大鼠作为假手术组, 其余大鼠使用双侧颈总动脉结扎法制备 VD 模型。具体手术方法如下:

手术前 12 h 禁食, 6 h 禁饮, 采用 1% 戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉。麻醉成功后的大鼠取仰卧位置于手术台上。剃除大鼠颈部中央毛发, 酒精棉球擦拭消毒, 使用组织剪在颈部中线纵向剪开 1 cm 左右的切口, 缓慢钝性分离颈部皮下组织及肌肉群, 直至一侧颈总动脉充分暴露, 使用眼科镊缓慢将颈总动脉上的白色神经与血管小心分离。用 4-0 手术线分别从颈总动脉的近心端和远心端进行外科结扎, 两处结扎完全后剪断中间部分后无血液渗出。另一侧颈总动脉按照同样的方法处理, 双侧颈总动脉结扎完成后观察大鼠呼吸、心跳正常后, 逐层进行缝合, 缝合处予以碘伏棉球消毒处理, 并涂抹青霉素粉预防感染, 放回饲养笼保温饲养。假手术组仅剥离双侧颈总动脉及神经, 颈总动脉不进行结扎。术后第 10 日将 35 只造模成功大鼠随机分为模型组、蒲红醒脑益智方低剂量组 (10.6 g/kg)、中剂量组 (21.2 g/kg)、高剂量组 (42.4 g/kg) 和阳性药组 (盐酸多奈哌齐, 0.45 g/kg), 每组 7 只。假手术组和模型组给予等量的蒸馏水灌胃。其余各组每日灌胃给药 1 次, 连续灌胃 30 d。

2.14 Morris 水迷宫实验对 VD 大鼠行为学评估

大鼠连续灌胃 30 d 以后, 对大鼠进行为期 6 d 的水迷宫实验, 包括定位导航实验和空间探索实验。在 Morris 水迷宫设备的中央放置一个直径为 160 cm, 高度为 50 cm 的黑色圆形水池, 摄像机固定在水迷宫设备上方并连接自动录制系统。将水池分为四个象限, 站台设置在第四象限中央, 向水池中注入清水至高出站台 2 cm。将大鼠从第二象限的池壁放下后, 立即开始记录时间, 逃避潜伏期设定为 90 s, 记录 90 s 内大鼠到达站台的时间。若在 90 s 内大鼠未到达站台, 记录逃避潜伏期为 90 s, 并引导大鼠到达平台后停留 20 s。实验连续进行 5 d, 记录大鼠的逃避潜伏期及轨迹。大鼠定位航行实验后, 次日将站台撤掉, 记录 90 s 内大鼠穿越站台的次数。

2.15 样本采集与处理

水迷宫实验结束后, 用 1% 戊巴比妥钠溶液麻醉大鼠, 腹主动脉取血, 3500 r/min 离心 15 min 收集血清。取大鼠海马组织在预冷的生理盐水中洗涤, 部分海马组织使用 10% 中性甲醛溶液浸泡于阴凉干燥处, 其余海马组织用锡箔纸包裹于 -80℃ 保存。

2.16 HE 染色观察海马 CA1 区的病理变化

将固定好的大鼠海马组织取出, 用 PBS 浸泡清洗。按照规定的时间与方法进行脱水、透明及包埋。蜡块进行切片, HE 染色后封片。显微镜下观察病理形态并拍照。

2.17 ELISA 检测大鼠海马组织中炎症因子水平

取适量大鼠海马组织匀浆, 按照重量体积比 1 g:9 mL 的比例加入 PBS, 在低温条件下, 将标本充分匀浆, 3000 r/min 离心 20 min 后收集上清备用。按照相关试剂盒的说明书进行大鼠海马组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的测定。

2.18 Western blot 检测 VD 大鼠海马组织中 SIRT1/NF- κ B p65/p53 信号通路及凋亡相关蛋白的表达水平

称取适量冷冻海马组织, 组织和裂解液按照 10 mg:100 μ L 的比例加入裂解液, 匀浆机研磨至组织块消失。匀浆完成后于冰上裂解 30 min, 然后 4℃、12 000 r/min 离心 20 min, 取上清液。其余操作同“2.11”项下。

2.19 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 和 SPSS 25.0 统计软件进行数据分析, 所有计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。数据符合正态分布的多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 若数据不符合正态分布, 则采用秩和检验。多个样本均数之间的两两比较采用 Tukey 多重比较检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 蒲红醒脑益智方有效成分筛选结果

通过 TCMS、BATMAN-TCM、TCMIP 数据库检索和筛选, 共获得蒲红醒脑益智方有效成分 223 种, 去重后蒲红醒脑益智方共获得 191 种活性化合物。主要通过调控 TP53 (p53)、Bcl-2、caspase-3、TNF、IL-6 等核心靶点对 VD 产生防治作用。

3.2 VD 靶点

GeneCards 数据库获得 VD 靶点 1349 个, OMIM 和 TTD 数据库共获得 38 个 VD 靶点, 最终得到 1357 个 VD 疾病靶点。

3.3 蒲红醒脑益智方治疗 VD 的潜在作用靶点预测

蒲红醒脑益智方与 VD 直接相关的交集靶点有 149 个。因此可以推测蒲红醒脑益智方是通过

多靶点干预 VD 的。

3.4 蒲红醒脑益智方治疗 VD 的疾病 - 药物 - 成分 - 靶点网络

通过 Cytoscape 构建疾病 - 药物 - 成分 - 靶

点网络 (见图 1)。根据 degree 值筛选出排名前 5 的核心成分为槲皮素 (quercetin)、 β -谷甾醇 (beta-sitosterol)、山柰酚 (kaempferol)、豆甾醇 (stigmasterol) 和木犀草素 (luteolin)。

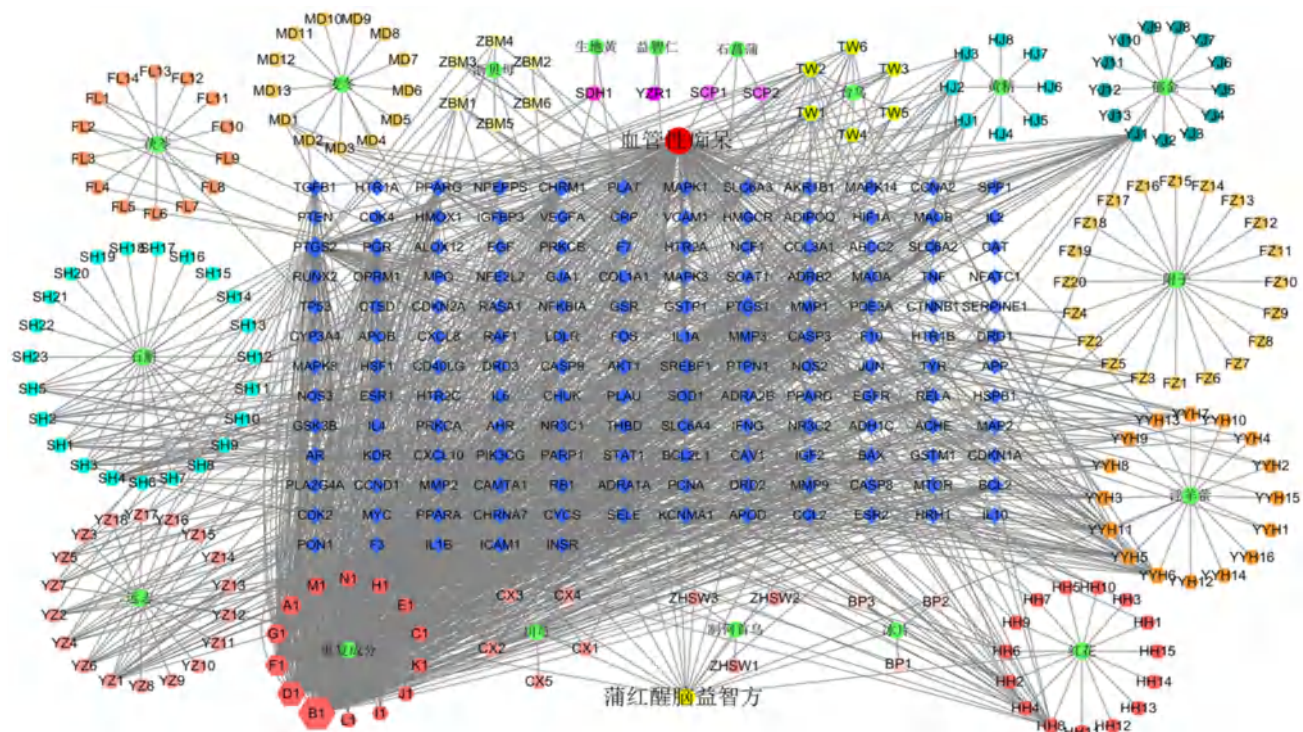


图 1 蒲红醒脑益智方的疾病 - 药物 - 成分 - 靶点网络图

Fig 1 Disease drug ingredient target network diagram of Puhong Xingnao Yizhi formula

3.5 PPI 网络及网络拓扑分析

根据 degree 值筛选出 PPI 核心网络关键靶点中排名前 5 的核心靶点为 TP53 (p53)、Bcl-2、caspase-3、TNF、IL-6 (见图 2)。

3.6 GO 和 KEGG 富集分析结果

GO 富集分析生物过程 (BP) 2779 个, 主要包括对氧化应激的反应、对脂多糖的反应、对活性氧的反应、对缺氧的反应、对氧气水平的反应等; 细胞组成 (CC) 98 个, 主要包括膜筏、膜微区、陷窝、质膜筏、突触前膜的组成部分等; 分子功能 (MF) 184 个, 主要包括 RNA 聚合酶 II 特异性 DNA- 结合转录因子结合、DNA- 结合转录因子结合、转录共调节因子结合、核受体活性、配体激活的转录因子活性等 (见图 3)。

KEGG 富集分析发现了 184 条不同的信号通路, 表明蒲红醒脑益智方干预 VD 主要通过癌症途径、IL-17 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、NF- κ B 信号通路、cAMP 信号通路、钙信号通路、cGMP-PKG 信号通路、坏死性凋亡等信号通路实现 (见图 4)。

3.7 谷氨酸诱导 VD 细胞模型的浓度筛选结果分析

CCK-8 检测结果表明, 随着谷氨酸浓度升高,

细胞存活率越来越低, 浓度为 10 mmol/L 时, 细胞存活率在 50% 左右; 谷氨酸浓度大于 10 mmol/L 时, 细胞存活率急剧下降, 明显低于 50%。故谷氨酸的适宜造模浓度选为 10 mmol/L (见图 5)。

3.8 蒲红醒脑益智方对 VD 细胞存活率的影响

CCK-8 检测结果表明, 模型组细胞经 10 mmol/L 谷氨酸作用 24 h 后, 细胞的存活率明显下降, 细胞活力约 50% ($P < 0.01$), 阳性组细胞活力在 80% 左右, 蒲红醒脑益智方低剂量组细胞活力在 65% 左右, 中剂量组细胞活力在 78% 左右, 高剂量组细胞活力在 68% 左右 (见图 6)。提示蒲红醒脑益智方可以明显提升谷氨酸诱导的 VD 细胞的活力。

3.9 蒲红醒脑益智方对 VD 细胞凋亡的影响

Annexin V-FITC/PI 双染结果表明, 与对照组相比, 模型组细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 各给药组细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.01$) (见图 7)。结果表明蒲红醒脑益智方能明显改善 VD 细胞凋亡情况。

3.10 蒲红醒脑益智方对 VD 细胞中 SIRT1/NF- κ B/p53 信号通路及凋亡相关蛋白表达的影响

根据网络药理学分析及细胞凋亡检测结果可

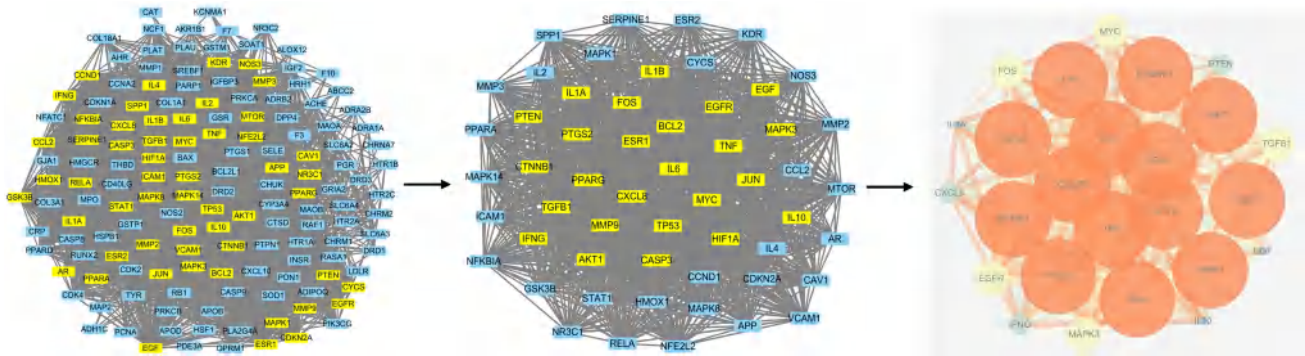


图 2 蒲红醒脑益智方治疗 VD 的 PPI 蛋白网络及核心靶点
Fig 2 PPI and core targets of Puhong Xingnao Yizhi formula treated for VD

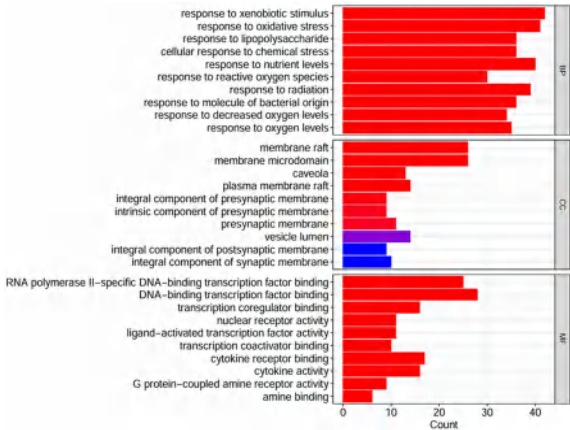


图 3 蒲红醒脑益智方治疗 VD 的 GO 功能富集分析
Fig 3 GO functional enrichment analysis of Puhong Xingnao Yizhi formula treated for VD

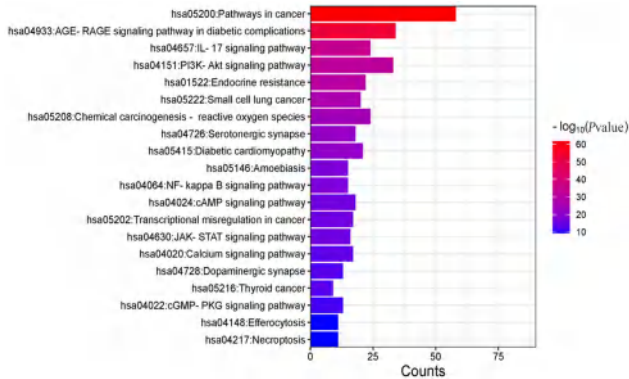


图 4 蒲红醒脑益智方治疗 VD 的 KEGG 通路富集分析
Fig 4 KEGG pathway enrichment analysis of Puhong Xingnao Yizhi formula treated for VD

知,蒲红醒脑益智方可能通过调控 SIRT1/NF- κ B/p53 信号通路及凋亡相关蛋白的表达从而发挥对 VD 的改善效果。因此,我们通过 Western blot 实验探究蒲红醒脑益智方对 VD 细胞中 SIRT1/NF- κ B/p53 信号通路及凋亡相关蛋白表达的影响。

Western blot 实验结果显示,与对照组相比,模型组 NF- κ B p65、p53、caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平明显升高, SIRT1、Bcl-2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组相比,各给药组 NF- κ B

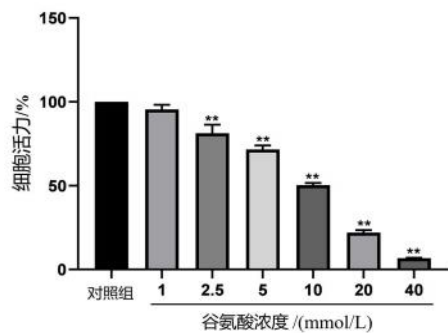


图 5 谷氨酸对 VD 细胞的细胞活力的影响
Fig 5 Effect of glutamate on the viability of VD cells
注:与对照组相比较, ** $P < 0.01$ 。
Note: Compared with the control group, ** $P < 0.01$.

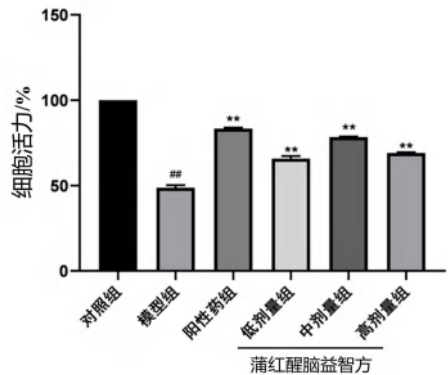


图 6 蒲红醒脑益智方对 VD 细胞活力的影响
Fig 6 Effect of Puhong Xingnao Yizhi formula on the viability of VD cells
注:与对照组相比, ## $P < 0.01$; 与模型组相比, ** $P < 0.01$ 。
Note: Compared with the control group, ## $P < 0.01$; compared with the model group, ** $P < 0.01$.

p65、p53、caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平明显降低, SIRT1、Bcl-2 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)(见图 8)。提示蒲红醒脑益智方可以上调 SIRT1 的表达水平,抑制 NF- κ B p65、p53 的转录活性,并且调控凋亡相关蛋白的表达,减轻谷氨酸诱导的细胞损伤,抑制细胞凋亡,从而对 VD 细胞起到保护作用。

3.11 水迷宫实验结果

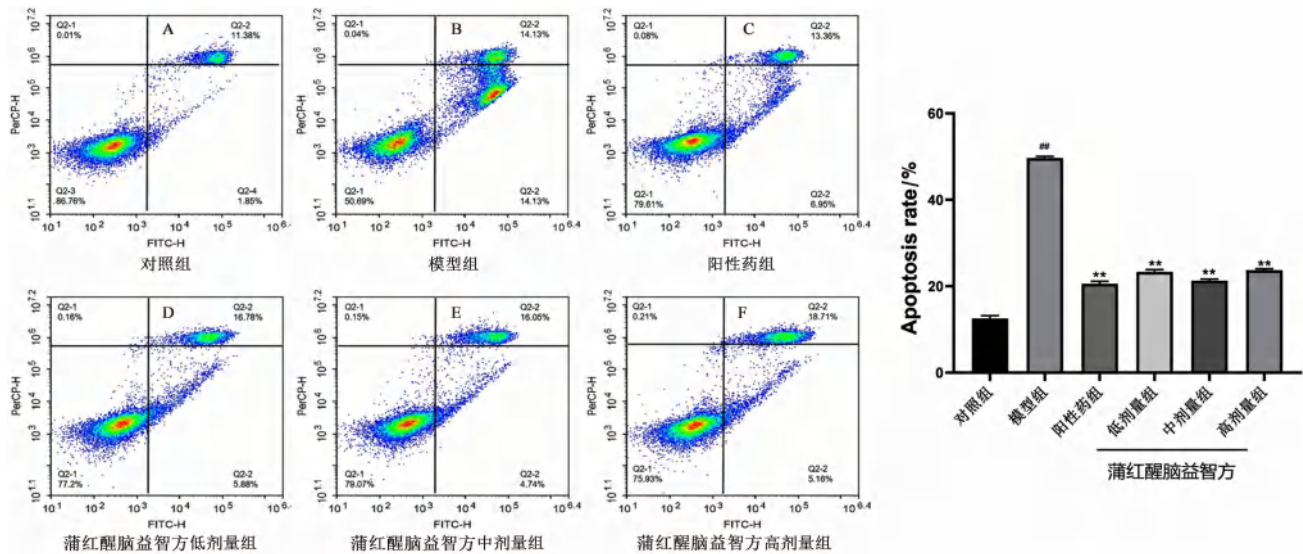


图 7 蒲红醒脑益智方对 VD 细胞凋亡的影响

Fig 7 Effect of Puhong Xingnao Yizhi formula on the apoptosis of VD cells

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

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

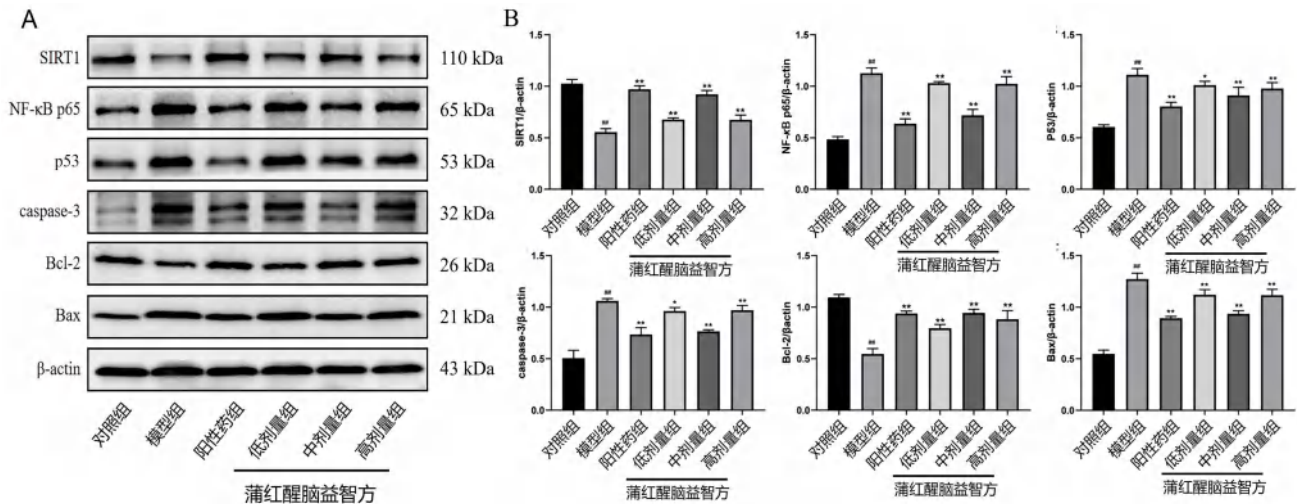


图 8 蒲红醒脑益智方对 VD 细胞中 SIRT1、NF-κB p65、p53、caspase-3、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响

Fig 8 Effect of Puhong Xingnao Yizhi formula on SIRT1, NF-κB p65, p53, caspase-3, Bax and Bcl-2 protein expression in VD cells

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

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

3.11.1 蒲红醒脑益智方对 VD 大鼠逃避潜伏期的影响 经过 5 d 水迷宫训练后，各组大鼠逃避潜伏期逐渐减少 ($P < 0.05$)。与假手术组比较，模型组第 1 ~ 5 日逃避潜伏期均明显延长 ($P < 0.01$)；与模型组相比，蒲红醒脑益智方低、中、高剂量组及阳性药组大鼠的逃避潜伏期均明显缩短；第 4 日和第 5 日蒲红醒脑益智方低剂量和高剂量组逃避潜伏期明显缩短 ($P < 0.05$)；第 1 日至第 5 日蒲红醒脑益智方中剂量组和阳性药组逃避潜伏期显著缩短 ($P < 0.01$)；训练第 5 日后，各给药组大鼠逃避潜伏期明显缩短 ($P < 0.01$) (见图 9)。结果表明，蒲红醒脑益智方能明显缩短 VD 大鼠的逃避潜伏期。

3.11.2 蒲红醒脑益智方对 VD 大鼠穿越平台次数的影响 与假手术组相比，模型组大鼠穿越站台次数显著减少 ($P < 0.01$)，经药物干预后，各组大鼠穿越站台次数明显增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) (见图 10)。结果表明，蒲红醒脑益智方显著增加 VD 大鼠穿越平台次数。

3.12 蒲红醒脑益智方对 VD 大鼠海马 CA1 区病理损伤的改善结果

大鼠海马 CA1 区经 HE 染色后，电镜下观察结果显示，假手术组的大鼠海马 CA1 区结构排列整齐、均匀并紧密，细胞数量多且核仁清晰可见。与假手术组相比，模型组出现了病理损伤，结构排列

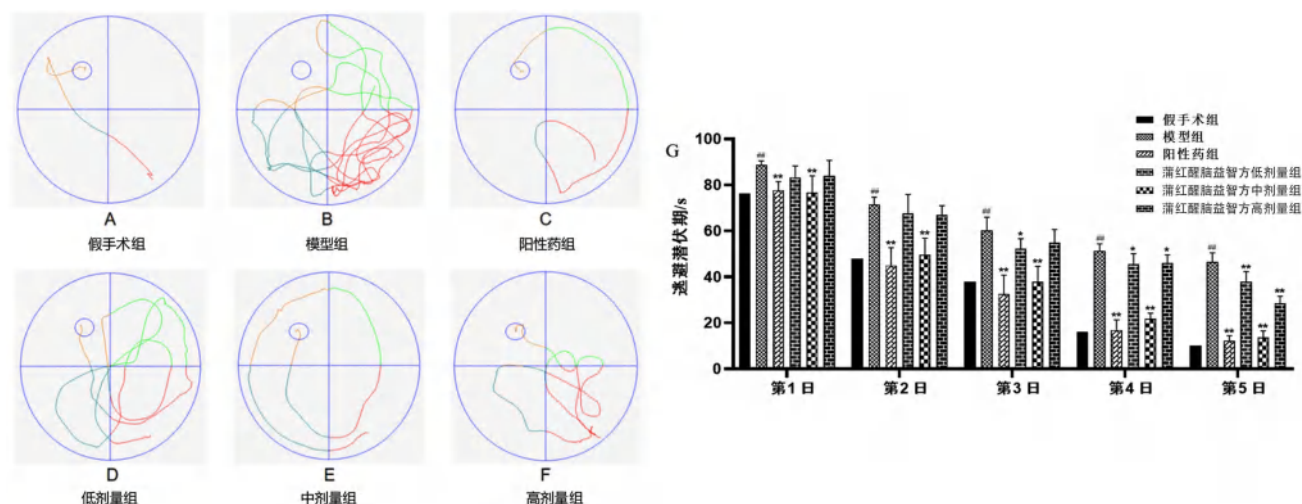


图 9 蒲红醒脑益智方对各组大鼠逃避潜伏期的影响 ($n = 6$)

Fig 9 Effect of Puhong Xingnao Yizhi formula on the latency of escape in rats of various groups ($n = 6$)

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

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

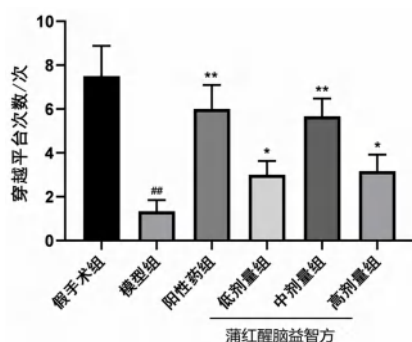


图 10 蒲红醒脑益智方对各组大鼠各时间段站台穿越次数的影响 ($n = 6$)

Fig 10 Effect of Puhong Xingnao Yizhi formula on the number of station traversals in each group of rats at each time period ($n = 6$)

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

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

紊乱且稀疏, 细胞间隙加大, 细胞数目减少, 核仁形态不清, 固缩成不规则形。与模型组相比, 经给药蒲红醒脑益智方治疗后各组大鼠海马 CA1 区病理形态有所改善, 结构排列较整齐, 疏松区域减少, 细胞核形态趋于正常 (见图 11)。提示蒲红醒脑益智方具有改善 VD 大鼠海马 CA1 区病理损伤作用。

3.13 蒲红醒脑益智方对 VD 大鼠海马组织中炎症因子的影响

与假手术组相比, 模型组海马组织中 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 水平明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 阳性药组和蒲红醒脑益智方低、中、高剂量组海马组织中 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 水平均明显降低 ($P < 0.01$), $IL-6$ 水平明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) (见图 12)。结果表明, 蒲红醒脑益智方能降低 VD 大鼠海马组织的炎症因子水平。

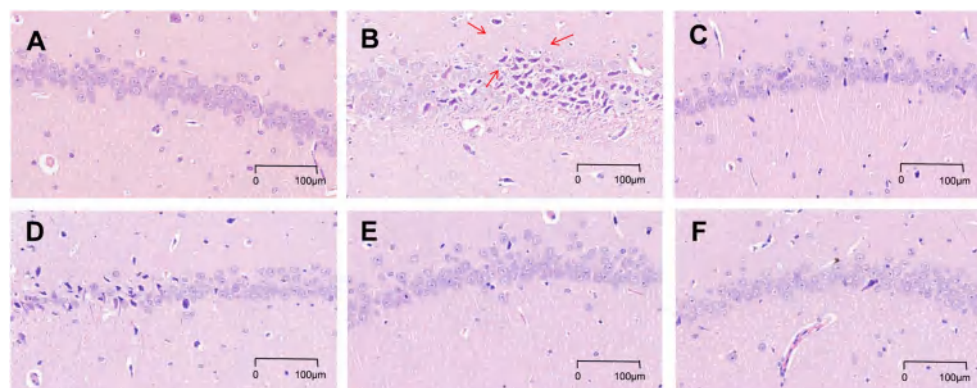


图 11 蒲红醒脑益智方对各组大鼠海马组织 CA1 区病理损伤的影响 ($\times 200$)

Fig 11 Effect of Puhong Xingnao Yizhi formula on pathological damage in CA1 region of hippocampal tissue of rats in various groups ($\times 200$)

A. 假手术组 (sham operation group); B. 模型组 (model group); C. 阳性药组 (positive drug group); D. 蒲红醒脑益智方低剂量组 (Puhong Xingnao Yizhi formula low-dose group); E. 蒲红醒脑益智方中剂量组 (Puhong Xingnao Yizhi formula medium-dose group); F. 蒲红醒脑益智方高剂量组 (Puhong Xingnao Yizhi formula high-dose group)

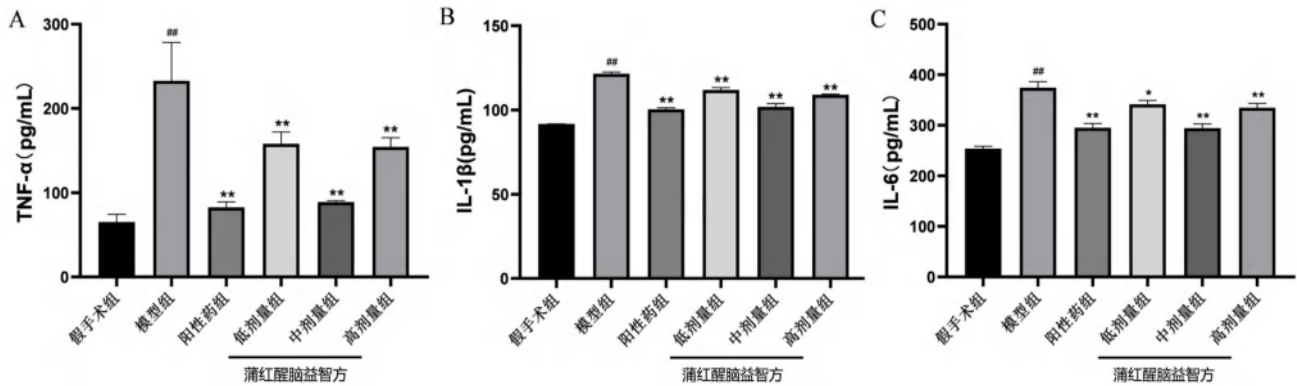


图 12 蒲红醒脑益智方对大鼠海马组织中炎症因子水平的影响 ($n = 6$)

Fig 12 Effect of Puhong Xingnao Yizhi formula on the levels of inflammatory factors in rat hippocampal tissue ($n = 6$)

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

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

3.14 蒲红醒脑益智方对 VD 大鼠海马组织中 SIRT1/NF-κB/p53 信号通路及凋亡相关蛋白表达的影响

与假手术组相比，模型组 NF-κB p65、p53、caspase-3、Bax 蛋白表达量显著上调，SIRT1、Bcl-2 蛋白表达量显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组相比，各给药组 NF-κB p65、p53、caspase-3、Bax 蛋白表达

量明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，SIRT1、Bcl-2 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) (见图 13)。提示蒲红醒脑益智方可以上调 VD 大鼠海马组织中 SIRT1 的表达水平，抑制 NF-κB p65、p53 的转录活性，并且调控凋亡相关蛋白的表达，从而减轻海马神经元的凋亡水平，延缓 VD 的病程进展。

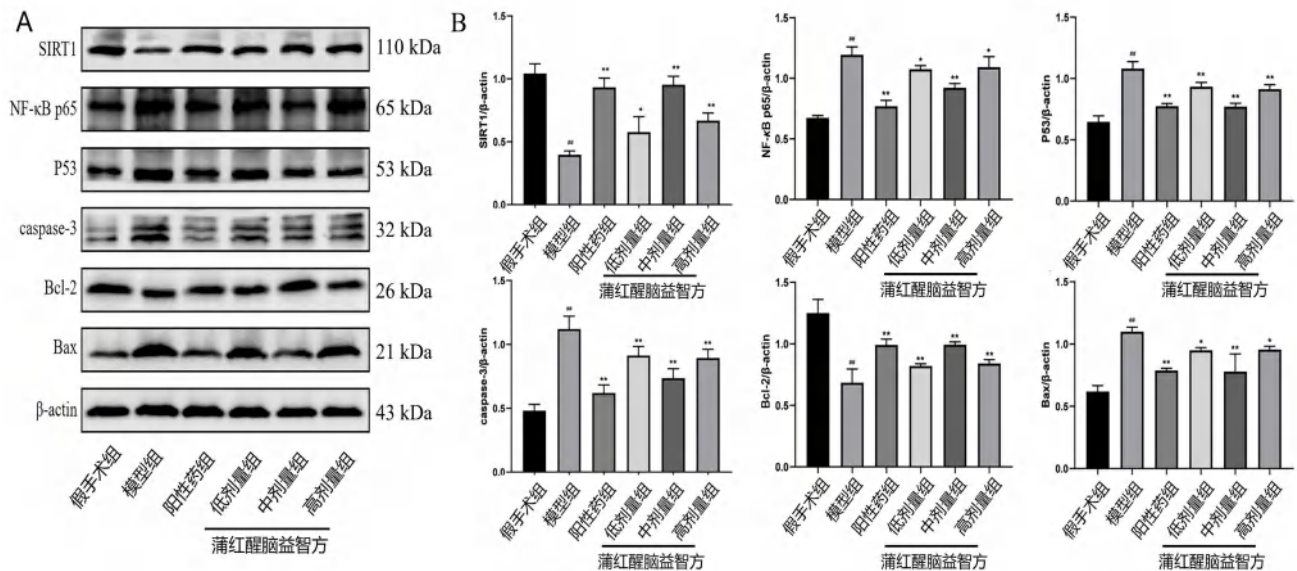


图 13 蒲红醒脑益智方对 VD 大鼠海马组织中 SIRT1、NF-κB p65、p53、caspase-3、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响 ($n = 6$)

Fig 13 Effect of Puhong Xingnao Yizhi formula on the expression of SIRT1, NF-κB p65, p53, caspase-3, Bax and Bcl-2 proteins in hippocampal tissues of VD rats ($n = 6$)

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

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

4 讨论

网络药理学结果显示，蒲红醒脑益智方的核心成分为槲皮素、β-谷甾醇、山柰酚、豆甾醇和木犀草素。槲皮素是一种黄酮类化合物，具有抗氧化、抗炎、免疫调节等作用^[9]，能激活 PINK1/Parkin 信号通路，缓解海马神经元炎症损伤，改

善 VD 大鼠的学习记忆功能^[10]。山柰酚所表现出的脑保护作用可能是通过调控 AKT、Src 蛋白的磷酸化水平实现的^[11]，还能调控 mTOR 信号通路，缓解神经元损伤^[12]。豆甾醇能调控 NF-κB 通路和 NLRP3 炎症小体进而直接调控神经炎症发挥缓解脑损伤的作用^[13]。β-谷甾醇能调控 Nr2f2/

HO-1 信号通路减轻氧化应激损伤,从而发挥保护神经元的作用^[14]。木犀草素是存在于多种植物中的一种天然黄酮类化合物^[15],可通过抑制免疫细胞激活、炎症介质释放、神经炎症而发挥神经保护作用,对脑损伤或神经退行性疾病具有治疗潜力^[16]。上述 5 个核心成分可能是蒲红醒脑益智方治疗 VD 的物质基础。

此外, PPI 结果显示, 蒲红醒脑益智方治疗 VD 的核心靶点包括 TP53 (p53)、Bcl-2、caspase-3、TNF、IL-6。SIRT1 在神经系统退行性疾病的发生发展过程中发挥重要作用^[17]。SIRT1 能抑制促凋亡相关蛋白 NF- κ B 的表达^[18], 还可以通过下调 p53 的乙酰化水平抑制 p53 转录依赖的凋亡过程^[19]。p53 在凋亡和细胞焦亡等相关通路中起关键调节作用^[20], 可以通过转录依赖性和转录非依赖性途径调控 Bcl-2 家族, 激活 Bax 等促凋亡基因的表达^[21]。Bax 的激活可以活化 caspase-3 的表达, 最终引发级联反应促进细胞凋亡^[22]。此外, 激活的 NF- κ B 蛋白会诱发急慢性炎症反应, 促进 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等炎症因子的释放, 加重神经元的损伤^[23]。实验结果表明, 蒲红醒脑益智方可以明显抑制 VD 大鼠海马组织中炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的水平; 抑制 VD 大鼠海马组织和谷氨酸诱导的 VD 细胞模型中 NF- κ B p65、p53、caspase-3、Bax 的蛋白表达量, 上调 SIRT1、Bcl-2 的蛋白表达水平; 提示蒲红醒脑益智方通过调控上述核心靶点的表达, 抑制炎症反应和神经元细胞凋亡, 发挥抗 VD 作用。

谷氨酸是哺乳动物脑内含量丰富的内源性神经递质, 与学习记忆过程息息相关^[24]。谷氨酸可以诱导神经毒性, 谷氨酸释放过多会引起突触间信息传递障碍, 导致凋亡通路的过度激活, 最终导致神经细胞死亡, 引发记忆功能障碍^[25]。VD 患者脑内谷氨酸浓度异常增高, 可引起兴奋性氨基酸毒性和突触可塑性改变, 导致 VD 发生^[26]。因此, 本研究选用谷氨酸诱导 HT22 细胞损伤构建 VD 细胞模型, 结果显示, 谷氨酸的细胞毒性能明显抑制 HT22 细胞增殖, 降低细胞存活率并诱导细胞凋亡, 经蒲红醒脑益智方干预治疗后, 细胞存活率及凋亡率明显改善。提示蒲红醒脑益智方能改善谷氨酸诱导的 HT22 细胞损伤, 降低细胞凋亡率, 提高细胞存活率。

研究表明, VD 的发病与慢性脑灌注不足、海马组织局部缺血密切相关^[27]。双侧颈总动脉永久性结扎法制备的 VD 模型高度符合人类 VD 的

发病特点, 结扎双侧颈总动脉后大鼠会出现脑血流量减少, 造成学习、记忆等障碍^[28-29]。Morris 水迷宫已经被广泛用于评估大鼠空间学习和记忆能力^[30]。本研究结果表明, 蒲红醒脑益智方能显著缩短 VD 大鼠的逃避潜伏期, 表明其可以显著提高 VD 大鼠的学习、记忆及认知能力。

综上所述, 本研究基于网络药理学技术及体内实验验证发现, 蒲红醒脑益智方能抑制海马神经元凋亡, 改善 VD 大鼠的认知功能障碍和海马 CA1 区病理损伤, 减轻海马组织中的炎症反应, 其作用机制可能与调控 SIRT1/NF- κ B/p53 信号通路及凋亡相关蛋白的表达有关。此研究为后续蒲红醒脑益智方治疗 VD 机制的深入研究提供了理论依据, 并为后续实验设计提供了新的思路 and 方向。

此外, 本研究存在一定局限性: 造模方法的特殊性导致造模期间有相当数量的大鼠死亡, 进而导致样本量相对较小; 蒲红醒脑益智方治疗 VD 涉及多种信号通路, 其余信号通路在 VD 发病机制中的作用还有待后续深入研究。

参考文献

- [1] Schneck MJ. Vascular dementia [J]. Top Stroke Rehabil, 2008, 15 (1): 22-26.
- [2] 高媛, 惠乐乐, 杨瑞林, 等. 基于 cAMP-PKA-CREB 信号通路中药防治血管性痴呆的研究进展 [J]. 中南药学, 2024, 22 (4): 1037-1041.
- [3] 陈欣悦, 边文超, 赵晴, 等. MAPK 信号通路在血管性痴呆中研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2023, 43 (5): 1267-1270.
- [4] Jia LF, Du YF, Chu L, et al. Prevalence, risk factors, and management of dementia and mild cognitive impairment in adults aged 60 years or older in China: a cross-sectional study [J]. Lancet Public Health, 2020, 5 (12): e661-e671.
- [5] Ellen CW, Helena CC. Vascular cognitive impairment and dementia [J]. Continuum (Minneapolis), 2022, 28 (3): 750-780.
- [6] Wimo A, Jönsson L, Bond J, et al. The worldwide economic impact of dementia 2010 [J]. Alzheimers Dement, 2013, 9 (1): 1-11.e3.
- [7] 姜林, 李彬, 臧运华, 等. 血管性痴呆的中西医研究进展 [J]. 湖北中医杂志, 2022, 44 (9): 62-66.
- [8] Giannopoulos S, Katsanos AH, Kosmidou M, et al. Statins and vascular dementia: a review [J]. J Alzheimers Dis, 2014, 42 (Suppl 3): S315-S320.
- [9] 王绍展, 王媛媛, 顾妍秋, 等. 槲皮素通过抑制 TGF- β /TAK1/JNK 和 TGF- β /Smad2 信号通路发挥抗肝纤维化的作用 [J]. 中南药学, 2022, 20 (5): 965-972.

- [10] 唐森, 方建, 高立功, 等. 基于 PINK1/Parkin 通路研究槲皮素减轻血管性痴呆大鼠海马神经元损伤的作用机制 [J]. 中草药, 2022, 53 (20): 6529-6535.
- [11] 徐芳琴, 郭超, 王婧雯. 山柰酚对脑缺血 / 再灌注损伤的体内外保护作用机制研究 [J]. 中国药房, 2022, 33 (17): 2065-2071.
- [12] 刘展, 蔡美云, 庄文欣, 等. 山柰酚通过 mTOR 通路诱导细胞自噬保护帕金森病模型小鼠多巴胺能神经元 [J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33 (4): 446-453.
- [13] 揭璠. 豆甾醇对阿尔茨海默病中神经炎症的潜在影响及调控机制研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2022.
- [14] 袁明洲, 袁欣欣, 林瑶, 等. β -谷甾醇对帕金森病模型大鼠脑氧化应激损伤及 Nrf2/HO-1 蛋白通路的影响 [J]. 福建中医药, 2024, 55 (3): 32-35.
- [15] 冯松林, 张涛, 冯凌, 等. 木犀草素对金葡菌颅内感染大鼠血脑屏障功能障碍的治疗作用及机制 [J]. 世界中医药, 2025, 20 (2): 216-222.
- [16] Kempuraj D, Thangavel R, Kempuraj DD, et al. Neuroprotective effects of flavone luteolin in neuroinflammation and neurotrauma [J]. Biofactors, 2021, 47 (2): 190-197.
- [17] 雷琦, 朱婷鸽, 何进伟, 等. 异钩藤碱对癫痫大鼠 SIRT1/p53/caspase-3 通路及海马神经元凋亡的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38 (18): 2205-2208.
- [18] Ji KH, Sun XH, Liu Y, et al. Regulation of apoptosis and radiation sensitization in lung cancer cells via the Sirt1/NF- κ B/smac pathway [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 48 (1): 304-316.
- [19] 贲涵芝, 邱丙全, 杨洋. SIRT1 调控其下游非组蛋白分子乙酰化修饰影响细胞凋亡的分子机制 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2021, 37 (10): 1281-1289.
- [20] 孙健, 白彩娟, 魏超君. 细胞死亡诱导 p53 靶蛋白 1—一种新型凋亡蛋白的功能研究进展 [J]. 国际检验医学杂志, 2023, 44 (17): 2155-2162.
- [21] Wei HD, Wang HL, Wang GX, et al. Structures of p53/BCL-2 complex suggest a mechanism for p53 to antagonize BCL-2 activity [J]. Nat Commun, 2023, 14 (1): 4300.
- [22] 吴佳明, 邓忠权, 朱奕, 等. MicroRNA-431-5p 在胃癌组织中低表达: 基于线粒体和 Bax/Bcl-2/caspase3 信号通路 [J]. 南方医科大学学报, 2023, 43 (4): 537-543.
- [23] 何轶帆, 唐娅妮, 崔艺敏, 等. 针灸防治血管性痴呆研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2024, 26 (1): 145-149.
- [24] Oo EM, Ruamyod K, Khawawisetsut L, et al. Germinated brown rice attenuates cell death in vascular cognitive impaired mice and glutamate-induced toxicity in HT22 cells [J]. J Agric Food Chem, 2020, 68 (18): 5093-5106.
- [25] 高风超, 陈翔, 田新英. 血管性痴呆危险因素及发病机制的研究进展 [J]. 医学综述, 2014, 20 (06): 1068-1071.
- [26] 吴佳慧, 刘剑刚, 李浩, 等. 阿尔茨海默病和血管性痴呆的病理机制及相关临床研究比较 [J]. 浙江医学, 2019, 41 (11): 1227-1231.
- [27] Yang T, Sun Y, Lu ZY, et al. The impact of cerebrovascular aging on vascular cognitive impairment and dementia [J]. Ageing Res Rev, 2017, 34: 15-29.
- [28] Du SQ, Wang XR, Xiao LY, et al. Molecular mechanisms of vascular dementia: what can be learned from animal models of chronic cerebral hypoperfusion? [J]. Mol Neurobiol, 2017, 54 (5): 3670-3682.
- [29] 彭晓燕, 万婷, 张丽丹, 等. 血管性痴呆大鼠模型的研究概述 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36 (2): 311-314.
- [30] Meenakshi PK, Mehrotra D, Nruthyathi N, et al. Novel measures of Morris water maze performance that use vector field maps to assess accuracy, uncertainty, and intention of navigational searches [J]. Hippocampus, 2022, 32 (4): 264-285.

(收稿日期: 2025-03-05; 修回日期: 2025-06-01)

基于 UPLC 指纹图谱及化学模式识别的 祛湿消脂颗粒质量评价

陈思迪^{1, 2, 3, 4}, 岳凤芹^{1, 2, 3}, 孙婉瑾^{2, 3}, 段雪云^{2, 3}, 周仲瑜^{2, 3}, 黄伟^{2, 3*} (1. 湖北中医药大学 药学院, 武汉 430065; 2. 湖北中医药大学附属医院/湖北省中医院/湖北省中医药研究院药事部, 武汉 430061; 3. 湖北时珍实验室, 武汉 430061; 4. 湖北省中西医结合医院药学部, 武汉 430015)

摘要: 目的 建立医疗机构制剂祛湿消脂颗粒超高效液相色谱 (UPLC) 指纹图谱, 为其质量控制提供依据。**方法** 采用 ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.1% 甲酸水溶液进行梯度洗脱, 进样量 3 μL, 柱温 30 ℃, 流速 0.2 mL/min, 检测波长 265 nm。运用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”分别对 10 批祛湿消脂颗粒的相似度进行评价; 通过化学模式识别方法寻找影响 10 批祛湿消脂颗粒的差异性成分。**结果** 建立了 10 批祛湿消脂颗粒的 UPLC 指纹图谱, 相似度在 0.885 ~ 0.966, 标定了 29 个共有峰, 并指认了其中 7 个成分, 分别为甘草苷、橙皮苷、党参炔苷、肉桂酸、荷叶碱、甘草酸铵、甘草次酸。进一步采用聚类分析 (CA) 将 10 批样品分为 3 类; 主成分分析 (PCA) 得出 6 个主成分, 累计贡献率为 95.016%, 表明 6 个主成分可代表样品的大部分信息; 正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 根据投影重要性指标进一步筛选出主要影响祛湿消脂颗粒间差异的 5 个成分峰。**结论** 指纹图谱、CA、PCA 和 OPLS-DA 相结合可全面评价祛湿消脂颗粒的质量, 此方法可为其质量控制提供依据。

关键词: 祛湿消脂颗粒; 超高效液相色谱; 指纹图谱; 化学模式识别

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)12-3514-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.008

Quality evaluation of Qushi Xiaozhi granules based on UPLC fingerprints and chemical pattern recognition

CHEN Sidi^{1, 2, 3, 4}, YUE Fengqin^{1, 2, 3}, SUN Wanjin^{2, 3}, DUAN Xueyun^{2, 3}, ZHOU Zhongyu^{2, 3}, HUANG Wei^{2, 3*} (1. College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430056; 2. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Hubei University of Chinese Medicine/Hubei Hospital of Traditional Chinese Medicine/Institute of Chinese Medicine, Hubei Academy of Chinese Medicine, Wuhan 430061; 3. Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430061; 4. Department of Pharmacy, Hubei Hospital of Integrated Chinese & Western Medicine, Wuhan 430015)

Abstract: Objective To establish the UPLC fingerprints of preparation Qushi Xiaozhi granules by medical institutions and to provide evidence for their quality control. **Methods** ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) column was used, gradient elution with acetonitrile-0.1% formic acid. The injection volume was 3 μL, the column temperature was 30 ℃, the flow rate was 0.2 mL/min, and the detection wavelength was 265 nm. The similarity of 10 batches of Qushi Xiaozhi granules was evaluated by “Traditional Chinese Medicine Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System (2012 edition)”. Chemical pattern recognition was used to determine the components affecting the 10 batches of Qushi Xiaozhi granules. **Results** The UPLC fingerprints of the 10 batches of Qushi Xiaozhi

基金项目: 湖北省自然科学基金联合项目 (No.2022CFD024); 湖北中医药大学 2023 年度“双一流”建设重点类专项科研项目 (No.2023ZZXT005); 湖北省中医药管理局中医药科研项目 (No.ZY2025Q040); 湖北省时珍人才工程项目 (鄂卫函〔2024〕256 号)。

作者简介: 陈思迪, 女, 硕士研究生, 主要从事中药制剂及新技术、新剂型、新材料研究, email: chenisdi@163.com * 通信作者: 黄伟, 男, 主任医师, 教授, 主要从事肥胖症的针药结合治疗及其临床研究, email: huangwei@hbhtcm.com

granules were established, and the similarity ranged between 0.885 and 0.966. Totally 29 common peaks and 7 components were identified, including liquiritin, hesperidin, lobetyolin, cinnamic acid, nuciferine, ammonium glycyrrhizinate, and glycyrrhetic acid. The 10 batches of samples were divided into three groups by cluster analysis. Six principal components were obtained by principal component analysis, and the cumulative contribution rate reached 95.016%, indicating that the 6 principal components could represent most of the information content of the sample. In partial least squares-discriminant analysis, according to the value of the projected importance index, 5 component peaks mainly affecting the difference between Qushi Xiaozhi granules were further screened. **Conclusion** The combination of fingerprints, cluster analysis, principal component analysis and partial least squares-discriminant analysis can comprehensively evaluate the quality of Qushi Xiaozhi granules, and provide evidence for their quality control.

Key words: Qushi Xiaozhi granule; UPLC; fingerprint; chemical pattern recognition

肥胖症是由多种因素引起的慢性代谢性疾病,世界卫生组织(WHO)将超重和肥胖定义为异常或过多的脂肪堆积,且达到损害健康的程度^[1]。肥胖给患者及社会带来了沉重的经济负担,因此早期干预肥胖、减少并发症具有重要意义^[2]。西方医学所称的肥胖症是单纯性肥胖,到目前为止,美国食品药品监督管理局批准的6种减肥药中,只有1种(奥利司他)在我国获准上市,远少于欧美市场上用于肥胖症的药品,无法满足临床用药的需要。肥胖的发病率呈上升趋势,其治疗手段亟须改进;单纯通过生活方式干预进行减肥,很难实现减肥的可持续目标^[3];虽然化学药物治疗的效果很好,但也有一定的不良反应;手术减重效果显著,持续时间长,但会产生各种各样的并发症,需要终身营养监测和补充营养素^[4]。因此,研发更加安全、有效的减肥药,具有重大的紧迫性和社会意义。

祖国传统医学认为,脾虚湿阻型肥胖症主要是由于饮食不节、情志失调、劳逸失度等导致脾胃运化功能失司,气血津液运行失常,以致水湿内阻形成肥胖,治疗需健脾益气、祛湿消脂^[5]。祛湿消脂方由第七批全国老中医专家学术经验继承工作指导老师周仲瑜教授团队探索脾虚湿阻型肥胖症病因病机,通过临床反复实践验证而成。该方具有健脾益气、祛湿消脂之功,适用于脾虚湿阻型肥胖症,症见形体肥胖,神疲乏力,身体沉重,肢体困倦,舌质淡胖,边有齿印,苔薄白或白腻,脉濡细或滑。祛湿消脂方共11味,其中党参性味甘平,具有补脾益气生津的功效;茯苓性味甘淡平,具有健脾渗湿的作用;麸炒白术性味甘苦温,具有补气健脾燥湿之功。诸药合用,共奏健脾益气、祛湿消脂之功。

祛湿消脂方组方合理,具有前期临床基础,效果显著,遂将该方研发为医疗机构制剂,推广到临床广泛使用。为了更好地控制其质量,本研究拟建立祛湿消脂颗粒UPLC指纹图谱,同时结合相似度评价及化学模式识别^[6],为祛湿消脂颗粒的质量评价提供依据。

1 材料

1.1 仪器

Wayeal 3600 超高效液相色谱仪(安徽皖仪科技股份有限公司);AS220.R2 万分之一分析天平(美国奥豪斯公司);ES225M-DR 十万分之一分析天平(瑞士Precisa公司)。

1.2 试药

甘草苷(批号:111610-202209)、肉桂酸(批号:110786-202305)、荷叶碱(批号:111566-201907)、甘草酸铵(批号:110731-202122)、甘草次酸(批号:110723-202316)(中国食品药品检定研究院);党参炔苷(批号:B20283)、橙皮苷(批号:B20182)(上海源叶生物科技有限公司);甲醇、乙腈均为色谱纯。10批祛湿消脂颗粒均由湖北省中医院制剂中心提供(批号依次为20231201~20231210,对应编号为S1~S10)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱 ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm);流动相乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B);进样量3 μL;流速0.2 mL/min;柱温30℃;检测波长265 nm;梯度洗脱:0~5 min, 15%A;5~20 min, 15%→20%A;20~30 min, 20%→24%A;30~45 min, 24%→35%A;45~60 min, 35%→65%A;60~61 min, 65%→15%A。

2.2 溶液的准备

2.2.1 对照品溶液 精密称取对照品甘草苷、橙皮苷、党参炔苷、肉桂酸、荷叶碱、甘草铵、甘草次酸适量，加甲醇制成质量浓度分别为 52.00、12.94、6.53、0.79、21.90、25.38、12.10 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

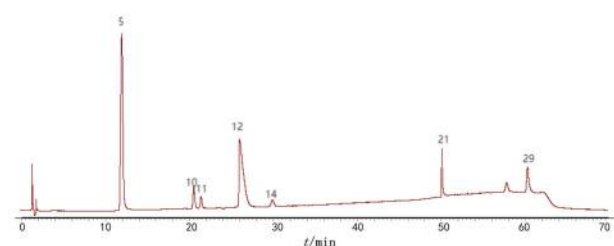
2.2.2 供试品溶液 取祛湿消脂颗粒适量，研细，精密称取 5 g，置于具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 25 mL，称定重量，超声（功率 400 W，频率 45 kHz）处理 20 min，放冷后再称重，甲醇补足减失的重量，滤过，滤液以 0.22 μm 的微孔滤膜过滤，即得。

2.2.3 单味饮片供试品溶液 按处方比例分别称取 11 个单味饮片，再按祛湿消脂颗粒的制备工艺进行制粒，取各单味饮片颗粒按“2.2.2”项下方法进行制备，即得单味饮片供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性 分别取“2.2.1”项下混合对照品溶液和“2.2.2”项下祛湿消脂颗粒供试品溶液各 3 μL ，按“2.1”项下色谱条件测定，结果显示甘草苷、橙皮苷、党参炔苷、肉桂酸、荷叶碱、甘草铵、甘草次酸色谱峰峰形良好，如图 1 所示。

A



B

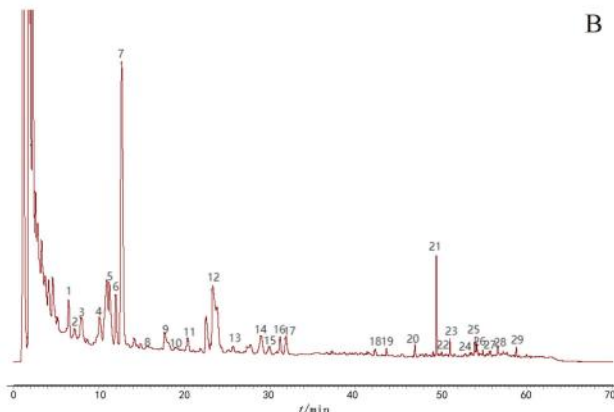


图 1 混合对照品 (A) 和供试品 (B) UPLC 图

Fig 1 UPLC chromatograms of mixed reference standards (A) and test sample (B)

5. 甘草苷 (liquiritin); 10. 橙皮苷 (hesperidin); 11. 党参炔苷 (lobetyolin); 12. 荷叶碱 (nuciferine); 14. 肉桂酸 (cinnamic acid); 21. 甘草铵 (ammonium glycyrrhizinate); 29. 甘草次酸 (glycyrrhetic acid)

2.3.2 精密度 取祛湿消脂颗粒 (S1)，按“2.2.2”项下制备供试品溶液，连续进样 6 次，所得色谱峰中 14 号峰峰形和分离度较好，确定其为参照峰，计算得各共有峰相对保留时间 RSD 均在 0.10% 以下，相对峰面积 RSD 均在 4.8% 以下，表明仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性 取祛湿消脂颗粒 (S1)，按“2.2.2”项下制备供试品溶液，在 0、2、4、8、12、24 h 时进样测定，以 14 号峰为参照峰，计算得各共有峰相对保留时间 RSD 均在 0.10% 以下，相对峰面积 RSD 均在 4.8% 以下，表明 24 h 内供试品溶液较稳定。

2.3.4 重复性 取祛湿消脂颗粒 (S1)，按“2.2.2”项下制备供试品溶液，进样测定，以 14 号峰为参照峰，计算得各共有峰相对保留时间 RSD 均在 2.3% 以下，相对峰面积 RSD 均在 4.7% 以下，表明本方法重复性良好。

2.4 祛湿消脂颗粒指纹图谱的建立

分别取 10 批颗粒，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，进样检测，将所得色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”，设置 S1 为参照图谱，采用中位数法生成对照指纹图谱，时间窗 0.1，多点校正后进行全谱峰匹配，得 10 批祛湿消脂颗粒的指纹图谱和对照指纹图谱，见图 2、3。共确定了 29 个共有峰，并指认了 7 个成分，分别为 5 号峰甘草苷、10 号峰橙皮苷、11 号峰党参炔苷、12 号峰荷叶碱、14 号峰肉桂酸、21 号峰甘草铵、29 号峰甘草次酸。指纹图谱相似度分别为 0.957、0.925、0.934、0.934、0.931、0.885、0.963、0.965、0.952、0.966，表明 10 批样品各批次之间相似度较高。

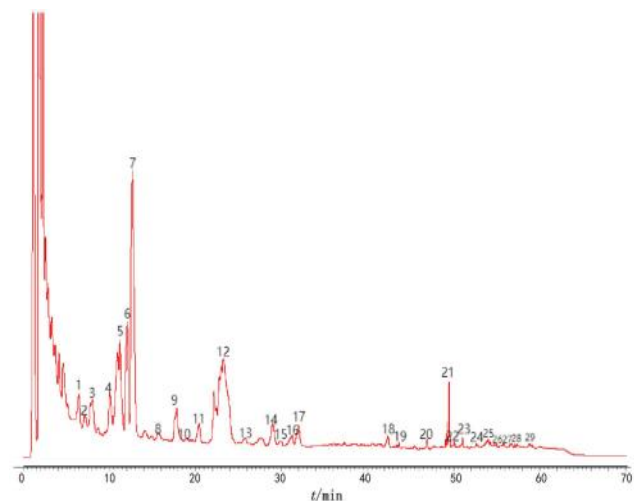


图 2 祛湿消脂颗粒的对照指纹图谱

Fig 2 Control fingerprint of Qushi Xiaozhi granules

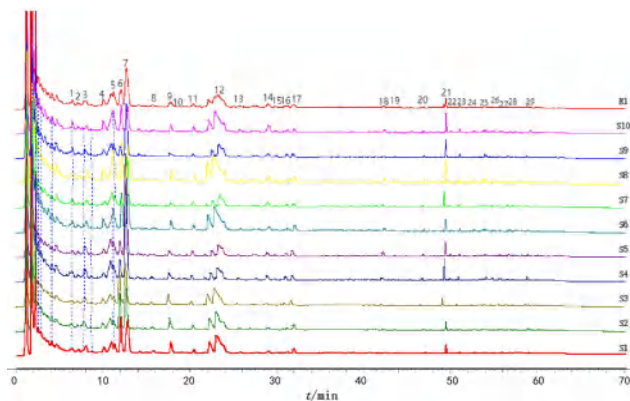


表 2 主成分因子载荷矩阵
Tab 2 Principal component factor load matrix

峰号	因子 1	因子 2	因子 3	因子 4	因子 5	因子 6	峰号	因子 1	因子 2	因子 3	因子 4	因子 5	因子 6
1	0.861						16						0.945
2	0.599	0.713					17						- 0.803
3					0.504		18	0.604		0.587	0.502		
4	0.720						19	0.960					
5 (甘草苷)	0.699						20	0.930					
6		0.951					21 (甘草酸铵)	0.900					
7				0.787			22			0.951			
8		0.699					23	0.950					
9		0.972					24	0.740				- 0.544	
10 (橙皮苷)		0.687					25	0.948					
11 (党参炔苷)	0.504		0.689				26	0.895					
12 (荷叶碱)		0.888					27					0.878	
13			- 0.643	0.539			28	0.802					
14 (肉桂酸)	0.581		0.598				29 (甘草次酸)			0.909			
15		0.506				0.816							

表 3 10 批祛湿消脂颗粒的主成分因子得分及排序
Tab 3 Principal component factor scores and ranking of 10 batches of Qushi Xiaozhi granules

	成分 1	成分 2	成分 3	成分 4	成分 5	成分 6	综合评分	排名
S1	- 0.9722	1.2508	- 0.4395	- 0.4165	0.5591	- 1.2309	- 0.2544	7
S2	- 0.9119	0.5898	- 0.1044	0.0166	0.2129	2.5995	0.0408	4
S3	- 1.1498	0.5393	- 0.4669	- 0.4817	- 0.0652	- 0.7036	- 0.4875	10
S4	1.3523	- 0.1160	- 1.2978	0.7891	1.9082	0.0082	0.5452	2
S5	- 0.5914	- 0.9323	1.0015	2.1370	- 0.1858	- 0.3716	- 0.0839	6
S6	0.1358	0.5094	- 0.5512	0.6580	- 1.6218	- 0.1399	- 0.0147	5
S7	- 0.6262	- 1.3585	0.5863	- 0.4952	0.5504	- 0.2464	- 0.4506	9
S8	1.6221	1.3564	1.2684	0.0295	- 0.4587	- 0.0542	0.9953	1
S9	0.6928	- 1.2927	- 1.3462	- 0.7836	- 1.2905	0.0988	- 0.4062	8
S10	0.4483	- 0.5462	1.3498	- 1.4532	0.3913	0.0399	0.1161	3

成分。由图 6 可知，VIP 值 > 1 的共有峰共有 5 个，从大到小分别为 5 号峰（甘草苷）、7 号峰、12 号峰（荷叶碱）、6 号峰、4 号峰，这些可能是影响组间差异的关键成分。

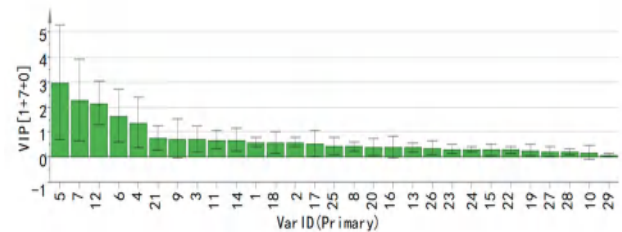


图 6 10 批祛湿消脂颗粒的 VIP 值图
Fig 6 VIP value diagram of 10 batches of Qushi Xiaozhi granules

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

曾分别考察不同提取溶剂（50% 甲醇、70% 甲醇、甲醇），提取方法（超声、回流），提取时间（20、30、40 min），取样量（1、3、5 g），柱温（25、30、35 ℃），流动相（乙腈 -0.2% 磷酸水、

乙腈 -0.1% 甲酸水溶液），检测波长（265、260、254 nm）对色谱的影响^[7-12]，结果显示提取溶剂、方法、时间对色谱图影响较小，为方便和节省能源，最终确定甲醇超声 20 min 为宜；取样量为 5 g 时色谱峰峰形较好，峰面积大小较适；柱温对出峰时间稍有影响但变化不大，最终选择柱温为 30 ℃；流动相为乙腈 -0.1% 甲酸水溶液时分离度较好，出峰数较多；检测波长为 265 nm 时，色谱峰响应较高，最终确定文中的色谱条件。

3.2 指纹图谱相似度评价分析

在中药煎煮过程中，药效成分间发生了复杂的化学反应，不仅表现在单味药的不同类型化学成分间的反应，而且也表现在中药复方间众多未知的关键中药煎煮反应^[13]。指纹图谱技术具有特征性强、整体性和模糊性的特点，可从整体上全面评价中药之间的相似性。本研究考察了样品制备方法、流动相比比例、柱温及检测波长，建立了祛湿消脂颗粒的指纹图谱分析方法。所建立方法

的重复性、精密度和稳定性的 *RSD* 值均符合要求,表明该方法稳定性较好。

通过中药色谱指纹图谱相似度评价系统所得 10 批指纹图谱相似度均在 0.885 ~ 0.966,表明不同产地和来源的药材质量差异较小,配制工艺稳定;指纹图谱标定的 29 个共有峰中指认了 7 个主要特征成分,其中党参炔苷为君药党参的指标性成分^[14],可作为党参的含量测定指标^[15-17];从单味药材色谱峰可知,另外两味君药麸炒白术、茯苓所贡献的色谱峰较少,一方面可能是因为样品制备过程中无法成功提取^[18-19],另一方面可能是有些成分在颗粒制备过程中被分解或转化^[20],目前《中国药典》中也只有其醇溶性浸出物的规定,还未有化学成分的质量控制标准;通过 OPLS-DA 结果可知,在影响组间差异的 5 个关键成分中,峰 7、6、4 的化学成分尚未明确,前期曾采用 LC-MS 对祛湿消脂颗粒进行成分鉴定,但缺少对照品和数据库进行比对,未确定出其化学成分,后续将继续对以上成分进一步研究。其余两个峰甘草苷和荷叶碱是影响祛湿消脂颗粒批次间差异的另外两个关键成分。有研究证明荷叶碱能够在肥胖小鼠模型的肝脏与脂肪组织中通过抑制脂肪合成、调节葡萄糖转运发挥减肥和改善胰岛素敏感性作用^[21-23],表明其作为整体质量控制的指标是较为合理的。

指纹图谱是一种评价中药真实性、稳定性、有效性的可行模式,在中药质量控制领域被广泛应用^[24]。中药成分众多且复杂,仅凭一种或几种化学成分不足以表明其整体质量,本研究建立的祛湿消脂颗粒 UPLC 指纹图谱方法操作简便,重复性好,可为祛湿消脂颗粒的整体质量评价提供参考。后续研究将深入分析祛湿消脂颗粒中的未知成分,为临床使用提供更为全面的科学依据。

参考文献

- [1] Camacho S, Ruppel A. Is the calorie concept a real solution to the obesity epidemic? [J]. *Global Health Action*, 2017, 10 (1): 1289650.
- [2] 宋昌梅, 杲春阳, 付燕来, 等. 肥胖中医研究进展 [J]. *现代中医药*, 2021, 41 (3): 6-9.
- [3] 覃湛玉, 刘佳瑞, 郑瑞茂. 肥胖治疗的研究进展 [J]. *生理科学进展*, 2020, 51 (3): 167-173.
- [4] 曲伸 2016. 美国临床内分泌医师学会肥胖治疗指南的解析和探讨 [J]. *中华内分泌杂志*, 2017, 33 (3): 190-193.
- [5] 叶薇. 中药加味温胆汤治疗小儿单纯性肥胖效果分析 [J]. *中外医疗*, 2020, 39 (4): 152-154.
- [6] 陈倩萍, 谢琦, 党蕊, 等. 基于超高效液相色谱指纹图谱和含量测定的党参和蜜麸炒党参配方颗粒质量评价 [J]. *上海中医药杂志*, 2022, 56 (7): 83-88.
- [7] 庞维荣, 双少敏, 刘养清. RP-HPLC 法测定党参内酯和党参炔苷的含量及相关性研究 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2008, 3 (2): 89-91.
- [8] 刘荣华, 殷茜茜, 孟晓伟, 等. 基于 HPLC 指纹图谱和多成分含量测定的降香质量评价研究 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47 (4): 959-966.
- [9] 黄娜娜, 李俊, 普俊学, 等. 党参 HPLC 指纹图谱结合多种化学模式识别研究 [J]. *中国现代应用药学*, 2022, 39 (16): 2103-2111.
- [10] 范成太, 闫克里, 赵丽, 等. 高效液相色谱法测定降脂宁颗粒中药材荷叶中荷叶碱的含量 [J]. *中国药物与临床*, 2007, 7 (12): 950-951.
- [11] 李梦杰, 刘苏珍, 周斌, 等. RP-HPLC 法同时测定荷叶颗粒中 3 种有效成分的含量 [J]. *中国药房*, 2016, 27 (18): 2532-2534.
- [12] 白桦芳, 针涛, 王宏进, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定归脾丸中 14 种成分 [J]. *中成药*, 2023, 45 (7): 2138-2144.
- [13] 赖长江生, 陈泽炎, 邱子栋, 等. 中药煎煮的化学反应机制研究现状 [J]. *中国中药杂志*, 2023, 48 (4): 890-899.
- [14] 边惠琴, 武晓玉, 夏鹏飞, 等. 党参的研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. *华西药学杂志*, 2022, 37 (3): 337-344.
- [15] 兰晓燕, 周利, 李翔, 等. 党参的研究进展及其质量标志物的预测分析 [J]. *中国中药杂志*, 2023, 48 (8): 2020-2040.
- [16] Liu W, Lv X, Huang WH, et al. Characterization and hypoglycemic effect of a neutral polysaccharide extracted from the residue of *Codonopsis Pilosula* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 197: 215-226.
- [17] 姜奇瑶, 刘臣臣, 陈惠玲, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 和 UPLC 的六君子汤化学成分定性与定量分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30 (6): 169-178.
- [18] 叶青, 刘东升, 王兰霞, 等. 茯苓化学成分、药理作用及质量控制研究进展 [J]. *中医药信息*, 2023, 40 (2): 75-79.
- [19] Li BQ, Li XK, Lin Y, et al. Development and validation of ultra-high performance supercritical fluid chromatography method for quantitative determination of six compounds in Guizhi Fuling capsule and tablet samples [J]. *J Sep Sci*, 2021, 44 (17): 3199-3207.
- [20] 赵玉娇, 徐文慧, 沈小丽, 等. 白术中内酯类成分的 TLC 鉴别与 UPLC 含量测定 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42 (3): 531-535.
- [21] Yu Y, Lu J, Sun L, et al. Akkermansia muciniphila: A potential novel mechanism of nuciferine to improve hyperlipidemia [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133: 111014.
- [22] 许瀚元. 荷叶碱在预防肥胖和减肥中的作用及其机制的研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2023.
- [23] 潘秋, 张志清, 田聪阳, 等. 基于网络药理学分析荷叶调脂的有效成分及药理作用 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36 (6): 3195-3200.
- [24] 刘主洁, 张伟, 顾利红, 等. 基于聚类分析及主成分分析的猴耳环消炎颗粒指纹图谱研究 [J]. *今日药学*, 2020, 30 (9): 608-611.

(收稿日期: 2025-03-03; 修回日期: 2025-05-06)

毛囊靶向纳米制剂的制备及离体渗透评价

包凌云^{1, 2, 3}, 冯向阳^{1, 2, 3}, 陈千千^{1, 2, 3}, 叶田田^{4*}, 杨瑞^{5*}, 王淑君^{4*} (1.江西中医药大学药学院, 南昌 330000; 2.江苏艾迪纳米生物医药有限公司制剂部, 江苏 南通 226133; 3.南通市海门长三角药物高等研究院, 江苏 南通 226133; 4.沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016; 5.辽宁中医药大学附属第二医院, 沈阳 110034)

摘要: **目的** 制备米诺地尔脂质体, 并对其离体皮肤渗透行为进行评价。**方法** 采用液相色谱建立米诺地尔含量测定的方法; 采用微柱离心技术建立米诺地尔脂质体包封率的检测方法。结合单因素考察和响应面分析法对关键工艺参数进行系统优化, 并对其粒径、多分散指数(PDI)和 Zeta 电位进行表征; Franz 扩散池模型评估米诺地尔脂质体的离体皮肤渗透行为和皮肤滞留性。**结果** 建立了高效液相色谱方法测定米诺地尔含量、微柱离心法测定脂质体包封率, 结果均符合测定要求。工艺优化最佳组方参数: 大豆卵磷脂与主药质量比为 22.37:1、磷脂与胆固醇比例为 7.82:1、旋转蒸发温度为 50.3℃。响应面分析结果与预测值相对误差小于 3%, 粒径 (99.19±4.8) nm、PDI (0.559±0.007)、Zeta 电位 (−29.166±2.26) mV。与米诺地尔酊剂相比, 米诺地尔脂质体 48 h 的累积透皮量更高, 且皮肤滞留量更多。**结论** 将米诺地尔制备成脂质体, 既能够提高其透皮渗透的效果, 又能够达到缓释的目的。

关键词: 雄激素性脱发; 米诺地尔; 毛囊靶向; 皮肤渗透

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)12-3520-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.009

Preparation of follicle-targeted nano-formulations and their ex vivo penetration

BAO Lingyun^{1, 2, 3}, FENG Xiangyang^{1, 2, 3}, CHEN Qianqian^{1, 2, 3}, YE Tiantian^{4*}, YANG Rui^{5*}, WANG Shujun^{4*} (1. School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330000; 2. Preparation Department, Jiangsu Aidi Nano Bio-Pharmaceutical Co., Ltd., Nantong Jiangsu 226133; 3. Haimen Yangtze River Delta Institute of Pharmaceutical Higher Research, Nantong Jiangsu 226133; 4. School of Pharmaceutical Sciences, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016; 5. The Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110034)

Abstract: Objective To prepare minoxidil liposomes and evaluate their ex vivo skin permeation. **Methods** Liquid chromatography method was developed for the quantification of minoxidil, while microcolumn centrifugation technique was used to determine the encapsulation efficiency of minoxidil liposomes. The key process parameters were systematically optimized by combining one-factor experiment and response surface analysis. The particle size, PDI and Zeta potential were characterised; Franz diffusion cell model was used to assess the ex vivo skin permeation behavior and skin retention of minoxidil liposomes. **Results** HPLC method was established to determine the content of minoxidil, and a microcolumn centrifugation method was established to determine the liposome efficiency. The best composition parameters for process optimization were 22.37:1 for mass ratio of soy lecithin to the main drugs, 7.82:1 for phospholipid to cholesterol ratio, and rotary evaporation temperature at 50.3℃. The relative error of response surface analysis to predicted values was less than 3% for particle size (99.19±4.8) nm, PDI (0.559±0.007), and Zeta potential (−

基金项目: 辽宁省教育厅基本科研项目 (No.JYTMS20231357)。

作者简介: 包凌云, 男, 硕士, 主要从事药剂学研究, email: 2585552751@qq.com *通信作者: 王淑君, 女, 教授, 博士研究生导师, 主要从事药剂学、药代动力学研究工作, email: 1252116911@qq.com; 杨瑞, 女, 研究员, 主要从事药剂学、药代动力学研究工作, email: yang_rui1983@163.com; 叶田田, 女, 副教授, 主要从事药剂学与工业药剂学研究, email: 729587208@qq.com

29.166±2.26) mV. The cumulative transdermal amount of minoxidil liposomes at 48 h was higher and the skin retention was more than that of minoxidil tincture. **Conclusion** The formulation of minoxidil into liposomes improves transdermal penetration and provides a sustained release effect.

Key words: androgenetic alopecia; minoxidil; follicle targeting; skin penetration

雄激素性脱发 (androgenic alopecia, AGA), 既往称为脂溢性脱发、男性秃或早秃, 是一种于青春期及之后发病、可致毛发进行性减少的疾病。近年来, AGA 普遍被认为是一种雄激素依赖的遗传性疾病, 在我国男女患病率分别约为 21.3% 与 6.0%^[1]。AGA 发病率呈逐年上升态势, 且对患者心理健康产生明显影响, 探寻行之有效的治疗策略已成为医学界的关键议题。在美国食品药品监督管理局 (FDA) 认证的治疗方案里, 仅有米诺地尔 (MDX) 和非那雄胺 (口服制剂) 这两种药物获批用于 AGA 的规范化治疗^[2]。

MDX 酊获得了国家药品监督管理局的批准, 由于其在溶解方面有特殊需求, 处方中添加了丙二醇^[3-4]。然而, 丙二醇的添加会刺激头皮, 给患者带来一些不良影响, 包括头皮瘙痒、发红、脱屑等症状, 从而影响患者的使用体验^[5]。因此, 关于如何使用 MDX 治疗脱发, 增强 MDX 的生物相容性及生物降解性, 增加滞留效应 (EPR), 减少不良反应等方面的研究是非常有价值的。

脂质体作为一种纳米级递送系统, 由类脂质双分子膜包裹药物而成, 因具备出色的生物相容性、可降解特性以及低毒副作用, 现已成为医药领域的重要载体技术^[6-7]。脂质体结构基础为磷脂与胆固醇构成的双分子层, 能够同时负载亲水性和疏水性药物^[8], 并可通过优化药物的物理化学性质, 突破皮肤屏障的限制。该技术在经皮给药领域表现出显著优势, 能增强药物对角质层的渗透能力, 既能降低系统性暴露风险, 又能突破传统透皮技术的多重屏障, 因而成为当前药剂学研究的重点方向^[9]。故本研究旨在以脂质体作为传递 MDX 的载体用于经皮给药治疗脱发疾病, 并对其离体皮肤渗透行为进行评价。

1 材料

1.1 仪器

PX85Z 型分析天平 (常州奥豪斯); YRE-2000E 旋转蒸发仪、DF-101S 型集热式磁力搅拌器 (巩义予华); TDZ4K 型离心机 (湖南湘仪); SCIENCETZ-E 型超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物); UV-2550 型紫外分光光度计、LC-20AT 型高效液相色谱仪 (日本岛津); Digi-MIN-001 型

荧光分子成像仪 (北京数字精准医疗); FJ200-SH 型数显高速分散均质机 (上海标本模型厂)。

1.2 试药

MDX 原料药 (中山万汉制药, 批号: 6232402103); 大豆卵磷脂 (德国利宝益公司, 批号: 579010); 胆固醇 (批号: C12398357)、葡聚糖凝胶 G-50 (批号: C12585657) (上海麦克林生化科技); 甲醇 (批号: 20230814)、乙醇 (批号: P3081552)、油酸 (批号: 20210319)、卡波姆 940 (批号: 20210522)、无水氯化钠 (批号: 20210413)、氯化钾 (批号: 20210904)、磷酸氢二钠 (批号: 20210508) (国药集团化学试剂有限公司); 大豆油 (上海阿拉丁试剂, 批号: S110244); 吲哚菁绿 (自制, 批号: 20221126)。

1.3 实验动物

健康的 ICR 小鼠, 体重 20 ~ 30 g, 在温度 18 ~ 22 °C 和湿度 50% ~ 60% 环境下饲养 [百奥赛图江苏基因生物技术有限公司, 许可证号: sYXK (苏) 2022-0046]。

2 方法与结果

2.1 MDX 含量测定方法建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Phenomenex Luna C18 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-纯水 (450:550, V/V); 检测波长: 228 nm; 柱温: 35 °C; 流速: 0.8 mL·min⁻¹; 进样时间: 13 min; 进样体积: 10 μL。

2.1.2 溶液的配制

① 空白溶液: 甲醇, 0.22 μm 滤膜过滤即得。

② 对照品溶液: 精密称取 MDX 10.12 mg 于 100 mL 量瓶中, 加入甲醇稀释并定容至刻度, 摇匀, 制成 101.2 μg·mL⁻¹ 的对照品溶液, 过 0.22 μm 滤膜过滤即得。

③ 供试品溶液: 精密称取 MDX 10.08 mg、胆固醇 25.06 mg、大豆卵磷脂 200.29 mg 置于茄形瓶中, 加入 10 mL 无水乙醇超声至固体全部溶解, 50 °C 减压旋转蒸干有机溶剂, 得到薄膜状固体; 加入 50 °C 的 10 mL 纯水, 缓慢旋转水化; 置于冷水浴中 300 W 探头超声 10 min, 用 0.22 μm 滤膜过滤, 即得米诺地尔脂质体 (MDX-LIP)。取 5 mL

MDX-LIP 置于 50 mL 量瓶, 加入甲醇超声破乳后, 继续用甲醇定容, 即得 MDX-LIP 供试品溶液。

④ 空白辅料溶液: 精密称取胆固醇 25.41 mg、大豆卵磷脂 200.04 mg 置于茄形瓶中, 其余同供试品溶液制备方法。

2.1.3 专属性 分别取“2.1.2”项下配制的空白溶

液、空白辅料溶液、供试品溶液、对照品溶液 1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度。进样测定, 记录色谱图及保留时间。结果可知, 供试溶液和对照溶液中 MDX 的出峰时间基本一致, 且空白辅料溶液在 MDX 出峰位置无干扰, 表明该方法专属性良好 (见图 1)。

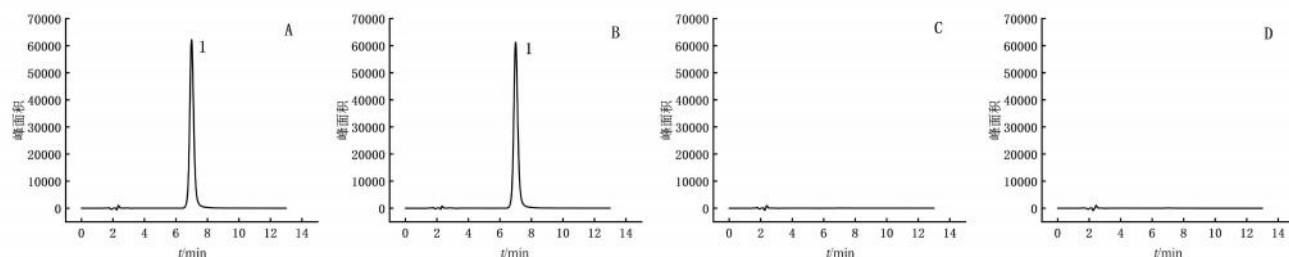


图 1 专属性试验色谱图

Fig 1 Chromatogram of specific test

A. 对照品溶液 (reference solution); B. 供试品溶液 (test solution); C. 空白辅料溶液 (blank excipient solution); D. 空白溶液 (blank solution); 1. 米诺地尔 (minoxidil)

2.1.4 仪器精密度 取“2.1.2”项下配制的对照品溶液适量, 连续进样 6 次, 记录峰面积和保留时间。测得保留时间、峰面积的 *RSD* 分别为 0.15%、1.5%, 表明该仪器精密度良好。

2.1.5 线性 分别精密量取“2.1.2”项下配制的对照品溶液 0.5、0.8、1.0、1.2、1.5 mL 于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释并定容至刻度, 记录峰面积。以 MDX 的质量浓度为横坐标 (X), MDX 的峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线。回归方程为: $Y = 1.22 \times 10^5 X - 6.81 \times 10^4$ ($R^2 = 0.9992$)。结果表明 MDX 在 $5.16 \sim 15.48 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与峰面积内线性关系良好。

2.1.6 回收率 精密称取原料药适量, 配制成相当于主药测定浓度的 80%、100%、120% 的样品各 3 份, 再精密称定空白脂质体适量, 混匀后, 进行测定, 记录峰面积。结果 80%、100%、120% 浓度 MDX 样品平均回收率均在 98% ~ 101% 内, *RSD* 分别为 0.41%、0.79%、0.37%, 表明样品含量测定的回收率良好, 符合测定要求。

2.2 MDX-LIP 封装率的测定

以薄膜分散法^[10]制备 MDX-LIP。原理是基于脂质在有机溶剂中的溶解性以及在水溶液中的自组装特性。胆固醇和大豆卵磷脂在脂质体中分别发挥结构稳定和功能活性的作用, 两者的协同作用使脂质体兼具药物递送效率和生理相容性。

2.2.1 凝胶柱制备 称取 1 g 葡聚糖凝胶 G-50, 添加 20 mL 纯水, 于室温条件下溶胀 24 h。在 2.5 cm 针管底部铺设一层棉花, 将溶胀完毕的凝胶进行上样操

作, 以 $2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 2 min, 观察凝胶柱状态, 重复操作直至获得均匀且无开裂现象的凝胶柱。

2.2.2 洗脱参数调整与流程 为区分 MDX-LIP 和游离 MDX 溶液的洗脱时间, 对葡聚糖凝胶柱柱高、MDX-LIP 和游离 MDX 溶液上样量、离心速度以及离心时间等参数予以调整。最终确定的洗脱参数为: 柱高为 1.5 cm、上样量为 0.2 mL、离心速度为 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、离心时间为 3 min、洗脱液为 0.2 mL 纯水。

2.2.3 游离 MDX 溶液和 MDX-LIP 洗脱曲线的绘制 分别精密量取 0.2 mL 游离 MDX 溶液和 MDX-LIP 加于葡聚糖 G-50 柱顶端, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min, 加洗脱液 0.2 mL 后 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min, 收集洗脱液于 5 mL 量瓶中, 用甲醇破乳超声溶解, 并定容至刻度, 在 228 nm 下测定吸光度, 并绘制游离 MDX 溶液和 MDX-LIP 的洗脱曲线。由图 2 可知, 脂质体能与游离药物在该分离条件下可以很好地分离。所以最佳收集方案是前 1 ~ 4 管为脂质体部分, 11 ~ 19 管为游离药物部分。

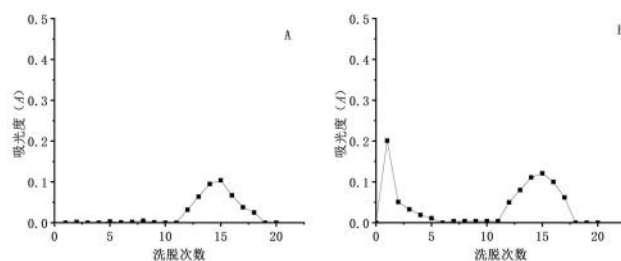


图 2 游离 MDX (A) 和 MDX-LIP (B) 的洗脱曲线

Fig 2 Elution profiles of free MDX (A) and MDX-LIP (B)

2.2.4 柱回收率测定 精密量取 0.2 mL 空白脂质体加于葡聚糖 G-50 柱顶端, 3000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min, 加洗脱液 0.2 mL 后 3000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min, 收集 1~4 管洗脱液于 5 mL 量瓶中, 在 450 nm 下测定吸光度 (A_0), 平行三次。再取 0.2 mL 空白脂质体, 用洗脱液稀释至 5 mL。在 450 nm 下测定吸光度 (A_1)。再根据公式计算空白脂质体的柱回收率。

精密量取 0.2 mL 游离 MDX 溶液加于葡聚糖 G-50 柱顶端, 按“2.2.3”项下洗脱操作, 在 228 nm 下测定吸光度 (A_0), 平行三次。再取 0.2 mL 游离 MDX 溶液用洗脱液稀释至 5 mL, 在 228 nm 下测定吸光度 (A_1)。再根据公式计算游离 MDX 溶液的柱回收率。

根据柱回收率公式: 柱回收率 (%) = $A_0/A_1 \times 100\%$, 结果空白脂质体的柱回收率分别为 97.95%、98.10%、97.92% (RSD 为 0.090%, $n = 3$), 游离 MDX 溶液的柱回收率分别为 2.28%、2.23%、2.25% (RSD 为 1.1%, $n = 3$), 结果表明葡聚糖凝胶对脂质体几乎无吸附作用, 而对游离药物有较强的吸附作用, 前 4 管脂质体可以被完全洗脱, 而游离 MDX 溶液则凝胶柱被吸附下不来, 满足测定条件。

2.3 单因素试验考察 MDX-LIP 的处方

2.3.1 药物与磷脂比例对 MDX-LIP 包封率 ($EE\%$) 的影响 保持处方中磷脂与胆固醇的质量比恒定, 仅改变药物与磷脂的比例, 分别设定为 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30。以包封率作为评价指标, 考察药物与磷脂的比例对 MDX-LIP 包封率的影响, 结果如图 3 所示, 随着 MDX-LIP 中磷脂与药物比例的增大, 包封率先升高后下降。这一趋势表明, 磷脂与药物的配比在调控药物包封效果方面起着关键作用^[11]。随着磷脂比例增加至适宜比例, 磷脂能够更有效地包裹药物, 形成更稳定的包封结构, 从而提高包封率。因此, 确定处方中药物与磷脂的比例为 1:20。

2.3.2 磷脂和胆固醇质量比对 MDX-LIP 包封率的影响 对处方中的药物和磷脂的质量比进行控制, 将磷脂和胆固醇质量比分别调整为 2:1、5:1、8:1、10:1、12:1。以包封率作为评价的依据, 考察磷脂和胆固醇质量比对 MDX-LIP 包封率的影响, 结果见图 4, 随着磷脂与胆固醇比例的减小, 包封率先升高后下降, 在磷脂和胆固醇质量比为 8:1 时, 脂质体包封率达到最高

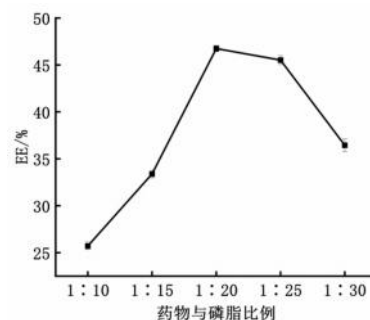


图 3 药物与磷脂比例对 MDX-LIP 包封率的影响 ($n = 3$)

Fig 3 Effect of drug to phospholipid ratio on MDX-LIP encapsulation rate ($n = 3$)

值。过多的胆固醇会使包封率明显降低。胆固醇能够提升脂质体膜结构的稳定性, 减少载药脂质体在递送过程中的药物泄漏, 所以选择磷脂和胆固醇的质量比为 8:1。

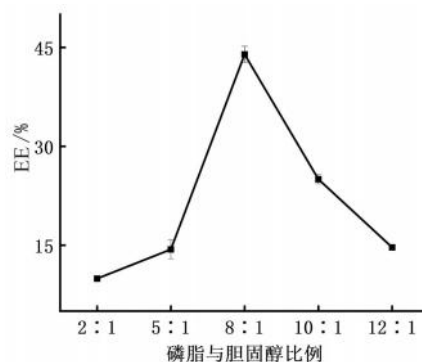


图 4 磷脂与胆固醇比例对 MDX-LIP 包封率的影响 ($n = 3$)

Fig 4 Effect of phospholipid to cholesterol ratio on MDX-LIP encapsulation rate ($n = 3$)

2.4 单因素试验考察 MDX-LIP 的制备工艺

固定 MDX-LIP 处方, 依次考察旋蒸温度为 40、50、60 $^{\circ}\text{C}$ 时, 水化温度为 40、50、60 $^{\circ}\text{C}$ 时, 水化时间为 15、30、45 min 时, 超声功率为 100、200、300 W 时对 MDX-LIP 包封率的影响, 结果见图 5。过热环境会加速脂质氧化反应进程, 引发磷脂分子链的化学降解^[12], 所以本实验选用 50 $^{\circ}\text{C}$; 水化温度会影响脂质膜和药物的动态重组, 基于此, 选择 50 $^{\circ}\text{C}$ 作为制备脂质体的水化温度; 水化时间过长, 脂质体的结构可能会遭到破坏, 同样会造成包封率下降^[13]。因此将水化时间控制在 15 min, 能够获得较高的脂质体包封率。高功率和低功率可能无法形成稳定的脂质体囊泡结构, 易导致包封药物的泄漏^[14-16]。因此超声功率需维持在一个平衡区间, 既能实现粒径的缩减, 又能避免膜破裂而导致包封率下降, 选用 300 W 作为脂质体制备的超声功率。

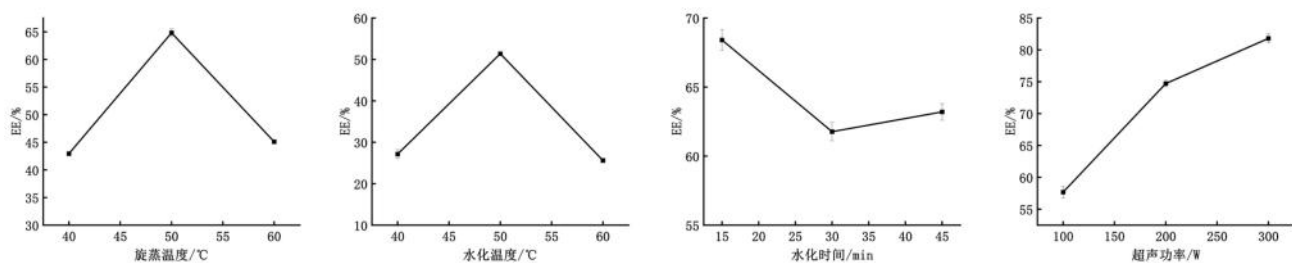


图 5 制备工艺对 MDX-LIP 包封率的影响 ($n = 3$)

Fig 5 Influence of preparation process on MDX-LIP encapsulation rate ($n = 3$)

2.5 基于 Box-Behnken 设计的 MDX-LIP 处方工艺优化

单因素考察结果显示,大豆卵磷脂与主药质量比(磷药比)、磷脂与胆固醇比例(磷胆比)和旋蒸温度是脂质体制备过程中的三个关键要素,它们分别从药物与磷脂的比例、膜的组成以及制备工艺条件三个方面影响脂质体的结构、稳定性和功能表现。通过优化这三个参数,可以显著提高脂质体的包封率、载药能力和释放特性,从而满足不同药物的递送需求。因此,将磷药比、磷胆比以及旋蒸温度作为对 MDX-LIP 包封率有显著影响的三个关键要素。将包封率当作响应值,运用 -1 、 0 、 1 对各个变量因素予以编码(见表 1)。依照 Box-Behnken 响应曲面设计来安排试验,具体的试验方案及试验结果见表 2。

表 1 因素和水平表
Tab 1 Factor and level

水平	因素		
	磷药比 (A)	磷胆比 (B)	旋蒸温度 (C) / $^{\circ}\text{C}$
-1	15	5	40
0	20	8	50
1	25	10	60

2.5.1 模型拟合 利用 Design-Expert 13 软件对实验数据实施回归分析,从而构建二次多元回归方程: $EE\% = -287.5167 + 11.4249A + 17.7486B + 7.3330C - 0.1225AB + 0.0072AC + 0.0163BC - 0.2423A^2 - 1.0112B^2 - 0.0759C^2$ 。依据方差分析结果(见表 3),模型显著性检验所得 P 值低于 0.0001 ,此结果表明各变量间的差异有统计学意义。失拟检验的 P 值为 0.4044 (大于 0.05),这意味着模型并未出现显著的失拟状况,从而证实了该数学模型具备合理性与可靠性。三个考察因素对包封率影响的主次顺序为:磷药比>磷胆比>旋蒸温度。基于 Design-Expert 13 软件所生成的响应面三维图以及二维等高线图(见图 6),得到最佳工艺参数:磷药比为 $22.37:1$,磷胆比为 $7.82:1$,旋转蒸发温度

表 2 Box-Behnken 效应面法试验设计与结果

Tab 2 Design and results of Box-Behnken surface method experimental

实验组	磷药比 (A)	磷胆比 (B)	旋蒸温度 (C) / $^{\circ}\text{C}$	包封率 /%
1	1	0	1	84.73
2	0	0	0	93.70
3	1	1	1	82.25
4	0	0	0	92.14
5	-1	-1	-1	75.37
6	-1	0	-1	73.56
7	0	-1	0	70.78
8	1	0	1	72.30
9	-1	0	-1	84.56
10	0	0	0	92.56
11	1	-1	1	75.60
12	0	1	0	85.70
13	0	0	0	92.70
14	0	-1	0	85.07
15	0	1	0	77.78
16	0	0	0	91.05
17	-1	1	-1	80.00

为 50.3°C 。即最优处方工艺为称取 MDX 8.94 mg 、胆固醇 25.58 mg 、大豆卵磷脂 200 mg 置于茄形瓶中,加入 10 mL 无水乙醇溶解, 50.3°C 减压旋转蒸发干燥直至有机溶剂被完全除尽,再加入 50°C 的 10 mL 纯水, 50°C 缓慢旋转水化 15 min ; 在此之后,将其置于冷水浴中用 300 W 探头超声 10 min ,最后用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 的滤膜过滤,即得 MDX-LIP。

2.5.2 响应面预测与验证 按筛选出的最优处方工艺制备 3 组 MDX-LIP,分别测定包封率,与预测包封率进行比较。结果实测平均包封率为 91.87% ($n = 3$),相较于预测包封率的 93.7% ,相对误差为 1.99% ,表明该响应面模型具备可靠的预测精准度,实测数据和模型预测值之间展现出良好的一致性。

2.6 脂质体的粒度及电位分布

采用动态光散射 (DLS) 测得其粒径为 $(99.19 \pm 4.8)\text{ nm}$,多分散指数 (PDI) 为 (0.559 ± 0.007) , Zeta 电位为 $(-29.166 \pm 2.26)\text{ mV}$,见图 7, MDX-LIP 的

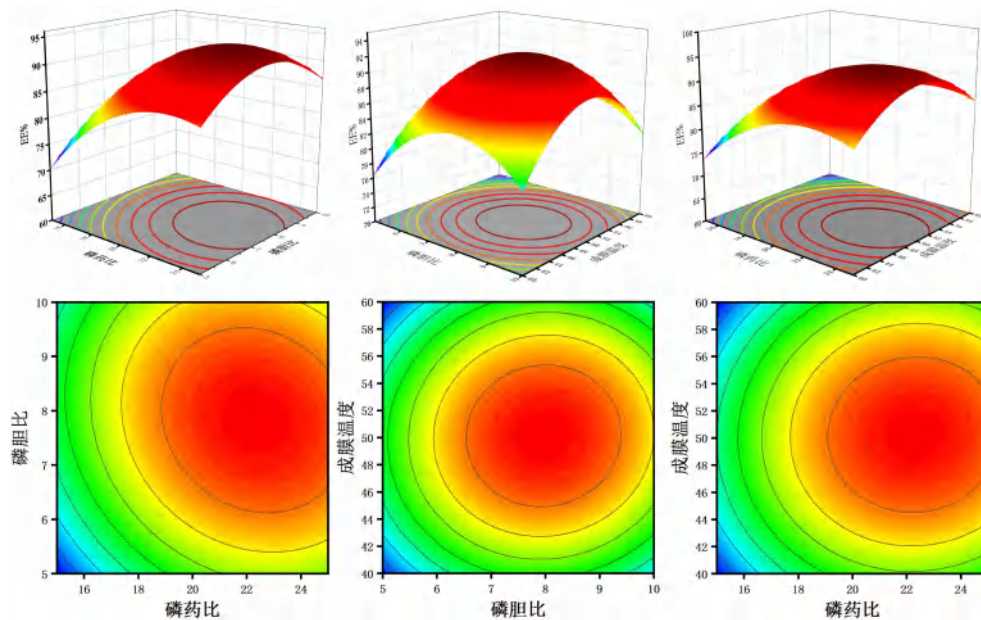


图 6 MDX-LIP 影响因素磷药比、磷胆比、成膜温度中两两比较的效应面图与等高线图

Fig 6 Effect surface and contour plots comparing two of the MDX-LIP influencing factors: phosphorus-to-drug ratio, phosphorus-to-bile ratio, and film-forming temperature

表 3 方差分析

Tab 3 Analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	
模型	959	9	106.76	104.73	< 0.0001	显著
A	260.38	1	260.38	255.43	< 0.0001	
B	44.70	1	44.70	43.85	0.0003	
C	0.2415	1	0.2415	0.2369	0.6413	
AB	10.14	1	10.14	9.95	0.0160	
AC	0.5112	1	0.5112	0.5015	0.5017	
BC	1.02	1	1.02	1.00	0.3505	
A ²	154.50	1	154.50	151.56	< 0.0001	
B ²	180.09	1	180.09	176.67	< 0.0001	
C ²	242.24	1	242.24	237.64	< 0.0001	
Residual	7.14	7	1.02			
失拟项	3.44	3	1.15	1.24	0.4044	不显著
纯误差	3.69	4	0.9228			
总误差	967.96	16				

粒径在 99 nm 左右, 呈现出单峰, 并结合其电位表明 MDX-LIP 粒径分布均匀, 有较好的稳定性。

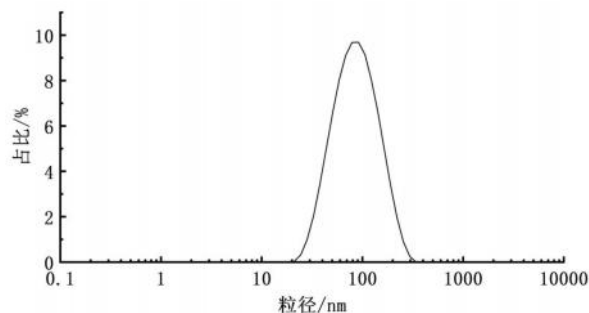


图 7 MDX-LIP 的粒径分布图

Fig 7 Particle size diagram of MDX-LIP

2.7 离体皮肤透皮实验

2.7.1 离体皮肤的处理 挑选 ICR 小鼠, 使用脱毛膏对其背部皮肤予以脱毛处理。随后, 精心剔除皮下脂肪, 用生理盐水对皮肤加以清洗。清洗后的皮肤置于 -20°C 冷冻保存, 以备次日实验之用。

2.7.2 制剂的配制

① MDX-LIP 制备: 按照“2.5”项下得到的最优处方工艺制备 MDX-LIP。

② MDX 酞剂的制备: 精密称取 10.14 mg MDX, 将其与 1.2 mL 无水乙醇和 0.4 mL 丙二醇相混合, 把混合液放置于 35°C 的恒温水浴中加热加速溶解进程, 直至溶液达到均一透明的状态。将完全溶解的溶液转移至 10 mL 量瓶内, 选用纯水作为稀释并定容, 得 MDX 酞剂。

2.7.3 离体皮肤体外透皮 借助 Franz 扩散池开展实验, 首先把处理好的鼠皮固定于扩散池之上。在接收池中添加 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 作为接收介质。分别取 MDX-LIP 溶液和 MDX 酞剂 (含相同浓度的 MDX) 置于供给池中, 将扩散池置于 37°C 的水浴中以保持恒温, 并进行搅拌操作, 以此模拟体内生理环境。在实验开始之后的不同时间节点, 即 0.5、1、2、3、4、5、6、12、24、48 h 开展取样操作, 每次从接收池中取出 1 mL 样品, 同时补充与取出样品等温等量的释放介质, 从而维持接收池内溶液体积与条件的稳定性。取出的样品采用 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 以清除其中可能存在的杂质和颗粒。照“2.1”项下方法进行

定量分析,按公式(1)计算 MDX 的累积透过量(Q_n)。式中 C_n 为第 n 个取样点检测所得的药物浓度; C_i 为第 i 个取样点对应的药物浓度; A 为表征扩散池有效透皮面积的参数; V 为接收液容积的量化表征; V_i 为单次样本采集量数值。

$$Q_n (\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}) = \frac{C_n V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i V_i}{A} \quad \text{公式 (1)}$$

图 8 结果显示, MDX-LIP 与 MDX 酊剂于 48 h 内的累积渗透量依次为 $738.94 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ 和 $264.20 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。MDX-LIP 是 MDX 酊剂的 2.8 倍,传统酊剂依赖被动扩散,药物分子需克服皮肤屏障阻力,穿透效率较低。脂质体通过磷脂双分子层包裹 MDX,增加药物的亲脂性,使其更易穿过皮肤角质层。以上结果说明将 MDX 制为脂质体之后,可以显著提高其透皮渗透的效果。

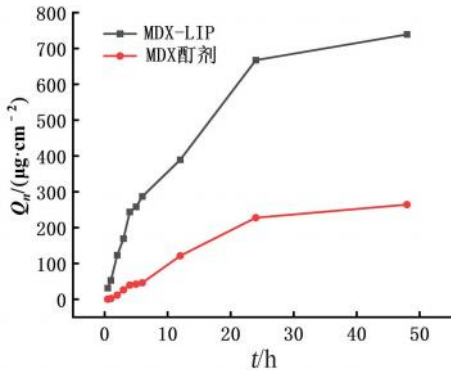


图 8 MDX-LIP、MDX 酊剂的透皮吸收实验
Fig 8 Transdermal absorption test of MDX-LIP, MDX tincture

运用四种数学模型(零级动力学方程、一级动力学方程、Higuchi 扩散模型以及 Ritger-Peppas 释放方程)对比不同模型的拟合优度,能够揭示药物渗透进程的主导机制^[17]。由表 4 可知,MDX-LIP 体外透皮模型拟合符合一级方程和 Higuchi 方程,显示其具有显著的缓释作用。综合上述结果表明,将 MDX 制备成脂质体,既能够提高其透皮渗透的效果,又能够达成缓释的目的。

2.7.4 皮肤滞留量 在透皮吸收试验结束时,用温生理盐水将皮肤冲洗干净,晾干后将其剪碎加纯水至 10 mL,均质 5 min,静置 3 min,重复 3 次。取出 1 mL,在其中加入 1 mL 甲醇后 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,取上清液经 $0.45 \mu\text{m}$ 的滤膜过滤,按照“2.1”项下方法进行定量分析,以药物皮肤滞留量公式: $Q_s (\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}) = VC/A$ (V 为接收液体积; C 为皮肤中滞留的药物浓度; A 为表征扩散池有效透皮面积的参数),计算得 MDX-LIP 和 MDX 酊剂

表 4 MDX-LIP、MDX 酊剂的经皮累计渗透量-时间模型拟合方程
Tab 4 Transdermal cumulative infiltration volume-time model fitting equations for MDX-LIP, MDX tincture

组别	模型	模型拟合方程	R^2
MDX-LIP	零级方程	$Q_n = 14.85t + 139.336$	0.8260
	一级方程	$Q_n = 758.524 (1 - e^{-0.078t})$	0.9829
	Hinguchi 方程	$Q_n = 22.445t^{1/2} - 32.518$	0.9572
	Ritger-Peppas 方程	$Q_n = 18.029t^{0.518}$	0.9511
MDX 酊剂	零级方程	$Q_n = 5.772t + 12.179$	0.9848
	一级方程	$Q_n = -254.997 (1 - e^{7.771t})$	0.9279
	Hinguchi 方程	$Q_n = 45.469t^{1/2} - 48.919$	0.9435
	Ritger-Peppas 方程	$Q_n = 14.304t^{0.766}$	0.9744

的 MDX 皮肤滞留量分别为 304.69 、 $39.16 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。结果表明,MDX-LIP 的皮肤滞留量更多,说明将 MDX 制成脂质体可以增加其在皮肤滞留量,有利于发挥治疗脱发的作用。

3 讨论

脂质体作为由磷脂和胆固醇构建的纳米级递送系统,其独特的双层膜结构使其具有良好的生物相容性和可降解性,已被广泛应用于医学领域。此载体凭借类脂质双分子层结构,能够同时包载亲水性和疏水性药物,在透皮给药领域,这种智能载体不仅能够增强药物对角质层的渗透能力,还可大幅降低系统毒性,为突破传统经皮给药的局限提供了创新性的解决途径。多项研究充分证实了脂质体的透皮增效作用: Sacha 等^[18]团队在对比分析市售双氯芬酸钠制剂时发现,含有 $10 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 脂质体的凝胶在 48 h 内的累积渗透量达到 $(69.30 \pm 14.38) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$,相较于 $23.2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 的传统凝胶,渗透效率提高了两倍,具有良好的渗透效果。Lafarge 等^[19]团队将白藜芦醇封装于脂质体后,在 3 h 内实现了皮肤渗透速率 73% 的提升。值得关注的是, Kuznetsova 等^[20]研发的阳离子型脂质体不仅显著增加了药物的渗透总量,还将作用时长延长至 51 h,展现出出色的缓释性能。

本研究运用薄膜分散法成功制备出包封率较高的 MDX-Lip,制备工艺操作简便、质量易于把控,并且对人体无毒无刺激。离体皮肤渗透行为及皮肤滞留量表明,将 MDX 制成脂质体之后,既能够提高其透皮渗透的效果,又能够达到缓释的目的。这得益于脂质体的磷脂双分子层结构,使 MDX 更易于渗透进入皮肤,延长其在皮肤中的滞留时间,不仅可解决药物溶解度差的问题,还避免了 MDX 酊剂的不良反应。研究表明,脂质体有一定的毛囊靶向作用^[21],故将药物制成脂质体后可直接靶向毛

囊, 延长在毛囊中的作用时间, 减少全身吸收, 提高生物利用度, 还能够促进药物的透皮吸收, 增强药物的局部作用, 同时减少不良反应。

在后续的实验, 本课题组将围绕 MDX-LIP 的生发作用开展更为深入、系统的研究, 进一步阐明 MDX-LIP 治疗 AGA 的药效和作用机制, 从而为 MDX 透皮制剂的研发和临床应用提供具有价值的参考。

参考文献

- [1] 孙建林, 吕新翔. 雄激素性脱发的发病机制与治疗进展 [J]. 内蒙古医科大学学报, 2020, 42 (1): 106-108, 112.
- [2] Devjani S, Ezemma O, Kelley KJ, et al. Androgenetic alopecia: therapy update [J]. *Drugs*, 2023, 83 (8): 701-715.
- [3] 王馨雨, 王子妤. 雄激素性脱发中西医研究进展 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2019, 17 (6): 122-124.
- [4] Choi N, Shin S, Song SU, et al. Minoxidil promotes hair growth through stimulation of growth factor release from adipose-derived stem cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19 (3): 691.
- [5] Suchonwanit P, Thammarucha S, Leerunyakul K. Minoxidil and its use in hair disorders: a review [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 2777-2786.
- [6] Ramanunni AK, Wadhwa S, Gulati M, et al. Nanocarriers for treatment of dermatological diseases: principle, perspective and practices [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 890: 173691.
- [14] Large DE, Abdelmessih RG, Fink EA, et al. Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, 176: 113851.
- [7] Zhang YB, Sun CZ, Wang C, et al. Lipids and lipid derivatives for RNA delivery [J]. *Chem Rev*, 2021, 121 (20): 12181-12277.
- [8] Eygeris Y, Gupta M, Kim J, et al. Chemistry of lipid nanoparticles for RNA delivery [J]. *Acc Chem Res*, 2022, 55 (1): 2-12.
- [9] Antoniou AI, Giofrè S, Seneci P, et al. Stimulus-responsive liposomes for biomedical applications [J]. *Drug Discov Today*, 2021, 26 (8): 1794-1824.
- [10] Adil A, Godwin M. The effectiveness of treatments for androgenetic alopecia: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2017, 77 (1): 136-141. e5.
- [11] Chountoulesi M, Naziris N, Pippa N, et al. The significance of drug-to-lipid ratio to the development of optimized liposomal formulation [J]. *J Liposome Res*, 2018, 28 (3): 249-258.
- [12] Nemoto R, Fujieda K, Hiruta Y, et al. Liposomes with temperature-responsive reversible surface properties [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019, 176: 309-316.
- [13] Gorain B, Al-Dhubiab BE, Nair A, et al. Multivesicular liposome: a lipid-based drug delivery system for efficient drug delivery [J]. *Curr Pharm Des*, 2021, 27 (43): 4404-4415.
- [14] Guner S, Oztup MH. Food grade liposome systems: Effect of solvent, homogenization types and storage conditions on oxidative and physical stability [J]. *Colloid Surface A*, 2017, 513: 468-478.
- [15] Kurniawan MO, Mittal A, Benjakul S, et al. Ultrasonicated omega-3-enriched skipjack tuna eyeball oil nanoliposome: preparation, characterisation, and fortification in milk [J]. *Int J Food Sci Technol*, 2024, 59 (10): 6975-6986.
- [16] Chotphruethipong L, Hutamekalin P, Sukketsiri W, et al. Effects of sonication and ultrasound on properties and bioactivities of liposomes loaded with hydrolyzed collagen from defatted sea bass skin conjugated with epigallocatechin gallate [J]. *J Food Biochem*, 2021, 45 (8): e13809.
- [17] 陈荣, 黄斌, 陈碧波, 等. 缓释制剂表征及其释放度检测技术研究进展 [J]. *药物分析杂志*, 2016, 36 (11): 1904-1911.
- [18] Sacha M, Faucon L, Hamon E, et al. Ex vivo transdermal absorption of a liposome formulation of diclofenac [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 111: 785-790.
- [19] Lafarge E, Villette S, Cario-André M, et al. Transdermal diffusion of resveratrol by multilamellar liposomes: effect of encapsulation on its stability [J]. *J Drug Delivery Sci, Technol*, 2022, 76: 103742.
- [20] Kuznetsova DA, Vasileva LA, Gaynanova GA, et al. Cationic liposomes mediated transdermal delivery of meloxicam and ketoprofen: optimization of the composition, in vitro and in vivo assessment of efficiency [J]. *Int J Pharm*, 2021, 605: 120803.
- [21] Li QB, Wang YM, Guo Q, et al. Nanostructured lipid carriers promote percutaneous absorption and hair follicle targeting of tofacitinib for treating alopecia areata [J]. *J Control Release*, 2024, 372: 778-794.

(收稿日期: 2025-03-15; 修回日期: 2025-05-06)

新疆一枝蒿不同极性提取物体外抗乙型肝炎病毒作用 “谱 - 效”关系研究

程江南, 丁曼*, 蔡晓翠, 王新堂, 毛艳* (新疆维吾尔自治区药物研究所 新疆维吾尔药重点实验室, 乌鲁木齐 830010)

摘要: **目的** 研究一枝蒿提取物的高效液相色谱 (HPLC) 指纹图谱与抗乙肝病毒 (HBV) 作用的关联性, 初步明确一枝蒿中抗乙肝病毒的活性成分。**方法** 采用 HPLC 法建立一枝蒿 8 个不同极性提取物的指纹图谱; 以体外转染人乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸 (HBV-DNA) 的肝细胞 HepG 2.2.15 为研究对象, 考察一枝蒿不同极性提取物对细胞上清液乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 和乙型肝炎 e 抗原 (HBeAg) 的抑制作用, 比较其体外抗 HBV 活性的差异性; 结合灰色关联度分析、正交偏最小二乘法探究一枝蒿指纹图谱共有峰与抗 HBV 作用的“谱 - 效”关系, 从而揭示成分对药效的贡献。**结果** 建立一枝蒿提取物的指纹图谱, 确定 24 个共有峰, 并指认其中 11 个峰。体外抗 HBV 活性结果提示, 样品 S7 体外抗 HBV 活性最强, 与体外抗 HBV 活性密切相关的 6 个共有峰分别为色谱峰 9 (异绿原酸 B)、11、13、16 (蒙花苷)、17、18 (一枝蒿酮酸)。**结论** 本研究通过构建色谱指纹图谱及其与抗 HBV 活性的谱效关联性分析, 推测色谱峰 9 (异绿原酸 B)、13、16 (蒙花苷)、18 (一枝蒿酮酸) 为一枝蒿提取物发挥抗 HBV 药效的物质基础, 说明其抗 HBV 作用是多种活性成分协同作用的结果, 为建立基于活性成分群的一枝蒿质量评价体系提供了科学依据。

关键词: 一枝蒿; 不同极性提取物; 抗乙型肝炎病毒活性; 指纹图谱; “谱 - 效”关系

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)12-3528-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.010

Spectrum-effect relationship of *Artemisia rupestris* L. extracts with varying polarities for in vitro anti-HBV activity

CHENG Jiangnan, DING Man*, CAI Xiaocui, WANG Xintang, MAO Yan* (*Xinjiang Institute of Materia Medica, Key Laboratory of Xinjiang Uygur Medicine, Urumqi 830010*)

Abstract: **Objective** To determine the correlation between the high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprints of *Artemisia rupestris* L. extracts and their anti-hepatitis B virus (HBV) activity, and identify the active components for the anti-HBV effects. **Methods** HPLC was used to establish the fingerprints of eight extracts of *Artemisia rupestris* L. with different polarities. The inhibitory effects of these extracts on the secretion of HBV surface antigen (HBsAg) and HBV e antigen (HBeAg) were evaluated with the HBV-transfected human hepatoma cell line HepG 2.2.15. A combination of grey relational analysis (GRA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) was used to determine the correlation between the common peaks in the HPLC fingerprints and the anti-HBV activity, so as to uncover the contribution of specific components to the pharmacological effects. **Results** The HPLC fingerprints of *Artemisia rupestris* L. extracts were successfully established, and 24 common characteristic peaks identified. Among them, 11 peaks were chemically characterized. Extract S7 showed the strongest anti-HBV activity, significantly inhibiting the secretion of HBsAg and HBeAg.

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金青年科学基金 (No. 2022D01B188); 新疆维吾尔自治区自然科学基金 - 杰出青年项目 (No. 2021D01E25); 新疆维吾尔自治区重点研发计划项目 (No. 2023B03012-2)。

作者简介: 程江南, 女, 助理研究员, 主要从事中药民族药活性成分发现与新药研发, email: 648699388@qq.com *通信作者: 毛艳, 女, 研究员, 硕士研究生导师, 主要从事中药药效物质快速发现与鉴定新技术新方法研究, email: maoyan7529@163.com; 丁曼, 女, 助理研究员, 主要从事中药民族药新药研发及质量控制研究, email: 714450733@qq.com

Six peaks [No. 9 (isochlorogenic acid B), 11, 13, 16 (linarin), 17, and 18 (rupestonic acid)] were closely associated with the observed anti-HBV effects. **Conclusion** The chromatographic fingerprints have been established and spectrum-effect relationship with anti-HBV activity determined. Chromatographic peaks 9 (isochlorogenic acid B), 13, 16 (linarin), and 18 (rupestonic acid) serve as the material basis for the anti-HBV efficacy of *Artemisia rupestris* extract, which indicates that the anti-HBV effect is achieved through the synergistic action of multiple active components, providing a scientific foundation for the quality evaluation of *Artemisia rupestris* L. based on bioactive compound clusters.

Key words: *Artemisia rupestris* L.; extract with different polar; anti-hepatitis B virus activity; fingerprint; spectrum-effect relationship

新疆一枝蒿 (*Artemisia rupestris* L.) 系菊科多年生耐寒草本植物, 广泛分布于新疆阿尔泰山麓等高海拔区域, 其干燥地上部分作为维药、哈药传统药材, 被《卫生部药品标准·维吾尔药分册》(1999 版)、《维吾尔药志》(上册) 及《中华本草·维吾尔药卷》共同收载。新疆一枝蒿通过多靶点调控, 发挥清热解毒、祛风凉血、广谱抗病毒活性及肝细胞保护作用^[1-4]。在新型冠状病毒感染 (COVID-19) 防控阶段, 新疆维吾尔自治区卫生健康委发布《2024 年自治区冬春季呼吸道传染性疾病中医药防治指导方案》, 该方案特别将复方一枝蒿颗粒列入风热犯表证 (症状包括发热、咽痛、咳黏痰等) 的推荐用药目录, 其成分中的一枝蒿与板蓝根等药材兼具祛风解表、解毒凉血功效, 可显著减轻呼吸道炎症反应并抑制病毒活性。

现阶段, 关于新疆一枝蒿抗乙肝病毒 (HBV) 活性物质的研究大多聚焦于单一成分或特定药理机制的分析, 从整体化学成分层面对其抗 HBV 相关物质开展的研究鲜少。本研究采用转染人乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸 (HBV-DNA) 的肝细胞 HepG 2.2.15 细胞培养技术, 对一枝蒿的不同极性提取物进行体外抗 HBV 活性检测; 同时, 开展高效液相色谱 (HPLC) 指纹图谱分析与体外抗 HBV 药效实验, 运用多元统计数据处理方法, 对一枝蒿提取物进行“谱-效”分析, 筛选抗 HBV 的药效物质群, 以期为一枝蒿抗 HBV 物质基础的筛选及质量评价奠定理论基础。

1 材料

1.1 仪器

Agilent1260 系列高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); 150i 培养箱、GO1510 酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); CPA225D 电子天平 (Sartorius 公司, $d = 0.01$ mg)。

1.2 试药

一枝蒿酮酸 (批号: GSB11-2530-2020, 含量: 99.71%, 中国科学院新疆理化技术研究所); 绿原酸 (批号: 110753-202018, 含量: 96.10%)、蒙

花苷 (批号: 111528-201911, 含量: 98.50%)、木犀草苷 (批号: 111720-201810, 含量: 93.50%) (中国食品药品检定研究院); 新绿原酸 (批号: DSTDX001504, 含量: 98.8%)、隐绿原酸 (批号: DST221220-035, 含量: 99.17%)、异绿原酸 B (批号: DSTDY003703, 含量: 99.00%)、金腰乙素 (批号: DST201023-100, 含量: 98.16%)、异绿原酸 A (批号: MUST-21102611, 含量: 98.46%)、异绿原酸 C (批号: MUST-21081010, 含量: 99.77%)、艾黄素 (批号: MUST-21050813, 含量: 99.04%) (成都德思特生物技术有限公司); 其他试剂均为分析纯; 水为纯化水。

HepG 2.2.15 细胞 (上海联迈生物工程有限公司); 胎牛血清 (美国 Gibco Laboratories 公司); MEM 培养基、含 EDTA 0.25% 胰酶、青霉素和链霉素 (美国 Hyclone 公司); G418 遗传霉素 (北京索莱宝科技有限公司); 细胞活力检测试剂 MTS (美国 Promega 公司); 乙型肝炎病毒 e 抗原 (HBsAg) 检测试剂盒、乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg) 检测试剂盒 (上海科华生物工程股份有限公司)。

新疆一枝蒿 (新疆阜康, 人工栽培, 于 2018 年 8 月采收), 样本为该植物的地上部分, 由新疆维吾尔自治区药物研究所毛艳研究员鉴定为菊科 (Compositae) 蒿属 (*Artemisia*) 植物新疆一枝蒿 (*Artemisia rupestris* L.)。

2 方法与结果

2.1 一枝蒿 HPLC 指纹图谱的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent TC-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相 A 为 0.2% 甲酸溶液, B 为乙腈, 梯度洗脱 (0 ~ 20 min, 8% → 18%A; 20 ~ 40 min, 18% → 29%A; 40 ~ 60 min, 29% → 42%A, 60 ~ 70 min, 42% → 85%A; 70 ~ 72 min, 85%A, 72 ~ 72.01 min, 85% → 8%A, 72.01 ~ 80 min, 8%A); 流速 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 245 nm; 进样量 10 μL。

2.1.2 对照品溶液制备 取新绿原酸、绿原酸、隐

绿原酸、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C、蒙花苷、一枝蒿酮酸、金腰乙素、艾黄素对照品精密称定,加甲醇制成质量浓度分别为 2.23、21.68、2.52、1.00、1.64、13.00、3.87、18.36、32.25、9.22、3.77 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 将一枝蒿药材粉碎后,分别以 12 倍体积的水、30% 乙醇、50% 乙醇、75% 乙醇加热回流提取 3 次,每次提取 1 h。滤过后合并滤液,减压浓缩,真空干燥得到干浸膏,分别编号为 S1、S2、S3、S4。取样品 S3 适量,以水混合溶解后上聚酰胺树脂柱,分别用水、30%、50%、75% 乙醇溶液洗脱,收集各极性洗脱部位,减压浓缩至干浸膏,样品编号为 S5、S6、S7、S8。取样品 S1 ~ S8 各约 20 mg,精密称定,分别置于 5 mL 量瓶中,加入适量 50% 乙醇,超声处理 30 min (功率为 250 W,频率为 40 kHz),摇匀,以 50% 乙醇定容,过微孔滤膜 (0.45 μm),取续滤液,即得。

2.2 指纹图谱的方法学考察

2.2.1 精密度实验 取同一供试品溶液 (S3) 连续进样 6 次,测得 24 个共有峰相对保留时间的相对标准偏差 (RSD) $\leq 0.070\%$,相对峰面积的 $RSD \leq 3.0\%$,表明仪器精密度良好。

2.2.2 重复性实验 取同一供试品 (S3) 6 份,按“2.1.3”项下方法制备,进样测定,测得各共有峰相对保留时间的 $RSD \leq 0.27\%$,相对峰面积的 $RSD \leq 3.0\%$,表明该方法重复性良好。

2.2.3 稳定性实验 取同一供试品溶液 (S3),于 0、4、8、12、48 h 进样测定,测得 48 h 内各共有峰相对保留时间的 $RSD \leq 0.14\%$,相对峰面积的 $RSD \leq 2.9\%$,表明样品在 48 h 内稳定。

2.3 指纹图谱的生成与相似度评价、共有峰分析

2.3.1 指纹图谱的生成及相似度评价 将 8 种不同一枝蒿不同极性提取物按“2.1.3”项下方法配制供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件分别进样,记录色谱图,将数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价软件”(2012 版)中,以 S3 号样品色谱图为参照图谱,采用中位数法,设置时间窗宽度为 0.2 min,通过多点校正与标记 (Mark) 峰匹配,获取 HPLC 叠加图谱和对照图谱 (见图 1)。相似度评价结果见表 1。

2.3.2 共有峰分析 记录色谱图及各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,得到 8 种一枝蒿不同极性提取物指纹图谱,确定 24 个共有峰。通过查阅参考文献^[5-6]及前期课题组化学成分基础^[7-8],与对照品比对 (见图 2),指认了 11 个成分,峰 1 为新绿原酸、峰 2 为绿原酸、峰 3 为咖啡酸、峰 7 为木犀草苷、峰 9 为异绿原酸 B、峰 10 为异绿原酸 A、

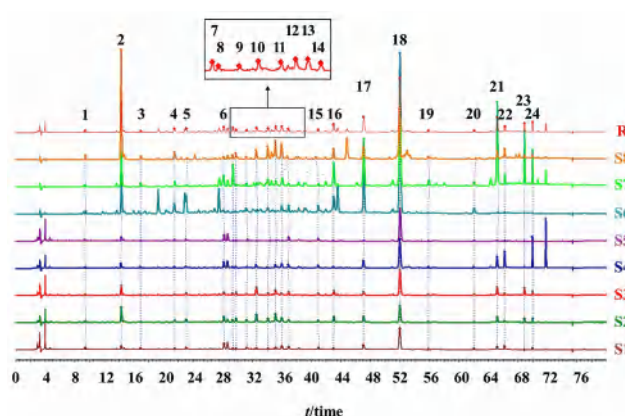


图 1 一枝蒿不同极性提取物的 HPLC 图谱叠加图

Fig 1 Superimposed HPLC chromatograms of different polarity extracts from *Artemisia rupestris* L.

峰 12 为异绿原酸 C、峰 16 为蒙花苷、峰 18 为一枝蒿酮酸、峰 21 为金腰乙素、峰 23 为艾黄素。其中峰 18 一枝蒿酮酸化学性质稳定,保留时间及峰面积重复性良好,且峰面积较大,与其他相邻峰分离良好,因此选择峰 18 为参照峰,计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积。实验结果表明峰各共有峰的相对保留时间较为一致 (RSD 均小于 1.0%),但相对峰面积差异较大,表明不同极性提取物的主成分含量差异性较大,便于后期进行抗 HBV “谱 - 效” 关系研究。

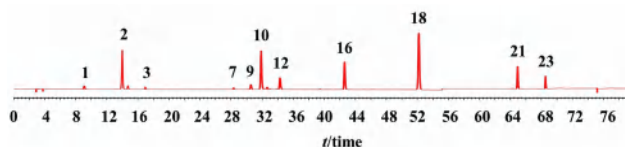


图 2 混合对照品的高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatogram of mixed reference standards

1. 新绿原酸 (neochlorogenic acid); 2. 绿原酸 (chlorogenic acid);
3. 咖啡酸 (caffeic acid); 7. 木犀草苷 (luteoloside); 9. 异绿原酸 B (isochlorogenic acid B); 10. 异绿原酸 A (isochlorogenic acid A);
12. 异绿原酸 C (isochlorogenic acid C); 16. 蒙花苷 (linarin); 18. 一枝蒿酮酸 (rupestonic acid); 21. 金腰乙素 (chrysosplenetin B);
23. 艾黄素 (artemisetin)

2.4 “谱 - 效” 关系研究

2.4.1 抗 HBV 活性筛选 将体外转染人 HBV-DNA 肝细胞 HepG 2.2.15 细胞以 2×10^4 个/mL 接种于 96 孔培养板内,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱内培养 24 h 后,弃去培养基,加入含有一枝蒿不同极性提取物样品的培养基,药物终质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$,每 3 日换一次含药培养基,分别于第 3、6、9 日收集细胞上清液,置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。第 9 日收集上清液后,96 孔板中加入 10% MTS 溶液 100 μL ,置于培养箱内培养 2 h,用酶标仪在 490 nm 处测定光密度 (OD) 值。按照 HBsAg 和 HBeAg 检测试剂盒说明书操作,测定

表 1 一枝蒿不同极性提取物指纹图谱的相似度评价结果

Tab 1 Similarity of fingerprints of different polar extracts of *Artemisia rupestris* L.

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	对照指纹图谱
S1	1	0.828	0.937	0.913	0.971	0.963	0.838	0.545	0.971
S2	0.828	1	0.927	0.793	0.746	0.809	0.827	0.821	0.902
S3	0.937	0.927	1	0.891	0.907	0.921	0.894	0.664	0.972
S4	0.913	0.793	0.891	1	0.854	0.861	0.863	0.519	0.902
S5	0.971	0.746	0.907	0.854	1	0.962	0.761	0.492	0.941
S6	0.963	0.809	0.921	0.861	0.962	1	0.827	0.598	0.971
S7	0.838	0.827	0.894	0.863	0.761	0.827	1	0.586	0.892
S8	0.545	0.821	0.664	0.519	0.492	0.598	0.586	1	0.686
对照指纹图谱	0.971	0.902	0.972	0.902	0.941	0.971	0.892	0.686	1

第 3、6、9 日细胞上清液中 HBeAg 和 HBsAg 的含量，结果见表 2，可知样品 S7 体外抗 HBV 活性最强。

表 2 一枝蒿不同极性提取物体外抗 HBV 活性测定结果

Tab 2 In vitro anti-HBV activity of different polar extracts of *Artemisia rupestris* L.

样品名称	HBsAg 抑制率 /%	HBeAg 抑制率 /%
S1	35.86	38.96
S2	25.93	35.05
S3	85.83	49.36
S4	67.45	43.30
S5	13.95	61.96
S6	79.00	72.69
S7	87.12	99.17
S8	86.32	98.55

2.4.2 灰色关联度分析 (grey relational analysis, GRA) GRA 是通过计算指纹图谱共有峰峰面积与药效指标数据的关联度大小，确定该共有峰与活性指标间的相关关系^[9-11]。本研究对一枝蒿 8 个不同极性提取物指纹图谱中 24 个共有峰的峰面积与 HBsAg 抑制率和 HBeAg 抑制率分别进行初值化处理，分别以 HBsAg 抑制率和 HBeAg 抑制率为母序列，峰面积为子序列，计算一枝蒿各共有峰与 HBsAg 抑制率和 HBeAg 抑制率之间的关联度，若色谱峰关联度>0.6，意味着该峰与药效指标存在一定的关联；若关联度>0.8，意味着该峰与药效指标存在较强的关联性。结果见表 3。

根据 24 个共有峰所代表的化学成分与 HBsAg 抑制率关联度大小，确定共有峰关联度>0.8 的为：色谱峰 9>13>15>14>5>4>1>2>18>22>20>3>11>16，与 HBeAg 抑制率关联度>0.8 的为：色谱峰 3>6>5>13>1>9>15>14>22>5>18>20>19，共有峰对 HBsAg 和 HBeAg 抑制率关联度均>0.8 的峰是：1 (新绿原酸)、3 (咖啡酸)、5、9 (异绿原酸 B)、13、14、15、18 (一枝蒿酮酸)、20、22。可见，一枝蒿提取物的抗 HBV 功效来源于其“有效物质群”的协同作用。

2.4.3 正交偏最小二乘法 (OPLS) 由于 GRA 得

表 3 一枝蒿提取物中 24 个共有峰与抗 HBV 活性的 GRA 结果

Tab 3 GRA of the 24 common peaks in the extract of *Artemisia rupestris* L. and their anti-HBV activity

峰号	HBsAg 抑制率		HBeAg 抑制率		化学成分
	关联度	关联序	关联度	关联序	
1	0.821	7	0.839	4	新绿原酸
2	0.819	8	0.762	19	绿原酸
3	0.808	12	0.856	1	咖啡酸
4	0.821	6	0.780	14	—
5	0.827	5	0.828	9	—
6	0.789	17	0.847	2	—
7	0.745	22	0.743	22	木犀草苷
8	0.764	20	0.753	20	—
9	0.862	1	0.838	5	异绿原酸 B
10	0.770	18	0.773	16	异绿原酸 A
11	0.806	13	0.786	13	—
12	0.754	21	0.776	15	异绿原酸 C
13	0.847	2	0.839	3	—
14	0.831	4	0.831	7	—
15	0.837	3	0.836	6	—
16	0.800	14	0.772	17	蒙花苷
17	0.790	16	0.746	21	—
18	0.815	9	0.820	10	一枝蒿酮酸
19	0.798	15	0.800	12	—
20	0.811	11	0.802	11	—
21	0.764	19	0.765	18	金腰乙素
22	0.813	10	0.829	8	—
23	0.737	24	0.738	23	艾黄素
24	0.738	23	0.724	24	—

注：“—”表示未知化合物。

Note: “—” Represents unknown compounds.

到的结果只能体现各化学成分与一枝蒿抗 HBV 发挥药效作用的相关性大小，无法评估它是正向调控还是负向调控。因此，研究中以 8 批一枝蒿提取物共有峰的峰面积为横坐标 (X)，以 HBsAg 抑制率为纵坐标 (Y)，导入 SMICA 14.1 软件，进行 OPLS 分析，通过拟合生成谱效回归模型，并得到变量投影重要性分析值 (VIP 值)，计算得到特征峰的峰面积与 HBeAg 抑制率模型拟合参数 R^2X 为 0.613， R^2Y 为 0.942， Q^2 为 0.833，拟合参数均大于 0.5，说明建立的模型预测以及解释较好。回归系数的正、负

代表各峰与 HBsAg 抑制率正相关或负相关, 图 3A 的结果显示, 峰 8 ~ 24 与 HBsAg 抑制率均成正相关, 对药效贡献较大。VIP 作为特征筛选的核心参数, 量化了各自变量对因变量变异的解释贡献度, VIP 值 > 1 的变量通常被视为具有显著解释作用的特征变量, 这类变量能够有效表征不同样本组间的本质差异特征^[8-9]。图 3B 的结果显示一枝蒿指纹图谱中贡献较大的 14 个变量 (VIP > 1) 的 VIP 由大到小依次为: 色谱峰 9 (异绿原酸 B) > 14 > 16 (蒙花苷) > 13 > 15 > 17 > 18 (一枝蒿酮酸) > 11 > 20 > 10 (异绿原酸 A) > 19 > 22 > 12 (异绿原酸 C) > 21 (金腰乙素), 这 14 个峰是样品产生差异的主要变量, 是抑制 HBsAg 作用相关的主要药效峰。

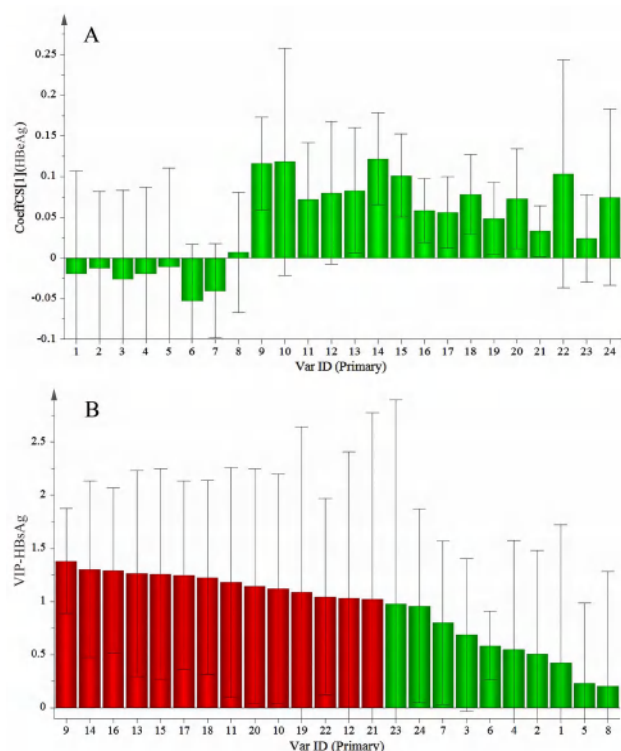


图 3 HBsAg 抑制率 OPLS 回归模型系数 (A) 及 VIP 贡献 (B)
Fig 3 OPLS regression model coefficients (A) of inhibition rates of HBsAg and VIP contribution (B)

将 8 批一枝蒿提取物共有峰的峰面积为横坐标 (X), 以 HBeAg 抑制率作为纵坐标 (Y), 导入 SMICA 14.1 软件, 进行 OPLS-DA 分析, 计算得到特征峰的峰面积与 HBeAg 抑制率模型拟合参数 R^2X 为 0.646, R^2Y 为 0.896, Q^2 为 0.786, 拟合参数均大于 0.5, 说明建立的模型预测以及解释较好。图 4A 的结果显示, 峰 1 ~ 24 与 HBeAg 抑制率均成正相关, 对药效贡献较大。图 4B 的结果显示一枝蒿指纹图谱中贡献较大的 12 个变量 (VIP > 1) 的 VIP 由大到小依次为: 色谱峰 16 (蒙花苷) > 13 > 9 (异绿原酸 B) > 3 (咖啡酸) > 1 (新绿原酸) > 17 > 11 > 4 > 6 > 18 (一枝蒿酮酸) > 2

(绿原酸) > 5, 这 12 个峰是样品产生差异的主要变量, 是抑制 HBeAg 作用相关的主要药效峰。

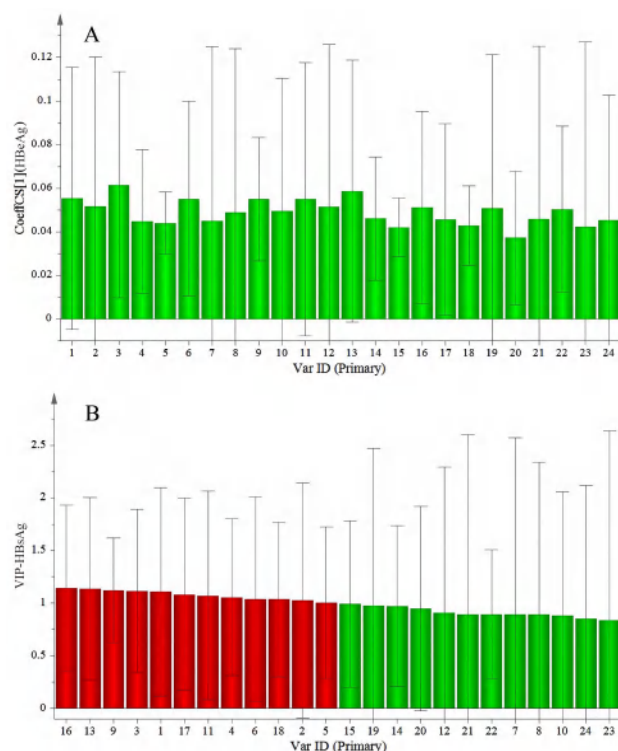


图 4 HBeAg 抑制率 OPLS 回归模型系数 (A) 及 VIP 贡献 (B)
Fig 4 OPLS regression model coefficients (A) of inhibition rates of HBeAg and VIP contribution (B)

3 讨论

本研究聚焦乙型肝炎这一问题展开探讨, 乙型肝炎是由 HBV 引发的肝脏慢性持续性炎症, 长期病变会显著增加肝硬化及肝细胞癌 (HCC) 等终末期肝病致死风险, 甚至导致慢性感染危及生命。世界卫生组织 (WHO) 发布的《2024 年全球肝炎报告》显示, 2022 年全球大约 130 万人死于病毒性肝炎, 我国曾是 HBV 感染高流行区, 据推算, 目前我国全人群 HBsAg 流行率为 5% ~ 7%, 现有慢性 HBV 感染者约 7500 万^[12]。HBsAg 阳性率持续居全球首位, 已成为影响人们身体健康、阻碍社会发展的重大疾病。

在这样的背景下, 一枝蒿作为维吾尔族传统习用药材, 其抗 HBV 活性在民间应用广泛, 但现代研究多集中于单一成分分析。研究显示一枝蒿多种成分有抗 HBV 作用: 一枝蒿酮酸作用于 PI3K-AKT 等关键通路, 抑制 HBV 复制及病毒相关肝损伤, 抗病毒作用获网络药理学分析及体内外实验双重支持^[3, 7-9]; 蒙花苷通过激活 AMPK-TFEB 自噬通路改善非酒精性脂肪性肝炎^[13]; 绿原酸抑制 HBV 聚合酶、抗氧化, 干扰 HBsAg 糖基化过程^[14]; 新绿原酸抑制 HBV 核心蛋白稳定性, 阻断病毒复制关键步骤, 同时诱导 HO-1 表达降低病毒 DNA 水平^[12];

异绿原酸 B 直接抑制 HBV S 蛋白与宿主 ACE-2 受体结合, 干扰病毒进入细胞, 还通过抑制 TLR/NF- κ B 通路, 减少炎症反应^[15]; 异绿原酸 A 作用于 HMGB1 减轻肝纤维化^[16]; 异绿原酸 C 通过抗氧化和抗炎机制保护肝细胞、抑制 HBV 复制^[17]。咖啡酸可抑制 HBV-DNA 复制以及 HBsAg 的产生, 降低血清中鸭乙型肝炎病毒 (DHBV) 水平^[18]; 金腰草用于治疗肝炎、肝坏死, 金腰乙素作为金腰草的核心黄酮类成分之一, 可能通过调节肝酶活性 (如谷丙转氨酶、谷草转氨酶) 减轻肝损伤, 抑制肝细胞凋亡, 促进肝组织修复^[19]。

基于上述情况, 本研究构建新疆一枝蒿 HPLC 指纹图谱并结合体外抗 HBV 药效实验, 通过极性提取物“谱-效”关联分析筛选可能协同作用的活性物质群, 探索抗乙型肝炎病毒潜在药效物质群^[20-25], 为阐明该民族药材药效物质基础提供科学依据。开展一枝蒿不同极性提取物指纹图谱研究发现, 其主成分含量差异大, 体外抗 HBV 药效实验表明不同极性提取物抗 HBV 作用有差异, 综合 GRA 和 OPLS 分析, 样品 S7 和 S8 含量高且抗 HBV 效果最佳, 与药效学试验结果相符。GRA 分析显示 10 个共有峰 (色谱峰 1、3、5、9、13、14、15、18、20、22) 与药效关联度 > 0.8 ; OPLS 结果表明色谱峰 9、11、13、16、17、18 的 VIP > 1 。综合推测, 色谱峰 9 (异绿原酸 B)、13、16 (蒙花苷)、18 (一枝蒿酮酸) 可能是发挥抗 HBV 药效的物质基础, 体现中药多组分协同作用特点, 未指认成分待进一步探究。

参考文献

- [1] 万英洁, 夏建新, 唐丽. 新疆一枝蒿化学成分、药理作用及临床应用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42 (23): 4565-4573.
- [2] Cai X, Kuerban M, Hasimu H, et al. Bioactive compounds from dichloromethane extract of *Artemisia rupestris* L. alleviates CCl₄/ConA-induced acute liver injury by inhibiting PI3K-AKT pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 333: 118416.
- [3] 孟繁龙, 李治建, 斯拉甫·艾白, 等. 一枝蒿有效部位对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 医药导报, 2010, 29 (10): 1266-1268.
- [4] 梁正诚, 施开创, 王勉, 等. 1H-1, 2, 3-三氮唑乙酸酯衍生物的合成与体外抗乙型肝炎病毒活性研究 [J]. 中国药物化学杂志, 2023, 33 (3): 168-174.
- [5] Cao XQ, Li MC, Ma LC, et al. Quality assessment of *Artemisia rupestris* L. using quantitative analysis of multi-components by single marker and fingerprint analysis [J]. Molecules, 2022, 27 (9): 2634.
- [6] Gu DY, Yang Y, Abdulla R, et al. Characterization and identification of chemical compositions in the extract of *Artemisia rupestris* L. by liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2012, 26 (1): 83-100.
- [7] Zhang S, Cai X, Khan GJ, et al. Exploring the molecular mechanism of *Artemisia rupestris* L. for the treatment of hepatocellular carcinoma via PI3K/AKT pathway [J]. Ethnopharmacol, 2024, 322: 117572.
- [8] 毛艳, 刘荣昌, 丁曼, 等. 基于网络药理学和指纹图谱的一枝蒿抗乙型肝炎病毒质量标志物预测分析 [J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34 (5): 864-873.
- [9] 杨璐, 张素挽, 刘中奇, 等. 一枝蒿黄酮类提取物体内抗乙型肝炎病毒活性及化学成分研究 [J]. 新疆医科大学学报, 2016, 39 (5): 578-581.
- [10] 陈超, 李娜, 师伟, 等. 经典名方桂枝茯苓方对子宫内膜间质细胞 TNF- α 表达的谱效关系及分子对接研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43 (3): 243-251.
- [11] 徐广灿, 袁洁, 田儒艳, 等. 肝靶向马蹄素衍生物的合成及抗乙型肝炎病毒活性研究 [J]. 中南药学, 2016, 14 (5): 449-456.
- [12] 中国疾控中心. 流行病学 [R/OL]. (2025-5-28) [2025-5-28]. https://www.chinacdc.cn/jkmy/mygh02/jbzt/bdxcrb/yxgy/202409/t20240925_300978.html.
- [13] Chen M, Liu GW, Fang ZY, et al. Buddleoside alleviates nonalcoholic steatohepatitis by targeting the AMPK-TFEB signaling pathway [J]. Autophagy, 2025, 16: 1-19.
- [14] 刘军, 黄正明, 王选举, 等. 绿原酸对抗乙型肝炎病毒-HBsAg 和 HBeAg 的抑制作用 [J]. 解放军药理学学报, 2010, 26 (1): 33-36.
- [15] 刘鑫, 牛子冉, 梅丹, 等. 异绿原酸 B 对肝损伤小鼠的保护作用及其机制 [J]. 医药导报, 2020, 39 (7): 895-899.
- [16] Stott K, Watson M, Howe FS, et al. Tail-mediated collapse of HMGB1 is dynamic and occurs via differential binding of the acidic tail to the A and B domains [J]. Mol Biol, 2010, 403 (5): 706-722.
- [17] 伍义行. 异绿原酸类化合物及不同组合在肝炎治疗上的应用: 200810121523.6 [P]. 2009-03-11.
- [18] Wang GF, Shi LP, Ren YD, et al. Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid in vivo and in vitro [J]. Antivir Res, 2009, 83 (2): 186-190.
- [19] 万青, 涂楚月, 熊慧, 等. 一测多评法测定藏药金腰草中 4 种黄酮类化学成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36 (6): 1053-1058.
- [20] 王琳琳, 牛晨冬, 卢宜然, 等. 中药材谱效关系研究进展 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2022, 43 (4): 379-383.
- [21] 陈姣, 王继森, 邓晶晶, 等. 基于量质传递及化学计量学的药食同源名方青龙白虎汤质量控制研究 [J]. 中草药, 2021, 52 (13): 3872-3884.
- [22] 陈彦洁, 蒋学青, 罗鑫, 等. 基于高效液相色谱指纹图谱及多模式化学计量学分析评价菝葜饮片的质量 [J]. 中南药学, 2023, 21 (10): 2738-2743.
- [23] 丘琴, 卢显兴, 阮必高, 等. 基于灰色关联度和偏最小二乘回归分析的扁担藤抗炎谱效关系研究 [J]. 中药材, 2021, 44 (2): 369-373.
- [24] 王巧, 许磊, 冯超, 等. 金莲花药材高效液相色谱法指纹图谱分析 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21 (2): 331-332.
- [25] 周玲利, 刘刚, 刘育辰, 等. 中药谱效关系在中药中应用进展 [J]. 中南药学, 2024, 22 (9): 2398-2404.

(收稿日期: 2025-03-09; 修回日期: 2025-06-19)

基于液质联用技术和生物信息学对方丹参制剂体内外成分与作用特点的初步对比研究

陈斌¹, 莫尊汇², 颜榕¹, 蔡剑斌², 王羚邴¹, 王健松^{1, 2*} (1. 广州中医药大学中药学院, 广州 510006; 2. 广州白云山医药集团股份有限公司白云山制药总厂, 广州 510515)

摘要: **目的** 运用液质联用 (HPLC-MS/MS) 技术比较复方丹参丸、复方丹参滴丸、复方丹参颗粒、复方丹参胶囊的化学成分以及入血成分, 结合生物信息学筛选差异成分并比较其作用特点。 **方法** 通过正负离子分析模式采集数据, 结合 Compound Discoverer 3.3 等软件以及 Thermo mzCloud、Thermo mzVault 等数据库, 对检测到的物质进行鉴定。从不同复方丹参制剂药液成分中筛选出共有成分以及各自的特有成分, 基于空白血清、含药血清数据, 采用主成分分析 (PCA)、正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 等方法筛选 4 种复方丹参制剂入血成分, 并进行基因本体 (GO) 功能富集与京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析对比。 **结果** 4 种复方丹参制剂药液中得到丹酚酸 B、隐丹参酮等共有成分, 以及 A-姜黄烯、蒽黄素、人参皂苷 Rg₁ 等差异成分。通过与空白血清进行对比, 复方丹参丸、复方丹参滴丸、复方丹参颗粒及复方丹参胶囊含药血清中分别检测出 16 个、6 个、23 个、17 个入血成分。GO 功能富集分析中, 4 种制剂有涉及细胞钙离子平衡、核受体活性等共同作用特点, 也有类固醇结合、配体-激活转录因子活性等方面不同的作用特点; KEGG 代谢富集分析中, 有涉及甘油磷脂代谢、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢等共同代谢通路, 也有不饱和脂肪酸生物合成、色氨酸代谢等不同的代谢通路。 **结论** 本研究运用液质联用技术结合生物信息学对 4 种复方丹参制剂进行系统的分析, 为探究其物质基础、挖掘新的临床应用提供了新视角。

关键词: 液质联用; 生物信息学; 复方丹参制剂; 物质基础; 对比研究

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)12-3534-10

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.011

A preliminary comparison of in vivo and in vitro components and action characteristics of compound Danshen preparations based on HPLC-MS/MS and bioinformatics

CHEN Bin¹, MO Zunhui², YAN Rong¹, CAI Jianbin², WANG Lingli¹, WANG Jiansong^{1, 2*} (1. School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006; 2. Baiyunshan Pharmaceutical General Factory, Guangzhou Baiyunshan Pharmaceutical Holdings Co., Ltd., Guangzhou 510515)

Abstract: Objective To compare the chemical components and blood-entry components of compound Danshen pills, compound Danshen dropping pills, compound Danshen granules, and compound Danshen capsules with HPLC-MS/MS, and to screen differential components through bioinformatics while comparing their functional characteristics. **Methods** The data were collected by positive and negative ion analysis mode, and the detected substances were identified by combining software such as Compound Discoverer 3.3 and databases such as Thermo mzCloud and Thermo mzVault. The common components and their unique components were screened out from different compound Danshen preparations. Based on the blank serum and drug-containing serum data, principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) were used to screen the blood-entry components of the four compound Danshen preparations Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

作者简介: 陈斌, 男, 硕士研究生, 主要从事中成药的药理研究, email:1198226326@qq.com * **通信作者:** 王健松, 男, 教授级高级工程师, 主要从事药物新剂型与质量标准研究, email: wangjs@byszc.com

(KEGG) enrichment analyses were performed to investigate the functional roles of these components.

Results The four compound Danshen preparations shared components such as salvianolic acid B and cryptotanshinone, also had many differential components, such as α -curcumene, circimaritin, ginsenoside Rg₁, and so on. By comparison with the blank serum, 16, 6, 23, and 17 blood components were detected in the serum containing compound Danshen pills, compound Danshen dropping pills, compound Danshen granules, and compound Danshen capsules, respectively. In the GO functional enrichment analysis, there were common action features involving cellular calcium ion homeostasis, nuclear receptor activity, and other common actions in the four preparations, as well as differential action features in terms of steroid-binding and ligand-activated transcription factor activity. In the KEGG metabolic enrichment analysis, there were action features involving glycerophospholipid metabolism, glycine, serine and threonine metabolism, and other common action features, as well as unsaturated fatty acid biosynthesis, tryptophan metabolism, and other differential metabolic pathways. **Conclusion** HPLC-MS/MS in combination with bioinformatics is used to systematically analyze four compound Danshen preparations, which provides new perspectives for exploring their material basis and developing novel clinical applications.

Key words: HPLC-MS/MS; bioinformatics; compound Danshen preparation; material basis; comparative study

心血管疾病是一类严重危害人类健康和生命的重大疾病,其发病原因极为复杂且多变,其中较为常见的有冠状动脉疾病(冠心病)、心肌血液灌注不足(心肌缺血)、心肌梗死以及血压持续升高(高血压)等病症。中医认为,心血管疾病的根本病机为本虚标实,本虚以气虚、阳虚为主,标实包括气滞、血瘀等。

复方丹参方是治疗心血管疾病的常用方剂,其中包含丹参、三七、冰片 3 种常见中药材,有活血化瘀、理气止痛的功效,治疗心绞痛等症疗效确切。丹参具有活血化瘀、祛瘀止痛以及凉血消肿的功效^[1];三七属于五加科人参属植物,其根茎部可入药,具有消肿止痛和止血化瘀的作用;冰片则具有清热止痛与醒神凝神之功^[2]。由上述 3 种药物及其他辅料制成的复方丹参制剂,在治疗心肌缺血、冠心病等心血管疾病方面有其独特的作用,且疗效显著,应用广泛。复方丹参方最早的剂型为片剂,随着医药技术的发展,复方丹参片逐渐被改进为(浓缩)丸、滴丸、胶囊、软胶囊等多种剂型。各种剂型的制作工艺存在差异,所引起的成分及含量的改变也导致了各自作用机制的差异。目前对复方丹参制剂的研究主要集中在其药理作用,而对于不同剂型之间的成分差异以及入血后成分的差异等相关的研究却较少。

液相色谱-质谱联用技术(HPLC-MS/MS)在中药领域的应用极为广泛,包括但不限于中药复方成分的结构鉴定、含量分析以及体内代谢研究等多个方面。作为中药的质量控制和药效研究强有力的分析工具,HPLC-MS/MS 技术能够帮助研究人员精确地识别和定量中药中的复杂成分^[3]。

此外,生物信息学是结合分子生物学和信息技术的新兴学科,对于揭示疾病发生的分子机制具有重要意义。近年来,随着生物信息学新理论、新技术的不断发展,中医药和生物信息学联合数据库的建设日臻完善,为中药及复方作用机制的研究提供了新的视角^[4-5]。因此,本研究拟采用液质联用技术结合生物信息学对不同复方丹参制剂入血前后成分进行分析与鉴定,找出不同剂型各自的作用特点,为系统解析中药复方多成分、多途径、多靶点的特点和传统中医药理论提供了新的理论依据。

1 材料

1.1 仪器

Thermo Vanquish UHPLC 型超高效液相色谱仪、Q-Exactive HF 型高分辨质谱(赛默飞世尔科技有限公司);Zorbax Eclipse C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μ m)(安捷伦科技有限公司);TGL-16M 型离心机(湘仪离心机仪器有限公司);JXFSTPRP-48 型全自动样品快速研磨仪(上海净信实业发展有限公司);KQ-00DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);FD-1A-50 型冷冻干燥机(上海比朗仪器制造有限公司);AUW120D 型天平(精度:0.1 mg, 岛津公司);JC-2500 型多管涡旋仪(常州市金坛区白塔金昌实验仪器厂)。

1.2 试药

复方丹参丸(批号:2204150042, 河南爱民药业集团股份有限公司);复方丹参颗粒(批号:220309, 珠海金鸿药业股份有限公司);复方丹参滴丸(批号:221245, 天津天士力医药集团股份有

限公司); 复方丹参胶囊 (批号: 220604, 云南特安呐制药股份有限公司)。

甲醇、乙腈、异丙醇 (纯度 $\geq 99.9\%$, 德国 Merck KGaA 公司), 甲酸 (纯度 $\geq 98\%$, 山东西亚化学有限公司), 2-氯苯丙氨酸 (纯度 $\geq 97\%$, 上海源叶生物科技有限公司), 水为超纯水。

1.3 动物

C57BL/6J 雄性小鼠 15 只, 8 周龄, SPF 级, 体重 (23 ± 2) g [广东维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK (粤) 2022-0063, 动物质量合格证号: 44829700033041]。小鼠饲养于广州中医药大学实验动物中心 SPF 级动物房, 室温 $19 \sim 23^\circ\text{C}$, 相对湿度 $50\% \sim 70\%$, 昼夜各半, 自由摄食、饮水。本动物实验经广州中医药大学实验动物伦理委员会批准, 伦理批准号: 20240412001。

2 方法与结果

2.1 复方丹参制剂及其含药血清的液质成分分析

2.1.1 复方丹参制剂样品的制备 将制剂内容物 100 mg 充分混匀, 置于 2 mL 离心管中, 加入 1 mL 70% 甲醇溶液, 并投入 3 mm 规格的钢珠。利用全自动样品快速研磨仪 (JXFSTPRP-48, 70 Hz) 振荡破碎处理 3 min。完成破碎后, 待样品冷却, 低温超声处理 10 min (40 kHz) 4°C 、12 000 r/min 离心 10 min 后, 取上清液, 按照 2 至 100 倍的比例范围进行稀释。稀释后, 向其中加入 10 μL 质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 2-氯苯丙氨酸内标溶液, 将处理后的溶液过 0.22 μm PTFE 滤头, 备用。

2.1.2 血清样品的制备 选用 C57BL/6J 雄性小鼠 15 只, 随机分为空白血清组、复方丹参丸组、复方丹参滴丸组、复方丹参颗粒组和复方丹参胶囊组, 每组 3 只。给予正常饮食, 适应性饲养 5 d。禁食不禁水 12 h 后, 除空白血清组外分别灌胃给药 (生药量: 0.84 g/kg), 每日 2 次, 连续给药 3 d, 空白血清组给予等体积纯水。于末次给药后 5 h, 小鼠用异氟烷麻醉, 眼球取血, 37°C 静置 1 h, 于 4°C 、3000 r/min 离心 10 min 分离血清, 取上清液至干净的离心管中, 4°C 、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液分装到 1.5 mL 离心管中, 每管 0.2 mL, -80°C 冰箱保存备用。

取 100 μL 混合均匀的样品置于 2 mL 离心管中, 加入 400 μL 甲醇, 涡旋 10 min 混匀, 4°C 、12 000 r/min 离心 10 min, 上清液过 0.22 μm PTFE 滤头后加入 100 $\mu\text{g/mL}$ 内标, 使其质量浓度为 1 mg/L, 待测。

2.1.3 色谱条件 Zorbax Eclipse C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.8 μm); 流动相: 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱 ($0 \sim 7\text{ min}$,

$5\% \sim 30\% \text{B}$; $7 \sim 14\text{ min}$, $30\% \sim 78\% \text{B}$; $14 \sim 20\text{ min}$, $78\% \sim 95\% \text{B}$; $20 \sim 25\text{ min}$, $95\% \sim 5\% \text{B}$); 进样量 2 μL ; 流速 0.3 mL/min; 柱温 30°C 。

2.1.4 质谱条件 采用正、负离子分析模式; 加热器温度: 325°C ; 鞘气流速: 45 arb; 辅助气流速: 15 arb; 吹扫气流速: 1 arb; 电喷雾电压: 3.5 kV; 毛细管温度: 330°C ; S-Lens RF Level: 55%。扫描模式: 一级全扫描 (Full Scan, m/z 100 $\sim$ 1500) 与数据依赖性二级质谱扫描 (dd-MS², TopN = 5); 分辨率: 120 000 (一级质谱), 60 000 (二级质谱); 碰撞模式: 高能量碰撞解离 (HCD)。

2.1.5 数据分析 通过检索 CNKI、PubMed 和 Medline 等文献数据库及 TCMSP、PubChem 和 ChemSpider 等化学成分数据库, 构建复方丹参制剂及其组方药材可能的化学成分数据库, 包括化学成分的名称、分子式、精确相对分子质量、化学结构和一级、二级质谱信息。接着基于 Compound Discoverer 3.3 软件的在线匹配预测, 采用 Compound Discoverer 3.3 化合物分析软件将质谱数据与软件中 mzCloud、mzVault、ChemSpider 等在线数据库相匹配, 筛选误差小于 5×10^{-6} 的化合物, 借助人工智能的质谱数据处理技术对成分进行检测判别^[6-10], 进一步补充和完善复方丹参制剂及其组方药材成分库。

2.2 不同复方丹参制剂成分差异分析

2.2.1 入血成分类型分析 将制得的各组血清样品上机检测, 通过“2.1.5”项下方法对实验数据进行鉴定和整理, 最后将得到的数据导入 Venny 2.1.0 在线工具中, 绘制韦恩图。找出不同复方丹参制剂入血后的成分差异, 接着对各组总体成分进行分类并统计。

2.2.2 多元统计分析 对每组数据进行主成分分析 (PCA), 分析各组间化学成分是否存在显著差异, 考察各给药组与空白血清组的差异, 以便初步了解各组样本之间的总体成分差异和组内样本之间的变异度大小。接着通过 R 软件中的 MetaboAnalystR 包 OPLSR.Anal 函数对每组数据进行正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA)。

2.2.3 入血差异成分筛选及聚类分析 基于 OPLS-DA 模型 (生物学重复 ≥ 3) 得到的变量重要性投影 (variable importance in projection, VIP), 可以初步筛选出不同组间差异的成分。同时可以结合单变量分析的 P -value/FDR (生物学重复 ≥ 2) 或差异倍数 (fold change, FC) 值进一步筛选入血成分。本次入血成分的筛选基于两个标准: $\text{VIP} \geq 1$ 和 $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$ 。使用免费的在线数据分析平台 Metware Cloud (<https://cloud.metware.cn>) 进行差异分析^[6]。为了方便观察成分相对含

量的变化规律,我们对应用筛选标准鉴定得到的入血成分的原始相对含量按行采用 UV (Unit Variance Scaling) 处理,通过 R 软件包绘制热图。

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

将“2.2.3”项下得到的各复方丹参制剂入血成分首先在 PubChem 数据库中进行检索,获取各成分对应的 Canonical SMILES 格式,据此构建出相应的分子结构信息;接着把这些分子结构信息导入 SwissTargetPrediction 数据库中,进行靶点预测,筛选出预测概率超过 0 的靶点作为潜在作用靶点;将每个制剂的潜在靶点导入 DAVID 6.8 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov>),选择物种为“Homo sapiens”,根据 $P < 0.01$ 对差异基因做 GO 功能富集,分别选取生物学过程 (BP)、细胞组成 (CC)、分子功能 (MF) 的前 10 个条目,使用微生信在线绘图工具 (<https://www.bioinformatics.com.cn>) 做可视化分析。根据入血成分结果,进行 KEGG 通路富集分析,其中 Rich Factor 为对应通路中成分个数与该通路注释到的成分总数的比值,该值越大表示富集程度越大。

2.3 复方丹参制剂的体外成分分析

通过高效液相色谱串联质谱 (HPLC-MS/MS) 技术检测制得的 4 种复方丹参制剂样品,分别得到各样品的总离子图,见图 1。经 Thermo mzCloud 在线数据库, Thermo mzVault 本地数据库等鉴定出的各制剂所含成分,可知:复方丹参丸共含 146 种成分;复方丹参滴丸共含 107 种成分;复方丹参颗粒共含 141 种成分;复方丹参胶囊共含 139 种成分。

将不同制剂所含成分分别导入 Venny 2.1.0 在线工具中,得到不同复方丹参制剂成分的韦恩图。分析得到 4 种复方丹参制剂含丹酚酸 B、隐丹参酮、丹参酮 II A、二氢丹参酮 I、丹参酮 I 等 78 种共有成分。除共有成分外,各制剂都有区别于其余制剂的特有成分:复方丹参丸有 A-姜黄烯、三七素等 5 种特有成分;复方丹参滴丸有蒽黄素、(Z)-3-(4-碘苯基)-2-巯基-2-丙烯酸等 14 种特有成分;复方丹参颗粒有人参皂苷 Rg₁、油酸酰胺等 8 种特有成分;复方丹参胶囊有右旋奎宁酸、白杨素等 4 种特有成分。

2.4 复方丹参制剂入血成分类型

各组血清样品进行检测,结果空白血清组有 108 种成分,复方丹参丸组有 149 种成分,复方丹参滴丸组有 140 种成分,复方丹参颗粒组有 139 种成分,复方丹参胶囊组有 147 种成分。5 组样品中,共有 39 种主要成分,其中含量排在前十的成分有:脂肪酸 (22.7%)、羧酸及其衍生物

(12.97%)、苯及其取代衍生物 (7.57%)、孕烯醇酮类 (7.03%)、类固醇和类固醇衍生物 (6.49%)、甘油磷脂 (4.86%)、有机氮化合物 (4.86%)、吡啶及其衍生物 (2.7%)、有机氧化合物 (2.16%)、香豆素及其衍生物 (1.62%)。

2.5 多元统计分析

对血清样本数据进行 PCA,发现相比于空白血清组,各复方丹参制剂组入血成分均有显著差异,见图 2。为了进一步确定不同复方丹参制剂组差异入血成分,对 PCA 结果进行 OPLS-DA,同时对 OPLS-DA 模型进行置换检验 ($n = 200$), $Q^2 = 0.817$, $R^2Y = 0.985$, 且 $P < 0.005$, 说明该 OPLS-DA 模型具有较好的拟合度和预测能力。OPLS-DA 结果显示,各组间存在明显差异,可以用于后续的入血成分的筛选分析,见图 3、4。

2.6 入血差异成分筛选及聚类分析

将处理好的数据基于两个标准: $VIP \geq 1$ 和 $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$ 筛选出各复方丹参制剂与空白血清组的差异成分,得出复方丹参丸 16 个、复方丹参滴丸 6 个、复方丹参颗粒 23 个、复方丹参胶囊 17 个入血成分 (见表 1)。

进一步对数据进行归一化处理,并进行聚类分析,结果见图 5。复方丹参丸、颗粒、胶囊组共有成分较多,相比之下,复方丹参滴丸与其余 3 组的共有成分较少,其中复方丹参胶囊组与颗粒组相似度最高,与丸组相似度次之,滴丸组与各组的相似度最低,此结果与入血成分聚类热图所呈现的结果一致。复方丹参制剂各组均涉及棕榈油酸及茉莉酸,表明这些成分是复方丹参制剂的共性物质基础,可能与抗炎、抗氧化等核心药效相关;滴丸组中的 6-姜酚以及胶囊组中的 α -亚麻酸等成分均显著上调,表明滴丸和胶囊更有利于脂溶性或缓释成分的释放;此外,颗粒组中的香豆素类成分和二氢丹参酮 I 的显著富集,表明颗粒剂更利于水溶性或极性成分的释放;丸剂由于传统高温工艺导致热敏感性与挥发性成分的显著降解,使其在相关成分上与其他剂型差异较大。

2.7 入血成分 GO 功能与 KEGG 通路富集分析

将各个复方丹参制剂对应入血成分的潜在靶点进行 GO 功能富集分析,分析包括生物学过程分析、细胞组分分析、分子功能分析三部分。在生物学过程方面,复方丹参丸主要涉及细胞钙离子稳态、循环系统中的血管过程等方面;复方丹参滴丸主要涉及调节 MAP 激酶活性、肽基酪氨酸修饰等方面;复方丹参颗粒主要涉及调节细胞膜钙离子浓度、G 蛋白偶联受体信号通路等方面;复方丹参胶囊主要涉及对药物的反应、细胞钙离子平衡等方面。

在细胞组分方面,复方丹参丸主要涉及膜筏、

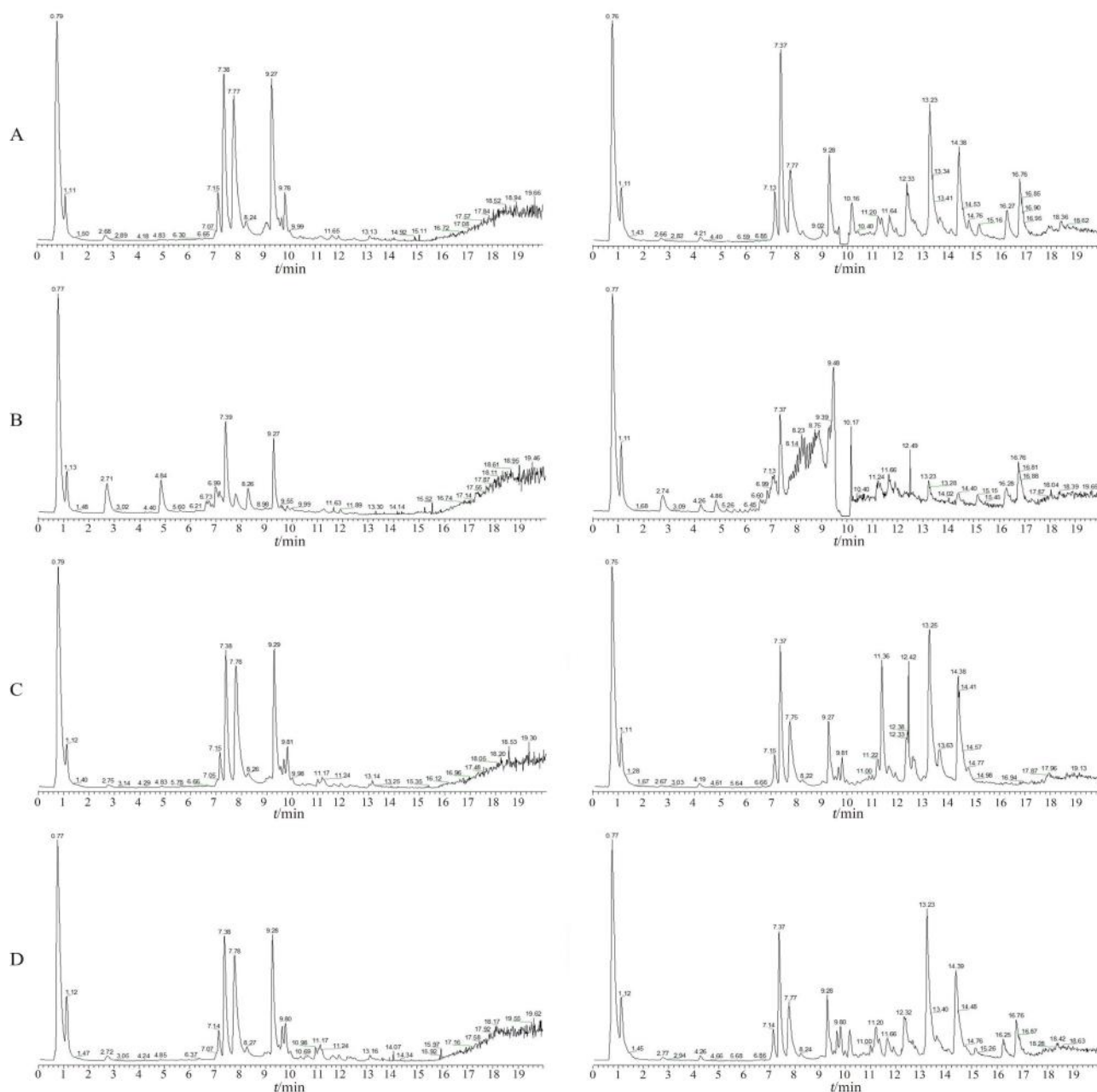


图1 总离子流图(左为负离子模式,右为正离子模式)

Fig 1 Total ion chromatography (left: negative ion mode, right: positive ion mode)

A. 复方丹参丸 (compound Danshen pill); B. 复方丹参滴丸 (compound Danshen dropping pill); C. 复方丹参颗粒 (compound Danshen granule); D. 复方丹参胶囊 (compound Danshen capsule)

膜区等方面;复方丹参滴丸主要涉及突触后膜的固有成分、突触前膜的固有成分等方面;复方丹参颗粒主要涉及膜微域、突触膜的组成部分等方面;复方丹参胶囊主要涉及突触后膜、膜区等方面。

在分子功能方面,复方丹参丸主要涉及酪氨酸激酶活性、类固醇结合等方面;复方丹参滴丸主要涉及蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性、核受体活性等方面;复方丹参颗粒主要涉及神经递质受体活性、配体-激活转录因子活性等方面;复方丹参胶囊主要涉及G蛋白偶联胺受体活性、血清素受

体活性等方面。

将4种复方丹参制剂组血清与空白血清的差异成分进行KEGG通路富集分析,结果显示,复方丹参丸可能通过 α -亚麻酸代谢、脂肪酸生物合成等通路起作用;复方丹参滴丸可能通过甘油磷脂代谢、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢等通路起作用;复方丹参颗粒可能通过牛磺酸和低牛磺酸代谢、苯丙氨酸代谢等通路起作用;复方丹参胶囊可能通过不饱和脂肪酸的生物合成、色氨酸代谢等通路起作用。

表 1 不同复方丹参制剂入血成分

Tab 1 Differential blood-entry components of different compound Danshen preparations

No.	英文名	中文名	误差 / ×10 ⁻⁶	理论值 m/z	测定值 m/z	保留时 间 /min	变量重 要性投影	P	成分类型	来源
1	7-hydroxycoumarine	7-羟基香豆素 ^[11]	—	1.71 162.0316	162.0314	9.943	1.41	0.04	代谢产物	丹参
2	choline	胆碱 ^[12]	1.93	103.0997	103.0999	0.778	1.50	0.00	原形成分	丹参
3	hecogenin	海柯皂苷元 ^[13]	—	1.9 430.3083	430.3074	13.179	1.44	0.04	代谢产物	三七
4	α -linolenoyl ethanolamide	α -亚麻酰乙醇酰胺 ^[14]	—	1.64 321.2667	321.2662	15.746	1.44	0.02	代谢产物	三七、丹参
5	Steviol	甜菊醇 ^[15]	—	2.11 318.2194	318.2188	13.842	1.43	0.02	代谢产物	三七
6	cafestol	咖啡醇 ^[16]	—	2.33 316.2038	316.2031	13.234	1.4	0.03	原形成分	三七
7	1, 7-bis (4-hydroxyphenyl) -3, 5-heptanediol	1, 7-双 (4-羟基苯基) -3, 5-庚二醇 ^[17]	—	0.91 316.1674	316.1671	11.472	1.46	0.02	原形成分	三七
8	gibberellin A7	赤霉素 A7 ^[18]	—	0.67 330.1467	330.146	10.014	1.51	0.01	代谢产物	丹参
9	decanoylcarnitine	癸酰肉碱 ^[19]	—	1.9 315.2409	315.2403	10.148	1.37	0.05	代谢产物	三七
10	6-gingerol	6-姜酚 ^[20]	—	0.88 294.1831	294.1828	11.421	1.50	0.00	代谢产物	三七
11	palmitoleic acid	棕榈油酸 ^[21]	—	2.48 254.2245	254.2239	12.883	1.38	0.03	代谢产物	三七
12	curcumol	莪术醇 ^[22]	—	2.27 236.1776	236.1770	13.631	1.49	0.00	代谢产物	三七
13	isovalantolactone	异土木香内酯 ^[23]	—	1.76 232.1463	232.1459	11.143	1.48	0.00	代谢产物	三七
14	2-hydroxymyristic acid	2-羟基十四烷酸 ^[24]	—	2.3 244.2038	244.2032	11.727	1.45	0.01	代谢产物	三七
15	5, 7-dihydroxy-4-methylcoumarin	5, 7-二羟基-4-甲基香豆素 ^[25]	—	1.55 192.0422	192.0419	11.417	1.51	0.00	代谢产物	丹参
16	queen bee acid	蜂王酸 ^[26]	—	4.96 186.1255	186.1246	10.618	1.51	0.00	代谢产物	三七
17	choline	胆碱 ^[12]	1.93	103.0997	103.0999	0.778	1.54	0.01	原形成分	丹参
18	decanoylcarnitine	癸酰肉碱 ^[19]	—	1.9 315.2409	315.2403	10.148	1.45	0.04	代谢产物	三七
19	6-gingerol	6-姜酚 ^[20]	—	0.88 294.1831	294.1828	11.421	1.54	0.01	代谢产物	三七
20	curcumol	莪术醇 ^[22]	—	2.27 236.1776	236.1770	13.631	1.51	0.02	代谢产物	三七
21	scoparone	6, 7-二甲氧基香豆素 ^[27]	—	1.73 206.0579	206.0575	11.395	1.47	0.03	代谢产物	丹参
22	5, 7-dihydroxy-4-methylcoumarin	5, 7-二羟基-4-甲基香豆素 ^[25]	—	1.55 192.0422	192.0419	11.417	1.55	0.00	代谢产物	丹参
23	7-hydroxycoumarine	7-羟基香豆素 ^[11]	—	1.71 162.0316	162.0314	9.943	1.33	0.01	代谢产物	丹参
24	choline	胆碱 ^[12]	1.93	103.0997	103.0999	0.778	1.33	0.00	原形成分	丹参
25	sarsasapogenin	知母皂苷元 ^[28]	—	1.87 416.3290	416.3282	15.001	1.28	0.02	代谢产物	三七
26	hecogenin	海柯皂苷元 ^[13]	—	1.9 430.3083	430.3074	13.179	1.29	0.03	代谢产物	三七
27	taurocholic acid	牛磺胆酸 ^[29]	—	1.56 515.2916	515.2908	9.313	1.28	0.02	代谢产物	三七
28	1-[(9Z) -hexadecenoyl]-sn- glycerophosphocholine	溶血磷脂酰胆碱 LPC (16 : 1) ^[30]	—	1.81 493.3168	493.3159	12.018	1.27	0.02	代谢产物	三七
29	α -linolenoyl ethanolamide	α -亚麻酰乙醇酰胺 ^[14]	—	1.64 321.2667	321.2662	15.746	1.29	0.02	代谢产物	三七、丹参
30	isosteviol	异甜菊醇 ^[31]	—	2.36 318.2194	318.2187	12.685	1.31	0.01	代谢产物	丹参
31	1, 7-bis (4-hydroxyphenyl) -3, 5-heptanediol	1, 7-双 (4-羟基苯基) -3, 5-庚二醇 ^[17]	—	0.91 316.1674	316.1671	11.472	1.32	0.01	原形成分	三七
32	gibberellin A7	赤霉素 A7 ^[18]	—	0.67 330.1467	330.1465	10.014	1.28	0.03	代谢产物	丹参
33	13 (R) -HODE	13S-羟基十八碳二烯酸 ^[32]	—	1.8 296.2351	296.2346	13.213	1.32	0.01	代谢产物	三七、丹参
34	α -eleostearic acid	α -亚麻酸 ^[33]	—	2.25 278.2245	278.2239	16.136	1.23	0.04	代谢产物	三七、丹参
35	16 α -hydroxyestrone	16 α -羟基雌酮 ^[34]	—	2.43 286.1568	286.1562	11.494	1.3	0.02	原形成分	丹参
36	decanoylcarnitine	癸酰肉碱 ^[19]	—	1.9 315.2409	315.2403	10.148	1.25	0.03	代谢产物	三七
37	6-gingerol	6-姜酚 ^[20]	—	0.88 294.1831	294.1828	11.421	1.31	0.01	代谢产物	三七
38	palmitoleic acid	棕榈油酸 ^[21]	—	2.48 254.2245	254.2239	12.883	1.29	0.02	代谢产物	三七
39	1, 4-dimethylanthraquinone	1, 4-二甲基蒽醌 ^[35]	—	2.33 236.0837	236.0831	10.252	1.3	0.02	代谢产物	丹参
40	curcumol	莪术醇 ^[22]	—	2.27 236.1776	236.1770	13.631	1.34	0.00	代谢产物	三七
41	2-hydroxymyristic acid	2-羟基十四烷酸 ^[24]	—	2.3 244.2038	244.2032	11.727	1.33	0.00	代谢产物	三七
42	jasmonic acid	茉莉酸 ^[36]	—	2 210.1255	210.1251	12.021	1.33	0.00	代谢产物	三七、丹参
43	senkyunolide A	洋川芎内酯 A ^[37]	—	1.28 192.1150	192.1147	11.466	1.25	0.04	代谢产物	丹参
44	scoparone	6, 7-二甲氧基香豆素 ^[27]	—	1.73 206.0579	206.0575	11.395	1.32	0.01	代谢产物	丹参
45	5, 7-dihydroxy-4-methylcoumarin	5, 7-二羟基-4-甲基香豆素 ^[25]	—	1.55 192.0422	192.0419	11.417	1.33	0.00	代谢产物	丹参
46	choline	胆碱 ^[12]	1.93	103.0997	103.0999	0.778	1.40	0.00	原形成分	丹参
47	panaxtriol	人参三醇 ^[19]	—	2.05 476.3865	476.3855	14.360	1.40	0.00	代谢产物	三七
48	hecogenin	海柯皂苷元 ^[13]	—	1.9 430.3083	430.3074	13.179	1.37	0.01	代谢产物	三七
49	α -linolenoyl ethanolamide	α -亚麻酰乙醇酰胺 ^[14]	—	1.64 321.2667	321.2662	15.746	1.35	0.02	代谢产物	三七、丹参
50	steviol	甜菊醇 ^[15]	—	2.11 318.2194	318.2188	13.842	1.32	0.04	代谢产物	三七
51	1, 7-bis (4-hydroxyphenyl) -3, 5-heptanediol	1, 7-双 (4-羟基苯基) -3, 5-庚二醇 ^[17]	—	0.91 316.1674	316.1671	11.472	1.40	0.00	原形成分	三七

续表 1

No.	英文名	中文名	误差 / $\times 10^{-6}$	理论值 m/z	测定值 m/z	保留时 间 /min	变量重 要性投影	P	成分类型	来源
52	13 (R) -HODE	13 (R) - 羟基十八碳二烯酸 ^[32]	- 1.8	296.2351	296.2346	13.213	1.36	0.01	代谢产物	三七、丹参
53	α -eleostearic acid	α - 亚麻酸 ^[33]	- 2.25	278.2245	278.2239	16.136	1.29	0.04	代谢产物	三七、丹参
54	16 α -hydroxyestrone	16 α - 羟基雌酮 ^[34]	- 2.43	286.1568	286.1562	11.494	1.38	0.01	原形成分	丹参
55	dihydrotanshinone I	二氢丹参酮 I ^[38]	- 2.63	278.0942	278.0935	12.517	1.39	0.01	原形成分	丹参
56	decanoylcarnitine	癸酰肉碱 ^[19]	- 1.9	315.2409	315.2403	10.148	1.32	0.03	代谢产物	三七
57	palmitoleic acid	棕榈油酸 ^[21]	- 2.48	254.2245	254.2239	12.883	1.35	0.02	代谢产物	三七
58	curcumol	莪术醇 ^[22]	- 2.27	236.1776	236.1770	13.631	1.4	0.00	代谢产物	三七
59	jasmonic acid	茉莉酸 ^[36]	- 2.00	210.1255	210.1251	12.021	1.36	0.01	代谢产物	三七、丹参
60	5, 7-dihydroxy-4-methylcoumarin	5, 7- 二羟基 -4- 甲基香豆素 ^[25]	- 1.55	192.0422	192.0419	11.417	1.40	0.00	代谢产物	丹参
61	queen bee acid	蜂王酸 ^[26]	- 4.96	186.1255	186.1246	10.618	1.37	0.01	代谢产物	三七
62	L-kynurenine	L- 犬尿氨酸 ^[39]	- 1.76	208.0847	208.0844	2.261	1.39	0.01	代谢产物	丹参

注：序号 1 ~ 16 为复方丹参丸组；序号 17 ~ 22 为复方丹参滴丸组；序号 23 ~ 45 为复方丹参颗粒组；序号 46 ~ 62 为复方丹参胶囊组。
Note: Serial numbers 1 to 16 are for the group of compound Danshen pills; serial numbers 17 to 22 are for the group of compound Danshen dropping pills; serial numbers 23 to 45 are for the group of compound Danshen granules; and serial numbers 46 to 62 are for the group of compound Danshen capsules group.

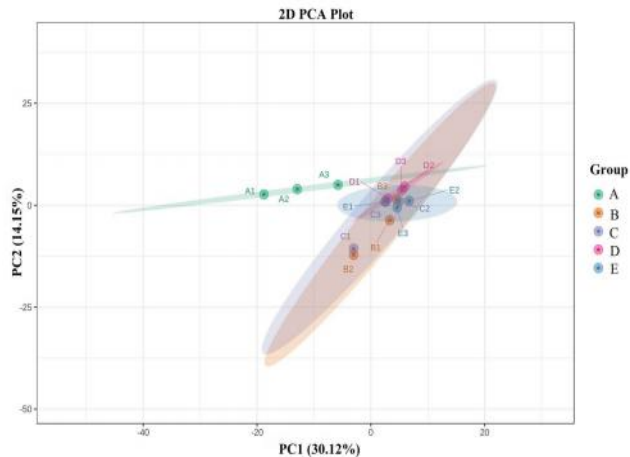


图 2 各组 PCA 得分
Fig 2 PCA score of each group

A. 空白血清组 (blank serum group); B. 复方丹参丸组 (compound Danshen pills group); C. 复方丹参滴丸组 (compound Danshen dropping pills group); D. 复方丹参颗粒组 (compound Danshen granules group); E. 复方丹参胶囊组 (compound Danshen capsules group)

预防心血管疾病和神经退行性疾病^[44]。结合成分差异以及剂型特点分析，复方丹参丸可能适合稳定型慢性病和轻度血栓预防，也能与西药联用增强对高血压、冠心病的治疗作用^[55-56]；滴丸因其含有的抗炎成分和胆汁酸成分，可用于急性炎症与高胆固醇血症等^[57]；颗粒因其抗氧化与挥发性成分的高效保留，相比于滴丸，可能更适用于慢性炎症与慢性呼吸系统疾病^[58]；胶囊可减少心肌氧化应激，延缓动脉粥样硬化进程，也可用于治疗慢性肝纤维化^[59-60]。

综上所述，通过对比入血前后 4 种复方丹参制剂的成分，复方丹参胶囊组与颗粒组相似度最高，胶囊组与丸剂组相似度次之，滴丸组与各组的相似度最低。4 种复方丹参制剂入血前后的差异

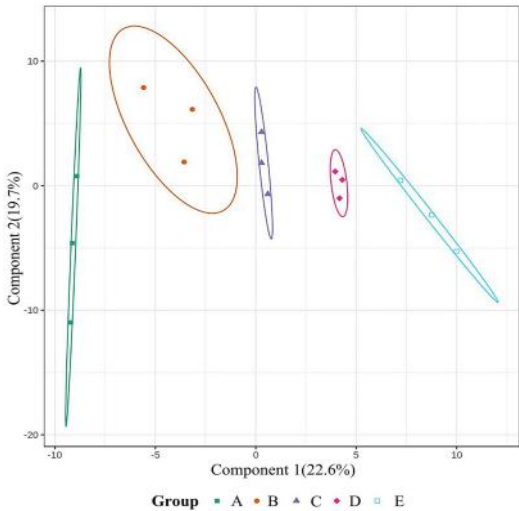


图 3 各组 OPLS-DA 得分
Fig 3 OPLS-DA score of each group

A. 空白血清组 (blank serum group); B. 复方丹参丸组 (compound Danshen pills group); C. 复方丹参滴丸组 (compound Danshen dropping pills group); D. 复方丹参颗粒组 (compound Danshen granules group); E. 复方丹参胶囊组 (compound Danshen capsules group)

很有可能是由组分比例的差异以及制剂工艺不同造成的。从组分比例上看，复方丹参滴丸中丹参在整个方中所占比例要高于其他 3 种制剂；从制剂工艺上来看，它通过滴丸技术优化活性成分的溶出，发挥了该剂型的高效与实用性，体现了该剂型的技术优势，相比于其他 3 种制剂，其在临床上应用也较为广泛，药效也受到广大患者的认可。中药入血后在体内发生极其复杂的变化，可能分布于不同位置，不限于血清，之后的研究可从其他方面出发进行检测。在未来实际应用中，4 种复方丹参制剂的作用特点还需进一步通过分子生物学等方法进行验证与探究。

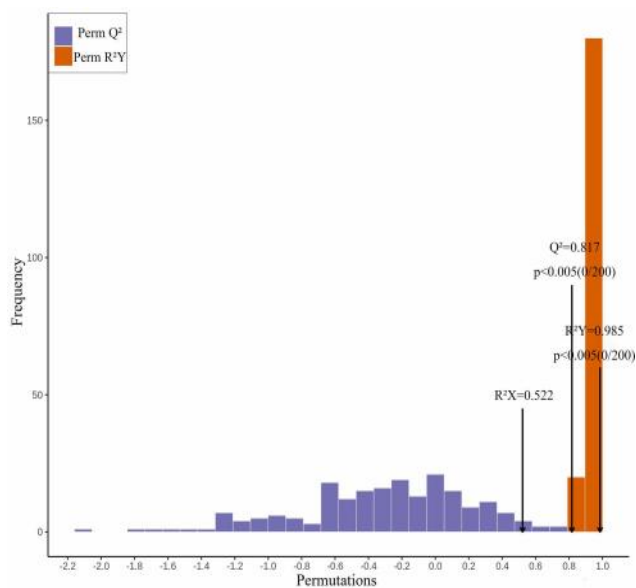


图 4 OPLS-DA 验证图

Fig 4 OPLS-DA validation diagram

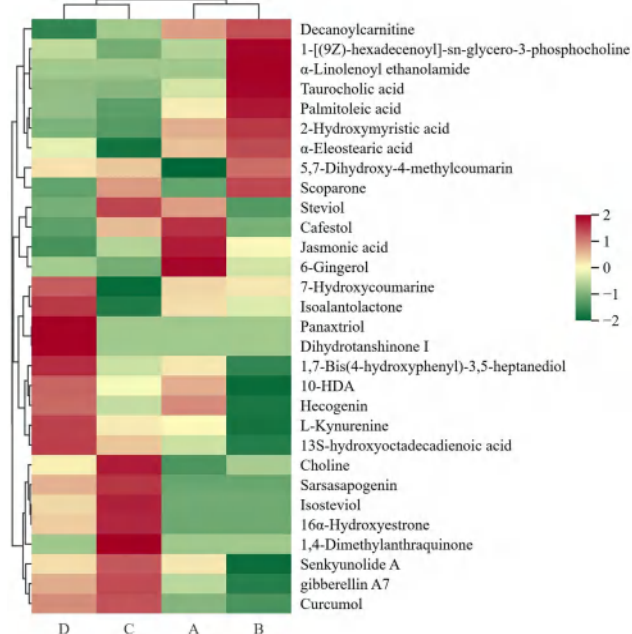


图 5 入血成分聚类热图

Fig 5 Clustered heatmap of blood-entry components

A. 复方丹参丸组 (compound Danshen pills group); B. 复方丹参滴丸组 (compound Danshen dropping pills group); C. 复方丹参颗粒组 (compound Danshen granules group); D. 复方丹参胶囊组 (compound Danshen capsules group)

3 讨论

中药制剂的质量与其制备过程中的成分变化紧密相关。中药的组成成分较为复杂,多味中药组合使用后,各成分的含量和种类可能会有所变化,这种变化在药品制备过程中尤为显著,因此可对药品的最终质量产生较大影响。在中药制剂的生产过程中,制药技术占据了核心地位,只有确保工艺流程的顺利进行,才能制造出符合高

标准要求的中药制剂^[40]。在2020年版《中国药典》一部中,收录了本次研究的4种复方丹参制剂,包括复方丹参丸(浓缩丸、滴丸)、胶囊和颗粒。这4种制剂在功效与适应证、药物组成上基本一致,除滴丸外,其他3种制剂中丹参、三七和冰片的比例为56.2:17.6:1,而滴丸中则为90:17.6:1,其丹参含量是其他3种制剂的1.6倍。此外,滴丸的制备方法和主要活性成分也与其他3种制剂存在显著差异^[41]。在制备工艺方面,除了滴丸在制备过程中对丹参和三七采用水提醇沉的工艺外,其他3种制剂均采用了醇提,随后进行浓缩的工艺来处理丹参。而三七的处理方法是将其粉碎成细粉,并在相似的程序和工艺控制下进行;至于冰片,在4种制剂中均经过研磨细化,然后根据不同剂型的特性,选择合适的辅料和工艺方法进行混合和成型^[42]。这种差异化的制备方法可能对最终产品的质量和疗效产生影响。

心肌缺血是心脏供血不足导致心肌缺氧的病理状态,其危害包括急性威胁和慢性损伤,发病率和死亡率高^[43-44]。复方丹参方是由丹参、三七、冰片3种中药组成的常用方剂,有活血化瘀、理气止痛的功效,治疗心绞痛等症状疗效确切。研究表明,丹参中的丹参酮ⅡA在多种病理状态下具有显著的抗炎效果,其作用机制包括抑制炎症反应,从而减缓动脉粥样硬化的进程^[45]。另一方面,三七中的人参皂苷成分能够阻断细胞外钙离子的内流以及其释放,进而非特异性地抑制由钙离子激动剂引起的心肌收缩,有助于预防钙离子超载现象^[46]。此外,冰片通过其冠状动脉扩张作用,能够增加冠脉血流量,从而缓解心肌缺血状况^[47]。这些活性成分的药理作用为相关疾病的治疗提供了潜在的药物治疗靶点。

通过本次研究得到4种复方丹参制剂含有丹酚酸B、隐丹参酮、丹参酮ⅡA等78种共有成分。除共有成分外,各个制剂都有区别于其他制剂的特有成分,复方丹参丸中的A-姜黄烯为较为常见植物精油的原料,已被报道在抗炎、抗氧化方面有一定的成效^[48-49],三七素为三七主要的止血活性成分,有很好的凝血效果^[50-51];复方丹参滴丸中的黄酮素,是一种主要从蓼属植物中提取的黄酮类化合物,已被证实具有抗氧化以及保护心血管等多种生物活性^[52-53];复方丹参颗粒中含有人参皂苷Rg₁,能够减轻过氧化氢引发的神经元细胞氧化应激,这一作用机制可能与其降低细胞内活性氧(ROS)及丙二醛(MDA)水平有关^[54],进一步的研究发现,在缺血再灌注过程中,人参皂苷Rg₁通过抑制了ROS的生成,从而对肠上皮细胞起到了保护作用^[54];复方丹参胶囊中的白杨素具有抗氧化、抗炎等广泛药理生理活性,有助于

本研究通过对 4 种不同的复方丹参制剂及对应的含药血清,采用液质联用技术进行分析,找出不同制剂的差异化学成分,以及通过多元统计方法找出制剂入血成分,从整体上了解不同复方丹参制剂的性质,并结合生物信息学对差异成分进行富集分析,结果显示不同的复方丹参制剂有其独有的作用特点及通路。本研究为进一步研究复方丹参制剂对心血管疾病的防治作用提供了参考和依据,也为临床用药选择增添了新角度。

参考文献

- [1] Xue YJ, Zhang LY, Zhang LS, et al. Danshensu prevents thrombosis by inhibiting platelet activation via SIRT1/ROS/mtDNA pathways without increasing bleeding risk [J]. *Phyto-medicine*, 2022, 104: 154271.
- [2] 叶扬帆, 蒋娇君. 复方丹参制剂的药理作用探讨 [J]. *淮海医药*, 2016, 34 (3): 344-345.
- [3] 王莹, 杜静. 液质联用技术在中药复方研究中的应用 [J]. *浙江中西医结合杂志*, 2015 (8): 799-800.
- [4] Zhao L, Zhang H, Li N, et al. Network pharmacology, a promising approach to reveal the pharmacology mechanism of Chinese medicine formula [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 309: 116306.
- [5] Gu PQ, Chen HJ. Modern bioinformatics meets traditional Chinese medicine [J]. *Brief Bioinform*, 2014, 15 (6): 984-1003.
- [6] Thevenot EA, Roux A, Xu Y, et al. Analysis of the human adult urinary metabolome variations with age, body mass index, and gender by implementing a comprehensive workflow for univariate and OPLS statistical analyses [J]. *J Proteome Res*, 2015, 14 (8): 3322-3335.
- [7] Wan MQ, Liu XY, Gao H, et al. Systematic analysis of the metabolites of angelicae pubescentis radix by UPLC-Q-TOF-MS combined with metabonomics approaches after oral administration to rats [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 188: 113445.
- [8] Chen SM, Dai BX, Zhang DD, et al. Advances in intelligent mass spectrometry data processing technology for in vivo analysis of natural medicines [J]. *Chin J Nat Med*, 2024, 22 (10): 900-913.
- [9] Jiang MT, Sha YY, Zou YD, et al. Integration of deep neural network modeling and LC-MS-based pseudo-targeted metabolomics to discriminate easily confused ginseng species [J]. *J Pharm Anal*, 2025, 15 (1): 101116.
- [10] Zeng J, Li YP, Wang CL, et al. Combination of in silico prediction and convolutional neural network framework for targeted screening of metabolites from LC-HRMS fingerprints: a case study of "pericarpium citri reticulatae-fructus aurantii" [J]. *Talanta*, 2024, 269: 125514.
- [11] Han S, Zhang PB, Lin HF, et al. Real-time monitoring the efficacy of 7-hydroxycoumarin to cells cultured on microfluidics in different extracellular pH environments by chip-mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2022, 243: 123331.
- [12] Koc H, Mar MH, Ranasinghe A, et al. Quantitation of choline and its metabolites in tissues and foods by liquid chromatography/electrospray ionization-isotope dilution mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2002, 74 (18): 4734-4740.
- [13] 李静娜, 吕西雨, 韩冰, 等. 基于 UHPLC-MS/MS 技术研究蒺藜炒制前后 7 个甾体皂苷在大鼠体内的组织分布 [J]. *中药材*, 2023, 46 (11): 2715-2722.
- [14] 张国媛, 李磊, 孟红旭, 等. 冠心病痰瘀互结证小型猪血浆代谢组学研究 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2023, 30 (6): 117-122.
- [15] Noitem R, Yuajit C, Soodvilai S, et al. Steviol slows renal cyst growth by reducing AQP2 expression and promoting AQP2 degradation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 101: 754-762.
- [16] 洪启迪, 董文江, 梅丽宝, 等. 基于热诱导的绿咖啡油氧化过程解析及活性成分变化规律研究 [J]. *热带作物学报*, 2021, 42 (11): 3327-3338.
- [17] Yang LY, Lin J, Zhou B, et al. Activity of compounds from *Taxillus sutchuenensis* as inhibitors of HCV NS3 serine protease [J]. *Nat Prod Res*, 2017, 31 (4): 487-491.
- [18] Nani BD, Sardi JCO, Lazarini JG, et al. Anti-inflammatory and anti-candida effects of brazilian organic propolis, a promising source of bioactive molecules and functional food [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68 (10): 2861-2871.
- [19] 张金花, 刘汉湘, 刘雨轩, 等. 基于血浆代谢组学探究三七总皂苷对 2 型糖尿病小鼠的降糖作用 [J]. *药学报*, 2024, 59 (4): 1028-1039.
- [20] 汪杰, 刘宇洁, 张静, 等. 基于化学计量法和指纹图谱对生姜不同处理方法的成分差异研究 [J]. *中草药*, 2024, 55 (9): 3107-3115.
- [21] Zhang JH, Zhao MJ, Yu HL, et al. Palmitoleic acid ameliorates metabolic disorders and inflammation by modulating gut microbiota and serum metabolites [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2024, 68 (7): e2300749.
- [22] 唐冰冰. 抗肿瘤中药单体莪术醇在大鼠中的吸收、分布和毒理学研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2023.
- [23] 袁园. HPLC 法同时测定康妇软膏中异土木香内酯、土木香内酯、花椒毒酚、氧化前胡素、欧前胡素和蛇床子素 [J]. *中国药师*, 2018, 21 (2): 339-342.
- [24] Zhang YD, Li P, Zheng N, et al. A metabolomics approach to characterize raw, pasteurized, and ultra-high temperature milk using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry and multivariate data analysis [J]. *J Dairy Sci*, 2018, 101 (11): 9630-9636.
- [25] 李偲. 5, 7-二羟基-4-甲基香豆素 (D4M) 通过调节 JNK/FoxO1 信号通路抑制氧化应激和细胞凋亡以减轻顺铂诱导的耳毒性的体外研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2023.
- [26] Zhao T, Xue XF, Liu PX, et al. Queen bee larva, an edible by-product of royal jelly, alleviate D-galactose-induced aging in mouse by regulating gut microbiota structure and amino acid metabolism [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2024, 13 (11): 1275.
- [27] Kumar C, Chibber P, Painuli R, et al. Scoparone chemical modification into semi-synthetic analogues featuring 3-substitution for their anti-inflammatory activity [J]. *Mol Divers*,

- 2024, 28 (4): 2467-2478.
- [28] 王晓婷, 于颖琦, 高慧. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 探究知母皂苷类成分质谱裂解规律[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37 (5): 2593-2597.
- [29] 马光朝, 章从恩, 马致洁, 等. 基于 LC/IT-TOF-MS 技术的雷公藤甲素干预溃疡性结肠炎的代谢组学研究[J]. 中草药, 2020, 51 (13): 3493-3500.
- [30] Li YB, Deng HY, Ju L, et al. Screening and validation for plasma biomarkers of nephrotoxicity based on metabolomics in male rats[J]. Toxicol Res (Camb), 2016, 5 (1): 259-267.
- [31] Jin HP, Gerber JP, Wang JP, et al. Oral and i. v. pharmacokinetics of isosteviol in rats as assessed by a new sensitive LC-MS/MS method[J]. J Pharm Biomed Anal, 2008, 48 (3): 986-990.
- [32] Ahmad MI, Umair IM, Hussain M, et al. High fat diet incorporated with meat proteins changes biomarkers of lipid metabolism, antioxidant activities, and the serum metabolomic profile in Glrx1^{-/-} mice[J]. Food Funct, 2020, 11 (1): 236-252.
- [33] 梁晓莲, 桂雄斌, 赵凤仙, 等. 咽痒咳合剂挥发油成分分析及薄层色谱鉴别研究[J]. 辽宁中医杂志, 2025, 52 (3): 140-145.
- [34] Chen XP, Talati M, Fessel JP, et al. Estrogen metabolite 16alpha-hydroxyestrone exacerbates bone morphogenetic protein receptor type II-associated pulmonary arterial hypertension through microRNA-29-mediated modulation of cellular metabolism[J]. Circulation, 2016, 133 (1): 82-97.
- [35] 何婷, 王亚楠, 王银洁, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨青龙衣治疗白癜风的物质基础及作用机制[J]. 亚太传统医药, 2021, 17 (12): 182-189.
- [36] 李姝诺, 高守红, 陈军峰, 等. 基于 UHPLC-MS/MS 的药用植物内源性激素含量检测方法及其黄花蒿不同器官激素的测定[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24 (5): 1865-1874.
- [37] 张奥, 段天华, 徐荣荣, 等. 基于 UHPLC-Q-TOF-MS 技术的洋川芎内酯 A 在大鼠体内的代谢产物分析[J]. 中国药理学杂志, 2023, 58 (14): 1287-1294.
- [38] Zeng H, Wang LL, Zhang JW, et al. Activated PKB/GSK-3beta synergizes with PKC-delta signaling in attenuating myocardial ischemia/reperfusion injury via potentiation of NRF2 activity: therapeutic efficacy of dihydrotanshinone- I [J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11 (1): 71-88.
- [39] 徐开成, 于瑞莲, 杨云菲, 等. LC-MS/MS 法同时测定大鼠血浆中 L-色氨酸和 L-犬尿氨酸浓度的研究[J]. 中国药科大学学报, 2016, 47 (6): 714-718.
- [40] 万鑫浩, 舒清霞, 王子千, 等. 基于工艺与装备视角分析中药制剂质量的关键影响因素[J]. 中国中药杂志, 2024, 49 (6): 1699-1704.
- [41] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 1305-1312.
- [42] 张翠莲, 王彪, 刘芳, 等. 5 种复方丹参口服制剂质量标准对比分析与启示[J]. 中国药事, 2021, 35 (4): 390-396.
- [43] 苏未, 张颖, 马爽. 1990—2019 年中国和全球缺血性心脏病疾病负担变化趋势与发病预测分析[J]. 中国全科医学, 2024, 27 (19): 2375-2381, 2387.
- [44] Liu TT, Wang QQ, Yao KW. Huoxue Wentong Formula ameliorates myocardial infarction in rats through inhibiting CaMK II oxidation and phosphorylation[J]. Chin Med, 2020, 15: 3.
- [45] Chang CC, Chu CF, Wang CN, et al. The anti-atherosclerotic effect of tanshinone II A is associated with the inhibition of TNF-alpha-induced VCAM-1, ICAM-1 and CX3CL1 expression[J]. Phytomedicine, 2014, 21 (3): 207-216.
- [46] Wang XY, Wang Y, Jiang M, et al. Differential cardioprotective effects of salvianolic acid and tanshinone on acute myocardial infarction are mediated by unique signaling pathways[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 135 (3): 662-671.
- [47] Zhu D, Wu L, Li CR, et al. Ginsenoside Rg1 protects rat cardiomyocyte from hypoxia/reoxygenation oxidative injury via antioxidant and intracellular calcium homeostasis[J]. J Cell Biochem, 2009, 108 (1): 117-124.
- [48] Mahdavi A, Bagherniya M, Mirenayat MS, et al. Medicinal plants and phytochemicals regulating insulin resistance and glucose homeostasis in type 2 diabetic patients: a clinical review[J]. Adv Exp Med Biol, 2021, 1308: 161-183.
- [49] 李成慧, 左文明, 李锦萍, 等. 金露梅中一种 α -葡萄糖苷酶抑制剂的提取富集及活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35 (3): 460-466.
- [50] 王珍, 宋书杰, 赵守涣, 等. 三七素对凝血功能的影响及止血机制[J]. 中国新药杂志, 2014, 23 (3): 356-359.
- [51] Mancuso C. Panax notoginseng: pharmacological aspects and toxicological issues[J]. Nutrients, 2024, 16 (13): 2120.
- [52] Shin MS, Park JY, Lee J, et al. Anti-inflammatory effects and corresponding mechanisms of cirsimaritin extracted from *Cirsium japonicum* var. *maackii* maxim[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2017, 27 (14): 3076-3080.
- [53] Yan HY, Wang HQ, Ma LL, et al. Cirsimaritin inhibits influenza A virus replication by downregulating the NF-kappaB signal transduction pathway[J]. Virol J, 2018, 15 (1): 88.
- [54] Wang Y, Liu Q, Xu YQ, et al. Ginsenoside Rg₁ protects against oxidative stress-induced neuronal apoptosis through myosin II A-actin related cytoskeletal reorganization[J]. Int J Biol Sci, 2016, 12 (11): 1341-1356.
- [55] 董雪花, 王超, 王冰. 复方丹参丸联合阿司匹林实施在冠心病患者中治疗的临床效果分析[J]. 中国保健营养, 2021, 31 (21): 182.
- [56] 吴庆柏. 复方丹参丸联用卡托普利和非洛地平治疗高血压冠心病疗效观察[J]. 现代诊断与治疗, 2013 (13): 2926-2927.
- [57] 李峰, 张娟. 复方丹参滴丸对老年冠心病患者血液流变学及血脂的影响[J]. 世界复合医学, 2021, 7 (7): 64-67.
- [58] 洪艳, 文晓霞, 李莎, 等. LC-MS/MS 法同时测定复方丹参颗粒和复方丹参滴丸中 6 种成分[J]. 中成药, 2019, 41 (2): 270-274.
- [59] 赵琳. 丹参和补骨脂的体外抑菌活性及隐丹参酮、二氢丹参酮 I 的抑菌机制研究[D]. 开封: 河南大学, 2012.
- [60] 陶朝阳, 朱臻宇, 邢心睿, 等. 基于 LC-MS 技术的二氢丹参酮 I 抗肝纤维化肝脏代谢组学研究[J]. 药学实践杂志, 2021, 39 (5): 403-408, 471.

(收稿日期: 2025-03-17; 修回日期: 2025-06-16)

基于网络药理学和体外实验探究白鲜皮诱导铁死亡致肝损伤机制

贺文杰¹, 孙慧娟¹, 邓戈宇¹, 黄琳¹, 卢芳^{2*}, 刘树民² (1. 黑龙江中医药大学研究生院, 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江中医药大学中医药研究院, 哈尔滨 150040)

摘要: **目的** 在细胞水平探究白鲜皮诱导铁死亡致肝损伤机制, 并通过网络药理学和分子对接技术预测白鲜皮诱导铁死亡致肝损伤的主要活性成分以及潜在靶点。**方法** 在 TCMSP 数据库筛选白鲜皮主要活性成分及作用靶点, 在 DisGeNET 数据库和 GeneCards 数据库筛选铁死亡和肝损伤的疾病靶点, 在 Venny 网站筛选药物与疾病的交集靶点, 并在 STRING 数据库中完成蛋白质相互作用网络 (PPI) 的构建并筛选出核心靶点, 通过 Cytoscape 进行可视化分析, 在 DAVID 数据库进行 GO 和 KEGG 富集分析, 最后利用 AutoDock 进行分子对接。通过 CCK-8 筛选细胞实验给药浓度, 通过 q-PCR 和蛋白免疫印迹 (Western blot) 法检测细胞 Nrf2/HO-1/GPX4 通路的 mRNA 和蛋白的表达情况。对 Nrf2 进行过表达, 验证其在铁死亡过程中的作用。**结果** 网络药理学筛选出白鲜皮中的潜在毒性成分为栲酮、黄柏酮和茵芋碱, 潜在靶点为周期蛋白依赖性激酶 1 (CDK1)、表皮生长因子受体 (EGFR)、糖原合成酶激酶 3 β (GSK3B), 毒性成分与靶点之间具有显著的结合活性, 并且与铁死亡相关靶点铁蛋白 (Ferritin) 和 Nrf2 也具有显著的结合活性。在给予不同浓度的白鲜皮含药培养基后, 给药组 Nrf2/HO-1/GPX4 的 mRNA 和蛋白表达显著下调。**结论** 栲酮、黄柏酮和茵芋碱是白鲜皮中潜在的毒性成分, 而 CDK1、EGFR 和 GSK3B 是白鲜皮诱导铁死亡致肝损伤的潜在靶点, 白鲜皮可能通过抑制 Nrf2 的表达, 进而抑制 HO-1 和 GPX4 的活性, 从而诱导铁死亡引起肝损伤。

关键词: 白鲜皮; 铁死亡; 药源性肝损伤; 网络药理学; 分子对接

中图分类号: R285, R286 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)12-3544-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.012

Mechanism of Dictamni Cortex-induced liver injury via ferroptosis based on network pharmacology and in vitro experiments

HE Wenjie¹, SUN Huijuan¹, DENG Geyu¹, HUANG Lin¹, LU FANG^{2*}, LIU Shumin² (1. School of Graduate, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040; 2. Institute of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040)

Abstract: Objective To determine the mechanism of Dictamni Cortex induced ferroptosis in liver injury at the cellular level, and to predict the main active components and potential targets of Dictamni Cortex induced ferroptosis in liver injury through network pharmacology and molecular docking. **Methods** The main active ingredients and their targets were screened in TCMSP database. The disease targets of ferroptosis and liver injury were screened in DisGeNET database and GeneCards database. The intersection targets of drugs and diseases were screened in Venny website, and the PPI protein network was established and core targets were screened in STRING database. Cytoscape was used for visualization analysis, and GO and KEGG enrichment analysis were performed in DAVID database. AutoDock was used for the molecular docking. In the cell experiment, the drug concentration was screened by CCK-8, and the mRNA and protein expressions of Nrf2/HO-1/GPX4

基金项目: 国家重点研发计划 - 中医药现代化 (No.2022YFC3502100, No.2022YFC3502102, No.2022YFC3502102-04)。

作者简介: 贺文杰, 男, 硕士研究生, 主要从事中药药性理论及药物功效研究, email: 1849729853@qq.com *通信作者: 卢芳, 女, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事中药药性理论及药物功效研究, email: lufang_1004@163.com

pathway were detected by q-PCR and Western blot. Nrf2 was overexpressed to verify its role in ferroptosis. **Results** Network pharmacology showed that the potential toxic components in Dictamni Cortex included fraxinellone, obacunone and skimmianin, and the potential targets included cyclin-dependent kinase 1 (CDK1), epidermal growth factor receptor (EGFR) and glycogen synthase kinase 3 β (GSK3B). There were significant binding activities between the toxic components and the targets. Moreover, ferritin and Nrf2 also had obvious binding activity with ferroptosis-related targets. The mRNA and protein expressions of Nrf2/HO-1/GPX4 were much down-regulated after the cells were treated with different concentrations of Dictamni Cortex drug containing the medium. **Conclusion** Fraxinellone, obacunone and skimmianin are potential toxic components in Dictamni Cortex, while CDK1, EGFR and GSK3B are potential targets of Dictamni Cortex to induce ferroptosis in liver injury. Dictamni Cortex may inhibit the expression of Nrf2 and the activities of HO-1 and GPX4, thereby inducing the ferroptosis and further causing liver injury.

Key words: Dictamni Cortex; ferroptosis; drug-induced liver injury; network pharmacology; molecular docking

白鲜皮为芸香科植物白鲜 (*Dictamnus dasycarpus* Turcz.) 的干燥根皮, 性苦、寒, 归脾、胃、膀胱经, 具有清热燥湿、祛风解毒的功效, 临床常用于皮肤病和湿热黄疸的治疗, 现代药理学研究表明白鲜皮具有抗炎、抗菌、抗过敏和免疫调节的作用^[1]。中医认为“是药三分毒”, 越来越多的临床研究表明, 长期或过量使用白鲜皮及其复方制剂会导致药源性肝毒性 (DILI)。当白鲜皮临床用药剂量达到规定剂量的 10 倍^[2], 就会引起肝损伤, 并且有研究表明白鲜皮中的呋喃类化合物可以通过叠加效应共同作用产生肝毒性^[3]。DILI 是指药物或其代谢产物对肝脏造成的损害, 引起肝功能的损伤, 严重时会导致患者肝功能衰竭, 甚至死亡^[4]。

铁死亡 (ferroptosis) 是一种铁依赖性的、以脂质过氧化物积累为特征的新型细胞程序性死亡形式, 目前已被证实参与多种肝损伤过程^[5]。本课题组前期基于尿液代谢组学发现, 白鲜皮水提液引起大鼠肝毒性与铁死亡有关^[6]。然而白鲜皮诱导铁死亡引起肝损伤的具体原因尚不明确, 且此类研究很少, 因此本研究通过阐明白鲜皮诱导铁死亡的机制, 预测其毒性成分和潜在靶点, 为日后预防及治疗白鲜皮的肝毒性提供新的思路及见解。

网络药理学是一门以相互作用网络为理念的学科, 预测药物治疗疾病的信号通路及治疗疾病的作用机制。分子对接是一种计算模拟技术, 通过预测小分子与生物大分子的结合模式和亲和力, 筛选潜在药物候选分子。两者结合有利于发现药物作用的新的靶点和通路, 尤其适用于中药多成分-多靶点研究^[7]。

1 材料

1.1 试药

白鲜皮药材 (批号: Y057-23-05-001, 产地: 辽宁, 河北全泰药业), 经黑龙江中医药大学药学院药用植物教研室南洋副教授鉴定为芸香科植物白鲜的干燥根皮。人源肝细胞 (HepaRG) (上海冠导生物)。优级胎牛血清 (批号: S9020, 北京索莱宝); 细胞增殖-毒性检测试剂盒 (CCK-8)、细胞冻存液、胰酶溶液、超灵敏化学发光检测试剂盒 (上海雅酶); RPMI 1640 培养基、青链霉素混合双抗、Nrf2 抗体、HO-1 抗体、GPX4 抗体 (批号分别为 G4532-8500mL、G4003-100mL、GB113808-50、GB115713-50、GB154327-50, Servicebio); RNAiso Plus (批号: AM61709A, 哈尔滨宝士得); PCR 去基因组与逆转录预混液、通用型快速抗体染料法定量 PCR 预混液 (莫纳生物); PCR 引物由黑龙江箭速基因科技有限公司设计合成。

1.2 仪器

371 型细胞培养箱、M2000Pro 型酶标分析仪 (赛默飞世科技中国有限公司); Nikon Eclipse C1 型正置显微镜 (日本尼康); ChemiScope 5300 型化学发光成像系统 (上海勤翔科学仪器); BC200 型细胞计数仪 (吉林星博医疗器械); Quantstudio3 型实时荧光定量仪器 (上海沃特世); HFsafe-1200LC 型超净工作台 (上海力申科学仪器)。

2 方法

2.1 网络药理学

在 TCMSP 数据库 (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>) 输入“白鲜皮”进行检索, 以口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 和结合类药性 (DL) ≥ 0.18 筛选白鲜皮的主要活性成分及其作用靶点^[8]。GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 数据库中以“drug-induced liver injury”和“ferroptosis”检索

获取药源性肝损伤和铁死亡的相关靶点。在 Venny 2.1.0 网站中构建“白鲜皮”“药源性肝损伤”和“铁死亡”的韦恩图，并获取三者交集靶点，通过 Cytoscape 3.9.1，构建药物-成分-靶点-疾病网络图。再将交集靶点导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org>) 构建蛋白质相互作用 (PPI) 网络^[9]，并用 Cytoscape 3.9.1 进行可视化展示，根据 Degree 值筛选出核心靶点。在 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov>) 对交集靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析^[10]，分别将前 10 条和前 20 条项目导入维生信 (www.bioinformatics.com.cn) 平台绘制生物学过程 (BP)、细胞组分 (CC)、分子功能 (MF) 三合一柱状图以及 KEGG 富集气泡图。

2.2 分子对接实验

在 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 获取白鲜皮核心活性成分的 3D 结构，作为配体^[11]。在 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 中获取 PDB 文件格式的核心靶点蛋白^[12]，作为受体。通过 AutoDockVina 和 Pymol 软件进行分子对接和可视化，并计算结合能，当结合能数值小于 -20.9 kJ/mol 时，表明配体和受体之间具有良好的结合活性；当结合能数值小于 -29.3 kJ/mol 时，表明具有显著的结合活性。

2.3 白鲜皮提取物的制备

取白鲜皮 300 g，加入 8 倍体积的蒸馏水，浸泡 30 min 后回流提取 30 min，转移药液后再加入 6 倍体积的蒸馏水，回流提取 30 min，将两次药液合并，置于旋转蒸发仪中浓缩，浓缩液冻干后备用。

2.4 细胞常规培养

在复苏的 HepaRG 细胞中加入完全培养基，放入 37℃、5%CO₂ 的培养箱中培养，显微镜下观察细胞融合度达到 80%~90% 时，磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 3 次，加入胰酶消化 3~4 min 后，加入完全培养基终止消化，以 1:2 进行传代。

2.5 CCK-8 法检测细胞活性并筛选给药浓度

称取 2.5 g 白鲜皮冻干粉溶于 50 mL 脂多糖 (LPS) 溶液，配制 50 mg/mL 的白鲜皮药液，再用完全培养基 (RPMI 1640 普通培养基+10% 胎牛血清+1% 青链霉素双抗) 稀释为不同浓度的白鲜皮含药培养基。

选取生长状态良好的对数生长期细胞，常规消化后，制成细胞悬液。以每 100 μL 最少 2500 个细胞的浓度接种至 96 孔板中，每组 6 个复孔，37℃、5%CO₂ 的培养箱中培养，待细胞融合度达 50% 时加药。设置空白组 (培养基)、对照组 (只有细胞) 以及 6 个给药组 (白鲜皮的质量浓度分别为 1、2、4、

6、8、10 mg/mL)。继续培养 24 h 后，每孔加入 100 μL 的 CCK-8 溶液，孵育 2 h，取出细胞培养板，用酶标仪检测 450 nm 处的 OD 值，计算细胞存活率。细胞存活率 (%) = [给药组 OD 值 - 空白组 OD 值] / [对照组 OD 值 - 空白组 OD 值] × 100%。

2.6 细胞分组与给药

取对数生长期细胞，常规消化细胞离心后，弃去上清液，加入 2 mL 完全培养基制成细胞悬液，细胞计数仪计数，以每孔 (2~2.5) × 10⁵ 个细胞接种，分为 Control 组、白鲜皮高剂量组 (8 mg/mL, CD-H)、白鲜皮中剂量组 (6 mg/mL, CD-M) 和白鲜皮低剂量组 (4 mg/mL, CD-L)，待细胞融合度在 80% 以上，PBS 清洗，分别加入完全培养基以及不同浓度的白鲜皮含药培养基，放入培养箱中，24 h 后提取细胞 RNA 进行 PCR 实验，48 h 后提取细胞蛋白进行 Western blot 实验。

2.7 q-PCR 检测细胞中 Nrf2、HO-1、GPX4 mRNA 的表达

用 Trizol 法提取细胞中的 RNA，逆转录为 cDNA，在荧光定量 PCR 仪上进行扩增，以 GAPDH 为内参，用 2^{-ΔΔCT} 法计算目的基因 Nrf2、HO-1、GPX4 的 mRNA 相对表达量。引物序列信息见表 1。

表 1 引物序列

Tab 1 Primer sequence

基因		引物序列 (5'-3')
GAPDH	F	GTCAAGGCTGAGAACGGGAA
	R	AAATGAGCCCCAGCCTTCTC
Nrf2	F	GCTGAGCCCAGTATCAGCAA
	R	TTCTGTGTGCTTTCAGGGT
HO-1	F	AGTCTTCGCCCCTGTCTACT
	R	CTTCACATA GCGCTGCATGG
GPX4	F	TGAAGATCCAACCCAAGGGC
	R	TCTTGTCGATGAGGAACGTGTGG

2.8 Western blot 检测细胞中 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白的表达

提取细胞蛋白，用 RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂 (100:1) 配制裂解混合液。弃去培养基，PBS 清洗 1 遍，每孔加入 400 μL 裂解混合液，涡旋，室温静置 30 min，4℃、12 000 g 离心 15 min，取上清液备用。BCA 法测定蛋白浓度后，取等量蛋白样品进行凝胶电泳分离，采用免冰浴快速转膜法将蛋白转印至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上，用 5% 的脱脂牛奶封闭 1 h，加入一抗 Nrf2、HO-1、GPX4、GAPDH 孵育，4℃过夜，摇床上轻摇 1 h，用 TBST 洗膜 3 次后，加入二抗 (1:5000) 孵育，摇床上轻摇 1 h，TBST 洗膜后加入 ECL 显影液，显影仪采集图片，通过 Image J 分析条带灰度值。

2.9 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。SPSS 27.0.1 软件分析显著性，多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)，两两比较采用 LSD 检验。实验结果采用 GraphPad Prism 9 软件生成柱状图。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 网络药理学的预测结果

从 TCMSP 数据库中获得白鲜皮活性成分共 63 种，其中 $OB \geq 30\%$ ， $DL \geq 0.18$ 的有 14 种 (见表 2)，靶点 390 个。在 GeneCards 数据库收集到药源性肝损伤疾病靶点 2559 个，铁死亡疾病靶点 1866 个。将白鲜皮作用靶点与疾病靶点导入 Venny 2.1.0 中，共获得交叉靶点 53 个。将交集靶点导入 STRING 数据库，构建 PPI 蛋白网络 (见图 1)，再将 PPI 网络信息导入 Cytoscape 3.9.1 中，构建其核心靶点互作图 (见图 2A)，并构建“药物-活性成分-靶点-疾病”网络示意图 (见图 2B)。图中白鲜皮连接不同的活性成分，各个成分连接了药物与疾病的交集靶点，连线越多，说明其为关键成分，由图 2 可知，白鲜皮中的梣酮 (fraxinellone)、黄柏酮 (obacunone)、茵芋碱 (skimmianin) 等较为关键，将其作为核心活性成分，周期蛋白依赖性激酶 1 (CDK1)、表皮生长因子受体 (EGFR)、糖原合成酶激酶 3 β (GSK3B) 为核心靶点，并对其进行分子对接。

将筛选得到的白鲜皮诱导铁死亡致肝损伤的交集靶点数据导入 DAVID 数据库，进行 GO 和 KEGG 富集分析。结果共富集到 429 个 GO 条目，其中 279 个生物学过程、58 个细胞成分和 92 个分子功能，根据 P 值选择最显著的前 10 项进行展示，主要包括凋亡过程的负调控、蛋白质磷酸化、蛋白质复合物等，见图 3A。富集到 111 个 KEGG 条目，根据 P 值选择最显著的前 20 项进行展示，图中圆形越大，则证明富集到 KEGG 条目上的基因数目越多，圆形越小则基因数目越少，此外圆形越红，证明 P 值越显著，主要包括癌症中的信号通路、PI3K/Akt 信号通路、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性等多个通路，见图 3B。

3.2 分子对接结果

结果显示，活性化合物梣酮、黄柏酮、茵芋碱与核心靶点结合能均小于 -25.1 kJ/mol，表明 3 种活性成分与核心靶点具有良好的结合活性。此外，3 种活性成分与 Ferritin 和 Nrf2 的结合能均小于 -20.9 kJ/mol，表明白鲜皮中的主要活性

表 2 白鲜皮主要有效成分信息

Tab 2 Ingredient information of the main active ingredients of Cortex dictamni

MOLID	成分名称	OB/%	DL
MOL000173	汉黄芩素 (wogonin)	30.68	0.23
MOL002663	茵芋碱 (skimmianin)	40.14	0.20
MOL000358	β -谷甾醇 (beta-sitosterol)	36.91	0.75
MOL005043	胆甾-5-烯-3 β -醇 (campest-5-en-3beta-ol)	37.58	0.71
MOL000006	木犀草素 (luteolin)	36.16	0.25
MOL006233	3'-O-甲基花旗松素 (3'-O-methyl taxifolin)	48.36	0.30
MOL006235	白鲜明碱 (dasycarpamin)	59.14	0.21
MOL006236	柠檬苦素 (limonin diosphenol)	91.69	0.55
MOL006261	异斑点沸林草碱 (isomaculosidine)	31.99	0.20
MOL013352	黄柏酮 (obacunone)	43.29	0.77
MOL006268	前茵芋碱 (preskimmianine)	42.14	0.21
MOL006270	甘遂烷型三萜类 (tirucallane)	44.02	0.75
MOL006258	梣酮 (fraxinellone)	35.96	0.13
MOL000098	槲皮素 (quercetin)	46.43	0.28

成分与铁死亡的核心靶点之间具有良好的结合活性。尤其是黄柏酮，与各核心靶点的结合活性最强 (见表 3 及图 4)。

表 3 各成分与核心靶点的结合能 (kJ/mol)

Tab 3 Binding energy of each component to the core target(kJ/mol)

靶点	CDK1	EGFR	GSK3B	Ferritin	Nrf2
梣酮	-31.6	-28.4	-30.1	-23.4	-22.6
黄柏酮	-33.9	-36.4	-36.4	-30.5	-32.2
茵芋碱	-31.8	-25.1	-25.5	-22.2	-20.9

3.3 CCK-8 检测细胞活性并筛选给药浓度

当白鲜皮质量浓度为 1 mg/mL 时，对 HepaRG 细胞的活力几乎无影响，但在质量浓度为 2 ~ 10 mg/mL 时，细胞活力显著降低 ($P < 0.05$)，且随着给药浓度的不断增加，细胞活力不断下降，表明白鲜皮对肝细胞具有毒性作用，见图 5。因此选择 4、6、8 mg/mL 分别作为白鲜皮低、中、高剂量组进行后续实验。

3.4 细胞中 Nrf2/HO-1/GPX4 通路的 mRNA 和蛋白表达情况

与 Control 组相比，各给药组中 Nrf2、HO-1、GPX4 mRNA 的相对表达量均显著降低 ($P < 0.001$)，且随着白鲜皮给药剂量的升高依次下降，结果见图 6。Western blot 结果显示，与 Control 组相比，各给药组细胞中 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白表达量显著下降 ($P < 0.001$)，表明白鲜皮可以抑制 Nrf2、HO-1、GPX4 的表达，见图 7。

4 讨论

本实验通过网络药理学发现，白鲜皮中潜在的毒性成分为梣酮、黄柏酮、茵芋碱等，且与药

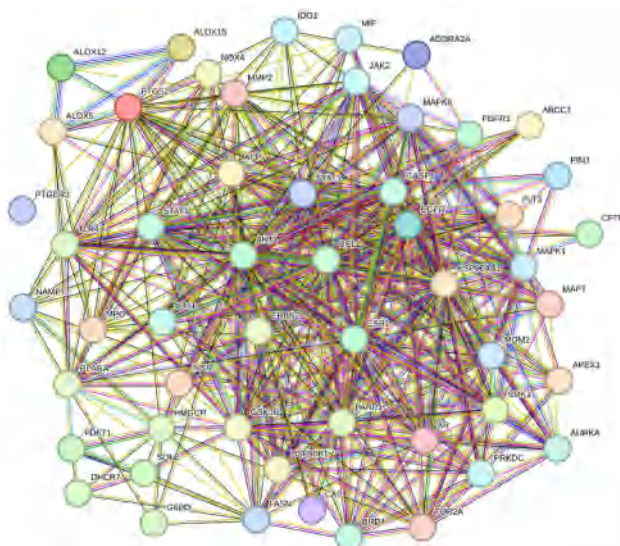


图 1 药物有效成分与疾病靶点 PPI 网络
Fig 1 PPI network between drug active ingredients and disease targets

源性肝损伤和铁死亡的核心靶点 CDK1、EGFR、GSK3B 进行分子对接后具有显著的结合活性，并且与铁死亡的关键靶点 Ferritin 和 Nr2 也具有良好的结合活性。CDK1 作为调控细胞周期的关键蛋白，在促进 G₂ 期向 M 期转换过程中起核心作用，并参与调控蛋白质磷酸化过程^[13]。该蛋白可能通过影响细胞周期进展及铁死亡相关蛋白的磷酸化修饰来调节细胞对铁死亡的敏感性。EGFR 作为一种跨膜酪氨酸激酶受体，在调控细胞生长、分化、存活及运动等生物学过程中具有重要作用。已有证据显示，EGFR 能够通过激活 PI3K/AKT/mTOR 信号转导途径，上调 GPX4 的表达水平，进而抑制脂质过氧化反应，提高细胞对铁死亡的抵抗能力^[14]。值得注意的是，携带 EGFR 突变的肿瘤细胞可能通过改变铁代谢相关蛋白的表达水平来提

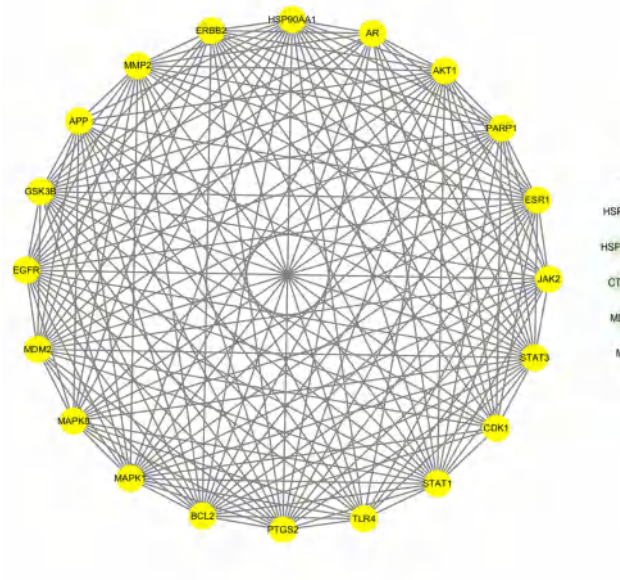


图 2 疾病核心靶点互作网络与药物 - 成分 - 靶点网络
Fig 2 Disease core target interaction network and drug-ingredient-target network

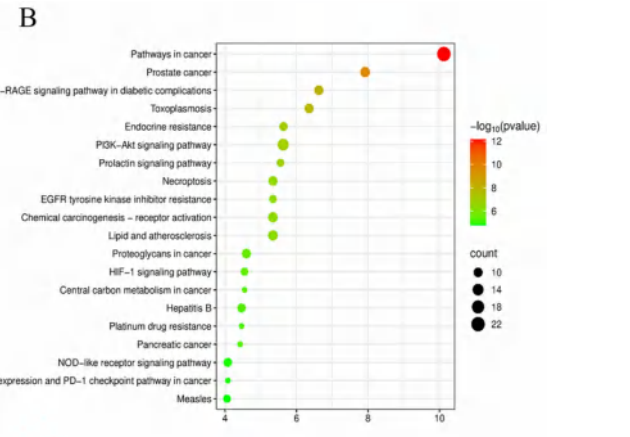
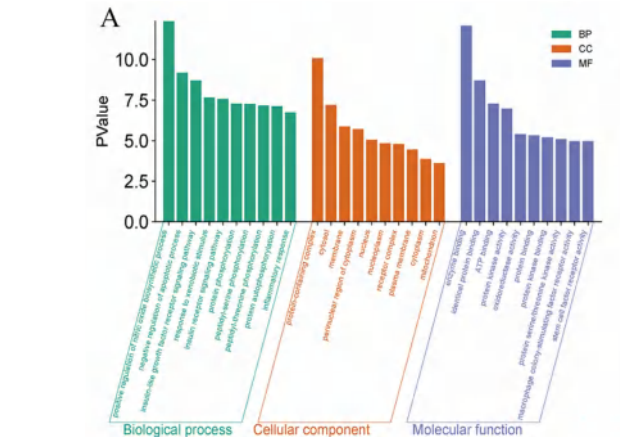
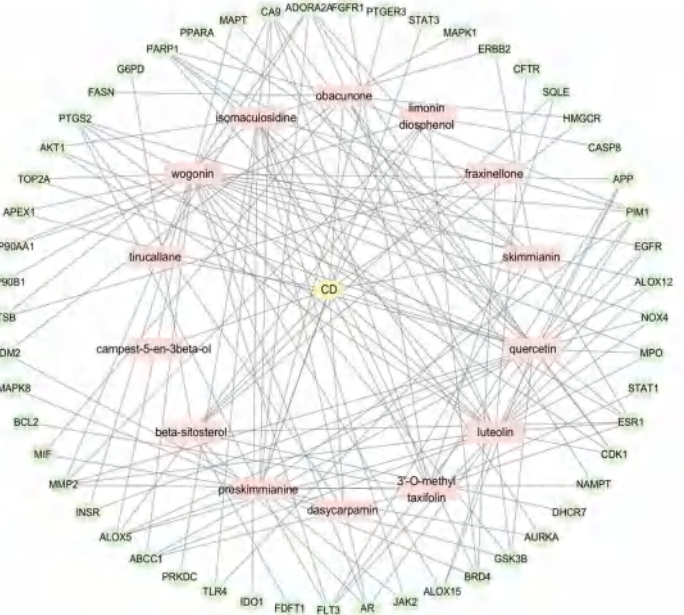


图 3 药物与疾病交集靶点的 GO (A) 和 KEGG (B) 富集分析结果
Fig 3 Results of GO (A) and KEGG (B) enrichment analysis of drug-disease intersection targets

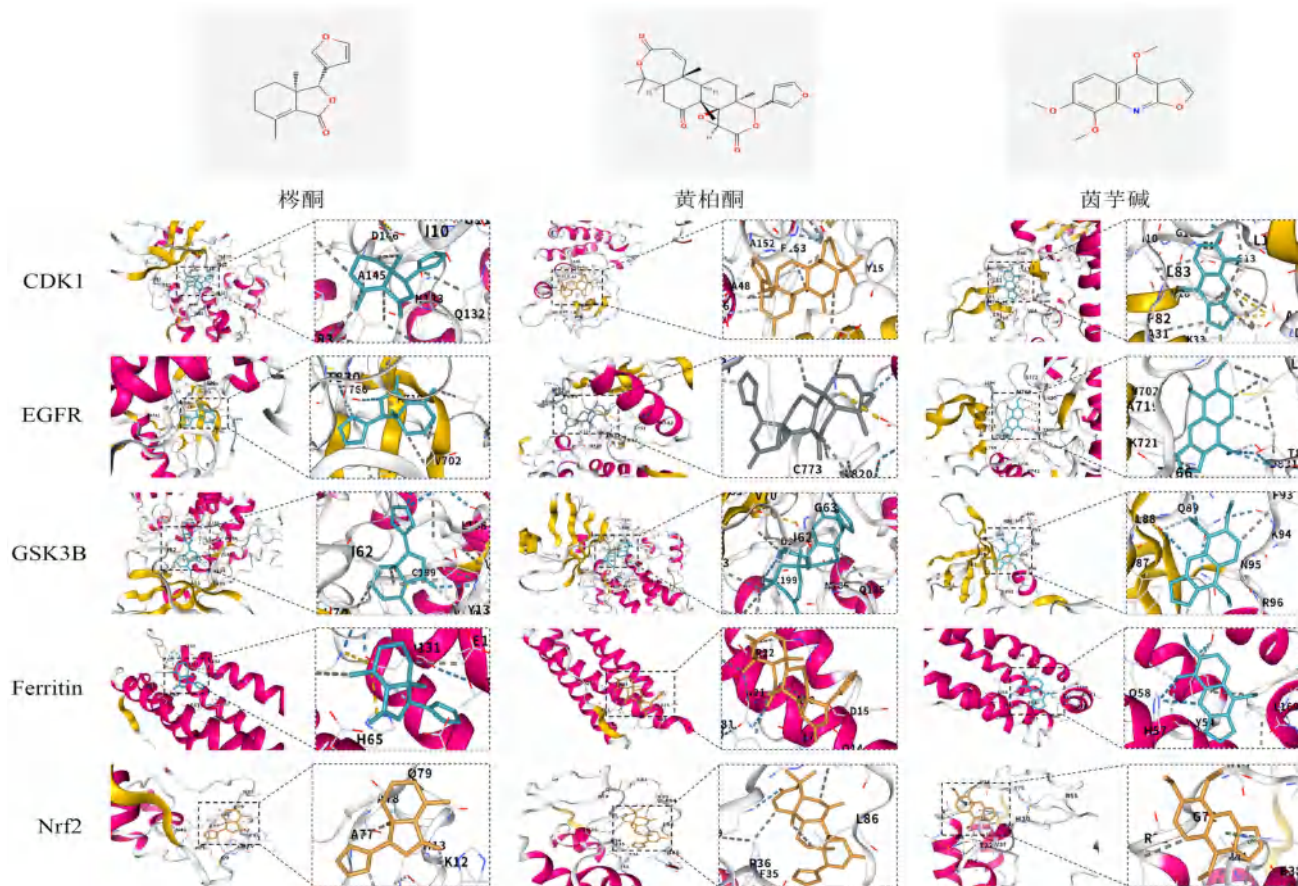


图 4 各成分与核心靶点分子对接结果

Fig 4 Molecular docking results of each component to the core target

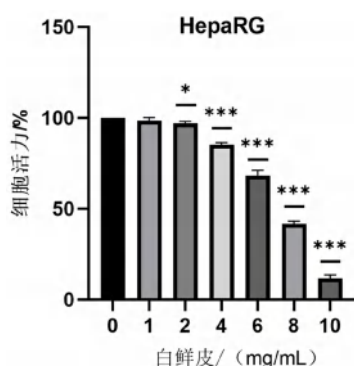


图 5 白鲜皮对 HepaRG 细胞活力的影响

Fig 5 Effect of Dictamnini Cortex on the viability of HepaRG cells

 注: 与 Control 组相比, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

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

升对铁死亡的敏感性。GSK3B 作为一种进化保守的丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶, 广泛参与糖代谢、细胞生长、程序性死亡、炎症反应、神经退行性病变及肿瘤发生发展等过程。该激酶在激活状态下可通过抑制 Nrf2 转录因子及其调控的 GPX4 表达, 降低细胞的抗氧化防御能力, 进而促进铁死亡的发生。应用其特异性抑制剂 LY2090314 能够有效阻断 GSK3B 对 Nrf2 的抑制作用^[15]。

细胞内抗氧化系统的失衡引起的脂质过氧化物的积累是导致细胞铁死亡的关键因素。Nrf2/HO-1/GPX4 通路是细胞内调控铁死亡的核心防御网络, 通过多层次的抗氧化与铁代谢调控维持细胞稳态。GPX4 作为还原脂质过氧化物关键物的关键酶, 可以将有毒的脂质过氧化物还原为无毒的脂质醇, 从而维持细胞膜的氧化还原稳态^[16]。HO-1 在铁死亡调控中表现出双向调节作用。该酶通过分解血红素生成胆绿素、一氧化碳 (CO) 和游离铁离子。其中, 胆绿素和 CO 作为抗氧化物质, 能够中和脂质过氧化产生的活性氧 (ROS), 改善铁死亡。而 HO-1 催化产生的游离铁离子则会促进细胞内不稳定铁池 (LIP) 的积累, 并通过芬顿反应加剧脂质过氧化, 最终增强细胞对铁死亡的易感性^[17-18]。在正常生理条件下, Nrf2 调节 HO-1 表达, 发挥细胞保护功能; 但在病理情况下, HO-1 的持续激活可能导致铁离子释放过量, 超出细胞的储存和外排能力, 进而促进铁死亡的发生^[19]。Nrf2 是调控氧化应激应答的核心转录因子。正常情况下, Keap1 介导 Nrf2 的泛素化降解; 但在氧化应激时, Nrf2 脱离 Keap1 的抑制,

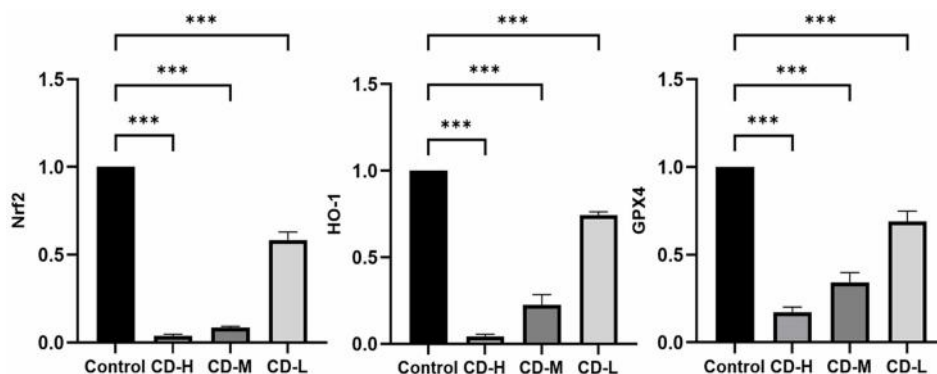


图6 白鲜皮对 *Nrf2*、*HO-1*、*GPX4* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig 6 Effect of Dictamnini Cortex on *Nrf2*, *HO-1*, and *GPX4* mRNA expression ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

注: 与 Control 组相比, *** $P < 0.001$ 。

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

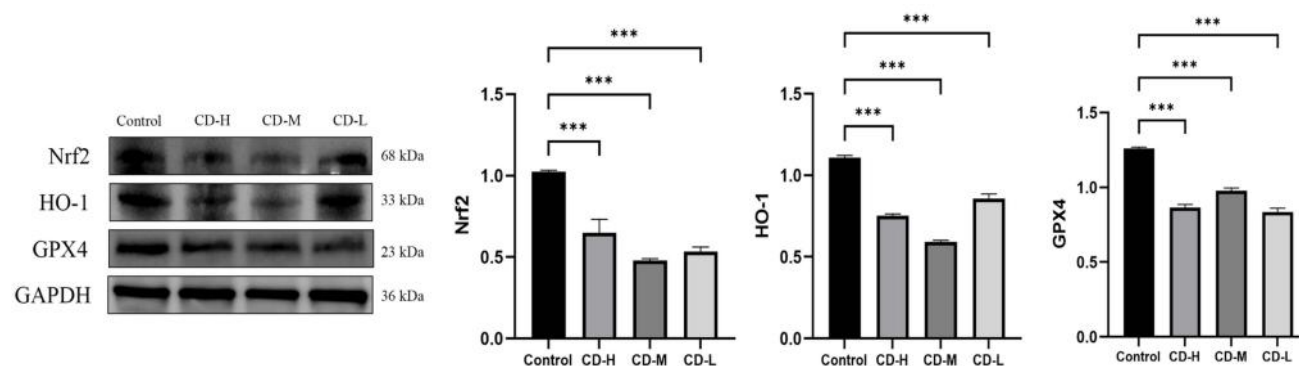


图7 白鲜皮对 *Nrf2*、*HO-1*、*GPX4* 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig 7 Effect of Dictamnini Cortex on *Nrf2*, *HO-1* and *GPX4* protein expression ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

注: 与 Control 组相比, *** $P < 0.001$ 。

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

促进 *HO-1*、*GPX4* 等抗氧化基因的表达, 并调节 FTH1 和 FPN1 以维持铁代谢平衡^[20]。铁死亡发生时, *Nrf2*/*HO-1*/*GPX4* 通路被抑制, 使抗氧化系统失调, 最终导致细胞死亡。由实验结果可知, 经不同浓度的白鲜皮水提液处理后, 细胞内 *Nrf2*/*HO-1*/*GPX4* 通路的 mRNA 和蛋白表达均显著下调, 表明白鲜皮可以诱导肝细胞发生铁死亡, 其机制可能是通过抑制 *Nrf2* 的活性及其下游 *HO-1* 和 *GPX4* 的表达, 使细胞内的抗氧化系统崩溃。

综上, 白鲜皮中的枞酮、黄柏酮和茵芋碱具有潜在的肝毒性, 可以抑制 *Nrf2*/*HO-1*/*GPX4* 通路及相关蛋白的表达, 使细胞的抗氧化系统失衡, 从而增加细胞对铁死亡的敏感性, 而 *CDK1*、*EGFR* 和 *GSK3B* 是白鲜皮诱导铁死亡的潜在作用靶点。本实验揭示了白鲜皮引起肝损伤的内在机制, 可为后续研究提供参考, 但仍具有一定的局限性, 如没有确定铁死亡是否为主要死亡形式, 还需进一步研究以验证白鲜皮对 *CDK1*、*EGFR* 和 *GSK3B* 的影响。

参考文献

- [1] Yang NN, Shao HF, Deng JL, et al. Network pharmacology-based analysis to explore the therapeutic mechanism of cortex dictamni on atopic dermatitis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 304: 116023.
- [2] 石子叶, 张妍, 徐旭, 等. 中药致肝损伤的研究进展 [J]. *抗感染药学*, 2024, 21 (3): 228-231.
- [3] Pan J, Wu CT, Tan R, et al. Difference in hepatotoxicity of furan-containing components in cortex dictamni correlates the efficiency of their metabolic activation [J]. *Phyto-medicine*, 2023, 114: 154778.
- [4] Colaci CS, Mendizabal M, Bessone F. Idiosyncratic drug-induced acute liver failure: a challenging and distressing scenario [J]. *Curr Drug Saf*, 2019, 14 (2): 94-101.
- [5] Liu YF, Wang XY, Fu NY, et al. "Three-key-and-lock" near-infrared fluorescent probe for dual-channel tracking ONOO⁻ in mitochondria and viscosity in lysosomes in ferroptosis and drug-induced liver injury [J]. *Dyes Pigm*, 2024, 225: 112102.
- [6] 孙慧娟, 高蕊, 张萌萌, 等. 基于尿液代谢组学发掘白鲜皮水提液致大鼠肝毒性生物标志物 [J]. *中国中药杂志*,

- 2025, 50 (9): 2526-2538.
- [7] 王路路. 白鲜皮化学成分及其基于网络药理学抗类风湿性关节炎活性研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2023.
- [8] Ru JL, Li P, Wang JN, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. J Cheminformatics, 2014, 6 (1): 13.
- [9] Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, et al. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest [J]. Nucleic Acids Res, 2023, 51 (D1): D638-D646.
- [10] Sherman BT, Hao M, Qiu J, et al. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists [J]. Nucleic Acids Res, 2022, 50 (W1): W216-W221.
- [11] Kim S, Chen J, Cheng TJ, et al. PubChem 2025 update [J]. Nucleic Acids Res, 2025, 53 (D1): D1516-D1525.
- [12] Burley SK. Protein data bank: from two epidemics to the global pandemic to mRNA vaccines and paxlovid [J]. Curr Opin Struc Biol, 2024, 90: 102954.
- [13] Zeng KX, Li WH, Wang Y, et al. Inhibition of CDK1 overcomes oxaliplatin resistance by regulating ACSL4-mediated ferroptosis in colorectal cancer [J]. Adv Sci, 2023, 10 (25): e2301088.
- [14] 朱明雪, 闫清, 王鹏, 等. EGFR 突变对肺腺癌预后及治疗意义生物信息分析[J]. 青岛大学学报(医学版), 2023, 59 (4): 522-526.
- [15] Gui JX, Wang LM, Liu J, et al. Ambient particulate matter exposure induces ferroptosis in hippocampal cells through the GSK3B/Nrf2/GPX4 pathway [J]. Free Radical Biol Med, 2024, 213: 359-370.
- [16] Huangfu BX, Li J, Xu TX, et al. Zearalenone induces intestinal damage and flora disturbance in rats by triggering ferroptosis via the system Xc-GSH-GPX4 signaling pathway [J]. Ecotoxicology Environ Saf, 2025, 302: 118600.
- [17] Ficiarà E, Munir Z, Boschi S, et al. Alteration of iron concentration in Alzheimer's disease as a possible diagnostic biomarker unveiling ferroptosis [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22 (9): 4479-4479.
- [18] 贾小慧, 王泽宇, 田嘉莹, 等. 丹参酮 II A 通过抑制细胞色素 P450 1B1/长链酰基辅酶 A 合成酶 4 通路介导铁死亡缓解缺血性脑卒中[J]. 陕西医学杂志, 2025, 54 (7): 882-887, 913.
- [19] 崔语桐, 祝欣欣, 张琦, 等. 铁死亡在心脏疾病中的作用及机制研究进展[J]. 生理学报, 2025, 77 (1): 75-84.
- [20] Yang TF, Zhang SY, Nie K, et al. WWOX-mediated p53/SAT1 and NRF2/FPN1 axis contribute to toosendanin-induced ferroptosis in hepatocellular carcinoma [J]. Biochem Pharmacol, 2025, 233: 116790.

(收稿日期: 2025-08-06; 修回日期: 2025-10-20)

基于 16S rRNA 测序探讨木犀草素致骨折大鼠肠道菌群变化

郑丽¹, 王慧¹, 丁一桁², 郑书深³, 席少华⁴, 郑龙², 郝艳娜¹, 薛军霞^{1*} (1. 邢台医学院, 河北 邢台 054000; 2. 河北医科大学, 石家庄 050017; 3. 河北中医药大学, 石家庄 050200; 4. 邢台医学高等专科学校第二附属医院, 河北 邢台 054000)

摘要: **目的** 探究木犀草素对骨折大鼠肠道菌群的调节作用。**方法** 建立大鼠胫骨骨折模型, 通过影像学评估骨折愈合情况, 采用 16S rRNA 测序分析肠道菌群组成。**结果** Garrett 评分结果显示, 与对照组相比, 模型组骨折愈合评分显著降低 ($P < 0.05$); 而与模型组相比, 木犀草素组评分显著提高 ($P < 0.05$)。线性判别分析效应量 (LEfSe) 结果显示, 对照组和木犀草素组粪球菌属 (*Coprococcus*) 明显富集, 模型组无显著富集。METASTATS 分析显示: 粪球菌属及其分类单元 (毛螺菌科、梭菌纲、厚壁菌门) 分布趋势一致; 与对照组相比, 模型组中放线菌门相对丰度有增多趋势, 红蝾菌目、微球菌科、阿德勒克吕兹菌属及罗氏菌属相对丰度明显升高 ($P < 0.01$), 木犀草素干预后上述菌属相对丰度显著降低 ($P < 0.05$)。**结论** 木犀草素可能通过调节肠道菌群促进骨折愈合。

关键词: 木犀草素; 16S rRNA 测序; 骨折; 肠道菌群

中图分类号: R683, R286 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)12-3551-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.013

基金项目: 河北省省级科技计划资助 (河北省重点研发计划项目, No.223777133D)。

作者简介: 郑丽, 女, 副教授, 主要从事骨折及骨质疏松等研究, email: zhengli2008happy@163.com ^{*} **通信作者:** 薛军霞, 女, 教授, 主要从事骨折及骨质疏松等研究, email: xuejunxia77@126.com

Impact of luteolin on gut microbiota in rats with fracture based on 16S rRNA sequencing

ZHENG Li¹, WANG Hui¹, DING Yiheng², ZHENG Shushen³, XI Shaohua⁴, ZHENG Long², HAO Yanna¹, XUE Junxia^{1*} (1. *Xingtai Medical College, Xingtai Hebei 054000*; 2. *Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017*; 3. *Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200*; 4. *The Second Affiliated Hospital of Xingtai Medical College, Xingtai Hebei 054000*)

Abstract: Objective To determine the alterations in gut microbiota after luteolin treatment in rats with fracture. **Methods** A rat tibial fracture model was established, fracture healing progression was evaluated via radiographic imaging, and gut microbiota composition was analyzed with 16S rRNA sequencing. **Results** The Garrett scoring demonstrated that the fracture healing score was significantly lower in the model group than in the control group ($P < 0.05$), while luteolin treatment greatly improved the score relative to the model group ($P < 0.05$). Linear Discriminant Analysis Effect Size (LEfSe) revealed obvious enrichment of the genus *Coprococcus* in both the control and the luteolin-treated groups, whereas no such enrichment was observed in the fracture model group. METASTATS revealed congruent trends for *Coprococcus*-associated taxa (Lachnospiraceae/Clostridia/Firmicutes); model-group elevations in Actinobacteria (showed an increasing trend), Coriobacteriales, Micrococcaceae, *Adlercreutzia* and *Rothia* ($P < 0.01$), and all attenuated by luteolin ($P < 0.05$). **Conclusion** Luteolin may promote fracture healing through the regulation of intestinal microbiota.

Key words: luteolin; 16S rRNA sequencing; fracture; gut microbiota

骨折是由于暴力等原因导致骨连续性破坏的一种常见病,约有 10% 的骨折患者会发展为骨不连。骨折患者数量连年增长,尤其是骨不连会持续消耗医疗资源,给社会带来沉重负担。因此,如何促进骨折快速愈合成为研究热点^[1-2]。

人类肠道微生物群由数量庞大的微生物群落组成。肠道菌群与糖尿病、心血管疾病及神经退行性疾病等多种疾病的发病机制密切相关。近年来,研究发现肠道菌群与骨代谢也关系密切:乳酸菌和拟杆菌属抑制破骨细胞活性,罗伊氏乳杆菌则促进成骨细胞增殖与分化^[3],动物实验也表明定向移植菌群影响小鼠骨量^[4]。然而,目前关于肠道菌群与骨折愈合的关系尚未完全阐明,因此亟须从肠道菌群角度探究骨折愈合的相关机制。

本项目组前期研究发现,木犀草素促进地塞米松损伤的成骨细胞增殖和早期分化。已有研究报道木犀草素加速大鼠骨折愈合^[5]。此外,有研究表明木犀草素有益于肠道屏障完整性的维持,并且增加粪杆菌属相对丰度等^[6]。然而,关于木犀草素在促进骨折愈合过程中是否调节肠道菌群,目前相关研究仍较缺乏。

本研究旨在用木犀草素干预骨折大鼠,采用 16S rRNA 测序技术分析肠道菌群变化,探索肠道菌群在骨折愈合中的作用机制,为骨折快速愈合及相关疾病提供实验支持。

1 材料

1.1 试药

木犀草素(上海麦克林生化科技股份有限公司,纯度 $\geq 98\%$,批号:C16598770);羧甲基纤维素钠(天津市永大化学试剂有限公司,分析纯,批号:20240701);克氏针(张家港市华阳医疗器械厂,直径 0.8 mm,批号:250310);缝合线(扬州市金环医疗器械厂,规格 6-0,批号:20230906);红霉素软膏[国药集团三益药业(芜湖)有限公司,批号:220411]。

1.2 仪器

R105 型 X 射线机(意大利 Ralco 公司);DHG-9145A 型电热鼓风干燥箱(上海一恒公司);H1850/TG16-W 型离心机(上海湘仪公司);FA1204C 型电子天平(上海越平公司);NovaSeq 6000 测序仪(美国 Illumina 公司)。

1.3 实验动物

18 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,体重(200 ± 10) g[北京华阜康生物科技股份有限公司,合格证号:SYXK(冀)2020-002],实验在河北医科大学实验动物中心进行,饲养条件 12 h 光照/12 h 黑暗,环境维持湿度(55 ± 5)%,温度(23 ± 2)℃,大鼠自由饮水及摄食。本研究所有动物实验方案均经邢台医学院伦理委员会批准(编号:2023123)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

大鼠适应性喂养后,随机分为对照组、模型组、木犀草素组,每组 6 只。对照组仅行髓内克氏针固定(胫骨不造成骨折);模型组实施髓内克氏针固定联合胫骨骨折造模;木犀草素组在模型组处理基础上,每日木犀草素(100 mg/kg,用 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液溶解)灌胃给药,持续 4 周。骨折模型造模^[7]条件如下,大鼠禁食 8 h 后,经异氟烷吸入麻醉,电动剃毛器备皮左下肢,仰卧位固定,碘伏消毒术区,于左膝关节外侧做 1 cm 切口,暴露膝关节腔后,将高压灭菌的 0.8 mm 克氏针自胫骨平台部分插入骨髓腔定位,确认胫骨粗隆位置后,用骨科剪垂直于骨干完成横向皮质截骨,然后将克氏针完全置入骨髓腔(确保针尾埋入骨内),逐层缝合筋膜及皮肤,无菌敷料包扎。术后单笼饲养,创面连续 3 d 涂抹适量红霉素软膏,密切观察动物状态。

2.2 X 线观察骨折愈合情况

干预 4 周后,对大鼠左侧胫骨进行正位 X 线片摄片(拍摄参数:管电压 41 kV,管电流 125 mA,曝光量 12.5 mAs)。采用 Garrett 评分^[8],即 0 分:无骨痂形成;1 分:有骨痂形成但无桥接;2 分:至少一侧皮质有骨桥形成;3 分:双侧皮质均有骨桥形成并伴有骨痂塑形。

2.3 收集血清及肠道内容物

干预 4 周后,大鼠经异氟烷麻醉,行胸腹联合切口。首先沿胸骨中线开胸暴露心脏,经心尖穿刺采集心脏全血;随后沿腹白线开腹,分离结肠并收集肠内容物,放于 -80 °C 冰箱中待测。采集的全血经 3000 r/min 离心 10 min 后,分离上层血清,分装后置于一 80 °C 冰箱中备用。

2.4 16S rRNA 测序及分析肠道菌群

首先对样品进行质检,合格后用 T4 DNA 聚合酶、大肠埃希菌 DNA 聚合酶 I 和 T4 多聚核苷酸激酶进行末端修复(将黏性末端修复成平末端),3' 端添加腺嘌呤碱基尾,使得 DNA 片段能与 3' 端带有胸腺嘧啶碱基的接头连接。随后构建合格文库,进行操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)制备及测序。最后进行数据分析,即原始数据过滤,基于核苷酸片段重叠区域拼接标签,将标签聚成 OTU,在数据库比对后对 OTU 进行物种注释,用物种注释结果与 OTU 进行分析。本测序及数据分析工作由北京博云华康基因科技有限公司完成。

2.5 统计学分析

骨折 Garrett 评分使用 SPSS 21.0 进行分析,方差不齐并且正态分布数据,进行单因素方差分析,组间使用 LSD 分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。OTU 分析:先用 UPARSE 在 97% 相似度下进行聚类,得到 OTU 的代表序列,再用 UCHIME

(v4.2.40) 将聚合酶链式反应(PCR)扩增产生的嵌合体从 OTU 代表序列中去除,最后使用 USEARCH (v7.0.1090) 比对,得到 OTU 丰度统计表。主成分分析(principal component analysis, PCA):采用 R 软件中 ade4 包进行 PCA 统计。Alpha 多样性分析:采用多样品比较的 Kruskal-Wallis Test (R 中的 kruskal.test) 分析 Observed species 指数、Chao1 指数、ACE 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数。各组肠道菌群间差异分析:用线性判别分析效应量(linear discriminant analysis effect size, LDA effect size, LEfSe) 分析,即先用非参数 Kruskal-Wallis 检验(R 软件中 kruskal.test 包)筛选组间差异显著的物种,通过 Wilcoxon 秩和检验(R 软件中 wilcox.test 包)验证亚组差异,最后用 MASS 包的 lda 函数计算, LDA 评分 > 2.0 , $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。各组肠道菌群门、属差别分析:用软件 Metastats (<http://metastats.cbcb.umd.edu/>),进行非参数检验方法(改进的 Fisher 精确检验),置换检验,多重假设校正(Benjamini-Hochberg),以 $FDR < 0.05$ 为差异具有统计学意义(统计相对丰度 $> 0.01\%$ 的菌属)。BugBase 表型分析使用成对 Mann-Whitney-Wilcoxon 检验,以 $FDR < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 木犀草素促进大鼠骨折愈合

术后观察显示,大鼠骨折部位出现局部肿胀,胫骨表面无骨性突起,并有跛行行为,表明造模成功。术后 3 d,局部肿胀逐渐消退,伤口敷料自然脱落。木犀草素干预 4 周后,进行 X 线摄片。典型影像学表现及统计分析结果见图 1。影像学结果显示,对照组胫骨完整,无骨折线;模型组中两根胫骨可见透亮线状骨折线;木犀草素组骨折线模糊,提示骨折愈合良好。Garrett 评分结果显示,与对照组相比,模型组骨折愈合评分显著降低($P < 0.05$);与模型组相比,木犀草素组评分显著提高($P < 0.05$)。结果表明,木犀草素可促进大鼠胫骨骨折愈合。

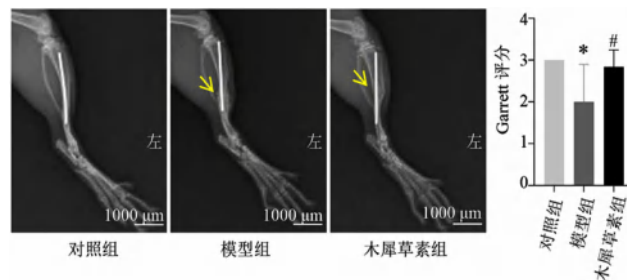


图 1 木犀草素对骨折愈合的影响

Fig 1 Effects of luteolin on fracture healing

注:与对照组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

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

3.2 木犀草素对大鼠肠道菌群的影响

随后,PCA 结果如图 2 所示,模型组与木犀草素组的样本点在空间分布上较为接近(PC1 与 PC2 坐标相似),而对照组样本点则明显分离,表明骨折显著改变了肠道菌群结构。值得注意的是,与模型组相比,木犀草素组的样本点分布更趋近于对照组(PC1 和 PC2 坐标位置),提示木犀草素可能促进肠道菌群结构向健康状态恢复。

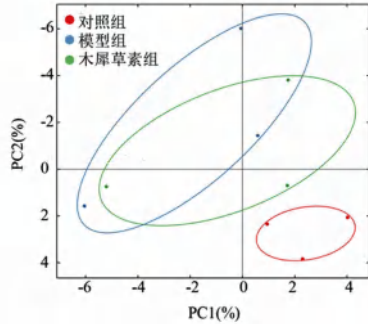


图 2 木犀草素对肠道菌群主成分的影响
Fig 2 Effect of luteolin on the principal components of gut microbiota

Alpha 多样性结果如表 1 所示,与对照组相比,模型组的 Observed species 指数、Chao1 指数、ACE 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数均呈现下降趋势;与模型组相比,木犀草素组 Observed species 指数、Chao1 指数、ACE 指数、Shannon 指数均表现出向对照组恢复的趋势, Simpson 指数有下降趋势。这些结果表明,骨折可能导致肠道菌群物种丰富度降低,而木犀草素可能具有恢复菌群多样性并且维持优势菌群的潜在作用。

然后,进行差异菌群分析。首先,LEfSe 分析结果如图 3 所示,对照组及木犀草素组粪球菌属(*Coprococcus*)显著富集,而模型组该菌属富集不显著。其次,各组肠道菌群组成存在显著差异(见图 4)。其中, METASTATS 分析显示,与对照组相比,粪球菌属及其上级分类单元(毛螺菌科、梭菌纲、厚壁菌门)相对丰度在木犀草素组中呈现上升趋势,在模型组中呈现下降趋势,虽未达到统计学显著性,但与 LEfSe 结果趋势一致(见图 5)。组间差异菌群分析如

表 1 木犀草素对肠道菌群 Alpha 多样性的影响
Tab 1 Effect of luteolin on Alpha diversity of gut microbiota

组别	Alpha 多样性分析				
	Observed species 指数	Chao1 指数	ACE 指数	Shannon 指数	Simpson 指数
对照组	368.667±40.067	397.724±41.229	396.652±43.485	3.665±0.698	0.092±0.096
模型组	284.333±54.169	296.906±51.018	299.446±53.565	3.361±0.212	0.075±0.021
木犀草素组	329.000±68.505	347.014±68.531	353.433±70.239	3.672±0.174	0.049±0.004
P	0.129	0.113	0.113	0.393	0.252

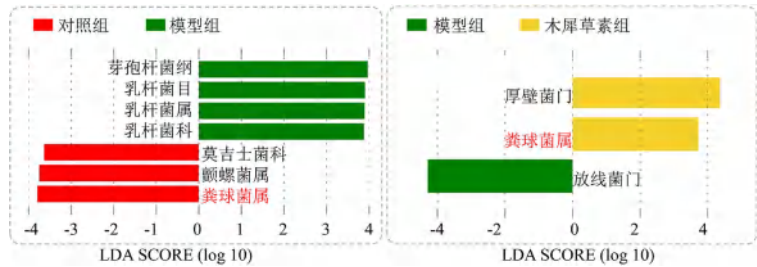


图 3 木犀草素对肠道菌群 LEfSe 的影响
Fig 3 Effect of luteolin on LEfSe of gut microbiota

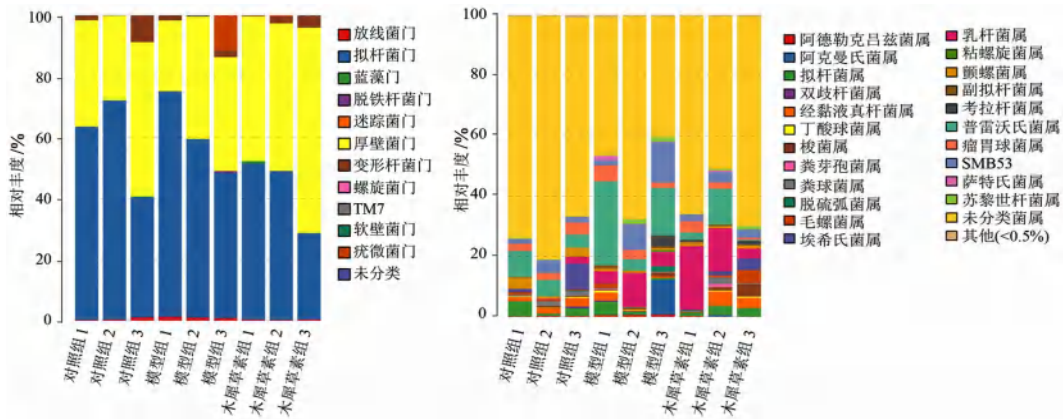


图 4 木犀草素对肠道菌群门、属分布的影响
Fig 4 Effect of luteolin on the phylum and genus distribution of gut microbiota

图 6 所示。与对照组相比,模型组中放线菌门相对丰度有上升趋势,红蝽菌目、微球菌科、阿德勒克吕兹菌属及罗氏菌属相对丰度明显增加 ($P < 0.01$);木犀草素干预后,这些菌属均显著下降 ($P < 0.01$)。这些结果说明木犀草素增加 *Coprococcus* 相对丰度,减少放线菌门、红蝽菌目、微球菌科、阿德勒克吕兹菌属及罗氏菌属相对丰度,促进肠道菌群结构正常化。

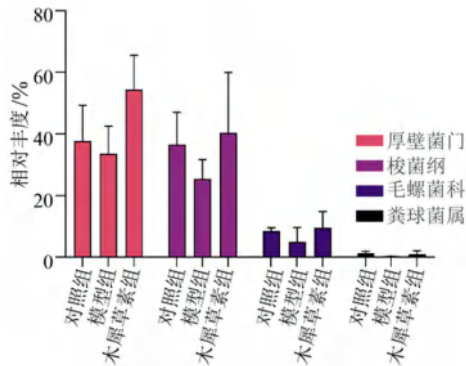


图 5 木犀草素对肠道菌群中粪球菌属所属分类层级的影响
Fig 5 Effect of luteolin on the taxonomic distribution of *Coprococcus* in gut microbiota

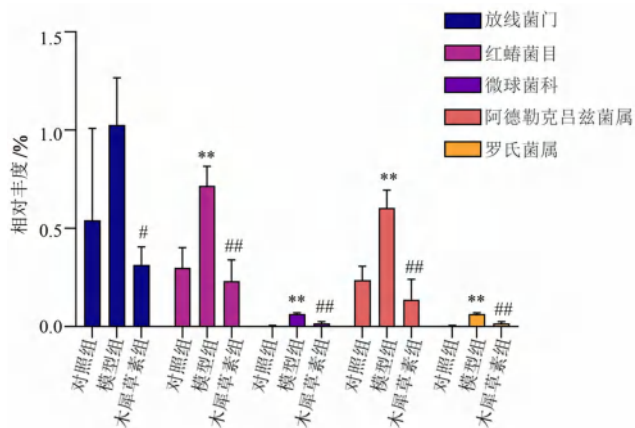


图 6 木犀草素对肠道菌群中差异分类单元 (门/目/科/属) 的影响
Fig 6 Effect of luteolin on differentially abundant taxa (phylum/order/family/genus) in gut microbiota

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

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

最后,本研究进行了表型预测。如图 7 所示,与对照组 (0.48 ± 0.09) % 相比,模型组革兰氏阳性菌含量平均值 (0.47 ± 0.11) % 轻微下降;与模型组相比,木犀草素组革兰氏阳性菌含量平均值 (0.61 ± 0.16) % 呈上升趋势。革兰氏阳性菌在各组中的平均值变化趋势与 *Coprococcus* 的丰度变化趋势一致,但差异不具有统计学意义。

4 讨论

本研究表明,骨折后大鼠肠道菌群中, *Coprococcus* 相对丰度降低,放线菌门相对丰度有增多趋

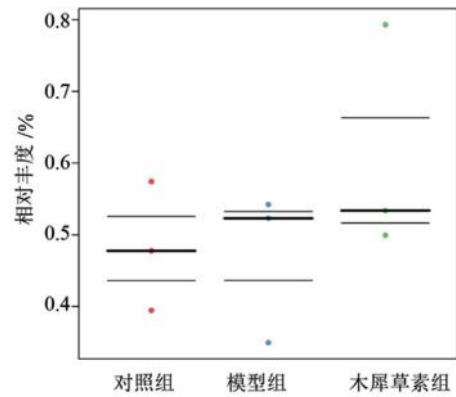


图 7 预测木犀草素对肠道菌群 BugBase 表型的影响
Fig 7 Predicting effect of luteolin on BugBase phenotypic profiles of gut microbiota

势,红蝽菌目、微球菌科、阿德勒克吕兹菌属和罗氏菌属相对丰度增加,木犀草素促进大鼠骨折愈合,增加 *Coprococcus* 相对丰度,降低放线菌门、红蝽菌目、微球菌科、阿德勒克吕兹菌属和罗氏菌属相对丰度。这些结果提示木犀草素可能通过重塑肠道菌群促进骨折愈合。

木犀草素具有抗炎、抗氧化等多种生物活性^[9],且安全性良好,动物实验表明其灌胃给药剂量可达每日 200 mg/kg^[10]。在本研究中参考 Tang 等^[11] 研究方案,采用每日 100 mg/kg 的剂量对骨折大鼠进行干预。结果表明,木犀草素促进大鼠骨折愈合,这与 Wang 等^[12] 研究结果一致。

LEfSe 结果显示,与对照组相比,模型组 *Coprococcus* 丰度明显降低,而木犀草素治疗使其显著回调。另外, *Coprococcus* 所在的分类单元 (毛螺菌科、梭菌纲、厚壁菌门) 以及革兰氏阳性菌的整体分布趋势与 LEfSe 结果一致,这进一步说明了 *Coprococcus* 是关键差异菌群。此外,木犀草素还显著下调骨折鼠肠道中放线菌门、红蝽菌目、微球菌科、阿德勒克吕兹菌属和罗氏菌属相对丰度。 *Coprococcus* 产大量丁酸^[13],而放线菌门主要产丙酸或乙酸^[14],微球菌科产乙酸或乳酸^[15]。根据上述菌群代谢产物特征的结果,笔者推测木犀草素可能通过增加 *Coprococcus* 相对丰度、促进丁酸生成,从而加速骨折愈合。

丁酸在骨折愈合中发挥关键作用,主要体现在以下几方面。首先,丁酸促进成骨,提高骨密度并促进骨折愈合^[16],增强人成骨细胞的矿化能力,增加钙沉积,上调小鼠颅骨及 MC3T3-E1 细胞中成骨标志物表达。其次,丁酸抑制破骨,可显著抑制大鼠骨髓破骨细胞分化,减少抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate resistant acid phosphatase, TRAP) 阳性多核破骨细胞形成。最后,丁酸改善局部微环境,上调血管内皮细胞中血管内皮生长因子等的表达,降低

软骨细胞中促炎因子水平。另外,基于丁酸构建的纳米药物显著加速骨折愈合。

肠道菌群和骨折愈合存在密切关联。*Coprococcus* 对维持肠道微生态平衡有益^[17],其相对丰度在克罗恩病患者中下降^[18],既往研究发现木犀草素上调该菌属相对丰度^[19],这与本研究结果一致。然而,菌群和骨骼作用存在时效性,无菌小鼠定植肠道微生物 4 周后骨形成增加,该促骨形成作用在 8 个月后消失^[16]。目前关于肠道菌群影响骨折愈合的长期效应机制仍需进一步验证。

本研究局限性在于样本量较少和观测时间点单一。后续实验需要设置木犀草素剂量梯度、样本量及观测时间点,评估木犀草素对肠道菌群的长期作用及其潜在的不良反应等,并且检测肠道中丁酸含量,明确木犀草素、肠道菌群变化以及骨折愈合效果之间的因果关系。定植产丁酸菌群对骨折愈合的作用需要进一步实验进行证实。

总之,本研究为木犀草素促进骨折愈合提供实验支持,也为肠道菌群调控骨折等疾病提供新的研究思路。

参考文献

- [1] Chen S, Zhang QS, Ouyang ZB, et al. Global, regional, and national burdens of fracture in children and adolescents from 1990 to 2019 [J]. BMC Public Health, 2025, 25 (1): 1055.
- [2] 吴文强,夏宸渝,谢鑫炎,等.姜黄素对衰老相关骨质疏松小鼠骨代谢平衡的影响[J].中南药学,2021,19(6):1108-1113.
- [3] Jha SS, Jeyaraman N, Jeyaraman M, et al. Cross-talks between osteoporosis and gut microbiome [J]. World J Orthop, 2025, 16 (3): 102274.
- [4] Wang HC, Tian G, Pei ZM, et al. Bifidobacterium longum increases serum vitamin D metabolite levels and modulates intestinal flora to alleviate osteoporosis in mice [J]. mSphere, 2025, 10 (3): e0103924.
- [5] 董武,卢孟康,王强,等.木犀草素对大鼠股骨骨折愈合及 Wnt/ β -catenin 信号通路影响[J].辽宁中医药大学学报,2023,25(7):21-25.
- [6] Bi X, Peng H, Xiong H, et al. Fabrication of the rapid self-assembly hydrogels loaded with luteolin: their structural characteristics and protection effect on ulcerative colitis [J]. Foods, 2024, 13 (7): 1105.
- [7] Braga Frade B, Dias da Cunha Muller L, Bonfim DC. Establishing a diaphyseal femur fracture model in mice [J]. J Vis Exp, 2022, doi: 10.3791/64766.
- [8] 侯秀秀,邢宝瑞,冯元超,等.马骨续筋胶囊通过 SDF-1/CXCR4 信号通路促进老年大鼠髌骨骨折愈合[J].天津医药,2025,53(1):19-23.
- [9] Jomova K, Alomar SY, Valko R, et al. Flavonoids and their role in oxidative stress, inflammation, and human diseases [J]. Chem Biol Interact, 2025, 413: 111489.
- [10] Xiao C, Chen MY, Han YP, et al. The protection of luteolin against diabetic cardiomyopathy in rats is related to reversing JNK-suppressed autophagy [J]. Food Funct, 2023, 14 (6): 2740-2749.
- [11] Tang L, Fan XY, Xu YQ, et al. Luteolin inhibits dexamethasone-induced osteoporosis by autophagy activation through miR-125b-5p/SIRT3/AMPK/mTOR axis, an in vitro and in vivo study [J]. Food Sci Nutr, 2025, 13 (3): e70071.
- [12] Wang G, Cheng L, Shao ZC, et al. Treatment of delayed fracture healing with Bushen Tiansui decoction: analysis of active agents and targets using bioinformatics and network pharmacology analysis [J]. Int J Clin Pharmacol Ther, 2025, 63 (3): 114-138.
- [13] Xu LS, Hu DB, He JL, et al. Intratumor microbiome-derived butyrate promotes chemo-resistance in colorectal cancer [J]. Front Pharmacol, 2025, 15: 1510851.
- [14] Zhang LY, Zhu TT, Wang Y, et al. Effects of in vitro simulated digestion and fecal fermentation on the structure and regulating the glucose and lipid activity of a polysaccharide from Mori Folium [J]. Int J Biol Macromol, 2024, 280 (Pt 1): 135595.
- [15] Zampieri E, Cucu MA, Franchi E, et al. Characterization of different soil bacterial strains and assessment of their impact on the growth of *Triticum turgidum* spp. durum and *Lens culinaris* spp. culinaris [J]. Curr Microbiol, 2025, 82 (5): 199.
- [16] Wallimann A, Magrath W, Thompson K, et al. Gut microbial-derived short-chain fatty acids and bone: a potential role in fracture healing [J]. Eur Cell Mater, 2021, 41: 454-470.
- [17] De Maesschalck C, Van Immerseel F, Eeckhaut V, et al. *Faecalicoccus acidiformans* gen. nov., sp. nov., isolated from the chicken caecum, and reclassification of *Streptococcus pleomorphus* (Barnes et al. 1977), *Eubacterium bifforme* (Eggerth 1935) and *Eubacterium cylindroides* (Cato et al. 1974) as *Faecalicoccus pleomorphus* comb. nov., *Holdemanella bifformis* gen. nov., comb. nov. and *Faecalitalea cylindroides* gen. nov., comb. nov., respectively, within the family Erysipelotrichaceae [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2014, 64 (Pt 11): 3877-3884.
- [18] Wu J, Li MJ, Zhou C, et al. Changes in amino acid concentrations and the gut microbiota composition are implicated in the mucosal healing of ulcerative colitis and can be used as noninvasive diagnostic biomarkers [J]. Clin Proteomics, 2024, 21 (1): 62.
- [19] Zhang JJ, Cao W, Zhao HA, et al. Protective mechanism of *Fagopyrum esculentum* Moench. bee pollen EtOH extract against type II diabetes in a high-fat diet/streptozocin-induced C57BL/6J mice [J]. Front Nutr, 2022, 9: 925351.

(收稿日期:2025-04-29;修回日期:2025-07-01)

口腔科常用含漱液的适口性评价

张娅, 陈静*, 穆长清, 朱琳, 孔亚群 (首都医科大学附属北京友谊医院口腔科, 北京 100050)

摘要: **目的** 评价口腔科常用含漱液的适口性, 为临床用药提供参考和指导。**方法** 通过体外 (电子舌评价) 和体内 (人群尝味评价) 两种方法, 对口腔科常用的 6 种含漱液进行适口性评价。**结果** 电子舌评价结果表明, 西吡氯铵含漱液和复方氯己定含漱液具有较强的盐酸盐类苦味 (BT0) 和碱性苦味 (AN0) 信号响应, 聚维酮碘具有酸性苦味 (C00) 和涩味信号 (AE1) 响应, 西帕依固龈液具有涩味信号 (AE1) 响应。人群尝味结果表明, 浓替硝唑含漱液和西吡氯铵含漱液的适口性综合评分显著低于其他含漱液 (表明其适口性较好), 西帕依固龈液的适口性综合评分最高, 显著高于其他各含漱液 (表明其适口性较差), 反映了各含漱液具有不同的适口性情况。**结论** 不同的含漱液分别具有苦、麻、涩、甜等适口性特点, 明确各种含漱液的适口性特点有助于医师根据患者的口感偏好有针对性地用药, 为含漱液的临床应用提供参考和指导, 有利于含漱液更好地发挥预防和治疗口腔疾病的作用。

关键词: 含漱液; 适口性; 电子舌; 人群尝味

中图分类号: R988.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)12-3557-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.014

Evaluation of palatability of gargles commonly used in stomatology department

ZHANG Ya, CHEN Jing*, MU Changqing, ZHU Lin, KONG Yaqun (Department of Stomatology, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050)

Abstract: Objective To evaluate the palatability of gargles commonly used in stomatology department, to provide reference for their clinical application. **Methods** With in vitro (electronic tongue evaluation) and in vivo (human taste panel assessment) methods, this study evaluated 6 gargles commonly used in stomatology department. **Results** Data obtained by electronic tongue evaluation showed that cetylpyridinium chloride gargles and compound chlorhexidine gargles induced strong hydrochloride bitterness (BT0) and basic bitter (AN0) signal responses, povidone-iodine gargles led to acidic bitterness (C00) and astringent signal (AE1) responses, while Xipayi Guyin Ye caused astringent signal (AE1) responses. The human taste panel assessment showed that concentrated tinidazole gargles and cetylpyridinium chloride gargles scored much lower than that of the other gargles, indicating better palatability. Xipayi Guyin Ye scored the highest, indicating worse palatability. **Conclusion** Different gargles have diverse palatability profiles, with bitter, astringent, or sweet tastes, respectively. Clarification of the taste characteristics of gargles helps rationally and reasonably clinical medication of different gargles, based on the taste preference of patients.

Key words: gargle; palatability; electronic tongue; human taste panel assessment

口腔内存在多种微生物, 其中细菌最为常见且数量最多。许多口腔疾病都会导致菌群紊乱, 如牙周疾病、口腔黏膜病及某些系统性疾病。在稳定口腔内环境的各种药物中, 含漱液局部用药

效果较显著^[1-2], 在消除口腔异味、减少口腔细菌、抗炎和镇痛等方面都有良好的效果, 在口腔炎、咽喉炎、口腔溃疡、牙周炎、冠周炎、口腔黏膜炎等口腔疾病的预防与治疗中发挥重要作用。

作者简介: 张娅, 女, 硕士, 医师, 主要从事口腔医学研究, email: zhangzhongya321123@163.com *通信作者: 陈静, 女, 硕士, 医师, 主要从事口腔医学研究, email: 08.chenjing@163.com

用，已逐渐得到口腔医师和患者的认可^[3-5]。

适口性是影响口服制剂和口腔局部制剂临床应用的因素之一，药物的不良味道往往影响患者用药依从性，可能导致患者用药中断，难以达到或维持理想的治疗效果^[6-9]。药品适口性问题引起了国内外药品监管机构的重视，世界卫生组织（WHO）^[10]、欧洲药品管理局（EMA）^[11]和国家药品监督管理局药品审评中心（NMPA CDE）^[12-14]等机构陆续发布的多个指导原则都强调了药品适口性的重要性，明确了药品适口性的改善方法和评价方法。

含漱液大多有苦味、涩味等不良味道，有些患者不能忍受这些味道，导致用药中断，难以达到预防和/或治疗口腔疾病的目的。药品适口性评价的常用方法^[14-15]包括基于分析方法的味道定量评价（体外溶出试验）^[16]、味觉传感器定量评价味道（电子舌技术）^[17-20]、动物偏好实验/短暂摄取味觉测试^[8, 21]和受试者尝味试验^[22-24]四大类。基于含漱

液的溶液剂型特点和已上市产品属性，本研究采用电子舌技术和受试者尝味试验两种评价方法，评价口腔科常用的 6 种含漱液的适口性。在电子舌初步评价的基础上，通过受试者尝味试验，进一步评价这些含漱液的适口性，明确各种含漱液的适口性特点，为含漱液的临床应用提供参考和指导，有助于医师根据患者的偏好有针对性地用药。

1 材料

1.1 仪器

SA402B 电子舌味觉分析系统（日本 Insent 公司）；ML802/02 电子天平（精度：0.01 g，瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司）；ME403E 电子天平（精度：0.001 g，瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司）。

1.2 试药

含漱液分别来自 6 家生产厂家（见表 1）；氯化钾、L（+）-酒石酸、氢氧化钾、无水乙醇（国药集团化学试剂有限公司）；盐酸（南京化学试剂股份有限公司）。

表 1 不同含漱液的产品信息和样品配制方法
Tab 1 Product information and preparation of different gargles

药品名称	药品厂家	批号	适应证	含漱体积	使用前样品配制 [*]
浓替硝唑含漱液	江苏晨牌邦德药业有限公司	202311022	用于厌氧菌感染引起的牙龈炎、冠周炎、牙周炎等口腔疾病的辅助治疗	未标注	在 50 mL 温水中加入本品 2 mL，摇匀
复方硼砂含漱液	上海小方制药股份有限公司	231103	用于口腔炎、咽炎等的口腔消毒防腐	未标注	取本品 10 mL，加 50 mL 温水稀释，摇匀
西吡氯铵含漱液	南京恒生制药有限公司（HSZY）	13230610	本品对牙菌斑的形成有一定抑制作用，用于口腔疾病的辅助治疗，也可用作日常口腔护理及清洁口腔	15 mL	不稀释，直接含漱
西吡氯铵含漱液	杭州民生药业股份有限公司（MSYY）	K2303281		15 mL	不稀释，直接含漱
复方氯己定含漱液	深圳南粤药业有限公司	20231114	用于牙龈炎、冠周炎、口腔黏膜炎等引致的牙龈出血、牙周脓肿、口腔黏膜溃疡等的辅助治疗	10 ~ 20 mL	不稀释，直接含漱
西帕依固龈液	新奇康药业股份有限公司	230911	健齿固龈，清血止痛。用于牙周疾病引起的牙齿酸软，咀嚼无力，松动移位，牙龈出血以及口舌生疮，咽喉肿痛，口臭烟臭	3 ~ 5 mL	不稀释，直接含漱
聚维酮碘含漱液	杭州民生药业股份有限公司	K2402161	可用于口腔炎、咽喉炎、口腔溃疡、牙周炎、冠周炎等口腔疾病，也可用于口腔手术前的消毒，以及日常的口腔消毒保健	10 mL	不稀释，直接含漱；或用等体积的温水稀释后含漱

注：^{*}根据说明书中“用法用量”项下的描述，确定各含漱液的使用前配制方法。

Note：^{*}Various gargles were prepared according to the description in the “Dosage and Administration Instructions” sections of the labels.

2 方法

2.1 体外适口性评价方法

使用 SA402B 味觉分析系统（电子舌，配套脂膜传感器：盐酸盐类苦味，BT0；碱性苦味，AN0；酸性苦味，C00；涩味，AE1），对不同含漱液进行评价^[24-28]。为了能够真实反映含漱液在实际使用时的味道，根据各含漱液说明书中“用法用量”项下的描述进行样品稀释，样品浓度与

患者实际使用时的浓度保持一致：在 50 mL 温水中加入浓替硝唑含漱液 2 mL，摇匀；在 50 mL 温水中加入复方硼砂含漱液 10 mL，摇匀；西吡氯铵含漱液（MSYY）、西吡氯铵含漱液（HSZY）、复方氯己定含漱液和西帕依固龈液不需稀释；聚维酮碘含漱液（未稀释）和稀释后的聚维酮碘含漱液（在 15 mL 聚维酮碘含漱液中加入 15 mL 温水，摇匀）分别进行检测。将 25 mL 上述含漱液样品

分别与 25 mL 20 mmol/L 氯化钾溶液混合, 作为电子舌待测样品。以 10 mmol/L 氯化钾溶液作为参比溶液, 参比溶液的电势值设置为零点 (V_r), 测试样品的电势值 (V_s) 与零点电势 (V_r) 的差值认为是能够反映供试品味觉信息的味觉先味值, 完成测试后对传感器进行清洗 (清洗液 4 和 5, 各

3 s), 再次测得样品的电势值 (V_r') 与 V_r 的差值被认作味觉回味值。按电子舌检测程序 (见表 2) 对各样品进行检测, 循环测试 4 次, 根据仪器检测规程的要求弃去第 1 个循环的数据, 以后面 3 个循环的数据平均值作为检测结果。

表 2 电子舌检测程序

Tab 2 Procedure for electronic tongue measurement

溶液	溶液组成	检测时间 /s	清洗时间 /s	传感器响应
清洗液 1	负极清洗液 (BT0/AN0): 30% 乙醇、100 mmol/L 盐酸 正极清洗液 (C00/AE1): 100 mmol/L 氯化钾、10 mmol/L 氢氧化钾、30% 乙醇	/	90	
清洗液 2	0.3 mmol/L 酒石酸; 30 mmol/L 氯化钾	/	120	
清洗液 3	0.3 mmol/L 酒石酸; 30 mmol/L 氯化钾	/	120	
基准液	0.3 mmol/L 酒石酸; 30 mmol/L 氯化钾	30	/	传感器对基准液的响应
样品	样品; 10 mmol/L 氯化钾	30	/	传感器对样品的响应
清洗液 4	0.3 mmol/L 酒石酸; 30 mmol/L 氯化钾	/	3	
清洗液 5	0.3 mmol/L 酒石酸; 30 mmol/L 氯化钾	/	3	
CPA 溶液	0.3 mmol/L 酒石酸; 30 mmol/L 氯化钾	30	/	传感器对 CPA 溶液的响应

注: CPA. 由吸附引起的膜电位的变化。

Note: CPA. change of membrane potential caused by adsorption.

2.2 体内适口性评价方法

基于体外电子舌评价结果, 参考文献^[22, 24-26, 29]报道的方法, 采用受试者尝味试验对其中 6 组含漱液进行体内适口性评价研究。本研究经首都医科大学附属北京友谊医院伦理委员会审查和批准 (项目编号: BFHHZS20240207)。15 位年龄为 21 ~ 38 岁的健康受试者参与本研究, 所有受试者对本研究知情且自愿参与并能配合研究。根据各含漱液说明书中的用法进行样品稀释, 含漱体积根据说明书中的用量而定, 说明书未明确用量的含漱液的含漱体积定为 15 mL: 在 50 mL 温水中加入浓替硝唑含漱液 2 mL, 摇匀 (含漱体积 15 mL); 在 50 mL 温水中加入复方硼砂含漱液 10 mL, 摇匀 (含漱体积 15 mL); 西吡氯铵含漱液 (MSYY) (含漱体积 15 mL)、复方氯己定含漱液 (含漱体积 15 mL)、西帕依固龈液 (含漱体积 15 mL) 和聚维酮碘含漱液 (含漱体积 10 mL) 不需稀释。样品信息不得向受试者披露。受试者含漱时间为 10 s, 然后吐出。记录适口性情况, 不良口感强度记录为 0 到 4 (无味道为 0, 阈值不良适口性为 1, 适口性微差为 2, 适口性差为 3, 适口性非常差为 4), 考虑到每位受试者对不良味道的耐受程度各有不同, 难以准确判断各强度值的具体表现, 在开展尝味试验时, 受试者可以在综合对比了各含漱液的适口性情况后, 基于总体感受分别记录各含漱液的适口性强度值; 同时记录受试者的主观感受 (样品是否具有苦味、涩味以及

其他不良味道)。样品的选择是随机的; 每次尝味前, 用矿泉水漱口 3 次; 两次尝味之间间隔 15 min。

2.3 数据处理与统计分析

所有数据均以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 GraphPad Prism 软件进行绘图和统计学分析, 两组间的差异采用 t 检验进行分析。使用 SPSS 软件进行 Power 功效分析 (α 值为 0.05, 差异性双侧检验), $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 体外适口性评价

电子舌是一种新型的味觉分析测定系统, 可以利用传感器阵列检测的样品特征响应信号模拟人体味觉感知过程, 近年来受到了广泛关注^[30]。本研究检测了口腔科常用的 6 种含漱液, 其中浓替硝唑含漱液和复方硼砂含漱液根据说明书中的用法进行了稀释, 西吡氯铵含漱液选择了两个不同厂家的产品 (HSZY 和 MSYY), 聚维酮碘含漱液分别检测了未稀释样品和稀释样品。两个厂家西吡氯铵含漱液的 BT0 传感器先味电势值 (见图 1A)、回味电势值 (见图 1C) 和回味味觉值 (见图 1D) 均明显高于其他产品, 表明其具有较明显的盐酸盐类苦味信号响应, 且回味持续时间较长。西吡氯铵含漱液和复方氯己定含漱液的 AN0 传感器回味电势值 (见图 1C) 和回味味觉值 (见图 1D) 均明显高于其他产品, 表明两种产品具有较明显的碱性苦味信号响应。在酸性苦味 (C00 传

感器)方面,聚维酮碘含漱液的先味电势值(见图 1A 及图 1B)和回味电势值(见图 1C 及图 1D)均显著强于其他产品,且稀释样品的信号强度和未稀释样品类似,复方硼砂含漱液和西帕依固龈液表现出一定的酸性苦味。西帕依固龈液和聚维酮碘含漱液的 AE1 传感器先味电势值(见图 1A)和先味味觉值(见图 1B)均显著高于其他产品,其中未稀释的聚维酮碘含漱液的响应值最高;西帕

依固龈液的 AE1 传感器回味电势值(见图 1C)和回味味觉值(见图 1D)最高,而聚维酮碘含漱液的响应值有所降低,这表明西帕依固龈液的涩味较强且持续时间较长,聚维酮碘含漱液有涩味,但涩味回味减弱。上述结果表明不同的含漱液在 BT0(盐酸盐类苦味)、AN0(碱性苦味)、C00(酸性苦味)和 AE1(涩味)传感器上的响应均有所差异,各产品具有不同的适口性特点。

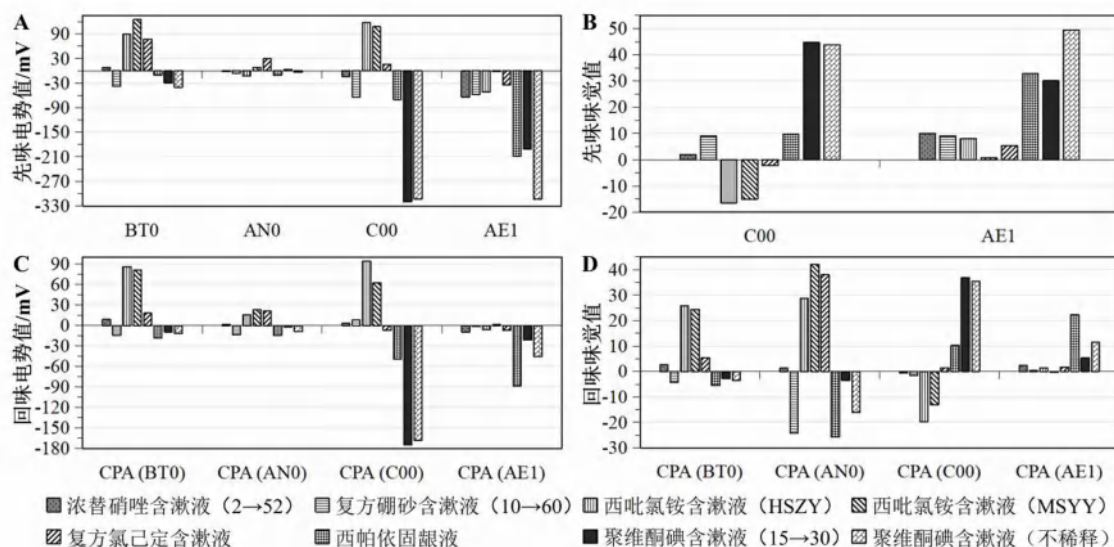


图 1 不同含漱液电子舌评价结果

Fig 1 Palatability profiles of different gargles based on electronic tongue evaluation

注:受限于电子舌仪器和配套软件的功能,BT0 和 AN0 传感器的先味电势值不能转换成味觉值。

Note: Limited by the function of electronic tongue analyzer and related software, initial taste-potential value for BT0 and AN0 sensors couldn't be transformed into taste value.

3.2 体内适口性评价

为了进一步评估不同含漱液的适口性,基于体外电子舌试验结果,采用受试者尝味试验对各样品进行体内适口性评价。严格按照患者实际使用含漱液时的方法进行含漱液样品配制,以便于真实反映含漱液的适口性情况。从受试者对各含漱液的适口性情况评分结果(见图 2 和表 3)可知,浓替硝唑含漱液和西吡氯铵含漱液的评分显著低于其他含漱液,表明这两种含漱液的整体适口性情况优于其他含漱液;浓替硝唑含漱液的适口性评分平均值略低于西吡氯铵含漱液,但差异没有统计学意义,表明两者具有类似的适口性。复方硼砂含漱液和聚维酮碘含漱液的适口性评分类似,两者均略低于复方氯己定含漱液的评分,但差异没有统计学意义,表明这 3 种含漱液的适口性情况类似;西帕依固龈液的适口性评分最高,显著高于其他各含漱液,表明其适口性最差,接受度最低。在受试者主观反馈方面,9 位受试者反馈了浓替硝唑含漱液具有淡淡的

薄荷味,有 14 位受试者反馈西吡氯铵含漱液具有较重的薄荷味,这可能是西吡氯铵含漱液的适口性评分略高于浓替硝唑含漱液的原因之一;有 12 位受试者反馈了复方硼砂含漱液具有淡淡的、无法描述的异味,可能是源自本品所含液化酚的酚臭;有 9 位受试者反馈了西吡氯铵含漱液具有明显的甜味,其中 3 位受试者反馈甜味过重,推测是该含漱液处方中添加的甜味剂所致;所有受试者均反馈复方氯己定含漱液具有较重的苦味,2 位受试者反馈有麻感,2 位受试者反馈有辛辣感,3 位受试者反馈有涩味;所有受试者均反馈西帕依固龈液具有较强的涩味(与图 1 电子舌结果相关)且持续时间较长[与图 1C ~ 1D CPA (AE1) 结果相关],这与本含漱液说明书中所描述的“味涩”一致,4 位受试者反馈有苦味,2 位受试者反馈有麻感(推测是涩味所致);7 位受试者反馈聚维酮碘含漱液具有先甜后苦、苦甜交加的适口性情况,3 位受试者反馈有糖浆味。

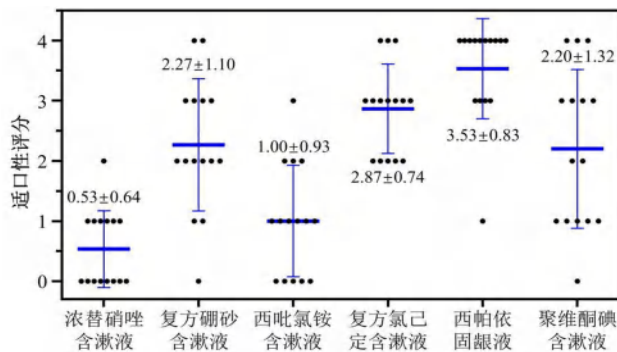


图2 通过人群尝味试验得到的含漱液适口性评分结果 ($n = 15$)
Fig 2 Palatability score profile of different gargles based on human taste panel assessment ($n = 15$)

表3 通过人群尝味试验得到的含漱液适口性评分的组间差异情况

Tab 3 Differences between groups of gargle palatability scores by human taste panel assessment

含漱液	复方硼砂含漱液	西吡氯铵含漱液	复方氯己定含漱液	西帕依固龈液	聚维酮碘含漱液
浓替硝唑含漱液	0.999***	0.344	1.000	1.000***	0.989***
复方硼砂含漱液		0.909**	0.395	0.928**	0.053
西吡氯铵含漱液			1.000***	1.000***	0.793**
复方氯己定含漱液				0.602*	0.381
西帕依固龈液					0.890**

注：括号内为 Power 功效分析 (α 值为 0.05，差异性双侧检验) 得到的 Power 值，* $P < 0.05$ ；** $P < 0.01$ ；*** $P < 0.001$ 。

Note: Data in parentheses mean Power value by Power analysis (α as 0.05, differential, two-sided test), * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

4.1 电子舌评价

电子舌采用标准化的检测程序来评价待测样品的味道，可以避免人群尝味评价中受试者适口性偏好和主观差异的影响，检测结果更客观^[20]。本研究使用的电子舌基于电化学分析中的电位法，配备了 4 种人工脂膜传感器（检测 BT0、AN0、C00 和 AE1 传感器），传感器表面覆盖的脂膜对特定物质具有特异选择性响应，导致膜电势变化，从而反映样品的酸、甜、苦、咸等各种味道，可提供初始味道（也称为先味，反映待测样品的初始味道）和余味（也称为回味，反映味道的持久性）的信息^[15, 20, 31]。电子舌评价结果反映了西吡氯铵含漱液和复方氯己定含漱液的盐酸盐类苦味（BT0）和碱性苦味（AN0）信号响应、聚维酮碘的酸性苦味（C00）和涩味信号（AE1）响应以及西帕依固龈液的涩味信号（AE1）响应，这些结果显示了上述含漱液的潜在苦味、涩味特点。

4.2 人群尝味评价

受试者尝味试验是常用的适口性评价方法，虽然具有操作烦琐、个体差异性、受试者主观影响、生活习惯影响等缺点，但该方法是最直接、最能真实反映适口性的评价方法，是适口性评价的“金标准”方法^[15, 19]。基于文献^[22, 24-25, 29]报道的人群尝味试验方案和受试者例数以及待评价

4 讨论

含漱液在口腔疾病的预防与治疗中发挥重要作用，但含漱液种类多样，口感特点差异较大，苦味、涩味等不良味道影响患者可接受性和用药依从性，进而影响含漱液的用药效果。药品适口性是影响口服和口腔局部作用药物临床应用的关键因素之一，近年来越来越受到药品监管机构和医药行业的重视。本研究通过体外（电子舌评价）和体内（人群尝味评价）两种方法，评价口腔科常用的 6 种含漱液的适口性。

含漱液的潜在适口性情况，本研究纳入 15 位健康成人受试者参与含漱液尝味试验。适口性评分结果与电子舌评价结果具有较强的相关性，受试者主观反馈情况显示出了电子舌结果以外的信息（例如麻感、辛辣感等）。含漱液适口性评分结果和组间差异情况显示，除适口性评分非常接近的个别组（例如浓替硝唑含漱液和西吡氯铵含漱液，复方硼砂含漱液和聚维酮碘含漱液）外，本研究能够有效地区分大部分含漱液的组间适口性差异（15 组比较中，有 11 组间的差异具有统计学意义）。对适口性评分结果进行 Power 功效分析，在 15 组比较中，有 9 组比较的 Power 值高于 0.8，显示出这些对比结果具有较高的可信度；在后续进一步对比评价 Power 值低于 0.8 的各组时，需要扩大样本量，本研究得到的适口性评分结果为样本量的计算提供了参考数据。考虑到本研究中的个别含漱液不适宜儿童和 / 或老年人群使用（例如，小儿和老年人慎用复方硼砂含漱液，6 岁以下儿童不宜使用聚维酮碘含漱液），本研究选择健康成人受试者进行尝味试验，初步评价了各含漱液的适口性情况，在此基础上，后续可以进一步选择儿童或老年人受试者，有针对性地对适合儿童或老年人的含漱液做更深入的评价。

4.3 矫掩味策略

采用适当的矫掩味技术可以掩盖药物的不良味道,药品研发过程中常用的矫掩味策略包括以下几类^[14, 32-33]:使用物理或分子屏障阻止药物在口腔中的溶解;通过共晶或改变 pH 值来降低药物在口腔中的溶解;使用甜味剂、调味剂或味道阻断剂来掩盖味道或减弱味蕾的敏感性。考虑到含漱液是口腔局部用药,药物需要在口腔中溶解后才能发挥作用,因此前两种掩味策略不适用于含漱液,而甜味剂、调味剂或味道阻断剂的掩味策略有望应用于含漱液中,改善其适口性。HSZY 和 MSYY 的西吡氯铵浓度均为 0.1% (m/v , %),但两者的电子舌评价结果略有差异;除了相同辅料组分薄荷油(或薄荷脑)、聚山梨酯 80、枸橼酸、甘油、无水乙醇和纯化水以外,HSZY 处方中还有枸橼酸钠(pH 调节剂)、色素(亮蓝)、留兰香精(调味剂)和复配甜味剂 US-50, MSYY 处方中还有甜菊糖苷(甜味剂);处方组成的差异导致了两种含漱液在电子舌各传感器上的响应信号的略微差异。电子舌通过检测各种待测物质和传感器人工脂膜之间的静电作用或疏水性相互作用产生的膜电势变化来反映其适口性情况,因此处方中的辅料成分也可能通过静电作用或疏水性相互作用来影响电子舌各传感器的响应信号,辅料成分的分子结构、电离情况、浓度、疏水性等特性是值得关注的参数。Choi 等^[34]采用电子舌方法评价了甜味剂橙皮苷二氢查尔酮、蔗糖、三氯蔗糖和阿斯巴甜对布洛芬、对乙酰氨基酚、盐酸曲马多和枸橼酸西地那非的掩味效果,发现甜味剂掩味效果主要依赖于其摩尔浓度和离子结构,而不是它们的甜度。Lenik 等^[35]采用电子舌法研究了环糊精、安赛蜜、糖精钠、蔗糖和乳糖对双氯芬酸的掩味效果,结果表明甜味剂结构是影响掩味效果的关键因素。

本研究的评价结果表明不同的含漱液分别具有苦、麻、涩、甜等适口性特点,明确各种含漱液的适口性特点可以为含漱液的临床应用提供参考和指导,有助于口腔科医师根据患者的偏好有针对性地用药,有利于含漱液更好地发挥对口腔疾病的预防和治疗作用。在以后的临床实践中,可以在询问、确认患者的味道偏好的基础上,有针对性地推荐合适的含漱液,并及时跟进、记录患者的用药情况,从而进一步验证本研究的结论,并为含漱液适口性评价的更深入研究提供临床数据支持。

参考文献

- [1] 王梦,夏付云,王宇甲,等.基于不同活性成分含漱液的研究进展[J].广东化工,2024,51(18):88-90.
- [2] 陈卫民,张璋,谢辉,等.口腔局部用药防治造血干细胞移植致口腔黏膜炎的临床研究进展[J].中南药学,2023,21(1):187-191.
- [3] Liu N, Liu Y, Zhang HL, et al. Investigation on the cognitive situation of gargles by dentists with different titles in a province of China: a cross-sectional survey [J]. Clin Med Res, 2020, 9(3): 47-53.
- [4] Prasad M, P atthi B, Singla A, et al. The clinical effectiveness of post-brushing rinsing in reducing plaque and gingivitis: a systematic review [J]. J Clin Diagn Res, 2016, 10: ZE01-ZE07.
- [5] 张竹砚,王雯,尚永一.含漱液在口腔疾病中的应用研究进展[J].现代医药卫生,2023,39(19):3360-3364.
- [6] Adenot CC, Abdelhakim HE. Palatability assessment of oral dosage forms for companion animals: a systematic review [J]. J Drug Deliv Sci Tec, 2022, 77: 103841.
- [7] Schluterman HM, Linardos CG, Drulia T, et al. Evaluating palatability in young children: a mini-review of relevant physiology and assessment techniques [J]. Front Pediatr, 2024, 12: 1350662.
- [8] Shinotsuka H, Mizutani N, Aikawa S, et al. Palatability evaluation of sulfamethoxazole/trimethoprim with sweetener using the two-bottle choice test [J]. Chem Pharm Bull, 2023, 71(12): 906-908.
- [9] Ternik R, Liu F, Bartlett JA, et al. Assessment of swallowability and palatability of oral dosage forms in children: report from an M-CERSI pediatric formulation workshop [J]. Int J Pharmaceut, 2018, 536(2): 570-581.
- [10] World Health Organization. Development of paediatric medicines: points to consider in formulation [R/OL]. (2011-12-31) [2025-04-18]. <https://cdn.who.int/media/docs/default-source/medicines/norms-and-standards/guidelines/trs970/annex5trs-970.pdf>.
- [11] European Medicines Agency. Guideline on pharmaceutical development of medicines for paediatric use [EB/OL]. (2013-08-01) [2025-04-18]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-guideline-pharmaceutical-development-medicines-paediatric-use_en.pdf.
- [12] 国家药品监督管理局药品审评中心.儿童用化学药品改良型新药临床试验技术指导原则(试行)[EB/OL].(2021-09-13) [2025-04-18]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/924cbea7b-9ce702f48196eb8f80d5479>.
- [13] 国家药品监督管理局药品审评中心.儿童用药(化学药品)药学开发指导原则(试行)[EB/OL].(2020-12-31) [2025-04-18]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/95102a5facaf8fd-4430d0916a24cab53>.

- [14] 国家药品监督管理局药品审评中心. 儿童用药口感设计与评价的技术指导原则(试行)[EB/OL]. (2022-11-02)[2025-04-18]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/35fa15bba5721b-0c653262d14792f3b6>.
- [15] 张威风, 王晓玲, 翟光喜, 等. 儿童用药口感评价方法研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2021, 16(9): 1407-1411.
- [16] 张威风, 李国相, 戚淑叶, 等. 体外溶出试验在药品适口性评价中的应用进展[J]. 中国医药工业杂志, 2024, 55(5): 637-644, 651.
- [17] Guedes MDV, Marques MS, Guedes PC, et al. The use of electronic tongue and sensory panel on taste evaluation of pediatric medicines: a systematic review[J]. Pharm Dev Technol, 2021, 26(2): 119-137.
- [18] Imam M, Nagpal K. The electronic tongue: an advanced taste-sensing multichannel sensory tool with global selectivity for application in the pharmaceutical and food industry[J]. Pharm Dev Technol, 2023, 28(3-4): 318-332.
- [19] 梅冬, 张欢, 游龙泰, 等. 基于电子舌技术的儿童用药羧甲司坦口服溶液的适口性评价[J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(24): 3470-3474.
- [20] 戚淑叶, 耿利华, 赵悦, 等. 电子舌在药品适口性评价中的应用进展[J]. 药学学报, 2023, 58(11): 3151-3159.
- [21] Frie JA, Khokhar JY. An open source automated two-bottle choice test apparatus for rats[J]. HardwareX, 2019, 5: e00061.
- [22] Yoo O, Von Ungern-Sternberg BS, Lim LY. Paediatric medicinal formulation development: utilising human taste panels and incorporating their data into machine learning training[J]. Pharmaceutics, 2023, 15(8): 2112.
- [23] Abdelhakim HE, Williams GR, Craig DQM, et al. Human mouthfeel panel investigating the acceptability of electrospun and solvent cast orodispersible films[J]. Int J Pharmaceut, 2020, 585: 119532.
- [24] Peng YG, Zhang H, Gao LC, et al. Palatability assessment of carbocysteine oral solution strawberry taste versus carbocysteine oral solution mint taste: a blinded randomized study[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 822086.
- [25] Zhang WF, Li GX, Xiao CQ, et al. Mesoporous silica carrier-based composites for taste-masking of bitter drug: fabrication and palatability evaluation[J]. AAPS Pharm-SciTech, 2022, 23(2): 75.
- [26] 梅冬, 游龙泰, 张欢, 等. 基于体内外评价技术对儿童口服铁剂的适口性评价研究[J]. 药科学报, 2024, 59(6): 1847-1853.
- [27] 王利民, 戚淑叶, 张威风, 等. 基于感官评价和电子舌法的甘草锌颗粒处方筛选与掩味作用分析[J]. 药科学报, 2023, 58(11): 3191-3197.
- [28] 薛婉莹, 李红鑫, 吴婧楠, 等. 基于电子舌技术与人工口尝评价相结合的银杏叶提取物掩味技术研究[J]. 中南药学, 2022, 20(8): 1799-1803.
- [29] Li SY, Zhang Y, Khan AR, et al. Quantitative prediction of the bitterness of atomoxetine hydrochloride and taste-masked using hydroxypropyl- β -cyclodextrin: a bio-sensor evaluation and interaction study[J]. Asian J Pharm Sci, 2020, 15(4): 492-505.
- [30] 廖萍, 曹萌, 陈一飞, 等. 药品适口性评价新工具: 电子舌[J]. 上海医药, 2024, 45(13): 22-28.
- [31] 杨杰, 梁林, 李树英, 等. 基于仿生味觉系统的药物处方开发[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(7): 768-774.
- [32] Walsh J, Cram A, Woertz K, et al. Playing hide and seek with poorly tasting paediatric medicines: do not forget the excipients[J]. Adv Drug Deliver Rev, 2014, 73: 14-33.
- [33] 赵佳柱, 祝雨辰, 邝柏宇, 等. 基于CNKI文献计量分析的中药矫味与掩味研究现状[J]. 中南药学, 2023, 21(4): 1093-1100.
- [34] Choi DH, Kim NA, Nam TS, et al. Evaluation of taste-masking effects of pharmaceutical sweeteners with an electronic tongue system[J]. Drug Dev Ind Pharm, 2014, 40(3): 308-317.
- [35] Lenik J, Wesoly M, Ciosek P, et al. Evaluation of taste masking effect of diclofenac using sweeteners and cyclodextrin by a potentiometric electronic tongue[J]. J Electroanal Chem, 2016, 780: 153-159.

(收稿日期: 2025-05-16; 修回日期: 2025-07-16)

氢氯噻嗪低共熔体系的筛选及药效评价

薛莺¹, 曹烨君¹, 王一男², 吴静¹, 罗卓卡^{1*} (1.常州市第四人民医院药剂科, 江苏 常州 213032; 2.徐州医科大学药学院, 江苏 徐州 221004)

摘要: **目的** 构建一种新型低共熔溶剂 (DES) 递送系统, 以同步提升其口服生物利用度及疗效。**方法** 基于溶解度筛选天然组分 DES 体系; 通过 CCK-8 法细胞活力检测及 SD 大鼠 7 d 重复给药实验评估 DES 的生物安全性; 利用 Caco-2 单层模型解析 DES 对药物肠道转运的调控机制; 结合药动力学与药效学综合评价 DES 的体内增效作用。**结果** 苹果酸-蔗糖-水 (摩尔比 1:2:2) DES 使氢氯噻嗪溶解度提升为 6.74 mg/mL; 在 0.8 ~ 6.4 mg/mL DES 内, HEK293T、L02 及 Caco-2 细胞存活率均 > 80%, 且未诱发动物肝肾损伤。大鼠药动力学研究显示, DES 提高了氢氯噻嗪的相对生物利用度, 并显著增加了利尿率。**结论** 苹果酸-蔗糖-水 (1:2:2) DES 增溶与肠道渗透性协同增强机制, 显著提高了氢氯噻嗪的生物利用度与药效强度, 其天然组分特性与可控毒性为 BCS IV 类药物的新型制剂开发提供了安全高效的技术路径。

关键词: 氢氯噻嗪; 低共熔溶剂; 生物利用度; 溶解度; 细胞毒性; 药动力学

中图分类号: R943, R96 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)12-3564-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.015

Screening of hydrochlorothiazide-based deep eutectic system and pharmacodynamic evaluation

XUE Ying¹, CAO Yejun¹, WANG Yinan², WU Jing¹, LUO Zhuoka^{1*} (1. Department of Pharmacy, The Fourth People's Hospital of Changzhou, Changzhou Jiangsu 213032; 2. School of Pharmacy, Xuzhou Medical University, Xuzhou Jiangsu 221004)

Abstract: Objective To construct a novel deep eutectic solvent (DES) delivery system to simultaneously enhance the oral bioavailability and therapeutic efficacy of hydrochlorothiazide. **Methods** Natural component DES systems were screened based on the solubility; CCK-8 assays and 7-day repeated dosing experiments in SD rats were used to evaluate DES biosafety; Caco-2 monolayer models helped explor the mechanism of DES regulation on drug intestinal transport. Integrated pharmacokinetics and pharmacodynamics were used to determine the in vivo synergistic effect. **Results** Malic acid-sucrose-water DES (at 1:2:2 molar ratio) achieved solubility 6.74 mg/mL for hydrochlorothiazide. Within 0.8 ~ 6.4 mg/mL, DES maintained > 80% viability in HEK293T, L02, and Caco-2 cells without inducing hepatorenal toxicity in rats. Pharmacokinetic studies revealed DES formulation greatly improved relative bioavailability and diuresis rate in rats. **Conclusion** The malic acid-sucrose-water DES at 1:2:2 demonstrates synergistic solubilization and intestinal permeability enhancement, markedly elevates hydrochlorothiazide bioavailability and potency, and provides a safe, and efficient platform for the development of BCS class IV drugs due to its natural composition and controlled toxicity.

Key words: hydrochlorothiazide; deep eutectic solvent; bioavailability; solubility; cytotoxicity; pharmacokinetics

现代药物研发中, 约四成已上市药品及七成在研候选药物存在溶解性缺陷^[1]。这一理化特性直接

影响药物的胃肠道吸收效率, 使口服制剂常面临生物利用度降低的困境。根据生物药剂学分类系统

基金项目: 徐州市科技发展社会事业项目 (No.KC23308)。

作者简介: 薛莺, 女, 主管药师, 主要从事药物制剂分析研究, email: 18151231028@163.com * **通信作者:** 罗卓卡, 女, 主任药师, 主要从事临床药学和药物安全性评价研究, email: 120104302@qq.com

(BCS) 对药物溶解性和渗透性的双重评估, BCS IV 类药物同时存在溶解性低和渗透性低的特点, 其体内吸收过程受限于胃肠道溶解度^[2-3]。值得注意的是, IV 类药物在临床应用中尤为常见, 因而通过制剂技术创新改善难溶药物的溶解性能, 已成为提升口服给药有效性的关键突破口^[4]。

氢氯噻嗪作为经典噻嗪类利尿剂的典型代表, 根据 BCS 被划分为 IV 类药物, 其降压机制主要涉及促进钠离子排泄及降低外周血管阻力等途径^[5-6]。然而, 该药物在临床应用中可能引发多种不良反应, 包括代谢紊乱 (如低钾血症、高尿酸血症及血糖异常) 和免疫相关反应 (皮疹、光敏性皮炎等), 需通过定期实验室监测实现风险管控^[6]。值得注意的是, 该化合物存在明显的药动学缺陷, 即水溶性较差、口服生物利用度偏低, 这与其 BCS IV 类药物的理化特性密切相关, 导致临床疗效存在个体差异。目前针对其生物药剂学性质的改良研究仍处于探索阶段, 特别是通过制剂技术创新改善溶解特性与吸收效率的相关报道尤为匮乏。

药物共晶技术领域, 低共熔溶剂 (DES) 作为新型功能材料备受关注。该体系由氢键受体与供体通过特定摩尔比例形成的超分子复合物, 展现出绿色溶剂特性 (可调控的合成工艺、低生态毒性等优势)^[7]。其独特的生物适配性已延伸至药物递送系统开发, 主要应用方向包括难溶药物增溶策略构建^[8]、跨膜转运效率优化 (透皮/肠道吸收增强)^[9]、药物活性位点暴露调控^[10]等创新领域。特别值得关注的是, 低共熔技术可实现药物分子与辅料的原位复合, 同步改善药物的物理化学特性与生物利用行为^[11-12]。本研究选择氢氯噻嗪作为 BCS IV 类药物的模型化合物, 其分子内同时存在的氢键作用位点使其成为 DES 体系构建的理想研究对象。

基于此, 本研究拟通过系统构建氢氯噻嗪-DES 共晶体系, 重点解决氢氯噻嗪溶解特性与生物利用度的技术瓶颈。研究成果既可为该药物新型递送系统的开发提供分子机制层面的理论依据, 又能为 BCS IV 类药物共晶体系的设计提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1260 型高效液相色谱仪、1290 Infinity II 型液相色谱系统串联 G6470A 三重四极杆串联质谱仪 (美国安捷伦公司), BB150 型二氧化碳培养箱、LUX 多功能酶标仪 (美国 Thermo Fisher 科技有限公司), NDJ-1 型旋转黏度计 (上海右一仪器有限公司)。

1.2 试药

氢氯噻嗪 (纯度 $\geq 99\%$, 湖北康迪斯化工有限

公司); 甲醇 (天津永大化工有限公司), HPLC 级甲醇 (美国 Fisher Scientific); 薄荷醇、乳酸、氯化胆碱、百里酚、甜菜碱、苹果酸、葡萄糖、木糖醇、蔗糖、乙酰胺、甘油、脯氨酸、抗坏血酸 (分析纯, 上海阿拉丁试剂有限公司)。大鼠尿素氮 (BUN)、肌酐 (Cr)、谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) ELISA 试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。

1.3 动物与细胞

SPF 级健康 SD 大鼠 (200 ± 20) g [江苏集萃药康生物科技股份有限公司, 许可证号: SCXK (苏) 2022-0009], 饲养于温度 (22 ± 2) °C、湿度 (55 ± 5) % 的环境中, 实验方案经动物伦理委员会批准 (批准号: 202305T006)。人胚肾细胞 (HEK293T, SCSP-5291)、人正常肝细胞 (L02, SCSP-3591) 及人结直肠腺癌细胞 (Caco-2, SCSP-4031) [中国科学院细胞库 (上海)]。

2 方法

2.1 DES 的制备

基于氢键供体与受体的摩尔比 (见表 1), 精密称取各组分子于玻璃烧杯中, 置于磁力搅拌器 (800 r/min) 中加热至预设温度, 直至形成均一透明液体^[13-14]。所得 DES 冷却后密封保存于干燥器中, 备用。

表 1 8 种不同 DES 的组成比例及反应条件

Tab 1 Ratios and reaction conditions for 8 different DESs

组成成分	化学计量比	反应温度 / °C
蔗糖 - 柠檬酸	1 : 1	80
薄荷醇 - 百里酚	1 : 1	80
甘油 - 脯氨酸	4 : 1	70
木糖醇 - 抗坏血酸	3 : 1	100
苹果酸 - 蔗糖	1 : 2	90
乳酸 - 葡萄糖	1 : 2	90
甜菜碱 - 乳酸	1 : 2	90
氯化胆碱 - 乙酰胺	1 : 2	80

2.2 氢氯噻嗪在低共熔体系中的溶解度的测定

2.2.1 HPLC 分析条件 色谱柱为 Agilent C18 反相柱 ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); 流动相: 甲醇 - 水 ($85 : 15$, V/V), 等度洗脱; 流速 1.0 mL/min , 柱温 $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 检测波长 272 nm , 进样量 $5 \mu\text{L}$ ^[15]。

2.2.2 标准曲线与定量限 精密称取氢氯噻嗪对照品 5.0 mg , 甲醇溶解定容, 配制 1 mg/mL 母液。采用梯度稀释法获得浓度梯度为 0.01 、 0.05 、 0.1 、 0.5 、 2 、 10 、 $50 \mu\text{g/mL}$ 的系列标准溶液。经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后, 进行 HPLC 检测。以标准溶液浓度为自变量, 色谱峰峰面积为因变量, 建立线性回归方程。

2.2.3 精密度与准确度实验 精密度测试: 取 $10 \mu\text{g/mL}$ 氢氯噻嗪标准溶液, 通过连续 6 次进样分析, 计算峰面积相对标准偏差 (RSD), 验证仪器精密度。加标回收率实验: 精密量取 6 份 0.5 mL

已知浓度样品溶液, 分别加入 0.5 mL 10 $\mu\text{g/mL}$ 对照溶液, 混匀后测定目标物含量。计算回收率, 回收率 (%) = (加标样品测试值 - 样品测定值) / 加标量 $\times 100\%$ 。

2.2.4 多溶剂体系溶解度测定 准确移取 1 mL DES 至 5 mL 离心管中, 加入过量氢氯噻嗪, 涡旋混匀 30 s。避光条件下 25 $^{\circ}\text{C}$ 静置 24 h, 通过光学浊度法判定过饱和状态。3330 g 离心 5 min, 取上清液经 0.45 μm 滤膜过滤, 收集滤液。将滤液以甲醇稀释 1000 倍后进样, 依据标准曲线计算溶解度值。

2.3 DES 的细胞毒性评估

2.3.1 细胞培养体系 HEK293T、L02 及 Caco-2 细胞系均采用高糖 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清、100 IU/mL 青霉素、100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素及 0.6 mg/mL 新霉素) 进行培养。细胞接种密度为 6000 个 / cm^2 , 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱中常规传代, 每 48 h 更换培养基以维持细胞活性。

2.3.2 细胞活力测定 采用 CCK-8 法评估 DES 对上述细胞系的毒性效应。将细胞悬液以 2×10^4 个 / 孔的密度接种于 96 孔板, 预培养 24 h 至贴壁。移除原培养基, 替换为含 0.8 ~ 6.4 mg/mL 质量浓度 DES 的新鲜培养基, 继续培养 24 h。每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 4 h 后, 使用酶标仪测定 450 nm 处吸光度 (OD 值)。按公式计算相对细胞存活率, 细胞存活率 (%) = $(\text{OD}_{\text{实验组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}) / (\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}) \times 100\%$, 其中空白组为只含培养基而不含细胞的样品组, 对照组为含有培养基和细胞的样品组。

2.4 DES 的体内器官毒性评价

选取 SD 大鼠 12 只, 随机分为对照组与 DES 暴露组, 每组 6 只, 雌雄各半。DES 暴露组自由摄取含 10 mg/mL DES 的饮用水, 对照组给予正常饮水, 持续干预 7 d。每日监测动物行为学指标 (活动度、摄食量) 及体重变化, 记录异常毒性反应。于实验第 0 日 (基线) 及第 7 日 (终点) 经尾静脉采血, 分离血浆后通过 ELISA 检测 ALT、AST、Cr 及 BUN 水平。麻醉处死动物后, 迅速摘取肝脏、肾脏及结肠组织, 经 10% 中性甲醛固定 18 h, 梯度乙醇脱水, 石蜡包埋后制备 5 μm 切片。切片经脱蜡、苏木精 - 伊红 (HE) 染色及中性树胶封固后, 于光学显微镜下观察组织病理学改变。

2.5 基于 DES 的氢氯噻嗪药动力学研究

2.5.1 实验动物与血样采集 选取 12 只 SD 大鼠, 随机分为两组, 禁食 12 h 后, 对照组灌胃给予 10 mg/kg 的氢氯噻嗪水混悬溶液, DES 组灌

胃给予 10 mg/kg 的氢氯噻嗪 DES 溶液。分别于给药后 0、0.5、1、1.5、2、2.5、4、8、12、24 h 通过眼静脉丛穿刺采集全血 300 μL 至肝素化 EP 管, 立即于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、17 300 g 离心 3 min, 分离血浆并冻存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 待测。

2.5.2 血浆前处理 取 100 μL 血浆加入 10 μL 托伐普坦内标溶液 (100 ng/mL), 混合后加入 300 μL 乙腈, 涡旋振荡 1 min, 17 300 g 离心 10 min。转移上清液至氮吹仪, 35 $^{\circ}\text{C}$ 下挥干溶剂, 残留物以 100 μL 甲醇 - 水 (1:1, V/V) 复溶, 经 0.22 μm 滤膜过滤后, 待测。

2.5.3 LC-MS/MS 分析参数 色谱条件: 选用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 柱 (2.1 mm $\times$ 50 mm, 1.8 μm) 为色谱柱; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 流动相 A (水) - B (乙腈); 梯度洗脱 (0 ~ 1.5 min, 20%B; 1.5 ~ 4 min, 90%B; 4 ~ 5 min, 30%B); 流速 0.3 mL/min; 进样量 1 μL 。质谱条件: 选用 ESI 负离子模式, 离子源温度 500 $^{\circ}\text{C}$, 喷雾电压 3.5 kV; MRM 监测离子对: 氢氯噻嗪 m/z 296 $\rightarrow$ 269 (碰撞能 15 eV), 厄贝沙坦 m/z 427 $\rightarrow$ 193 (碰撞能 10 eV) [16]。

2.5.4 标准曲线建立 采用空白血浆加标法配制 1 ~ 1000 ng/mL 系列质量浓度校准品 (含 1% 内标), 按 “2.5.2” 项下前处理流程操作。以氢氯噻嗪浓度 (x) 与内标归一化峰面积比值 (y) 进行加权最小二乘回归, 建立定量标准曲线。

2.5.5 药动力学参数分析 采用 DAS 3.2.6 软件非房室模型计算药时曲线下面积 ($AUC_{0 \sim t}$ 、 $AUC_{0 \sim \infty}$)、达峰时间 (t_{max})、表观清除率 (CL_z/F)、达峰浓度 (C_{max})、消除半衰期 ($t_{1/2}$)。相对生物利用度通过 AUC 来确定。

2.6 DES 对氢氯噻嗪经 Caco-2 细胞跨膜转运的调控作用

2.6.1 Caco-2 单层模型构建 取对数生长期细胞, 经胰酶消化、离心收集后, 重悬于含 10% 胎牛血清的完全培养基。将细胞悬液以 1×10^5 个 / cm^2 密度接种至 Transwell 板顶室 (AP 侧, 0.5 mL), 底室 (BL 侧) 注入 1.5 mL 培养基, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下持续培养 21 d, 通过跨膜电阻 (TEER) $> 500 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 验证单层完整性 [17]。

2.6.2 跨膜转运实验设计 分别移除 AP、BL 侧培养基, 预热的 HBSS 缓冲液 (pH 6.8) 清洗两次, 平衡 30 min。DES 组 AP 侧加入 0.5 mL 含 6.4 mg/mL DES 与 100 $\mu\text{g/mL}$ 氢氯噻嗪的 HBSS 溶液; BL 侧注入 1.5 mL 空白 HBSS; 对照组 AP 侧加入等体积 HBSS - 氢氯噻嗪溶液。分别于 0、0.5、1、2、4、8 h 取 BL 侧液体 0.5 mL (补加等量 HBSS), LC-MS/MS 法检测药物浓度。根据标准曲线计算

转运量 (Q), $Q(\mu\text{g}) = (C_{\text{BL}} \times V_{\text{BL}}) \times F$, 其中, C_{BL} 为 BL 侧氢氯噻嗪质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$), V_{BL} 为取样体积 (mL), F 为稀释倍数。

2.7 DES 对氢氯噻嗪利尿活性的影响

选取 24 只 SD 大鼠, 随机分为 4 组。氢氯噻嗪水溶液组: 灌胃给予 10 mg/kg 氢氯噻嗪的水混悬溶液 2 mL; 氢氯噻嗪 DES 组: 灌胃给予 10 mg/kg 氢氯噻嗪-DES 混悬液 2 mL; 空白组: 灌胃给予水溶液 2 mL; 空白 DES 组: 灌胃给予 DES 溶液 2 mL。给药后立即将大鼠转移至代谢笼, 收集 6 h 内尿液, 记录总尿量 (mL), 并计算利尿率。利尿率 (%) = [(用药组尿量 - 空白组尿量) / 空白组尿量] $\times 100\%$ 。

2.8 统计分析

采用 SPSS 23.0 软件进行单因素方差分析 (ANOVA), 组间差异通过 Tukey 法进行多重比较。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 氢氯噻嗪在不同 DES 体系中的溶解度特性

3.1.1 HPLC 方法学验证 氢氯噻嗪在 0.01 ~ 50 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积呈良好的线性关系, 标准曲线方程为: $y = 42.5x + 13.1$, $r = 0.9995$, 定量限为 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 。方法学验证结果显示: 日内精密度 $RSD = 1.6\%$ ($n = 6$), 平均加标回收率为 97.9% ($RSD = 1.9\%$), 表明该方法符合定量分析要求。

3.1.2 溶剂体系优化 氢氯噻嗪在水中的溶解度低于定量限 ($< 0.01 \mu\text{g/mL}$), 基于苹果酸-蔗糖

的 DES 体系对溶解度提升最显著 (见表 2)。通过调节水含量 (摩尔比 1 : 2 : 1 至 1 : 2 : 4), 发现溶解度与 DES 黏度成负相关。最终选择苹果酸-蔗糖-水 (1 : 2 : 2) 为最优体系, 兼顾高溶解度 (6.74 mg/mL) 与适宜黏度 ($< 50 \text{ mPa} \cdot \text{s}$)。

表 2 溶解氢氯噻嗪不同溶剂的理化性质对比

Tab 2 Comparison of physicochemical properties of different solvents for dissolving hydrochlorothiazide

溶剂	化学计量比	溶解度 / (mg/mL)	黏度 / ($\text{mPa} \cdot \text{s}$)
水	—	$< 10^{-5}$	2.91
甲醇	—	3.12	0.51
蔗糖-柠檬酸	1 : 1	2.51	114
薄荷醇-百里香酚	1 : 1	4.38	91
甘油-脯氨酸	4 : 1	3.57	112
木糖醇-抗坏血酸	3 : 1	5.68	127
乳酸-葡萄糖	1 : 2	6.68	95
甜菜碱-乳酸	1 : 2	4.81	87
氯化胆碱-乙酰胺	1 : 2	5.15	78
苹果酸-蔗糖	1 : 2	7.41	105
苹果酸-蔗糖-水	1 : 2 : 1	7.10	77
苹果酸-蔗糖-水	1 : 2 : 2	6.74	46
苹果酸-蔗糖-水	1 : 2 : 3	5.41	34
苹果酸-蔗糖-水	1 : 2 : 4	4.97	27

3.2 DES 的细胞相容性评价

CCK-8 实验表明, 苹果酸-蔗糖-水 (1 : 2 : 2) 在 0.8 ~ 6.4 mg/mL DES 中, HEK293T、L02 及 Caco-2 细胞存活率均 $> 80\%$ (见图 1), 提示其具有良好生物安全性。

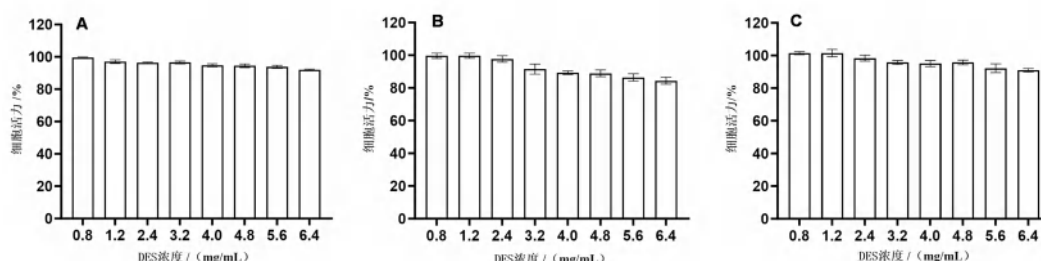


图 1 DES 对 HEK293T (A)、L02 (B)、Caco-2 (C) 的细胞毒性

Fig 1 Cytotoxicity of DES on HEK293T (A), L02 (B) and Caco-2 (C) cells

3.3 DES 的体内安全性验证

连续 7 d 口服苹果酸-蔗糖-水 (1 : 2 : 2) DES (10 mg/mL) 的 SD 大鼠未出现异常行为或死亡。与对照组相比, DES 组与对照组增重趋势一致 (见图 2); 血液生化指标 ALT、AST、Cr 及 BUN 水平均差异无统计学意义 (见图 3); 组织病理学结果显示肝、肾及结肠组织 HE 染色未见炎性浸润或结构损伤 (见图 4)。上述结果证实该 DES 体系在吸收、代谢及排泄过程中未引发显著器官毒性。

3.4 DES 对药物肠吸收的促进作用

Caco-2 单层模型 ($\text{TEER} > 500 \Omega \cdot \text{cm}^2$) 实验显示, DES 可显著提升氢氯噻嗪的跨膜转运效率 (见图 5)。AP $\rightarrow$ BL 方向累积转运量呈时间依赖性, DES 组 8 h 累积转运量较水溶液对照组提高 1.8 倍 ($P < 0.05$)。

3.5 药动学行为改善

DES 作为载体的氢氯噻嗪口服制剂显著改善其药动学参数 (见图 6 及表 3)。具体表现为 C_{max} 相较水溶液对照组显著升高 ($P < 0.05$), 表明药物吸收增强; $AUC_{0 \sim \infty}$ 值显著增加 ($P < 0.05$), 表明药物

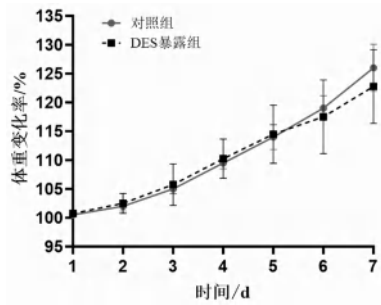


图2 口服DES对大鼠体重变化的影响

Fig 2 Effect of oral administration of DES on body weight changes in rats

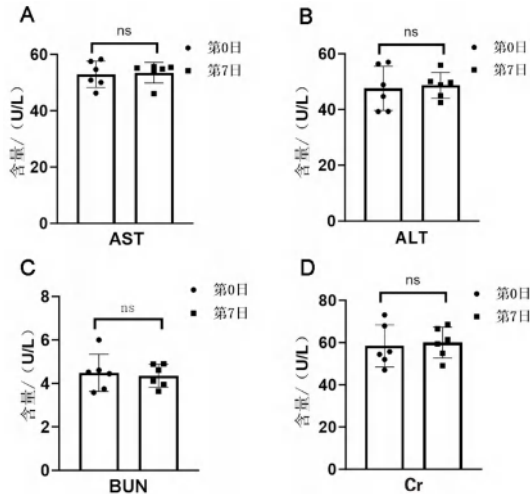


图3 口服DES对大鼠血清中AST、ALT、BUN、Cr含量的影响

Fig 3 Effect of oral administration of DES on AST, ALT, BUN and Cr levels in serum of rats

表3 口服氢氯噻嗪主要药动学参数对比

Tab 3 Pharmacokinetic parameters following oral administration of hydrochlorothiazide

组别	$AUC_{0\sim t} / [(\mu\text{g} \cdot \text{h}) / \text{L}]$	$AUC_{0\sim \infty} / [(\mu\text{g} \cdot \text{h}) / \text{L}]$	$C_{\text{max}} / (\mu\text{g} / \text{L})$	$t_{1/2} / \text{h}$	$t_{\text{max}} / \text{h}$	$CL_z / F / [L / (\text{h} \cdot \text{kg})]$
对照组	564 ± 165	608 ± 205	213 ± 67	7.75 ± 1.9	2.1 ± 0.1	0.22 ± 0.078
DES组	$978 \pm 267^*$	$1045 \pm 377^*$	$331 \pm 82^*$	6.91 ± 1.1	2.2 ± 0.1	$0.14 \pm 0.041^*$

注：与对照组比较， $^*P < 0.05$ 。

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

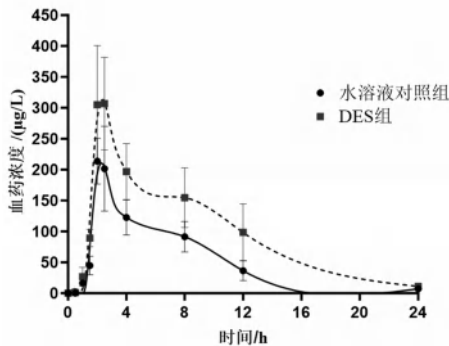


图6 大鼠口服氢氯噻嗪后血药浓度-时间曲线对比

Fig 6 Comparison of plasma concentration-time curves of hydrochlorothiazide in rats after the oral administration

可通过延长药物作用时间增强其利尿效应。

4 讨论

口服给药是临床治疗的主要途径之一，其疗

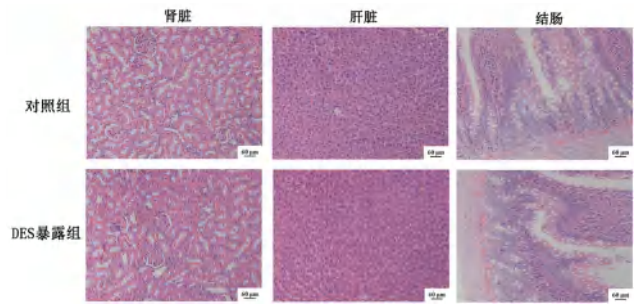


图4 口服DES对大鼠肾脏、肝脏和结肠组织的影响(HE染色)

Fig 4 Effect of oral administration of DES on the kidney, liver and colon tissues of rats (HE staining)

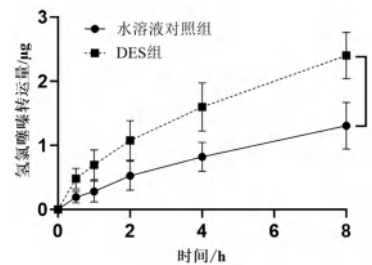


图5 DES对Caco-2细胞模型中氢氯噻嗪跨膜转运的影响($^*P < 0.05$)

Fig 5 Effect of DES on the transmembrane transport of hydrochlorothiazide in Caco-2 cell model ($^*P < 0.05$)

暴露量增加，是对照组的1.7倍。上述结果归因于DES对药物溶解度及肠道渗透性的协同提升。

3.6 利尿活性增效作用

如图7所示，DES的利尿率显著高于水溶液($P < 0.05$)。表明DES不仅提高生物利用度，还

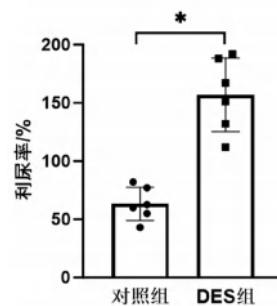


图7 口服氢氯噻嗪-DES对大鼠利尿率影响($^*P < 0.05$)

Fig 7 Effect of oral administration of hydrochlorothiazide in DES on diuretic rate in rats ($^*P < 0.05$)

效受药物吸收、分布、代谢及排泄(ADME)过程的综合影响，其中肠道吸收效率为关键限速步骤^[18]。氢氯噻嗪作为BCS IV类药物，其低溶解度与低渗透性严重制约了它的口服生物利用度。

本研究首次证实, 苹果酸-蔗糖-水 (1:2:2) 组成的 DES 可协同改善氢氯噻嗪的溶解性及肠道渗透性, 进而显著提升利尿活性与相对生物利用度。药动学数据显示, DES 组 CL_z/F 降低而 $t_{1/2}$ 无显著变化, 表明生物利用度提升主要源于吸收相的优化, 而非代谢或排泄路径的改变。其机制可能为 DES 中的羧酸基团 (苹果酸) 及羟基 (蔗糖) 可与氢氯噻嗪磺胺基团形成多重氢键网络, 同时甜菜碱的季铵结构通过 $\pi-\pi$ 堆积增强药物分子分散稳定性, 共同促进溶出-吸收协同增效。

氢氯噻嗪的 DES 体系在体外 Caco-2 模型与动物体内的增幅接近, 可能归因于 DES 在肠道环境的稳定性, 即 DES 组分可被肠道酶部分代谢, 但其增溶作用在吸收阶段已主导生物利用度提升; 另外氢氯噻嗪的首关代谢较低, DES 对吸收的增强直接反映在 AUC ; 分布与排泄的平衡: CL_z/F 降低表明清除率下降, 可能与 DES 延缓药物代谢有关。综上, 体外与体内结果的一致性验证了 DES 通过增溶和促渗双重机制改善吸收, 而代谢影响较小。后期研究可聚焦于 Caco-2 细胞或肠组织中 P-糖蛋白 (P-gp)、乳腺癌耐药蛋白 (BCRP)、多药耐药相关蛋白 (MRP) 等外排泵的表达水平, 明确 DES 是否调控转运蛋白活性从而增加生物利用度。

作为新型药用辅料, DES 的生物安全性是其临床转化的核心考量。本研究从细胞-器官-整体动物层面系统评估其毒性风险。细胞相容性结果显示在 0.8 ~ 6.4 mg/mL 的 DES 中, HEK293T、L02 及 Caco-2 细胞的存活率 > 80%; 器官保护性结果显示连续 7 d 摄入 DES 的大鼠肝肾功能指标与对照组相比差异无统计学意义, 且组织病理学未见炎性损伤。另外, DES 组分中的苹果酸 (FDA 认证的食品添加剂) 及蔗糖 (机体能量来源) 均为 GRAS (Generally Recognized as Safe) 公认的安全物质, 其摩尔比设计遵循生理代谢耐受阈值, 确保体系生物可接受性。

针对含水 DES 口服载体或者口服制剂的开发设计, 可考虑将药物的 DES 溶液冻干为固体粉末, 复溶后保持增溶效果; 或将 DES 与羟丙基甲基纤维素等载体共喷雾干燥, 制成固体分散体改善储存稳定性; 也可以考虑利用脂质或聚合物包裹 DES-药物复合物, 延缓水分蒸发并控制释放。最后, 本文测试了乙酰唑胺 (BCS IV 类) 在苹果酸-蔗糖-水 (1:2:2) 中的溶解度, 其从 0.01 mg/mL (水溶液) 提升至 4.3 mg/mL (DES), 表明该体系对疏水药物具有增溶潜力, 未来研究将系统评估更多 BCS IV 类药物的适用性。

5 结论

本研究成功构建苹果酸-蔗糖-水 (1:2:2) DES 体系, 并验证其作为氢氯噻嗪口服载体的多重优势。该 DES 体系为 BCS IV 类药物的剂型改良提供了创新解决方案, 其“天然组分-可控毒性-多重增效”的设计策略有望推广到其他难溶性药物的开发。

参考文献

- [1] Kimoto K, Yamamoto M, Karashima M, et al. Pharmaceutical cocrystal development of TAK-020 with enhanced oral absorption [J]. Crystals, 2020, 10 (3): 211.
- [2] 祝文静, 李娜, 王萌, 等. 雷公藤甲素生物药剂学分类研究 [J]. 时珍国医国药, 2023, 34 (7): 1586-1589.
- [3] Miranda C, Pérez-Rodríguez Z, Hernández-Armengol R, et al. Biowaiver or bioequivalence: ambiguity in sildenafil citrate BCS classification [J]. AAPS PharmSciTech, 2018, 19: 1693-1698.
- [4] 贾米, 张心泰, 彭睿, 等. *O*-羧甲基壳聚糖提高生物药剂学分类系统 II 类药物溶解度能力的研究 [J]. 华西药理学杂志, 2021, 36 (3): 248-253.
- [5] 赵思宁, 杨慧, 赵岩. 利尿药的临床应用及研究进展 [J]. 疾病监测与控制, 2022, 16 (4): 331-336.
- [6] 李文艳. 氢氯噻嗪对大鼠的利尿作用的研究 [J]. 现代电生理学杂志, 2012, 19 (1): 25-27, 29.
- [7] 宣婧婧, 武喜营, 戚建平, 等. 天然低共熔溶剂在药剂学中的应用 [J]. 药学学报, 2021, 56 (1): 146-157.
- [8] 朱溶月, 李博莉, 王文苹, 等. “薄荷脑-樟脑”低共熔物载甘草次酸纳米乳的制备与初步评价 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30 (12): 2898-2900.
- [9] Radosevic K, Curko N, Sreck VG, et al. Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity [J]. LWT-Food Sci Technol, 2016, 73: 45-51.
- [10] Wu XY, Chen ZJ, Li Y, et al. Improving dermal delivery of hydrophilic macromolecules by biocompatible ionic liquid based on choline and malic acid [J]. Int J Pharm, 2019, 558: 380-387.
- [11] Dai YT, Witkamp GJ, Verpoorte R, et al. Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications [J]. Food Chem, 2015, 187: 14-19.
- [12] 李元春, 董雪晴, 李聪伟, 等. 双啉达莫低共熔物体系的筛选、表征及性质评价 [J]. 河北大学学报 (自然科学版), 2023, 43 (4): 387-394.
- [13] 白佳乐, 燕童凡, 谷嘉诚, 等. 低共熔溶剂的性质与应用研究进展 [J]. 工业催化, 2024, 32 (9): 26-32.
- [14] 全洛慧, 朱越, 李佳凝, 等. 低共熔溶剂对黄连中生物碱绿色提取工艺的优化 [J]. 中成药, 2023, 45 (9): 3014-3017.
- [15] 安鸿雪, 武明泽, 高森, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定水中氢氯噻嗪 [J]. 河北科技大学学报, 2024, 45 (4): 454-460.
- [16] 郭建军, 陈波, 陈波, 等. LC-MS/MS 测定人血浆中厄贝沙坦和氢氯噻嗪的含量及其应用 [J]. 中国现代应用药学, 2021, 38 (1): 63-70.
- [17] 张雨晴, 郝星慧, 王飞, 等. 染料木素-川芎嗪共晶在 Caco-2 细胞模型中的转运研究 [J]. 动物医学进展, 2024, 45 (2): 40-47.
- [18] 高燕, 何少明. 基于体内过程的民族药药效物质基础研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2016, 12 (6): 16-18.

(收稿日期: 2025-03-04; 修回日期: 2025-05-20)

加味补中益气汤改善多囊卵巢综合征作用机制的网络药理学分析及实验验证

孙蕾¹, 申艳朵², 张家乐², 吴星霏², 谢秉恒², 吴刘俊², 张明昊^{3*} (1. 河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450003; 2. 河南中医药大学第五临床医学院, 郑州 450002; 3. 河南中医药大学医学院, 郑州 450046)

摘要: **目的** 基于网络药理学及动物实验验证加味补中益气汤改善多囊卵巢综合征(PCOS)的作用机制。**方法** 采用网络药理学方法预测加味补中益气汤改善 PCOS 的潜在靶点并进行分子对接验证, 以结合能为评判标准。将 53 只 SD 大鼠灌胃来曲唑复制 PCOS 模型, 第 14 日阴道涂片, 造模完成后随机取 3 只大鼠麻醉, 剖取卵巢观察病理变化, 以阴道上皮细胞持续角化及卵巢组织囊性病变为标准进行成模判断。将 50 只造模成功的大鼠随机分为模型组, 阳性药组(炔雌醇环丙孕酮片, $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)和加味补中益气汤低、中、高剂量组(6.795 、 13.59 、 $27.18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组 10 只, 另取 10 只未造模大鼠为正常组。各组大鼠给予相应药物干预, $1 \text{ 次} \cdot \text{d}^{-1}$, 连续 28 d。末次给药 24 h 后, 采集大鼠血液, 采用酶联免疫法测定雌二醇(E_2)、睾酮(T)、促性腺激素释放激素(GnRH)、促卵泡激素(FSH)、促黄体生成素(LH)水平; 取大鼠双侧卵巢, 称重, 计算卵巢系数; 苏木精-伊红(HE)染色法观察卵巢病理变化; 免疫组织化学(IHC)法验证加味补中益气汤的核心调控靶点。**结果** 网络药理学结果显示加味补中益气汤改善 PCOS 主要与 AKT1、TNF α 、IL6 有关, 涉及癌症途径、脂质与动脉粥样硬化、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路等; 分子对接结果显示加味补中益气汤 3 个关键活性成分与 AKT1、TNF α 、IL6 结合稳定。实验验证结果显示, 与正常组比较, 模型组大鼠血清 E_2 、FSH 水平显著降低($P < 0.05$), T、GnRH、LH 水平显著升高($P < 0.05$), 卵巢系数显著升高($P < 0.05$), 卵巢组织中闭锁卵泡及无卵丘的囊性卵泡数量增多, 卵泡颗粒细胞层数减少, 卵巢组织中 AKT1 水平显著降低($P < 0.05$), TNF α 、IL6 水平显著升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 各给药干预组大鼠血清 E_2 、FSH 水平显著升高($P < 0.05$), T、GnRH、LH 水平显著降低($P < 0.05$), 卵巢系数显著降低($P < 0.05$), 卵巢组织囊性病变明显减轻, 卵巢中 AKT1 水平显著升高($P < 0.05$), TNF α 、IL6 水平显著降低($P < 0.05$)。**结论** 加味补中益气汤可通过上调 AKT1 水平, 下调 TNF α 、IL6 水平来实现对 PCOS 的改善作用。

关键词: 加味补中益气汤; 多囊卵巢; 网络药理学

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)12-3570-08

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.016

Mechanism and experimental verification of Buzhong Yiqi decoction for polycystic ovary syndrome based on network pharmacology

SUN Lei¹, SHEN Yanduo², ZHANG Jiale², WU Xingfei², XIE Bingheng², WU Liujun², ZHANG Minghao^{3*} (1. The First Affiliated Hospital, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450003; 2. The Fifth Clinical Medical College, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450002; 3. Medical School, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

Abstract: Objective To determine the mechanism of Buzhong Yiqi decoction in the improvement of polycystic ovary syndrome (PCOS) based on network pharmacology and animal experiment verification. **Methods** We predicted the potential target of Buzhong Yiqi decoction by network pharmacology in the intervention of PCOS and validated by molecular docking, with binding energy

基金项目: 河南省卫生健康委国家中医临床研究基地科研专项 (No.2022JDZX079)。

作者简介: 孙蕾, 女, 硕士, 副主任技师, 主要从事临床医学检验与免疫学研究, email: sunlei1604@126.com * **通信作者:** 张明昊, 男, 硕士, 高级实验师, 主要从事基础药理学与动物实验研究, email: zhangminghao@hactcm.edu.cn

as the evaluation standard. The PCOS model was replicated by gavage of letrozole in 53 SD rats. On the 14th day of modeling, the estrous cycle was detected by vaginal smear. Upon the model completion, 3 rats were randomly selected for anesthesia, the ovary was dissected to observe the pathological changes of the ovarian tissue. The model was evaluated by persistent keratinization of vaginal epithelial cells and pathological changes. The remaining 50 successfully modeled rats were randomly divided into a model group, a positive control group (ethinylestradiol and cyproterone acetate tablets, $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and Buzhong Yiqi decoction low, medium and high dose groups (6.795 , 13.59 , and $27.18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), with 10 rats in each group. Another 10 healthy rats were taken as the normal group. The rats in the administration groups were given corresponding drugs intragastrically, once daily, for consecutive 28 d before blood was collected after the final administration. The levels of serum estrogen (E_2), testosterone (T), gonadotropin releasing hormone (GnRH), follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The ovary weight was measured and ovary index was calculated. The pathological changes in the ovarian tissue were observed by haematoxylin-eosin (HE) staining. Immunohistochemistry was used to verify the expression levels of potential core targets. **Results** The network pharmacology showed that the effects of Buzhong yiqi decoction on PCOS were mainly related to RAC-alpha serine/threonine-protein kinase (AKT1), tumor necrosis factor α (TNF α) and interleukin-6 (IL6), and were closely related to pathways in cancer, lipid and atherosclerosis and AGE-RAGE signaling pathway. The molecular docking showed that stable binding of 3 key active ingredients of Buzhong Yiqi decoction to AKT1, TNF α and IL6. The experimental verification showed that compared with the normal group, E_2 and FSH levels were markedly decreased ($P < 0.05$), while ovary index and T, GnRH, LH levels were significantly increased ($P < 0.05$); there were atretic follicles and cystic follicles in the ovarian tissue in the model group; the level of AKT1 was decreased ($P < 0.05$), while the level of TNF α and IL6 was increased ($P < 0.05$) in the model group. Compared with the model group, E_2 and FSH levels were much increased ($P < 0.05$), while ovary index and T, GnRH, LH levels were obviously decreased ($P < 0.05$); ovarian tissue lesions were significantly reduced; the level of AKT1 was increased ($P < 0.05$), while the level of TNF α , IL6 was decreased ($P < 0.05$) in each drug treatment group. **Conclusion** Buzhong Yiqi decoction may improve PCOS by promoting the protein expressions of AKT1, and demoting the protein expressions of TNF α and IL6.

Key words: Buzhong Yiqi decoction; polycystic ovary syndrome; network pharmacology

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是育龄妇女常见的内分泌紊乱性疾病, 以卵巢多囊样改变、雄激素过高、持续无排卵为主要临床表现, 并伴有肥胖、经期不规律、毛发旺盛及胰岛素抵抗等特征^[1-2]。西医常应用抗高雄激素血症药物、促排卵药物、胰岛素增敏剂等药物改善临床症状, 促进生育, 但难以根治^[3]。

PCOS 归属中医学“不孕”“月经后期”“闭经”范畴, 认为肝、脾、肾功能失调, 冲任督三脉不利, 痰多闭塞胞宫, 长卵、行经受阻, 终至 PCOS^[4]。中医对 PCOS 辨证多趋向于肾虚痰阻, 痰阻为病因, 近年来依据“脾虚成湿、湿聚成痰”理论, 也有中医家认为 PCOS 发生责之于脾, 以脾虚为本, 痰湿为标^[5], 治疗当以泄水化痰补脾为原则。加味补中益气汤出自清代医家傅青山著的《傅青主女科》, 原文为“妇人身体肥胖。痰涎甚多, 不能受孕者, ……乃脾土之内病也。……治之法, 必须

以泄水化痰为主。然徒泄水化痰, 而不急于补脾胃之气, 则阳气不旺, 湿痰不去, 方用加味补中益气汤^[6]。”课题组考虑到加味补中益气汤“泄水化痰补脾”符合中医对 PCOS 治疗理念, 故选用加味补中益气汤为 PCOS 改善方剂, 先通过网络药理与分子对接技术筛选加味补中益气汤改善 PCOS 的有效成分及核心作用靶点, 再以体内动物实验验证加味补中益气汤对 PCOS 的药效及作用机制, 为该方在 PCOS 治疗方面的临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 试药

加味补中益气汤组方为党参 15 g、黄芪 15 g、柴胡 9 g、甘草 6 g、白术 30 g、升麻 9 g、陈皮 12 g、茯苓 20 g、半夏 15 g、当归 20 g, 原生药材购于封丘县福兴中药材金银花有限公司, 蒸馏水浸泡 30 min, 大火煮沸后小火煎 30 min, 共煎 3 次, 合并药液并浓缩至 $1.36 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 炔雌醇

环丙孕酮片(德国 Bayer 公司, 批号: 240430kk, 规格: 2 mg/片); 来曲唑(江苏恒瑞医药股份有限公司, 批号: KTOKJ4J, 规格: 2.5 mg/片); 氨基甲酸乙酯(天津市光复科技发展有限公司, 批号: 20220613); 大鼠雌二醇(estrogen, E₂)、睾酮(testosterone, T)、促性腺激素释放激素(gonadotropin releasing hormone, GnRH)、促卵泡激素(follicle stimulating hormone, FSH)、促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)酶联免疫吸附法测定试剂盒(江苏酶免实业有限公司); 兔抗大鼠 AKT1、TNF α 、IL6 抗体及免疫组化专用山羊抗兔二抗、DAB 显色试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司)。

1.2 实验动物

60 只健康雌性 SD 大鼠, 8 周龄, 体重 180 ~ 200 g [郑州市惠济区华兴实验动物养殖场, 合格证号 SCXK (豫) 2023-0002]。所有大鼠分笼饲养于河南中医药大学医学动物实验室, 室温 20 ~ 22 °C, 相对湿度为 55% ~ 60%, 正常光照, 大鼠自由饮水采食。本实验获河南中医药大学实验动物伦理委员会批准(批件号 DWLL202301016)。

1.3 仪器

BSA124S-CW 型电子天平(德国 Sartorius 公司); MR-96TB 型酶标仪[骋克仪器(上海)有限公司]; JW-1016 型医用离心机(安徽嘉文仪器设备有限公司); RM2235 石蜡切片机(德国 Leica 公司); YD-6D 型组织包埋机、YD-A 型组织摊片机、YD-B 型组织烤片机(金华市科迪仪器设备有限公司); CX23 光学显微镜(日本 Olympus 公司)。

2 方法与结果

2.1 网络药理学

2.1.1 加味补中益气汤作用靶点筛选 以加味补中益气汤组方中药“党参”“黄芪”“柴胡”“甘草”“白术”“升麻”“陈皮”“茯苓”“半夏”“当归”为关键词, 检索 TCMSP (<https://www.tcmsp-e.com/database>), 获得加味补中益气汤组方中药化学成分, 再以口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 、药物相似性(DL) ≥ 0.18 为条件, 筛选得主要活性成分和靶点; 经筛选去重后得到加味补中益气汤活性成分 209 个, 其中党参 21 个, 黄芪 20 个, 柴胡 17 个, 甘草 92 个, 白术 7 个, 升麻 17 个, 陈皮 5 个, 茯苓 15 个, 半夏 13 个, 当归 2 个。将 209 个活性成分导入 DrugBank 数据库进行靶点预测, 经去重后共得到靶点 279 个。

2.1.2 加味补中益气汤-PCOS 靶点筛选结果 从 GeneCard 数据库、OMIM 数据库、TTD 数据库中搜索靶点并合并去重后得 PCOS 相关靶点共

4498 个。279 个加味补中益气汤潜在靶点与 4498 个 PCOS 相关靶点交集, 筛选出共同靶点 202 个, 为加味补中益气汤干预 PCOS 潜在靶点。

2.1.3 加味补中益气汤-PCOS 靶点的蛋白网络互作(PPI)分析结果 将 202 个交集靶点导入 STRING 数据库, 获得加味补中益气汤-PCOS 靶点 PPI 网络图。结果显示, PPI 网络共包括 201 个节点和 2005 条边, 其中节点平均度值为 50.6, 平均局部聚集系数为 0.655。然后以 Cytoscape 软件对 PPI 网络进行修饰, 以 Degree 值排序, 得大于 Degree 平均值的靶点共 88 个, 再以 88 个关键靶点为基础构建“配伍中药-活性成分-核心靶点”网络, 可知 88 个关键靶点分别对应黄芪 15 个成分, 白术 2 个成分, 党参 14 个成分, 甘草 84 个成分, 陈皮 5 个成分, 当归 2 个成分, 柴胡 11 个成分, 半夏 7 个成分, 茯苓 3 个成分。

2.1.4 GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析结果 将 88 个交集靶点通过 DAVID 数据库进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析, 根据 $P \leq 0.05$ 筛选出 289 个 GO 功能条目和 165 个 KEGG 信号通路, 结果见图 1。GO 功能富集分析结果中生物过程(BP)涉及对基因表达的正向调控(positive regulation of gene expression)、RNA 聚合酶 II 对转录的正向调控(positive regulation of transcription by RNA polymerase II)、DNA 模板转录的正向调控(positive regulation of DNA-templated transcription)等; 细胞组分(CC)涉及细胞核(nucleus)、核质(nucleoplasm)、细胞外区(extracellular region)等; 分子功能(MF)涉及酶结合(enzyme binding)、相同的蛋白质结合(identical protein binding)、蛋白质结合(protein binding)等。KEGG 功能富集分析结果显示癌症的途径(pathways in cancer)、脂质与动脉粥样硬化(lipid and atherosclerosis)、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路(AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)等通路参与其中。根据以上网络药理学结果预测, 结合以往研究报道, 推测加味补中益气汤可通过脂质与动脉粥样硬化途径干预多囊卵巢过程, 涉及的核心靶点为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(RAC- α serine/threonine-protein kinase, AKT1)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF α)、白细胞介素 6(interleukin-6, IL6)。

2.1.5 分子对接 从 TCMSP 数据库(<https://www.tcmsp-e.com>)中下载加味补中益气汤组方中药黄芪、柴胡、甘草共同成分槲皮素(quercetin)、山柰酚(kaempferol)和党参成分木犀草素(luteolin) mol2 结构文件; 再从 PDB 数据库(<https://www.rcsb.org>)中下载 AKT1、TNF α 、IL6 这 3 个靶点蛋

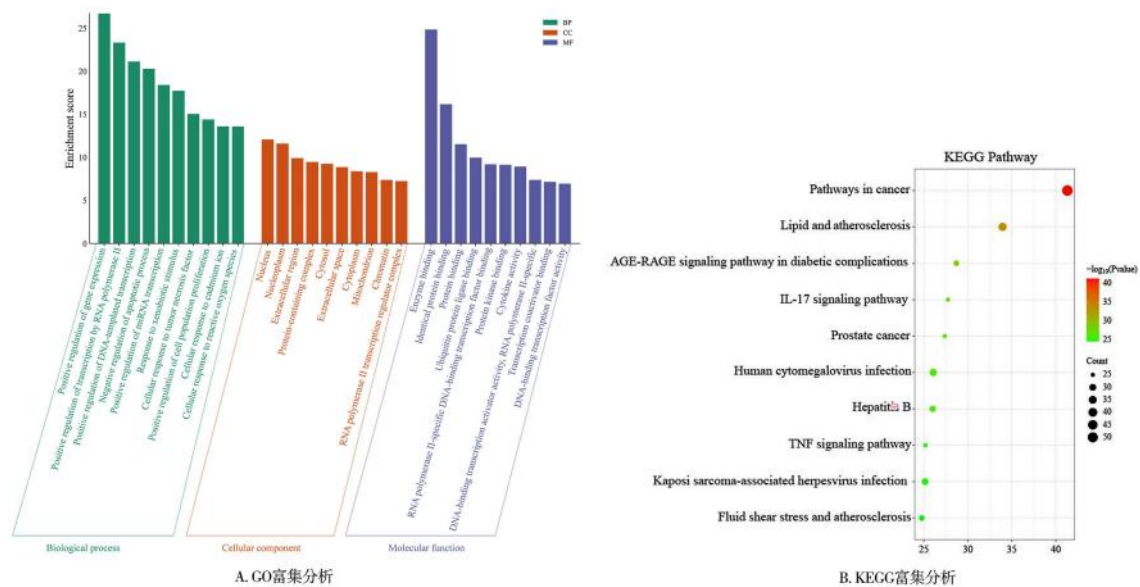


图 1 补中益气汤改善 PCOS 的 GO 和 KEGG 富集分析图

Fig 1 Enrichment analysis of GO and KEGG pathways of Buzhong Yiqi decoction in treatment of PCOS

白结构 PDB 文件, 利用 AutoDock Tools 1.5.7 软件进行分子对接, 结果表明, 以上对接结合能均小于 $-5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 表明黄芪、柴胡、甘草共同成分槲皮素、山柰酚和党参成分木犀草素与 AKT1、TNF α 、IL6 结合稳定。结果见图 2、3。

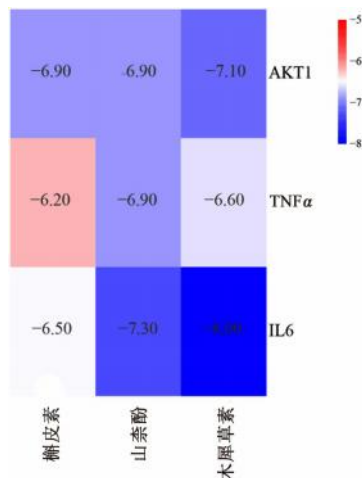

 图 2 槲皮素、山柰酚、木犀草素与 AKT1、TNF α 、IL6 分子对接结合能热图

 Fig 2 Binding energy heatmap of quercetin, kaempferol, and luteolin with AKT1, TNF α , and IL6 molecular docking

2.2 动物实验验证

2.2.1 模型构建、动物分组与给药 取大鼠 53 只, 适应性饲养 1 周后, 按 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃来曲唑混悬液 (10 mg 来曲唑溶于 100 mL 蒸馏水中制成混悬液), 1 次 $\cdot \text{d}^{-1}$, 连续 28 d, 所有大鼠在造模第 14 日开始进行阴道涂片检测, 第 29 日随机取 3 只大鼠腹腔注射 $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 氨基甲酸乙酯麻醉, 剖取卵巢做常规病理检查, 参考文献资料^[7]及课题组前期预实验结果, 若大鼠阴道涂片

光镜下可见阴道上皮细胞持续角化, 且卵巢组织明显病理变化, 则提示 PCOS 模型构建成功。

将 50 只造模成功大鼠按体重随机分为模型组、阳性药组 (炔雌醇环丙孕酮片) 和加味补中益气汤低、中、高剂量组, 每组 10 只, 另取 10 只未造模大鼠作为正常组。加味补中益气汤、炔雌醇环丙孕酮片成人用量分别为 $151 \text{ g}/70 \text{ kg}$ 、 $2 \text{ mg}/70 \text{ kg}$, 经大鼠换算, 以折算剂量 $13.59 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为加味补中益气汤中剂量, 以 $6.795 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (折算剂量的 1/2 倍) 为加味补中益气汤低剂量, 以 $27.18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (折算剂量的 2 倍) 为加味补中益气汤高剂量, 以 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为炔雌醇环丙孕酮片剂量, 以上药物均灌胃给药, 灌胃体积为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 正常组和模型组大鼠灌胃等体积蒸馏水, 1 次 $\cdot \text{d}^{-1}$, 连续 28 d。

2.2.2 卵巢外观形态观察 ① 末次给药 24 h 后, 各组大鼠称重后腹腔注射 $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 氨基甲酸乙酯麻醉, 腹主动脉取血, 血浆 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液于 -80°C 下储存。② 解剖取双侧卵巢, 去除周围组织, 以生理盐水洗涤后观察卵巢外观形态, 以滤纸吸尽卵巢表面液体后称质量, 一部分使用甲醛固定, 另一部分经液氮速冻后于 -80°C 下储存。结果正常组大鼠卵巢外观形态正常, 表面可见不规则的结节状卵泡; 模型组大鼠卵巢稍大, 表面可见充满液体的小囊; 阳性药组和加味补中益气汤低、中、高剂量组大鼠卵巢外观病变较模型组减轻, 见图 4。

2.2.3 大鼠血清中 E₂、T、GnRH、FSH、LH 水平检测 取“2.2.2”项下各组大鼠血清样品, 室温融化, 按照试剂盒说明书方法操作, 采用酶标仪于 450 nm 波长处测定吸光度, 并依据标准曲线计算大

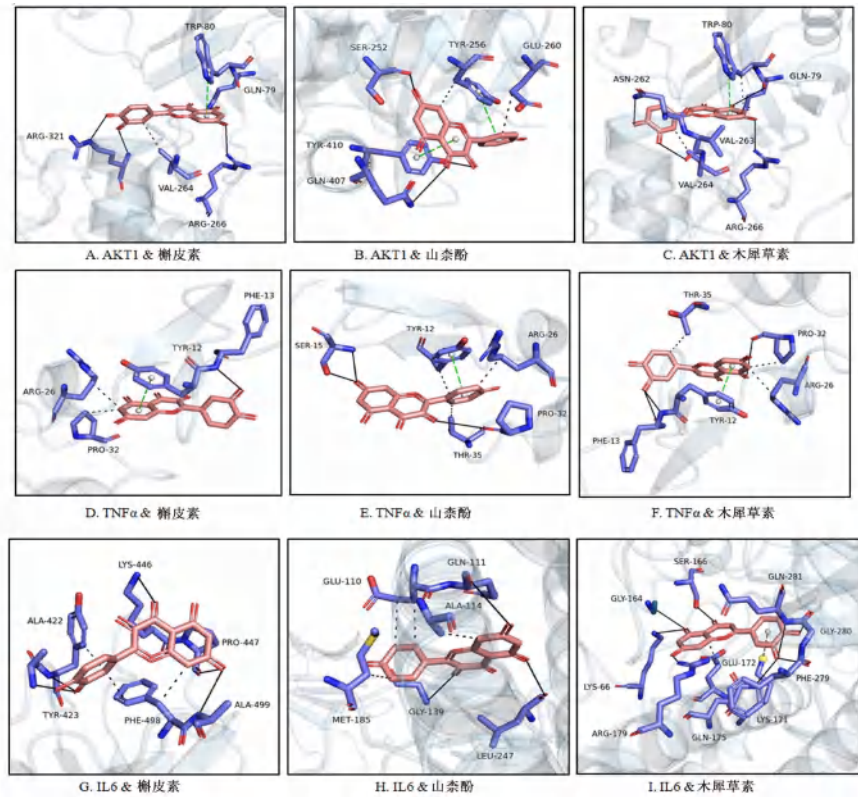


图 3 部分补中益气汤成分与核心靶点的分子对接模拟图

Fig 3 Molecular docking simulation diagram of some components of Buzhong Yiqi decoction and core targets

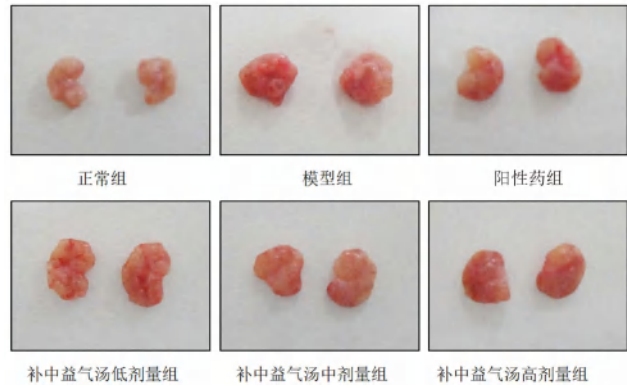


图 4 补中益气汤对 PCOS 大鼠卵巢外观形态的影响

Fig 4 Effect of Buzhong Yiqi decoction on the appearance of ovaries in PCOS rats

鼠血清中 E_2 、T、GnRH、FSH、LH 水平。结果显示，与正常组比较，模型组大鼠血清 E_2 、FSH 水平显著降低 ($P < 0.05$)，血清 T、GnRH、LH 水平显著升高 ($P < 0.05$)；与模型组比较，阳性药组和加味补中益气汤低、中、高剂量组大鼠血清 E_2 、FSH 水平显著升高 ($P < 0.05$)，T、GnRH、LH 水平显著降低 ($P < 0.05$)，见图 5。

2.2.4 大鼠卵巢系数计算 统计各组大鼠卵巢质量与体重，计算卵巢系数 (卵巢系数 = 卵巢质量 / 体重)，以此来评价卵巢病变程度。与正常组比较，模型组大鼠卵巢系数显著升高 ($P < 0.05$)；与模型组比较，阳性药组和加味补中益气汤低、中、高剂量组大鼠

卵巢系数显著降低 ($P < 0.05$)，结果见图 6。

2.2.5 大鼠卵巢组织病理形态学观察 取“2.2.2”项下固定于甲醛的卵巢组织，经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片 ($4\mu m$) 后，以二甲苯脱蜡，取部分切片 (其余部分用于免疫组织化学染色)，经苏木精 - 伊红 (HE) 染色后，以梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片，然后于光学显微镜下观察卵巢组织的病理形态学变化。

HE 染色结果显示，正常组大鼠卵巢组织结构完整，各级卵泡发育良好；模型组大鼠卵巢皮质胶原化，囊性卵泡数量增多，卵泡颗粒细胞层数减少；阳性药组大鼠卵巢组织结构完整，卵泡颗粒细胞层数明显增加，卵泡无囊性病变；加味补中益气汤低、中、高剂量组大鼠各级卵泡清晰可见，卵泡颗粒细胞层数增加，未见卵泡囊性病变。结果见图 7。

2.2.6 大鼠卵巢组织中 AKT1、TNF α 、IL6 蛋白水平检测 采用免疫组织化学染色法进行检测。取“2.2.2”项下各组大鼠剩余切片，经二甲苯脱蜡、水化后。用柠檬酸盐缓冲液热修复 8 min，待切片温度降至室温后，0.5% TritonX-100 切片打孔，滴加 AKT1 (1 : 1000)、TNF α (1 : 1000)、IL6 (1 : 1000) 抗体，4℃孵育过夜。次日切片于 37℃复温 30 min，滴加 HRP 标记的羊抗兔二抗孵育 20 min，磷酸盐缓冲液 (PBS) 浸洗，DAB 显色 10

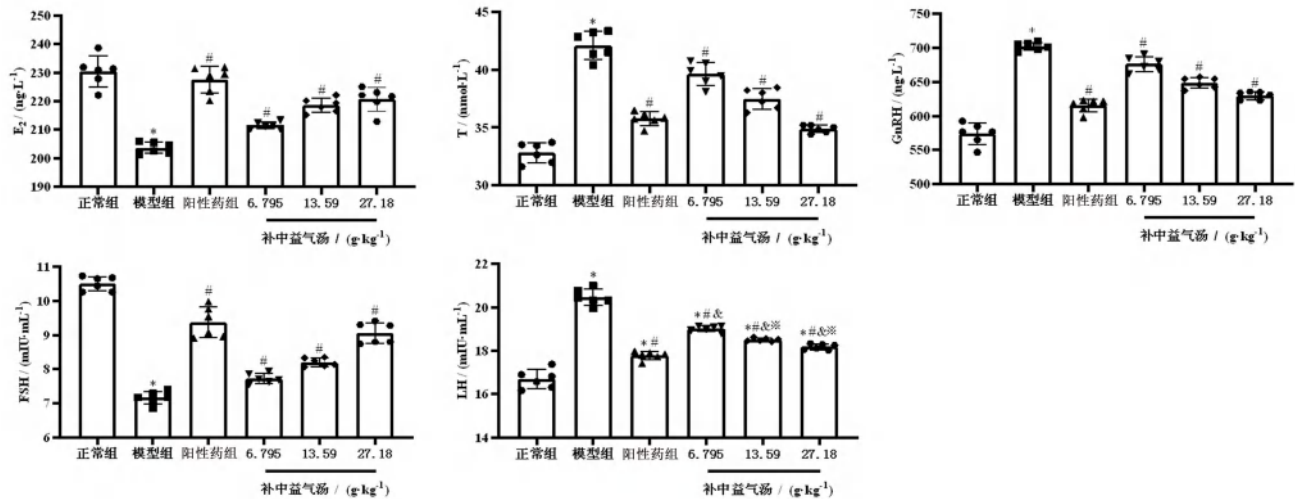

 图 5 补中益气汤对 PCOS 大鼠血清中 E₂、T、GnRH、FSH、LH 水平的影响

 Fig 5 Effect of Buzhong Yiqi decoction on the levels of E₂, T, GnRH, FSH and LH in the serum of PCOS rats

 注：与正常组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ；与阳性药组比较，& $P < 0.05$ ；与补中益气汤剂量组比较，** $P < 0.05$ 。

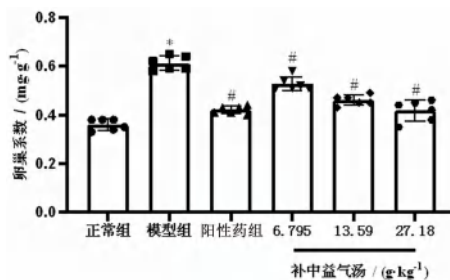
 Note: Compared with the normal group, * $P < 0.05$; compared with the model group, # $P < 0.05$; compared with the positive control group, & $P < 0.05$; compared with the Buzhong Yiqi decoction low dose group, ** $P < 0.05$.


图 6 补中益气汤对 PCOS 大鼠卵巢系数的影响

Fig 6 Effect of Buzhong Yiqi decoction on the ovarian index of PCOS rats

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

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

min，自来水冲洗终止。后苏木精复染 3 min，盐酸乙醇分化，自来水再次冲洗蓝化，切片经乙醇梯度脱水、二甲苯透明、中性树胶封片后镜检。每只大鼠卵巢组织切片在 400 倍镜下随机选取 1 个视野，以棕黄色为阳性染色，采用 Image-Pro Plus 6.0 测定每个视野中积分光密度 (IOD) 值进行统计分析。

免疫组化结果显示，与正常组比较，模型组大鼠卵巢组织 AKT1 水平显著降低 ($P < 0.05$)，TNF、IL6 水平显著升高 ($P < 0.05$)；与模型组比较，阳性药组和加味补中益气汤低、中、高剂量组大鼠卵巢组织 AKT1 水平显著升高 ($P < 0.05$)，TNF、IL6 水平显著降低 ($P < 0.05$)。结果见图 8。

2.3 统计学方法

数据采用 SPSS 24.0 进行统计分析，计量资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较方差齐者采用最小显著性差异法 (LSD) 检验，方差不齐者采用 Dunnett's 检验，以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 讨论

PCOS 病因病机尚未完全明确，研究者可通过构建动物模型来评估 PCOS 的病理过程，该种动物模型可由雄激素、芳香化酶抑制剂等药物诱导构建。来曲唑是一种人工合成的非甾体芳香化酶抑制剂，可通过抑制雄激素向雌激素转化使卵巢内源性雄激素水平升高，造成机体性周期紊乱、卵巢排卵障碍及多囊性改变^[8]。本研究采用来曲唑诱导构建了大鼠 PCOS 模型，结果发现，模型大鼠血清中 E₂、FSH 水平降低，T、GnRH、LH 水平升高，卵巢增大且出现多囊性改变，表明造模成功。

加味补中益气汤是补脾泄水化痰之经典方剂，方中以黄芪、党参、白术、茯苓、甘草健脾益气，和胃，脾健则湿除；升麻、柴胡升肝脾之气，气通则无瘀滞；佐以当归活血调经，半夏化痰，陈皮理气，共奏补益脾胃祛除痰湿之功效。由于雄激素升高是 PCOS 的典型特征，故临床上常采用炔雌醇环丙孕酮片治疗 PCOS^[9]。因此本研究选择炔雌醇环丙孕酮片作为阳性对照药，发现经加味补中益气汤干预后，PCOS 大鼠卵巢囊性病变改善，颗粒细胞层数增加，表明加味补中益气汤对 PCOS 大鼠有较好的改善作用。

GnRH 是由下丘脑分泌的一种肽类激素，可与下丘脑和腺垂体的 GnRH 受体 (GnRH-R) 结合后作用于垂体前叶促性腺激素细胞，调控 LH 和 FSH 的分泌^[10]。LH 和 FSH 均由垂体前叶促性腺激素细胞分泌，与卵巢颗粒细胞合成和分泌的 E₂ 协同作用于卵巢，调控雌孕激素分泌，影响动情周期、卵泡发育及排卵过程^[11-12]。PCOS 患者通常

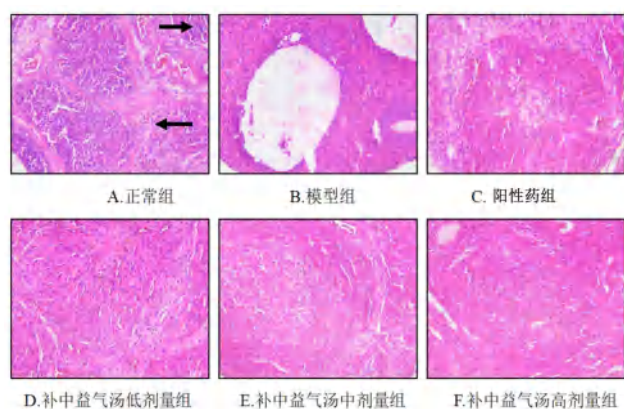


图 7 补中益气汤对 PCOS 大鼠卵巢组织形态的影响 (HE, $\times 400$)
Fig 7 Effect of Buzhong Yiqi decoction on the morphology of ovarian tissue in PCOS rats (HE, $\times 400$)

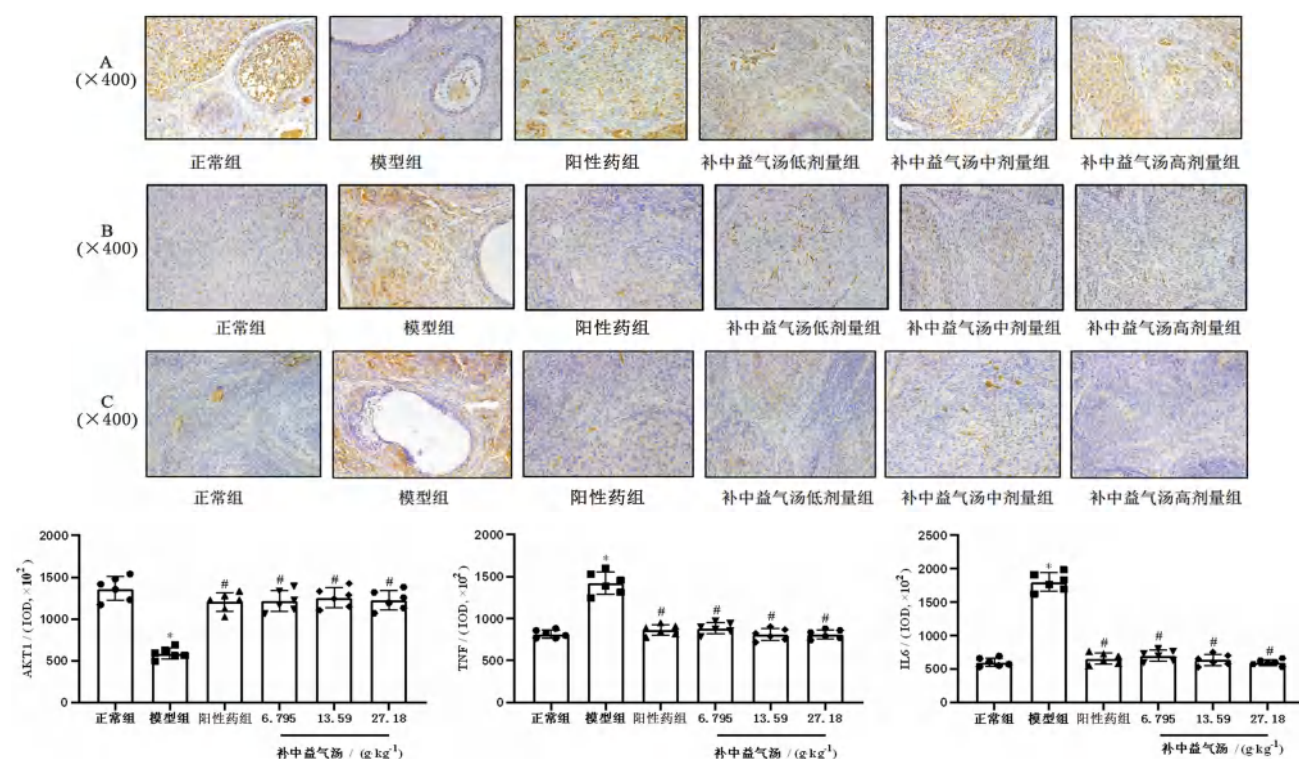


图 8 补中益气汤对 PCOS 大鼠卵巢组织 AKT1 (A)、TNF α (B)、IL6 (C) 的影响
Fig 8 Effect of Buzhong Yiqi decoction on AKT1 (A), TNF α (B), and IL6 (C) in ovarian tissues of PCOS rats

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

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

汤能显著升高 E_2 和 FSH 水平, 降低 T、GnRH 和 LH 水平, 表明加味补中益气汤可以通过调控性激素分泌水平来实现对 PCOS 大鼠的改善作用。

目前关于加味补中益气汤治疗 PCOS 的文献报道多集中于临床研究, 具体机制研究相对较少。本研究通过网络药理学和分子对接技术初步研究了加味补中益气汤改善 PCOS 的分子机制, 结果显示加味补中益气汤组方中药黄芪、柴胡、甘草共同成分槲皮素、山柰酚和党参成分木犀草素可作用于 AKT1、TNF α 、IL6 这 3 个核心靶点影响脂

质与动脉粥样硬化途径, 进而干预多囊卵巢过程。槲皮素、山柰酚和木犀草素均属黄酮类化合物, 其中槲皮素可补肾养血、助孕调经; 山柰酚可抗炎、抗氧化; 木犀草素可改善卵巢功能, 调节激素水平, 故三者合用可改善 PCOS^[19-21]。AKT1 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 也是 PI3K/AKT 通路的枢纽分子, 表达于卵母细胞、原始卵泡膜细胞、颗粒细胞及黄体细胞, 通过磷酸化作用活化下游生长因子及旁路分子, 促进卵泡生长发育而改善卵巢功能, 其表达缺失会造成小鼠生育表现为 GnRH 长期大量分泌, 而 GnRH 长期高频的脉冲刺激会导致 GnRH-R 低表达且敏感性下降, 致使 LH、FSH 分泌调节失衡, 即 LH 水平升高, FSH 水平下降, 而高水平的 LH 会刺激卵泡膜细胞合成大量 T; 低水平的 FSH 则会使卵巢颗粒细胞中芳香化酶活性下降, T 向雌激素转化进程受阻, 形成卵巢内高雄激素环境, 这一环境会使优势卵泡发育障碍, 排出受阻, 进而形成卵巢多囊性改变^[13-15]。此外, 卵巢颗粒细胞还会分泌 E_2 , E_2 与 LH、FSH 共同介导卵泡发育、闭锁与排卵过程, PCOS 患者卵巢通常可见颗粒细胞损伤, E_2 分泌水平下降, 这也是加剧卵泡闭锁与排卵障碍的主要原因^[16-18]。本实验结果发现加味补中益气

汤能显著升高 E_2 和 FSH 水平, 降低 T、GnRH 和 LH 水平, 表明加味补中益气汤可以通过调控性激素分泌水平来实现对 PCOS 大鼠的改善作用。

力降低^[22-23]。TNF α 和 IL6 均为重要的炎症因子,其中 TNF α 可刺激 NF- κ B 与内源性雄激素受体 (androgen receptor, AR) 启动子结合,诱导 AR 启动子活性,增加内源性 AR 表达^[24]; IL6 可上调卵巢组织中 AR 表达,两者均可增加雄激素活性,临床研究亦证实 AKT1、TNF α 、IL6 与 PCOS 患者密切相关^[25]。本研究结果显示,PCOS 大鼠卵巢组织中 AKT1 水平显著下降, TNF α 和 IL6 水平均显著升高,在加味补中益气汤干预下,PCOS 大鼠卵巢组织出现了 AKT1 水平上调, TNF α 和 IL-6 水平下调的情况,推测该方剂可以通过升高卵巢组织 AKT1 水平,降低卵巢组织 TNF α 和 IL-6 水平来影响脂质与动脉粥样硬化途径,以实现 PCOS 大鼠的改善作用,这一新的分子机制将为加味补中益气汤的进一步临床应用提供实验依据,而由此提出的 AKT1、TNF α 、IL6 靶点调控也将成为加味补中益气汤改善 PCOS 研究的一个新途径。

参考文献

- [1] 张逸,陈萍,吴悦靓,等. 中药调控 NF- κ B 信号通路改善多囊卵巢综合征的研究进展[J]. 中国药房, 2024, 35 (17): 2181-2187.
- [2] 李泉洋,靳英英,杜国辉,等. 防风通圣散对多囊卵巢综合征小鼠的治疗作用[J]. 华西药学杂志, 2024, 39 (5): 497-502.
- [3] 周全,施斌,黄梅花,等. 苍附导痰丸联合腹针对肥胖型多囊卵巢综合征患者的临床疗效[J]. 中成药, 2024, 46 (9): 2950-2953.
- [4] 逯克娜,黄金华,林寒梅. 当代中医妇科名家辨治多囊卵巢综合征的学术思想荟萃[J]. 时珍国医国药, 2024, 35 (8): 1994-1997.
- [5] 商婷婷,庄子荀,马桦,等. 从“脾为之卫”理论探析巨噬细胞极化在 PCOS 慢性低度炎症中的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30 (9): 211-218.
- [6] 刘媛,赵恒侠,陈叶,等. 傅氏加味补中益气汤治疗脾虚痰湿型多囊卵巢综合征的临床疗效观察[J]. 辽宁中医杂志, 2022, 49 (7): 86-89.
- [7] 张明昊,高一盈,董文霞,等. 补肾强身片对多囊卵巢综合征模型大鼠的干预作用及机制研究[J]. 中国药房, 2022, 33 (21): 2632-2637, 2653.
- [8] 苗晋鑫,李秀敏,苗明三,等. 多囊卵巢综合征动物模型数据挖掘及分析[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30 (2): 135-140, 146.
- [9] 李晓燕,张蓓,林莉. 炔雌醇环丙孕酮分别联合二甲双胍、吡格列酮治疗多囊卵巢综合征的疗效和安全性比较[J]. 中国药房, 2016, 27 (36): 5073-5075.
- [10] Shin J, Park KE, Choi YM, et al. Early gonadotropin-releasing hormone antagonist protocol in women with polycystic ovarysyndrome: a preliminary randomized trial [J]. Clin Exp Reprod Med, 2018, 45 (3): 135-142.
- [11] Luque-Ramirez M, Escobar-Morreale HF. Targets to treat androgen excess in polycystic ovary syndrome [J]. Expert Opin Ther Targets, 2015, 19 (11): 1545-1560.
- [12] Vitek W, Hoeger K, Legro RS. Treatment strategies for infertile women with polycystic ovary syndrome [J]. Minerva Ginecol, 2016, 68 (4): 450-457.
- [13] 尹利军,王晓慧. 雄激素及其受体在肥胖、肥胖相关疾病及糖脂代谢紊乱中的作用[J]. 生理学报, 2018, 70 (3): 319-328.
- [14] Walters KA. Role of androgens in normal and pathological ovarian function [J]. Reproduction, 2015, 149 (4): R193-R218.
- [15] 苗明三,彭孟凡,闫晓丽,等. 菟丝子总黄酮对来曲唑致多囊卵巢综合征大鼠模型的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25 (16): 17-23.
- [16] Zhang CY, Ma J, Wang WS, et al. Lysyl oxidase blockade ameliorates anovulation in polycystic ovary syndrome [J]. Hum Reprod, 2018, 33 (11): 2096-2106.
- [17] Wang MM, Liu M, Sun J, et al. MicroRNA-27a-3p affects estradiol and androgen imbalance by targeting Creb1 in the granulosa cells in mouse polycystic ovary syndrome model [J]. Reprod Biol, 2017, 17 (4): 295-304.
- [18] 孙艳敏,胡俊攀,王冰玉,等. 山姜素对来曲唑诱导的多囊卵巢综合征模型大鼠的治疗作用及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2022, 48 (1): 129-135.
- [19] 徐海鹏,徐淑颖,张森,等. 槲皮素对多囊卵巢综合征的治疗作用及机制研究[J]. 上海中医药杂志, 2025, 59 (4): 82-88, 94.
- [20] 王建波,王肖力. 厄洛替尼联合山柰酚诱导卵巢癌细胞凋亡协同作用[J]. 中国公共卫生, 2015, 31 (11): 1402-1405.
- [21] 路璐,冯晓玲,马堃. 木犀草素通过 AMPK/GSK3 β 通路调节多囊卵巢综合征大鼠内分泌的研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40 (23): 3424-3428.
- [22] Nekoonam S, Naji M, Nashtaei MS, et al. Expression of AKT1 along with AKT2 in granulosa-lutein cells of hyperandrogenic PCOS patients [J]. Arch Gynecol Obstet, 2017, 295 (4): 1041-1050.
- [23] Kargar Godaneh M, Rahimi S, Abizadeh M, et al. Insulin ameliorates folliculogenesis in an experimental model of PCOS mice [J]. Int J Fertil Steril, 2023, 17 (1): 22-27.
- [24] Ye HY, Song YL, Ye WT, et al. Serum granulosa cell-derived TNF- α promotes inflammation and apoptosis of renal tubular cells and PCOS-related kidney injury through NF- κ B signaling [J]. Acta Pharmacol Sin, 2023, 44 (12): 2432-2444.
- [25] Zhou LH, Zou H, Hao JY. Metformin inhibits ovarian granular cell pyroptosis through the miR-670-3p/NOX2/ROS pathway [J]. Aging (Albany NY), 2023, 15 (10): 4429-4443.

(收稿日期: 2025-05-21; 修回日期: 2025-08-07)

基于 UHPLC-MS 的代谢组学技术评价 不同产地当归药材质量差异

马琪¹, 杨泽锋¹, 张再磊¹, 杨小蓓², 韩文超^{1*} (1. 郑州市第七人民医院, 郑州 450016; 2. 郑州大学第二附属医院, 郑州 450014)

摘要: **目的** 通过 UHPLC-MS 法建立不同产地当归药材的指纹图谱, 并结合化学计量学评估不同产地当归的质量差异。**方法** 采用 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm), 0.1% 甲酸水溶液-乙腈为流动相进行梯度洗脱, 柱温 35℃, 流速为 0.4 mL/min, 进样量 5 μL, 建立当归的指纹图谱, 通过 Compound Discoverer 进行峰提取, 层次聚类、主成分分析 (PCA) 及正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 对当归质量进行评价, 筛选差异性标志物。**结果** 对 20 批不同产地的当归药材进行了 UHPLC-MS 分析, 共检测到 7297 个特征离子。聚类分析、主成分分析和正交偏最小二乘法判别分析等结果均显示, 岷县当归和会川当归在成分上存在显著性差异。根据对照品、精准分子量、二级碎片和自建数据库共鉴定出 20 个潜在差异成分, 这些差异成分主要是藁本内酯及异构体和二聚体, 这也可能是导致两地当归特定差异的原因。**结论** 本研究不仅建立了当归药材的指纹图谱, 而且通过多种分析方法揭示不同产地当归在化学成分上的区别, 为进一步当归质量评价和中医临床安全用药提供了科学依据。**关键词:** 当归; 液质联用; 代谢组学; 产地; 化学计量学
中图分类号: R283, R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)12-3578-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.017

Metabolomics in identification of *Angelica sinensis* Radix from various sources based on ultra high performance liquid chromatography-mass spectrometry

MA Qi¹, YANG Zefeng¹, ZHANG Zailei¹, YANG Xiaobei², HAN Wenchao^{1*} (1. The 7th People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450016; 2. The Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014)

Abstract: Objective To establish fingerprint profiles of *Angelica sinensis* Radix from different origins with ultra high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UHPLC-MS) and determine their quality variations combined with chemometrics. **Methods** ACQUITY UPLC HSS T3 column (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) was used for gradient elution with 0.1% formic acid aqueous solution-acetonitrile as the mobile phase. The column temperature was 35℃, the flow rate was 0.4 mL/min, and the sample volume was 5 μL. The fingerprint of *Angelica sinensis* Radix was established, and the peak extraction by Compound Discoverer and hierarchical clustering, principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were conducted. **Results** Totally 20 batches of *Angelica sinensis* Radix from different origins were analyzed with UHPLC-MS, and 7297 characteristic ions were detected. Multivariate analyzes including cluster analysis, PCA, and OPLS-DA consistently demonstrated obvious compositional differences between *Angelica sinensis* Radix from Mianxian and Huichuan. A total of 20 potential differential components were identified through comprehensive characterization by reference standards, accurate molecular weights, secondary fragments, and a self-built database. These differential components were primarily ligustilide isomers and dimers, which accounted for the region-specific variations in *Angelica sinensis* Radix. **Conclusion**

基金项目: 郑州市医疗卫生领域科技创新指导计划项目 (No.2024YLZDJH235)。

作者简介: 马琪, 女, 主要从事药效物质基础及临床药学方面的研究, email: 3478709921@qq.com * **通信作者:** 韩文超, 男, 硕士, 主要从事药效物质基础及药物体内代谢分析与监测方面的研究, email: hanwc2022@163.com

This study not only establishes the fingerprint of *Angelica sinensis* Radix, but also reveals the differences in chemical components of *Angelica sinensis* Radix from different habitats, which provides scientific basis for further quality evaluation of *Angelica sinensis* Radix and its clinical safe use.

Key words: *Angelica sinensis* Radix; UHPLC-MS; metabolomics; source; chemometrics

当归，学名为 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels，是一种在中医药中具有重要地位的药材^[1]。其最早的记载可追溯至东汉时期的《神农本草经》，被列为中品，具有补血活血、调经止痛、润燥滑肠等功效^[2]。当归主要分布于中国西北和西南地区，尤其是甘肃岷县等地，这些地区因其独特的气候和土壤条件，被认为是当归的道地产区^[3-4]。

当归的栽培范围广泛，包括甘肃、陕西、四川、云南、湖北等地，不同地区根据其地理特征，产出的当归被称为岷归、秦归、川归、云归、瑶归等^[5]。不同产地当归药效成分的差异对中医诊断产生极大的影响，不同产地的当归在药效成分含量上存在显著差异。例如，甘肃岷县的当归在正丁基苯酞、藁本内酯、阿魏酸等化学成分的含量上普遍高于其他地区^[6-7]。这些化学成分是当归发挥药效的关键，因此，不同产地的当归在临床应用中的效果可能会有所不同。由于不同产地的当归在生长环境、气候、土壤等方面存在差异，这些因素影响了药材的生长和化学成分的吸收，进而导致不同产地的同一药材在质量上存在显著差异^[8-9]。中医诊断和治疗的有效性在很大程度上依赖于药材的质量，这种地域性差异极大地影响了中医在诊断和治疗时对药材剂量和疗效的把控。因此，研究不同产地当归品质差异对当归规范化种植、产地溯源和品质评价均有重要意义，有助于提高药材质量，从而提高中医临床的治疗效果。

1 材料

1.1 试药

当归样品来源于岷县和会川 2 个产区，每个产区收集 10 个批次（见表 1），采集后的当归样品放入瓷质容器中，避免使用铁器，置于通风良好、阴凉且无强光的温暖环境中，阴干，切片后保存。

色谱纯甲酸（美国 ACS 恩科化学公司）；色谱纯乙腈（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；屈臣氏饮用水（北京屈臣氏蒸馏水有限公司）。精氨酸（批号：MKBD3032V，纯度≥98%）、Z-藁本内酯（批号：JB270530，纯度≥98%）、正丁基苯酞（批号：JV331111，纯度≥98%）、蔗糖（批号：S02S6G1，纯度≥98%）、欧当归内酯 A（批号：JB241729，纯度≥98%）（上海源叶生物科技有限公司）。

表 1 20 批次当归药材样品的基本信息
Tab 1 Basic information of 20 batches of *Angelica sinensis* Radix medicinal samples

序号	产地	批号	序号	产地	批号
1	岷县	20230502	11	会川	20240601
2	岷县	20240302	12	会川	20241203
3	岷县	20231001	13	会川	20231201
4	岷县	20231103	14	会川	20230901
5	岷县	20240801	15	会川	20240503
6	岷县	20240502	16	会川	20231002
7	岷县	20230403	17	会川	20230401
8	岷县	20230602	18	会川	20230403
9	岷县	20231102	19	会川	20240602
10	岷县	20240401	20	会川	20231103

1.2 仪器

PL-S60 型超声波清洗仪（广州康士洁超声波科技有限公司）；AX205 电子天平 [赛多利斯科学仪器（北京）有限公司]；KC-08 型粉碎机（北京开创同和科技发展有限公司）；UHPLC-MS 高效液相色谱 - 质谱联用仪（美国赛默飞世尔科技公司）。

2 方法与结果

2.1 混合对照品溶液的制备

取对照品精氨酸、Z-藁本内酯、正丁基苯酞、蔗糖、欧当归内酯 A 适量，精密称定，加入 50% 甲醇配制成质量浓度均为 1 mg/mL 的混合对照品溶液，使用 50% 甲醇水溶液稀释至 1 μg/mL 备用。

2.2 供试品溶液的制备

精密称取当归各样品粉末 100 mg，置于离心管中，加入 50% 甲醇 1000 μL，涡旋混匀，超声提取 30 min，14 000 r/min 离心 20 min，取上清液 200 μL 至进样小瓶进行检测。同时每个样品中吸取 10 μL 混合制备质控（QC）样品，混合后涡旋 1 min，14 000 r/min 离心 10 min，取上清液 200 μL 进行检测。

2.3 方法学及指纹图谱的建立

2.3.1 色谱与质谱条件

① 色谱条件：采用 Vanquish UPLC，配备 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）；流动相：0.1% 甲酸水溶液（A）- 乙腈（B），梯度洗脱（0～5 min，3%～60%B，5～10 min，60%～80%B，10～16 min，80%～100%B，16～18 min，100%B，18～18.1 min，100%～3%B，18.1～20 min，3%B）；柱温：35℃；流速：0.4 mL/min；进样量：5 μL。

② 质谱参数：采用 Thermo Fisher Q-Orbitrap MS (OE120) 质谱仪进行数据采集；离子源采用高能电喷雾离子源 (HESI 源)，在 Full-*ms*/dd-*ms*² 模式下正负离子同时采集；离子源参数：在正离子模式下喷雾电压为 3.5 kV，负离子模式下为 2.8 kV；毛细管温度为 320 ℃；离子源辅助器温度为 350 ℃；鞘气 (sheath gas, N₂) 流速为 35 L/h，辅助气 (auxiliary gas, N₂) 流速为 10 L/h。碰撞能量设置为 20 V、40 V、60 V。扫描范围为 *m/z* 100 ~ 1500，分辨率为 70 000。

2.3.2 线性关系考察 精密移取“2.1”项下混合对照品储备液梯度体积进行稀释，制得一系列浓度范围对照品溶液，线性范围、线性方程及相关性系数如表 2 所示。

表 2 基于 UHPLC-MS 的检测的线性关系考察结果
Tab 2 Linear relationship based on UHPLC-MS detection

化合物	线性范围 / (ng/mL)	线性方程	R ²
正丁基苯酚	1 ~ 2500	$y = 6.58 \times 10^5 x + 1.00 \times 10^7$	0.9991
Z- 藜本内酯	1 ~ 2500	$y = 5.62 \times 10^5 x + 1.00 \times 10^7$	0.9990
欧当归内酯 A	5 ~ 2500	$y = 8.45 \times 10^3 x + 2.22 \times 10^5$	0.9991
蔗糖	5 ~ 2500	$y = 7.26 \times 10^4 x + 3.00 \times 10^6$	0.9992
L- 精氨酸	2.5 ~ 2500	$y = 2.59 \times 10^4 x + 5.79 \times 10^5$	0.9991

2.3.3 精密度试验 精密称取 6 份当归样品粉末 (批号：20240302) 100 mg，参照“2.2”项下方法制备供试品溶液，连续进样 6 次 (*n* = 6) 测得日内精密度；连续检测 3 d 测得日间精密度，记录特征峰面积，计算相对标准偏差 (*RSD*)，验证色谱系统在连续运行状态下的稳定性。结果如表 3 所示，日内、日间精密度的 *RSD* 值均小于 10%，表明 UHPLC-MS 测定当归的方法精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 取当归样品粉末 (批号：20240302) 100 mg，参照“2.2”项下方法制备供试品溶液。每隔 2 h，连续 12 h 稳定性考察，结果如表 3 所示，*RSD* 值小于 8%，证实样品溶液在规定时间内稳定性符合方法学要求。

表 3 基于 UHPLC-MS 的当归检测的方法学结果
Tab 3 Methodological results of *Angelica sinensis* Radix detection based on UHPLC-MS

化合物	日内精密度 <i>RSD</i> /%	日间精密度 <i>RSD</i> /%	重复性 <i>RSD</i> /%	稳定性 <i>RSD</i> /%
正丁基苯酚	4.51	4.62	5.90	5.38
Z- 藜本内酯	3.33	4.80	4.09	5.98
欧当归内酯 A	8.68	6.28	4.53	7.13
蔗糖	3.25	2.53	2.08	2.57
L- 精氨酸	3.01	1.94	1.18	1.85

2.3.5 重复性试验 精密 6 份当归样品粉末 (批

号：20240302) 100 mg，参照“2.2”项下方法制备供试品溶液，进样分析，采集峰面积，结果见表 3，6 批重复性样品中 5 种指标成分的含量 *RSD* 值小于 6%，表明 UHPLC-MS 测定当归的方法重复性良好。

2.3.6 指纹图谱的建立 基于 UHPLC-MS 法测定了 20 批不同产地当归药材的指纹图谱 (见图 1)，特征性的总离子流图结果如图 2 所示，采用 Compound Discoverer 3.2 软件对不同产地当归样本进行色谱峰提取，在当归药材提取物中共检测到 7297 个特征离子。

2.4 数据分析

将得到的原始数据用 Compound Discoverer 3.2 (Thermo-Fisher Scientific, USA) 软件对特征峰进行峰提取，分别得到保留时间、质荷比、峰面积的数据矩阵。在统计学分析中，对样品数据进行缺失值填充、数据过滤、峰面积总和归一化，同时使用 SPSS 17.0 软件进行 *t* 检验进行统计分析 (*P* < 0.05)。将筛选后的数据矩阵导入 SIMCA-P 14.0 软件进行多元统计分析 [主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘法 - 判别分析 (OPLS-DA)]，得分图 (SIMCA-P 14.0 软件) 可以直观表示不同产地间当归的化学成分的差异，并得到代谢物变量权重 (VIP) 值，同时满足 VIP > 1 和 *P* < 0.05 的特征成分被认为是产地之间差异性成分，同时使用置换检验 (200 次) 以及单因素方差分析共同评估 OPLS-DA 模型是否过拟合。

2.4.1 聚类分析 利用 Compound Discoverer 提取到的特征离子峰进行聚类分析 (层次聚类和 K-Means 聚类分析)，结果如图 3 所示，不管是使用层次聚类分析还是 K-Means 聚类分析，均可将岷县当归和会川当归显著区分开。结果表明，岷县当归和会川当归成分之间存在显著性差异，因此，有必要对不同产地当归的质量进一步评价。

2.4.2 PCA 非靶向代谢组学是一种全局性的分析方法，旨在无偏向性地检测样本中尽可能多的代谢物 (药材中的化学成分)，其目标是全面捕捉药材整体的化学成分变化，从而发现不同品种和批次间的差异成分，为揭示其品质差异、道地性机制及功能成分开发提供了强有力的工具。本研究为确保分析方法的可靠性，在整个分析过程中，每 5 个样品检测一次 QC 样品，用 QC 样品进行评价，以确保仪器系统和方法的稳定性。将提取得到的 QC 样品数据导入到 Simca 软件分析，QC 样品重合度越高表明仪器和分析方法越稳定，结果如图 3 所示。采用无监督模式的 PCA 进行分析，QC 样品紧密地聚集在一起，表明数据质量可信度高，而岷县与会川当归发生明显的分离，表明岷县与会川当归的代谢物间存

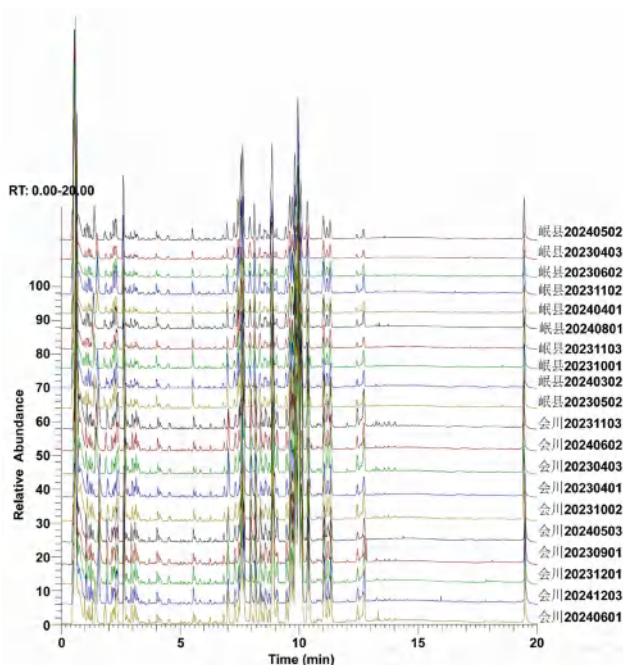


图 1 20 批不同产地当归药材的指纹图谱

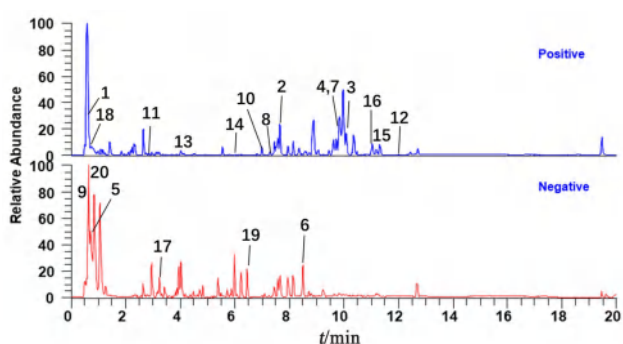
 Fig 1 Fingerprints of 20 batches of *Angelica sinensis* Radix from different origins


图 2 基于 UHPLC-Q/Orbitrap MS 的当归总离子色谱图分析

 Fig 2 Analysis of total ion chromatogram of *Angelica sinensis* Radix based on UHPLC-Q/Orbitrap MS

在明显差异 (见图 4A)。上述结果表明岷县当归与会川当归之间在代谢物水平上存在着显著区别。

2.4.3 OPLS-DA 在本研究中,运用 OPLS-DA 法来识别岷县当归与会川当归之间的潜在差异。这种分析方法成功地揭示了岷县当归与会川当归样本的显著聚类现象,通过 200 次的置换检验有效验证了 OPLS-DA 模型 (见图 4B),其结果显示置换检验所得的 R^2Y 值与 Q^2 值分别为 0.994 和 0.955 (见图 4D)。上述接近 1 的验证值不仅证明了模型具有强大的预测能力,同时也体现了模型的卓越性能^[10]。具体而言, Q^2 值超过 0.9 进一步确认了所构建模型的预测效能,而 R^2 值则反映了这些变量变异性的解释程度^[11]。

VIP 值越大说明该化合物在多批次数据中的差异越明显,根据 VIP 图中数据的分布情况选择合适的划分线,将划分线以上的数据作为差异成

分进行进一步的表征与鉴定,通常 $VIP > 1.0$ 的数据即视为差异成分。根据前面 OPLS-DA 所得结果进行进一步分析得到如图所示的 VIP 图,根据岷县当归、会川当归共 20 批次数据得到 VIP 图中的分布状况,选择 $VIP > 3.0$ 的 128 个数据作为潜在差异标志物 (见图 4C)。

2.4.4 差异化合物的筛选与鉴定 通过与采集对照品数据进行比对、与目标质量数的二级质谱数据、与文献已报道成分^[12-15]、对照品检测结果及 The Encyclopedia of Traditional Chinese Medicine 网站 [ETCM (tcnip.cn)] 等进行匹配与检索等方法对 128 个潜在差异成分进行鉴定,最终鉴定出 20 个作为潜在标志物,详细信息见表 4。

化合物鉴定以 Z-藁本内酯为例,质荷比为 191.1064 ($C_{12}H_{15}O_2$) 的 $[M + H]^+$ 分子离子峰脱去一分子的 H_2O (18.0100 Da),生成质荷比 173.0959 ($C_{12}H_{13}O$),或者连续失去一分子的 CO (27.9944 Da) 和 H_2O (18.0100 Da),产生 m/z 为 163.1057 ($C_{11}H_{15}O$), 145.1010 ($C_{11}H_{13}$) 的 $[M + H]^+$ 离子,如图 5A 所示,被表征为 Z-藁本内酯;苯酐二聚体以欧当归内酯 A 为例,质荷比为 381.2055 ($C_{24}H_{28}O_4$) 的 $[M + H]^+$ 分子离子峰裂解为苯酐单体后丢失一分子的 H_2O (18.0100 Da),生成质荷比为 191.1065 ($C_{12}H_{15}O_2$) 的碎片,单体再脱去一个 H_2O (18.0100 Da),生成 m/z 为 173.0959 ($C_{12}H_{13}O$) 的碎片,或者单体丢失一分子的 C_3H_6 (42.0464 Da) 或 C_4H_8 (56.0621 Da),产生 m/z 为 149.0602 ($C_{11}H_{15}O$) 和 135.0438 ($C_{11}H_{13}$) 的 $[M + H]^+$ 离子,如图 5B 所示,被鉴定为欧当归内酯 A^[16]。

对岷县当归和会川当归中的 20 个潜在标志物含量进行分析,结果如图 6 所示。根据 VIP 值由高到低排列的顺序,可以确定精氨酸、藁本内酯、藁本内酯异构体、欧当归内酯 A、蔗糖是两种当归中最明显的差异成分。其中会川当归中的藁本内酯二聚体、欧当归内酯 A、藁本内酯及异构体、蔗糖、6'-双藁本内酯、十八碳二烯酸、葡萄糖酸和二藁本内酯含量比岷县当归的含量高;岷县当归中精氨酸、丁基苯酐、二咖啡酰奎宁酸、洋川芎内酯 F 和吡啶-3-丙烯酸异构体含量比会川当归含量高。通过利用岷县当归和会川当归的含量成分可以实现对两种当归药材的快速区分,本文结果将有助于当归类药材后续相关的研究。

3 讨论

本研究通过 UHPLC-Q/Orbitrap MS 测定不同产地当归的化学成分组成,利用代谢组学技术结合化学计量学分析,通过层次聚类、K-Means 聚类分析、PCA 和 OPLS-DA,实现了对不同产地的当归进行

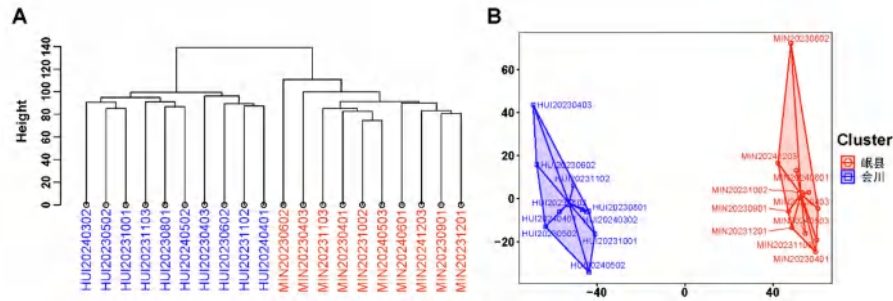


图 3 不同产地当归聚类分析图

Fig 3 Cluster analysis diagram of *Angelica sinensis* Radix from different habitats

A. 层次聚类分析 (hierarchical cluster analysis) ; B.K-Means 聚类分析 (K-Means cluster analysis)

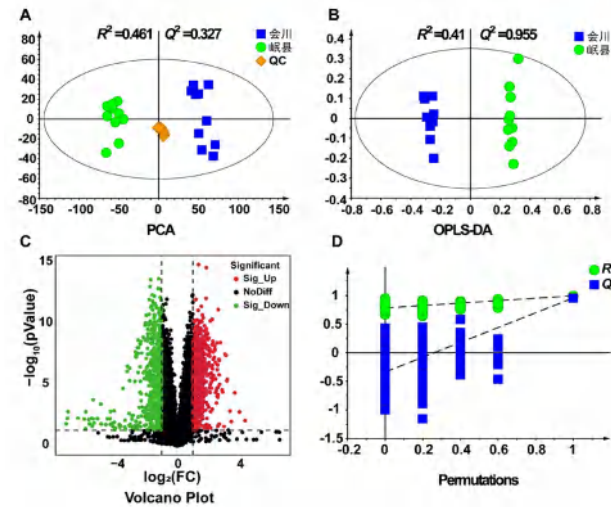


图 4 基于 UHPLC-MS 对岷县和会川当归的多元统计分析

Fig 4 Multivariate statistical analysis of *Angelica sinensis* Radix in Mianxian and Huichuan based on UHPLC-MS

A. 主成分分析 (principal component analysis) ; B. 正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis) ; C. 阈值大于 3 的 VIP 图 (VIP diagram with threshold greater than 3) ; D. 置换检验分析 (replacement test analysis)

快速有效的区分, 系统揭示了不同产地当归药材的代谢差异, 为中药质量评价提供了科学依据。基于 UHPLC-MS 的非靶向代谢组学结果显示共筛选出 VIP 大于 3 的差异成分 128 种, 最终鉴定出 20 种差异成分, 这些差异主要集中在苯酚类成分和苯酚类二聚体, 与当归的药效物质基础高度相关。苯酚类化合物是当归的主要活性成分, 具有镇痛、抗肿瘤、神经保护、抗炎、肾脏保护、抗氧化和抗脑缺血的作用^[17-20], 其异构体 (如 Z-藁本内酯) 和二聚体的含量差异可能直接影响药材功效。而不同产地的气候、土壤、光照等生态因素均会影响当归的生长发育和次生代谢途径中代谢物组成, 进而影响药材的化学成分和药效^[6]。岷县当归中藁本内酯类成分的显著富集可能与其独特的气候 (高寒、昼夜温差大) 和土壤条件 (如腐殖质含量) 相关, 这些环境因子可能通过调控苯丙素类代谢通路 (如苯丙氨酸解氨酶活性) 促进次生代谢物合成。藁本内酯类成分的丰度差异可作为岷县当归的潜在“化学指纹”, 为道地性鉴别提供客观指标。传统质量评价多关注单

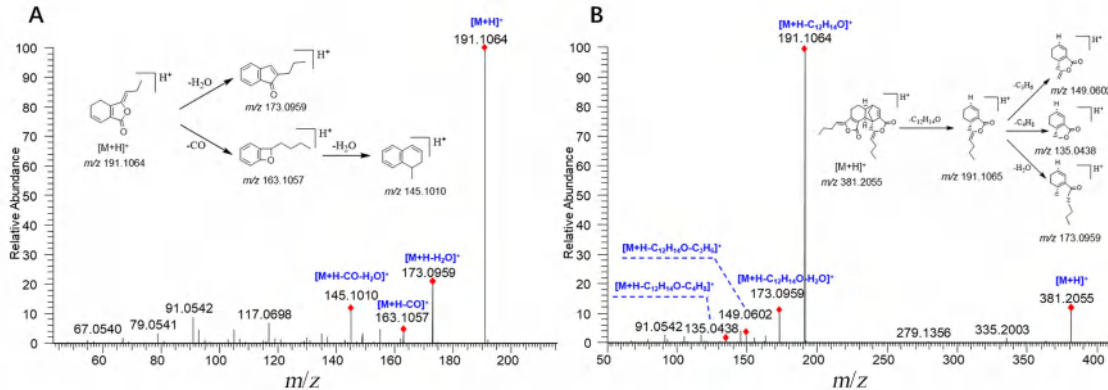


图 5 当归中化合物的二级碎片及可能的裂解途径分析

Fig 5 Analysis of secondary fragments and possible fragmentation pathways of compounds in *Angelica sinensis* Radix

A. Z-藁本内酯 (Z-ligustilide) ; B. 欧当归内酯 A (ligustilide A)

一成分 (如阿魏酸), 本研究通过非靶向代谢组学揭示多成分协同作用的重要性, 提示未来标准应纳入多指标综合评价体系。

本研究尽管通过自建数据库和二级质谱碎片鉴定了 20 个差异成分, 但仍有大量未知代谢物 (如新型二聚体) 未被解析, 需结合核磁共振

表 4 基于 UHPLC-Q/Orbitrap MS 的当归化学成分分析
Tab 4 Chemical composition of *Angelica sinensis* Radix based on UHPLC-Q/Orbitrap MS

No.	组分	保留时间/min	VIP	实测质量	理论质量	分子式	离子模式	MS/MS 碎片
1	精氨酸 [*]	0.60	18.69	175.1185	175.1189	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	[M+H] ⁺	175.1187, 158.0921, 130.0973, 116.0704, 112.0867, 70.0651
2	Z- 藁本内酯 [*]	7.60	16.99	191.1062	191.1066	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	[M+H] ⁺	191.1064, 173.0959, 163.1057, 145.1010, 117.0697
3	欧当归内酯 A [*]	10.10	16.77	381.2052	381.2060	C ₂₄ H ₂₈ O ₄	[M+H] ⁺	381.2045, 335.2007, 191.1064, 173.0959, 149.0602, 135.0438
4	藁本内酯异构体	9.91	9.36	191.1063	191.1066	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	[M+H] ⁺	191.1064, 173.0961, 163.1117, 145.1010, 117.0699
5	蔗糖 [*]	0.71	8.53	341.1085	341.1089	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	[M-H] ⁻	341.1080, 179.0562, 161.0460, 143.0349, 119.03507, 113.0243, 89.02448
6	十八碳二烯酸	8.57	8.13	295.2277	295.2278	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	[M-H] ⁻	295.2277, 277.2172, 171.1028
7	藁本内酯二聚体	9.90	8.05	381.2053	381.2060	C ₂₄ H ₂₈ O ₄	[M+H] ⁺	381.2054, 335.2012, 237.0908, 191.1064, 173.0960, 149.0602, 135.0438
8	E- 藁本内酯	7.30	7.52	191.1062	191.1066	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	[M+H] ⁺	191.1066, 173.0959, 163.1127, 145.1013, 117.0698
9	葡萄糖酸	0.66	6.93	195.0509	195.0510	C ₆ H ₁₂ O ₇	[M-H] ⁻	195.0510, 177.0403, 159.0299, 129.0193
10	丁基苯酚 [*]	6.98	6.27	191.1063	191.1066	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	[M+H] ⁺	191.1064, 173.0958, 163.1114, 145.1010, 117.0697
11	吡啶-3- 丙烯酸	2.70	5.76	188.0703	188.0706	C ₁₁ H ₉ NO ₂	[M+H] ⁺	188.0702, 146.0598, 118.0650
12	亚油酸	12.66	5.55	279.2330	279.2329	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	[M+H] ⁺	279.2328, 261.2226, 131.3880
13	二咖啡酰奎宁酸	4.11	5.23	517.1330	517.1341	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	[M+H] ⁺	499.1190, 163.0387
14	洋川芎内酯 F	6.02	5.01	207.1017	207.1016	C ₁₂ H ₁₄ O ₃	[M+H] ⁺	207.1010, 189.0909, 165.1133, 161.0960, 151.0388, 147.0433
15	东当归内酯 B	11.44	4.98	381.2056	381.2060	C ₂₄ H ₂₈ O ₅	[M+H] ⁺	381.2052, 363.1952, 279.1385, 191.1063, 173.0959, 149.0602, 135.0438
16	E, E'-3, 3': 8, 8'- 二藁本内酯	11.04	4.73	381.2053	381.2060	C ₂₄ H ₂₈ O ₄	[M+H] ⁺	381.2052, 335.2007, 297.1481, 191.1064, 173.0959, 149.0602, 135.0438
17	香草酸	3.35	3.95	167.0351	167.0350	C ₈ H ₈ O ₄	[M-H] ⁻	167.0350, 152.0117, 123.0451
18	棉子糖	0.66	3.23	543.1309	543.1327	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	[M+K] ⁺	543.1310, 381.0780, 363.0683
19	川芎内酯 E	6.52	3.11	203.0713	203.0714	C ₁₂ H ₁₂ O ₃	[M-H] ⁻	203.0713, 173.0243, 145.0296
20	半乳糖醇	0.62	3.01	181.0718	181.0718	C ₆ H ₁₄ O ₆	[M-H] ⁻	181.0718, 163.0609, 149.0460, 131.0350, 119.0350, 113.0243

注：* 表示和对照品进行对比。
Note: * indicates comparison with standard.

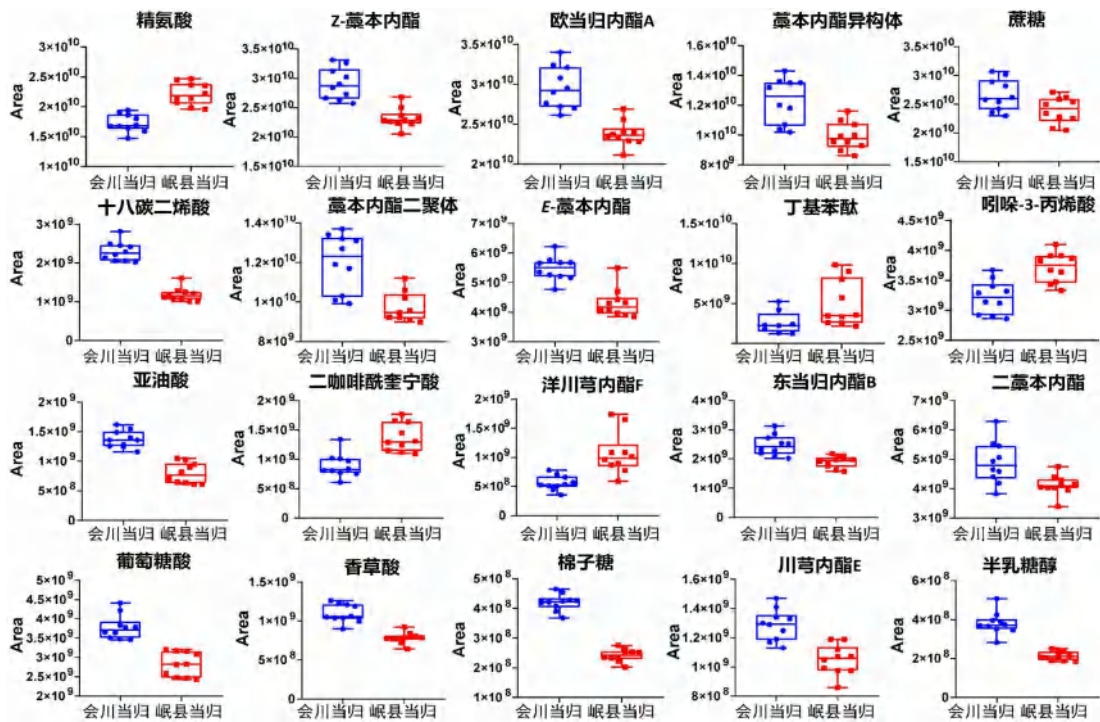


图 6 岷县和会川当归差异成分含量分析
Fig 6 Different components of *Angelica sinensis* Radix in Minxian and Huichuan

(NMR) 或合成对照品进一步验证。此外, 20 批样本虽能揭示显著差异, 但需扩大样本量 (如纳入更多产地、多年份样本) 以增强普适性。分析方法也仅采用液质联用的方法进行分析比较, 对于当归中的挥发性成分很难兼顾, 研究报道当归中的挥发性成分也是其发挥药效的有效成分。此外, 会川当归和岷县当归均产自甘肃省, 这也反映出在同一省份的药材也会有成分上的差异, 对于药材的质量控制亟待解决。这也提示后续的研究应进一步扩大研究的样本量, 减少批次间的误差, 拓宽分析检测方法, 比如说 LC-MS 和 GC-MS 相结合同时检测当归中挥发性和非挥发性的成分, 进一步解释不同产地或不同品种引起的当归的质量差异, 为中医临床安全用药提供更准确的物质基础和参考。

综上所述, 基于 UHPLC-MS 的非靶向代谢组学研究揭示了岷县与会川的当归之间显著的化学特征差异。研究显示, 会川当归中富含较高水平的藁本内酯, 以其药用价值著称; 而岷县当归则含有更高浓度的有机酸和氨基酸, 对促进人体健康具有重要作用。此外, 会川当归中高含量的藁本内酯二聚体突显了其强大的药理作用。上述研究成果不仅深化了我们对不同产地当归差异的认识, 还对中医临床安全用药以及不同产地质量差异的探索奠定了基础。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 113.
- [2] 拱健婷, 王大仟, 张金霞, 等. 硫磺熏蒸对当归品质影响及其替代技术研究进展 [J]. 中南药学, 2018, 16 (6): 793-798.
- [3] 冯慧敏, 李玥, 罗旭东, 等. 当归化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40 (4): 159-166.
- [4] 徐小琼, 朱田田, 席少阳, 等. 道地产区当归药材品质区域划分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27 (5): 132-139.
- [5] 孙红梅. 当归药材资源调查与品质特征的研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2010.
- [6] 荔淑楠, 王引权, 王富胜, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的不同品种当归代谢组学分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26 (8): 138-147.
- [7] Zhou WL, Qiu J, Wei CL, et al. Comprehensive quality evaluation of two different geography originated *Angelica sinensis* Radix based on potential production area development and resource protection [J]. Plant Physiol Biochem, 2023, 201: 107878.
- [8] 徐小琼, 陈博, 张小波, 等. 甘肃各主产区当归 UPLC 多成分含量测定及评析 [J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32 (6): 1014-1022.
- [9] 田朋, 柳娜, 王雅莉, 等. 不同产地当归品质的研究进展 [J]. 中医药学, 2020, 48 (1): 72-75.
- [10] Barbosa S, Saurina J, Puignou L, et al. Targeted UH-PLC-HRMS (Orbitrap) polyphenolic and capsaicinoid profiling for the chemometric characterization and classification of paprika with protected designation of origin (PDO) attributes [J]. Molecules, 2020, 25 (7): 1623.
- [11] Wolfender JL, Rudaz S, Choi YH, et al. Plant metabolomics: from holistic data to relevant biomarkers [J]. Curr Med Chem, 2013, 20 (8): 1056-1090.
- [12] Lv YH, Xu XK, Yang JS, et al. Identification of chemical components and rat serum metabolites in Danggui Buxue decoction based on UPLC-Q-TOF-MS, the UNIFI platform and molecular networks [J]. RSC Adv, 2023, 13 (46): 32778-32785.
- [13] 张来宾, 吕洁丽, 陈红丽, 等. 当归中苯酞类成分及其药理作用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41 (2): 167-176.
- [14] Chen LL, Qi J, Chang YX, et al. Identification and determination of the major constituents in traditional Chinese medicinal formula Danggui-Shaoyao-San by HPLC-DAD-ESI-MS/MS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2009, 50 (2): 127-137.
- [15] Zhang KX, Yan ML, Han S, et al. Identification of chemical markers for the discrimination of *Radix Angelica sinensis* grown in geoherb and non-geoherb regions using UHPLC-QTOF-MS/MS based metabolomics [J]. Molecules, 2019, 24 (19): 3536.
- [16] 张清清, 冯媛, 李春花, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术快速鉴定当归中苯酞类和有机酸类成分 [J]. 中国药房, 2022, 33 (5): 579-585.
- [17] 王雨薇, 刘凯, 孙少伯, 等. 当归挥发油对血管紧张素 II 所致肥大心肌细胞 Ca²⁺ 信号通路和 T 型钙通道的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2023, 32 (12): 1634-1637.
- [18] Li CL, Cai QY, Wu XY, et al. Anti-inflammatory study on the constituents of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels, *Angelica dahurica* (Hoffm.) Benth. & Hook. f. ex Franch. & Sav., *Angelica pubescence* Maxim and *Foeniculum vulgare* Mill. essential oils [J]. J Oleo Sci, 2022, 71 (8): 1207-1219.
- [19] 张怡, 章宪慧, 王丽丽, 等. 当归挥发油与当归多糖不同配比对原发性痛经模型大鼠的影响 [J]. 时珍国医国药, 2024, 35 (8): 1848-1851.
- [20] Ji P, Wei YM, Xue WX, et al. Characterization and antioxidative activities of polysaccharide in Chinese angelica and its processed products [J]. Int J Biol Macromol, 2014, 67: 195-200.

(收稿日期: 2025-03-16; 修回日期: 2025-06-11)

人血浆中紫杉醇及 4 种代谢产物 UPLC-MS/MS 分析方法的开发与应用

李三望¹, 李晶晶¹, 谢非凡^{2, 3*} (1.中南大学湘雅二医院药学部, 长沙 410011; 2.中南大学湘雅药学院, 长沙 410013; 3.根特大学药学院, 比利时 根特 B-9000)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 法测定人血浆中紫杉醇及其代谢产物 3'-*p*-羟基紫杉醇、6 α -羟基紫杉醇、6 α , 3'-*p*-二羟基紫杉醇和 7-表紫杉醇的浓度。**方法** 采用 ¹³C₆-紫杉醇和 6 α -羟基紫杉醇-*d*₅ 为内标, 利用 HybridSPE-Plus 磷脂去除 96 孔板处理样本后进样分析。以 Waters Acquity UPLC BEH C18 柱 (50 mm×2.1 mm, 1.7 μ m) 为固定相, 10% 甲醇水溶液 (含 0.2% 甲酸) 和甲醇 (含 0.2% 甲酸) 为流动相, 在 0.45 mL·min⁻¹ 流速下进行梯度洗脱。电喷雾离子源采用正离子模式进行检测。**结果** 紫杉醇及其 4 种代谢产物在各自线性范围内呈良好的线性关系 ($r \geq 0.9983$), 最低定量限为 0.05 ~ 0.2 ng·mL⁻¹, 方法准确度为 92.9% ~ 114.7%, 批内及批间相对标准偏差 $\leq 12.7\%$ 。**结论** 本方法快速、灵敏、准确、特异性强, 可用于紫杉醇及其代谢产物的药动学研究。

关键词: 紫杉醇; 代谢产物; 超高效液相色谱; 质谱; 血药浓度

中图分类号: R917, R969.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)12-3585-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.018

Development and application of a UPLC-MS/MS method for the analysis of paclitaxel and 4 metabolites in human plasma

LI Sanwang¹, LI Jingjing¹, XIE Feifan^{2, 3*} (1. Department of Pharmacy, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011; 2. Xiangya School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410013; 3. Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ghent University, Ghent Belgium B-9000)

Abstract: Objective To determine paclitaxel and its metabolites, including 3'-*p*-hydroxypaclitaxel, 6 α -hydroxypaclitaxel, 6 α , 3'-*p*-dihydroxypaclitaxel, and 7-epipaclitaxel in human plasma by UPLC-MS/MS. **Methods** ¹³C₆-paclitaxel and 6 α -hydroxyl-paclitaxel-*d*₅ were used as the internal standards. Plasma samples were processed with HybridSPE-Plus phospholipid removal 96-well plates before the analysis. Chromatographic separation of target analytes was achieved on a Waters Acquity UPLC BEH C18 column (50 mm×2.1 mm, 1.7 μ m), with the mobile phase consisting of 10% methanol aqueous solution (containing 0.2% formic acid) and methanol (containing 0.2% formic acid) under gradient elution at 0.45 mL·min⁻¹. Electrospray ionization source in positive ion mode was used for the detection. **Results** Paclitaxel and its 4 metabolites demonstrated good linearity within their respective ranges ($r \geq 0.9983$), with lower limits of quantification ranging from 0.05 to 0.2 ng·mL⁻¹. The method exhibited accuracies of 92.9% ~ 114.7%, with intra- and inter-batch relative standard deviations $\leq 12.7\%$. **Conclusion** This method is rapid, sensitive, accurate, and highly specific, suitable for the pharmacokinetic studies of paclitaxel and its metabolites.

Key words: paclitaxel; metabolite; ultra performance liquid chromatography; mass spectrometry; plasma drug concentration

作者介绍: 李三望, 女, 博士, 主管药师, 主要从事体内药物分析研究, email: sanwangli@csu.edu.cn * 通信作者: 谢非凡, 男, 教授, 主要从事药动学研究, email: feifan.xie@csu.edu.cn

紫杉醇, 又称为红豆杉醇, 是 1968 年从太平洋紫杉树皮中提取出来的一种天然的抗肿瘤药物^[1-2]。它能与 β -微管蛋白结合稳定微管, 从而使细胞分裂终止在 M 期, 抑制肿瘤细胞的增殖, 从而发挥抗肿瘤作用^[3-6]。作为一种广谱高效的抗肿瘤药物, 目前被广泛应用于卵巢癌、胃癌、子宫内膜癌、结肠癌、乳腺癌等多种肿瘤的治疗^[7-12]。紫杉醇主要通过细胞色素 P450 酶 CYP2C8 和 CYP3A4 在肝脏中代谢^[13-15]。CYP2C8 酶可使紫杉醇代谢为 6 α -羟基紫杉醇, 而 CYP3A4 酶将紫杉醇转化为 3'-*p*-羟基紫杉醇, 这两种代谢产物还能进一步氧化生成 6 α , 3'-*p*-二羟基紫杉醇^[14]。此外, 紫杉醇结构中的 C-7 手性中心非常不稳定, 在水性环境中很容易发生差向异构化, 从而产生具有相同活性的 7-表紫杉醇^[16]。研究表明, 紫杉醇与 7-表紫杉醇是其发挥抗肿瘤作用的活性形式, 同时也是导致药物毒性的主要原因^[6, 17]。紫杉醇的其他代谢产物的抗肿瘤活性和细胞毒性都低于紫杉醇^[18]。

加压腹膜内气雾剂化疗 (pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy, PIPAC) 是一种新兴的区域化疗技术, 主要用于治疗晚期腹膜癌转移患者。该技术通过腹腔镜将化疗药物 (如紫杉醇) 以气雾形式喷射到腹腔内, 在加压环境下实现化疗药物的均匀分布与深层渗透, 从而提高治疗效果并减少全身毒性。为了解紫杉醇在 PIPAC 这一新型给药方式下的首过效应程度与体内动力学过程, 有必要测定紫杉醇及其代谢产物在体内的浓度水平变化情况。

目前, 国内外学者已经报道了多种液相色谱串联质谱法用于人血浆样品中紫杉醇和/或部分代谢产物的浓度测定^[7, 14, 18-22]。然而, 已有方法以检测紫杉醇原形药物为主, 部分方法测定了紫杉醇的主要代谢产物 3'-*p*-羟基紫杉醇和 6 α -羟基紫杉醇, 鲜有方法同时测定紫杉醇及 7-表紫杉醇等代谢产物。

为更好地了解紫杉醇在行 PIPAC 腹膜癌患者体内的代谢特征, 本研究拟构建灵敏且高效的超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 法同时测定人血浆中紫杉醇及其 4 种代谢产物的浓度, 并将其用于研究紫杉醇在行 PIPAC 腹膜癌患者的代谢特征。

1 材料

1.1 仪器

Waters ACQUITY UPLC H-Class XEVO TQS 超高效液相质谱联用仪、PlatePrep 96 孔真空萃取装置 (美国 Waters 公司); 万分之一精密电子天

平 (德国 Sartorius 公司); Vortex-Genie 2 涡旋振荡器 (美国 Scientific 公司)。

1.2 试剂

紫杉醇、3'-*p*-羟基紫杉醇、6 α -羟基紫杉醇、6 α , 3'-*p*-二羟基紫杉醇、7-表紫杉醇、¹³C₆-紫杉醇 (内标) 和 6 α -羟基紫杉醇-*d*₅ (内标) (加拿大 Toronto Research Chemicals 公司), 紫杉醇及其 4 种代谢产物结构式见图 1; 水和甲醇均为色谱纯 (美国 Merck 公司); 甲酸 (分析纯) 和 HybridSPE-Plus 磷脂去除 96 孔板 (规格: 2 mL) (美国 Sigma 公司); 空白人体血浆样品由健康志愿者提供。

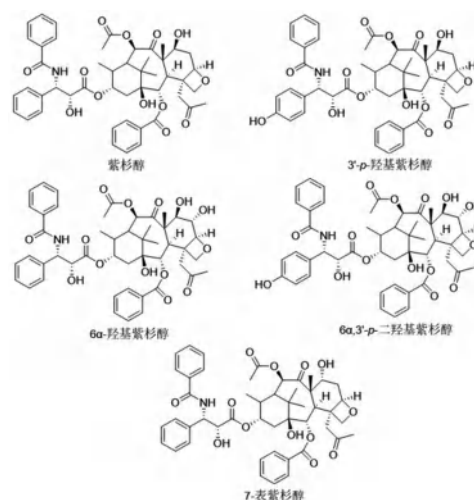


图 1 紫杉醇及其代谢产物的化学结构

Fig 1 Chemical structures of paclitaxel and its metabolites

2 方法

2.1 色谱和质谱条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Waters Acquity UPLC BEH C18 柱 (50 mm×2.1 mm, 1.7 μ m); 保护柱: Waters Acquity BEH C18 VanGuard 柱 (5 mm×2.1 mm, 1.7 μ m); 流动相 A 为 10% 甲醇水溶液 (含 0.2% 甲酸), 流动相 B 为甲醇 (含 0.2% 甲酸), 梯度洗脱程序: 0~1.25 min, 50%~80%B, 1.25~1.5 min, 80%~100%B, 1.5~2 min, 100%~50%B, 2~2.5 min, 50%B, 流速为 0.45 mL·min⁻¹。柱温为 50℃。通过自动切换阀的使用来控制流动相进入质谱或废液, 切换流程为 0~0.75 min: 进废液; 0.75~2.0 min: 进质谱; 2.0~2.5 min: 进废液。

2.1.2 质谱条件 采用电喷雾离子源 (ESI) 正离子模式, 多重反应离子监测 (MRM) 方式进行检测。紫杉醇及其代谢产物、内标的检测参数见表 1。离子源其他相关参数设置如下, 毛细管电压: 3000 V, 离子源温度: 150℃, 干燥气体 (氮气) 流速: 1000 L·h⁻¹, 干燥气温度: 600℃, 碰撞气体 (氩气) 流速: 0.15 mL·min⁻¹。

表 1 紫杉醇及其代谢产物、内标的检测参数

Tab 1 MS/MS detection parameters for paclitaxel, its metabolites and the internal standards

待测化合物	监测离子对 (<i>m/z</i>)	碎裂 电压 /V	碰撞能 /eV
紫杉醇	876.3 → 308.1	30	28
3'- <i>p</i> - 羟基紫杉醇	892.5 → 324.1	60	30
6 α - 羟基紫杉醇	892.5 → 308.1	36	30
6 α , 3'- <i>p</i> - 二羟基紫杉醇	908.5 → 324.1	18	30
7- 表紫杉醇	876.6 → 308.2	10	30
¹³ C ₆ - 紫杉醇 (内标)	882.3 → 314.2	74	28
6 α - 羟基紫杉醇- <i>d</i> ₅ (内标)	897.5 → 313.2	28	32

2.2 溶液配制

2.2.1 对照品储备液的配制 精密称取紫杉醇及其代谢产物对照品适量, 加入乙醇使其充分溶解后定容, 得到质量浓度分别为 0.96、0.0345、1.104、0.257、0.943 mg·mL⁻¹ 的紫杉醇、3'-*p*- 羟基紫杉醇、6 α - 羟基紫杉醇、6 α , 3'-*p*- 二羟基紫杉醇和 7- 表紫杉醇的对照品储备液。取适量各对照品储备液混合, 用甲醇逐级稀释得到含紫杉醇、6 α - 羟基紫杉醇和 7- 表紫杉醇质量浓度为 2000、4000、10 000、20 000、50 000、200 000 ng·mL⁻¹ 的 6 个高浓度级别的系列混合对照品工作溶液①, 以及含紫杉醇、3'-*p*- 羟基紫杉醇、6 α - 羟基紫杉醇、6 α , 3'-*p*- 二羟基紫杉醇和 7- 表紫杉醇质量浓度为 1、2、4、20、50、200、500、2000 ng·mL⁻¹ 的 8 个低浓度级别的系列混合对照品工作溶液②。上述的储备液和工作溶液均保存于 -20℃ 冰箱中。

2.2.2 内标储备溶液和工作溶液的配制 精密称取 ¹³C₆- 紫杉醇和 6 α - 羟基紫杉醇-*d*₅ 的对照品适量, 加入乙醇使其充分溶解后定容, 得到质量浓度为 0.1 mg·mL⁻¹ 的 ¹³C₆- 紫杉醇储备液和质量浓度为 0.5 mg·mL⁻¹ 的 6 α - 羟基紫杉醇-*d*₅ 储备液。取 ¹³C₆- 紫杉醇和 6 α - 羟基紫杉醇-*d*₅ 储备液适量, 用甲醇进一步稀释得到 ¹³C₆- 紫杉醇和 6 α - 羟基紫杉醇-*d*₅ 质量浓度分别为 40 和 400 ng·mL⁻¹ 的混合内标工作溶液。上述的储备液和工作溶液均保存于 -20℃ 冰箱中。

2.3 血浆样品的制备与处理

2.3.1 标准血浆样品的制备 精密吸取空白血浆 95 μ L, 分别加入上述混合对照品工作溶液①或② 5 μ L, 充分混匀后得到含紫杉醇、6 α - 羟基紫杉醇和 7- 表紫杉醇质量浓度范围为 100 ~ 10 000 ng·mL⁻¹ 的系列混合标准血浆样本 (高浓度系列) 及含紫杉醇、3'-*p*- 羟基紫杉醇、6 α - 羟基紫杉醇、6 α , 3'-*p*- 二羟基紫杉醇和 7- 表紫杉醇质量浓度范围为 0.05 ~ 100 ng·mL⁻¹ 的系列混合标准血浆样本 (低浓度系列)。

2.3.2 标准血浆样品的处理 吸取上述标准血浆样品 100 μ L 置于 HybridSPE-Plus 磷脂去除 96 孔板中, 依次加入混合内标工作溶液 50 μ L、甲醇溶液 (含

0.1% 甲酸) 250 μ L 后, 通过移液枪上下吹打 10 次使样本混合均匀。将样品收集板置于 PlatePrep 真空萃取装置的真空歧管中, 含有样品的 HybridSPE-Plus 板放在其顶部, 将两者完全接合后施加真空 (1333 Pa, 8 min)。样品完全通过 HybridSPE-Plus 填充床后, 停止施加真空, 取出样品收集板。

对于含紫杉醇、6 α - 羟基紫杉醇和 7- 表紫杉醇质量浓度范围为 100 ~ 10 000 ng·mL⁻¹ 的混合标准血浆样本, 吸取洗脱液 40 μ L 置于新的 96 孔板中, 加入 760 μ L 50% 甲醇水溶液 (高稀释模式), 混合均匀后, 取 1 μ L 样品溶液进行 UPLC-MS/MS 分析。对于含紫杉醇、3'-*p*- 羟基紫杉醇、6 α - 羟基紫杉醇、6 α , 3'-*p*- 二羟基紫杉醇和 7- 表紫杉醇质量浓度范围为 0.05 ~ 100 ng·mL⁻¹ 的混合标准血浆样本, 吸取洗脱液 90 μ L 置于新的 96 孔板中, 加入 90 μ L 超纯水 (低稀释模式), 混合均匀后, 取 10 μ L 样品溶液进行 UPLC-MS/MS 分析。

2.3.3 待测血浆样品的处理 精密吸取待测血浆样品 100 μ L 置于 HybridSPE-Plus 磷脂去除 96 孔板的孔中, 按“2.3.2”项下方法处理吸取洗脱液同时进行高稀释模式和低稀释模式的处理后, 分别取 1 μ L 和 10 μ L 样品溶液进样至 UPLC-MS/MS 系统分析。高稀释模式样品分析物的浓度采用高浓度系列标准曲线进行计算, 低稀释模式样品分析物的浓度采用低浓度系列标准曲线进行计算。

2.4 方法学验证

参照欧洲药品管理局 2011 年颁布的 *Guideline on bioanalytical method validation* 对建立的 UPLC-MS/MS 法进行了方法学验证。

2.4.1 专属性 专属性通过对比 6 份不同来源的空白血浆样品, 分别加入紫杉醇、3'-*p*- 羟基紫杉醇、6 α - 羟基紫杉醇、6 α , 3'-*p*- 二羟基紫杉醇和 7- 表紫杉醇以及内标 ¹³C₆- 紫杉醇和 6 α - 羟基紫杉醇-*d*₅ 的空白血浆样品和给药后患者的血浆样品色谱图来评估。

2.4.2 标准曲线与最低定量限 最低定量限 (LLOQ) 被认定为标准曲线上的最低浓度点, 其信噪比 (*S/N*) 应 ≥ 10 , 且偏差和精密度 (变异系数, *CV*) 应 $\leq 20\%$ 。参照“2.3.1”项下方法配制不同浓度的系列混合标准血浆样品, 按“2.3.2”项下方法处理后, 分别进样至 UPLC-MS/MS 系统分析。以血浆样品中待测物的质量浓度 (ng·mL⁻¹) 为横坐标 *X*, 以待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标 *Y*, 用加权最小二乘法 (1/*X*²) 进行回归运算, 构建标准曲线。除 LLOQ 外, 各浓度点的偏差和精密度应 $\leq 15\%$, 且至少 75% 的标准样品应符合该标准。

2.4.3 准确度与精密度 参照“2.3.1”项下方法, 对于高浓度系列和低浓度系列标准曲线, 分别制备

低、中、高浓度的标准血浆样品 6 份作为质控样品,按照“2.3.2”项下方法处理,进样分析,考察批内准确度与精密度。连续 3 d 进样分析,考察批间准确度与精密度。准确度和精密度的接受标准是各个浓度水平的质控样品的平均测定浓度应在标示浓度的 $\pm 15\%$ 偏差范围内,且 CV 值应 $\leq 15\%$ 。

2.4.4 提取回收率 参照“2.3.1”项下方法,制备低、高浓度的标准血浆样品,按照“2.3.2”项下方法处理后,进样分析获得紫杉醇、3'-*p*-羟基紫杉醇、6 α -羟基紫杉醇、6 α , 3'-*p*-二羟基紫杉醇、7-表紫杉醇和内标 $^{13}\text{C}_6$ -紫杉醇、6 α -羟基紫杉醇- d_5 的峰面积。另取空白血浆样品 100 μL ,按照“2.3.2”项下方法处理,取洗脱液,即得空白基质。向空白基质中分别加入低、高浓度的紫杉醇及其代谢产物的对照品工作溶液,使最终浓度与上述质控样品浓度保持一致,进样分析测得紫杉醇、3'-*p*-羟基紫杉醇、6 α -羟基紫杉醇、6 α , 3'-*p*-二羟基紫杉醇、7-表紫杉醇和内标 $^{13}\text{C}_6$ -紫杉醇、6 α -羟基紫杉醇- d_5 的峰面积。通过比较标准血浆样品与空白基质加标样品中目标分析物的峰面积考察提取回收率。

2.4.5 基质效应 取空白血浆样品 100 μL ,按照“2.3.2”项下方法处理,取洗脱液,即得空白基质。向空白基质中分别加入低、高浓度的紫杉醇及其代谢产物的对照品溶液和内标工作溶液,使最终浓度与质控样品保持一致,进样分析获得紫杉醇及其代谢产物和内标的峰面积。另外,以 50% 甲醇水代替空白基质,向其中分别加入低、高浓度的紫杉醇及其代谢产物的对照品溶液和内标工作溶液,使最终浓度与上述样品保持一致,进样分析获得各目标分析物和内标的峰面积。基质效应通过比较空白基质加标样品与以 50% 甲醇水代替空白基质配制的加标样品在低和高浓度水平下的平均峰面积的比值来评估。

2.4.6 稳定性 由于紫杉醇及其代谢产物 3'-*p*-羟基紫杉醇、6 α -羟基紫杉醇在人体血浆样本中的短期、长期及冻融稳定性研究已有相关报道^[7, 14, 18-20],表明以上分析物的稳定性良好。因此,本研究只对 6 α , 3'-*p*-二羟基紫杉醇和 7-表紫杉醇在人体血浆样本的稳定性进行了考察。制备含 6 α , 3'-*p*-二羟基紫杉醇 (1、2.5、100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和 7-表紫杉醇 (0.1、100、10 000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 低、中、高浓度的标准血浆样品,每个浓度平行配制 3 份。血浆样品分别在室温放置 4 h、反复冻融 3 次、 -80°C 放置 30 d 后,按照“2.3.2”项下方法处理后进样分析,以考察 6 α , 3'-*p*-二羟基紫杉醇和 7-表紫杉醇在人体血浆样本中的稳定性。

2.5 方法应用

建立的 UPLC-MS/MS 法被应用于测定腹膜癌患者经 PIPAC 给药后血浆中紫杉醇及其代谢产物

的浓度变化。该药动力学研究由根特大学附属医院伦理委员会批准,伦理批件号为 AGO/2017/003。患者纳入标准为:成年患者(年龄 18 岁及以上)且患有晚期、经活检证实的来源于卵巢、乳腺、胃、肝胆或胰腺的腹膜癌。患者通过 PIPAC 技术的给药剂量为 $140 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ 。分别于给药前 (0 h) 和给药后 0.25、0.5、1、1.5、2、4、8、12、24 h 采集静脉血 2 mL, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后,取上层血浆置于 -80°C 保存直至分析。药动力学分析采用 Phoenix WinNonlin 8.1 软件的非房室模型分析模块完成,主要计算药动力学参数如药物浓度-时间曲线下面积 ($AUC_{0-24 \text{ h}}$)、 $AUC_{0-\text{inf}}$ 、 C_{max} 、 t_{max} 和 $t_{1/2}$ 。

3 结果

3.1 方法学验证

3.1.1 专属性 标准血浆样本中紫杉醇及其代谢产物的代表性色谱图见图 2。如图 2 所示,紫杉醇、3'-*p*-羟基紫杉醇、6 α -羟基紫杉醇、6 α , 3'-*p*-二羟基紫杉醇和 7-表紫杉醇的保留时间分别为 1.69、1.25、1.57、1.14、1.82 min,内标 $^{13}\text{C}_6$ -紫杉醇和 6 α -羟基紫杉醇- d_5 的保留时间分别为 1.69、1.57 min。各分析物的色谱峰峰形良好,基线平稳,空白血浆中的内源性物质在各分析物的保留时间区域均未出现色谱峰,表明方法的专属性良好。

3.1.2 标准曲线与最低定量限 紫杉醇及其代谢产物的线性关系考察结果见表 2。紫杉醇、3'-*p*-羟基紫杉醇、6 α -羟基紫杉醇、6 α , 3'-*p*-二羟基紫杉醇和 7-表紫杉醇在各自的线性范围内与峰面积线性关系良好。血浆中紫杉醇、3'-*p*-羟基紫杉醇、6 α -羟基紫杉醇、6 α , 3'-*p*-二羟基紫杉醇和 7-表紫杉醇的 LLOQ 分别为 0.05、0.05、0.1、0.2 和 0.1 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.1.3 准确度与精密度 紫杉醇及其代谢产物的准确度与精密度考察结果见表 3。紫杉醇及其代谢产物 3'-*p*-羟基紫杉醇、6 α -羟基紫杉醇、6 α , 3'-*p*-二羟基紫杉醇、7-表紫杉醇的准确度在 92.9% ~ 114.7%,批内相对标准偏差 (RSD) 在 1.6% ~ 12.7%,批间 RSD 在 3.8% ~ 10.8%,均符合生物样品分析的要求。

3.1.4 提取回收率 紫杉醇、3'-*p*-羟基紫杉醇、6 α -羟基紫杉醇、6 α , 3'-*p*-二羟基紫杉醇和 7-表紫杉醇的提取回收率分别在 100.5% ~ 112.4%、93.7% ~ 104.5%、99.9% ~ 104.0%、89.2% ~ 99.8% 和 98.4% ~ 109.3%,内标 $^{13}\text{C}_6$ -紫杉醇、6 α -羟基紫杉醇- d_5 的平均回收率分别为 (103.9 $\pm$ 12.2)% 和 (87.3 $\pm$ 6.2)%。各分析物的回收率基本均在 90% 以上,这与文献报道的蛋白质沉淀法相当^[14],但显著高于文献报道的液液萃取法(回收率在 65% ~ 80%)^[18]。

3.1.5 基质效应 紫杉醇、3'-*p*-羟基紫杉醇、6 α -羟基紫杉醇、6 α , 3'-*p*-二羟基紫杉醇、7-表紫杉醇

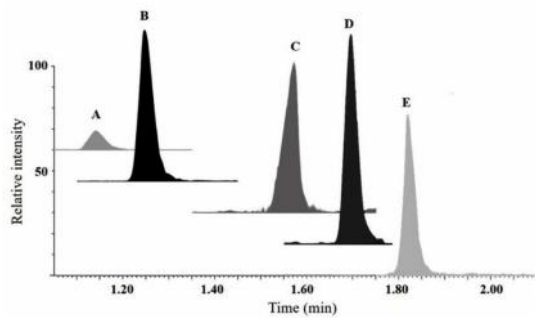


图2 标准血浆样本中紫杉醇及其代谢产物的代表性色谱图
Fig 2 Representative chromatogram of paclitaxel and its metabolites in standard plasma samples

A. 6α, 3'-p-二羟基紫杉醇 (6α, 3'-p-dihydroxypaclitaxel); B. 3'-p-羟基紫杉醇 (3'-p-hydroxypaclitaxel); C. 6α-羟基紫杉醇 (6α-hydroxypaclitaxel); D. 紫杉醇 (paclitaxel); E. 7-表紫杉醇 (7-epipaclitaxel)

表 2 紫杉醇及其代谢产物的线性关系考察结果

Tab 2 Evaluation of the linearity for paclitaxel and its metabolites

待测化合物	内标	线性范围 / (ng · mL ⁻¹)	回归方程	r
紫杉醇	¹³ C ₆ -紫杉醇 (40 ng · mL ⁻¹)	0.05 ~ 100	Y = 0.0454X + 0.0321	0.9992
		100 ~ 10 000	Y = 0.0498X - 1.9098	0.9987
3'-p-羟基紫杉醇	6α-羟基紫杉醇-d ₅ (400 ng · mL ⁻¹)	0.05 ~ 100	Y = 0.0248X + 0.0220	0.9990
6α-羟基紫杉醇	6α-羟基紫杉醇-d ₅ (400 ng · mL ⁻¹)	0.1 ~ 100	Y = 0.0087X + 0.0058	0.9995
		100 ~ 10 000	Y = 0.0099X - 1.2681	0.9983
6α, 3'-p-二羟基紫杉醇	6α-羟基紫杉醇-d ₅ (400 ng · mL ⁻¹)	0.2 ~ 100	Y = 0.0040X + 0.0018	0.9998
7-表紫杉醇	¹³ C ₆ -紫杉醇 (40 ng · mL ⁻¹)	0.1 ~ 100	Y = 0.0464X + 0.0316	0.9994
		100 ~ 10 000	Y = 0.0376X - 1.5897	0.9987

表 3 准确度与精密度考察结果

Tab 3 Evaluation of accuracy and precision

待测化合物	理论浓度 / (ng · mL ⁻¹)	批内 (n = 6)		批间 (n = 18)		待测化合物	理论浓度 / (ng · mL ⁻¹)	批内 (n = 6)		批间 (n = 18)	
		准确 度 / %	精密度 RSD / %	准确 度 / %	精密度 RSD / %			准确 度 / %	精密度 RSD / %	准确 度 / %	精密度 RSD / %
紫杉醇	0.1	100.9	7.1	97.8	10.8	6α-羟基紫杉醇	0.1	113.2	7.5	105.6	9.5
	2.5	104.8	3.2	100.8	4.4		2.5	102.0	3.0	97.6	5.0
	100	93.5	2.3	92.9	5.2		100	93.8	2.9	93.8	5.1
	200	101.8	4.3	102.9	4.9		200	103.7	2.3	105.4	4.4
	1000	113.8	3.4	106.4	7.8		1000	109.5	3.4	106.0	6.0
	10 000	103.8	4.6	99.7	5.3		10 000	105.3	5.6	100.9	5.2
3'-p-羟基紫杉醇	0.1	114.7	4.7	105.5	9.4	7-表紫杉醇	0.1	108.7	12.7	104.6	8.4
	2.5	102.1	3.7	99.0	3.8		2.5	103.2	3.2	97.4	6.2
	100	100.9	3.5	98.6	4.6		100	105.5	3.7	98.2	8.2
6α, 3'-p-二羟基紫杉醇	1	109.4	9.3	102.6	10.7		200	100.9	2.7	101.7	4.1
	2.5	102.1	7.2	96.1	6.8		1000	112.0	3.7	105.0	7.8
	100	103.8	1.6	102.8	6.4		10 000	102.8	5.1	98.8	5.9

3.2 方法应用

共纳入行 PIPAC 治疗的 8 名腹膜癌患者。图 3 展示了 8 名患者经 PIPAC 给药后体内紫杉醇及其代谢产物的平均血药浓度-时间曲线。从药时曲线图可知,本研究开发的 UPLC-MS/MS 法灵敏度高,线性范围宽,能够测定紫杉醇及其代谢产物在采样期间的血药浓度,满足实际临床药动力学研究需求。紫杉醇及其代谢产物的药动力学参数见表 5。在

基质效应分别在 95.9% ~ 103.1%、92.6% ~ 96.7%、86.1% ~ 105.4%、91.9% ~ 94.9、95.4% ~ 104.8%,内标 ¹³C₆-紫杉醇、6α-羟基紫杉醇-d₅ 的基质效应分别为 (99.3±7.0) % 和 (97.5±6.3) %。采用 HybridSPE-Plus 磷脂去除 96 孔板作为样本预处理方法,各分析物均无明显的基质效应,而文献报道的蛋白质沉淀法由于不能有效去除干扰成分,紫杉醇及其代谢物存在明显的基质抑制现象(基质效应在 60% ~ 80%)^[14]。

3.1.6 稳定性考察 6α, 3'-p-二羟基紫杉醇和 7-表紫杉醇的稳定性考察结果见表 4。结果显示,6α, 3'-p-二羟基紫杉醇和 7-表紫杉醇的稳定性 RSD 均在 0.20% ~ 10.7%,满足生物样品分析测试的要求(见表 4)。

患者体内,6α, 3'-p-二羟基紫杉醇和 6α-羟基紫杉醇的浓度相对较高,两者的 AUC_{0-inf} 分别为紫杉醇的 20.2% 和 12.7%。相反,3'-p-羟基紫杉醇和 7-表紫杉醇的浓度相对较低,两者的 AUC_{0-inf} 分别为紫杉醇的 4.5% 和 1.5%。紫杉醇与其代谢产物的半衰期较为接近,在 8 ~ 11 h 内,这与文献报道的紫杉醇经静脉注射给药后的药动力学结果相一致^[23]。

4 讨论

表 4 6 α , 3'-*p*-二羟基紫杉醇和 7-表紫杉醇的稳定性考察结果 ($n = 3$)
Tab 4 Stability of 6 α , 3'-*p*-dihydroxypaclitaxel and 7-epipaclitaxel ($n = 3$)

待测化合物	理论浓度 / ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	室温放置 4 h		反复冻融 3 次		80℃放置 30 d	
		准确度 /%	RSD/%	准确度 /%	RSD/%	准确度 /%	RSD/%
6 α , 3'- <i>p</i> -二羟基紫杉醇	1	98.8	4.4	103.0	6.3	91.3	2.8
	2.5	91.0	1.6	97.3	2.7	105.4	1.3
	100	99.6	2.1	93.5	8.6	94.1	0.20
7-表紫杉醇	0.1	88.9	2.9	98.2	1.6	102.2	10.1
	100	93.5	10.7	92.4	0.4	97.1	1.5
	10000	97.6	1.2	98.6	2.1	95.5	2.3

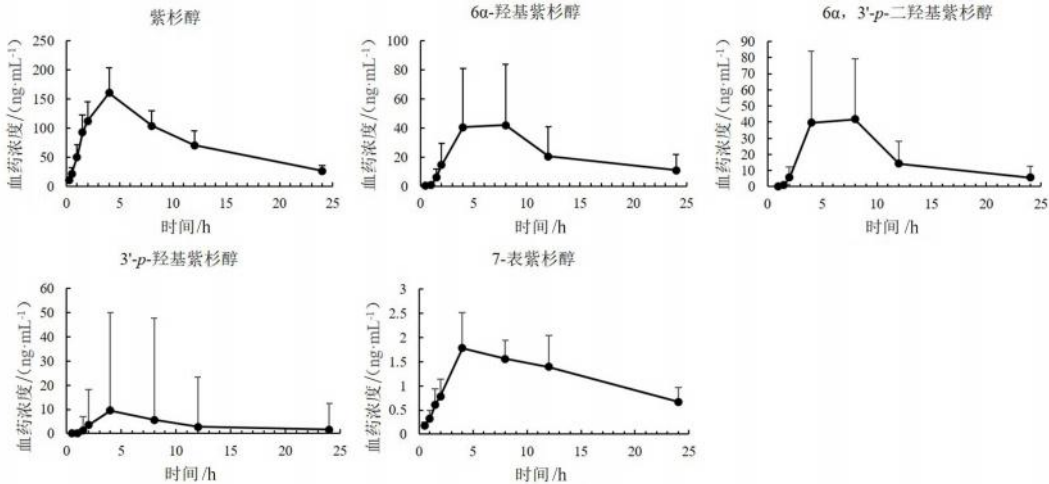


图 3 腹膜癌患者经 PIPAC 治疗用药后血浆中紫杉醇及其代谢产物的平均血药浓度 - 时间曲线图
Fig 3 Plasma concentration-time curves of paclitaxel and its metabolites in patients with peritoneal cancer after the PIPAC administration

表 5 紫杉醇及其代谢物的药动学参数 ($\bar{x} \pm s$)
Tab 5 Pharmacokinetic parameters of paclitaxel and its metabolites ($\bar{x} \pm s$)

药物	$AUC_{0 \sim 24\text{h}} / (\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1})$	$AUC_{0 \sim \text{inf}} / (\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1})$	$C_{\text{max}} / (\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	$t_{\text{max}} / \text{h}$	$t_{1/2} / \text{h}$
紫杉醇	1846.18 ± 435.89	2177.01 ± 499.61	160.74 ± 43.60	3.75 ± 0.71	8.36 ± 1.70
7-表紫杉醇	28.26 ± 8.50	33.44 ± 13.46	1.94 ± 0.62	7.0 ± 3.55	8.37 ± 1.06
3'- <i>p</i> -羟基紫杉醇	87.47 ± 36.37	97.07 ± 39.65	9.70 ± 6.97	5.0 ± 1.85	9.75 ± 3.53
6 α -羟基紫杉醇	263.63 ± 137.05	277.51 ± 130.74	44.63 ± 41.44	5.0 ± 1.85	8.48 ± 5.57
6 α , 3'- <i>p</i> -二羟基紫杉醇	387.86 ± 305.38	439.29 ± 256.50	57.38 ± 48.69	6.0 ± 2.14	11.29 ± 10.78

本研究开发了一种快速、灵敏、准确和特异性强的 UPLC-MS/MS 方法用于人血浆样本内紫杉醇及其代谢产物 3'-*p*-羟基紫杉醇、6 α -羟基紫杉醇、6 α , 3'-*p*-二羟基紫杉醇和 7-表紫杉醇的浓度测定。为了实现紫杉醇及其代谢产物的灵敏检测,笔者将质量浓度为 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的各目标分析物的对照品工作溶液以 $20 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速注入质谱。在正离子模式下,分别对紫杉醇及其代谢产物进行一级质谱扫描,考察响应最高的分子离子峰。研究发现,各分析物的最佳分子离子峰均为 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 形式,而非传统的 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 形式,因此 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 被选择为各分析物的目标分子离子峰。通过监测选定的分子离子峰,在 $10 \sim 80 \text{ V}$ 内对各待测物的碎裂电压进行了优化。碎裂电压优化从 10 V 开始,先按照 5 V 的递增过程快速寻找可产生最大分子离子峰信号的潜在的碎裂电压范围,在此基础上按 2 V 变动程度确定最佳的碎裂电压。笔者发现

虽然不同分析物的化学结构比较相近,但各自最佳的碎裂电压存在较大差异,具体见“2.1.2”项下。在确定好碎裂电压后,我们对各待测物进行二级质谱扫描,通过设置不同的碰撞能 ($10 \sim 60 \text{ eV}$),记录不同碰撞能下响应最高的子离子,以此寻找各分析物最佳的碰撞能,发现各分析物最佳的碰撞能较为接近,大致在 30 eV 左右,这是因为监测的产物离子均来自相同酯键的断裂。

为了实现紫杉醇及其代谢产物的有效分离,并且尽可能节省分析时间,本研究以 10% 甲醇水溶液 (含 0.2% 甲酸) 和甲醇 (含 0.2% 甲酸) 为流动相,系统地考察了在不同流速 ($0.3 \sim 0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) 和梯度条件 (不同的有机相起始比例与有机相递增比例) 下紫杉醇及其代谢产物的分离情况。在考察的流速范围内,流速大小对化合物的分离效果影响不大,最后基于实验习惯选择了 $0.45 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 作为最终流速。有机相起始比例

的大小对于化合物的保留与分离至关重要,有机相起始比例过低(如 $< 30\%$)会使分析时间延长,有机相起始比例过高(如 $> 70\%$),难以实现化合物的完全分离。另外,梯度洗脱过程中,有机相递增比例的设置对于紫杉醇与 7-表紫杉醇的完全分离十分重要。经过一系列摸索,本研究最终确定的色谱条件在 2.5 min 内成功实现了紫杉醇及其代谢产物的完全分离。为了减少血浆样品中内源性物质对质谱可能造成的污染,我们通过切换阀将 0.75 ~ 2.0 min 之外的洗脱液直接导入废液。

文献报道的人血浆样本内紫杉醇代谢物如 3'-*p*-羟基紫杉醇和 6 α -羟基紫杉醇的 LLOQ 通常在 0.25 ~ 0.87 ng · mL⁻¹[7, 14, 18-20],本研究开发的分析方法的检测灵敏度更高,各分析物的最低定量限在 0.05 ~ 0.2 ng · mL⁻¹。极低的定量限能够满足紫杉醇代谢物的分析需求。同时,因紫杉醇及其代谢产物在血浆样本中的浓度未知,为尽可能实现血浆样本中不同浓度的目标分析物的准确测定,本研究通过构建高浓度和低浓度两条标准曲线,并结合不同的样本稀释策略,构建了极宽的浓度范围。与已有文献相比,本研究全面测定了紫杉醇的所有相关代谢产物,并显著缩短了样本分析时间,能够满足高通量样本分析的需求。

本研究中的血浆样本处理方法采用了 HybridSPE-Plus 磷脂去除 96 孔板,该技术是一种基于固相萃取的样品前处理方法,可同时实现去除血浆样品中的蛋白质与磷脂。HybridSPE-Plus 板内填料含有锆离子修饰的硅胶(Zr-Silica),可特异性与磷脂分子中的磷酸基团形成配位键,从而选择性吸附磷脂。使用该技术可消除磷脂导致的基质效应如基质抑制现象,从而可提高方法的精密度和准确性。

PIPAC 治疗腹膜癌患者的药动学研究显示,紫杉醇的一级代谢产物 6 α -羟基紫杉醇和二级代谢产物 6 α , 3'-*p*-二羟基紫杉醇为其体内的主要代谢物。此外,本研究发现 7-表紫杉醇的体内浓度极低, $C_{\max}$ 约为 2 ng · mL⁻¹,表明紫杉醇仅有极少量经差向异构化转化为 7-表紫杉醇。鉴于紫杉醇代谢产物的体内浓度均显著低于紫杉醇原形药物,可推测紫杉醇通过 PIPAC 给药后,在经腹膜吸收进入肝脏的过程中未发生显著的肝脏首过效应。此外,由于紫杉醇代谢产物基本是低活性和低毒性产物,且代谢物体内浓度都远低于紫杉醇,因此可以推测紫杉醇经 PIPAC 给药在体内的药效和毒性主要取决于原药本身。

综上所述,本研究成功构建了 UPLC-MS/MS 同时测定紫杉醇及其 4 种代谢产物的分析方法。该方法为紫杉醇的临床药动学研究及体内代谢转化特征分析提供了有力的分析手段。

参考文献

- [1] Hendrikx JJ, Rosing H, Schinkel AH, et al. Combined quantification of paclitaxel, docetaxel and ritonavir in human feces and urine using LC-MS/MS [J]. Biomed Chromatogr, 2014, 28 (2): 302-310.
- [2] Mortier KA, Renard V, Verstraete AG, et al. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for the quantification of docetaxel and paclitaxel in human plasma and oral fluid [J]. Anal Chem, 2005, 77 (14): 4677-4683.
- [3] Wang TH, Wang HS, Soong YK. Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together [J]. Cancer, 2000, 88 (11): 2619-2628.
- [4] Stage TB, Bergmann TK, Kroetz DL. Clinical pharmacokinetics of paclitaxel monotherapy: an updated literature review [J]. Clin Pharmacokinet, 2018, 57 (1): 7-19.
- [5] Zhang SQ, Song YN, He XH, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of paclitaxel in rat plasma after intravenous administration of poly (L-glutamic acid) -alanine-paclitaxel conjugate [J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 51 (5): 1169-1174.
- [6] Barbuti AM, Chen ZS. Paclitaxel through the ages of anticancer therapy: exploring its role in chemoresistance and radiation therapy [J]. Cancers, 2015, 7 (4): 2360-2371.
- [7] Green H, Vretenbrant K, Norlander B, et al. Measurement of paclitaxel and its metabolites in human plasma using liquid chromatography/ion trap mass spectrometry with a sonic spray ionization interface [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2006, 20 (14): 2183-2189.
- [8] Tong XY, Zhou JP, Tan Y. Liquid chromatography/tandem triple-quadrupole mass spectrometry for determination of paclitaxel in rat tissues [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2006, 20 (12): 1905-1912.
- [9] Baati T, Schembri T, Villard C, et al. An ultrasensitive LC-MS/MS method with liquid phase extraction to determine paclitaxel in both cell culture medium and lysate promising quantification of drug nanocarriers release in vitro [J]. J Pharm Biomed Anal, 2015, 115: 300-306.
- [10] Gardner ER, Dahut W, Figg WD. Quantitative determination of total and unbound paclitaxel in human plasma following Abraxane treatment [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008, 862 (1-2): 213-218.
- [11] Wang TT, Ma WX, Sun YT, et al. Ultra-sensitive assay for paclitaxel in intracellular compartments of A549 cells using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2013, 912: 93-97.
- [12] 黄鑫, 汤维维, 江振洲, 等. LC-MS/MS 法测定 Beagle 犬血浆中紫杉醇及其药代动力学研究 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33 (11): 1868-1872.
- [13] Lee HH, Hong A, Cho Y, et al. Structural characterization of anticancer drug paclitaxel and its metabolites using ion mobility mass spectrometry and tandem mass spectrometry [J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2016, 27 (2): 329-338.

- [14] Yamaguchi H, Fujikawa A, Ito H, et al. Quantitative determination of paclitaxel and its metabolites, 6 α -hydroxypaclitaxel and *p*-3'-hydroxypaclitaxel, in human plasma using column-switching liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. Biomed Chromatogr, 2013, 27 (4): 539-544.
- [15] Hendriks JJ, Hillebrand MJ, Thijssen B, et al. A sensitive combined assay for the quantification of paclitaxel, docetaxel and ritonavir in human plasma using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2011, 879 (28): 2984-2990.
- [16] Tian J, Stella VJ. Degradation of paclitaxel and related compounds in aqueous solutions I: epimerization [J]. J Pharm Sci, 2008, 97 (3): 1224-1235.
- [17] Li P, Albrecht BJ, Yan X, et al. A rapid analytical method for the quantification of paclitaxel in rat plasma and brain tissue by high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2013, 27 (19): 2127-2134.
- [18] Zhang W, Dutschman GE, Li X, et al. Quantitation of paclitaxel and its two major metabolites using a liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2011, 879 (22): 2018-2022.
- [19] Alexander MS, Kiser MM, Culley T, et al. Measurement of paclitaxel in biological matrices: high-throughput liquid chromatographic-tandem mass spectrometric quantification of paclitaxel and metabolites in human and dog plasma [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2003, 785 (2): 253-261.
- [20] Vainchtein LD, Thijssen B, Stokvis E, et al. A simple and sensitive assay for the quantitative analysis of paclitaxel and metabolites in human plasma using liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. Biomed Chromatogr, 2006, 20 (1): 139-148.
- [21] Zhang SQ, Chen GH. Determination of paclitaxel in human plasma by UPLC-MS-MS [J]. J Chromatogr Sci, 2008, 46 (3): 220-224.
- [22] 许秋霞, 庄奕筠, 高雅莉, 等. 反相高效液相色谱法测定人血浆中紫杉醇浓度 [J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34 (4): 464-466.
- [23] Huizing M, Sparreboom A, Rosing H, et al. Quantification of paclitaxel metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr B Biomed Appl, 1995, 674 (2): 261-268.

(收稿日期: 2024-12-11; 修回日期: 2025-04-03)

基于指纹图谱和网络药理学预测牛黄解毒胶囊质量标志物

陈琪^{1, 2}, 李欣茹^{1, 2}, 冯丽³, 刘兴鹏^{1, 2}, 喻懋国⁴, 林雪⁴, 刘勋^{1, 2*} (1. 贵州省食品药品检验所, 贵阳 550081; 2. 贵州省市场监督管理局中药民族药质量控制与评价重点实验室, 贵阳 550081; 3. 贵州中医药大学第二附属医院, 贵阳 550001; 4. 贵州济生制药有限公司, 贵阳 550201)

摘要: **目的** 基于高效液相色谱法建立牛黄解毒胶囊指纹图谱, 结合网络药理学预测分析质量标志物。**方法** 建立牛黄解毒胶囊指纹图谱, 指认并归属共有峰, 通过相似度评价考察 15 批样品间的差异性; 通过网络药理学构建“成分-靶点-通路”网络图, 预测其质量标志物。**结果** 共指认出 18 个共有峰, 其中 1、3 (大黄酸-8-*O*- β -D-葡萄糖苷)、5、12 (大黄酸)、15 (大黄素)、17 (大黄酚)、18 号峰来源于大黄; 2、4、6 (黄芩苷)、7 (千层纸素 A-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷)、8 (汉黄芩苷)、9 (黄芩素)、11 (汉黄芩素)、13、14 号峰来源于黄芩; 10 (甘草酸)、16 号峰来源于甘草。15 批次样品的相似度均 > 0.980, 表明 15 批样品间相似度良好。网络药理学预测汉黄芩素、黄芩素、大黄酚、大黄酸为牛黄解毒胶囊的潜在质量标志物, 通过 PI3K/AKT 信号通路、MAPK 信号通路等发挥功效。**结论** 本研究建立的 HPLC 指纹图谱方法重复性好, 稳定性好, 操作简便; 结合网络药理学预测 4 个化学成分为牛黄解毒胶囊的潜在质量标志物, 其中大黄酸为现行标准的质量控制成分之一; 本研究为拓展牛黄解毒制剂质量标志物的预测提供更多理论基础。

关键词: 牛黄解毒胶囊; 指纹图谱; 网络药理学; 质量标志物

中图分类号: R284.1, R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)12-3592-08
doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.019

基金项目: 贵州省中医药管理局中医药、民族医药基金资助项目 (No.QZYY-2025-069)。

作者简介: 陈琪, 女, 中级工程师, 主要从事中药检验检测方面的工作, email: 1316843742@qq.com * **通信作者:** 刘勋, 男, 高级工程师, 主要从事中药检验检测方面的工作, email: 448175666@qq.com

Prediction of quality markers for Niu Huang Jiedu capsules based on fingerprint chromatography and network pharmacology

CHEN Qi^{1,2}, LI Xinru^{1,2}, FENG Li³, LIU Xingpeng^{1,2}, YU Maoguo⁴, LIN Xue⁴, LIU Xun^{1,2*} (1. Guizhou Food and Drug Inspection Institute, Guiyang 550081; 2. Guizhou Key Laboratory for Quality Control and Evaluation of Traditional Chinese Medicine and Ethnomedicine, Guiyang 550081; 3. The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001; 4. Guizhou Jisheng Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550201)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint of Niu Huang Jiedu capsules and predict the potential quality markers with network pharmacology. **Methods** The HPLC fingerprint of Niu Huang Jiedu capsules was developed, and common peaks were identified and assigned. The similarity among 15 batches of samples was evaluated by fingerprint similarity analysis. Network pharmacology was used to establish a compound-target-pathway network to predict the quality markers. **Results** Totally 18 common peaks were identified. Peaks 1, 3 (rhein-8-*O*- β -D-glucopyranoside), 5, 12 (rhein), 15 (emodin), 17 (chrysophanol), and 18 were derived from *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf.; Peaks 2, 4, 6 (baicalin), 7 (oroxylin A-7-*O*- β -D-glucuronide), 8 (wogonoside), 9 (baicalein), 11 (wogonin), 13, and 14 originated from *Scutellaria baicalensis* Georgi; Peaks 10 (glycyrrhizic acid) and 16 were from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.. The similarity of the 15 batches was all above 0.980, indicating good inter-batch consistency. Network pharmacology analysis predicted wogonin, baicalein, chrysophanol and rhein to be the potential quality markers of Niu Huang Jiedu capsules, acting mainly through the PI3K/AKT signaling pathway and MAPK signaling pathway. **Conclusion** The established HPLC fingerprint method is reproducible, stable, and easily operable. Combined with network pharmacology, it identified 4 chemical components as potential quality markers (Q-markers) for Niu Huang Jiedu capsules. This study provides a broader theoretical foundation for predicting Q-markers in Niu Huang Jiedu formulations.

Key words: Niu Huang Jiedu capsule; fingerprint chromatogram; network pharmacology; quality marker

牛黄解毒胶囊源于经典名方“牛黄解毒丸”，在保留原方疗效的基础上提高了药物稳定性，临床主要用于治疗由火热内盛而引起的上呼吸道疾病（咽喉肿痛）、口腔疾病（牙龈肿痛、口舌生疮）、眼部疾病（目赤肿痛）^[1-3]等。牛黄解毒胶囊收载于2020年版《中国药典》一部^[4]。由人工牛黄、雄黄、石膏、大黄、黄芩、桔梗、冰片和甘草八味药组成，其中人工牛黄由人工提取牛胆汁制得，主要成分有胆汁色素类、胆汁酸类，具有清热解毒、化痰定惊的功效^[5]。雄黄的主要成分为二硫化二砷（As₂S₂），可祛痰解毒，多用于防治瘟疫^[6]。石膏为硫酸盐类矿物药，主要成分为含水硫酸钙（CaSO₄·2H₂O），能清热泻火、止咳宣肺^[7]。大黄的主要活性成分芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚等，具有抗炎、抗菌、抗氧化等疗效^[8]。黄芩的主要活性成分为黄酮类，包括黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素等，可解热镇痛、抗菌、抗炎^[9]。桔梗的主要活性

成分桔梗皂苷可利咽镇咳、祛痰化脓^[10]。冰片的主要活性成分为挥发性物质龙脑，可镇静镇痛、舒张血管^[11]。甘草的主要活性成分为三萜类、黄酮类，包括甘草酸、甘草次酸、甘草苷，具有抗炎、抗病毒等药理作用^[12]。八味中药共同使用，旨在通过抗炎、抗菌、解热镇痛、祛痰泻火等多方面作用达到清热解毒的目的。

目前，对于牛黄解毒胶囊的质量标准仅有薄层鉴别及黄芩苷的含量测定^[4]。现有的标准已无法对其进行全面系统的评价，现有文献报道大多集中在片剂、丸剂的质量标准、临床应用研究、成分分析等方面^[13-15]，对于牛黄解毒胶囊的质量标准研究局限于胆红素和黄芩苷的含量测定^[16-17]，亟待进一步完善。

中药复方制剂通过多味药材、多种有效成分共同发挥作用，其作用靶点、作用途径复杂多样，依据单一或几个成分进行评判难以反映其整体质

量^[18]。刘昌孝院士^[19]于2016年提出质量标志物概念,从有效性、安全性、稳定性等多方面寻找活性化学成分,具有可测性、传递性的特点。中药指纹图谱是目前较为全面表征中药化学成分的一种重要方法,具有整体性、一致性和稳定性^[20]。网络药理学可通过构建“药物-成分-靶点-通路”多维网络图,分析中药多成分的协同作用,为建立指纹图谱提供理论依据^[21]。因此,本研究通过高效液相色谱法(HPLC)构建指纹图谱研究牛黄解毒胶囊中从饮片传递到复方制剂的有效成分,通过网络药理学方法预测发挥药效的化学成分,进一步佐证质量控制指标是否合理,为牛黄解毒胶囊的质量稳定性和全面性提供理论依据。

1 材料

1.1 试药

人工牛黄(浙江国光生物制药股份有限公司,批号:230102);雄黄粉(贵阳道生健康产业有限公司,批号:24090201);石膏、大黄、黄芩、桔梗、甘草(安徽家和中药科技股份有限公司,批号依次为:241001、240701、231001、230701、230301);冰片(四川青神康华制药有限公司,批号:241213),经贵州省食品药品检验所中药(民族药)室正高级工程师刘兴鹏鉴定为正品。

牛黄解毒胶囊均由贵州济生制药有限公司提供,共15批,编号为S1~S15(规格:0.3 g/粒,批号分别为20250203~20250205、20250301~20250312)。

对照品大黄酸(批号:110757-202308,纯度:95.0%)、大黄素(批号:110756-202414,纯度:98.5%)、大黄酚(批号:110796-202423,纯度:99.8%)、黄芩苷(批号:110715-202223,纯度:97.2%)、汉黄芩苷(批号:112002-202303,纯度:98.5%)、黄芩素(批号:111595-202309,纯度:98.6%)、汉黄芩素(批号:111514-202207,纯度:100%)(中国食品药品检定研究院);大黄酸-8-*O*- β -D-葡萄糖苷(批号:34298-86-7,纯度:99.4%)、千层纸素 A-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷(批号:36948-76-2,纯度:98.4%)、甘草酸(批号:1405-86-3,纯度:99.4%)(上海诗丹德标准技术服务有限公司)。乙腈(色谱纯,德国Merck公司),磷酸、乙醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司),纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

1.2 仪器

Thermo UHPLC 3000 高效液相色谱仪(美国Thermo Fisher公司),MR 204 万分之一电子天平、ML-204T 十万分之一电子天平[梅特勒托利

多科技(中国)有限公司],JM-30 D-40 型超声波清洗器(深圳市洁盟清洗设备有限公司)。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

取牛黄解毒胶囊内容物,研细,精密称取0.5 g,置具塞锥形瓶中,精密加入乙醇10 mL,称定重量,超声(40 W, 250 Hz) 30 min,过滤,水浴蒸干,用乙醇溶解,定容至1 mL量瓶中,过滤,取续滤液,即得。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取大黄酸、大黄素、大黄酚、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、大黄酸-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、千层纸素 A-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷、甘草酸对照品适量,分别加甲醇制成5 mg/mL的溶液,即得。

2.3 单味药材样品溶液的制备

取人工牛黄、雄黄、石膏、大黄、黄芩、桔梗、甘草等饮片,分别按“2.1”项下方法制备,即得。

2.4 色谱条件

色谱柱为X-bridge C18 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)柱,流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~20 min, 95%~75%A; 20~35 min, 75%~60%A; 35~45 min, 60%~50%A; 45~60 min, 50%~5%A; 60~70 min, 5%~95%A; 70~80 min, 95%A),柱温为30 $^{\circ}$ C,进样量为10 μ L,波长为278 nm^[4]。

2.5 指纹图谱研究

2.5.1 精密度试验 取同一牛黄解毒胶囊制备供试品溶液(编号为S1),连续进样测定6次。以黄芩苷峰为参照峰,计算得各色谱峰的相对保留时间RSD<0.50%,表明仪器精密度良好。

2.5.2 稳定性试验 取同一牛黄解毒胶囊制备供试品溶液(编号为S1),于0、3、6、9、12、18 h间隔进样测定。以黄芩苷峰为参照峰,计算得各色谱峰的相对保留时间RSD<0.50%,表明供试品溶液在18 h内稳定性良好。

2.5.3 重复性试验 取同一牛黄解毒胶囊(编号为S1)制备供试品溶液6份,按“2.4”项下方法,进样测定。以黄芩苷峰为参照峰,计算得各色谱峰的相对保留时间RSD<0.50%,表明该方法重复性良好。

2.5.4 指纹图谱建立及相似度评价 取15批牛黄解毒胶囊,按“2.1”项下方法制备供试品溶液,进样测定,将所有图谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)”,以S1号样品的色谱图为参照图谱,时间窗宽度设为0.1 min,采用平均数位法进行多点校正和全峰匹配模式比较,共

标记 18 个共有峰, 结果见图 1。15 批样品的相似度评价结果见表 1, 15 批样品相似度均 > 0.980, 表明各批次样品之间相似度良好。

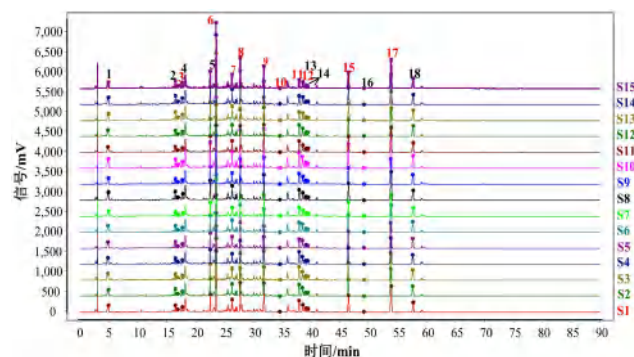


图 1 15 批牛黄解毒胶囊样品指纹图谱

Fig 1 Fingerprint chromatograms of 15 batches of Niu Huang Jiedu capsules

表 1 15 批牛黄解毒胶囊样品相似度评价结果

Tab 1 Similarity of 15 batches of Niu Huang Jiedu capsules

编号	相似度	编号	相似度
S1	1.000	S9	0.996
S2	0.998	S10	0.987
S3	0.996	S11	0.993
S4	0.996	S12	0.992
S5	0.996	S13	0.993
S6	0.995	S14	0.993
S7	0.989	S15	0.998
S8	0.994		

2.5.5 共有峰指认与归属 对比供试品溶液、对照药材溶液、对照品溶液, 以保留时间及紫外光谱均相同视为同一峰, 共指认 10 个共有峰, 结果见图 2。其中 3 号峰为大黄酸-8-*O*- β -D-葡萄糖苷, 6 号峰为黄芩苷, 7 号峰为千层纸素 A-7-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷, 8 号峰为汉黄芩苷, 9 号峰为黄芩素, 10 号峰为甘草酸, 11 号峰为汉黄芩素, 12 号峰为大黄酸, 15 号峰为大黄素, 17 号峰为大黄酚。

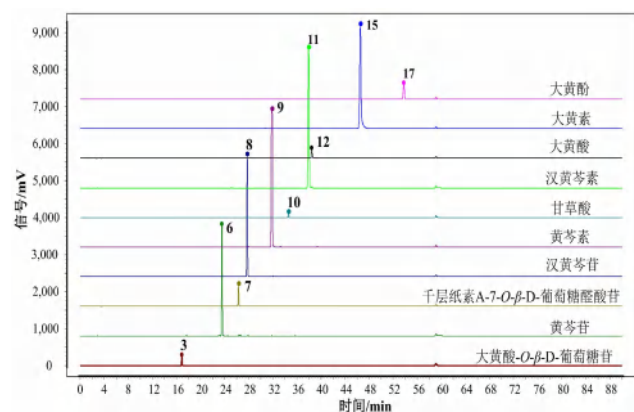


图 2 10 个共有峰的对照品图谱

Fig 2 Chromatogram of the reference standard indicating 10 common peaks

通过比对供试品溶液、单味药材样品溶液, 结果显示 1、3、5、12、15、17、18 号峰来源于大黄, 2、4、6、7、8、9、11、13、14 号峰来源于黄芩, 10、16 号峰来源于甘草, 结果见图 3。人工牛黄、雄黄、石膏、桔梗和冰片的色谱峰未在指纹图谱中体现。

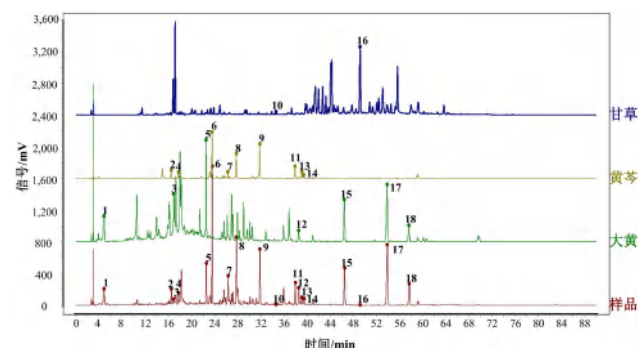


图 3 大黄、黄芩、甘草药材特征峰归属

Fig 3 Characteristic peak assignments of *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf., *Scutellaria baicalensis* Georgi and *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.

2.6 牛黄解毒胶囊网络药理学预测分析

2.6.1 牛黄解毒胶囊成分靶点收集 基于指纹图谱中共有峰归属显示, 共 10 个化学成分能够实现从饮片到制剂的传递。本研究选取上述 10 个成分及冰片的主要活性成分龙脑进行预测, 在 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获得简化分子线性输入规范 (SMILES), 随后导入 SwissTargetPrediction 数据库 (<https://www.swisstargetprediction.ch/>) 获取对应靶点, 除去重复值, 得到相关靶点。将药材、成分、靶点导入 Cytoscape 3.10.3 软件, 构建药材-成分-靶点网络图, 其中汉黄芩素、黄芩素的度值均大于 100, 大黄酚、大黄素的度值均大于 50, 大黄酸的度值为 49, 这 5 个化合物对应的靶点较多影响较大。

2.6.2 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络构建

将“2.6.1”项下筛选得到的 255 个作用靶点导入 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>), 构建 PPI 网络图, 物种设置为“Homo sapiens”, 蛋白交互参数评分值设为 > 0.9, 隐藏 PPI 网络中离散的节点, 其他参数设置不变, 获得 PPI 网络。将结果保存为 tsv 格式文件, 导入 Cytoscape 3.10.3 软件重构蛋白互作网络, 网络拓扑属性分析筛选核心靶点选取在中介中心性、接近中心性、度中心性, 3 个拓扑参数均大于中位数且度值 > 10 作为核心靶点, 共筛选到 14 个核心靶点, 结果见图 4。按颜色从深到浅、形状从大到小代表其度值从高到低, 主要有原癌基因酪氨酸蛋白激酶 SRC (SRC)、信号转导及转录激活因子 3 (STAT3)、热休克蛋白 90a 家族 A 类成员 1 (HSP90AA1)、磷酸肌醇 3-激酶调节亚基 1 (PIK3R1) 等核心靶点。

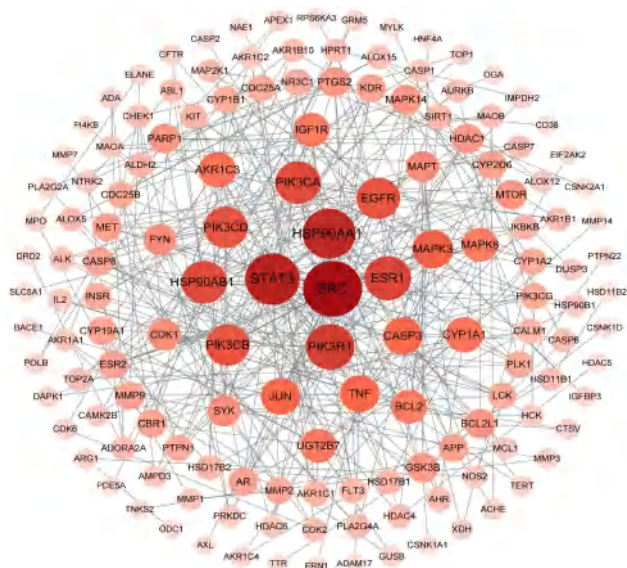


图 4 255 个靶蛋白的 PPI 网络图
Fig 4 PPI network of 255 target proteins

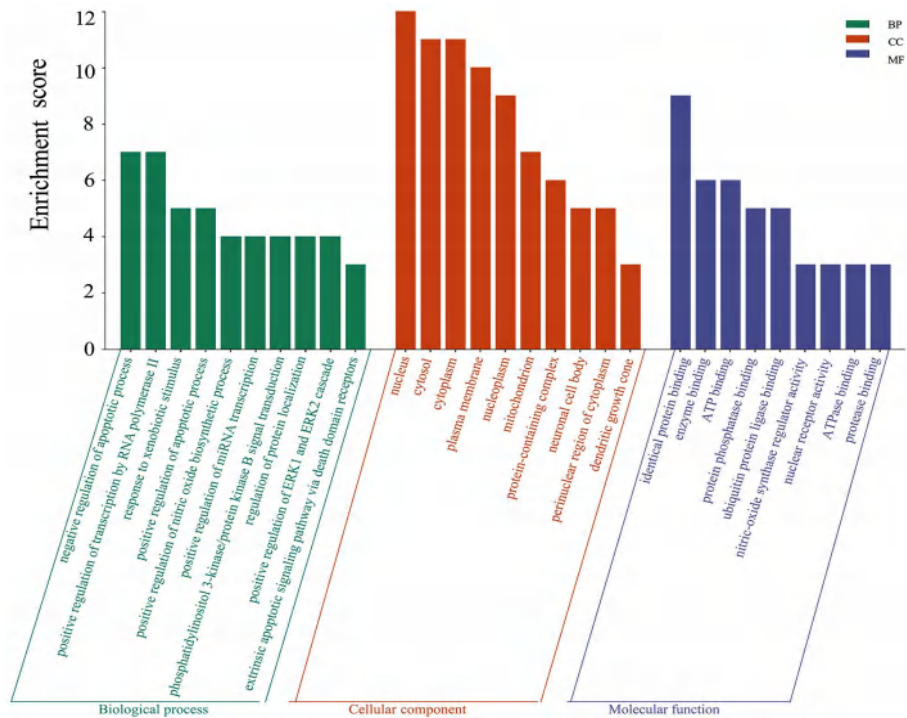


图 5 14 个核心靶点的 GO 富集分析图
Fig 5 GO enrichment analysis for the 14 core targets

KEGG 富集分析共测得 103 条信号通路，选取 15 条与抗炎相关的通路在微生信网站上做富集分析图，结果见图 6，其通路主要包括 IL-17 信号通路、C 型凝集素受体信号通路、Th17 细胞分化等。

2.6.4 成分-靶点-通路构建 将“2.5.5”项下指认得到的化学成分，“2.6.2”项下筛选得到的核心靶点，“2.6.3”项下筛选得到的 KEGG 通路导入 Cytoscape 3.10.3 软件中构建成分-靶点-通路网络图，结果见图 7。

汉黄芩素、黄芩素、大黄酚、大黄的度

2.6.3 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析

将“2.6.1”项下筛选得到的 14 个核心靶点导入 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov>) 进行基因本体 (GO) 功能富集分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。以 $P < 0.01$ 和伪发现率 (FDR) < 0.05 对 GO 分析及 KEGG 分析获得条目，在微生信网站上绘制富集分析图。

通过 GO 分析获得条目 46 个，其中生物过程 (BP) 23 个条目，细胞组成 (CC) 14 个条目，分子功能 (MF) 9 个条目。BP 和 CC 分别取前 10 个条目，MF 取 9 个条目，在微生信网站上做富集分析图，结果见图 5，其中 BP 主要富集在凋亡过程的负调控、RNA 聚合酶 II 对转录的正向调控、对外源刺激的反应等。CC 主要富集在细胞核、胞质溶胶、细胞质等。MF 主要富集在同源蛋白结合、酶结合、ATP 结合等。

值较高，靶点蛋白中 MAPK3、JUN、MAPK8、TNF、PIKER1 的连接度较高，信号通路中 IL-17 信号通路、细胞凋亡、NOD 样受体信号通路、C 型凝集素受体信号通路、Th17 细胞分化、TNF 信号通路、MAPK 信号通路、PI3K/AKT 信号通路度值较高。

2.7 牛黄解毒胶囊 Q-Marker 预测和分析

本研究基于质量标志物“五原则”，对牛黄解毒胶囊的 Q-Marker 进行系统分析与预测。首先，基于可测性及质量传递与溯源原则，本研究

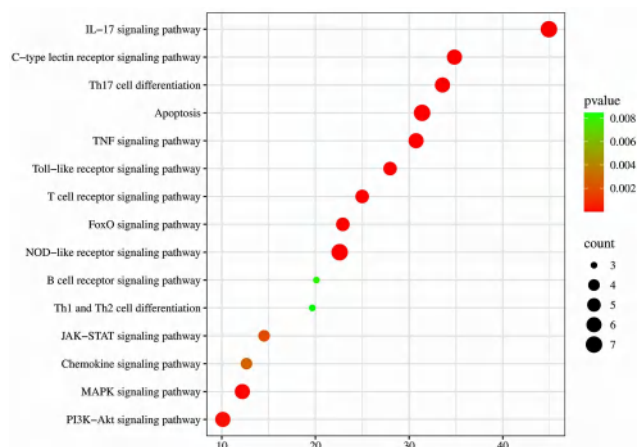


图 6 14 个核心靶点的 KEGG 富集分析图

Fig 6 KEGG enrichment analysis for the 14 core targets

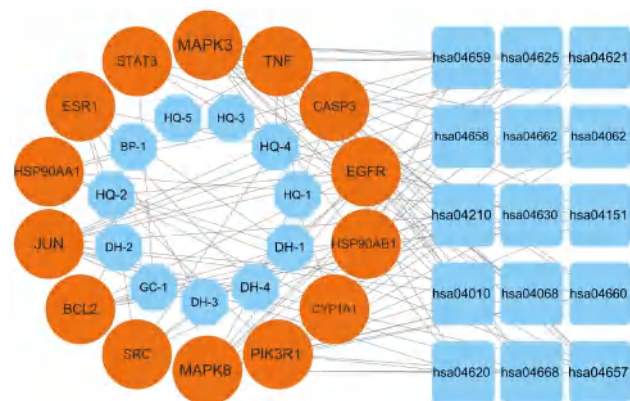


图 7 牛黄解毒胶囊成分-靶点-通路网络图

Fig 7 Niu Huang Jie Du capsules component-target-pathway network diagram

注 (Note): HQ-1. 汉黄芩苷 (wogonoside); HQ-2. 汉黄芩素 (wogonin); HQ-3. 黄芩苷 (baicalin); HQ-4. 黄芩素 (baicalein); HQ-5. 千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷 (oroxylin A-7-O-β-D-glucuronide); DH-1. 大黄酚 (chrysophanol); DH-2. 大黄素 (emodin); DH-3. 大黄酸-8-O-β-D-葡萄糖苷 (rhein-8-O-β-D-glucopyranoside); DH-4. 大黄酸 (rhein); GC-1. 甘草酸 (glycyrrhizic acid); BP-1. 龙脑 (borneol); hsa04657. IL-17 信号通路 (IL-17 signaling pathway); hsa04625. C 型凝集素受体信号通路 (C-type lectin receptor signaling pathway); hsa04659. Th17 细胞分化 (Th17 cell differentiation); hsa04210. 细胞凋亡 (apoptosis); hsa04668. TNF 信号通路 (TNF signaling pathway); hsa04620. Toll 样受体信号通路 (Toll-like receptor signaling pathway); hsa04660. T 细胞受体信号通路 (T cell receptor signaling pathway); hsa04068. FoxO 信号通路 (FoxO signaling pathway); hsa04621. NOD 样受体信号通路 (NOD-like receptor signaling pathway); hsa04662. B 细胞受体信号通路 (B cell receptor signaling pathway); hsa04658. Th1 和 Th2 细胞分化 (Th1 and Th2 cell differentiation); hsa04630. JAK-STAT 信号通路 (JAK-STAT signaling pathway); hsa04062. 趋化因子信号通路 (chemokine signaling pathway); hsa04010. MAPK 信号通路 (MAPK signaling pathway); hsa04151. PI3K-Akt 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway)。

建立的 HPLC 指纹图谱在 15 批牛黄解毒胶囊及相对应的药材 (大黄、黄芩、甘草) 中, 均检测出 18 个共有峰, 批相似度均 > 0.980, 这表明该

方法稳定性好, 重复性好, 且这些成分能从药材传递至制剂。其次, 基于成分特有性及复方配伍环境原则, 通过对照品指认的 10 个化学成分可明确归属为臣药大黄、黄芩、使药甘草。其中大黄特征性成分为蒽醌类 (大黄酚、大黄酸等), 黄芩特征性成分为黄酮类 (汉黄芩素、黄芩素等), 甘草则主要含有三萜皂苷类成分 (甘草酸)。这些成分均来源于牛黄解毒胶囊的核心药味, 共同体现了“清热解毒”的配伍性。最后, 基于成分有效性原则, 网络药理学及文献研究均表明, 核心成分汉黄芩素、黄芩素、大黄酸、大黄酚的抗炎抗菌机制与牛黄解毒胶囊的清热解毒功效高度相关。综上所述, 本研究提出将汉黄芩素、黄芩素、大黄酸、大黄酚作为牛黄解毒胶囊质量标志物。

3 讨论与结论

3.1 指纹图谱分析

目前关于牛黄解毒制剂的成分测定研究仍有限, 现有研究多采用 HPLC 法测定单一或少数成分, 如刁全平等^[22]通过 HPLC 同时测定牛黄解毒片中大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 4 种化合物的含量; 或通过指纹图谱指认少量特征峰, 如潘丽丽等^[23]通过 HPLC 指纹图谱检测牛黄解毒片研究归属了 9 个峰, 指认了黄芩苷、黄芩素、大黄素、芦荟大黄素 4 个成分。本研究建立的 HPLC 指纹图谱方法, 共归属了 18 个特征峰, 指认了 10 个成分, 该方法能同时涵盖臣药大黄、黄芩及使药甘草的特征信息, 操作简单, 结果稳定。

在该色谱条件下, 桔梗、人工牛黄、雄黄、石膏、冰片等药材未出现色谱峰, 推测其原因:

① 成分性质的差异: 桔梗的主要成分为皂苷类, 其紫外吸收较弱, 采用高效液相色谱-蒸发光散射检测器方法检测更适宜^[24]; 冰片的主要成分为挥发性物质, 采用气相色谱法检测更适宜^[25]。② 成分溶解性差异: 人工牛黄中的主要成分为胆酸类、雄黄的主要成分为无机金属硫化物、石膏的主要成分为硫酸钙, 均难溶于乙醇, 本研究的提取溶剂为乙醇, 故无相应的色谱峰出现^[26-27]。后续将继续增加对照品指认, 进一步优化指纹图谱条件以检测更多的成分特征峰, 同时将会继续研究桔梗、人工牛黄、雄黄、石膏、冰片等药材的检测方法, 进一步完善牛黄解毒胶囊的质量控制体系。

3.2 网络药理学分析

本文采用网络药理学方法, 基于成分-靶点-通路分析, 牛黄解毒胶囊的关键活性成分为汉黄

芩素、黄芩素、大黄酚、大黄酸,现对上述 4 个成分进行药代动力学评价:通过 TCMSP 数据库 (<https://www.tcmsp-e.com/>) 进行查询,汉黄芩素、黄芩素、大黄酸的口服生物利用度 (OB) > 30%,类药性 (DL) > 0.18;值得注意的是,大黄酚的 OB 值较低 (18.64),但 DL 值良好 (0.21),提示其仍具备一定的成药潜力。为进一步评估,笔者通过 SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) 平台进行补充分析,预测结果显示其胃肠道吸收为“高”,且符合里宾斯基五规则 (Lipinski's Rule of Five; 0 项违反),该结果提示大黄酚在体内具有良好的吸收特性,具备被利用并发挥药理作用的潜力。综上所述,4 个成分均具有良好的成药潜力,本研究将上述 4 个成分均保留为牛黄解毒胶囊的关键活性成分,用于后续的网络药理学分析。现代研究表明,上述 4 个成分有显著抗炎、抗菌作用。其中汉黄芩素在牙周炎、鼻咽癌等疾病中通过调节炎症信号发挥药效^[28-29];黄芩素在牙周炎、缺血性视网膜病中表现出抗炎、组织保护等药理作用^[30-31];大黄酚在慢性青光眼大鼠中发挥保护作用^[32];大黄酸对牙龈卟啉菌等牙周炎致病菌有显著抑菌作用^[33]。通过网络药理学所筛选出来的核心成分与牛黄解毒胶囊的药效具有关联性。

基于核心靶点分析,MAPK3 又名细胞外信号调节激酶 1 (extracellular signal-regulated kinase 1, ERK1),是 MAPK 信号通路中的核心组分,通过介导信号传递调节细胞生长、发育、分化,其在慢性萎缩性胃炎、溃疡性结肠炎、舌鳞癌中都有表达;JUN 属于 AP-1 转录因子家族,是 JNK、NF- κ B、NFAT 等多条信号通路的重要靶点,在炎症反应、细胞凋亡中起关键调控作用;MAPK8 又名 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK1),是 MAPK 信号传导途径的重要靶点,在细胞凋亡中发挥重要作用,参与多种炎症过程。TNF 编码的 TNF- α 蛋白是一种重要的促炎因子,由巨噬细胞、单核细胞和淋巴细胞等分泌,参与多种炎症过程。PIK3R1 可通过调控 PI3K/AKT 信号通路调节细胞代谢、增殖和迁移等方面,现研究主要集中在免疫与代谢疾病及癌症方面^[34-38]。

基于 KEGG 分析,C 型凝集素受体与 NOD 受体是模式识别受体,受体激活后可激活下游通路 NF- κ B、MAPK 及 Th17 细胞的分化,Th17 细胞分泌的 IL-17 通过结合 IL-17R 激活下游通路 NF- κ B、MAPK 信号通路。TNF 信号通路中,TNF- α 与 TNFR1 结合后,也可激活下游通路 NF- κ B、MAPK。NF- κ B、MAPK 信号通路为典型抗炎通路,在各种急性、慢性炎症中都起着至关重要的作用。同时,在 TNF 信

号通路中,TNF 与 TNFR1 结合后可通过 TRADD-TRAF2 激活 PI3K/AKT 信号通路。其中,TNF、MAPK 信号能直接诱导凋亡,PI3K/AKT、IL-17、NF- κ B 信号通路则需要调控抗凋亡因子等调节凋亡过程^[39]。由网络药理学预测的结果可得,其对应的高度值靶点及通路间以 NF- κ B、MAPK 为枢纽形成交叉调控网络,该结果为后续对牛黄解毒胶囊进行机制研究提供理论基础。

现代研究表明,在心肌缺血再灌注损伤大鼠模型中,汉黄芩素能下调 NF- κ B/MAPK 信号通路抑制炎症反应^[40];在过敏性鼻炎小鼠中,黄芩素能通过调节 NF- κ B/STAT3/ERK 信号通路减少炎症细胞聚集^[41]。在皮肤光老化大鼠中,大黄酸能通过抑制抗炎因子 TNF- α 、IL-1、IL-6 mRNA 的表达,可能通过 P38 MAPK 信号通路抑制皮肤炎症^[42]。大黄酸还可通过抑制 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 炎症小体缓解结肠炎症状^[43]。在脑出血大鼠模型中,大黄酚可通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路减少 IL-6、TNF- α 等炎症因子,从而抑制炎症反应^[44]。汉黄芩素、黄芩素、大黄酚、大黄酸等主要通过调控 MAPK、PI3K/AKT 信号通路,抑制 TNF- α 、IL-6 炎症因子的表达,发挥抗炎作用。与网络药理学预测结果一致。

3.3 结论

在现有的牛黄解毒胶囊质量标准中,大黄、黄芩、甘草三味药材仅以大黄酸、黄芩苷作为质控成分,难以客观反映整体药效物质基础,存在一定局限性。本研究基于 HPLC 指纹图谱方法结合网络药理学分析,并依据质量标志物五原则,提出该复方制剂的潜在核心质量标志物为汉黄芩素、黄芩素、大黄酚、大黄酸,上述成分可能通过调控 MAPK、PI3K/AKT 等关键信号通路干预炎症。

综上,本研究结果不仅为牛黄解毒胶囊的质量标准控制体系提供了科学依据,同时也为其临床适应证奠定了理论基础。未来研究可进一步结合体内外实验验证核心成分的药效机制,并探索复方中各成分的协同作用关系,以推动中药复方的现代化基础研究与临床应用。

参考文献

- [1] 邱维彬,张德放.牛黄解毒片与复方新诺明联合在治疗急性扁桃体炎中的应用[J].中医临床研究,2012,4(3): 85-86.
- [2] 贾文明,曹藏柱,张雯丽,等.牛黄解毒方治疗复发性口腔溃疡 172 例疗效观察[J].河北北方学院学报(自然科学版),2015,31(6): 80-81, 83.
- [3] 高素强,傅得兴,赵展荣.牛黄解毒片(丸或胶囊)的临床合理应用[J].中国全科医学,2007,10(12):

- 1002-1003.
- [4] 中国药典 2020 年版.一部[S]. 2020: 24-25, 696-697.
 - [5] 陈海, 王建. 牛黄主要活性成分及中枢系统药理作用研究进展[J]. 河北中医, 2022, 44 (7): 1228-1232.
 - [6] 孙赛阳, 李海波. 中药雄黄与朱砂安全性应用研究[J]. 实用中医内科杂志, 2025, 39 (1): 116-119.
 - [7] 吕静, 贾茹, 王波. 基于现代文献的儿童支原体肺炎(痰热闭肺证)组方用药规律分析[J]. 中国中医基础医学杂志, 2025, 31 (5): 877-881.
 - [8] 刘文攀, 曹郁宁, 黄家豪, 等. 大黄的药理作用及其药对研究进展[J/OL]. 中华中医药学刊, 1-16[2025-06-17]. <https://link.cnki.net/urlid/21.1546.R.20250507.1604.008>.
 - [9] 韩航. 黄芩主要有效成分医药用途的专利分析[J]. 中国科技信息, 2019, 605 (10): 32-34, 36.
 - [10] 刘艳, 王宇瑄, 刘培, 等. 桔梗中三萜皂苷类化学成分研究[J]. 中药材, 2024, 47 (8): 1957-1965.
 - [11] 褚子璇. 中药冰片的药代动力学研究及其活性物质发现[D]. 上海: 中国科学院大学(中国科学院上海药物研究所), 2022: 25-28.
 - [12] 李倩, 高海荣, 郭九峰. 甘草主要化学成分及药效活性与环境关系研究进展[J]. 黑龙江农业科学, 2019 (9): 150-154.
 - [13] 尹丽, 张潇茜, 马丽娟, 等. 牛黄解毒片的显微鉴别及薄层鉴别[J]. 河南大学学报(医学版), 2016, 35 (2): 85-88.
 - [14] 曹峥, 王宇峰. 牛黄解毒片治疗急性牙髓炎一次性根管治疗术后临床研究[J]. 新中医, 2020, 52 (12): 92-94.
 - [15] 王倩倩, 柴晓钰, 王新宇, 等. 4 种牛黄解毒制剂中胆汁酸类成分分析[J]. 中国药业, 2025, 34 (2): 49-55.
 - [16] 杨梦玉, 周富荣. 高效液相色谱法测定牛黄解毒胶囊中黄芩甙的含量[J]. 中国医药学报, 1998, 13 (5): 34-35.
 - [17] 林恒道, 崔援军, 林恒标. 高效液相色谱法测定牛黄解毒胶囊中胆红素的含量[J]. 中医研究, 2000, 13 (6): 13-14.
 - [18] 顾杰, 周思源, 阳长明, 等. 保障功效稳定的中药制剂质量控制体系[J]. 药学学报, 2025, 60 (6): 1682-1691.
 - [19] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物(Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念[J]. 中草药, 2016, 47 (9): 1443-1457.
 - [20] 滕泽学. 中药指纹图谱在药品检验中的应用及质量评价[J]. 实验室检测, 2025, 3 (9): 151-153.
 - [21] 李秋月, 许红, 李欣欣, 等. 基于 CiteSpace 的 2011—2021 年国内外网络药理学研究在中医药领域的文献计量学分析[J]. 安徽医药, 2024, 28 (11): 2316-2324.
 - [22] 刁全平, 侯冬岩, 郭华, 等. HPLC 法测定牛黄解毒片中蒽醌类化合物的含量[J]. 鞍山师范学院学报, 2016, 18 (4): 32-34, 48.
 - [23] 潘丽丽, 郝变, 袁少雄, 等. 牛黄解毒片薄层鉴别和 HPLC 指纹图谱定性研究[J]. 中药材, 2014, 37 (11): 2087-2091.
 - [24] 司晓晶, 冯华峰, 陈旭, 等. 基于桔梗皂苷 D 检测的 HPLC-CAD 试验设计[J]. 食品工业, 2025, 46 (1): 322-324.
 - [25] 郝立芳, 袁晓芳. GC 法考察牛黄解毒片中冰片质量[J]. 中国药师, 2011, 14 (6): 894-895.
 - [26] 贾哲, 韩婷, 张慧, 等. 牛黄解毒片中雄黄含量的测定[J]. 中成药, 2017, 39 (8): 1748-1750.
 - [27] 唐娜, 宋莉, 张秉华, 等. HPLC 法测定复方胰酶片中猪去氧胆酸和鹅去氧胆酸的含量[J]. 中国医药科学, 2023, 13 (13): 77-79, 103.
 - [28] 何丽艳, 张海欧, 曾文雅. 汉黄芩素调节 IL-6/STAT3 信号通路对牙周炎大鼠牙槽骨丢失的影响[J]. 中国老年学杂志, 2025, 45 (5): 1252-1257.
 - [29] 林彩星, 陈罡, 杨振东, 等. 汉黄芩素抑制鼻咽癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的研究[J]. 医学信息, 2023, 36 (10): 71-76.
 - [30] 杜宁, 张哲, 周湘, 等. 黄芩素调控 NLRP3/Caspase-1 通路对牙周炎大鼠牙槽骨吸收的影响[J]. 医学分子生物学杂志, 2022, 19 (4): 276-281.
 - [31] Chao HM, Chuang MJ, Liu JH, et al. Baicalein protects against retinal ischemia by antioxidation, antiapoptosis, downregulation of HIF-1 α , VEGF, and MMP-9 and upregulation of HO-1 [J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2013, 29 (6): 539-549.
 - [32] 胡浩, 江灵莉. 大黄酚对青光眼神经退行性病变的保护作用及其信号转导通路[J]. 国际眼科杂志, 2016, 16 (1): 34-36.
 - [33] 韩宁, 杨圣辉, 任蕾, 等. 口腔大黄滴剂的实验研究[J]. 中国微生态学杂志, 2000, 12 (1): 34-36.
 - [34] 王天祥, 郑文菊, 王秋旭. 舌鳞癌中 ERK1、ERK2 基因的表达及其意义[J]. 上海口腔医学, 2007, 16 (5): 458-460.
 - [35] 李容, 于润, 杜鹏. AP-1 家族基因与相关信号通路、肿瘤、发育和衰老进程[J]. 中国科学(生命科学), 2025, 55 (5): 898-911.
 - [36] 王赛健. JNK1 和 JNK2 在非小细胞肺癌中的表达及其对非小细胞肺癌细胞凋亡的调控[D]. 大连: 大连医科大学, 2024, 20-26.
 - [37] Khalil M, Monir MM, Bakrey HAM, et al. Toll-like receptor 7 and tumor necrosis factor alpha polymorphisms in Egyptian patients with autoimmune thyroid diseases [J]. J Immunoassay Immunochem, 2024, 45 (2): 93-111.
 - [38] 魏轩辉. 宫颈癌 PIK3R1 基因表达水平及临床意义[J]. 实验与检验医学, 2021, 39 (4): 819-821, 841.
 - [39] 孙淑萍, 杜云艳, 李胜利, 等. 中药主要抗炎机制研究进展[J]. 通化师范学院学报, 2021, 42 (4): 78-84.
 - [40] 王蕾, 李强, 姚书霞. 汉黄芩素调节 NF- κ B/MAPK 信号通路对心肌缺血再灌注损伤大鼠炎症损伤的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2024, 40 (11): 2335-2342.
 - [41] 胡青, 颜微微, 王文广, 等. 黄芩素通过抑制 NF- κ B/STAT3/ERK 信号通路改善过敏性鼻炎小鼠的炎症反应[J]. 中国老年学杂志, 2024, 44 (1): 165-170.
 - [42] 邵冠儒, 张坤阳. 大黄酸通过抑制 p38 MAPK 磷酸化减轻 UVB 诱导的皮肤光老化损伤[J]. 日用化学工业(中英文), 2024, 54 (7): 836-843.
 - [43] Zhuang S, Zhong J, Zhou QL, et al. Rhein protects against barrier disruption and inhibits inflammation in intestinal epithelial cells [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 71: 321-327.
 - [44] Jadaun KS, Mehan S, Sharma A, et al. Neuroprotective effect of chrysophanol as a PI3K/AKT/mTOR signaling inhibitor in an experimental model of autologous blood-induced intracerebral hemorrhage [J]. Curr Med Sci, 2022, 42 (2): 249-266.

(收稿日期: 2025-08-02; 修回日期: 2025-10-14)

怀山药资源化学专题

【编者按】

怀山药 (*Dioscorea opposita* Thunb.) 是河南道地大宗中药材,也是著名“四大怀药”中种植面积最大、产值最高的品种。自 2014 年以来,河南农业大学麻兵继科研团队紧密围绕怀山药的道地性形成机制和资源开发利用开展研究。团队先后完成了怀山药的全基因组测序和注释、怀山药根皮“锈斑”的化学本质及其形成机制,怀山药多酚系统化学成分、怀山药多糖理化特征及其化学结构和生物活性、怀山药内生真菌生物多样性和次生代谢产物化学多样性、怀山药零余子休眠机制等研究工作。尽管对怀山药的研究已取得了一定的进展,但讲好怀山药的故事仍然任重道远。本专题对怀山药皮中主要多酚物质的含量测定和一株怀山药内生真菌的次生代谢产物进行了研究,可为后续相关研究提供参考。

【主持人简介】



麻兵继,河南农业大学教授,博士研究生导师,中药活性物质及质量标准创新团队带头人。主要从事怀山药道地性的形成机制和资源开发利用研究,主持国家自然科学基金面上项目、河南省重点研发专项、河南省自然科学基金重点项目等省部级以上课题 13 项;以第一作者或通信作者在 *Food Hydrocolloids* 等杂志上发表 SCI 论文 45 篇,出版专著和教材 6 部,授权国家发明专利 8 项,获河南省科技进步奖三等奖 1 项。兼任郑州市中药材种质资源创新与代谢工程重点实验室主任、河南省药学会中药资源专委会副主任委员。

怀山药内生真菌 *Fusarium* sp. L46 的次生代谢产物研究

文春南^{1,2}, 葛梦煊³, 赵莹菲¹, 王非凡¹, 詹松杰¹, 刘淼^{1,2*}, 麻兵继^{1,2*} (1. 河南农业大学农学院中药材系, 郑州 450046; 2. 郑州市中药材种质资源创新与代谢工程重点实验室, 郑州 450046; 3. 南阳医学高等专科学校, 南阳 473061)

摘要: 目的 研究怀山药内生真菌 *Fusarium* sp. L46 的次生代谢产物。方法 利用柱层析和半制备高效液相等色谱技术分离纯化 *Fusarium* sp. L46 的次生代谢产物,采用高分辨质谱、核磁共振等波谱分析技术鉴定化合物的化学结构。结果 从 *Fusarium* sp. L46 的大米发酵物的乙酸乙酯提取物中分离得到 5 个化合物,分别鉴定为 4-hydroxy-3, 5, 6-trimethyl-pyrone (1)、(7R, 2E, 5E)-3, 5, 7-trimethyl-2, 5-octadienedioic acid (2)、麦角甾醇 (3)、对羟基苯乙酸乙酯 (4)、间羟基苯乙酸 (5)。结论 化合物 1 为新天然产物,化合物 2 是第二次从镰孢属真菌中分离得到。

关键词: 怀山药; 内生真菌; 镰孢属; 次生代谢产物; 分离鉴定

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)12-3600-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.020

Secondary metabolites from endophytic fungi *Fusarium* sp. L46 isolated from *Dioscorea opposita* Thunb.

WEN Chunnan^{1,2}, GE Menghuan³, ZHAO Yingfei¹, WANG Feifan¹, ZHAN Songjie¹, LIU Miao^{1,2*}, MA Bingji^{1,2*} (1. Department of Traditional Chinese Medicine, College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046; 2. Zhengzhou Key Laboratory of Germplasm Resources Innovation and Metabolic Engineering of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046; 3. Department of Pharmacy, Nanyang Medical College, Nanyang 473061)

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No. 82473890); 河南省自然科学基金重点项目 (No. 232300421127); 河南省高等学校重点科研项目 (No. 25B360013); 豫药全产业链研发河南省协同创新中心开放课题 (No. 2024YYXT-KFKT-01)。

作者简介: 文春南,男,讲师,主要从事中药化学方面的研究, email: cnwen@henau.edu.cn *通信作者: 刘淼,男,讲师,主要从事中药化学方面的研究, email: liumiao@henau.edu.cn; 麻兵继,男,教授,主要从事中药化学与生物学研究, email: mbj12345@henau.edu.cn

Abstract: Objective To determine the secondary metabolites from endophytic fungi *Fusarium* sp. L46 isolated from *Dioscorea opposita* Thunb.. **Methods** The secondary metabolites of *Fusarium* sp. L46 were separated and purified by column chromatography and semi-preparative high performance liquid chromatography. The chemical structures of the isolated compounds were identified by HR-MS and NMR spectroscopy analyzed. **Results** Totally 5 compounds were isolated from the ethyl acetate extract of the rice fermentation of *Fusarium* sp. L46, and identified as 4-hydroxy-3, 5, 6-trimethyl-pyrone (1), (7*R*, 2*E*, 5*E*)-3, 5, 7-trimethyl-2, 5-octadienedioic acid (2), ergosterol (3), 2- (4-hydroxyphenyl) ethylacetate (4), and *m*-hydroxyphenylacetic acid (5), respectively. **Conclusion** Compound 1 is a new natural product and compound 2 is isolated from genus *Fusarium* for the second time.

Key words: *Dioscorea opposita* Thunb.; endophytic fungi; genus *Fusarium*; secondary metabolite; isolation and identification

植物内生真菌是指生活史的全部或部分阶段生活于健康植物组织和器官内, 对植物没有引起明显病害的真菌类群^[1]。植物内生真菌在植物生长发育、适应环境等过程中具有重要作用^[2-4]。同时, 植物内生真菌还可以独立代谢产生结构多样的次生代谢产物, 如萜类、黄酮、聚酮、生物碱、甾体等; 许多次生代谢产物具有良好的生物活性, 如抗肿瘤、抗细菌、抗病毒等^[5-7]。来源于不同植物、不同生长环境的同种植物, 其内生真菌次生代谢产物可能存在显著差异, 因此, 植物内生真菌是挖掘结构新颖、活性显著次生代谢产物的重要资源^[8]。

镰孢菌属真菌是一大类丝状植物内生真菌, 其中包含多种能够分泌玉米赤霉烯酮、单端孢霉烯、伏马毒素等真菌毒素的植物致病菌^[9-10], 是导致多种农作物腐烂枯萎的重要因素。但是, 镰孢属真菌也能产生多种结构新颖、生物活性显著的化合物, 如生物碱、萜类、醌类、聚酮等^[11-12]。

山药为薯蓣科植物薯蓣 (*Dioscorea opposita* Thunb.) 的干燥根茎, 具有补脾养胃、生津益肺、补肾涩精的功效^[13], 药用价值和营养价值极高。目前, 对山药内生菌次生代谢产物的研究较少。本课题组在前期研究中对怀山药内生真菌进行了分离和鉴定, 并对部分优势内生真菌的代谢产物进行了研究^[14-17]。在前期基础上, 本研究选取一株怀山药内生真菌 *Fusarium* sp. L46 为研究对象, 对其次生代谢产物进行研究, 以期发现结构新颖、活性较好的次生代谢产物。

1 材料

1.1 仪器与试剂

DRX 400/600 MHz 核磁共振仪 (瑞士布鲁克集团公司), EYELA-N1300 旋转蒸发仪 (东京理化器械株式会社), Agilent 1100 高效液相色谱仪 (安捷伦科技有限公司), Waters Xevo G2-XS QToF 高分

辨质谱、Waters 1525 半制备高效液相色谱仪 (沃特世科技有限公司), YMC-Triart-C18 色谱柱 (5 μ m, 10 mm $\times$ 250 mm), LDZF-50KB 型立式压力蒸汽灭菌器 (上海申安医疗器械厂), GXZ 型智能光照培养箱 (宁波江南制造厂)。RP-C18 (YMC, 50 μ m, 日本 YMC 株式会社), 柱色谱硅胶 (80 ~ 100 目, 100 ~ 200 目, 青岛海洋化工厂)。色谱乙腈 (美国天地有限公司), 柱层析用甲醇、丙酮、乙酸乙酯、二氯甲烷、石油醚等均为分析纯。

1.2 菌株

试验菌种系采用麦芽浸膏琼脂培养基 (MEA) 从河南怀山药根茎中分离, 并通过马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA) 纯化得到。分离纯化的菌种经 5.8S rDNA-ITS 测序, 对比 GenBank 数据库, 将其鉴定为镰孢属真菌 *Fusarium* sp. L46, 其 ITS 序列已保存至 GenBank (保藏号 No. OR978133), 菌种存放于河南农业大学农学院中药材系。

2 方法与结果

2.1 菌种发酵

将保存在 -80 $^{\circ}$ C 冰箱的试验菌种置于常温活化, 接种于灭菌后的 PDA 培养基上, 置于培养箱中培养 (28 $^{\circ}$ C, 7 d)。将培养后的菌种接种于 PDB 培养基中, 置于恒温摇床培养 (28 $^{\circ}$ C, 120 r $\cdot$ min⁻¹, 7 d) 得到真菌种子液。在 650 mL 的培养瓶中加入大米 100 g 和 100 mL 水, 高压灭菌 (121 $^{\circ}$ C, 20 min), 在灭菌后的大米培养基 (共 100 瓶) 中加入种子液约 10 mL, 置于光照培养箱中 28 $^{\circ}$ C 培养 30 d。

2.2 提取与分离

将菌株大米发酵物用乙酸乙酯浸提, 每次 3 d, 提取 3 次, 提取液经减压浓缩除去乙酸乙酯得浸膏 79.43 g。将乙酸乙酯浸膏经硅胶柱层析, 以石油醚 - 丙酮 (1 : 0, 20 : 1, 10 : 1, 5 : 1, 2 : 1) 依次洗脱得到 5 个组分 Fr.A ~ Fr.E。

Fr.B (6 g) 经硅胶柱层析, 以石油醚 - 乙酸乙酯 (20 : 1、15 : 1、8 : 1、5 : 1) 依次洗脱得到组分 Fr.B1 ~ Fr.B4, 其中, Fr.B4 (100 mg) 经半制备液相 (30% 乙腈 - 水) 分离得到化合物 **5** (20 mg, $t_R = 24$ min)。

Fr.C (5.64 g) 经硅胶柱层析, 以石油醚 - 乙酸乙酯 (20 : 1、15 : 1、8 : 1、4 : 1) 依次洗脱得到组分 Fr.C1 ~ Fr.C4, 其中, Fr.C1 析出晶体, 即得化合物 **3** (10 mg)。

Fr.D (11.31 g) 经 C-18 反相中压柱色谱, 以甲醇 - 水 (20%、40%、60%、80%、100%) 进行洗脱得到组分 Fr.D1 ~ Fr.D5。Fr.D2 (980.7 mg) 经硅胶柱层析, 以二氯甲烷 - 丙酮 (1 : 0, 50 : 1、30 : 1、20 : 1、10 : 1) 依次洗脱, 得到组分 Fr.D2.1 ~ Fr.D2.5。Fr.D2.2 (81.6 mg) 经半制备液相 (40% 乙腈 - 水) 分离得到化合物 **4** (10 mg, $t_R = 24$ min)。Fr.D2.3 (37.5 mg) 经半制备液相 (40% 乙腈 - 水, 3 mL · min⁻¹) 分离得到化合物 **1** (7 mg, $t_R = 7.9$ min)。Fr.D3 (1.14 g) 经硅胶柱层析, 以石油醚 - 丙酮 (8 : 1、5 : 1、3 : 1、1 : 1) 洗脱得到组分 Fr.D3.1 ~ Fr.D3.13, Fr.D3.9 (63.7 mg) 经半制备液相 (30% 乙腈 - 水, 3 mL · min⁻¹) 分离得到化合物 **2** (6.7 mg, $t_R = 16.1$ min)。

2.3 化合物的结构鉴定

化合物 **1**: 淡粉色固体, 通过 HRESIMS m/z

153.0548 [M-H]⁻ (计算值 C₈H₉O₃ 153.0546), 确定化合物 **1** 的分子式为 C₈H₉O₃, 包含 4 个不饱和度。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) 图谱中仅显示 3 个单峰甲基信号 δ_H 2.22 (3H, s, H-7), 1.94 (3H, s, H-8), 1.89 (3H, s, H-9) (见表 1)。¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) 图谱共显示 8 个碳信号, 结合碳谱数据和 HSQC 图谱可知该化学结构中包含 3 个甲基 δ_C 17.2 (C-7), 10.2 (C-8), 8.9 (C-9) 和 5 个季碳 δ_C 168.8 (C-2), 98.6 (C-3), 168.7 (C-4), 109.6 (C-5), 156.7 (C-6), 推测结构中包含 2 个双键和 1 个内酯环。在 HMBC 图谱中, H-7 与 C-5 (δ_C 109.6) 和 C-6 (δ_C 156.7) 相关, H-8 与 C-4 (δ_C 168.7)、C-5 (δ_C 109.6) 和 C-6 (δ_C 156.7) 相关, H-9 与 C-2 (δ_C 168.8)、C-3 (δ_C 98.6) 和 C-4 (δ_C 168.7) 相关 (见图 1), 确定 C-7 与 C-6 相连, C-8 与 C-5 相连, C-9 与 C-3 相连, C-4 位存在羟基取代。从而确定该化合物的结构为 4-hydroxy-3, 5, 6-trimethyl-pyrone^[18] (见图 2), 经检索化合物 **1** 为新天然产物。

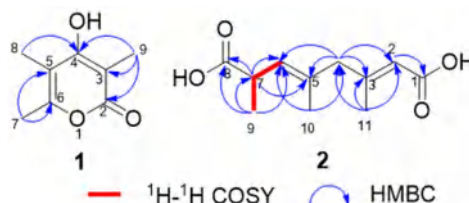


图 1 化合物 **1** 和 **2** 的 ¹H-¹H COSY 和关键 HMBC 相关

Fig 1 ¹H-¹H COSY and key HMBC correlations of compound **1** and **2**

表 1 化合物 **1** 和 **2** 的 NMR (400/100 MHz) 数据
Tab 1 NMR (400/100 MHz) spectroscopic data of compound **1** ~ **2**

No.	化合物 1 ^a		化合物 2		化合物 3	
	δ_H , J (Hz)	δ_C , type	δ_H , J (Hz)	δ_C , type	δ_H , J (Hz)	δ_C , type
1	—	—	—	170.2, C	—	172.0, C
2	—	168.8, C ^c	5.70, s	118.6, CH	5.72, s	116.9, CH
3	—	98.6, C	—	158.8, C	—	160.8, C
4	—	168.7, C ^c	2.85, s	51.8, CH ₂	2.84, s	51.3, CH ₂
5	—	109.6, C	—	134.9, C	—	134.4, C
6	—	156.7, C	5.30, d (9.3)	129.4, CH	5.29, d (9.2)	127.5, CH
7	2.22, s	17.2, CH ₃	3.36, m	40.3, CH	3.39, m	39.1, CH
8	1.94, s	10.2, CH ₃	—	179.1, C	—	181.2, C
9	1.89, s	8.9, CH ₃	1.22, d (7.0)	18.3, CH ₃	1.27, d (6.9)	17.9, CH ₃
10	—	—	1.63, s	16.0, CH ₃	1.63, s	16.3, CH ₃
11	—	—	2.06, s	18.3, CH ₃	2.10, s	18.7, CH ₃

注: a. 氘代甲醇; b. 氘代氯仿; c. 同一列中两数值可交换。

Note: a. recorded in CD₃OD; b. recorded in CDCl₃; c. values in the same column may be interchanged.

化合物 **2**: 白色固体, 通过 HRESIMS m/z 235.0934 [M + Na]⁺ (计算值 C₁₁H₁₆O₄Na 235.0946), 确定化合物的分子式为 C₁₁H₁₆O₄, 不饱和度为 4。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) 图谱显示 2 个单峰甲基 δ_H 2.06 (3H, s, H-11), 1.63 (3H, s, H-10), 1 个双峰

甲基 δ_H 1.22 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-9), 2 个烯烃质子 δ_H 5.70 (1H, s, H-2), 5.30 (1H, d, $J = 9.3$ Hz, H-6), 1 个次甲基 δ_H 3.36 (1H, m, H-7) 和 1 个亚甲基 δ_H 2.85 (2H, s, H-4) 氢信号。¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) 数据显示 11 个碳信号, 其中 3 个甲

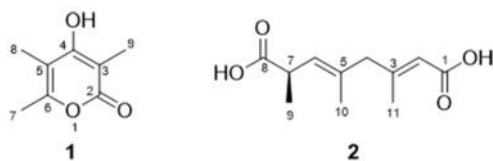


图2 化合物1和2的化学结构

Fig 2 Chemical structures of compounds 1 and 2

基, 1个亚甲基, 3个次甲基, 4个季碳。推测该化合物的结构中包含2个双键和2个羧基或酯基, 为链状结构。由于在化合物2的 ^1H - ^1H COSY图谱中存在H-6与H-7以及H-7与H-9的相关(见图1), 说明C-6与C-7, C-7与C-9相连。在HMBC图谱中, H-9与C-6, C-7和C-8相关, H-7与C-5, C-6, C-8和C-9相关, 说明C-7与C-8相连, C-5与C-6相连; H-10与C-4, C-5和C-6的HMBC相关, 说明C-4与C-5相连;进一步地, 根据H-11与C-2, C-3和C-4以及H-4与C-2, C-3, C-5和C-6的HMBC相关, 说明C-2与C-3, C-3与C-4分别相连。综合以上分析, 确定了该链状结构化合物的碳原子连接方式。文献调研发现, 该化合物的核磁数据与(7*R*, 2*E*, 5*E*)-3, 5, 7-trimethyl-2, 5-octadienedioic acid^[19]相近, 但本研究中测定化合物2所用氘代试剂与文献不同。为确认该化合物的化学结构, 笔者用氘代氯仿溶解样品测定了其核磁共振图谱(见表1), 结果显示, 该化合物的氢谱数据与文献报道一致^[19], 但其碳谱C-1和C-3位的化学位移有显著差异, 其余碳信号化学位移一致。进一步对比、分析文献支撑数据中的核磁共振图谱, 发现文献中C-1和C-3位的化学位移归属有误, 从而确证了该化合物的化学结构。由于该化合物仅有1个手性中心, 可通过比旋光度确定其绝对构型。其比旋光度($[\alpha] - 23.8$)与文献报道值($[\alpha] - 22.8$)一致^[19], 推断该化合物C-7位绝对构型为*R*。因此, 将化合物2鉴定为(7*R*, 2*E*, 5*E*)-3, 5, 7-trimethyl-2, 5-octadienedioic acid(见图2)。

化合物3: 无色晶体(甲醇)。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 5.57 (1H, dd, $J = 5.6, 2.5$ Hz, H-6), 5.38 (1H, m, H-7), 5.21 (1H, overlap, H-22), 5.18 (1H, overlap, H-23), 3.64 (1H, m, H-3), 1.04 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-21), 0.95 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-28), 0.84 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-27), 0.82 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-26), 0.63 (3H, s, H-18)。 ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 141.5 (C-8), 139.9 (C-5), 135.7 (C-22), 132.1 (C-23), 119.7 (C-6), 116.4 (C-7), 70.6 (C-3), 55.9 (C-17), 54.7 (C-14),

46.4 (C-9), 43.0 (C-13), 42.4 (C-24), 40.9 (C-20), 40.6 (C-12), 39.2 (C-4), 38.5 (C-1), 37.2 (C-10), 33.2 (C-25), 32.1 (C-2), 28.4 (C-16), 23.1 (C-15), 21.3 (C-11), 20.1 (C-21), 19.8 (C-27), 19.5 (C-26), 17.7 (C-28), 16.4 (C-19), 12.0 (C-18)。经查阅文献, 化合物3的核磁数据与文献报道一致^[20], 鉴定为麦角甾醇。

化合物4: 白色固体。 ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 7.06 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2, 6), 6.77 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3, 5), 4.24 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, H-8), 2.86 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, H-7), 2.05 (3H, s, H-10)。经查阅文献, 化合物4的氢谱数据与文献基本一致^[21], 将化合物4确定为对羟基苯乙酸乙酯。

化合物5: 白色固体。 ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 7.09 (2H, overlap, H-2, 6), 6.77 (2H, overlap, H-3, 5), 3.34 (2H, s, H-7)。 ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 176.4 (C-8), 156.7 (C-4), 132.0 (C-2), 129.2 (C-6), 122.8 (C-1), 120.4 (C-3), 115.9 (C-5), 36.7 (C-7)。化合物5的核磁数据与文献^[20]一致, 故将化合物5鉴定为间羟基苯乙酸。

3 讨论与结论

本研究选取一株怀山药内生镰孢属真菌 *Fusarium* sp. L46 为研究对象, 对其次生代谢产物进行了研究, 从该菌株大米发酵物的乙酸乙酯提取物中分离得到5个化合物。化合物1为新天然产物, 由 Kanazawa 等^[18]首次合成得到, 但文献仅提供了其氢谱数据; Shimamura 等^[22]于2007年也合成了该化合物, 并测定了该化合物在氘代氯仿中的核磁共振图谱; Guo 等^[23-24]将消旋的 *N*-乙酰基半胱胺底物类似物 2-SNAC 与甲基丙二酸单酰辅酶 A 和带有附加 DEBS 硫脂酶结构域的重组 NANS 模块共孵育得到化合物1。化合物2是 Feng 等^[19]首次从一株青霉属真菌中分离得到的新天然产物, 但文献中该化合物的C-1和C-3核磁共振数据归属有误;与此同时, Tang 等^[25]从一株海洋来源的镰孢属真菌 *Fusarium solani* H915 分离得到化合物2, 但其C-7位绝对构型未确定, 且文中该化合物的化学结构与名称对应有误;本研究系第二次从镰孢属真菌中发现该化合物, 且通过对比比旋光度确定了化合物2的绝对构型。本研究进一步丰富了怀山药内生真菌次生代谢产物的研究内容, 为深入挖掘山药内生真菌活性代谢产物奠定了一定基础。

参考文献

- [1] Kusari S, Hertweck C, Spiteller M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites [J]. Chem Bio, 2012, 19 (7): 792-798.
- [2] 梁宇, 高玉葆. 内生真菌对植物生长发育及抗逆性的影响 [J]. 植物学报, 2000, 17 (1): 52-59.
- [3] 尹雁玲, 蔡然, 张功良, 等. 植物内生菌增强植物对生物胁迫抗性的研究进展 [J]. 广西植物, 2023, 43 (2): 212-220.
- [4] 黄雪珍, 赵龙飞. 药用植物内生菌对宿主植物促生作用机制研究进展 [J]. 微生物学通报, 2023, 50 (4): 1653-1665.
- [5] Hashem AH, Attia MS, Kandil EK, et al. Bioactive compounds and biomedical applications of endophytic fungi: a recent review [J]. Microb Cell Fact, 2023, 22 (1): 107.
- [6] Wang ZC, Wang L, Pan YP, et al. Research advances on endophytic fungi and their bioactive metabolites [J]. Bioproc Biosyst Eng, 2023, 46 (2): 165-170.
- [7] 孙剑秋, 郭良栋, 臧威, 等. 药用植物内生真菌及活性物质多样性研究进展 [J]. 西北植物学报, 2006, 26 (7): 1505-1519.
- [8] Toghueo RMK. Bioprospecting endophytic fungi from *Fusarium* genus as sources of bioactive metabolites [J]. Mycology, 2020, 11 (1): 1-21.
- [9] Desjardins AE, Proctor RH. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins [J]. Int J Food Microbiol, 2007, 119 (1): 47-50.
- [10] Kristensen R, Torp M, Kosiak B, et al. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences [J]. Mycol Res, 2005, 109 (2): 173-186.
- [11] Wei JH, Wu B. Chemistry and bioactivities of secondary metabolites from the genus *Fusarium* [J]. Fitoterapia, 2020, 146: 104638.
- [12] Li MZ, Yu RL, Bai XL, et al. *Fusarium*: a treasure trove of bioactive secondary metabolites [J]. Nat Prod Rep, 2020, 37 (12): 1568-1588.
- [13] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 30.
- [14] 张朋展, 赵作威, 王丽, 等. 怀山药内生真菌次生代谢产物及其抗氧化活性菌株筛选研究 [J]. 时珍国医国药, 2020, 31 (7): 1703-1706.
- [15] 盛蒙珂, 赵莹菲, 田若丹, 等. 怀山药内生真菌 *Chaetomium* sp. 的次生代谢产物研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2024, 36 (6): 982-985, 962.
- [16] Tian RD, Sheng MK, Zhao YF, et al. α -pyrone derivatives from the endophytic *Fusarium* sp. L33 isolated from *Dioscorea opposita* [J]. Phytochem Lett, 2024, 62: 14-17.
- [17] 刘明爽, 田若丹, 葛梦焕, 等. 怀山药内生真菌 *Alternaria* sp. L12 的次生代谢产物研究 [J]. 中南药学, 2021, 19 (3): 382-385.
- [18] Kanazawa T, Ohkawa Y, Kuda T, et al. γ -pyrones from *Gonystylus keithii*, as new inhibitors of parathyroid hormone (PTH)-induced Ca release from neonatal mouse calvaria [J]. Chem Pharm Bull, 1997, 45 (6): 1046-1051.
- [19] Feng QM, Li XY, Li BX, et al. Isolation and identification of two new compounds from the *Penicillium* sp. SYPF7381 [J]. Nat Prod Res, 2020, 34 (14): 2007-2013.
- [20] 张捷, 刘洪新, 刘昭明, 等. 春砂仁内生真菌 *Leten-draea helminthicola* A696 的次级代谢产物研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33 (5): 773-778.
- [21] 孙彦斌, 夏桂阳, 夏欢, 等. 赤芍内生真菌 *Colletotrichum capsici* 中的 1 个新酚酸酯成分 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46 (11): 2837-2842.
- [22] Shimamura H, Sunazuka T, Izuhara T, et al. Total synthesis and biological evaluation of verticipyrene and analogues [J]. Org Lett, 2007, 9 (1): 65-67.
- [23] Guo X, Liu TG, Valenzano CR, et al. Mechanism and stereospecificity of a fully saturating polyketide synthase module: nanchangmycin synthase module 2 and its dehydratase domain [J]. J Am Chem Soc, 2010, 132 (42): 14694-14696.
- [24] Guo X, Liu TG, Deng ZX, et al. Essential role of the donor acyl carrier protein in stereoselective chain translocation to a fully reducing module of the nanchangmycin polyketide synthase [J]. Biochemistry, 2012, 51 (4): 879-887.
- [25] Tang XX, Yan X, Fu WH, et al. New β -lactone with tea pathogenic fungus inhibitory effect from marine-derived fungus MCCC3A00957 [J]. J Agr Food Chem, 2019, 67 (10): 2877-2885.

(收稿日期: 2025-03-13; 修回日期: 2025-03-24)

铁棍山药皮中三个菲类化合物的含量测定

赵小磊¹, 王菲凡², 赵莹菲², 詹松杰², 文春南², 刘森^{2*}, 麻兵继^{2*} (1. 河南省药品审评查验中心, 郑州 450000; 2. 河南农业大学农学院中药材系, 郑州 450046)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法测定铁棍山药皮中三个菲类化合物的含量。**方法** 采用 ZORBAX Eclipse XDB C8 (5 μ m, 4.6 mm $\times$ 150 mm) 色谱柱, 以乙腈 (A) -0.1% 甲酸水 (B) 溶液为流动相, 进行梯度洗脱, 洗脱梯度 (0 ~ 15 min, 25% $\rightarrow$ 30%A; 15 ~ 45 min, 30% $\rightarrow$ 45%A), 流速 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹, 检测波长 260 nm。**结果** 三个化合物在 0.02 ~ 0.12 mg $\cdot$ mL⁻¹ 内与峰面积均呈良好的线性关系 ($R^2 > 0.999$), 精密度、稳定性、重复性良好, 平均加样回收率为 98.23% ~ 106.02%, RSD 为 2.4% ~ 4.7%。**结论** 该方法稳定可靠, 可用于测定铁棍山药皮中三个菲类化合物的含量, 为铁棍山药的质量控制及其开发利用提供一定理论支持。

关键词: 铁棍山药; 山药皮; 菲类化合物; 高效液相色谱; 含量测定

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)12-3605-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.021

Determination of three phenanthrenes in the peels of *Dioscorea opposita* Thunb. cv. Tiegun

ZHAO Xiaolei¹, WANG Feifan², ZHAO Yingfei², ZHAN Songjie², WEN Chunnan², LIU Miao^{2*}, MA Bingji^{2*} (1. Henan Center for Drug Evaluation and Inspection, Zhengzhou 450000; 2. Department of Traditional Chinese Medicine, College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046)

Abstract: **Objective** To determine the content of three phenanthrenes in the peels of *Dioscorea opposita* Thunb. cv. Tiegun by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** ZORBAX Eclipse XDB C8 chromatographic column (5 μ m, 4.6 mm $\times$ 150 mm) was used. The mobile phase was acetonitrile (A)-0.1% formic acid solution (B) with gradient elution (0 ~ 15 min, 25% $\rightarrow$ 30%A; 15 ~ 45 min, 30% $\rightarrow$ 45%A). The flow rate was 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹. The detection wavelength was 260 nm. **Results** The three compounds showed good linearity ($R^2 > 0.999$) in the concentration ranges of 0.02 to 0.12 mg $\cdot$ mL⁻¹, with good precision, stability, and repeatability. The average recoveries of three phenanthrenes ranged 98.23% ~ 106.02%, with RSDs of 2.4% ~ 4.7%. **Conclusion** The method is stable and reliable, and can be used to determine the content of three phenanthrenes in the peels of *Dioscorea opposita* Thunb. cv. Tiegun. It provides a theoretical support for the quality control and development of *Dioscorea opposita* Thunb. cv. Tiegun.

Key words: *Dioscorea opposita* Thunb. cv. Tiegun; peel of *Dioscorea opposita*; phenanthrene; HPLC; content determination

山药来源于薯蓣科 (Dioscoreaceae) 薯蓣属 (*Dioscorea*) 薯蓣 (*Dioscorea opposita* Thunb.) 的干燥根茎, 又名“薯蓣”“延章”, 是重要的药食同源药材之一, 具有很高的营养价值和药用价值^[1-2]。

其味甘, 性平, 主要归于肺、脾、肾经, 能健脾, 补肺, 固肾, 益精, 用于脾虚食少、泄泻不止、尿频、带下等症^[3]。研究表明, 山药中含有丰富的多糖、氨基酸、皂苷、淀粉、多酚、黄酮和山药素等

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 82473890); 河南省自然科学基金 (No. 232300421127); 河南省高等学校重点科研项目 (No. 25B360013); 河南省市场监管局科技计划项目 (No. 30803666); 豫药全产业链研发河南省协同创新中心开放课题 (No. 2024YYXT-KFKT-01)。

作者简介: 赵小磊, 女, 高级工程师, 主要从事中药质量标准研究, email: zxl723555@126.com * **通信作者:** 刘森, 男, 讲师, 硕士研究生导师, 主要从事中药化学研究, email: liumiao@henau.edu.cn; 麻兵继, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药化学与生物学研究, email: mbj12345@henau.edu.cn

活性成分^[4-7]。山药在加工过程中产生的山药皮往往被废弃,造成了山药资源的极大浪费^[8]。研究表明,山药皮中部分生物活性成分如尿囊素、总酚等在山药皮中的含量均比去皮部位更高,尤其是总酚含量^[9-11]。因此,山药皮中化学成分,尤其是含量丰富的酚类物质具有较好的开发利用价值。

目前关于山药皮中化学成分含量测定的研究报道较少。朱金花等^[12]建立了高效液相色谱方法测定山药皮、零余子、块茎、茎叶中的山药素 I、III、IV、V 四种山药素类化合物,但是,色谱峰信号较弱,且色谱图中一个主要的色谱峰未指认和测定。Kim 等^[13]确定了韩国产的四种薯蓣属植物 *Dioscorea batatas*, *Dioscorea opposita*, *Dioscorea quinqueloba* 和 *Dioscorea bulbifera* 根茎皮部位的三个主要成分为山药素 I、2, 7-dihydroxy-4, 6-dimethoxy phenanthrene 和 6, 7-dihydroxy-2, 4-dimethoxy phenanthrene, 并对其进行了含量测定,然而,该方法中山药素 I 的色谱峰明显存在肩峰,说明其色谱峰与另一色谱峰未完全分离,因此其含量测定结果准确性有待商榷。本研究以铁棍山药为研究对象,采用高效液相色谱建立了铁棍山药皮中三个菲类化合物的含量测定方法,采用该方法三个菲类化合物的分离度好,克服了 Kim 等^[13]方法中山药素 I 分离度差的问题,且该方法稳定可靠,能够充分利用山药皮中的活性成分,促进山药皮资源的进一步开发利用提供理论支撑。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters 1525 高效液相色谱仪(沃特世科技有限公司),半制备色谱柱(DAISOPACK C8, 5 μm , 10 mm $\times$ 250 mm),Agilent 1100 高效液相色谱仪

(安捷伦科技有限公司),分析色谱柱(ZORBAX Eclipse XDB C8, 5 μm , 4.6 mm $\times$ 150 mm);AE224 电子分析天平(上海菁海仪器有限公司, $d = 0.1 \text{ mg}$);Discovery DV215CD 电子分析天平(奥豪斯, $d = 0.01 \text{ mg}$);KQ5200DE 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

材料采自温县基地,经河南中医药大学兰金旭副教授鉴定为薯蓣科薯蓣属铁棍山药(*Dioscorea opposita* Thunb. cv. Tiegun)。削铁棍山药外皮,将皮于 45 $^{\circ}\text{C}$ 烘干,粉碎后备用。色谱乙腈(美国天地),纯净水(屈臣氏),无水乙醇、甲酸、乙酸乙酯均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 铁棍山药皮中三个化合物的分离制备

铁棍山药皮粉末(2571 g)置于锥形瓶中,加入适量乙酸乙酯,超声辅助提取 40 min,提取三次,提取液过滤合并,减压浓缩除去有机溶剂得到乙酸乙酯浸膏(29 g)。采用 Waters 半制备 HPLC(67% 乙腈水, 3 mL $\cdot$ min $^{-1}$)分离铁棍山药皮乙酸乙酯提取物中三个主要成分(色谱图见图 1, 化合物 1~3 的保留时间分别为 14.406、7.718、9.682 min),并通过 NMR 技术确定化合物 1~3 的化学结构分别为 Batatasin I (山药素 I)^[14]、2, 7-dihydroxy-3, 5-dimethoxy phenanthrene (亦作 2, 7-dihydroxy-4, 6-dimethoxy phenanthrene)^[15]和 6, 7-dihydroxy-2, 4-dimethoxy phenanthrene^[16](见图 2)。制备所得三个单体化合物分别经二次 HPLC 分离纯化,通过面积归一化法测定三个化合物的纯度均达到 98% 以上,以此作为自制对照品。

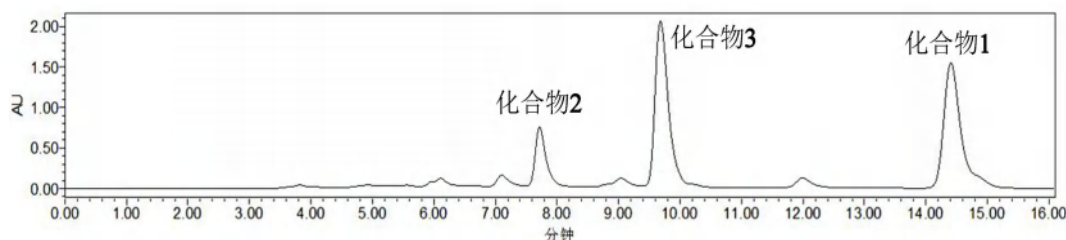


图 1 铁棍山药皮提取物中化合物 1~3 的分离

Fig 1 Isolation of compounds 1~3 from the extracts of the peels of *Dioscorea opposita* Thunb. cv. Tiegun

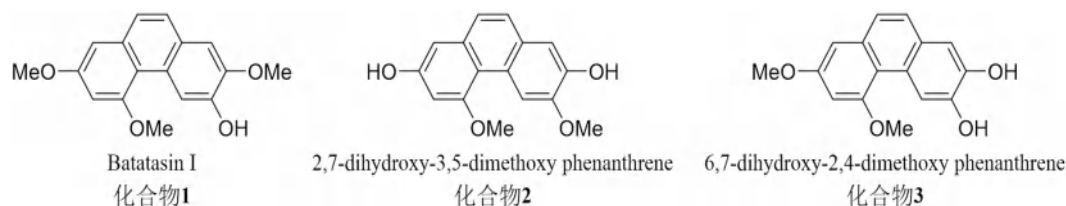


图 2 铁棍山药皮提取物中化合物 1~3 的化学结构

Fig 2 Chemical structures of compounds 1~3 from the extracts of the peels of *Dioscorea opposita* Thunb. cv. Tiegun

2.2 色谱分析条件

以乙腈为流动相 A, 以 0.1% 甲酸水溶液为流动相 B, 梯度洗脱 (0 ~ 15 min, 25% → 30%A; 15 ~ 45 min, 30% → 45%A), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 进样量为 5 μL, 色谱柱为 ZORBAX Eclipse XDB C8 (5 μm, 4.6 mm×150 mm)。采用紫外可见分光光度计对分离得到的三个单体化合物进行全波长扫描, 结果显示, 化合物 1 ~ 3 的最大吸收波长分别为 259 nm、260 nm 和 260 nm, 故选择 260 nm 为检测波长进行后续含量测定。该色谱条件下对照品以及铁棍山药皮提取物样品溶液的高效液相色谱图见图 3。

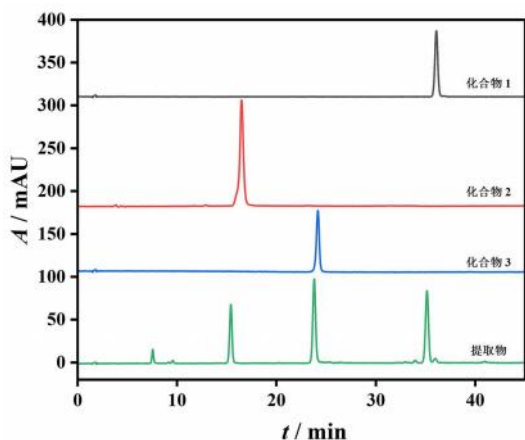


图 3 化合物 1 ~ 3 和铁棍山药皮提取物的高效液相色谱图

Fig 3 HPLC spectra of compounds 1 ~ 3 and the extracts of the peels of *Dioscorea opposita* Thunb. cv. Tiegun

2.3 对照品储备液的制备

精确称取自制化合物 1、2、3 对照品各约 10.00 mg, 加无水乙醇溶解, 摇匀, 分别配制得到质量浓度为 0.2 mg·mL⁻¹ 的各对照品储备液。

2.4 样品溶液的制备

准确称取粉碎后的干燥铁棍山药皮样品 1.1400 g, 加 40 mL 乙酸乙酯, 超声辅助提取 40 min, 滤过, 滤液蒸干后得到样品浸膏, 用无水乙醇溶解浸膏并定容至 50 mL 得待测样品溶液。

2.5 定量方法的建立

2.5.1 线性关系考察 分别精密量取质量浓度为 0.2 mg·mL⁻¹ 的化合物 1、2、3 的对照品储备液 1、2、3、4、5、6 mL 置于 10 mL 量瓶, 无水乙醇定容至刻度, 得到不同浓度的对照品溶液, 各不同浓度的对照品溶液分别进行 HPLC 分析。以化合物质量浓度为横坐标, 其对应峰面积为纵坐标, 绘制得到各化合物的标准曲线, 化合物 1 的回归方程为 $y = 2.7326 \times 10^4 x - 23.18$, $R^2 = 1.000$; 化合物 2 的回归方程为 $y = 5.0049 \times 10^4 x - 18.847$, $R^2 = 0.9999$; 化合物 3 的回归方程为 $y =$

$2.6160 \times 10^4 x - 2.3267$, $R^2 = 0.9998$ 。结果表明, 在 0.02 ~ 0.12 mg·mL⁻¹ 内化合物 1 ~ 3 均与峰面积呈良好的线性关系。

2.5.2 精密度试验 准确称取化合物 1 ~ 3 对照品适量, 分别配制成质量浓度为 0.12、0.03、0.04 mg·mL⁻¹ 的对照品溶液。取各对照品溶液进行 HPLC 分析。同一样品连续进样 6 次, 计算化合物 1 ~ 3 的峰面积 RSD 值分别为 0.32%、0.42%、1.2%, 表明仪器的精密度良好。

2.5.3 重复性试验 取干燥山药皮粉末样品 6 份, 每份约 1.1400 g。向每份样品中加入 40 mL 乙酸乙酯, 超声 40 min, 滤过, 滤液蒸干后得到提取物浸膏。将每份浸膏用无水乙醇定容至 50 mL, 进样测定化合物 1、2、3 的峰面积, 计算得到化合物 1、2、3 的峰面积 RSD 值分别为 0.91%、1.2%、0.85%, 表明该方法重复性良好。

2.5.4 稳定性试验 待测样品配制同上述重复性试验方法, 在 0、12、24、36、48、60、72 h 分别进样测定其峰面积, 计算得到化合物 1、2、3 峰面积的 RSD 值分别为 1.2%、0.59%、0.55%, 表明样品在 72 h 内稳定性良好。

2.5.5 加样回收试验 准确称取适量山药皮样品, 按照“2.4”项下方法制备样品溶液, 测定化合物 1 ~ 3 的含量。分别准确称量化合物 1 ~ 3 对照品适量, 分别配制得到质量浓度为 0.1054、0.0437 和 0.1181 mg·mL⁻¹ 的对照品溶液。精密量取适量等体积的已知各化合物含量的样品溶液 3 份, 分别加入 0.5、1.0、1.5 mL 不同质量浓度的化合物 1 ~ 3 对照品溶液, 进行分析, 测定回收率。经计算得化合物 1 ~ 3 的平均加样回收率均在 98.23% ~ 106.02%, RSD 均在 2.4% ~ 4.7%。说明化合物 1 ~ 3 均有较好的回收率。

2.6 山药皮中三个化合物的含量测定

按“2.4”项下方法制备样品溶液, 在“2.2”项条件下测定各化合物的峰面积, 计算可得化合物 1、2、3 在铁棍山药皮中的含量分别为 0.294%、0.104% 和 0.329%。

3 讨论与结论

本课题组在前期研究中发现, 怀山药皮上不规则的“锈斑”的化学本质是花青素类物质, 且只分布在根茎的局部皮组织中^[17]。笔者通过测定怀山药皮和去皮部位中的总酚含量发现, 山药皮中总酚含量为 3.55 mg 没食子酸当量·g⁻¹, 而去皮部位仅为 0.36 mg 没食子酸当量·g⁻¹, 说明山药皮中总酚含量是去皮部位的近 10 倍; 并

且针对山药皮的化学成分研究结果表明, 山药皮中的酚类物质主要包括山药素类、二苯庚烷类和酪胺衍生物; 其中, 山药皮脂溶性部位中主要的酚类物质为山药素类化合物, 在化学结构上属于菲类化合物, 如山药素 I、6, 7-dihydroxy-2, 4-dimethoxy phenanthrene 等^[18]。山药中的菲类化合物是重要的活性成分, 具有抗氧化、抗炎、降血糖等活性^[19], 具有重要的开发利用价值。

目前,《中国药典》中山药的质量标准仅包括性状、鉴别、检查、浸出物等, 尚未建立含量测定标准。由于山药根茎加工成饮片过程中均经过去皮处理, 去皮后的饮片中酚类化合物含量极低, 因此, 本研究建立的含量测定方法没有考察山药饮片中相应成分的含量。李寒冰等^[9]采用组织化学法对山药中的活性物质进行了定位分析, 结合抗氧化活性分析, 提出山药入药以不去皮为宜的观点。根据上述观点, 本研究建立的含量测定方法或可作为山药的含量测定标准。

本研究以铁棍山药皮为研究对象, 提取山药皮中的脂溶性成分进行 HPLC 分析, 建立了铁棍山药皮中三个菲类化合物的含量测定方法, 可用于铁棍山药皮中三个菲类化合物的含量测定, 为山药皮的开发利用及其质量控制等方面研究提供一定理论支持。

参考文献

- [1] 赵小亮, 龙则宇, 鲁云, 等. 山药中部分活性物质的功效研究与应用进展[J]. 浙江农业学报, 2024, 36 (4): 920-931.
- [2] 陈泽历, 高静娟, 杨旭昆, 等. 基于主成分分析的 3 个品种山药营养品质综合评价[J]. 农产品质量与安全, 2024 (2): 25-30.
- [3] 董庆海, 吴福林, 王涵, 等. 山药的化学成分和药理作用及临床应用研究进展[J]. 特产研究, 2018, 40 (4): 98-103.
- [4] 陈梦雨, 刘伟, 俞桂新, 等. 山药化学成分与药理活性研究进展[J]. 中医学报, 2020, 48 (2): 62-66.
- [5] 王晓辉, 胡明航, 董黎明, 等. 响应面法优化超声辅助提取山药素 I 工艺[J]. 徐州工程学院学报 (自然科学版), 2022, 37 (3): 59-64.
- [6] 刘国栋. 山药素[J]. 植物生理学通讯, 1993, 29 (3): 202.
- [7] 孙荣, 高艳华, 张九勋, 等. 山药皮中重要功能性成分的研究进展[J]. 食品与药品, 2014, 16 (3): 228-230.
- [8] Wang HO, Liu SH, Zhou XJ, et al. Treatment with hydrogen peroxide improves the physicochemical properties of dietary fibres from Chinese yam peel [J]. Int J Food Sci Tech, 2020, 55 (3): 1289-1297.
- [9] 李寒冰, 刘孟奇, 齐向云, 等. 怀山药药用“去皮与否”的合理性研究[J]. 中成药, 2012, 34 (8): 1560-1563.
- [10] 于东, 方忠祥, 杨海花, 等. 紫山药酚酸类化合物鉴定及含量测定[J]. 中国农业科学, 2010, 43 (12): 2527-2532.
- [11] Liu YX, Li HF, Fan YY, et al. Antioxidant and antitumor activities of the extracts from Chinese yam (*Dioscorea opposita* Thunb.) flesh and peel and the effective compounds [J]. J Food Sci, 2016, 81 (6): H1553-H1564.
- [12] 朱金花, 东莹莹, 胡卫平, 等. 高效液相色谱法同时测定怀山药中 4 个山药素化合物[J]. 药物分析杂志, 2015, 35 (3): 396-400.
- [13] Kim H, Cao TQ, Yeo C, et al. Development and validation of quantitative analysis method for phenanthrenes in peels of the *Dioscorea* genus [J]. J Microbiol Biotechn, 2022, 32 (8): 976-981.
- [14] Kum EJ, Park SJ, Lee BH, et al. Antifungal activity of phenanthrene derivatives from aerial bulbils of *Dioscorea batatas* Decne [J]. J Life Sci, 2006, 16 (4): 647-652.
- [15] Lim JS, Hahn D, Gu MJ, et al. Anti-inflammatory and antioxidant effects of 2, 7-dihydroxy-4, 6-dimethoxy phenanthrene isolated from *Dioscorea batatas* Decne [J]. Appl Biol Chem, 2019, 62: 29.
- [16] Lee W, Jeong SY, Gu MJ, et al. Inhibitory effects of compounds isolated from *Dioscorea batatas* Decne peel on particulate matter-induced pulmonary injury in mice [J]. J Toxicol Env Heal A, 2019, 82 (12): 727-740.
- [17] 刘森, 唐雪莲, 赵作威, 等. 怀山药皮花青素理化特性研究[J]. 中南药学, 2024, 22 (10): 2764-2768.
- [18] 葛梦焕. 怀山药皮酚类化学成分及其生物活性研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2022.
- [19] 葛梦焕, 阮元, 刘森, 等. 山药化学成分及其生物活性研究进展[J]. 食品营养化学, 2023, 1 (2): 1-14.

(收稿日期: 2025-01-25; 修回日期: 2025-03-26)

综述

提升难溶性药物口服吸收的脂质递送策略

李小花, 胡罗娟*, 韩思飞* (中国药科大学药学院, 南京 210009)

摘要: 低水溶性导致的口服生物利用度低下是药物开发中的常见难题。然而, 水溶性极低的脂质却能通过乳化、脂解等一系列生理过程实现高达 95% 的吸收效率, 该特性为提升难溶性药物的吸收提供了重要的启示。本文系统探讨脂质策略在难溶性药物递送中的应用机制, 包括①脂基制剂通过提供脂溶性环境, 提高药物的溶解度和生物利用度; ②脂质前药通过将药物与脂质分子进行共价结合, 通过模拟脂质生理代谢途径, 实现药物的高效吸收; ③离子液体通过将药物与特定亲脂性离子配对形成亲脂性盐, 降低药物晶格能, 或者直接将药物溶解于离子液体, 提高药物的溶出和吸收。本文通过多维度案例分析, 阐明上述策略的增效机制及临床转化潜力, 为难溶性药物的口服优化开发提供有价值的理论参考。

关键词: 低水溶性药物; 脂基制剂; 脂质前药; 离子液体; 口服生物利用度

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)12-3609-12

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.022

Lipid delivery strategies to enhance oral absorption of drugs with poor solubility

LI Xiaohua, HU Luojuan*, HAN Sifei* (School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009)

Abstract: Low oral bioavailability due to poor water solubility is a common challenge in drug development. However, lipids, despite very low water solubility, can achieve high absorption efficiencies of more than 95% through physiological processes such as emulsification and lipolysis, which provides important insights for enhancing the absorption of drugs with poor solubility. This study explored the mechanism of lipid strategies in drug delivery, including: ① Lipid-based formulations enhance drug solubility and bioavailability by providing a lipophilic environment; ② Lipid prodrugs are covalently bound to lipid molecules to facilitate drug absorption by mimicking lipid physiological metabolic pathways; ③ Ionic liquids greatly improve drug dissolution and absorption by pairing drugs with specific lipophilic ions to form lipophilic salts, reducing the drug lattice energy, or by dissolving the drug in the ionic liquid. Through multi-dimensional case studies, this paper elucidated the synergistic mechanism and clinical translation potential of the above strategies to provide theoretical reference for the development of insoluble drugs for oral administration.

Key words: drug with poor solubility; lipid-based formulation; lipid prodrug; ionic liquid; oral bioavailability

基金项目: 江苏省药物分子设计与成药性优化重点实验室资助项目 (No.DDORC202202)。

作者简介: 李小花, 女, 硕士研究生, 主要从事难溶性药物代谢动力学研究, email: 3170487763@qq.com *通信作者: 韩思飞, 男, 特聘副研究员, 博士研究生导师, 主要从事淋巴系统药物转运与脂质药物系统研究, email: sifei.han@cpu.edu.cn; 胡罗娟, 女, 特聘副研究员, 硕士研究生导师, 主要从事前体药物促口服吸收、大分子淋巴系统转运与优化、淋巴递送与疾病治疗研究, email: luojuan.hu@cpu.edu.cn

口服给药具有安全性、便捷性、患者依从性好及医疗成本低优势,是小分子药物临床给药的首选方式。尤其在医疗资源紧张(如公共卫生事件或偏远落后地区),口服产品可有效降低冷链运输、专业操作及医疗废弃物处理等复杂性,对保障区域及全球药物可及性具有重要意义。然而,药物口服生物利用度受多重因素制约,其中难溶性(低水溶性)问题尤为突出,是口服药物开发过程中的主要瓶颈之一^[1]。根据生物药剂学分类系统(biopharmaceutics classification system, BCS),若药物在 37℃、pH 在 1.0~7.5 内,其临床使用的最大推荐剂量在 250 mL(或更少)的水溶性介质中无法完全溶解,则该药物被界定为难溶性药物,并进一步被划分为 BCS II 类(低溶解度、高渗透性)和 BCS IV 类(低溶解度、低渗透性)^[2]。据统计,美国药典收录的约 33% 药物、处于临床前及临床开发阶段的约 75% 候选化合物以及约 90% 新化学实体存在难溶性特征^[3]。此类药物因难溶性导致口服生物利用度低下,常需增加给药剂量以达到有效血药浓度(会增加毒性风险)或采用肠外给药(会增加治疗成本),严重制约了临床用药安全性与可及性^[4-5]。针对上述挑战,药学工作者开发了多种策略,包括改变剂型、制备纳米晶体、制备固体分散体、使用助溶剂等药剂学手段,以及改变药物分子结构、筛选晶型/盐型、合成前体药物等药物化学手段^[6]。以脂质辅料为主体所构成的脂基制剂(lipid-based formulation)是较为常用的药剂学方法,低水溶性、高亲脂性药物通过溶解于油脂,可借助脂质在胃肠道消化吸收过程中形成的特定乳滴、囊泡和胶束等结构实现对药物的增溶,从而增加药物的口服吸收^[6]。当药物本身的亲脂性或在脂基制剂中的溶解度有限时,通过前体药物或离子液体等形式对药物分子进行适当的亲脂化改造,即合成共价的脂-药衍生物或形成非共价结合的亲脂性离子液体盐,也是优化药物口服吸收的有效手段。鉴于脂质策略在助力药物口服吸收中的广泛应用和显著优势,本文深入探讨了 3 种脂质策略的作用机制,并系统归纳了近年来的研究案例,旨在为难溶性药物口服产品研发提供坚实的理论依据和实用的技术参考。

1 脂质递送系统概述

我国居民膳食,以三酰甘油(triglyceride, TG)为主的脂质(还包含少量的磷脂、胆固醇及其衍生物等^[7])平均每日摄入约为 50 g。这些比常规口服药物剂量高出若干数量级的油脂可被机体高效吸收(>95%),而完全不受 TG 极低水溶性(远低于 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,甚至低于多数难溶性小分子药物)的限制。TG 的高效吸收利用主要依赖其一系列特

有的消化吸收过程,具体包括乳化、消化、吸收、重合成及经脂蛋白转运等。如图 1 所示,摄入的 TG 在胃部与消化液基本是油-水相互分离的两相,在经历胃部蠕动物理混合与脂肪酶的初步分解后,原先自成一相的油脂开始分散为油滴;进入小肠后,在胆盐、磷脂与胰脂肪酶(及辅酶)的共同作用下, TG 进一步分散成细小的乳滴并被水解为单甘油酯(monoglyceride, MG)和游离脂肪酸(fatty acid, FA);MG 和 FA 借助胆盐和磷脂等成分形成十余纳米至数十纳米的超微混合胶束结构,实现其在消化液中的高效分散与扩散,进而被小肠上皮细胞吸收。在肠细胞内,短链脂质和中链脂质(碳原子数量<12 的 MG 和 FA)通过被动扩散穿越肠上皮细胞进入固有层,经肠系膜毛细血管流入门静脉,最终通过肝脏进入体循环。而长链脂质(碳原子数量 ≥ 12 的 MG 和 FA)则在肠细胞内迁移至内质网,在其中重新酯化为 TG,随后与载脂蛋白等组装成乳糜微粒。这些乳糜微粒通过胞吐作用分泌至肠上皮细胞外,经肠系膜淋巴管吸收转运至胸导管,最终汇入锁骨下静脉进入体循环。这一淋巴转运途径使药物绕过肝脏,显著降低首过效应^[6, 8-9]。

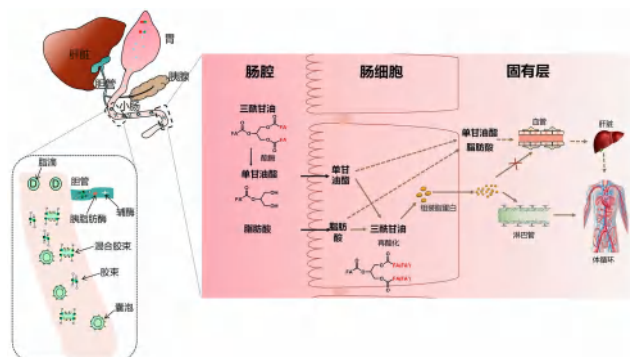


图 1 TG 体内吸收示意图(绘图软件: word processing system office, WPS Office)

Fig 1 Schematic diagram of TG absorption in vivo (Source: word processing system office, WPS Office)

脂质独特的吸收途径为提升难溶性药物的口服吸收提供了重要启示:通过构建脂溶性环境有望促进药物溶解和跨膜转运。例如,阿比特龙^[10]、灰黄霉素^[11]、瑞戈非尼^[12]等难溶性药物与食物同服时吸收显著增强,这很可能归功于食物中的油脂摄入后刺激胆汁和胰液分泌增加,进而促进混合胶束、囊泡或油珠等的形成,实现药物分子的增溶及肠上皮细胞吸收增强^[13-15]。脂基制剂策略在提高难溶性药物口服吸收方面的应用,正是基于对该生理机制的理解和利用。

1.1 脂基制剂概述

脂基制剂,作为基于脂质载体的药物递送系统,通常由脂质、表面活性剂、助表面活性剂和/或有机溶剂等组成。该类制剂通过将药物分子溶解

或分散于脂质基质中,形成胶束、微乳或者纳米乳等自组装结构,显著提升难溶性药物在胃肠道中的溶解度与吸收效率。此外,制剂中的脂质(如 TG)在消化吸收进入肠细胞并经过再酯化并组装乳糜微粒的过程中,部分药物分子有可能被动吸附至乳糜微粒,随乳糜微粒经淋巴系统吸收,绕过肝脏首关代谢,进一步提高口服生物利用度。脂基制剂涵盖多种形式,包括脂质体(liposome)、固体脂质纳米颗粒(solid lipid nanoparticle, SLN)、自乳化药物递送系统(self-emulsifying drug delivery system, SEDDS)[包括自微乳化药物递送系统(SMEDDS)和自纳米乳化药物递送系统(SNEDDS)]以及纳米结构脂质载体(nanostructured lipid carrier, NLC)等。这些制剂在提高药物溶解度、增强稳定性及优化生物利用度方面展现出显著优势,已被广泛应用于药物递送领域^[16-17]。研究表明,自首款口服脂基制剂上市 20 余年来,其制备过程中最常用的辅料主要为中链 TG (medium chain triglyceride, MCT) 或长链 TG (long chain triglyceride, LCT)。其中 MCT 通常来源于椰子油和棕榈籽油,而 LCT 常来源于玉米油、花生油、芝麻油和大豆油等^[18]。

1.2 脂质前药概述

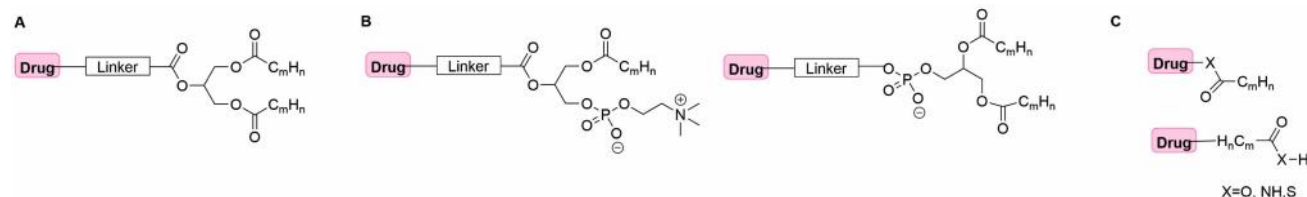


图 2 脂质前药类型^[21]

Fig 2 Lipid prodrug types^[21]

A. TG 类前药, 通常通过 sn-2 位置连接 (glyceride-based prodrugs, usually linked through the sn-2 position); B. 磷脂类前药, 药物结合到甘油主链 (以 sn-2 位置为例)(左)或磷酸基(右)[phospholipid-based prodrugs, with the drug conjugated to the glycerol backbone (sn-2 position as an example)(left) or the phosphate group (right)]; C. 脂肪酸类前药, 药物直接与羧酸盐(上)或 ω -碳(下)相连 [fatty acid-based prodrugs, with the drug linking to the carboxylate (upper) or the ω -carbon (lower)]

1.3 离子液体概述

离子液体,由有机阳离子和有机/无机阴离子构成的盐类液体^[22](亦称亲脂性盐^[23]),其阴阳离子体积庞大且高度不对称。这种独特的结构赋予其在室温或接近室温条件下呈现液态的性质,因为强大的空间位阻使阴阳离子能够自由振动、转动甚至平动,从而破坏有序的晶体结构(以桂利嗪为例,见图 3)^[24]。起初,离子液体在天然产物活性成分的提取中作为绿色溶剂方面得到广泛应用,显著减少了制药过程中的环境污染,并有效满足了原料药及中间体合成对有机溶剂的需求^[25]。近年来,研究发现离子液体在药物制剂领域展现出多重功能:首先,其可通过与药物分子形成离子对或共晶结构,显著提升药物溶解度;其次,能保护药物分子

脂质前药,通过将药物分子与脂质分子共价结合,以模拟天然脂质的吸收途径。其主要类型包括 TG 前药、磷脂前药和脂肪酸前药等(如图 2 所示)^[19]。TG 的吸收途径前文已详述,主要通过水解、吸收、再酯化及组装成乳糜微粒,从而经肠系膜淋巴管转运(如图 1 所示)。磷脂的吸收与 TG 类似,口服摄入后,经胰磷脂酶 A₂ 催化水解,生成相应的脂肪酸和 sn-1 溶血磷脂。这些水解产物被肠上皮细胞吸收后,部分 sn-1 溶血磷脂在溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶作用下重新酯化为磷脂分子。随后,新合成的磷脂被整合到脂蛋白组装途径中,参与乳糜微粒的形成,最终也通过肠淋巴系统进入全身循环^[20]。脂肪酸的吸收则根据具体的脂肪酸类型(例如不同碳链长度),存在两种吸收途径:短链脂肪酸(如碳原子数量 < 12)在肠细胞内可直接穿越细胞进入肝门静脉,经肝脏汇入体循环;长链脂肪酸(如碳原子数量 ≥ 12)则参与 TG 的再酯化,进而整合至乳糜微粒,通过肠系膜淋巴系统吸收再进入体循环。采用脂质前药设计策略后,药物有望被引入脂质吸收通路,进而显著增强其口服生物利用度和靶向递送效率,特别是实现淋巴系统靶向,为提升药物疗效提供了重要的技术途径^[21]。

免受酶降解或 pH 值变化的影响,提高药物在胃肠道内的稳定性;此外,还可以增强药物分子的亲脂性,使其更容易透过细胞膜的脂质双分子层^[26-28]。通过上述多重作用,离子液体为显著提高药物的口服生物利用度提供了新的策略和途径。

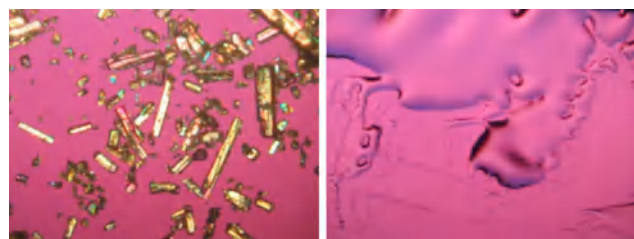


图 3 桂利嗪晶体(左)及桂利嗪离子液体(右)示意图^[29]

Fig 3 Schematic diagram of crystalline cinnarizine (left) and cinnarizine ionic liquid (right)^[29]

脂基制剂、脂质前药和离子液体作为提升难溶性药物口服生物利用度的三种策略,各自展现出独特的优势和局限性。脂基制剂凭借其制备过程的便利性和较低的成本,已成为改善难溶性药物成药性的常用方法。然而,其应用范围受限,尤其对于既难溶于水又难溶于油的高晶格能药物或需要高剂量的情况,效果并不理想。此外,脂质在消化道内的乳化、消化过程中常伴随从油相到乳滴、再到微分散胶束体系等界面性质的巨大变化,可能导致原先溶解在脂质体系中的药物在消化道内再次析出,从而导致口服吸收远低于预期^[15]。相比之下,脂质前药通过共价修饰显著提高药物的亲脂性,进而改善药物的溶解度、稳定性和生物利用度,对药物分子原有的亲脂性无特定要求^[30],且还具有靶向性强等优点,能够实现淋巴系统靶向,提高药物疗效。但是,脂质前药的合成过程相对复杂,成本较高,且活性原药的释放速率可能受个体酶活性差异的影响,导致疗效波动。离子液体作为一种新兴策略,不仅能够提高药物溶解度,还能保护药物免受酶降解和 pH 值变化的影响,同时增强药物的亲脂性。尽管如此,离子液体在应用中存在生物相容性隐患(可能对细胞膜或生物分子产生毒性)、代谢和清除机制的不明确性(可能导致在特定组织或器官中的积累),以及缺乏大规模临床试验数据等问题,其安全性和有效性尚未得到充分验证。

综上所述,脂基制剂、脂质前药和离子液体在提升难溶性药物口服生物利用度方面各有优缺点。在选择适宜的递送策略时,需综合考虑药物特性、制备成本、疗效稳定性和生物安全性等因素,以实现最佳的治疗效果。

2 脂质递送系统应用

为进一步阐述脂基制剂、脂质前药和离子液体在提升难溶性药物口服生物利用度方面的实际应用与效果,本文详细剖析各策略的代表性案例,旨在通过具体实例展示这些技术的应用及特点,并为未来药物递送系统的设计提供实践指导。

2.1 脂基制剂策略

脂基制剂除了在生物相容性和提升生物利用度方面的优势,还具备可控的药物释放特性、被动/主动靶向能力以及减少毒副作用的潜力,使得脂基制剂成为一种高效的药物递送系统。表 1 总结了多种药物通过脂基制剂形式实现口服生物利用度显著提升的实例(模型药物化学结构式见图 4)^[31-56]。本文选择脂质体、SLN、SEDDES 和 NLC 等中的代表性例子,介绍脂基制剂在难溶性药物递送中的广泛适用性和显著优势。

脂质体是由一个或多个同心脂质双层组成的磷脂囊泡,具有较好的生物相容性、较强的自组装能力、较高的载药量及可调控特性^[57]。利用这些特性,研究人员开发了基于海藻酸钠(sodium alginate, SA)和壳聚糖(chitosan, CH)的纳米复合材料、采用逐层涂层技术制备的负载羟基- α -山椒醇(hydroxy- α -sanshool, HAS)的脂质体(SA/CH-HAS 脂质体),旨在改善 HAS 的口服递送效率。HAS 是花椒中的一种亲脂性羟基脂肪酸,具有抗氧化、抗炎和抗糖尿病等多种药理活性,但其低水溶性和在低 pH 环境下的不稳定性限制了口服吸收。药代动力学研究表明,与游离 HAS 相比,SA/CH-HAS 脂质体的相对口服生物利用度显著提升至 433.04%^[58]。

SLN 由固态脂质和表面活性剂组成,具有生物相容性好、可降解、可提高生物利用度以及靶向递送等多重优势^[59-60]。以辛伐他汀(simvastatin, SVA)为例,药代动力学研究表明,与 SVA 混悬液相比,SVA SLN 制剂可显著延长药物在体内的平均驻留时间,且相对口服生物利用度高达 691.28%,有效解决了其低水溶性导致的生物利用度问题^[61]。

SEDDES 是由油相、表面活性剂和助表面活性剂组成的各向同性混合物,能在胃肠道中自发乳化形成纳米乳剂,显著提高药物溶解度和生物利用度^[62]。奥拉帕尼是一种高效抗肿瘤药物,因其低水溶性和低渗透性导致口服生物利用度低,往往需要高剂量给药,从而引发不良反应和患者依从性问题。为克服该局限,有研究人员开发了含 Capmul MCM 10%、Labrasol 80%和聚乙二醇(PEG)400 10%的 SMEDDS 制剂,该制剂能形成粒径很小的微乳液,在水中表现出更优异的分散性和稳定性,大鼠口服实验显示,与奥拉帕尼粉末相比,SMEDDS 制剂的峰浓度和生物利用度分别提高 4.2 倍和 3.2 倍,且生物利用度比市售 Lynparza 片剂高 2.4 倍;此外,体外细胞毒性实验显示,SMEDDS 处理组的 CT26 细胞死亡率低于 3%,表明该制剂在实验条件下安全,为临床应用奠定了安全保障^[63]。

NLC 是由固体脂质(70%~99%)和液体脂质(1%~30%)组成的复合递送系统,具有可调控的药物释放特性、卓越的载药能力以及良好的生物相容性和可降解性^[64]。替格瑞洛是一种新型非竞争性、直接作用的抗血小板药物,通过抑制 P2Y₁₂ 受体预防血栓形成,因其低溶解度和低渗透性被归为 BCS IV 类药物,为改善其口服吸收情况,研究者将其制备成替格瑞洛 NLC,并进行体内药代动力学研究,实验结果表明,与常规混悬液相比,替格瑞洛 NLC 制剂的相对口服生物利用度达 254.99%,显著改善了药物的吸收特性^[65]。

表 1 常见难溶性药物采用口服脂基制剂提高生物利用度
Tab 1 Oral lipid-based formulations used for drugs with poor solubility to enhance their bioavailability

策略	模型药物	编号	水溶性 / (mg·mL ⁻¹)	亲脂性 (log <i>P</i>)	口服生物 利用度限制 因素	制剂配方	体内实验结果
脂质体	他克莫司 ^[31]	1	0.004 02	3.19	水溶性低、p 糖蛋白外排、 首关代谢强	他克莫司:二硬脂磷脂酰胆碱:胆固醇= 1:2:0.5	与混悬液相比,相对口服生物利用度为 193.33%
	洛伐他汀 ^[32]	2	0.0243	4.11	水溶性低、首 关代谢强	洛伐他汀:大豆磷脂酰胆碱:胆固醇= 1:0.45:0.05	与混悬液相比,相对口服生物利用度为 162.26%
	多西他赛 ^[33]	3	0.127	2.59	水溶性低	卵磷脂、脱氧胆酸钠和硬脂酰胺	与混悬液相比,半衰期延长了 0.44 倍、 相对口服生物利用度为 309.95%
	环孢素 A ^[34-35]	4	0.006 ^b	3.69 ^a	水溶性低、低 渗透性	大豆磷脂酰胆碱和脱氧胆酸钠	与市售制剂 Sandimmune Neoral 相比,相 对口服生物利用度为 120.3%
	丁香酸 ^[36-37]	5	0.066 05 ^b	1.31 ^b	水溶性低	以 D- α -生育酚酰基聚乙二醇 1000 琥珀酸 为载体的丁香酸脂质体	与混悬液相比,半衰期延长了 1.83 倍、 平均驻留时间延长了 1.11 倍、相对口 服生物利用度为 280.38%
	甘草素 ^[38-39]	6	0.98 ^b		水溶性低	磷脂:胆固醇=6:1、80 mg 胆酸钠、甘 草素:总辅料=1:40	与混悬液相比,相对口服生物利用度为 883.85%
SLN	睾酮 ^[40]	7	0.0333	2.99	水溶性低、 首关代谢强	未提及	与十一酸睾酮油溶液相比,相对口服生物 利用度为 259.3%
	尼达尼布 ^[41]	8	0.0309	3.7	水溶性低	未提及	与悬浮液相比,半衰期延长了 0.95 倍、 平均驻留时间延长了 0.54 倍、相对口 服生物利用度为 287.03%
	索拉非尼 ^[42]	9	0.001 71	4.12	水溶性低	16.8 mg 索拉非尼游离碱、50 mg Miglyol 812、50 mg TPGS、50 mg Aeroperl 300	与粉末相比,峰浓度提高超过 4 倍
SEDDS	芫花素 ^[43-44]	10	0.0001		水溶性低、 低渗透性	0.5 mg·mL ⁻¹ 芫花素、20% Maisine CC、 60% Labrasol ALF、20% Transcutol HP	与混悬液相比,相对口服生物利用度为 353.29%
	非诺贝特 ^[45]	11	0.000 707	4.86	水溶性低	肉桂酸衍生物样物质 (CAOM) SMEDDS CAOM (LCT): 30% CAOM、40% Cremophor EL、30% Maisine 35-1	与混悬液相比,相对口服生物利用度为 837.37%
NLC	雷洛昔芬 ^[46]	12	0.000 512	5.45	水溶性低	5% 雷洛昔芬、单硬脂酸甘油酯、Capmul MCM C8、聚乙烯醇、10 mL 乙醇和丙酮 混合物 (1:1, <i>V/V</i>)	与混悬液相比,相对口服生物利用度为 374.92%
	塞来昔布 ^[47]	13	0.005 03	3.99	水溶性低、首 关代谢强	未提及	与市售药物 Celebrex 相比,相对口服生物 利用度为 142.22%
	芳樟醇 ^[48-49]	14	3.116 ^b		水溶性低	脂质:芳樟醇=5.5:1 2.5% 单硬脂酸甘油、2.5% 葵酸 / 辛酸甘油 酯、2.0% Span 80、4.0% Tween 80	与混悬液相比,相对口服生物利用度为 393.34%
	吡格列酮 ^[50]	15	0.004 41	3.17	水溶性低	吡格列酮、硬脂醇、柠檬油、Span 40、 Tween 20、PEG-4000	与混悬液相比,相对口服生物利用度为 171.15%
	奥氮平 ^[51]	16	0.0942	3.61	水溶性低、首 关代谢强	5 mg 奥氮平、20 mg Labrasol、1.5 mg 磷脂 酰胆碱、80 mg 胆固醇、Pluronic F127、 0.5% 正硅酸四乙酯	与混悬液相比,相对口服生物利用度为 107.54%
	山柰酚 ^[52]	17	0.178	1.99	水溶性低	山柰酚 NLC (KNLC): 山柰酚、35 mg 硬 脂酸、25 mg 单硬脂酸甘油酯、50 mg 辛 酸 / 葵酸三酰甘油、210 mg Cremophor EL	与混悬液相比,葵酸和棕榈酸通过 <i>N</i> -三 甲基壳聚糖连接形成 KNLC 的半衰期 分别延长了 1.32 倍和 1.59 倍、平均驻 留时间延长了 0.59 倍和 0.54 倍、相对 口服生物利用度为 1512.36% 和 818.48%
	亚微乳	18	0.008 79	3.58	水溶性低	亚微乳+油溶液	与混悬液相比,亚微乳 (长、中、短链 TG) 和油溶液 (长、中、短链 TG) 的 相对口服生物利用度分别为 295.88%、 199.25%、138.83%、279.15%、 257.43%、234.83%
	阿托伐他汀 ^[54]	19	0.000 63	4.24	水溶性低	0.3% 阿托伐他汀-磷脂复合物、5% 大豆 油、1.4% 卵磷脂、0.8% 吐温 80、1.0% Pluronic F-68、0.05% 油酸钠、2.25% 甘油	与市售制剂 Lipitor 相比,口服生物利用 度为 258.36%

续表 1

策略	模型药物	编号	水溶性 / ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	亲脂性 ($\log P$)	口服生物 利用度限制 因素	制剂配方	体内实验结果
其他	坎地沙坦 酯 ^[55]	20	0.007 45	3.44	水溶性低	坎地沙坦酯:大豆油: Solutol HS-15 : Tween 80 = 1 : 6 : 10 : 20	与混悬液相比, 相对口服生物利用度为 1044.36%
	姜黄素 ^[56]	21	0.005 75	3.62	水溶性低	姜黄素双离子脂质纳米系统: 单硬脂酸甘 油酯、十六烷基三甲基溴化铵(阳离子 表面活性剂)、十二烷基硫酸钠(阴离子 表面活性剂)、大豆磷脂	与混悬液相比, 相对口服生物利用度为 420.3%

注: 水溶性及 $\log P$ (ALOGPS) 来源于 DrugBank; a. 来源于 DrugBank (Chemaxon); b. 来源于文献。

Note: Water solubility and $\log P$ (ALOGPS) from DrugBank; a. from DrugBank (Chemaxon); b. from the reference.

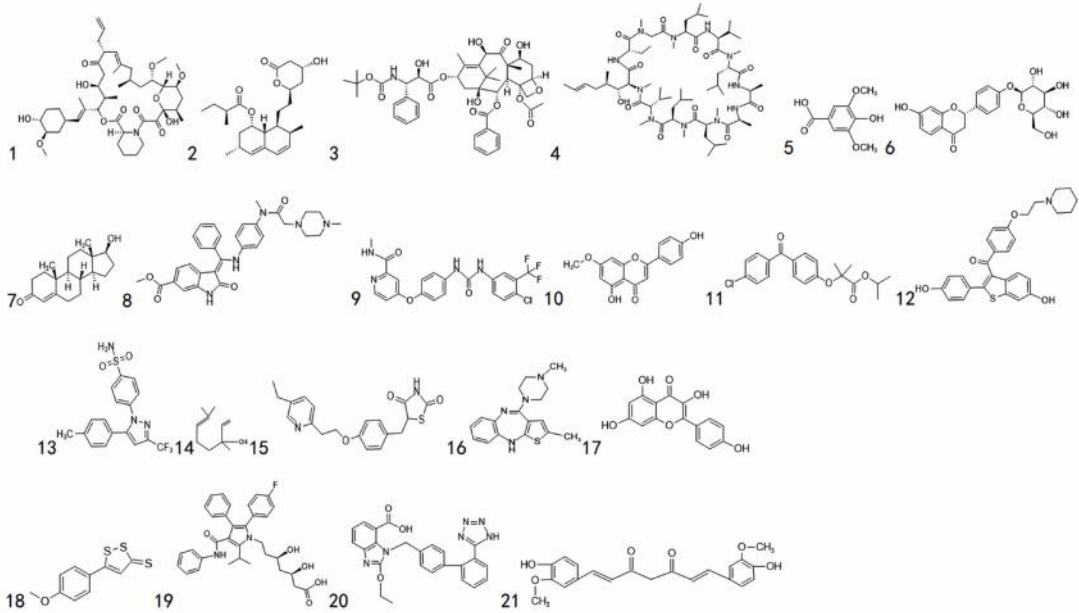


图 4 模型药物化学结构式 (来源于 KingDraw)

Fig 4 Chemical structure of model drugs (from KingDraw)

2.2 脂质前药策略

脂质前药策略通过模拟脂质的吸收机制, 可有效提高难溶性药物的吸收效率。表 2 列举了通过 TG 前药、磷脂前药和脂肪酸前药形式提升药物吸收的实例(模型药物及其前药化学结构式见图 5), 充分展示了该策略的多样性及其在改善口服生物利用度方面的潜力^[66-77]。本文选取其中两个代表性例子进行深入阐述。

拉罗他赛(larotaxel, LTX)和 SB-T-1214 (SBT) 均为新型紫杉烷类药物, 具有广谱抗肿瘤活性, 尤其对耐药性肿瘤效果显著, 但这两种药物水溶性低、膜通透性差及首过效应严重限制了口服应用。为突破这些限制, 研究人员设计并合成了通过二硫键(S-S)桥接的 LTX 和 SBT 的 TG 前药(即 LTX-S-S-TG 和 SBT-S-S-TG), 并将其溶解至 SNEDDS 中。大鼠药代动力学实验表明, LTX-S-S-TG SNEDDS 的相对口服生物利用度较 LTX 溶液和 LTX SNEDDS 分别提升至 453.0% 和 171.8%, 绝对口服生物利用度达到 27.0%; SBT-S-S-TG SNEDDS 的相对口服生物利用度较 SBT

溶液和 SBT SNEDDS 分别增至 342.2% 和 221.2%, 绝对口服生物利用度为 18.5%^[78]。这些结果证实了 TG 前药与 SNEDDS 制剂策略的协同作用在提高紫杉烷类药物口服生物利用度方面的巨大潜力。

葛根素是葛根的主要活性成分, 具有血管舒张、心脏保护、神经保护、抗氧化及抗炎等多种药理作用, 广泛应用于心血管疾病治疗。然而, 作为 BCS IV 类药物, 葛根素水溶性差、口服吸收不佳, 严重限制了它的临床应用^[79]。为解决这一问题, Mo 等^[80]合成了葛根素脂肪酸前药-葛根素酸酯(puerarin acid esters, PAES), 包括葛根素丙酸酯(puerarin propionate, PP)、葛根素己酸酯(puerarin hexanoate, PH)和葛根素肉豆蔻酸酯(puerarin myristate, PM)。大鼠口服给药实验评估显示, 与游离葛根素相比, PAES 的口服清除率显著降低, 平均驻留时间明显延长。具体而言, PP、PH 和 PM 的相对口服生物利用度分别达到 123.49%、559.95% 和 845.65%。PAES 作为葛根素衍生物, 不仅显著提升了葛根素的口服吸收效率, 还改善了其组织分布特性。

表 2 常见难溶性药物采用口服脂质前药提高生物利用度

Tab 2 Oral lipid prodrugs are used for many poorly soluble drugs to enhance their bioavailability

策略	模型药物	结构式 编号	水溶性 / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) ($\log P$)	亲脂性 ($\log P$)	口服生物利用 度限制因素	制剂配方	体内实验结果
TG 前药	睾酮 ^[66]	22	0.0333	2.99	水溶性低、首 过效应强	未提及	与市售药物十一酸睾酮相比，血浆 暴露量增加了 90 倍
	野黄芩 苷 ^[67-68]	23	0.2 ^b	- 2.56 ^b	水溶性低、首 过效应强	未提及	与游离药物溶液相比，Scu 的两种 TG 前药 (Scu-Me-C5-TG 和 Scu- Me-C5-bMe-TG) 的相对口服生物 利用度分别为 223.8% 和 245.2%
	紫杉醇 ^[69]	24	0.005 56	3.2	水溶性低、渗 透性低、首 过效应强、 胃肠道毒性	20 mg 紫杉醇 (PTX) 采用二硫键 连接的 TG 前药 (PTX-S-S-TG)、 300 mg 蛋黄卵磷脂、1 mL 橄榄油、 100 μL Transcutol HP	与市售药物 Taxol 相比，PTX-S- S-TG (辛酸 / 油酸 / 硬脂酸) 相对口服生物利用度分别为 129.05%、333.90% 和 428.85%
	多西他赛 ^[70]	25	0.127	2.59	水溶性低	MCT SMEDDS: 20 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 多西他 赛 TG 前药、三辛酸甘油酯 / Tween-80/ Transcutol HP = 26.5/63/10.5 LCT SMEDDS: 20 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 多西他赛 TG 前药、橄榄油 / 蛋黄卵磷脂 / Transcutol HP = 70/21/9	相对口服生物利用度: DTX-TG 油溶液较 MCT SMEDDS 为 238.92%、DTX-TG LCT SMEDDS 较游离药物为 508%; 绝对口服 生物利用度: 游离药物和 DTX- TG LCT SMEDDS 为 8% 和 41%
磷脂前药	SN38 ^[71]	26	0.29	2.73	水溶性低、低 渗透性	10 mg SN38 溶血磷脂偶联物、5 mg 卵 磷脂、1 mg DSPE-mPEG ₂₀₀₀	与伊立替康溶液相比，半衰期延长 了 2.43 倍，静脉给药的相对生 物利用度为 365.85%
	维生素 E 琥 珀酸 ^[72]	27	0.000 011 8	7.96	水溶性低、生 物利用度低	5 mg 双维生素 E 琥珀酸磷脂偶联物、 5 mL PBS、15 mL 氯仿	
	全反式维甲 酸 ^[73]	28	0.004 77	5.66	水溶性低、半 衰期短、不 良反应显著	10 mg 二聚体全反式维甲酸磷酸化胆 碱、5 mL 二氯甲烷 / 甲醇 (1/1)、10 mL 磷酸盐缓冲液 (PBS)	与游离药物相比，半衰期延长了 1.16 倍，静脉给药的相对生物利 用度为 283.71%
脂肪酸前 药	紫杉醇 ^[74]	29	0.005 56	3.2	水溶性低、低 渗透性、首 过效应强、 胃肠道毒性	PTX 采用二硫键连接的亚油酸前 药 (PTX-S-S-LA) SMEDDS: 30 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ PTX-S-S-LA、14% Maisine 35-1、68% Tween 80、18% Transcutol HP	与游离药物溶液相比，相对口服 生物利用度: PTX SMEDDS 为 147.5%，PTX-S-S-LA SMEDDS 为 264.9%
	SN38 ^[75]	30	0.29	2.73	水溶性低、低 渗透性	SN38 十一酸前药 (SN38-unde20) SMEDDS: 0.5% SN38-unde20、 10% Labrafil、77% ~ 78% Labrasol、 10% Transcutol、2% ~ 3% TPGS	与游离药物溶液相比，相对口服生 物利用度为 11685.71%
	喜树碱 ^[76]	31	0.511	1.91	水溶性低、低 渗透性	喜树碱 (CPT) 通过二硫键连接的棕 桐酸前药 (CPT-SS-PA) SLN: 2.50 g 单硬脂酸甘油酯、1.00 g 泊洛沙姆 188、0.05 g CPT/0.11 g CPT-SS-PA、 50 mL 去离子水	相对口服生物利用度: 与 CPT 混悬 液相比为 389.95%，与 CPT SLN 相比为 166.27%
	CAT3 ^[77]	32			低脂溶性、水 溶性低	油酸 CAT3 结合物 (oleic acid-CAT3、 OA-CAT3) SLN: 60 mg OA-CAT3、 0.3 g compritrol 888 ATO、0.2 g Lipoid S75、0.1 g Tween 80、0.1 g 泊洛沙姆 188	相对口服生物利用度: 与游离药物 混悬液相比为 170.65%，与 OA- CAT3 相比为 233.68%，与 CAT3 SLN 相比为 147.52%

注: 水溶性及 $\log P$ (ALOGPS) 来源于 DrugBank; a. 来源于 DrugBank (Chemaxon); b. 来源于文献。

Note: Water solubility and $\log P$ (ALOGPS) from DrugBank; a. from DrugBank (Chemaxon); b. from the reference.

2.3 离子液体策略

离子液体作为一种多功能溶剂，不仅可作为辅料提高难溶性药物的溶解度和生物利用度，还可通过其阳离子或阴离子与药物活性成分结合，显著改善药物的稳定性和释放特性。表 3 详细列举了利用离子液体策略提升难溶性药物口服吸

收实例 (模型药物及其离子液体化学结构式见图 6)^[81-91]，本文选取代表性药物进行详细阐述。

2.3.1 离子液体作为辅料 槲皮素是一种天然黄酮类化合物，具有抗炎、抗病毒和抗肿瘤等多种药理功效，但其水溶性较差、生物利用度极低 ($< 3.6\%$)，严重限制了临床应用。宣婧婧等^[92]

表 3 常见难溶性药物采用口服离子液体提高生物利用度
Tab 3 Oral ionic liquids are used for many poorly soluble drugs to enhance their bioavailability

策略	模型药物	结构式 编号	水溶性 / (mg • mL ⁻¹)	亲脂性 (logP)	口服生物利用 度限制因素	制剂配方	体内实验结果
作为辅 料	达那唑 ^[81]	33	0.0176	3.62	水溶性低、首过效 应强	SEDDS _{liquids} : 30% 脂质 (大豆 油: MaisineTM 35-1, 1 : 1)、60% Cremophor EL、10% 乙醇 SEDDS _{NTF2} : 30%[hhcpy][NTf2]、60% Cremophor EL、10% 乙醇 SEDDS _{C10SO4} : 30%[C _{8mf} py][C ₁₀ SO ₄]、 60% Cremophor EL、10% 乙醇 SEDDS _{C18SO4} : 30%[C _{8mf} py][C ₁₈ SO ₄]、 60% Cremophor EL、10% 乙醇	与达那唑 SEDDS _{liquids} 相比, 相对口服 生物利用度: SEDDS _{NTF2} 为 19.3%、 SEDDS _{C10SO4} 为 31.1%、SEDDS _{C18SO4} 为 97.4%、晶体混悬液为 22.5% [SEDDS _{N(CN)2} 导致药物结晶]
	索拉非尼 ^[82]	34	0.001 71 (0.000 004 4 ^b)	4.12	水溶性低、需高剂 量且频繁给药	胆碱和香叶酸离子液体 (CAGE)	与盐水溶液相比, 离子液体的相对口服 生物利用度为 340.0%
	环孢素 A ^[35, 83]	35	0.006 ^b	3.69 ^a	水溶性低、个体差 异大、脂质体载 药量低	未提及	与混悬液相比, 离子液体的半衰期延 长了 3.41 倍、平均驻留时间延长 0.77 倍、相对口服生物利用度为 281.03%
	维奈托克 ^[84-85]	36	0.000 933 (0.000 004 2 ^b)	6.92	水溶性低	维奈托克肉碱 - 亚油酸离子液体的纳 米乳剂系统: 10 mg • kg ⁻¹ 维奈托克、 40% (肉碱 - 亚油酸: 单亚油酸甘油 酯 = 1 : 1)、40% Kolliphor ELP、 20% Transcutol HP	与混悬液相比, 离子液体的相对口服 生物利用度为 459.79%
作为阳 离子	萘普生 ^[86-87]	37	0.0511	3.29	水溶性低	未提及	与混悬液相比, 离子液体的相对口服 生物利用度为 119.69%
	甲氨蝶呤 ^[88-89]	38	0.0819 (0.1 ^b)	— 0.05	水溶性低	未提及	与钠盐相比, [ProEt][MTX] 相对口服 生物利用度最高, 为 460.0%
	法匹拉韦 ^[90]	39	8.7 (7 ^b)	0.49	水溶性低、需高剂 量给药 3600 mg • d ⁻¹	[TMA][FAV] 具有较高的热稳定性	与 FAV 对照组相比, [AlaEt][FAV] 相对口服生物利用度最高, 为 190.0%
作为阴 离子	桂利嗪 ^[29]	40	0.75	5.88 ^a	水溶性低	长链 SEDDS: 30% 脂质 (大豆 油: Maisine 35-1, 1 : 1)、60% Kolliphor EL、10% 乙醇	与游离碱水溶液相比, 游离碱 SEDDS 和离子液体 SEDDS 相对口服 生物利用度为 279.9% 和 493.9%
	伊曲康唑 ^[29]	41	0.009 64	5.48	水溶性低	长链 SEDDS: 60% 脂质 (大豆 油: Maisine 35-1, 1 : 1)、30% Kolliphor EL、10% 乙醇	与市售制剂 Sporanox 相比, 相对口服 生物利用度为 246.0%
	厄洛替尼 ^[91]	42	0.008 91	3.13 (3.1 ^b)	亲脂性高、水溶性 低、熔点高	中链 SEDDS: 20% 单辛酸甘油酯、 40% 单辛酸丙二醇酯、40% 聚氧乙 烯 35 蓖麻油	与游离碱相比, 离子液体中链 SEDDS 相对口服生物利用度为 117.2%
	卡博替尼 ^[91]	43	0.001 99	4.01	亲脂性高、水溶性 低、熔点高	长链 SEDDS: 30% 玉米油、30% 单亚 油酸甘油酯、30% 聚氧乙烯 35 蓖麻 油、10% 乙醇	与游离碱相比, 离子液体长链 SEDDS 的相对口服生物利用度为 177.1%

注: 水溶性及 logP (ALOGPS) 来源于 DrugBank; a. 来源于 DrugBank (Chemaxon); b. 来源于文献
Note: Water solubility and logP (ALOGPS) from DrugBank; a. from DrugBank (Chemaxon); b. from the reference.

合成了氢氧化胆碱与 6 种不同酸的离子液体, 并从中筛选出增溶效果最为显著的香叶酸胆碱和山梨酸胆碱, 体内实验表明, 与槲皮素混悬液相比, 这两种离子液体的相对口服生物利用度分别高达 588.0% 和 501.9%, 证实了离子液体在提升难溶性药物的溶解度和口服吸收效率方面的潜力。
2.3.2 离子液体作为阳离子 维甲酸 (tretinoin, Tre) 是维生素 A 的活性代谢物, 在调节细胞分化、增殖和凋亡等过程中发挥重要作用, 但其临床应用受限于水溶性差和首过效应显著。研究通过将 Tre 和

胆碱 (choline, Ch) 制备为离子液体 [Ch][Tre], 使其溶解度从 0.24 μg • mL⁻¹ 提升至 42.10 g • mL⁻¹[93]。与 Tre 混悬液相比, 进一步与 Ch 和香叶酸 (geranic acid, Ger) 离子液体 ([Ch][Ger]) 混合后给药大鼠的相对口服生物利用度可达 361.4%。
2.3.3 离子液体作为阴离子 帕唑帕尼 (pazopanib, PAZ) 是一种酪氨酸激酶抑制剂, 用于治疗晚期肾细胞癌和软组织肉瘤。然而, PAZ 水溶性差、口服生物利用度低、患者间个体差异显著且受食物效应影响较大, 限制了其临床应用。Jadhav 等 [94] 设计并

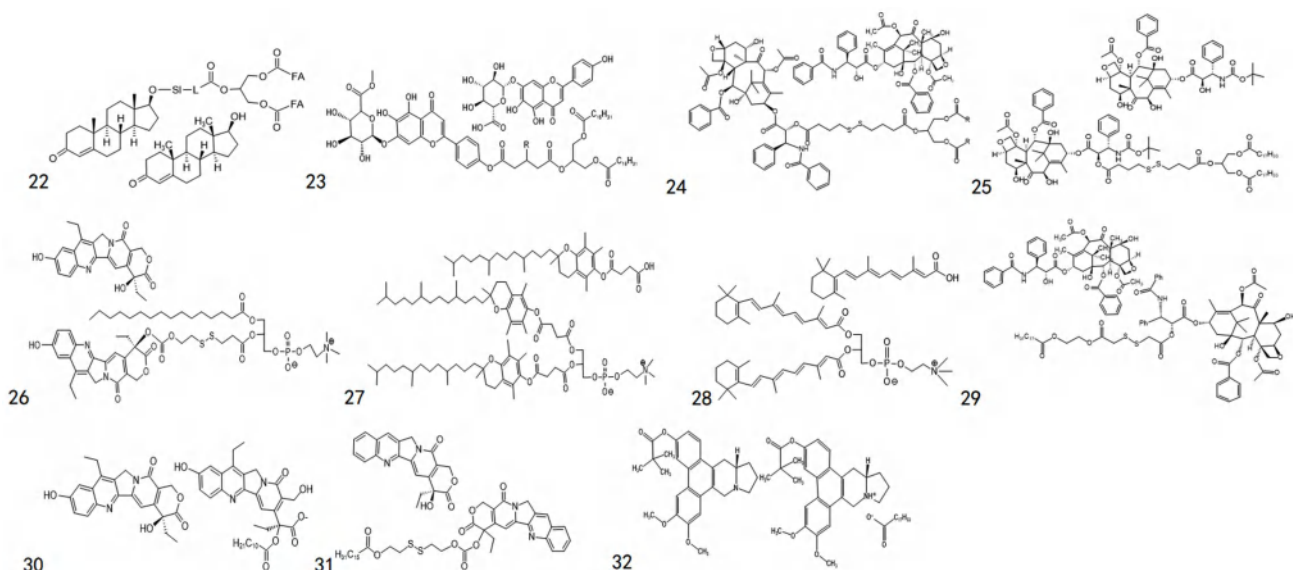


图 5 模型药物及其脂质前药化学结构式 (来源于 KingDraw)

Fig 5 Chemical structure of model drugs and its lipid prodrugs (from KingDraw)

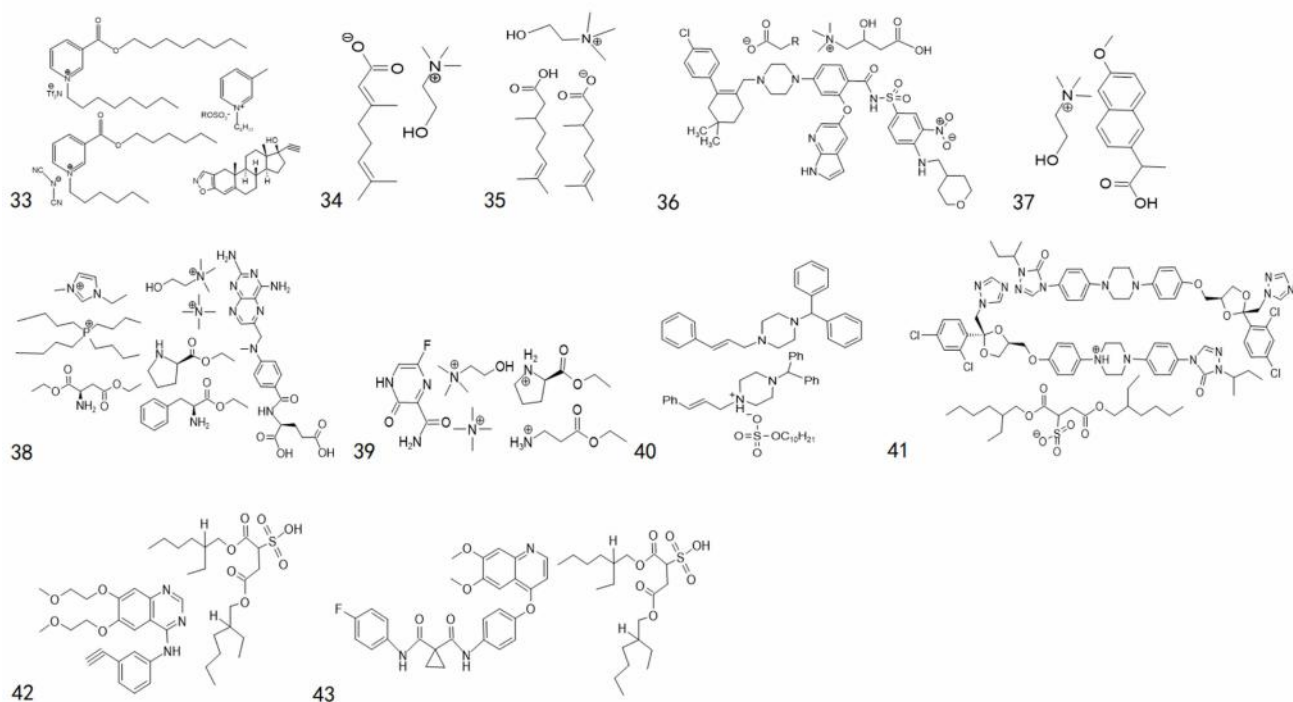


图 6 模型药物及其离子液体的化学结构式 (来源于 KingDraw)

Fig 6 Chemical structure of model drugs and its ionic liquids (from KingDraw)

合成了以 PAZ 为阳离子、docusate (DOC) 为阴离子的亲脂性盐 (PAZ-DOC), 并将其溶解到脂基制剂中。体外实验表明, PAZ-DOC 在多种溶剂中的溶解度显著提高, 其熔点远低于结晶帕唑帕尼, 表明其物理化学性质得到改善; 体内药代动力学研究显示, 与市售制剂 Votrient 相比, PAZ-DOC 脂基制剂的相对口服生物利用度达到 259.8%, 为帕唑帕尼的临床应用提供了新的解决方案。

3 总结与展望

在药物递送领域, 脂基制剂、脂质前药与离子

液体作为 3 种重要的技术策略, 各自在提升难溶性药物递送效率方面取得了显著进展。值得注意的是, 这些策略并非孤立存在, 药学工作者可以根据药物特性和具体需求进行灵活组合, 例如, 脂基制剂与脂质前药、脂基制剂与离子液体的联合应用, 可进一步优化药物的递送效率和靶向性。这些多元化的应用方式, 为药物递送系统的设计提供了更加丰富的选择。随着对药物递送机制的深入理解、新型脂质药用辅料的涌现以及精准药物递送理念的快速发展, 脂基制剂、脂质前药与离子液体在药物递

送领域的应用有望迎来更广阔的空间。

参考文献

- [1] Alqahtani MS, Kazi M, Alsenaidy MA, et al. Advances in oral drug delivery [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 618411.
- [2] Wu CY, Benet LZ. Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system [J]. *Pharm Res*, 2005, 22 (1): 11-23.
- [3] Nyamba I, Sombié CB, Yabré M, et al. Pharmaceutical approaches for enhancing solubility and oral bioavailability of poorly soluble drugs [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2024, 204: 114513.
- [4] Kawabata Y, Wada K, Nakatani M, et al. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: basic approaches and practical applications [J]. *Int J Pharm*, 2011, 420 (1): 1-10.
- [5] Elsayed A, Al-Remawi M, Jaber N, et al. Advances in buccal and oral delivery of insulin [J]. *Int J Pharm*, 2023, 633: 122623.
- [6] Williams HD, Trevaskis NL, Charman SA, et al. Strategies to address low drug solubility in discovery and development [J]. *Pharmacol Rev*, 2013, 65 (1): 315-499.
- [7] Infantes-Garcia MR, Verkempinck SHE, Carrière F, et al. Pre-duodenal lipid digestion of emulsions: relevance, colloidal aspects and mechanistic insight [J]. *Food Res Int*, 2023, 168: 112785.
- [8] Yáñez JA, Wang SWJ, Knemeyer IW, et al. Intestinal lymphatic transport for drug delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, 63 (10-11): 923-942.
- [9] Han SF, Hu LJ, Quach T, et al. Profiling the role of deacylation-reacylation in the lymphatic transport of a triglyceride-mimetic prodrug [J]. *Pharm Res*, 2015, 32 (5): 1830-1844.
- [10] Taheri A, Almasri R, Wignall A, et al. Enhancing the pharmacokinetics of abiraterone acetate through lipid-based formulations: addressing solubility and food effect challenges [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2024, 15 (11): 3770-3782.
- [11] Ong SGM, Ming LC, Lee KS, et al. Influence of the encapsulation efficiency and size of liposome on the oral bioavailability of griseofulvin-loaded liposomes [J]. *Pharmaceutics*, 2016, 8 (3): 25.
- [12] 黄琼叶, 赵杨, 刘仪, 等. 酪氨酸激酶抑制剂治疗胃肠间质瘤的药动学和治疗药物监测研究进展 [J]. *中国药房*, 2024, 35 (7): 890-895.
- [13] 蔡毅范, 张子辰, 卢懿, 等. 胆盐促进药物口服吸收的作用及机制研究进展 [J]. *中国医药工业杂志*, 2020, 51 (12): 1529-1540.
- [14] 张艳宝, 高慧桃, 崔馨戈, 等. 口服药物食物影响研究进展 [J]. *中国新药杂志*, 2023, 32 (18): 1843-1849.
- [15] Porter CJH, Trevaskis NL, Charman WN. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6 (3): 231-248.
- [16] Yan SJ, Cheng YX, Li LY, et al. Lipid-based formulations: a promising approach for poorly soluble drug delivery via the intestinal lymphatic system [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2023, 87: 104770.
- [17] 周航. 基于脂质基质的醋酸阿比特龙片剂的制备与评价 [D]. 青岛: 青岛大学, 2021.
- [18] Hauss DJ. Oral lipid-based formulations [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007, 59 (7): 667-676.
- [19] Cheng YX, Zhong CH, Yan SJ, et al. Structure modification: a successful tool for prodrug design [J]. *Future Med Chem*, 2023, 15 (4): 379-393.
- [20] Shackleford DM, Porter CJH, Charman WN. Lymphatic absorption of orally administered prodrugs [M]. Stella VJ, Borchardt RT, Hageman MJ, et al. *Prodrugs: challenges and rewards part 1*. New York: Springer New York, 2007: 653-682.
- [21] Zaro JL. Lipid-based drug carriers for prodrugs to enhance drug delivery [J]. *AAPS J*, 2015, 17 (1): 83-92.
- [22] 杜卓芳, 符渝昕, 程泽能. 阿戈美拉汀离子液体贴片的制备及体外透皮研究 [J]. *中南药学*, 2024, 22 (4): 908-913.
- [23] Lai A, Sahbaz Y, Ford L, et al. Stabilising disproportionation of lipophilic ionic liquid salts in lipid-based formulations [J]. *Int J Pharm*, 2021, 597: 120292.
- [24] 曹建平, 牟永晓, 陈媛媛, 等. 离子液体在药物研究中的应用 [J]. *药学报*, 2019, 54 (2): 245-257.
- [25] 汤忠亮, 黎晓, 张子怡, 等. 离子液体在药学研究中的应用 [J]. *安徽化工*, 2023, 49 (2): 23-26.
- [26] Shukla MK, Tiwari H, Verma R, et al. Role and recent advancements of ionic liquids in drug delivery systems [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15 (2): 702.
- [27] 姜毓鑫, 姜琦, 王迪, 等. 离子液体在药物递送中的应用 [J]. *药学报*, 2022, 57 (2): 331-342.
- [28] Jiang LX, Sun Y, Lu A, et al. Ionic Liquids: promising approach for oral drug delivery [J]. *Pharm Res*, 2022, 39 (10): 2353-2365.
- [29] Sahbaz Y, Williams HD, Nguyen TH, et al. Transformation of poorly water-soluble drugs into lipophilic ionic liquids enhances oral drug exposure from lipid based formulations [J]. *Mol Pharm*, 2015, 12 (6): 1980-1991.
- [30] 杜国新, 彭彩云, 方渡. 磷酸酯类前药设计及其合成方法研究进展 [J]. *中南药学*, 2008, 6 (1): 82-85.
- [31] Nekkanti V, Rueda J, Wang ZJ, et al. Design, characterization, and in vivo pharmacokinetics of tacrolimus proliposomes [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2016, 17 (5): 1019-1029.
- [32] Yanamandra S, Venkatesan N, Kadajji VG, et al. Proliposomes as a drug delivery system to decrease the hepatic first-pass metabolism: case study using a model drug [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2014, 64: 26-36.
- [33] Kim JH, Shin DH, Kim JS. Preparation, characterization, and pharmacokinetics of liposomal docetaxel for oral administration [J]. *Arch Pharm Res*, 2018, 41 (7): 765-775.
- [34] Guan PP, Lu Y, Qi JP, et al. Enhanced oral bioavailability of cyclosporine A by liposomes containing a bile salt [J]. *Int J Nanomedicine*, 2011, 6: 965-974.
- [35] Yang SG. Biowaiver extension potential and IVIVC for BCS Class II drugs by formulation design: case study for cyclosporine self-microemulsifying formulation [J]. *Arch Pharm Res*, 2010, 33 (11): 1835-1842.
- [36] Liu YK, Sun CY, Li WJ, et al. Preparation and characterization of syringic acid-loaded TPGS liposome with enhanced

- oral bioavailability and in vivo antioxidant efficiency [J]. AAPS PharmSciTech, 2019, 20 (3): 98.
- [37] 孙从永. 助眠天然活性成分丁香酸脂质体的制备及体内外评价研究 [D]. 镇江: 江苏大学, 2017.
- [38] Wang QL, Wei CM, Weng W, et al. Enhancement of oral bioavailability and hypoglycemic activity of liquiritin-loaded precursor liposome [J]. Int J Pharm, 2021, 592: 120036.
- [39] Nguyen TTH, Jung SJ, Kang HK, et al. Production of rubusoside from stevioside by using a thermostable lactase from *Thermus thermophilus* and solubility enhancement of liquiritin and teniposide [J]. Enzyme Microb Technol, 2014, 64-65: 38-43.
- [40] 陈建, 姜赛平. 鞣酐固体脂质纳米粒的药物动力学特点 [J]. 浙江医学, 2008, 30 (7): 698-700.
- [41] Kaur R, Shaikh TB, Priya Sripadi H, et al. Nintedanib solid lipid nanoparticles improve oral bioavailability and ameliorate pulmonary fibrosis in vitro and in vivo models [J]. Int J Pharm, 2024, 649: 123644.
- [42] Mans JC, Dong XW. The development of lipid-based sorafenib granules to enhance the oral absorption of sorafenib [J]. Pharmaceutics, 2023, 15 (12): 2691.
- [43] Li YJ, Hong JY, Li HW, et al. Genkwanin nanosuspensions: a novel and potential antitumor drug in breast carcinoma therapy [J]. Drug Deliv, 2017, 24 (1): 1491-1500.
- [44] Yin HF, Yin CM, Ouyang T, et al. Self-nanoemulsifying drug delivery system of genkwanin: a novel approach for anti-colitis-associated colorectal cancer [J]. Drug Des Devel Ther, 2021, 15: 557-576.
- [45] Abbasi S, Higashino H, Sato Y, et al. Maximizing the oral bioavailability of poorly water-soluble drugs using novel oil-like materials in lipid-based formulations [J]. Mol Pharm, 2021, 18 (9): 3281-3289.
- [46] Shah NV, Seth AK, Balaraman R, et al. Nanostructured lipid carriers for oral bioavailability enhancement of raloxifene: design and in vivo study [J]. J Adv Res, 2016, 7 (3): 423-434.
- [47] Zhu Y, Chen ML, Yang CZ, et al. Revealing changes in celecoxib nanostructured lipid carrier's bioavailability using hyaluronic acid as an enhancer by HPLC-MS/MS [J]. Drug Des Devel Ther, 2024, 18: 3315-3327.
- [48] Shi F, Zhao YY, Firempong CK, et al. Preparation, characterization and pharmacokinetic studies of linalool-loaded nanostructured lipid carriers [J]. Pharm Biol, 2016, 54 (10): 2320-2328.
- [49] 赵莹莹. 芳樟醇纳米结构脂质载体的制备及药动药效研究 [D]. 镇江: 江苏大学, 2016.
- [50] Faiz S, Arshad S, Kamal Y, et al. Pioglitazone-loaded nanostructured lipid carriers: in-vitro and in-vivo evaluation for improved bioavailability [J]. J Drug Deliv Sci Technol, 2023, 79: 104041.
- [51] Ammar HO, Ghorab MM, Saleh MS, et al. Olanzapine mesoporous nanostructured lipid carrier: optimization, characterization, in vivo assessment, and physiologically based pharmacokinetic modeling [J]. IEEE Trans Nanobioscience, 2021, 20 (2): 166-174.
- [52] Du Q, Chen JQ, Yan GJ, et al. Comparison of different aliphatic acid grafted N-trimethyl chitosan surface-modified nanostructured lipid carriers for improved oral kaempferol delivery [J]. Int J Pharm, 2019, 568: 118506.
- [53] Han SF, Yao TT, Zhang XX, et al. Lipid-based formulations to enhance oral bioavailability of the poorly water-soluble drug anethol trithione; effects of lipid composition and formulation [J]. Int J Pharm, 2009, 379 (1): 18-24.
- [54] Qin LH, Niu YW, Wang YM, et al. Combination of phospholipid complex and submicron emulsion techniques for improving oral bioavailability and therapeutic efficacy of water-insoluble drug [J]. Mol Pharm, 2018, 15 (3): 1238-1247.
- [55] Gao F, Zhang ZW, Bu HH, et al. Nanoemulsion improves the oral absorption of candesartan cilexetil in rats: performance and mechanism [J]. J Control Release, 2011, 149 (2): 168-174.
- [56] Li SL, Fang CH, Zhang JQ, et al. Catanionic lipid nanosystems improve pharmacokinetics and anti-lung cancer activity of curcumin [J]. Nanomedicine, 2016, 12 (6): 1567-1579.
- [57] Sercombe L, Veerati T, Moheimani F, et al. Advances and challenges of liposome assisted drug delivery [J]. Front Pharmacol, 2015, 6: 286.
- [58] Tan FM, Li H, Zhang K, et al. Sodium alginate/chitosan-coated liposomes for oral delivery of hydroxy- α -sanshool: in vitro and in vivo evaluation [J]. Pharmaceutics, 2023, 15 (7): 2010.
- [59] Pandey S, Shaikh F, Gupta A, et al. A recent update: solid lipid nanoparticles for effective drug delivery [J]. Adv Pharm Bull, 2022, 12 (1): 17-33.
- [60] 李厚丽, 翟光喜. 固体脂质纳米粒的制备与应用研究进展 [J]. 中南药学, 2006, 4 (5): 366-369.
- [61] Abd-Elghany AE, El-Garhy O, Fatease AA, et al. Enhancing oral bioavailability of simvastatin using uncoated and polymer-coated solid lipid nanoparticles [J]. Pharmaceutics, 2024, 16 (6): 763.
- [62] Mishra V, Nayak P, Yadav N, et al. Orally administered self-emulsifying drug delivery system in disease management: advancement and patents [J]. Expert Opin Drug Deliv, 2021, 18 (3): 315-332.
- [63] Kim YH, Kim SB, Choi SH, et al. Development and evaluation of self-microemulsifying drug delivery system for improving oral absorption of poorly water-soluble olaparib [J]. Pharmaceutics, 2023, 15 (6): 1669.
- [64] Viegas C, Patrício AB, Prata JM, et al. Solid lipid nanoparticles vs. nanostructured lipid carriers: a comparative review [J]. Pharmaceutics, 2023, 15 (6): 1593.
- [65] Son GH, Na YG, Huh HW, et al. Systemic design and evaluation of ticagrelor-loaded nanostructured lipid carriers for enhancing bioavailability and antiplatelet activity [J]. Pharmaceutics, 2019, 11 (5): 222.
- [66] Hu LJ, Quach T, Han SF, et al. Glyceride-mimetic prodrugs incorporating self-immolative spacers promote lymphatic transport, avoid first-pass metabolism, and enhance oral bioavailability [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2016, 55 (44): 13700-13705.
- [67] Wang XR, Zhang C, Han N, et al. Triglyceride-mimetic prodrugs of scutellarin enhance oral bioavailability by promoting

- intestinal lymphatic transport and avoiding first-pass metabolism [J]. *Drug Deliv*, 2021, 28 (1): 1664-1672.
- [68] Lu J, Cheng CM, Zhao XG, et al. PEG-scutellarin prodrugs: synthesis, water solubility and protective effect on cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Eur J Med Chem*, 2010, 45 (5): 1731-1738.
- [69] Miao YF, Ye Q, Zhang MY, et al. Enhancing oral performance of paclitaxel lipid-mimic prodrug via modulating type of fatty acids [J]. *Adv Healthc Mater*, 2023, 12 (19): e2203118.
- [70] Tian CT, Guo JJ, Miao YF, et al. Long chain triglyceride-lipid formulation promotes the oral absorption of the lipidic prodrugs through coincident intestinal behaviors [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2022, 176: 122-132.
- [71] He W, Du YW, Wang T, et al. Redox responsive 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN38) lysophospholipid conjugate: synthesis, assembly and anticancer evaluation [J]. *Int J Pharm*, 2021, 606: 120856.
- [72] Hou YP, Yao C, Ling LB, et al. Novel dual VES phospholipid self-assembled liposomes with an extremely high drug loading efficiency [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017, 156: 29-37.
- [73] Lu L, Du YW, Ismail M, et al. Liposomes assembled from dimeric retinoic acid phospholipid with improved pharmacokinetic properties [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2018, 112: 186-194.
- [74] Zhang MY, Guo CL, Miao YF, et al. Incorporating a lipophilic disulfide-bridged linoleic prodrug into a self-microemulsifying drug delivery system to facilitate oral absorption of paclitaxel [J]. *Mol Pharm*, 2023, 20 (1): 461-472.
- [75] Bala V, Rao S, Bateman E, et al. Enabling oral SN38-based chemotherapy with a combined lipophilic prodrug and self-microemulsifying drug delivery system [J]. *Mol Pharm*, 2016, 13 (10): 3518-3525.
- [76] Du YW, Ling LB, Ismail M, et al. Redox sensitive lipid-camptothecin conjugate encapsulated solid lipid nanoparticles for oral delivery [J]. *Int J Pharm*, 2018, 549 (1-2): 352-362.
- [77] Wang HL, Li L, Ye J, et al. Improving the oral bioavailability of an anti-glioma prodrug CAT3 using novel solid lipid nanoparticles containing oleic acid-CAT3 conjugates [J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12 (2): 126.
- [78] Miao YF, Liu JR, Xiao HY, et al. Enabling oral novel taxanes-based chemotherapy with lipophilic prodrug self-nanoemulsifying drug delivery system [J]. *Bioorg Chem*, 2024, 153: 107902.
- [79] Liu X, Huang R, Wan JY. Puerarin: a potential natural neuroprotective agent for neurological disorders [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 162: 114581.
- [80] Mo L, Zhao GL, Li XF, et al. Green synthesis of puerarin acid esters and their oral absorption evaluation in vivo [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2022, 67: 102882.
- [81] Williams HD, Sahbaz Y, Ford L, et al. Ionic liquids provide unique opportunities for oral drug delivery: structure optimization and in vivo evidence of utility [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2014, 50 (14): 1688-1690.
- [82] Shi YJ, Zhao ZM, Gao YS, et al. Oral delivery of sorafenib through spontaneous formation of ionic liquid nanocomplexes [J]. *J Control Release*, 2020, 322: 602-609.
- [83] 闫鑫, 曹玉珍, 姜小梅, 等. 离子液体对环孢素 A 口服吸收的影响 [J]. *药学报*, 2022, 57 (4): 1180-1186.
- [84] Kala SG, Chinni S. Development and characterization of venetoclax nanocrystals for oral bioavailability enhancement [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2021, 22 (3): 92.
- [85] Das R. Design of carnitine-fatty acids ionic liquids self nano emulsifying systems to enhance oral drug delivery [D]. Tucson: The University of Arizona, 2024.
- [86] Tang Y, Yang K, Zhao SY, et al. Evaluation of solubility, physicochemical properties, and cytotoxicity of naproxen-based ionic liquids [J]. *ACS Omega*, 2023, 8 (9): 8332-8340.
- [87] 唐一梅, 扈本荃, 张博, 等. 蔡普生胆碱离子液体在大鼠体内的药动学及生物利用度研究 [J]. *中国现代应用药学*, 2023, 40 (18): 2506-2511.
- [88] Moshikur RM, Ali MK, Wakabayashi R, et al. Methotrexate-based ionic liquid as a potent anticancer drug for oral delivery: in vivo pharmacokinetics, biodistribution, and antitumor efficacy [J]. *Int J Pharm*, 2021, 608: 121129.
- [89] Md Moshikur R, Chowdhury MR, Wakabayashi R, et al. Ionic liquids with methotrexate moieties as a potential anticancer prodrug: synthesis, characterization and solubility evaluation [J]. *J Mol Liq*, 2019, 278: 226-233.
- [90] Moshikur RM, Ali MK, Wakabayashi R, et al. Favipiravir-based ionic liquids as potent antiviral drugs for oral delivery: synthesis, solubility, and pharmacokinetic evaluation [J]. *Mol Pharm*, 2021, 18 (8): 3108-3115.
- [91] Williams HD, Ford L, Han SF, et al. Enhancing the oral absorption of kinase inhibitors using lipophilic salts and lipid-based formulations [J]. *Mol Pharm*, 2018, 15 (12): 5678-5696.
- [92] 宣婧婧, 武喜营, 戚建平, 等. 胆碱类离子液体促进槲皮素口服吸收的考察 [J]. *中国医药工业杂志*, 2024, 55 (6): 811-819.
- [93] Xuan JJ, Wu XY, Li LS, et al. Improving oral absorption of tretinoin by ionic liquids technology [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2024, 95: 105534.
- [94] Jadhav K, Sirvi A, Janjal A, et al. Utilization of lipophilic salt and phospholipid complex in lipid-based formulations to modulate drug loading and oral bioavailability of pazopanib [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2024, 25 (3): 59.

(收稿日期: 2025-03-07; 修回日期: 2025-05-02)

DNA 糖基化酶与肿瘤药物开发的研究进展

周杰², 邓佳丽², 刘思思², 蒋斌元^{1, 2*} (1. 南华大学附属长沙中心医院药物临床试验机构, 长沙 410004; 2. 南华大学附属长沙中心医院, 长沙 410004)

摘要: 化疗作为癌症治疗的关键核心技术之一, 其作用机制主要基于细胞的 DNA 损伤反应。铂类药物、烷化剂以及拓扑异构酶抑制剂等化疗药物, 发挥作用时会非选择性地杀伤肿瘤细胞, 在有效控制癌症方面成效显著, 但不可避免地伴随着毒副作用。DNA 损伤“合成致死”机制是肿瘤小分子创新药研发的热门方向, 此机制借助抑制肿瘤细胞赖以生存的 DNA 损伤修复酶的作用, 能够有选择性地杀灭肿瘤细胞, 减少对正常细胞的损害。碱基切除修复 (BER) 途径在 DNA 损伤修复体系中占据重要地位, 能对 DNA 损伤做出及时响应, 并进行精准修复, 防止有害突变在细胞内不断累积。DNA 糖基化酶 (DNA glycosylases) 是碱基切除修复途径中 DNA 损伤修复蛋白的核心成员, 本文聚焦于靶向 DNA 糖基化酶的小分子药物开发, 对 DNA 糖基化酶所涉及的 DNA 修复方式进行介绍, 概述 DNA 糖基化酶在不同肿瘤中的表达情况及相关抑制剂的最新研究进展, 期望能为相关领域的研究以及药物研发工作提供具有价值的参考依据。

关键词: 肿瘤治疗; DNA 损伤反应; DNA 糖基化酶; 合成致死

中图分类号: R730.5, R914.5 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)12-3621-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.023

Advances in DNA glycosylases and their therapeutic potential in cancer drug development

ZHOU Jie², DENG Jiali², LIU Sisi², JIANG Binyuan^{1, 2*} (1. Drug Clinical Trial Organization, South China University Affiliated Changsha Central Hospital, Changsha 410004; 2. South China University Affiliated Changsha Central Hospital, Changsha 410004)

Abstract: Chemotherapy remains one of the central pillars in cancer treatment, with its therapeutic effects closely tied to the induction of DNA damage. Chemotherapeutic agents such as platinum-based compounds, alkylating agents, and topoisomerase inhibitors exert their antitumor effects by non-selectively damaging DNA in rapidly dividing cancer cells, thereby achieving obvious clinical efficacy in controlling tumor progression. However, these treatments are often accompanied by inevitable toxic side effects. The concept of DNA damage-induced lethality has emerged as a promising strategy in the development of novel small-molecule anticancer drugs. By targeting key DNA damage repair enzymes upon which cancer cells are critically dependent, this approach allows for selective tumor cell killing while sparing normal cells from excessive harm. Among various DNA repair pathways, base excision repair plays a crucial role in maintaining genomic stability by promptly recognizing and repairing DNA lesions, thereby preventing the accumulation of deleterious mutations. DNA glycosylases, as essential enzymes in the base excision repair pathway, initiate the repair process by detecting and excising damaged bases. This review focused on the development of small-molecule inhibitors targeting DNA glycosylases, their roles in DNA repair and recent advances in the discovery and characterization of glycosylase inhibitors.

Key words: tumor therapy; DNA damage response; DNA glycosylase; synthetic lethality

基金项目: 湖南省自然科学基金 (No.2025JJ80111); 长沙市自然科学基金 (No.kq2403169); 长沙市卫生健康委科研计划项目 (No.KJ-B2023030)。

作者简介: 周杰, 男, 在读硕士研究生, 主要从事肿瘤化疗药物分子药理研究, email: 20222106111955@stu.usc.edu.cn *通信作者: 蒋斌元, 男, 博士, 硕士研究生导师, 主要从事肿瘤发生发展的分子机制研究、肿瘤化疗药物分子药理研究, email: jby2225859@126.com

肿瘤严重威胁人类健康，是全球关注的健康问题。肿瘤发生发展涉及大量错综复杂的分子机制，深入了解这些机制可以帮助人类治疗肿瘤，提高肿瘤患者的寿命和生存质量^[1]。化疗作为肿瘤治疗的关键核心技术之一，其作用机制主要基于细胞的 DNA 损伤反应。铂类药物、烷化剂以及拓扑异构酶抑制剂等化疗药物通过诱导 DNA 损伤非选择性地杀灭肿瘤细胞，在控制肿瘤方面成效显著，但不可避免地伴随毒副作用。

1 研究背景

1.1 DNA “合成致死”效应

肿瘤细胞具有基因组不稳定性和快速复制的特点，部分肿瘤细胞会更加依赖于某个特定的 DNA 修复途径，靶向抑制肿瘤依赖的代偿性修复途径可选择性地杀死肿瘤细胞，降低毒副作用，这一策略被称为 DNA 损伤“合成致死”效应。根据此策略研究者们研发了大量靶向 DNA 损伤修复蛋白的小分子药物，2014 年全球第一个靶向 DNA 损伤反应设计的抗肿瘤药物聚腺苷二磷酸核糖聚合酶（PARP）抑制剂奥拉帕尼被批准用于治疗卵巢癌，现已是卵巢癌治疗的一线药物^[2]。随后全球陆续已有 6 种 PARP（奥拉帕利、鲁卡帕利、尼拉帕利、他拉唑帕利、氟唑帕利、帕米帕利）抑制剂获批上市，被用于卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、前列腺癌等癌症的治疗。

2024 年是 DNA 损伤“合成致死”药物临床试验的爆发年，有多个基于此原理的新药进入临床试验，受到广泛关注。先声药业开发了靶向 USP1 蛋白的小分子抑制剂 SIM0501，可通过阻断 DNA 损伤反应中的泛素化调控进程抑制肿瘤增殖^[3]；勤浩医药的 GH2616 为 KIF18A 的靶向抑制剂，通过限制微管生长抑制纺锤体微管与着丝粒的连接杀死肿瘤细胞^[4]；阿斯利康公司（Astra Zeneca）开发了靶向 MTA 和 PRMT5 复合物的二代 PRMT5 抑

制剂 AZD3470，较第一代 PRMT5 抑制剂毒副作用显著减少，可选择性干预 MTA 蛋白缺失的肿瘤细胞，抑制 DNA 修复、转录调控过程^[5]；诺华公司（Novartis）开发的 HRO761 可诱导 WRN 蛋白降解，激活 p53 调控的细胞凋亡信号，对基因组存在微卫星不稳定性的肿瘤具有显著抑制效果^[6]。细胞的 DNA 损伤反应是一个复杂的信号网络，各种蛋白在特定条件下被差异性地抑制或者激活，过度依赖 DNA 修复能力生存的肿瘤细胞较正常细胞更容易受到 DNA 损伤“合成致死”效应药物的作用。

1.2 DNA 损伤反应

细胞内遗传物质受到损伤时会激活 DNA 损伤反应（DNA damage response, DDR），启动下游信号通路进行 DNA 的修复。当细胞受到轻微的损伤可通过碱基切除修复（base excision repair, BER）、核苷酸切除修复（nucleotide excision repair, NER）、错配修复（mismatch repair, MMR）等方式修复，较严重的 DNA 双链断裂则经非同源末端连接（non-homologous end joining, NHEJ）和同源重组修复（homologous recombination, HR）的方式修复（见表 1）。如果 DNA 损伤过重无法有效修复，细胞则启动程序性死亡、衰老等强制性机制，杜绝把错误遗传信息传递给子代细胞，降低因为异常信息突变诱发疾病的风险。BER 途径是一种进化上保守的 DNA 修复方式，在 DNA 损伤修复体系中占据重要地位，主要负责消除自发水解、烷基化和氧化 DNA 损伤，通过识别、切除和替换等流程纠正 DNA 损伤^[7]。

DNA 糖基化酶（DNA glycosylases）是 BER 途径起始 DNA 损伤修复进程的关键分子，本文将聚焦于靶向 DNA 糖基化酶的小分子药物开发，对 DNA 糖基化酶所涉及的 DNA 修复方式进行介绍，概述 DNA 糖基化酶在不同肿瘤中的表达情况及相关抑制剂研究的最新研究进展，以期能为相关领域的研究以及药物研发工作提供具有价值的参考依据。

表 1 DNA 损伤修复的主要方式
Tab 1 Major modes of DNA damage repair

修复途径	主要修复损伤	涉及的关键修复酶	特点
BER	单个碱基损伤	DNA 糖基化酶、AP 核酸内切酶、DNA 聚合酶 β 、DNA 连接酶	精准、简单、快速
NER	较大的 DNA 损伤（如嘧啶二聚体、DNA 加合物）	XPC、HR23B 等、RNA 聚合酶、多种核酸内切酶、DNA 聚合酶、DNA 连接酶	分为全基因组修复（GGR）和转录偶联修复（TCR）两个途径，修复由环境因素引起的损伤
MMR	碱基插入和缺失不匹配	MutS 蛋白、MutL 蛋白、核酸内切酶和外切酶、DNA 聚合酶、DNA 连接酶	消除 DNA 合成过程中的错配
HR	双链断裂	MRN 复合物、RAD51 蛋白、DNA 聚合酶	以同源染色体为模板进行准确修复
NHEJ	双链断裂	KU70/KU80 异二聚体、DNA-PKcs、XRCC4 和 Ligase IV	快速但相对不准确

2 DNA 糖基化酶分类

DNA 糖基化酶是 BER 通路的核心成员，识

别 DNA 链上受损或错配的碱基后启动 BER 进程，通过切除、修复过程保持基因序列的稳定。不同

的 DNA 糖基化酶识别对应的底物并发挥功能, 根据其催化活性的不同本文将 DNA 糖基化酶细分为单功能糖基化酶和双功能糖基化酶。

2.1 单功能糖基化酶

单功能糖基化酶识别受损位点后仅切割目的碱基和脱氧核糖之间的 *N*-糖苷键, 释放游离碱基并留下无嘌呤/无嘧啶 (AP) 位点 (见图 1), 随后被 AP 核酸内切酶 (APE1) 识别并切割生成 3' 羟基和 5' 脱氧核糖磷酸 (5'dRP) 末端^[8], 最后 DNA 裂解酶 Pol β 移除 5'dRP 形成修复切口^[9]。单功能糖基化酶主要包括尿嘧啶 DNA 糖基化酶 (uracil DNA glycosylase, UDG)、*N*-甲基嘌呤 DNA 糖基化酶 (*N*-methylpurine DNA glycosylase, MPG)、含甲基化 CpG 结合域蛋白质 4 (methyl-CpG-binding domain protein 4, MBD4) 及腺嘌呤 DNA 糖基化酶 (adenine DNA glycosylase, MUTYH) 等^[10]。其中 UDG 又细分为尿嘧啶-*N*糖基化酶 1 (uracil-*N* glycosylase 1, UNG1)、尿嘧啶-*N*糖基化酶 2 (uracil-*N* glycosylase 2, UNG2)、胸腺嘧啶 DNA 糖基化酶 (thymine DNA glycosylase, TDG) 和单链选择性单功能尿嘧啶 DNA 糖基化酶 1 (single strand specific monofunctional uracil DNA glycosylase 1, SMUG1)。UDG 存在 α/β 折叠结构的催化结构域, 可去除因氧化应激反应导致胞嘧啶脱氨后错误生成的尿嘧啶^[11]。TDG 能够去除氧化或脱氨基产生的嘧啶碱基, 在 DNA 去甲基化中起关键作用^[12]。MPG 主要针对烷基化引起的 DNA 损伤, 可识别并切除 3-甲基腺嘌呤 (3MA), 以及腺嘌呤、鸟嘌呤在 N7 和 N3 位点的甲基^[13]。

2.2 双功能糖基化酶

双功能糖基化酶具有 DNA 糖基化酶活性和 AP 裂解酶活性, 包括核酸内切酶 III 样蛋白 1 (En-

donuclease III-like protein 1, NTH1)、8-氧代鸟嘌呤 DNA 糖基化酶 1 (8-oxoguanine DNA glycosylase 1, OGG1) 和核酸内切酶 VIII 样糖基化酶 (Endonuclease VIII-like glycosylase, NEIL) 超家族。双功能糖基化酶可识别 8-氧代鸟嘌呤 (8-oxoG)、胸腺嘧啶乙二醇 (Tg)、甲酰胺基嘧啶腺嘌呤 (FapyA) 和甲酰胺基嘧啶鸟嘌呤 (FapyG) 等因氧化应激反应引起的 DNA 损伤。双功能糖基化酶去除受损碱基后, 利用 AP 裂解酶活性在 DNA 和活性位点赖氨酸残基之间形成席夫碱基中间体, 随后糖-磷酸骨架经 β -消除反应切开并产生 3' α , β -不饱和醛 (PUA) 和 5' 磷酸基团。NEIL 超家族都具有螺旋-双转角-螺旋结构, NEIL1 和 NEIL2 研究较多, 主要通过 β , δ -消除反应产生 3' 末端磷酸基团 (3'-PO₄) 进而形成 DNA 修复切口, 3' 末端磷酸基团和 PUA 会分别在多核苷酸激酶 3'-磷酸酶 (PNKP) 和 APE1 的活性作用下被去除^[14] (见图 1)。DNA 糖基化酶的类型与作用方式见表 2。

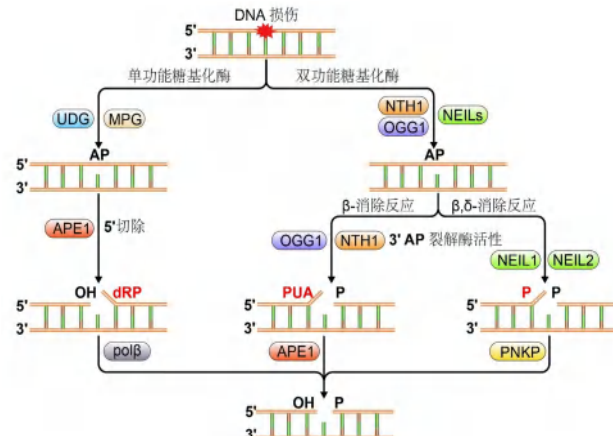


图 1 DNA 糖基化酶作用方式示意图 (使用 Adobe Illustrator 软件绘制)
Fig 1 Scheme of mode of action of DNA glycosylases (by Adobe Illustrator software)

表 2 DNA 糖基化酶的类型与作用方式

Tab 2 Types and modes of action of DNA glycosylases

DNA 糖基化酶类型	名称	作用底物
单功能糖基化酶	UDG	尿嘧啶
	SMUG1	尿嘧啶、5-甲酰基尿嘧啶、5-羟甲基尿嘧啶
	TDG	5-甲酰基胞嘧啶、5-羧基胞嘧啶
	MBD4	CpG 位点内错配的胸腺嘧啶、尿嘧啶或者 5-氟尿嘧啶
	MPG	3-甲基腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤
	MUTYH	与 8-oxoG 错配的腺嘌呤
双功能糖基化酶	OGG1	8-oxoG、FapyG
	NTH1	5-羟基尿嘧啶、5-羟基胞嘧啶、胸腺嘧啶乙二醇、FapyA、FapyG
	NEIL1、NEIL2、NEIL3	胸腺嘧啶乙二醇、5-羟基尿嘧啶、FapyA 和 FapyG

3 DNA 糖基化酶与修复方式的选择

细胞内的 BER 途径在进化过程中高度保守, 存在精确的调控过程, 使得基因组完整性保持稳

定, 细胞会根据自身状态选择短补丁修复 (short-patch BER, SP-BER) (去除单个受损碱基) 或者长补丁修复 (long-patch BER, LP-BER) (合成 2 ~ 8

个核苷酸来置换受损区域)^[15] (见图 2)。

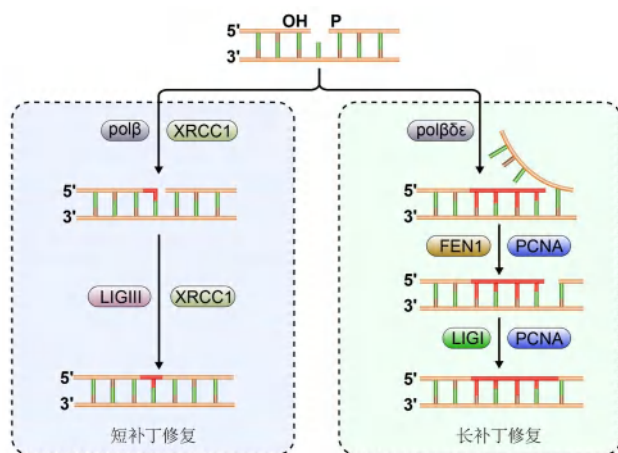


图 2 BER 途径中短补丁/长补丁修复方式示意图 (使用 Adobe Illustrator 软件绘制)

Fig 2 Scheme of short/long patch repair approach in the base excision repair pathway (by Adobe Illustrator software)

通常而言 SP-BER 途径在非复制和快速复制的细胞中均存在, DNA 糖基化酶切除损伤位点后, APE1、DNA 聚合酶 β (Pol β)、PNKP、DNA 连接酶 III (LIG III) 和支架蛋白 XRCC1 共同协调完成修复^[16]。LP-BER 途径则主要存在于复制活跃的细胞中, 由 DNA 聚合酶 δ/ϵ 、增殖细胞核抗原 (PCNA)、皮瓣核酸内切酶 (FEN1) 和 DNA 连接酶 I (LIGI) 等复制相关蛋白协作完成 2 ~ 8 个核苷酸间隙的填充^[17]。

BER 修复途径的起始涉及 DNA 糖基化酶对于不同类型的 DNA 损伤, 如脱嘌呤、脱氨基、烷基化和氧化损伤等, 同时 DNA 损伤方式及所涉及的 DNA 糖基化酶, 还影响着后续修复方式的选择。当 DNA 损伤是由氧化还原反应所致, SP-BER 途径的 Pol β 无法有效实现 DNA 的修复, 必须依赖 LP-BER 途径中的 FEN1 完成^[18]。此外, NEIL 超家族通过 β , δ -消除反应形成 DNA 修复切口同样需要 FEN1 和 PCNA 参与的 LP-BER 途径完成修复。真核生物在进化历程中逐渐形成了完备的 DNA 修复机制, 在一定条件下可以保证遗传信息的稳定, 其中有大量的基础理论工作有待探索。

4 DNA 糖基化酶与肿瘤

肿瘤本质上是因为基因信息错误遗传而导致的疾病, 不可避免地涉及 DNA 损伤修复机制异常, 其中 DNA 糖基化酶表达及功能的失调与肿瘤的发生发展以及患者预后等多个方面密切相关, 影响了肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移等多个关键步骤, 本文将按照 DNA 糖基化酶在功能上的分类对其与肿瘤的关系及相关研究展开介绍。

4.1 单功能 DNA 糖基化酶与肿瘤

UNG1 和 UNG2 同属单功能 DNA 糖基化酶家族, 但其胞内定位和功能各不相同。UNG1 主要定位于线粒体, 能够对线粒体 DNA (mtDNA) 中的尿嘧啶进行修复, 维持 mtDNA 的稳定性, 保障线粒体的正常功能^[19]。在小细胞肺癌和鳞状细胞癌中, 较高水平的 UNG1 与培美曲塞耐药有关, 定向沉默 UNG1 的表达可以增强 A549 和 H1975 细胞对培美曲塞的敏感性, 有助于肺癌的治疗^[20]。UNG1 的正常表达被认为是头颈肿瘤患者 (HNSC) 保持顺铂药物敏感性所必需的^[21]。UNG2 则主要分布在细胞核, 能够迅速识别并切除 DNA 中的尿嘧啶, 防止因尿嘧啶的存在而导致的碱基错配和基因突变。使用组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 抑制剂处理 B 淋巴瘤和 T 淋巴瘤细胞系可导致 UNG2 的功能抑制和肿瘤细胞生长^[22]。在结直肠癌组织中 UNG2 阳性率达 80%, 而在癌旁或正常组织中的阳性表达率仅为 20%, UNG2 的表达随着肿瘤分期的进展逐渐升高, 且晚期结直肠癌患者 UNG2 的高表达与肿瘤的远处转移和患者的低生存率显著相关^[23]。

在人结直肠癌组织中 TDG 存在高表达的情况, 抑制 TDG 表达可减弱人结直肠癌细胞体内外的增殖能力^[24]。近期研究发现 TDG 可以与 DNA 甲基转移酶 3 α (DNMT3A) 相互作用, 导致 *TIMP2* 启动子的低甲基化, 促进 *TIMP2* 表达, 进而抑制人结直肠癌细胞 (CRC) 的迁移和侵袭能力^[25]。黑色素瘤细胞中 TDG 的失活会导致细胞周期停滞, 并发生衰老, 体内实验结果均显示敲低 TDG 可以抑制黑色素瘤细胞的增殖能力^[26]。

MPG 在神经胶质细胞瘤中与替莫唑胺 (TMZ) 的治疗耐药有关, 可以作为神经胶质细胞瘤抗耐药化疗的潜在靶点^[27]。最近研究发现, C1q 肿瘤坏死因子相关肽 8 (CTRP8) 通过 RXFP1-STAT3 信号级联反应靶向 MPG, 使得 MPG 表达与活性增加, 增加神经胶质细胞瘤对化疗药物 TMZ 耐药风险^[28]。抑制 HIV-1TAT 相互作用蛋白 2 (HTATIP2) 的表达会增加 MPG 的核定位, 削弱 MPG 参与的 DNA 修复, 被认为与肿瘤耐药性的产生有关^[29]。结肠癌细胞中, 上皮-间质转化因子 ZEB1 结合 MPG 启动子抑制其表达, 从而增加细胞的转移能力^[30]。此外, 肝癌细胞中敲低 SMUG1 表达会抑制肝癌细胞的增殖能力, 使细胞周期停滞在 G₂/M 期, 并诱导细胞凋亡, 可增强短波紫外线 (UVC) 照射后的 DNA 损伤和细胞凋亡, 推测 SMUG1 是肝癌细胞周期和转录调控的关键因子^[31]。

4.2 双功能 DNA 糖基化酶与肿瘤

OGG1 对 DNA 修复至关重要, 还涉及多种调节功能, 包括转录调节、调节由内毒素或氧化应激触发的炎症、诱导细胞死亡以及自噬反应的协调, OGG1 的变异和功能异常与癌症发展风险增加有关^[32]。OGG1 敲除小鼠 34 周可发生多器官肿瘤^[33]。OGG1 可增强肿瘤细胞中氧化 DNA 损伤的修复, 有助于肝细胞癌 (HCC) 的发生发展, 有望成为评估 HCC 预后的新生物标志物和治疗 HCC 的新靶点^[34]。NEIL 糖基化酶家族的异常可导致 DNA 损伤的积累并引发细胞的恶性转化。结直肠癌组织中 NEIL1 高度表达, 敲除 NEIL1 可显著抑制肿瘤细胞体内外的增殖能力^[35]。在癌症基因组图谱数据库评估的 13 种人类癌症中, 体细胞突变率的增加与 NEIL1/2 表达水平降低和 NEIL3 表达水平的增加有关, 提示 NEIL3 增高与癌症的发生有关^[36]。HCC 中, NEIL3 的表达与晚期 TNM 分期、肿瘤体积、肿瘤耐药和低生存时间成正相关。肝癌细胞中 NEIL3 在有丝分裂期间大量聚集到端粒并修复端粒 DNA 损伤, 增强 HCC 细胞的增殖, 而敲低 NEIL3 可抑制 HCC 细胞的增殖^[37]。肺腺癌 (LUAD) 相关的生信分析发现 NEIL3 过度表达可导致 p53 信号通路异常和 LUAD 患者的不良预后^[38], 并且 NEIL3 的表达量与肺癌患者对顺铂和紫杉醇的敏感性成正相关^[39]。NEIL3 在多种肿瘤组织或肿瘤细胞中显著过表达, 提示 NEIL3 可能是一个致癌基因, 其表达水平过高或过低都可能导致疾病的发展, 在不同的肿瘤中预后也存在差异。有关机制、预后和治疗相关的研究较少, 需要进一步探索。

5 DNA 糖基化酶与药物开发

肿瘤的发生发展与多种 DNA 糖基化酶的功能异常密切相关, 涉及肿瘤细胞的增殖、转移以及化疗药物耐受, 大量研究显示抑制 DNA 糖基化酶可有效遏制肿瘤细胞的恶性进展, 是肿瘤治疗药物开发的重要来源。

5.1 靶向 DNA 糖基化酶的小分子抑制剂

大量靶向 DNA 糖基化酶的活性位点的小分子抑制剂被发现, 并表现出良好的抑癌效果。靶向 UDG 的小分子药物金羧酸 (ATA) 可有效抑制人结肠癌细胞 DLD1 的增殖能力^[40]。另外一种高效的 UDG 抑制剂四氢-2, 4, 6-三氧代嘧啶酰基 (PyO3), 能够结合并抑制人和病毒尿嘧啶-DNA 糖基化酶, 但抑癌方面的作用还有待研究^[41]。在黑色素瘤方面, 研究者发现胡桃酮、氯生酮和头孢克肟是 TDG 的抑制剂且可有效抑制黑色素瘤的增殖^[26]。天然多酚黄酮醇桑色素^[42]、4-甲基咪唑吡咯烷^[43]、舒尼替尼被鉴定为靶向 MPG 的小分

子抑制剂, 在胶质母细胞瘤 (GBM) 中抑制 MPG 的活性可以恢复肿瘤细胞对 TMZ 的敏感性, 抑制 GBM 细胞增殖, 并使 GBM 细胞周期停滞^[44]。

OGG1 抑制剂在癌症治疗中用作单一疗法的潜力已经证明。多个 OGG1 的小分子抑制剂被开发并进行研究, 如酰肼化合物 O8 抑制 OGG1, 半数有效浓度 (IC_{50}) 为 0.22 ~ 0.35 $\mu\text{mol/L}$, 且对具有重叠底物特异性的 NEIL1 和 NTH1 糖基化酶的影响较小^[45]。SU0268 能够抑制 HeLa 细胞中的 OGG1, 导致基因组中 8-oxoG 增加^[46]; 随后开发的 SU0383, 可同时抑制 OGG1 和 MutT 人同源物 -1 (MTH1, 又名 NUDT) 的活性^[47]。OGG1 抑制剂 TH5487 可抑制 OGG1 与 8-oxoG 的结合^[48], 被认为是一种很有前途的抗炎、抗纤维化和抗肿瘤药物^[49]。然而, 有研究揭示了 OGG1 竞争性抑制剂 TH5487 和 SU0268 具有脱靶效应, 可分别通过直接抑制外排泵和干扰有丝分裂进程导致高细胞毒性, 这与 OGG1 活性无关^[50]。这将提示我们需要重新评估 OGG1 抑制剂与其他化疗药物或 PARP 抑制剂之间的协同作用, TH5487 被发现可以通过合成致死性增强 PARP 抑制剂奥拉帕尼在 *BRCA1* 基因缺陷型三阴性乳腺癌细胞系中的敏感性^[51]。然而, TH5487 的作用未在 OGG1 缺陷细胞中进行验证, 所以很难确定它们是否真的是由于 DNA 糖基化酶活性的抑制作用或者是脱靶效应。因此, 更好地研究这些分子的分子作用机制以及开发更具特异性的抑制剂分子至关重要。

几种代谢辅因子已被证明可有效抑制 DNA 糖基化酶, 如吡哆醛 5'-磷酸 (PLP) 可显著抑制 NEIL2 的功能, 使 NEIL2 与 DNA 结合环之间形成了席夫碱基^[52]。同样, 酪氨酸分解代谢的中间体富马酰乙酰乙酸酯 (FAA) 被发现可强烈抑制 NEIL1 和 NEIL2 的酶活性, 但对 NTH1、OGG1、UNG2 的影响很小, I 型遗传性酪氨酸血症 (HT1) 患者缺乏 FAA 水解酶, 积累的 FAA 对 DNA 糖基化酶功能抑制, 导致 HT1 患者 DNA 修复能力减弱, 也解释了 HT1 患者肝癌发生概率增加的原因^[53]。

5.2 靶向 DNA 糖基化酶的基因治疗

基因治疗通过抑制 DNA 糖基化酶相关基因的表达水平达到治疗目的。对于一些因 DNA 糖基化酶过度表达而导致疾病的情况, 可以利用基因敲除技术降低其表达水平, 从而达到治疗的效果。通过基因编辑 CRISPR-Cas9 技术可以对 DNA 糖基化酶基因进行精确编辑, 修复突变的基因或者调控其表达。有研究开发出不依赖脱氨酶 (deaminase-free, DAF) 的新型碱基编辑器, 可

以分别在大肠埃希菌中实现 C-to-A、T-to-A 的碱基颠换，在哺乳动物细胞中实现 C-to-G、T-to-G 的碱基颠换编辑，在不切割 DNA 双链的情况下实现对单个碱基的精准编辑，修正肿瘤细胞中的致病基因，诱导肿瘤细胞向正常细胞转化或直接导致肿瘤细胞死亡^[54]。此外，基因递送载体的选择也是基因治疗中的关键环节。目前常用的载体包括病毒载体和非病毒载体。病毒载体如腺相关病毒（AAV）具有高效的基因递送能力，但存在

免疫原性和潜在的致癌风险。非病毒载体如脂质体、纳米颗粒等则具有较低的免疫原性和较好的生物相容性，但基因递送效率相对较低。如何优化基因递送载体，提高基因治疗的安全性和有效性，也是当前研究的热点和难点。

DNA 糖基化酶相关抑制剂的功能及应用，见表 3。

6 总结与展望

生物体历经漫长的进化形成了应对 DNA 损伤

表 3 DNA 糖基化酶相关抑制剂的功能及应用

Tab 3 Functions and applications of DNA glycosylase-related inhibitors

DNA 糖基化酶	抑制剂	作用方式	癌症的关联
UDG	ATA、PyO3	抑制酶活性	结肠癌
TDG	胡桃酮、氯生酮、头孢克肟	抑制酶活性、诱导细胞周期停滞	黑色素瘤
MPG	桑色素、4-甲基咪唑吡咯烷、舒尼替尼	抑制酶活性（非 DNA 结合）、抑制 DNA 修复	胶质母细胞瘤
OGG1	O8、SU0268、SU0383、TH5487	竞争性抑制（O8、SU0268）、双重抑制（SU0383）、阻断 8-oxoG 结合（TH5487）	宫颈癌、结肠癌、骨肉瘤、膀胱癌
NEIL1/NEIL2	FAA、PLP	抑制酶活性	肝癌

的修复机制，旨在确保遗传信息的相对稳定和生命个体的正常运转。肿瘤疾病发生的根源来自遗传信息的错误累积和传递，人类一直利用细胞内的 DNA 损伤监管机制开发化疗药物对抗肿瘤疾病。自 2014 年全球第一个靶向 DNA 损伤反应设计的抗肿瘤药物 PARP 抑制剂奥拉帕尼被批准用于肿瘤治疗，DNA 损伤“合成致死”策略开发抗肿瘤药物的热度持续上升，到 2024 年多种此策略的药物被投入临床试验，关注度前所未有。本综述聚焦 DNA 损伤反应中的 BER 途径，对起始该修复途径的 DNA 糖基化酶功能及在肿瘤药物研发方面的研究进行了较全面的综述，有助于研究者更便捷地了解 DNA 糖基化酶与肿瘤疾病的关系。

目前，以 DNA 糖基化酶为靶点的肿瘤治疗研究已经取得了大量的研究进展，靶向 DNA 糖基化酶的治疗策略为结肠癌、宫颈癌、黑色素瘤、肺癌等多种疾病的治疗提供了新的治疗靶点和思路。研究者们尝试通过小分子抑制剂、基因治疗等策略从不同角度探索靶向 DNA 糖基化酶在肿瘤领域潜在的应用价值，然而，考虑到 DNA 损伤修复信号通路的复杂性及单个 DNA 修复蛋白在致病过程中起决定性作用的概率，单纯使用 DNA 糖基化酶抑制剂的治疗效果可能存在一定的局限性，但也可以说是未来精准治疗应用前的研究积累。相较之下，笔者认为将 DNA 糖基化酶抑制剂与传统 DNA 损伤类的化疗药物联合使用，或许会是一种更为直接的治疗策略。这一联合策略在提升治疗效果的同时可减少 DNA 损伤类药物的剂量，降低毒副作用。

人类利用 DNA 损伤反应机制对抗肿瘤，不可避免地要面对因放化疗产生的选择压力，这会加速肿瘤细胞的进化，加剧肿瘤异质性的发生。真核生物进化过程中形成的 DNA 损伤反应机制具有从 DNA 修复到修复失败处理的完善机制，程序性细胞死亡如凋亡、坏死、焦亡可将修复失败的细胞以最小的代价消灭，逃脱死亡命运的细胞会被细胞的衰老机制抑制而无法复制，或者是被免疫系统当成外来物清除^[55]。化疗、放疗等传统方式一旦失败，大部分生物体固有的保障机制有可能都已失效，未被彻底消灭而存活下来的肿瘤细胞恶性程度往往更高。未来各类的 DNA 修复蛋白抑制剂类药物的使用要如何实现治疗效果的最大化还有待探索，是用于辅助杀灭肿瘤细胞，还是用于肿瘤复发后的再次治疗更优均还未知。

综上所述，DNA 糖基化酶作为 DNA 损伤修复途径的重要分子，其功能异常极可能会导致肿瘤疾病的发生，同时也呈现出其在肿瘤治疗中的应用前景。但是靶向 DNA 糖基化酶的临床应用还需克服肿瘤疾病的复杂性、药物对靶点的特异性以及抑制 DNA 糖基化酶是否会增加细胞突变风险等问题，未来靶向 DNA 糖基化酶的转化研究还有大量的工作有待开展。

参考文献

[1] Swanton C, Bernard E, Abbosh C, et al. Embracing cancer complexity: hallmarks of systemic disease [J]. Cell, 2024, 187 (7): 1589-1616.
[2] O' Malley DM, Krivak TC, Kabil N, et al. PARP inhib-

- itors in ovarian cancer: a review [J]. *Target Oncol*, 2023, 18 (4): 471-503.
- [3] Huang P, Wang YH, Zhang PF, et al. Ubiquitin-specific peptidase 1: assessing its role in cancer therapy [J]. *Clin Exp Med*, 2023, 23 (7): 2953-2966.
- [4] Chen QS, Le XY, Li QB, et al. Exploration of inhibitors targeting KIF18A with ploidy-specific lethality [J]. *Drug Discov Today*, 2024, 29 (10): 104142.
- [5] Bray C, Balcells C, McNeish IA, et al. The potential and challenges of targeting MTAP-negative cancers beyond synthetic lethality [J]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1264785.
- [6] Ferretti S, Hamon J, de Kanter R, et al. Discovery of WRN inhibitor HRO761 with synthetic lethality in MSI cancers [J]. *Nature*, 2024, 629 (8011): 443-449.
- [7] Gohil D, Sarker AH, Roy R. Base excision repair: mechanisms and impact in biology, disease, and medicine [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (18): 14186.
- [8] Xue ZYY, Demple B. Knockout and inhibition of Ape1: roles of Ape1 in base excision DNA repair and modulation of gene expression [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11 (9): 1817.
- [9] Howard MJ, Horton JK, Zhao ML, et al. Lysines in the lyase active site of DNA polymerase beta destabilize nonspecific DNA binding, facilitating searching and DNA gap recognition [J]. *J Biol Chem*, 2020, 295 (34): 12181-12187.
- [10] Grundy GJ, Parsons JL. Base excision repair and its implications to cancer therapy [J]. *Esays Biochem*, 2020, 64 (5): 831-843.
- [11] Schormann N, Ricciardi R, Chattopadhyay D. Uracil-DNA glycosylases-structural and functional perspectives on an essential family of DNA repair enzymes [J]. *Protein Sci*, 2014, 23 (12): 1667-1685.
- [12] Onabote O, Hassan HM, Iovic M, et al. The role of thymine DNA glycosylase in transcription, active DNA demethylation, and cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14 (3): 765.
- [13] Song SS, Xing GC, Yuan L, et al. *N*-methylpurine DNA glycosylase inhibits p53-mediated cell cycle arrest and coordinates with p53 to determine sensitivity to alkylating agents [J]. *Cell Res*, 2012, 22 (8): 1285-1303.
- [14] Islam A, Chakraborty A, Sarker AH, et al. Site-specific acetylation of polynucleotide kinase 3'-phosphatase regulates its distinct role in DNA repair pathways [J]. *Nucleic Acids Res*, 2024, 52 (5): 2416-2433.
- [15] Lee D, Lee G. Single-molecule studies of repair proteins in base excision repair [J]. *BMB Rep*, 2025, 58 (1): 17-23.
- [16] Caglayan M. Repair pathway coordination from gap filling by polbeta and subsequent nick sealing by LIG1 or LIG3alpha governs BER efficiency at the downstream steps [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2025, 148: 103826.
- [17] Sallmyr A, Bhandari SK, Naila T, et al. Mammalian DNA ligases: roles in maintaining genome integrity [J]. *J Mol Biol*, 2024, 436 (1): 168276.
- [18] Laverde EE, Polyzos AA, Tsegay PP, et al. Flap endonuclease 1 endonucleolytically processes RNA to resolve R-loops through DNA base excision repair [J]. *Genes (Basel)*, 2022, 14 (1): 98.
- [19] Sarno A, Lundback M, Liabakk NB, et al. Uracil-DNA glycosylase UNG1 isoform variant supports class switch recombination and repairs nuclear genomic uracil [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47 (9): 4569-4585.
- [20] Weeks LD, Fu P, Gerson SL. Uracil-DNA glycosylase expression determines human lung cancer cell sensitivity to pemetrexed [J]. *Mol Cancer Ther*, 2013, 12 (10): 2248-2260.
- [21] Conner KL, Shaik AN, Ekinici E, et al. HPV induction of APOBEC3 enzymes mediate overall survival and response to cisplatin in head and neck cancer [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2020, 87: 102802.
- [22] Iveland TS, Hagen L, Sharma A, et al. HDACi mediate UNG2 depletion, dysregulated genomic uracil and altered expression of oncoproteins and tumor suppressors in B- and T-cell lines [J]. *J Transl Med*, 2020, 18 (1): 159.
- [23] Guo CG, Zhang XD, Fink SP, et al. Ugene, a newly identified protein that is commonly overexpressed in cancer and binds uracil DNA glycosylase [J]. *Cancer Res*, 2008, 68 (15): 6118-6126.
- [24] Xu XH, Yu TX, Shi JD, et al. Thymine DNA glycosylase is a positive regulator of Wnt signaling in colorectal cancer [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289 (13): 8881-8890.
- [25] Miao JY, Zhao CA, Tang KJ, et al. TDG suppresses the migration and invasion of human colon cancer cells via the DNMT3A/TIMP2 axis [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18 (6): 2527-2539.
- [26] Mancuso P, Tricarico R, Bhattacharjee V, et al. Thymine DNA glycosylase as a novel target for melanoma [J]. *Oncogene*, 2019, 38 (19): 3710-3728.
- [27] Serrano-Heras G, Castro-Robles B, Romero-Sanchez CM, et al. Involvement of *N*-methylpurine DNA glycosylase in resistance to temozolomide in patient-derived glioma cells [J]. *Sci Rep*, 2020, 10 (1): 22185.
- [28] Thanasupawat T, Glogowska A, Burg M, et al. C1q/TNF-related peptide 8 (CTRP8) promotes temozolomide resistance in human glioblastoma [J]. *Mol Oncol*, 2018, 12 (9): 1464-1479.
- [29] Nguyen TT, Rajakannu P, Pham MDT, et al. Epigenetic silencing of HTATIP2 in glioblastoma contributes to treatment resistance by enhancing nuclear translocation of the DNA repair protein MPG [J]. *Mol Oncol*, 2023, 17 (9): 1744-1762.
- [30] de Barrios O, Sanchez-Moral L, Cortes 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.
- [31] An MJ, Shin GS, Lee HM, et al. Ablation of SMUG1 reduces cell viability and increases UVC-mediated apoptosis in hepatocarcinoma HepG2 cells [J]. *Genes (Basel)*, 2021,

- 12 (2): 201.
- [32] Zhong YX, Zhang XY, Feng RB, et al. OGG1: an emerging multifunctional therapeutic target for the treatment of diseases caused by oxidative DNA damage [J]. *Med Res Rev*, 2024, 44 (6): 2825-2848.
- [33] Kakehashi A, Ishii N, Okuno T, et al. Enhanced susceptibility of OGG1 mutant mice to multiorgan carcinogenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18 (8): 1801.
- [34] Zhang H, Jiang PJ, Lv MY, et al. OGG1 contributes to hepatocellular carcinoma by promoting cell cycle-related protein expression and enhancing DNA oxidative damage repair in tumor cells [J]. *J Clin Lab Anal*, 2022, 36 (7): e24561.
- [35] Cao JH, Cao CH, Lin JL, et al. NEIL1 drives the initiation of colorectal cancer through transcriptional regulation of COL17A1 [J]. *Cell Rep*, 2024, 43 (1): 113654.
- [36] Shinmura K, Kato H, Kawanishi Y, et al. Abnormal expressions of DNA glycosylase genes NEIL1, NEIL2, and NEIL3 are associated with somatic mutation loads in human cancer [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 1546392.
- [37] Zhao ZJ, Gad H, Benitez-Buelga C, et al. NEIL3 prevents senescence in hepatocellular carcinoma by repairing oxidative lesions at telomeres during mitosis [J]. *Cancer Res*, 2021, 81 (15): 4079-4093.
- [38] Zhao C, Liu J, Zhou HM, et al. NEIL3 may act as a potential prognostic biomarker for lung adenocarcinoma [J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21 (1): 228.
- [39] Huang HB, Hua QW. NEIL3 mediates lung cancer progression and modulates PI3K/AKT/mTOR signaling: a potential therapeutic target [J]. *Int J Genomics*, 2022, 2022: 8348499.
- [40] Nguyen MT, Moiani D, Ahmed Z, et al. An effective human uracil-DNA glycosylase inhibitor targets the open pre-catalytic active site conformation [J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2021, 163: 143-159.
- [41] Grin IR, Mechetin GV, Kasymov RD, et al. A new class of uracil-DNA glycosylase inhibitors active against human and vaccinia virus enzyme [J]. *Molecules*, 2021, 26 (21): 6668.
- [42] Dixon M, Woodrick J, Gupta S, et al. Naturally occurring polyphenol, morin hydrate, inhibits enzymatic activity of *N*-methylpurine DNA glycosylase, a DNA repair enzyme with various roles in human disease [J]. *Bioorg Med Chem*, 2015, 23 (5): 1102-1111.
- [43] Mas Claret E, Al Yahyaie B, Chu S, et al. An aza-nucleoside, fragment-like inhibitor of the DNA repair enzyme alkyladenine glycosylase (AAG) [J]. *Bioorg Med Chem*, 2020, 28 (11): 115507.
- [44] Song YQ, Li GD, Niu D, et al. A robust luminescent assay for screening alkyladenine DNA glycosylase inhibitors to overcome DNA repair and temozolomide drug resistance [J]. *J Pharm Anal*, 2023, 13 (5): 514-522.
- [45] Donley N, Jaruga P, Coskun E, et al. Small molecule inhibitors of 8-oxoguanine DNA glycosylase-1 (OGG1) [J]. *ACS Chem Biol*, 2015, 10 (10): 2334-2343.
- [46] Tahara YK, Auld D, Ji D, et al. Potent and selective inhibitors of 8-oxoguanine DNA glycosylase [J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140 (6): 2105-2114.
- [47] Tahara YK, Kietrys AM, Hebenbrock M, et al. Dual inhibitors of 8-oxoguanine surveillance by OGG1 and NUDT1 [J]. *ACS Chem Biol*, 2019, 14 (12): 2606-2615.
- [48] Visnes T, Cazares-Korner A, Hao W, et al. Small-molecule inhibitor of OGG1 suppresses proinflammatory gene expression and inflammation [J]. *Science*, 2018, 362 (6416): 834-839.
- [49] Wu WJ, Jia HX, Chen S, et al. Inhibition of OGG1 ameliorates pulmonary fibrosis via preventing M2 macrophage polarization and activating PINK1-mediated mitophagy [J]. *Mol Med*, 2024, 30 (1): 72.
- [50] Tanushi X, Pinna G, Vandamme M, et al. OGG1 competitive inhibitors show important off-target effects by directly inhibiting efflux pumps and disturbing mitotic progression [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 11: 1124960.
- [51] Baquero JM, Marchena-Perea E, Mirabet R, et al. OGG1 Inhibition triggers synthetic lethality and enhances the effect of PARP inhibitor olaparib in BRCA1-deficient TNBC cells [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 888810.
- [52] Grin IR, Rieger RA, Zharkov DO. Inactivation of NEIL2 DNA glycosylase by pyridoxal phosphate reveals a loop important for substrate binding [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 394 (1): 100-105.
- [53] Blikrud YT, Ellingsen A, Bjoras M. Fumarylacetoacetate inhibits the initial step of the base excision repair pathway: implication for the pathogenesis of tyrosinemia type I [J]. *J Inher Metab Dis*, 2013, 36 (5): 773-778.
- [54] Ye LJ, Zhao DD, Li J, et al. Glycosylase-based base editors for efficient T-to-G and C-to-G editing in mammalian cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2024, 42 (10): 1538-1547.
- [55] Schmitt CA, Wang BS, Demaria M. Senescence and cancer-role and therapeutic opportunities [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2022, 19 (10): 619-636.

(收稿日期: 2025-03-25; 修回日期: 2025-06-30)

4 种莲子心生物碱的主要心血管药理作用研究进展

周佳^{1,2}, 曾宾宇^{1,2}, 寇舒豪^{1,2}, 刘雅婷^{1,2}, 肖秦^{2,3*}, 秦群^{1,2*} (1. 中南大学湘雅医院药学部, 长沙 410008; 2. 湖南省生物制剂早期临床试验国际科技创新合作基地, 长沙 410008; 3. 中南大学湘雅医院医保办公室, 长沙 410008)

摘要: 莲子心为“药食同源”的中药, 甲基莲心碱、莲心碱、异莲心碱和荷叶碱是其主要生物碱成分, 这 4 种生物碱成分在心血管保护中展现出值得深入研究的潜力。本研究主要综述甲基莲心碱、莲心碱、异莲心碱和荷叶碱对心血管疾病的防治作用, 并对其药理作用及相关机制进行阐述。结果显示, 4 种生物碱成分对心血管疾病的防治作用主要体现在抗高血压、抗心律失常、逆转脑缺血损伤、保护心肌和调节血脂 5 个方面。现有研究虽揭示了这 4 种生物碱对心血管疾病的部分机制, 但仍具有值得深入研究的巨大空间, 本综述旨在为未来 4 种莲子心生物碱在心血管领域的深入研究提供思路, 并提出具体建议。

关键词: 甲基莲心碱; 莲心碱; 异莲心碱; 荷叶碱; 心血管药理作用

中图分类号: R285.5, R972 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)12-3629-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.024

Research progress on the cardiovascular pharmacological effect of 4 Nelumbinis Plumula alkaloids

ZHOU Jia^{1,2}, ZENG Binyu^{1,2}, KOU Shuhao^{1,2}, LIU Yating^{1,2}, XIAO Qin^{2,3*}, QIN Qun^{1,2*} (1. Department of Pharmacy, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008; 2. International Science and Technology Innovation Cooperation Base for Early Clinical Trials of Biological Agents in Hunan Province, Changsha 410008; 3. Medical Insurance Office, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008)

Abstract: Nelumbinis Plumula, a traditional Chinese medicine with culinary and medicinal origins, contains 4 main alkaloids: neferine, liensinine, isoliensinine, and nuciferine, which exhibit potential cardiovascular protective properties. The current research reviewed available literatures on the pharmacological effect and associated mechanism of neferine, liensinine, isoliensinine, and nuciferine, on cardiovascular disorders. The 4 alkaloids exhibited obvious preventative and therapeutic benefits on cardiovascular disorders in 5 domains: antihypertension, antiarrhythmia, reversal of cerebral ischemia damage, myocardial protection, and blood lipid regulation. While current research has elucidated certain effect of these 4 alkaloids on cardiovascular diseases, there remains potential for further investigation. This review intends to offer insights into these 4 Nelumbinis Plumula alkaloids and to propose specific recommendations.

Key words: neferine; liensinine; isoliensinine; nuciferine; cardiovascular pharmacological effect

目前, 心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 仍然是全世界死亡的主要原因^[1], 每年约有 1790 万人死于 CVD, 占有死亡人数的近三分之一。CVD 的主要类型包括冠状动脉疾病、心力衰竭、高血压和缺血性卒中等。针对 CVD 的治疗

目前主要包括药物治疗、介入手术和生活方式干预治疗。近年来, 挖掘以天然产物为基础的治疗 CVD 的有效药物备受研究人员的关注。莲子心为多年水生植物草本睡莲科植物莲的成熟莲子种仁内绿色胚芽, 略呈细圆柱形, 长 1 ~ 1.4 cm, 直

作者简介: 周佳, 女, 硕士, 主要从事临床药理学研究, email: 228112400@csu.edu.cn ***通信作者:** 肖秦, 男, 助理研究员, 主要从事临床流行病学和医院政策管理相关研究, email: shaw0713@sina.com; 秦群, 女, 主任药师, 博士研究生导师, 主要从事中药药理和新药临床相关研究, email: 2395038683@qq.com

径约为 0.2 cm。莲子心主产于亚洲,中国、印度、日本和东南亚国家都广泛栽培,其中中国为主要产地。莲子心在中国传统中医药中有着极高的药用价值,主要功效包括清心安神、降压、防治高血脂和动脉粥样硬化等^[2]。此外,莲子心在人们饮食方面亦能起到日常保健作用,例如莲子心茶,具有清热解毒的功效,是“药食同源”的典型。莲子心主要通过其生物碱类成分发挥 CVD 防治作用。莲子心中富含多种生物碱类成分,其中甲基莲心碱、莲心碱、异莲心碱和荷叶碱为发挥保护心血管药理活性的主要成分^[3]。因此,本文将综述这 4 种生物碱成分抗 CVD 的药理作用机制。

1 4 种莲子心生物碱的理化性质

莲子心中的生物碱是发挥对 CVD 预防与治疗作用的重要药理成分,莲子心生物碱的主要成分包括甲基莲心碱、莲心碱、异莲心碱和荷叶碱(见图 1)。

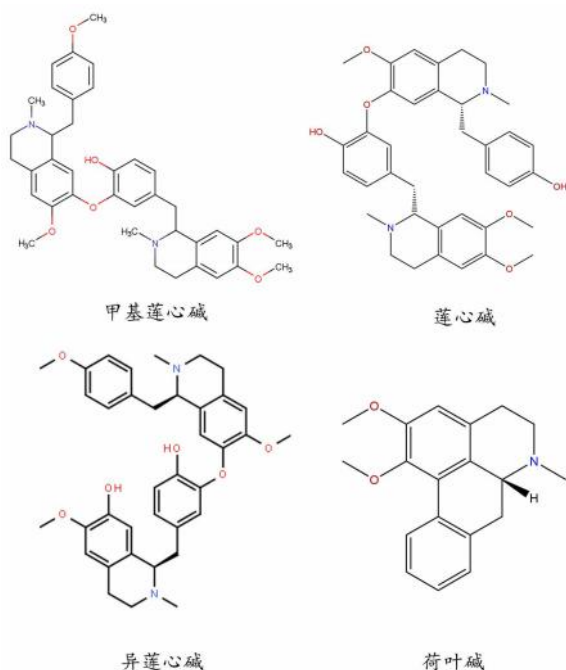


图 1 甲基莲心碱、莲心碱、异莲心碱和荷叶碱的化学结构式

Fig 1 Chemical structures of neferine, liensinine, isoliensinine and nuciferine

1.1 甲基莲心碱

甲基莲心碱(neferine)是从莲子绿色胚胎中提取出来的一种天然生物碱。甲基莲心碱, (4-[(1*R*)-6, 7-dimethoxy-2-methyl-3, 4-dihydro-1*H*-isoquinolin-1-yl]methyl]-2-[(1*R*)-6-methoxy-1-[(4-methoxyphenyl)methyl]-2-methyl-3, 4-dihydro-1*H*-isoquinolin-7-yl]oxy]phenol), 属于双苄基异喹啉类生物碱, 分子式为 $C_{38}H_{44}N_2O_6$, 呈松散的淡黄色无定形粉末, 可溶于甲醇、乙醇、二甲基亚砜(DMSO)等有机溶剂。

1.2 莲心碱

莲心碱(liensinine), (*R*)-1, 2-dimethoxy-7-(3, 4, 5-trimethoxybenzyl)-5, 6-dihydroisoquinolin-6-yl methyl phenol, 是从莲子心中提取的一种双苄基异喹啉类生物碱, 分子式为 $C_{37}H_{42}N_2O_6$ 。莲心碱由两个苯环和一个异喹啉环组成, 基本结构特点为双苄基异喹啉骨架, 在苯环和异喹啉环上有多个甲氧基(-OCH₃)取代基, 异喹啉环上有一个苄基侧链, 侧链上的苯环也有甲氧基取代。莲心碱外观为白色或淡黄色结晶性粉末, 在水中溶解性较低, 易溶于乙醇、甲醇、氯仿等有机溶剂。对莲子心中甲基莲心碱、莲心碱和异莲心碱 3 种生物碱成分含量研究中指出, 莲心碱与莲子心生物碱总量的相关性次于甲基莲心碱和异莲心碱^[4]。

1.3 异莲心碱

异莲心碱(isoliensinine)是从莲子心中提取的一种双苄基异喹啉类生物碱, 化学名称是 (1*R*)-1-[(6*aR*)-1, 2-dimethoxy-6, 6*a*-dihydroisoquinolin-7(5*H*)-yl]-3-(3, 4, 5-trimethoxyphenyl) propan-2-ol, 分子式为 $C_{37}H_{42}N_2O_6$, 是一种白色或淡黄色无定形粉末, 在水中的溶解度较低, 易溶于乙醇、DMSO 等有机溶剂。

1.4 荷叶碱

荷叶碱(nuciferine), (*R*)-1, 2-dimethoxyaporphine, 是一种阿朴啡型生物碱, 通常从晒干粉碎的荷叶中提取, 但 1991 年在国产莲子心中首次提取分离得到荷叶碱, 莲子心中也含有荷叶碱成分。荷叶碱分子式为 $C_{19}H_{21}NO_2$, 相对分子量为 295.4。荷叶碱难溶于水, 易溶于乙醚、氯仿等极性较低的有机溶剂或丙酮、乙醇等亲水性有机溶剂。荷叶碱外观为类白色结晶性粉末, 通常纯度越高, 色泽越浅。

2 4 种莲子心生物碱的心血管保护作用

莲子心对 CVD 的作用在传统中医药中被记载为清心安神、涩精止血。在现代研究中, 莲子心总生物碱(total alkaloids of *Plumula Nelumbinis*, TAPN) 被发现可以降低肺动脉高压模型大鼠的右心室收缩压, 延缓肺血管和右心室重塑过程, 从而改善大鼠右心的功能。甲基莲心碱、莲心碱、异莲心碱、莲子心荷叶碱对于 CVD 的保护作用, 各有侧重, 见表 1。

2.1 抗高血压

2.1.1 甲基莲心碱 Zheng 等^[23] 研究发现, 甲基莲心碱可能通过下调 *Fractalkine* (*Fkn*) 基因的表达, 从而达到抑制血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 诱导的大鼠主动脉平滑肌细胞增殖的作用, 经甲基莲心碱处理后的经 Ang II 暴露 24 h 后

表 1 甲基莲心碱、莲心碱、异莲心碱和荷叶碱的心血管药理作用机制

Tab 1 Mechanism of cardiovascular pharmacological effects of neferine, liensinine, isoliensinine and nuciferine

药理作用	药物	给药剂量	实验对象	机制	结果	文献
抗高血压	甲基莲心碱	1 ~ 1000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	兔	α_1 受体 $\downarrow$ 、 Ca^{2+} 通道 $\downarrow$	动脉环显著舒张，血压下降	[5]
		10 ~ 1000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	兔	外 Ca^{2+} 内流 $\downarrow$	动脉环显著舒张，血压降低	[6]
	莲心碱	6 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	大鼠	心肌肌浆网钙泵活力 $\uparrow$ 、细胞内 Ca^{2+} $\downarrow$	血压显著降低左室质量 / 体重比显著降低	[7]
		5 ~ 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	大鼠 A7R5 细胞株	α -SMA 表达 $\downarrow$	血压显著下降	[8]
	异莲心碱	10、20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	大鼠	外 Ca^{2+} 内流 $\downarrow$ 、 α_1 受体 $\downarrow$	血压显著降低、血流动力学改善	[9]
		5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	大鼠	心肌肌浆网钙泵活力 $\uparrow$ 、细胞内 Ca^{2+} $\downarrow$	血压显著降低	[10]
抗心律失常	甲基莲心碱	0.5 ~ 5.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	大鼠	氧自由基 $\downarrow$ 、LDH $\downarrow$ 、MDA $\downarrow$	心律失常发生率 $\downarrow$ 、心功能参数	[11]
		0.1 ~ 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 1 ~ 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	HEK293 细胞、兔	Kv4.3 通道 $\downarrow$	APD ₁₀ 显著 $\uparrow$ 、QT 间期剂量依赖 $\uparrow$	[12]
	莲心碱	3 ~ 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	豚鼠心室肌细胞	钠电流 $\downarrow$ 、L 型 - 钙电流 $\downarrow$ 、APD $\uparrow$	心律失常发生率 $\downarrow$	[13]
		5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	豚鼠、大鼠	钠通道 $\downarrow$ 、钙超载 $\downarrow$ 、抗氧化	心律失常阈值 $\uparrow$ 、死亡率 $\downarrow$	[14]
	异莲心碱	3、5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	豚鼠、大鼠	Na^{+} 内流 $\downarrow$ 、 Ca^{2+} 内流 $\downarrow$ 、APD $\downarrow$ 、零相 V_{max} $\downarrow$	心律失常阈值 $\uparrow$ 、室颤持续时间 $\downarrow$	[15]
逆转脑缺血再灌注损伤	甲基莲心碱	50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (腹腔注射)	Wistar 大鼠	抑制自噬、调节 AMPK/mTOR 通路、 Ca^{2+} 通道阻滞、抗凋亡	梗死体积减小、神经功能缺损评分改善	[16]
	莲心碱	3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Wistar 大鼠	C-Fos 蛋白表达 $\downarrow$ 、抗氧化、TNF- α $\downarrow$ 、LDH $\downarrow$	梗死体积显著减少，神经功能缺损改善	[17]
	荷叶碱	10 ~ 40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	大鼠	AMPK/mTOR 通路 $\uparrow$ 、抗氧化、TNF- α $\downarrow$ 、IL-1 β $\downarrow$	神经功能评分显著降低，梗死体积减小	[18]
保护心肌	甲基莲心碱	10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	H9C2 细胞株	细胞衰老相关蛋白 1 (SIRT1) $\uparrow$ 、抑制 TGF- β 1/MMPs 信号通路、抗氧化	显著逆转心肌细胞肥大及纤维化、细胞凋亡减少	[19]
	莲心碱	60 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (腹腔注射)	C57 小鼠	动力蛋白相关蛋白 1 (Drp1) 磷酸化 $\downarrow$ 、线粒体自噬 $\downarrow$ 、抗氧化	显著抑制心肌细胞凋亡、恢复线粒体功能	[20]
	荷叶碱	10 ~ 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	H9C2 细胞株	抗氧化、抗凋亡、保护线粒体功能	细胞凋亡减少、心脏功能改善	[21]
降血脂	荷叶碱	高脂饲料添加 0.5% 荷叶碱	C57 小鼠	增强脂酶活性、抗氧化	血脂水平下降	[22]

注：“ $\uparrow$ ”代表上调或激活，“ $\downarrow$ ”代表下调或抑制。
Note: “ $\uparrow$ ” denotes up-regulation or activation, while “ $\downarrow$ ” signifies down-regulation or inhibition.

的大鼠主动脉平滑肌细胞的 mRNA 和蛋白质水平上发现 *Fkn* 基因的表达明显降低，提示甲基莲心碱可能通过下调 *Fkn* 表达，对 Ang II 诱导的大鼠主动脉平滑肌细胞增殖导致的高血压发挥治疗作用。除此之外，高帅^[24]在野百合碱诱导的大鼠肺动脉高压模型中，发现甲基莲心碱能够有效降低肺动脉高压大鼠的肺动脉压力，同时改善肺动脉高压大鼠的肺动脉平滑肌细胞（pulmonary arterial smooth muscle cells, PASMCs）增殖导致的肺血管重构；该实验还发现甲基莲心碱可有效抑制低氧诱导的 PASMCs 增殖迁移并且在低氧条件下能够有效促进 PASMCs 的凋亡，并抑制 Erk 信号通路活化，从而抑制 PASMCs 增殖并促进其凋亡，减轻并治疗肺动脉高压。Zeng 等^[25]则发现不同浓度的甲基莲心碱对自发性高血压大鼠（spontaneously

hypertensive rats, SHR）均具有显著的降压作用，甲基莲心碱给药治疗组还显著降低了脉搏波速度，减轻了腹主动脉增厚病变程度。此外，RNA 测序和 KEGG 分析发现，甲基莲心碱可能通过抑制多条信号通路的活化达到降血压的作用，例如可能抑制 PI3K/AKT 和 TGF- β 1/Smad2/3 等信号通路，这为甲基莲心碱治疗高血压的具体机制研究提供了思路。上述证据均提示，甲基莲心碱能够通过一定的途径抑制动脉平滑肌的增殖或减轻动脉增厚病变的程度，最终达到降低血压的效果。然而甲基莲心碱对高血压心脏的损伤仍然未知，Guo 等^[26]进一步指出甲基莲心碱对自发性高血压大鼠的抗高血压的作用机制，其在研究中揭示 Nef 能够提高 Bcl-2/Bax 的比率，有效逆转大鼠高血压过程中的心肌凋亡，除此之外，还能够在体内外有

效清除活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的蓄积, 减轻包括 PI3K/AKT、MAPK 和 HIF-1 通路在内的异常激活, 最为重要的是 Nef 还明显改善了高血压大鼠伴随的心功能不全, 并且还明显减弱了高血压大鼠心肌组织心肌细胞无序和横截面积增加的病理特征。这提示, 甲基莲心碱不仅能够有效降低血压, 还能够保护心脏功能, 减轻高血压疾病可能伴随的病理特征, 甲基莲心碱有望成为未来抗高血压临床用药的天然候选药物。

2.1.2 莲心碱 主动脉收缩会使血管变窄, 导致血流受阻, 可能最终导致高血压。黄先菊等^[27]发现莲心碱可浓度依赖性抑制氯化钾、去甲肾上腺素和组胺诱导的家兔离体主动脉条收缩, 其作用机制与 Ca^{2+} 通道拮抗相关, 通过抑制细胞内钙释放及外钙内流发挥舒张血管效应, 提示其舒张血管作用具有 Ca^{2+} 通道亚型选择性。陆曙等^[28]将莲心碱与莲心季铵碱对肾性高血压大鼠 (renovascular hypertensive rats, RHR) 左室肥厚的逆转作用进行比较, 发现莲心碱与莲心季铵碱均能显著降低 RHR 血压, 逆转左室肥厚, 表现为左室质量/体重比及室壁厚度显著下降, 其中莲心碱高剂量组效果更优, 可能通过抑制局部肾素-血管紧张素 (RAS) 系统、改善胰岛素抵抗及调控钙泵活性发挥作用, 为莲子心生物碱类成分用于高血压心脏重构治疗提供实验依据。Jia 等^[29]在 Ang II 诱发的高血压小鼠模型中发现, 莲心碱通过抑制 Ang II 诱导的 MAPK 和 TGF- β 1/Smad2/3 信号的激活, 减弱增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 的表达并逆转 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 的减少, 共同发挥抑制 Ang II 诱发的高血压血管重塑的作用, 降低血压以及减少腹主动脉血管壁厚度, 改善血管重构的病理。莲心碱不仅能够有效降低高血压, 还能够高血压过程中有效抑制血管重塑, 改善左心室肥厚。

2.1.3 异莲心碱 异莲心碱对于血管平滑肌的异常增殖具有良好的抑制作用。Xiao 等^[30]在 Ang II 诱导的猪 PCASMCs 增殖模型中, 异莲心碱具有抑制 PCASMCs 增殖的作用, 揭示其抑制增殖的机制可能与抑制血小板源性生长因子- β (PDGF- β)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 及原癌基因 *c-fos*、*c-myc* 和 *hsp70* 的增强表达有关, 并与厄贝沙坦组抑制作用相当。陆曙等^[31]在探讨异莲心碱改善高血压大鼠左室肥厚与心肌肌浆网钙泵活力的关系实验过程中发现, RHR 模型组大鼠经异莲心碱给药后, 左心室肥厚显著改善, 初步推测可能与升

高 RHR 肥厚左室心肌肌浆网 (SERCA) 活力有关。鉴于异莲心碱对治疗高血压展示出巨大的治疗潜力, 姚梦滢等^[32]采用网络药理学与实验验证相结合的方式揭示异莲心碱治疗高血压的作用机制, 揭示异莲心碱具有改善 Ang II 诱导的血管平滑肌细胞增殖的作用, 可能通过 PI3K/AKT 通路改善血管平滑肌细胞增殖来治疗高血压。Yao 等^[33]为进一步提高异莲心碱的生物利用度, 制备了负载异莲心碱的 PEG-PLGA 聚合物纳米颗粒 (PEG-PLGA@Isoliensinine), 发现 PEG-PLGA@Isoliensinine 能更有效地促进 A7R5 细胞对异莲心碱的吸收, 并且体内靶向分布增强, 相较于游离的异莲心碱, 其能更有效地治疗高血压, 并且具有良好的生物安全性。异莲心碱治疗高血压的相关机制与甲基莲心碱接近, 对血管平滑肌的增殖有明显的抑制作用, 除此之外, 也具有改善左心室肥厚的作用。

2.2 抗心律失常

2.2.1 甲基莲心碱 郭治彬等^[34]建立缺血性室性心动过速犬模型, 观察甲基莲心碱抗心律失常的电生理作用, 发现与普鲁卡因胺 (procainamide, PA) 组相比, 甲基莲心碱同样显著延长 QTc 间期和缺血心肌的有效不应期, 以及提高缺血心肌舒张期兴奋阈值, 这提示甲基莲心碱可有效预防犬心肌缺血损伤后再发性室性快速性心律失常的发生。王琛^[35]研究发现甲基莲心碱能够调控 HEK293 细胞 Kv4.3 通道表达从而对兔心脏离体电生理产生影响, 甲基莲心碱以浓度依赖性和频率依赖性方式有效且可逆地抑制 Kv4.3 电流, 甲基莲心碱是瞬时外向钾电流 (transient outward current, I_{to}) 的有效直接阻断剂, 并且可能有助于甲基莲心碱显著增加心外膜 (epicardial, Epi) 位点在复极 10% 时测量动作电位持续时间 (action potential duration, APD) 的能力。Jiang 等^[36]从心房颤动与氧化应激之间关联的角度切入, 探讨研究甲基莲心碱能否缓解 Ang II 诱导的房颤并探索其潜在机制。研究发现甲基莲心碱能够逆转 Ang II 诱导的氧化应激现象, 具体表现在一定程度上减少了 ROS 的生成, 增加了谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 的水平, 并且从机制上验证甲基莲心碱通过上调 Nrf2/HO-1 和抑制 TGF- β /Smad2/3 通路缓解 Ang II 诱导的心房颤动和纤维化。以上都提示甲基莲心碱是具有潜力的抗心律失常药物, 但由于缺乏体内治疗效果的可靠验证和具体机制研究不够全面, 使得甲基莲心碱真正转化成临床抗心律失常药物受到了阻碍。

2.2.2 莲心碱 魏婷等^[37]在探究莲心碱对 HEK-293 细胞中 HERG 钾通道表达的影响时,发现莲心碱给药浓度的增加 (3、10、30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 能够促进 HERG 钾通道表达。HERG 缺陷或某些药物阻断该通道可引发长 QT 综合征 (long QT syndrome, LQTS), 并且在心肌细胞复极化过程中起关键作用, 是抗心律失常药物作用的最佳靶点。莲心碱能够浓度依赖性地促进 HERG-HEK 细胞中 HERG 通道蛋白表达, 这不仅为治疗 LQTS 提供新思路, 也为开发抗心律失常药物提供了可借鉴的候选药物。Cao 等^[38]探讨了二乙酰-莲心碱 (一种莲心碱的合成衍生物) 对兔心室肌细胞的电生理作用, 发现低浓度 (10、30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的二乙酰-莲心碱显著延长动作电位复极化 50% 和 90% 的时程 (APD_{50} 、 APD_{90}), 而高浓度 (100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 则缩短 APD, 除此之外通过平衡抑制钙、钾通道, 延长 APD 的同时减少传统 III 类抗心律失常药物 (如单纯阻断延迟整流钾电流引发的 QT 延长和尖端扭转型室速) 的不良反应发生风险。莲心碱的化学稳定性优于天然莲心碱和二乙酰-莲心碱, 有可能成为新型多通道抗心律失常药物的候选分子。Wang 等^[39]通过整合网络药理学与电生理实验, 解析了中药复方心速宁抗心律失常的多靶点机制, 并结合实验验证关键成分 (如莲心碱) 的作用, 结果发现莲心碱可剂量依赖性地抑制心脏钠通道 ($\text{Nav}1.5$, $\text{IC}_{50} = 3.58 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 说明其通过调节钠电流延长动作电位, 抑制快速性心律失常。未来仍需进一步加强具体机制的完善和安全性验证。

2.2.3 异莲心碱 陈默思等^[40]通过离体心脏心外膜心电图和在体心脏单相动作电位记录技术, 研究异莲心碱对牵张性心律失常的影响, 结果发现异莲心碱可剂量依赖性地缩短膨胀引起的牵张性心律失常持续时间, 减少触发活动发生率, 还可对抗结扎主动脉引起的动作电位时程缩短。Liu 等^[41]以家兔左心室肌细胞为研究对象, 采用全细胞膜片钳技术, 发现异莲心碱呈浓度依赖性地抑制瞬时钠电流、海葵毒素诱导增大的晚钠电流和 L 型钙电流, 在不影响内向整流钾电流和延迟整流钾电流的同时, 还消除了海葵毒素诱导的早期后除极及高钙诱导的晚期后除极, 明确了异莲心碱对多种离子通道电流的作用, 为未来异莲心碱抗心律失常的研究提供了基础。为开发安全有效的抗心律失常药物, 未来应该深入研究异莲心碱在体内治疗心律失常的效果, 并且深入研究异莲心碱对复杂心律失常的更为具体全面的作用机制。

2.3 逆转脑缺血再灌注损伤

2.3.1 甲基莲心碱 Zhu 等^[42]研究发现甲基莲心碱可通过抑制 NLRP3 炎症小体激活, 减少细胞焦亡和炎症因子 ($\text{IL-1}\beta$ 、 IL-18) 的释放, 并减轻氧化应激损伤, 从而保护新生大鼠缺氧缺血性脑损伤 (hypoxic ischemic brain injury, HIBD)。甲基莲心碱还能显著缩小脑梗死体积、减轻脑水肿、改善神经元形态及促进白质修复, 通过调控 NLRP3/ASC/caspase-1 通路发挥神经保护作用, 为其从心血管保护拓展至脑损伤治疗提供思路。Zheng 等^[43]也在甲基莲心碱对减少脑缺血再灌注损伤的研究中发现, 甲基莲心碱通过激活 PGC-1 α 蛋白, 抑制线粒体氧化应激及 NLRP3 炎症小体介导的脑微血管内皮细胞焦亡, 以维持缺血性中风模型中血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 的完整性, 同时显著缩小梗死体积、减轻脑水肿、改善神经功能, 并且提示甲基莲心碱通过靶向 PGC-1 α /NLRP3/GSDMD 通路发挥神经保护作用。甲基莲心碱作为天然低毒成分, 为开发新型神经保护药物提供了新思路, 尤其在改善 BBB 功能、减少继发性脑损伤方面具有潜在临床应用价值。

2.3.2 莲心碱 余万桂等^[44]研究发现莲心碱可通过发挥抗氧化活性显著改善大鼠局灶性脑缺血/再灌注损伤, 具体机制主要是莲心碱提升血清中 SOD 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性, 降低脂质过氧化产物丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量, 并改善脑组织能量代谢, 增加受损脑组织三磷酸腺苷 (ATP) 生成和减少乳酸堆积, 从而起到脑缺血/再灌注损伤的治疗效果: 神经功能评分降低、脑梗死体积缩小及脑水肿减轻。Qiao 等^[45]发现莲心碱可通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路减轻脑缺血再灌注损伤。通过下调 PI3K/AKT 磷酸化水平, 抑制自噬相关蛋白 LC3 和 p-TSC2, 同时上调 p-mTOR 和 P62, 从而阻断过度自噬介导的神经元损伤, 莲心碱在体外显著提高神经元存活率, 减少乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 释放及细胞凋亡, 并抑制自噬活性; 莲心碱改善大鼠神经功能缺损, 缩小脑梗死体积, 减轻脑组织坏死^[45]。莲心碱作为天然生物碱, 针对脑缺血再灌注损伤中过度自噬引发的神经细胞死亡, 在调控自噬平衡、改善神经功能预后方面具有潜在临床应用价值。

2.3.3 异莲心碱 异莲心碱对于逆转脑缺血再灌注损伤的研究较少, 但徐俊英等^[46]还是就异莲心碱对小鼠前脑缺血再灌注损伤的保护机制进行了初步的研究。异莲心碱通过显著降低脑组织及线粒体中 MDA 和 ROS 含量, 增强总 SOD 活性, 同时改善

Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 和 Ca^{2+} -ATPase 活性,有效缓解氧化应激并恢复能量代谢,其效果与阳性对照药物尼莫地平相当,阐明了异莲心碱通过抗氧化与调控线粒体钙泵功能的多靶点协同作用机制,突破了单一抗氧化路径的传统认知,该发现为开发基于天然产物的神经保护药物提供了新思路,为未来研究异莲心碱治疗脑缺血损伤起到了引导性作用。

2.3.4 荷叶碱 Wu等^[47]通过 UPLC-Q-TOF/MS 血清代谢组学揭示荷叶碱对大鼠中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)大鼠缺血性脑卒中的保护机制。UPLC-Q-TOF/MS 血清代谢组学鉴定出 19 种差异代谢物(如乳酸、鞘氨醇 1-磷酸等)和 7 条关键代谢通路(如鞘脂代谢、能量代谢等),并且证实荷叶碱主要通过调节能量代谢紊乱、抑制炎症及凋亡、恢复鞘脂代谢平衡发挥神经保护作用。MCAO 大鼠缺血性脑卒中经过荷叶碱治疗后,神经功能评估分数显著改善,脑水肿体积减小,提示能量代谢与鞘脂代谢是荷叶碱治疗缺血性脑损伤的关键调控节点。刘晓旭^[48]在揭示荷叶碱通过调控 PERK/Nrf2 信号通路减轻脑缺血再灌注损伤的机制研究中发现,荷叶碱可显著改善 MCAO 大鼠神经功能缺损,降低脑含水量及梗死面积,并通过激活 PERK 磷酸化促进 Nrf2 核转位,上调 SOD 活性、抑制 MDA 生成,从而缓解氧化应激损伤。但未来仍需深入解析 PERK/Nrf2 与其他通路(如炎症、凋亡)的交互网络,并探索荷叶碱调节线粒体功能及血脑屏障稳定性的分子机制,为脑缺血治疗的代谢干预策略及复方中药优化提供理论依据。Li等^[49]创新性地结合网络药理学、分子对接及体内外实验,系统揭示了荷叶碱通过 PI3K/AKT/NF- κ B 通路减轻脑缺血再灌注损伤炎症的机制。荷叶碱通过激活 PI3K/AKT 信号,抑制 NF- κ B 磷酸化及核转位,进而调控下游 NLRP3 炎症小体和炎症因子的释放,降低 NF- κ B 和 NLRP3 基因及蛋白的表达;在大脑中动脉闭塞再灌注(middle cerebral artery occlusion and reperfusion, MCAO/R)大鼠模型中改善神经功能缺损,减少脑梗死面积,并降低血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素(IL-6)水平。未来研究可多维度验证荷叶碱靶向炎症通路的核心作用,为天然药物开发提供新思路。

2.4 减少心肌损伤作用

2.4.1 甲基莲心碱 Qi等^[50]通过体内外实验结合 PI3K 抑制剂 LY294002 反向验证甲基莲心碱通过激活 PI3K/AKT/mTOR 通路改善脓毒症心肌损伤的作用机制。甲基莲心碱能够上调 Bcl-2、抑制 cleaved

caspase-3 和 ROS 生成,修复线粒体膜电位及 ATP 水平,显著提高脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的脓毒症小鼠的生存率(从 30% 升至 67%),改善心功能参数,通过调控 PI3K/AKT/mTOR 通路达到抑制凋亡与氧化应激的双重心肌保护作用。Lu等^[51]通过 siRNA 基因沉默技术结合 H9C2 细胞缺氧复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)模型,系统揭示了甲基莲心碱通过激活 SIRT1/Nrf2/HO-1 信号通路保护心肌细胞的机制。具体表现为甲基莲心碱可显著抑制 H/R 诱导的细胞凋亡(降低 Bax/Bcl-2 比值),减少 ROS 生成(降幅约 50%),修复线粒体膜电位及 ATP 水平,并上调 SOD、过氧化氢酶(CAT)等抗氧化酶活性;同时甲基莲心碱通过 SIRT1 依赖性机制激活 Nrf2 核转位,促进血红素加氧酶-1(HO-1)表达,从而抑制氧化应激与线粒体功能障碍,为甲基莲心碱治疗心肌缺血再灌注损伤提供新策略。Sun等^[52]通过分子对接技术结合体内实验,系统揭示了甲基莲心碱预处理通过多通路协同作用减轻异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌损伤的新机制。甲基莲心碱通过激活 Nrf2/Keap1/ARE 通路增强抗氧化酶(SOD、CAT)活性,抑制 TLR4/NF- κ B/MAPK 炎症信号,降低 TNF- α 、IL-6 等炎症因子水平,调控 Bax/Bcl-2 平衡及 caspase 级联反应进而抑制线粒体凋亡;还能够与 Nrf2、TLR4 等关键蛋白结合,从而形成对氧化应激、炎症和凋亡的三重调控网络。现有研究为甲基莲心碱的心肌保护作用提供了理论依据,后续可深入探索其信号通路的交互作用机制及临床转化潜力。

2.4.2 莲心碱 Zhang等^[53]采用 LPS 诱导的脓毒症小鼠模型,通过血清酶学指标检测[肌酸激酶(CK)、LDH]、组织病理学观察及分子生物学技术(qRT-PCR、Western blot),探讨了莲心碱对心肌损伤的保护作用,结果发现莲心碱通过多靶点发挥保护效应:抑制 NF- κ B 通路减轻炎症反应(降低 IL-1 β 、TNF- α 、iNOS,上调 IL-10),激活 Nrf2/Keap1 通路增强抗氧化能力(提高 SOD/CAT/GSH-Px 活性,降低 MDA),抑制 Bax/caspase 凋亡通路减少细胞死亡,并通过调控 LC3/ATG5/P62 轴促进自噬,揭示莲心碱通过“抗炎-抗氧化-抗凋亡-促自噬”多通路协同作用保护心肌,为脓毒症小鼠的心脏损伤提供了新的治疗策略。Shen等^[54]揭示莲心碱通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路对心肌梗死发挥保护作用。研究采用小鼠心肌梗死模型和过氧化氢(H_2O_2)诱导的氧化损伤细胞模型,结合超声心动图、Western blot 及 TOPFlash 报告基因实验,发现莲心碱显著改善心功能,减少梗死面积及纤维化标志物(胶原 I / III

下调),降低血清心肌损伤标志物。其机制在于抑制 β -catenin核转位(核内 β -catenin减少50%),阻断Wnt通路激活介导的氧化应激(γ -H2AX焦点减少60%)和DNA损伤。莲心碱通过靶向Wnt/ β -catenin通路调控氧化应激的新机制,为心肌梗死治疗提供了天然药物候选,但由于自身溶解度较差,未来可借助合适的载体材料增强莲心碱对心肌保护的靶向作用,优化药物递送系统,提高其体内生物利用度,以期达到更好的治疗效果。

2.4.3 异莲心碱 截至目前,异莲心碱在心肌保护方面的研究报道同样极其缺乏。目前只有张翔等^[55]比较深入地揭示了异莲心碱通过激活Nrf2/HO-1通路减轻H/R诱导的心肌细胞凋亡。研究采用原代心肌细胞H/R模型,发现异莲心碱($5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)通过上调Bcl-2/Bax比值(提升67%),抑制caspase-3表达,同时激活Nrf2/HO-1通路(mRNA表达分别增加2.4倍和2.5倍),显著提高细胞活力(提升80%),降低LDH(减少36%)和肌酸激酶同工酶(减少20%)释放,抑制凋亡率(从27.75%降至12.48%);异莲心碱通过抗氧化应激通路发挥心肌保护作用,为心肌缺血再灌注损伤治疗提供新靶点。后续可进一步开展体内实验验证疗效,并优化药物递送系统以提高生物利用度。

2.4.4 荷叶碱 Li等^[56]研究发现荷叶碱通过上调过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR- γ)改善小鼠心肌缺血再灌注损伤的分子机制。通过构建小鼠心肌缺血再灌注损伤模型及体外心肌细胞H/R模型,荷叶碱通过激活PPAR- γ 通路,减少促凋亡蛋白Bax和cleaved caspase-3的表达,从而降低心肌梗死面积、抑制心肌细胞凋亡及氧化应激水平,并恢复心室射血分数,得出荷叶碱或可作为潜在心肌保护剂的结论。Xie等^[57]通过构建小鼠急性心肌梗死模型及人冠状动脉微血管内皮细胞(human coronary microvascular endothelial cells, HCMECs)氧糖剥夺模型,发现荷叶碱可通过上调PI3K/AKT磷酸化水平,抑制血管内皮(VE)-钙黏蛋白内化,维持内皮细胞间连接完整性,达到显著降低心肌梗死面积、减少血管渗漏的效果,最终改善心肌微血管损伤。这表明荷叶碱可作为改善急性心肌梗死预后的潜在药物,为临床干预血管渗漏及心肌修复提供了新思路。

2.5 降低血脂

血脂调节方面,在4种莲子心生物碱成分中,主要是荷叶碱具有相关作用,其余3种成分作用尚不明确。Wang等^[58]采用高脂饮食大鼠模型结合RNA测序技术,发现荷叶碱($10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)能

显著降低体重(减少12%)、脂肪沉积(附睾脂肪减少35%)及血清三酰甘油(降低46%),并揭示其效果与调节肠道菌群密切相关。荷叶碱通过降低Firmicutes/Bacteroidetes比值(降低40%),减少产LPS菌属*Desulfovibrio*(丰度下降58%),同时富集产SCFAs菌属如*Prevotella*-9(丰度增加2.3倍),促进乙酸(增加32%)和丁酸(增加41%)生成,增强肠道屏障功能(ZO-1蛋白表达上调65%),抑制慢性炎症(TNF- α 降低38%)。可见荷叶碱通过“菌群-SCFAs-肠屏障”轴发挥代谢脂质调节的关键作用,为其低生物利用度下的药效提供了新机制。Yu等^[59]采用传统抗菌药物干预的伪无菌小鼠模型,结合宏基因组测序,发现荷叶碱($7.5\sim30\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)显著降低血清三酰甘油(降低38%)、总胆固醇(降低35%)及肝脏脂肪沉积,同样也发现其效果依赖于肠道菌群,机制上解释了荷叶碱可能通过富集嗜黏蛋白阿克曼菌(*Akkermansia muciniphila*, AKK),增强肠道屏障功能、抑制炎症反应并促进短链脂肪酸生成,从而改善脂质代谢。研究发现,荷叶碱主要通过调节肠道菌群以改善高脂饮食诱导的肥胖及代谢紊乱,从而发挥对高脂血症的干预作用。

3 总结与展望

莲子心作为传统中药的重要成分,其所含的4种主要生物碱类化合物在CVD的治疗中展现出独特的药理潜力。甲基莲心碱、莲心碱及异莲心碱在抗高血压和抗心律失常方面表现显著,它们可调节RAS系统,抑制Ang II的生成,并增强一氧化氮(NO)介导的内皮依赖性血管舒张功能;在抗心律失常方面,这些生物碱通过延长心肌细胞动作电位时程、阻滞钾离子外流,以及抑制氧化应激诱导的心肌电重构,有效改善室性心律失常;除此之外,荷叶碱为莲子心调节血脂的主要成分,现有研究揭示其主要以肠道菌群为靶点,改善脂质代谢紊乱,为高脂血症及血脂相关代谢疾病干预提供了新思路。4种成分在缺血再灌注损伤和心肌的保护作用中都展现出一些研究潜力,其机制主要涉及减少ROS生成,激活PI3K/AKT/NF- κ B通路,抑制炎症因子释放(如TNF- α 、IL-6),并通过调控Bcl-2/Bax平衡减少细胞凋亡。尽管研究取得些许进展,但未来4种莲子心生物碱成分在心血管领域的研究潜力仍须进一步深入探索:

①多靶点协同机制:现有研究多聚焦单一通路,需结合代谢组学与蛋白互作网络,解析生物碱对心血管系统的整体调控网络;②临床转化瓶颈:多数证据来自动物模型,须推进剂量优化、

药代动力学研究及长期安全性评估；③ 新型递送系统开发：针对生物碱口服生物利用度低的问题，可设计纳米载体或前药策略提高靶向性；④ 个性化治疗潜力：结合基因组学探讨生物碱对不同心血管表型的响应差异，为精准用药提供依据。

综上，4 种莲子心生物碱凭借多效性药理作用，有望成为 CVD 防治的天然候选药物。未来研究需跨越基础与临床的鸿沟，推动其从实验室向实际应用的转化，为 CVD 治疗开辟植物药理学的新篇章。

参考文献

- [1] Perry AS, Dooley EE, Master H, et al. Physical activity over the lifecourse and cardiovascular disease [J]. *Circ Res*, 2023, 132 (12): 1725-1740.
- [2] Chen SX, Li XP, Wu JX, et al. Plumula Nelumbinis: a review of traditional uses, phytochemistry, pharmacology, pharmacokinetics and safety [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 266: 113429.
- [3] Zhao T, Zhu YC, Zhao R, et al. Structure-activity relationship, bioactivities, molecular mechanisms, and clinical application of nuciferine on inflammation-related diseases [J]. *Pharmacol Res*, 2023, 193: 106820.
- [4] 黄丹丹, 张飞, 肖凌, 等. 莲子心中 3 种生物碱类成分含量影响因素分析 [J]. *中国药师*, 2021, 24 (5): 867-875.
- [5] 卢青, 柯庆. 甲基莲心碱对兔离体脑基底动脉收缩的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11 (4): 322-324.
- [6] 陈歆, 王波, 廖慧颖, 等. 甲基莲心碱对家兔离体肠系膜动脉环收缩性能的影响 [J]. *内蒙古中医药*, 2014, 33 (12): 136.
- [7] 陆曙, 龚少愚, 张志斌. 莲心碱对高血压大鼠左室肥厚及心肌肌浆网钙泵活力的影响 [J]. *江苏中医药*, 2006, 27 (2): 59-60.
- [8] 贾沛芝, 林珊, 曾建伟, 等. 莲心碱体外吸收对 Ang II 诱导血管平滑肌细胞表型转化的影响 [J]. *福建中医药*, 2022, 53 (5): 20-23.
- [9] 冯秀玲, 喻欣, 肖军花, 等. 异莲心碱对心血管功能及压力超负荷型左心室肥大的作用 [J]. *华中科技大学学报 (医学版)*, 2002, 31 (6): 608-611.
- [10] 陆曙, 张志斌, 龚少愚, 等. 异莲心碱对高血压大鼠左室肥厚及心肌肌浆网钙泵活力的影响 [J]. *中华高血压杂志*, 2008, 16 (1): 33-35.
- [11] 吴运明, 胡本容, 贾菊芳. 甲基莲心碱对电解性氧自由基损伤离体大鼠心脏的保护作用 [J]. *中国药理学通报*, 1996, 12 (4): 325-328.
- [12] Wang C, Chen YF, Quan XQ, et al. Effects of neferine on Kv4.3 channels expressed in HEK293 cells and ex vivo electrophysiology of rabbit hearts [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2015, 36 (12): 1451-1461.
- [13] 王嘉陵, 农艺, 姚伟星, 等. 莲心碱对豚鼠心室肌细胞动作电位及钠与钙电流的影响 [J]. *中草药*, 2000, 31 (3): 193-196.
- [14] 杨健, 罗顺德, 陈怡. 莲心碱衍生物抗实验性心律失常的作用 [J]. *医药导报*, 2003, 22 (11): 758-760.
- [15] 张帆, 王嘉陵, 钱家庆. 异莲心碱抗实验性心律失常作用及对豚鼠心肌动作电位的影响 [J]. *中草药*, 2000, 31 (10): 753-755.
- [16] Sengking J, Oka C, Wicha P, et al. Neferine protects against brain damage in permanent cerebral ischemic rat associated with autophagy suppression and AMPK/mTOR regulation [J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58 (12): 6304-6315.
- [17] 王勇, 黄劲柏. 莲心碱改善脑缺血再灌注损伤的机制 [J]. *时珍国医国药*, 2012, 23 (6): 1593-1594.
- [18] 陈畅. 从 G3BP1 介导的应激颗粒角度探讨荷叶碱的抗脑缺血作用及机制 [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2024.
- [19] Lohanathan BP, Rathinasamy B, Huang CY, et al. Neferine attenuates doxorubicin-induced fibrosis and hypertrophy in H9c2 cells [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2022, 36 (7): e23054.
- [20] Liang XY, Wang SY, Wang LF, et al. Mitophagy inhibitor liensinine suppresses doxorubicin-induced cardiotoxicity through inhibition of Drp1-mediated maladaptive mitochondrial fission [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 157: 104846.
- [21] Harishkumar R, Christopher JG, Ravindran R, et al. Nuciferine attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity: an in vitro and in vivo study [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2021, 21 (11): 947-963.
- [22] 张丽静, 艾耀伟, 王政强. 荷叶碱防治小鼠高脂血症作用及其机制 [J]. *医药导报*, 2015, 34 (4): 440-444.
- [23] Zheng LW, Cao YW, Liu S, et al. Neferine inhibits angiotensin II-induced rat aortic smooth muscle cell proliferation predominantly by downregulating fractalkine gene expression [J]. *Exp Ther Med*, 2014, 8 (5): 1545-1550.
- [24] 高帅. 甲基莲心碱对野百合碱诱导的大鼠肺动脉高压的影响 [D]. 青岛: 青岛大学, 2022.
- [25] Zeng WQ, Zhang XL, Lu Y, et al. Neferine ameliorates hypertensive vascular remodeling modulating multiple signaling pathways in spontaneously hypertensive rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 158: 114203.
- [26] Guo Z, Wu MZ, Chen LQ, et al. Neferine attenuates hypertensive cardiomyocyte apoptosis and modulates key signaling pathways: an in vivo and in vitro study [J]. *Eur J Pharmacol*, 2025, 994: 177393.
- [27] 黄先菊, 罗顺德. 莲心碱对家兔主动脉条收缩性能的影响 [J]. *中国药理学杂志*, 2005, 40 (2): 109-111.
- [28] 陆曙, 潘扬, 陶冉, 等. 莲心碱与莲心季铵碱对肾性高血压大鼠左室肥厚逆转作用的比较 [J]. *南京中医药大学学报*, 2008, 24 (5): 327-329.
- [29] Jia PZ, Chen DX, Zhu Y, et al. Liensinine improves ang II -induced vascular remodeling via MAPK/TGF- β 1/Smad2/3 signaling [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 317: 116768.
- [30] Xiao JH, Zhang YL, Feng XL, et al. Effects of isoliensinine on angiotensin II -induced proliferation of porcine coronary arterial smooth muscle cells [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2006, 8 (3): 209-216.
- [31] 陆曙, 张志斌, 龚少愚, 等. 异莲心碱防止高血压大鼠左室肥厚的可能机制 [J]. *中华高血压杂志*, 2008, 16 (1): 33-35.

- [32] 姚梦滢, 吴与伦, 吴美珠, 等. 基于网络药理学和实验验证探讨异莲心碱治疗高血压的作用机制 [J]. 福建中医药, 2023, 54 (8): 44-49.
- [33] Yao MY, Wu M, Yuan M, et al. Enhancing the therapeutic potential of isoliensinine for hypertension through PEG-PLGA nanoparticle delivery: a comprehensive in vivo and in vitro study [J]. Biomed Pharmacother, 2024, 174: 116541.
- [34] Guo ZB, Li Q, Cao HY, et al. Antiarrhythmic efficacy of neferine assessed by programmed electrical stimulation in a canine model of electropharmacology [J]. Chin Pharm Sci, 2002 (2): 35-42.
- [35] 王琛. 甲基莲心碱对稳定表达于 HEK293 细胞上的 Kv4.3 通道、Nav1.5 通道的作用及其对兔离体心脏电生理的影响 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2016.
- [36] Jiang XX, Zhang R, Wang HS. Neferine mitigates angiotensin II -induced atrial fibrillation and fibrosis via upregulation of Nrf2/HO-1 and inhibition of TGF- β /p-Smad2/3 pathways [J]. Aging (Albany NY), 2024, 16 (10): 8630-8644.
- [37] 魏婷, 梁喆, 金彦, 等. 小檗碱、莲心碱和甲基莲心碱对 HERG 通道表达的影响 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38 (2): 239-244.
- [38] Cao F, Wang T, Ding WM, et al. Effects of diacetyl-liensinine on electrophysiology in rabbit ventricular myocytes [J]. BMC Pharmacol Toxicol, 2017, 18: 33.
- [39] Wang TY, Streeter H, Wang X, et al. A network pharmacology study of the multi-targeting profile of an antiarrhythmic Chinese medicine Xin Su Ning [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 1138.
- [40] 陈默思, 贾麟, 费宇杰, 等. 异莲心碱对牵张性心律失常的作用 [J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26 (6): 658-661.
- [41] Liu ZP, Hu LK, Zhang ZF, et al. Isolienisnine eliminates afterdepolarizations through inhibiting late sodium current and L-type calcium current [J]. Cardiovasc Toxicol, 2021, 21 (1): 67-78.
- [42] Zhu JJ, Yu BY, Huang XK, et al. Neferine protects against hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats by suppressing NLRP3-mediated inflammasome activation [J]. Oxid Med Cell Longevity, 2021, 2021: 6654954.
- [43] Zheng ZJ, Zhu LZ, Qiu H, et al. Neferine inhibits BMECs pyroptosis and maintains blood-brain barrier integrity in ischemic stroke by triggering a cascade reaction of PGC-1 α [J]. Sci Rep, 2024, 14: 14438.
- [44] 余万桂, 张恒文, 杨涛, 等. 莲心碱对大鼠局灶性脑缺血 / 再灌注损伤的抗氧化作用 [J]. 中药药理与临床, 2013, 29 (2): 32-35.
- [45] Qiao WC, Zang ZX, Li DW, et al. Liensinine ameliorates ischemia-reperfusion-induced brain injury by inhibiting autophagy via PI3K/AKT signaling [J]. Funct Integr Genomic, 2023, 23 (2): 140.
- [46] 徐俊英, 冯霞, 冯秀玲, 等. 异莲心碱对实验性前脑缺血 / 再灌注损伤的保护机制 [J]. 华中科技大学学报 (医学版), 2006 (2): 231-233.
- [47] Wu LL, Chen C, Li YB, et al. UPLC-Q-TOF/MS-based serum metabolomics reveals the anti-ischemic stroke mechanism of Nuciferine in MCAO rats [J]. ACS Omega, 2020, 5 (51): 33433-33444.
- [48] 刘晓旭. 基于 PERK/Nrf2 信号通路探讨荷叶碱对脑缺血再灌注损伤保护的作用机制 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2024.
- [49] Li JH, Dong SZ, Quan SL, et al. Nuciferine reduces inflammation induced by cerebral ischemia-reperfusion injury through the PI3K/AKT/NF- κ B pathway [J]. Phytomedicine, 2024, 125: 155312.
- [50] Qi Z, Wang RR, Liao RH, et al. Neferine ameliorates sepsis-induced myocardial dysfunction through anti-apoptotic and antioxidative effects by regulating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 706251.
- [51] Lu C, Jiang B, Xu J, et al. Neferine protected cardiomyocytes against hypoxia/oxygenation injury through SIRT1/Nrf2/HO-1 signaling [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2023, 37 (8): e23398.
- [52] Sun XQ, Gu YW, Liu XH, et al. Neferine pretreatment attenuates isoproterenol-induced cardiac injury through modulation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis in rats [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2024, 196 (10): 7404-7428.
- [53] Zhang W, Wang TL, Chen HZ, et al. Liensinine alleviates septic heart injury by targeting inflammation, oxidative stress, apoptosis, and autophagy [J]. Acta Bioch Bioph Sin, 2023, 55 (3): 521-524.
- [54] Shen F, Wu CL, Zhong XM, et al. Liensinine prevents ischemic injury following myocardial infarction via inhibition of Wnt/ β -catenin signaling activation [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 162: 114675.
- [55] 张翔, 张博方. 异莲心碱促进 Nrf2/HO-1 通路减轻缺氧 / 复氧致心肌细胞凋亡的机制研究 [J]. 河北医药, 2023, 45 (11): 1611-1615, 1620.
- [56] Li RS, Qin XC, Yue LJ, et al. Nuciferine improves cardiac function in mice subjected to myocardial ischemia/reperfusion injury by upregulating PPAR- γ [J]. Heliyon, 2023, 9 (2): e13630.
- [57] Xie W, Chen SM, Wang WZ, et al. Nuciferine reduces vascular leakage and improves cardiac function in acute myocardial infarction by regulating the PI3K/AKT pathway [J]. Sci Rep, 2024, 14: 7086.
- [58] Wang Y, Yao WF, Li B, et al. Nuciferine modulates the gut microbiota and prevents obesity in high-fat diet-fed rats [J]. Exp Mol Med, 2020, 52 (12): 1959-1975.
- [59] Yu Y, Lu J, Sun L, et al. Akkermansia muciniphila: a potential novel mechanism of nuciferine to improve hyperlipidemia [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 133: 111014.

(收稿日期: 2025-03-14; 修回日期: 2025-04-28)

TLR4/NF- κ B 信号通路在神经退行性疾病中的研究进展

夏鋈涛, 孙逸, 何玲* (中国药科大学药学院, 南京 211198)

摘要: Toll 样受体 4 (TLR4) / 核因子 κ B (NF- κ B) 信号通路是调控炎症与适应性免疫应答的重要通路。多项研究表明, 小胶质细胞介导的神经炎症是神经退行性疾病的关键因素。TLR4/NF- κ B 信号通路通过激活小胶质细胞并诱导促炎因子的释放, 导致持续的神经炎症反应, 加剧了神经元的损伤, 与神经退行性疾病的发展存在密切联系, 因此, 针对 TLR4/NF- κ B 信号通路的调控成为潜在的治疗靶点, 抑制该通路的激活可减轻神经炎症并延缓疾病进程。本文综述了 TLR4/NF- κ B 信号通路在神经退行性疾病中的研究进展, 并探讨了基于该通路的治疗策略, 以期对相关药物开发和临床应用提供新的视角和理论参考。

关键词: TLR4/NF- κ B 信号通路; 神经炎症; 神经退行性疾病; 小胶质细胞; 神经元

中图分类号: R741, R96 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)12-3638-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.025

Research progress in the role of TLR4/NF- κ B signaling pathway in neurodegenerative diseases

XIA Juntao, SUN Yi, HE Ling* (School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198)

Abstract: Toll-like receptor 4 (TLR4)/nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway regulates both the inflammation and adaptive immune responses. Microglia-mediated neuroinflammation has been found to be a key factor in the development of neurodegenerative diseases. TLR4/NF- κ B signaling pathway is closely associated with neurodegeneration through microglial activation and promoting the release of pro-inflammatory factors, leading to a persistent neuroinflammatory response and exacerbating neuronal damage. Therefore, modulation of the TLR4/NF- κ B pathway is important in the treatment of the above mentioned diseases, as preventing activation of the pathway would reduce the neuroinflammation and delay disease progression. This article reviewed research progress in the role of TLR4/NF- κ B signaling pathway in neurodegenerative diseases and discussed therapeutic strategies based on this pathway, providing new perspectives and theoretical references for drug development and clinical applications.

Key words: Toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B; neuroinflammation; neurodegenerative disease; microglia; neuron

神经退行性疾病是以神经胶质细胞过度激活、神经元及其髓鞘的进行性丧失、异常蛋白病理性沉积等为主要病理特征的慢性疾病, 主要包括阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)、帕金森病 (Parkinson's disease, PD)、血管性痴呆 (vascular dementia, VaD)、亨廷顿病 (Huntington's disease, HD)、肌萎缩侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS)、多发性硬化 (multiple sclerosis, MS)^[1]。慢性神经炎症是

神经退行性疾病的共同特征^[2]。小胶质细胞表面的 Toll 样受体 4 (TLR4) 作为先天免疫系统中的模式识别受体 (PRRs) 能够识别外源性病原体 (如病毒蛋白) 以及内源性异常蛋白 (如淀粉样蛋白)^[3-4], 并激活核因子 κ B (NF- κ B) 导致炎症级联反应。神经元功能障碍与 NF- κ B 的激活和促炎因子如肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 (IL)-1 β (IL-1 β)、活性氧 (ROS) 的释放密切相关^[5]。大量研究表明 TLR4/NF- κ B 信号通路是先

作者简介: 夏鋈涛, 男, 硕士, 主要从事阿尔茨海默病药理研究, email: xiajuntao1008@aliyun.com * 通信作者: 何玲, 女, 教授, 主要从事神经退行性疾病靶点及机制研究, email: heling92@hotmail.com

天免疫应答的核心调控通路,其过度活化可驱动代谢紊乱、神经变性及肿瘤进展。近年来的研究表明 TLR4/NF- κ B 信号通路介导神经炎症,在神经退行性疾病中发挥重要作用^[6-7]。本文结合近年来国内外的研究,对 TLR4/NF- κ B 信号通路在神经退行性疾病中的作用及治疗意义进行综述,并探讨其潜在治疗价值。

1 TLR4/NF- κ B 信号通路

TLRs 是模式识别受体的一类,是先天免疫系统的重要组成部分,而 TLR4 是 Toll 样受体蛋白家族的一员^[8]。到目前为止,在人类基因组中共确认了 10 个功能性的 TLRs (TLR1 ~ TLR10),在感染防御、组织修复和炎症反应等过程中发挥核心作用^[9],其中 TLR4 是最早被研究的 Toll 样受体之一^[10]。如图 1 所示,TLR4 作为跨膜糖蛋白含有 3 个结构域。胞外含亮氨酸富集重复 (LRR) 结构域与胞外髓样分化蛋白 2 (MD-2) 结合负责识别病原体相关分子模式 (PAMPs) 及损伤相关分子模式 (DAMPs)。跨膜结构域 (TMD) 稳定受体结构和促进 TLR4 的二聚化。胞内 Toll/IL-1 受体 (TIR) 结构域结合特定的适配蛋白^[11]并通过两条主要的信号通路启动免疫反应并激活下游 NF- κ B 信号通路 (见图 2)。

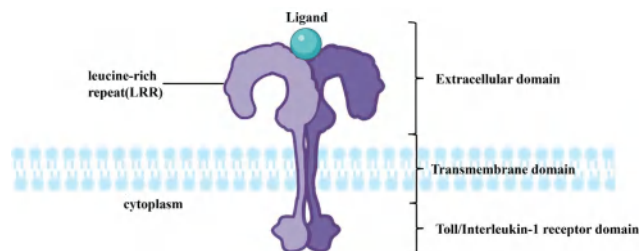


图 1 TLR4 的结构^[11]

Fig 1 Structure of TLR4^[11]

激活的 TLR4 经由髓系分化因子 88 (MyD88) 依赖性通路和含 TIR 结构域干扰素 β 诱导因子 (TRIF) 依赖性通路协调调控下游信号传导^[12]。TRIF 和 TRIF 相关接头分子 (TRAM) 通过细胞的内吞作用被带入细胞内形成内体,通过下游信号传导释放 I 型干扰素 (IFN- I)^[13]。NF- κ B 是一类关键的转录因子,在调控免疫应答、炎症反应、细胞增殖和存活以及细胞凋亡等多个生物学过程中发挥重要作用^[14]。哺乳动物 NF- κ B 家族蛋白有 5 种,包括 RelA (p65)、RelB、c-Rel、p50 和 p52,这些亚基可以形成各种同源或异源二聚体,在大多数的细胞类型中,这些二聚体主要存在于细胞质中。其中 p50 和 p65 组成的异二聚体是 NF- κ B 最主要的激活形式^[15],在非激活状态下,位于细胞质中的 p50 和 p65 组成的异二聚体通常与抑制性蛋白 κ B (I κ B) 结合在一起。当细胞受

到炎症因子、细胞因子或其他信号的刺激时,通过 TLR4 激活 κ B 抑制因子激酶 (IKK)。IKK 的激活导致 I κ B 的磷酸化和随后的泛素化降解,释放由 p50 和 p65 组成的异二聚体进入细胞核,异二聚体结合到特定的 DNA 序列上,调控多种基因的表达,这些基因通常涉及多种炎症介质和趋化因子的产生^[16]。

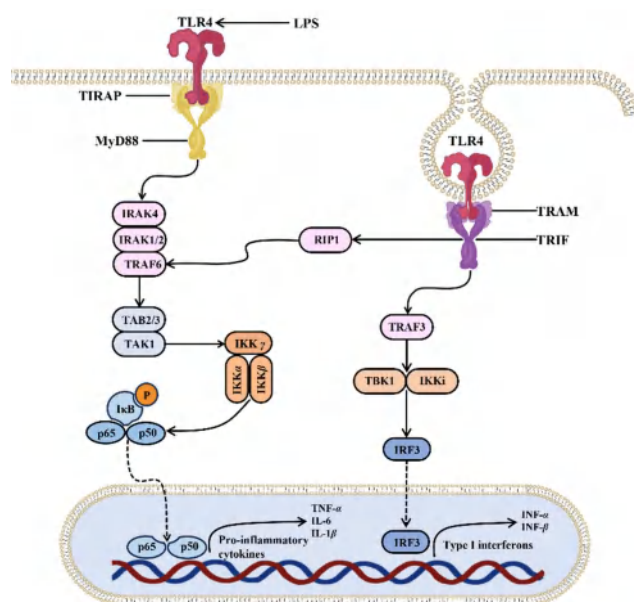


图 2 TLR4/NF- κ B 信号通路机制图^[11]

Fig 2 Mechanism of TLR4/NF- κ B signaling pathway^[11]

注 (Note): TIR 结构域适配蛋白 (TIR domain-containing adaptor protein, TIRAP); 肿瘤坏死因子受体相关因子 (TNF receptor-associated factor, TRAF); 受体相互作用蛋白激酶 1 (receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1, RIP1); IL-1 受体相关激酶 (interleukin-1 receptor-associated kinase, IRAK); TANK 结合激酶 1 (TANK-binding kinase 1, TBK1); TGF- β 激活激酶 1 结合蛋白 2/3 (TGF-beta-activated kinase 1-binding protein 2/3, TAB2/3); TGF- β 激活激酶 1 (transforming growth factor beta-activated kinase 1, TAK1); 干扰素调节因子 3 (interferon regulatory factor 3, IRF3)。

TLR4 配体包括 PAMPs 和 DAMPs。PAMPs 是微生物保守的结构组分,可被免疫系统特异性识别,典型代表有细菌脂多糖 (LPS) 和病毒蛋白等^[17]。TLR4/NF- κ B 信号通路在病毒感染相关的神经炎症中起关键调控作用。Tang 等^[18]构建了大鼠博尔纳病毒 (BoDV-1) 感染模型,发现海马区 TLR4/MyD88 通路的活化水平与炎症因子浓度呈正相关,感染组动物在 Morris 水迷宫测试中表现出空间记忆损伤,提示 TLR4 激活可能通过过度的先天性免疫应答加速认知衰退。类似地,在呼吸道合胞病毒 (RSV) 感染小鼠神经母细胞瘤细胞 (N2a) 模型中,RSV 通过 TLR4 诱导 NF- κ B 核转位,导致促炎因子 (IL-1 β) 分泌增加及线粒体途径凋亡,进一步支持 TLR4 作

为病毒性神经炎症的靶点^[19]。DAMPs 主要包括 A β 、热休克蛋白 (HSP)、S100 钙结合蛋白 A9 (S100A9)、高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 等,在神经退行性疾病中驱动 TLR4 介导的慢性炎症^[20]。以 A β 为例,其异常聚集可通过结合小胶质细胞表面的 TLR4,激活 NF- κ B 信号并上调炎症小体 (NLRP3) 转录,形成以 IL-1 β 、IL-18 过量释放为特征的促炎微环境,最终导致突触丢失及神经元凋亡^[21]。凋亡的神经元释放的线粒体 DNA (mtDNA)、循环游离 DNA (cfDNA) 和 HMGB1 可以作为 DAMPs 引起炎症。促炎因子会活化小胶质细胞主动释放 HSP 和 S100A9^[22]。在生理状态下, HMGB1 主要位于细胞核内,通过动态结合 DNA 参与染色质的调控,在维持核小体稳定性及基因转录激活中发挥重要作用。然而,在多种细胞死亡模式 (如凋亡及焦亡) 的病理进程中, HMGB1 可被小胶质细胞主动分泌至胞外,激活 TLR4^[23]。S100A9 是 S100 家族的一员,可参与小胶质细胞表型的转换,在 AD 疾病前期能直接抑制 A β 病理性聚集、减少 ROS 生成及促凋亡因子激活,从而发挥神经保护功能;而在疾病后期,与 Ca²⁺ 协同促进 A β 原纤维稳定化,加速老年斑成熟,加剧神经元损伤^[24]。

值得注意的是, TLR4/NF- κ B 信号通路受到凋亡信号通路的负性调节。半胱天冬酶 8 (Caspase-8) 在外源性死亡受体途径调节凋亡中发挥关键作用。TLR4 激活后,通过适配蛋白 TRIF 招募受体相互作用蛋白激酶-1 (RIPK1) 形成包含 Caspase-8 的信号复合物。Caspase-8 在此复合物中通过酶活性或非酶支架作用,促进下游 NF- κ B 的激活。在转录调控层面, Caspase-8 通过酶活性切割转录抑制因子 Nedd4 结合蛋白 1 (N4BP1),解除其对 NF- κ B 的抑制,增强炎症基因的表达^[25-26],提示细胞凋亡信号通过 TLR4/NF- κ B 信号通路具有炎症放大效应。

2 TLR4/NF- κ B 信号通路在神经退行性疾病中的作用

在中枢神经系统 (CNS) 中, TLR4/NF- κ B 信号通路在神经发育和神经保护等关键生理过程中发挥重要作用^[27]。作为 CNS 内高表达 TLR4 的常驻免疫效应细胞,小胶质细胞通过 TLR4/NF- κ B 通路协调免疫监视与炎症应答功能。生理状态下, TLR4 通过低水平活性参与突触修剪及损伤修复;当神经退行性疾病释放的各种 DAMPs 通过 TLR4/NF- κ B 信号级联触发小胶质细胞向促炎表型 (M1 型) 极化,驱动 NLRP3 炎症小体活化及 TNF- α 、ROS 等神经毒性因子的释放^[28]。活化的 NLRP3 驱动前体细胞因子 IL-1 β /IL-18 成熟并诱导消皮素 D

(GSDMD) 介导的细胞焦亡^[29]。IL-1 β 可诱导神经元 Tau 蛋白磷酸化加速,死亡的神经元也会释放 DAMPs,而 ROS 会进一步促进 TLR4 受体敏化,这种炎症信号级联通过正反馈环路持续放大,形成神经退行与免疫紊乱的恶性循环 (见图 3)。目前已证实,靶向 TLR4/NF- κ B 通路可通过重塑小胶质细胞表型转换的动态平衡,显著改善模型动物的认知及运动功能障碍^[30]。因此,更深入地探索该信号通路在疾病状态下的具体作用和调控机制,对于开发新的治疗方法具有重要意义。

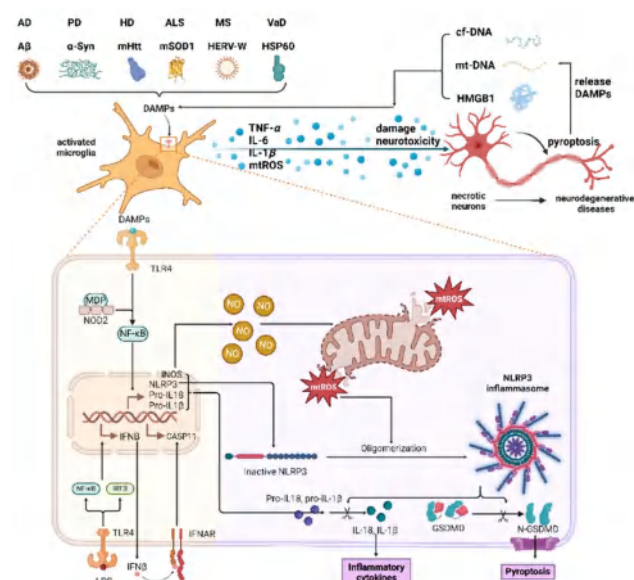


图 3 DAMPs 激活小胶质细胞损伤神经元机制图 (由 Biorender 软件绘制)

Fig 3 Mechanism of DAMPs activate microglia to damage neurons (drawn by Biorender)

2.1 TLR4/NF- κ B 信号通路在 AD 中的作用

AD 是一种导致记忆和认知功能逐渐丧失的神经退行性疾病^[31]。AD 的两个最典型的病理特征是细胞外 A β 的沉积和细胞内高磷酸化 Tau 蛋白的聚集^[32]。而基于 A β 和 Tau 假说的药物研发尚未取得实质性突破,神经炎症则逐渐成为 AD 治疗研究的热点。研究表明,神经炎症反应也是导致 AD 的一个关键因素,或许可以针对这一点寻求治疗 AD 的新方法^[33]。

中枢神经系统中的神经胶质细胞主要由小胶质细胞、星形胶质细胞和少突胶质细胞组成。小胶质细胞是主要常驻免疫细胞,在维持神经环境的免疫平衡方面发挥着重要作用^[34]。在 AD 患者的大脑皮质和脑脊髓液中观察到炎症因子的病理性蓄积,表明他们的大脑中存在持续的炎症反应^[35]。过去的观点认为神经炎症是 AD 病变的结果,而近年来的研究却认为其为 AD 发生发展的关键病理环节^[36]。神经影像技术结果显示,在 AD 早期阶段,

皮质区域的小胶质细胞异常激活甚至早于 $A\beta$ 斑块沉积及 Tau 病理的跨脑区扩散^[37], 提示神经炎症可能是主动驱动 AD 核心病理反应的关键上游事件。遗传学研究进一步支持神经炎症的核心地位。全基因组关联研究 (GWAS) 显示, 超过 50% 的 AD 风险基因集中于先天性免疫调控通路^[38], 涉及基因载脂蛋白 E (*APOE*)、髓系细胞触发受体 2 (*TREM2*)、分拣蛋白相关受体 1 (*SORL1*) 等^[39]。*TREM2* 作为免疫球蛋白超家族成员, 能调节炎症反应、能量代谢和小胶质细胞对受损神经元的吞噬作用, 其功能的多样性可能与它和大量配体相互作用有关, 如 $A\beta$ 、LPS 和 *APOE*^[40]。临床研究显示, *APOE* $\epsilon 4$ 携带者的小胶质细胞中 *TREM2* mRNA 表达量显著提升, 且与 PET 检测的 $A\beta$ 斑块沉积呈正相关^[41]。最近研究显示, *TREM2*-*APOE* 通路能驱动 AD 中小胶质细胞从稳态表型转变为神经退行性表型 (MGnD)^[42], 其特征包括协调抑制 NF- κ B 介导的促炎极化及上调甘露糖受体 (CD206) 抗炎亚群比例^[43], 这一机制为 *TREM2* 通过调节小胶质细胞表型转换干预 AD 提供了直接证据。而在体外实验中, 姜黄素通过抑制 BV2 细胞中 TLR4/NF- κ B 通路激活并上调 *TREM2* 表达, 从而减轻 LPS 诱导的神经炎症^[44], 进一步展现出 TLR4/NF- κ B 信号通路通过 *TREM2* 干预 AD 的潜力。

近年来研究揭示, 肠道菌群通过肠-脑轴调控中枢神经系统炎症微环境的机制, 已成为解析 AD 发病机制的重要突破口^[45]。AD 患者肠道菌群表现为多样性降低、菌群失调、益生菌丰度下降及微生物代谢产物改变, 上述菌群紊乱可能通过诱发炎症, 破坏血脑屏障 (BBB) 的完整性, 增加其通透性, 特定菌群产生的 LPS 或淀粉样蛋白会突破 BBB 激活脑内 TLR4/NF- κ B 信号通路引发神经炎症^[46], 这种跨器官信号级联现象为 AD 的病理阻断提供新的治疗方向。

2.2 TLR4/NF- κ B 信号通路在 PD 中的作用

PD 是继 AD 之后最常见的神经退行性疾病, 主要在 65 岁以上的人群中流行。PD 的临床表现包括僵硬、震颤, 其病理特征是黑质致密部 (SNpc) 中多巴胺能神经元的丢失以及错误折叠的 α 突触核蛋白 (α -Syn) 异常聚集^[47]。具有 PD 病理学的大脑区域显示小胶质细胞的过度激活和促炎细胞因子水平升高, 并且可能比 α -Syn 的积累和 PD 的发作更早发生, 表明炎症是 PD 病理的重要组成部分^[48-49]。因此, 靶向神经炎症或可成为阻断 α -Syn 的朊病毒样扩散的可行策略, 为疾病治疗提供新靶点。

α -Syn 作为内源性的 DAMP 会被小胶质细胞上

的 TLR4 识别, 激活小胶质细胞内的 NLRP3, 最终通过 NF- κ B 的易位释放促炎细胞因子, 诱导神经炎症级联反应与线粒体稳态失衡, 最终引发多巴胺能神经元的不可逆退变^[50]。通过转录组数据分析, 在 PD 患者的不同脑区域中, TLR4 及其衔接蛋白 MyD88、下游信号分子 NF- κ B 的表达更高, 其中黑质致密部 (SN) 和壳核中的上调最明显^[51]。此外, 跨膜转运蛋白 (TSPO)-PET 检测显示, 脑桥、基底节及额颞叶等区域的 TSPO 结合量显著升高, 提示小胶质细胞介导的免疫应答在边缘系统及皮层下结构广泛激活^[52]。研究发现, 在 PD 患者死后的脑组织中, TLR4 表达水平与促炎因子 IL-1 β 及 IL-10 的异常上调呈正相关, 提示 TLR4 对局部神经炎症的放大作用^[53]。有研究发现, 鱼藤酮处理的 *Tlr4*^{-/-} 小鼠相对于鱼藤酮处理的野生型动物, 肠道炎症、运动功能障碍和神经炎症减弱, 对 PD 患者结肠活检的研究进一步揭示, 肠道 TLR4 的过度激活可能导致肠屏障功能受损, 表现为血浆内毒素 (LPS) 等微生物易位标志物水平升高, 伴随肠道上皮细胞促炎因子基因表达异常上调^[54]。然而关于 TLR4 在 PD 模型中的神经保护作用存在一些争议。一项研究显示, 用 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶 (MPTP) 诱导的 *Tlr4*^{-/-} 小鼠 PD 模型中, 黑质多巴胺能神经元丢失加剧, 同时引发 α -Syn 在中脑沉积及全脑 mRNA 异常高表达, 尽管 MPTP 毒素能显著上调 α -Syn 基因转录, 但其调控因子 GATA 结合蛋白 2 (GATA2) 的表达不受 *Tlr4* 缺失影响, 提示 TLR4 独立于 GATA2 转录调控 α -Syn 的机制, 具有神经元保护性调控作用^[55]。

总结来说, TLR4 在 PD 中呈现双面作用: 急性期识别异常 α -Syn, 激活胶质细胞吞噬并释放适量炎症因子, 促进 α -Syn 清除以延缓 PD 进展; 慢性期持续活化诱导神经炎症风暴, 加重神经退行性病变并加速病程进展。

2.3 TLR4/NF- κ B 信号通路在 VaD 中的作用

VaD 是因慢性脑低灌注所致缺血缺氧性损伤引发的综合征, 涉及神经炎症与 Tau 病理等多种因素, 导致神经血管单位损伤、脑血流量减少及认知持续衰退^[56]。神经炎症与 BBB 被认为与 VaD 有密切联系, BBB 破坏会激活小胶质细胞和星形胶质细胞并释放促炎因子, 进一步加剧 BBB 损伤, 形成神经炎症与 BBB 功能障碍相互促进的恶性循环^[57-58]。HSP60 通过外泌体激活 TLR4/NF- κ B 通路, 介导糖尿病相关 VaD 的神经炎症及 BBB 损伤^[59]。黄芩素除直接抑制神经炎症外, 还通过重塑肠道菌群, 降低促炎菌丰度, 改善肠-脑轴双向调控, 为慢性脑低灌注模型提供多靶点

干预策略。这些结果显示, TLR4/NF- κ B 通路不仅是神经炎症枢纽, 其与肠道微生物的跨系统互作或成为 VaD 治疗突破口, 但临床转化仍面临 BBB 穿透效率低、菌群个体差异等挑战^[60]。

2.4 TLR4/NF- κ B 信号通路在 HD 中的作用

HD 是一种由 *Huntingtin* 基因中 CAG 三核苷酸重复序列异常扩增引发的神经退行性疾病。该病以运动障碍、认知衰退及精神症状为特征, 伴随纹状体中等多棘神经元 (MSNs) 选择性退化及多聚谷氨酰胺链 (PolyQ) 的形成。扩增的 PolyQ 增强淀粉样蛋白聚集倾向, 形成寡聚体破坏神经细胞通路^[61]。全基因组分析发现, 与健康对照相比, NF- κ B 家族成员中 4 个成员的 mRNA 水平表达存在显著差异。动物实验表明, 基因分型确认的 *Thr4*^{+/-} HD 小鼠相较野生型 *Thr4*^{+/+} 小鼠生存期显著延长^[62]。临床研究进一步发现, HD 患者纹状体中 TLR4 和 TREM2 表达增加, 且 *TLR4* 基因多态性与运动功能衰退加速相关, 而 *TREM2* 基因 R47H 点突变则与认知恶化显著关联。TLR4 通过调控神经炎症影响 HD 表型, 而 TREM2 可能参与认知损伤机制^[63]。这些发现为靶向 TLR4/NF- κ B 先天免疫信号轴的干预策略提供了理论依据, 提示抑制特定炎症通路或可延缓 HD 病理进展。

2.5 TLR4/NF- κ B 信号通路在 ALS 中的作用

ALS 是累及运动神经元的神经退行性疾病, 以进行性肌无力和呼吸衰竭为特征, 涉及氧化应激、线粒体失调及神经炎症等核心机制^[64]。研究揭示皮质运动神经元中 ALS 相关基因特异性富集, 证实其遗传易感性及细胞自主调控的关键作用^[65]。机制上, SOD1-TLR4/NF- κ B 轴异常激活驱动 NLRP3 炎症小体及外周免疫应答, *SOD1G93A* 转基因模型显示脊髓 TLR4 及 NF- κ B 核转位上调^[66], 提示炎症级联反应是 ALS 进展的核心机制。Saleki 等^[67]开发的 TLR4 靶向多表位疫苗通过激活 NF- κ B 信号诱导辅助性 T 细胞 2 型 (Th2) 极化, 免疫模拟显示其可诱导 Th2 偏移和长效记忆反应, 实现对突变 SOD1/TDP43 的特异性清除, 为 ALS 靶向免疫治疗提供新方向。

2.6 TLR4/NF- κ B 信号通路在 MS 中的作用

MS 是累及中枢神经系统的慢性炎症性疾病, 以脱髓鞘、少突胶质细胞丢失及神经轴突损伤为特征。传统发病机制强调外周自身免疫 T/B 细胞浸润及血脑屏障破坏引发的继发免疫反应, 而基因和环境的作用进一步驱动促炎因子释放及小胶质细胞激活。现有疗法通过调控外周免疫细胞如靶向抑制 T 细胞迁移或控制小胶质活化延缓复发, 但慢性区室化炎症与累积性轴突变性仍是治疗难

点, 需进一步研究^[68-70]。有研究显示, MS 患者外周血及脑病变中人类内源性逆转录病毒 W 家族包膜蛋白 (HERV-W Env) 特异性高表达, 其水平与疾病进展呈正相关, 提示其作为生物标志物及治疗靶点的潜力^[71]。进一步研究表明, 病毒亚型 Env-ms 通过激活血管内皮细胞 TLR4 受体, 上调黏附分子、激活 NF- κ B 并诱导促炎因子分泌, 且该过程可被 TLR4 沉默阻断, 证实 TLR4-Env-ms 轴是驱动神经炎症的关键通路^[72], 这些发现为靶向 HERV-W Env 及 TLR4/NF- κ B 通路的治疗策略提供了分子机制依据。

3 TLR4/NF- κ B 信号通路相关调控剂

TLR4/NF- κ B 信号通路的异常激活导致多种神经退行性疾病炎症因子的过度释放。开发靶向 TLR4 受体、阻断 NF- κ B 核转位的小分子抑制剂或天然化合物, 或可成为治疗新策略。

3.1 靶向 TLR4 的抑制剂

TLR4 作为 TLR4/NF- κ B 通路的核心受体, 其过度激活通过触发下游促炎因子释放参与神经炎症及代谢疾病进程。抑制剂可通过结合 TLR4/MD2 复合物疏水口袋或阻断共受体募集, 抑制 NF- κ B 核转位与炎症级联反应, 为相关疾病的干预提供策略。

研究表明, 球形红杆菌 A (RsDPLA) 作为首个已知的天然 TLR4 拮抗剂, 可竞争性结合 TLR4/MD2 复合物, 阻断病原相关分子的促炎信号, 且在小鼠及人类模型中无显著毒性, 成为 TLR4 调控的重要分子工具^[73]。基于 RsDPLA 结构开发的临床级拮抗剂包括依立托兰四钠 (E5564) 和瑞沙托维 (TAK-242)^[74]。Hsieh 等^[75]用 Eritoran 治疗四氯化碳诱导的慢性肝损伤小鼠, 发现 TLR4 下游信号传导 MyD88 表达、p65 核转位被成功抑制。Feng 等^[76]用 TAK-242 治疗创伤性脑损伤 (TBI) 大鼠, TAK-242 显著下调了大鼠海马区 p65、TNF- α 和 IL-1 β 的表达。此外, 从植物中提取的天然化合物分子如姜黄素、白藜芦醇等, 也显示出了对 TLR4 的拮抗作用。Han 等^[77]评估长期口服姜黄素在 *APP/PS1* 转基因小鼠 AD 模型中的抗炎作用发现, 姜黄素处理可有效降低转基因小鼠海马体中 TLR4、NF- κ B 和 HMGB1 的表达, 改善 AD 小鼠的记忆衰退。在体内实验中, 姜黄素可有效调控 A β ₂₅₋₃₅ 激活的小胶质细胞炎症反应, 下调了 TLR4 的表达和促炎因子的释放, 保护神经元免受小胶质细胞介导的神经炎症损伤^[78]。尽管这些天然成分具有 TLR4 拮抗活性, 但其临床转化受限于化学稳定性差、靶向特异性差及代谢不稳定性等问题^[79]。靶向 TLR 抑制剂总结见表 1。

表 1 靶向 TLR4 的抑制剂
Tab 1 Inhibitors targeting TLR4

类别	抑制剂	机制	动物 / 细胞模型	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	文献
小分子抑制剂	依立托仑	竞争性结合 TLR4-MD2 复合物, 阻止天然配体识别	FFD/CCI ⁻ 慢性肝损伤小鼠模型	10	[75]
	瑞沙托维	结合 TLR4 的 TIR 结构域, 阻断其与下游适配蛋白 MyD88 和 TRIF 的相互作用	TBI 大鼠模型	0.5	[76]
天然产物	IAXO-102	选择性结合 MD2, 抑制 TLR4 二聚化及下游炎症信号	E4FAD 小鼠	10	[80]
	CLI-095	干扰 TLR4 内吞及 TRIF 依赖性信号传导	APP/PS1 小鼠	3	[81]
	姜黄素	结合 TLR4/MD2 疏水口袋, 抑制 NF-κB	6- 羟基多巴胺诱导的小鼠 PD 模型	100	[82]
	白藜芦醇	下调 TLR4 膜表达, 抑制 NLRP3 炎症小体激活	LPS 诱导的小鼠	30	[83]
	6- 姜烯酚	竞争性结合 MD2 活性位点, 抑制 TLR4 磷酸化	<i>Proteus mirabilis</i> 诱导的 PD 小鼠	10	[84]
	槲皮素	减少 TLR4 细胞膜表达, 抑制 TRIF/IRF3 通路活性	DPN 大鼠模型	30	[85]

3.2 靶向 NF-κB 的抑制剂

鉴于 NF-κB 于信号通路的过度激活在驱动神经炎症反应、病理性蛋白沉积及神经元损伤中的重要作用, 开发靶向该靶点的抑制剂已成为神经退行性疾病治疗干预的重要研究方向。Bay 11-7082 是一种磺酸衍生物, 具有多种药理活性, 其作用取决于乙烯基砜基^[86]。该小分子通过选择性抑制 IKK 的活性, 阻断 IκB 蛋白磷酸化及其后续的泛素化降解过程, 从而阻碍 NF-κB 二聚体向核内迁移, 抑制其介导的炎症及免疫相关基因转录

激活^[87]。小白菊内酯 (PN) 是一种倍半萜内酯化合物, 具有抑制 NF-κB 活性的作用^[88]。研究表明, PN 干预可显著降低实验大鼠海马及皮层组织中 IL-6 与 TNF-α 等炎症介质的异常表达^[89]。进一步研究指出, 在颅内出血 (ICH) 模型大鼠中, PN 通过阻断 TLR4/NF-κB 信号轴的过度活化, 抑制小胶质细胞介导的炎症介质的合成, 释放并抑制 ROS 水平的升高^[90]。以 NF-κB 蛋白为靶点的 TLR4/NF-κB 信号通路抑制剂总结见表 2。

表 2 靶向 NF-κB 的抑制剂
Tab 2 Inhibitors targeting NF-κB

类别	抑制剂	机制	动物 / 细胞模型	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	文献
小分子抑制剂	Bay 11-7082	抑制 IκBα 磷酸化, 阻断 NF-κB 核转位	链脲佐菌素诱导的 2 型糖尿病大鼠	3	[91]
	TPCA-1	特异性抑制 IKKβ, 阻断信号传导	体内结扎诱导的小鼠牙周炎模型	0.2	[92]
	DHMEQ	阻断 NF-κB 核转位, 抑制 DNA 结合	三硝基苯磺酸诱导的大鼠结肠炎模型	15	[93]
	IMD-0354	抑制 IKKβ, 阻断 NF-κB 激活	体内结扎诱导的小鼠牙周炎模型	10	[94]
天然产物	小白菊内酯	直接结合 IKK 复合体, 抑制其活性	链脲佐菌素诱导的 2 型糖尿病大鼠	0.5	[89]
	鼠尾草酸	抑制 IKKβ 的激酶活性, 阻断 IκBα 的磷酸化	APP/PS1 转基因小鼠	30	[95]
	银杏内酯	阻断 IκBα 降解, 抑制 NF-κB 核转位	慢性双侧颈总动脉闭塞大鼠 VaD 模型	5	[96]
	百里香醌	阻断 IκBα 降解, 抑制 NF-κB 核转位	LPS 诱导的大鼠神经炎症模型	10	[97]

4 总结与展望

神经退行性疾病因其进行性神经元损伤与高致残率已成为全球公共卫生难题, 病理机制复杂。TLR4/NF-κB 信号通路被证实为调控神经炎症的核心枢纽, 贯穿于神经元退变的全过程。该通路通过识别外源性病原体及内源性损伤分子, 驱动小胶质细胞过度激活并释放促炎因子, 同时诱导线粒体功能障碍、血脑屏障破坏及氧化应激级联反应。尤其在 AD、PD 等疾病中, TLR4/NF-κB 的异常活化不仅可加剧病理性蛋白沉积, 还影响突触可塑性及能量代谢平衡, 导致神经稳态失衡。目前研究揭示了姜黄素、白藜芦醇等天然产物的多靶点抑制潜力, 以及 TAK-242、Eritoran 等小分子药物通过特异性拮抗 TLR4-TIR 结构域实现神经保护作用的机制。然而, 如何在

抑制病理性炎症的同时维持神经免疫稳态, 仍是该通路转化的关键挑战。未来需进一步解析 TLR4/NF-κB 的激活机制, 并探索其与肠道菌群、蛋白质稳态系统的交互作用, 以期对神经退行性疾病的治疗提供潜在新靶点。

参考文献

[1] Armstrong R. What causes neurodegenerative disease? [J]. Folia Neuropathol, 2020, 58 (2): 93-112.
[2] Giri PM, Banerjee A, Ghosal A, et al. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: current knowledge and therapeutic implications [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25 (7): 3995.
[3] Tao L, Zhang L, Gao R, et al. Andrographolide alleviates acute brain injury in a rat model of traumatic brain injury: possible involvement of inflammatory signaling [J]. Front Neurosci, 2018, 12: 657.
[4] Muhammad T, Ikram M, Ullah R, et al. Hesperetin, a

- citrus flavonoid, attenuates LPS-induced neuroinflammation, apoptosis and memory impairments by modulating TLR4/NF- κ B signaling [J]. *Nutrients*, 2019, 11 (3): 648.
- [5] Sanz P, Garcia-Gimeno MA. Reactive glia inflammatory signaling pathways and epilepsy [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (11): 4096.
 - [6] Wu ZC, Song Y, Wang Y, et al. Biological role of mitochondrial TLR4-mediated NF- κ B signaling pathway in central nervous system injury [J]. *Cell Biochem Funct*, 2024, 42 (4): e4056.
 - [7] Leitner GR, Wenzel TJ, Marshall N, et al. Targeting toll-like receptor 4 to modulate neuroinflammation in central nervous system disorders [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2019, 23 (10): 865-882.
 - [8] Fitzgerald KA, Kagan JC. Toll-like receptors and the control of immunity [J]. *Cell*, 2020, 180 (6): 1044-1066.
 - [9] Temperley ND, Berlin S, Paton IR, et al. Evolution of the chicken Toll-like receptor gene family: a story of gene gain and gene loss [J]. *BMC Genomics*, 2008, 9 (8): 1-12.
 - [10] Behzadi P, García-Perdomo HA, Karpiński TM, et al. Toll-like receptors: general molecular and structural biology [J]. *J Immunol Res*, 2021, 2021 (1): 1-21.
 - [11] Kang JY, Lee JO. Structural biology of the Toll-like receptor family [J]. *Annu Rev Biochem*, 2011, 80 (1): 917-941.
 - [12] Pålsson-McDermott EM, O'Neill LAJ. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4 [J]. *Immunology*, 2004, 113 (2): 153-162.
 - [13] Choannasard A, Shofa M, Okabayashi T, et al. Conserved functions of orthohepadnavirus X proteins to inhibit type-I interferon signaling [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25 (7): 3739-3753.
 - [14] Dolcet X, Llobet D, Pallares J, et al. NF- κ B in development and progression of human cancer [J]. *Virchows Arch*, 2005, 446 (5): 475-482.
 - [15] Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity [J]. *Annu Rev Immunol*, 2000, 18 (1): 621-663.
 - [16] Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF- κ B [J]. *Genes Dev*, 2004, 18 (18): 2195-2224.
 - [17] Zindel J, Kubers P. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in immunity and sterile inflammation [J]. *Annu Rev Pathol Mech Dis*, 2020, 15 (1): 493-518.
 - [18] Tang T, Guo YJ, Xu XY, et al. BoDV-1 infection induces neuroinflammation by activating the TLR4/MyD88/IRF5 signaling pathway, leading to learning and memory impairment in rats [J]. *J Med Virol*, 2021, 93 (11): 6163-6171.
 - [19] Yuan XL, Hu T, He HW, et al. Respiratory syncytial virus prolifically infects N2a neuronal cells, leading to TLR4 and nucleolin protein modulations and RSV F protein co-localization with TLR4 and nucleolin [J]. *J Biomed Sci*, 2018, 25: 1-13.
 - [20] Kaur J, Singh H, Naqvi S. Intracellular DAMPs in neurodegeneration and their role in clinical therapeutics [J]. *Mol Neurobiol*, 2023, 60 (7): 3600-3616.
 - [21] Li YF, Chen XJ, Zhou ML, et al. Microglial TLR4/NLRP3 inflammasome signaling in Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2024, 97 (1): 75-88.
 - [22] Venegas C, Heneka MT. Danger-associated molecular patterns in Alzheimer's disease [J]. *J Leukoc Biol*, 2017, 101 (1): 87-98.
 - [23] Ren WX, Zhao L, Sun Y, et al. HMGB1 and Toll-like receptors: potential therapeutic targets in autoimmune diseases [J]. *Mol Med*, 2023, 29 (1): 117.
 - [24] Sarkar S, Porel P, Kosey S, et al. Diverse role of S100 calcium-binding protein B in Alzheimer's disease: pathological mechanisms and therapeutic implications [J]. *Inflammopharmacology*, 2025, 19 (8): 1-14.
 - [25] Malireddi RK, Gurung P, Kesavardhana S, et al. Innate immune priming in the absence of TAK1 drives RIPK1 kinase activity-independent pyroptosis, apoptosis, necroptosis, and inflammatory disease [J]. *J Exp Med*, 2019, 217 (3): e20191644.
 - [26] Pang J, Vince JE. The role of caspase-8 in inflammatory signalling and pyroptotic cell death [J]. *Semin Immunol*, 2023, 70: 101832.
 - [27] Tang Z, Cheng SW, Sun YY, et al. Early TLR4 inhibition reduces hippocampal injury at puberty in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain damage via regulation of neuroimmunity and synaptic plasticity [J]. *Exp Neurol*, 2019, 321: 113-125.
 - [28] Wu LY, Xian XH, Xu GY, et al. Toll-like receptor 4: a promising therapeutic target for Alzheimer's disease [J]. *Mediators Inflamm*, 2022, 2022 (1): 7924199.
 - [29] Yuan R, Zhao WT, Wang QQ, et al. Cucurbitacin B inhibits non-small cell lung cancer in vivo and in vitro by triggering TLR4/NLRP3/GSDMD-dependent pyroptosis [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 170: 105748.
 - [30] Xie JH, Tuo P, Zhang W, et al. Inhibition of the TLR4/NF- κ B pathway promotes the polarization of LPS-induced BV2 microglia toward the M2 phenotype [J]. *Neuroreport*, 2023, 34 (17): 834-844.
 - [31] Kumfor F, Halliday GM, Piguet O. Clinical aspects of Alzheimer's disease [J]. *Adv Neurobiol*, 2017, 15: 31-53.
 - [32] Sengoku R. Aging and Alzheimer's disease pathology [J]. *Neuropathology*, 2020, 40 (1): 22-29.
 - [33] Webers A, Heneka MT, Gleeson PA. The role of innate immune responses and neuroinflammation in amyloid accumulation and progression of Alzheimer's disease [J]. *Immunol Cell Biol*, 2020, 98 (1): 28-41.
 - [34] Pereira-Iglesias M, Maldonado-Teixido J, Melero A, et al. Microglia as hunters or gatherers of brain synapses [J]. *Nat Neurosci*, 2025, 28 (1): 15-23.
 - [35] Leng F, Edison P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? [J]. *Nat Rev Neurol*, 2021, 17 (3): 157-172.
 - [36] Zhang WF, Xiao D, Mao QW, et al. Role of neuroinflammation in neurodegeneration development [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8 (1): 267.
 - [37] Castro-Gomez S, Binder J, Heneka MT. Neuroinflammation as motor of Alzheimer's disease [J]. *Nervenarzt*, 2019, 90

- (8): 898-906.
- [38] Fan Z, Brooks DJ, Okello A, et al. An early and late peak in microglial activation in Alzheimer's disease trajectory [J]. *Brain*, 2017, 140 (3): 792-803.
 - [39] Li Y, Laws SM, Miles LA, et al. Genomics of Alzheimer's disease implicates the innate and adaptive immune systems [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78 (16): 6105-6134.
 - [40] Liu GT, Zhang LL, Fan YZ, et al. The pathogenesis in Alzheimer's disease: TREM2 as a potential target [J]. *J Integr Neurosci*, 2023, 22 (6): 131-150.
 - [41] Ulrich JD, Finn MB, Wang Y, et al. Altered microglial response to A β plaques in APPPS1-21 mice heterozygous for TREM2 [J]. *Mol Neurodegener*, 2014, 9 (1): 1-9.
 - [42] Krasemann S, Madore C, Cialic R, et al. The TREM2-APOE pathway drives the transcriptional phenotype of dysfunctional microglia in neurodegenerative diseases [J]. *Immunity*, 2017, 47 (3): 566-581.
 - [43] Li YR, Xu HF, Wang HF, et al. TREM2: potential therapeutic targeting of microglia for Alzheimer's disease [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 165 (9): 115218.
 - [44] Zhang JW, Zheng YL, Luo Y, et al. Curcumin inhibits LPS-induced neuroinflammation by promoting microglial M2 polarization via TREM2/TLR4/NF- κ B pathways in BV2 cells [J]. *Mol Immunol*, 2019, 116 (2): 29-37.
 - [45] Shabbir U, Tyagi A, Elahi F, et al. The potential role of polyphenols in oxidative stress and inflammation induced by gut microbiota in Alzheimer's disease [J]. *Antioxidants*, 2021, 10 (9): 1058-1370.
 - [46] Yang JS, Liang JY, Hu NY, et al. The gut microbiota modulates neuroinflammation in Alzheimer's disease: elucidating crucial factors and mechanistic underpinnings [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2024, 30 (10): e70091.
 - [47] Soni R, Mathur K, Shah J. An update on new-age potential biomarkers for Parkinson's disease [J]. *Ageing Res Rev*, 2024, 94 (4): 102208.
 - [48] Grozdanov V, Bousset L, Hoffmeister M, et al. Increased immune activation by pathologic α -synuclein in Parkinson's disease [J]. *Ann Neurol*, 2019, 86 (4): 593-606.
 - [49] Olanow CW, Savolainen M, Chu Y, et al. Temporal evolution of microglia and α -synuclein accumulation following foetal grafting in Parkinson's disease [J]. *Brain*, 2019, 142 (6): 1690-1700.
 - [50] Negi S, Khurana N, Duggal N. The misfolding mystery: α -syn and the pathogenesis of Parkinson's disease [J]. *Neurochem Int*, 2024, 178 (5): 105760.
 - [51] Hughes CD, Choi ML, Ryten M, et al. Picomolar concentrations of oligomeric alpha-synuclein sensitizes TLR4 to play an initiating role in Parkinson's disease pathogenesis [J]. *Acta Neuropathol*, 2019, 137 (1): 103-120.
 - [52] Rodríguez-Chinchilla T, Quiroga-Varela A, Molinet-Dronda F, et al. [18F]-DPA-714 PET as a specific in vivo marker of early microglial activation in a rat model of progressive dopaminergic degeneration [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2020, 47 (11): 2602-2612.
 - [53] Kouli A, Camacho M, Allinson K, et al. Neuroinflammation and protein pathology in Parkinson's disease dementia [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2020, 8 (1): 1-19.
 - [54] Perez-Pardo P, Dodiya HB, Engen PA, et al. Role of TLR4 in the gut-brain axis in Parkinson's disease: a translational study from men to mice [J]. *Gut*, 2019, 68 (5): 829-843.
 - [55] Mariucci G, Pagiotti R, Galli F, et al. The potential role of toll-like receptor 4 in mediating dopaminergic cell loss and alpha-synuclein expression in the acute MPTP mouse model of Parkinson's disease [J]. *J Mol Neurosci*, 2018, 64 (4): 611-618.
 - [56] Qiu YM, Cheng L, Xiong YY, et al. Advances in the study of necroptosis in vascular dementia: focus on blood-brain barrier and neuroinflammation [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2025, 31 (2): e70224.
 - [57] Takata F, Nakagawa S, Matsumoto J, et al. Blood-brain barrier dysfunction amplifies the development of neuroinflammation: understanding of cellular events in brain microvascular endothelial cells for prevention and treatment of BBB dysfunction [J]. *Front Cell Neurosci*, 2021, 15 (4): 123-135.
 - [58] Zhang YX, Zhang JW, Zhao Y, et al. ChemR23 activation attenuates cognitive impairment in chronic cerebral hypoperfusion by inhibiting NLRP3 inflammasome-induced neuronal pyroptosis [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14 (11): 721.
 - [59] Liyanagamage DS, Martinus RD. Role of mitochondrial stress protein HSP60 in diabetes-induced neuroinflammation [J]. *Mediators Inflamm*, 2020, 2020 (1): 8073516.
 - [60] Song JX, Li MX, Kang N, et al. Baicalein ameliorates cognitive impairment of vascular dementia rats via suppressing neuroinflammation and regulating intestinal microbiota [J]. *Brain Res Bull*, 2024, 208 (1): 110888.
 - [61] Tong HC, Yang TQ, Xu SY, et al. Huntington's disease: complex pathogenesis and therapeutic strategies [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25 (7): 3845-3860.
 - [62] Griffioen K, Mattson MP, Okun E. Deficiency of Toll-like receptors 2, 3 or 4 extends life expectancy in Huntington's disease mice [J]. *Heliyon*, 2018, 4 (1): e00501.
 - [63] Vuono R, Kouli A, Legault EM, et al. Association between Toll-like receptor 4 (TLR4) and triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) genetic variants and clinical progression of Huntington's disease [J]. *Mov Disord*, 2019, 35 (3): 401-408.
 - [64] Sever B, Ciftci H, DeMirci H, et al. Comprehensive research on past and future therapeutic strategies devoted to treatment of amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (5): 2400-2415.
 - [65] Brenner D, Freischmidt A. Update on genetics of amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Curr Opin Neurol*, 2022, 35 (5): 672-677.
 - [66] Gugliandolo A, Giacompo S, Bramanti P, et al. NLRP3 inflammasome activation in a transgenic amyotrophic lateral sclerosis model [J]. *Inflammation*, 2018, 41 (1): 93-103.
 - [67] Saleki K, Mohamadi MH, Banazadeh M, et al. In silico design of a TLR4-mediating multi-epitope chimeric vaccine against amyotrophic lateral sclerosis via advanced immunoinformatics [J]. *J Leukoc Biol*, 2022, 112 (5): 1191-1207.

- [68] Haase S, Linker RA. Inflammation in multiple sclerosis [J]. *Ther Adv Neurol Disord*, 2021, 14 (8): 175-187.
- [69] Yang JH, Rempe T, Whitmire N, et al. Therapeutic advances in multiple sclerosis [J]. *Front Neurol*, 2022, 13: 824926.
- [70] Yong VW. Microglia in multiple sclerosis: protectors turn destroyers [J]. *Neuron*, 2022, 110 (21): 3534-3548.
- [71] Perron H, Germe R, Bernard C, et al. Human endogenous retrovirus type W envelope expression in blood and brain cells provides new insights into multiple sclerosis disease [J]. *Mult Scler J*, 2012, 18 (12): 1721-1736.
- [72] Duperray A, Barbe D, Raguenez G, et al. Inflammatory response of endothelial cells to a human endogenous retrovirus associated with multiple sclerosis is mediated by TLR4 [J]. *Int Immunol*, 2015, 27 (11): 545-553.
- [73] Tam JSY, Collier JK, Hughes PA, et al. Toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists as potential therapeutics for intestinal inflammation [J]. *Indian J Gastroenterol*, 2021, 40 (1): 5-21.
- [74] Mun SJ, Cho E, Kim HK, et al. Enhancing acute inflammatory and sepsis treatment: superiority of membrane receptor blockade [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1424768.
- [75] Hsieh YC, Lee KC, Wu PS, et al. Eritoran attenuates hepatic inflammation and fibrosis in mice with chronic liver injury [J]. *Cells*, 2021, 10 (6): 1547-1562.
- [76] Feng Y, Ju YR, Wu Q, et al. TAK-242, a toll-like receptor 4 antagonist, against brain injury by alleviates autophagy and inflammation in rats [J]. *Open Life Sci*, 2023, 18 (1): 654-662.
- [77] Han Y, Chen R, Lin QC, et al. Curcumin improves memory deficits by inhibiting HMGB1-RAGE/TLR4-NF- κ B signalling pathway in APPswe/PS1dE9 transgenic mice hippocampus [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25 (18): 8947-8956.
- [78] He W, Yuan KM, Ji B, et al. Protective effects of curcumin against neuroinflammation induced by $A\beta_{25-35}$ in primary rat microglia: modulation of high-mobility group box 1, toll-like receptor 4 and receptor for advanced glycation end products expression [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8 (4): 88-98.
- [79] Molteni M, Bosi A, Rossetti C. Natural products with toll-like receptor 4 antagonist activity [J]. *Int J Inflamm*, 2018, 2018 (1): 2859135.
- [80] Balu D, Valencia-Olvera AC, Nguyen A, et al. A small-molecule TLR4 antagonist reduced neuroinflammation in female E4FAD mice [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2023, 15 (1): 181-196.
- [81] Zhu MX, Liu Y, Chen C, et al. TLR4/Rac1/NLRP3 pathway mediates amyloid- β -induced neuroinflammation in Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2024, 99 (3): 911-925.
- [82] Bhowmick S, Sarkar M, Hussain J, et al. Curcuma longa extract ameliorates motor and cognitive deficits of 6-hydroxydopamine-infused Parkinson's disease model rats [J]. *Adv Tradit Med*, 2021, 21 (1): 1-15.
- [83] Zeini S, Davoodian N, Kazemi H, et al. Resveratrol prevents cognitive impairment and hippocampal inflammatory response induced by lipopolysaccharide in a mouse model of chronic neuroinflammation [J]. *Physiol Behav*, 2024, 278: 114508.
- [84] Huh E, Choi JG, Choi Y, et al. 6-shogaol, an active ingredient of ginger, improves intestinal and brain abnormalities in proteus mirabilis-induced Parkinson's disease mouse model [J]. *Biomol Ther*, 2023, 31 (4): 417-430.
- [85] Zhao BJ, Zhang Q, Liang XC, et al. Quercetin reduces inflammation in a rat model of diabetic peripheral neuropathy by regulating the TLR4/MyD88/NF- κ B signalling pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 912: 174607.
- [86] Momen Y. Targeting the NLRP3 inflammasome: novel inhibitors for cardiovascular disease management [J]. *Preprints*, 2025, 2025 (4): 401-418.
- [87] Cook M, Lin H, Mishra SK, et al. BAY 11-7082 inhibits the secretion of interleukin-6 by senescent human microglia [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 617 (2): 30-35.
- [88] Zhu SP, Sun P, Bennett S, et al. The therapeutic effect and mechanism of parthenolide in skeletal disease, cancers, and cytokine storm [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1111218.
- [89] Khare P, Datusalia AK, Sharma SS. Parthenolide, an NF- κ B inhibitor ameliorates diabetes-induced behavioural deficit, neurotransmitter imbalance and neuroinflammation in type 2 diabetes rat model [J]. *Neuromolecular Med*, 2017, 19 (1): 101-112.
- [90] Wang JA, Tong ML, Zhao B, et al. Parthenolide ameliorates intracerebral hemorrhage-induced brain injury in rats [J]. *Phytother Res*, 2020, 34 (1): 153-160.
- [91] Sharan L, Pal A, Babu SS, et al. Bay 11-7082 mitigates oxidative stress and mitochondrial dysfunction via NLRP3 inhibition in experimental diabetic neuropathy [J]. *Life Sci*, 2024, 359: 123203.
- [92] Wang B, Bai SZ, Wang J, et al. TPCA-1 negatively regulates inflammation mediated by NF- κ B pathway in mouse chronic periodontitis model [J]. *Mol Oral Microbiol*, 2021, 36 (3): 192-201.
- [93] Ma J, Zhang YY, Sugai T, et al. Inhibition of cellular and animal inflammatory disease models by NF- κ B inhibitor DH-MEQ [J]. *Cells*, 2021, 10 (9): 2271-2284.
- [94] Kure K, Sato H, Suzuki J, et al. A novel I κ B kinase inhibitor attenuates ligature-induced periodontal disease in mice [J]. *J Periodont Res*, 2019, 54 (2): 164-173.
- [95] Wang YB, Li X, Yang B, et al. Inhibition of the CEBP β -NF- κ B interaction by nanocarrier-packaged carnosic acid ameliorates glia-mediated neuroinflammation and improves cognitive function in an Alzheimer's disease model [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13 (4): 318-330.
- [96] Huang LJ, Shi YJ, Zhao L. Ginkgolide B alleviates learning and memory impairment in rats with vascular dementia by reducing neuroinflammation via regulating NF- κ B pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 676392.
- [97] Bargi R, Asgharzadeh F, Beheshti F, et al. The effects of thymoquinone on hippocampal cytokine level, brain oxidative stress status and memory deficits induced by lipopolysaccharide in rats [J]. *Cytokine*, 2017, 96: 173-184.

(收稿日期: 2025-03-23; 修回日期: 2025-05-06)

“肠 - 皮”轴对皮肤疾病的影响及中药干预作用的研究进展

兰孝东¹, 张喜武^{2, 3}, 窦金金^{4*} (1. 黑龙江中医药大学研究生院, 哈尔滨 150040; 2. 经方与现代中药融合创新全国重点实验室, 哈尔滨 150040; 3. 黑龙江中医药大学实验实训中心, 哈尔滨 150040; 4. 黑龙江中医药大学附属第四医院, 哈尔滨 150077)

摘要: 皮肤作为人体最大的器官, 构成了抵御外界侵害的第一道防线, 其稳态的维持不仅受制于体外病原微生物的侵袭, 也受体内肠道微生物环境存在深刻的影响。微生物群落是复杂而精细的生态系统, 在维护皮肤稳态、参与免疫调节中扮演着核心角色。本综述系统阐述了中药通过由皮肤表面微生物群和体内肠道微生物群共同介导的肠 - 皮轴治疗银屑病、痤疮、特应性皮炎等常见顽固性皮肤病的具体机制, 揭示了皮肤和肠道的微生物与皮肤病之间的紧密联系, 为中医药在皮肤病治疗中的应用提供了新的理论依据。

关键词: 微生物群; 皮肤病; 肠 - 皮轴; 银屑病; 特应性皮炎; 痤疮

中图分类号: R275, R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)12-3647-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.026

Research progress on the effect of gut-skin axis on skin diseases and intervention with Chinese medicine

LAN Xiaodong¹, ZHANG Xiwu^{2, 3}, DOU Jinjin^{4*} (1. Graduate School of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040; 2. National Key Laboratory of Integration and Innovation of Traditional Chinese Medicine and Modern Chinese Medicine, Harbin 150040; 3. Experimental Training Center of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040; 4. The Fourth Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150077)

Abstract: As the largest organ of the human body, skin constitutes the first line of defense against external aggression. The maintenance of its homeostasis not only subject to the invasion of pathogenic microorganisms in vitro, but also to profound interactions with the intestinal microbial environment in vivo. Microbial community is a complex and delicate ecosystem, which plays a central role in maintaining skin homeostasis and participating in immune regulation. This review systematically elucidated the specific mechanism by which traditional Chinese medicine treats common refractory skin diseases such as psoriasis, acne, and atopic dermatitis—through the gut-skin axis mediated by both the skin surface microbiota and the intestinal microbiota. It revealed the close relationship between microbial communities in the skin and gut and the pathogenesis of skin disorders, providing a novel theoretical foundation for the application of traditional Chinese medicine in dermatological therapy.

Key words: microbiota; skin disease; gut-skin axis; psoriasis; atopic dermatitis; acne

皮肤病作为全球性健康问题, 其患病率和复发率居高不下, 已成为人类第四大常见疾病, 影响着全球约三分之一的人口^[1]。我国居民的皮肤病患病率高达 27.3%, 且呈现逐年上升趋势, 凸显了对皮肤病有效治疗方案的迫切需求^[2]。目前治疗皮肤病主要依赖激素、免疫抑制剂等药物, 虽

基金项目: 黑龙江省“揭榜挂帅”项目 (No.2023ZXJ02C02); 黑龙江省“优秀青年教师基础研究支持计划”项目 (No.YQJH2023150); 黑龙江中医药大学科研项目 (No.2019JC01); 李永吉全国老药工传承工作室项目; 经方与现代中药融合创新全国重点实验室开放课题 (No.LSLSKL20240403)。

作者简介: 兰孝东, 女, 硕士研究生, 主要从事中西医结合防治心脑血管疾病研究, email: 348502326@qq.com * **通信作者:** 窦金金, 女, 主任医师, 主要从事中西医结合防治心脑血管疾病研究, email: doujinjin1980@126.com

可有效缓解症状，但长期使用易导致诸多不良反应，如骨髓抑制、肝肾功能损伤、胃肠道反应、感染、致畸、不孕不育等，并且给患者带来了沉重的精神压力和经济负担^[3]。相比之下，中药凭借抗炎、抗菌和免疫调节等多重作用，以及标本兼治、不易复发的特色优势，为皮肤病的治疗提供了新的思路和方法，为中医药在皮肤病治疗中的应用提供了科学依据。

中医学“肠皮同病”理论从人体整体观出发，揭示了皮肤与肠道之间存在的“肠-皮”轴关联。皮肤作为人体最大的免疫器官，其微生物组和肠道微生物组通过“肠-皮”轴形成双向免疫调控网络。《黄帝内经》提出“皮厚者大肠厚，皮薄者大肠薄”，《针灸甲乙经》进一步阐释“皮薄而不泽，肉不坚而淖泽，如此则肠胃恶，恶则邪气留止，积聚乃伤”^[4]，从形态与功能双重维度阐述了“肠皮共病”的理念。这一理论彰显了肠道健康与皮肤状态之间的紧密纽带，为“肠-皮”轴研究提供了最早的医学范式。本文聚焦于银屑病、痤疮、特应性皮炎（atopic dermatitis, AD）等常见顽固性皮肤病，从皮肤微生物与肠道微生物两个维度出发，深入阐释“肠-皮”轴跨界交流机制在维持皮肤稳态中的关键作用，并基于“以肠治皮、皮肠同治”的治疗理念，进一步探讨中药通过调微生物组治疗皮肤病的具体作用机制。

1 微生态

1.1 皮肤微生态

皮肤微生物群是由细菌、真菌、病毒等多种微生物组成的复杂生态系统，在维持皮肤屏障功能、抵御病原体侵袭、调节免疫反应等方面发挥关键作用^[5]。

皮肤微生物组成受年龄、性别、环境等因素的影响，其中环境影响占主导。基于微生物群落多样性及相对丰度差异，皮肤微环境分为四类：油性、湿润、干燥和足部^[6]（见表1）。油脂分泌旺盛区（如面部、躯干）以痤疮杆菌属和葡萄球菌属为主；湿润区（如肘窝、膝窝）以棒状杆菌属和葡萄球菌属为主；干燥部位（如前臂掌侧）主要由痤疮库蒂杆菌和棒状杆菌属定植；足部是真菌感染主要部位，由马拉色菌、曲霉菌、隐球菌、红球菌、附球菌等构成复杂真菌群落^[7-8]。当皮肤微生物稳态失衡时，可引发皮肤屏障功能障碍，成为多种炎症性皮肤病的诱发或加重因素。例如，金黄色葡萄球菌过度增殖导致表皮异常增厚，同时激活Th2细胞与Th17细胞亚群，破坏角质形成细胞，从而加剧AD的病理进程^[9]。

1.2 肠道微生态

成人肠道内定植着1000~1500种细菌，共

表1 皮肤微生物的组成和分布

Tab 1 Composition and distribution of skin microbiota		
皮肤微环境	身体部位	微生物组成
油性	面部、躯干	痤疮杆菌属、葡萄球菌属
湿润	肘窝、膝窝	棒状杆菌属、葡萄球菌属
干燥	前臂掌侧	痤疮库蒂杆菌、棒状杆菌属
足部	足部	马拉色菌、曲霉菌、隐球菌、红球菌、附球菌等

同形成一个重量达1.5~2 kg庞大菌群生态系统，其细胞数量甚至可达人体自身细胞数量的10~100倍。肠道菌群主要集中在结肠和末端小肠，被称为“人类的第二基因组”^[10]。健康成人的肠道微生物群落主要由厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门、放线菌门、梭杆菌门和疣菌门等六大门类组成^[11]，其中有益菌在维持宿主-微生物共生平衡中发挥核心作用。

肠道菌群异常紊乱，是皮肤疾病高发的潜在隐患。银屑病患者的厚壁菌门扭链瘤胃球菌通过分泌促炎多糖，进一步破坏肠道屏障，形成“肠漏-皮肤炎”恶性循环，是银屑病慢性化的重要机制^[12]；厚壁菌门普拉梭菌异常减少，削弱了其核因子（nuclear factor, NF）-κB通路的抑制作用，导致促炎因子释放增加，直接加剧皮肤炎症反应^[13]。AD患者的肠道菌群中乳酸杆菌和双歧杆菌等有益菌的相对丰度降低，而大肠埃希菌、艰难梭菌和金黄色葡萄球菌等致病菌的比例升高^[14]。痤疮患者肠道微生物群可见肠道乳酸杆菌、双歧杆菌减少，瘤胃球菌、拟杆菌增加^[15]。双歧杆菌缺失引发肠黏膜通透性异常，促使内毒素易位入血并引发氧化应激和炎症反应，同时刺激神经肽P物质（substance P, SP）释放，最终加剧痤疮炎性皮损^[16]。基于当前研究证据，肠道菌群稳态失衡通过“肠-皮”轴调控机制，成为多种皮肤病发生发展的关键因素。

1.3 “肠-皮”轴相互作用

“肠-皮”轴概念源于对肠道与皮肤间双向信号交流的系统性研究，两者虽胚胎起源不同（皮肤源自外胚层，肠道源自内胚层与中胚层），但均具有物理屏障作用、免疫调控枢纽等功能特征^[17]。

肠道微生物群与皮肤微生物群通过“肠-皮”轴形成双向动态互动，如图1所示，其稳态失衡可通过多重机制加剧皮肤病理进程。肠道菌群失调可导致肠屏障破坏，促使细菌产物和代谢物进入循环系统，细菌成分通过TLR4等受体激活固有免疫，诱导促炎因子释放，加剧皮肤炎症^[18]。反之，皮肤损伤（如紫外线诱导的DNA损伤）引发全身性炎症介质迁移至肠道，导致菌群失衡。皮肤微生物（如葡萄球菌属）降解色氨酸产生的芳香

烃受体配体或尿刊酸等分子,可能经血液迁移至肠道,激活肠道芳香烃受体信号通路,调节白细胞介素-22(interleukin-22, IL-22)分泌,影响肠道屏障功能与菌群稳态。肠道菌群紊乱还会导致毒性代谢物蓄积,如艰难梭菌等致病菌异常增殖产生的对甲酚、苯酚等芳香族化合物,进入血液循环后可在皮肤中累积,不仅可导致皮肤水合能力下降,还可导致表皮分化和表皮屏障功能障碍。

在皮肤疾病研究中,“肠-皮”轴机制的应用已取得显著进展。银屑病患者肠道中阿克曼菌属、普拉梭菌属等减少,乳酸杆菌属、戴阿利斯特杆菌属等增加,激活 IL-17/IL-23 炎症通路,副干酪乳酪杆菌可通过调节 SCFAs 改善皮损^[19-20]。AD 患者肠道菌群多样性显著降低,表现为双歧杆菌等有益菌减少而拟杆菌属增多,其代谢产物 SCFAs 缺乏导致皮肤屏障破坏和 Th2 免疫失衡,益生菌干预可改善患者病情^[21]。痤疮患者肠道微生物性别差异显著,SCFAs 生成菌(如乳酸杆菌)缺失加剧皮脂腺炎症,益生菌单用效果与抗菌药物相当(病变减少 84.4%)^[22-23]。此外,作为连接内外环境的关键界面,肠道与皮肤组织共享以 Th17 细胞为核心的免疫调控网络。Th17 细胞在两者中都很丰富, Th17 及其产生的促炎因子直接参与了银屑病、痤疮和 AD 等多种炎症性皮肤病的发病机制。

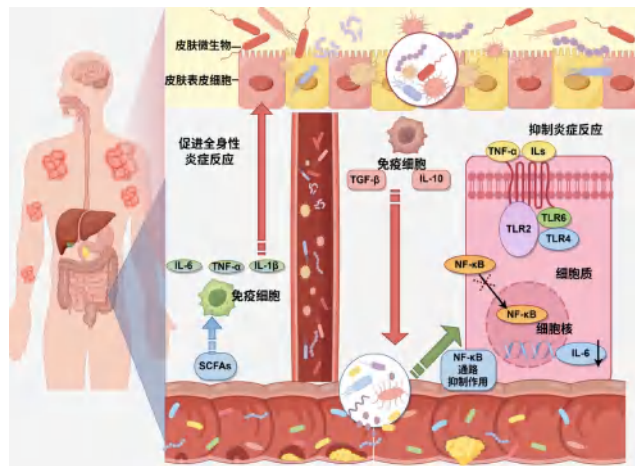


图1 “肠-皮”轴中微生物的双向调节作用(绘图软件为Figdraw)
Fig 1 Bidirectional regulation of microbes in the gut-skin axis (The drawing software is Figdraw)

TLR2: Toll样受体2 (Toll like receptor 2); TLR4: Toll样受体4 (Toll like receptor 4); TLR6: Toll样受体6 (Toll like receptor 6); IL-6: 白细胞介素6 (interleukin-6); IL-10: 白细胞介素10 (interleukin-10); IL-1 β : 白细胞介素1 β (interleukin-1 β); TNF- α : 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α); TGF- β : 转化生长因子 β (transforming growth factor- β)。

2 中药通过干预微生物治疗皮肤病

中药(天然药物提取物和中草药配方)不仅可以通过外用调控皮肤微生物群,也可以通过口

服改善肠道菌群的组成和代谢功能,有助于维持肠道菌群稳态,通过调节物质代谢与吸收转运,从而治疗皮肤病。

2.1 银屑病

银屑病是慢性炎症性皮肤病,以红斑、鳞屑为典型表现,常见于头皮及四肢伸侧^[24]。银屑病发病核心为 IL-23/Th17 免疫轴异常激活,驱动角质形成细胞过度增殖和炎症反应增强。研究表明肠道菌群失衡通过“肠-皮”轴参与疾病进程,而中医药治疗银屑病效果显著,显示出减轻皮损、提高生活质量、缓解中医证候、减轻瘙痒、减少联合治疗的不良反应及降低复发率的治疗效果^[25]。

近年来,基于动物模型的研究逐步揭示了单味中药成分对银屑病炎症通路及肠道菌群的调控作用(见表2)。枞酸(松香成分)可通过抑制鼠银屑病模型中 IL-23/IL-17 轴相关细胞因子,并通过重塑肠道菌群结构(降低促炎菌属丰度,提高抗炎菌属水平)缓解皮肤炎症^[26],直接证明了其通过“肠-皮”轴发挥作用。Cai等^[27]发现姜黄素可降低银屑病小鼠模型体内 γ -干扰素(interferon γ , IFN- γ)、IL-17等促炎因子水平,同时增加肠道中拟杆菌门和变形菌门中别样杆菌属(*Alistipes*)、黏螺旋菌属(*Mucispirillum*)和理研菌属(*Rikenella*)等有益菌群,从而缓解皮肤炎症。人参皂苷则通过增加双歧杆菌等有益菌的丰度、抑制艰难梭菌等致病菌增殖,改善肠道微生态平衡,降低促炎因子(如 TNF- α 、IL-1 β)及氧化应激标志物水平,显著改善银屑病患者红斑、鳞屑及皮肤增厚等表型^[28]。

复方中药也可通过调节肠道菌群结构和功能,发挥治疗银屑病的作用(见表3)。例如,犀角地黄汤可降低银屑病小鼠肠系膜中 IL-23、IL-17 及 TNF- α 的水平,提高乳酸杆菌与双歧杆菌的丰度,降低肠球菌及肠杆菌的数量,从而改善小鼠皮损的炎症反应^[29-30],展现了复方中药干预“肠-皮”轴的潜力。参地消银颗粒通过调节肠道菌群的组成,尤其是在提高考拉杆菌属的丰度方面显示出显著效果,有助于恢复血热湿滞毒蕴型银屑病患者的肠道微生态平衡,从而可能影响银屑病的疾病进程和治疗效果^[31]。秦艽丸对血热证患者肠道菌群及 TNF- α 、IL-6、IL-10、IL-17 等炎症因子有显著调控作用,治疗前后皮损缓解、肠道菌群改善、炎症因子平衡三者成正向相关,阐明了其通过除湿、清热、解毒以治疗血热证银屑病的微观机制^[32]。

此外,有研究表明,利吉乳酸杆菌属(*Ligilactobacillus*)和厌氧截形菌属(*Anaerotruncus*)等菌属与

表 2 单味中药治疗皮肤疾病

Tab 2 Single-herb traditional Chinese medicine for skin diseases

治疗疾病	中药	有效成分	调节菌群	参考文献
银屑病	姜黄	姜黄素	Alistipes、Mucispirillum、Rikenella↑	[27]
银屑病	人参	人参皂苷	双歧杆菌↑, 艰难梭菌↓	[28]
AD	芍药	芍药苷	厚壁菌门/拟杆菌门↑、变形菌门↓	[38]
AD	金银花	木犀草苷、绿原酸	乳酸杆菌↑, 大肠埃希菌↓	[40]
痤疮	黄芩	黄芩苷	双歧杆菌↑	[45]
痤疮	葛根	葛根素	乳酸杆菌、双歧杆菌↑	[47]
痤疮	菊花	菊花多糖	乳酸杆菌、双歧杆菌↑	[48]

表 3 中药复方治疗皮肤疾病

Tab 3 Compound formulations of traditional Chinese medicine for skin diseases

疾病	复方	组成	功效	调节菌群	参考文献
银屑病	犀角地黄汤	犀角、地黄、芍药、牡丹皮	清热解毒、凉血	乳酸杆菌、双歧杆菌↑, 肠球菌、肠杆菌↓	[29-30]
银屑病	参地消银颗粒	生地黄、牡丹皮、拳参、玄参、丹参、生槐花	清热凉血、化湿解毒	考拉杆菌↑	[31]
银屑病	参苓白术散	人参、茯苓、白术、白扁豆、陈皮、豆蔻、砂仁、补益肺脾 薏仁、桔梗等		<i>g_Aerococcus</i> 、 <i>g_norank_f_UCG-010</i> ↑	[34]
银屑病	土槐饮	土茯苓、槐花、甘草	清热解毒、除湿	厚壁菌门、放线菌门↑	[35]
AD	健脾益肠方	炙黄芪、党参、麸炒白术、山药、桔梗、乌梅、厚朴、赤石脂、肉豆蔻、炙甘草等	益气健脾	拟杆菌门↓, 厚壁菌门↑	[39]
AD	健脾益肠方	炙黄芪、党参、麸炒白术、山药、桔梗、乌梅、厚朴、赤石脂、肉豆蔻、炙甘草等	益气健脾	双歧杆菌、乳酸杆菌↑, 类杆菌、大肠埃希菌↓	[41]
AD	参苓白术散	人参、茯苓、白术、白扁豆、陈皮、豆蔻、砂仁、补益肺脾 薏仁、桔梗等		双歧杆菌/大肠埃希菌↑	[42]
AD	培土清心方	太子参、山药、薏苡仁、灯芯草、连翘、淡竹叶、钩藤、牡蛎、龙骨、甘草等	健脾利湿	厚壁菌门↑, 拟杆菌门↓	[43]
痤疮	枇杷清肺饮	枇杷叶、桑白皮、黄连、黄柏	宣肺、清热、化湿	厚壁菌门↑, 拟杆菌门↓	[46]
痤疮	半夏泻心汤	半夏、黄连、黄芩、干姜、甘草、大枣、人参	寒热平调、消痞散结	乳酸杆菌↑, 大肠埃希菌↓	[49-50]

银屑病相关细胞因子 IL-6、IL-17A 等成正相关, 而 *Rikenella*、*Alistipes* 和 *Mucispirillum* 则成负相关^[33]。参苓白术散中甘草和人参中的黄酮类化合物和皂苷可增加 *g_Aerococcus* (厚壁菌门、气球菌属) 和 *g_norank_f_UCG-010* (厚壁菌门、梭菌纲) 等菌群^[34]。Di 等^[35]发现土槐饮治疗后, 银屑病患者的厚壁菌门和放线菌门显著增加。因此, 中药可能通过促进有益共生菌的增加和整体菌群多样性的提高, 改善肠道菌群结构, 从而增强肠道黏膜的屏障功能, 抑制 Th17 等炎性因子活化等多种机制治疗银屑病。

2.2 AD

AD 是一种以瘙痒、湿疹性皮损、皮肤干燥及苔藓样化为主要特征的慢性炎症性皮肤病, 其发病机制与 T 细胞介导的免疫应答密切相关^[36]。中药调节肠道菌群及其代谢产物在 AD 治疗中的作用日益受到关注。

黄芩苷可纠正肠道菌群失调, 粪便微生物移植实验证实黄芩苷干预后的菌群可显著降低 AD 模型小鼠血清组胺及 TNF- α 水平, 改善皮肤屏障功

能^[37]。芍药苷 (200 mg/kg) 通过上调肠道紧密连接蛋白 -1 和闭合蛋白表达, 可修复肠道屏障, 重塑菌群结构 (厚壁菌门/拟杆菌门丰度增加, 变形菌门减少), 促进产丁酸菌增殖, 并抑制 Th17 细胞分化及增强 Treg 细胞功能, 从而阻断 AD 病理进程^[38]。在中药复方中, 健脾祛风汤亦对脾虚型 AD 患者疗效显著, 罗瑞静等^[39]运用 16S rRNA 高通量测序法观察到脾虚型 AD 患儿口服该方后拟杆菌门及其属、种水平丰度呈降低趋势, 厚壁菌门及其属、种水平丰度则相反, 其中普拉梭菌的降低被证实为 AD 诊断标志物, 凸显菌群调节与疗效的关联性。

此外, 金银花中的木犀草苷和绿原酸通过促进乳酸杆菌等共生菌增殖、抑制大肠埃希菌等机会致病菌扩增, 重塑肠道微生态稳态, 进而促进 Th1 细胞分化并增强 IFN- γ 分泌, 纠正 AD 患者 Th1/Th2 免疫失衡^[40]。健脾益肠方作用于脾虚型 AD 小鼠可提高双歧杆菌、乳酸杆菌等有益菌的含量, 并抑制类杆菌、大肠埃希菌等有害菌, 进而改善肠道微生态, 通过修复肠黏膜屏障改善 AD 症状^[41]。参苓白术散通

过增加双歧杆菌/大肠埃希菌比值,平衡 Th1/Th2 免疫反应,以缓解皮肤炎症^[42]。在中医药临床实践中,裴悦等^[43]应用培土清心方治疗心火脾虚型 AD 患儿 60 例,发现其肠道内厚壁菌门、柔嫩梭菌属数量上调,拟杆菌门相对丰度下降,减轻肠道炎症并改善免疫失衡。这些研究证实了多种中药对 AD 患者或动物模型肠道菌群结构及相关免疫指标具有显著的调节作用,为探索其潜在治疗机制提供了重要的基础。

2.3 痤疮

痤疮,中医称为“粉刺”或“面疮”,表现为粉刺、丘疹、脓疱和囊肿等皮损,是一种常见的慢性炎症性皮肤病,影响超过 85% 的青少年^[44]。《素问·生气通天论》中提到:“劳汗当风,寒薄为皴,郁乃痤”,《诸病源候论》亦记载:“面疮者,谓面上有风热气生疮,头如米大,亦如谷大,白色者是”。

中药可以通过影响肠道菌群来调节机体血清痤疮相关生化指标(SP、SCFAs、雄激素)水平,干预毛囊皮肤微生物定植及毛囊皮脂腺角化,改善局部免疫炎症,从而对痤疮起到治疗作用。黄芩苷元、黄芩苷均可通过增加肠道中的双歧杆菌属丰度,降低 SP 水平,从而抑制皮脂腺分泌和炎症反应^[45]。枇杷清肺饮作为中医治疗肺胃湿热型痤疮的经典复方,通过增加肠道厚壁菌门(如乳杆菌属)丰度并减少拟杆菌门比例,降低内毒素入血水平,抑制 SP 释放,从而缓解皮脂腺过度分泌^[46]。

部分中药虽然可调节肠道菌群,但其通过“肠-皮”轴对痤疮的影响仍需进一步研究。葛根素通过增加肠道中乳酸杆菌和双歧杆菌的数量,提高肠上皮细胞对 IL-10 和 IL-8 的敏感性,从而发挥抗菌作用^[47]。菊花多糖能够提高双歧杆菌和乳酸杆菌的相对丰度,并通过调节 Th17/Treg 免疫平衡来增加结肠内 SCFAs 水平,从而抑制全身低度炎症反应^[48]。在中药复方中,半夏泻心汤通过上调拟杆菌门、下调厚壁菌门的相对丰度,改善胰岛素抵抗和雄激素水平,可发挥寒热平调、消痞散结的作用,抑制大肠埃希菌等致病菌,促进乳酸杆菌定植,间接改善皮肤健康^[49]。半夏泻心汤中黄芩与黄连以 1:2 的比例混合时,其抗炎杀菌效果最佳^[50]。

3 总结与展望

微生物组在皮肤病中的重要作用已得到广泛认可,皮肤和肠道微生物组的失衡与多种皮肤病的发生和发展密切相关。中药通过调节微生物组的生态平衡,展现出显著的抗炎、抗菌和免疫调节作用,为皮肤病的治疗提供了新的思路和方法。尽管中药在调节肠道和皮肤微生物群方面显

示出一定的疗效,但其具体作用机制尚未完全阐明。例如,中药成分通过“肠-皮”轴影响皮肤微生物群的具体分子机制仍需进一步研究。

本文不仅为皮肤病的治疗提供了新的视角和策略,同时也丰富和完善了中医药理论体系,对指导临床诊疗实践具有重要意义。未来的研究可通过现代分子生物学技术(如代谢组学、转录组学等)深入研究中药成分对肠道和皮肤微生物群的影响机制,明确其作用靶点和信号通路。结合个体微生物群的差异,开发个性化的中药治疗方案,通过益生菌、益生元等辅助手段,增强中药的疗效。通过现代制药技术对中药进行标准化生产,确保中药成分的稳定性和一致性,提高中药的质量控制水平,为皮肤病的治疗提供更加科学和有效的解决方案。

参考文献

- [1] Yang WJ, Yu TM, Huang XS, et al. Intestinal microbiota-derived short-chain fatty acids regulation of immune cell IL-22 production and gut immunity [J]. Nat Commun, 2020, 11 (1): 4457.
- [2] Flohr C, Hay R. Putting the burden of skin diseases on the global map [J]. Br J Dermatol, 2021, 184 (2): 189-190.
- [3] 王艺, 赵晴, 糜自豪, 等. 长期使用传统免疫抑制剂治疗皮肤病的不良反应比较 [J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2024, 40 (5): 311-316.
- [4] 王文霸, 惠毅, 朱珺. 基于中医学“皮肠同病”与现代医学“肠-皮肤轴”理论探讨“皮病治肠”思路 [J]. 中国中西医结合杂志, 2021, 41 (2): 234-237.
- [5] Lee HJ, Kim M. Skin barrier function and the microbiome [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23 (21): 13071.
- [6] Yang Y, Qu L, Mijakovic I, et al. Advances in the human skin microbiota and its roles in cutaneous diseases [J]. Microb Cell Fact, 2022, 21 (1): 176.
- [7] De Almeida CV, Antiga E, Lulli M. Oral and topical probiotics and postbiotics in skincare and dermatological therapy: a concise review [J]. Microorganisms, 2023, 11 (6): 1420.
- [8] Kim HS. Microbiota in rosacea [J]. Am J Clin Dermatol, 2020, 21 (Suppl 1): 25-35.
- [9] Al Kindi A, Williams H, Matsuda K, et al. Staphylococcus aureus second immunoglobulin-binding protein drives atopic dermatitis via IL-33 [J]. J Allergy Clin Immunol, 2021, 147 (4): 1354-1368. e3.
- [10] 窦一民, 冯爱平. 常见炎症性皮肤病的肠道微生态研究进展 [J]. 皮肤病与性病, 2022, 44 (3): 213-217.
- [11] Rygula I, Pikiewicz W, Grabarek BO, et al. The role of the gut microbiome and microbial dysbiosis in common skin diseases [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25 (4): 1984.
- [12] Sikora M, Stec A, Chrabaszcz M, et al. Gut microbiome in psoriasis: an updated review [J]. Pathogens, 2020, 9 (6): 463.

- [13] Liu PY, Wang YB, Yang G, et al. The role of short-chain fatty acids in intestinal barrier function, inflammation, oxidative stress, and colonic carcinogenesis [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 165: 105420.
- [14] Fang ZF, Li LZ, Zhang H, et al. Gut microbiota, probiotics, and their interactions in prevention and treatment of atopic dermatitis: a review [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 720393.
- [15] Thompson KG, Rainer BM, Antonescu C, et al. Minocycline and its impact on microbial dysbiosis in the skin and gastrointestinal tract of acne patients [J]. *Ann Dermatol*, 2020, 32 (1): 21-30.
- [16] Badgeley A, Anwar H, Modi K, et al. Effect of probiotics and gut microbiota on anti-cancer drugs: mechanistic perspectives [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, 1875 (1): 188494.
- [17] Jimenez-Sanchez M, Celiberto LS, Yang H, et al. The gut-skin axis: a bi-directional, microbiota-driven relationship with therapeutic potential [J]. *Gut Microbes*, 2025, 17 (1): 2473524.
- [18] Brown EM, Kenny DJ, Xavier RJ. Gut microbiota regulation of T cells during inflammation and autoimmunity [J]. *Annu Rev Immunol*, 2019, 37: 599-624.
- [19] Wang XM, Chen Z, Qiao S, et al. Analysis of alterations of the gut microbiota in moderate to severe psoriasis patients using 16S rRNA gene sequencing [J]. *Indian J Dermatol*, 2022, 67 (5): 495-503.
- [20] Gueniche A, Philippe D, Bastien P, et al. Randomised double-blind placebo-controlled study of the effect of *Lactobacillus paracasei* NCC 2461 on skin reactivity [J]. *Benef Microbes*, 2014, 5 (2): 137-145.
- [21] Yoon W, Park SH, Lee JS, et al. Probiotic mixture reduces gut inflammation and microbial dysbiosis in children with atopic dermatitis [J]. *Australas J Dermatol*, 2021, 62 (3): e386-e392.
- [22] Huang YK, Liu L, Chen LN, et al. Gender-specific differences in gut microbiota composition associated with microbial metabolites for patients with acne vulgaris [J]. *Ann Dermatol*, 2021, 33 (6): 531-540.
- [23] Irshad M, Syed AW, Shahid MW, et al. Comparative effects of azithromycin and probiotics for treatment of acne vulgaris [J]. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2023, 33 (5): 516-520.
- [24] Thye AY, Bah YR, Law JW, et al. Gut-skin axis: unravelling the connection between the gut microbiome and psoriasis [J]. *Biomedicines*, 2022, 10 (5): 1037.
- [25] 徐田红, 单筠筠, 赵斌, 等. 中医自然疗法治疗静止期寻常性银屑病临床研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35 (10): 5299-5302.
- [26] Li XQ, Chen Y, Dai GC, et al. Abietic acid ameliorates psoriasis-like inflammation and modulates gut microbiota in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 272: 113934.
- [27] Cai ZG, Wang WQ, Zhang Y, et al. Curcumin alleviates imiquimod-induced psoriasis-like inflammation and regulates gut microbiota of mice [J]. *Immun Inflamm Dis*, 2023, 11 (8): e967.
- [28] Zou XY, Zou XF, Gao LX, et al. Gut microbiota and psoriasis: pathogenesis, targeted therapy, and future directions [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2024, 14: 1430586.
- [29] 陈金鹏, 张克霞, 刘毅, 等. 地黄化学成分和药理作用的研究进展 [J]. *中草药*, 2021, 52 (6): 1772-1784.
- [30] 黄港, 袁弦, 胡初向, 等. 基于肠-免疫-皮肤轴研究犀角地黄汤对银屑病小鼠肠道 Th17/Treg 失衡的影响 [J]. *中医药临床杂志*, 2023, 35 (8): 1569-1572.
- [31] 彭静, 王爱娟, 李孜怡, 等. 基于 16S rRNA 基因测序探究参地消银颗粒对血热湿滞毒蕴型银屑病患者肠道菌群的影响 [J]. *中医药信息*, 2024, 41 (11): 48-56.
- [32] 郑毅, 张琼, 王婷, 等. 基于“肠-皮”轴研究秦艽丸对银屑病患者肠道微生态及相关炎症因子影响 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2023, 25 (10): 53-58.
- [33] Ghoushi E, Poudinch M, Parsamanesh N, et al. Curcumin as a regulator of Th17 cells: unveiling the mechanisms [J]. *Food Chem (Oxf)*, 2024, 8: 100198.
- [34] Tang B, Zheng XW, Luo QQ, et al. Network pharmacology and gut microbiota insights: unraveling Shenling Baizhu powder's role in psoriasis treatment [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1362161.
- [35] Di T, Zhao JW, Wang YQ, et al. Tuhuaiyin alleviates imiquimod-induced psoriasis via inhibiting the properties of IL-17-producing cells and remodels the gut microbiota [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 141: 111884.
- [36] Sroka-Tomaszewska J, Trzeciak M. Molecular mechanisms of atopic dermatitis pathogenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (8): 4130.
- [37] Wang L, Xian YF, Loo SKF, et al. Baicalin ameliorates 2, 4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis-like skin lesions in mice through modulating skin barrier function, gut microbiota and JAK/STAT pathway [J]. *Bioorg Chem*, 2022, 119: 105538.
- [38] Lee SY, Hong SH, Kim HI, et al. *Paeonia lactiflora* Pallas extract alleviates antibiotics and DNCB-induced atopic dermatitis symptoms by suppressing inflammation and changing the gut microbiota composition in mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 154: 113574.
- [39] 罗瑞静, 刘杰, 彭勇, 等. 健脾祛风汤对特异性皮炎患者肠道菌群的影响 [J]. *实用临床医药杂志*, 2022, 26 (22): 77-82, 89.
- [40] Jin ML, Zhu YM, Shao DY, et al. Effects of polysaccharide from mycelia of *Ganoderma lucidum* on intestinal barrier functions of rats [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 94 (Pt A): 1-9.
- [41] 钱佳丽, 刘久利, 何静岩, 等. 健脾益肠方对脾虚型特异性皮炎小鼠模型的免疫调节作用及其机制研究 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2019, 14 (2): 211-214, 226.
- [42] 刘明强. 参苓白术散加减治疗脾虚型特异性皮炎的临床疗效及对肠道菌群的影响 [D]. 南昌: 江西中医药大学,

- 2021.
- [43] 裴悦, 肖水明, 莫秀梅, 等. 培土清心方对特异性皮炎儿童肠道菌群的影响[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2020, 34(6): 688-691.
- [44] Baldwin H, Tan J. Effects of diet on acne and its response to treatment[J]. Am J Clin Dermatol, 2021, 22(1): 55-65.
- [45] 黄玉普, 吴大章, 王森. 黄芩的药理作用及其药对研究进展[J]. 中国药业, 2022, 31(15): 129-133.
- [46] 王婷婷, 林霞, 金李慧. 自拟改良版枇杷清肺饮治疗青春痤疮肺经风热证疗效及对血清 T、IgA、IgG、IgM 水平的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2023, 50(6): 164-167.
- [47] 王登远. 葛根对肠道微生态、物质代谢和细胞因子表达的影响及其安全性的初步评价[D]. 南昌: 南昌大学, 2016.
- [48] Yang B, Sun DF, Sun LJ, et al. Water extract of *Chrysanthemum indicum* L. flower inhibits capsaicin-induced systemic low-grade inflammation by modulating gut microbiota and short-chain fatty acids[J]. Nutrients, 2023, 15(5): 1069.
- [49] 赵粉琴, 丁晓南, 安明霞, 等. 应用 16S rDNA 测序法探讨半夏泻心汤对多囊卵巢综合征肠道菌群的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2022, 34(10): 1151-1157.
- [50] 甘丽华, 杨坤, 郭超峰. 半夏泻心汤类方的方证释义与现代研究概况[J]. 辽宁中医药大学学报, 2022, 24(11): 82-86.

(收稿日期: 2025-05-22; 修回日期: 2025-07-21)

靶向 NAMPT 的抗肿瘤策略的研究进展

段玲雁*, 张永杰*, 陈西敬* (中国药科大学基础医学与临床药学院, 南京 211198)

摘要: 烟酰胺磷酸核糖转移酶 (NAMPT) 是哺乳动物细胞烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD^+) 合成途径中的关键酶, 在乳腺癌、卵巢癌、胃癌等诸多癌症中过度表达, 与不良预后及肿瘤进展密切相关。 NAD^+ 在 DNA 合成、氧化还原反应、代谢及衰老等重要细胞功能中扮演关键角色。NAMPT 介导 NAD^+ 的代谢调控, 是癌症治疗的潜在靶点。尽管 NAMPT 抑制剂在临床前模型中展现出显著的抗肿瘤活性, 但其在 I/II 期临床试验中显示出有限的单药疗效, 并伴随剂量依赖性毒性。值得注意的是, 药物代谢动力学特征异常及获得性耐药机制的激活, 共同构成了该靶点向临床转化的瓶颈。临床前研究针对性提出了多种联合治疗策略, 旨在通过同时作用于多个代谢和信号通路, 增强治疗效果, 减少不良反应, 并克服耐药性。本文首先概括性介绍了 NAMPT 在肿瘤中的作用机制, 重点总结了 NAMPT 抑制剂的研究进展与应用策略, 涵盖靶向单药治疗与联合用药策略, 并探讨其面临的主要挑战及应对措施, 进一步展望了该领域的未来前景, 强调了开发新型抑制剂和创新型联合治疗策略的重要性。

关键词: 烟酰胺磷酸核糖转移酶 (NAMPT); NAMPT 抑制剂; 癌症治疗; 耐药性; 联合治疗策略
中图分类号: R730.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)12-3653-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.027

Research progress on targeting NAMPT in cancer therapy

DUAN Lingyan, ZHANG Yongjie*, CHEN Xijing* (Clinical Pharmacokinetics Laboratory, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198)

Abstract: Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT), an essential enzyme in nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) biosynthetic pathway in mammalian cells, exhibits elevated expression in many cancers, notably breast, ovarian, and gastric cancers, and correlates with some adverse outcomes and tumor progression. NAD^+ , a cofactor with various key effects, modulates pivotal cellular processes such as DNA replication, redox homeostasis, metabolic pathways, and aging. NAMPT is the rate-limiting

作者简介: 段玲雁, 女, 硕士研究生, 主要从事药物代谢动力学研究, email: duanly621@163.com *通信作者: 张永杰, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事药物代谢与毒理学研究, email: zhangyongjie@cpu.edu.cn; 陈西敬, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事药物代谢动力学研究, email: cpuclinicalpk2020@163.com

enzyme in NAD^+ metabolism, emerging a promising therapeutic target in anti-cancer therapies. Although NAMPT inhibitors have demonstrated obvious anticancer activity in preclinical models, they also show limited efficacy as monotherapy in phase I / II clinical trials, accompanied by dose-dependent toxicity. Notably, aberrant pharmacokinetic properties and the activation of acquired resistance mechanisms become major bottlenecks in its clinical translation. Preclinical studies have proposed strategies for various therapeutic combinations to enhance therapeutic efficacy, reduce side effects, and overcome drug resistance by targeting multiple metabolic and signaling pathways simultaneously. This review briefly introduced the mechanisms of NAMPT in tumors, summarized the research progress and application strategies of NAMPT inhibitors, covering targeted monotherapy and strategies for combination usage. Major challenges and corresponding strategies were discussed. Emphasis should be on the development of novel inhibitors and new combination strategies.

Key words: nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT); NAMPT inhibitor; cancer therapy; drug resistance; combination therapeutic strategy

肿瘤细胞的特征之一是细胞代谢重编程，这一过程通过增强营养获取和生物合成，来促进肿瘤细胞的生长、存活和增殖^[1]。在这些途径中，烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（ NAD^+ ）作为关键辅酶，参与各种氧化还原反应，且是多种 NAD^+ 消耗酶的底物，而这些 NAD^+ 消耗酶调控基因表达、DNA 修复、细胞凋亡和免疫应答等重要生物学过程。肿瘤细胞由于其活跃的增殖和高能量需求，表现出对 NAD^+ 更强的依赖性^[2-3]。烟酰胺磷酸核糖转移酶（nicotinamide phosphoribosyltransferase, NAMPT）是人体内合成 NAD^+ 的主要途径中的关键限速酶，对肿瘤细胞的存活至关重要。通过抑制 NAMPT，降低 NAD^+ 水平，能够抑制肿瘤细胞的增殖和代谢活动^[4]。

研究表明，恶性肿瘤细胞中存在 NAMPT 过度表达，且与患者预后不良、晚期、侵袭性表型和化疗药物耐药性相关^[5]。抑制 NAMPT 不仅可以有效降低肿瘤细胞中的 NAD^+ 水平，抑制肿瘤细胞生长和侵袭，还能诱导细胞死亡，增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[6]。然而，尽管 NAMPT 抑制剂在临床前研究中展现出显著的抗肿瘤活性，

但目前仅有少数药物成功进入临床研究，并且存在剂量依赖性毒性和耐药性等问题。

近年来，联合治疗策略逐渐受到关注。尤其是在 NAMPT 抑制剂与其他靶向药物、化疗药物或免疫治疗药物联合使用时，可以通过协同作用增强疗效并克服耐药性。这些策略为癌症治疗提供了新的前景。本文旨在综述 NAMPT 在肿瘤中的作用机制，重点总结 NAMPT 抑制剂的研究进展，并探讨其在靶向单药治疗及联合治疗中的应用策略。此外，笔者还将讨论目前面临的主要挑战（如耐药性问题和毒性反应）及其应对策略。

1 NAMPT 在肿瘤治疗中的作用

NAMPT 是一种同源二聚体蛋白，分子量为 52 ~ 57 kDa^[7]。其二聚化对酶活性至关重要，每个活性位点包含两个底物结合口袋，分别结合烟酰胺（NAM）和 5-磷酸核糖焦磷酸（PRPP）（见图 1），催化生成烟酰胺单核苷酸（NMN）。大多数抑制剂由于其拓扑结构与 NAM 相似，可通过杂环骨架精准占据 NAM 结合口袋，从而阻断 NAD^+ 的合成^[8]。

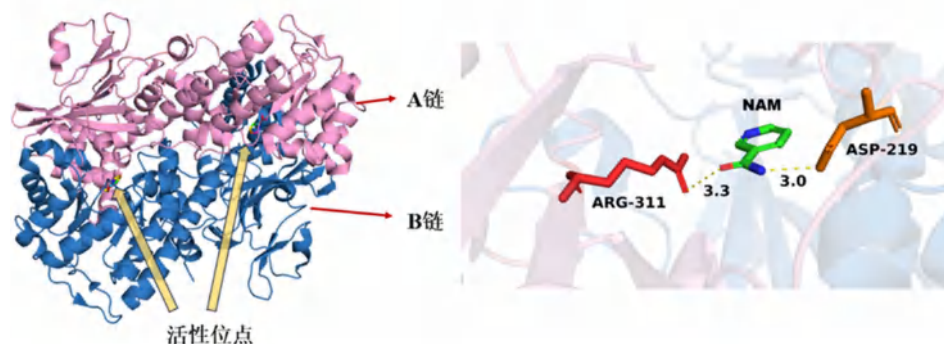


图 1 NAMPT 的二聚体结构（左）及其活性位点与底物相互作用（右）

Fig 1 NAMPT dimer structure (left) and its active site interaction with substrate (right)

NAD^+ 的生物合成可通过从头合成途径、Preiss-Handler 途径和补救途径三种不同的途径实现, NAMPT 是 NAD^+ 合成途径中的关键限速酶

(见图 2)^[9]。补救途径能够回收利用代谢过程中产生的 NAM, NAMPT 与 NAD^+ 消耗酶共同构成了一个重要的代谢循环^[10]。

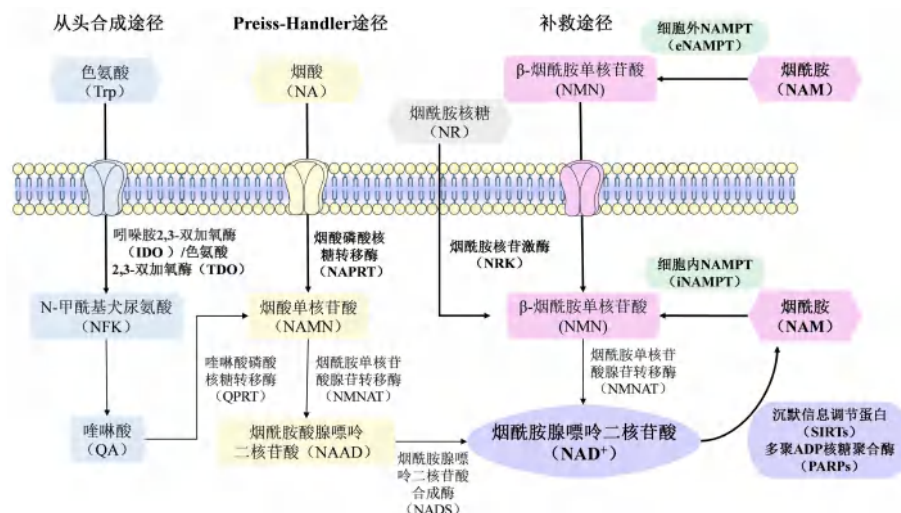


图 2 NAD^+ 的生物合成途径^[9]

Fig 2 Biosynthetic pathways of NAD^+ ^[9]

NAMPT 主要以两种不同的形式存在: 细胞外 NAMPT (eNAMPT) 和细胞内 NAMPT (iNAMPT)。iNAMPT 主要作为 NAD^+ 补救途径的限速酶, 参与合成 NAD^+ 。抑制 iNAMPT, 从而降低 NAD^+ 的生成减少三磷酸腺苷 (ATP) 水平, 能够抑制肿瘤细胞的增殖和存活。iNAMPT 并通过调控 NAD^+ 水平, 进而影响多种 NAD^+ 依赖酶的活性, 促进肿瘤细胞存活以及治疗耐受^[11-12]。除了在细胞内发挥酶样功能调节代谢外, eNAMPT 还通过信号通路调控免疫抑制、血管生成和炎症等过程。此外, eNAMPT 能够调控上皮-间质转化 (EMT), 促进肿瘤侵袭和转移^[13]。NAMPT 在能量代谢、DNA 修复、基因表达调控和信号通路激活等过程中发挥核心作用 (见图 3)^[14], 成为癌症治疗的重要潜在靶点, 同时也为癌症治疗提供了新的策略和临床机遇。

2 NAMPT 抑制剂临床研究状况

近年来, 以 NAMPT 为靶点, 开发出了许多具有较好抑制作用的化合物, 如 FK866、CHS828、OT-82 等。然而, 只有少数 NAMPT 小分子抑制剂进入临床研究 (见表 1), 截至 2025 年 1 月, 在 clinicaltrials.gov 网站上登记了 11 项关于 NAMPT 抑制剂的临床试验, 但由于疗效不佳、不良反应明显等问题, 部分试验未能继续推进, 其余的大部分抑制剂仍处于临床前研究阶段。

2.1 特异性与双靶点抑制剂

2.1.1 特异性抑制剂 特异性 NAMPT 抑制剂通过直接作用于 NAMPT 酶, 抑制 NAD^+ 的合成, 引发能量耗竭从而诱导肿瘤细胞凋亡。FK866 (APO866) 是首个 NAMPT 抑制剂 (见图 4A), 其

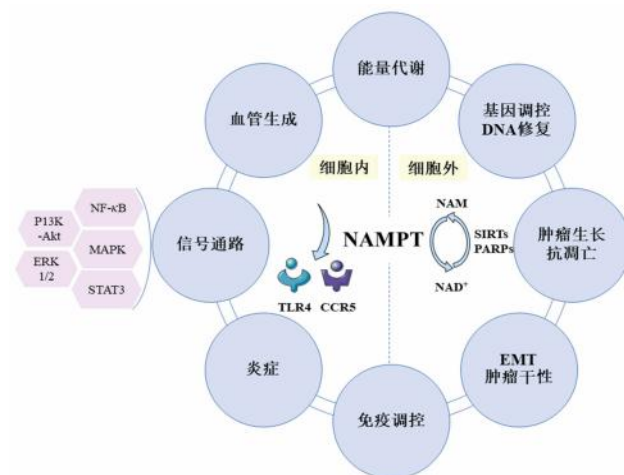


图 3 细胞内外的 NAMPT 在肿瘤发生和发展中的作用^[14]

Fig 3 Roles of intracellular and extracellular NAMPT in tumorigenesis and progression^[14]

结构中类似 NAM 的部分竞争 NAMPT 上的活性位点, 抑制 NAMPT, 引发 NAD^+ 耗竭, 导致肿瘤细胞凋亡^[15], 并通过抑制 NAMPT 而不影响烟酰胺磷酸核糖转移酶 (NAPRT), 有效减少了对正常细胞的毒性^[16]。临床前研究显示, FK866 对多种血液系统恶性肿瘤 (如白血病、淋巴瘤等) 具有显著疗效^[17]。

与 FK866 类似, 特异性 NAMPT 抑制剂 CHS828、GMX1777 和 OT-82 也显示出良好的抗肿瘤效果。CHS828 (见图 4B) 通过类似 FK866 的机制抑制 NAMPT 并消耗 NAD^+ , 对乳腺癌和小细胞肺癌具有良好的抗肿瘤效果^[18]。GMX1777 (见图 4C) 是在 CHS828 结构基础上进行优化的产物, 改善了溶解度和药代动力学特性^[19]。它

表 1 NAMPT 抑制剂的临床试验总结
Tab 1 Clinical trials on NAMPT inhibitors

药物名称	试验阶段	试验登记号	开始时间	肿瘤类型	状态
CHS828	I	NCT00003979	1999 年	实体瘤	撤回
FK866	II	NCT00431912	2007 年	皮肤 T 细胞淋巴瘤	完成
	II	NCT00432107	2006 年	黑色素瘤	完成
	I / II	NCT00435084	2007 年	B 细胞慢性淋巴细胞白血病	完成
GMX1777	I	NCT00457574	2007 年	实体瘤, 淋巴瘤	撤回
GMX1777 + 替莫唑胺	I / II	NCT00724841	2008 年	转移性黑色素瘤	终止
KPT-9274	I	NCT02702492	2016 年	实体瘤, 非霍奇金淋巴瘤	终止
KPT-9274 + 缓释烟酸					
KPT-9274 + 纳武利尤单抗					
OT-82	I	NCT03921879	2019 年	淋巴瘤	招募
KPT-9274	I	NCT04281420	2020 年	实体瘤, 非霍奇金淋巴瘤	终止
KPT-9274 + 烟酸					
KPT-9274	I	NCT04914845	2021 年	急性髓系白血病	招募
RPT1G	I	NCT06667765	2024 年	未公布	招募

可以通过静脉注射在体内快速起效, 已被证明能够有效抑制乳腺癌、小细胞肺癌等多种肿瘤的生长。OT-82 (见图 4D) 通过耗竭 NAD^+ 和 ATP, 抑制参与 DNA 修复的聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 1 (PARP1), 提高活性氧 (ROS) 水平并引发 DNA 损伤, 最终促使细胞凋亡, 其在儿童急性淋巴细胞白血病模型中表现出显著的抗肿瘤效果^[20]。值得注意的是, 已报道的一种新型抑制剂 RPT1G (结构式尚未公布) 与完全抑制 NAMPT 酶活性的传统抑制剂不同, 它能够在部分抑制 NAMPT 活性的同时, 保持其部分酶活性。其在急性淋巴细胞白血病小鼠模型中表现出了显著的疗效, 具有较高的治疗指数且对健康细胞的损害较小^[21]。

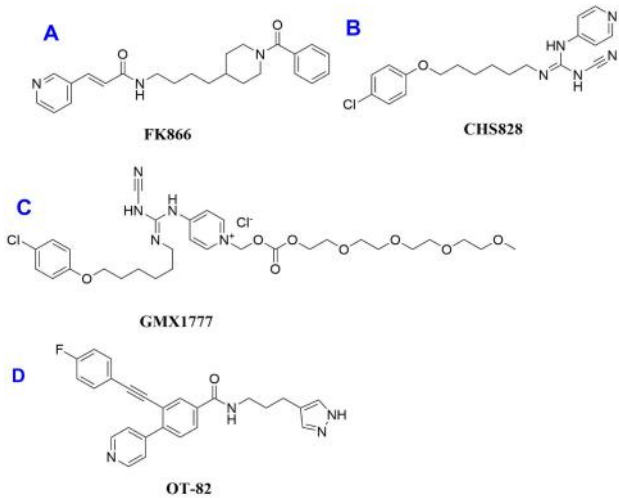


图 4 特异性抑制剂化学结构式

Fig 4 Chemical structures of specific inhibitors

2.1.2 双靶点抑制剂 近年来, 双靶点抑制剂通过联合靶向多种关键代谢途径, 能够突破单靶点抑制剂的局限性, 增强疗效的同时减缓耐药性。研究发现, KPT-9274 (见图 5A) 能够同时靶向 NAMPT 与丝氨酸/苏氨酸 p21 激活激酶 4

(PAK4), 并在多发性骨髓瘤、白血病和淋巴瘤等多种细胞模型中表现出显著的抗增殖活性^[22]。此外, KPT-9274 通过抑制 PAK4, 改善肿瘤血管微环境, 增强嵌合抗原受体 T 细胞 (CAR-T) 的效力, 从而显著提高免疫治疗对胶质母细胞瘤的疗效^[23]。另一种双靶点抑制剂 STF-31 (见图 5B), 同时靶向 NAMPT 与葡萄糖转运蛋白 1 (GLUT1), 在胶质母细胞瘤和结肠癌模型中显示出优异的疗效。STF-31 因能同时抑制能量代谢和氧化应激, 有望成为解决肿瘤耐药的新型治疗选择^[24]。西达本胺 (Chidamide), 作为一种组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 抑制剂 (见图 5C)^[25], 也表现出双重抑制效果: 不仅能抑制 HDAC, 还能下调 NAMPT 表达, 从而同时影响肿瘤代谢和基因表达, 进一步增强抗肿瘤效果^[26]。

NAMPT 双靶点抑制剂通过多途径干扰肿瘤细胞的代谢重编程, 特别是在代谢异常肿瘤 [如 Kirsten 大鼠肉瘤病毒癌基因同源物 (*KRAS*)、表皮生长因子受体 (*EGFR*) 和异柠檬酸脱氢酶 (*IDH*) 等突变型肿瘤] 中展现出独特优势。在 *KRAS* 突变型胰腺癌中, 化合物 B5 (见图 5D) 能够通过抑制磷酸二酯酶 6 δ (PDE δ) 和 NAMPT 阻断代谢途径, 抑制 *KRAS* 驱动的代谢重编程, 进而抑制肿瘤细胞的增殖和生长^[27-28]; 在 *EGFR* T790M 突变型非小细胞肺癌中, 化合物 28 (见图 5E) 通过抑制 NAMPT, 增强 *EGFR* 抑制剂的作用, 从而克服厄洛替尼因突变引发的耐药性问题^[29]; 而 *IDH1/2* 突变通常发生在神经胶质母细胞瘤、急性髓性白血病和胆管癌等中, 这些突变对代谢调节药物敏感。突变导致 D-2-羟基戊二酸 (D-2HG) 累积, D-2HG 诱导异常的组蛋白修饰和 DNA 甲基化, 从而促进肿瘤发展。D-2HG 的生成同时伴随着烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 转化为氧化

型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADP), 而抑制 NAMPT 能够减少 NADPH 并且通过调控 PARP 抑制 DNA 修复。化合物 23h (见图 5F) 通过同时抑制 IDH 和 NAMPT, 进而抑制肿瘤细胞的能量代谢和表观遗传重编程。尤其在脑内肿瘤中, 化合物 23h 可有效改善单一 IDH 抑制剂疗效不足的问题^[30-31]。此外, 针对 IDH 基因突变型胶质瘤, 目前已开发出一种新型术中靶向技术。此疗法基于荧光定量 PCR 进行快速基因分型并用临床肿瘤标本验证, 在切除的肿瘤边缘使用 CHS828 缓释微粒进行局部递送治疗, 让药物在原发肿瘤区域达到有效浓度, 减少了药物对正常组织的毒性, 显示出更好的安全性与治疗效果^[32]。

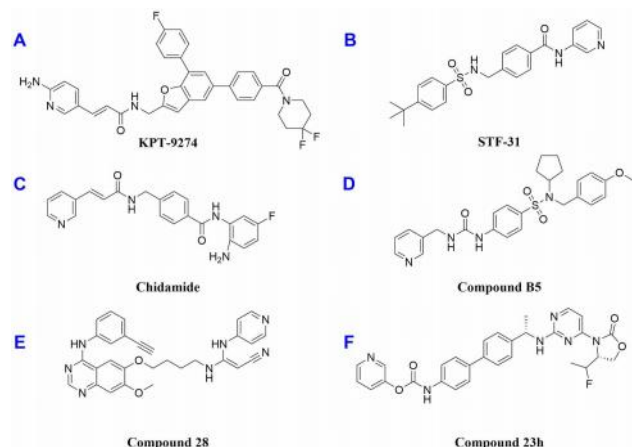


图 5 双靶点抑制剂化学结构式

Fig 5 Chemical structures of dual target NAMPT inhibitors

2.2 靶向递送与降解疗法

传统的 NAMPT 抑制剂在治疗过程中可能会引起较高的系统性毒性, 并且肿瘤细胞容易出现耐药性。为解决这些问题, 研究者们提出了多种策略, 包括靶向递送技术和新型降解剂的开发。

靶向递送技术, 如抗体药物偶联物 (ADC)、光活化前药和微粒介导的药物递送系统, 能够将 NAMPT 抑制剂精准递送到肿瘤部位, 最大限度地减少对正常组织的损伤并增强治疗效果^[33-35]。

肿瘤细胞可能通过突变改变 NAMPT 的活性部位或抑制剂的结合位点, 以及上调 NAMPT 的表达水平, 从而产生抗药性。与传统的 NAMPT 抑制剂不同, 降解剂并非简单地抑制酶活性, 而是通过调控蛋白质的稳定性来达到更好的治疗效果。蛋白降解靶向诱导化合物 (PROTAC) 和自噬体结合化合物 (ATTEC) 可通过诱导 NAMPT 蛋白的降解, 有效克服肿瘤细胞耐药问题。PROTAC 利用 E3 连接酶通过泛素化机制, 选择性降解 NAMPT, 进而降低耐药风险^[36]。研究表明, 化合物 A7 (见图 6A) 不仅可降低 NAD^+ 水平, 还能在肿瘤微环

境中发挥免疫调节作用, 进一步优化肿瘤的代谢状态并增强肿瘤免疫应答^[37]。ATTEC 则通过自噬-溶酶体途径降解 NAMPT, 化合物 A3 (见图 6B) 在对人卵巢癌 A2780 细胞的抗增殖活性方面, 比传统抑制剂提高约 10 倍, 且在小鼠肿瘤模型中的抑瘤率达到 88.1%^[38]。

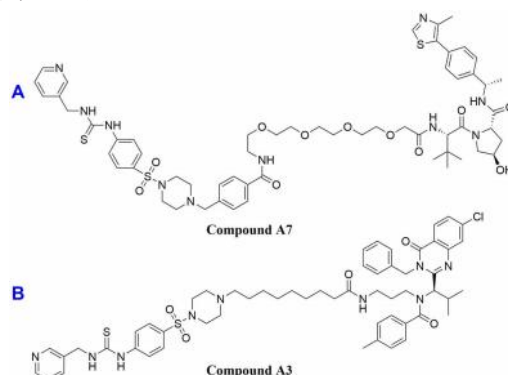


图 6 NAMPT 降解剂化学结构式

Fig 6 Chemical structures of NAMPT degraders

2.3 药物联用

NAMPT 抑制剂单药治疗面临耐药性、治疗范围有限等问题, 而联用治疗则通过多靶点作用、克服耐药性和减轻不良反应, 成为当前及未来研究的主流策略 (见表 2)。

多项研究表明, NAMPT 抑制剂与化疗药物 (如顺铂、紫杉醇) 或放疗联用, 可以通过抑制 DNA 修复、增加 DNA 损伤来增强肿瘤细胞对治疗的敏感性, 减少耐药性。例如, FK866 与放疗联合治疗, 通过抑制 NAMPT, 减弱肿瘤细胞的 DNA 修复能力, FK866 提高了恶性脑膜瘤细胞对放射的敏感性, 显著提升治疗效果^[39]。NAMPT 抑制剂联合免疫检查点抑制剂, 可以调节肿瘤微环境, 增强免疫细胞的功能, 从而克服肿瘤的免疫逃逸, 并改善免疫耐药; 联用代谢调节药物 (如吉西他滨) 可以调节细胞代谢, 通过降低治疗强度和不良反应, 提高患者的耐受性和生活质量。NAMPT 抑制剂作为上游靶点, 能够影响多条信号通路, 联用策略能综合作用多个代谢和信号通路, 扩大治疗范围, 尤其是癌症和代谢性疾病中的多途径调控。因此, 未来的治疗策略将更加注重个性化、精准的联合疗法, 结合新型药物和治疗方式, 为癌症患者提供更有效、更安全的治疗方案。

2.4 NAMPT 抑制剂的局限性及应对策略

尽管 NAMPT 抑制剂在肿瘤治疗中的潜力受到广泛关注, 但其研究和临床应用仍面临许多挑战。如临床上观察到明显的血液毒性与视网膜毒性; 因肿瘤细胞增加 NAMPT 表达、代偿其他途径合成 NAD^+ 以及微环境改变等机制产生的耐药

表 2 已报道的癌症治疗中 NAMPT 抑制剂与其他药物的联用
Tab 2 Reported combinations of NAMPT inhibitors with other agents in cancer therapy

NAMPT 抑制剂	联合药物	药物类型	癌症类型
FK866	卡格列净	钠-葡萄糖协同转运蛋白 2 抑制剂	胆管癌 ^[40]
	顺铂	烷化剂	卵巢癌 ^[41]
	奥拉帕尼	聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶抑制剂	卵巢癌 ^[42]
	替莫唑胺	烷化剂	神经胶质母细胞瘤 ^[43]
	2-羟基-1-萘醛	烟酸磷酸核糖转移酶抑制剂	转移性胃肠癌 ^[44]
GNE617	多西他赛	烷化剂	头颈鳞状细胞癌 ^[45]
GMX1777	培米曲塞	抗代谢物	非小细胞肺癌 ^[46]
OT-82	依托泊苷	拓扑异构酶抑制剂	急性淋巴细胞白血病 ^[20]
	达沙替尼	酪氨酸激酶抑制剂	急性淋巴细胞白血病 ^[20]
	维莫非尼	丝氨酸/苏氨酸激酶抑制剂	黑色素瘤 ^[47]
	度维利塞	磷酸肌醇 3-激酶抑制剂	淋巴瘤 ^[48]
KPT-9274	PD-1 抑制剂	免疫检查点抑制剂	黑色素瘤 ^[49]
	维奈托克	B 细胞淋巴瘤-2 蛋白抑制剂	急性髓性白血病 ^[50]
	吉西他滨	抗代谢物	胰腺导管腺癌 ^[51]
	苯达莫司汀	烷化剂	原发性巨球蛋白血症 ^[52]
	氟维司群	雌激素受体拮抗剂	转移性乳腺癌 ^[53]

性；半衰期短，生物利用度低和组织渗透性差等药代动力学问题。针对这些问题，研究者提出了一些有效的应对策略。

首先，为了解决 NAMPT 抑制剂的毒性问题，可将其与烟酸联合使用，以防止正常细胞因 NAD⁺ 的耗竭而受到损害^[54]。其次，结合靶向递送技术和合成降解剂等手段，可以有效提高药物的靶向性，减少对正常细胞的影响。例如，GMX1777 纳米颗粒能够实现药物的持续缓慢释放，在 IDH 突变型胶质瘤模型中显著降低肿瘤负荷^[55]。还有，开发新型抑制剂也是策略之一，例如，与 FK866 相比，新型抑制剂 OT-82 在动物模型中未出现明显的视网膜毒性^[56]。此外，对结构进行优化并进行测试，筛选出药代动力学特性较好的药物。

克服耐药性的策略有：

① 基于基因组学和代谢组学信息，筛选出对 NAMPT 抑制剂敏感的患者群体并根据其肿瘤的具体特征，为患者制订个体化治疗方案。例如，对于表现出某些代谢逃逸机制的患者，可能需要联合其他代谢调节剂或免疫疗法来提高治疗效果。② 将 NAMPT 抑制剂与其他抗肿瘤药物或疗法相结合，以达到协同治疗效果，如与 NAPRT 抑制剂合用，可以避免肿瘤细胞通过 Preiss-Handler 途径合成 NAD⁺。③ 设计合成新的 NAMPT 降解剂，实现选择性、持久地降解 NAMPT 蛋白。④ 开发双重抑制剂，诸如 KPT-9274、STF-31，同时调控多个靶点。⑤ 开发能够中和 eNAMPT 并降低其活性的抗体药物，调控肿瘤微环境，减少免疫逃逸，并避免细胞外补充合成 NAD⁺^[57]。⑥ 结合检测 NAD⁺、6-磷酸葡萄糖和二羟丙酮磷酸等代谢物水平为临床治疗效果提供监测，以实现精准用药^[58]。

3 总结与展望

NAMPT 抑制剂通过靶向 NAD⁺ 代谢途径在多种肿瘤中展现出显著的抗肿瘤潜力^[59]。肿瘤细胞对 NAD⁺ 的依赖，使得 NAMPT 成为一个潜在的治疗靶点。尽管 NAMPT 抑制剂在肿瘤治疗中展现了显著的临床前优势，但其临床应用仍面临剂量限制性毒性和耐药性等挑战。

为了克服这些问题，联合治疗策略的创新将是未来研究的关键。重点探索 NAMPT 抑制剂与免疫治疗、靶向治疗、化疗或放疗等传统和新兴疗法的联合应用。联合治疗能够综合多条信号通路的调控，提高疗效并克服耐药性，还能通过互补的作用机制，减少毒性反应，降低药物的不良反应，提高患者的耐受性和治疗的整体效果。同时，随着精准医学的进步，未来研究将更多关注根据患者特定的肿瘤特征或代谢特征，从而制订个性化的联合治疗方案。此外，新型 NAMPT 抑制剂的开发将聚焦于提高药物的靶向性和选择性。通过结构优化提高药物的靶向性、选择性，或通过纳米技术增强药物的局部浓度和生物利用度，这些创新性策略能够在保证治疗效果的同时，降低药物的系统性毒性，显著提升患者的生活质量。

总之，NAMPT 抑制剂作为癌症治疗的新兴策略，具有广阔的研究前景，但要实现其在临床中的广泛应用，还需要进一步克服耐药性、不良反应的挑战。随着药物设计、递送系统的创新及联合治疗策略的优化，NAMPT 抑制剂在癌症治疗中有望发挥更为重要的作用。然而，仍需通过多方位的研究、技术创新以及临床经验积累，克服当前的瓶颈，进一步提升其临床疗效和安全性。

参考文献

- [1] Audrito V, Managò A, Gaudino F, et al. Targeting metabolic reprogramming in metastatic melanoma: the key role of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2020, 98: 192-201.
- [2] Yaku K, Okabe K, Hikosaka K, et al. NAD metabolism in cancer therapeutics [J]. *Front Oncol*, 2018, 8: 622.
- [3] Covarrubias AJ, Perrone R, Grozio A, et al. NAD⁺ metabolism and its roles in cellular processes during ageing [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22 (2): 119-141.
- [4] Kollmar J, Xu JM, Gonzalves D, et al. Differential mitochondrial redox responses to the inhibition of NAD⁺ salvage pathway of triple negative breast cancer cells [J]. *Cancers (Basel)*, 2024, 17 (1): 7.
- [5] Indini A, Fiorilla I, Ponzzone L, et al. NAD/NAMPT and mTOR pathways in melanoma: drivers of drug resistance and prospective therapeutic targets [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (17): 9985.
- [6] Ghanem MS, Caffa I, Monacelli F, et al. Inhibitors of NAD⁺ production in cancer treatment: state of the art and perspectives [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25 (4): 2092.
- [7] Peng AH, Li JQ, Xing JX, et al. The function of nicotinamide phosphoribosyl transferase (NAMPT) and its role in diseases [J]. *Front Mol Biosci*, 2024, 11: 1480617.
- [8] Navas LE, Carnero A. Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) metabolism as a relevant target in cancer [J]. *Cells*, 2022, 11 (17): 2627.
- [9] Ozgencil F, Gunindi HB, Eren G. Dual-targeted NAMPT inhibitors as a progressive strategy for cancer therapy [J]. *Bioorg Chem*, 2024, 149: 107509.
- [10] Yong JX, Cai SQ, Zeng ZL. Targeting NAD⁺ metabolism: dual roles in cancer treatment [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1269896.
- [11] Khaidizar FD, Bessho Y, Nakahata Y. Nicotinamide phosphoribosyltransferase as a key molecule of the aging/senescence process [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (7): 3709.
- [12] Podyacheva E, Toropova Y. The role of NAD⁺, SIRT6 interactions in stimulating and counteracting carcinogenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (9): 7925.
- [13] Casanova NG, Herazo-Maya JD, Kempf CL, et al. eNAMPT is a novel DAMP and therapeutic target in human and murine pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2025 (2025-03-24).
- [14] Tang H, Wang L, Wang TY, et al. Recent advances of targeting nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) for cancer drug discovery [J]. *Eur J Med Chem*, 2023, 258: 115607.
- [15] Khan JA, Tao X, Tong L. Molecular basis for the inhibition of human NMPRTase, a novel target for anticancer agents [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13 (7): 582-588.
- [16] Zhu XT, Li Y, Liu HX, et al. NAMPT-targeting PROTAC and nicotinic acid co-administration elicit safe and robust anti-tumor efficacy in NAMPT-deficient pan-cancers [J]. *Cell Chem Biol*, 2024, 31 (6): 1203-1218. e17.
- [17] Fratta S, Biniecka P, Moreno-Vargas AJ, et al. Synthesis and structure-activity relationship of new nicotinamide phosphoribosyltransferase inhibitors with antitumor activity on solid and hematological cancer [J]. *Eur J Med Chem*, 2023, 250: 115170.
- [18] Ghanem MS, Monacelli F, Nencioni A. Advances in NAD-lowering agents for cancer treatment [J]. *Nutrients*, 2021, 13 (5): 1665.
- [19] Wei YC, Xiang HT, Zhang WQ. Review of various NAMPT inhibitors for the treatment of cancer [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 970553.
- [20] Somers K, Evans K, Cheung L, et al. Effective targeting of NAMPT in patient-derived xenograft models of high-risk pediatric acute lymphoblastic leukemia [J]. *Leukemia*, 2020, 34 (6): 1524-1539.
- [21] Crimmins G, Bhurruth-Alcor Y, Jarvela T, et al. RPT1G: a 1 st-in-class small molecule NAMPT inhibitor as a novel therapeutic for acute lymphocytic leukemia [J]. *Blood*, 2023, 142 (Suppl 1): 419.
- [22] Mpilla G, Aboukameel A, Muqbil I, et al. PAK4-NAMPT dual inhibition as a novel strategy for therapy resistant pancreatic neuroendocrine tumors [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11 (12): 1902.
- [23] Ma WJ, Wang YL, Zhang RX, et al. Targeting PAK4 to reprogram the vascular microenvironment and improve CAR-T immunotherapy for glioblastoma [J]. *Nat Cancer*, 2021, 2 (1): 83-97.
- [24] Kraus D, Reckenbeil J, Veit N, et al. Targeting glucose transport and the NAD pathway in tumor cells with STF-31: a re-evaluation [J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2018, 41 (5): 485-494.
- [25] Dong GQ, Chen W, Wang X, et al. Small molecule inhibitors simultaneously targeting cancer metabolism and epigenetics: discovery of novel nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) and histone deacetylase (HDAC) dual inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2017, 60 (19): 7965-7983.
- [26] Wu Y, Wang L, Huang YH, et al. Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) is a new target of antitumor agent chidamide [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2019, 11 (1): 40-44.
- [27] Zhang ZN, Zhang H, Liao X, et al. KRAS mutation: the booster of pancreatic ductal adenocarcinoma transformation and progression [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 11: 1147676.
- [28] 董国强, 盛春泉, 陈振倩. 一种作为 NAMPT-PDEδ 双靶点抑制剂的化合物及其应用: CN116589402A [P]. 2023-08-15.
- [29] Zhang WH, Zhang KJ, Yao YW, et al. Dual nicotinamide phosphoribosyltransferase and epidermal growth factor receptor inhibitors for the treatment of cancer [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 211: 113022.
- [30] Clausing M, William D, Preussler M, et al. Different effects of RNAi-mediated downregulation or chemical inhibition of NAMPT in an isogenic IDH mutant and wild-type glioma cell model [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (10): 5787.
- [31] Wen F, Gui G, Wang XY, et al. Discovery of novel dual inhibitors targeting mutant IDH1 and NAMPT for the treatment of glioma with IDH1 mutation [J]. *J Med Chem*, 2024, 67 (11): 8667-8692.
- [32] Shankar GM, Kirtane AR, Miller JJ, et al. Genotype-targeted local therapy of glioma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018,

- 115 (36): E8388-E8394.
- [33] Lameijer LN, Ernst D, Hopkins SL, et al. A red-light-activated ruthenium-caged NAMPT inhibitor remains phototoxic in hypoxic cancer cells [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, 56 (38): 11549-11553.
- [34] van Geest EP, Götzfried SK, Klein DM, et al. A lock-and-kill anticancer photoactivated chemotherapy agent [J]. *Photochem Photobiol*, 2023, 99 (2): 777-786.
- [35] Böhnke N, Berger M, Griebenow N, et al. A novel NAMPT inhibitor-based antibody-drug conjugate payload class for cancer therapy [J]. *Bioconjug Chem*, 2022, 33 (6): 1210-1221.
- [36] Zhu XT, Liu HX, Chen L, et al. Addressing the enzyme-independent tumor-promoting function of NAMPT via PROTAC-mediated degradation [J]. *Cell Chem Biol*, 2022, 29 (11): 1616-1629. e12.
- [37] Wu Y, Pu CY, Fu YX, et al. NAMPT-targeting PROTAC promotes antitumor immunity via suppressing myeloid-derived suppressor cell expansion [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12 (6): 2859-2868.
- [38] Dong GQ, Wu Y, Cheng JF, et al. Ispinesib as an effective warhead for the design of autophagosome-tethering chimeras: discovery of potent degraders of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) [J]. *J Med Chem*, 2022, 65 (11): 7619-7628.
- [39] Lv YF, Deng YX, Feng J, et al. NAD⁺ metabolic enzyme inhibitor as radiosensitizer for malignant meningioma and its modulation of P53 expression [J]. *Mol Cancer Ther*, 2024, 23 (11): 1586-1596.
- [40] Taguchi D, Shirakami Y, Sakai H, et al. Dual roles of canagliflozin on cholangiocarcinoma cell growth and enhanced growth suppression in combination with FK866 [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26 (3): 978.
- [41] Nacarelli T, Fukumoto T, Zundell JA, et al. NAMPT inhibition suppresses cancer stem-like cells associated with therapy-induced senescence in ovarian cancer [J]. *Cancer Res*, 2020, 80 (4): 890-900.
- [42] Sauriol SA, Carmona E, Udaskin ML, et al. Inhibition of nicotinamide dinucleotide salvage pathway counters acquired and intrinsic poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor resistance in high-grade serous ovarian cancer [J]. *Sci Rep*, 2023, 13 (1): 3334.
- [43] Perryman R, Chau TW, De-Felice J, et al. Distinct capabilities in NAD metabolism mediate resistance to NAMPT inhibition in glioblastoma [J]. *Cancers (Basel)*, 2024, 16 (11): 2054.
- [44] Franco J, Piacente F, Walter M, et al. Structure-based identification and biological characterization of new NAMPT inhibitors [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2022, 15 (7): 855.
- [45] Navas LE, Blanco-Alcaina E, Suarez-Martinez E, et al. NAD pool as an antitumor target against cancer stem cells in head and neck cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2023, 42 (1): 55.
- [46] Chan M, Gravel M, Bramoullé A, et al. Synergy between the NAMPT inhibitor GMX1777 (8) and pemetrexed in non-small cell lung cancer cells is mediated by PARP activation and enhanced NAD consumption [J]. *Cancer Res*, 2014, 74 (21): 5948-5954.
- [47] Ponzone L, Audrito V, Landi C, et al. RICTOR/mTORC2 downregulation in BRAF^{V600E} melanoma cells promotes resistance to BRAF/MEK inhibition [J]. *Mol Cancer*, 2024, 23 (1): 105.
- [48] Messana VG, Fasci A, Vitale N, et al. A molecular circuit linking the BCR to the NAD biosynthetic enzyme NAMPT is an actionable target in richter syndrome [J]. *Blood Adv*, 2024, 8 (8): 1920-1933.
- [49] Abril-Rodriguez G, Torrejon DY, Liu W, et al. PAK4 inhibition improves PD-1 blockade immunotherapy [J]. *Nat Cancer*, 2020, 1 (1): 46-58.
- [50] Eldfors S, Saad J, Ikonen N, et al. Monosomy 7/del (7q) cause sensitivity to inhibitors of nicotinamide phosphoribosyltransferase in acute myeloid leukemia [J]. *Blood Adv*, 2024, 8 (7): 1621-1633.
- [51] Samant C, Kale R, Bokare A, et al. PAK4 inhibition significantly potentiates gemcitabine activity in PDAC cells via inhibition of Wnt/ β -catenin, p-ERK/MAPK and p-AKT/PI3K pathways [J]. *Biochem Biophys Rep*, 2023, 35: 101544.
- [52] Li N, Lopez MA, Linares M, et al. Dual PAK4-NAMPT inhibition impacts growth and survival, and increases sensitivity to DNA-damaging agents in Waldenström macroglobulinemia [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25 (1): 369-377.
- [53] Mogol AN, Zuo QY, Yoo JY, et al. NAD⁺ metabolism generates a metabolic vulnerability in endocrine-resistant metastatic breast tumors in females [J]. *Endocrinology*, 2023, 164 (6): bqad073.
- [54] ElMokh O, Matsumoto S, Biniecka P, et al. Gut microbiota severely hampers the efficacy of NAD-lowering therapy in leukemia [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13 (4): 320.
- [55] Murray MA, Noronha KJ, Wang YZ, et al. Exploiting metabolic defects in glioma with nanoparticle-encapsulated NAMPT inhibitors [J]. *Mol Cancer Ther*, 2024, 23 (8): 1176-1187.
- [56] Korotchikina L, Kazyulkin D, Komarov PG, et al. OT-82, a novel anticancer drug candidate that targets the strong dependence of hematological malignancies on NAD biosynthesis [J]. *Leukemia*, 2020, 34 (7): 1828-1839.
- [57] Travelli C, Colombo G, Aliotta M, et al. Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase (eNAMPT) neutralization counteracts T cell immune evasion in breast cancer [J]. *J Immunother Cancer*, 2023, 11 (10): e007010.
- [58] Quijada H, Bermudez T, Kempf CL, et al. Endothelial eNAMPT amplifies pre-clinical acute lung injury: efficacy of an eNAMPT-neutralising monoclonal antibody [J]. *Eur Respir J*, 2021, 57 (5): 2002536.
- [59] Gasparrini M, Giovannuzzi S, Nocentini A, et al. Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) in cancer: a patent review [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2024, 34 (7): 565-582.

(收稿日期: 2025-03-05; 修回日期: 2025-05-12)

药物分析与检验

基于指纹图谱结合化学模式识别技术对 15 个厂家的三黄片进行质量评价

王欣¹, 李婷婷^{1*}, 刘莉¹, 曾桢¹, 李及¹, 罗霄^{1*}, 何小芳² (1.成都市药品检验研究院, 国家药品监督管理局中药材质量监测评价重点实验室, 成都 610045; 2.成都中医药大学, 成都 611100)

摘要: **目的** 建立三黄片超高效液相色谱 (UPLC) 指纹图谱分析方法, 结合化学模式识别分析对三黄片质量进行综合评价。**方法** 采用 Waters Acquity UPLC Hss T3 色谱柱 (150 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 以甲醇 (A) -0.1% 磷酸水溶液 (B) 为流动相, 梯度洗脱, 柱温为 30 ℃, 流速为 0.3 mL/min, 检测波长为 254 nm; 采用 SIMCA 14.1 和 SPSS 25.0 软件进行层次聚类分析 (HCA)、主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA)。**结果** 建立的三黄片指纹图谱方法标定 18 个共有峰并确认其化学成分, 全部样品相似度为 0.890 ~ 0.998。化学模式识别综合分析表明: 厂家 1、2、8、9 的质量较好。**结论** 建立的 UPLC 指纹图谱方法操作便捷, 可靠; 联合 HCA、PCA 和 OPLS-DA 可为三黄片质量评价提供参考。

关键词: 三黄片; UPLC 指纹图谱; 化学模式识别; 主成分分析; 综合评价; 质量评价

中图分类号: R286

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)12-3661-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.028

Quality evaluation of Sanhuang tablets from 15 manufacturers based on chromatographic fingerprints combined with chemometric pattern recognition

WANG Xin¹, LI Tingting^{1*}, LIU Li¹, ZENG Zhen¹, LI Ji¹, LUO Xiao^{1*}, HE Xiaofang² (1. Chengdu Institute for Drug Control, NMPA Key Laboratory for Quality Monitoring and Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610045; 2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611100)

Abstract: Objective To establish the UPLC fingerprints of Sanhuang tablets, and comprehensively evaluate their quality with chemical pattern recognition. **Methods** A Waters Acquity UPLC Hss T3 (150 mm×2.1 mm, 1.8 μm) column was used, and the mobile phase was methanol (A)-0.1% aqueous phosphoric acid (B). The column temperature was 30 ℃, the flow rate was 0.3 mL/min, and the detection wavelength was 254 nm. SIMCA 14.1 and SPSS 25.0 software were used for the hierarchical cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA). **Results** Eighteen common peaks were identified from the established UPLC fingerprints of Sanhuang tablet, with the similarity ranging from 0.890 to 0.998. The comprehensive evaluation showed that the quality of Sanhuang tablets from manufacturers 1, 2, 8 and 9 was better. **Conclusion** The UPLC fingerprint method is convenient and reliable. The combination of HCA, PCA and OPLS-DA can provide a reference for the quality evaluation of Sanhuang tablets.

Key words: Sanhuang tablet; UPLC fingerprint; chemical pattern recognition; principal component analysis; comprehensive evaluation; quality assessment

基金项目: 国家重点研发计划-中医药现代化专项 (No. 2023YFC3504100)。

作者简介: 王欣, 女, 硕士, 主管中药师, 主要从事中药质量评价与研究, email: 30712433@qq.com ***通信作者:** 李婷婷, 女, 副主任药师, 主要从事中药质量评价与研究, email: ltt2910@163.com; 罗霄, 男, 副主任中药师, 主要从事中药材鉴定、质量评价与研究, email: 76209608@qq.com

三黄片 (Sanhuang tablet) 最早出自东汉医圣张仲景所著的《金匱要略》中的经典名方“泻心汤”，组方为大黄、黄芩浸膏以及盐酸小檗碱，功效为清热解毒、泻火通便。三黄片可治疗三焦热盛所致的目赤肿痛、口鼻生疮、咽喉肿痛、牙龈肿痛等；也可治疗急性胃肠炎、痢疾。现行标准为 2020 年版《中国药典》^[1]。三黄片是临床上广泛使用的中成药制剂，生产厂家众多，为确保药品有效性、质量一致性，对其质量进行严格控制极为重要^[2]。在《中国药典》2020 年版一部三黄片项下仅以盐酸小檗碱、黄芩苷、大黄素和大黄酚总量作为其质量评价标准，没有对不同厂家的质量进行全面、整体的客观评价。根据现有研究，指纹图谱作为一致性评价的常用技术手段^[3]，在中药及中药制剂化学成分整体评价中应用广泛。关于三黄片的相关研究，近几年多集中在对其含量丰富的成分或标准项下规定的成分进行研究^[4-8]，鲜见对其进行指纹图谱研究。

因此，本研究对收集于 15 个厂家的 45 批次三黄片样本进行了 UPLC 指纹图谱研究，并结合层次聚类分析 (HCA)、主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘法 - 判别分析 (OPLS-DA) 化学模式识别对其进行分析，综合、整体评价其质量，为三黄片质量控制与综合评价提供实验依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters Acquity H class 超高效液相色谱仪 (美国沃特世科技有限公司)；XPE26 万分之一天平、ME204E 百万分之一天平 (梅特勒托利多公司)；Milli-Q 超纯水仪 (美国密理博公司)；SK250H 超声仪 (上海科导超声仪器有限公司)。

1.2 试药

对照品：黄芩苷 (批号：110715-202223，纯度：97.20%)、黄芩素 (批号：110595-201808，纯度：97.90%)、汉黄芩苷 (批号：112002-201702，纯度：98.50%)、大黄酸 (批号：110757-201607，纯度：99.30%)、芦荟大黄素 (批号：110795-202011，纯度：97.50%)、大黄素甲醚 (批号：111758-202218，纯度：98.90%)、大黄酚 (批号：110796-201922，纯度：99.40%)、大黄素 (批号：110759-201913，纯度：96.00%)、没食子酸 (批号：110831-201906，纯度：91.50%)、盐酸小檗碱 (批号：110713-202015，纯度：85.90%) (中国食品药品检定研究院)；汉黄芩素 (批号：DSTDH002501，纯度：98.99%)、千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷 (批号：DSTDQ004101，纯度：98.49%)、大黄酚-1-O-葡萄糖苷 (批号：DST210401-138，纯度：100.00%)、大黄酚-8-O-葡萄糖苷 (批号：DST210201-071，纯度：98.59%)、芦荟大黄素-8-O-葡萄糖苷 (批号：DST221227-125，纯度：98.57%)、大黄酸-8-O-β-D-葡萄糖苷 (批号：DST230504-132，纯度：98.91%)、千层纸素 A (批号：DSTDQ004102，纯度：98.00%)、白杨素 (批号：DST200323-048，纯度：98.00%) (成都德思特生物技术有限公司)。甲醇 (色谱纯，美国 Fisher 公司)；磷酸 (色谱级，天津市科密欧化学试剂有限公司)；甲醇 (分析纯，成都市科隆化学品有限公司)；纯水仪制备超纯水。大黄饮片、黄芩饮片分别采购自成都吉安康药业有限公司、四川国强中药饮片有限公司、成都欣福源中药饮片有限公司，黄芩浸膏粉末均采用上述来源的黄芩饮片，按《中国药典》2020 年版一部三黄片项下方法自制而成。45 批三黄片样品来自 15 个厂家，详细信息见表 1。

表 1 45 批三黄片的样品信息
Tab 1 Sample information of 45 batches of Sanhuang tablets

厂家	批号	编号	厂家	批号	编号
厂家 1	220610、220524、220816	S1 ~ S3	厂家 9	20221013、20230504、20230501	S25 ~ S27
厂家 2	220801、221002、230201	S4 ~ S6	厂家 10	20211202、20220601、20210801	S28 ~ S30
厂家 3	221103、221101、230101	S7 ~ S9	厂家 11	20221102、20220702、20221107	S31 ~ S33
厂家 4	20210906、20210902、20221203	S10 ~ S12	厂家 12	220307、220606、230203	S34 ~ S36
厂家 5	622037、622038、622039	S13 ~ S15	厂家 13	211109、211012、220514	S37 ~ S39
厂家 6	D14153、D14193、D14204	S16 ~ S18	厂家 14	220901、221001、221101	S40 ~ S42
厂家 7	220704、220301、220604	S19 ~ S21	厂家 15	230308、230307、230312	S43 ~ S45
厂家 8	210305、210304、220120	S22 ~ S24			

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液 取三黄片 10 片，除去包衣，精密称定，研细，取约 0.1 g，置锥形瓶中，精密加入 70% 甲醇 25 mL，称定重量，超声 30 min，

放冷，再次称定重量，用 70% 甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.1.2 对照品溶液 取汉黄芩苷等 18 个对照品适量，置于量瓶中，加甲醇适量溶解并稀释至刻度，分别配制成含黄芩苷 206.70 μg/mL、千层纸素 A-7-

O-β-*D*-葡萄糖醛酸苷 98.40 μg/mL、汉黄芩苷 130.70 μg/mL、黄芩素 96.00 μg/mL、汉黄芩素 101.40 μg/mL、没食子酸 1071.50 μg/mL、芦荟大黄素 -8-*O*-葡萄糖苷 38.00 μg/mL、大黄酚 -1-*O*-葡萄糖苷 102.00 μg/mL、大黄酚 -8-*O*-葡萄糖苷 66.26 μg/mL、芦荟大黄素 120.00 μg/mL、大黄酸 121.00 μg/mL、大黄素 115.00 μg/mL、大黄酚 102.00 μg/mL、大黄素甲醚 122.00 μg/mL、盐酸小檗碱 100.00 μg/mL、大黄酸 -8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷 95.00 μg/mL、千层纸素 A 100.00 μg/mL、白杨素 101.00 μg/mL 的溶液, 作为对照品母液, 备用。

2.1.3 单药味溶液 按三黄片处方比例分别称取大黄饮片、黄芩浸膏粉末、盐酸小檗碱粉末适量, 置锥形瓶中, 按“2.1.1”项下方法操作, 即得各处方药味溶液。

2.2 指纹图谱建立

2.2.1 色谱条件 Waters Acquity UPLC Hss T3 色谱柱 (150 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相 A: 甲醇, 流动相 B: 0.1% 磷酸水溶液, 按表 2 进行梯度洗脱; 流速为 0.3 mL/min; 柱温为 30 ℃; 检测波长为 254 nm; 进样体积为 1 μL。

表 2 流动相梯度洗脱程序		
Tab 2 Gradient of mobile phase		
时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
0 ~ 5	3 → 20	97 → 80
5 ~ 20	20 → 40	80 → 60
20 ~ 27	40 → 45	60 → 55
27 ~ 40	45 → 58	55 → 42
40 ~ 50	58 → 90	42 → 10
50 ~ 53	90	10
53 ~ 54	90 → 3	10 → 97
54 ~ 64	3	97

2.2.2 精密度试验 取三黄片 1 份 (S1), 精密称定, 按“2.1.1”项下方法制备并连续进样 6 次, 以保留时间居中, 峰响应值大、峰形较好的黄芩苷为参照峰 (峰 5), 记录色谱图。结果表明, 各色谱峰的相对保留峰面积和相对保留时间 *RSD* 均 < 1.0%, 说明仪器精密度良好。

2.2.3 重复性试验 取三黄片 6 份 (S1), 精密称定, 平行制备 6 份供试品溶液, 分别进样测定, 以黄芩苷为参照峰 (峰 5), 记录色谱图。结果表明, 各色谱峰的相对保留峰面积和相对保留时间 *RSD* 均 < 1.0%, 说明该方法具有较好的重复性。

2.2.4 稳定性试验 取三黄片 1 份 (S1), 精密称定, 分别于制备后 0、4、8、12、16、24 h 注入液相色谱仪, 记录色谱图。结果表明, 各色谱峰的

相对保留峰面积和相对保留时间 *RSD* 均 < 1.0%, 说明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.5 指纹图谱建立及相似度分析 取 15 个厂家的 45 批次三黄片, 按“2.1.1”项下方法制备并进样分析, 记录 45 批次三黄片的 UPLC 图谱。每个厂家样品中随机选取 1 批次的 UPLC 图谱, 导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 年版)》, 建立对照指纹图谱 (R), 结果见图 1。

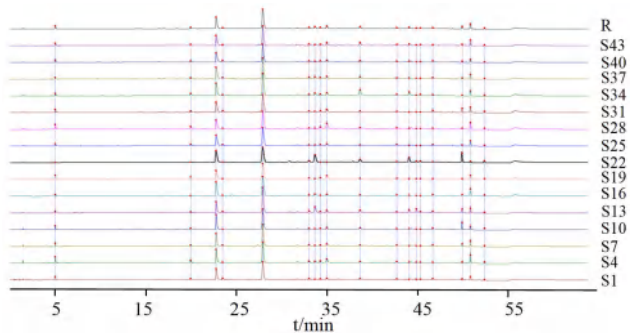


图 1 15 批次不同厂家三黄片的 UPLC 叠加指纹图谱和对照指纹图谱 (R)

Fig 1 UPLC superimposed fingerprints and control fingerprints (R) of 15 batches of Sanhuang tablets from different manufacturers

利用分析检验功能, 以对照指纹图谱 (R) 为参照图谱计算 45 批次三黄片的相似度为 0.890 ~ 0.998, 结果见表 3。相似度结果分析 45 批次三黄片制剂中除厂家 9 (S25 ~ S27) 外, 其余 42 批次的三黄片制剂指纹图谱的相似度均高于 0.95, 表明这 42 批次三黄片的一致性较好, 质量较为稳定; 而厂家 9 的 3 批次与其余 42 批次存在差异。

表 3 45 批次三黄片的相似度					
Tab 3 Similarity of 45 batches of Sanhuang tablets					
编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.984	S16	0.994	S31	0.998
S2	0.984	S17	0.996	S32	0.998
S3	0.989	S18	0.995	S33	0.997
S4	0.977	S19	0.993	S34	0.973
S5	0.975	S20	0.991	S35	0.973
S6	0.982	S21	0.993	S36	0.967
S7	0.985	S22	0.991	S37	0.996
S8	0.988	S23	0.990	S38	0.994
S9	0.989	S24	0.991	S39	0.995
S10	0.991	S25	0.900	S40	0.989
S11	0.991	S26	0.890	S41	0.986
S12	0.990	S27	0.935	S42	0.991
S13	0.994	S28	0.995	S43	0.996
S14	0.995	S29	0.992	S44	0.992
S15	0.995	S30	0.992	S45	0.996

2.2.6 指纹图谱共有峰指认及归属 通过查阅文献 [9-17] 明确三黄片中各味药所含的化学成分, 按“2.1”项下方法制备相应溶液并进样分析, 以黄

芩苷(峰5)为参照峰,通过比较各色谱峰的相对保留时间、紫外光谱图的最大吸收波长及单味药色谱图,进行各色谱峰的归属。结果确定了三黄片中18个共有峰的归属,并指出各自成分,结果见表4。供试品溶液和混合对照品图谱见图2,单味药的UPLC图谱见图3。

表 4 共有峰指认及归属

Tab 4 Identification and attribution of common peak

序号	保留时间/min	化学成分	归属
峰 1	5.180	没食子酸	大黄
峰 2	20.557	芦荟大黄素 -8-O- 葡萄糖苷	大黄
峰 3	23.496	盐酸小檗碱	盐酸小檗碱
峰 4	24.193	大黄酸 -8-O-β-D- 葡萄糖苷	大黄
峰 5 (S)	28.838	黄芩苷	黄芩浸膏
峰 6	34.029	千层纸素 A-7-O-β-D- 葡萄糖醛酸苷	黄芩浸膏
峰 7	34.715	汉黄芩苷	黄芩浸膏
峰 8	35.184	大黄酚 -1-O- 葡萄糖苷	大黄
峰 9	35.952	大黄酚 -8-O- 葡萄糖苷	大黄
峰 10	39.640	黄芩素	黄芩浸膏
峰 11	43.537	芦荟大黄素	大黄
峰 12	44.922	汉黄芩素	黄芩浸膏
峰 13	45.525	白杨素	黄芩浸膏
峰 14	45.939	千层纸素 A	黄芩浸膏
峰 15	47.230	大黄酸	大黄
峰 16	50.378	大黄素	大黄
峰 17	51.322	大黄酚	大黄
峰 18	52.869	大黄素甲醚	大黄

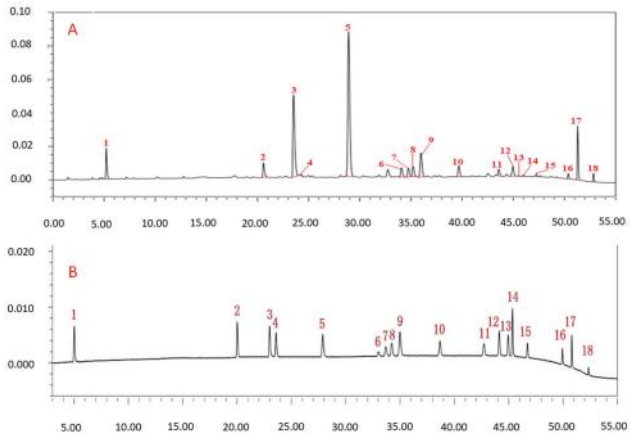


图 2 供试品溶液 (A) 和混合对照品 (B) UPLC 图谱
Fig 2 UPLC map of test solution (A) and mixed control (B)
注 (Note): 1 ~ 18 对应表 4 中峰 1 ~ 18 的化学成分 (1 ~ 18 corresponds to the chemical composition of peaks 1 ~ 18 in Table 4)。

2.3 化学模式识别分析

2.3.1 HCA 以 45 批次三黄片样品指纹图谱的 18 个共有峰峰面积为变量,导入 SPSS 25.0 软件中进行 HCA。采用组间连接的聚类方法,以平方欧氏距离为样品间距离进行聚类分析,绘制树状

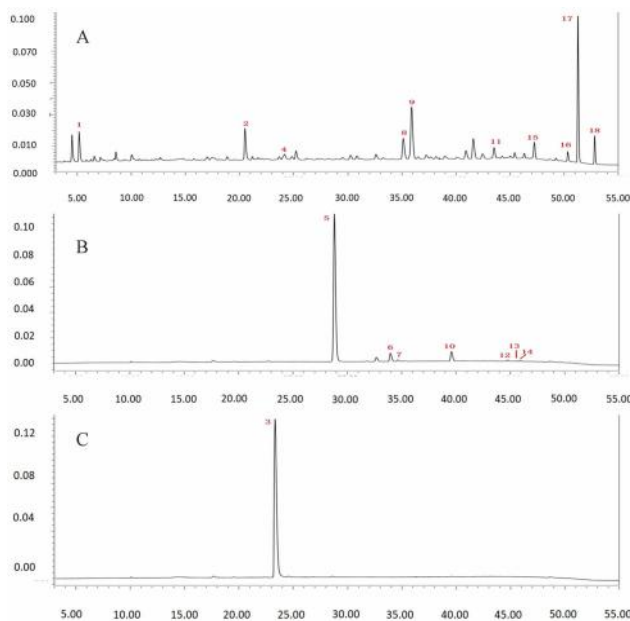


图 3 单味药的 UPLC 图谱
Fig 3 UPLC of single herb
注 (Note): A、B、C 分别为大黄药材、黄芩浸膏、盐酸小檗碱,1 ~ 18 对应表 4 中峰 1 ~ 18 的化学成分 (A, B and C are *Rhubarb*, *Scutellaria baicalensis* extract and *Berberine hydrochloride*, respectively, 1 ~ 18 corresponds to the chemical composition of peaks 1 ~ 18 in Table 4)。

图。结果如图 4 所示,当欧氏距离为 10 时 45 批三黄片被聚为 3 类:S1 ~ S6、S22 ~ S24 (厂家 1、2、8) 聚为第 1 类;S25 ~ S27 (厂家 9) 聚为第 2 类;S7 ~ S21、S28 ~ S45 聚为第 3 类,结果显示大部分厂家的三黄片聚为一类。表明不同厂家生产的三黄片既存在相似性,又存在差异性。

2.3.2 PCA 以 45 批次三黄片样品指纹图谱的 18 个共有峰峰面积为变量,导入 SPSS 25.0 软件中采用降维的方式进行 PCA。以主成分特征值 > 1 为提取标准,结果 Bartlett 球形度检定显著性 $P < 0.0001$,说明拒绝变量相互独立的假设,即数据进行 PCA 成立,共提取 5 个主成分,累计方差贡献率为 86.098%,表明前 5 个主成分可综合解释三黄片原有变量 86.098% 的信息,表明提取的这 5 个主成分可反映三黄片品质的大部分信息,可作为不同厂家三黄片质量评价的综合指标,具体结果见表 5、表 6。

同时以 45 批次三黄片的 18 个共有峰的峰面积为变量,应用统计软件 SIMCA 14.1 建立 PCA 模型,经分析生成得分矩阵图见图 5。由 PCA 得分矩阵图可知,厂家 1、2、8、9 区别于其余厂家,其他厂家大致聚在一起,与 HCA 结果大致一致。

结合 PCA 分析得到的主成分数据对 45 批次样品进行综合评价,由于 5 个主成分的特征值及方差贡献

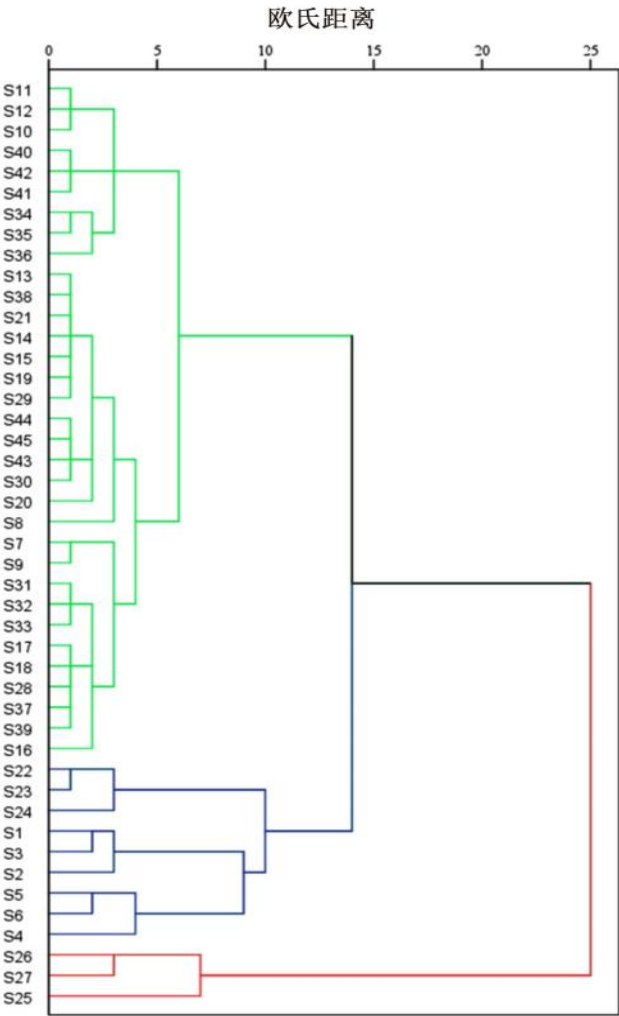


图 4 45 批三黄片的聚类分析树状图
Fig 4 Dendrogram of cluster analysis of 45 batches of Sanhuang tablets

表 5 三黄片中 5 个主成分的特征值和方差贡献率

Tab 5 Eigenvalues and variance contribution rates of the 5 principal components in Sanhuang tablets

主成分	特征值	方差贡献率 /%	累计方差贡献率 /%
1	6.931	38.505	38.505
2	3.987	22.152	60.657
3	1.939	10.775	71.432
4	1.624	9.019	80.451
5	1.017	5.647	86.098

率均不同，因此在进行综合评价时，利用表 6 的主成分载荷矩阵中各因子值除以开完根号后的 5 个主成分特征值^[18-19]，得到 5 个主成分各指标对应的特征向量，以特征向量为主成分分数，构建 5 个主成分的函数表达式，再以 5 个主成分所对应的方差贡献率为权重，构建三黄片的综合评价模型： $Y = 0.385Y_1 + 0.222Y_2 + 0.108Y_3 + 0.090Y_4 + 0.056Y_5$ ，以该模型计算 45 批次三黄片的主成分得分及综合得分并进行排名，结果见表 7。从结果中可以看出排名前 10 的样品来自厂家 1、2、8、9，单从 18 个共有峰面积分析，这 4 个厂家的三黄片质量较好。

2.3.3 OPLS-DA 为进一步分析影响不同厂家三黄片质量的成分，以 45 批三黄片的 18 个共有峰峰面积为变量，导入 SIMCA 14.1 软件进行 OPLS-DA 分析，建立 OPLS-DA 模型，该模型解释率参数 $R^2X = 0.997$ ，模型区分参数 $R^2Y = 0.646$ ，预测能力参数 $Q^2 = 0.601$ 均大于 0.5，表明模型稳定可行，可用于 15 个厂家三黄片的差异标志物的分析，得分图见图 6。为避免模型过度拟合造成假

表 6 主成分载荷矩阵

Tab 6 Principal component loading matrix

成分名称	载荷				
	主成分 1	主成分 2	主成分 3	主成分 4	主成分 5
没食子酸	-0.817	0.399	-0.251	-0.113	0.081
芦荟大黄素 -8-O- 葡萄糖苷	-0.672	0.579	-0.297	0.210	0.053
盐酸小檗碱	0.378	0.489	0.354	-0.429	-0.142
大黄酸 -8-O-β-D- 葡萄糖苷	-0.239	-0.133	0.471	0.643	0.340
黄芩苷	0.080	0.678	0.593	-0.108	-0.059
千层纸素 A-7-O-β-D- 葡萄糖醛酸苷	0.682	0.391	-0.027	0.103	0.391
汉黄芩苷	0.882	0.330	-0.153	0.074	0.164
大黄酚 -1-O- 葡萄糖苷	-0.761	0.517	-0.249	0.146	0.179
大黄酚 -8-O- 葡萄糖苷	-0.732	0.572	-0.204	0.050	0.197
黄芩素	0.486	0.555	-0.016	0.380	-0.491
芦荟大黄素	-0.052	0.853	0.245	-0.015	0.019
汉黄芩素	0.858	0.350	-0.195	0.229	-0.107
白杨素	0.607	0.264	0.190	0.188	0.437
千层纸素 A	0.771	0.414	-0.188	0.340	-0.246
大黄酸	0.362	-0.295	0.634	-0.097	0.148
大黄素	0.783	-0.120	-0.399	-0.267	0.197
大黄酚	-0.468	0.584	0.339	-0.424	-0.061
大黄素甲醚	0.588	0.285	-0.341	-0.555	0.220

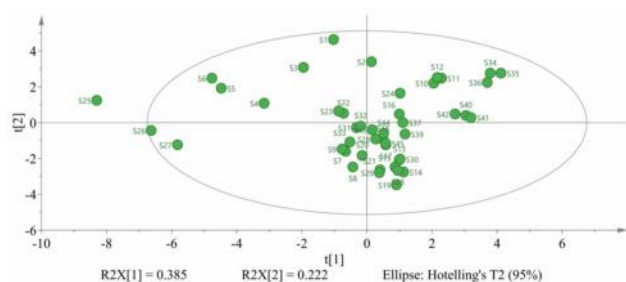


图5 45批三黄片样品 PCA 得分图

Fig 5 PCA score chart of 45 batches of Sanhuang tablets

阳性结果的出现, 设置分类 Y 矩阵变量随机排列 200 次做置换检验, 检验图见图 7。结果最右侧的 R^2 值和 Q^2 值均高于左侧的 R^2 值和 Q^2 值, R^2 回归线在 Y 轴截距为 0.213、 Q^2 回归线在 Y 轴截距为 -0.693, 证明模型未出现过拟合现象, 可运用于判别分析 45 批样品的组间差异^[20]。以 VIP 值 > 1 为标准筛选影响 15 个厂家三黄片质量差异的主要成分, 共筛选出白杨素、黄芩苷、大黄酸-8- O - β -D-葡萄糖苷、没食子酸、黄芩素、千层纸素 A-7- O - β -D-葡萄糖醛酸苷、芦荟大黄素、盐酸小檗碱、大黄酚-8- O -葡萄糖苷 9 个成分, 其 VIP 值分别为 1.17759、1.02909、1.13476、1.07429、1.06526、1.06252、1.05938、1.01968、1.01341, 表明以上 9 种成分可能是引起三黄片质量差异较大的成分, VIP 值图见图 8。

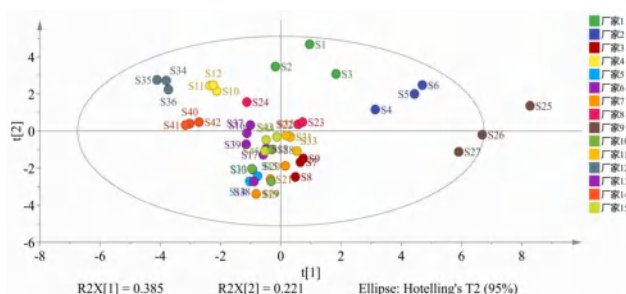


图6 45批三黄片样品 OPLS-DA 得分图

Fig 6 OPLS-DA score chart of 45 batches of Sanhuang tablets

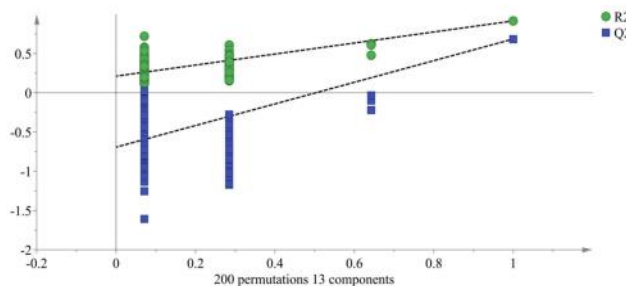


图7 45批三黄片样品 200 次检验置换图

Fig 7 Replacement chart of 45 batches of Sanhuang tablets for 200 tests

3 讨论

3.1 色谱条件优化

采用光电二极管阵列 (PDA) 检测器对其

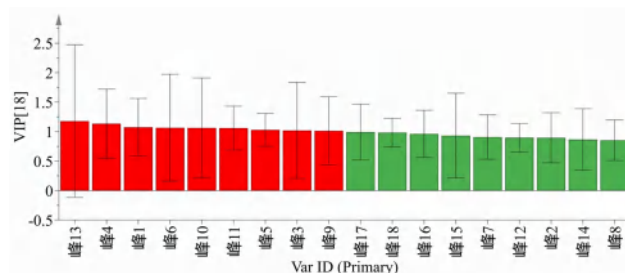


图8 45批三黄片样品中 18 个共有峰的 VIP 图

Fig 8 VIP of 18 peaks from 45 batches of Sanhuang tablets

200 ~ 400 nm 波长进行扫描, 结果表明, 254 nm 波长下检测到最多的共有峰, 且分离度较好, 可满足指纹图谱分析要求, 故采用 254 nm 作为检测波长。本研究分别考察了 Acquity UPLC Hss T3 (150 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m) 色谱柱、Waters Acquity UPLC BEH C18 (150 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m) 色谱柱、Agilent InfinityLab Poroshell 120EC-C18 (150 mm $\times$ 2.1 mm, 2.7 μ m) 色谱柱, 考察方法的重现性。结果表明, 使用不同品牌的色谱柱, 供试品各色谱峰均可获得满意的分离, 峰形均较好, 该方法可满足耐用性要求, 最终选择 Waters Acquity UPLC BEH C18 (150 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m) 色谱柱作为指纹图谱分析柱。

分别对超声、加热回流处理两种供试品提取方法进行考察, 结果各共有峰峰面积差异不大, 从便利性考虑, 最终选择超声提取; 取适量样品, 分别精密加入水、甲醇、50% 甲醇、乙醇、50% 乙醇、70% 甲醇、70% 乙醇进行提取, 结果甲醇和 70% 甲醇提取效率最高, 且两者结果接近, 从节约溶剂角度考虑, 最终选择 70% 甲醇作为提取溶剂; 超声时间的考察, 分别对样品超声处理 20、30、40 min, 结果超声 30 min 基本提取完全。本着节约、环保的理念, 最终确定供试品制备方法为 70% 甲醇超声提取 30 min。

3.2 相似度与化学模式识别结果分析

本研究将建立的指纹图谱分析方法结果与 HCA、PCA 和 OPLS-DA 三种化学模式分析相结合, 结果显示厂家 1、2、8、9 的三黄片质量明显优于其他厂家, 提示这 4 个厂家在原料选择、制剂工艺、生产设备、质量内控等方面可能更有优势; 但上述 4 个厂家各自不同批次三黄片间的质量也存在差异, 提示其可能存在原辅料质量、生产工艺参数等把控不严的情况, 后续可深入调研后进行分析, 以提升三黄片质量。

3.3 小结

本研究建立的 UPLC 指纹图谱方法操作简便, 联合 PCA、HCA、OPLS-DA 等化学模式识别分析

表 7 45 批三黄片的主成分得分、综合得分及排序

Tab 7 Principal component scores, composite scores and ranking of 45 batches of Sanhuang tablets

样品	综合得分	排序	样品	综合得分	排序	样品	综合得分	排序
S1	340.9852	5	S16	218.2884	18	S31	248.1119	12
S2	290.1005	11	S17	207.4935	25	S32	243.3249	13
S3	329.6112	7	S18	209.9409	24	S33	239.0160	15
S4	339.0384	6	S19	172.5424	0	S34	164.7921	42
S5	379.7907	3	S20	212.0215	23	S35	156.6370	43
S6	394.0389	2	S21	197.1519	29	S36	149.1802	45
S7	222.9501	17	S22	290.8341	10	S37	216.0346	20
S8	188.1066	33	S23	291.0176	9	S38	186.4463	34
S9	225.0447	16	S24	241.8787	14	S39	212.9310	21
S10	201.4753	28	S25	433.4977	1	S40	165.6845	41
S11	201.9916	27	S26	361.5804	4	S41	154.1049	44
S12	202.0042	26	S27	318.5506	8	S42	176.8828	36
S13	194.4256	32	S28	216.1840	19	S43	212.8842	22
S14	174.2527	37	S29	169.4433	40	S44	195.4602	30
S15	185.2897	35	S30	172.5282	39	S45	194.4662	31

可有效地对三黄片质量进行一致性评价；三黄片生产企业应严格把控产品质量，对原料药材或饮片的质量加强控制，严格按照生产工艺参数要求与标准进行生产，优化三黄片工艺参数，以减少批间差异。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 517.
- [2] 李晓花, 郭允, 李佳, 等. RP-HPLC 法同时测定三黄片中 7 种指标成分的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2016, 33(8): 637-642.
- [3] 关欢欢, 白雪, 袁冬平, 等. 中药制造全过程的品质传递控制与一致性评价研究进展[J]. 中草药, 2024, 55(5): 1728-1737.
- [4] 肖春霞, 周世玉, 文永盛. HPLC 法同时测定三黄片中 9 种成分[J]. 中成药, 2018, 40(3): 601-604.
- [5] 岳磊, 张丹, 黄丽杰, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定三黄片中 5 种成分的含量[J]. 药品评价, 2021, 18(13): 791-794.
- [6] 郭伟魁, 严倩茹, 宋伟. 化学计量学在三黄片质量综合评价中的应用[J]. 中国医院用药评价与分析, 2022, 22(5): 560-562, 566.
- [7] 崔新刚, 王颖莹, 王新胜. 基于主成分分析和聚类分析的不同厂家三黄片质量分析[J]. 中国民族民间医药, 2020, 29(16): 36-40, 43.
- [8] 何选林, 王群英. RP-HPLC 法同时测定三黄片中 7 种成分[J]. 中成药, 2017, 39(7): 1522-1524.
- [9] 肖先, 李春燕, 薛金涛. 大黄的主要化学成分及药理作用研究进展[J]. 新乡医学院学报, 2024, 41(5): 486-490, 496.
- [10] 黄烈岩, 聂黎行, 康帅, 等. 黄芩化学成分、药理作用和质量控制的研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2024, 26(4): 88-96.
- [11] 李恩泽, 刘月芬, 刘玉君, 等. 不同产地黄芩中 6 种化学成分含量测定[J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(9): 946-948.
- [12] 彭春, 唐玲, 王燕. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术的三黄片化学成分解析[J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40(7): 757-764.
- [13] 王玉, 杨雪, 夏鹏飞, 等. 大黄化学成分、药理作用研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中草药, 2019, 50(19): 4821-4837.
- [14] 杜闻杉, 刘喜纲, 李忠思, 等. 市售三黄片中游离和结合蒽醌含量的比较及聚类分析[J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(22): 1950-1956.
- [15] 刘娟, 魏胜利, 刘春生, 等. HPLC 测定 2 种大黄中 4 类功效组分含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24): 157-161.
- [16] 郑勇凤, 王佳婧, 傅超美, 等. 黄芩的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中成药, 2016, 38(1): 141-147.
- [17] 罗兰, 魏劭恒, 张英, 等. UPLC 法比较黄芩不同炮制品中 5 种黄酮类成分[J]. 中成药, 2021, 43(4): 966-970.
- [18] 孙博位, 孙怡宁, 原鹏强, 等. 基于主成分分析综合评价不同采收期五味子果实品质[J]. 北方园艺, 2024, 2024(11): 97-105.
- [19] 廖予菲, 王萍, 张瑞瑞, 等. 基于主成分分析和响应面法优化夏枯草活性成分超声提取工艺[J]. 化学与生物工程, 2023, 40(6): 44-50.
- [20] 徐微, 高必兴, 齐景梁, 等. 基于 UPLC 指纹图谱结合化学模式识别的不同产地与不同部位川牛膝及其混淆品差异性分析[J]. 中草药, 2024, 55(16): 5639-5648.

(收稿日期: 2025-03-05; 修回日期: 2025-05-12)

盐小茴香 HPLC 指纹图谱的建立及小茴香炮制前后成分差异分析

王宸¹, 刘梦云^{1, 2, 3*}, 朱静平¹, 李凯^{1, 2, 3}, 李红伟^{1, 2, 3}, 石延榜¹, 王彬¹ (1.河南中医药大学, 郑州 450046; 2.豫药全产业链研发河南省协同创新中心, 郑州 450046; 3.河南省中药特色炮制技术工程研究中心, 郑州 450046)

摘要: **目的** 建立盐小茴香的高效液相色谱 (HPLC) 指纹图谱及指标成分定量分析方法, 比较小茴香炮制前后的质量差异。**方法** 采用 HPLC 法建立盐小茴香指纹图谱, 结合化学模式识别方法对小茴香盐制前后指纹图谱进行评价与分析, 同时测定 5 种指标成分的含量。**结果** 建立的盐小茴香 HPLC 指纹图谱中, 共匹配了 20 个共有峰, 指认了其中 5 个色谱峰, 分别为峰 4 (紫丁香苷)、峰 10 (芦丁)、峰 11 (槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷)、峰 17 (茴香醛)、峰 19 (反式茴香脑)。不同批次小茴香生品与盐制品相似度均较高, 聚类分析 (HCA) 和主成分分析 (PCA) 可将小茴香生品与盐制品聚为两大类, 正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 结果显示峰 11 (槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷)、峰 6、峰 19 (反式茴香脑)、峰 10 (芦丁) 和峰 7 可作为小茴香盐制前后的差异性标志成分。含量测定结果显示, 盐制后小茴香中紫丁香苷、槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷、茴香醛、反式茴香脑和芦丁的含量均有所降低, 其中, 反式茴香脑的含量降低较明显。**结论** 建立的 HPLC 指纹图谱及成分定量方法高效稳定, 化学模式识别方法结果可靠, 可为小茴香及其炮制品的质量控制和整体性评价提供参考。

关键词: 小茴香; 盐制; 指纹图谱; 含量测定; 化学模式识别

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)12-3668-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.029

HPLC fingerprints of salt-processed *Foeniculi Fructus* and its composition differences before and after the processing

WANG Chen¹, LIU Mengyun^{1, 2, 3*}, ZHU Jingping¹, LI Kai^{1, 2, 3}, LI Hongwei^{1, 2, 3}, SHI Yanbang¹, WANG Bin¹ (1. *Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou* 450046; 2. *Collaborative Innovation Center for Research and Development of the Whole Industry Chain of Yu-Medicine, Zhengzhou* 450046; 3. *Henan Research Center for Special Processing Technology of Chinese Medicine, Zhengzhou* 450046)

Abstract: **Objective** To establish the HPLC fingerprints of salt-processed *Foeniculi Fructus*, and to determine the changes in chemical compositions of *Foeniculi Fructus* before and after the processing by multivariate statistical analysis and content determination. **Methods** The fingerprints of salt processed *Foeniculi Fructus* were established and determined by HPLC. The fingerprints were evaluated by chemical pattern recognition methods and the content of 5 main components was determined. **Results** In the established fingerprints of *Foeniculi Fructus*, 20 common peaks were matched. Among them, five peaks were recognized: peak 4 (eleutheroside B), peak 10 (rutin), peak 11 (quercetin-3-*O*-glucuronide), peak 17 (*p*-anisaldehyde) and peak 19 (*trans*-anethol). Different batches of raw and salted-processed products were highly similar. Hierarchical clustering analysis (HCA), principal component analysis (PCA), and orthogonal partial leastsquares-discriminant analysis (OPLS-DA) could clearly distinguish the raw and salt-processed products. Peak 11 (quercetin-3-*O*-glucuronide), peak 6, peak 19 (*trans*-

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.82404865); 河南省重点研发与推广专项 (科技攻关) 项目 (No.242102310542)。

作者简介: 王宸, 男, 在读硕士研究生, 主要从事中药炮制工艺及质量标准研究, email: wangchen010831@163.com *通信作者: 刘梦云, 女, 博士, 硕士研究生导师, 主要从事中药炮制机制及质量标准研究, email: liumengyun218@163.com

anethole), peak 10 (rutin), and peak 7 were the five differential compositions before and after the salt-processing of *Foeniculi Fructus*. The contents of eleutheroside B, rutin, quercetin-3-*O*-glucuronide, *p*-anisaldehyde and *trans*-anethole were decreased. The content of *trans*-anethol was decreased significantly. **Conclusion** The established HPLC fingerprints and content determination results could provide a reference for the quality control and holistic evaluation of salt-processed *Foeniculi Fructus*.

Key words: *Foeniculi Fructus*; salt-processed; HPLC fingerprint; content determination; chemical pattern recognition

小茴香来源于伞形科植物茴香 *Foeniculum vulgare* Mill. 的干燥成熟果实, 是大宗药食同源中药之一。《中国药典》记载小茴香有散寒止痛、理气和胃的传统功效, 现代药理研究发现, 其可以缓解身体寒冷、促进胃肠蠕动、排除腹部胀气、减少疼痛, 目前临床上常用于治疗寒疝腹痛、少腹冷痛等病症^[1]。小茴香临床应用广泛, 且多以炮制品入药, 小茴香常用的炮制品有盐小茴香、醋小茴香、酒小茴香等^[2], 但从古至今应用较多的为宋代《圣济总录》记载的盐小茴香。传统炮制理论认为, 肾为水脏, 咸为水化, 故小茴香盐制入肾, 专行下焦, 可治疗肾虚腰痛、疝气疼痛等症。现代研究发现, 盐中主要含氯化钠, 钠离子和氯离子可通过肾脏进行代谢, 并维持细胞外液, 大部分过滤后的氯化钠能被近端肾小管重吸收, 是电解质运输的一种重要途径^[3]; 在临床应用中, 盐制药物中大量的有效成分会伴随钠离子的重吸收而被肾脏吸收^[4]。因此, 关于小茴香盐制品的研究具有一定的临床应用意义。

目前, 小茴香及其盐制品已收载于《中国药典》2020 年版一部中, 且以挥发油和反式茴香脑作为定量的质控指标。现代研究表明, 小茴香中含有挥发油类 (茴香醛、反式茴香脑等)、黄酮类 (槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷、芦丁等)、氨基酸等成分, 其中挥发油类成分占 3%~6%, 具有抗炎、镇痛、抗氧化、抑菌等药理活性, 是其主要的活性成分^[2, 5]。本课题组前期已对小茴香盐制工艺^[6]及不同产地小茴香高效液相色谱 (HPLC) 指纹图谱^[7]进行了研究, 但小茴香盐制前后, 其化学成分及饮片质量有何变化, 尚待进一步研究。为明晰小茴香盐制前后的化学成分变化情况, 本试验建立小茴香盐制品的 HPLC 指纹图谱, 运用相似度评价及化学模式识别方法对其进行综合评价, 同时对小茴香生品与盐制品中 5 种成分进行含量测定, 以期盐小茴香质量标准的制订及炮制前后药理作用的研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1260 型 HPLC 仪 (美国安捷伦科技有限公司); 十万分之一电子分析天平 (Sartorius BT25S 型, 赛多利斯科学仪器有限公司); 电子分析天平 [FA2104B 型, 上海越平科学仪器 (苏州) 制造有限公司]; TGL-16M 型高速冷冻离心机 (常州金坛良友仪器有限公司); 优普超纯水机 (四川优普超纯科技有限公司); ZNHW 型智能控温电热套 (上海树立仪器仪表有限公司); KQ-500DV 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 114B 型粉碎机 (瑞安市永历制药机械有限公司)。

1.2 试药

食盐 (纯度大于 99.1%, 河南省盐业集团有限公司); 芦丁 (批号: MUST-12040302)、紫丁香苷 (批号: PRF21051005)、反式茴香脑 (批号: Y24N6S6391)、槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷 (批号: X24O6C4947)、茴香醛 (批号: H04J10Z78823) (纯度均大于 98%, 上海源叶生物科技有限公司); 磷酸、甲醇、乙腈 (色谱纯, 赛默飞世尔科技有限公司), 其他试剂均为分析纯, 水为去离子水。

1.3 样品

本研究收集了甘肃、陕西、内蒙古、新疆等 4 个产区的生小茴香药材, 由河南中医药大学李凯教授鉴定为伞形科植物茴香 *Foeniculum vulgare* Mill. 的干燥成熟果实。样品产地来源及批次见表 1。

表 1 小茴香饮片样品信息

Tab 1 Information of *Foeniculi Fructus* samples

编号	产地	批号	编号	产地	批号
S1	甘肃民乐	220901	S6	新疆	230605
S2	甘肃民乐	220923	S7	新疆	2301046
S3	甘肃景泰	230201	S8	内蒙古	230801
S4	甘肃金塔	230901	S9	甘肃玉门	210701
S5	陕西汉中	230401	S10	新疆	230705

2 方法和结果

2.1 盐小茴香的制备

按照《中国药典》和课题组前期研究^[6]的炮制工艺进行制备: 每 50 g 净制后的生小茴香, 用 1 g 食盐, 盐水体积分数 21%, 拌匀、闷润 3 h 后, 置于热锅内, 184℃ 翻炒 5 min, 倒入瓷盘内, 摊开、

放凉, 即得盐小茴香 (Y1 ~ Y10)。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取紫丁香苷、芦丁、槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷、茴香醛、反式茴香脑对照品适量, 精密称定重量, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶液至刻度, 超声溶解, 制成含紫丁香苷、槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷、茴香醛、反式茴香脑、芦丁分别为 290.7、83.3、815.65、771.3、411.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的单一储备溶液, 备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 分别取约 2.0 g 的生小茴香和盐小茴香样品粉末 (过 50 目筛), 精密称定, 分别置于 50 mL 的具塞锥形瓶中, 精密加入 25 mL 50% 甲醇溶液, 摇匀, 静置, 称重, 超声提取 (500 W, 40 kHz) 45 min, 取出、冷却, 再次称重, 缓缓加入 50% 甲醇补足失重, 摇匀, 静置 10 min, 吸取上清液过 0.22 μm 的滤膜, 续滤液即为供试品溶液。

2.3 HPLC 色谱条件

色谱柱为 ZORBAX EclipseXDB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 柱; 流动相为乙腈 (A)-0.1% 磷酸水 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 5% ~ 10%A; 10 ~ 17 min, 10% ~ 17%A; 17 ~ 21 min, 17% ~ 20%A; 21 ~ 51 min, 20% ~ 45%A; 51 ~ 65 min, 45% ~ 85%A; 65 ~ 75 min, 85% ~ 5%A); 流速 0.8 mL/min; 检测波长 220 nm; 进样量 10 μL ; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ [7]。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取盐小茴香 1 号 (Y1) 样品粉末 2.0 g, 精密称重, 按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 连续进样 6 次, 以峰 4 为参照。经计算, 各共有指纹峰的相对峰面积与相对保留时间的 RSD 值均小于 2.2%, 表明仪器具有较好的精密度。

2.4.2 稳定性试验 取精密度试验样品 (Y1), 按照“2.2.2”项下方法制备, 在 0、2、4、6、8、12、24 h 分别进样分析。以峰 4 为参照。经计算, 各共有指纹峰的相对峰面积与相对保留时间的 RSD 值均小于 0.20%, 表明样品溶液在 24 h 内具有较好的稳定性。

2.4.3 重复性试验 取 6 份同一批样品 (Y1), 按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 进样测定。以峰 4 为参照, 经计算, 各共有指纹峰的相对峰面积与相对保留时间的 RSD 值均小于 2.0%, 表明方法具有较好的重复性。

2.5 盐小茴香 HPLC 指纹图谱的研究

2.5.1 HPLC 指纹图谱的建立 各取 10 批的小茴香和盐小茴香样品, 按照“2.2.2”项下方法供试品溶液制备方法和色谱条件, 分别进行样品溶液的

制备和 HPLC 的测定。采用“2008 A 版中药色谱指纹图谱相似度评价软件系统”处理分析采集的色谱图数据, 分别以生小茴香样品 (S1) 和盐小茴香样品 (Y1) 色谱图为参照图谱, 设置 0.1 min 为时间窗宽度, 运用多点校正和中位数法, 对各色谱峰进行匹配, 分别生成 10 批小茴香 (S1 ~ S10) 和 10 批盐小茴香 (Y1 ~ Y10) 指纹图谱叠加图和各自对照特征图谱。共得到 20 个共有峰, 其中 4 号峰 (紫丁香苷) 峰面积相对较大, 具有较好的分离效果和稳定性, 且保留时间较适中, 故设为参照峰 (S)。经对照品对比, 指认出其中 5 种成分, 依次为紫丁香苷 (峰 4)、芦丁 (峰 10)、槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷 (峰 11)、茴香醛 (峰 17) 和反式茴香脑 (峰 19)。共有模式指纹图如图 1 所示, 对照品色谱图如图 2 所示。

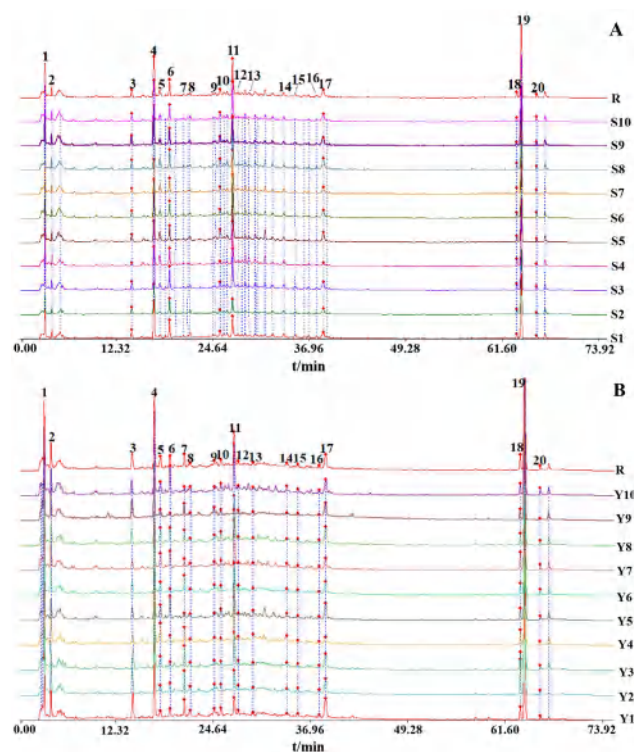


图 1 生小茴香 (S1 ~ S10)(A) 及盐小茴香 (Y1 ~ Y10)(B) 指纹图谱

Fig 1 Fingerprint of raw (S1 ~ S10)(A) and salt processed (Y1 ~ Y10)(B) Foeniculi Fructus

2.5.2 相似度评价及聚类分析 (HCA) 利用“2008 A 版中药色谱指纹图谱相似度评价软件系统”, 分别计算 10 批生小茴香和 10 批盐小茴香的相似度。结果显示, 10 批生小茴香 (S1 ~ S10) 的相似度分别为 0.973、0.958、0.994、0.981、0.983、0.991、0.990、0.991、0.965、0.992; 10 批盐小茴香 (Y1 ~ Y10) 的相似度分别为 0.984、0.976、0.993、0.984、0.977、0.995、0.991、0.995、0.958、0.991。10 批生小茴香相似度较高, 表明不同产地小茴香药

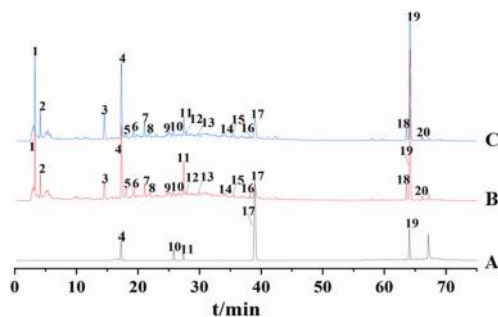


图 2 混合对照品 (A)、盐小茴香饮片 (B) 和生小茴香饮片 (C) HPLC 共有模式色谱图

Fig 2 HPLC chromatogram of mixed control samples (A), salt processed (B) and raw (C) of *Foeniculi Fructus*

4. 紫丁香苷 (eleutheroside B); 10. 芦丁 (rutin); 11. 槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷 (quercetin-3-*O*-glucuronide); 17. 茴香醛 (*p*-anisaldehyde); 19. 反式茴香脑 (*trans*-anethol)

材之间的质量较稳定; 10 批盐小茴香相似度较高, 表明小茴香盐制工艺较为稳定。将 10 批生小茴香和 10 批盐小茴香的 20 个共有峰峰面积导入 SPSS 22.0 软件中 Z-Score 标准化处理后进行聚类分析, 以平方欧氏距离为样品间距离, 采用 Ward 法开展不同批次之间小茴香的聚类分析。结果见图 3, 当平方欧氏距离为 15 时, 10 批样品可聚为两大类, 其中小茴香生品聚为 I 类、盐制品聚为 II 类, 表明小茴香盐制后饮片化学成分发生了变化。

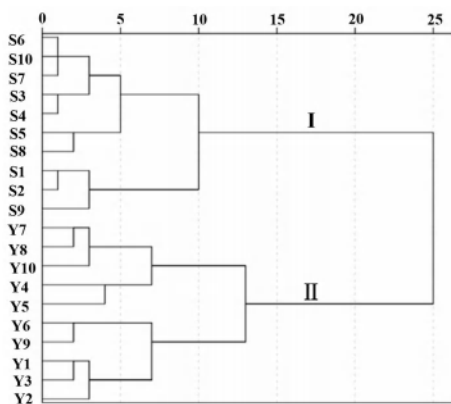


图 3 小茴香盐制前后的 HCA 分析

Fig 3 HCA analysis of *Foeniculi Fructus* before and after the processing

2.5.3 主成分分析 (PCA) 将 10 批生小茴香和 10 批盐小茴香的 20 个共有峰峰面积导入 SPSS 22.0 软件中, 采用 Z-Score 标准化处理共有峰峰面积数据。分析结果如表 2 所示, 根据特征值 > 1 的提取标准, 共提取获得 5 个主成分, 其累计贡献率为 83.059%, 表明这 5 个主成分能较好地反映 20 个共有峰的主要信息。因子载荷矩阵可以反映出各主成分与共有峰的相关系数, 如表 3 所示, 第一主成分主要反映了峰 2、6、7、10 (芦丁)、11 (槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷)、14、16、20 的信息, 第二主成分主要反映了峰 3、9、15、

17 (茴香醛) 的信息, 第三主成分主要反映了峰 1、4 (紫丁香苷)、5、13 的信息, 第四主成分主要反映了峰 12, 第五主成分主要反映了峰 19 (反式茴香脑), 这些成分是影响小茴香饮片质量的重要因素。将 10 批生小茴香和 10 批盐小茴香 20 个共有色谱峰面积导入 SIMCA 14.1 软件中, 选择无监督模式的 PCA。如图 4 所示, 所有数据均在置信区间内, 生小茴香主要分布在第一、四象限, 盐小茴香主要分布在第二、三象限, 两者明显分布于两个区域, 说明生、盐小茴香化学成分之间有一定的差异, 进一步验证了 HCA 结果。

表 2 特征值及方差贡献率

Tab 2 Eigenvalue and variance contribution rate			
主成分因子	特征值	方差贡献率 /%	累计方差贡献率 /%
1	6.468	32.340	32.340
2	4.124	20.620	52.960
3	2.901	14.504	67.464
4	1.652	8.262	75.726
5	1.467	7.333	83.059

表 3 因子载荷矩阵

Tab 3 Factor load matrix					
共有峰编号	载荷				
	主成分 1	主成分 2	主成分 3	主成分 4	主成分 5
1	-0.213	0.330	0.678	-0.273	-0.300
2	-0.658	0.352	0.564	0.071	0.007
3	-0.462	0.864	-0.051	-0.041	0.091
4 (紫丁香苷)	0.304	0.165	0.665	0.513	0.254
5	0.353	-0.435	0.692	0.178	-0.194
6	0.938	-0.028	-0.078	0.064	0.004
7	-0.816	0.294	0.346	0.034	0.216
8	0.578	0.425	0.038	-0.124	0.513
9	0.110	0.716	0.056	-0.461	-0.138
10 (芦丁)	0.786	0.408	0.106	-0.007	-0.233
11 (槲皮素-3- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷)	0.827	-0.174	0.464	0.071	-0.180
12	0.150	0.299	0.269	-0.777	0.038
13	0.181	-0.558	0.670	-0.215	0.221
14	0.765	-0.073	0.248	-0.255	0.226
15	0.495	0.679	-0.232	0.222	0.102
16	0.729	0.514	-0.079	0.333	0.167
17 (茴香醛)	0.078	0.826	0.070	0.160	-0.194
18	-0.470	0.223	0.368	0.214	0.469
19 (反式茴香脑)	-0.457	0.242	0.243	0.302	-0.592
20	0.715	0.171	0.008	0.016	-0.320

2.5.4 正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA)

以 10 批生小茴香和 10 批盐小茴香的共有峰峰面积为变量, 采用 SIMCA14.1 软件在 PCA 基础上进一步采取有监督模式的 OPLS-DA 识别。结果如图 5 所示。OPLS-DA 模型中累计解释能力参数 R^2X_{cum} 为 0.807, R^2Y_{cum} 为 0.880, 预测能力参数 Q^2_{cum} 为 0.518 > 0.5, 表明所建模型稳定、可靠,

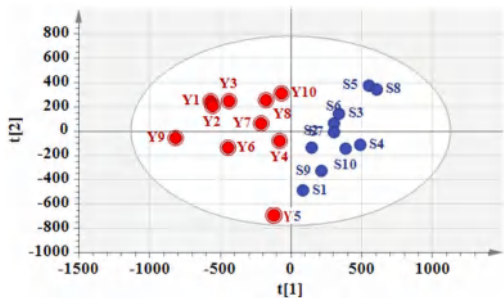


图 4 小茴香盐制前后的 PCA 得分图
Fig 4 PCA score of Foeniculi Fructus before and after processing

预测能力强, 可用于区分小茴香生品与盐制品。由图 5A 计算可知, 经过 200 次置换检验后发现, R^2 的截距值为 0.31 (< 0.4)、 Q^2 的截距值为 -0.62 (< 0.05), 所有样品的 R^2 和 Q^2 左侧值均低于最右侧, 表明模型不存在过拟合现象。通过图 5B 得分图可以看出, 小茴香生品和盐制品能够明显地区分开来, 其结果与 HCA 结果基本一致。根据变量重要性投影值 (VIP) > 1 的筛选标准, 炮制前后差异性成分中共筛选得到 5 个差异性标志物, 见图 5C。其影响显著性排序为: 峰 11 (槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷) $>$ 峰 6 $>$ 峰 19 (反式茴香脑) $>$ 峰 10 (芦丁) $>$ 峰 7, 表明这 5 种成分对小茴香生品和盐制品的分类具有显著影响, 是引起小茴香盐制前后质量差异的潜在标志成分。

2.6 小茴香盐制前后 5 种成分的含量测定

2.6.1 色谱条件及溶液的制备 同“2.3”项和“2.2.2”项。

2.6.2 线性关系 精密吸取“2.2.1”项下各单一对照品储备溶液, 采用倍比稀释法缓缓加入甲醇溶液进行系列稀释, 进样测定。以进样质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线。结

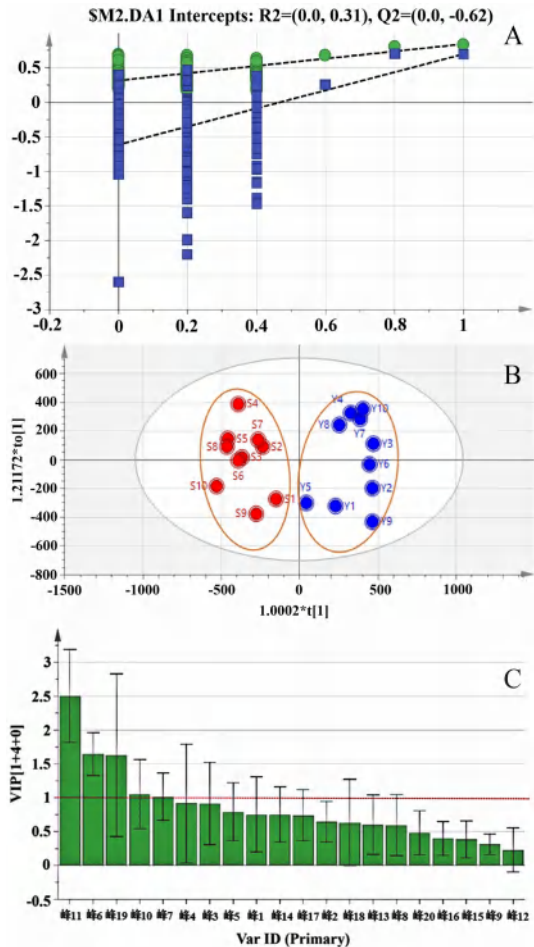


图 5 小茴香盐制前后 OPLS-DA 的置换图 (A)、得分图 (B) 和 VIP 值图 (C)

Fig 5 Permutation (A), score (B), and VIP value charts (C) of OPLS-DA for Foeniculi Fructus before and after processing

果如表 4 所示, 紫丁香苷、芦丁、槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷、茴香醛和反式茴香脑 5 种成分在各自质量浓度范围内与其峰面积线性关系良好。

表 4 5 种成分的线性回归方程、相关系数及线性范围
Tab 4 Linear relationship for 5 components of Foeniculi Fructus

化学成分	回归方程	r	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
紫丁香苷	$Y = 6.27 \times 10^4 X + 19.61$	1.000	2.27 ~ 290.70
芦丁	$Y = 2.12 \times 10^4 X + 34.48$	0.9998	3.21 ~ 411.30
槲皮素-3- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷	$Y = 7.75 \times 10^4 X + 21.63$	0.9998	0.65 ~ 83.30
茴香醛	$Y = 6.36 \times 10^4 X + 8.62$	0.9999	2.04 ~ 407.83
反式茴香脑	$Y = 2.27 \times 10^4 X + 328.71$	0.9993	6.03 ~ 771.30

2.6.3 精密度、重复性、稳定性考察 取盐小茴香供试品溶液, 连续进样 6 次, 测得紫丁香苷、芦丁、槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷、茴香醛和反式茴香脑峰面积 RSD 值分别为 2.2%、0.27%、0.57%、0.09%、0.62%, 表明仪器具有良好的精密度; 取盐小茴香样品平行制备 6 份样品溶液, 进样测定, 结果得出, 紫丁香苷、芦丁、槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷、茴香醛和反式茴香脑质量分数的平均值为 0.663、

0.385、0.466、0.266、2.692 mg/g, RSD 值分别为 1.1%、2.0%、2.1%、1.4%、2.1%, 表明试验方法具有良好的重复性; 取盐小茴香样品, 分别于样品溶液制备后的 2、4、8、12、16、24 h, 进样测定, 结果紫丁香苷、芦丁、槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷、茴香醛和反式茴香脑峰面积 RSD 值分别为 0.19%、0.07%、0.14%、0.088%、0.14%, 表明样品溶液在 24 h 内具有良好的稳定性。

2.6.4 加样回收试验 取已知紫丁香苷、芦丁、槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷、茴香醛和反式茴香脑含量的盐小茴香样品 (Y1) 共 6 份, 每份 1.0 g, 精密称重, 分别向其中精密加入与样品中对应成分等量的混合对照品, 按照“2.2.2”和“2.3”项下方法制备供试品溶液, 并进样分析。结果得到紫丁香苷、芦丁、槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷、茴香醛、反式茴香脑的加样回收率分别为 99.23% ($RSD = 0.94\%$)、101.40% ($RSD = 0.98\%$)、101.02% ($RSD = 1.3\%$)、98.42% ($RSD = 0.33\%$) 和 100.33% ($RSD = 0.52\%$), 表明方法准确、可行。

2.6.5 样品含量测定 分别取生小茴香和盐小茴

香各 10 批粉末, 精密称重, 按“2.2.3”项下方法和“2.3”项下色谱条件分别进行样品溶液的制备和 HPLC 的分析, 根据各指标成分峰面积计算各自的含量。结果 10 批生小茴香中紫丁香苷、芦丁、槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷、茴香醛、反式茴香脑的含量平均值分别为 0.775、0.445、0.586、0.255、3.735 mg/g; 盐制后的含量平均值分别为 0.722、0.414、0.567、0.229、2.834 mg/g (见表 5)。使用 SPSS 25.0 软件对小茴香炮制前后 5 种指标成分的含量进行配对 t 检验。结果见图 6, 小茴香经盐制后 5 种指标成分的含量均有所下降, 其中, 反式茴香脑含量下降差异有统计学意义。

表 5 10 批小茴香生品和盐制品中 5 种指标成分含量

Tab 5 Content of 5 active ingredients of 10 batches of raw and salt processed *Foeniculi Fructus*

编号	生小茴香 / (mg/g)					编号	盐小茴香 / (mg/g)				
	紫丁香苷	芦丁	槲皮素-3- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷	茴香醛	反式茴香脑		紫丁香苷	芦丁	槲皮素-3- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷	茴香醛	反式茴香脑
S1	0.795	0.379	0.357	0.223	3.535	Y1	0.873	0.447	0.385	0.318	3.051
S2	0.605	0.222	0.239	0.186	3.280	Y2	0.369	0.149	0.162	0.104	2.805
S3	0.749	0.406	0.574	0.232	3.880	Y3	0.690	0.367	0.552	0.184	3.624
S4	0.803	0.172	0.630	0.284	3.392	Y4	0.799	0.081	0.730	0.172	2.611
S5	0.896	0.669	0.826	0.288	4.273	Y5	0.927	0.699	0.852	0.307	2.301
S6	0.764	0.526	0.681	0.256	4.372	Y6	0.681	0.460	0.619	0.229	2.650
S7	0.667	0.385	0.688	0.199	3.920	Y7	0.541	0.358	0.584	0.151	2.850
S8	0.973	0.596	0.861	0.369	4.312	Y8	0.854	0.549	0.767	0.344	2.509
S9	0.762	0.568	0.424	0.274	3.379	Y9	0.749	0.515	0.390	0.222	3.009
S10	0.738	0.527	0.576	0.234	3.005	Y10	0.742	0.514	0.627	0.260	2.930
平均值	0.775	0.445	0.586	0.255	3.735	平均值	0.722	0.414	0.567	0.229	2.834

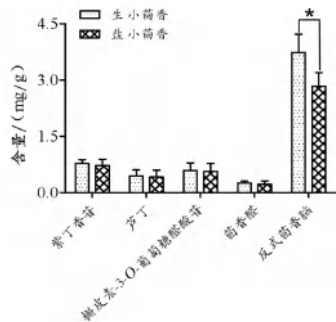


图 6 小茴香盐制前后 5 种成分含量比较 (* $P < 0.05$)

Fig 6 Content of 5 components in *Foeniculi Fructus* before and after processing (* $P < 0.05$)

3 讨论

本课题组前期已对小茴香盐制工艺^[6]和不同产地小茴香 HPLC 指纹图谱进行了研究, 本试验在前期研究的基础上, 采用 HPLC 法探究小茴香盐制前后化学成分的整体质量变化。试验过程中曾对盐小茴香样品的提取方法、提取溶剂、提取时间、流动相体系等条件均进行了考察, 且通过 DAD 检测器进行了全波长扫描, 结果发现, 盐小茴香 HPLC 色谱条件与课题组前期报道的生小茴

香 HPLC 指纹图谱色谱条件^[7]基本一致。

通过化学模式识别, 本试验可以将小茴香生品及盐制品区分开。相似度结果显示, 不同批次的小茴香样品炮制前后相似度均较高, 聚类分析可明显区分生品与盐制品。通过 VIP 值分析, 筛选出 5 个差异性成分, 其影响显著性顺序大小为峰 11 (槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷) > 峰 6 > 峰 19 (反式茴香脑) > 峰 10 (芦丁) > 峰 7。研究发现, 小茴香中的挥发油类成分 (如反式茴香脑、茴香醛等) 和黄酮类成分 (如槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷、紫丁香苷、芦丁等) 具有抑菌、护肝、抗病毒、抗氧化等作用, 是小茴香主要的活性成分^[8-10], 可作为衡量小茴香饮片质量的质控指标。通过测定差异性成分和已知成分的含量, 发现小茴香经盐炒后变化较明显的是挥发油类成分, 其所含的主要活性成分的种类基本相同, 但含量均有所下降, 其中反式茴香脑含量变化较显著; 而黄酮类成分含量下降不太明显, 该结果与文献报道基本一致^[11-12]。这可能是因为挥发油性质不稳定, 且炮制过程中的加热易使其成分分解, 导致

含量降低；而黄酮类成分结构性质较稳定，炮制过程中受热时间短，成分结构分解过程较慢，因此其含量降低不明显。试验所筛选出的差异性成分峰 6 和峰 7 尚需进一步确认。

综上所述，本研究通过 HPLC 指纹图谱对小茴香盐制前后的化学成分进行定性与定量分析，发现小茴香盐制后反式茴香脑成分变化较明显，与生品有较大差异，其可能与小茴香盐制后辛散作用稍缓，专行下焦，长于温肾祛寒、疗疝止痛的功效有关。本研究在一定程度上解析了小茴香盐制前后化学成分的变化，可为其后续炮制前后药效变化研究及饮片质量标准的制订提供参考。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版.一部[S]. 2020: 49-50.
- [2] 王金金, 毋启桐, 时博, 等. 小茴香炮制沿革、化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26 (20): 178-190.
- [3] 牛艺璇, 果佳霖, 王亮, 等. 基于网络药理-分子对接探析小茴香挥发油治疗术后肠梗阻机制[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40 (10): 1337-1346.
- [4] 王蕾, 燕彩云, 乐智勇, 等. 盐制法及炮制辅料盐的炮制沿革研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42 (20): 3880-3885.
- [5] Badgujar SB, Patel VV, Bandivkekar AH. *Foeniculum vulgare* Mill: a review of its botany, phytochemistry, pharmacology, contemporary application, and toxicology [J]. Bio Med Res Int, 2014, 2014: 842674.
- [6] 徐若颖, 豆市蓉, 曹彦刚, 等. 盐小茴香制备工艺优化[J]. 中成药, 2023, 45 (1): 17-23.
- [7] 朱静平, 刘梦云, 贾梦雪, 等. 基于 HPLC 指纹图谱和多成分定量结合化学模式识别法评价不同产地小茴香饮片质量[J]. 中草药, 2024, 55 (27): 8564-8573.
- [8] 谢敏华, 陈丽. 小茴香抗菌与抗氧化作用研究进展[J]. 中国调味品, 2012, 37 (10): 15-17.
- [9] 郭佳, 魁永忠, 夏洪斌, 等. 不同品种小茴香果实挥发性成分、多酚、黄酮含量及抗氧化性比较分析[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45 (8): 215-224.
- [10] Roby MHH, Sarhan MA, Selim KAH, et al. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) [J]. Ind Crops Prod, 2013, 44: 437-445.
- [11] 汪作元, 李敏, 杨静, 等. 小茴香中反式茴香脑的含量测定及其变化规律研究[J]. 天津中医药, 2019, 36 (10): 1021-1024.
- [12] 李敏, 窦志英, 柴欣, 等. 炮制对小茴香中黄酮成分的影响[J]. 天津中医药, 2019, 36 (6): 612-614.

(收稿日期: 2025-03-15; 修回日期: 2025-05-19)

LC-MS/MS 法测定盐酸托莫西汀口服溶液中遗传毒性杂质

冯文, 王璐, 傅萍, 刘峰* (四川省药品检验研究院/国家药品监督管理局药物制剂体内外相关性技术研究重点实验室, 成都 611731)

摘要: **目的** 建立一种高效、准确的 LC-MS/MS 方法, 以控制盐酸托莫西汀口服溶液中特定遗传毒性杂质 *N*-甲基-*N*-[3-苯基-3-(邻甲基苯氧基)丙基]亚硝基胺(杂质Ⅲ-13)的残留量。**方法** 采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 (150 mm×4.6 mm, 2.7 μm) 色谱柱, 以 10 mmol/L 甲酸铵溶液(甲酸调 pH 值至 3.5)为流动相 A, 乙腈为流动相 B; 进样体积 20 μL; 采用 ESI 正离子多反应监测模式(MRM)及标准加入法测定。**结果** 杂质Ⅲ-13 在 0.1941 ~ 0.5824 μg/mL 与峰面积线性关系良好($r = 0.9976$); 杂质Ⅲ-13 在 80%、100%、120% 浓度水平的平均回收率分别为 85.7%、90.1%、97.2%, 相应 RSD 分别为 8.6%、4.6% 和 8.5% ($n = 3$)。**结论** 本方法简便、快速、灵敏度高、专属性好、准确可靠, 可用于盐酸托莫西汀口服溶液中亚硝胺类杂质的测定, 能够满足质量控制需求。同时也为其他口服液品种中亚硝胺类杂质的控制提供了方法参考。

关键词: 盐酸托莫西汀口服溶液; 遗传毒性杂质; LC-MS/MS 法; *N*-甲基-*N*-[3-苯基-3-(邻甲基苯氧基)丙基]亚硝基胺

中图分类号: R927.2, R944.3 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)12-3674-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.030

作者简介: 冯文, 女, 硕士研究生, 副主任药师, 主要从事药品质量评价与质量标准研究, email: 273344933@qq.com

*通信作者: 刘峰, 男, 硕士研究生, 主任药师, 主要从事药品质量评价与质量标准研究, email: 52986758@qq.com

Determination of genotoxic impurities in atomoxetine hydrochloride oral solution by LC-MS/MS

FENG Wen, WANG Lu, FU Ping, LIU Feng* (Sichuan Institute for Drug Control/NMPA Key Laboratory for Technical Research on Drug Products in Vitro and in Vivo Correlation, Chengdu 611731)

Abstract: Objective To develop an efficient and accurate LC-MS/MS method to control the residue of specific genotoxic impurity *N*-methyl-*N*-[3-phenyl-3-(*O*-methylphenoxy) propyl] nitrosamine (impurity III-13) in atomoxetine hydrochloride oral solution. **Methods** Chromatographic separation was achieved on an Agilent Poroshell 120 EC-C18 (150 mm×4.6 mm, 2.7 μm) column, with 10 mmol/L of ammonium formate solution (adjusting pH 3.5 with formic acid) as mobile phase A and acetonitrile as mobile phase B. The injection volume was 20 μL. Mass spectrometry was performed with electrospray ionization (ESI) in positive ion mode under multiple reaction monitoring (MRM). Quantification was conducted by standard addition method. **Results** Impurity III-13 exhibited excellent linearity within 0.1941 ~ 0.5824 μg/mL ($r = 0.9976$). And the average recoveries of impurity III-13 at the concentration levels of 80%, 100%, and 120% were 85.7%, 90.1%, and 97.2%, respectively, with the *RSD* of 8.6%, 4.6%, and 8.5% ($n = 3$). **Conclusion** The method is fast, simple, highly sensitive, specific, accurate and reliable, making it suitable for the determination of nitrosamine impurity in atomoxetine hydrochloride oral solution. It meets the requirements for quality control and provides a reference for the monitoring of nitrosamines impurities in other oral solutions.

Key words: atomoxetine hydrochloride oral solution; genotoxic impurity; LC-MS/MS; *N*-methyl-*N*-[3-phenyl-3-(*O*-methylphenoxy) propyl] nitrosamine

盐酸托莫西汀化学名为 *R*-($-$)-*N*-甲基-3-苯基-3-(2-甲基苯氧基)丙胺盐酸盐, 属去甲肾上腺素递质再摄取抑制剂, 2003 年由 Lilly 公司研发成功并在美国上市, 是首个用于治疗注意缺陷/多动障碍的非兴奋性药物^[1-6]。盐酸托莫西汀口服溶液具有易吸收、给药方便、口感好的优势, 易为儿童和青少年患者所接受, 用于治疗 6 岁及 6 岁以上儿童和青少年的注意缺陷/多动障碍 (ADHD)。

近年来, 沙坦类药物中痕量的亚硝胺类杂质引发了国内外药监机构对于遗传毒性杂质的关注, 国家药品监督管理局 (NMPA)、欧洲药物管理局 (EMA) 和美国食品药品监督管理局 (FDA) 等均颁布遗传毒性杂质的指导原则, 要求对药物中潜在的遗传毒性杂质进行全面的分析、风险评估, 并制订合理的控制策略。查询盐酸托莫西汀合成路线信息^[7-9], 目前多是以 3-甲胺基苯丙醇为起始物料, 在碱性条件下与邻氟甲苯经醚化、拆分、成盐得到, 而本品的合成起始物料与成品中均含有仲胺基团, 在一定条件下易与环境中存在的亚硝酸盐生成亚硝类杂质, 盐酸托莫西汀可产生 *N*-甲基-*N*-[3-苯基-3-(邻甲基苯氧基)丙基]亚硝基胺 (以下简称“杂质 III-13”)。目前, 现已发表的相

关文献都是关于盐酸托莫西汀或其制剂含量、溶出度、有关物质等质量控制方面, 均不涉及遗传毒性杂质的研究^[9-16]。

考虑到盐酸托莫西汀口服溶液为儿童用药, 其安全性备受关注, 针对其潜在的亚硝胺类遗传毒性杂质 III-13 建立灵敏、快速和准确的分析方法十分必要。另外盐酸托莫西汀口服溶液处方较为复杂, 且辅料种类众多, 待测组分信号常被共出峰掩盖而无法测定, 且本品规格仅为 4 mg/mL, 给检测设备和方法开发均带来极大的挑战。本文研究建立了 LC-MS/MS 方法, 该方法能够准确检测出样品中痕量杂质的含量, 并能满足相关法规和标准的要求。同时, 本方法还具有较好的重现性和耐用性, 适用于该药物的常规分析和质量控制, 也为其他类似的口服溶液剂中遗传毒性杂质的测定提供了参考。

1 仪器与试药

LC-MS/MS 岛津 LC-30 串联 AB API 4000 质谱仪、LC-MS/MS 岛津 LC-40 串联 AB Triple Quad 5500 + 质谱仪 (日本岛津); Agilent Poroshell 120 EC-C18 (150 mm×4.6 mm, 2.7 μm); Mettler Toledo XA205 十万分之一天平、XPR6UD5 百万分之一天平 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公

司]; 水为超纯水(赛多利斯), 色谱纯乙腈及质
谱纯乙酸铵、甲酸、甲酸铵(Fisher)。相关研究

用杂质对照品与样品均由重庆希尔安药业有限公司提供。相关杂质与样品信息见表1, 结构见图1。

表 1 杂质信息与样品信息

Tab 1 Information of impurity and sample

名称	来源	批号	含量 /%	用途
N- 甲基 -N-[3- 苯基 -3- (邻甲基苯氧基) 丙基] 亚硝基胺 (杂质 III -13) 对照品	山东百诺医药股份有限公司	22010601	100.0	基因毒性杂质检查
盐酸托莫西汀口服溶液	重庆希尔安药业有限公司	220501、220502、220503	/	基因毒性杂质检查
盐酸托莫西汀原料药	山东百诺医药股份有限公司	22030010210、21120010210	/	基因毒性杂质检查



图 1 盐酸托莫西汀及其杂质的化学结构

Fig 1 Structure of atomoxetine hydrochloride and its impurity

2 方法

2.1 溶液配制

2.1.1 空白溶剂 10 mmol/L 甲酸铵溶液 (甲酸调 pH 值至 3.5)。

2.1.2 空白辅料溶液 根据处方比例配制空白辅料。精密量取空白辅料 5 mL 置于 10 mL 量瓶中, 用空白溶剂稀释至刻度, 摇匀。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密量取本品 5 mL 置 10 mL 量瓶中, 用 10 mmol/L 甲酸铵溶液 (甲酸调 pH 值至 3.5) 稀释至刻度, 摇匀。

2.1.4 对照品储备液 I 的制备 精密称取杂质 III-13 对照品适量, 加乙腈 -10 mmol/L 甲酸铵溶液 (甲酸调 pH 值至 3.5)(50 : 50) 定量稀释制成每 1 mL 中约含 360 ng 的溶液。

2.1.5 对照品储备液 II 的制备 精密量取对照品储备液 I 1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 用供试品溶液稀释至刻度, 摇匀。

2.1.6 对照品溶液的制备 精密量取对照品储备液 II 0.1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 用供试品溶液稀释至刻度, 摇匀。

2.1.7 加标供试品溶液 精密量取杂质 III-13 对照品储备液 II (约 36 ng/mL) 80、100、120 μ L 分别置于 10 mL 量瓶中, 用供试品溶液稀释至刻度, 摇匀作为准确度加标供试品溶液; 每个浓度平行配制 3 份。

2.2 色谱条件

采用 Agilent Proshell 120 EC-C18 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 2.7 μ m) 色谱柱, 柱温 40 $^{\circ}$ C, 以 10 mmol/L 甲酸铵溶液 (甲酸调 pH 值至 3.5) 为流动相 A, 以乙腈为流动相 B, 按表 2 进行梯度洗脱, 流速 0.6 mL/min, 进样体积 20 μ L; 采用三重四极杆串联质谱检测器, 正离子模式, 采集模式为多反应监测 (MRM), 杂质 III-13 定量离子对为质荷比 (m/z) 302.1 $\rightarrow$ 177.1, 去簇电压 (DP) 10 V, 碰撞能量 (CE) 14 eV, 碰撞室出口电压 (CXP) 7 V, 入口电压 (EP) 10 V。

表 2 梯度洗脱程序

Tab 2 Gradient elution

时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	35	65
10	35	65
10.1	10	90
20	10	90
20.1	35	65
30	35	65

2.3 专属性

精密量取空白溶剂、空白辅料溶液、对照品溶液、供试品溶液分别进样测定, 记录色谱图, 见图 2。结果显示, 空白溶剂与空白辅料对杂质 III-13 的检测无干扰, 对照品溶液中杂质 III-13 峰形良好, 表明方法专属性良好。

2.4 线性与范围

取杂质 III-13 对照品储备液 II, 用供试品溶液作为溶剂进行稀释, 得到系列不同质量浓度的线性标准溶液, 进样测定, 记录色谱图。以质量浓度作为横坐标, 待测组分峰面积作为纵坐标, 结果杂质 III-13 线性方程为 $y = 2.134 \times 10^5 x + 1.554 \times 10^4$, 相关系数 $r = 0.9976$, 表明杂质 III-13 在 0.1941 ~ 0.5824 ng/mL 内与峰面积呈良好的线性关系。

2.5 准确度

取“2.1.5”项下加标供试品溶液, 进样测定, 计算加标溶液中加入的量与实际加入量的比值, 即得回收率, 结果杂质 III-13 在 80%、100%、120% 浓度水平的平均回收率分别为 85.7%、90.1%、97.2%, RSD 分别为 8.6%、4.6% 和 8.5%, 结果表明, 该方法能够

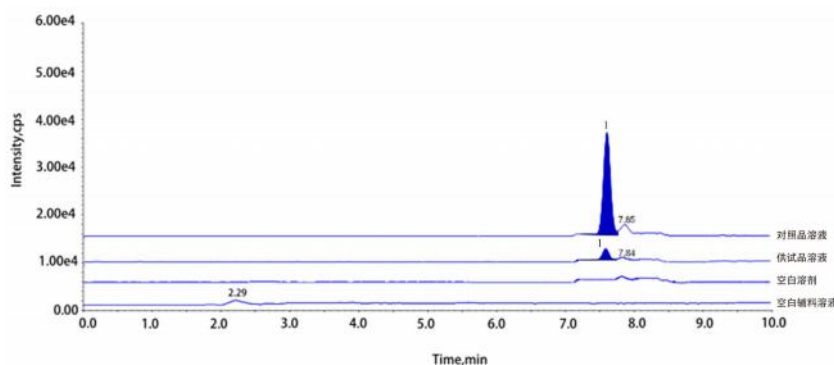


图2 专属性典型色谱图

Fig 2 Typical chromatogram of specific

1. 杂质Ⅲ-13 (impurity Ⅲ-13)

准确检测出样品中杂质Ⅲ-13的含量。

2.6 精密度

取“2.1.4”项下对照品溶液,连续进样6次,计算峰面积 RSD 为 3.8%,表明方法进样精密度良好;按“2.1.1”项下方法配制6份供试品溶液,测得杂质Ⅲ-13峰面积 RSD 为 1.5%,表明方法重复性良好;采用“2.1”项下方法,在不同时间、不同人员情况下配制对照品溶液与6份供试品溶液,考察中间精密度,结果6份供试品测定结果与重复性试验结果 RSD 为 5.7% ($n = 12$),无明显差异,方法中间精密度良好。

2.7 溶液稳定性

取“2.1.4”项下对照品溶液 (0.36 ng/mL) 与供试品溶液,于 0、2、4.5、8.5、12.5、17.5 h 分别注入液相色谱仪,记录色谱图,考察溶液稳定性,结果对照品溶液和供试品溶液峰面积的 RSD 分别为 7.2%、13.9%,表明两者在 17.5 h 内均较为稳定。

2.8 耐用性

取“2.1”项下供试品溶液以及对照品溶液 (0.36 ng/mL),分别按照下列条件测定供试品溶液中杂质Ⅲ-13的含量:

① 耐用性 1: 调整柱温为 35℃; ② 耐用性 2: 调整柱温为 45℃; ③ 耐用性 3: 调整流速为 0.58 mL/min; ④ 耐用性 4: 调整流速为 0.62 mL/min。因方法筛选时已试验过多根色谱柱,故建议固定色谱柱进行检测,耐用性未再更换色谱柱考察。结果表明,微调色谱条件时方法耐用性良好,供试品测定结果分别为 0.027、0.029、0.034 和 0.028 mg/kg,平均值为 0.0295 mg/kg, RSD 为 10.8%。

2.9 样品测定

取本品按照拟订的检查方法进行测定,结果见表 3。

3 讨论

3.1 检测方法的初筛

表 3 样品中杂质Ⅲ-13 的含量测定结果 (1×10^{-6})Tab 3 Impurity Ⅲ-13 in the sample solution (1×10^{-6})

批号	杂质Ⅲ
0 d-Lot 220501	0.026
0 d-Lot 220502	0.023
0 d-Lot 220503	0.011
Lot 220501 长期 6 个月	0.038
Lot 220502 长期 6 个月	0.014
Lot 220503 长期 6 个月	0.012
Lot 220501 加速 6 个月	0.026
Lot 220502 加速 6 个月	0.018
Lot 220503 加速 6 个月	0.016
Lot 21120010210 原料	0.017
Lot 22030010210 原料	0.011

文献报道^[16]对盐酸托莫西汀口服溶液参比制剂进行逆向工程研究,确定其处方为:100 mL 的盐酸托莫西汀口服溶液中托莫西汀含量为 0.4 g,苯甲酸钠约为 0.08 g,山梨醇约为 3.3 g,木糖醇约为 30.0 g,磷酸约为 0.08 g,磷酸二氢钠约为 1.3 g,三氯蔗糖约为 0.05 g,草莓香精约为 2.0 g。由此可见,该处方成分较多,较为复杂,辅料含量远大于主成分含量,为痕量的遗传毒性杂质测定带来了极大的障碍。

考虑到遗传毒性杂质均痕量形式存在于研究样本中,优先选择灵敏度高、专属性强的 LC-MS/MS 法作为首选分析手段。试验中首先选择了岛津 LC-30 串联 AB API 4000 质谱仪进行测定,采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱试验,发现亚硝胺类物质分析常用的 APCI 源检测灵敏度较低,ESI 源对检测灵敏度有明显改善;盐酸托莫西汀口服溶液规格仅为 4 mg/mL,在不稀释直接进样的情况下,杂质Ⅲ-13 的检测灵敏度无法满足要求;口服溶液中共出峰严重干扰目标杂质测定。因此需采用灵敏度更高的“岛津 LC-40 串联 AB Triple Quad 5500 + 质谱仪”进行试验。取对照品溶液 (100 ng/mL) 进行离子扫描,采用 ESI

源, 筛选质谱参数, 杂质Ⅲ-13 最终选定的质谱参数为 ESI 源、正离子模式, 采集模式为 MRM, 定量离子对为质荷比 (m/z) $302.1 \rightarrow 177.1$, DP 10 V, CE 14 eV, CXP 7 V, EP 10 V。

3.2 杂质Ⅲ-13 分析方法的筛选

考虑供试品浓度较低, 为保证杂质Ⅲ-13 的灵敏度符合要求, 试验中采用口服溶液稀释 1 倍后直接进样测定, 同时优化确定进样体积为 20 μ L。质谱需采用阀切换技术, 7.3 min 之前切换至废液, 7.3 ~ 8.5 min 液体进入质谱, 8.5 min 之后切换至废液, 确保质谱不被高浓度供试品污染; 另因质谱型号差异, 可根据仪器情况进行质谱参数优化, 以达到试验灵敏度要求。杂质Ⅲ-13 采用外标法测定时发现基质效应明显, 平均回收率仅 50% 左右, 考虑到口服溶液基质较为复杂, 原辅料之间极性差异较大, 前处理尚无法完全去除原辅料的干扰, 因此选择了标准加入法进行试验。

4 小结

样品测定结果在 0.011 ~ 0.038 mg/kg, 且稳定性考察结果显示杂质含量并无显著增加, 表明现有生产工艺、包装材料与贮存过程均能有效控制杂质Ⅲ-13。但在大生产过程中, 仍应关注制药用水、原辅料、包装材料、生产设备等环节存在的亚硝酸盐与盐酸托莫西汀的仲胺基团反应可能导致亚硝胺杂质的产生。考虑到杂质Ⅲ-13 为亚硝胺类杂质, 其潜在的遗传毒性不容忽视, 且本品用药的目标人群为儿童, 尽管当前缺乏详尽的毒理数据支持, 但基于 EMA 的评估报告及建议, 笔者采取了保守的限度设定策略, 其杂质残留量必须严格控制。根据 EMA 发布的亚硝胺类杂质评估报告及问答, 在没有足够毒理数据的情况下, 可使用亚硝胺类别特定的毒理学关注阈值 (TTC) (18 ng/d)^[17] 为计算限度, 这也是目前全球最为严格的要求。结合盐酸托莫西汀口服溶液日最大服用剂量为 100 mg (以盐酸托莫西汀计算), 根据 TTC 值计算杂质Ⅲ-13 限度为 $18 \text{ ng/d}/100 \text{ mg} = 0.18 \mu\text{g/g}$, 即限度为不得过 0.18 $\mu\text{g/g}$ (以盐酸托莫西汀标示量计算)。这一限度的设定既符合科学原则, 又确保了产品的安全性和有效性。

此外, 企业应进一步加强生产过程中的质量控制, 通过优化工艺条件、提高原料纯度、加强反应监控等措施, 力求从源头上减少亚硝胺类杂质的生成。同时为了确保产品的安全性与合规性, 还应持续关注国内外药监机构对于亚硝胺类杂质的最新研究成果与指导原则, 一旦有新的毒理数据或更严格的评估标准出台, 适时调整杂质的控制策略。

参考文献

- [1] 钦云峰, 凌寅杰, 郎妍. 维生素 D 联合盐酸托莫西汀治疗儿童注意力缺陷多动障碍的临床疗效和安全性评价 [J]. 中国药师, 2024, 27 (2): 287-294.
- [2] 谢凤, 刘晓峰, 林泓, 等. 注意缺陷/多动障碍儿童服用盐酸托莫西汀治疗的疗效与安全性观察 [J]. 中南药学, 2020, 18 (11): 1920-1927.
- [3] 赵涇涇, 徐通, 周翊, 等. 盐酸托莫西汀对注意缺陷多动障碍患儿生活质量的研究 [J]. 药学服务与研究, 2018, 18 (2): 92-95.
- [4] Clemow DB, Bushe C, Mancinim, et al. A review of the efficacy of atomoxetine in the treatment of attention-deficit hyperactivity disorder in children and adult patients with common comorbidities [J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2017 (13): 357-371.
- [5] Nakano M, Witcher J, Satoi Y, et al. Pharmacokinetic profile and palatability of atomoxetine oral solution in healthy japanese male adults [J]. Clin Drug Investig, 2016, 36 (11): 903-911.
- [6] 杜杨. 盐酸托莫西汀治疗儿童注意缺陷多动障碍伴抽动障碍的疗效探讨 [J]. 中国现代药物应用, 2022, 16 (19): 159-161.
- [7] 陈文波, 金晴昊, 綦宇轩, 等. 盐酸托莫西汀的合成工艺改进研究 [J]. 浙江海洋大学学报 (自然科学版), 2017, 36 (6): 546-550.
- [8] 钱祥均, 方正, 杨照, 等. 盐酸托莫西汀合成路线图解 [J]. 中国医药工业杂志, 2012, 43 (4): 317-319.
- [9] 李树英, 倪志伟, 张庆, 等. 基于合成路线分析的盐酸阿托莫西汀有关物质研究进展 [J]. 药学研究, 2022, 41 (6): 400-405.
- [10] 张辉, 符才东. 高效液相色谱法测定盐酸托莫西汀口服溶液中盐酸托莫西汀含量 [J]. 中国药业, 2022, 31 (16): 77-79.
- [11] 曾倩, 吴雪英, 王伟婷, 等. 盐酸托莫西汀口服溶液的有关物质和含量测定方法研究 [J]. 海峡药学, 2023, 35 (1): 51-57.
- [12] 杨凤, 曾祥盛. GC-MS 法测定盐酸托莫西汀中甲基苯胺类化合物的含量 [J]. 山东化工, 2022, 51 (15): 107-109.
- [13] 陈言德, 童振雄, 林利敏. HPLC 法测定盐酸托莫西汀口服溶液中对映异构体含量 [J]. 精细化工中间体, 2021, 51 (4): 65-68.
- [14] 陈杰, 李展. HPLC 法检查盐酸托莫西汀左旋异构体的有关物质 [J]. 中国药房, 2014, 25 (45): 4299-4301.
- [15] 吴拥军, 傅收, 吕和平, 等. 盐酸托莫西汀旋光异构体的手性拆分研究 [J]. 药物分析杂志, 2007, 27 (10): 1523-1525.
- [16] 曾倩, 吴雪英, 王伟婷, 等. 采用逆向工程方法研究盐酸托莫西汀口服溶液 [J]. 药物流行病学杂志, 2023, 32 (5): 545-553.
- [17] Nitrosamine impurities in human medicinal products. EMA/189634/2021 (2023 年 1 月修订版)

(收稿日期: 2025-03-19; 修回日期: 2025-06-04)

UPLC-MS/MS 法同时测定妇康片中 4 种生物碱的含量及其在质量控制中的应用

卢秋梅, 王虹, 顾利红, 栗建明, 李纯* (广州市药品检验所, 国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室, 广州 510160)

摘要: **目的** 建立 UPLC-MS/MS 法同时测定妇康片中盐酸益母草碱、盐酸水苏碱、延胡索乙素和脱氢紫堇碱的含量。**方法** 质谱分析采用电喷雾离子源 (ESI), 正离子扫描, 多反应监测模式 (MRM) 采集数据; 色谱分离采用 Waters XSelect CSH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 2.5 μm), 以 0.1% 甲酸水溶液 (含 5 mmol/L 乙酸铵) - 甲醇为流动相进行梯度洗脱, 流速为 0.3 mL/min, 柱温为 40 °C。**结果** 盐酸益母草碱、盐酸水苏碱、延胡索乙素和脱氢紫堇碱 4 种生物碱在各自浓度范围内与峰面积线性关系良好 ($r > 0.9995$), 盐酸益母草碱的回收率为 95.25% ~ 103.13%, RSD 为 2.4% ~ 2.7%; 盐酸水苏碱的回收率为 75.10% ~ 80.63%, RSD 为 1.5% ~ 1.6%; 延胡索乙素的回收率为 88.94% ~ 94.13%, RSD 为 0.47% ~ 1.4%; 脱氢紫堇碱的回收率为 83.02% ~ 91.52%, RSD 为 0.98% ~ 3.6%。不同企业生产的样品含量测定结果存在显著差异。**结论** 该方法灵敏度高、实用性强、重复性好, 可用于妇康片中益母草和延胡索的质量控制。

关键词: 妇康片; 益母草; 延胡索; 生物碱; 含量测定; UPLC-MS/MS

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)12-3679-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.031

Simultaneous determination of four alkaloids in Fukang tablets by UPLC-MS/MS and their quality control

LU Qiumei, WANG Hong, GU Lihong, LI Jianming, LI Chun* (Guangzhou Institute for Drug Control, NMAP Key Laboratory of Quality Evaluation of Chinese Patent Medicine (Traditional Chinese Patent Medicine), Guangzhou 510160)

Abstract: Objective To simultaneously determine leonurine hydrochloride, stachydrine hydrochloride, tetrahydropalmatine, and dehydrocorydaline in Fukang tablets by UPLC-MS/MS. **Methods** Mass spectrometry analysis was performed on an electrospray ionization (ESI) source with positive ion scanning and multiple reaction monitoring (MRM) mode for data collection. Chromatographic separation was achieved on Waters XSelect CSH C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 2.5 μm) with a mobile phase consisting of 0.1% formic acid aqueous solution (containing 5 mmol/L ammonium acetate) and methanol in a gradient elution mode. The flow rate was 0.3 mL/min, and the column temperature was maintained at 40 °C. **Results** The four alkaloids (leonurine hydrochloride, stachydrine hydrochloride, tetrahydropalmatine, and dehydrocorydaline) all exhibited good linearity ($r > 0.9995$) within their respective concentration ranges. The recovery rate of leonurine hydrochloride ranges from 95.25% to 103.13%, with an RSD of 2.4% to 2.7%; the recovery of stachydrine hydrochloride ranges from 75.10% to 80.63%, with an RSD of 1.5% to 1.6%; the recovery of tetrahydropalmatine ranges from 88.94% to 94.13%, with an RSD of 0.47% to 1.4%; the recovery of dehydrocorydaline ranges from 83.02% to 91.52%, with an RSD of 0.98% to 3.6%. Obvious content variations were observed among samples from different manufacturers. **Conclusion** This method is highly sensitive, practical, and reproducible, and can be used for the quality control of *Leonurus japonicus* and *Corydalis yanhusuo* in Fukang tablets.

基金项目: 2023 年国家药品评价性抽验项目 (No.027)。

作者简介: 卢秋梅, 女, 副主任中药师, 主要从事中药质量标准研究, email: 670747691@qq.com * 通信作者: 李纯, 女, 主任中药师, 主要从事中药质量标准及其安全性研究, email: lichun8464@sina.com

Key words: Fukang tablet; *Leonurus japonicus*; *Corydalis yanhusuo*; alkaloid; content determination; UPLC-MS/MS

妇康片是由益母草、当归、醋延胡索、熟地黄等 11 味中药组成的复方制剂，具有补气养血、调经止痛的功效，临床主要用于治疗气血两虚所致的体虚乏力、月经不调及经期腹痛等症状^[1]。目前该制剂的质量标准存在较大差异，在 16 个法定标准中，显微鉴别主要针对当归、川芎和白术，薄层色谱（TLC）鉴别则涵盖人参、白芍、当归、醋延胡索、益母草和白术等药材，其中仅 3 个标准建立了延胡索乙素的含量测定方法^[1-2]。现有研究文献中，主要关注芍药苷、阿魏酸、延胡索乙素和人参皂苷等活性成分的含量测定，但各标准的检测指标和检测方法尚未统一^[3-9]。现有文献对妇康片中君药益母草的质量控制研究较为局限，仅见采用高效薄层色谱法（HPTLC）测定盐酸水苏碱的报道^[10]，尚未建立盐酸益母草碱的含量测定方法。考虑到 HPTLC 法存在重现性欠佳、自动化程度有限、分辨率及灵敏度不足等固有缺陷^[11]，本研究采用超高效液相色谱-质谱联用技术（UPLC-MS/MS），实现了妇康片中 4 种特征生物碱（益母草来源的盐酸益母草碱、盐酸水苏碱，以及延胡索来源的延胡索乙素、脱氢紫堇碱）的同时测定，为该制剂的质量标准提升提供了科学依据。

1 材料

1.1 仪器

H-CLASS plus UPLC 超高效液相色谱仪（美国 Waters 公司）串联 QTRAP 6500 + 质谱仪（美国 Sciex 公司）；XP-26 型电子分析天平（百万分之一）、XS-204 型电子分析天平（十万分之一）（瑞士 Mettler Toledo 公司）；P300H 超声波清洗机（德国 Elma 公司）；Milli-Q Advantage A10 超纯水制备系统（美国 Millipore 公司）。

1.2 试药

甲醇（色谱纯，美国 Fisher 公司）；甲酸、乙酸铵（色谱纯，上海安谱实验科技有限公司）；乙醇（分析纯，广州化学试剂厂）；对照品盐酸益母草碱（批号：111823-202206，纯度：98.1%）、延胡索乙素（批号：110726-202020，纯度：99.3%）（中国食品药品检定研究院）；盐酸水苏碱对照品（批号：16434，纯度：96.4%，STANDARD）；脱氢紫堇碱对照品（批号：wkq1609024，纯度：97.0%，四川维克奇生物科技股份有限公司）。其余试剂均为分析纯；水为自制超纯水。实验室自制缺益母草阴性样品、缺醋延胡索阴

性样品、缺益母草与醋延胡索双阴性样品。

妇康片为本所承担的 2023 年国家药品评价抽验品种，共收集 6 家生产企业共 29 批次样品（生产企业 A，批号：210701；生产企业 B，批号：19210301；生产企业 C，批号：210501、210801；生产企业 D，批号：200901、210101、210301、210604、210801、211101、220501、221101；生产企业 E，批号：210101、210102、210301、210302；生产企业 F，批号：20201101、20201201、20210701、20210702、20210703、20210705、20220101、20220102、20220103、20220104、20220105、20221101、20221102）。

2 方法与结果

2.1 色谱-质谱分析条件

2.1.1 色谱条件 Waters XSelect CSH C₁₈ 色谱柱（100 mm×2.1 mm，2.5 μm）；柱温：40℃；流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液（含 5 mmol/L 乙酸铵），流动相 B 为甲醇，梯度洗脱（0～2 min，10%B；2～4 min，10%→80%B；4～6 min，80%→90%B；6～6.1 min，90%→10%B；6.1～10 min，10%B）；流速：0.3 mL/min；进样体积：2 μL。

2.1.2 质谱条件 以三重四极杆串联质谱仪检测，电喷雾（ESI）离子源，正离子扫描模式，多反应监测（MRM）。离子喷雾电压（IS）：+ 4.5 kV；射入电压（EP）：10 V；碰撞室射出电压（CXP）：9 V；离子源温度：350℃；雾化气（GS₁）：50 kPa；辅助气（GS₂）：50 psi；气帘气（CUR）：35 psi。相关质谱参数见表 1。

表 1 4 种生物碱保留时间及离子对信息
Tab 1 Retention times and ion pair information of the 4 alkaloids

成分	保留时间 /min	定量离子对 (<i>m/z</i>)	定性离子对 (<i>m/z</i>)
盐酸益母草碱	4.83	312.2 → 181.1	312.2 → 114.1
盐酸水苏碱	0.86	144.1 → 102.0	144.1 → 58.1
延胡索乙素	4.99	356.3 → 165.1	356.3 → 192.1
脱氢紫堇碱	5.18	367.2 → 351.1	367.2 → 323.1

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 分别取盐酸益母草碱、盐酸水苏碱、延胡索乙素、脱氢紫堇碱对照品适量，精密称定，用 70% 乙醇制成质量浓度为 0.1 mg/mL 的单标储备液。精密量取各单标储备液适量置于 100 mL 量瓶中，加 70% 乙醇定容，摇匀，

制得混合对照品储备液。精密量取混合对照品储备液 5 mL 置于 50 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，制成盐酸益母草碱、盐酸水苏碱、延胡索乙素和脱氢紫堇碱质量浓度分别为 207.03、4427.46、506.73、2033.90 ng/mL 的混合对照品工作溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取供试品适量，研细，取约 3 片量（约 1.5 g），精密称定，置锥形瓶中，精密加 70% 乙醇 25 mL，称定重量，超声处理 30 min（350 W，37 kHz），放冷，再称定重量，用 70% 乙醇补充减失的重量，摇匀，离心，精密量取上清液 1 mL 置于 100 mL 量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，0.22 μ m 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.2.3 阴性样品溶液的制备 按处方和工艺，分别取除益母草外的各药味适量，制得缺益母草的阴性样品；取除醋延胡索外的各药味适量，制得缺醋延胡索的阴性样品；取除益母草与醋延胡索外的各药味适量，制得缺益母草与醋延胡索的双阴性样品，并按“2.2.2”项下方法制备各阴性样品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液、各阴性样品溶液，按“2.1”项下条件进样分析，结果上述 4 种生物碱色谱峰峰形基本对称，保留时间合适，且阴性样品无干扰，方法专属性良好（见图 1）。

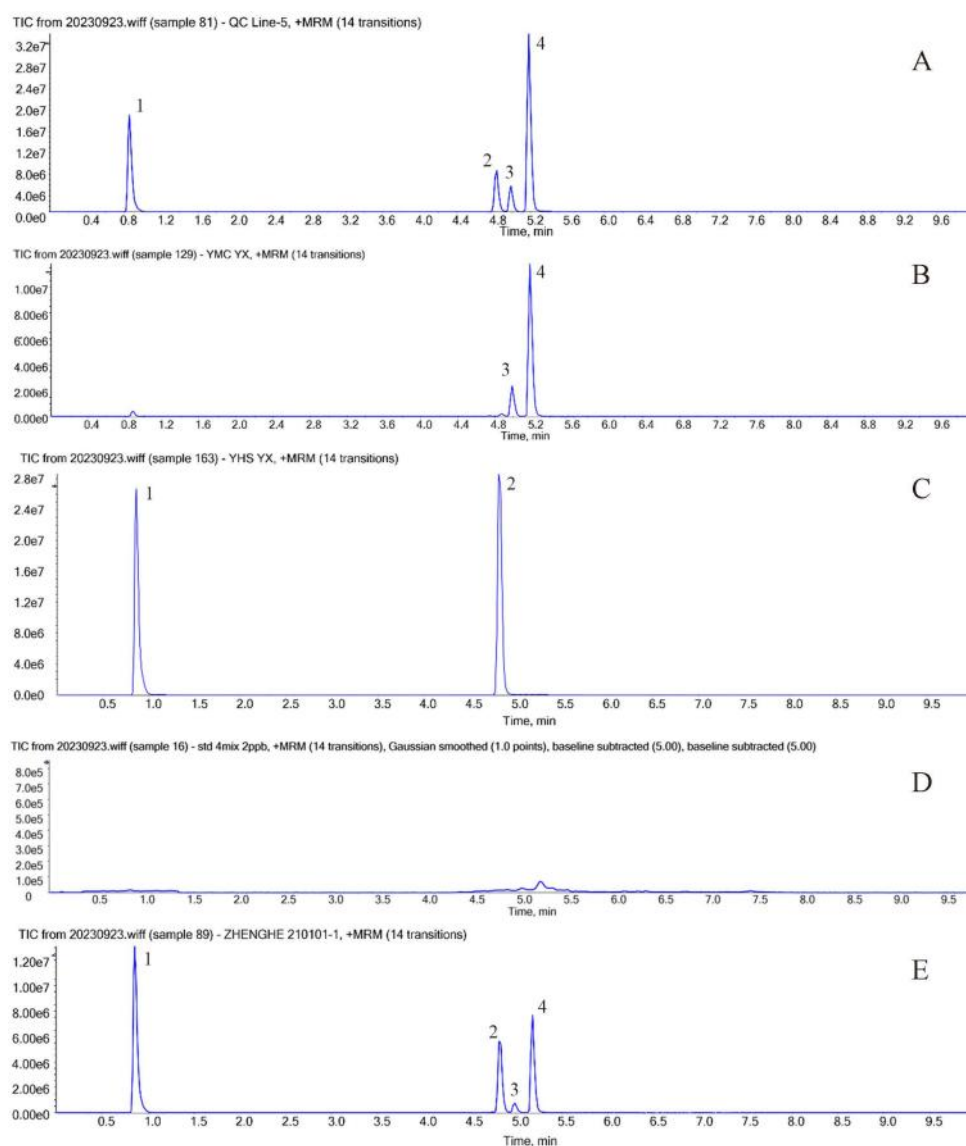


图 1 4 种生物碱 UPLC-MS/MS 色谱图

Fig 1 UPLC-MS/MS chromatograms of the four alkaloids

A. 混合对照品溶液（mixed reference standard solution）；B. 缺益母草的阴性样品溶液（negative sample solution of *Leonurus japonicus*）；C. 缺醋延胡索的阴性样品溶液（negative sample solution of *Corydalis yanhusuo*）；D. 缺益母草和醋延胡索的双阴性样品溶液（double-negative sample solution of *Leonurus japonicus* and *Corydalis yanhusuo*）；E. 供试品溶液（sample solution）；1. 盐酸水苏碱（stachydrine hydrochloride）；2. 盐酸益母草碱（leonurine hydrochloride）；3. 延胡索乙素（tetrahydropalmatine）；4. 脱氢紫堇碱（dehydrocorydaline）

2.3.2 线性关系考察及定量限测定 精密量取“2.2.1”项下混合对照品工作溶液 10、20、50、100、200、300 μL 置 1 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，制得系列质量浓度的混合对照品溶液。按“2.1”项下条件进样测定，以峰面积为横坐标 X ，对照品质量浓度为纵坐标 Y ，绘

制标准曲线，拟合得到回归方程。将各对照品溶液稀释至 2 ng/mL ，其定量离子对的色谱峰信噪比 (S/N) 约为 10 : 1，根据前处理方法推算得到定量限，见表 2。结果表明，上述 4 个生物碱在各自线性浓度范围内，其质量浓度与峰面积线性关系良好。

表 2 4 种生物碱的线性关系
Tab 2 Linear relationships of the 4 alkaloids

成分	回归方程	相关系数 (r)	线性范围 / (ng/mL)	定量限 / ($\mu\text{g/片}$)
盐酸益母草碱	$y = 3.504 \times 10^5 x - 1.816 \times 10^5$	0.9997	2.07 ~ 62.11	1.7
盐酸水苏碱	$y = 5.603 \times 10^3 x + 1.721 \times 10^4$	0.9999	44.27 ~ 1328.24	1.8
延胡索乙素	$y = 6.918 \times 10^4 x - 3.735 \times 10^4$	0.9999	5.07 ~ 152.02	1.7
脱氢紫堇碱	$y = 8.798 \times 10^4 x - 2.112 \times 10^5$	0.9999	20.34 ~ 610.17	1.7

2.3.3 精密度试验 精密量取“2.2.1”项下混合对照品工作溶液 50 μL 置 1 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀。连续进样 6 次，结果盐酸益母草碱、盐酸水苏碱、延胡索乙素、脱氢紫堇碱峰面积的 RSD 分别为 2.1%、2.2%、0.90%、2.1%，表明仪器精密度良好。

2.3.4 重复性试验 取供试品（生产企业 D，批号：210301），共 6 份，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，进样测定，测得盐酸益母草碱、盐酸水苏碱、延胡索乙素、脱氢紫堇碱含量的 RSD 分别为 3.0%、1.2%、2.0%、1.6%，表明该方法重复性良好。

2.3.5 稳定性试验 取同一供试品溶液（生产企业 D，批号：210301），分别于 0、2、4、7、17、22、26 h 进样测定，结果盐酸益母草碱、盐酸水苏碱、延胡索乙素、脱氢紫堇碱含量的 RSD 分别为 3.8%、3.3%、3.9%、3.3%，表明供试品溶液在 26 h 内稳定性良好。

2.3.6 加样回收试验 按处方及制法制备益母草与醋延胡索双阴性样品，取含 3 片样品的量（约 1.5 g），按不同添加水平平行制备 3 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，计算回收率。结果盐酸益母草碱的回收率为 95.25% ~ 103.13%， RSD 为 2.4% ~ 2.7%；盐酸水苏碱的回收率为 75.10% ~ 80.63%， RSD 为 1.5% ~ 1.6%；延胡索乙素的回收率为 88.94% ~ 94.13%， RSD 为 0.47% ~ 1.4%；脱氢紫堇碱的回收率为 83.02% ~ 91.52%， RSD 为 0.98% ~ 3.61%，表明方法回收率符合要求。

2.3.7 基质效应 精密量取“2.2.1”项下的混合对照品溶液 10、20、50、100、200、300 μL ，各加甲醇补充体积至 1 mL，摇匀，制得系列浓度的溶剂标准溶液。按“2.1”项下条件进样测定。精密量

取“2.2.1”项下混合对照品溶液 10、20、50、100、200、300 μL ，加“2.2.3”项下自制的益母草与延胡索阴性的妇康片基质溶液 500 μL ，各加甲醇补充体积至 1 mL，摇匀，制得系列浓度的基质标准溶液。按“2.1”项下色谱条件进样测定，建立溶剂及基质的标准曲线并计算回归方程，通过斜率比值进行判断。计算公式为：基质效应 (%) = (基质匹配的标准曲线斜率 / 溶剂标准曲线斜率) $\times$ 100%。结果发现，盐酸益母草碱、盐酸水苏碱、延胡索乙素和脱氢紫堇碱的基质效应均大于 85%，表明其对含量误差可忽略，因此采用溶剂（甲醇）制备标准溶液。

2.3.8 样品含量测定 取收集的样品，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，结果见表 3。

基于表 3 数据分析及图 2 箱型图结果显示，部分生产企业样品数据分布离散度较大，表明其原料质量或生产工艺稳定性存在显著波动；同时，各企业样品主要成分含量测定结果呈现明显差异，提示该品种在质量控制标准体系建立、原料药材溯源管理以及生产工艺标准化等方面均具有较大优化空间。此外，本试验也存在后续可完善的地方，如部分厂家的样品收集批次不足，可能对该厂家数据分析结果的准确性和可靠性产生影响。

3 讨论

3.1 检测成分、检测方法的选择

益母草和延胡索作为妇康片的君药和臣药，《中国药典》2020 年版一部益母草项下分别测定盐酸水苏碱和盐酸益母草碱的含量，延胡索项下测定延胡索乙素含量^[12]。现行的 16 个标准中^[1-2]均未对益母草进行含量控制，部分标准对延胡索乙素进行了含量测定，但不同标准的限度不一致。文献报道，脱氢紫堇碱也是延胡索药材的主要药理活性

表 3 样品中 4 种生物碱含量测定结果
Tab 3 Content determination of the 4 alkaloids in samples

生产企业	批号	盐酸益母草碱 / (μg/片)	盐酸水苏碱 / (μg/片)	延胡索乙 / 素 (μg/片)	脱氢紫堇碱 / (μg/片)
A	210701	7.35	235.26	4.60	21.25
B	19210301	4.76	1110.45	4.39	22.35
C	210501	3.89	300.05	11.39	57.81
C	210801	7.39	435.60	11.19	46.46
D	200901	42.91	528.49	15.33	68.39
D	210101	28.75	577.08	15.04	83.92
D	210301	13.23	578.88	11.14	71.90
D	210604	3.70	593.43	8.47	66.97
D	210801	21.78	851.25	10.51	77.27
D	211101	21.47	578.34	6.33	47.01
D	220501	8.53	843.99	8.81	72.90
D	221101	6.80	1033.53	9.27	71.97
E	210101	1.77	583.47	2.59	63.40
E	210102	2.62	645.67	2.85	63.76
E	210301	3.25	580.61	2.21	54.31
E	210302	2.44	606.31	2.57	57.01
F	20201101	2.10	276.32	3.61	16.74
F	20201201	2.10	296.25	4.54	22.77
F	20210701	1.85	252.84	3.76	17.36
F	20210702	1.86	247.85	3.47	16.17
F	20210703	1.92	243.85	3.48	17.08
F	20210705	1.90	249.02	3.72	17.35
F	20220101	2.29	256.43	3.86	17.74
F	20220102	2.19	260.73	3.62	16.85
F	20220103	2.17	252.58	3.57	17.15
F	20220104	2.33	283.06	3.85	19.76
F	20220105	2.24	269.56	3.80	18.44
F	20221101	1.73	320.90	4.36	31.21
F	20221102	1.67	321.96	4.29	28.90

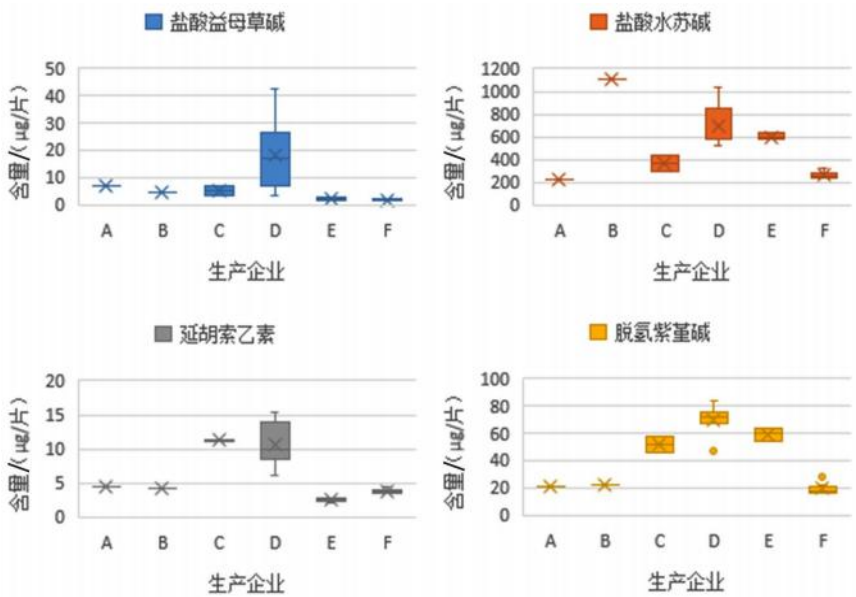


图 2 6 家企业 29 批样品 4 种生物碱箱型图
Fig 2 Box plot of 4 alkaloids in 29 batches of samples from 6 manufacturers

成分之一^[13],具有抗炎、镇痛作用^[14]。试验过程中,曾尝试采用 HPLC 法分别测定主成分益母草和延胡索的含量,但由于本品为复方制剂,成分干扰严重,并且盐酸水苏碱测定的蒸发光散射检测器灵敏度较低,需要较大取样量,无法获得较好的色谱图^[15]。为兼顾专属性及灵敏度,最终采用 UPLC-MS/MS 法同时测定 4 种生物碱的含量。

3.2 电离模式、色谱柱、流动相选择

生物碱为含氮化合物,在正离子扫描模式下容易检出分子离子峰 $[M + H]^+$,因此本试验选择电喷雾电离及正离子扫描模式^[16]。通过全扫描模式确定化合物的保留时间及相应的离子对,每个化合物选择两组 MRM 离子对,响应值高的作为定量离子对。采用 C_{18} 反相色谱柱,通过疏水相互作用保留生物碱,分离效果好,能有效减少峰拖尾,确保分离结果的重现性^[17]。流动相选用甲醇-水体系,并添加 0.1% 甲酸以提高离子化效率,提升质谱检测效果。此外,流动相中加入乙酸铵可进一步提高分离效果、优化峰形,改善色谱条件^[18]。

3.3 提取条件的选择

试验过程中通过比较不同提取溶剂(甲醇、70% 甲醇、0.1% 氨水甲醇、0.5% 甲酸甲醇、70% 乙醇)、提取方式(超声提取、加热回流提取)和提取时间(15、30、45 min)对提取效果的影响,最终确定采用 70% 乙醇超声提取 30 min,此时各生物碱基本可被完全提取,效率最佳。

3.4 基质效应考察

基质效应是指基质中存在的干扰物影响目标化合物的离子化过程,导致化合物在仪器上的响应增强或抑制^[19]。基质效应在 80%~120%,表示基质效应可忽略;大于 120%,表示存在基质增强效应;小于 80%,表示存在基质抑制效应。本试验采用绝对法评价基质效应^[20-22],结果盐酸益母草碱、盐酸水苏碱、延胡索乙素和脱氢紫堇碱的基质效应分别为 96%、85%、93%、93%,表明基质对含量测定的影响较小。

4 结论

本研究采用 UPLC-MS/MS 法同时测定妇康片中 4 种生物碱的含量,方法灵敏度高、实用性强、重复性好,可用于妇康片中益母草和延胡索的质量控制。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国卫生部药品标准(中药成方制剂第十二册)[S]. 1997: 56.

[2] 国家食品药品监督管理总局. 妇康片: 国家药品标准(WS₃-B-2319-97-1-15)[S]. 2014.

[3] 谢思敏, 陈俊妃, 黄浩宇, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定妇康片中 11 种人参皂苷的含量[J]. 中成药, 2024, 46(9): 2858-2863.

[4] 肖林林. 妇康片的薄层色谱鉴别研究[J]. 江西中医药, 2012, 43(10): 66-67.

[5] 孟淑智, 杨君. 妇康片中人参白芍当归的薄层色谱鉴别[J]. 辽宁中医学院学报, 2005, 7(2): 163.

[6] 李中娥, 王春颖. HPLC 同时测定妇康片中芍药苷和阿魏酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 143-145.

[7] 马杰. HPLC 法测定妇康片中阿魏酸的含量[J]. 中国当代医药, 2009, 16(7): 170-171.

[8] 夏军龙, 张鹏, 李巧如, 等. HPLC 法测定妇康片中延胡索乙素的含量[J]. 现代中医药, 2006, 26(4): 48-50.

[9] 魏桂林, 李泽玲, 吴珺, 等. RP-HPLC 波长切换法同时测定妇康片中 3 种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(11): 58-61.

[10] 王美多, 温畅. 高效薄层色谱法测定妇康片中盐酸水苏碱的含量[J]. 内蒙古石油化工, 2014, 40(18): 20-21.

[11] 王世清. 不同方法测定六味地黄丸(浓缩丸)中熊果酸含量的比较[J]. 中医学报, 2011, 26(10): 1215-1216.

[12] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 145-146, 302-303.

[13] Tian B, Tian M, Huang SM. Advances in phytochemical and modern pharmacological research of *Rhizoma Corydalis* [J]. Pharm Biol, 2020, 58(1): 265-275.

[14] 高风, 郭丽君, 王安铸, 等. 脱氢紫堇碱的药理作用研究现状与展望[J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(11): 5377-5380.

[15] 周红玲, 刘阳. LC-MS/MS 法测定益母颗粒中盐酸水苏碱的含量[J]. 中南药学, 2014, 12(8): 805-808.

[16] 李振雨, 丁青, 吕渭升, 等. 基于 UHPLC-Q-exactive obitrap MS 的延胡索醋制前后化学成分分析[J]. 中南药学, 2021, 19(8): 1537-1542.

[17] 王荣, 刘艳芳, 王超然, 等. 生物碱的高效液相色谱分离分析与纯化制备研究进展[J]. 分析测试学报, 2019, 38(5): 586-594.

[18] 樊轻亚, 许卫军, 代春美. 双水相萃取/超高效液相色谱-串联质谱法测定倒提壶中 8 种生物碱[J]. 分析测试学报, 2019, 38(11): 1328-1334.

[19] 闫君, 陈婷, 张婕, 等. 农药残留检测的基质效应研究综述[J]. 食品科技, 2024, 49(6): 335-341.

[20] 王鹏, 蒋学华, 王凌. LC-MSⁿ 应用于生物样品检测中基质效应的评价[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(20): 1953-1956.

[21] 张圆圆, 刘磊, 李娜, 等. 农药残留检测中不同蔬菜的基质效应[J]. 农药学学报, 2019, 21(3): 327-337.

[22] 李纯, 陈俊妃, 熊颖, 等. QuEChERS/高效液相色谱-串联质谱法测定黄金罗汉果中 50 种常用农药残留[J]. 分析测试学报, 2022, 41(12): 1793-1799.

(收稿日期: 2025-03-11; 修回日期: 2025-05-06)

红背叶根及其混淆品的鉴别研究

陈家仪¹, 叶伟霞¹, 侯惠婵^{1*}, 洪晓茜¹, 陈奕霖¹, 黄晓丹², 黄燕卿², 朱焕容² (1.广州市药品检验所/国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室, 广州 510160; 2.广州王老吉药业股份有限公司, 广州 510450)

摘要: **目的** 对红背叶根及其混淆品白背叶根、苕麻根进行鉴别研究, 为红背叶根的准确鉴定及质量控制提供研究思路。**方法** 采用药材性状鉴定、组织和粉末显微鉴定、薄层色谱鉴定以及 HPLC 指纹图谱等方法, 在不同层面对红背叶根及其混淆品进行鉴别研究。**结果** 红背叶根与白背叶根及苕麻根在药材性状、组织和粉末显微特征、薄层色谱等方面均存在差异, 建立了红背叶根及其混淆品的 HPLC 指纹图谱, 共标定了红背叶根 11 个共有峰, 峰 4、5、6、7 以及峰 11 为红背叶根特有峰, 其中峰 7 鞣花酸可作为鉴别红背叶根及其混淆品的指标性成分。**结论** 所建立的鉴定方法能够快速、有效地鉴别红背叶根药材, 为完善红背叶根药材质量标准提供依据。

关键词: 红背叶根; 混淆品; 性状鉴别; 显微鉴别; 薄层鉴别; 指纹图谱

中图分类号: R283, R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)12-3685-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.032

Identification of *Alchornea Trewioides* and its adulterants

CHEN Jiayi¹, YE Weixia¹, HOU Huichan^{1*}, HONG Xiaoxi¹, CHEN Yilin¹, HUANG Xiaodan², HUANG Yanqing², ZHU Huanrong² (1. NMPA Key Laboratory for Quality Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou Institute for Drug Control, Guangzhou 510160; 2. Guangzhou Wanglaoji Pharmaceutical Company Limited, Guangzhou 510450)

Abstract: Objective To provide new research ideas for the accurate identification and quality control of *Alchornea trewioides*, and systematically identify *Alchornea trewioides*, *Mallotus apelta* and *Boehmeria nivea*. **Methods** To identify *Alchornea trewioides* and its adulterants based on character identification, microscopic identification, thin-layer chromatography and high performance liquid chromatograph fingerprints. **Results** Significant differences were found between *Alchornea trewioides* and its adulterants by character identification, microscopic identification, and thin-layer chromatography. The high performance liquid chromatograph fingerprints of *Alchornea trewioides* and its adulterants were established, and 11 common peaks were identified. Peaks 4, 5, 6, 7, and 11 were characteristic peaks of *Alchornea trewioides*, among which peak 7 (ellagic acid) was ultimately selected as the indicator component for *Alchornea trewioides* and its adulterants. **Conclusion** The established method can rapidly and effectively identify *Alchornea trewioides* and provide a theoretical basis for improving the quality standard of *Alchornea trewioides*.

Key words: *Alchornea trewioides*; adulterant; character identification; microscopic identification; thin-layer chromatography identification; fingerprint

红背叶根为大戟科植物红背山麻杆 *Alchornea trewioides* (Benth.) Muell.Arg. 的干燥根和根茎^[1]。《中华本草》《中药大辞典》《全国中草药汇编》以及《广东中药志》第二卷均有记载^[2-5]。红背叶根在广

东、广西两地资源相当丰富, 药用历史悠久。本品性味甘, 微寒, 具有清热利湿、散瘀止血的功效, 民间常采用红背叶根治疗各种肝炎、慢性支气管炎、痢疾、尿路结石等疾病, 具有保肝护肝、

基金项目: 2024 年广东省中药材标准体系建设项目 (No.SN2024021)。

作者简介: 陈家仪, 女, 副主任中药师, 主要从事中药及中药制剂质量标准研究, email: 463122928@qq.com *通信作者: 侯惠婵, 女, 主任中药师, 主要从事中药及中药制剂的质量标准研究, email: 1732807959@qq.com

抗肾间质纤维化、镇咳、抗炎、抗菌、抗肿瘤等药理作用^[6-7]。红背叶根的主要化学成分有酚类成分、黄酮类成分、多酚类成分、奎宁类成分等^[8]。《卫生部药品标准》中药成方制剂第十四册收录的慢支紫红丸，其处方中红背叶根为君药^[1]。红背叶根民间临床应用广泛且历史悠久，是岭南医药中具有良好开发利用潜力的特色药用植物资源。由于红背叶根暂未有法定标准，民间采挖时，常把植物形态相似、同样具有抗肝炎、抗菌作用的大戟科白背叶 *Mallotus apelta* (Lour.) Muell.Arg. 和荨麻科苎麻 *Boehmeria nivea* (L.) Gaud. 的干燥根和根茎也作为红背叶根药材使用，极大地影响了临床用药准确性和安全性。为了避免商品市场上的误用和乱用，本研究拟从性状鉴定、显微鉴定、薄层鉴定和指纹图谱等方面对红背叶根及其混淆品白背叶根和苎麻根进行系统比较，旨在建立一种简便易行的方法，快速鉴别红背叶根与其混淆品白背叶根和苎麻根，以保证临床用药的安全和有效。

1 材料

红背叶根样品共 10 批 (M1 ~ M10)，分别采自广西壮族自治区靖西市、玉林市和广东省广州市、佛山市，经广州市药品检验所侯惠婵主任中药师鉴定为大戟科植物红背山麻杆 *Alchornea trewioides*

(Benth.) Muell.Arg. 的全株；白背叶根采自广西，经鉴定为大戟科植物白背叶 *Mallotus apelta* (Lour.) Muell.Arg. 的全株；苎麻根采自广东省广州市南沙区横沥镇冯马三村，经鉴定为荨麻科植物苎麻 *Boehmeria nivea* (L.) Gaud. 的全株。再取其药用部位根和根茎，洗净，晒干，加工为试验药材。

鞣花酸对照品 (批号：111959-201903，质量分数：88.8%)、没食子酸对照品 (批号：110831-202407，质量分数：90.8%) (中国食品药品检定研究院)；乙腈 (色谱纯，美国飞世尔试剂公司)；水为超纯水；其余试剂均为分析纯。

FUJIFILM FINEPIX S8100 型相机 (日本富士胶片株式会社)；OLYMPUS BX53 型显微镜及成像系统 (日本奥林巴斯株式会社)；CAMAG 薄层数码成像系统 (瑞士卡玛公司)；Shimadzu LC-40D 型高效液相色谱仪 (日本岛津公司)；Mettler AE240 型电子天平 (瑞士梅特勒公司)；色谱柱 Inertsil ODS-3 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) (日本 GL Sciences 公司)。

2 方法与结果

2.1 性状鉴别

观察记录红背叶根、白背叶根与苎麻根的形状、大小、表面、色泽、质地、断面、气味等特征，并进行了比较分析。结果见表 1 及图 1。

表 1 红背叶根及其混淆品性状比较
Tab 1 Character identification results of *Alchornea trewioides* and its adulterants

样品	性状类别					
	形状	直径/cm	表面特征	横切面	质地及断面	气味
红背叶根	类圆柱形	0.5 ~ 3	灰黄色至灰棕色，具不规则纵皱纹或密集皮孔样突起	外皮部极薄，木部可见放射状纹理或年轮状环纹，小孔不明显	质坚硬，不易折断，略带纤维性	气微，味淡、微苦
白背叶根	长圆锥形	1 ~ 3	棕黄色或浅棕褐色，具细纵皱纹或稀疏小点状斑痕	外皮部薄，木部放射状纹理不明显，小孔不明显	质坚硬，不易折断，略带纤维性	气微，味苦、微涩
苎麻根	不规则长圆柱形	0.8 ~ 2	灰棕色至红棕色，具极粗糙纵皱纹或稀疏类圆形皮孔样突起	外皮部稍厚，木部放射状纹理或同心环纹明显，小孔明显且密集	质硬脆，易折断，纤维性强	气微，味淡，嚼之略有黏性

除表 1 中信息外，红背叶根有分枝，表面偶见瘤状突起。外皮部黄褐色，易与木部分离；木部浅黄色，根茎髓部浅黄色。白背叶根 (混淆品) 少有分枝，稍弯曲。外皮部棕色，易与木部分离；木部黄白色，根茎髓部黄白色。苎麻根 (混淆品) 表面粗糙，稍弯曲，残留须根较多。外皮部灰褐色，木部淡棕色，根茎髓部棕色或中空。

2.2 显微鉴别

2.2.1 横切面 红背叶根、白背叶根、苎麻根三者药材根横切面相似，主要区别点见表 2，根部位横切面显微图见图 2。红背叶根木栓层列数较少。皮层狭窄，纤维较少；散在或成群，皮层及韧皮薄壁细胞内含有较多草酸钙簇晶，方晶偶见。木

质部宽广，木射线宽 1 ~ 2 列细胞，不明显，较其他细胞稍长，导管密集。白背叶根 (混淆品) 木栓层列数较少。皮层宽，纤维群多；形成 3 ~ 5 环列，皮层及韧皮薄壁细胞内含有较多草酸钙方晶，簇晶偶见。木质部宽广，木射线宽 1 ~ 2 列细胞，明显，较其他细胞长大，导管较密集，年轮处导管较大，向外渐小。苎麻根 (混淆品) 木栓层列数较多。皮层宽，纤维多；散在或成群，皮层及韧皮薄壁细胞内含有极多草酸钙簇晶，方晶偶见。木质部宽广，木射线宽 2 ~ 10 列细胞，明显，可见方晶，导管稀疏。三者根茎中心均有髓，薄壁细胞中含有淀粉粒、草酸钙方晶或簇晶。

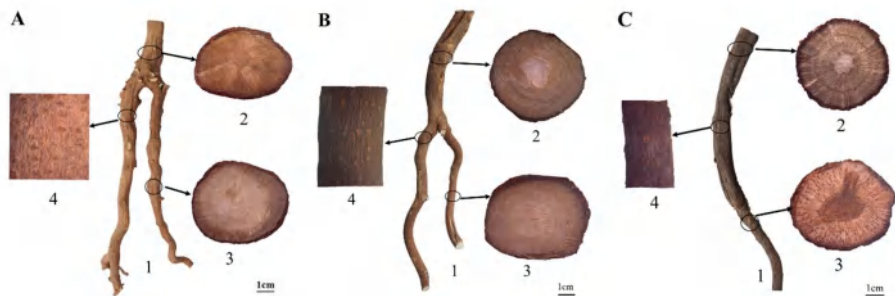


图 1 红背叶根及其混淆品根性状-微性状特征图

Fig 1 Morphological and micro-morphological character of *Alchornea trewioides* and its adulterants

A.红背叶根 (*Alchornea trewioides*)；B.白背叶根 (*Mallotus apelta*)；C. 苕麻根 (*Boehmeria nivea*)；1. 药材 (crude drugs)；2. 根茎横切面 (rhizoma transection)；3. 根横切面 (radix transection)；4. 表面特征 (surface character)

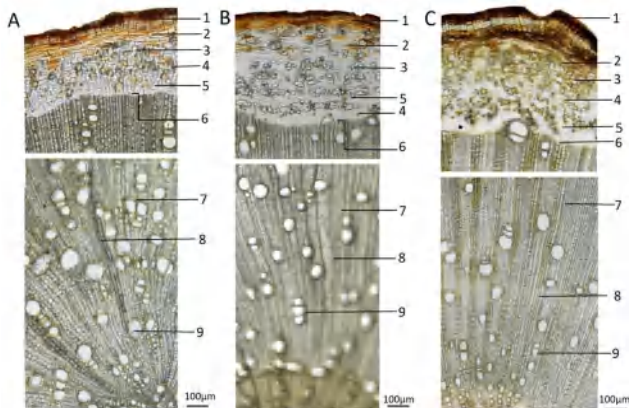


图 2 红背叶根及其混淆品根部横切面显微特征图

Fig 2 Microscopic-characteristics of the cross-section of root of *Alchornea trewioides* and its adulterants

A.红背叶根 (*Alchornea trewioides*)；B.白背叶根 (*Mallotus apelta*)；C. 苕麻根 (*Boehmeria nivea*)；1. 木栓层 (cork)；2. 皮层 (cortex)；3. 纤维 (xylon)；4. 草酸钙簇晶 (calcium oxalate cluster crystal)；5. 韧皮部 (phloem)；6. 形成层 (cambium)；7. 木质部 (xylem)；8. 木射线 (wood ray)；9. 导管 (catheter)

2.2.2 粉末鉴别 红背叶根、白背叶根、苕麻根三者药材粉末显微主要区别点在纤维的形态、草酸钙结晶直径以及数目、导管类型、淀粉粒数目等, 分析和比较结果见表 2, 粉末显微图见图 3。红背叶根粉末浅黄棕色。纤维成束或散离, 长梭形, 壁厚, 先端渐尖或圆钝。草酸钙簇晶直径 10 ~ 23 µm, 散在或排列成行, 草酸钙方晶偶见。具缘纹孔导管多见。石细胞偶见, 孔沟明显。白背叶根 (混淆品) 粉末黄白色或浅灰黄色。纤维成束, 壁厚, 周围薄壁细胞含草酸钙方晶, 形成晶纤维。草酸钙簇晶, 偶见, 直径 8 ~ 30 µm。具缘纹孔导管多见。苕麻根 (混淆品) 粉末黄棕色。淀粉粒甚多, 单粒类球形、椭圆形或卵圆形, 直径 8 ~ 20 µm, 脐点点状; 复粒由 2 ~ 3 分粒组成。分泌道细胞内含红棕色分泌物。草酸钙簇晶极多, 直径 10 ~ 25 µm, 草酸钙方晶少见。纤维成束或散离, 细长条形, 壁厚。网纹导管、梯纹导管、

表 2 红背叶根及其混淆品主要显微鉴别特征

Tab 2 Main microscopic-characteristics of *Alchornea trewioides* and its adulterants

样品	横切面类别					粉末类别			
	木栓层	皮层	结晶	木质部	木射线	纤维	淀粉粒	分泌细胞	导管
红背叶根	8 ~ 10 列	狭窄, 纤维散在	草酸钙簇晶较多, 方晶偶见	导管密集	不明显, 1 ~ 2 列细胞	先端渐尖或圆钝	少见	少见	具缘纹孔导管
白背叶根	8 ~ 12 列	宽, 纤维成群, 3 ~ 5 列	草酸钙方晶较多, 簇晶偶见	导管较密集	明显, 1 ~ 2 列细胞	晶纤维多见	少见	少见	具缘纹孔导管
苕麻根	10 ~ 15 列	宽, 纤维散在	草酸钙簇晶极多, 方晶偶见	导管稀疏	明显, 2 ~ 10 列细胞	细长条形	众多	多见	网纹、梯纹、螺旋及具缘纹孔导管

螺旋导管及具缘纹孔导管为主。三者木栓细胞类多角形或类方形; 内含棕色至红棕色物。木射线细胞类方形或类长方形, 壁呈连珠状增厚。

2.3 薄层色谱鉴别

取红背叶根、白背叶根、苕麻根粉末 2 g, 加乙醇 50 mL, 水浴加热回流 1 h, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。取鞣花酸对照品 1 mg, 加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 鞣

花酸的溶液, 作为对照品溶液。分别精密吸取对照品溶液 2 ~ 4 µL、供试品溶液各 2 ~ 6 µL, 分别点于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上, 以甲苯 - 乙酸乙酯 - 甲醇 - 甲酸 (5 : 4 : 1 : 1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外线灯 (254 nm) 下检视。结果 10 批红背叶根供试品色谱与鞣花酸对照品色谱相应的位置上, 均显示相同的斑点, 而白背叶根和苕麻根供试品色谱在与鞣花酸对照品色谱相应的



图3 红背叶根及其混淆品根粉末显微特征图

Fig 3 Main powder characteristics characteristics of *Alchornea trewioides* and its adulterants

A. 红背叶根 (*Alchornea trewioides*); B. 白背叶根 (*Mallotus apelta*); C. 苕麻根 (*Boehmeria nivea*); 1. 纤维 (xylon); 2. 草酸钙簇晶 (calcium oxalate cluster crystal); 3. 草酸钙方晶 (calcium oxalate cristobalite); 4. 木栓细胞 (cork cell); 5. 木射线细胞 (wood ray cell); 6. 导管 (catheter); 7. 石细胞 (stone cell); 8. 淀粉粒 (starch granule); 9. 分泌细胞 (secretory cells)

位置上,均未显示任何斑点,表明该展开体系可较好地区分红背叶根及其混淆品白背叶根和苕麻根,可用于三者的快速鉴别(见图4)。

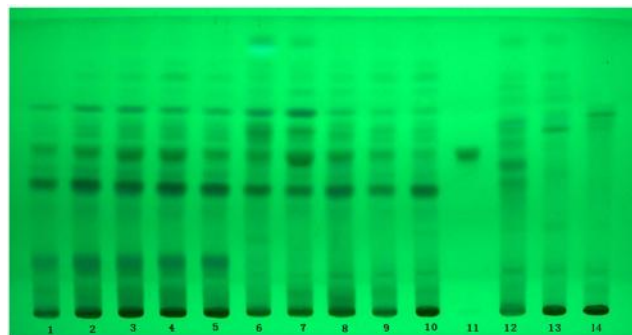


图4 红背叶根及其混淆品薄层色谱图

Fig 4 Thin-layered chromatogram of *Alchornea trewioides* and its adulterants

1 ~ 10. 红背叶根 (*Alchornea trewioides*) (M1 ~ M10); 11. 鞣花酸 (ellagic acid); 12. 白背叶根 (*Mallotus apelta*); 13 ~ 14. 苕麻根 (*Boehmeria nivea*)

2.4 指纹图谱研究

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 ACE Excel5 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 (A) - 0.1% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 40 min, 8% ~ 30%A; 40 ~ 50 min, 30% ~ 45%A); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 254 nm; 柱温: 25 °C; 进样量: 10 μL。

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称取没食子酸、鞣花酸对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 各含 50 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.4.3 供试品溶液的制备 取红背叶根、白背叶根、苕麻根粉末 (过 3 号筛) 约 2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加乙醇 50 mL, 水浴加热回流 60 min, 放冷, 滤过, 滤渣用乙醇多次洗涤, 洗涤液与滤液一并蒸干, 残渣加甲醇使溶解, 移至

5 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液。

2.4.4 精密度试验 精密吸取红背叶根供试品溶液, 连续进样 6 次, 记录色谱图。以鞣花酸 (7 号峰) 为参照峰, 计算得各共有峰相对保留时间及相对峰面积 RSD 分别小于 0.15%、0.75%, 表明仪器精密度良好。

2.4.5 稳定性试验 取红背叶根供试品溶液, 分别在 0、4、8、12、24、36 h 进样, 记录色谱图, 以鞣花酸 (7 号峰) 为参照峰, 计算得 36 h 内各共有峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 分别小于 0.52%、2.2%, 表明供试品溶液在 36 h 内稳定。

2.4.6 重复性试验 取红背叶根样品 6 份, 按“2.4.3”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 记录色谱图, 以鞣花酸 (7 号峰) 为参照峰, 计算得各共有峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 分别小于 0.51%、2.6%, 表明方法重复性良好。

2.4.7 指纹图谱建立及相似度评价 取 10 批红背叶根样品, 按“2.4.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.4.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。将数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统” (2012 版), 采用中位数法进行多点校正生成指纹图谱共有模式及对照指纹图谱^[9-11]。结果共确定红背叶根共有峰 11 个, 与对照品比对, 共指认出 2 个共有峰: 2 号峰为没食子酸、7 号峰为鞣花酸 (见图 5)。对照指纹图谱与各批次样品图谱进行相似度评价, 10 批红背叶根样品, M1 ~ M10 样品相似度较高, 分别为 0.995、0.984、0.989、0.990、0.973、0.965、0.982、0.975、0.983、0.994, 表明红背叶根各批次间质量差异较小, 整体质量相对稳定。

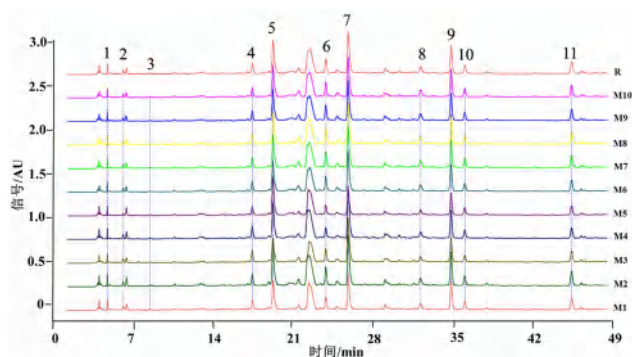


图 5 10 批红背叶根的 HPLC 指纹图谱

Fig 5 HPLC fingerprint of *Alchornea trewioides*

2.4.8 红背叶根与其混淆品的化学成分差异性研究

按上述指纹图谱条件进样分析, 获得红背叶根及其混淆品的指纹图谱 (见图 6)。结果显示: ① 红背叶根指纹图谱共有峰 11 个, 其中峰 2 为没食子酸, 峰 7 为鞣花酸; ② 白背叶根未检出红背叶根 4~7 号、11 号共有峰, 检出红背叶根 1~3 号、8 号、10 号共有峰, 但含量均较低; ③ 苧麻根未检出红背叶根 4~11 号共有峰, 检出红背叶根 1~3 号共有峰。可见, 本试验建立的红背叶根指纹图谱能直观、清晰、全面地反映出红背叶根与其混淆品 (白背叶根、苧麻根) 的化学成分差异, 其中鞣花酸专属性较强, 在两种混淆品中均未检出。

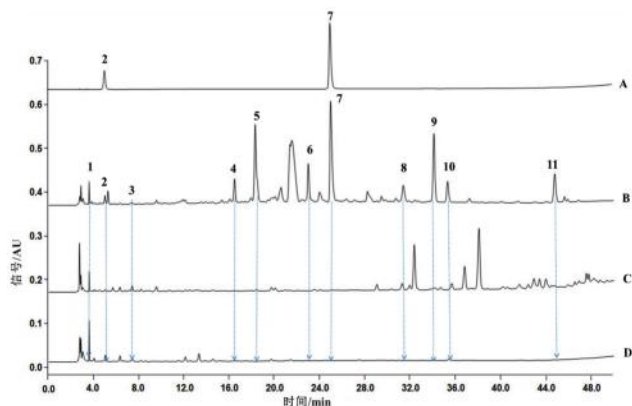


图 6 红背叶根及其混淆品指纹图谱

Fig 6 HPLC chromatograms of *Alchornea trewioides* and its adulterants
A. 混合对照品溶液 (mixed references); B. 红背叶根 (*Alchornea trewioides*); C. 白背叶根 (*Mallotus apelta*); D. 苧麻 (*Boehmeria nivea*); 2. 没食子酸 (gallic acid); 7. 鞣花酸 (ellagic acid)

3 讨论

本试验梳理出红背叶根及其混淆品在性状、组织和粉末显微特征方面的鉴别要点: 表面颜色、纵皱纹粗细、皮孔样附属器的形态等可作为具有鉴别意义的性状特征; 组织和粉末显微特征可重点关注木射线细胞形态及列数、草酸钙簇晶及方晶的数目及分布位置、纤维或纤维束的形态等进行鉴别。通过上述鉴别要点可快速而又准确地鉴

别红背叶根及其混淆品白背叶根及苧麻根。

药理研究表明, 鞣花酸具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、心血管保护、肝脏保护、调节血糖、抑菌等作用^[12-13]。从薄层色谱结果可见, 红背叶根中含有鞣花酸成分, 其混淆品白背叶根及苧麻根中未检出鞣花酸, 因此本试验选择鞣花酸作为指标成分可以快速而简便地区别三者。从指纹图谱分析结果可见, 红背叶根指纹图谱能呈现 11 个稳定的共有峰, 其中 2 号峰为没食子酸、7 号峰为鞣花酸, 红背叶根与其混淆品指纹图谱共有峰数目较少、化学成分差异大, 其中鞣花酸专属性较强, 在两种混淆品中均未检出。

综上所述, 本试验建立了红背叶根的性状鉴别、组织和粉末显微鉴别、薄层色谱鉴别, 同时建立了红背叶根的 HPLC 指纹图谱, 可以快速准确地鉴别红背叶根及其混淆品, 为红背叶根的质量标准研究提供参考。

参考文献

- [1] 梁冰, 屈信成, 覃兰芳, 等. 壮药红背娘质量标准研究[J]. 中医药导报, 2018, 24(2): 40-43.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草: (第四册)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 755-756.
- [3] 南京中医药大学. 中药大辞典 (上册)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 1400-1401.
- [4] 王国强. 全国中草药汇编 (第 3 版, 卷二)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 117-118.
- [5] 广东中药志编辑委员会. 广东中药志 (第二卷)[M]. 广州: 广东科技出版社, 1996: 365-367.
- [6] 冯守爱, 覃日懂, 韦康, 等. 红背山麻杆根中 PTP1B 抑制活性成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(12): 1915-1918.
- [7] 黄洁春, 熊苗, 刘强, 等. 红背叶根生物碱对急性肝损伤小鼠的预防保护作用[J]. 陕西中医, 2016, 37(5): 628-630.
- [8] 陈淳. 红背叶根醇提物的药效学及化学成分的初步研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2015.
- [9] 贾苗苗, 吴明慧, 谢和兵, 等. 藏药痛风丸 HPLC 特征图谱及 7 种成分含量测定研究[J]. 中南药学, 2025, 23(3): 668-673.
- [10] 王贺伟, 刘亭阳, 任盈盈, 等. 茵陈果饮片标准汤剂质量标准研究[J]. 中南药学, 2025, 23(3): 725-729.
- [11] 汪怡, 郭曼曼, 徐倩菲, 等. 基于指纹图谱结合化学模式识别以及网络药理学筛选经典方剂旋覆代赭汤的质量标志物[J]. 中南药学, 2025, 23(2): 385-391.
- [12] 陈婷婷, 吴宿慧, 李根林, 等. 鞣花酸类成分的肠道菌代谢过程及其药理作用变化研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(21): 2982-2989.
- [13] 郝志清, 谢婧, 李丽华. 鞣花酸对纳米二氧化钛颗粒诱导肝损伤的保护作用及其机制[J]. 遵义医科大学学报, 2024, 47(6): 577-586.

(收稿日期: 2025-03-09; 修回日期: 2025-04-10)

中药资源开发与利用

基于稻芽炮制原理及市场调研对《中国药典》稻芽炮制品标准修订的思考

杨超, 李千, 张海霞, 姜水蓝, 刘艺淇, 王煜杰, 张欣悦, 马廷轩, 徐新房*, 李向日* (北京中医药大学中药学院/国家中医药管理局中药炮制技术传承基地/中药品质评价北京重点实验室, 北京 102488)

摘要: **目的** 基于稻芽炮制原理的初步探究及市场研究现状对《中国药典》稻芽炮制品标准的修订提出思考与建议。**方法** 按照 2020 年版《中国药典》四部通则 2201 浸出物测定法测定浸出物; 采用 CM-5 分光测色计测定色差值; 运用 3, 5-二硝基水杨酸比色法 (DNS 法) 测定淀粉酶活力。结合 Spearman 相关性分析考察出芽率与浸出物的相关性; t 检验及单因素方差分析考察不同样品之间相关指标的差别。**结果** 稻谷发芽过后, 浸出物和淀粉酶活力显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且炒稻芽、焦稻芽的浸出物显著高于炒稻谷、焦稻谷 ($P < 0.05$); 市售稻芽的出芽率与浸出物呈显著正相关 ($P < 0.05$), 市售炒稻芽及焦稻芽的出芽率大部分未达到 85% 且稻芽炮制品色差值跨度范围较大; 基于性状与出芽率及炮制程度的相关性, 制订了稻芽炮制品性状评价标准。**结论** 通过建立稻芽炮制品的性状标准可以很好地保证其炮制原料及炮制程度合格, 控制其质量。

关键词: 稻芽; 炒稻芽; 焦稻芽; 浸出物; 淀粉酶活力; 色差值

中图分类号: R283

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)12-3690-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.033

Revision of the standard of rice bud products in *Chinese Pharmacopoeia* based on the principle of rice bud processing and market research

YANG Chao, LI Qian, ZHANG Haixia, JIANG Shuilan, LIU Yiqi, WANG Yujie, ZHANG Xinyue, MA Tingxuan, XU Xinfang*, LI Xiangri* (School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine/Traditional Chinese Medicine Processing Technology Inheritance Base of National Administration of Traditional Chinese Medicine/Beijing Key Laboratory of Quality Evaluation of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488)

Abstract: Objective To suggest revisions for the standard for processed products of rice buds in *Chinese Pharmacopoeia* based on the processing principles and market research. **Methods** The extractives were determined in accordance with the determination method of extractives 2201 of General Chapter IV of the 2020 Edition of the *Chinese Pharmacopoeia*. The color difference was determined by the CM-5 spectrophotometer. The activity of amylase was determined by the 3, 5-dinitrosalicylic acid colorimetric method (DNS method). Spearman correlation analysis helped investigate the correlation between the germination rate and the extract. The t -test and one-way analysis of variance were used to detect the difference in related indicators among samples. **Results** After the rice germination, the extractive and amylase activities increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), resulting in the extractives of fried buds and burnt buds being much higher than those of fried rice and burnt rice ($P < 0.05$). A significant positive correlation was observed between the germination rate and the extractives of commercially available rice buds ($P < 0.05$).

基金项目: 国家重点研发计划项目 (No.2019YFC1711502)。

作者简介: 杨超, 男, 硕士研究生, 主要从事中药品质评价与中药炮制相关研究, email: 17596573409@163.com * **通信作者:** 徐新房, 男, 博士, 助理研究员, 主要从事中药炮制及其药效物质基础研究, email: xuxinfang007@163.com; 李向日, 女, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药品质评价与中药炮制相关研究, email: lixiangri@sina.com

The germination rates of commercially available stir-fried rice buds and charred rice buds mostly failed to reach 85%, and the color difference in rice bud processed products was large. Based on the correlation between morphological characteristics, germination rate, and processing degree, the evaluation standard for the morphological characteristics of processed rice buds was established. **Conclusion** By establishing characteristic standards for rice sprout processed products, it is possible to ensure that their processing materials and degree are qualified, and to control their quality.

Key words: rice bud; fried rice bud; burnt rice bud; extractive; amylase activity; color difference

稻芽为禾本科植物稻 (*Oryza sativa* L.) 的成熟果实经发芽干燥的炮制加工品。《中国药典》2020 年版收载的稻芽的饮片规格为稻芽、炒稻芽及焦稻芽。稻芽性甘、温，归脾、胃经，具有消食和中、健脾开胃的功效，用于食积不消、腹胀口臭、脾胃虚弱、不饥食少。炒稻芽偏于消食，用于不饥食少；焦稻芽善化积滞，用于积滞不消^[1]。目前关于稻芽发芽前后的物质成分变化的研究尚不多见，淀粉酶作为稻芽的主要有效成分，浸出物可作为中药质量标准控制项，稻芽发芽前后两者的具体变化尚不清楚；此外，稻芽不同炮制品的对比研究仅比较了 α -淀粉酶活性及还原糖的含量^[2-3]，其炮制后药效增强的物质基础也未见有相关文献的报道，其炮制原理有待阐明。笔者还收集了市售生稻芽、炒稻芽及焦稻芽各 15 批，调研发现炒稻芽及焦稻芽的出芽率大部分均未达到稻芽药材所规定的 85%，且炒稻芽及焦稻芽的总色差值范围跨度较大，说明不同企业对于炮制终点的判断存在明显差异，稻芽市场现存问题亟须解决。因此本课题组研究了稻谷与稻芽及其炮制品的浸出物、淀粉酶活力和色差值等指标并深入调研了稻芽的市场现状，为建立稻芽炮制品的性状标准提供理论支撑。

1 仪器与试药

1.1 仪器

DFT-50A 手提式高速粉碎机 (温岭市林大机械有限公司)；FA1104 电子天平 (上海乐平科学仪器有限公司)；HH-S6A 电热恒温水浴锅 (北京科伟永兴仪器有限公司)；BPS-100CA 恒温恒湿箱 (上海一恒科学仪器有限公司)；DHG-9070A 电热鼓风干燥箱 (常州诺基仪器有限公司)；PHSJ-4F 实验室 pH 计 (上海仪电科学仪器股份有限公司)；KQ-600DE 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)；HC-3518 高速离心机 (安徽中科中佳科学仪器有限公司)；biotek 酶标仪 - 宝特 Epoch 酶标仪 (美国伯腾仪器有限公司)；柯尼卡美能达 CM-5 分光测色计 (日本柯尼卡美能达公司)；体视显微镜 (上海舜宇恒平科学仪器有限公司)。

1.2 试药

3, 5-二硝基水杨酸 (分析纯, 天津市光复精细化工研究所)；氢氧化钠 (分析纯, 天津市大茂化学

试剂厂)；丙三醇 (分析纯, 萨恩化学技术有限公司)；无水葡萄糖、乙醇、可溶性淀粉 (分析纯、天津市福晨化学试剂厂)；无水醋酸钠 (分析纯, 天津市光复科技发展有限公司)；乙酸 (分析纯, 北京化工厂)。

共收集 3 批稻谷 (稻谷购自安徽亳州, 编号分别为 DG1、DG2 和 DG3)，经北京中医药大学李向日教授鉴定为禾本科植物稻 (*Oryza sativa* L.) 的成熟果实。从全国各地收集稻芽 15 批 (编号 S1 ~ S15)，炒稻芽 15 批 (编号 C1 ~ C15)，焦稻芽 15 批 (编号 J1 ~ J15)，具体样品信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

依照《中国药典》2020 年版中稻谷的发芽方法进行发芽。将 3 批稻谷用水浸泡后，保持适宜的温、湿度，待须根长至约 1 cm 时，干燥，得到稻芽 (DY1 ~ DY3)。稻谷和稻芽分别炒黄和炒焦得到炒稻谷 (CDG1 ~ CDG3)、焦稻谷 (JDG1 ~ JDG3)、炒稻芽 (CDY1 ~ CDY3) 及焦稻芽 (JDY1 ~ JDY3)。

炒稻谷及炒稻芽的炮制方法是：取净稻谷或净稻芽，置热锅内，用文火炒至表面深黄色，有香气，取出，晾凉。焦稻谷及焦稻芽的炮制方法是：取净稻谷或净稻芽，置热锅内，用武火炒至表面焦黄色，有焦香气，取出，晾凉^[4]。炒稻谷和焦稻谷炮制程度与炒稻芽和焦稻芽炮制程度基本一致；《中国药典》2020 年版未对稻芽及其炮制品饮片的性状作出描述，稻芽饮片性状同药材，因此我们着重观察了炒稻芽及焦稻芽的饮片性状 (见图 1 及图 2) 及粉末颜色特征 (见图 3)，具体直观性状描述见表 2。

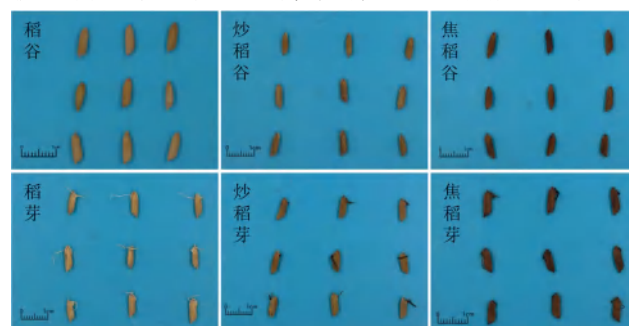


图 1 稻谷、稻芽及其炮制品外观性状图

Fig 1 Appearance characteristics of rice, rice buds and their processed products

表 1 市售稻芽及其炮制品样品信息

Tab 1 Information of commercially available rice sprouts and their processed products

编号	产地	批号	编号	产地	批号	编号	产地	批号
S1	河北	1901006	C1	河北	1907005	J1	赣州	210501
S2	广东	210300201	C2	广东	210802221	J2	四川	20120102
S3	黑龙江	2109005	C3	北京	191112001	J3	北京	210908007
S4	江苏	A210903	C4	江苏	A211019	J4	江苏	1911072
S5	赣州	211001	C5	黑龙江	2110001	J5	江苏	A213002
S6	四川	20070103	C6	江苏	20210516	J6	安徽	200917
S7	江苏	1911024	C7	安徽	20181201	J7	广东	212352
S8	河北	20201006	C8	四川	21090104	J8	广东	210311231
S9	广东	210401	C9	安徽	200701	J9	河北	B6103131
S10	河北	20231104	C10	四川	200801	J10	黑龙江	2111001
S11	四川	C162220501	C11	重庆	2106012	J11	四川	20210901
S12	河北	231201921	C12	安徽	900021456	J12	河北	20170530
S13	四川	240101	C13	江苏	210201	J13	赣州	211016
S14	江苏	23010702	C14	河北	20210715	J14	赣州	221201
S15	安徽	220401	C15	浙江	200818	J15	江苏	23010907

表 2 炒稻芽和焦稻芽直观性状描述

Tab 2 Descriptive characteristics of fried rice buds and charred rice buds

编号	性状
CDY1	饮片形如稻芽，表面深黄色，偶有焦斑；须根常断裂，白色茸毛残留或脱落；有香气，味微苦；粉末深黄色，偏黄
CDY2	饮片形如稻芽，表面深黄色，焦斑稍多；须根常断裂，白色茸毛多脱落；有香气，味微苦；粉末深黄色，偏黄褐色
CDY3	饮片形如稻芽，表面深黄色，偶有焦斑；须根常断裂，白色茸毛残留或脱落；有香气，味微苦；粉末深黄色，偏黄
JDY1	饮片形如稻芽，表面焦黄色至焦褐色，有部分裂开；须根断裂，白色茸毛脱落；有焦香气，味微苦；粉末焦褐色，偏褐色
JDY2	饮片形如稻芽，表面焦黄色，有部分裂开；须根断裂，白色茸毛脱落；有焦香气，味微苦；粉末黄褐色，偏褐色
JDY3	饮片形如稻芽，表面焦黄色，有部分裂开；须根断裂，白色茸毛脱落；有焦香气，味微苦；粉末黄褐色，偏褐色

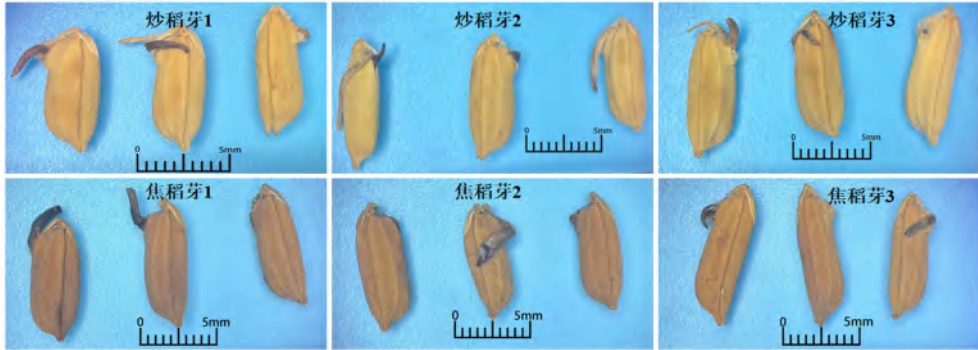


图 2 炒稻芽及焦稻芽表面观图

Fig 2 Appearance of fried rice buds and charred rice buds

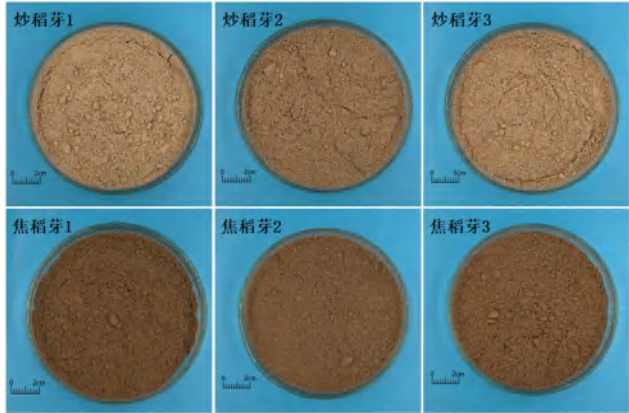


图 3 炒稻芽及焦稻芽粉末图

Fig 3 Powder pictures of fried rice buds and charred rice buds

2.2 水分、浸出物及出芽率的测定

按照 2020 年版《中国药典》通则 0832 第二法测水分；以 50% 乙醇为溶剂，通则 2201 浸出物测定法热浸法测定浸出物；取稻芽样品，按照药材取样法^[4]（通则 0211），分取对角两份供试品至约 10 g，检查出芽粒数与总粒数，计算出芽率。结果见表 3、表 4。

2.3 色差值的测定

每批样品取 200 g 粉碎，使 95% 以上过二号筛，未能过二号筛的与已过筛的粉末合并，混合均匀。每批样品重复测定 3 次，以平均值为最终测定结果。使用柯尼卡美能达 CM-5 分光测色计测量饮片粉末的颜色，取各粉末置培养皿中，约为 1/2 的体积，光源 D65，照明系统为 SCE

表 3 稻谷、炒稻谷、焦稻谷、稻芽、炒稻芽、焦稻芽的水分、浸出物及出芽率测定 (n = 2)

Tab 3 Moisture, extractives and germination rate of rice, fried rice, charred rice, rice buds, fried rice buds and charred rice buds (n = 2)

编号	水分 /%	浸出物 /%	编号	水分 /%	浸出物 /%	出芽率 /%
DG1	10.6	4.2	DY1	7.0	6.4	89
DG2	12.2	4.9	DY2	7.4	6.7	92
DG3	11.9	4.7	DY3	7.2	7.2	98
CDG1	2.8	4.0	CDY1	2.7	5.2	/
CDG2	3.8	4.2	CDY2	2.9	5.2	/
CDG3	3.0	3.6	CDY3	2.7	5.3	/
JDG1	1.0	6.3	JDY1	1.1	10.7	/
JDG2	1.5	5.7	JDY2	1.1	8.2	/
JDG3	1.2	5.6	JDY3	1.2	8.0	/

表 4 稻芽、炒稻芽、焦稻芽的水分、浸出物及出芽率测定 (n = 2)

Tab 4 Moisture, extractive and germination rate of rice buds, fried rice buds and charred rice buds (n = 2)

编号	水分 /%	浸出物 /%	出芽率 /%	编号	水分 /%	浸出物 /%	出芽率 /%
S1	7.5	7.2	81	C1	7.4	6.7	92
S2	8.0	11.9	90	C2	7.2	7.2	98
S3	4.9	4.1	33	C3	2.7	5.2	/
S4	9.9	6.4	76	C4	2.9	5.2	/
S5	8.9	8.4	91	C5	2.7	5.3	/
S6	9.9	9.5	88	C6	1.1	10.7	/
S7	7.6	9.3	77	C7	1.1	8.2	/
S8	8.8	8.9	77	C8	1.2	8.0	/
S9	8.1	11.7	97	C9			
S10	9.9	8.7	86	C10			
S11	9.0	8.2	85	C11			
S12	9.9	8.8	93	C12			
S13	8.4	9.2	83	C13			
S14	10.5	6.7	87	C14			
S15	10.6	7.8	72	C15			

表 5 稻谷、炒稻谷、焦稻谷、稻芽、炒稻芽、焦稻芽的颜色测定 (n = 3)

Tab 5 Color determination of rice, fried rice, charred rice, rice buds, fried rice buds and charred rice buds (n = 3)

编号	L* (D65)	a* (D65)	b* (D65)	E*ab	编号	L* (D65)	a* (D65)	b* (D65)	E*ab
DG1	78.11	3.29	16.49	79.9	DY1	81.92	2.37	13.54	83.1
DG2	74.62	3.08	15.56	76.3	DY2	79.73	2.39	13.55	80.9
DG3	76.35	3.66	17.62	78.4	DY3	82.70	2.28	12.73	83.7
CDG1	69.68	6.84	23.12	73.7	CDY1	72.37	6.12	23.46	76.3
CDG2	70.47	5.81	21.44	73.9	CDY2	66.34	7.23	23.79	70.9
CDG3	66.58	7.28	23.71	71.1	CDY3	69.55	7.12	24.36	74.0
JDG1	55.66	8.43	22.78	60.7	JDY1	52.70	9.03	24.67	58.9
JDG2	56.61	8.18	23.18	61.7	JDY2	56.98	8.05	23.20	62.1
JDG3	55.26	8.88	24.05	60.9	JDY3	55.42	8.84	24.62	61.3

mg/mL 内与吸光度值呈良好线性关系。

2.4.5 淀粉酶活力的测定 吸取 1% 可溶性淀粉溶液 1 mL 于对应具塞比色管中，40℃ 水浴保温 5

(Specular Component Excluded) 反射，标准观察角度 10°，测试区域 30 mm，以色空间 L*，a*，b* 进行色泽量化^[5-6]。结果见表 5、6。

2.4 淀粉酶活力的测定

2.4.1 显色剂的配制 称取 3，5 - 二硝基水杨酸 (DNS) 0.65 g 溶于少量纯化水中，移入 100 mL 量瓶中，加 2 mol/L 氢氧化钠溶液 32.5 mL，再加入 4.5 g 丙三醇，摇匀，用纯化水定容至 100 mL，储存于棕色瓶中，放置在冰箱中待用^[7]。

2.4.2 1% 可溶性淀粉溶液及葡萄糖标准溶液的配制 取可溶性淀粉 1.0 g，精密称定，用少量纯化水调匀，倾入已沸纯化水，再加热煮沸至透明，冷却后定容至 100 mL^[8]。取经 105℃ 烘至恒定质量的分析纯葡萄糖，称取约 100 mg，精密称定，用纯化水溶解并定容至 100 mL，保存于 4℃ 冰箱中备用^[9]。

2.4.3 稻芽淀粉酶的提取 取稻芽 2.0 g，精密称定，加入 45 mL 纯化水、5 mL 醋酸钠 - 醋酸缓冲液 (pH 5.60) 充分搅拌浸提，室温条件下提取 15 min，再超声提取 45 min，摇匀，将振荡后的酶液放入离心机中，4000 r/min 离心 8 min，离心结束后平缓取出离心管，避免沉淀物溶解，用移液枪吸取其上清液即为稻芽淀粉酶酶液^[10-11]。

2.4.4 标准曲线的绘制 取 8 支具塞比色管，依次加入 1 mg/mL 葡萄糖溶液 0、0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL，加入显色剂 1.5 mL 摇匀，在沸水浴中反应 5 min，迅速流水冷却，然后加纯化水定容至 5 mL，依次标记为 0 ~ 7 号。以 0 号管作为空白对照，在 540 nm 波长下测各管的吸光度值。以葡萄糖标准溶液浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标绘制标准曲线，得回归方程为 $Y = 2.7794X - 0.0134$ ， $R^2 = 0.9996$ ，结果表明，葡萄糖质量浓度在 0.01 ~ 0.2

min，再加入稻芽淀粉酶酶液 0.1 mL，在 40℃ 水浴中恒温酶解 15 min 后，再加入显色剂 2 mL，摇匀，置于沸水浴中煮沸 5 min，取出，迅速用流水冷却，

表 6 稻芽、炒稻芽、焦稻芽的颜色测定 (n = 3)

Tab 6 Determination of rice buds, fried rice buds and charred rice buds (n = 3)														
编号	L* (D65)	a* (D65)	b* (D65)	E*ab	编号	L* (D65)	a* (D65)	b* (D65)	E*ab	编号	L* (D65)	a* (D65)	b* (D65)	E*ab
S1	81.22	2.54	14.35	82.5	C1	71.65	5.93	22.69	75.4	J1	50.84	9.72	26.25	58.0
S2	82.41	2.51	13.33	83.5	C2	66.13	7.50	24.65	71.0	J2	31.71	10.38	20.53	39.2
S3	78.04	2.39	14.68	79.4	C3	57.86	9.15	25.90	64.0	J3	32.98	9.61	20.05	39.8
S4	79.50	2.45	13.68	80.7	C4	78.12	3.26	16.15	79.8	J4	44.93	8.16	21.65	50.5
S5	81.55	2.12	12.84	82.6	C5	61.86	8.44	25.91	67.6	J5	40.87	8.58	21.32	46.9
S6	81.91	2.47	13.69	83.1	C6	65.18	7.05	23.56	69.7	J6	46.29	7.97	21.72	51.7
S7	79.43	2.61	14.38	80.8	C7	64.32	7.38	24.05	69.1	J7	42.32	7.51	19.56	47.2
S8	79.75	2.25	13.13	80.9	C8	70.82	3.89	17.78	73.1	J8	39.65	8.53	20.80	45.6
S9	80.31	2.69	14.37	81.6	C9	66.29	5.70	21.03	69.8	J9	32.68	11.10	22.02	40.9
S10	78.61	2.77	14.76	80.0	C10	70.01	6.42	22.88	73.9	J10	55.26	9.39	25.92	61.8
S11	80.19	2.34	13.16	81.3	C11	77.13	4.18	19.26	79.6	J11	44.65	10.04	24.67	52.0
S12	82.52	2.31	12.29	83.5	C12	61.61	7.96	24.18	66.7	J12	32.66	10.72	21.37	40.5
S13	76.96	2.79	14.99	78.5	C13	78.87	3.17	14.87	80.3	J13	41.29	8.04	20.46	46.8
S14	77.21	2.79	14.93	78.7	C14	72.03	5.40	20.20	75.0	J14	46.09	10.45	24.75	53.3
S15	78.84	2.45	13.29	80.0	C15	74.98	3.57	16.33	76.8	J15	48.97	8.38	22.58	54.6

加纯化水定容至 25 mL，作为待测液^[12-13]。

另取 0.1 mL 纯化水，同法操作，作为空白液，酶标仪测吸光度值，并计算淀粉酶活力。淀粉酶活力用 1 g 稻芽样品水解淀粉得到葡萄糖的量 (g) 来表示，结果见表 7。

表 7 稻谷及稻芽的淀粉酶活力测定 (n = 2)
Tab 7 Determination of amylase activity in rice and rice buds (n = 2)

编号	酶活力 / (g/g)	编号	酶活力 / (g/g)
DG1	0.062	S6	1.09
DG2	0.066	S7	0.72
DG3	0.061	S8	0.95
DY1	0.62	S9	1.23
DY2	0.43	S10	0.67
DY3	0.52	S11	1.00
S1	0.87	S12	0.94
S2	0.61	S13	0.75
S3	0.13	S14	0.66
S4	0.67	S15	1.09
S5	0.98		

$$\text{淀粉酶活力 (g/g)} = [C_x (\text{mg/mL}) \times \text{体积 (mL)} \times \text{稀释倍数}] / [(1000 \times \text{样品量 (g)})]$$

其中 C_x 为葡萄糖浓度 (mg/mL)，将测定的吸光度值代入葡萄糖标准曲线方程计算可得。

2.5 统计分析

用 SPSS 20 对稻谷与稻芽、炒稻谷与炒稻芽、焦稻谷与焦稻芽的浸出物数据进行 t 检验，结果见图 4A ~ 4C；对稻谷与稻芽的淀粉酶活力数据进行 t 检验，结果见图 4D；对稻芽、炒稻芽及焦稻芽的总色差值进行单因素方差分析，结果见图 4E；对市售稻芽的出芽率与浸出物的数据进行相关性分析，结果见表 8；市售稻芽、炒稻芽及焦稻芽总色差值及出芽率分布的散点图见图 5。

表 8 市售稻芽出芽率与浸出物相关性分析
Tab 8 Correlation between germination rate and extracts of commercial rice sprouts

指标	相关系数 r	P 值
出芽率与浸出物	0.561	0.029

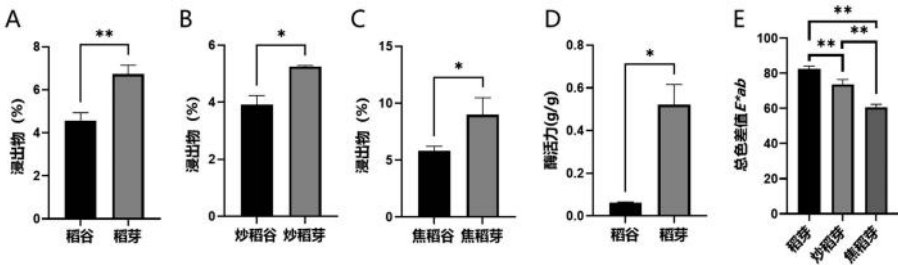


图 4 稻谷、稻芽及其炮制品的浸出物、酶活力及总色差值图 (n = 3, *P < 0.05, **P < 0.01)
Fig 4 Chart of extract, amylase activity and total color difference values of rice, rice buds and their processed products (n = 3, *P < 0.05, **P < 0.01)

3 分析与结论

稻芽为临床常用消食药，研究其炮制原理与明晰其市场状况具有十分重要的意义。稻谷发芽过后，浸出物和淀粉酶活力显著升高，这可能是由于发芽过程

中生物化学反应活跃^[14]，既有大分子物质的分解代谢，使得某些化学成分更加易于溶出，浸出物含量增加；又有新物质的合成转化，产生了大量的淀粉酶，淀粉酶活力上升，这也导致了炒稻芽、焦稻芽的

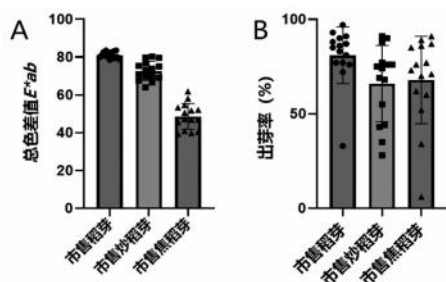


图 5 市售稻芽、炒稻芽及焦稻芽的总色差值及出芽率散点图

Fig 5 Scatter plots of the total color difference values and germination rates of commercially available rice buds, fried rice buds and charred rice buds

浸出物均显著高于炒稻谷、焦稻谷。稻芽炒黄后呈现浸出物降低,可能是由于挥发性等成分损失;炒焦后浸出物升高,可能炒制温度高促进了长链淀粉等大分子断裂后易于溶出或是高温破坏了细胞结构促进了成分溶出。从色差值上看, E^*ab (稻芽) $>E^*ab$ (炒稻芽) $>E^*ab$ (焦稻芽),说明稻芽的炒黄品及炒焦品在炮制程度上有很大不同,可以作为指示炮制火候的指标。市售稻芽的出芽率与浸出物之间呈显著正相关,出芽率越高,浸出物含量也越高。市售炒稻芽及焦稻芽的出芽率大部分未达 85%;市售稻芽的总色差值范围跨度较小,为 78.5~83.5,说明不同批次差异较小;市售炒稻芽及焦稻芽的总色差值跨度范围较大,分别为 64.0~80.3 及 39.2~61.8;说明不同批次差异较大。稻芽、炒稻芽及焦稻芽在色差上显著的不同反映了控制炮制终点的重要性,不同企业对于炮制火候判断的差异势必会引起饮片质量的不同,而中药色泽作为传统经验鉴别的重要特征之一,是受内在物质基础和外界环境因子等多种因素影响而呈现出来的,能够反映药材中化学成分的含量^[15],故色差值可以作为指示炮制火候的指标之一。

综上,稻谷发芽后,淀粉酶活力及浸出物均显著上升,稻谷与稻芽、炒稻谷与炒稻芽、焦稻谷与焦稻芽在成分上差异较大,临床上不能替代使用,这也说明发芽的重要性,企业应严格控制稻芽出芽率,特别是要保证用出芽率合格的稻芽进行炒制得到炒稻芽及焦稻芽,以保证质量。《中国药典》2020 年版未规定炒稻芽及焦稻芽的【性状】项及出芽率的【检查】项,经过研究,考虑出芽率检查不宜执行。根据《中国药典》和参考全国各地中药饮片炮制规范规定应炮制的程度以及课题组自制样品及市售品的性状特征,重点研究了炒稻芽及焦稻芽的性状。炒稻芽的性状特征应为:

形如稻芽,表面深黄色,须根常断裂,白色茸毛残留或脱落;有香气。焦稻芽的性状特征应为:形如稻芽,表面焦黄色至焦褐色,须根断裂,白色茸毛脱落,常从浆片处爆裂;有焦香气,味微苦。基于炒稻芽及焦稻芽的市场现存问题,我们研究建议增加《中国药典》炒稻芽及焦稻芽的【性状】并已于国家药典委员会官网稻芽国家药品标准拟修订草案(拟修订部分)公示稿上公示,现 2025 年版《中国药典》已经开始施行。对于稻谷发芽前后和稻芽炒黄及炒焦后发挥药效的具体物质基础及其作用机制,有待进一步研究。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版.一部[S]. 2020: 391.
- [2] 王朝晖,朱丽婷,许娟,等.稻芽不同炮制品中 α -淀粉酶活性的比较研究[J].中国现代药物应用, 2011, 5(19): 1-2.
- [3] 石继连,蒋新平,许娟,等.不同炮制方法对稻芽还原糖含量的影响研究[J].中国药师, 2012, 15(3): 318-320.
- [4] 中国药典 2020 年版.四部[S]. 2020: 29-31.
- [5] 雷林,肖锐钰,瞿领航,等.基于颜色量化技术的谷芽及其炮制品外观性状判别标准的建立[J].时珍国医国药, 2020, 31(8): 1877-1881.
- [6] 屈玟珊,李林媛,戴全宽,等.不同产地西洋参的色彩色差分析[J].广东化工, 2018, 45(5): 18-19.
- [7] 赵凯,许鹏举,谷广辉.3, 5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究[J].食品科学, 2008, 29(8): 534-536.
- [8] 赵蓉,李多伟,任涛,等.DNS 比色法测定白芸豆中 α -淀粉酶抑制剂活性的方法研究[J].中成药, 2013, 35(3): 573-576.
- [9] 刘彩华,曾嘉童,包竹君,等.3, 5-二硝基水杨酸比色法测定芒果的可溶性糖含量[J].食品安全质量检测学报, 2022, 13(9): 2892-2900.
- [10] 何晶,施偲,陈永刚,等.正交试验法优选麦芽最佳炮制工艺[J].中国医院药学杂志, 2017, 37(2): 130-134.
- [11] 陈伟峰,刘雨星,田润刚.黄酒酿造中的麦曲淀粉酶活力影响因素分析[J].中国酒, 2022(8): 60-67.
- [12] 宋阳,王亚琼,赵丽恋,等.基于淀粉酶活性检测的麦芽质量评价方法[J].药学进展, 2010, 34(9): 411-417.
- [13] 毛宇辉,张永昭,陈丽娜,等.DNS 比色法在十二烷基葡萄糖苷体系中的应用研究[J].广州化工, 2012, 40(17): 55-57.
- [14] 吴皓,李飞,李向日,等.中药炮制学[M].北京:人民卫生出版社, 2016: 390.
- [15] 马婷婷,龚慕辛,王智民,等.甘草色泽与有效成分含量的相关性研究[J].中国中药杂志, 2017, 42(19): 3776-3785.

(收稿日期: 2025-03-24; 修回日期: 2025-05-24)

关于按古代经典名方目录管理的中药复方制剂 黄酒应用研究探讨

刘思燚^{1, 2}, 李灿^{1, 2}, 许文博^{1, 2}, 林丹^{1, 2}, 吴晨悦^{1, 2}, 陈浩^{1, 2}, 李佳珊^{1, 2}, 韩炜^{1, 2*} (1. 国家药品监督管理局药品审评中心, 北京 100076; 2. 药品监管科学全国重点实验室, 北京 100076)

摘要: 黄酒在中医药领域具有悠久的历史, 其种类较多、酿造原料多样、酿造工艺复杂, 上述因素均是影响黄酒质量的关键因素, 进而可能会对中药制剂或酒制后的中药饮片的有效性、安全性及质量可控性产生影响。古代经典名方中药复方制剂的研制是推进古代经典名方向中药新药转化, 促进新时代中药传承创新发展的重要举措。经对国家中医药管理局会同国家药品监督管理局发布的 5 批古代经典名方关键信息表中的 107 首方剂进行梳理, 有 19 首经典名方将黄酒列在处方药味项下或作为炮制用辅料, 而黄酒在古代经典名方中药复方制剂研发中关注度并不高, 研究较少。本文梳理了黄酒的研究概况, 黄酒在古代经典名方中发挥的作用, 以及含有黄酒的经典名方制剂研发的常见问题。建议研究者根据中医药理论、传统经验、临床用药及中药研究设计需要等, 对黄酒开展充分研究; 进一步加强黄酒的质量控制, 以更好地保证古代经典名方中药复方制剂的安全、有效及质量可控。

关键词: 黄酒; 古代经典名方; 中药复方制剂; 酒制饮片; 酒制辅料

中图分类号: R289.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)12-3696-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.034

Role of rice wine in traditional Chinese medicine compound preparations developed from catalogued ancient classical prescriptions

LIU Siyi^{1, 2}, LI Can^{1, 2}, XU Wenbo^{1, 2}, LIN Dan^{1, 2}, WU Chenyue^{1, 2}, CHEN Hao^{1, 2}, LI Jiashan^{1, 2}, HAN Wei^{1, 2*} (1. *Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration Bureau, Beijing* 100076; 2. *State Key Laboratory of Drug Regulation Science, Beijing* 100076)

Abstract: Rice wine has long been used in traditional Chinese medicine (TCM), and its various types, diverse brewing materials, and complex brewing techniques, are all key factors for the quality of rice wine, which in turn may impact the efficacy, safety, and quality of TCM preparations or decoction pieces processed with rice wine. Compound preparations from ancient classic preparations (ACPs) help to promote the transformation of ACPs into new TCM, fostering the inheritance and innovation of TCM. We reviewed 107 formulas from five batches of key information on ACPs released by the National Administration of Traditional Chinese Medicine in conjunction with the National Medical Products Administration, and found that 19 ACPs listed rice wine either as a medicinal ingredient or as a processing aid for medicinal ingredients. However, limited attention is given to rice wine in the development of compound preparations from ACPs. This article summarized the current status of rice wine, and its role in ACPs containing rice wine. Further research on TCM theories, traditional experience, clinical medication, and TCM research design is needed to not only inherit traditional techniques and further strengthen the quality control of rice wine, but also better ensure the safety, efficacy, and quality of compound preparations from ACPs in TCM.

Key words: rice wine; traditional Chinese medicine compound preparation; ancient classic prescription; wine-processed herbal piece; wine-processed adjuvant

基金项目: 药品监管科学全国重点实验室项目 (No.2023SKLDRS0130)。

作者简介: 刘思燚, 女, 主管药师, 主要从事药品技术审评工作, email: liusy@cde.org.cn * **通信作者:** 韩炜, 男, 主任药师, 主要从事药品技术审评工作, email: hanw@cde.org.cn

酒用于治病最早记载于《五十二病方》，其中酒疗方 40 首，以酒入药，以“卒、沃、煮、渍”等多种炮制方法制成汤剂、丸剂、散剂等，用于外敷内服，治疗伤痍、蛊病等内科病以及犬、蛇、毒虫咬伤等所致的多种外伤。随着酿酒技术的发展，酒在医学中的应用更加广泛，《本草纲目》所载的 1892 种药物中，95% 以上与酒同用。酒制常用辅料黄酒，古称清酒或米酒，《本草纲目》中记载：“诸酒醇不同，唯米酒入药用”^[1-3]，2020 年版《中国药典》规定的酒制法也主要以黄酒为炮制用辅料。究其原因，黄酒酒精度适中，不经过蒸馏，自然酿造过程中形成的营养物质全部保留下来，且性温、刚柔相济之风与中医阴阳相调和之理论相通，故在中药炮制过程中常用黄酒浸泡、炒煮、蒸炙药材，起到引药上行、促进药效成分溶出、缓和药性、除臭矫味的作用^[4]。

古代经典名方是指至今仍广泛应用、疗效确切、具有明显特色与优势的古代中医典籍所记载的方剂，是传承传统中医药文化的经典载体，是临床组方用药的基础，也是中药新药创制的源泉^[5]。古代经典名方中药复方制剂研发的核心是还原现今临床仍使用的、承载了古代经典名方的物质基础和安全有效性的“一碗汤”^[6-7]。经对国家中医药管理局会同国家药品监督管理局发布的 5 批古代经典名方关键信息表中的 107 首方剂进行梳理，有 19 首经典名方将黄酒列在处方药味项下或作为酒制品的炮制用辅料，应用较多。故本文梳理了黄酒的研究概况、黄酒在古代经典名方中发挥的作用，以及含有黄酒的经典名方制剂研发的常见问题，并相应地提出了建议，以期对含有黄酒的古代经典名方制剂研究提供参考。

1 黄酒研究概况

黄酒种类繁多，酿造原料多样，酿造工艺复杂，若采用不同种类、酿造原料或工艺的黄酒入药，在中药炮制、生产过程中发挥的作用亦会有差别，进而对酒制后的中药饮片或中药制剂的质量、安全性、有效性等产生影响^[4]。

1.1 黄酒的种类

黄酒的国家标准（标准编号：GB/T 13662—2018）将黄酒按照产品风格分类，分为传统型黄酒、清爽型黄酒、特型黄酒；按照含糖量分类，分为干黄酒、半干黄酒、半甜黄酒、甜黄酒；按照酿制原料分类，分为糯米黄酒和非糯米黄酒。李灿等^[8]研究比较了传统型、清爽型、特型黄酒的总酚含量及抗氧化活性的差异，并通过多种方法对 3 种黄酒的抗氧化功能进行了综合性评价。结果表明，传统型、清爽型和特型黄酒对 DPPH 自由基、羟基自由基、ABTS⁺自由基、超氧阴离子自由基均具有清除和抑制作用，综合评价认为，传统型黄酒抗氧化能力最强，清爽型黄酒最弱。杨倩等^[9]通过提取干黄酒、半干黄酒、半甜黄

酒、甜黄酒等 4 种不同甜型黄酒中酚类化合物，分别采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱和超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱进行定性和定量分析，同时评估其体外抗氧化能力。在 4 种黄酒中共鉴定出 364 个酚类化合物，以酚酸和黄酮类为主，在不同甜型黄酒的总酚含量几乎一致的情况下，酚类化合物不同的组成导致了不同的抗氧化能力，其中半干黄酒表现出较强的抗氧化能力。

1.2 黄酒酿造原料

黄酒是以稻米、黍米、小米、玉米、小麦、水等为主要原料，经加曲和/或部分酶制剂、酵母等糖化发酵剂酿制而成的发酵酒。原料是影响黄酒品质的关键因素，原理想化特性的不同可能会导致所酿造的黄酒品质存在一定的差异。酿造黄酒的谷物在理化性质上都具有淀粉含量高，蛋白质、脂肪含量低的特点，一般为稻米、黍米、玉米、小米、小麦等，其中，较为常用的是大米和糯米^[2, 10-12]。

根据文献报道，黄酒酿造原料的品种以糯米最佳，以糯米酿制的黄酒氨基酸与矿物质等含量丰富，品质更优^[11-13]。汪建国等^[13]通过对江南一带糯米、粳米和籼米的理化性质进行比较，认为糯米与非糯米的主要不同在于所含淀粉的结构不同，糯米所含淀粉大多为支链淀粉结构，而非糯米存在更多比例的直链淀粉结构。因此糯米的糊化温度低，胶稠度软，蒸煮品质优，适用于黄酒酿造用米的品种以糯米最佳。糯米分粳糯和籼糯两大类，籼糯米直链淀粉含量约为 2%、粒型较长，蒸熟后黏性强，而优质粳糯米直链淀粉含量一般在 2% 以下、粒型较短为椭圆形，蒸熟后黏度强于籼糯米^[14]。沈馨等^[12]使用电子舌、色度仪、高效液相色谱仪和常规理化分析相结合的方法对大米、籼糯米和粳糯米酿造黄酒的品质进行了评价，结果表明，不同原料酿造黄酒的滋味和品质存在显著差异，籼糯米和粳糯米酿造的黄酒的滋味较为相似；以大米为原料酿造的黄酒其涩味、涩的回味显著高于籼糯米和粳糯米酿造的黄酒，认为以籼糯米和粳糯米为原料酿造的黄酒其产品品质要优于以大米为原料酿造的黄酒。另有研究表明，以籼糯米、大米和粳糯米为原料在同一条件下酿造黄酒，经电子鼻技术评价发现以粳糯米为原料酿造的黄酒其芳香类挥发性风味物质强度显著偏高；经 GC-MS 技术检测发现以粳糯米为原料酿造的黄酒乙酸乙酯和己酸乙酯相对含量显著偏高，而异戊醇、异丁醇和 2-甲基-1-丁醇相对含量显著偏低^[15]。

1.3 黄酒酿造工艺

黄酒按生产工艺可分为传统工艺和新工艺两种^[16-18]。传统工艺是采用传统的酿造方法，即以药、红曲、麦曲或米曲及一定量酒母为糖化剂，经多

菌种、自然、混合发酵而成,发酵时间比较长。传统黄酒加工工艺按米饭冷却及投料方式可分为摊饭法、淋饭法和喂饭法三种形式。新工艺是采用纯种酵母发酵剂取代自然发酵过程,实现大工业化生产,即小型手工操作被大型发酵生产设备取代。黄酒富含蛋白质、多糖、多酚、氨基酸等多种营养物质,在发酵过程中会产生氨基酸、肽类、酚类化合物、低聚糖、维生素、 γ -氨基丁酸及矿物质等功能性成分^[3]。不同酿造工艺可能会对黄酒的发酵过程或黄酒质量产生影响。而目前尚无充分研究阐明新工艺与传统工艺酿造的黄酒之间的差异,仍需进一步深入研究,为酿造黄酒新工艺的应用提供更多的理论依据。

2 黄酒在古代经典名方中发挥的作用

经对截至 2025 年 6 月国家中医药管理局会同国家药品监督管理局发布的 5 批古代经典名方关键信息表中的 107 首方剂进行梳理,有 3 首方剂在关键信息表中将黄酒列在“药味名称”项下,另有 16 首方剂包含需经黄酒进行炮制的药味,下文将对这两种情况展开讨论。

2.1 黄酒在关键信息表中列为处方药味

在已发布的关键信息表中,有 3 首方剂将黄酒列在了“药味名称”项下,分析黄酒在 3 首方剂中发挥的作用可分为两种。

① 第一种是发挥提取溶剂等作用。如经典名方“瓜蒌薤白半夏汤”^[19],其关键信息中现代对应的用法用量明确为“加入黄酒 2000 mL,煎至 800 mL,温服 200 mL,每日 3 次”;再如经典名方“五味消毒饮”^[20],其关键信息明确与现代对应的用法用量为“上药加水 400 mL,煎至 160 mL,加黄酒 100 mL,再煮沸 2~3 次。热服”。前者为直接加黄酒煎煮,后者为水煎煮后再加黄酒煎煮,黄酒在处方中均有提取溶剂作用。有研究表明,“瓜蒌薤白半夏汤”采用传统酒煎法能提取 95 种化学成分,可鉴定出石榴酸、琥珀酸、油酸等对冠心病具有疗效的成分,而水煎法则提取鉴定出 28 种成分,采用酒煎法较水煎煮具有更好的临床效果^[21-23]。在安全性方面,在酒煎法制备的“瓜蒌薤白半夏汤”中并未发现水煎汤剂的水杨酸、间羟基苯甲酸等潜在毒性物质,表明酒煎法在该方剂中具有一定程度的增效减毒作用。

② 第二种是作为全方炮制用辅料。如在经典名方“泻黄散”的关键信息中^[24],明确与现代对应的用法用量为“上药粉碎成粗粒,加蜜和酒微炒香,再粉碎为细末,每服 6.20 g,加水 300 mL,煎至 150 mL,温服,可不时服用”。关键信息将作为全方炮制用辅料的黄酒和蜂蜜均列在了“药味名称”项下,属于传统多辅料共制的炮制方法。研究表明,蜜酒共制可起到改变药物性质、增加有效成

分含量、延长贮存期等作用^[23]。

2.2 黄酒作为酒制品的炮制用辅料

酒制是传统中药炮制中应用广泛且较为重要的一种中药炮制技术,是将中药饮片,加入一定量的酒作辅料,经炙制、炖制、蒸制等方法处理,旨在改变药性、降低不良反应、增强药效,从而满足临床用药需求^[24-25]。临床常用的苦寒清热、养血活血药、祛风通络药、温补肝肾药等多用酒制法炮制^[26-27]。历代酒制方法有酒蒸、酒炒、酒洗、酒浸、酒化、酒拌、酒淋、酒渍、酒腌、酒炙等^[28]。2020 年版《中国药典》一部“药材和饮片”部分收录的酒制品有近 20 种,包括采用酒炙法的酒大黄、酒川牛膝、酒牛膝、酒丹参、酒白芍、酒当归、酒黄芩、酒续断、酒黄连、酒蛇蜕、酒蕲蛇、酒乌梢蛇等;采用酒炖或酒蒸法的熟大黄、酒萸肉、酒女贞子、酒苁蓉、熟地黄、酒黄精等;采用酒蒸法的酒豨莶草等。以酒大黄为例^[29-30],生大黄经黄酒炮制后,结合型大黄酸苷类减少,而鞣质含量变化不明显,故酒大黄的泻下作用相比生大黄弱些;酒大黄有缓和苦寒之作用,免伤脾胃,使活血化瘀之效得到增强,并借黄酒之性引药上行而清上焦实热。

目前已发布关键信息的 107 首古代经典名方中,共含有 11 种酒制法炮制的药味,11 个酒制品共出现 29 次,酒当归(涉及 7 个方剂)、酒白芍(涉及 5 个方剂)、酒生地/酒地黄(涉及 4 个方剂)等,共涉及 16 个方剂。上述方剂中均未将黄酒列入“药味名称”项下。11 个酒制品在关键信息表基本信息中的“处方、制法及用法”中载明为酒洗、酒炒、酒浸、酒制等炮制方法。酒生地/酒地黄、酒红花、酒炒赤茯苓在所列关键信息中均明确了要参照 2020 年版《中国药典》的酒炙法进行炮制,酒香附在“宣郁通经汤”中未明确炮制方法,在“清肝止淋汤”中明确了“建议参考 2020 年版《中国药典》酒炙法进行炮制”;酒车前子在“完带汤”中未明确炮制方法,在“易黄汤”中明确了“参考酒炙法”。其余酒制品均为 2020 年版《中国药典》收载品种。已发布关键信息的古代经典名方中酒制品情况见表 1。

3 含有黄酒的经典名方制剂研发关注点及建议

自相关法规及技术要求发布以来,古代经典名方中药复方制剂的研发受到业界的高度关注,沟通交流、注册申报以及批准品种数量逐年增加^[6]。审评发现,含有黄酒的古代经典名方中药复方制剂在基准样品和制剂的一致性、黄酒种类选择、黄酒用量、质量控制等方面的研究存在较多的问题。下文通过梳理审评、一般性技术问题咨询、沟通交流会等工作中的不足,总结了该类制剂研究方面的一些共性问题,并提出了相关建议,以期帮助研究单位更有针对性地开展含有黄酒的古代经典名方药

表 1 已发布关键信息的古代经典名方中酒制品的情况
Tab 1 Wine-processed decoction pieces in ACPs with critical information released

现代对应情况	出现	基本信息中相关处	方剂名称
中的炮制规格	频次	方及制法表述	
酒当归	7	当归 当归（酒洗）	三痹汤、温经汤 桃红四物汤、清肝止淋汤、 当归补血汤、宣郁通经汤、 清上蠲痛汤
酒白芍	5	白芍（酒炒）	桃红四物汤、清经散、两地 汤、宣郁通经汤、完带汤
酒生地 / 酒地黄	4	生地黄（酒制） 生地（酒炒） 生地（酒洗） 大生地（酒炒）	清胃散 清肝止淋汤 桃红四物汤 两地汤
酒牛膝	2	牛膝	三痹汤、温经汤
酒香附	2	香附（酒炒）	清肝止淋汤、宣郁通经汤
酒黄芩	2	黄芩（酒炒） 片芩（酒炒）	宣郁通经汤 清上蠲痛汤
酒苡蓉	2	肉苡蓉（酒浸，焙） 肉苡蓉（酒洗去咸）	地黄饮子 济川煎
酒车前子	2	车前子（酒炒）	易黄汤、完带汤
酒红花	1	红花（酒洗）	桃红四物汤
酒炒赤茯苓	1	赤茯苓（酒炒）	清宁散
酒大黄	1	大黄（酒洗）	小承气汤

学研究，助力古代经典名方的转化。

3.1 处方中含有黄酒的经典名方制剂的剂型选择

《按古代经典名方目录管理的中药复方制剂药学研究技术指导原则（试行）》^[31]（以下简称中药 3.1 类药学指导原则）中明确“工艺路线、给药途径和剂型应当与国家发布的古代经典名方关键信息及古代医籍记载一致，其中以汤剂形式服用的古代经典名方可制成颗粒剂”。五味消毒饮在《古代经典名方目录（第一批）》中明确剂型为汤剂，目前以该方剂申报上市的古代经典名方中药复方制剂的剂型均为颗粒剂。但颗粒剂制粒后还需要进行干燥，从申请人的研究情况进行总结发现，干燥步骤会使处方中的大部分黄酒挥发，使制剂与基准样品在黄酒保留等方面存在差异，这也是该方剂研发者的主要困惑之一。而液体制剂（如合剂）较固体制剂减少了干燥步骤，对方剂中的黄酒影响较小，可更好地达到基准样品与制剂质量的一致性。基于上述情况，结合前文分析黄酒在该处方中有提取溶剂等作用，故建议该方剂的研发在与国家发布的关键信息保持一致的前提下，进一步研究选择适宜的剂型及相应的制剂工艺。

3.2 关于黄酒种类问题

根据中药 3.1 类药学指导原则相关要求，古代经典名方的处方组成、药材基原等内容应与国家发布的古代经典名方关键信息一致。在已发布的“泻黄散”等经典名方的关键信息表中明确了“黄酒”来源

为“参考国家标准 GB/T 13662—2018 传统型黄酒（以糯米 *Oryza sativa* var. *glutinosa* 为原料）”，这类经典名方的黄酒种类应与关键信息明确的内容保持一致。

而对于作为酒制品炮制用辅料的黄酒，大多未在关键信息中明确黄酒种类，根据《中药新药用饮片炮制研究技术指导原则（试行）》^[32]相关要求，建议研究者根据中医药理论、传统经验、临床用药及中药研究设计需要等，对酒制饮片开展充分研究。

3.3 关于黄酒用量问题

在黄酒的用量方面，部分经典名方研发者未参照《中国药典》或省级炮制规范等开展研究。根据《按古代经典名方目录管理的中药复方制剂药学申报资料撰写指导原则（试行）》^[33]相关要求，“加辅料炮制的，应当明确辅料的名称、用量、来源、质量标准等。若中药饮片的炮制规格已收载于《中国药典》《国家中药饮片炮制规范》或省、自治区、直辖市炮制规范的，应当按照相关规定进行炮制，明确工艺参数”。对于黄酒用量的要求，2020 年版《中国药典》四部规定酒炙法“除另有规定外，一般用黄酒。除另有规定外，每 100 kg 待炮炙品，用黄酒 10 ~ 20 kg”。2020 年版《中国药典》一部对部分酒制品规定了具体的黄酒用量，如酒炙法中，酒黄连（每 100 kg 黄连，用黄酒 12.5 kg）、酒蛇蜕（每 100 kg 蛇蜕，用黄酒 15 kg）、酒蕲蛇（每 100 kg 蕲蛇，用黄酒 20 kg）、酒乌梢蛇（每 100 kg 乌梢蛇，用黄酒 20 kg）；采用酒蒸法的酒豨莶草，用量为“每 100 kg 豨莶草，用黄酒 20 kg”；采用酒炖或酒蒸的酒黄精，用量为“每 100 kg 黄精，用黄酒 20 kg”；若为酒炖法炮制的熟地黄，用量为“每 100 kg 生地黄，用黄酒 30 ~ 50 kg”。此外，省级炮制规范亦对部分酒制品的黄酒用量进行了明确。

3.4 保证黄酒质量的稳定、均一、可控

酿造黄酒时主要是将各种糖分经过发酵转化成酒精，其微生物转化过程非常复杂，主要的化学反应发生在糖化和发酵的过程中，以葡萄糖淀粉酶、蛋白酶、 α -淀粉酶、纤维素酶等为主的酶群，将原料中的大分子营养物质转化成各种有利于酿酒菌群利用的代谢产物^[34]。不同种类、不同酿造原料及酿造工艺的黄酒，含有的化学成分不尽相同，在中药炮制、生产过程中发挥的作用亦会有所差别。因此，建议通过对黄酒的原料、制备工艺、质量控制等方面进行充分研究，以进一步固定其酿造原料、酿造工艺等，明确其质量要求，以提高黄酒质量的稳定、均一、可控，进而保证含有黄酒的中药制剂的安全、有效及质量可控。

4 结语

黄酒在中医药领域具有悠久的使用历史，丰富的应用实践，尤其是在国家发布的古代经典名方目录中作为处方药味及炮制用辅料等应用较为广泛。黄酒的种类较多，酿造原料多样、酿造工艺复杂，

均是影响黄酒质量的关键因素。研究者应在尊重传统,遵循中医药理论的基础上,重视对黄酒的研究,还原古法炮制原貌,阐明古籍要求内涵,明确和固定黄酒种类、用量、酿造原料及质量要求等,进一步保证中药的安全性及质量的稳定、均一、可控,共同推动古代经典名方向高质量中药新药转化。

参考文献

- [1] 李小宁, 龚千锋, 于欢, 等. 液体炮制辅料应用概况 [J]. 江西中医药大学学报, 2016, 28 (2): 117-121.
- [2] 李新月, 董燕, 张卫, 等. 浅述黄酒的药用历史与现代研究 [J]. 中国食品药品监管, 2022 (10): 116-123.
- [3] 刘慧敏, 刘雪梅, 江雨柔, 等. 酒在中药制药与用药过程中的古今研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53 (11): 3538-3549.
- [4] 戴冰, 黄雍, 张嘉妮, 等. 中药炮制辅料黄酒的现代研究概况 [J]. 中医导报, 2018, 24 (20): 114-116.
- [5] 江苏省药品监督管理局. 权威解读 | 发挥中医药原创优势推动中医药传承创新 [EB/OL]. (2021-04-09) [2024-12-02]. http://da.jiangsu.gov.cn/art/2021/4/9/art_84621_10499779.html.
- [6] 刘思焱, 宋菊, 唐溱, 等. 关于按古代经典名方目录管理的中药复方制剂药材和饮片研究的思考 [J]. 中国中药杂志, 2025, 50 (10): 2883-2887.
- [7] 赵晓霞, 阳长明, 韩伟, 等. 试论按古代经典名方目录管理的中药复方制剂的基准样品研究 [J]. 中国中药杂志, 2024, 49 (12): 3404-3408.
- [8] 李灿, 陈同强. 3 种不同类型黄酒抗氧化作用比较研究 [J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11 (10): 3119-3123.
- [9] 杨倩, 任青兮, 周志磊, 等. 不同甜型黄酒酚类化合物的定性定量及抗氧化活性研究 [J]. 食品与发酵工业, 2025, 51 (18): 8-18.
- [10] 汪涛. 发酵型黄精糯米黄酒酿造工艺优化及品质评价 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2020.
- [11] 韩惠敏, 李新生, 耿敬章, 等. 黄酒酿造原料及生产工艺研究现状与展望 [J]. 生物资源, 2019, 41 (1): 87-93.
- [12] 沈馨, 戴彩霞, 王菲, 等. 原料种类对黄酒产品品质影响的研究 [J]. 保鲜与加工, 2018, 18 (2): 80-85, 93.
- [13] 汪建国, 汪陆翔. 大米品种和品质与黄酒酿造关系的探讨 [J]. 中国酿造, 2006 (9): 60-63.
- [14] 王卓权, 林祯芑, 陈旭东, 等. 不同原料糯米品种对绍兴黄酒品质的影响 [J]. 浙江农业学报, 2024, 36 (4): 773-779.
- [15] 葛东颖, 龙旭霞, 杨成聪, 等. 基于电子鼻和 GC-MS 联用技术对不同原料酿造黄酒风味品质的比较研究 [J]. 食品研究与开发, 2019, 40 (9): 137-142.
- [16] 邵胜男, 于中玉. 黄酒酿造工艺现状及行业发展 [J]. 吉林农业, 2015 (23): 116.
- [17] 钮敏洁, 蔡皓, 曹岗. 中药酒制及其机理研究概述 [J]. 中药材, 2020, 43 (11): 2837-2841.
- [18] 韩娟, 李杰, 梁迪, 等. 黄酒生产工艺及安全问题浅析 [J]. 中国果菜, 2021, 41 (9): 70-74, 92.
- [19] 国家中医药管理局办公室国家药品监督管理局综合和规划财务司. 关于发布《古代经典名方关键信息表 (25 首方剂)》的通知 (国中医药办科技发〔2022〕3 号). (2022-09-16) [2025-07-21]. <http://www.natcm.gov.cn/kejisi/gongzuodongtai/2022-09-27/27803.html>.
- [20] 国家中医药管理局办公室国家药品监督管理局综合和规划财务司. 关于发布《古代经典名方关键信息表 (“竹叶石膏汤”等 25 首方剂)》的通知 (国中医药综科技函〔2023〕154 号). (2023-07-28) [2025-07-21]. <http://www.natcm.gov.cn/kejisi/gongzuodongtai/2023-07-28/31404.html>.
- [21] 刘明阳, 金莹, 赵启韬, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 分析酒煎瓜蒌薤白半夏汤物质成分 [J]. 辽宁中医杂志, 2024, 51 (9): 141-148.
- [22] 边汝涛, 张理, 徐学功. 瓜蒌薤白半夏汤制备工艺、物质基础、药理作用的研究概述 [J/OL]. 中华中医药学刊, <https://link.cnki.net/urlid/21.1546.r.20250522.1308.022>.
- [23] 刘倩, 张定堃, 黄伟, 等. 中药饮片多辅料共制的传承挖掘与现代研究概况 [J]. 中草药, 2022, 53 (7): 2184-2195.
- [24] 国家中医药管理局办公室. 国家药品监督管理局综合和规划财务司. 关于发布《古代经典名方关键信息表 (“异功散”等 7 首方剂)》的通知 (国中医药综科技发〔2023〕2 号). (2023-05-05) [2025-07-21]. <http://www.natcm.gov.cn/kejisi/gongzuodongtai/2023-05-31/30768.html>.
- [24] 孙秀梅, 张兆旺. 对酒制中药技术研究设计的几点看法 [A]/ 中华中医药学会四大怀药与地道药材研究论坛暨中药炮制分会第二届第五次学术会与第三届会员代表大会论文集 [C]. 中华中医药学会中药炮制分会, 2007.
- [25] 钱先庆. 浅谈中药炮制辅料 - 酒及酒制法 [J]. 时珍国医国药, 2000, 11 (1): 33-34.
- [26] 白亚亚, 张桥, 程鸿俊, 等. 酒制对“寒性”中药影响的研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54 (17): 5773-5785.
- [27] 高自飞. 浅析炮制对中药疗效的影响 [J]. 基层医学论坛, 2021, 25 (23): 3366-3367.
- [28] 杨锦妮, 刘新月, 张艳. 中药“酒制升提”炮制理论的研究进展与探讨 [J]. 中草药, 2023, 54 (18): 6139-6149.
- [29] 魏江存. 大黄不同炮制品对大承气汤活性成分及药效影响研究 [D]. 南宁: 广西中医药大学, 2018.
- [30] 高自飞. 浅析炮制对中药疗效的影响 [J]. 基层医学论坛, 2021, 25 (23): 3366-3367.
- [31] 国家药品监督管理局药品审评中心. 关于发布《按古代经典名方目录管理的中药复方制剂药学研究技术指导原则 (试行)》的通告 [EB/OL]. (2021-08-31) [2024-12-02]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/1c18dd163e7c9221786e5469889367d0>.
- [32] 国家药品监督管理局药品审评中心. 关于发布《中药新药用药材质量控制研究技术指导原则 (试行)》等 3 个指导原则的通告 (2020 年第 31 号). (2020-10-12) [2025-07-21]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/4f9393f8e9e02a253f7649ec28941ac0>.
- [33] 国家药品监督管理局药品审评中心. 关于发布《按古代经典名方目录管理的中药复方制剂药学申报资料撰写指导原则 (试行)》的通告 (2024 年第 20 号). (2024-04-23) [2025-07-21]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/2ec60f7849641d2b9c19bbbf124973d>.
- [34] 陈双. 中国黄酒挥发性组分及香气特征研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2013.

(收稿日期: 2025-08-20; 修回日期: 2025-09-20)

医院药学

剖宫产术后低分子肝素预防血栓的疗效与影响因素研究

温娟清¹, 熊慧婷², 唐子轩³, 冯小轩⁴, 周伯庭^{3*}, 彭麒麟^{3, 5*} (1. 瑞金市妇幼保健院妇产科, 江西 瑞金 342500; 2. 湖北科技学院药学院, 湖北 咸宁 437100; 3. 中南大学湘雅医院药学部, 长沙 410008; 4. 中国药科大学基础与临床药学院, 南京 211100; 5. 中南大学湘雅医院神经内科, 长沙 410008)

摘要: **目的** 评价低分子肝素 (LMWH) 在剖宫产产妇静脉血栓栓塞症 (VTE) 预防中的有效性与安全性, 并分析影响疗效的相关因素。 **方法** 回顾性纳入 2023 年 8 月至 2025 年 8 月行剖宫产的 125 例产妇, 随访 2 个月。按术后是否使用 LMWH 分为 LMWH 组与未用 LMWH 组, 比较深静脉血栓形成 (DVT) 及出血发生率, 并在 LMWH 组内按首次用药时间和连续用药天数分层。收集人口学特征、高危因素、实验室指标变化并进行单因素及多因素分析。 **结果**

LMWH 组 DVT 发生率显著低于未用 LMWH 组 [15.05% vs 59.38%, $P < 0.001$], 且未增加出血风险。多因素 Logistic 回归显示, LMWH 的使用与较低的 DVT 风险独立相关 (调整后的 $OR = 0.163$, 95%CI: 0.049 ~ 0.544, $P = 0.003$), 而既往血栓史是最强危险因素 ($P < 0.001$)。首次用药时间对 DVT 和出血无显著影响; 疗程 > 14 d DVT 发生率反而升高 ($P < 0.001$)。纤维蛋白原变化量与 DVT 风险相关 ($P = 0.009$)。 **结论** 预防性应用 LMWH 可显著降低剖宫产产妇 DVT 发生率, 其保护作用在校正基线差异后依然稳健。既往血栓史患者风险最高, 应重点关注。结合风险分层与凝血指标动态监测可优化个体化抗凝策略。

关键词: 剖宫产; 低分子肝素; 静脉血栓栓塞症; 深静脉血栓; 抗凝治疗

中图分类号: R969.4, R714.46 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)12-3701-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.035

Efficacy and influence factors of low-molecular-weight heparin for thromboprophylaxis after cesarean section

WEN Juanqing¹, XIONG Huiting², TANG Zixuan³, FENG Xiaoxuan⁴, ZHOU Boting^{3*}, PENG Qilin^{3, 5*}
(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Ruijin Maternal and Child Health Hospital, Ruijin Jiangxi 342500; 2. School of Pharmacy, Hubei University of Science and Technology, Xianning Hubei 437100; 3. Department of Pharmacy, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008; 4. School of Basic and Clinical Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211100; 5. Department of Neurology, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008)

Abstract: Objective To evaluate the efficacy and safety of low-molecular-weight heparin (LMWH) in preventing venous thromboembolism (VTE) after cesarean section, and to analyze factors influencing therapeutic outcomes. **Methods** Totally 125 women who underwent cesarean section between August 2023 and August 2025 were retrospectively studied and followed for two months. According to postoperative LMWH administration, patients were divided into an LMWH group and a non-LMWH group. The incidence of deep vein thrombosis (DVT) and bleeding events was compared

基金项目: 湖南省自然科学基金 (No. 2022JJ30989)。

作者简介: 温娟清, 女, 主管护师, 主要从事妇产科患者围手术期与围生期护理及质量改进方面的研究, email: 1017478715@qq.com

***通信作者:** 周伯庭, 男, 教授, 主任药师, 博士研究生导师, 主要从事肝素诱导的血小板减少症 (HIT) 相关临床与转化方面的研究, email: botingzhou0918@126.com; 彭麒麟, 女, 在站博士后, 助理研究员, 主要从事抗凝及抗癫痫药物的合理用药与个体化治疗方面的研究, email: qilinpeng@csu.edu.cn

between both groups. In the LMWH group, subgroup analyses were performed based on the timing of initial administration and the duration of continuous treatment. Demographic characteristics, high-risk factors, and laboratory parameter changes were analyzed using univariate and multivariate analyses. **Results** The incidence of DVT was significantly lower in the LMWH group than that in the non-LMWH group [15.05% vs 59.38%, $P < 0.001$], with no increase in bleeding risk. Multivariate Logistic regression demonstrated that LMWH use was independently associated with a reduced risk of DVT (adjusted $OR = 0.163$, 95% CI : 0.049 ~ 0.544, $P = 0.003$), while history of thrombosis was identified as the strongest independent risk factor ($P < 0.001$). The timing of initial LMWH administration did not obviously affect DVT or bleeding, whereas a treatment duration of > 14 days was associated with a higher DVT incidence ($P < 0.001$). Changes in the fibrinogen levels were also associated with DVT risk ($P = 0.009$). **Conclusion** Prophylactic LMWH greatly reduces the incidence of DVT after the cesarean section, whose protective effect remains robust after adjustment for baseline differences. A history of thrombosis confers the highest risk and requires special attention. Combining clinical risk stratification with dynamic monitoring of coagulation parameters may help optimize individualized anticoagulation strategies.

Key words: cesarean section; low-molecular-weight heparin; venous thromboembolism; deep vein thrombosis; anticoagulant therapy

静脉血栓栓塞症 (venous thromboembolism, VTE) 是产科常见且严重的并发症之一, 涵盖深静脉血栓形成 (deep vein thrombosis, DVT) 和肺栓塞 (pulmonary embolism, PE) [1-3]。妊娠期及产褥期的女性处于生理性高凝状态, 较非妊娠女性 VTE 发生风险增加 4 ~ 5 倍, 其中剖宫产产妇的风险更高 [4]。这一高风险主要归因于手术创伤导致的组织因子释放、术后活动受限及妊娠相关凝血因子水平升高等多重因素的叠加作用 [5-6]。若未能及时预防, DVT 可进展为 PE, 严重威胁母体生命 [7-8]。

低分子肝素 (low-molecular-weight heparin, LMWH) 因抗 Xa 活性高、起效迅速、半衰期适中及出血风险相对较低, 被广泛应用于产科 VTE 一级预防 [9]。既往研究及多国指南均建议对剖宫产后合并高危因素的产妇予以 LMWH 干预。然而, 不同国家及地区在给药时机、用药时长、适应证范围等方面存在明显差异。例如, 英国皇家妇产科医师学会 (RCOG) 主张大部分剖宫产产妇应持续预防至产后 10 d [10]; 美国妇产科医师学会 (ACOG) 则强调基于个体化风险评估, 仅对中高危人群进行抗凝预防 [11]。我国的专家共识亦指出, 应结合本单位的资源条件及产妇的个体风险, 制订个性化的预防策略 [12]。

在实际临床工作中, LMWH 在剖宫产后的应用仍存在多方面不确定性。一方面, 部分接受 LMWH 预防的患者仍发生血栓, 而部分未用药的患者未出现 VTE 事件, 提示其预防效果可能受产妇个体差异及多种高危因素的共同影响; 另一

方面, LMWH 给药的起始时间与疗程设置缺乏统一标准, 临床实践中常依赖经验判断。此外, LMWH 的使用与实验室凝血相关指标 (如血小板计数、D-二聚体、纤维蛋白原) 之间的动态变化关系尚未被系统阐明, 而这些指标可能为疗效评估与个体化调整提供重要参考 [13]。

基于此, 本研究以剖宫产分娩的住院产妇为研究对象, 回顾性分析 LMWH 的应用现状及其在不同风险人群中的预防效果, 重点评估给药时机、疗程与血栓发生及出血风险的关系, 并探讨术前术后相关凝血指标的变化与血栓发生的关联性, 旨在为剖宫产术后 LMWH 的个体化应用提供循证依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2023 年 8 月至 2025 年 8 月在中南大学湘雅医院行剖宫产分娩的住院产妇 125 例作为研究对象。所有产妇均在住院期间及出院后接受为期 2 个月的随访, 随访方式包括门诊复查及电话随访, 以获取血栓事件及出血情况等结局资料。

纳入标准: ① 年龄 18 ~ 45 岁; ② 单胎或多胎妊娠; ③ 完成下肢静脉超声检查; ④ 临床资料及随访信息完整。

排除标准: ① 术前已确诊 DVT 或 PE; ② 合并需全程治疗性抗凝的疾病 (如房颤、机械心脏瓣膜等); ③ 合并出血性疾病或严重凝血功能障碍; ④ 对 LMWH 过敏或禁忌使用者; ⑤ 产后随访期间资料不完整或失访者。

1.2 分组方法

依据术后 LMWH 的使用情况进行分组。首先, 根据是否接受术后 LMWH 预防分为 LMWH 组和未用 LMWH 组; 在 LMWH 组内, 再按手术结束后的首次用药时间分为 ≤ 12 h 组、 $12 \sim 24$ h 组和 > 24 h 组; 按术后连续用药天数分为 ≤ 7 d 组、 $7 \sim 14$ d 组和 > 14 d 组。如中断用药, 按实际用药日合计计入; 若存在剂量或频次调整, 仍按累计用药天数进行分层。

1.3 数据收集

本研究经中南大学湘雅医院伦理委员会批准 (批件号为 202110193-2)。收集患者的一般资料、用药信息、实验室检查结果及临床结局。

① 人口学资料及高危因素: 人口学资料包括年龄、体质量指数 (BMI)、分娩孕周; 高危因素包括妊娠期高血压 (含先兆子痫)、糖尿病 (妊娠期或合并糖尿病)、心脏病 (风湿性心脏病、先天性心脏病等)、静脉曲张、高龄 (≥ 35 岁)、肥胖 ($\text{BMI} \geq 28 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$)、多胎妊娠、长期卧床 (≥ 7 d)、既往血栓史及高脂血症。

② LMWH 用药情况: 包括首次用药时间 (术后至首次注射的间隔时间, 单位为 h)、每次剂量 (IU)、给药频次及连续用药天数。

③ 实验室指标: 肝素首次使用前与使用后的血小板计数 ($\times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$)、D-二聚体 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 及纤维蛋白原 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)。

④ 临床结局: 血栓发生情况, 术后及出院后 2 个月内的下肢静脉超声检查结果, 包括有无 DVT、血栓部位及严重程度; 出血情况, 住院期间阴道出血总量 $\geq 500 \text{ mL}$ 定义为严重出血。

⑤ 数据收集与随访流程: 所有数据均由两名研究人员独立提取并采用双录入方式核对, 若有分歧由第三位研究者裁定。随访方式包括出院时门诊复查及出院后 2 个月内的电话随访, 以确保全面获取血栓及出血事件。

⑥ 盲法操作: 在结局事件的判定过程中, 数据提取者对患者的 LMWH 用药情况不知情; 统计分析亦由另一名研究人员独立完成, 从而尽可能减少回顾性研究带来的信息偏倚。

⑦ DVT 诊断标准: 所有患者均接受双下肢彩色多普勒超声检查。DVT 诊断参照《中国血栓性疾病防治指南》及国际 CHEST 指南^[14-15], 标准包括静脉腔内可见低回声血栓、血流充盈缺损及受压不完全塌陷等, 由具有资质的超声科医师统一判定。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。计量资料经正态性检验后, 符合正态分布者组间比较采用独立样本 t 检验; 不符合正态分布者组间比较采用 Mann-Whitney U 检验。计数资料以例数和百分比表示, 组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。LMWH 使用前后配对测量的计量资料, 正态分布者采用配对 t 检验, 非正态分布者采用 Wilcoxon 符号秩检验。多组率的比较采用 χ^2 检验。对血栓发生的单因素分析包括人口学特征、高危因素、LMWH 用药情况及相关实验室指标变化等。所有检验均为双侧检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基线资料比较

本研究共纳入剖宫产产妇 125 例, 其中 93 例 (74.4%) 术后接受 LMWH 预防性抗凝, 32 例 (25.6%) 未使用 LMWH。两组在部分基线特征上存在差异: LMWH 组产妇平均年龄更大 [(35.31 ± 4.32) 岁 vs (32.16 ± 4.73) 岁, $P = 0.001$], 高龄 (≥ 35 岁) 比例更高 (58.1% vs 34.4%, $P = 0.02$); 而未用 LMWH 组长期卧床 (37.5% vs 6.5%, $P < 0.001$)、既往血栓史 (25.0% vs 8.6%, $P = 0.017$) 及高脂血症 (50.0% vs 8.6%, $P < 0.001$) 的比例更高。两组在 BMI、分娩孕周、糖尿病、心脏病、静脉曲张、术前血小板计数、D-二聚体、纤维蛋白原等指标上差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (见表 1)。两组在部分基线特征上存在差异, 因此在后续分析中采用多因素 Logistic 回归进行校正, 以提高结果的可比性和结论的可靠性。

2.2 对总体剖宫产人群的影响

在结局方面, LMWH 组 DVT 发生率显著低于未用 LMWH 组 ($P < 0.001$); 两组产后出血量差异无统计学意义 ($P = 0.20$) (见表 2)。在全部 33 例发生血栓的患者中, 5 例为 PE 或合并下肢静脉血栓, 其余 28 例为单纯下肢静脉血栓。

进一步进行多因素 Logistic 回归分析, 以是否发生 DVT 为因变量, 纳入 LMWH 使用情况及高龄、长期卧床、既往血栓史和高脂血症等基线风险因素。结果显示, LMWH 的使用仍与血栓风险显著降低独立相关 (调整后 $OR = 0.163$, 95%CI: 0.049 ~ 0.544, $P = 0.003$)。其中, 既往血栓史是血栓发生的最强危险因素 (调整后 $OR = 37.799$, 95%CI: 6.280 ~ 227.522, $P < 0.001$), 高脂血症提示风险升高 (调整后 $OR = 3.421$, 95%CI: 0.834 ~ 14.028, $P = 0.088$)。高龄和长期卧床虽呈现风险增加趋势, 但差异无统计学意义 (见表 3)。

表 1 剖宫产患者基线特征在未用 LMWH 组与 LMWH 组间的比较

Tab 1 Baseline characteristics between patients with cesarean section between the LMWH group and the non-LMWH group			
变量	未用 LMWH 组 (n = 32)	LMWH 组 (n = 93)	P
人口学特征			
年龄 / 岁 (均数 ±SD)	32.16±4.73	35.31±4.32	1×10 ^{-3*}
BMI/ (kg · m ⁻²)(中位数 [IQR])	27.0 [25.6 ~ 28.4]	26.9 [25.1 ~ 29.2]	0.85
分娩孕周 / 周 (中位数 [IQR])	37.0 [35.0 ~ 39.0]	37.0 [36.0 ~ 38.0]	0.87
初产妇 [n (%)]	14 (43.8)	47 (50.5)	0.50
高危因素 [n (%)]			
妊娠期高血压	2 (6.3)	16 (17.2)	0.13
糖尿病	9 (28.1)	37 (39.8)	0.24
心脏病	3 (9.4)	10 (10.8)	0.83
静脉曲张	2 (6.3)	5 (5.4)	0.85
高龄 (≥ 35 岁)	11 (34.4)	54 (58.1)	0.02*
肥胖	12 (37.5)	9 (9.7)	0.12
多胎妊娠	2 (6.3)	10 (10.8)	0.45
长期卧床	12 (37.5)	6 (6.5)	1.6×10 ^{-5*}
既往血栓史	8 (25.0)	8 (8.6)	0.017*
高脂血症	16 (50.0)	8 (8.6)	2.9×10 ^{-7*}
实验室指标 (用肝素前)			
血小板计数 / (×10 ⁹ · L ⁻¹)(均数 ±SD)	181.84±76.44	186.49±63.59	0.73
纤维蛋白原 / (g · L ⁻¹)(均数 ±SD)	4.39±1.06	4.49±1.22	0.69
D-二聚体 / (mg · L ⁻¹)(中位 [IQR])	0.51 [0.35 ~ 0.86]	0.62 [0.38 ~ 1.24]	0.18

注 (Note): 与未用 LMWH 组比较, *P < 0.05 (Compared with the non-LMWH group, *P < 0.05)。

表 2 LMWH 组与未用 LMWH 组的 DVT 发生率和出血量比较
Tab 2 DVT incidence and bleeding volume between the LMWH group and the non-LMWH group

组别	DVT 发生率 [n (%)]	出血量 /mL (中位 [IQR])
LMWH 组 (n = 93)	14 (15.05)	300 (300 ~ 357.5)
未用 LMWH 组 (n = 32)	19 (59.38)	300 (300 ~ 400)
统计量	$\chi^2 = 24.07$	$U = 1277$
P	9.30×10 ^{-7*}	0.2

注 (Note): 与未用 LMWH 组比较, *P < 0.05 (Compared with the non-LMWH group, *P < 0.05)。

表 3 DVT 发生的多因素 Logistic 回归分析
Tab 3 Multivariable Logistic regression of factors associated with DVT

变量 (参考水平)	调整后 OR (95%CI)	P
LMWH 使用: 是 vs 否	0.163 (0.049 ~ 0.544)	0.003
高龄 (≥ 35 岁 vs < 35 岁)	1.779 (0.555 ~ 5.697)	0.332
长期卧床 (≥ 7 d vs < 7 d)	1.745 (0.627 ~ 15.333)	0.336
既往血栓史: 有 vs 无	37.799 (6.280 ~ 227.522)	< 0.001
高脂血症 (有 vs 无)	3.421 (0.834 ~ 14.028)	0.088

2.3 高危因素分析

在各高危因素分层中, LMWH 对部分人群的 DVT 预防作用具有显著差异 (见表 4)。与未用 LMWH 组相比, LMWH 组在合并糖尿病、高龄 (≥ 35 岁)、肥胖 (BMI ≥ 28 kg · m⁻²)、长期卧床 (≥ 7 d) 及高脂血症患者中 DVT 发生率明显降

低 (P 均 < 0.01)。其他高危因素如妊娠期高血压、心脏病、静脉曲张、多胎妊娠及既往血栓史患者中, 两组 DVT 发生率差异无统计学意义 (P > 0.05)。

2.4 给药疗程和时间点分析

在 LMWH 组内, 根据手术结束后的首次用药时间分为 ≤ 12 h 组、12 ~ 24 h 组和 > 24 h 组。三组的 DVT 发生率分别为 27.8%、10.4% 和 25.0% ($\chi^2 = 4.00$, P = 0.13), 严重出血发生率分别为 11.1%、7.5% 和 12.5% (P = 0.81)(见表 5)。

根据术后连续用药天数分为 ≤ 7 d 组、7 ~ 14 d 组和 > 14 d 组。三组的 DVT 发生率分别为 11.5%、8.6% 和 66.7% ($\chi^2 = 20.87$, P < 0.001), 其中 > 14 d 组显著高于前两组。严重出血发生率分别为 3.8%、12.1% 和 0.0% (P = 0.29)(见表 5)。

在疗程 > 14 d 的 9 例患者中, 合并高危因素情况复杂: 妊娠期高血压 3 例、糖尿病 3 例、静脉曲张 1 例、高龄 5 例、多胎妊娠 2 例、既往血栓史 2 例。进一步统计显示, 其中 2 例未合并危险因素, 4 例合并 1 ~ 2 种危险因素, 3 例合并 ≥ 3 种危险因素。提示该组患者整体风险水平参差不齐, 但部分患者确属高危人群, 延长疗程更可能反映了基础风险较高或活动受限等情况, 而非延长用药本身导致血栓发生率升高。

表 4 剖宫产高危产妇在 LMWH 组与未用 LMWH 组血栓发生情况比较 [n(%)]

组别	高血压	糖尿病	心脏病	静脉曲张	高龄 (≥ 35 岁)	肥胖	多胎妊娠	长期卧床	既往血栓史	高脂血症
未用 LMWH 组	2/2 (100.0)	7/9 (77.8)	1/3 (33.3)	0/2 (0.0)	6/11 (54.5)	10/12 (83.3)	2/2 (100.0)	5/6 (83.3)	8/8 (100)	14/16 (87.5)
用 LMWH 组	3/16 (18.8)	4/37 (10.8)	2/10 (20.0)	1/5 (20.0)	9/54 (16.7)	1/9 (11.1)	3/10 (30.0)	1/12 (8.3)	6/8 (75.0)	3/8 (37.5)
χ^2	0.45	17.843	0.231	0.467	7.386	10.755	3.36	10.125	2.286	6.454
P	0.502	$2.4 \times 10^{-4*}$	0.631	0.495	0.007*	0.001*	0.067	0.001*	0.131	0.011*

注 (Note): 与未用 LMWH 组比较, * $P < 0.05$ (Compared with the non-LMWH group, * $P < 0.05$)。

表 5 首次给药时间与给药天数分别与血栓及严重出血的关系

Tab 5 Association of initial administration time and duration of LMWH therapy with thrombus formation and severe hemorrhage

分组变量	分组	例数	血栓 [n (%)]	χ^2	P 值	严重出血 [n (%)]	χ^2	P
首次给药时间 /h	≤ 12	18	5 (27.8)	4.00	0.13	2 (11.1)	0.40	0.81
	12 ~ 24	67	7 (10.4)			5 (7.5)		
	> 24	8	2 (25.0)			1 (12.5)		
	合计	93	14 (15.1)			8 (8.6)		
给药天数 /d	≤ 7	26	3 (11.5)	20.87	$2.9 \times 10^{-5*}$	1 (3.8)	2.48	0.29
	7 ~ 14	58	5 (8.6)			7 (12.1)		
	> 14	9	6 (66.7)			0 (0.0)		
合计		93	14 (15.1)			8 (8.6)		

注 (Note): LMWH 组内总体比较, * $P < 0.05$ (Overall comparison within the LMWH group, * $P < 0.05$)。

2.5 生理生化指标变化

LMWH 组患者在使用药前后血液学及凝血指标变化情况见表 6。用药后血小板计数较用药前显

著升高 ($P < 0.001$); D- 二聚体及纤维蛋白原水平变化均差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 6 剖宫产患者肝素使用前后血液学及凝血指标的变化

Tab 6 Pre- and post-heparin changes in hematological and coagulation parameters in patients with cesarean section

指标	术前 (中位数 [IQR])	用药后 (术后)(中位数 [IQR])	Z	P
血小板计数 ($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	178.0 [140.75 ~ 215.25]	196.5 [156.5 ~ 236.5]	- 3.941	$1.6 \times 10^{-4*}$
D- 二聚体 / ($mg \cdot L^{-1}$)	0.575 [0.27 ~ 0.86]	0.55 [0.26 ~ 0.62]	- 1.505	0.132
纤维蛋白原 / ($g \cdot L^{-1}$)	4.38 [3.52 ~ 5.60]	4.32 [3.54 ~ 5.61]	- 0.550	0.583

注 (Note): 与用 LMWH 前比较, * $P < 0.05$ (Compared with the pre-LMWH, * $P < 0.05$)。

进一步分析各指标变化量与血栓发生的关系 (见表 7) 显示, 血小板计数变化量和 D- 二聚体变化量在有血栓与无血栓患者间差异均无统计学意义

($P > 0.05$); 而纤维蛋白原变化量在有血栓患者中显著高于无血栓患者 ($P = 0.009$)。

表 7 剖宫产患者肝素使用前后血液学及凝血指标变化量与血栓发生的关系

Tab 7 Association of pre- to post-heparin changes in hematological and coagulation parameters with thrombosis in cesarean section patients

指标变化量	无血栓 (中位数 [IQR])	有血栓 (中位数 [IQR])	Z	P
Δ 血小板 / ($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	14.0 [- 3.5 ~ 31.5]	12.5 [- 38.9 ~ 63.9]	- 0.36	0.71
Δ D- 二聚体 / ($mg \cdot L^{-1}$)	- 0.05 [- 0.15 ~ 0.05]	- 0.16 [- 1.28 ~ 0.96]	- 0.22	0.82
Δ 纤维蛋白原 / ($g \cdot L^{-1}$)	- 1.20 [- 1.46 ~ - 0.94]	1.07 [- 0.21 ~ 2.35]	- 2.61	0.009

注 (Note): 与无血栓组比较, * $P < 0.05$ (Compared with the non-thrombosis group, * $P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 LMWH 的总体预防效果与安全性

本研究基于本院 125 例剖宫产产妇的真实世界数据, 回顾性分析了 LMWH 术后预防性应用的效果及影响因素。结果显示, LMWH 组的 DVT 发生率显著低于未用 LMWH 组, 而产后出血风险未增加, 提示在剖宫产产妇中合理应用 LMWH 是安全且有效的, 这与国内外多项研究及指南的

结论一致^[1, 16-17]。考虑到两组在部分基线特征 (如年龄、高龄比例、长期卧床、既往血栓史及高脂血症等) 方面存在差异, 本研究进一步进行了多因素 Logistic 回归分析。结果显示, 在校正上述因素后, LMWH 的使用仍与血栓风险显著降低独立相关, 提示其预防效果具有一定的稳健性。其中, 既往血栓史对血栓发生的影响最为显著, 提示该类患者在围产期应予以重点识别和管理。

3.2 高危人群的获益特点

在单因素分层分析中, LMWH 在合并糖尿病、高龄、肥胖、长期卧床及高脂血症等高危人群中均显示出较明显的预防效果, 这与既往国内外指南及多项临床研究强调的“应针对高危人群强化抗凝预防”的观点一致^[6, 18], 提示在产科 VTE 预防中, 高危人群的精准识别对于优化用药获益至关重要。

3.3 给药时机与疗程管理

首次用药时间 ($\leq 12\text{ h}$ 、 $12 \sim 24\text{ h}$ 、 $> 24\text{ h}$) 对 DVT 和严重出血的发生率无显著影响, 这与部分研究提出的“早期启动可获益”的结论有所不同^[19]。可能原因包括剖宫产后炎症反应与高凝状态在 24 h 内持续存在, 不同产妇的基础风险差异可能掩盖时间因素的影响。在疗程方面, 本研究观察到 $> 14\text{ d}$ 组的 DVT 发生率反而升高, 可能并非延长用药本身的因果效应, 而是反映该组患者基础风险极高或存在活动受限、并发症等情况, 这一现象在其他高危人群的抗凝研究中亦有报道^[20-21]。进一步分析显示, 该组 9 例患者中, 2 例未合并危险因素, 4 例合并 1~2 种危险因素, 3 例合并 ≥ 3 种危险因素, 提示其中部分患者确属高危人群。因此, 延长疗程并非一概有益, 临床药师在参与用药管理时, 应结合产妇活动恢复、并发症及凝血功能动态监测, 综合评估是否需要延长或缩短疗程, 避免不必要的用药暴露。

3.4 实验室指标与风险评估

实验室指标分析显示, LMWH 使用后血小板计数显著升高, 而纤维蛋白原变化量与 DVT 发生显著相关, 这与部分研究提出的“纤维蛋白原升高提示高凝及血栓风险”观点一致^[22-23]。这一发现提示, 除临床危险因素外, 动态监测凝血指标可作为辅助剖宫产术后患者血栓风险评估的重要工具, 有助于及早识别可能发生血栓的患者, 从而优化抗凝策略。临床药师可利用这些指标, 在围产期为高危患者提供个体化的抗凝建议, 例如根据纤维蛋白原趋势评估风险并与临床团队讨论是否调整方案。

3.5 临床意义、创新性与局限性

本研究不仅提供了 LMWH 在剖宫产产妇真实临床环境下的预防效果与安全性数据, 为制订本土化的 VTE 防治策略提供了直接证据, 还进一步明确了特定高危人群的获益特点, 为临床药师在围产期用药管理中进行风险分层与精准干预提供了参考。同时, 本研究结合首次用药时间、用药疗程及动态凝血指标变化进行综合分析, 提

示在临床实践中应将疗程管理与实验室监测相结合, 以在最大化获益的同时降低不必要的用药风险。与既往单纯探讨药物有效性或单一危险因素的研究不同, 本研究将真实世界的临床高危特征、给药策略和实验室指标趋势纳入同一分析框架, 在剖宫产围产期抗凝管理领域具有一定的探索性和创新性。

需要指出的是, 本研究仍存在一定局限性。

① 单中心回顾性设计及有限的样本量, 尤其在部分分层分析中例数较少, 可能影响统计效能。② 未涵盖所有潜在 VTE 风险因素, 如家族史及遗传性血栓倾向等, 可能导致风险评估不够全面。③ 由于事件数有限, 多因素回归分析仅能纳入部分基线差异较大的变量进行校正, 仍可能存在残余混杂, 研究结论需谨慎解读。④ 本研究检测纤维蛋白原的时间点多集中在入院时与出院前 (或 LMWH 前后), 多数患者仅有两次测量, 缺乏标准化的动态序列, 因此未能进一步绘制趋势曲线或寻找风险阈值, 相关结论仍需依赖前瞻性研究加以验证。⑤ 随访时间仅为产后 2 个月, 无法反映更长期的 VTE 事件发生情况。⑥ 本研究未对不同 LMWH 制剂进行比较, 不排除药物差异对结果的潜在影响。

未来应在多中心开展大样本的前瞻性队列研究, 以进一步验证本研究结论, 并探索 LMWH 的最佳起始时机、剂量及疗程。同时, 可结合个体化风险评分工具进行精细化分层, 提升风险预测的准确性。此外, 围产期血栓相关实验室指标及潜在生物标志物的筛选与验证 (如纤维蛋白原动态变化、血小板功能指标等), 将有助于建立更加精准的风险预测模型, 为临床提供个体化抗凝管理的依据, 从而进一步优化母婴安全结局。

4 结论

本研究基于剖宫产产妇的真实世界数据表明, 预防性应用 LMWH 在不增加产后出血风险的前提下, 可显著降低 DVT 发生率。多因素分析结果提示, LMWH 的保护作用在校正多种基线风险因素后仍然显著, 而既往血栓史是最强的独立危险因素。首次用药时间在产后 24 h 内的不同分组间未见显著差异, 而延长疗程的获益需结合患者基础风险、恢复情况及凝血功能动态变化进行综合评估。纤维蛋白原变化量与 DVT 风险的显著相关性提示, 凝血指标的动态监测可作为辅助风险评估与个体化抗凝决策的重要依据。

研究结果提示, 产科 VTE 防治应注重高危人群的精准识别, 将临床危险因素与实验室指标

动态监测相结合, 优化 LMWH 的给药时机与疗程管理。临床药师在围产期抗凝方案的制订、风险评估与疗效监测中具有重要的实践价值, 可为提高母婴安全水平提供有力的药学支持。

参考文献

- [1] Middleton P, Shepherd E, Gomersall JC. Venous thromboembolism prophylaxis for women at risk during pregnancy and the early postnatal period [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2021, 3 (3): CD001689.
- [2] Lao TT. Pulmonary embolism in pregnancy and the puerperium [J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2022, 85 (Pt A): 96-106.
- [3] Pastori D, Cormaci VM, Marucci S, et al. A comprehensive review of risk factors for venous thromboembolism: from epidemiology to pathophysiology [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (4): 3169.
- [4] Heit JA, Kobbervig CE, James AH, et al. Trends in the incidence of venous thromboembolism during pregnancy or postpartum: a 30-year population-based study [J]. *Ann Intern Med*, 2005, 143 (10): 697-706.
- [5] Bukhari S, Fatima S, Barakat AF, et al. Venous thromboembolism during pregnancy and postpartum period [J]. *Eur J Intern Med*, 2022, 97: 8-17.
- [6] Maughan BC, Marin M, Han J, et al. Venous thromboembolism during pregnancy and the postpartum period: risk factors, diagnostic testing, and treatment [J]. *Obstet Gynecol Surv*, 2022, 77 (7): 433-444.
- [7] Kalaitzopoulos DR, Panagopoulos A, Samant S, et al. Management of venous thromboembolism in pregnancy [J]. *Thromb Res*, 2022, 211: 106-113.
- [8] Nichols KM, Henkin S, Creager MA. Venous thromboembolism associated with pregnancy: JACC focus seminar [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2020, 76 (18): 2128-2141.
- [9] Bistervels IM, Buchmuller A, Wieggers HMG, et al. Intermediate-dose versus low-dose low-molecular-weight heparin in pregnant and post-partum women with a history of venous thromboembolism (Highlow study): an open-label, multicentre, randomised, controlled trial [J]. *Lancet*, 2022, 400 (10365): 1777-1787.
- [10] Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. Reducing the risk of venous thromboembolism during pregnancy and the puerperium (Green-top Guideline No. 37a) [S]. London: Royal College of Obstetricians and Gynaecologists, 2015.
- [11] American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee on Practice Bulletins—Obstetrics. ACOG practice bulletin No. 196: thromboembolism in pregnancy [J]. *Obstet Gynecol*, 2018, 132 (1): e1-e17.
- [12] 中华医学会妇产科学分会产科学组. 妊娠期及产褥期静脉血栓栓塞症预防和诊治专家共识 [J]. *中华妇产科杂志*, 2021, 56 (4): 241-251.
- [13] Chen XY, Jiang HY, Zhou AP, et al. Is early bilateral compression ultrasonography and D-dimer monitoring appropriate for prophylaxis and diagnosis of deep venous thrombosis after cesarean section: a single-center observational study of Chinese Han population [J]. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2024, 24 (1): 181.
- [14] 中国血栓性疾病防治指南专家委员会. 中国血栓性疾病防治指南 [J]. *中华医学杂志*, 2018, 98 (36): 2861-2888.
- [15] Kearon C, Akl EA, Comerota AJ, et al. Antithrombotic therapy for VTE disease: antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines [J]. *Chest*, 2012, 141 (2 Suppl): e419S-e494S.
- [16] Feucht F, Richart P, Trillot N, et al. Should pregnant women with anticoagulant prophylaxis benefit from scheduled delivery? [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2021, 303 (5): 1191-1196.
- [17] Hart C, Rott H, Heimerl S, et al. Management of antithrombin deficiency in pregnancy [J]. *Hamostaseologie*, 2022, 42 (5): 320-329.
- [18] Bates SM, Greer IA, Middeldorp S, et al. VTE, thrombophilia, antithrombotic therapy, and pregnancy: antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines [J]. *Chest*, 2012, 141 (2 Suppl): e691S-e736S.
- [19] Moriuchi K, Chigusa Y, Kondoh E, et al. Enoxaparin administration within 24 hours of caesarean section: a 6-year single-centre experience and patient outcomes [J]. *J Obstet Gynaecol*, 2019, 39 (4): 451-454.
- [20] Liew AY, Piran S, Eikelboom JW, et al. Extended-duration versus short-duration pharmacological thromboprophylaxis in acutely ill hospitalized medical patients: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2017, 43 (3): 291-301.
- [21] Kolkailah AA, Abdelghaffar B, Elshafeey F, et al. Standard-versus extended-duration anticoagulation for primary venous thromboembolism prophylaxis in acutely ill medical patients [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2024, 12 (12): CD014541.
- [22] Tilly MJ, Geurts S, Pezzullo AM, et al. The association of coagulation and atrial fibrillation: a systematic review and meta-analysis [J]. *Europace*, 2023, 25 (1): 28-39.
- [23] McIntyre WF, Um KJ, Alhazzani W, et al. Association of vasopressin plus catecholamine vasopressors vs catecholamines alone with atrial fibrillation in patients with distributive shock: a systematic review and meta-analysis [J]. *JAMA*, 2018, 319 (18): 1889-1900.

(收稿日期: 2025-08-13; 修回日期: 2025-09-17)

规范化培训阶段住院医师药学素养认知与评估研究

李炳仪¹, 宋建飞², 刘超¹, 郭翰扬¹, 姚文兵^{1*} (1. 中国药科大学, 南京 211198; 2. 南京大学, 南京 210023)

摘要: **目的** 全面系统地评估住院医师的药学相关知识与技能水平, 明确当前药学素养现状, 为规范化培训阶段药学教育的优化提供建议。**方法** 采用文献调研、专家访谈和问卷调查相结合的方法, 对江苏省正在接受培训的住院医师进行药学素养认知自评和客观测试评估。江苏省 13 个市的 29 家培训单位中的 504 位住院医师参与问卷调查。**结果** 经过筛选, 保留 471 份有效问卷。住院医师药学素养自评得分为 (3.80 ± 0.60) 分, 客观测试得分为 (16.67 ± 6.53) 分, 正确率为 53.77%, 提示其药学知识掌握仍有提升空间。亚组分析显示, 接受培训时间较长、通过执业医师考试的住院医师药学素养自评得分较高 ($P < 0.05$), 但客观测试得分组间差异无统计学意义。同时, 团队配备临床药师、医院开展药学相关培训及知晓合理用药制度均显著提高了住院医师药学素养自评和客观测试得分 ($P < 0.05$)。**结论** 部分住院医师高估自身药学素养, 其药学知识储备和合理用药能力仍需提升。强化规范化培训阶段的药学教育, 对培养高质量的临床医师具有重要的战略意义。

关键词: 住院医师; 规范化培训; 继续医学教育; 药学素养; 现状调研

中图分类号: R95

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)12-3708-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.036

Perception and assessment of pharmacy competency of residents

LI Bingyi¹, SONG Jianfei¹, LIU Chao¹, GUO Hanyang¹, YAO Wenbing^{1*} (1. *China Pharmaceutical University, Nanjing* 211198; 2. *Nanjing University, Nanjing* 210023)

Abstract: Objective To systematically evaluate residents' pharmacy-related knowledge and skills, clarify the current status of their pharmacy competency, and provide evidence for optimizing pharmacy education during residency. **Methods** A mixed-method approach, including literature review, expert interviews, and questionnaire, was used to assess both self-perceived and objectively tested pharmacy competency among residents in hospital of Jiangsu province. Totally of 504 residents from 29 training institutions across 13 cities responded to the survey. **Results** After data screening, 471 valid questionnaires were included in the final analysis. The mean self-assessment score of pharmacy competency was 3.80 ± 0.60 , while the objective test score was 16.67 ± 6.53 , with an accuracy rate of 53.77%, indicating room for improvement in pharmacy knowledge. Subgroup analysis showed that residents with longer years of training and those who had passed the medical licensing examination had much higher self-assessment scores ($P < 0.05$), although no obvious differences were observed in the objective test scores between groups. Additionally, the presence of clinical pharmacists in the team, hospital-based pharmacy training, and awareness of rational drug use policies were all associated with markedly higher self-assessment and objective test scores ($P < 0.05$). **Conclusion** Some residents overestimate their pharmacy competency, and their pharmaceutical knowledge and rational prescribing skills need improvement. Strengthening pharmacy education during residency is important for cultivating high-quality clinicians.

Key words: resident; residency; continuing medical education; pharmacy competency; current situation research

基金项目: 2024 年江苏省研究生实践创新计划 (No. SJCX24_0001)。

作者简介: 李炳仪, 男, 硕士, 主要从事药学教育研究, email: 3222041135@stu.cpu.edu.cn *通信作者: 姚文兵, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事管理药学、药品监管科学研究、药学教育研究, email: wbyao_cpu@163.com

住院医师规范化培训作为毕业后医学教育的重要组成部分,是衔接院校医学教育和继续医学教育的桥梁,对于提高医疗质量、确保医疗安全具有重要意义^[1]。随着《住院医师规范化培训内容与标准》的不断修订与完善^[2],住院医师六大核心胜任力要求日益细化,培养过程强调理论与实践相结合,旨在全面提升住院医师临床决策、沟通协作和应急处理等能力^[3]。

然而,现有针对住院医师的考核评估体系偏重医学能力^[4-8],主要关注疾病诊断、手术操作以及危重患者抢救等技能,对其在药学理论知识、用药监测和用药指导等能力的掌握情况关注不足。考虑到住院医师在完成规范化培训后将成为具有处方权的临床医师,其药学素养对保障患者安全、提高治疗效果具有关键作用^[9]。

本研究将住院医师的药学知识储备、用药监测、用药指导、与药师合作及自主学习 5 个维度的综合能力归纳为药学素养,并通过设计调查问卷来探究住院医师目前的药学素养现状。研究旨在了解住院医师药学素养现状与不足,分析规范化培训阶段药学教育中存在的问题并提出改进措施,以期优化培训体系,提升住院医师药学素养。

1 方法

1.1 研究对象

本研究于 2024 年 10 月—2025 年 2 月,采用目的性抽样选取江苏省 13 个市共 29 家经过认定的规范化培训基地中正在接受培训的住院医师进行调研。联系各基地医务处工作人员在培训基地内进行动员,并结合问卷星平台发放电子问卷的方式进行调研。

1.2 纳排标准

研究对象的纳入标准:①愿意接受调查且知情同意;②正在接受规范化培训的住院医师;③至少完成 2 个及以上科室的轮转或在同一科室培训时长大于 3 个月。排除标准:①身份为主治医师、副主任医师及主任医师;②非医学专业群体(如临床药师、护士等);③问卷填写时间过短;④基础信息填写不完整。

1.3 研究方法

基于住院医师核心胜任力框架并参考相关文献研究结果^[5, 10-16],本研究对住院医师应掌握的药学知识与技能、用药态度及价值观进行梳理与整合,设计了《临床住院医师规范化培训阶段药学素养现状自评问卷》。同时征求临床医学与临床药学领域专家的意见,结合执业医师考试大纲、题库及院校教育教材等,设计了与自评问卷

相对应的《临床住院医师规范化培训阶段药学素养现状测试题》。

1.3.1 临床住院医师规范化培训阶段药学素养现状自评问卷 《临床住院医师规范化培训阶段药学素养现状自评问卷》从 5 个维度对住院医师药学素养现状展开评价,包括药学知识储备、用药监测、用药指导、与药师合作能力及自主学习。根据 Likert 量表,每个问题设计 5 个选项(非常不同意=1 分;不同意=2 分;一般=3 分;同意=4 分;非常同意=5 分),分数越高代表住院医师自评药学素养越高。调查问卷整体 Cronbach's alpha 系数为 0.962 > 0.7,且变量中每个题项的 CITC 系数 > 0.4,说明问卷信度较好。对调查问卷内容进行效度检验,KMO 值为 0.862, Bartlett 球形检验结果差异有统计学意义($P < 0.05$),提示数据适合进行因子分析。另外,4 个因子的旋转后累计方差解释率为 79.95% > 50%,意味着研究项的信息量可以有效地提取出来^[17]。

1.3.2 临床住院医师规范化培训阶段药学素养水平测试题 《临床住院医师规范化培训阶段药学素养水平测试题》旨在考查住院医师对药学知识、法律法规等核心内容的掌握情况。综合参考执业医师考试大纲、题库及临床医学与药学专家的建议,问卷从药学知识储备、用药监测和与药师合作 3 个维度进行设计^[18-19]。药学知识储备维度包含 16 道题目,涉及药代动力学、药效学、临床用药及相关法律法规;用药监测维度设有 10 道题目,考查不良反应识别与上报、用药监测及用药错误分类;与药师合作维度包含 5 道题目,涉及药师配置情况、与药师合作的认知及实践。3 个维度共计 31 道题目。所有试题均选自执业医师考试题库和药学相关教材,并经过临床专家严格筛选与补充,确保科学性与实用性。

1.4 统计学方法

采用 Excel 2019 进行数据双人录入并完成数据清洗,采用 SPSS 15.0 统计软件对数据进行统计描述和分析。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,差异性分析采用独立样本 t 检验、单因素方差分析等统计学方法研究不同亚组的差异情况, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 描述性统计

本研究共发放问卷 504 份,经过数据筛选保留 471 份有效问卷,问卷有效率 93.45%。471 位被调查者中,一年级住院医师 150 位,二年级住院医师 111 位,三年级住院医师 210 位。纳入分

析的住院医师中，347 人已通过执业医师考试。地区划分依据《江苏统计年鉴 2024》，对江苏省 13 个市按照经济发展情况进行划分。被调查者的详细基本信息如表 1 所示。

表 1 调研对象基础信息
Tab 1 Basic information of research subjects

项目	<i>n</i> (%)
性别	
男	182 (38.64)
女	289 (63.36)
所属地区	
苏北地区	212 (45.01)
苏中地区	67 (14.23)
苏南地区	192 (40.76)
规范化培训阶段	
一年级	150 (31.85)
二年级	111 (23.57)
三年级	210 (44.59)
规范化培训模式	
全科专业培训	180 (38.22)
非全科专业培训	291 (61.78)
执业医师资格考试	
已通过	347 (73.67)
未通过	124 (26.33)

2.2 药 学 素 养 自 评 得 分 情 况

在自评部分，研究将 1～2 分认定为“水平较低”；3 分为“平均水平”；4～5 分为“水平较高”。结果显示，471 位住院医师的药 学 素 养 总 分 为 (3.80 ± 0.60) 分，接近于较高水平。在药 学 知 识 储 备、用 药 监 测、用 药 指 导、与 药 师 合 作 能 力 及 自 主 学 习 5 个 维 度 的 得 分 依 次 为 (3.89 ± 0.73) 、 (4.00 ± 0.67) 、 (4.04 ± 0.68) 、 (3.91 ± 0.73) 、 (3.15 ± 0.94) 分。除用药监测、用 药 指 导 维 度 为 较 高 水 平 外，药 学 知 识 储 备、自 主 学 习、与 药 师 合 作 能 力 维 度 均 为 平 均 水 平。

2.3 药 学 素 养 客 观 测 试 得 分 情 况

药 学 素 养 客 观 测 试 总 分 31 分，调 研 对 象 得 分 为 (16.67 ± 6.53) 分，正确率为 53.77%，反映出其药 学 素 养 实 际 水 平 较 为 基 础，仍 有 提 升 空 间。进 一 步 分 析 各 维 度 得 分 及 正 确 率，药 学 知 识 储 备 维 度（满 分 16 分）得 分 为 (8.50 ± 3.63) 分，正确率为 53.12%，表明部分住院医师在药 学 知 识 储 备 方 面 存 在 一 定 知 识 盲 区 或 掌 握 不 全 面^[20]；用 药 监 测 维 度（满 分 10 分）得 分 为 (4.89 ± 2.50) 分，正确率为 48.90%，显示其对不良反应识别、判断以及上报等知识掌握情况较弱。与药师合作能力维度（满 分 5 分）得 分 为 (3.28 ± 1.21) 分，正 确 率 为 65.61%，体 现 出 住 院 医 生 在 与 临 床 药 师 沟 通 与 合 作 方 面 的 意 识 较 强，能 够 理 解 临 床 药 师 在 临

床治疗中的重要作用。

2.4 亚 组 分 析

为探究住院医师药 学 素 养 在 不 同 背 景 下 的 差 异，研究将根据地区发展情况、规范化培训阶段、执业医师资格考试通过情况、团队是否配置临床药师、医院是否开设药 学 相 关 培 训 以 及 合 理 用 药 制 度 知 晓 情 况 等 多 个 维 度 进 行 亚 组 分 析^[21-24]，以 期 为 优 化 住 院 医 生 药 学 素 养 培 养 提 供 科 学 依 据 与 指 导。

亚组分析结果显示，江苏省不同经济发展水平地区住院医师在药 学 素 养 自 评 与 客 观 测 试 得 分 上 差 异 无 统 计 学 意 义。接 受 培 训 时 间 较 长 以 及 通 过 执 业 医 师 考 试 均 提 高 了 住 院 医 生 的 药 学 素 养 自 评 得 分，但客 观 测 试 得 分 差 异 无 统 计 学 意 义。此 外，团 队 配 置 临 床 药 师、医 院 开 设 药 学 相 关 培 训 及 知 晓 合 理 用 药 制 度 的 住 院 医 生，在 药 学 素 养 自 评 与 客 观 测 试 各 维 度 得 分 及 总 得 分 上 均 表 现 更 优，体 现 了 相 关 支 持 与 培 训 对 药 学 素 养 的 提 升 作 用。具 体 结 果 见 表 2、3。

3 讨 论

3.1 住 院 医 生 对 药 学 素 养 自 我 评 估 偏 高，需 要 优 化 规 范 化 培 训 阶 段 的 药 学 教 育 体 系

结果显示，调研对象药 学 素 养 自 评 得 分 偏 高，实 际 在 药 学 基 础 理 论、临 床 用 药、不 良 反 应 识 别 与 上 报 等 知 识 掌 握 方 面 仍 存 在 不 足。研 究 认 为 原 因 在 于 院 校 教 育 阶 段 的 学 习 内 容 侧 重 医 学 诊 疗 知 识 和 操 作 技 能，对 药 学 理 论 知 识 学 习 较 少^[25-27]。医 院 教 学 存 在 同 样 问 题，忽 略 了 系 统 化 合 理 用 药 知 识 体 系 构 建，从 而 导 致 住 院 医 生 对 药 学 知 识 的 掌 握 情 况 较 差。

为提升住院医师药 学 素 养，建议构建住院医师阶梯式药 学 课 程 教 育 体 系，根 据 培 训 阶 段 分 层 次 设 计 教 学 内 容，实 现 从 基 础 到 专 科、从 理 论 到 实 践 的 渐 进 式 培 养^[28-29]。在 规 范 化 培 训 第 一 年 侧 重 加 强 药 学 基 础 知 识 教 育 与 处 方 审 核 能 力，衔 接 院 校 教 育 内 容，强 化 住 院 医 生 对 药 物 作 用 机 制、配 伍 禁 忌 等 核 心 知 识 的 掌 握。规 范 化 培 训 第 二 年 通 过 真 实 病 例 开 展 用 药 方 案 设 计 培 训，提 高 住 院 医 生 在 复 杂 场 景 下 的 用 药 决 策 水 平。规 范 化 培 训 第 三 年 进 一 步 强 化 临 床 决 策 能 力，要 求 住 院 医 生 独 立 进 行 病 历 分 析、诊 断 及 用 药 方 案 制 订，并 在 带 教 老 师 的 指 导 下 查 漏 补 缺，完 善 合 理 用 药 能 力。此 外，探 索 由 临 床 医 生 与 临 床 药 师 联 合 指 导 的“双 导 师 制”^[30-31]。临 床 医 生 侧 重 培 养 住 院 医 生 的 疾 病 诊 断 思 维，临 床 药 师 专 注 于 药 物 治 疗 全 周 期 管 理，通 过 多 维 度 指 导 提 升 住 院 医 生 的 药 学 素 养 与 合 理 用 药 能 力，以 更 好 地 满 足 临 床 实 践 需 求。通 过 分 层 递 进 的 课 程 设 计 与 资 源 整 合，结 合

表 2 不同亚组住院医师药学素养自评得分情况(分)

Tab 2 Self-assessment scores of pharmacy competency among resident subgroups (score)

项目	<i>n</i>	药学知识储备	用药监测	用药指导	与药师合作能力	自主学习	总分	
地区	苏南	192	3.77±0.76	3.92±0.68	3.91±0.73	3.78±0.75	2.98±1.03	3.67±0.65
	苏中	67	3.97±0.77	4.02±0.70	4.12±0.69	3.97±0.71	3.09±0.82	3.83±0.60
	苏北	212	3.94±0.68	4.05±0.64	4.10±0.63	3.96±0.72	3.29±0.91	3.87±0.56
	<i>F</i>		1.583	1.348	1.969	1.888	1.106	0.800
	<i>P</i>		0.206	0.261	0.141	0.153	0.332	0.450
规范化培训阶段	一年级	150	3.97±0.71	4.07±0.62	4.11±0.62	4.01±0.67	3.00±1.02	3.83±0.58
	二年级	111	4.04±0.70	4.13±0.62	4.19±0.61	4.04±0.69	3.13±1.04	3.91±0.58
	三年级	210	4.07±0.74	4.18±0.61	4.22±0.63	4.06±0.70	3.29±1.02	3.96±0.60
	<i>F</i>		3.461	1.843	4.363	3.077	5.274	5.101
	<i>P</i>		0.032	0.160	0.013	0.047	0.005	0.006
执业医师考试通过情况	通过	347	3.96±0.73	4.04±0.68	4.11±0.67	3.98±0.73	3.21±0.90	3.86±0.60
	未通过	124	3.72±0.72	3.89±0.65	3.86±0.68	3.70±0.71	2.95±1.02	3.62±0.60
	<i>t</i>		3.134	2.181	3.597	3.715	2.648	3.802
	<i>P</i>		0.002	0.030	< 0.001	< 0.001	0.008	< 0.001
	临床药师配备情况	有	281	3.98±0.75	4.10±0.71	4.12±0.73	4.04±0.73	3.29±0.94
无		190	3.76±0.68	3.86±0.58	3.93±0.59	3.71±0.69	2.93±0.90	3.64±0.54
<i>t</i>			3.193	3.939	3.230	4.924	4.153	4.840
<i>P</i>			0.002	< 0.001	0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
医院药学相关教育和培训设置情况		有	340	3.99±0.73	4.10±0.67	4.15±0.68	4.03±0.73	3.26±0.91
	无	131	3.64±0.69	3.74±0.61	3.77±0.62	3.59±0.67	2.84±0.96	3.52±0.55
	<i>t</i>		4.731	5.392	5.642	6.128	4.353	6.543
	<i>P</i>		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
	医院规范合理用药制度知晓情况	知晓	339	4.01±0.68	4.11±0.63	4.16±0.63	4.01±0.73	3.28±0.91
不知晓		132	3.59±0.78	3.72±0.70	3.76±0.72	3.65±0.69	2.80±0.92	3.50±0.61
<i>t</i>			5.482	5.829	5.877	4.793	5.091	6.900
<i>P</i>			< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

“双导师制”，有助于系统地提升住院医师从药学基础知识到临床用药决策的能力，确保其在培训结束后具备胜任临床工作的药学素养。

3.2 住院医师需要积极引导与精准化、个性化学习指导，提升自主学习能力

根据调研结果，住院医师的自主学习能力较低，每月自主学习药学相关内容的次数仅为3~5次，自主学习频率不足，难以满足药学知识补充与更新的需求。此外，亚组分析显示，接受培训时间较长及已通过执业医师考试的住院医师药学自评得分较高，但药学素养客观测试得分差异无统计学意义。此现象可能源于多数住院医师刚完成本科院校教育或正处于临床实践探索阶段，未完成从“被动灌输”到“主动思考”的学习思维转换^[32]。同时，缺乏带教老师的积极引导与精准化、个性化指导，住院医师难以定期进行阶段性思考总结，阻碍了其自主学习能力的培养^[33]。

为此，本研究提出两点建议以激励住院医师提升自主学习能力。第一，鼓励住院医师定期参与药学查房、多学科会诊、病例讨论等活动，以激励并维持学习积极性^[34]。在活动前，鼓励住院医师主动收集病历资料，分析患者治疗方案，并结合诊

疗规范和相关文献提出个人见解。在讨论环节，住院医师应积极表达观点，临床药师、多学科会诊成员及带教老师则应针对其陈述内容指出不足并提供改进建议。讨论结束后，住院医师可结合意见内容进行复盘与学习，以系统性提升药学知识自主获取、临床转化及终身学习能力。第二，医院应搭建标准化用药治疗案例库^[35]。从实际医疗记录中提取常见病种、典型病例、用药方案分析、错误案例等数据，结合治疗指南和循证医学证据，构建涵盖单病种标准化治疗、多药联用复杂病例、特殊人群用药等内容的资源库。住院医师可根据自身学习需求与临床实际病例进行自主学习，选择合适的用药方案，通过对比筛选与查缺补漏，提高合理用药能力，满足对高质量临床医师的需求。

3.3 临床药师协作与医院药学培训对住院医师合理用药能力提升的促进作用

在亚组分析中，有药师配合工作的住院医师的药学素养自评得分及客观题测试得分均显著高于无药师合作的住院医师。说明临床药师的参与能够帮助住院医师深化对药物机制、药代动力学及药物相互作用的理解，促进合理用药^[36-38]。此外，医院有开设药学相关培训的住院医师，其自

表 3 不同亚组住院医师药学素养客观测试得分情况

Tab 3 Objective test scores of pharmacy competency among resident subgroups

项目	n	药学知识储备		用药监测		与药师合作能力		总分		
		得分	正确率 /%	得分	正确率 /%	得分	正确率 /%	得分	正确率 /%	
地区	苏南	192	8.08±3.58	52.64	5.02±2.48	48.33	3.23±1.26	65.31	16.33±6.54	53.29
	苏中	67	8.33±3.61	56.44	4.68±2.54	54.78	3.29±1.20	69.55	16.31±6.56	58.02
	苏北	212	8.71±3.60	52.51	4.90±2.49	47.55	3.31±1.20	64.62	16.93±6.43	52.86
	F		0.835		2.231		1.073		1.612	
	P		0.435		0.109		0.343		0.201	
规范化培训阶段	一年级	150	8.31±3.58	50.83	5.02±2.48	50.20	3.23±1.26	52.86	16.39±6.54	64.67
	二年级	111	8.45±3.71	52.82	4.68±2.54	46.85	3.29±1.20	52.98	16.42±6.65	65.77
	三年级	210	8.79±3.62	54.91	4.90±2.49	49.05	3.31±1.20	54.84	17.00±6.48	66.19
	F		1.425		0.582		0.175		0.487	
	P		0.241		0.559		0.840		0.615	
执业医师考试通过情况	通过	347	8.64±3.60	54.00	4.83±2.48	48.27	3.25±1.21	65.07	16.72±6.49	53.94
	未通过	124	8.10±3.63	50.66	5.06±2.52	50.65	3.35±1.22	67.10	16.52±6.66	53.30
	t		1.408		— 0.909		— 0.797		0.287	
	P		0.160		0.364		0.426		0.779	
临床药师配备情况	有	281	8.87±3.70	55.45	5.25±2.56	52.53	3.41±1.27	68.26	17.54±6.76	56.57
	无	190	7.95±3.47	49.67	4.35±2.31	43.53	3.08±1.11	61.68	15.38±5.97	49.63
	t		2.762		3.898		2.978		3.639	
	P		0.007		< 0.001		0.003		< 0.001	
医院药学相关教育和培训设置情况	有	340	9.16±3.61	57.28	5.26±2.49	52.59	3.43±1.22	68.59	17.85±6.51	57.59
	无	131	6.72±3.06	42.02	3.90±2.21	39.00	2.88±1.09	57.54	13.50±5.45	43.55
	t		7.346		5.753		4.74		7.33	
	P		< 0.001		< 0.001		< 0.001		< 0.001	
医院规范合理用药制度知晓情况	知晓	339	9.14±3.59	57.13	5.28±2.47	52.83	3.47±1.19	69.50	17.90±6.39	57.74
	不知晓	132	6.85±3.22	42.84	3.89±2.31	38.85	2.78±1.15	55.57	13.52±5.83	43.61
	t		6.676		5.617		5.756		7.105	
	P		< 0.001		< 0.001		< 0.001		< 0.001	

评总分和客观测试总分均高于不知晓或未参与的住院医师。同时了解医院合理用药制度的住院医师药学素养自评得分与客观测试表现更佳。两项结果与以往研究一致，医院定期开展的知识培训与教育讲座能够有效帮助住院医师提高诊疗能力，规范临床行为，增强风险防控意识，从而整体提升医疗质量并保障患者安全^[39-40]。

为进一步完善住院医师药学教育，医院应鼓励临床药师定期组织药物治疗专题讨论会，分享最新药学研究成果和临床经验，实现信息共享。同时，医院应推动科室定期开展药学类培训，提升住院医师药物理论知识储备与临床运用能力，帮助其了解临床常见疾病治疗药物的研发进展、最新药物使用指南，以确保科学合理用药。此外，加强合理用药制度宣传与学习，有助于规范医院用药管理，降低药物滥用和错误使用的风险，督促医护人员在临床实践中关注过度处方、用药不当及药物相互作用等问题。综上，提升住院医师和临床药师的协同效应，优化药学知识培训与临床实践的衔接，能有效推动医疗资源的合理配置和高效利用，构建“以病人为中心”的医疗服务体系。

4 结论

本研究首次调查住院医师的药学素养，通过自评问卷和客观测试评估住院医师药学知识、技能和素养的掌握情况。亚组分析结果显示，规范化培训阶段应加强药学知识与技能的教学，并考虑让临床药师参与教育过程，以帮助住院医师提高合理用药的认知。同时，结合医院药学教育培训和合理用药制度宣讲，进一步提升住院医师的药学素养。本研究的局限性在于样本仅来自江苏省，受访住院医师的数量和范围有限。未来的研究可扩大样本范围，涵盖全国不同省份，以深入分析住院医师药学素养的现状，并为毕业后医学教育的完善提供建议。

参考文献

[1] 曲歌乐, 魏占云, 张仲迎. 住院医师规范化培训中科研能力的培养[J]. 中国病案, 2023, 24 (1): 78-79, 112.

[2] 中国医师协会. 住院医师规范化培训内容与标准(2022年版)[EB/OL]. (2022-08-05) [2025-03-05]. <https://www.ccgme-cmda.cn/pole-portal/#/>.

[3] Zeng Y, Yang J, Zhang JW. Post competency training in standardized training of resident physicians and integrated postgraduates [J]. World J Clin Cases, 2024, 12 (29):

- 6250-6254.
- [4] Chen Q, Li M, Wu N, et al. A survey of resident physicians' perceptions of competency-based education in standardized resident training in China: a preliminary study [J]. BMC Med Educ, 2022, 22 (1): 801.
 - [5] Wei Y, Wang FL, Pan ZL, et al. Development of a competency model for general practitioners after standardized residency training in China by a modified Delphi method [J]. BMC Fam Pract, 2021, 22 (1): 171.
 - [6] 李兰, 曹怡, 黄丹丹, 等. 住院医师规范化培训招收考核评价框架构建和考核方式探索 [J]. 中国毕业后医学教育, 2025, 9 (1): 37-41.
 - [7] 张冕, 杨雨飞, 胡汉昆. 临床药师培训和住院医师规范化培训的比较及启示 [J]. 中南药学, 2020, 18 (9): 1595-1598.
 - [8] 李兰, 黄丹丹, 曹怡, 等. 我国住院医师胜任力评价指标体系的系统评价 [J]. 中国循证医学杂志, 2024, 24 (11): 1312-1316.
 - [9] 陈丽芬, 王亚军, 卢洁, 等. 以胜任力为导向的住院医师规范化培训模式改革 [J]. 医学教育管理, 2023, 9 (1): 21-27.
 - [10] Fu YZ, Zhao GX, Shan J, et al. Study on a job competence evaluation system for resident physicians (including integrated postgraduates) receiving standardized training [J]. BMC Med Educ, 2023, 23 (1): 834.
 - [11] Hauer KE, Clauser J, Lipner RS, et al. The internal medicine reporting milestones: cross-sectional description of initial implementation in U. S. residency programs [J]. Ann Intern Med, 2016, 165 (5): 356-362.
 - [12] Feng XM, Wang YJ, Wei LJ, et al. How to become an excellent pediatric resident: a qualitative comparative study from China [J]. BMC Health Serv Res, 2023, 23 (1): 53.
 - [13] 廖吴美子. 广东省中医院住院医师规范化培训后岗位胜任力评价研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2020.
 - [14] 刘思言. 山东省全科医学专业住院医师规范化培训现状调查 [D]. 济南: 山东大学, 2023.
 - [15] 晏文娟. 贵州省妇产科住院医师规范化培训学员岗位胜任力现状及提升对策 [D]. 贵州: 贵州大学, 2023.
 - [16] 田仁萍. 重庆市住院医师规范化培训学员岗位胜任力现状调查研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2021.
 - [17] 魏岚, 黄跃, 宋亚楠, 等. 面向大众人群的老年患者多重用药评价管理与咨询服务平台需求调研 [J]. 中国全科医学, 2023, 26 (25): 3163-3169.
 - [18] 金英杰医学教育研究院. 临床执业 (含助理) 医师资格考试命题规律之应试讲义 [M]. 9 版. 北京: 化学工业出版社, 2021: 164-229.
 - [19] 王毅, 张秀峰. 临床技能与临床思维 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2024: 21-53.
 - [20] 邱丽丽, 张慕华, 林莺, 等. 全科医师实习阶段增设临床药理学实践教学探索 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2021, 19 (2): 177-179.
 - [21] Sun S, Hu K, Zhang FQ, et al. Investigation of standardized training of radiation oncology residents for gynaecological tumours in China [J]. BMC Med Educ, 2023, 23 (1): 296.
 - [22] Tamblyn R, Moraga T, Girard N, et al. Do clinical and communication skills scores on credentialing exams predict potentially inappropriate antibiotic prescribing? [J]. BMC Med Educ, 2023, 23 (1): 821.
 - [23] 陈璐, 王倩, 林尚雄, 等. 住院医师规范化培训效果的影响因素分析 [J]. 中国继续医学教育, 2021, 13 (14): 68-72.
 - [24] 陈璐, 袁联雄, 王倩, 等. 住院医师规范化培训过程考核核心因素研究 [J]. 中国毕业后医学教育, 2023, 7 (7): 330-334.
 - [25] 瞿海龙, 张冰, 张红强. 毕业后医学教育核心胜任力的内涵与评价 [J]. 中国继续医学教育, 2024, 16 (23): 32-36.
 - [26] 张黎峰, 宋述铭, 董亚莉, 等. 住院医师核心胜任力里程碑 2.0 版评价体系解读及思考 [J]. 中国毕业后医学教育, 2024, 8 (12): 908-912, 922.
 - [27] 左博文. 云南省某国家级住培基地住院医师规范化培训公共课程体系现状研究 [D]. 云南: 昆明医科大学, 2022.
 - [28] Vollman KE, Adams CB, Shah MN, et al. Survey of emergency medicine pharmacy education opportunities for students and residents [J]. Hosp Pharm, 2015, 50 (8): 690-699.
 - [29] 罗舒文, 冷晓萍. 对住培分阶段应用不同教学模式的探索 [J]. 中国继续医学教育, 2022, 14 (3): 59-62.
 - [30] Lenning J, Nay A, Ogren M, et al. PEARL: pharmacy education applied to resident learners [J]. West J Emerg Med, 2022, 24 (1): 23-29.
 - [31] 何芳, 李银. 双导师制度联合多学科协作教学模式在住院医师规范化培训中的应用效果 [J]. 现代医院, 2023, 23 (8): 1281-1283, 1286.
 - [32] 俞璐. 自主学习能力培养在住院医师规范化培训临床教学中的现况和实践 [J]. 中国医药导报, 2020, 17 (4): 63-65, 69.
 - [33] Yang CH, Zhu YX, Jiang HK, et al. Influencing factors of self-directed learning abilities of medical students of mainland China: a cross-sectional study [J]. BMJ Open, 2021, 11 (10): e051590.
 - [34] 向阳. 探讨住院医师自主学习能力的培养 [J]. 中国毕业后医学教育, 2020, 4 (1): 19-22.
 - [35] 吴海丰, 张丽媛, 李文庭. 病例库联合情景模拟教学法在传染病学住培带教中的应用 [J]. 中国继续医学教育, 2024, 16 (11): 78-82.
 - [36] 程愈, 申晶. 跨专业教育在内分泌科住院医师规范化培训中的探索与应用 [J]. 中国毕业后医学教育, 2023, 7 (7): 565-570.
 - [37] 陈学增, 刘嘉欣, 刘云娣, 等. 药师医师双点评模式在重点监控药品监管中的实践 [J]. 中南药学, 2022, 20 (7): 1703-1706.
 - [38] 周玉冰, 张爱玲, 张文达, 等. 临床药师参与免疫相关性垂体炎继发性肾上腺皮质功能不全诊治的药理学实践 [J]. 中南药学, 2024, 22 (7): 1949-1952.
 - [39] 赖晓波, 黄红丽, 李萍. 情景模拟教学在消化内科住院医师规范化培训中的应用 [J]. 现代医院, 2020, 20 (1): 46-48.
 - [40] 李芳芳. 科室专业讲座在心内科住院医师规范化培训中的探讨 [J]. 中国卫生产业, 2019, 16 (36): 77-79.

(收稿日期: 2025-03-13; 修回日期: 2025-07-11)

胰高血糖素样肽 -1 (GLP-1) 受体激动剂 治疗 2 型糖尿病卫生技术评估

李鼎, 梁雨薇, 张丽, 安明惠, 张冉, 孙悦, 丁佳欣, 冉卓灵, 胡锐, 宫建* (沈阳药科大学 药物流行病学与临床药物评价课题组, 沈阳 110016)

摘要: **目的** 对我国已上市的 6 种胰高血糖素样肽 -1 (GLP-1) 受体激动剂艾塞那肽、利拉鲁肽、利司那肽、贝那鲁肽、度拉糖肽和司美格鲁肽进行综合评价, 为医疗机构提供有效的决策证据, 提高卫生资源的利用质量和效率。**方法** 采用快速卫生技术评估 (HTA) 方法, 计算机检索 PubMed、CNKI 和维普等数据库, 由 2 名评价者根据纳入和排除标准独立筛选文献、提取资料及质量评价, 对上述 6 种药物在药学特性、有效性、安全性、经济性及其他属性五个方面进行比较, 并根据《医疗机构药品评价与遴选量化记录表》进行打分。**结果** 司美格鲁肽最终得分为 78.1 分, 艾塞那肽最终得分为 77.0 分, 利拉鲁肽最终得分为 76.7 分, 度拉糖肽最终得分为 75.1 分, 贝那鲁肽最终得分为 60.2 分, 利司那肽最终得分为 66.7 分。根据评分结果, 司美格鲁肽、艾塞那肽和利拉鲁肽的综合得分较高。司美格鲁肽在降低糖化血红蛋白、空腹血糖及改善体重方面表现最为优越; 其安全性评分亦位于较高水平, 并显示出一定的肾脏保护作用。相比之下, 艾塞那肽需每日用药, 可能影响患者依从性; 利拉鲁肽虽疗效较好, 但日均治疗费用相对较高。司美格鲁肽采用每周一次给药方式, 依从性更高, 且治疗成本在同类药物中具有一定优势。**结论** 综合疗效、安全性、依从性及经济性等因素, 司美格鲁肽或为目前我国 2 型糖尿病患者较为优选的 GLP-1 受体激动剂。

关键词: 胰高血糖素样肽 -1 受体激动剂; 2 型糖尿病; 有效性; 安全性; 经济性; 卫生技术评估

中图分类号: R977.15, R969.3 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)12-3714-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.037

Health technology assessment of glucagon-like peptide-1 receptor agonists for type 2 diabetes mellitus

LI Ding, LIANG Yuwei, ZHANG Li, AN Minghui, ZHANG Ran, SUN Yue, DING Jiaxin, RAN Zhuoling, HU Rui, GONG Jian* (*Pharmacoepidemiology and Clinical Drug Evaluation Research Group, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016*)

Abstract: Objective To conduct a comprehensive health technology assessment (HTA) of six glucagon-like peptide-1 receptor agonists (exenatide, liraglutide, lixisenatide, benaglutide, dulaglutide and semaglutide) currently approved in China, to provide evidence for decision-making in healthcare institutions and improve the quality and efficiency of healthcare resource utilization. **Methods** A rapid HTA approach was adopted. Literature was retrieved from PubMed, CNKI, and VIP. Two reviewers independently screened the studies, collected data, and assessed study quality based on predefined inclusion and exclusion criteria. The six drugs were compared from five dimensions, namely pharmaceutical characteristics, effectiveness, safety, cost-effectiveness, and other attributes, and were scored based on *Quantitative Record Form for Drug Evaluation and Selection in Medical*

基金项目: 沈阳药科大学中青年教师事业发展支持计划立项 (No. ZQN202205)。

作者简介: 李鼎, 男, 硕士研究生, 主要从事临床药学、循证医学、药物流行病学的相关研究, email: 1814481802@qq.com *通信作者: 宫建, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事药物循证医学、临床药学、药物经济学、功能性食品研发等方面的相关研究, email: fanxing1230@163.com

Institutions. Results The final scores were as follows: semaglutide 78.1; exenatide 77.0; liraglutide 76.7; dulaglutide 75.1; lixisenatide 66.7; and benaglutide 60.2. Semaglutide, exenatide, and liraglutide demonstrated higher comprehensive scores. Among them, semaglutide showed more favorable efficacy in reducing HbA1c, fasting plasma glucose, and body weight. It also ranked well in terms of safety and exhibited potential renal protective effects. While exenatide required daily administration, which may affect patient adherence. Liraglutide had good efficacy but relatively higher daily treatment costs, semaglutide's once-weekly dosing regimen improved adherence and offered a cost advantage among its peers. **Conclusion** Considering efficacy, safety, adherence, and economic factors, semaglutide may become a preferred glucagon-like peptide-1 receptor agonist option for patients with type 2 diabetes in China.

Key words: glucagon-like peptide-1 receptor agonist; type 2 diabetes mellitus; effectiveness; safety; cost-effectiveness; health technology assessment

近年来,随着我国经济水平提升和生活方式变化,糖尿病患者人数持续增长。研究显示,中国的成人糖尿病患病率为 11.2%^[1],其中多数为 2 型糖尿病,部分合并超重、心血管或肾脏疾病^[2]。目前 2 型糖尿病的治疗药物包括口服降糖药、胰岛素、中药制剂^[3]及胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 受体激动剂。然而,传统治疗方案存在不良反应多、服药频率高等问题,影响患者依从性^[4]。GLP-1 受体激动剂是一类新型降糖药物,其主要机制包括葡萄糖依赖性促进胰岛素分泌^[5]、增加饱腹感以减少食物摄入、延缓胃排空^[6],除降糖作用外还具有减重^[7]及心肾保护的潜在效益^[8]。目前国内已上市的 6 种 GLP-1 受体激动剂原研药在药效、不良反应、价格等方面存在明显差异。因此,对上述药物开展卫生技术评估 (HTA) 具有重要意义。

HTA 采用多学科方法对卫生技术进行系统评价,为决策人员提供科学的数据支持,该方法可降低卫生总费用并促进资源合理配置^[9]。本研究采用 HTA 方法,系统评价 GLP-1 受体激动剂用于 2 型糖尿病治疗的有效性、安全性和经济性,旨在为临床合理用药提供参考。

1 资料与方法

收集艾塞那肽、利拉鲁肽、利司那肽、贝那鲁肽、度拉糖肽、司美格鲁肽 6 种 GLP-1 受体激动剂在药学特性、有效性、安全性、经济性及其他属性方面的资料。药学特性、安全性和有效性方面的资料主要来源于药品说明书、诊疗规范、临床指南、专家共识及相关文献报道;经济性的评价资料参照国家药品集中采购平台、国家医疗保障局等官方网站发布的药品价格信息;其他属性的评价资料参照《国家基本药物目录 (2018 年

版)》《国家基本医疗保险、工伤保险和生育保险药品目录 (2024 年)》、美国《制药经理人》杂志发布的“2024 年全球制药企业 50 强”等。有关文献的获得方法如下。

1.1 文献纳入与排除标准

纳入标准:①研究对象应为年满 18 周岁的 2 型糖尿病患者。②干预措施为上述 6 种 GLP-1 受体激动剂单独使用或联合其他常规用药。③对照措施为不同种类的 GLP-1 受体激动剂、其他类型的降糖药、安慰剂或联合使用其他常规药物。④结局指标应包括有效性指标,如糖化血红蛋白 (HbA1c)、HbA1c < 7% 达标率、空腹血糖降低水平、体质量指数等;安全性指标如低血糖、消化道不良反应。⑤研究类型包括随机对照试验、系统评价或 Meta 分析。⑥文章语言限于中文或英文。

排除标准:①重复发表的文献;②无相关结局指标或无法获取相关数据;③会议摘要;④动物实验研究。

1.2 文献检索策略

计算机检索 PubMed、CNKI 和维普等数据库搜集上述 6 种 GLP-1 受体激动剂治疗 2 型糖尿病的随机对照试验、系统评价或 Meta 分析。英文检索词包括 glucagon-like peptide-1 receptor agonists、exenatide、dulaglutide、type 2 diabetes、meta-analysis 等;中文检索词包括 GLP-1 受体激动剂、艾塞那肽、度拉糖肽、2 型糖尿病、荟萃分析等。检索时限均为建库到 2024 年 12 月 31 日。采用主题词与自由词相结合的检索方式。为了尽可能纳入所有符合标准的研究,除了数据库检索外,还在以下情况下进行手动检索:①发现相关系统评价或 Meta 分析引用了数据库未检索到的研究;②研究可能发表在未完全被数据库收录的期刊或会

议论文集中;③关键词匹配可能存在遗漏,需通过研究作者或机构网站获取补充文献。

1.3 文献筛选、数据提取与文献质量评价

两位研究人员独立地对文献进行筛选、提取数据,并进行质量评价。如两位研究者意见不一致,通过讨论解决,必要时由第三位研究者裁决。根据文献类型不同采取相应的评价标准,如系统评价或 Meta 分析的文献质量采用系统评价方法学质量评估工具第二版(AMSTAR-II)量表进行评价^[10]。

1.4 药品评估

采用《医疗机构药品评价与遴选量化记录表》^[11]进行量化打分,以期对拟进入医疗机构的药品进行客观的遴选与评价。

2 结果

依据既定的纳入与排除标准,检索所得文献,经标题、摘要及全文分层筛选,剔除质量较差的研究后,最终纳入系统评价(SR)/Meta 分析共 40 篇。纳入的 40 篇系统评价/Meta 分析的基本特征和质量评价结果见表 1^[12-51]。

2.1 药学特性

6 种 GLP-1 受体激动剂的药动学比较见表 2。药理作用方面, GLP-1 受体激动剂对 2 型糖尿病的临床疗效确切,通过与人体的 GLP-1 受体结合,以葡萄糖依赖性的方式刺激胰岛素合成与分泌;另外,还可以通过调节神经的激活增加患者饱腹感,进而减少食物的摄入;通过迷走传入神经将感知信号传递至脑干,从而抑制消化道中五肽胃泌素的分泌及进食时的胃酸分泌,从而延迟胃排空。艾塞那肽为全球首个上市的 GLP-1 受体激动剂,司美格鲁肽首创口服剂型,优化给药方式,具有一定创新性。评价新上市 GLP-1 受体激动剂时,综合考虑给药方式、机制或靶点改进、脏器保护作用及药动学特征。体内过程方面,6 种药物的药动学参数普遍存在缺失。药剂学和使用方法方面,6 种药物均有皮下注射制剂(仅司美格鲁肽有片剂剂型),成分明确,适用于患者自行注射;度拉糖肽和司美格鲁肽每周给药一次;利拉鲁肽、利司那肽每日一次;艾塞那肽每日两次;贝那鲁肽每日三次。贮藏条件方面,6 种药品均需 2~8℃ 冷藏,启用后可在室温条件下储存一定时间。有效期方面,艾塞那肽和司美格鲁肽最长,为 36 个月,其余药品≥24 个月。

2.2 有效性

目前 GLP-1 受体激动剂国内外均被批准用于成人 2 型糖尿病患者的治疗,在权威指南或专家共识中,通常是将 GLP-1 受体激动剂作为一个整体来进行用药推荐的,见表 3^[52-56]。

一些纳入的研究^[12, 20, 22, 30, 32, 42-43]表明,与胰岛素相比, GLP-1 受体激动剂在降低 HbA1c、空腹血糖、改善体重以及提高糖化血红蛋白达标率方面具有更明显的优势。另一些研究^[13-21, 23-29, 31, 34, 36-41, 44-47, 49-51]表明,与安慰剂或其他降糖药物相比, GLP-1 受体激动剂也能发挥出更好的作用。研究表明,与安慰剂相比,所有 GLP-1 受体激动剂均能有效降低 HbA1c 的水平,其中司美格鲁肽效果最好,其次是度拉糖肽、艾塞那肽^[25]。在降低空腹血糖和改善体重方面,效果最好的是司美格鲁肽。

2.3 安全性

2.3.1 不良反应 根据药品说明书,6 种 GLP-1 受体激动剂中,中度不良反应(如胃肠道症状)发生率均≥10%。重度不良反应发生率分别为:艾塞那肽[0.010%, 0.1%),度拉糖肽[0.010%, 0.1%),司美格鲁肽[0.010%, 1%),利拉鲁肽<0.01%。低血糖发生率在利拉鲁肽和贝那鲁肽中为[1%, 10%)。临床研究中,贝那鲁肽与利司那肽均鲜有急性胰腺炎的报告。

2.3.2 特殊人群 目前 GLP-1 受体激动剂尚无确切的儿童用药安全性资料,但有研究提及,利拉鲁肽用于 2 型糖尿病患儿的胃肠道不良反应发生率高于安慰剂组,不过并未发生严重低血糖不良反应^[57]。另外,老年人可用此类药物。只有在胎儿潜在获益大于潜在风险时才考虑艾塞那肽用于妊娠期妇女,哺乳期应慎用。利拉鲁肽、利司那肽和司美格鲁肽禁用于妊娠期及哺乳期妇女。度拉糖肽不推荐用于妊娠期妇女,禁用于哺乳期妇女。除贝那鲁肽无安全性数据,其余药品均可用于肝肾功能异常患者。

2.3.3 药物相互作用 GLP-1 受体激动剂均有延缓胃排空的作用,司美格鲁肽虽然能延缓胃排空,但目前尚未发现司美格鲁肽与二甲双胍、阿托伐他汀、华法林、地高辛及口服避孕药存在临床显著相互作用^[58],服用需快速胃肠道吸收的口服药的患者,使用本药时应慎重。

2.3.4 其他 GLP-1 受体激动剂引起的不良反应均为可逆性,无致畸致癌作用。

2.4 经济性

根据 2024 年 5 月药智网平台公布的药品中标的挂网价格,计算 6 种药物的日均治疗费用由高到低如下:利拉鲁肽(30.922 元)、贝那鲁肽(24.595 元)、司美格鲁肽(20.952 元)、利司那肽(17.320 元)、度拉糖肽(15.545 元)、艾塞那肽(12.953 元)。这些原研药与同通用名药物相比,日均治疗费用也是最高的。

表 1 纳入 SR/Meta 分析的基本特征和质量等级
Tab 1 General characteristics and quality evaluation of systematic review (SR)/meta-analysis

纳入研究	分析类型	纳入研究总数	患者例数	干预措施	对照措施	结局指标	质量等级
赵俊 2018 ^[12]	SR/Meta	11	709	A	I	①③④⑤⑥	中
杨丹 2017 ^[13]	SR/Meta	6	2265	D	P	①②③④⑤⑥	中
范玲等 2017 ^[14]	SR/Meta	7	2089	C	P	①②④⑤⑥	低
陈枫 2021 ^[15]	SR/Meta	15	7868	A	P/F	①②③④⑤⑥	低
杨婷等 2018 ^[16]	SR/Meta	7	7708	E	P/F	①③④⑥	低
				E + F	P/F		
胡锦涛等 2022 ^[17]	SR/Meta	11	5753	E	P	①②③④⑥	低
秦元等 2019 ^[18]	SR/Meta	9	5556	E	P/F	①③④⑤⑥	低
颜新 2009 ^[19]	SR/Meta	6	2621	B	F	①④	低
				B	P		
				B + F	P + F		
王溢苏 2011 ^[20]	SR/Meta	8	2782	A/B	I	①③④⑤⑥	低
吴佳昕 2021 ^[21]	SR/Meta	24	4272	A/B + F	F	①③④⑤⑥	低
赵学敏 2013 ^[22]	SR/Meta	10	3065	A/B + F	I + F	①③④⑤	中
邢鑫秒 2024 ^[23]	网状 Meta	71	34 729	A/B/C/D/E	F	②③	中
Zaccardi 等 2016 ^[24]	SR/Meta	34	21 126	A/D/E	P	①③④⑤⑥	低
Chen 等 2023 ^[25]	网状 Meta	12	6213	A/D/E	P/F	①③④⑤⑥	低
Patel 等 2023 ^[26]	网状 Meta	3	2401	E	F	①③	中
Sharma 等 2018 ^[27]	网状 Meta	8	5546	E	F	①②③④	低
Kanters 等 2019 ^[28]	网状 Meta	21	11 714	E	F	①②③④	低
Ding 等 2020 ^[29]	SR/Meta	3	2066	A/E	F	①③④⑥	低
Yoon 等 2018 ^[30]	网状 Meta	50	15 494	A/B/C/D/F	I	①③④⑤	低
Li 等 2016 ^[31]	网状 Meta	78	34 685	A/B/D	P/F	②⑤	低
Xu 等 2021 ^[32]	SR/Meta	5	3383	D	I	①③⑤⑥	中
Jiang 等 2021 ^[33]	网状 Meta	54	23 209	A/B/D	A/B/D/P	①②③④⑤	低
Qie 等 2020 ^[34]	SR/Meta	21	20 367	D	P/F	①③④⑤	低
Xue 等 2016 ^[35]	SR/Meta	8	5531	A/B	A/B	①③④⑤⑥	低
Karagiannis 等 2015 ^[36]	SR/Meta	33	16 003	A/D	P/F	①③⑥	低
Shi 等 2018 ^[37]	SR/Meta	9	9773	E	P/F	①③④⑤⑥	中
Nikfar 等 2012 ^[38]	SR/Meta	14	2583	A	P	①③④⑥	中
Hussein 等 2020 ^[39]	网状 Meta	64	31 384	A/B/C/D/E/F	P/F	①③⑥	中
Hu 等 2023 ^[40]	SR/Meta	17	14 940	E	P/F	①③⑤⑥	低
Tran 等 2018 ^[41]	SR/Meta	13	4330	A/B/C/D/E	F	①③⑤⑥	低
Li 等 2010 ^[42]	SR/Meta	5	1452	A/B/C	I + F	①②③④⑤⑥	低
Shyangdan 等 2010 ^[43]	SR/Meta	28	10 724	A/B	P/I/F	①②③④⑤⑥	低
Du 等 2014 ^[44]	SR/Meta	11	1538	B	P	①③④⑥	低
Li 等 2018 ^[45]	SR/Meta	11	9519	E	P/F	①②③④⑤⑥	低
Andreadis 等 2018 ^[46]	SR/Meta	12	9501	E	P/F	①③⑤⑥	低
Schmidt 等 2014 ^[47]	SR/Meta	14	6156	C	P/F	①③④⑤⑥	中
Visolyi 等 2023 ^[48]	网状 Meta	29	23 605	C + I	B + I	①③④⑤	低
Yao 等 2024 ^[49]	网状 Meta	76	39 246	A/B/C/D/E	P	①③④⑥	中
Yang 等 2024 ^[50]	SR/Meta	15	6984	E	P/F	①③④⑥	中
Deng 等 2024 ^[51]	SR/Meta	13	2885	A/E	P	①③④⑤⑥	中

注：A. 艾塞那肽；B. 利拉鲁肽；C. 利司那肽；D. 度拉糖肽；E. 司美格鲁肽；F. 其他降糖药物；I. 胰岛素；P. 安慰剂；① .HbA1c；② .HbA1c 达标率；③ . 体重；④ . 空腹血糖；⑤ . 低血糖发生率；⑥ . 胃肠道不良反应发生率。SR 的质量评估采用 AMSTAR- II 核查表进行评估^[10]。

Note: A. exenatid; B. liraglutide; C. lixisenatide; D. dulaglutide; E. semaglutide; F. other antidiabetic agents; I. insulin; P. placebo; 1. HbA1c; 2. HbA1c target achievement rate; 3. body weight; 4. fasting plasma glucose; 5. incidence of hypoglycemia; 6. incidence of gastrointestinal adverse events. The quality of system review was assessed with the AMSTAR- II checklist^[10].

2.5 其他属性

除药学特性、有效性、安全性和经济性外，为全面评估 GLP-1 受体激动剂在现实临床中的适

应性和政策支持情况，本文从医保目录纳入情况、是否进入国家集采、药品研发背景与企业实力、全球上市情况等方面进行补充说明，统称为“其他

表 2 胰高血糖素样肽 -1 受体激动剂的药动学比较

Tab 2 Pharmacokinetics between glucagon-like peptide-1 receptor agonists

药品名称	药动学参数							排泄途径
	达峰时 间 /h	峰浓度 / (ng/mL)	药时曲线下面积 / (ng·h/mL)	蛋白结 合率 /%	消除半 衰期 /h	表观分布 容积 /L	表观清除率 / (L/h)	
艾塞那肽	2.1	0.211	1.036	—	2.4	28.3	9.1	肾脏 / 蛋白质分解代谢
利拉鲁肽	8 ~ 12	0.035 261	—	98	13	11 ~ 17	1.2	尿液和粪便 / 蛋白质分解代谢
利司那肽	1 ~ 3.5	—	—	55	3	100	35	肾脏 / 蛋白质分解代谢
贝那鲁肽	0.32	0.642	0.32812	—	0.183	379	378.5 ~ 416.3	肾脏
度拉糖肽	48	114	14000	—	0.75 mg: 108 1.5 mg: 112.8	0.75 mg: 19.2 1.5 mg: 17.4	0.75 mg: 0.111 1.5 mg: 0.107	蛋白质分解代谢
司美格鲁肽	24 ~ 72	—	—	99	168	12.5	0.05	尿液和粪便 / 蛋白质分解代谢

注：“—”该项数据未知或当前无法获取。
Note: “—” Indicates that the data is unknown or currently unavailable.

表 3 胰高血糖素样肽 -1 受体激动剂在权威指南或共识中的推荐情况

Tab 3 Recommendations of glucagon-like peptide-1 receptor agonists in authoritative guidelines or consensus

年份	名称	发布机构	推荐情况	证据等级
2021	缓解 2 型糖尿病中国专家 共识 ^[52]	中华医学会	HbA1c 不达标且生活干预不能落实的 2 型糖尿病患者联用 GLP-1 受体激动剂，有助于缓解 2 型糖尿病	2A
2021	中国 2 型糖尿病防治指南 (2020 年版) ^[53]	中华医学会糖尿病学 分会	使用 GLP-1 受体激动剂能降低新发大量蛋白尿的风险	C
2022	2022 ADA 糖尿病医学诊疗 标准 ^[54]	美国糖尿病学会	对于患有动脉粥样硬化性心血管疾病、心力衰竭和 / 或慢性肾病或具有高风险的 2 型糖尿病患者，GLP-1 受体激动剂是合适的初始治疗	A
2022	中国老年 2 型糖尿病防治 临床指南 (2022 版) ^[55]	中国老年医学学会老 年内分泌代谢分会	对于 2 型糖尿病患者，在可能的情况下首选 GLP-1 受体激动剂	A
2022	中国老年 2 型糖尿病防治 临床指南 (2022 版) ^[55]	中国老年医学学会老 年内分泌代谢分会	合并动脉粥样硬化性心血管疾病或高风险因素、肾脏疾病或心力衰竭的老年 2 型糖尿病患者优先选择 GLP-1 受体激动剂	A
2024	2024 ADA 糖尿病医学诊疗 标准 ^[56]	美国糖尿病学会	对于成人 2 型糖尿病患者，GLP-1 受体激动剂比胰岛素更受青睐	A
			如果使用胰岛素，建议与 GLP-1 受体激动剂联合治疗，以提高疗效	A

属性”。上述 6 种 GLP-1 受体激动剂均在 2024 年版《国家基本医疗保险、工伤保险和生育保险药品目录》的医保乙类目录中，且均有限制条件。除利拉鲁肽注射液外，其余药物均不在 2018 年版《国家基本药物目录》中，且利拉鲁肽注射液无△要求（“△”表示药品应在具备相应处方资质的医师或在专科医师指导下使用，并加强使用监测和评价）。以上药物均不在国家集中采购药品目录中。这 6 种药物均为原研药。生产企业状况方面，艾塞那肽和利司那肽的生产企业在 2024 年度《全球制药企业 50 强》排行榜中排名前 10，度拉糖肽、利拉鲁肽和司美格鲁肽的生产企业排名前 20，而贝那鲁肽的生产企业不在该排行榜中。全球使用情况方面，贝那鲁肽只在中国上市使用，其余药物在美国、欧洲、日本、中国均已上市。

2.6 HTA 总分值

按上述评分标准进行评估，艾塞那肽、利拉鲁肽、度拉糖肽、贝那鲁肽、利司那肽、司美格鲁肽的总分值见表 4。

3 讨论

本研究结果显示，6 种 GLP-1 受体激动剂

表 4 药品卫生技术评估总分值 (分)

Tab 4 Total score of drug health technology assessment (score)

药品名称	药学特性	有效性	安全性	经济性	其他属性	总分
艾塞那肽	24.0	20.0	17.5	10.0	5.5	77.0
利拉鲁肽	23.0	23.0	18.0	5.4	7.3	76.7
度拉糖肽	23.0	21.0	17.0	8.8	5.3	75.1
贝那鲁肽	22.0	17.0	11.0	6.7	3.5	60.2
利司那肽	23.0	18.0	12.0	8.2	5.5	66.7
司美格鲁肽	24.5	25.0	16.0	7.3	5.3	78.1

中，司美格鲁肽、艾塞那肽、利拉鲁肽的评分较高，其中司美格鲁肽的评分最高。在药学特性方面，艾塞那肽和利拉鲁肽需每日注射，可能影响患者的依从性；而司美格鲁肽具有较长的半衰期，仅需每周给药一次，有助于提高患者的用药依从性^[59]。在有效性方面，司美格鲁肽在降低糖化血红蛋白、空腹血糖及改善体重方面的效果相对更优。在安全性方面，司美格鲁肽的不良反应发生率与其他 GLP-1 受体激动剂相当，作为长效制剂，其在胃肠道耐受性方面优于短效制剂^[60]。而在经济性方面，利拉鲁肽的日均治疗费用最高，这有可能使患者的经济负担加重。在其他属性方面，司美格鲁肽亦展现出较为突出的综合优势。

本研究亦存在局限, 纳入的 GLP-1 受体激动剂仅限于原研药, 未对国内上市仿制药进行分析。综上, 司美格鲁肽在综合效益方面表现较优, 可作为我国 2 型糖尿病患者 GLP-1 受体激动剂治疗的优选方案之一。

参考文献

- [1] Li YZ, Teng D, Shi XG, et al. Prevalence of diabetes recorded in mainland China using 2018 diagnostic criteria from the American Diabetes Association: national cross sectional study [J]. *BMJ*, 2020, 69: m997.
- [2] 孟彤, 吕旋瑞, 李旭晗, 等. 雷公藤多苷联合血管紧张素转换酶抑制剂/血管紧张素 II 受体阻滞剂治疗糖尿病肾病的荟萃分析 [J]. *解放军药理学学报*, 2023, 36 (3): 231-238.
- [3] 宗晓郁, 周锦, 张东强, 等. 黄芪联合 ACEI 或 ARB 治疗早期糖尿病肾病 meta 分析 [J]. *中国公共卫生*, 2022, 38 (9): 1219-1223.
- [4] 孟彤, 张灵健, 沈智文, 等. 临床药物依从性评价的研究进展 [J]. *医药导报*, 2021, 40 (4): 466-471.
- [5] Drucker DJ. GLP-1 physiology informs the pharmacotherapy of obesity [J]. *Mol Metab*, 2022, 57: 101351.
- [6] Ard J, Fitch A, Fruh S, et al. Weight loss and maintenance related to the mechanism of action of glucagon-like peptide-1 receptor agonists [J]. *Adv Ther*, 2021, 38 (6): 2821-2839.
- [7] Jastreboff AM, Kushner RF. New frontiers in obesity treatment: GLP-1 and nascent nutrient-stimulated hormone-based therapeutics [J]. *Annu Rev Med*, 2023, 74: 125-139.
- [8] 赵延珍, 杜婧. GLP-1 受体激动剂治疗 2 型糖尿病的研究进展 [J]. *老年医学研究*, 2021, 2 (3): 55-60.
- [9] 李旭晗, 冼静怡, 杨燕, 等. 药物流行病学在临床药物评价中的应用 [J]. *医药导报*, 2023, 42 (9): 1368-1374.
- [10] Shea BJ, Reeves BC, Wells G, et al. AMSTAR 2: a critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both [J]. *BMJ*, 2017, 358: j4008.
- [11] 赵志刚, 董占军, 刘建平. 中国医疗机构药品评价与遴选快速指南 (第二版) [J]. *医药导报*, 2023, 42 (4): 447-456.
- [12] 赵俊. 艾塞那肽治疗成人腹型肥胖 2 型糖尿病患者胰岛素抵抗的疗效评价 [D]. 青岛: 青岛大学, 2018.
- [13] 杨丹. 度拉糖肽治疗 2 型糖尿病的有效性和安全性系统评价 [D]. 泸州: 西南医科大学, 2017.
- [14] 范玲, 谢星星, 范小冬, 等. 利司鲁肽治疗 2 型糖尿病的系统评价 [J]. *中国医院药学杂志*, 2017, 37 (3): 254-257, 318.
- [15] 陈枫. 皮下注射艾塞那肽周制剂治疗 2 型糖尿病有效性和安全性的 Meta 分析 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2021.
- [16] 杨婷, 李明莎, 王治坤. 皮下注射索马鲁肽治疗 2 型糖尿病有效性和安全性的 Meta 分析 [J]. *中国药房*, 2018, 29 (20): 2856-2861.
- [17] 胡锦涛, 韩菁婕, 金旻, 等. 索马鲁肽治疗 2 型糖尿病疗效与安全性的系统评价 [J]. *中国医院用药评价与分析*, 2022, 22 (9): 1114-1121.
- [18] 秦元, 周俊凝, 张春燕, 等. 索马鲁肽治疗 2 型糖尿病疗效与安全性的系统评价 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2019, 36 (7): 626-641.
- [19] 颜新. GLP-1 类似物 -Liraglutide 治疗 2 型糖尿病的系统评价 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2009.
- [20] 王溢苏. GLP-1 类似物与胰岛素治疗口服药效果不佳 2 型糖尿病病人的系统评价 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2011.
- [21] 吴佳昕. GLP-1 受体激动剂对比 DPP-4 抑制剂治疗 2 型糖尿病疗效与安全性的 Meta 分析 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2021.
- [22] 赵学敏. GLP-1 受体激动剂治疗 2 型糖尿病的荟萃分析 [D]. 西宁: 青海大学, 2013.
- [23] 邢鑫秒. SGLT2 抑制剂和 GLP-1 受体激动剂治疗 2 型糖尿病伴或不伴心血管疾病的疗效和安全性的网状 meta 分析 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2024.
- [24] Zaccardi F, Htike ZZ, Webb DR, et al. Benefits and harms of once-weekly glucagon-like peptide-1 receptor agonist treatments: a systematic review and network meta-analysis [J]. *Ann Intern Med*, 2016, 164 (2): 102-113.
- [25] Chen H, Li XZ, Chen JQ, et al. Comparative efficacy and safety of glucagon-like peptide 1 receptor agonists for the treatment of type 2 diabetes: a network meta-analysis [J]. *Medicine*, 2023, 102 (27): e34122.
- [26] Patel T, Nageeta F, Sohail R, et al. Comparative efficacy and safety profile of once-weekly semaglutide versus once-daily sitagliptin as an add-on to metformin in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis [J]. *Ann Med*, 2023, 55 (2): 2239830.
- [27] Sharma R, Wilkinson L, Vrazic H, et al. Comparative efficacy of once-weekly semaglutide and SGLT-2 inhibitors in type 2 diabetic patients inadequately controlled with metformin monotherapy: a systematic literature review and network meta-analysis [J]. *Curr Med Res Opin*, 2018, 34 (9): 1595-1603.
- [28] Kanter S, Wilkinson L, Vrazic H, et al. Comparative efficacy of once-weekly semaglutide versus SGLT-2 inhibitors in patients inadequately controlled with one to two oral antidiabetic drugs: a systematic literature review and network meta-analysis [J]. *BMJ Open*, 2019, 9 (7): e023458.
- [29] Ding L, Sun B, Xiao XH. Comparing the efficacy and safety of glucagon-like peptide 1 receptor agonists with sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors for obese type 2 diabetes patients uncontrolled on metformin: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials [J]. *Int J Endocrinol*, 2020, 2020: 1626484.
- [30] Yoon JH, Min SH, Ahn CH, et al. Comparison of non-insulin antidiabetic agents as an add-on drug to insulin therapy in type 2 diabetes: a network meta-analysis [J]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1): 4095.
- [31] Li ZX, Zhang Y, Quan XC, et al. Efficacy and acceptability of glycemic control of glucagon-like peptide-1 receptor agonists among type 2 diabetes: a systematic review and network meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (5): e0154206.
- [32] Xu J, Yao DZ, Xia JY. Efficacy and safety of dulaglutide compared with glargine in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Clin Pharm Ther*, 2021, 46 (5): 1245-1253.
- [33] Jiang YW, Liu J, Chen X, et al. Efficacy and safety of glu-

- cagon-like peptide 1 receptor agonists for the treatment of type 2 diabetes mellitus: a network meta-analysis [J]. *Adv Ther*, 2021, 38 (3): 1470-1482.
- [34] Qie SH, Li XJ, Wang XY, et al. Efficacy and safety of long-acting glucagon-like peptide-1 receptor agonist dulaglutide in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of 21 randomized controlled trials [J]. *Endocrine*, 2020, 68 (3): 508-517.
- [35] Xue X, Ren Z, Zhang A, et al. Efficacy and safety of once-weekly glucagon-like peptide-1 receptor agonists compared with exenatide and liraglutide in type 2 diabetes: a systemic review of randomised controlled trials [J]. *Int J Clin Pract*, 2016, 70 (8): 649-656.
- [36] Karagiannis T, Liakos A, Bekiari E, et al. Efficacy and safety of once-weekly glucagon-like peptide 1 receptor agonists for the management of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2015, 17 (11): 1065-1074.
- [37] Shi FH, Li H, Cui M, et al. Efficacy and safety of once-weekly semaglutide for the treatment of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 576.
- [38] Nikfar S, Abdollahi M, Salari P. The efficacy and tolerability of exenatide in comparison to placebo: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials [J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2012, 15 (1): 1-30.
- [39] Hussein H, Zaccardi F, Khunti K, et al. Efficacy and tolerability of sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors and glucagon-like peptide-1 receptor agonists: a systematic review and network meta-analysis [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2020, 22 (7): 1035-1046.
- [40] Hu SS, Su XR, Fan GR. Efficacy and tolerability of subcutaneous semaglutide for type 2 diabetes patients: an updated systematic review and meta-analysis [J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2023, 15 (1): 218.
- [41] Tran S, Retnakaran R, Zinman B, et al. Efficacy of glucagon-like peptide-1 receptor agonists compared to dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for the management of type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2018, 20 (Suppl 1): 68-76.
- [42] Li WX, Gou JF, Tian JH, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists versus insulin glargine for type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Curr Ther Res Clin Exp*, 2010, 71 (4): 211-238.
- [43] Shyangdan DS, Royle PL, Clar C, et al. Glucagon-like peptide analogues for type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis [J]. *BMC Endocr Disord*, 2010, 10: 20.
- [44] Du Q, Wang YJ, Yang S, et al. Liraglutide for the treatment of type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials [J]. *Adv Ther*, 2014, 31 (11): 1182-1195.
- [45] Li XJ, Qie SH, Wang XY, et al. The safety and efficacy of once-weekly glucagon-like peptide-1 receptor agonist semaglutide in patients with type 2 diabetes mellitus: a systemic review and meta-analysis [J]. *Endocrine*, 2018, 62 (3): 535-545.
- [46] Andreadis P, Karagiannis T, Malandris K, et al. Semaglutide for type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2018, 20 (9): 2255-2263.
- [47] Schmidt LJ, Habacher W, Augustin T, et al. A systematic review and meta-analysis of the efficacy of lixisenatide in the treatment of patients with type 2 diabetes [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2014, 16 (9): 769-779.
- [48] Visolyi G, Domján BA, Svébis MM, et al. Efficacy and safety of commercially available fixed-ratio combinations of insulin degludec/liraglutide and insulin glargine/lixisenatide: a network meta-analysis [J]. *Can J Diabetes*, 2023, 47 (4): 368-377.
- [49] Yao HQ, Zhang AQ, Li DL, et al. Comparative effectiveness of GLP-1 receptor agonists on glycaemic control, body weight, and lipid profile for type 2 diabetes: systematic review and network meta-analysis [J]. *BMJ*, 2024, 384: e076410.
- [50] Yang L, Duan XY, Hua P, et al. Effectiveness and safety of semaglutide in overweight/obese adults with or without type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Res Med Sci*, 2024, 29: 60.
- [51] Deng R, Mei KB, Song TG, et al. First-line treatment with sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors and glucagon-like peptide-1 receptor agonists in type 2 diabetic population at low risk of cardiovascular disease: a meta-analysis [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2024, 15: 1289643.
- [52] 缓解 2 型糖尿病中国专家共识编写专家委员会. 缓解 2 型糖尿病中国专家共识 [J]. *中国全科医学*, 2021, 24 (32): 4037-4048, F01.
- [53] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2020 年版) [J]. *中华糖尿病杂志*, 2021, 13 (4): 315-409.
- [54] American Diabetes Association Professional Practice Committee. 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes-2022 [J]. *Diabetes Care*, 2022, 45 (Suppl 1): S17-S38.
- [55] 中国老年 2 型糖尿病防治临床指南编写组, 中国老年医学学会老年内分泌代谢分会, 中国老年保健医学研究会老年内分泌与代谢分会, 等. 中国老年 2 型糖尿病防治临床指南 (2022 年版) [J]. *中华内科杂志*, 2022, 61 (1): 12-50.
- [56] American Diabetes Association Professional Practice Committee. 2. Diagnosis and classification of diabetes: standards of care in diabetes-2024 [J]. *Diabetes Care*, 2024, 47 (Suppl 1): S20-S42.
- [57] 李素琼, 程晓亮, 班立丽, 等. 利拉鲁肽超说明书用药的循证评价 [J]. *中南药学*, 2021, 19 (5): 986-990.
- [58] 张恩景, 李玉萍. 长效胰高血糖素样肽-1 受体激动剂索马鲁肽 [J]. *中南药学*, 2018, 16 (6): 817-820.
- [59] 郑征, 徐静, 李慧杰, 等. 1 例精神分裂症合并糖尿病患者药学监护 [J]. *药物流行病学杂志*, 2022, 31 (9): 640-643.
- [60] 吴玥, 陈力, 何绪成. 基于 FAERS 数据库的司美格鲁肽不良事件信号挖掘研究 [J]. *中南药学*, 2022, 20 (9): 2160-2164.

(收稿日期: 2025-03-17; 修回日期: 2025-05-17)

患者分层评估的药学服务模式在老年慢性阻塞性肺疾病中的效果评价

梅玲, 周后凤*, 范玉婷 (成都市第五人民医院药剂科, 成都 611130)

摘要: **目的** 通过签约药学延续性服务, 探讨基于患者分层评估的药学延续性服务模式对老年慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 患者的影响。 **方法** 以随机抽样法收集老年 COPD 患者 104 例, 随机分成对照组 ($n = 52$) 和干预组 ($n = 52$), 6 个月后评估两组患者在 COPD 自我评估测试 (CAT) 评分、用药依从性、健康生命质量、用药偏差发生率的变化, 对干预组患者进行满意度评估。 **结果** 干预组患者较干预前、对照组相比, CAT 评分、用药偏差发生率显著下降, 依从性评分、健康生命质量、满意度均显著提高 ($P < 0.05$)。 **结论** 患者分层评估的药学服务干预有助于提高老年 COPD 患者的临床疗效和用药依从性, 减少用药偏差, 提高患者满意度。本研究为建立适用于老年 COPD 患者的分层评估干预流程提供参考。

关键词: 慢性阻塞性肺疾病; 患者分层评估; 药学延续服务模式

中图分类号: R95

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)12-3721-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.038

Effect of pharmaceutical care model with stratified patient evaluation in elderly patients with chronic obstructive pulmonary disease

MEI Ling, ZHOU Houfeng*, FAN Yuting (Department of Pharmacy, Chengdu Fifth People's Hospital, Chengdu 611130)

Abstract: Objective To determine the influence of pharmacy extended service model based on stratified evaluation of elderly patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) through contracted pharmacy extended service. **Methods** Totally 104 elderly patients with COPD were collected by random sampling and randomly divided into a control group ($n = 52$) and an intervention group ($n = 52$). After 6 months, the changes in COPD assessment test (CAT) score, medication compliance, quality of life and medication deviation incidence of patients in both groups were evaluated, and the satisfaction of patients in the intervention group was evaluated. **Results** Compared with before the intervention and the control group, CAT score and incidence of medication deviation were obviously decreased in the intervention group, while the compliance score, life quality and satisfaction were increased, with significance ($P < 0.05$). **Conclusion** Pharmaceutical care intervention based on stratified assessment of patients helps improve the clinical efficacy and medication compliance of elderly patients with COPD, reduce medication deviations, and enhance patient satisfaction. This study provides a reference for establishing a hierarchical evaluation intervention process for elderly patients with COPD.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease; stratified assessment of patient; pharmacy extended service model

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种常见的、可以预防和

治疗的慢性气道疾病, 以持续性呼吸道症状和气流受限为特征, 通常由于明显暴露于有害颗粒或

基金项目: 成都市卫生健康委员会医学科研课题 (No.2022540, No.2022506); 四川省卫生和计划生育委员会项目 (No.17PJ572)。

作者简介: 梅玲, 女, 主管药师, 主要从事临床药学研究, email: 314048194@qq.com ***通信作者:** 周后凤, 女, 主任药师, 主要从事药事管理、临床药学研究, email: 510823751@qq.com

气体导致气道和 / 或肺泡异常^[1-2]。调查研究表明：COPD 已成为 50 岁以上人群世界伤残调整生命年的第三大病因，也是导致我国生命损失年的第四大疾病原因^[3-4]。老年人为 COPD 的高发人群，主要原因有老年患者的临床症状缺乏特异性、不易正确使用吸入制剂、合并使用多种药物^[5]。出院延续性服务模式是近年来医院服务研究的热点。延续性服务模式最早起源于美国，多作为住院服务的延伸^[6]。本课题组基于我国老年 COPD 患者合理用药评价指标开展老年 COPD 患者不合理用药风险因素评估，对患者进行分层评估管理，对用药高风险人群开展重点药学监护，以期为进一步探索并构建个体化、规范化、系统化的分级药学延续性服务体系奠定基础，从而有效提高 COPD 患者延续性药学服务管理效率，完善延续性药学服务管理体系。

1 资料与方法

1.1 纳排标准和资料来源

选取 2023 年 7 月—2024 年 7 月在我院就诊的 COPD 患者，按照课题纳入与排除标准进行筛选。纳入标准：我院老年科 ≥ 60 岁、户籍人口或居住时间 ≥ 1 年的常住人口，并签署知情同意的 COPD 出院患者。排除标准：① 具体用药情况不明确；② 听力及语言交流障碍；③ 合并重大器官功能障碍或精神障碍。采用随机数字表法将研究对象分为干预组（ $n = 52$ ）和对照组（ $n = 52$ ）。干预组和对照组患者的药学服务模式均获得伦理委员会批准（伦理批准文号：AF/72/2019-01.1）。收集患者的基本人口学资料，包括年龄、

性别、教育程度、婚姻状态、医疗保险、月收入等；临床信息，包括诊断、所用吸入装置种类，两组资料差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ），见表 1。

表 1 两组患者基本信息
Tab 1 Basic characteristics of two groups of patients

项目	干预组 ($n = 52$)	对照组 ($n = 52$)	t/χ^2	P
年龄 / 岁 ($\bar{x} \pm s$)	75.10 ± 7.24	75.19 ± 6.74	0.074	0.941
性别 [n (%)] 男	33 (63.46)	32 (61.54)	0.041	1.000
吸烟 [n (%)] 有	28 (53.85)	21 (40.38)	1.891	0.238
教育				
小学以下	22	13	6.646	0.084
小学	21	26		
中学	7	13		
大专及以上	2	0		

1.2 方法

1.2.1 分组设计和管理方式 采用随机数字表法将符合纳入标准的患者随机分为两组。对照组仅接受常规出院用药教育，仅在患者需要时予以药学建议。干预组患者在常规管理的基础上同时接受患者分层评估辅助下的 COPD 药学延续性服务，具体内容如下：由临床药师主导，高年资调剂药师、高年资医师及护师共同组建 COPD 延续药学服务团队，并组建药学延续服务微信管理群，由团队内讨论制订延续服务方案、服务流程、问卷设计、问卷调研方式、评价指标等。延续药学服务团队对签约患者进行初始状态评估，并根据每位患者疾病因素和药物因素进行管理分级，评估要素中患者因素和药物因素的条目数以数字表示，见表 2。两组均于基线期和第 6 个月进行评估。

表 2 老年 COPD 患者分层评估要素及干预方案

Tab 2 Stratified assessment factors and intervention programs for elderly patients with COPD

项目	评估要素	干预方案
患者因素	年龄 (≥ 75 岁)	1. 三级管理：药物因素 = 0
	机体因素 (听力障碍、视力障碍或认知功能下降)	仅延续性药学随访服务
	精神状态 (焦虑、抑郁、紧张)	2. 二级管理：患者因素 ≤ 2 且药物因素 = 1
	基础疾病 (≥ 3 种)	COPD 患者用药教育 (管理群定期推送依从性教育等用药科普)；
	依从性欠佳 (漏服或错服药物、自行停药或购药)	一对一吸入装置使用指导；延续性药学随访服务
	近期末就医 (3 个月)	3. 一级管理：患者因素 ≥ 3 且药物因素 ≥ 1 或药物因素 ≥ 2
	近期末接受过用药指导	面对面用药指导 (定期开展面对面随访、COPD 用药指导及药物
药物因素	药品费用可接受能力差 (药品费用占家庭总收入 50% 以上)	咨询)，其余同“2”项
	多重用药 (用药 ≥ 5 种)	
	药品不良反应	
	正在或需要服用需用药监护的药物 (如华法林、地高辛等)	

观察干预前后：

① COPD 评估测试 (COPD assessment test, CAT 问卷)：本研究利用 CAT 问卷从咳嗽、痰量、胸闷、上楼气喘、居家活动、外出信心、睡眠和精力的角度进行全方位衡量，总分为 40 分。有研究表明，患者 CAT 评分 ≥ 2 分的差异或改变量，即

可表示临床治疗有效^[7]；② 用药依从性评分：采用 Morisky 依从性量表 (MMAS-8)^[8] 对患者用药依从性进行评价，该量表共包括 8 个条目，总分为 8 分，总分 < 6 分表示依从性差，6 ~ 7 分表示依从性中等，≥ 8 分表示依从性高；③ 健康生命质量评价：采用欧洲多维健康量表 (EQ-5D-5L)^[9] 即行动能力

(MO)、自我照顾(SC)、日常活动(UA)、疼痛不适(PD)、焦虑/抑郁(AD)五个维度(每个维度五个水平)的效用值进行评价;④用药偏差发生率;⑤干预组患者的满意度:患者干预前和干预6个月后填写我院自行设计的患者满意度调查问卷,包括药师专业素养、问题反馈及时性、治疗效果、服务态度、继续服务意愿五项内容,每项1分。

1.2.2 统计学方法 采用SPSS 25.0软件进行统计学分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 t 检验;计数资料以例数(n)或百分比(%)表示,采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者CAT评分比较

干预组6个月时CAT评分为(18.58 ± 5.45)分,显著优于干预前和同期对照组($P<0.05$),见表3。

表3 两组患者CAT评分比较
Tab 3 CAT scores between two groups

组别	CAT 评分			
	干预前	干预6个月	t	P
干预组	23.17 $\pm$ 6.50	18.58 $\pm$ 5.45	-12.23	<0.001
对照组	21.79 $\pm$ 7.36	22.15 $\pm$ 7.39	0.752	0.455
t	1.062	-2.751		
P	0.293	0.008		

2.2 两组患者干预前后Morisky依从性量表比较
干预组6个月时用药依从性评分为(6.30 ± 1.43)分,显著优于干预前和同期对照组($P<0.05$),见表4。

表4 两组患者用药依从性评分比较
Tab 4 MMAS-8 scores between two groups

组别	干预前/分	干预6个月后/分	t	P
干预组	4.50 $\pm$ 1.97	6.30 $\pm$ 1.43	7.34	<0.01
对照组	4.35 $\pm$ 2.00	4.18 $\pm$ 2.00	-1.405	0.166
t	0.357	6.308		
P	0.722	<0.01		

2.3 两组患者干预前后EQ-5D-5L量表比较

干预组6个月时EQ-5D-5L量表效用值为0.863 $\pm$ 0.134,显著优于干预前和同期对照组($P<0.05$),见表5。

表5 两组患者EQ-5D-5L量表比较
Tab 5 EQ-5D-5L scale between two groups

组别	干预前	干预6个月后	t	P
干预组	0.760 $\pm$ 0.208	0.863 $\pm$ 0.134	5.169	<0.01
对照组	0.771 $\pm$ 0.163	0.764 $\pm$ 0.153	-0.641	0.525
t	-0.303	3.132		
P	0.763	0.003		

2.4 两组患者6个月用药偏差发生率比较

干预组6个月时共有6例发生用药偏差,显著优于同期对照组($P<0.05$),见表6。

表6 两组患者6个月时用药偏差发生率比较[n(%)]

Tab 6 Medication deviation rates between the two groups at 6 months [n(%)]

组别	n	药物或吸入制剂使用不当	药物相互作用	其他	t	P
干预组	52	2 (3.85)	2 (3.85)	2 (3.85)	8.899	0.003
对照组	52	9 (17.31)	6 (11.54)	4 (7.70)		

2.5 干预组干预前后患者满意度评价比较

干预后6个月时患者满意度评价为(4.40 ± 0.664),显著优于基线期($P<0.05$),见表7。

表7 干预组在干预前后患者满意度比较

Tab 7 Satisfaction before and after the intervention in the intervention group

干预组	满意度评价	t	P
干预前	4.40 $\pm$ 0.664	5.956	0.01
干预后	3.48 $\pm$ 0.754		

3 讨论

3.1 患者分层评估的药学服务干预可降低患者CAT评分,改善患者的临床症状

随着我国人口老龄化的加剧,老年COPD患者需要更为精细化、个体化的药学服务。我院探索分层评估的出院延续性模式结合患者出院时的病情状态和药物因素,对患者进行分层评估、制订治疗方案以及个体化的随访药学服务,取得了较好的成效。COPD的临床症状具有持续性和进展性的特点。本研究从咳嗽、咳痰、肺部症状、爬楼、精力和睡眠等维度评估干预效果。与出院时相比,干预组在6个月时的CAT评分明显低于对照组,提示该干预模式可有效改善患者的临床症状。

3.2 患者分层评估的药学服务干预可提高患者的依从性、健康生命质量及患者满意度

吸入治疗是COPD稳定期管理的基石,不规范的吸入技术和使用错误的吸入剂型是导致COPD控制不佳或反复急性发作的重要原因之一。COPD患者使用的吸入剂型众多,包括压力定量吸入剂、干粉吸入剂、软物吸入剂等。研究发现,评估吸入技术并指导患者正确使用吸入剂与COPD患者出院后急性发作的频率成负相关^[10]。而老年患者常常存在自主吸入困难、吸气流速不足、手口不协调、疾病严重程度重等问题,导致使用吸入剂效果不佳^[11]。本研究发现忘记服药和擅自停药的患者仍占16%,主要是独居老人和家庭收入偏低的患者。本研究通过对干预组患者管理群定期推送依从性教育等用药科普,对于一级或二级管理患者给予一对一吸入装置使用指导或面对面用药指导,同时对于部分吸气功能不足的患者及时更换药品等模式。与出院时相比,干预

组在 6 个月时的 MMAS-8 评分显著高于对照组, EQ-5D-5L 量表评分明显高于对照组, 提示通过该干预模式对患者进行有效的指导和监督, 可使患者更易于接受长期规律使用吸入剂, 又可以有效提高患者用药依从性、改善患者生活质量。本研究表明, 经 6 个月干预随访后患者满意度显著提高, 与参考文献的研究结果一致^[12]。

3.3 患者分层评估的药学服务干预可减少用药偏差发生率

高龄 COPD 患者常因合并高血压、糖尿病等多种慢性疾病, 出现多重用药现象, 且老年人群多存在不同程度的理解和记忆障碍、用药依从性差等问题, 对各类药物的服用时间、服药间隔、注意事项、不良反应等用药问题认识模糊, 极易出现用药偏差, 导致病情加重。本研究发现的主要用药偏差包括使用吸入制剂致鹅口疮, 前列腺增生患者使用吸入剂导致排尿困难, 奥美拉唑与氯吡格雷同用, 肝功能异常未及时调整他汀类药物, 接受双联抗血小板药治疗同时使用糖皮质激素导致的消化道出血, 长期口服质子泵抑制剂导致的肠道菌群失调等。本研究通过对一级或二级管理患者给予一对一吸入装置使用指导或面对面用药指导, 对于部分吸气功能不足的患者及时更换药品, 以及用药评估和药物重组等干预措施, 干预组在 6 个月时的药品不良反应例数显著低于对照组。其中不良反应下降最显著的是使用吸入剂导致的口腔真菌感染, 提示吸入剂使用不当不仅达不到治疗作用, 反而会引起不良反应, 进而导致患者疾病加重。

4 结论

本研究通过分层评估药学延续性服务建立和实施, 不仅实现了从医院到院外老年 COPD 患者的闭环管理, 同时规范了我院 COPD 患者出院后延续性药学服务标准。这一模式促进了以临床药师为主的医药护患的药学服务管理水平的提高, 使患者对疾病的自我管理意识得到提高, 疾病得以控制, 患者对医院的信任度更高, 提示该服务模式的实践提高了老年 COPD 患者用药的有效性、安全性和经济性。老年 COPD 患者随着年龄的增长, 会有身体、生活、学习等能力的退化, 这将会导致部分患者就医意愿不足。研究表明, 数字化工具平台可以提高吸入剂依从性, 尤其是在资源可能稀缺的地区^[13]。本课题后续药学服务研究

将通过数字化远程平台对患者吸入剂使用的准确性、依从性进行监测, 定期推送相关教育视听资料, 及时反馈和干预, 以期能改善本地区乃至更大范围的老年 COPD 患者的健康状况, 减轻经济负担。

参考文献

- [1] Global initiative for chronic obstructive lung disease. Global strategy for prevention, diagnosis and management of COPD: 2024 report [EB/OL]. (2023-12-21) [2025-01-20]. <https://goldcopd.org/2024-gold-report/>.
- [2] 中国老年医学学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 中国老年慢性阻塞性肺疾病临床诊治实践指南 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2020, 43 (2): 100-119.
- [3] Vos T, Lim SS, Abbafati C, et al. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990—2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. Lancet, 2020, 396 (10258): 1204-1222.
- [4] Zhou MG, Wang HD, Zeng XY, et al. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990—2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. Lancet, 2019, 394 (10204): 1145-1158.
- [5] 连玉菲, 邱学佳, 杨警因, 等. 基于药物治疗管理的慢性阻塞性肺疾病患者哮喘药学门诊服务实践 [J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43 (5): 555-560.
- [6] 曹靛, 周燕. 食管癌手术患者护理模式的研究进展 [J]. 护理学杂志, 2020, 35 (3): 98-101.
- [7] 柳涛, 蔡柏蔷. 一种新型的生活质量评估问卷: 慢性阻塞性肺疾病评估测试 [J]. 中国医学科学院学报, 2010, 32 (2): 234-238.
- [8] Morisky DE, ANG A, Krousel-Wood M, et al. Predictive validity of a medication adherence measure in an outpatient setting [J]. J Clin Hypertens, 2008, 10 (5): 348-354.
- [9] Luo N, Liu G, Li MH, et al. Estimating an EQ-5D-5L value set for China [J]. Value Health, 2017, 20 (4): 662-669.
- [10] 孙兰, 张勇, 张翎, 等. 全程督导吸入在稳定期慢性阻塞性肺疾病患者维持治疗中的效果 [J]. 国际呼吸杂志, 2021, 19: 1482-1486.
- [11] 中华医学会全科医学分会, 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 中国慢性阻塞性肺疾病基层诊疗与管理指南 (2024 年) [J]. 中华全科医师杂志, 2024, 23 (6): 578-602.
- [12] 刘冀衡, 谢倩, 黄丽, 等. 慢性阻塞性肺疾病患者使用吸入剂用药依从性的研究进展 [J]. 中南药学, 2022, 20 (5): 1113-1117.
- [13] Aung H, Tan R, Flynn C, et al. Digital remote maintenance inhaler adherence interventions in COPD: a systematic review and meta-analysis [J]. Eur Respir Rev, 2024, 33 (174): 240136.

(收稿日期: 2025-03-18; 修回日期: 2025-05-02)

医疗失效模式与效应分析法降低 PIVAS 药品调配残留率的应用

陈天, 曹迪, 许菲, 孙超, 张士洋 (蚌埠市第三人民医院药学部, 安徽 蚌埠 233000)

摘要: **目的** 降低静脉用药调配中心 (PIVAS) 药品调配的残留率, 提高成品输液质量。**方法** 应用医疗失效模式和效应分析法 (HFMEA) 对药品调配全流程中引发药品调配残留的潜在失效模式进行效应分析, 计算出风险优先值 (RPN), 针对中等风险和高风险的失效模式制订改善措施并评价改进结果。**结果** 中等及以上风险的失效模式有 7 种, 其中操作熟练度不足、难溶性药物溶解不全、西林瓶胶塞设计不合理 3 个风险失效模式为高风险模式, 盲目追求速度、注入溶媒量不足、溶解药物产生泡沫过多、药物黏性高 4 个风险失效模式为中等风险模式。改进后 7 种失效模式的总体 RPN 值由改进前的 298 降至改进后的 104, 降幅为 65.1%; RPN 均值由 (42.57 ± 11.06) 下降至 (14.86 ± 7.29) ($P < 0.001$)。改进后 1、2、5、10 mL 安瓿瓶和西林瓶的药品调配残留率显著降低 ($P < 0.05$)。**结论** 运用 HFMEA 方法对药品调配流程进行系统性风险管理, 能够有效降低药物调配的残留率, 保证患者用药剂量准确, 提高药物治疗的有效性和安全性。

关键词: 医疗失效模式与效应分析; 静脉用药调配中心; 药品调配残留率

中图分类号: R95

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)12-3725-00

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.039

Healthcare failure mode and effect analysis in reducing drug residue rate during medication dispensing in PIVAS

CHEN Tian, CAO Di, XU Fei, SUN Chao, ZHANG Shiyang (Department of Pharmacy, The Third People's Hospital of Bengbu, Bengbu Anhui 233000)

Abstract: Objective To reduce the drug residue rate during medication dispensing in pharmacy intravenous admixture services (PIVAS) and improve the quality of finished infusions. **Methods** Healthcare failure mode and effect analysis (HFMEA) was used to systematically analyze potential failure modes causing drug residue in the medication dispensing process. Risk priority numbers (RPN) were calculated, and improvement measures were established for moderate-to-high-risk failure modes. The outcomes were evaluated after the implementation. **Results** Seven failure modes of medium or high risk were found. High-risk failure modes comprised: operator inexperience, inadequate dissolution of drugs, and suboptimal vial rubber stopper design. Medium-risk modes included: undue emphasis on production speed, insufficient solvent addition, excessive foam formation during dissolution, and elevated drug viscosity. After the intervention, the aggregate RPN for these failure modes declined from 298 to 104, a 65.1% reduction. The mean RPN decreased substantially from (42.57 ± 11.06) to (14.86 ± 7.29) ($P < 0.001$). Furthermore, significant decreases ($P < 0.05$) in the residual rates were documented for drug compounding with 1, 2, 5, 10 mL ampoules and vials. **Conclusion** HFMEA-based systematic risk management of medication dispensing effectively reduces drug residue rates, ensures accurate medication doses, and enhances the effectiveness and safety of drug therapy.

Key words: healthcare failure mode and effect analysis; pharmacy intravenous admixture service; drug residue rate during medication dispensing

静脉用药调配中心 (pharmacy intravenous admixture service, PIVAS) 是由具备专业资质的药学

技术人员在洁净环境中, 按标准化流程集中完成静脉药物的配置, 最终向临床提供可直接静脉输注成

基金项目: 蚌埠市中心医院科研项目 (No.2025bbsy42)。

作者简介: 陈天, 男, 主管药师, 主要从事临床药学工作, email: 18355250940@163.com

品输液的功能部门^[1-2]。临床数据显示,我国入院治疗患者群体中,超过 70% 的病患需要进行静脉输液治疗^[3],因此确保成品输液的质量是 PIVAS 工作的重点^[4-6]。近年来,成品输液质量管理重心主要集中在调配差错、无菌操作等环节,对药物调配残留量的关注较少。而在 PIVAS 日常工作中,时常发现药品调配过程中会产生药品残留的现象,一旦出现药品残留量过多的情况,会导致实际输入患者体内的药物剂量出现偏差,达不到理想的治疗效果,从而延长患者疾病的治愈时间。并且一些药物存在剂量微小但价格昂贵的特点,一旦出现残留,不仅会影响治疗进程,还会造成医疗资源的浪费,加重患者的经济负担^[7-8]。相关文献研究表明,PIVAS 工作人员在进行抗肿瘤药物调配操作时,可能因操作不规范或熟练程度不足,导致药物残留或溢出,进而形成肉眼不可见的气溶胶或气雾,造成环境污染^[9]。即使防护措施到位,长期频繁接触此类污染物仍可以通过皮肤或呼吸道进入体内,存在较高的致癌及致畸风险^[10-11]。因此,将药品调配残留率指标纳入我院 PIVAS 质量持续改进体系,对优化成品输液质量具有重要的实践意义。

医疗失效模式与效应分析 (healthcare failure mode and effects analysis, HFMEA) 是医疗系统专用的前瞻性风险管理工具,通过整合失效模式与效应分析 (failure mode and effects analysis, FMEA)、危害分析与关键控制点 (hazard analysis critical control point, HACCP) 以及根本原因分析 (root cause analysis, RCA) 三大方法中的核心概念、关键要素和标准定义构建而成,对医疗风险管理具有针对性和有效性^[12-13]。本研究通过 HFMEA 评估我院药品调配过程中可能产生药品残留的风险点,并加以持续优化改进,进而降低药品调配的残留率,提高成品输液质量。

1 对象与方法

1.1 对象

以蚌埠市第三人民医院 PIVAS 药品调配环节为研究对象,评估 HFMEA 实施前 (2024 年 11 月—2024 年 12 月) 与 HFMEA 实施后 (2025 年 1 月—2025 年 2 月) 的药品调配残留状况。

1.2 研究方法

1.2.1 组建研究小组 研究小组以 PIVAS 质控管理小组成员为主,同时加入了负责科室培训、调配标准化管理的相关人员,其中包括高级职称 1 人,中级职称 3 人,初级职称 4 人,共 8 人。研究小组成员需接受集中培训 HFMEA 相关知识,熟悉操作

流程和分析技巧,整理相关信息,对药品调配全流程进行风险识别和评价,提出优化方案。

1.2.2 确定药品调配的流程 HFMEA 研究小组成员结合 PIVAS 实际工作经验,绘制药品调配工作的流程图见图 1。

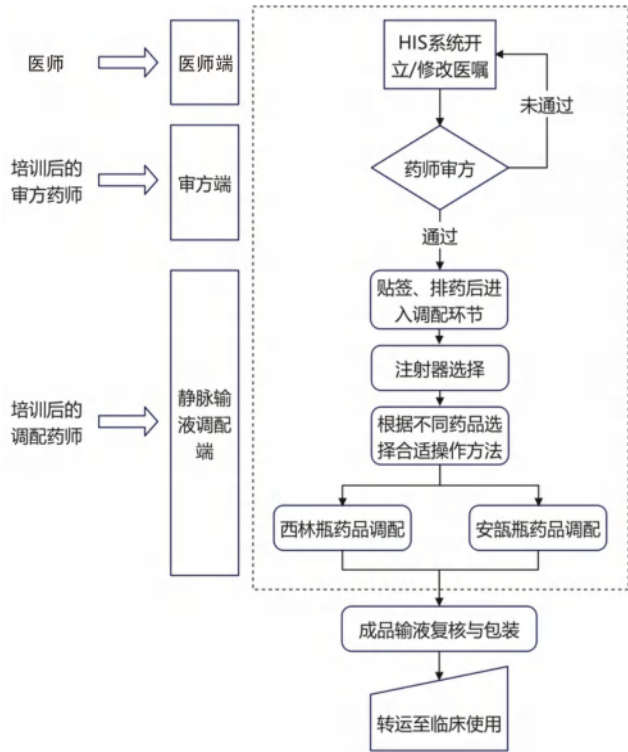


图 1 调配工作流程图

Fig 1 Medication dispensing workflow diagram

1.2.3 风险识别与分析评价 研究小组通过集体研讨,对药品调配过程中可能引发药品调配残留的各个环节进行失效模式识别。每个失效模式的严重程度 (severity, S)、发生频率 (frequency of occurrence, O) 和可探测度 (likelihood of detection, D) 均分为 5 个等级,分值为 1~5 分^[14-15] (见表 1)。

表 1 失效模式评分标准

Tab 1 Failure mode rating criteria

严重程度 (S)	发生频率 (O)	可探测度 (D)	评分值
无影响: 无残留	极低	很容易发现	1
轻度影响: 轻微残留	低	比较容易发现	2
中度影响: 中度残留	中等	不容易发现	3
重度影响: 较多残留	高	难发现	4
极重影响: 严重残留	极高	很难发现	5

为避免相互参考,研究小组成员对 S、O、D 三个方面进行单独打分,统计时实施双人双录入,计算出三个方面各自的平均分,按照四舍五入规则取整数,确定为最终评分。风险优先指数 (RPN) 分为五个等级,分值为 S、O、D 三个方面的乘积, RPN 值为 1~125,分为五个等级^[14-15],见表 2。

在此基础上,逐一分析各个失效模式相对应的失效原因和失效影响。最终对药品调配全流程实施失效

模式、影响及危害分析(failure mode, effects, and criticality analysis, FMECA)。

表 2 RPN 评估表
Tab2 RPN evaluation

分值	风险等级	处置
1 ~ 3	极低风险	维持现有的监控措施
4 ~ 26	低风险	维持当前监控措施并提升强度
27 ~ 47	中等风险	提升监控强度同时制订改善方法进行改进
48 ~ 63	高风险	实施改进方法并加强人员培训,禁止不熟练的人员进行该模式运作
64 ~ 125	极高风险	立即停止该模式运行,召开紧急会议由 HFMEA 小组人员共同研讨出新的有效方法后才可运行

1.3 药品残留率的测定方法

采用前后对照研究设计(before-after study),将该院 PIVAS 在 2024 年 11 月—12 月(HFMEA 实施前)与 2025 年 1 月—2 月(HFMEA 实施后)设定为两个研究周期。在每一周期内,从所有合格工作日(排除节假日及设备故障日)中,采用计算机随机数生成法抽取 20 个非连续的样本日。每日分拣流程结束后,首先剔除因非整支医嘱用量导致药品残留的药瓶。随后,根据当日药品实际消耗总量的比例,随机确定待抽取的药品名称及数量,确保每日抽取的样本(西林瓶 100 支、安瓿瓶 150 支)在药品种类、剂型及规格分布上均能代表当日消耗情况。HFMEA 实施后,根据实施前的药品目录确定待抽取的药品,可以控制药品目录的一致性。此方案基于消耗量的分层比例抽样方法,确保每个周期的累计样本量(西林瓶 2000 支、安瓿瓶 3000 支,合计 5000 支样本)在关键属性分布上具有可比性。针对注射用粉针剂的残留物定量分析,现行方法主要依赖紫外-可见分光光度法(UV-Vis)。该检测流程涉及多步骤预处理与光谱扫描过程,大规模抽样会导致整体操作耗时过长。考虑实际操作中的各种因素,对流程进行针对性精简,依据《中国药典》2020 年版四部^[16]制剂通则中注射剂装量的相关规定,注射用无菌粉末标示装量根据不同规格差异限度为 5%~15%,由此制订出残留量标准限度的改良版。粉针剂以最低溶剂 5 mL 为标准,取装量差异限度最低值的 5%即 0.25 mL^[17]。以最小限度严格要求调配残留量,能够有效保证药品调配质量。若残留量检测值超出既定阈值(0.25 mL)或西林瓶内壁存在目视可见颗粒物残留(粒径 $\geq 50\ \mu\text{m}$),则判定为药品调配残留不达标;注射用浓溶液的调配残留量限度标准采用不同规格测定的药品残留体积与相对应的残留限度对比,若大于残留限度规定的体积,则视为药品调配残留不达标,见表 3。

表 3 药品调配残留限度标准改良版

Tab 3 Revised residual limit standards for medication dispensing

剂型	规格	残留量限度
注射用浓溶液	1 mL	$\leq 0.1\ \text{mL}$
	2 mL	$\leq 0.15\ \text{mL}$
	5 mL	$\leq 0.3\ \text{mL}$
	10 mL	$\leq 0.5\ \text{mL}$
	20 mL	$\leq 0.6\ \text{mL}$
注射用无菌粉末	多种规格	$\leq 0.25\ \text{mL}$ 或肉眼可见药粉残留

残留量测定采用 1 mL 规格的注射器,将安瓿瓶和西林瓶的残留液体完全吸出,小心、缓慢地排出注射器内的空气,此过程需避免液体的意外排出。完成排气后,安排两位操作人员分别读取注射器上的刻度值,最终结果取两人所读数值的平均值,超过残留量限度视为不合格,西林瓶内有未完全溶解药粉的直接视为不合格。计算药品调配残留率($\%$)=药品调配不达标数量/总抽取数量 $\times 100\%$ 。

1.4 统计学处理

将全部数据录入 Excel 表格,运用 SPSS 27.0 统计软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,同一组间比较采用配对样本 t 检验;定性资料以例数、百分比($\%$)表示,通过 χ^2 检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HFMEA 实施前各环节的失效模式、失效影响及 RPN

研究小组对人员与制度、医嘱审核、注射器选择、操作方法和药品配置整个工作流程实施 FMECA 分析,一共找出造成药品调配残留的 20 种失效模式,其中高风险模式有 3 种,中等风险模式有 4 种,低风险模式有 12 种,极低风险模式有 1 种(见表 4)。

2.2 改进措施及成效

选择 RPN 值 ≥ 27 ,即风险等级为中等及以

表 4 HFMEA 实施前造成药品调配残留的各环节失效模式、失效原因及 RPN

Tab 4 Failure modes, root causes, and RPN of process steps contributing to medication dispensing residuals prior to HFMEA implementation								
环节	失效模式	失效原因	失效影响	S	O	D	RPN	等级
人员与制度	操作熟练度不足	新入职人员培训时间不足, 经验匮乏	造成各种类型的残留	5	5	2	50	高
	盲目追求速度, 忽视调配残留	调配岗位人员不足, 工作负荷大		4	4	2	32	中等
	工作积极性不足	绩效考核制度尚未建立		3	2	2	12	低
	调配工作监管不足	监察制度尚不完善		2	4	2	16	低
医嘱审核	溶媒类型选择不当	审方系统规则不完善, 未能自动预警溶媒不适宜的医嘱, 且审方药师因疲劳或时间压力未能深入审查溶媒选择	产生沉淀、浑浊或溶解不全, 造成固态残留	4	1	2	8	低
注射器选择	注射器规格选择过大	大规格针筒的无效腔体积比小规格的大	药液残留在针筒和针头连接处, 推注小剂量药物时(如 0.5 mL), 残留比例更高	2	2	3	12	低
	针头选择过细	内径过小, 推注阻力大, 回抽困难	操作人员因疲劳或疏忽导致药液残留	2	2	3	12	低
	针头类型选择不当	斜面针倾斜刺入药瓶时, 可能贴合容器内壁, 形成抽吸盲区	抽吸不尽导致药液残留	1	1	3	3	极低
操作方法	注射器未排空药液	操作人员节省时间未完全推注药液	针筒内药液残留	3	4	2	24	低
	注射器针尖朝向不对	针尖朝上时会导致针头液面下方抽吸不到	抽吸不全	3	2	3	18	低
西林瓶药品调配	药瓶针孔处喷出药液	溶媒中混入未排出的空气, 注入溶媒后药瓶内气压升高	药液喷出	3	1	2	6	低
	注入溶媒量不足	尚未制定溶媒用量标准表, 操作人员调配经验不足	药物未完全溶解, 造成固态残留	4	3	3	36	中等
	难溶性药物溶解不全	难溶性药物调配未按规程操作	造成固态残留, 成品输液不溶性微粒增多	4	5	3	60	高
	未使用振荡器	振荡器数量不足或设备故障; 因需要清洁操作人员较少使用	人工摇晃力度和频率不均, 无法达到机械振荡效果, 造成固态残留	3	2	1	6	低
	药物溶解产生气体	某些药物(如头孢他啶)溶解时产生大量二氧化碳气体	瓶内压力过大导致药液外渗	2	3	2	12	低
	溶解药物产生泡沫过多	推注溶媒过快, 操作方法不当	抽吸不到导致药液残留	3	5	2	30	中等
	西林瓶胶塞设计不合理	瓶塞(如平口瓶塞)设计不完善, 无内缺口, 导致药液残留于瓶塞与瓶壁之间的瓶颈处	抽吸不到导致药液残留	5	5	2	50	高
	安瓿瓶药品直接掰断安瓿瓶调配	安瓿瓶开启前未弹击或抖动	药液滞留于瓶身裂口及上部空间, 抽吸不全	4	2	2	16	低
	一次性抽吸多支安瓿	多次调整入针角度容易导致操作失误; 针头所在药瓶内位置不当, 难以抽吸干净或者抽吸过程中带入空气	抽吸不尽导致药液残留	4	2	1	8	低
	药物黏性高	某些药物本身具有很高的黏性	容易附着在药瓶内壁, 抽吸不尽	4	5	2	40	中等

上风险的失效模式, 研究小组通过头脑风暴, 找出具体的产生原因, 并讨论得出最终的改进措施。其中操作熟练度不足、盲目追求速度、注入溶媒量不足、难溶性药物溶解不全、溶解药物产生泡沫过多、西林瓶胶塞设计不合理六个失效模式改进后降到了低风险等级。失效模式中药物黏性高经改进后 RPN 值降幅为 25%, 风险等级仍为中等风险(见表 5)。

改进后中等及以上风险的失效模式造成药品调配

残留的 RPN 值较改进前有所降低, 总体 RPN 值由改进前的 298 降至改进后的 104, 降幅为 65.1%。RPN 均值差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 详见表 6。

2.3 HFMEA 实施前后药品调配残留率比较

HFMEA 实施后 1、2、5、10 mL 安瓿瓶和西林瓶的残留不达标瓶数均有所下降 ($P < 0.05$), 详见表 7。改进后药品调配残留率均有所下降(见图 2)。

2.4 改进后一些中等风险及高风险失效模式代表药物的改进情况

表 5 HFMEA 实施后中等风险及高风险失效模式的改进措施和效果

Tab 5 Corrective actions and outcomes for moderate- and high-risk failure modes post-HFMEA implementation									
失效模式	改进措施	S	O	D	RPN	RPN 值降 幅 /%	改进前 等级	改进后 等级	
操作熟练度不足	对该院 PIVAS 新进人员延长培训时间，并设立一套全面的操作技能考核标准，通过笔试、实操测试以及差错案例分析这三个关键环节，综合评价操作员的能力，只有成功通过考核的人员，才能够正式上岗	3	3	2	18	64	高	低	
盲目追求速度	1. 开展专题培训，强调残留问题的严重性，例如会使患者用药剂量不足，无法达到有效的血药浓度，影响疗效等；2. 将药品调配残留率加入月度考核之中	3	2	2	12	62.5	中等	低	
注入溶媒量不足	根据说明书要求结合药物的性质以及实际工作中溶媒量对药品残留的影响，制定《PIVAS 溶媒用量标准化目录》，方便操作人员查阅准确的溶媒用量信息	2	2	3	12	66.7	中等	低	
难溶性药物溶解不全	1. 选择足量且适宜的溶媒；2. 增加药物预溶时间；3. 加药前敲松粉末，增加药粉与溶媒的接触面积可有效提高药物的溶解速度；4. 采用负压抽吸法；5. 改进振荡器	2	2	3	12	80	高	低	
溶解药物产生泡沫过多	1. 调配容易产生泡沫的药物时（如七叶皂苷），抽取足量的溶媒沿瓶壁缓慢注入密封瓶内；注入溶媒后需轻轻旋转或翻转药瓶，不能剧烈摇晃；在抽吸药液时倾斜容器，使泡沫集中于一侧，方便针头避开泡沫层。 2. 调配中产生了泡沫需静置一段时间，等泡沫消散再进行抽取；3. 针对瓶身较小的西林瓶，抽吸时先在注射器内带入空气，然后往瓶内注入空气加压，一次性吸出瓶内药液，避免反复抽吸产生泡沫	2	2	2	8	73.3	中等	低	
药物黏性高	对于黏性较高的药物（如痰热清等、醒脑静等），可在抽取前适当振荡药瓶，打乱药物分子间的有序排列，破坏分子间的作用力，进而降低药物黏性，使其更易被抽出	3	5	2	30	25	中等	中等	
西林瓶胶塞设计不合理	对于胶塞无缺口的密封瓶，可以先按传统方法将容器倒置，针头位于液面下，吸尽液体后将针头继续往内部推进完全，再将药瓶倾斜 45 度，使针头侧孔贴近瓶颈或瓶壁，继续抽吸药液直至干净	2	2	3	12	76	高	低	

表 6 改进前后中等风险及高风险的失效模式 RPN 值对比

Tab 6 Pre- vs post-improvement comparison of RPN scores for moderate- and high-risk failure modes								
失效模式	操作熟练度不足	盲目追求速度	注入溶媒量不足	难溶性药物溶解不全	溶解药物产生泡沫过多	药物黏性高	西林瓶胶塞设计不合理	平均 RPN 值
改进前	50	32	36	60	30	40	50	42.57±11.06
改进后	18	12	12	12	8	30	12	14.86±7.29*

注：实施前平均 RPN 值比较，* $P < 0.001$ ($t = 5.54$)。
Note: Comparison with the average RPN values before implementation, * $P < 0.001$ ($t = 5.54$).

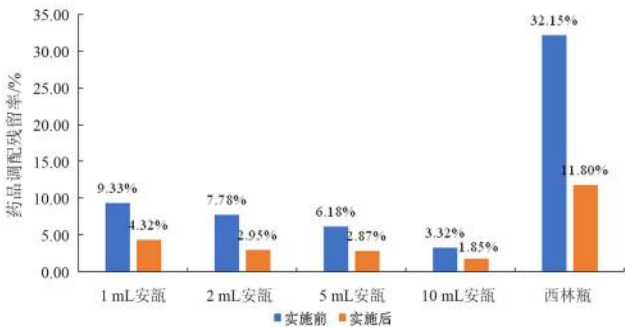


图 2 HFMEA 实施前后药品的调配残留率
Fig 2 Pre- vs post-HFMEA implementation comparison of medication dispensing residual levels

操作熟练度不足的失效模式中，如头孢他啶，因操作不熟练易出现推杆滑脱和药液喷出问题，改

进后残留率降低了 61.74%；盲目追求速度的失效模式中，维生素 C、维生素 B₆ 因用量大，操作人员易追求速度而忽视残留，改进后残留率分别降低了 59.35% 和 61.62%；注入溶媒量不足的失效模式中，如亚胺培南西司他丁钠（泰能），改进后分两次注入 10 mL 溶媒，残留率降低了 62.50%；难溶性药物溶解不全的失效模式中如头孢哌酮钠舒巴坦钠、血栓通的残留率分别降低了 65.51% 和 71.43%；西林瓶胶塞设计不合理的失效模式中，如阿莫西林克拉维酸钾的残留率降低了 81.25%；溶解药物产生泡沫过多的失效模式中，如七叶皂苷的残留率降低了 83.33%；药物黏性高的失效模式中，如痰热清和氟比洛芬酯的残留率分别降低了 10.71% 和 16.67%。

表 7 HFMEA 实施前后药品残留不达标数量对比
Tab 7 Pre- vs post-HFMEA implementation comparison of non-compliant medication residuals

注射剂容器	规格	实施前 抽取瓶数	实施前残留 不达标瓶数	实施前调配 残留率 /%	实施后 抽取瓶数	实施后残留 不达标瓶数	实施后调配 残留率 /%	χ^2	P 值
安瓿瓶	1 mL	386	36	9.33	370	16	4.32	7.380	0.007
	2 mL	1311	102	7.78	1391	41	2.95	31.449	< 0.001
	5 mL	566	35	6.18	522	15	2.87	6.787	0.009
	10 mL	722	24	3.32	703	9	1.85	6.578	0.01
西林瓶	0.005 ~ 4.5 g	2000	643	32.15	2000	236	11.80	241.527	< 0.001

3 讨论

近年来，多项研究表明，药品残留率过高会直接导致成品输液中药物剂量不足。特别是抗肿瘤药物具有治疗窗窄、价格昂贵等特点，剂量不足不仅会导致疗效不佳，缩短患者生存期，还会增加治疗成本^[18]，这进一步凸显了降低药品调配残留率的必要性。

本研究中共发现操作熟练度不足、难溶性药物溶解不全、西林瓶胶塞设计不合理、药物黏性高等 7 种中等风险及高风险失效模式。其中难溶性药物溶解不全的 PRN 值（60）最高，是导致西林瓶调配残留率高的主要原因，且改进前西林瓶的药品调配残留率（32.15%）最高，应着重改善。并且有研究发现，调配难溶性药物表柔比星时，随着预溶时间的缩短和溶媒量的减少，每毫升成品输液内粒径 $\geq 10\ \mu\text{m}$ 和粒径 $\geq 25\ \mu\text{m}$ 的不溶性微粒数量均有所增加^[19]。不溶性微粒一旦随注射液进入体内，可随血液流动却不能被代谢，可能对人体造成难以察觉的潜在严重危害，如炎症反应、热原反应、过敏反应、血管损伤、肉芽肿、血管栓塞、肿瘤等不良反应^[20]。通过减少难溶性药物溶解不全造成的固态粉末残留，可以减少输液中不溶性微粒的数量。HFMEA 研究小组通过优化溶解流程，改进后调配难溶性药物的速度明显加快，肉眼可见的固态粉末残留瓶数大幅减少。

药物黏性高的代表药物包括氟比洛芬酯注射液、痰热清注射液，前者为脂微球载体制剂，乳剂特性导致其黏度较高；后者属中药制剂，含大分子成分（如多糖、蛋白质），分子间作用力使其黏度显著增加。HFMEA 研究小组经过讨论，尝试采用抽取前轻微振荡药瓶模式，以降低分子间的作用力（如氢键、范德华力）。改进后测得的两种药物残留率下降不明显，该模式改进后风险等级仍为中等风险。后续将尝试在确保药物稳定性的前提下，通过对高黏性药物放入恒温水浴锅中加热预处理，降低其黏度后再进行调配操作，以

推动风险等级的进一步降低。除此失效模式外，经改进后所有中等风险及高风险失效模式代表药物残留率显著下降，风险等级均降至低风险水平。

HFMEA 实施前发现调配 1、2、5 及 10 mL 规格的安瓿瓶药品时，会随着规格的增大，残留率呈下降趋势。主要是由于小规格安瓿瓶虽然药液总量小，残留的绝对数值可能不大，但占总量的比例会更高；且由于其体积较小，对抽吸手法的精度要求更高，稍有操作不当会造成较高的残留率。因此，针对不同规格的药品选择合适的注射器及规范的操作手法就显得尤为重要。基于上述观察结果，HFMEA 研究小组按照国家卫健委医院管理研究所发布的《静脉用药调配中心评估规范》制定了药品调配岗标准化操作流程（standard operating procedure, SOP），包括《PIVAS 注射器选择标准化目录》，明确规定了不同药品注射器的容量规格及针尖类型选择；《PIVAS 溶媒用量标准化目录》，系统规定了各类粉针剂对应的溶媒使用量；《PIVAS 特殊药品溶解方法选择标准化目录》，详细制定了需要特殊溶解药品的溶媒选择、浓度控制及振荡时间；《PIVAS 抽吸操作标准化目录》，规范了药品溶解后的抽吸操作步骤。通过系统化开展药品调配 SOP 培训后，所有规格药品的残留率显著降低（ $P < 0.05$ ）。

在 PIVAS 中，危害药品污染对工作人员职业健康有着显著的影响。HFMEA 实施后，再次进行 FMECA 分析发现，抗菌药物及危害药物在工作台的残留量显著降低，从源头上减少了调配间环境污染，有效降低了工作人员职业暴露风险。但受限于客观条件，未针对环境中危害药物残留量的实际变化开展精准的量化评估。后续研究中拟引入专业设备，采用更为精准的环境监测技术与分析方法，如利用高效液相色谱法（HPLC）结合质谱联用技术（MS），对调配间不同区域的空气、台面以及相关设备表面等进行定期采样检测，

通过精确测定药物残留的具体成分及含量,形成详细且可靠的量化数据,从而更直观地掌握实施 HFMEA 管理后调配间内药物残留情况^[10]。

4 小结

HFMEA 作为医疗系统中一种重要的早期预防措施,能够识别和消除已知或潜在的失效模式,为医疗风险管理提供有价值的信息^[21]。本研究创新性地引入 PIVAS 药品调配全流程风险管理体系,通过科学化的分级管理,重点针对导致药品调配残留的中等风险及高风险失效模式实施干预措施,有效降低了调配残留率,切实保障患者用药安全与疗效。HFMEA 的价值更在于构建“持续发现未知风险”的能力,后续将不断更新风险等级及识别新型失效模式,从而形成事前预防和早期干预的闭环管理模式。然而,作为一项管理工具,HFMEA 具有一定的局限性,S、O、D 的评分高度依赖评分者的经验和主观判断,可能存在风险识别偏差。

参考文献

- [1] 国家卫生健康委办公厅. 国家卫生健康委办公厅关于印发静脉用药调配中心建设与管理指南(试行)的通知(国卫办医函〔2021〕598号)[EB/OL]. (2021-12-10)[2024-05-27]. https://www.gov.cn/zhengce/zhengce-ku/2021-12/21/content_5663666.htm.
- [2] 杨春松, 张天一, 张伶俐, 等. 我国静脉用药集中调配中心成本测算现状及系统评价[J]. 中国药房, 2019, 30(19): 2707-2711.
- [3] 李谷维, 骆金铠, 张杰, 等. 静脉输液质量监测闭环追踪系统的构建及应用[J]. 中华护理杂志, 2023, 58(23): 2829-2834.
- [4] 吕红梅, 何小敏, 何彩婷, 等. 静脉用药调配中心质量管理的核心要素与实施——《静脉用药调配中心建设与管理指南》系列解读(十五)[J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(14): 1535-1539.
- [5] 方宝霞, 吴松潮, 刘菁, 等. 静脉用药集中调配中心全面质量管理体系的构建与应用[J]. 中国药房, 2023, 34(15): 1798-1803.
- [6] Qiu QN, Zhu GH, Peng G, et al. Research on PIVAS risk assessment and control strategy based on quality risk management (QRM) [J]. Explor Res Clin Soc Pharm, 2024, 15: 100487.
- [7] 陈富超, 方宝霞, 姚嫚嫚, 等. 基于重量、残留量及含量监测技术的 PIVAS 输液质量监测模式构建[J]. 中国药理学杂志, 2023, 58(23): 2186-2192.
- [8] 赵欣, 刘梦, 周静, 等. 品管圈在提高某院 PIVAS 药品调配残留达标率的应用研究[J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40(5): 559-564.
- [9] 李芸, 沈国荣, 张晶晶, 等. 我国 10 家医院静脉药物调配中心抗肿瘤药物环境污染评估及工作人员防护措施效果比较[J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(24): 2591-2596.
- [10] 耿洲, 王洋, 屈昱晨, 等. 15 种细胞毒性抗肿瘤药物在我院 PIVAS 中的环境残留检测及清洁方法[J]. 中国药房, 2023, 34(2): 217-222.
- [11] 浦静雯, 张慧, 耿洲, 等. 失效模式与效应分析法在静脉用药集中调配中心抗肿瘤药物调配全流程风险管理中的应用[J]. 中国现代应用药学, 2025, 42(1): 130-136.
- [12] Sumarwoto T, Ilyas MF, Dewi A. Healthcare failure mode and effect analysis in surgery setting: a bibliometrics analysis and literature review [J]. Acta Inform Med, 2024, 32(1): 19-23.
- [13] Rah JE, Manger RP, Yock AD, et al. A comparison of two prospective risk analysis methods: traditional FMEA and a modified healthcare FMEA [J]. Med Phys, 2016, 43(12): 6347.
- [14] 范静, 乔永洁, 贾秀玲, 等. 失效模式和效应分析在 PIVAS 全肠外营养液调配全流程风险管理中的应用[J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40(17): 1881-1886.
- [15] 姚文鑫, 李柯, 王晓彤, 等. 医疗失效模式与效应分析在肿瘤患者肠外营养液调配全流程风险管理中的应用[J]. 实用药物与临床, 2024, 27(9): 715-720.
- [16] 中国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020: 38-39.
- [17] 唐威, 程姣, 王未, 等. 静脉用药调配残留量的控制[J]. 药学与临床研究, 2018, 26(1): 69-70.
- [18] 王晶, 李雅倩, 周于禄, 等. 抗肿瘤药物的治疗药物监测研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(24): 2889-2893.
- [19] 王超, 谭喜莹, 陈树, 等. 两种难溶性药物的输液调配规范[J]. 药学与临床研究, 2017, 25(5): 400-402.
- [20] 赵丰, 杨阳. 静脉药物配置中心的微粒分析与对策[J]. 实用药物与临床, 2015, 18(6): 753-755.
- [21] Liu HC, Zhang LJ, Ping YJ, et al. Failure mode and effects analysis for proactive healthcare risk evaluation: a systematic literature review [J]. J Eval Clin Pract, 2020, 26(4): 1320-1337.

(收稿日期: 2025-03-19; 修回日期: 2025-08-06)

临床药师在临床

临床药师对 1 例成人 Lemierre's 综合征患者的
药学治疗管理实践

李文妍¹, 肖云峰², 杨宏昕^{1*} (1.内蒙古自治区人民医院药学部, 呼和浩特 010010; 2.内蒙古医科大学药学院, 呼和浩特 010110)

摘要: 患者经宏基因组测序 (mNGS) 确诊为 Lemierre's 综合征, 并对头孢菌素类药物表现出过敏反应。在治疗的早期阶段, 哌拉西林他唑巴坦等药物的使用未能有效控制患者感染。临床药师在进行了广泛的文献调研后, 向医师提出更换为多西环素联合美罗培南的治疗方案, 取得了令人满意的临床治疗效果。针对患者右侧颈静脉血栓的形成, 药师建议采用那屈肝素钙进行抗凝治疗, 患者得以康复出院。临床药师为 Lemierre's 综合征的抗感染治疗提供了新的治疗方案, 为该综合征的抗感染及抗凝药物治疗管理提供了宝贵的参考。

关键词: Lemierre's 综合征; 坏死梭菌; 临床药师; 多西环素

中图分类号: R969.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)12-3732-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.040

Clinical pharmaceutical care and management for an adult patient
with Lemierre's syndrome

LI Wenyan¹, XIAO Yunfeng², YANG Hongxin^{1*} (1. Department of Pharmacy Inner Mongolia Autonomous Region People's Hospital, Hohhot 010010; 2. College of Pharmacy Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010010)

Abstract: In this case, the patient was diagnosed with Lemierre's syndrome through metagenomic next-generation sequencing (mNGS) and had a documented allergy history to cephalosporins. Initially, the infection demonstrated suboptimal responses to piperacillin-tazobactam. Based on a thorough literature evaluation, the clinical pharmacist proposed transition to a doxycycline-meropenem combination regimen, which subsequently obtained favorable clinical outcomes. Regarding the right internal jugular vein thrombosis, the pharmacist recommended initiating anticoagulation therapy with nadroparin calcium. Effective collaboration between the medical team and the pharmacist lead to the patient's full recovery and successful discharge. This case offered practical insights into antimicrobial selection and anticoagulation management for Lemierre's syndrome, emphasizing the essential role of pharmacists in providing patient-specific pharmaceutical care.

Key words: Lemierre's syndrome; fusobacterium necrophorum; clinical pharmacist; doxycycline

Lemierre's 综合征 (Lemierre's syndrome, LS), 亦称为咽峡后脓毒症或人坏死杆菌病, 是一种罕见但可能致命的疾病, 主要起病于急性口咽部感染。

LS 主要表现为感染性血栓性颈内静脉炎以及局部或全身性的化脓性感染扩散^[1]。

1 临床资料

基金项目: 内蒙古自治区卫生健康科技计划项目 (No.202202037)。

作者简介: 李文妍, 女, 副主任药师, 主要从事药事管理及抗感染药物研究, email: liwenyan5706@163.com *通信作者: 杨宏昕, 女, 主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事药事管理及药学服务优化等相关工作, email: ny1882@163.com; 肖云峰, 男, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事药物安全性评价研究, email: xiaoyunfeng0472@126.com

患者男性, 33 岁, 身高 174 cm, 体重 69 kg, 体质指数 $22.79 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$, 2023 年 10 月 22 日患者感冒后出现发热 (热峰 38°C), 间断咳嗽、咳少量白色黏痰, 偶见痰中带血, 就诊于当地社区诊所, 给予阿奇霉素 (具体剂量不详) 静脉滴注 2 d 治疗, 仍有发热, 热峰 39.7°C , 发热时伴寒战, 胸痛 (呈闷痛), 活动后气短明显。后就诊于外院, 查肺 CT 示: 双肺多发结节影, 给予哌拉西林舒巴坦 (4:1) 5.0 g q12h , 莫西沙星注射液 0.4 g qd , 痰热清 20 mL qd , 静脉滴注 6 d, 体温仍波动在 $37 \sim 39^{\circ}\text{C}$ 。2023 年 10 月 30 日就诊于我院, 我院呼吸科以“双肺多发结节影”收入院治疗, 患者平素体健, 有头孢类药物过敏史, 无家族史及外伤史。

入院体格检查示: 体温 37°C , 脉率 $96 \text{ 次} \cdot \text{min}^{-1}$, 呼吸 $20 \text{ 次} \cdot \text{min}^{-1}$, 血压 $120/67 \text{ mmHg}$ ($1 \text{ mmHg} = 0.133 \text{ kPa}$), 氧饱和度 98%; 神志清醒, 呼吸急促, 口唇、颜面无发绀, 颈软无抵抗, 颈部浅表淋巴结未触及, 甲状腺无肿大, 颈静脉无怒张, 双肺听诊呼吸音减弱, 未闻及明显干湿啰音。实验室检查示: 白细胞计数 $22.47 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$, 中性粒细胞百分比 $85.50\% \uparrow$, 血红蛋白 $123 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \downarrow$, 降钙素原 (PCT) $5.1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \uparrow$; C 反应蛋白 $191.97 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \uparrow$; 血气分析 pH $7.48 \uparrow$, 二氧化碳分压 $28.0 \text{ mmHg} \downarrow$, 血氧分压 $77 \text{ mmHg} \downarrow$, 实际碳酸氢盐浓度 $20.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \downarrow$, 全血二氧化碳总浓度 $18.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \downarrow$, 血浆二氧化碳总浓度 $21.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \downarrow$; 肺动脉 CT 血管成像未见异常; 尿胆原+, 酮体+-。入院后给予哌拉西林他唑巴坦 (8:1) 4.5 g q8h 联合莫西沙星注射液 0.4 g qd 抗感染治疗。

入院诊断: 社区获得性肺炎。

2 主要治疗过程

2023 年 11 月 1 日, 即患者入院第 2 日仍有发热 (热峰 38.2°C), 自觉胸痛症状明显, 查体可见上肢及躯干处散在疹状红斑, 实验室检查示 D-二聚体 $0.95 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \uparrow$, 结合患者肺动脉 CT 血管成像暂不考虑肺栓塞可能。CT 检查肺窗提示上肺多发斑片状阴影, 部分可见小空洞, 完善血培养及宏基因组二代测序 (mNGS) 以明确诊断。患者上肢及躯干处出现的散在疹状红斑, 结合患者头孢菌素过敏史, 考虑不排除应用哌拉西林他唑巴坦所致, 调整抗感染方案, 停用哌拉西林他唑巴坦, 改为美罗培南 1 g q8h 抗感染治疗。11 月 2 日患者血管超声回示右侧椎动脉走行变异, 右侧颈静脉血栓形成, 右侧颈静脉壁增厚 (考虑

颈静脉炎), 见图 1。实验室检查示 D-二聚体 $1.56 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 应用那屈肝素钙 6000 IU 皮下 q12h 抗凝治疗。

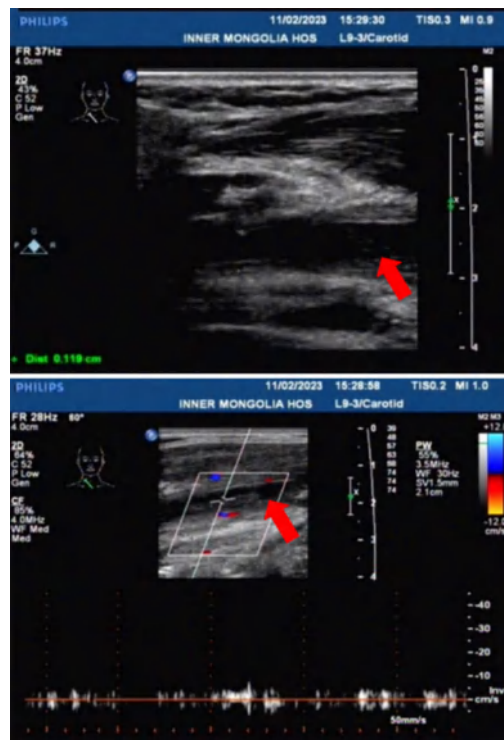


图 1 2023 年 11 月 2 日患者右侧颈静脉血栓的超声图像

Fig 1 Ultrasound image of right jugular vein thrombosis in the patient (November 2, 2023)

2023 年 11 月 5 日, 患者自述右侧颈部疼痛不适, 查体口唇、颜面无发绀, 颈静脉无怒张, 右侧颈静脉无明显红肿, 右侧颈部淋巴结肿大, 与胸锁乳突肌走行一致, 触痛阳性, 表皮充血。复查胸部 CT 示双肺多发结节及后壁空洞, 部分内见气液平面 (首先考虑感染性病变); 双肺下叶多发炎性索条及肺不张; 双肺散在微小结节; 右主支气管痰栓 (见图 2)。医师追问病史, 患者近 10 年里每 1~2 年扁桃体发炎一次, 入院前感冒后有扁桃体化脓, 考虑诊断 LS 可能性大, 同时影像 CT 示双肺多发病灶, 随机分布趋势, 边界不清, 病灶中心均有空洞, 空洞周围实变, 进展较快, 提示肺结构性损伤, 不排除厌氧菌感染可能, 与厌氧菌为主的 LS 诊断相呼应, 故经医师药师联合会诊后停用莫西沙星, 联合使用甲硝唑 500 mg po q8h 进行治疗。

2023 年 11 月 10 日, 患者再次出现体温升高 (最高 37.5°C), 未服药物, 体温自行降到正常值。晨起后偶有咳嗽、咳痰, 咳出大量黄色泡沫样痰。实验室检查示 PCT $1.400 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \uparrow$; 支气管镜肺泡灌洗液 NGS 结果回示: 梭杆菌属, 序列数 6610; 坏死梭菌, 序列数 6409。目前结合

患者症状、体征及辅助检查结果，考虑明确诊断为 LS，经药师会诊后将抗感染方案调整为美罗培南 1 g q8h 联合多西环素 0.2 g qd 进行治疗。

11 月 13 日，患者连续 2 d 未出现发热症状，精神状态明显好转，食欲、睡眠均改善，晨起后偶有咳嗽、咳痰，咳出大量黄色泡沫样痰。患者目前经积极抗感染治疗后体温控制在正常范围，实验室检查示 24 h 痰抗酸杆菌培养多次未检出，血培养阴性，痰培养阴性，D-二聚体 $0.65 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ↑。因患者近期有间断鼻黏膜出血症状，将那屈肝素钙剂量调整为 6000 IU qd 皮下注射。

11 月 19 日，患者自述体力状态恢复至平素状态，食欲、睡眠均明显改善，偶有咳嗽，无发热咳痰。复查肺部 CT（见图 2）较 2023 年 11 月 5 日 CT 大部分病灶体积缩小，实验室检查示血常规指标基本正常，PCT $0.09 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，白蛋白 $31.40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ↓，谷氨酰基转移酶 $82.00 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ↑，考虑目前病情稳定治疗有效，继续现有治疗方案。

11 月 26 日，患者无发热、无咳嗽、咳痰等症状，精神、食欲、睡眠良好，二便如常。患者要求出院，出院带药甲硝唑 0.4 g po tid，疗程 1 周；利伐沙班 15 mg po bid，疗程 2 周，1 个月后门门诊复诊。2024 年 4 月 14 日患者门诊复诊，患者诉未再发热，未再出现咳嗽、咳痰、颈部疼痛等症状，复查 CT 示：① 双肺多发索条，右肺中叶局部肺不张（见图 2），较 2023 年 12 月 28 日 CT 病灶体积明显吸收；② 双肺散在微小结节，较前均明显缩小；③ 双侧胸膜局部增厚。考虑临床治愈。

患者在院期间感染相关指标变化，见图 3。

3 分析与讨论

3.1 LS 的临床表现及病原学特点

LS 的临床首发症状较为多样，可能为扁桃体炎、扁桃体周围脓肿、发热和咽部疼痛等，也可能出现多种非特异性症状，如全身僵硬、寒战、颈部淋巴结肿大、颈部肿胀、眼眶疼痛、骨/关节疼痛、四肢无力以及恶心、呕吐等胃肠道症状。同时，由于报道例数较少，临床医师对此病的认识不足，可能导致临床误诊、漏诊。此例患者因发热、胸痛、血氧饱和度降低以及肺部多发斑片影被收治入院，误诊为社区获得性肺炎，导致了初始经验性治疗的失败，后续依据 NGS 的微生物结果调整用药，才获得了较好的治疗效果。

LS 的致病菌以厌氧菌为主，其中以坏死梭菌为主，约占 86%，A 组、B 组溶血性链球菌及产脓链球菌等需氧菌也可独立致病，约占 5.5%^[1-2]，

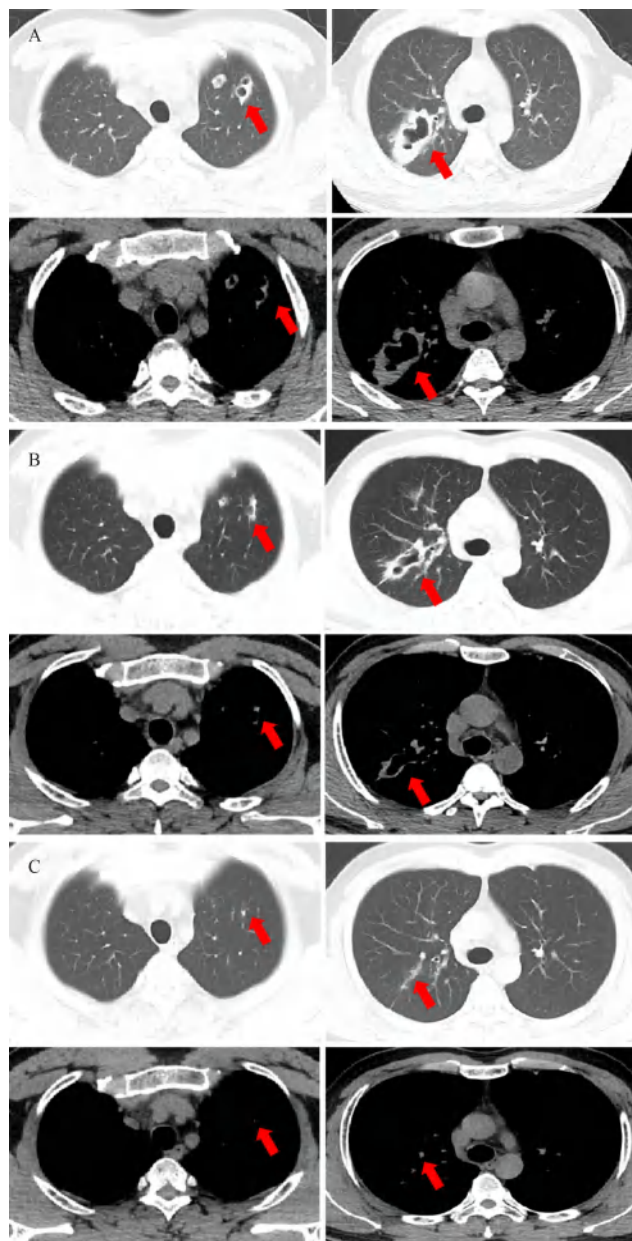


图 2 患者胸部不同时间 CT 图

Fig 2 Chest CT image of the patient at different time

注 (Note): A.2023-11-5; B.2023-11-19; C.2024-4-14; 红色箭头示病变位置 (red arrow indicating the site of the lesion)。

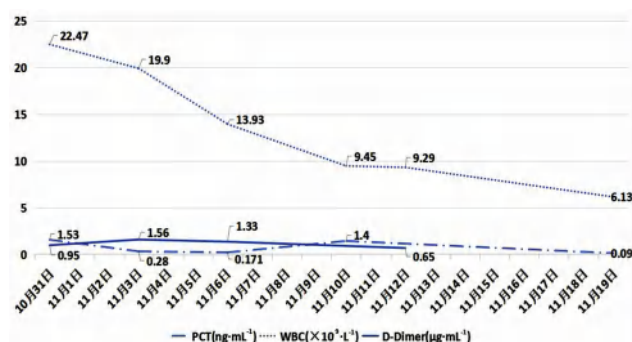


图 3 患者在院期间感染相关指标变化

Fig 3 Changes in infection-related indicators during the patient's hospitalization

其他被报道的致病菌还包括隐秘杆菌、葡萄球菌、克雷伯杆菌以及铜绿假单胞菌等^[3-5]。坏死梭菌为严格厌氧的革兰氏阴性杆菌，属苛养菌，易导致口腔、胃肠道和泌尿生殖道感染。坏死梭菌可释放多种致病因子，包括血凝集素、溶血毒素、内毒素及白细胞毒素等，其中白细胞毒素为坏死梭菌的毒力因子，可促进脓肿形成，而血凝素则与 LS 导致血栓形成有很大的相关性^[6-7]。

坏死梭菌的感染及传播途径尚不明确，但多数专家认为这是由于感染部位黏膜受损后，口咽部定植菌通过屏障进入循环系统后导致感染，此例患者在发病前有多次扁桃体化脓病史，考虑应为扁桃体内病原菌入血导致发病。由于病原菌多由咽旁间隙首先侵入颈内静脉，形成感染性栓塞性颈内静脉炎，患者多表现为单侧颈部的红、肿、热、痛伴淋巴结肿大，尤其是与胸锁乳突肌走行方向一致的、触痛阳性的条索状血管肿胀、表皮充血，是 LS 的典型体征，此例患者入院后体格检查与此体征完全相符，是确诊的重要依据^[1]。后菌栓进入肺循环，导致肺部脓毒性栓塞，患者常出现胸痛、咳嗽、咳脓血痰、呼吸困难、低氧血症等症状^[1]，也与该例患者临床表现相符合。

3.2 LS 抗感染治疗的用药管理

确诊 LS 应及早进行抗感染治疗，未进行抗感染治疗的 LS 急性病例自然病程大多在 12 d 内死亡，亚急性病例在 40 ~ 60 d 内死亡^[8]，延迟治疗也会导致病情进展，增加患者的死亡风险^[9]。

对于 LS 的抗感染药物选择，目前没有明确的指南共识作为支撑，而厌氧菌因其生长缓慢、培养困难等特点也很难取得实验室药敏结果，故抗感染方案的制订主要基于抗厌氧菌的治疗经验以及对相关案例报道的学习。治疗期间临床药师查阅大量文献，归纳出治疗坏死梭菌的有效治疗药物包括 β -内酰胺类、 β -内酰胺酶抑制剂复合制剂、碳青霉烯类以及甲硝唑，而克林霉素虽然在抗菌谱上对厌氧菌有较好的覆盖，但文献报道其对坏死梭菌疗效差，不作为首选的治疗方案；同时因天然耐药^[10]，大环内酯类也不作为治疗的首选方案。

β -内酰胺类/ β -内酰胺酶抑制剂以及碳青霉烯类联合甲硝唑的方案是文献报道最多的体外有效治疗方案，成功率可达 98%^[11]，故在患者未经 mNGS 确诊但从症状上诊断 LS 可能性大时，药师给出了哌拉西林他唑巴坦联合甲硝唑的会诊意见。患者应用后 5 d 未再发热，有一定的治疗效

果，但 5 d 后患者再次出现发热，考虑甲硝唑对该患者治疗效果不明显。

在初始治疗方案失败后，药师积极查找相关资料调整方案，《桑福德抗微生物治疗指南（第 50 版）》中对坏死梭菌的药物推荐首选方案包括哌拉西林他唑巴坦、甲硝唑及头孢曲松，但患者有头孢菌素类药物过敏史，次选方案包括碳青霉烯类药物及克林霉素，结合之前的文献查阅结果，选择碳青霉烯类药物美罗培南为主要治疗药物。对于是否联合用药，有文献认为 LS 可能合并有其他细菌，例如金黄色葡萄球菌感染，不推荐使用单药治疗^[12-13]，此例患者虽未检出金黄色葡萄球菌，但不排除存在金黄色葡萄球菌感染的可能。在学习颌面部及口腔病原菌药敏的相关文献后，药师发现多西环素也可对坏死梭菌有较好的临床疗效^[14]，同时多西环素也可作为金黄色葡萄球菌甚至是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌皮肤软组织感染的治疗用药^[15]，因此药师建议将抗感染方案调整为美罗培南联合多西环素进行治疗，并取得了较好的临床疗效。

与碳青霉烯类通过作用于青霉素结合蛋白来抑制细菌细胞壁合成的抗菌机制不同，多西环素通过与核糖体的 16S rRNA 3' 末端结合来抑制蛋白质翻译过程，进一步阻止 tRNA 与 RNA-30S 细菌核糖体亚基结合来阻断细菌蛋白质合成，两者相互配合可以起到更好的抗菌作用。同时抗白细胞毒素诱导的炎症反应也是多西环素治疗坏死梭菌的基础之一。白细胞毒素是坏死梭菌分泌的最常见的毒力因子，对机体中性粒细胞、巨噬细胞及肝细胞等均有较强的损伤，当白细胞毒素进入机体后，引起机体发生固有免疫功能低下，随着细菌生长、其他毒素释放，机体无法产生足够的抗体对抗病原菌，细胞因营养物质缺失，最终细胞坏死。坏死细胞聚集引起强烈炎症反应，机体会分泌更多的炎症因子消除抗原^[16]，从而导致脓肿等感染性病灶的生成。多西环素可以通过抑制炎症因子白细胞介素-1 (IL-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等炎症因子介导的基质金属蛋白酶 (MMPs) 的表达，从而抑制炎症反应，降低脏器损伤，达到临床治疗效果。有研究表明，多西环素对 MMPs 抑制作用较为广泛，其中对 MMP-1/2/7/8/9/12/13 均有不同程度的抑制作用^[17-18]。

多西环素对多种革兰氏阴性菌均有较好的临床疗效，但对于坏死梭菌治疗的报道甚少，以体外药敏结果居多，此例患者较好的临床转归，也

为 LS 的治疗提供了新的思路。LS 抗感染的治疗程建议 4 ~ 6 周, 患者经静脉治疗后症状体征好转, 影像明显吸收, 故临床药师建议出院后转为甲硝唑 0.4 g tid 口服序贯治疗, 疗程 1 周, 嘱患者用药期间避免饮酒, 如有胃肠道反应, 药物可与食物同服, 如有尿色转为黑色或红色的现象请勿担心, 为服药后的正常现象。患者 5 个月后复诊, CT 结果示病灶基本吸收, 考虑抗感染治疗较为成功。

3.3 LS 抗凝治疗的用药管理

病理研究发现, 坏死梭菌致病的中心环节为血管栓塞和组织坏死^[19], 但针对 LS 的抗凝治疗仍有争议, 一些荟萃研究认为是否进行抗凝治疗对 LS 患者血栓部位的血管再通和死亡率均无显著性影响^[20], 也有研究认为如果没有适当的药物管理, 97% 的 LS 会发展为脓毒性肺栓塞^[21]。在抗凝时机方面, 有较多文献认为由于细菌最初被隔离在脓毒性血栓内, 造成抗菌药物无法接触细菌, 只有当血栓溶解后, 细菌才能暴露在更高浓度的抗菌药物中, 从而避免感染性血栓播散至远端器官受累, 使抗感染治疗更为顺利^[22-23]。但抗凝治疗的启动也有造成严重出血和菌栓播散的可能。故笔者认为如 LS 患者并发血栓, 且无抗凝禁忌的情况下, 应在抗感染治疗的同时尽早启动抗凝治疗。

对于 LS 抗凝治疗, 可以选用华法林、肝素、低分子肝素或新型口服抗凝药等, 但由于低分子肝素类药物中的依诺肝素钠及那屈肝素钙, 具有无需监测凝血指标、出血风险小、经济实用等优势, 仍为应用最多的药物。

该例患者 11 月 2 日血管超声回示右侧颈静脉血栓形成, D-二聚体 $0.95 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 有抗凝治疗指征, 依据《肺血栓栓塞症诊治与预防指南》中内科住院患者出血危险因素评估表, 活动性消化道溃疡、入院前 3 个月内有出血时间、血小板计数 $< 50 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$, 具有 1 项表现的即为出血高危; 年龄 ≥ 85 岁、肝功能不全 [国际标准化比值 (INR) > 1.5]、严重肾功能不全 [肾小球滤过率 (GFR) $< 30 \text{ mL} / (\text{min} \cdot \text{m}^2)$]、入住重症监护室 (ICU) 或心脏病监护室 (CCU)、中心静脉置管、风湿性心脏病、现患恶性肿瘤、男性, 以上因素具有 3 项及以上表现的为出血高危。而此例患者为男性, 仅 1 项符合, 评估出血风险为低危, 同时右侧颈静脉内血栓形成, 故药师建议启动抗凝治疗, 依诺肝素钠及那屈肝素钙均可选择。

那屈肝素是钙盐制剂, 皮下注射后稳定、速效, 钙离子是细胞修复的成分, 使内皮细胞损伤得以修复, 没有溶血作用, 不易引起注射部位血肿、硬结。此外, 钙离子可以增强低分子肝素抗 Xa 因子活性, 加强抗血栓作用^[24], 所以, 药师最终建议临床应用那屈肝素钙抗凝治疗, 按照体重计算给药剂量, 患者体重 75 kg, 最终应用那屈肝素钙 6000 IU 皮下注射 q12h 抗凝治疗。但后续患者出现间断鼻黏膜出血症状, 将那屈肝素钙剂量调整为 6000 IU qd 皮下注射, 患者未再发生鼻黏膜出血, D-二聚体也降至 $0.65 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。LS 抗凝治疗的疗程推荐 6 ~ 12 周^[25], 该例患者在应用那屈肝素钙抗凝治疗 24 d 后出院, 临床药师建议继续应用利伐沙班抗凝治疗至 6 周。药师嘱患者用药期间注意皮下、牙龈、鼻腔以及胃肠道等出血问题, 及时复诊。

4 结语

该病例涉及 1 例由坏死梭菌引起的 LS 患者。临床药师全程参与了治疗过程, 通过广泛查阅文献并结合药专业知识, 为医师提供了制订个性化药物治疗方案的协助。该方案的实施取得了显著的临床疗效, 并确保了患者在药物治疗过程中的安全性和有效性。

参考文献

- [1] 何慕芝, 蔡闯, 钟南山. Lemierre's 综合征 [J]. 国际呼吸杂志, 2009, 29 (11): 688-691.
- [2] Vijay V, Fattah Z. Lesson of the month 1: Lemierre's syndrome: a reminder of the "forgotten disease" [J]. Clin Med, 2018, 18 (1): 100-102.
- [3] Kuppalli K, Livorsi D, Talati NJ, et al. Lemierre's syndrome due to *Fusobacterium necrophorum* [J]. Lancet Infect Dis, 2012, 12 (10): 808-815.
- [4] Moretti M, De Geyter D, Goethal L, et al. Lemierre's syndrome in adulthood, a case report and systematic review [J]. Acta Clin Belg, 2020, 76 (10): 1-11.
- [5] Syed MI, Baring D, Murray C. In reference to Lemierre's syndrome: a systematic review [J]. Laryngoscope, 2010, 120 (1): 215-216.
- [6] Sacco C, Zane F, Granziera S, et al. Lemierre syndrome: clinical update and protocol for a systematic review and individual patient data meta-analysis [J]. Hamostaseologie, 2019, 39 (1): 76-86.
- [7] Dasari SP, Jha P. A systematic review of Lemierre's syndrome with a focus on ophthalmologic complications [J]. Cureus, 2020, 12 (7): e9326.
- [8] 张悦悦, 王田乔, 邢小康, 等. 坏死梭杆菌致 Lemierre 综合征一例 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2021, 44 (12): 1106-1109.

- [9] Olson KR, Freitag SK, Johnson JM, et al. Case records of the massachusetts general hospital. Case 36-2014. an 18-year-old woman with fever, pharyngitis, and doublevision double vision [J]. N Engl J Med, 2014, 371 (21): 2018-2027.
- [10] Lee WS, Jean SS, Chen FL, et al. Lemierre's syndrome: a forgotten and re-emerging infection [J]. J Microbiol Immunol Infect, 2020, 53 (4): 513-517.
- [11] Riordan T. Human infection with *Fusobacterium necrophorum* (Necrobacillosis), with a focus on Lemierre's syndrome [J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20 (4): 622-659.
- [12] Puymirat E, Biais M, Camou F, et al. A lemierre syndrome variant caused by *Staphylococcus aureus* [J]. Am J Emerg Med, 2008, 26 (3): 380.
- [13] Syed MI, Baring D, Addidle M, et al. Lemierre syndrome: two cases and a review [J]. Laryngoscope, 2007, 7 (9): 1605-1610.
- [14] 王昆润, 潘义兴. 各种抗菌药对牙周炎病原菌的抗菌活性 [J]. 国外医药抗生素分册, 1999, 20 (4): 189.
- [15] Durupt F, Mayor L, Bes M, et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* toxins and nasal carriage in furuncles and impetigo [J]. Br J Dermatol, 2007, 157 (3): 567-573.
- [16] 肖佳薇, 蒋剑成, 贺显晶, 等. 坏死杆菌白细胞毒素的研究进展 [J]. 中国预防兽医学报, 2020, 42 (10): 1079-1083.
- [17] 于召龙, 田纪伟. 多西环素抑制基质金属蛋白酶作用机制的研究进展 [J]. 中国当代医药, 2019, 26 (30): 28-34.
- [18] 刘惟优, 曾治平, 刘永平. 多西环素对内毒素性急性肺损伤小鼠模型 MMP-9 及 TIMP-1 mRNA 表达的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2021, 4 (32): 1426-1427.
- [19] Riordan T, Murai M. Human infection with *Fusobacterium necrophorum* (necrobacillosis), with a focus on Lemierre's syndrome [J]. Clin Microbiol Rev, 2003, 16 (4): 622-639.
- [20] Adedeji A, Chukwura O, Obafemi T, et al. Anticoagulation strategies in the management of Lemierre syndrome: a systematic review of the literature [J]. Ann Pharmacother, 2021, 55 (5): 658-665.
- [21] Gbaguidi X, Janvresse A, Benichou J, et al. Internal jugular vein thrombosis: outcome and risk factorst [J]. QTM: An International Journal of Medicine, 2011, 104 (3): 209-219.
- [22] Le C, Gennaro D, Marshall D, et al. Lemierre's syndrome: one rare disease-two case studies [J]. J Clin Pharm Ther, 2019, 44 (1): 122-124.
- [23] Ge J, Zhou PP, Yang YF, et al. Anticoagulation may contribute to antimicrobial treatment of Lemierre syndrome: a case report [J]. Thromb J, 2021, 19 (1): 80-89.
- [24] 徐蕾, 张伟霞, 许倍铭, 等. 那屈肝素钙临床应用药学专家意见 [J]. 上海医药, 2022, 43 (21): 12-17.
- [25] Alves S, Stella L, Carvalho I, et al. Lemierre's syndrome: a disguised threat [J]. BMJ Case Rep, 2019, 12 (4): e228397.

(收稿日期: 2025-03-11; 修回日期: 2025-04-20)

卡泊芬净治疗新生儿术后念珠菌尿路感染的药学实践及文献复习

曹静¹, 过晓雯², 赵昕^{1*} (1.中南大学湘雅医学院附属儿童医院 (湖南省儿童医院) 药学部, 长沙 410007; 2.上海交通大学医学院附属新华医院药学部, 上海 200092)

摘要: 回顾性分析 1 例新生儿术后真菌性尿路感染的诊疗全过程, 检索相关文献并结合病例特点进行分析。结果发现经卡泊芬净治疗后, 患者临床症状好转、尿培养转阴、炎性指标下降, 且无不良反应发生, 随访 6 个月未复发。该病例为新生儿真菌性尿路感染患者无法耐受唑类药物且其他抗真菌药物存在使用禁忌证等情况时, 提供了新思路——卡泊芬净可作为新生儿术后尿路感染的替代选择。

关键词: 卡泊芬净; 新生儿; 尿路感染; 念珠菌

中图分类号: R978.5, R969.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)12-3737-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.041

基金项目: 2022 年湖南省卫生健康委科研项目 (No.202213023900)。

作者简介: 曹静, 女, 主管药师, 主要从事临床药学工作, email: 294977196@qq.com * **通信作者:** 赵昕, 男, 主任药师, 主要从事儿童临床药理研究及儿童合理用药, email: 8439471@qq.com

先天性膈疝（congenital diaphragmatic hernia, CDH）是一种罕见的膈肌发育缺陷，血流感染和尿路感染是其易发生的并发症，念珠菌是 CDH 真菌性尿路感染的主要原因^[1]。氟康唑和两性霉素 B 脱氧胆酸盐因能在泌尿系统达到足够的药物暴露量，是首选治疗药物，两性霉素 B 脂质体和棘白菌素类药物一般不推荐^[2]。当新生儿等特殊人群在特殊生理病理状态下，氟康唑等尿液浓度高的药物无法使用时，该如何选药，现在国内外尚无明确的指南推荐，缺乏标准化治疗方案。笔者参与 1 例新生儿术后真菌性尿路感染的药学实践，通过充分的循证医学证据协助临床医师合理选药，以期为此类患者的临床用药提供参考。

1 病历摘要

患儿，女，G2P1，孕 22 周时外院 B 超提示胎儿膈疝，孕 23 周时我院复查超声示左侧膈疝，孕 39⁺₃ 周于我院顺产娩出后即转入小儿外科重症监护病房（PSICU），体重 3.4 kg，出生时 Apgar 评分：9-10-10 分，断脐前予气管插管，复苏过程中予保暖、吸黏液、球囊加压给氧，脐静脉推注酚磺乙胺、肌肉注射维生素 K₁ 等处理。

体格检查：体温 36℃，脉搏 142 次/min，呼吸 29 次/min，血压 92/51 mmHg（1 mmHg = 0.133 kPa）。神清，反应一般，全身皮肤无黄染，头颅顶部可及质软波动感包块，头围 34.5 cm，囟门平软（3 cm×3 cm），双侧瞳孔等大等圆，直径 2.0 mm，对光反射灵敏，气管插管常频呼吸机辅助通气中，两肺呼吸音粗，未闻及啰音，左肺可闻及肠鸣音，脐带包扎完好，腹部平软，肝肋下未及，脾脏肋下未及，可闻及肠鸣音。四肢肌张力可，颈软，拥抱反射（+）、握持反射（+），觅食反射及吸吮反射未做，四肢末梢暖，毛细血管再充盈时间（CRT）< 2 s。入院诊断：先天性膈疝。

2 治疗经过

2021 年 8 月 9 日，患儿入科后予呼吸机辅助通气（高频振荡模式）、禁食、胃肠减压及留置导尿管，并加用头孢呋辛钠抗感染及其他对症支持治疗。8 月 11 日，行左侧膈疝修补术，术中留置胸引管，镇静可。8 月 16 日，患者出现发热，热峰 38℃，查 C 反应蛋白（CRP）51 mg/L↑，白细胞计数（WBC）11.43×10⁹/L，降钙素原（PCT）5.90 ng/mL↑，血培养危急值报“革兰氏阴性杆菌”，临床医师停用头孢呋辛，改头孢吡肟抗感染治疗，8 月 18 日血培养结果报耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌，调整治疗方案为多黏菌素 B 1.25 mg/

（kg·次）q12h ivgtt 和美罗培南联合抗感染。8 月 24 日，患儿仍反复低热，会阴部可见散在淡红色丘疹，且 WBC、中性粒细胞（N%）等异常升高，一般细菌涂片检查找到革兰氏阴性杆菌、真菌，血培养、尿培养回报白色念珠菌生长，尿中菌落数为 2 万 CFU/mL，对氟康唑、两性霉素 B、棘白菌素类药物等均敏感，血流感染病原微生物高通量基因检测示鲍曼不动杆菌（序列数 3）、白色念珠菌（序列数 1431），尿常规示颜色浑浊，WBC、白细胞酯酶等异常，外院多黏菌素 B 血药浓度回报谷浓度 0.158 μg/mL↓，药师会诊建议拔除导尿管，加用氟康唑 35 mg qd ivgtt 抗真菌治疗，调整多黏菌素 B 剂量为 1.5 mg/（kg·次）q12h ivgtt。8 月 27 日，复查肝功能示：谷丙转氨酶（ALT）802.0 U/L↑、谷草转氨酶（AST）1222.0 U/L↑，同时测得 CRP 131 mg/L↑、真菌葡聚糖 872.54 pg/mL↑，WBC、PCT 等也异常升高，血培养、尿培养仍报白色念珠菌生长，请临床药师会诊，药师综合疗效及实验室检查结果，建议停用氟康唑，改为卡泊芬净 6.5 mg qd ivgtt 抗真菌治疗，并加用谷胱甘肽（150 mg q12h ivgtt，8 月 27 日—9 月 9 日）护肝治疗。9 月 10 日，患儿病情较前明显好转，转入普外二科进一步诊治，继续维持卡泊芬净治疗方案。

患儿在新生儿重症监护室治疗 30 d，整个治疗主要围绕抗感染展开，其主要抗感染治疗方案及监护期间实验室检查结果见表 1、2。

表 1 主要抗感染药物治疗方案

药物名称	用法用量	用药时间
头孢呋辛	0.17 g q12h ivgtt	8 月 9 日—8 月 16 日
头孢吡肟	0.17 g q8h ivgtt	8 月 16 日—8 月 18 日
美罗培南	0.1 g q6h ivgtt	8 月 18 日—9 月 8 日
硫酸多黏菌素 B	4 万 U q12h ivgtt	8 月 18 日—8 月 25 日， 9 月 3 日—9 月 6 日
	5 万 U q12h ivgtt	8 月 25 日—9 月 3 日
头孢哌酮舒巴坦	0.26 g q8h ivgtt	9 月 8 日—9 月 16 日
氟康唑氯化钠	35 mg qd ivgtt	8 月 24 日—8 月 27 日
卡泊芬净	6.5 mg qd ivgtt	8 月 27 日—9 月 16 日

3 讨论

该患儿为膈肌修补术后新生儿，术后出现发热及尿常规异常，8 月 24 日，血和尿均培养出白色念珠菌，血宏基因检测也查出白色念珠菌，血真菌葡聚糖指标较高，此外患儿有中心静脉导管、免疫反应受损、肠外营养及其他侵入性设备等侵袭性念珠菌感染的高危因素，患儿真菌性血流感染和尿路感染不能排除，予氟康唑抗真菌治

表 2 主要实验室监测指标

日期	WBC/ ($\times 10^9/L$)	N/%	CRP/ (mg/L)	PCT/ (ng/mL)	血肌酐 (Cre) / ($\mu\text{mol/L}$)	血尿素氮 (BUN) / (mmol/L)	ALT/ (U/L)	AST/ (U/L)
8 月 9 日	17.00	70.9	< 1	0.08	51.4	3.1	17.6	51.5
8 月 11 日	13.73	70.4	2	1.42	55.4	3.2	< 6	55.5
8 月 16 日	11.43	44.1	51	5.90	13.3	4.5	15.4	27
8 月 20 日	6.67	36.3	35	1.41	14.9	3.3	14.2	34.2
8 月 25 日	17.10	62.6	6	0.20	< 13.3	6.1	216.5	431.5
8 月 27 日	12.61	67.9	131	1.99	< 13.3	9	802	1222
8 月 28 日	18.17	63.6	41	1.25	16.3	9	462	640
8 月 31 日	13.06	48.0	12	0.13	< 13.3	3.2	144.2	171.7
9 月 3 日	13.35	50.5	13	0.15	< 13.3	3	67	111.5
9 月 8 日	8.22	50.1	3	0.05	< 13.3	4	30	81

疗。8 月 25 日复查 ALT 216.5 U/L $\uparrow$ 、AST 802 U/L $\uparrow$ ，8 月 27 日复查肝功能指标进一步升高 (ALT 431.5 U/L $\uparrow$ 、AST 1222.0 U/L $\uparrow$)，临床医师请临床药师会诊，咨询针对泌尿道真菌感染如何调整抗真菌治疗方案。

3.1 新生儿念珠菌感染治疗方案调整分析

对于新生儿大型手术后侵袭性念珠菌感染，目前国际指南推荐尚不统一，2016 版 IDSA^[3] 建议使用两性霉素 B 脱氧胆酸盐和氟康唑作为一线治疗方案，而 2025 ECMM^[2] 建议使用两性霉素 B、氟康唑和米卡芬净。氟康唑多用于近期末暴露过唑类药物，且对其敏感的患者^[3-4]。该患儿血、尿培养结果均提示为对三唑类、棘白菌素类、两性霉素 B 均敏感的白色念珠菌，且该患儿为膈肌修补术后新生儿，既往未曾暴露过三唑类药物，考虑氟康唑尿液浓度约为 90%^[5]，可以兼顾血流感染、尿路感染，故初始选用氟康唑抗真菌治疗是合理的。但是针对使用氟康唑后肝酶升高的情况，药师采用 Naranjo's 评估量表法和 WHO 乌普萨拉监测中心 (Uppsala Monitoring Centre, UMC) 因果关系评价系统，对氟康唑致肝损伤进行评估，评价结果均为“很可能有关”。此外，有文献报道，氟康唑所致新生儿 307 例不良事件中，295 例为肝毒性反应，是氟康唑安全性系统评价中最常见的不良事件^[6]。结合患者实验室检查结果和临床症状，药师建议停用氟康唑，改用其他抗真菌药物。患者目前正在使用多黏菌素 B，该药物可致不同程度的肾损伤，与两性霉素 B 合用会增加肾毒性发生的风险，作用程度分级为严重，一般不建议联合使用。因此，该患者目前情况不适宜选用两性霉素 B。目前，我国临床常用的棘白菌素包括米卡芬净和卡泊芬净。米卡芬净是唯一被美国食品药品监督管理局 (FDA) 和欧洲药品管理

局 (EMA) 批准用于治疗新生儿念珠菌病的药物，但 EMA 发布了其潜在肝毒性的警告^[7]，且我院暂无该制剂，结合该患者肝功能情况，暂不考虑纳入首选药品。卡泊芬净是 FDA 批准的第一种棘白菌素，一般用于 3 个月及以上侵袭性真菌感染，尚未批准用于新生儿和 3 个月以下婴幼儿，但目前越来越多的证据表明卡泊芬净在治疗新生儿全身念珠菌病方面是安全有效的，且优于两性霉素 B^[8-12]。因此，就该患者而言，药师建议可选用卡泊芬净作为替代治疗。

3.2 卡泊芬净治疗念珠菌尿路感染分析

目前有循证证据支持卡泊芬净对尿路感染进行尝试性治疗：卡泊芬净虽然尿路浓度低，但具有高蛋白结合性和广泛的组织分布，其血浆蛋白结合率可高达 97%，肾的 AUC_{24h} 组织 - 血浆比为 2.9，在肾脏中的浓度仅次于肝脏和脾脏，可以达到有效治疗浓度^[13-14]。在一项小鼠研究中，同样证明肝、肾和大肠中的卡泊芬净组织水平高于血清水平^[15]。肾实质和上皮细胞通过全身吸收获得足够的游离药物浓度，游离抗菌药物可以在不同的体液区室中自由移动，包括尿路上皮细胞、细胞内和细胞外区室，这可能提供足够的抗菌药物浓度，以治疗浅表尿路感染和肾实质感染^[10, 16]。临床和微生物治愈率表明，尽管棘白菌素的肾脏排泄不良，但其治疗水平可能已经达到尿路上皮组织水平，可被考虑用于治疗尿路感染^[9]。一项回顾性分析发现，在复杂的尿路感染中，需要组织中高浓度的抗真菌药物来控制侵袭性真菌疾病，其中卡泊芬净是非常有效的药物^[17]。相关国内外临床研究报道了卡泊芬净成功治疗念珠菌尿路感染的病例^[18-19]。在念珠菌耐药或药物 - 药物相互作用的情况下，它可能是一种安全有效的替代唑类药物治疗尿路感染的方法^[8]。因此，针对

该患者氟康唑不耐受且同时在使用多黏菌素 B 等肾毒性药物的情况下,可尝试选择卡泊芬净治疗白色念珠菌尿路感染。

3.3 卡泊芬净新生儿剂量选择

新生儿(尤其是早产儿)的卡泊芬净清除率较低,分布容积较大,血浆蛋白水平较低,这可能使他们面临药物积累的风险^[20-22]。因此,选择合适的剂量尤为重要。新生儿卡泊芬净的药代动力学数据很少,建议的剂量主要是从年龄较大的儿童和成人的研究中推断出来。目前临床上新生儿剂量一般基于体重和体表面积(BSA)^[23]计算两种方式。对于体重计算方法,临床上有限证据证明 2 mg/(kg·d)是相对比较安全有效的用法用量,可能出现的不良反应包括发热、皮疹、肝酶短暂升高等,但症状轻微,不影响治疗^[8-9, 11, 13]。一项首次获得新生儿和婴幼儿卡泊芬净血浆水平和安全性数据的前瞻性研究证实,在<3个月大的新生儿/婴儿中,每日一次 25 mg/m²的卡泊芬净耐受性良好,并且似乎提供了与每日接受 50 mg/m²的成人相对相似的血浆暴露^[21]。因此,结合患者目前 Child-pugh 评分 6 分,为轻度肝损伤,药师建议选用卡泊芬净 25 mg/(m²·d)或 2 mg/(kg·d)治疗新生儿念珠菌尿路感染。

药师在与临床医师沟通过程中,临床医师担心是否会加重患儿肝功能损伤。棘白菌素的不良事件和毒性作用较少,相对安全。接受卡泊芬净治疗的患者经常出现肝功能异常,但并不总是与治疗有关^[24-25]。相关研究表明,卡泊芬净在大鼠体内的最大耐受剂量可达 38 mg/kg,临床卡泊芬净 150 mg qd 以下的不良事件较少^[26]。该患者按体表面积计算剂量约为 5.5 mg,按体重计算则超过 6 mg,结合有效性和安全性,药师建议首选剂量为 5.5 mg,但临床考虑患者当前感染重,且即使按体重计算日剂量亦低于 10 mg,相对安全。临床医师采纳药师建议使用卡泊芬净替代治疗,但鉴于有效性和调整方便性,选用 2 mg/(kg·d)的用法用量。经治疗,患儿 8 月 27 日后血培养未再培养出病原菌,8 月 31 日起尿培养转阴,尿常规基本恢复正常,真菌葡聚糖下降至 379.82 pg/mL。9 月 16 日,患儿生命体征平稳,无发热,予出院。6 个月后电话随访,感染未再复发。

3.4 药学监护

临床应对患者肝功能进行动态监测,以及及时发现并识别可能的不良反应,做出相应处理。该患儿 8 月 27 日改用卡泊芬净后,复查肝酶逐渐降

低。为保证用药安全性,提醒护士用生理盐水作为溶媒,缓慢静脉滴注 1 h 以上。护士按要求执行,未出现输注反应等不良反应。同时,考虑该患儿为膈疝修补术后新生儿,药代动力学具有高度变异性,且卡泊芬净表现出适度的非线性药代动力学,在高剂量下具有药物积累的潜力^[27-28],药师建议临床医师进行治疗药物监测(therapeutic drug monitoring, TDM),但由于条件受限未予执行。此外,药师密切跟踪随访,该患儿在卡泊芬净用药期间未出现相关不良反应。

4 总结

通过本例患儿治疗分析发现,对于新生儿念珠菌尿路感染,在唑类药物耐药或不耐受、两性霉素 B 等有使用禁忌的时候,卡泊芬净不失为一种好的替代方案。临床药师通过查阅国内外相关文献发现,卡泊芬净对新生儿念珠菌尿路感染具有一定的有效性和安全性,在新生儿重症监护病房中有潜在的治疗益处。但在棘白菌素广泛用于新生儿尿路感染前,仍需要在这类人群中进行大规模的前瞻性对照试验,以提供这些药物在该类人群中的药代动力学、疗效和耐受性的证据。

参考文献

- [1] Saha R, Das SD, Kumar A, et al. Pattern of Candida isolates in hospitalized children [J]. Indian J Pediatr, 2008, 75 (8): 858-860.
- [2] Cornely OA, Sprute R, Bassetti M, et al. Global guideline for the diagnosis and management of candidiasis: an initiative of the ECMM in cooperation with ISHAM and ASM [J]. The Lancet Infect Dis, 2025, 25 (5): e280-e293.
- [3] Tragiannidis A, Tsoulas C, Groll AH. Invasive candidiasis and candidaemia in neonates and children: update on current guidelines [J]. Mycoses, 2015, 58 (1): 10-21.
- [4] De Rose DU, Santisi A, Ronchetti MP, et al. Invasive candida infections in neonates after major surgery: current evidence and new directions [J]. Pathogens, 2021, 10 (3): 319.
- [5] 中国医药教育协会感染疾病专业委员会. 抗菌药物药代动力学/药效学理论临床应用专家共识 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2018, 41 (6): 409-446.
- [6] Egunsola O, Adefurin A, Fakis A, et al. Safety of fluconazole in paediatrics: a systematic review [J]. Eur J Clin Pharmacol, 2013, 69 (6): 1211-1221.
- [7] Auriti C, Piersigilli F, Ronchetti MP, et al. Shunt lock therapy with micafungin to treat shunt-associated Candida albicans meningitis in an infant [J]. J Antimicrob Chemother, 2016, 71 (7): 2060-2061.
- [8] Kim J, Nakwa FL, Araujo Motta F, et al. A randomized,

- double-blind trial investigating the efficacy of caspofungin versus amphotericin B deoxycholate in the treatment of invasive candidiasis in neonates and infants younger than 3 months of age [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2020, 75 (1): 215-220.
- [9] Jeon GW, Sin JB. Successful caspofungin treatment of persistent candidemia in extreme prematurity at 23 and 24 weeks' gestation [J]. *J Formos Med Assoc*, 2014, 113 (3): 191-194.
- [10] Natarajan G, Lulic-Botica M, Rongkavilit C, et al. Experience with caspofungin in the treatment of persistent fungemia in neonates [J]. *J Perinatol*, 2005, 25 (12): 770-777.
- [11] Mohamed WA, Ismail M. A randomized, double-blind, prospective study of caspofungin vs. amphotericin B for the treatment of invasive candidiasis in newborn infants [J]. *J Trop Pediatr*, 2011, 58 (1): 25-30.
- [12] Caudle KE, Inger AG, Butler DR, et al. Echinocandin use in the neonatal intensive care unit [J]. *Ann Pharmacother*, 2011, 46 (1): 108-116.
- [13] Dermitzaki N, Balomenou F, Gialamprinou D, et al. Perspectives on the use of echinocandins in the neonatal intensive care unit [J]. *Antibiotics (Basel)*, 2024, 13 (12): 1209.
- [14] Marx J, Reinstadler V, Gasperetti T, et al. Human tissue distribution of caspofungin [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2022, 59 (4): 106553.
- [15] Hajdu R, Thompson R, Sundelof JG, et al. Preliminary animal pharmacokinetics of the parenteral antifungal agent MK-0991 (L-743, 872) [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997, 41 (11): 2339-2344.
- [16] Ozkaya-Parlakay A, Tezer H, Kazmacan T, et al. Successful treatment of an infant infected with refractory *C. parapsilosis* with caspofungin [J]. *J Trop Pediatr*, 2014, 60 (4): 329-330.
- [17] Sobel JD, Bradshaw SK, Lipka CJ, et al. Caspofungin in the treatment of symptomatic candiduria [J]. *Clin Infect Dis*, 2007, 44 (5): e46-49.
- [18] Rezai MS, Vaezi A, Fakhim H, et al. Successful treatment with caspofungin of candiduria in a child with Wilms tumor; review of literature [J]. *J Mycol Med*, 2017, 27 (2): 261-265.
- [19] 周燕, 卢鋈, 邹娅, 等. 卡泊芬净治疗念珠菌尿路感染 1 例并文献复习 [J]. *中南药学*, 2024, 22 (7): 1944-1948.
- [20] Sáez-Llorens X, Macias M, Maiya P, et al. Pharmacokinetics and safety of caspofungin in neonates and infants less than 3 months of age [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 53 (3): 869-875.
- [21] Wiederhold NP, Herrera LA. Caspofungin for the treatment of immunocompromised and severely ill children and neonates with invasive fungal infections [J]. *Clin Med Insights Pediatr*, 2012, 6: 19-31.
- [22] Marion D, Caroline S, Renaud V, et al. Advocacy for close monitoring of caspofungin therapy in premature infants: a case report [J]. *Pediatr Neonatol*, 2021, 63 (3): 313-314.
- [23] Yang XM, Leroux S, Storme T, et al. Body surface area-based dosing regimen of caspofungin in children: a population pharmacokinetics confirmatory study [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019, 63 (7): e00248-19.
- [24] Marchetti O, Moreillon P, Glauser MP, et al. Potent synergism of the combination of fluconazole and cyclosporine in *Candida albicans* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44 (9): 2373-2381.
- [25] Mora-Duarte J, Betts R, Rotstein C, et al. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis [J]. *N Engl J Med*, 2002, 347 (25): 2020-2029.
- [26] Denning DW. Echinocandin antifungal drugs [J]. *Lancet*, 2003, 362 (9390): 1142-1151.
- [27] Kofla G, Ruhnke M. Pharmacology and metabolism of anidulafungin, caspofungin and micafungin in the treatment of invasive candidosis: review of the literature [J]. *Eur J Med Res*, 2011, 16 (4): 159-166.
- [28] Hashemian SM, Farhadi T, Velayati AA. Caspofungin: a review of its characteristics, activity, and use in intensive care units [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2020, 18 (12): 1213-1220.

(收稿日期: 2025-10-17; 修回日期: 2025-11-04)

1 例多西环素联合羟氯喹治疗疑诊惠普尔养障体肺部感染的药学监护

时绘绘¹, 李进², 袁耀辉¹ (1. 药剂科; 2. 呼吸与危重症医学科, 河北省邢台市中心医院, 河北 邢台 054500)

摘要: 临床药师参与 1 例多西环素联合羟氯喹治疗疑诊惠普尔养障体肺部感染的药学监护, 通过查阅文献, 协助临床医师明确惠普尔养障体诊断; 对比不同治疗方案, 结合患者低体重, 依据循证证据, 在保证疗效的前提下, 为减少羟氯喹相关视网膜损害的发生, 建议采取盐酸多西环素片 0.1 g bid 联合硫酸羟氯喹片 0.1 g bid 口服的治疗方案。临床药师从用药注意事项、药品不良反应、药物相互作用等方面对患者进行用药宣教, 提高患者用药安全性及服药依从性。后患者病情好转出院, 2 个月后随访, 病情控制良好, 无严重不良反应发生, 体现了临床药师的价值。

关键词: 惠普尔养障体; 肺部感染; 多西环素; 羟氯喹

中图分类号: R978, R969.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2025)12-3742-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.042

惠普尔养障体 (*Tropheryma whipplei*, TW) 是一种具有独特的三层质膜细胞壁超微结构的革兰氏阳性杆菌, 因可导致 Whipple 病而引起人们关注^[1]。TW 致肺部感染罕见, 如不及时治疗可致重症肺炎, 甚至威胁生命^[2]。由于 TW 所致肺部感染常不伴经典 Whipple 病的临床表现, 缺乏公认的诊断标准, 临床治疗方案不一, 给临床诊治带来了困难^[3]。本文就临床药师参与 1 例疑诊 TW 所致肺部感染患者的药学监护进行分析, 从感染的诊断、治疗方案的选择、给药剂量的确定以及患者用药宣教等方面作为切入点, 保障患者治疗安全有效, 体现了临床药师的价值。

1 病历资料

患者, 72 岁, 男性, 身高 170 cm, 体重 50 kg, 职业农民, 主因发热 7 d 于 2024 年 8 月 29 日入院。血常规示: 白细胞 (WBC) $11.24 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ ↑, 中性粒细胞百分比 (NE%) 90.3%↑。C-反应蛋白 (CRP) $83.2 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ ↑, 胸部 CT 示: ①双肺炎症, 肺气肿; ②双肺尖胸膜增厚粘连。体格检查: 体温 38.7°C , 心率 $91 \text{ 次} \cdot \text{min}^{-1}$, 呼吸 $20 \text{ 次} \cdot \text{min}^{-1}$, 血压 $108/65 \text{ mmHg}$ ($1 \text{ mmHg} = 0.133 \text{ Pa}$), 两肺呼吸音粗。既往史: 1 个月前曾因肺炎住院, 痰培养未见致病菌, 给予环丙沙星治疗后好转出院, 其间发现“男性乳房发育”, 给予口服小金胶囊治疗。否认冠心病、高血压、糖尿病等疾病史。无药物过敏史, 无吸烟史, 偶饮酒, 无嗜酒史, 无牧区疫区

居住史。家族史: 父母双亡, 死因不详, 1 姐 2 弟体健, 否认家族遗传病史及传染病史。入院诊断: 社区获得性肺炎, 非重症。

2 主要诊疗经过

入院给予注射用哌拉西林他唑巴坦 (8:1) 4.5 g q8h , 体温未见好转, 最高体温波动在 $38.6 \sim 38.9^\circ\text{C}$ 。完善呼吸道病毒、新型冠状病毒、真菌血清学、肺炎支原体抗体检测均为阴性。入院第 3 日, 行支气管镜吸痰、灌洗, 送检肺泡灌洗液 (BALF) 微生物培养及基因检测。入院第 5 日, BALF 靶向高通量基因检测 (tNGS) 结果回报: 铜绿假单胞菌 (序列数 225), TW (序列数 179)。入院第 6 日, 患者仍有发热, 9 月 3 日最高体温 38.6°C 。BALF 微生物培养示: 铜绿假单胞菌, $2 \times 10^3 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, 对环丙沙星、左氧氟沙星耐药 (R), 替卡西林/棒酸、氨曲南中介 (I), 哌拉西林他唑巴坦、头孢哌酮舒巴坦等敏感 (S)。具体药敏结果如表 1 所示。临床医师考虑 TW 共生菌可能性大, 鉴于当前哌拉西林他唑巴坦已使用 5 d, 治疗效果不佳, 依据药敏结果将抗菌药物调整为头孢哌酮舒巴坦 (2:1) 3 g q12h 。

入院第 11 日, 患者仍有发热, 9 月 8 日最高体温 38.5°C 。血常规示: WBC $7.14 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, NE% 81.5%↑, CRP $111.2 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ ↑。胸部 CT 示: ①双肺炎症, 部分实变; ②双肺多发微小结节, 建议随诊; ③右侧少量胸腔积液。血常规较前略

基金项目: 邢台市重点研发计划自筹项目 (No.2023ZC106)。

作者简介: 时绘绘, 女, 主管药师, 主要从事临床药学研究, email: shh880214@163.com

表 1 铜绿假单胞菌的药敏结果

抗菌药物	MIC/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	敏感度	抗菌药物	MIC/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	敏感度
阿米卡星	≤ 4	S	氨曲南	$= 16$	I
头孢哌酮舒巴坦	≤ 4	S	环丙沙星	$= 2$	R
头孢吡肟	$= 4$	S	庆大霉素	≤ 2	S
亚胺培南	≤ 1	S	左旋氧氟沙星	$= 4$	R
美罗培南	≤ 1	S	多黏菌素 B	≤ 0.5	S
哌拉西林	$= 16$	S	头孢他啶	$= 4$	S
替卡西林 / 棒酸	$= 64/2$	I	妥布霉素	≤ 1	S
哌拉西林他唑巴坦	$= 8/4$	S			

有好转，但胸部 CT 较前加重。医师与临床药师讨论后考虑 TW 感染可能性大，建议行肺部组织活检，患者拒绝。临床药师查阅 TW 治疗相关文献，建议给予盐酸多西环素片 0.1 g bid 联合硫酸羟氯喹片 0.1 g bid 口服，医师采纳。入院第 12 日，体温较前明显下降。入院第 13 日，未再发热。入院第 21 日，血常规示：WBC $3.82 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$ ，NE% 58.5%，CRP $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。血常规较前明显好转，停用注射用头孢哌酮舒巴坦。入院第 25 日，胸部 CT 示：① 双肺炎症，伴间质性改变；② 部分支气管扩张伴感染。胸部 CT 示病变较前明显吸收。入院第 28 日，患者无发热，一般状态可，准予出院。出院医嘱继续服用盐酸多西环素片 0.1 g bid 和硫酸羟氯喹片 0.1 g bid。随访，出院后 55 d，患者无明显不适。患者住院期间体温如图 1 所示，WBC、NE% 及 CRP 如表 2 所示，胸部 CT 如图 2 所示。

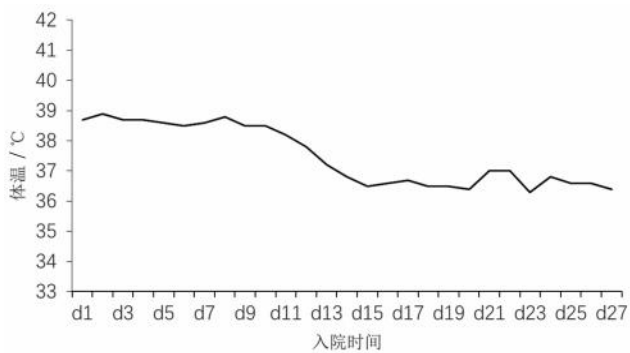


图 1 患者住院期间体温变化

表 2 患者住院期间 WBC、NE% 和 CRP 变化			
时间	WBC/ ($\times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$)	NE/%	CRP/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
d1	11.24↑	90.3↑	83.2↑
d11	7.14	81.5↑	111.2↑
d21	3.82	58.5	0.8

3 讨论

3.1 TW 致肺部感染的诊断

TW 所致肺部感染表现隐匿，临床表现无特异性^[4]，肺部影像学表现多种多样^[5]，临床容易误

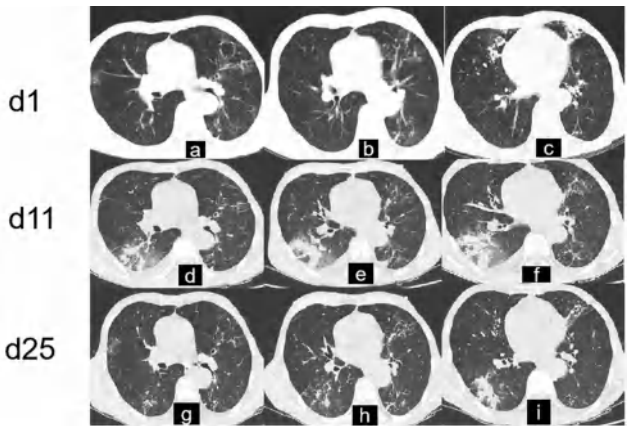


图 2 患者住院期间的胸部 CT

诊漏诊。TW 革兰氏染色效果不佳，抗酸染色为阴性，且在体外不易培养，常规的细菌培养至少需要 30 d^[6]。目前国外 TW 检测的技术主要分为侵入性操作（如组织病理学、免疫组织化学）和非侵入性操作 [如聚合酶链式反应（PCR）和高通量基因检测（NGS）]^[6]。单一的检测方法不能确诊 TW 感染，常需 2 种或 3 种方法复核。TW 所致肺部感染诊断金标准为肺组织病理活检^[7]，但因灵敏性低、主观性强、有创性等特点，患者接受度低，临床应用受限^[8]。我国尚未检索到经 PCR 确诊 TW 肺部感染的报道，这可能与 PCR 需要特异性的引物，且多数医院未将 PCR 作为常规检查有关。单纯 BALF 的 NGS 检出 TW 并不能确诊感染，需除外污染或定植。

为规范呼吸道标本 NGS 检出 TW 的诊疗，胡娅等^[3]基于感染性疾病诊治的临床经验和诊断思维，建立了针对呼吸道标本检出 TW 核酸的分级判断体系，按照 TW 为病原菌的可能性分为确诊、拟诊、疑诊、拟排、排除 5 个级别，并建议随着检查和治疗地开展，进行动态调整，分为初次判断和修正判断。本例患者明确有发热及影像学肺部病灶，不能用非感染性疾病解释，BALF 的 tNGS 结果可见铜绿假单胞菌和 TW，针对铜绿假单胞菌治疗后患者仍有发热，且肺部影像较

前加重,临床初次诊断疑似 TW 感染。后加用抗 TW 药物治疗,体温迅速降至正常,2 周后胸部 CT 较前吸收,临床治疗有效,修正诊断为拟诊 TW 感染。遗憾的是,该患者拒绝进行肺组织活检,未能确诊。

TW 常与其他病原体同时存在。目前尚无铜绿假单胞菌与 TW 合并感染的病例报道。铜绿假单胞菌的致病及耐药机制复杂^[9]。人体固有免疫系统是阻止细菌感染的第一道防线。研究显示,人缺少巨噬细胞很容易感染铜绿假单胞菌,且机体对细菌的清除也会减慢^[10]。而 TW 感染的主要靶细胞即为巨噬细胞,可使巨噬细胞的吞噬体成熟受损,硫氧还蛋白表达减少,致使巨噬细胞无法杀死细菌并呈递抗原^[6, 11]。本例患者中 BALF 微生物培养及 tNGS 可见铜绿假单胞菌,但菌量少,结合患者既往肺炎病史,认为铜绿假单胞菌定植可能性大,本次感染以 TW 急性感染为主,但不能排除后期合并铜绿假单胞菌感染的可能。

3.2 TW 感染治疗方案的制订

目前尚未形成 TW 诊疗的指南或专家共识,临床报道治疗方案不一,治疗药物有头孢曲松、四环素类、复方磺胺甲噁唑、碳青霉烯类、利福平、大环内酯类、羟氯喹等。但这些研究均在少数患者群体中进行,缺乏大型临床研究证实,部分患者还出现复发^[12]。Feurle 等^[13]一项前瞻性研究显示,患者先采用头孢曲松 2 g qd 或美罗培南 1 g tid 治疗 14 d,后采用复方磺胺甲噁唑治疗 12 个月,随访 36 个月临床症状和实验室数据均好转,该方案一度被认为是标准治疗方案。然而体外药敏试验显示,TW 对碳青霉烯类药物具有异质性,对复方磺胺甲噁唑、头孢曲松具有耐药性^[14]。复方磺胺甲噁唑治疗 TW 耐药、复发的报道日益增多^[15],但长期使用该药可能引起严重血液系统不良反应,有学者指出多西环素联合羟氯喹的体外敏感性良好,可能是有效的治疗方案^[16]。羟氯喹可通过增加巨噬细胞吞噬溶酶体的 pH 值而增强多西环素对 TW 的体外活性。Lagier 等^[17]研究证实了多西环素 0.2 g·d⁻¹ 联合羟氯喹 0.6 g·d⁻¹ 治疗方案的有效性。一项前瞻性随机对照研究显示,头孢曲松 2 g qd 静脉滴注 14 d 序贯复方磺胺甲噁唑 0.96 g bid 口服 12 个月与多西环素 0.1 g bid 联合羟氯喹 0.2 g bid 口服 12 个月疗效相当,但口服组在并发症、治疗费用及患者管理方面更优^[18]。若感染累及中枢系统,口服治疗方案需联合复方磺胺甲噁唑。《热病(第 53 版)》^[19]亦推荐多西环素 0.1 g bid 联合羟氯

喹 0.2 g tid 方案用于治疗小肠 Whipple 病。基于上述因素的考虑,临床药师建议采取多西环素+羟氯喹口服的治疗方案。

3.3 给药剂量的确定

多西环素联合羟氯喹治疗方案中,多西环素日剂量一致,硫酸羟氯喹片的日剂量存在差异。硫酸羟氯喹片说明书显示,日剂量超出 6.5 mg·kg⁻¹ 时视网膜损害明显增加。该患者体形消瘦,需给予较低剂量的羟氯喹。欧洲心脏病协会心内膜炎指南推荐多西环素 0.2 g·d⁻¹ 联合羟氯喹 0.2 ~ 0.6 g·d⁻¹ 口服治疗 TW^[20],提示小剂量羟氯喹临床治疗有效,这可能与羟氯喹药动学特征复杂,血药浓度在个体间表现出很大的差异有关^[21]。该患者体重 50 kg,故临床药师建议给予羟氯喹 0.1 g bid 联合多西环素 0.1 g bid 治疗。患者经治疗后体温及胸部 CT 均明显好转,提示该治疗方案有效。

3.4 用药监护的重点

TW 口服治疗需坚持服药至少 1 年以减少复发风险。临床药师对患者进行用药宣教,有助于提高患者依从性,减少药品不良事件发生。① 正确服用药物:多西环素服药后不宜立刻卧床,以减少食管炎和食管溃疡发生;羟氯喹宜与食物或牛奶同服,可减少胃肠道刺激。② 加强日常管理:多西环素易发生光敏反应,用药期间不宜将皮肤直接暴露于阳光或紫外线下,如出现皮肤红斑应立即停药。③ 监护药品不良反应:羟氯喹可引起视网膜病变及重度低血糖,注意监护是否出现视觉障碍并定期监测血糖,肝肾功能不全者需调整羟氯喹的给药剂量^[21];多西环素有肝毒性,用药期间应定期检查肝功能,如有异常及时就医。④ 警惕药物相互作用:羟氯喹可影响心率,不宜同用 β 受体阻滞剂及抗心律失常药物(如胺碘酮);羟氯喹主要经 CYP3A4 与 CYP2D6 代谢,避免与酶抑制剂(如红霉素、氟康唑等)合用,确需联用须减少羟氯喹剂量^[22],可咨询医师或药师。该患者出院后随访 2 个月,未见严重不良反应发生,后期将继续追踪。

4 小结

本例患者疑诊 TW 致肺部感染,临床药师查阅相关文献,提出多西环素联合羟氯喹的治疗方案;为减少视网膜损害,依据循证证据对低体重患者建议给予小剂量羟氯喹;由于需要长期服用药物,对患者进行用药宣教,以减少药害事件发生,提高患者依从性,并进行定期随访。临床药

师从自身专业角度为疑诊 TW 肺部感染患者实施药学监护,促进了患者的合理用药,体现了临床药师的价值。

参考文献

- [1] Marth T, Moos V, Muller C, et al. Tropheryma whipplei infection and Whipple's disease [J]. Lancet Infect Dis, 2016, 16 (3): e13-e22.
- [2] 陈平, 吴文兵, 任思冲, 等. 宏基因组二代测序诊断惠普尔养障体重症肺炎一例报道并文献复习 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2024, 32 (1): 134-137.
- [3] 胡娅, 唐光敏, 毕红霞, 等. 呼吸道样本中检出惠普尔养障体病例诊断的华西建议 [J]. 华西医学, 2024, 39 (3): 338-343.
- [4] Fang ZX, Liu Q, Tang W, et al. Experience in the diagnosis and treatment of pneumonia caused by infection with Tropheryma whipplei: a case series [J]. Heliyon, 2023, 9 (6): e17132.
- [5] Tao YH, Du R, Mao H. Tropheryma whipplei pneumonia revealed by metagenomic next-generation sequencing: report of two cases [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2024, 110 (1): 116427.
- [6] 程燕, 宁永忠. 惠普尔养障体导致急性肺炎的探讨 [J]. 中华检验医学杂志, 2021, 44 (11): 1090-1093.
- [7] 李嫦嫦, 潘晓宇, 任锡凯, 等. 儿童惠普尔养障体肺炎的临床特征分析 [J]. 温州医科大学学报, 2023, 53 (3): 240-244.
- [8] 周心怡, 黄晖蓉. 支气管肺泡灌洗液宏基因组学测序诊断惠普尔病 1 例报道并文献复习 [J]. 国际呼吸杂志, 2022, 42 (15): 1176-1180.
- [9] Qin SG, Xiao W, Zhou CM, et al. Pseudomonas aeruginosa: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics [J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7 (1): 199.
- [10] 汪速飞, 魏巍, 余冰, 等. 铜绿假单胞菌及其生物膜与机体固有免疫相互作用研究进展 [J]. 中华临床感染病杂志, 2017, 10 (3): 236-240.
- [11] Liu F, Yang XY, He ZH, et al. Using targeted next-generation sequencing to diagnose severe pneumonia due to Tropheryma whipplei and human metapneumovirus: a case report and literature review [J]. Infect Drug Resist, 2024, 17: 1863-1868.
- [12] Dolmans RA, Boel CH, Lacle MM, et al. Clinical manifestations, treatment, and diagnosis of Tropheryma whipplei infections [J]. Clin Microbiol Rev, 2017, 30 (2): 529-555.
- [13] Feurle GE, Junga NS, Marth T. Efficacy of ceftriaxone or meropenem as initial therapies in Whipple's disease [J]. Gastroenterology, 2010, 138 (2): 478-412.
- [14] Boulos A, Rolain JM, Raoult D. Antibiotic susceptibility of Tropheryma whipplei in MRC5 cells [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48 (3): 747-752.
- [15] Fenollar F, Lagier JC, Rolain JM, et al. Tropheryma whipplei endocarditis relapses after treatment with trimethoprim/sulfamethoxazole [J]. Int J Antimicrob Agents, 2013, 41 (6): 592-594.
- [16] Fenollar F, Perreal C, Raoult D. Tropheryma whipplei natural resistance to trimethoprim and sulphonamides in vitro [J]. Int J Antimicrob Agents, 2014, 43 (4): 388-390.
- [17] Lagier JC, Fenollar F, Lepidi H, et al. Treatment of classic Whipple's disease: from in vitro results to clinical outcome [J]. J Antimicrob Chemother, 2014, 69 (1): 219-227.
- [18] Moos V, Kruger J, Allers K, et al. Oral treatment of Whipple's disease with doxycycline and hydroxychloroquine versus intravenous therapy with ceftriaxone followed by oral trimethoprim-sulfamethoxazole in Germany: a phase 2/3, prospective, open-label, randomised, controlled, non-inferiority trial [J]. Lancet Infect Dis, doi: 10.1016/S1473-3099 (24) 00797-7.
- [19] Gilbert DN, Chambers HF, Saag MS, 等. 热病: 桑福德抗微生物治疗指南 [M]. 范洪伟, 译. 新译第 53 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2024: 22.
- [20] Delgado V, Ajmone MN, de Waha S, et al. 2023 ESC Guidelines for the management of endocarditis [J]. Eur Heart J, 2023, 44 (39): 3948-4042.
- [21] 黄莹, 谢茜, 葛卫红, 等. 羟氯喹血药浓度影响因素的研究进展 [J]. 医药导报, 2024, 43 (2): 215-220.
- [22] 卫红涛, 沈素, 邸宣, 等. 长期使用氯喹 / 羟氯喹不良反应 / 事件病例分析与药物相互作用 [J]. 中国药物警戒, 2020, 17 (5): 261-266, 271.

(收稿日期: 2025-03-20; 修回日期: 2025-05-02)

米卡芬净治疗光滑念珠菌尿路感染 1 例并文献复习

俞冰荟¹, 徐小婷¹, 张鸿博^{2*} (1.上饶市人民医院药学部, 江西 上饶 334000; 2.上饶市人民医院呼吸与危重症医学科, 江西 上饶 334000)

摘要: 回顾性分析 1 例光滑念珠菌尿路感染患者的诊疗经过, 并检索国内外数据库中应用米卡芬净治疗该病的相关病例, 对符合标准的病历资料进行汇总与分析。在纳入的 38 例患者中, 经米卡芬净治疗后, 36 例 (94.7%) 患者临床症状消失, 尿常规恢复正常且尿培养转阴; 1 例治疗失败; 另 1 例因基础肺部感染死亡。结果表明, 对于不能耐受或传统药物治疗无效的光滑念珠菌尿路感染, 米卡芬净可作为一种有效的替代治疗方案。

关键词: 尿路感染; 光滑念珠菌; 米卡芬净

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2025)12-3746-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.043

光滑念珠菌是侵袭性真菌感染的重要病原体, 因其对唑类药物固有的低敏感性及日益增加的耐药性, 被世界卫生组织列为高度优先级的真菌病原体^[1]。近年来, 其临床检出率显著上升, 流行病学数据显示, 在部分国家和地区, 光滑念珠菌已成为仅次于白色念珠菌的第二大侵袭性念珠菌病原体, 占念珠菌血症病例的 15% ~ 30%^[2]。值得注意的是, 尿路感染是其重要感染类型之一, 危险因素包括长期留置尿路引流装置、广谱抗菌药物暴露、糖尿病及恶性肿瘤等^[3-4], 此类感染的死亡率高达 40% ~ 50%, 而耐药菌株感染患者的预后更差^[5]。目前, 光滑念珠菌对唑类药物的耐药问题日益严峻。研究显示, 其对氟康唑的耐药率较高, 而棘白菌素类药物 (如米卡芬净) 对唑类或多烯类药物耐药的光滑念珠菌具有广泛的抗菌活性, 为治疗侵袭性真菌感染的一线选择。然而, 米卡芬净经肾脏代谢后在尿液中浓度极低, 理论上可能限制其在尿路感染中的疗效。因此, 2025 年《全球念珠菌诊断与治疗指南》推荐其用于血流感染^[6], 但针对光滑念珠菌尿路感染的治疗证据仍十分有限, 亟需更多临床数据支持。本文报道 1 例光滑念珠菌尿路感染病例, 并结合国内外米卡芬净用于光滑念珠菌尿路感染的病例报道进行复习总结, 以期临床决策提供参考。

1 病历资料

患者, 男, 72 岁, 身高 168 cm, 体重 77 kg。因“反复尿频、尿急、尿痛 4 个月余”, 于 2022 年 4 月 9 日入院。4 个月前患者无明显诱因出现尿频、尿急、尿痛, 每半小时小便 1 次, 量不多, 伴尿道口疼痛不适, 且无尿管留置史。尿常规: 白细胞+++~++++; 考虑“泌尿系统感染”, 先后

予“磷霉素氨丁三醇散 3 g po qd, 左氧氟沙星氯化钠注射液 0.5 g ivgtt qd, 多西环素片 0.1 g po bid”抗感染治疗, 但效果不佳。1 个月余前 (2 月 22 日) 于复旦大学附属华山医院检查, 尿常规: 白细胞 (WBC) 12 110/μL↑, 红细胞 (RBC) 63.3/μL↑, 尿培养: 光滑念珠菌 1.3 万 cfu/mL, 氟康唑、伏立康唑、伊曲康唑、两性霉素 B、5-氟胞嘧啶均敏感; 遂给予氟康唑 400 mg ivgtt qd + 氟胞嘧啶 1.5 g po tid 抗真菌治疗, 症状改善不明显。

入院查体: 体温 36.5 °C, 心率 98 次/min, 呼吸 18 次/min, 血压 127/72 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa)。神志清楚, 腹壁软, 全腹无压痛, 无肌紧张及反跳痛, 肝肾区无叩击痛。查血常规: 白细胞计数 $7.0 \times 10^9/L$, 中性粒细胞百分比 73.7%, C 反应蛋白 38.70 mg/L↑, 血沉 37 mm/h↑。降钙素原 0.03 ng/mL。尿常规: WBC 满视野, RBC 1405.8/μL; 生化检查: 谷丙转氨酶 11 U/L, 谷草转氨酶 15 U/L, 肌酐 78 μmol/L。门诊以“复杂性尿路感染”收住院。

既往史: 高血压病史 10 多年, 服用厄贝沙坦 75 mg po qd 降压, 血压维持在 (120 ~ 130) / (70 ~ 80) mmHg。糖尿病史 7 ~ 8 年, 服用阿卡波糖 50 mg po qd, 二甲双胍 500 mg po qd 降血糖, 血糖控制满意。前列腺增生 10 多年, 长期服用坦索罗辛胶囊 0.2 mg po qd。

入院考虑: ① 患者反复出现尿路感染, 入院尿常规异常, 感染来源明确, 为泌尿系统感染; ② 本次入院前尿培养为光滑念珠菌, 结合之前使用氟康唑联合氟胞嘧啶治疗后效果不佳, 于入院当日给予两性霉素 B 5 mg ivgtt qd, 逐渐加量直至 35 mg ivgtt qd, 并联合氟胞嘧啶片 1.5 g po qid 抗真菌治疗, 同时予降糖、降压、松弛平滑肌治疗, 但效果不理想。

作者简介: 俞冰荟, 女, 主管药师, 主要从事临床药学抗感染方面的研究, email: 526743809@qq.com *通信作者: 张鸿博, 男, 副主任医师, 主要从事呼吸与危重症医学科方面的研究, email: 43825989@qq.com

4 月 12 日前列腺磁共振示：前列腺体积稍增大，但尿道受压轻微，周围组织无浸润。完善 CT 尿路成像扫描：膀胱壁增厚毛糙，周围炎性渗出表现，考虑炎症可能性大，左肾小结石，双肾周少许渗出性改变。B 超：残余尿阳性（51 mL），膀胱内沉积尿沉渣可能性大，不排除肾实质炎症。4 月 13 日尿培养回报光滑念珠菌 400 cfu/mL，药敏结果：伏立康唑、两性霉素 B 敏感；氟胞嘧啶、伊曲康唑、氟康唑中介。并将抗真菌药物调整为米卡芬净 150 mg ivgtt qd 联合氟胞嘧啶 1.5 g po qid 抗真菌治疗。4 月 17 日尿常规细胞计数明显下降，WBC 594.5 / μ L $\uparrow$ ，RBC 405.8/ μ L $\uparrow$ 。经治疗后患者尿频、尿急、尿痛改善，无畏寒、发热，无腰酸背痛，4 月 23 日尿常规 WBC 107.8/ μ L $\uparrow$ ，RBC 23.8/ μ L $\uparrow$ 。米卡芬净用药 14 d 后患者于 4 月 26 日出院，3 个月门诊随访，尿路感染未复发。

2 文献复习

利用中文关键词“米卡芬净”“尿路感染”“光滑念珠菌”“念珠菌”检索中国知网、万方医学网、维普和中国生物医学文献数据库，英文关键词“micafungin”“urinary tract infection”“*candida glabrata*”“*glabrata*”检索 PubMed、Embase 数据库，检索时间为建库至 2024 年 10 月 1 日，文献纳入标准：①符合尿路感染诊断标准且尿培养为光滑念珠菌；②临床资料完整；③病例报道；④使用米卡芬净抗真菌治疗。文献剔除标准：①临床资料不全；②摘要、综述类文献；③重复报道及未公开发表的病例。通过去除重复文献及逐篇阅读米卡芬净治疗光滑念珠菌尿路感染的相关文献，共检索到英文文献 11 篇，中文文献 0 篇，共报道 37 个病例，结合本文病例共 38 例。收集患者性别、年龄、基础疾病、标本、药敏数据、给药方案、疗程、治疗及转归和治疗有效率^[7-17]，结果见表 1。38 例患者中男性 7 例，女性 18 例，13 例未知；年龄为 1~89 岁，其中 1 例为早产儿。纳入的病例中多数患者合并不同的基础疾病，糖尿病 14 例（14/38，36.84%）、膀胱炎 9 例（9/38，23.68%）、免疫性疾病 3 例（3/38，7.89%）、高血压 5 例（5/38，13.16%）、肾盂肾炎 5 例（5/38，13.16%）等。38 例患者中对氟康唑耐药 22 例，中介 1 例，敏感 10 例，剂量依赖性 1 例；34 例患者对米卡芬净敏感，4 例未知药敏结果。38 例患者均使用米卡芬净治疗，36 例患者痊愈，1 例患者治疗失败，1 例因肺部感染死亡，治疗的总有效率达 94.7%。

3 讨论

光滑念珠菌是重要的机会性致病真菌，其通过形成生物膜介导免疫逃逸和药物耐受，是导致临床难治性感染的关键毒力因子^[18]。生物膜中的

胞外多糖基质 [主要成分为 β -（1，3）-D-葡萄糖] 可阻碍氟康唑结合靶点，还能中和两性霉素 B 破坏其活性，使它们的最低抑菌浓度（MIC）显著提高 10~1000 倍^[19]。而棘白菌素类药物能抑制 β -葡萄糖合成酶，不易受生物膜影响，因此在生物膜环境中仍保持较强药效。基于这一机制，2016 年美国感染病学会（IDSA）指南强烈推荐棘白菌素作为念珠菌血症的一线治疗（非中性粒细胞减少患者为高等级；中性粒细胞减少患者为中等级），对于慢性播散性念珠菌病也强烈推荐棘白菌素作为初始治疗（低等级）^[20]。但对于光滑念珠菌尿路感染，因棘白菌素在尿液中浓度极低，IDSA 不建议将其用于此类感染，转而推荐使用两性霉素 B 脱氧胆酸盐或氟胞嘧啶单药/联合方案（强推荐，低等级）。卡泊芬净用于念珠菌尿路感染的文献复习有相关报道^[21]，然而，米卡芬净用于治疗光滑念珠菌尿路感染的临床证据非常有限，国内尚缺乏系统总结，国外也多为个案报道。

米卡芬净是美国食品药品监督管理局（FDA）批准的第二种棘白菌素类药物，其抗真菌疗效已获临床试验证实。该药物主要在肝脏代谢，代谢产物经粪便排泄，不足 1% 以原形经尿液排出。本文共汇总了 11 篇关于米卡芬净用于尿路感染的个案报道，结果显示其具有一定的临床有效率和微生物清除率，与卡泊芬净相关文献综述的结论相似，提示棘白菌素类药物在尿路感染中可能具备潜在的应用价值。其起效机制可能不依赖于尿液药物浓度，而涉及两方面：①组织渗透性，药物通过血液循环渗透至肾实质或输尿管/膀胱壁组织，从而清除病原体或生物膜^[22]；②生物膜干扰，通过抑制 β -葡萄糖的合成，破坏生物膜的完整性，促使其脱落。

光滑念珠菌尿路感染的发生与宿主基础疾病及医源性因素密切相关。在 38 例患者中，主要风险因素为导尿管留置（10/38，26.32%）和糖尿病（14/38，36.84%）。导管相关感染主要是病原体沿导管表面生物膜迁移或因引流不畅、集尿袋污染导致逆行感染^[23]。据美国 2011—2014 年数据，念珠菌占导管相关尿路感染的 24%，这强调了及时拔管和针对性抗真菌治疗的重要性^[24]。糖尿病患者易感机制包括高糖环境抑制免疫功能、促进微生物生长，以及长期糖代谢异常导致膀胱功能异常、残余尿增多，从而增加生物膜形成和病原体定植的风险。

光滑念珠菌对氟康唑的敏感性普遍较低，约 20% 的菌株可在治疗中发展为耐药。本研究中，38 例患者氟康唑耐药率高达 57.89%，与文献报道的唑类药物耐药率持续上升的趋势一致^[25]。对此，棘白菌素类药物（包括卡泊芬净、米卡芬净和阿尼

表 1 米卡芬净治疗光滑念珠菌尿路感染患者临床资料汇总

文献	例数	性别	年龄 / 岁	基础疾病	标本	药敏数据	给药方案	疗程 /d	治疗及转归
Lagrotteria 等 ^[7] 2007	2	女	39 ~ 75	1 例糖尿病、肾移植、 1 例肾功能不全，原 发性干燥综合征伴 皮肤血管炎	尿	1 例对 FLU 耐药，对芬 净类及其他唑类均敏 感，1 例未说明	50 mg ivgtt qd	14	2 例患者临床症状均消 失，微生物学根除
Pieralli 等 ^[8] 2014	1	女	56	糖尿病、肝衰竭	尿	对 FLU 耐药，对芬净类 及唑类敏感	200 mg ivgtt qd	25	临床症状消失，治疗第 12 日微生物学根除
Grau 等 ^[9] 2016	2	男	85 ~ 89	1 例肾盂肾炎和尿毒 症，1 例膀胱炎	尿	2 例对 FLU 耐药，对芬净 类及其他唑类均敏感	1 例 100 mg ivgtt qd， 1 例 150 mg ivgtt qd	6 ~ 18	2 例患者临床症状均消 失，微生物学根除
Gabardi 等 ^[10] 2016	10	未提及	平均年龄 60	未提及	尿	10 例均对 FLU 耐药， 对芬净类及其他唑 类均敏感	100 mg ivgtt qd	平均治 疗时间 12.5 d	10 例患者临床症状均 消失，微生物学根除
Kane 等 ^[11] 2016	4	男 1 例 女 3 例	42 ~ 78	糖尿病 2 例、心力衰竭 1 例、呼吸衰竭 1 例、 慢阻肺 1 例、终末 期肾病 1 例	尿	1 例对 FLU 耐药，对芬净 类及唑类均敏感，其余 3 例未说明	100 mg ivgtt qd	12 ~ 14	4 例患者临床症状均消 失，微生物学根除
McMorris 等 ^[12] 2017	11	男 2 例 女 9 例	39 ~ 89	3 例肾盂肾炎、6 例膀 胱炎、7 例糖尿病、 3 例高血压、2 例免 疫抑制、1 例肾积水	尿	2 例对 FLU 耐药，9 例对 FLU 敏感，11 例对芬 净类及其他唑类均敏感	100 mg ivgtt qd	3 ~ 44	临床治愈 10 例，1 例 失败
Rihova 等 ^[13] 2021	1	女	65	高血压、糖尿病、肾小 管间质性肾炎	尿	对 FLU 耐药，对芬净类、 其他唑类、AMB、5-FC 敏感	100 mg ivgtt qd	14	临床症状消失，微生物 学根除
Nagata 等 ^[14] 2021	1	男	52	糖尿病、肺栓塞	血和 尿	对 FLU 耐药，对芬净类、 其他唑类、AMB、5-FC 敏感	150 mg ivgtt qd	8	临床症状消失，微生物 学根除
Ekinci 等 ^[15] 2022	3	未提及	1 ~ 16	2 例膀胱炎，1 例肾盂 肾炎	尿	2 例对 FLU 耐药，1 例 FLU 敏感，3 例对芬净 类及其他唑类均敏感	2 mg/kg ivgtt qd	14	3 例患者临床症状均消 失，微生物学根除
Parramon-Teixido 等 ^[16] 2024	1	女	早产儿	无	尿	对 FLU 呈剂量依赖性敏 感，对棘白菌素类敏感	4 mg/kg ivgtt qd	5	因基础肺部感染死亡
Villegas 等 ^[17] 2024	1	女	46	糖尿病、肾结石	尿	对 FLU 耐药、对芬净类及 其他唑类均敏感	100 mg ivgtt qd	14	临床症状消失，微生物 学根除

注：FLU. 氟康唑；其他唑类. 伏立康唑、伊曲康唑、泊沙康唑；芬净类. 卡泊芬净、米卡芬净；5-FC. 5- 氟胞嘧啶；AMB. 两性霉素 B。

芬净) 已成为重要的治疗替代选择。体外药敏研究^[26]及巴西队列临床研究^[27]均证实，米卡芬净在棘白菌素类药物中抗真菌活性最优，其 MIC 值最低。进一步的临床疗效数据不仅验证了棘白菌素类药物的有效性，还揭示了明显的剂量 - 效应关系：米卡芬净在剂量提高至 150 mg qd 后，治疗成功率可达 90%，优于卡泊芬净和两性霉素 B^[28]。尽管各组间生存率无显著差异，但米卡芬净所呈现的剂量相关疗效提升与其体外药敏优势相符，提示通过剂量优化可进一步改善临床结局。

McMorris 等^[12]研究中纳入 11 例患者，其中 1 例尽管体外药敏试验显示对米卡芬净敏感，但仍出现治疗失败，提示体内外反应可能存在差异。这种不一致可能与宿主因素、药代动力学特性或微生物的适应性耐药机制有关。念珠菌属对棘白菌素类药物的耐药主要源于 *FKS* 基因突变，常见类型包括 *FKS1* 基因的 *S629P* 突变、*FKS2* 基因的 *S663P* 突变及 *F659* 缺失突变，这些突变是导致体内外耐

药的主要因素^[29]。此外，相关研究报道了具有独特突变的光滑念珠菌临床分离株，其 *FKS1* 基因携带 *K1323E* 突变，*FKS2* 基因含有 *Y1825fs* 缺失突变，这两种突变仅对米卡芬净表现出耐药性^[30]。而对其他棘白菌素类药物仍保持敏感。提示不同棘白菌素之间可能存在药理差异与耐药表型差异，临床需警惕“药物特异性耐药”。进一步开展 *FKS* 基因型与表型耐药的关联性研究，并结合体内外药效学模型验证，将有助于更精准地指导棘白菌素类药物在光滑念珠菌感染中的合理使用。

总之，光滑念珠菌生物膜的形成已成为临床治疗失败的关键因素。随着耐药念珠菌的流行，唑类及多烯类抗真菌药物的疗效面临严峻的挑战，而棘白菌素类药物凭借其独特的细胞壁靶向作用机制展现出显著优势。米卡芬净作为棘白菌素类代表药物，不仅对光滑念珠菌保持低 MIC 值，更通过良好的组织穿透性在泌尿系统实现有效药物暴露，已成为治疗的重要选择。本研究汇总的病

例数据为米卡芬净的应用提供了必要参考,但未来仍需通过更高质量的前瞻性临床研究进一步明确该药物在光滑念珠菌尿路感染治疗中的地位。

参考文献

- [1] Askari F, Kaur R. *Candida glabrata*: a tale of stealth and endurance [J]. ACS Infect Dis, 2025, 11 (1): 4-20.
- [2] 刘静, 郑秋实, 黄广华. 光滑念珠菌的生物学、流行病学以及耐药机制研究进展 [J]. 菌物学报, 2020, 39 (11): 2014-2024.
- [3] Jenks JD, Aneke CI, Al-Obaidi MM, et al. Race and ethnicity: risk factors for fungal infections? [J]. PLoS Pathog, 2023, 19 (1): e1011025.
- [4] Lass-Flörl C, Kanj SS, Govender NP, et al. Invasive candidiasis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2024, 10 (1): 20.
- [5] Ferngren G, Yu D, Unalan-Altintop T, et al. Epidemiological patterns of candidaemia: a comprehensive analysis over a decade [J]. Mycoses, 2024, 67 (5): e13729.
- [6] Cornely OA, Sprute R, Bassetti M, et al. Global guideline for the diagnosis and management of candidiasis: an initiative of the ECMM in cooperation with ISHAM and ASM [J]. Lancet Infect Dis, 2025, 25 (5): e280-e293.
- [7] Lagrotteria D, Rotstein C, Lee CH, et al. Treatment of candiduria with micafungin: a case series [J]. Can J Infect Dis Med Microbiol, 2007, 18 (2): 149-150.
- [8] Pieralli F, Bazzini C, Vannucchi V, et al. A case of *Candida glabrata* severe urinary sepsis successfully treated with micafungin [J]. Med Mycol Case Rep, 2014, 5: 1-3.
- [9] Grau S, Luque S, Echeverría-Esnal D, et al. Urinary micafungin levels are sufficient to treat urinary tract infections caused by *Candida* spp [J]. Int J Antimicrob Agents, 2016, 48 (2): 212-214.
- [10] Gabardi S, Martin S, Sura M, et al. Micafungin treatment and eradication of candiduria among hospitalized patients [J]. Int Urol Nephrol, 2016, 48 (11): 1881-1885.
- [11] Kane LE, Muzevich KM. Micafungin in the treatment of candiduria: a case series [J]. Med Mycol Case Rep, 2016, 11: 5-8.
- [12] McMorris TE, Smith WJ, Kupiec K, et al. Micafungin therapy for symptomatic candiduria in hospitalized patients: a review of 14 cases [J]. Infect Dis Clin Pract, 2017, 25 (2): 88-93.
- [13] Rihova ZJ, Slobodova L, Hrabovska A. Micafungin is an efficient treatment of multi drug-resistant *Candida glabrata* urosepsis: a case report [J]. J Fungi (Basel), 2021, 7 (10): 800.
- [14] Nagata J, Kawasaki T, Iesato K, et al. A case of candidemia after long-term presence of urethral foreign bodies [J]. IDCases, 2021, 25: e01176.
- [15] Ekinci F, Yildizdas D, Horoz OO, et al. Treatment of candida urinary tract infections with micafungin in children [J]. Pediatr Int, 2022, 64 (1): e15033.
- [16] Parramon-Teixido CJ, Garcia EC, Frick MA, et al. Case report: micafungin for treating *Candida glabrata* urinary infection: a clinical case in a premature neonate [J]. Front Pediatr, 2024, 12: 1397456.
- [17] Villegas KJ, Orhun N, Vera Garces S, et al. Unilateral renal fungus ball caused by *Candida glabrata* [J]. Med Mycol Case Rep, 2024, 44: 100649.
- [18] Lim SJ, Mohamad Ali MS, Sabri S, et al. Opportunistic yeast pathogen *Candida* spp.: secreted and membrane-bound virulence factors [J]. Med Mycol, 2021, 59 (12): 1127-1144.
- [19] Kuhn DM, George T, Chandra J, et al. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin blipid formulations and echinocandins [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46 (6): 1773-1780.
- [20] Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America [J]. Clin Infect Dis, 2016, 62 (4): e1-e50.
- [21] 周燕, 卢鋈, 邹娅, 等. 卡泊芬净治疗念珠菌尿路感染 1 例并文献复习 [J]. 中南药学, 2024, 22 (7): 1944-1948.
- [22] Felton T, Troke PF, Hope WW. Tissue penetration of antifungal agents [J]. Clin Microbiol Rev, 2014, 27 (1): 68-88.
- [23] Bardossy AC, Jayaprakash R, Alangaden AC, et al. Impact and limitations of the 2015 National Health and Safety Network case definition on catheter-associated urinary tract infection rates [J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2017, 38 (2): 239-241.
- [24] Weiner LM, Webb AK, Limbago B, et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the centers for disease control and prevention, 2011—2014 [J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2016, 37 (11): 1288-1301.
- [25] Pfaller MA, Diekema DJ, Turnidge JD, et al. Twenty years of the sentry antifungal surveillance program: results for *Candida* species from 1997—2016 [J]. Open Forum Infect Dis, 2019, 6 (Suppl 1): S79-S94.
- [26] Li Y, Hou X, Li RY, et al. Whole genome analysis of echinocandin non-susceptible *Candida glabrata* clinical isolates: a multi-center study in China [J]. BMC Microbiol, 2023, 23 (1): 341.
- [27] Mario DA, Denardi LB, Bandeira LA, et al. The activity of echinocandins, amphotericin B and voriconazole against fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant Brazilian *Candida glabrata* isolates [J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2012, 107 (3): 433-436.
- [28] Cornely OA, Vazquez J, De Waele J, et al. Efficacy of micafungin in invasive candidiasis caused by common *Candida* species with special emphasis on non-albicans *Candida* species [J]. Mycoses, 2014, 57 (2): 79-89.
- [29] Hu XL, Yang P, Chai CD, et al. Structural and mechanistic insights into fungal β -1, 3-glucan synthase FKS1 [J]. Nature, 2023, 616 (7956): 190-198.
- [30] Arastehfar A, Lass-Flörl C, Garcia-Rubio R, et al. The quiet and underappreciated rise of drug-resistant invasive fungal pathogens [J]. J Fungi (Basel), 2020, 6 (3): 138.

(收稿日期: 2025-08-25; 修回日期: 2025-09-15)

药品不良反应

1 例多奈哌齐过量导致的胆碱能综合征及文献回顾

刘欢欢¹, 郭叙喜², 张宇³, 曾秋明¹, 李方园¹, 梁奇¹, 梅全喜¹, 李汉洪^{1*}, 邱绿琴^{1*} (1.深圳市宝安区中医院药学部, 广东 深圳 518101; 2.深圳市宝安区中医院内分泌科, 广东 深圳 518101; 3.深圳市宝安区中医院重症医学科, 广东 深圳 518101)

摘要: 临床药师参与 1 例 82 岁女性阿尔茨海默病患者因误服过量多奈哌齐 25 mg 导致胆碱能综合征不良事件的诊疗过程。临床药师采用新型选择性抗胆碱药戊乙奎醚进行解救并实施药学监护, 最终成功缓解患者症状。本文通过对该病例的分析及文献综述, 总结了多奈哌齐过量的临床表现、解救措施及临床转归, 旨在为临床药师处理多奈哌齐引起的胆碱能综合征不良事件提供参考, 提升医疗团队应对类似情况的能力, 为临床工作提供实践指导。

关键词: 多奈哌齐; 阿尔茨海默病; 胆碱能综合征不良事件; 戊乙奎醚

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2025)12-3750-04

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.044

多奈哌齐 (donepezil, DNP) 是临床常用于治疗阿尔茨海默病的药物, 通过抑制乙酰胆碱酯酶活性, 增加中枢神经突触间隙乙酰胆碱含量, 从而改善患者认知功能^[1]。随着阿尔茨海默病患者增多及多奈哌齐的广泛应用, 药物过量服用的风险也逐渐增加。多奈哌齐常见的不良反应包括恶心呕吐、腹泻、睡眠障碍等^[2]。尽管多奈哌齐安全性较高, 但过量服用仍会导致不良事件的发生。目前, 国内多奈哌齐过量病例报道极少, 且尚无使用新型抗胆碱药戊乙奎醚解救的案例报道。本文报道了 1 例国内老年患者多奈哌齐急性单剂过量的诊疗过程, 并结合相关病例进行分析, 以期为临床工作提供参考。

1 病历资料

患者, 女, 82 岁, 因“头晕伴胸闷痛 4 h”于 2024 年 12 月 5 日入院, 诊断为 2 型糖尿病肾病 V 期、高血压病 3 级 (极高危)、阿尔茨海默病。入院前规律口服多奈哌齐片, 每日 5 mg (1 片)。入院体温 36.5℃, 心率 64 次/min, 呼吸 20 次/min, 血压 194/88 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa)。药物治疗方案: 硝苯地平片临嘱 10 mg 舌下含服快速降压; 前列地尔注射液 2 mL qd iv 改善微循环; 尿毒清颗粒 5 g tid po 保护肾功能; 盐酸多奈哌齐片 (商品名思博海, 植恩生物技术股份有限公司, 批号: 02240570) 5 mg qd po 联合喹硫平

片 0.1 g qn po 改善认知功能和精神症状。

12 月 6 日 14:15 患者误服多奈哌齐片 25 mg (5 片), 14:30 催吐处理, 吐出清水伴少量药渣 (约 15 mL), 予吸氧处理。心电监护显示血压 208/106 mmHg、心率 88 次/min, 临嘱再次给予硝苯地平片 10 mg 舌下含服降压。18:00 出现轻微流涎, 心电监护显示血压 125/74 mmHg、心率 92 次/min、呼吸 18 次/min、血氧饱和度 (SpO₂) 100%, 余无其他不适。临床药师会诊建议予特效解救药 M 受体阻断药阿托品对症治疗, 临床考虑患者当前症状轻微, 未出现严重胆碱能危象, 决定继续观察, 暂未使用阿托品。19:30 患者出现恶心呕吐, 呕吐物为胃内容物, 流涎明显增多, 精神状态差, 心电监护提示血压升至 175/103 mmHg、心率加快至 107 次/min、SpO₂ 100%、呼吸 19 次/min。结合患者误服多奈哌齐过量的情况, 考虑为药物过量导致的胆碱能综合征。19:48 考虑到患者胆碱能综合征症状明显, 同时伴有心率加快症状, 建议肌内注射新型选择性 M 受体阻断药戊乙奎醚注射液 0.5 mg 抗胆碱治疗。给药 1 h 后, 20:55 患者流涎明显减少, 恶心呕吐症状消失, 心电监护显示血压 139/74 mmHg、心率 68 次/min、SpO₂ 100%、呼吸 18 次/min, 生命体征趋于平稳。12 月 7 日患者精神状态明显好转, 流涎症状完全消失, 体温 36.5℃、血压

基金项目: 深圳市“医疗卫生三名工程”项目资助 (No.SZZYSM202206005)。

作者简介: 刘欢欢, 女, 副主任药师, 主要从事临床药学工作, email: 840653568@qq.com ***通信作者:** 李汉洪, 男, 副主任药师, 主要从事药事管理工作, email: 380097673@qq.com; 邱绿琴, 女, 主任中药师, 主要从事药事管理工作, email: qiulvqin@szbazyy.net

141/69 mmHg、心率 61 次/min、呼吸 20 次/min，后续未再出现胆碱能综合征症状，不良反应消失。

临床药师实施全程药学监护，提醒医护人员和患者戊乙奎醚可能出现排尿困难症状。12 月 7 日早晨，患者出现尿潴留症状，遂留置导尿管；12 月 8 日患者小便顺解，24 h 后恢复自主排尿，尿潴留不良反应症状消失，其出现与消退过程与戊乙奎醚的药动学和药效学特点相符^[3]。

2 讨论

2.1 多奈哌齐过量导致不良事件的临床表现

多奈哌齐口服吸收良好，生物利用度高达 99%，3 ~ 4 h 后达血药峰浓度，青年与老年的血药浓度达峰时间分别为 (3.4 ± 1.5) 和 (5.2 ± 2.8) h^[4]，老年患者达峰时间延迟。此例患者服药 3.5 h 后仅出现轻微流涎，被误认为症状不严重。服药 5 h 后，患者出现明显的恶心呕吐症状，胆碱能症状出现时间与血药浓度达峰时间基本一致，约 96% 与血浆蛋白结合，易穿过血脑屏障；经肝药酶代谢，半衰期达 70 h，每日给药 1 次即可；主要以原形和 4 种主要代谢物通过肾脏排泄。多奈哌齐每日维持剂量为 5 ~ 10 mg^[2]，本例高龄患者误服多奈哌齐 25 mg，超常规治疗剂量，导致对患者暂时性伤害并需要延长住院时间，根据《中国用药错误管理专家共识》，属于 F 级用药错误^[5-6]。

多奈哌齐使乙酰胆碱在突触间隙大量蓄积，引起胆碱能神经持续过度兴奋，体内生理效应发生相应改变，表现为毒蕈碱样（M 样）胆碱能中毒、烟碱样（N 样）胆碱能中毒和中枢神经系统中毒等症状和体征。本例患者短时间内过量服用多奈哌齐 25 mg 后出现流涎、恶心呕吐（M 样中毒症状）、精神状态较差（中枢神经系统症状），未出现 N 样（肌颤、肌无力、肌阵挛等）症状。同时患者未出现心动过缓，反而心率加快。入院时已排除心脏器质性病变引起的心率加快，考虑是患者舌下含服硝苯地平片，其扩张血管作用能反射性引起交感神经兴奋，从而加快心率^[7]。

笔者以“多奈哌齐/donepezil”和“过量/overdose”或“中毒/toxicity”为关键词，检索近 30 年中国知网（CNKI）、万方数据库、维普中文科技期刊数据库和 PubMed 收录的相关病例报道，收集到 10 例多奈哌齐过量的个案报道。将上述病例报道作为分析依据，建立数据库，记录文献信息、患者情况、基本疾病、合并用药、过量情况、临床表现、解救措施、临床转归等，进行分类和分析，详情见表 1。

结果显示，10 例病例大部分为老年阿尔茨海默病患者，2 例为儿童，这表明医疗提供者、患者和家

属合作防止用药错误非常重要。幼儿误服多奈哌齐，可能出现长时间精神状态改变、呕吐和间歇性心动过缓，因其半衰期长，胆碱能效应可持续 4 d，需住院观察和持续心脏监测。当成人误服剂量为 30 ~ 50 mg 时，主要出现恶心呕吐、腹泻、瞳孔缩小、多汗、心动过缓等 M 样症状，部分出现困倦、嗜睡等中枢神经系统症状，少数出现肌阵挛等 N 样症状；而在成人误服剂量为 150 ~ 200 mg 的严重过量病例中，出现躁动、意识模糊、定向障碍、肢体震颤、肌肉抽搐、横纹肌溶解症、高血压、心动过速等非典型症状。由于多奈哌齐的半衰期很长，且因人而异，因此建议过量服用多奈哌齐引起胆碱能不良反应的患者住院进行支持性治疗和阿托品治疗。

2.2 多奈哌齐过量的临床应对策略和抗胆碱药物的选择

目前尚无多奈哌齐过量用药的标准解救指南，既往文献显示，多奈哌齐急性过量的管理包括催吐洗胃、活性炭胃肠道去污、支持治疗及阿托品治疗^[8]。临床实践中根据患者服药剂量、时间、症状和体征等调整治疗策略。多奈哌齐口服吸收迅速，应尽早催吐洗胃，一般建议在误服后 30 min 内，但实际效果可能有限，如本例患者服药 15 min 后催吐仅见少量药渣；若症状严重或服药时间少于 8 h，推荐使用活性炭；若服药时间超过此限，则考虑支持治疗与观察^[8]。对于过量服用出现胆碱能中毒症状的患者，建议住院和使用 1 ~ 2 mg 阿托品治疗^[9]，3 d 后再考虑使用多奈哌齐（其消除半衰期约 70 h）^[10]。

阿托品属于非选择性 M 受体阻断药，同时作用于 M1、M2、M3 受体，对 N 受体无明显作用，因此对 M 样症状有较好作用，但对 N 样症状无效，对中枢神经系统中毒症状作用差；且对心脏 M2 受体作用较强，容易发生心动过速，增加心肌耗氧量；临床治疗剂量与中毒剂量接近，易发生过量中毒或用量不足；消除半衰期为 3.7 ~ 4.3 h，需多次使用以维持药效^[18]。本病例使用新型抗胆碱药戊乙奎醚治疗亦有效，戊乙奎醚可选择性结合 M、N 胆碱受体，因此对 M 样症状、N 样症状、中枢神经系统症状均有显著效果，抗胆碱作用强且全面^[19]；且对心脏 M2 受体无明显作用，不会导致心动过速、心肌耗氧量增加，安全性较高，可作为特殊人群（如心动过速、心绞痛、严重高血压、甲状腺功能亢进等患者）的药物选择；戊乙奎醚有效剂量小，持续作用时间长，消除半衰期约 10.35 h，是阿托品的 2.5 倍^[8]，一次给药可维持较长时间的有效血药浓度，减少给药频次（见表 2）。

表 1 多奈哌齐过量导致药物不良事件的病例文献回顾

作者	年龄	国别	性别	原患疾病	多奈哌齐 剂量	合并用药	主要表现	处理	转归
Shepherd 等 ^[8]	79 岁	美国	女	阿尔茨海默病； 高血压；间 歇性尿潴留	50 mg	25 mg 氢氯噻嗪； 100 mg 曲唑酮； 5 mg 丁螺环酮 tid；10 mg 帕 罗西汀	恶心呕吐；持续心动过缓； 皮肤苍白多汗；肺部有 啰音	1.25 h 后予 0.2 mg 阿托品，18 h 内 共给予 3.0 mg 阿 托品	2 d 后恢复，出院
Greene 等 ^[9]	74 岁	美国	女	脑血管意外； 心肌梗死；痴 呆病史；甲状 腺功能减退	45 mg	未提及	2 h 后短暂恶心呕吐，嗜睡； 9 h 后面部潮红、腹泻， 无胆碱能危象	家属监护，未做其 他治疗措施	3 d 后重新使用， 未再出现不良 反应
Yano 等 ^[10]	79 岁	日本	女	阿尔茨海默病	45 mg	未提及	心动过缓；窦性心律失常； 呕吐；呼吸功能不全；格 拉斯哥评分 14 分	支持性治疗；阿托 品	2 d 后胆碱能症状 减轻，5 d 后 恢复，出院
Garlich 等 ^[11]	14 个 月大	加拿大	男	健康	45 mg	未提及	3 h 后嗜睡、流涎、呕吐腹 泻、精神状态差、拒食、 行走困难、心动过缓；第 3 日精神状态恢复正常， 心动过缓持续到第 4 日	未使用活性炭和阿 托品治疗，儿科 重症监护室观察	5 d 恢复，出院
Thornton 等 ^[12]	2 岁	加拿大	女	健康	家属无法 估计吞 服多奈 哌齐及 美金刚 的量	未提及	焦虑不安并有视幻觉、嗜 睡、右眼偏斜和呼吸急 促，无强直阵挛活动， 神经系统无局灶性异常， 无阵挛或反射亢进；未出 现心动过缓、流涎、肌 束震颤或其他胆碱能亢 进症状	入院多奈哌齐血药 浓度 470 ng/mL， 美金刚 32 ng/ mL，经地西泮和 左乙拉西坦支持 治疗	3 d 后恢复，出院
Bougea 等 ^[13]	80 岁	希腊	女	阿尔茨海默病	30 mg	未提及	双侧上下肢肌阵挛抽搐	支持性治疗	3 d 后症状改善 出院，恢复 10 mg 常规剂量， 未再出现症状
Mottram 等 ^[14]	53 岁	美国	男	记忆丧失史	200 mg	多种维生素， 具体不明	30 min 后困倦、呕吐；后续 意识模糊、嗜睡、多汗、 心动过缓，轻度肺充血	支持性治疗；阿托 品 1 mg	3 d 后状态良好， 出院
Pourmand 等 ^[15]	84 岁	美国	男	阿尔茨海默病； 高血压；中 风；前列腺 增生病史	35 mg	未提及	6 h 后恶心呕吐、腹泻、意 识清醒但困倦、瞳孔缩 小、口腔分泌物增多、心 动过缓和 QTc 间期延长	静脉补液；阿托品 0.5 mg	2 d 后恢复正常， 出院
Mori 等 ^[16]	77 岁	日本	女	阿尔茨海默病； 蜂窝织炎；坐 骨神经病变； 颈椎病病史	150 mg	西洛他唑，具体 不明	9 h 后患者摔倒、体温下降、 血压升高、无心电图改 变，上肢震颤	静脉补液	3 d 后瞳孔大小 恢复，震颤消 失；8 d 后症 状完全恢复
Delirrad 等 ^[17]	49 岁	伊朗	男	精神病史；胃 旁路手术史	200 mg	80 mg 阿司匹林； 40 mg 缬沙坦； 40 mg 阿托伐他 汀；苯二氮草 类药物，具体 不明	2 h 后躁动、意识模糊、肢 体震颤、高血压、瞳孔 散大；后续出现非典型 症状，心动过速、定向 障碍、眼肌阵挛，抽搐， 横纹肌溶解症	支持性治疗；地西 泮 5 mg iv；雷尼 替丁 50 mg iv；昂 丹司琼 4 mg iv； 咪达唑仑 2.5 + 2.5 mg iv；阿托 品 1 mg	好转，7 d 后出院

表 2 阿托品和戊乙奎醚两种抗胆碱药物的对比

抗胆碱药物	血脑屏障	毒蕈碱型受体选择性	烟碱型受体选择性	特点
阿托品	透过	非选择性 M 受体阻断剂：对 M1、M2、M3 受体均有阻断作用，对心脏 M2 受体作用较强；引起心率加快，心肌耗氧量增加	对 N 受体无明显作用：对烟碱样症状无效；对乙酰胆碱蓄积中毒引起的中枢神经系统中毒症状如惊厥、躁动不安、中枢呼吸抑制等作用较差	阿托品临床治疗剂量与中毒剂量接近，易导致过量或用量不足；消除半衰期大约为 4 h，需高频使用维持药效
戊乙奎醚	透过	对 M 受体具有选择性：对 M1、M3 受体有较强选择性，对心脏 M2 受体没有明显作用；不引起心率加快和心肌耗氧增加	对 N 受体有作用：对烟碱样症状有效；对乙酰胆碱蓄积中毒引起中枢神经系统中毒症状作用好	戊乙奎醚比阿托品有效剂量小，抗胆碱作用强且全面，持续作用时间长

3 结论

医源性多奈哌齐过量可引发胆碱能作用，主要为毒蕈碱样症状，如流涎出汗、恶心呕吐、心动过缓等，部分出现困倦、嗜睡等中枢神经系统症状；严重过量时还可能出现烟碱样症状和非典型的表現，如瞳孔散大、激越、震颤、肌阵挛和多发性抽搐、横纹肌溶解症等。多奈哌齐过量的应对措施包括催吐、活性炭吸附、支持性治疗和阿托品等抗胆碱药物治疗。本文研究局限是未进行多奈哌齐血药浓度监测，既往研究建议将多奈哌齐血浆药物浓度保持在 15 ~ 50 ng/mL^[20]。本病例若能完善血药浓度监测环节，可为临床治疗提供更为精准和可靠的依据。鉴于国内对多奈哌齐过量误服事件的报道极少，本文所呈现的病例具有重要参考价值，可为广大医疗团队在处理类似药品不良事件时提供实践指导。

参考文献

- [1] 林贤桂, 贾敏, 钟洪兰. 1 例多奈哌齐致窦性心动过缓的药理学实践与分析[J]. 中南药学, 2024, 22 (10): 2816-2818.
- [2] 阿尔茨海默病的诊疗规范 (2020 年版) [J]. 全科医学临床与教育, 2021, 19 (1): 4-6.
- [3] 黑子清, 黄文起, 刘克玄, 等. 麻醉前应用抗胆碱能药物的广东省专家共识 (2021 版) [J]. 广东医学, 2021, 42 (11): 1290-1294.
- [4] 代国林, 王长春. 安理申 [J]. 中国新药杂志, 2000, 9 (4): 273-274.
- [5] 合理用药国际网络中国中心组临床安全用药组, 中国药理学学会药源性疾病专业委员会, 中国药学会医院药专业委员会, 等. 中国用药错误管理专家共识 [J]. 药物不良反应杂志, 2014, 16 (6): 321-326.
- [6] 刘朵, 高妍, 钱芳, 等. 某中医院 500 例用药错误隐患的发现与分析 [J]. 中南药学, 2018, 16 (5): 712-716.
- [7] 陈源源. 硝苯地平不同制剂临床应用的中国专家共识 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2022, 24 (11): 1143-1148.
- [8] Shepherd G, Klein-Schwartz W, Edwards R. Donepezil overdose: a tenfold dosing error [J]. Ann Pharmacother, 1999, 33 (7-8): 812-815.
- [9] Greene YM, Noviaskey J, Tariot PN. Donepezil overdose [J]. J Clin Psychiatry, 1999, 60 (1): 56-57.
- [10] Yano H, Fukuhara Y, Wada K, et al. A case of acute cholinergic adverse effects induced by donepezil overdose: a follow-up of clinical course and plasma concentration of donepezil [J]. Rinsho Shinkeigaku, 2003, 43 (8): 482-486.
- [11] Garlich FM, Balakrishnan K, Shah SK, et al. Prolonged altered mental status and bradycardia following pediatric donepezil ingestion [J]. Clin Toxicol (Phila), 2014, 52 (4): 291-294.
- [12] Thornton SL, Clark RF. Encephalopathy from unintentional donepezil and memantine ingestion [J]. Pediatr Emerg Care, 2014, 30 (9): 649-650.
- [13] Bougea A, Gerakoulis S, Anagnostou E, et al. Donepezil-induced myoclonus in a patient with Alzheimer disease [J]. Ann Pharmacother, 2014, 48 (12): 1659-1661.
- [14] Mottram AR, Haar ET. Donepezil overdose-trending levels and symptoms [J]. Case Rep Intern Med, 2014, 1 (2): 80-82.
- [15] Pourmand A, Shay C, Redha W, et al. Cholinergic symptoms and QTc prolongation following donepezil overdose [J]. Am J Emerg Med, 2017, 35 (9): 1386.e1-1386.e3.
- [16] Mori K, Hirose T, Matsumura T, et al. Follow-up of clinical symptoms and blood concentration in donepezil overdose [J]. Prim Care Companion CNS Disord, 2023, 25 (5): 23.
- [17] Delirrad M, Ahmadi H, Aghakhani N. Donepezil overdose and its atypical clinical presentations: a case report [J]. J Res Clin Med, 2024, 12 (2): 1-4.
- [18] 许小龙, 朱日进, 卓秀明, 等. 盐酸戊乙奎醚及阿托品在重度急性有机磷农药中毒中的疗效对比观察 [J]. 创伤与急诊电子杂志, 2022, 10 (2): 88-90, 96.
- [19] 赵光瑞, 段团周, 尤发江. 盐酸戊乙奎醚与阿托品对急性有机磷农药中毒谵妄症状及血清胆碱酯酶活性恢复时间的影响研究 [J]. 检验医学与临床, 2022, 19 (10): 1417-1419.
- [20] 李倩, 祝东林, 马文颖, 等. 多奈哌齐治疗 Alzheimer's 病有效血药浓度及影响因素 [J]. 临床神经病学杂志, 2021, 34 (1): 77-80.

(收稿日期: 2025-02-04; 修回日期: 2025-04-09)

基于 VigiBase 的阿杜那单抗不良事件的药物警戒研究

黄雨馨¹, 黎媛媛¹, 刘丽梅², 喻录容¹, 向秋蒙², 贾清艳^{2*} (1.重庆医科大学中医药学院, 重庆 401331; 2.重庆佑佑宝贝妇儿医院, 重庆 401120)

摘要: **目的** 挖掘真实世界数据中阿尔茨海默病患者使用阿杜那单抗相关不良事件的信号, 为该药的临床安全应用提供参考。**方法** 通过 VigiAccess 平台提取 VigiBase 数据库截至 2024 年 12 月 8 日的所有与阿杜那单抗相关的不良事件报告, 采用报告比值比 (ROR)、比例报告比 (PRR)、贝叶斯可信区间递进神经网络法 (BCPNN) 以及多项式伽马泊松分布缩减法 (MGPS) 4 种不相称性分析方法进行信号挖掘, 根据《监管活动医学词典》(MedDRA) 中的系统器官分类 (SOC) 和首选术语 (PT) 对药品不良事件 (ADE) 进行系统分类。**结果** 经筛选后共纳入 467 份不良事件报告、966 例次不良事件, 涉及 17 种 SOC, 确定了“痫性发作”“失语”“房颤”“尿路感染”等 6 个药品说明书中未收录的新的不良反应信号。**结论** 通过 VigiAccess 平台挖掘阿杜那单抗的不良反应信号, 从安全性方面回应了与该药相关的争议。阿杜那单抗的不良事件主要集中在各类神经系统疾病, 建议临床医师在用药过程中加强对患者的监测, 让患者家属对其给予更多的关注, 以避免某些不良事件的发生。

关键词: 阿杜那单抗; 阿尔茨海默病; VigiBase; VigiAccess

中图分类号: R969.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)12-3754-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.045

Pharmacovigilance study of adverse events of aducanumab based on VigiBase

HUANG Yuxin¹, LI Yuanyuan¹, LIU Limei², YU Lurong¹, XIANG Qiumeng², JIA Qingyan^{2*} (1. College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 401331; 2. Chongqing Youyou Baobei Women and Children's Hospital, Chongqing 401120)

Abstract: Objective To analyze signals of adverse events (ADE) in real-world data associated with the use of aducanumab in patients with Alzheimer's disease and provide a reference for the safe clinical drug use. **Methods** All ADE reports related to aducanumab in the VigiBase database up to December 8, 2024, were collected through the VigiAccess platform. Four disproportionality analysis methods, including the reporting odds ratio (ROR), proportional reporting ratio (PRR), Bayesian confidence propagation neural network (BCPNN), and Multinomial Gamma-Poisson Shrinker (MGPS), were used for the signal data mining. ADEs were systematically classified according to the system organ classes (SOC) and preferred terms (PT) in the *Medical Dictionary of Regulatory Activities* (MedDRA). **Results** Totally 467 ADE reports and 966 ADEs involving 17 systems. Notably, 6 new adverse reaction signals not previously listed in the drug labeling were included, including seizures, aphasia, atrial fibrillation, and urinary tract infection. **Conclusion** Mining adverse reaction signals of aducanumab through the VigiAccess platform addresses safety concerns associated with the drug. ADEs of aducanumab primarily involve various neurological disorders, emphasizing the need for clinicians to closely monitor patients during the treatment. Family members should also remain vigilant to prevent certain ADEs.

Key words: aducanumab; Alzheimer's disease; VigiBase; VigiAccess

基金项目: 重庆市科卫联合医学科研项目 (No.2022MSXM084)。

作者简介: 黄雨馨, 女, 主要从事药物警戒研究, email: 2569356296@qq.com * **通信作者:** 贾清艳, 女, 硕士, 主管药师, 主要从事药事管理与药物警戒研究, email: 296919887@qq.com

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种常见的神经退行性疾病, 发病隐匿, 主要发生在 65 岁以上的人群中^[1-2]。其临床表现主要涉及认知、记忆、语言及运动等多方面功能障碍。随着全球人口老龄化程度的加剧, AD 已成为无数家庭的沉重负担, 对国家公共卫生体系造成了巨大压力^[3]。AD 的发病机制极其复杂, 淀粉样蛋白假说是最常见的假说, 其病理特征主要表现为大脑中两种蛋白质的病变, 即以 β -淀粉样蛋白 ($A\beta$) 为主要的成分沉积于细胞外的神经炎症斑和由过度磷酸化 tau 蛋白在细胞内的过度积累。有研究表明, $A\beta$ 斑块是 AD 的关键早期诱因^[4-5], 因此, 针对 $A\beta$ 斑块的免疫疗法成为治疗 AD 的一种热门研究方向。

阿杜那单抗是一种针对聚集的可溶性和不溶性 β -淀粉样蛋白的人单克隆抗体^[6], 可与 $A\beta$ 肽的氨基酸 3-7 结合, 减少 AD 患者大脑中的 $A\beta$ 斑块, 达到治疗效果^[7-8]。2021 年 6 月, 美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 首次批准阿杜那单抗用于治疗 AD。然而, FDA 的这项决定却引起了诸多争议^[9]。首先, 关于阿杜那单抗的两项 III 期临床试验被提前终止, 其药品不良事件 (ADE) 可能会导致安全性数据缺失^[10]。其次, 淀粉样蛋白假说尚未被证实, 根据假说开发的药物能否给 AD 患者带来明显的临床益处也尚未确定^[11]。目前, 阿杜那单抗虽然在中国尚未获批上市, 但是部分医院经国家药品监督管理局批准, 已经将其投入临床使用。现有数据及事后分析未能充分支持阿杜那单抗的临床疗效与安全性, 这凸显了对其进行全面安全性研究的必要性。

VigiBase 数据库是世界卫生组织 (WHO) 乌普萨拉监测中心 (UMC) 建立和维护的全球最大药物警戒数据库, 汇集了自 1978 年成立以来世界各地的安全数据, 其内容包括患者特征、ADE、适应证、报告年份、地区等信息。自 2015 年以来, 公众可以通过 VigiAccess 平台免费访问存储在 VigiBase 中的公开数据^[12-13]。由于数据保护协议, 普通公众无法查看个人案例报告等详细数据。本研究通过对 VigiBase 数据库中 AD 患者使用阿杜那单抗的 ADE 信号进行挖掘与分析, 发现其潜在风险信号, 以期为阿杜那单抗的安全性评价和临床合理应用提供参考。

1 资料与方法

1.1 数据来源与可用性声明

本研究的数据来源于 VigiBase 数据库, 检索时间段为建库至 2024 年 12 月 8 日。访问公开免费

的 VigiAccess 平台 (<https://vigiaccess.org/>), 使用 Python3.10 调用 requests 包, 检索 WHO DRUG 词典中所有药物的 BASENAME, 将 JSON 数据通过 Pandas 包可视化, 并导出 Excel 完成所有药物公开数据的下载。采用 SAS 9.4 软件进行统计分析, 包括信号检测方法的计算及数据可视化。所有不良事件在提交到 VigiBase 时都会被匿名化处理, 以保护患者隐私, 因此不需要获得伦理委员会的批准。

1.2 研究设计

使用该药物的通用名进行检索, 根据 27.1 版的《监管活动医学词典》(MedDRA) 中的系统器官分类 (SOC) 和首选术语 (PT) 对 ADE 进行系统分类。提取的数据包括患者的性别和年龄、报告提交日期、地理分布以及受 ADE 影响的器官系统。

1.3 信号监测方法

不相称性分析是一种数据挖掘算法, 在减小各种偏差方面具有极高的灵敏度, 被广泛用于 ADE 的全球监测。为得到更准确的结果, 本研究采用了两种非贝叶斯方法 [报告比值比 (ROR) 和比例报告比 (PRR)] 和两种贝叶斯方法 [贝叶斯可信区间递进神经网络法 (BCPNN) 和多项式伽马泊松分布缩减法 (MGPS)]^[14-15], 确定 4 种算法指标、计算公式及阈值^[16-17], 同时满足 4 种方法则提示生成一个 ADE 阳性信号。

2 结果

2.1 数据基本情况

纳入分析的药品 24 131 种, 涉及 46 535 254 例患者的 117 935 336 例次 ADE 报告, 通过筛选目标药物阿杜那单抗相关的 ADE 报告, 共确定了 467 份 ADE 报告和 966 例次 ADEs。

纳入研究报告的人口学基本资料如表 1 所示, 发生 ADEs 的患者中女性 232 例 (49.68%)、男性 207 例 (44.33%)、性别不详 28 例 (6.00%)。在已知年龄的患者中, 65 岁以上的有 247 例。就报告地区而言, 美洲占报告的绝大多数, 其次是欧洲和大洋洲, 非洲和亚洲报告的 ADEs 最少。就报告年份而言, 阿杜那单抗的相关报告主要集中于 2022—2024 年, 2022 年报告数量最多, 其次是 2023 年和 2024 年, 2018 年报告数量最少。

报告的 ADEs 在 SOC 中的分布情况如图 1 所示, 主要涉及 17 种 SOC。排名前 5 的 SOC 分别为各类神经系统疾病 526 例 (54.45%)、精神病类 84 例 (8.70%)、各类损伤中毒及操作并发症 79 例 (8.18%)、全身性疾病及给药部位各种反应 73 例 (7.56%)、胃肠系统疾病 39 例 (4.04%)。图 2 展示了报告中所涉及的 PT 的具体占比及相对应的 SOC, 仅展示 ADEs 数量排名前 30 的 PT。其中, 排名前

表 1 人口学基本资料

Tab 1 Basic demographic information

指标		n (%)
性别	女性	232 (49.68)
	男性	207 (44.33)
	未知	28 (6.00)
年龄 / 岁	45 ~ 64	31 (6.64)
	65 ~ 74	105 (22.48)
	≥ 75	142 (30.41)
	未知	189 (40.47)
	未知	189 (40.47)
地区	非洲	1 (0.21)
	美洲	449 (96.15)
	亚洲	1 (0.21)
	欧洲	12 (2.57)
	大洋洲	4 (0.86)
报告年份 / 年	2016	18 (3.58)
	2018	1 (0.21)
	2021	10 (2.14)
	2022	206 (44.11)
	2023	160 (34.26)
	2024	72 (15.42)

5 的 PT 分别为淀粉样蛋白相关性影像异常水肿 / 渗出型 (ARIA-E) 116 例 (12.01%)、淀粉样蛋白相关性影像异常微出血和血铁质沉积型 (ARIA-H) 80 例 (8.28%)、头痛 43 例 (4.45%)、意识模糊状态 35 例 (3.62%)、大脑出血 25 例 (2.59%)。

2.2 信号挖掘与标准化 MedDRA 分析结果

表 2 描述了在 SOC 中阿杜那单抗相关 ADE 信号的数量和信号强度。其中, 满足 4 个标准的重要 SOC 是“各类神经系统疾病”, 有 526 例。图 3 展示了 PT 水平下同时满足 4 个标准的阳性信号频数排名前 30 的 ADE 信号。其中, ARIA-E (116 例)、ARIA-H (80 例)、意识模糊状态 (35 例)、大脑出血 (25 例)、跌倒 (23 例) 是报告最多的前 5 个 PT, 按信号强度排 (以 ROR 数值为准), 排名前 5 的 PT 是 ARIA-E、ARIA-H、中枢神经系统表面铁沉积症、淀粉样蛋白相关性影像异常、大脑微出血, 都属于同一个 SOC。综

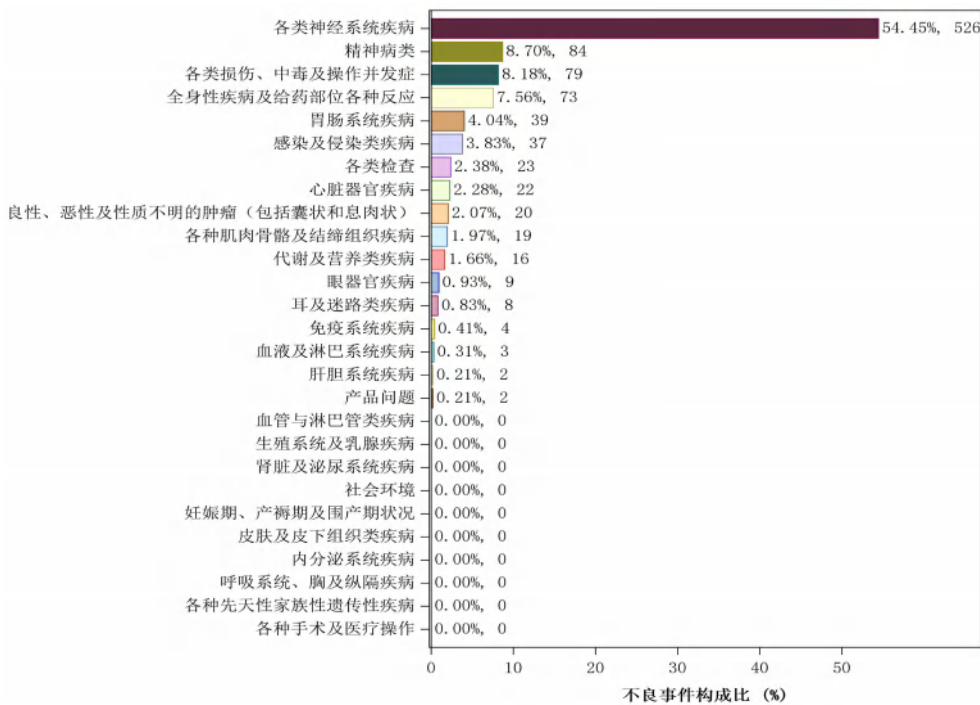


图 1 相关 ADEs 在 SOC 中的分布情况

Fig 1 Distribution of ADEs in SOC

合来看, 满足 4 种标准的 ADE 阳性信号集中在 8 个不同的 SOC 中, 按阳性 PT 例次排序, 占比最高的是各类神经系统疾病, 阳性信号数为 21 (61.76%)、阳性 PT 例次为 387 (75.29%); 其次是精神病类, 阳性信号数为 3 (8.82%)、阳性 PT 例次为 44 (8.56%), 见表 3。

3 讨论

3.1 ADEs 报告的基本情况

就年龄分布情况而言, 提取的 ADE 报告患

者年龄分布 (65 岁以上为主) 与 AD 流行病学特征一致^[18]。报告中女性患者占比略高于男性 (49.68% vs 44.33%), 与既往研究提示女性 AD 患病率较高的趋势一致^[10, 19]。造成此种性别差异的原因可能与绝经后女性的平均寿命较长、Tau 蛋白沉积水平较高有关^[20]。ADEs 报告集中于 2022—2024 年, 2022 年达峰值 (206 例), 此后逐年下降, 这可能与临床用药规范性的提升及 2023 年同类药物乐卡奈单抗上市后患者分流有关。

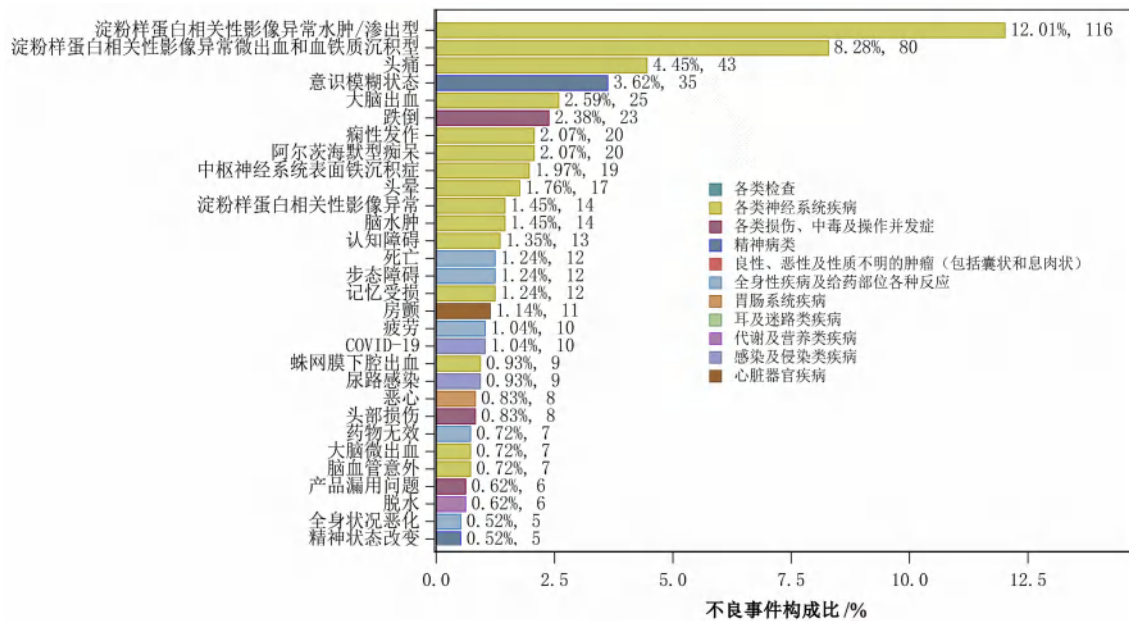


图2 ADEs数量排名前30PT占比图

Fig 2 Proportion of the top 30 PT of ADEs in frequency ranking

表2 在SOC水平报告阿杜那单抗相关ADE信号的数量和信号强度
 Tab 2 Report the quantity and signal strength of aducanumab-related ADE signals at the SOC level

SOC	例数 [n (%)]	ROR (95%CI)	PRR (Chi-Square)	IC (95%CI)	EBGM (95%CI)
各类神经系统疾病	526 (54.45)	10.3 (9.11 ~ 11.73)	5.25 (2020.63)	2.39 (2.22 ~ 2.54)	5.25 (4.63 ~ 5.96)
精神类	84 (8.70)	1.90 (1.52 ~ 2.38)	1.82 (32.75)	0.87 (0.52 ~ 1.18)	1.82 (1.46 ~ 2.28)
各类损伤、中毒及操作并发症	79 (8.18)	1.33 (1.06 ~ 1.67)	1.30 (5.89)	0.38 (0.04 ~ 0.71)	1.30 (1.03 ~ 1.64)
全身性疾病及给药部位各种反应	73 (7.56)	0.31 (0.24 ~ 0.39)	0.36 (105.82)	-1.48 (-1.81 ~ -1.12)	0.36 (0.28 ~ 0.46)
胃肠道系统疾病	39 (4.04)	0.38 (0.27 ~ 0.52)	0.40 (38.84)	-1.32 (-1.76 ~ -0.83)	0.40 (0.29 ~ 0.55)
感染及侵袭类疾病	37 (3.83)	1.00 (0.72 ~ 1.39)	1.00 (0.00)	0.00 (-0.48 ~ 0.48)	1.00 (0.72 ~ 1.39)
各类检查	23 (2.38)	0.36 (0.24 ~ 0.54)	0.25 (26.15)	-1.43 (-1.99 ~ -0.80)	0.37 (0.25 ~ 0.56)
心脏器官疾病	22 (2.28)	0.88 (0.58 ~ 1.35)	0.59 (0.34)	-0.18 (-0.78 ~ 0.44)	0.88 (0.58 ~ 1.35)
良性、恶性及性质不明的肿瘤 (包括囊状和息肉状)	20 (2.07)	1.49 (0.95 ~ 2.32)	0.96 (3.12)	0.56 (-0.11 ~ 1.17)	1.48 (0.95 ~ 2.30)
各种肌肉骨骼及结缔组织疾病	19 (1.97)	0.36 (0.23 ~ 0.56)	0.37 (21.57)	-1.44 (-2.04 ~ -0.74)	0.37 (0.23 ~ 0.58)
代谢及营养类疾病	16 (1.66)	0.92 (0.56 ~ 1.52)	0.93 (0.10)	-0.11 (-0.81 ~ 0.60)	0.93 (0.56 ~ 1.52)
眼器官疾病	9 (0.93)	0.51 (0.26 ~ 0.98)	0.51 (4.22)	-0.96 (-1.81 ~ 0.03)	0.51 (0.27 ~ 1.00)
耳及迷路类疾病	8 (0.83)	1.42 (0.71 ~ 2.84)	1.41 (0.97)	0.50 (-0.53 ~ 1.40)	1.41 (0.70 ~ 2.83)
免疫系统疾病	4 (0.41)	0.34 (0.13 ~ 0.92)	0.35 (4.96)	-1.53 (-2.62 ~ -0.03)	0.35 (0.13 ~ 0.93)
血液及淋巴系统疾病	3 (0.31)	0.12 (0.04 ~ 0.38)	0.13 (18.83)	-3.00 (-4.09 ~ -1.20)	0.13 (0.04 ~ 0.39)
产品问题	2 (0.21)	0.24 (0.06 ~ 0.96)	0.24 (4.80)	-2.05 (-3.30 ~ 0.04)	0.24 (0.06 ~ 0.97)
肝胆系统疾病	2 (0.21)	0.26 (0.06 ~ 1.04)	0.26 (4.20)	-1.93 (-3.20 ~ 0.14)	0.26 (0.07 ~ 1.05)

3.2 ADE信号挖掘分析

本研究显示“各类神经系统疾病”是发生频数最高的SOC，占比54.45%，ARIA-E是最常见的ADEs，其次是头痛、意识模糊、大脑出血、跌倒等。根据两项阿杜那单抗的Ⅲ期临床研究^[10]，服用高剂量阿杜那单抗的患者中约有40%发生淀粉样蛋白相关性影像异常(ARIA)(ARIA-E或ARIA-H)，而安慰剂组为10%，常见相关症状包括头痛、意识模糊、头晕和恶心；ARIA-E是最常见的ADEs，这与本研究结果基本一致。

载脂蛋白Eε4(APOEε4)基因型是AD和

ARIA的重要危险因素，与非携带者相比，接受抗Aβ抗体治疗的APOEε4携带者发生ARIA的风险更高^[21]。APOEε4等位基因频率在世界各地差异很大。例如，中国的APOEε4等位基因频率为8.5%^[22]，而欧洲为4%~27%，并表现出显著的北高南低梯度^[23]。另外，美洲人群的APOEε4等位基因频率因种族不同具有差异性，如委内瑞拉土著人群的APOEε4等位基因频率为29%，显著高于该国都市人群(16%)^[24]。尽管基因与环境的交互作用可能导致跨人群疾病机制差异^[25]，在中国APOEε4基因型依然是AD与ARIA不可忽

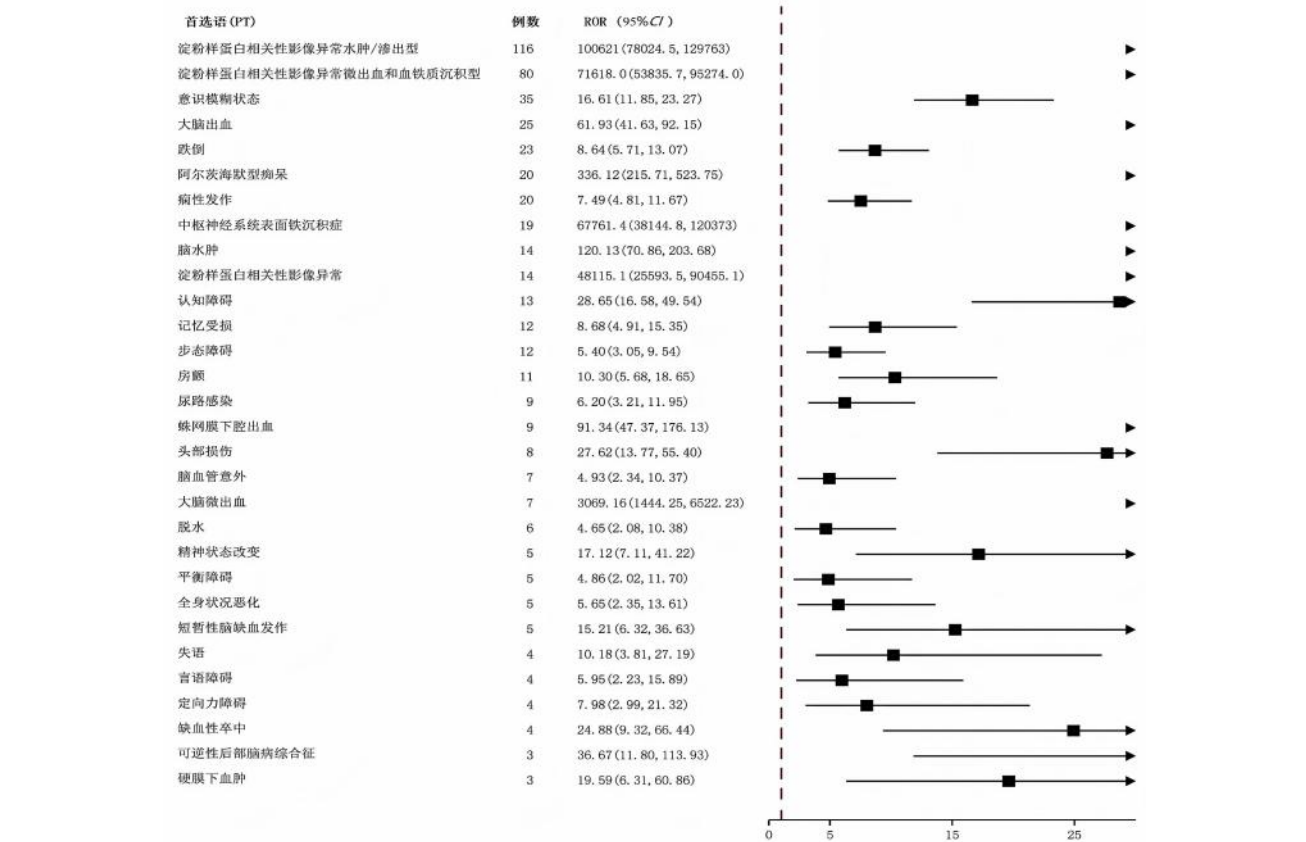


图 3 PT 水平满足 4 种方法的阳性信号频数排名前 30 的森林图

Fig 3 Forest plot of the top 30 positive signal meeting 4 methods by frequency rankings at PT level

表 3 阿杜那单抗使用 4 种方法检测的 ADE 阳性信号在不同 SOC 中的分布情况 [n(%)]

Tab 3 Distribution of positive signals detected by 4 methods of aducanumab in different SOC [n(%)]		
SOC	阳性信号数	阳性 PT 例次
各类神经系统疾病	21 (61.76)	387 (75.29)
精神病类	3 (8.82)	44 (8.56)
各类损伤、中毒及操作并发症	3 (8.82)	34 (6.61)
全身性疾病及给药部位各种反应	2 (5.88)	17 (3.31)
心脏器官疾病	1 (2.94)	11 (2.14)
感染及侵袭类疾病	1 (2.94)	9 (1.75)
良性、恶性及性质不明的肿瘤 (包括囊状和息肉状)	2 (5.88)	6 (1.17)
代谢及营养类疾病	1 (2.94)	6 (1.17)
总计	34 (100.00)	514 (100.00)

视的重要危险因素^[26]。应考虑在给药前对患者进行 APOE ϵ 4 基因筛查。另外，识别 ARIA 的常见症状有助于临床医师实施适当的检测、分类、监测和管理策略^[27]，患者给药应遵循抗 A β 抗体适当使用建议 (AUR)。

除了药物说明书中指出的相关 ADE 信号外，本研究还发现了临床试验中未观察到或未明确指示的新信号，例如大脑出血、蛛网膜下腔出血、可逆性后部脑病综合征 (PRES)、缺血性卒中、

失语、痫性发作 (见图 3)。其中某些信号虽与药品说明书中的 ADE 无法一一对应，但实际上与阿杜那单抗的药理作用相一致，例如大脑出血和蛛网膜下腔出血。尽管 ARIA 的发病机制仍不完全清楚，但研究表明 A β 的清除会导致血管壁损伤，从而增加脑血管通透性和出血风险^[28-29]。在提取的报告中，有 3 例发生了 PRES。PRES 常出现在高血压患者中，在某些情况下会出现癫痫发作、脑病、头痛和视力障碍及血管源性脑水肿等症状^[30]，没有足够数据支持阿杜那单抗与 PRES 的内在关联性，但阿杜那单抗给药出现的 ARIA-E 可能会加重 PRES 患者的临床症状。因此临床医师在进行阿杜那单抗给药前应充分考虑药物对 PRES 患者的影响，需评估是否优先治疗 PRES，并在给药期间进行脑部磁共振成像 (MRI) 监测，时刻关注疾病的发展。PT “痫性发作” 有 20 例，该 ADE 信号在说明书中没有列出，但在两项阿杜那单抗的临床 III 期研究中，某些报告的脑电图显示出癫痫样活动^[6]，这提示阿杜那单抗与癫痫发作之间可能存在某些关联。研究还证明，癫痫样活动可诱导网络功能障碍、认知障碍和 AD 的疾病进展^[31]。事实上，在 AD 患者中，伴有癫痫患者的认知能力下降比不伴癫痫

的患者早 5~7 年开始^[31]。因此,临床医师应在阿杜那单抗给药前进行癫痫发作的筛查,并且在该药物给药期间监测癫痫样活动,对有癫痫史的患者不予阿杜那单抗给药。目前,没有证据证明抗 $A\beta$ 药物可导致失语症。然而,AD 患者的大脑显示神经元死亡显著增加,这通常会导致认知能力的丧失,语言功能受损^[32]。关于阿杜那单抗与失语症的因果关联需要进一步研究。

除了 SOC“神经系统疾病”外,图 3 还展示了其他 SOC 层级下的新信号:头部损伤、硬膜下血肿、房颤、尿路感染、脱水。对于老年人来说,跌倒是头部损伤和硬膜下血肿的主要原因。通常认为,AD 会影响平衡、步态和视觉能力,这可能会增加跌倒的风险^[33]。因此,在治疗 AD 患者期间,预防跌倒和随之而来的伤害至关重要,这需要临床医师和患者家属给予 AD 患者更多关注。据推测,在 AD 患者的心脏和大脑中,都可能存在淀粉样蛋白沉积物,使用阿杜那单抗这类抗 $A\beta$ 药物会对这些器官造成损害^[34],这可能是引起房颤的潜在原因之一。但这一推测还未得到证实,对于抗 $A\beta$ 药物与房颤之间的相关性需进行更深层次的研究。另外,在阿杜那单抗给药期间如果出现需要抗凝治疗的疾病(如心房颤动、深静脉血栓形成、肺栓塞),则必须停止阿杜那单抗给药。临床试验表明,抗淀粉样蛋白治疗与抗凝剂、抗血小板或抗血栓形成剂同时进行与 ARIA 风险增加有关^[27]。“尿路感染”虽未在药品说明书中明确指出,但在阿杜那单抗的某项 I 期临床研究中有被检测到,发生率为 16%^[35]。研究指出 AD 会导致夜尿、尿失禁和尿急以及膀胱排空不良,这些症状可能与疾病的核心症状相互作用,增加尿失禁和感染的风险^[36]。总之,目前尚不清楚阿杜那单抗对房颤、尿路感染及脱水的影响,并且这些 ADE 尚未在临床研究和药物说明中得到探讨,因此需要进一步研究。

3.3 优势与局限性

FDA 规定,在 2030 年之前,必须解决对阿杜那单抗的紧迫担忧,包括整体疗效、不良反应、对真实世界患者的普遍性,以及淀粉样蛋白减少是否为 AD 临床改善的合适替代指标^[37]。本研究纳入了 VigiBase 数据库截至 2024 年 12 月 8 日阿杜那单抗相关的公开数据,对给药产生的 ADEs 进行信号挖掘,发现潜在的 ADE 信号,较常规前瞻性临床研究评价药物安全性具有显著优势。

本研究也存在一定的局限性:①由于 VigiBase 数据库是自发呈报系统,因此病历的数据完整性无法得到保证,易造成结果偏倚;②由于阿杜那

单抗的相关争议,许多国家尚未批准该药上市,ADEs 报告主要源于美洲,以此为基础的研究结果可能不适用于所有地区;③由于收集原始数据受限,本研究未对不同剂量下阿杜那单抗导致的 ADEs 的差异进行深入探讨。今后仍需进一步的临床试验佐证本研究发现的 ADE 风险信号。

3.4 小结

本研究提取 VigiBase 数据库的相关数据,挖掘与分析的 ADE 信号基本与阿杜那单抗说明书记载的不良反应相符。尽管出现了说明书中未提到的 6 个新信号,但多数与阿杜那单抗的药理作用相关且信号较弱,筛选出的 ADE 阳性信号如 PRES、痫性发作、失语、房颤、尿路感染及脱水的机制尚不明确,今后仍需进一步研究探讨。此外,为减少 ADE 的发生,临床医师需依据 AUR 对患者进行合理给药,并在给药期间进行脑部 MRI 监测,一旦出现严重症状及时停药。另一方面,患者家属也应承担起相应的责任,保障患者用药安全。阿杜那单抗的批准是基于减少大脑中淀粉样蛋白可预测临床益处的假设,尽管临床益处的证据尚不明确,且存在争议,但阿杜那单抗是一种对个人和社会产生重大影响的新药,它的批准为 AD 的管理带来了挑战和机遇。

参考文献

- [1] Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, et al. Alzheimer's disease [J]. *Lancet*, 2021, 397 (10284): 1577-1590.
- [2] 王菲,刘芬,张觅,等.维生素 D 及其受体在阿尔茨海默病中的作用 [J]. *中南药学*, 2013, 11 (3): 203-207.
- [3] 邹明月,闫景东,周妍妍.中医药调控 P38MAPK 信号通路防治阿尔茨海默症的研究进展 [J/OL]. *辽宁中医杂志*, 2025. <https://link.cnki.net/urlid/21.1128.R.20250214.1238.048>.
- [4] 南淞华,彭超杰,李振家,等.中医药靶向调控线粒体质量控制防治阿尔兹海默病的研究进展 [J]. *中药新药与临床药理*, 2024, 35 (12): 1944-1951.
- [5] Jucker M, Walker LC. Alzheimer's disease: from immunotherapy to immunoprevention [J]. *Cell*, 2023, 186 (20): 4260-4270.
- [6] Haeblerlein SB, Aisen PS, Barkhof F, et al. Two randomized phase 3 studies of aducanumab in early Alzheimer's disease [J]. *J Prev Alzheimers Dis*, 2022, 9 (2): 197-210.
- [7] Sevigny J, Chiao P, Bussière T, et al. The antibody aducanumab reduces $A\beta$ plaques in Alzheimer's disease [J]. *Nature*, 2016, 537 (7618): 50-56.
- [8] Söderberg L, Johannesson M, Nygren P, et al. Lecanemab, aducanumab, and gantenerumab—binding profiles to different forms of amyloid-beta might explain efficacy and side effects in clinical trials for Alzheimer's disease [J]. *Neurotherapeutics*, 2023, 20 (1): 195-206.
- [9] Tanne JH. Aduhelm: approval of Alzheimer's drug was highly unorthodox, finds report [J]. *BMJ*, 2023, 380: 6.

- [10] Salloway S, Chalkias S, Barkhof F, et al. Amyloid-related imaging abnormalities in 2 phase 3 studies evaluating aducanumab in patients with early Alzheimer disease [J]. *JAMA Neurol*, 2022, 79 (1): 13-21.
- [11] Karlawish J, Grill JD. The approval of aduhelm risks eroding public trust in Alzheimer research and the FDA [J]. *Nat Rev Neurol*, 2021, 17 (9): 523-524.
- [12] 邱雨婕, 张青霞. 基于 VigiBase 数据库对左炔诺孕酮宫内节育系统相关颅内血栓不良事件分析 [J]. *药物流行病学杂志*, 2023, 32 (2): 121-127.
- [13] Li MM, You RX, Su YY, et al. Characteristic analysis of adverse reactions of five anti-TNF α agents: a descriptive analysis from WHO-VigiAccess [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1169327.
- [14] Zou F, Cui ZW, Lou SY, et al. Adverse drug events associated with linezolid administration: a real-world pharmacovigilance study from 2004 to 2023 using the FAERS database [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1338902.
- [15] Chen Y, Guo JJ, Steinbuch M, et al. Comparison of sensitivity and timing of early signal detection of four frequently used signal detection methods: an empirical study based on the US FDA adverse event reporting system database [J]. *Pharmaceut Med*, 2008, 22 (6): 359-365.
- [16] 郭晓龙, 见海超, 张志琪, 等. 基于 FAERS 的头孢他啶/阿维巴坦致神经系统异常的不良反应信号挖掘与分析 [J]. *中国医院药学杂志*, 2022, 42 (19): 2046-2050.
- [17] 赵喆, 王涛, 唐彦, 等. 质子泵抑制剂导致的急性泛发性发疹性脓疱病: 基于真实世界的药物警戒研究 [J]. *协和医学杂志*, 2021, 12 (6): 965-971.
- [18] 2024 Alzheimer's disease facts and figures [J]. *Alzheimers Dement*, 2024, 20 (5): 3708-3821.
- [19] Buckley RF, Mormino EC, Rabin JS, et al. Sex differences in the association of global amyloid and regional tau deposition measured by positron emission tomography in clinically normal older adults [J]. *JAMA Neurol*, 2019, 76 (5): 542-551.
- [20] Wu SS, Qi YM, Jiang C, et al. Mining and analysis of adverse events associated with aducanumab: a real-world study using FDA adverse event reporting system database [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2025, 24 (4): 469-478.
- [21] Doran SJ, Sawyer RP. Risk factors in developing amyloid related imaging abnormalities (ARIA) and clinical implications [J]. *Front Neurosci*, 2024, 18: 1326784.
- [22] Hu P, Qin YH, Jing CX, et al. Does the geographical gradient of ApoE4 allele exist in China? A systemic comparison among multiple Chinese populations [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38 (1): 489-494.
- [23] Singh PP, Singh M, Mastana SS. Distribution in world populations with new data from India and the UK [J]. *Ann Hum Biol*, 2006, 33 (3): 279-308.
- [24] Martínez S, Ochoa B, Pérez MR, et al. Apolipoprotein E polymorphisms in adults over 60 years of age with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease in different Venezuelan populations [J]. *Biomedica*, 2022, 42 (S1): 116-129.
- [25] Chen Q, Wang T, Kang DY, et al. Protective effect of apolipoprotein E epsilon 3 on sporadic Alzheimer's disease in the Chinese population: a meta-analysis [J]. *Sci Rep*, 2022, 12 (1): 13620.
- [26] Liu MY, Bian C, Zhang JQ, et al. Apolipoprotein E gene polymorphism and Alzheimer's disease in Chinese population: a meta-analysis [J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 4383.
- [27] Hampel H, Elhage A, Cho M, et al. Amyloid-related imaging abnormalities (ARIA): radiological, biological and clinical characteristics [J]. *Brain*, 2023, 146 (11): 4414-4424.
- [28] Vaz M, Silva V, Monteiro C, et al. Role of aducanumab in the treatment of Alzheimer's disease: challenges and opportunities [J]. *Clin Interv Aging*, 2022, 17: 797-810.
- [29] Greenberg SM, Bacskai BJ, Hernandez-Guillamon M, et al. Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease-one peptide, two pathways [J]. *Nat Rev Neurol*, 2020, 16 (1): 30-42.
- [30] Fugate JE, Rabinstein AA. Posterior reversible encephalopathy syndrome: clinical and radiological manifestations, pathophysiology, and outstanding questions [J]. *Lancet Neurol*, 2015, 14 (9): 914-925.
- [31] Vossel KA, Tartaglia MC, Nygaard HB, et al. Epileptic activity in Alzheimer's disease: causes and clinical relevance [J]. *Lancet Neurol*, 2017, 16 (4): 311-322.
- [32] Decourt B, Noorda K, Noorda K, et al. Review of advanced drug trials focusing on the reduction of brain beta-amyloid to prevent and treat dementia [J]. *J Exp Pharmacol*, 2022, 14: 331-352.
- [33] Ilmanemi S, Taipale H, Tanskanen A, et al. Incidence of head injury and traumatic brain injury among people with Alzheimer's disease [J]. *J Epidemiol Community Health*, 2019, 73 (5): 451-454.
- [34] Benenati S, Canale C, De Marzo V, et al. Atrial fibrillation and Alzheimer's disease: a conundrum [J]. *Eur J Clin Invest*, 2021, 51 (7): e13451.
- [35] Yuksel JM, Noviasky J, Britton S. Aducanumab for Alzheimer's disease: summarized data from EMERGE, ENGAGE, and PRIME studies [J]. *Sr Care Pharm*, 2022, 37 (8): 329-334.
- [36] Tang MZ, Chen Z, Wu D, et al. Ferritinophagy/ferroptosis: iron-related newcomers in human diseases [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233 (12): 9179-9190.
- [37] Winge K. Lower urinary tract dysfunction in patients with parkinsonism and other neurodegenerative disorders [J]. *Handb Clin Neurol*, 2015, 130: 335-356.
- [38] Glymour MM, Weuve J, Dufouil C, et al. Aduhelm, the newly approved medication for Alzheimer disease: what epidemiologists can learn and what epidemiology can offer [J]. *Am J Epidemiol*, 2022, 191 (8): 1347-1351.

(收稿日期: 2025-03-10; 修回日期: 2025-05-28)

磷酸奥司他韦致血管神经性水肿 1 例并文献复习

贾东丽, 杨昊煜, 韩利平, 王秀粉 (邯郸市第一医院药学部, 河北 邯郸 056002)

关键词: 奥司他韦; 血管神经性水肿; 荨麻疹; 不良反应

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2025)12-3761-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.046

奥司他韦是一种强效的选择性神经氨酸酶抑制剂,可竞争性地与流感病毒神经氨酸酶的活动位点结合,有效抑制病毒颗粒从被感染的宿主细胞中释放而抑制流感病毒的传播,可缩短流感病程并减轻其严重程度,是临床用于抗流感病毒的一线药物^[1-3]。随着奥司他韦的广泛应用,其安全性也越来越受到关注。奥司他韦的不良反应主要为消化系统反应、神经系统反应、皮肤损害等^[4-8],关于奥司他韦所致血管神经性水肿的不良反应较为少见^[9-11],其具体发病机制及发生特点尚不完全明确。本文对 1 例应用奥司他韦后出现血管神经性水肿的病例进行介绍,对其相关性进行分析,并检索国内外相关数据库,对奥司他韦所致血管神经性水肿的文献资料进行复习,以期临床提供参考。

1 病历资料

患者,女,37岁,身高 158 cm,体重 59 kg。2025 年 4 月 16 日患者无明显诱因出现咽部肿胀、疼痛不适,伴发热,体温最高 38.6℃,无明显咳嗽咳痰,自行服用布洛芬退热治疗后体温可降至正常。4 月 17 日患者仍有发热,体温最高 39.2℃,自行开始服用磷酸奥司他韦胶囊(广东东阳光药业股份有限公司,批号:2402041)75 mg bid 抗流感病毒治疗(4 月 17 日服药 2 次)。4 月 18 日早晨患者服用 1 次奥司他韦,未再发热,感颜面部肿胀,照镜子发现颜面部明显水肿,4 月 18 日下午患者无明显诱因出现前胸部明显瘙痒不适,轻微抓挠后出现大米粒样红色丘疹,突出皮肤,散在分布,患者考虑可能为奥司他韦过敏所致,自行服用氯雷他定片 10 mg 后约 2 h,瘙痒好转,红疹逐渐消退,当日晚上未再服用奥司他韦。4 月 19 日患者未再发热,感咽部肿胀、疼痛较前明显减轻,颜面部水肿较前明显加重,伴肿胀、麻木、针扎样痛痒感,并因肿胀出现睁眼困难。门诊咨询药师

及皮肤科医师后,考虑可能为奥司他韦引起的急性荨麻疹、血管性水肿,建议应用氯雷他定联合西替利嗪抗过敏治疗。患者采纳建议,口服氯雷他定片 10 mg qd (早)(4 月 19 日—4 月 20 日)联合左西替利嗪片 5 mg qd (晚)(4 月 19 日—4 月 20 日)抗过敏治疗。4 月 20 日患者颜面部水肿较前减轻,因感白天头晕、困倦,停用氯雷他定,继续服用左西替利嗪片 5 mg qd (晚)(4 月 21 日—4 月 26 日)抗过敏治疗,4 月 20 日晚患者发现颜面部皮肤出现干燥、脱皮,眼周、唇部及唇周尤为明显,自行应用润唇膏、润肤乳保湿。4 月 25 日患者颜面部水肿较前明显好转,颜面部皮肤仍有明显干燥、脱皮。4 月 27 日患者颜面部水肿基本恢复,干燥、脱皮明显好转。

2 文献检索资料及结果

以“奥司他韦”“血管神经性水肿/水肿”“荨麻疹”“不良反应”为中文检索词检索万方和中国知网数据库,以“oseltamivir”“angioneurotic edema/edema”“urticaria”“adverse drug reactions”为英文检索词检索 PubMed、Embase 等数据库,纳入由奥司他韦致血管神经性水肿的文献报道,最终纳入文献 3 篇^[9-11],加上本例患者,共 4 例奥司他韦致血管神经性水肿的患者。4 例患者均为女性,其中 1 例为 7 岁儿童,其余 3 例为中青年;发生时间为用药第 2~3 日,缓解时间为 24 h~7 d;4 例患者停用药物,给予抗组胺药治疗后均好转(见表 1)。

3 讨论

3.1 不良反应关联性评价

根据国家药品不良反应监测的关联性评价原则对该不良反应进行分析:①患者既往未使用过奥司他韦,无水肿、皮疹等相关异常情况,使用奥司他韦后出现颜面部水肿,伴皮疹、瘙痒;②奥司他韦说明书提示本品可致面部水肿、皮疹等不良反应;③停药并给予抗组胺药 2 d 后颜面部

基金项目: 河北省医学科学研究课题计划资助 (No.20240759)

作者简介: 贾东丽,女,副主任药师,主要从事医院药学相关工作, email: 1067188577@qq.com

表 1 奥司他韦致血管神经性水肿 3 例临床资料

文献	年龄 / 岁	性别	主要诊断或症状	合并用药	ADR 发生时间	临床症状	处理措施	ADR 转归	个体疾病及特点
[9]	22	女	甲流继发急性呼吸窘迫综合征	克拉霉素、头孢吡肟、去甲肾上腺素	第 3 日	第 3 日开始出现轻微舌肿胀，第 4~9 日舌肿胀显著加重，伴有中度唇肿胀，舌头变大变硬，无法缩回口腔	停用奥司他韦	7 d 后舌唇肿胀逐渐减轻	既往体健，肥胖
[10]	29	女	咽喉痛、肌痛、发热	泼尼松龙、羟氯喹、碳酸钙 D ₃	第 3 日	舌肿胀，逐渐加重	停用奥司他韦，24 h 内缓解应用抗组胺药		系统性红斑狼疮、鼻窦炎
[11]	7	女	咽干、咳嗽伴发热	阿奇霉素	第 2 日	第 2 日晚上出现手足心皮疹、瘙痒，第 3 日停药后皮疹消退；第 4 日再次用药十分钟内双手发红、肿胀，十指弯曲不能伸直，手掌和个别手指出现水肿	停用奥司他韦，2 d 后好转应用抗组胺药		阿莫西林过敏，吃芒果出现口唇肿胀

水肿较前减轻，但出现干燥、脱皮，8 d 后水肿、干燥、脱皮均明显好转；④后未再使用奥司他韦，未再出现上述不适；⑤患者既往体健，无血管性水肿家族史，无食物药物过敏史，无心、肝、肾、甲状腺等水肿相关疾病，无皮肤相关疾病病史，故可以排除疾病本身所致；另外，合并用药布洛芬，患者既往多次使用过布洛芬，未见水肿、皮疹和脱皮等相关不良反应发生。因此，该患者使用奥司他韦与水肿的因果关系评价为很可能。

3.2 奥司他韦致血管神经性水肿的发生机制、特点与鉴别

血管神经性水肿属于荨麻疹的一种特殊表现类型，是一种巨大型荨麻疹，发病机制属于 I 型变态反应^[12-14]，常发生于疏松结缔组织，如面、唇、口、舌、咽喉、悬雍垂、四肢及外生殖器，表现为局限性真皮深层及皮下组织肿胀，边界不清，表面光亮，50% 的患者可能同时合并荨麻疹。血管性水肿累及咽喉、舌等部位时，发生喉水肿或舌肿胀引起气道阻塞，可危及生命^[15]。另外，有研究显示女性患者发生血管神经性水肿的风险是男性患者的 1.5~1.7 倍，具体原因尚不明确，可能与体内激素的差异、低体重和水分有关^[16-17]。本文介绍的 1 例患者和国内外文献报道的 3 例患者发生部位分别为舌、颜面部和四肢，性别均为女性，其中 2 例合并皮疹。

血管神经性水肿，可分为两种类型，一种为组胺相关的血管性水肿，此种最常见，也称过敏性血管性水肿，常伴荨麻疹、瘙痒和肿胀，抗组胺药、糖皮质激素、肾上腺素治疗有效；另一种为非组胺介导的血管性水肿，常见缓激肽介导的血管性水肿，包括遗传性血管性水肿（HAE）、获

得性 *CI-INH* 缺陷导致的血管性水肿和血管紧张素转化酶抑制剂（ACEI）诱导的血管性水肿。缓激肽介导的水肿一般无明显瘙痒，抗组胺药、糖皮质激素、肾上腺素治疗无效^[18]。HAE 的特点为反复发生、局限性水肿、有家族史、血 C1 酯酶抑制剂和 C4 水平下降；获得性 *CI-INH* 缺陷导致的血管性水肿与 HAE 相似，但与遗传无关，发病年龄推迟；ACEI 诱导的血管性水肿需有 ACEI 类用药史。另外，还应与由心脏、肝脏、肾脏疾病，低蛋白血症，变态反应或由于静脉淋巴管阻塞等明确原因引起的水肿及特殊类型或某些综合征伴发的血管性水肿相区别^[19]。上述 4 例患者，均无心、肝、肾、甲状腺等水肿相关疾病史，未使用 ACEI 类药物，其中 3 例为停药并应用抗组胺药后好转，符合组胺相关的血管神经性水肿。

回顾性分析上述应用奥司他韦后出现血管神经性水肿 4 例患者的个体情况，除本文介绍的 1 例无已知特殊病史外，另外 3 例均存在免疫异常。如肥胖患者常伴随慢性低度炎症状态^[20]，系统性红斑狼疮合并鼻窦炎患者存在免疫系统过度活跃和慢性炎症；阿莫西林过敏、吃芒果出现口唇肿胀患者可能为过敏体质。因此，奥司他韦可能在免疫紊乱或过敏体质的患者中更容易诱发血管神经性水肿。

4 小结

目前，奥司他韦所致血管神经性水肿的具体机制尚不完全清楚，可能为组胺相关的血管神经性水肿，存在免疫紊乱或过敏体质的女性患者可能更容易发生。奥司他韦所致的血管神经性水肿较为少见，但可能进展迅速，甚至危及生命，医护人员应提高警惕，严格把握用药指征，用药前

评估过敏史及高风险人群,用药期间密切监测皮肤、黏膜水肿症状,一旦发生应立即停药。关于治疗,轻、中症一般停药并应用抗组胺药即可,重症则需联合糖皮质激素或肾上腺素等治疗。另外,对于居家用药患者,药师应充分告知患者及家属应用奥司他韦的注意事项、常见不良反应特点及紧急处理措施,以免严重不良事件的发生。目前,关于奥司他韦所致血管神经性水肿病例数较少,机制尚未完全明确,后期可加强奥司他韦不良反应的主动监测及基础研究,进一步验证风险因素及病理生理机制,尤其是特殊人群,以预测个体化用药风险。

参考文献

- [1] 陈圣洁,戴兰芬,李丹丹,等.帕拉米韦与奥司他韦治疗儿童流感病毒肺炎的成本-效果分析[J].中国医药,2019,14(2):215-218.
- [2] Preziosi P. Influenza pharmacotherapy: present situation, strategies and hopes [J]. Expert Opin Pharmacother, 2011, 12(10): 1523-1549.
- [3] Hama R, Bennett CL. The mechanisms of sudden-onset type adverse reactions to oseltamivir [J]. Acta Neurol Scand, 2017, 135(2): 148-160.
- [4] 郝朵,刘俊保.1例磷酸奥司他韦颗粒引起小儿精神异常的病例报道[J].中南药学,2020,18(7):1264-1265.
- [5] 周虹,许宁,张晓,等.55例奥司他韦不良反应数据分析[J].中国药物警戒,2019,16(7):420-424.
- [6] 潘晓艳,凌峰.奥司他韦不良反应的研究进展[J].中国医药,2023,18(9):1423-1427.
- [7] 刘彦会,梅康康,阮文懿,等.奥司他韦致儿童药品不良反应文献分析[J].儿科药学杂志,2024,30(8):17-21.
- [8] 刘洋,夏彬彬,成华.磷酸奥司他韦致33例不良反应病例分析[J].中国药物应用与监测,2019,16(6):357-360.
- [9] Scott A, More R, Freebairn RC. Tongue swelling complicating management of a ventilated patient with acute respiratory distress syndrome secondary to novel influenza A (H1N1) [J]. Anaesth Intensive Care, 2010, 38(2): 370-372.
- [10] Kalsi T, Stevenson J, Wade P, et al. Tongue swelling in association with oseltamivir (Tamiflu) [J]. BMJ Case Rep, 2011, 2011: bcr0620114396.
- [11] 宋兵芳.磷酸奥司他韦致儿童血管神经性水肿一例[J].中国药物与临床,2020,20(22):3886-3887.
- [12] 石锐,李一辰,葛卫红.1例对乙酰氨基酚诱发迟发型成人血管神经性水肿及药学监护[J].中国医院药学杂志,2021,41(14):1481-1483.
- [13] 赖晓梅,李春红.1例非诺贝特致血管神经性水肿的不良反应分析[J].中南药学,2023,21(11):3100-3102.
- [14] 林文明,周慧萍,陈永春,等.布洛芬混悬液致急性荨麻疹伴血管神经性水肿1例[J].中国药物应用与监测,2022,19(6):419-421.
- [15] 中华医学会,中华医学会杂志社,中华医学会皮肤病学分会,等.药疹基层诊疗指南(2022年)[J].中华全科医师杂志,2022,21(9):804-813.
- [16] Rademaker M. Do women have more adverse drug reactions? [J]. Am J Clin Dermatol, 2001, 2(6): 349-351.
- [17] Kando JC, Yonkers KA, Cole JO. Gender as a risk factor for adverse events to medications [J]. Drugs, 1995, 50(1): 1-6.
- [18] 刘艳,王启华.荨麻疹与血管性水肿的鉴别和治疗[J].山东医学高等专科学校学报,2021,43(5):359-361.
- [19] 朱文元.荨麻疹[M].南京:东南大学出版社,2001:10.
- [20] 陈超凡,陈晓可,宋以玲,等.运动干预对超重或肥胖个体慢性炎症反应影响的系统综述和 Meta 分析[J].中国运动医学杂志,2025,44(3):225-236.

(收稿日期:2025-05-25;修回日期:2025-07-14)

药事管理

药品安全风险信号检测方法与世界卫生组织
乌普萨拉监测中心应用现状

钟露苗 (湖南省药品审评与不良反应监测中心, 长沙 410013)

摘要: **目的** 了解药品安全风险信号检测方法及世界卫生组织乌普萨拉监测中心 (UMC) 的应用现状, 提高风险信号监测的效率。**方法** 通过文献梳理, 汇总分析了非均衡性测量法 (频数法和贝叶斯法), 以及聚类分析法、决策树法、树状扫描统计量法、随机森林法、关联规则法和基线模型法等; 同时介绍了 UMC 信号管理的工具 VigiLyze, 以及其使用 vigiGrade、vigiMatch、vigiRank、VigiPoint、VigiGroup、VigiVector 等方法。**结果** 不同的信号检测方法各有优缺点, 应用范围也不同, 如非均衡性测量法主要适用于被动监测数据中的信号检测, 其中不同的方法对数据库的大小有不同的适用性。**结论** 在进行信号检测时, 需要综合考虑研究目的、数据库规模、药物特征、不良事件特征以及药物与不良事件之间关系特征等因素, 选择合适的信号检测方法。

关键词: 安全风险; 信号检测方法; UMC 应用现状

中图分类号: R944, R95 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2025)12-3764-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.047

Detection methods for drug safety risk signals and current status of World
Health Organization Uppsala Monitoring Center

ZHONG Lumiao (*Hunan Center for Drug Evaluation and Adverse Drug Reactions Monitoring, Changsha 410013*)

Abstract: Objective To determine the methods to detect drug safety risk signals and the current status of World Health Organization Uppsala Monitoring Center (UMC), and improve the efficiency of risk signal detection. **Methods** We summarized signal detection methods by literature reviewing, such as non-equilibrium measurement methods (frequency method and Bayesian method), clustering analysis, decision tree, dendrographic scan statistic, random forest, association rule, and baseline model methods. The UMC signal management tool VigiLyze was introduced, followed by method such as vigiGrade, vigiMatch, vigiRank, VigiPoint, VigiGroup, and VigiVector. **Results** Different signal detection methods showed their own advantages and disadvantages, and their application ranges varied. For example, the non-equilibrium measurement method was mainly suitable for signal detection of passive monitoring data, and different methods applied to database with various sizes. **Conclusion** We should consider factors such as research objectives, database size, drug characteristics, adverse event characteristics, and characteristics of relationship between drugs and adverse events before selecting an appropriate detection method.

Key words: safety risk; signal detection method; current applications status of UMC

基金项目: 湖南省自然科学基金部门联合基金项目 (No.2023JJ60114); 国家药品监督管理局药品监管科学体系建设重点项目 (No. RS2024G002)。

作者简介: 钟露苗, 女, 主任药师, 主要从事药物警戒工作, email: 373037526@qq.com

药品安全性是药品的关键属性之一。《中华人民共和国药品管理法》提出了风险管理的监管原则，国家建立药物警戒制度，要求对药品不良反应（ADR）及其他与用药有关的有害反应进行监测、识别、评估和控制。无论是药品上市许可持有人（MAH），还是药品监管部门，均需对不同途径、不同方式收集到的疑似 ADR 信息进行信号检测，以期及时发现风险。本文通过文献梳理，汇总分析不同的信号检测方法，同时介绍了世界卫生组织 ADR 监测中心，即乌普萨拉监测中心（UMC）信号管理的工具与方法，以期提高各方在开展风险信号检测时的工作效率。

1 信号检测方法

信号检测的数据源一般为自发报告和主动监测的数据。对于收到的自发报告数据，常用的方法是非均衡性测量法，可概括分为两大类，即频数法和贝叶斯法；对于主动监测的数据，除了非均衡性测量法外，还有聚类分析法、决策树法、树状扫描统计量法、随机森林法、关联规则法和基线模型法等。

1.1 非均衡性测量法

非均衡性测量法是以 ADR 报告数据库中某药物与某不良反应共同被报告的次数为依据，分析两者间的关联，定量评价既涉及目标药物又涉及目标事件的报告的相对频率。该方法基于经典四格表（见表 1），计算具体数据库中与该药物相关的不良反应报告数量和其他药物引发的其他不良反应数量的比值^[1]。当该比值达到一定程度（非均衡）时，即被视为可疑信号，认为可疑药物和可疑不良反应之间可能存在关联，而不是机会因素或数据库“嘈杂背景”所致。

表 1 比例失衡法四格表

Tab 1 Four grid table of proportional imbalance method

药物	目标不良反应 报告数	其他不良反应 报告数	合计
目标药物	a	b	a + b
其他药物	c	d	c + d
合计	a + c	b + d	a + b + c + d

当 a 接近 a + b 且 c 接近 c + d 时，“没有信号”；当 a 接近 a + b 且 c 远小于 c + d 时，“很强信号”；当 a 远小于 a + b 且 c 接近 c + d 时，“没有信号”；当 a 远小于 a + b 且 c 远小于 c + d 时，“罕见事件”。在信号检测具体数据库中，a + b + c + d 为数据库的总条目，a + b 为数据库中含有目标药物的记录数，a + c 是数据库中

目标不良事件发生的记录数。

目前，该方法已被 UMC 以及美国、中国、日本、英国、荷兰等国家的 ADR 自发报告系统和处方事件监测数据库广泛应用。

1.1.1 频数法 频数法是指在长期的重复试验或采样机制中事件的发生频率，包括报告比值比法（ROR）、成比例报告比值法（PRR）、综合标准法（MHRA）和处方序列分析（PSA），其中应用最广泛的是 ROR^[2-4]。

① ROR: ROR 法^[3]由荷兰药物警戒中心提出并被广泛应用。比值比（OR）是衡量两个事件发生概率的比值，用于比较两组之间的差异或关联性。ROR 与传统流行病学中的 OR 相类似，是暴露于某一药品所关注事件与其他所有事件之比除以未暴露于该药品所关注事件与其他所有事件之比。该方法简单并且灵敏度高，但缺点是特异性低，当数量较少时可能出现假阳性的结果。采用此方法对自发报告系统数据库进行信号检测时，“病例组”是数据库中出现目标不良事件的报告，“对照组”则是指其他不良事件（除目标不良事件之外）报告，而“暴露”指的是暴露于某目标药物。因此，当 b 或 c 为零，也就是说当目标药物仅发生目标不良事件而不出现其他不良事件，或者只有目标药物才导致目标不良事件的情况下，ROR 值无法计算，这也是 ROR 法的弊端之一。

1992 年，Stricker 等^[5]用 ROR 法报道了头孢克洛与血清病样反应，Moore 等^[6]用 ROR 法研究药物与事件（如血管紧张素转化酶抑制剂与咳嗽/低血糖）之间的关系。

② PRR: PRR 法是暴露于某一药品所关注的事件与所有事件之比除以未暴露于该药品所关注的事件与所有事件之比^[2, 7]。2001 年，Evans 等^[2]在黄卡系统收集的 ADR 报告的基础上进行了可疑 ADR 信号检测的尝试，此方法与 ROR 法的特点相似，都是基于四格表进行运算，具有计算简单、灵敏度高特点，但当分母较小时易产生假阳性的结果，特异性较低。欧盟药品管理局（EMA）至少每个月对 EudraVigilance 数据库中的数据进行一次分析，有些药品分析频率会更高，至少每两周一次，主要是采用 PRR 法进行信号检测^[8]。

③ MHRA: MHRA 法是一种采用含多个指标的综合标准法，即结合 PRR 值、绝对报告数（A 值）及皮尔森卡方值（Pearson Chi-square）或校正卡方值来评估信号的关联强度^[2]。此方法无论是结果稳定性还是灵敏度都较理想，但随着报告数的增

加灵敏度反而降低,且特异度较低^[9]。Kubota 等^[10]研究表明当每种药物-不良反应组合的报告数量增加时,其灵敏度有下降的趋势,进一步验证了 MHRA 法的灵敏度与报告数量成负相关的缺点。

④ PSA: 1988 年, Petri 等^[11]首次介绍 PSA 在医保数据库中的应用。PSA 通过评价特定药物服用前后事件分布的对称性,判断药物与事件是否存在关联,其以一种药物处方记录(标签药)替代特定 ADR,基于目标药物和标签药使用的时序关系发掘安全性信号。

例如,若怀疑 A 药会产生需用 B 药治疗的不良反应,则研究对象为某段时间内同时使用 A 药和 B 药的人群。无因果关联时,先使用 A 药与先使用 B 药的人数大致相当;若 A 药确实引发不良反应且需后续用 B 药治疗,则先使用 A 药的人数会多于先使用 B 药的人数,形成不对称分布。该方法可提供可能的时序因果关系,但确凿的因果关系需经其他经典流行病学方法验证^[12]。

1.1.2 贝叶斯法 贝叶斯学派的概率是结合新信息更新先验概率后得出的后验分布的置信度。贝叶斯法包括伽马泊松分布缩减法(GPS)、多项伽马泊松分布缩减法(MGPS)和贝叶斯置信传播神经网络法(BCPNN)。

BCPNN 和 MGPS 运用贝叶斯判别方法综合先验信息与样本信息,改进统计决策,自动化程度高,适用于超大型数据库的信号筛选^[13]。至于产生可能信号所需的病例数量,尚无定论,需综合报告数量与质量、药物种类、用量、反应性质与严重程度等因素进行考量。

① GPS: 1998 年,美国开发出快速贝叶斯信号检测技术 GPS 法, GPS 法的核心是通过药品、事件、性别、年龄计算药物事件对(drug-events pairs, DEP)的经验贝叶斯几何均数(EBGM),该方法可以通过平衡性别、年龄等因素以防止过度挖掘信号。后来通过该方法进行改进,在 2002 年开始实施 MGPS^[14],它是 GPS 法的改进版本,其贝叶斯原理和 GPS 法一致,仅在基线或无效假设数计算方面有所不同,计算 EBGM 后得到 EBGM 95% 可信区间,下限用 EB_{05} 表示,如果 $EB_{05} > 2$,提示生成一个信号。Xiong 等^[15]利用 MGPS 对美国食品药品监督管理局(FDA)的 ADR 报告数据库进行信号挖掘,发现该算法与其他算法(ROR、PRR、BCPNN)的结果表现出高度一致性,可以提供至关重要的新的 ADR 信号。

② BCPNN: 随着计算机技术和贝叶斯神经网络

模型的发展,2002 年,WHO UMC 的 Bate 等^[16-17]建立了一套新的 ADR 信号检测方法,称为 BCPNN^[14],也称为贝叶斯置信度递进神经网络法^[14],这是一种基于贝叶斯神经网络传播(BNN)的方法^[18],WHO 应用 BCPNN 法对 UMC 收集的不良反应报告进行信号挖掘。BCPNN 法作为一种基于概率的不确定性推理方法,是在四格表的基础上应用了贝叶斯定律,使得模型具有前馈性的特点,即随着数据库信息本身不断增加和更新,模型能进行定期的自主学习和演绎推断,结合新的信息对以往累积的 ADR 报告进行再评价,这一特点使模型能早期发现 ADR 信号。特异性较高,计算结果较为准确。该方法采用了信息理论的相关理念,没有设置限制条件,适用于大规模的统计分析,即便缺少部分数据仍然可以分析。

1.2 其他方法

1.2.1 聚类分析法 共识聚类分析算法主要是通过将一组基于混合模型的聚类分析中重复放置在相同聚类中的报告进行分组来实现的,它可以识别类似疑似 ADR 的病例报告组^[19]。此算法可以在对个别病例报告进行聚类时实现足够的稳定性和临床连贯性,从而能够更好地识别药物警戒中的病例系列和相关的不良事件概况。

1.2.2 决策树法 决策树是一种树状结构,将变量依据属性进行分支分类,当此类数据不能再进行分割或应用于某一分支时,决策树分析即完成^[20]。吴嘉瑞等^[21]应用决策树法挖掘研究双黄连注射剂不良反应文献信号,发现双黄连注射剂不良反应发生类型可能与患者年龄、药物剂型等因素具有相关性。

1.2.3 树状扫描统计量法^[22] 树状扫描统计量(TreeScan)是一种基于电子医疗数据库的数据挖掘方法。该方法最早由 Kulldorff 等^[23]于 2003 年提出并应用于职业病死因监测,而后于 2013 年应用于不良反应信号挖掘^[24]。TreeScan 是根据研究对象某种特征的内部层级从属关系将研究对象映射到树状结构中^[25]。研究对象可以是职业种类、疾病诊断、药品种类等。树中的每个叶子节点代表一类对象,相邻的叶子之间属性相近,父节点与子节点之间是层级从属关系。扫描窗口是对树的剪枝,即剪下的一簇枝叶,形成一个分组。

TreeScan 方法的步骤为:①扫描整个树结构,考虑所有的剪枝分组情况,逐一计算各分组的对数似然比;②找出最大对数似然比的分组作为检验统计量;③基于原假设利用蒙特卡洛方法生成

大量随机的数据集（为计算方便，通常取 9999 或 99 999 个）；④ 计算每个随机数据集中的所有剪枝分组的似然比，并分别找出最大对数似然比；⑤ 将真实数据的最大对数似然比与所有随机数据集的对数似然比进行比较（一共 10 000 个对数似然比），若前者大于 95% 的随机数据集的最大对数似然比，则认为具有统计学意义。

李海龙等^[26]通过 TreeScan 挖掘鄞州区区域医疗数据库的他汀类 ADR 信号，发现 TreeScan 方法能够同时对大量不同水平、互相有重叠的不良反应进行分析，并能有效地解决多重假设检验问题，其产生的信号数量适中且假阳性较少，可以作为其他不良反应挖掘方法的一种补充，为我国的药品安全主动监测提供新的参考。

1.2.4 随机森林法 随机森林法是由多个决策树构成的分类器集合，主要是根据不同的变量对数据进行检测^[27]。最终药物与不良反应之间的相关性与变量的重要性评分相关。凌俐等^[28]采用随机森林法分析阿糖胞苷致 ADR 发生的影响因素，通过对结果进行分析，认为随机森林法能够准确地从复杂的数据中对真实的影响因素进行识别。

1.2.5 关联规则法 关联规则法分析是指发现两个变量之间的关联关系^[29]，其中 Apriori 算法是最常用的关联规则算法^[30-31]。关联关系的强度由支持度、提升度和置信度同时决定，当三者均符合条件时，则认为两个变量之间的关联强度大。李志优等^[32]通过关联规则 Apriori 算法等多种算法研究艾迪注射液不良反应发生特点及发生规律，但由于样本量有限、临床用药复杂，整体结果不够理想。

1.2.6 基线模型法 基线模型法是由 Thakrar 等^[33]提出的，该方法是对比例报告法的扩展，已被 WHO 用于挖掘联合用药的不良反应信号。基线模型分为加法模型和乘法模型，两种模型均需计算各自的风险比例。加法模型为假定某种药物的期望风险加上背景风险，乘法模型为某种药物的期望风险乘以背景风险。罗宝章等^[34]将基线模型用于挖掘上海市 ADR 监测中心自发呈报系统数据中联合用药的药物组合。

2 UMC 数据管理工具与方法

2.1 UMC 信号管理工具

VigiLyze 是 UMC 进行信号检测和管理工具^[35]。首次发布日期为 2017 年 1 月 11 日，WHO PIDM 成员的药物安全信息是其高效定量信号检测的源头。

VigiLyze 与世界卫生组织药物警戒数据库

VigiBase 紧密结合，通过 VigiLyze 可以访问本国新的药物上市后的安全信息，包括在世界其他地区已经上市的安全信息。VigiLyze 免费提供给 WHO PIDM 成员国的所有国家中心。该系统能够快速基于任何选定的一个国家或多个国家计算其不平衡性，无论是国家共享还是全球共享，在搜索相同（或类似）的药品和不良反应时，均能访问相关内容，通过与全球数据库共享信息，有助于成员国增进彼此对潜在安全问题的了解，并降低药物造成的伤害风险。

VigiLyze 支持整个信号检测和管理过程，能够分配审查任务并在系统内记录。将评估与药物和不良反应联系起来，并且在搜索相同（或类似）的药物产品和不良反应时，它会显示相关审查任务，这样就避免了重复进行相同评估。在审查过程中，还可以上传相关文件，如信号检查表、模板或支持性参考资料。在最终完成信号评估后，可在 VigiLyze 中的 WHO PIDM 社区分享，显示为相关审查任务。当搜索类似的药物和反应时，VigiLyze 能提供国家数据的概览图、案例行列表和不均衡性计算。不平衡性计算基于用户选择的国家或国家组，支持数据挖掘。它支持各个国家的信号管理，包括定性评估，同时信号的分析是在用户友好的直观界面中执行的。

2.2 vigi 系列方法

UMC 官网上系统介绍了 vigiGrade、vigiMatch、vigiRank 和 VigiPoint。另外还有 VigiGroup^[36]、VigiVector^[37]，这些方法的应用能更高效地处理和分析 WHO 药物警戒数据库 VigiBase 中庞大的数据，大大提高了监测工作的效率和质量。

2.2.1 vigiGrade vigiGrade 是一种多维度评估报告信息量的度量方法，在 2013 年首次被提及，用来识别记录良好的个例安全性报告，并揭示系统性的数据质量问题。评估报告信息的完整性，检查报告中是否包含了对案例评估过程有用的关键信息，显示个例安全性报告总体的质量问题。对个例安全性报告的完整性进行评分是根据各部分在案例评估过程中的重要性选择某些字段，如果某个字段有信息，则赋予该字段一个得分，各个字段的得分被加权并合并为整个 ICSR 的得分，最高得分为 1.0。vigiGrade 主要用于与各国沟通数据质量，但它也被证明是一个真实信号的指标，因此，它是 UMC 在信号检测中使用的 vigiRank 方法中包含的一个参数。

2.2.2 vigiMatch 自 2014 年以来，UMC 在信号检测中一直使用 vigiMatch 方法来检测重复记录。

vigiMatch 是一种基于概率的记录匹配方法,它基于可能性的方法来识别大型数据库中意外相似的记录对。它为每对记录计算一个匹配得分,其中匹配的信息会得到奖励,而不匹配的信息会受到惩罚。这个匹配得分反映了两个记录关联到同一底层实体的概率,或者在这种情况下,它们是重复的概率。匹配得分超过某个阈值的记录被标记为疑似重复。这个阈值是从确认的重复记录与数据库中随机记录对的匹配得分之间的比较中得出的。

2.2.3 vigiRank vigiRank 是一种预测模型,它根据多个方面的证据强度对药物警戒安全信号进行排名。自 2014 年以来,vigiRank 已在 UMC 的信号检测中成功实施。构成 vigiRank 的参数包括:报告的不均衡性、最近的报告、地理分布、有信息的报告(vigiGrade 完整性得分)以及描述情况。

2.2.4 VigiPoint VigiPoint 是识别并精确指出报告数据子集(例如年龄、性别、共同报告的药物和不良反应)与更广泛数据集相比的关键特征的工具。它在 2017 年首次提出,又于 2024 年进行修订。

2.2.5 VigiGroup VigiGroup 是 UMC 开发的一种共识聚类算法,用于识别涉及类似疑似药物不良反应的个别病例报告组,并描述相关的不良事件概况。这种方法通过基于混合模型的聚类分析,将报告分组来实现共识聚类,并使用了经验贝叶斯统计方法来提高性能。通过 VigiGroup 聚类分析,可以尝试发现基于所有记录的体征、症状和诊断的不良事件报告数据的特点。此外,该算法还会根据报告中描述的临床条件对不良事件报告进行分组。

VigiGroup 的作用最近由 UMC 数据科学家 Nils Erlanson 展示^[38],他分享了使用 VigiGroup 聚类分析在 VigiBase 中研究 COVID-19 疫苗安全概况的结果,突出了其在前瞻检测新的安全信号和补充传统的不均衡性分析方面的能力。

2.2.6 VigiVector VigiVector 是 UMC 在药物警戒和信号检测领域持续创新的一个例子,它利用先进的数据分析技术来提高药物安全监测的效率和准确性。它是 UMC 开发的数据驱动发现的方法,由于详细审查大量报告可能不是信号检测和评估的可行或有效方法,该方法促进了对大量潜在 ADR 报告的分析。数据驱动发现的方法有助于将人类专家的注意力引向最值得关注和最相关的病例系列进行审查,并揭示影响信号评估的重要报告模式。

通过 VigiVector 分布式语义学,我们可以根据 VigiBase 中的报告模式,获取药物和不良事件的数据驱动向量。这使得可以根据它们在数据驱动向量空间中的位置,即倾向于在类似情境中被报告的不良事件进行分组,而不是根据 MedDRA 这样的层次术语中的位置进行分组。

3 小结

ADR/事件的发生影响因素很多,不同的药物警戒数据库以及不同来源的数据质量差异较大,不同的信号检测方法也各有优缺点,应用范围也不同。因此,在进行信号检测时,需要综合考虑研究目的、数据库规模、药物特征、不良事件特征,以及药物与不良事件之间关系的特征等因素,选择合适的信号检测方法。随着人工智能、机器学习的应用,信号检测方法的改进有望进一步提升安全风险信号检测的效率,这些领域均值得进一步探讨和研究。

参考文献

- [1] 郭剑非,江冬明,詹思延.数据库挖掘和药物不良反应信号的探索与分析(下)[J].药物流行病学杂志,2006,15(2):104-107.
- [2] Evans SJ, Waller PC, Davis S. Use of proportional reporting ratios (PRRs) for signal generation from spontaneous adverse drug reaction reports [J]. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 2001, 10(6): 483-486.
- [3] van Puijenbroek EP, Bate A, Leufkens HG, et al. A comparison of measures of disproportionality for signal detection in spontaneous reporting systems for adverse drug reactions [J]. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 2002, 11(1): 3-10.
- [4] Duggirala HJ, Tonning JM, Smith E, et al. Use of data mining at the food and drug administration [J]. *J Am Med Inform Assoc*, 2016, 23(2): 428-434.
- [5] Stricker BH, Tijssen JG. Serum sickness-like reactions to cefaclor [J]. *J Clin Epidemiol*, 1992, 45(10): 1177-1184.
- [6] Moore N, Thiessard F, Begaud B. The history of disproportionality measures (reporting odds ratio, proportional reporting rates) in spontaneous reporting of adverse drug reactions [J]. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 2005, 14(4): 285-286.
- [7] Hauben M, Madigan D, Gerrits CM, et al. The role of data mining in pharmacovigilance [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2005, 4(5): 929-948.
- [8] 宋洋,杨悦.欧盟药物警戒体系建立运行与实施进展[J].中国药物警戒,2014,11(7): 401-406.
- [9] Li CJ, Xia JL, Deng JX, et al. A comparison of measures of disproportionality for signal detection on adverse drug reaction spontaneous reporting database of Guangdong

- province in China [J]. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 2008, 17 (6): 593-600.
- [10] Kubota K, Koide D, Hirai T. Comparison of data mining methodologies using Japanese spontaneous reports [J]. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 2004, 13 (6): 387-394.
- [11] Petri H, de Vet HC, Naus J, et al. Prescription sequence analysis: a new and fast method for assessing certain adverse reactions of prescription drugs in large populations [J]. *Stat Med*, 1988, 7 (11): 1171-1175.
- [12] 方任飞, 潘昱廷, 詹思延. 处方序列对称分析研究现状的文献计量分析 [J]. *药物流行病学杂志*, 2016, 25 (2): 108-112, 118.
- [13] Gould AL. Practical pharmacovigilance analysis strategies [J]. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 2003, 12 (7): 559-574.
- [14] 黎润灵. FAERS 数据库药物不良反应挖掘与分析 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学, 2017.
- [15] Xiong S, Gou RY, Liang XD, et al. Adverse events of oral GLP-1 receptor agonist (Semaglutide Tablets): a real-world study based on FAERS from 2019 to 2023 [J]. *Diabetes Ther*, 2024, 15 (8): 1717-1733.
- [16] Bate A, Lindquist M, Edwards IR, et al. A data mining approach for signal detection and analysis [J]. *Drug Saf*, 2002, 25 (6): 393-397.
- [17] Bate A. Bayesian confidence propagation neural network [J]. *Drug Saf*, 2007, 30 (7): 623-625.
- [18] Tao C. Applications of Bayesian neural networks in outlier detection [J]. *Big Data*, 2023, 11 (5): 369-386.
- [19] Noren GN, Meldau EL, Chandler RE. Consensus clustering for case series identification and adverse event profiles in pharmacovigilance [J]. *Artif Intell Med*, 2021, 122: 102199.
- [20] Kumai M, Imai S, Kato S, et al. Construction of a risk prediction model of extended release oxycodone tablet-induced nausea and clarification of predictive factors [J]. *Biol Pharm Bull*, 2021, 44 (4): 593-598.
- [21] 吴嘉瑞, 张冰. 双黄连注射剂不良反应文献的数据挖掘研究 [J]. *中国药物警戒*, 2008, 5 (3): 139-143.
- [22] <https://www.treescan.org/>.
- [23] Kulldorff M, Fang Z, Walsh SJ. A tree-based scan statistic for data base disease surveillance [J]. *Biometrics*, 2003, 59 (2): 323-331.
- [24] Kulldorff M, Dashevsky I, Avery TR, et al. Drug safety data mining with a tree-based scan statistic [J]. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 2013, 22 (5): 517-523.
- [25] 李海龙, 赵厚宇, 周一帆, 等. 基于电子医疗数据库的药物不良反应信号挖掘方法概述 [J]. *药物流行病学杂志*, 2018, 27 (8): 541-549.
- [26] 李海龙, 赵厚宇, 詹思延. 树状扫描统计量在他汀类药物不良反应主动监测中的应用 [J]. *药物流行病学杂志*, 2022, 31 (6): 371-376, 394.
- [27] Jang MG, Cha S, Kim S, et al. Application of tree-based machine learning classification methods to detect signals of fluoroquinolones using the Korea Adverse Event Reporting System (KAERS) database [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2023, 22 (7): 629-636.
- [28] 凌俐, 陈丽, 谢兆莉. 随机森林法用于分析阿糖胞苷致不良反应发生的影响因素 [J]. *中国药房*, 2015, 26 (8): 1091-1093.
- [29] 张燕, 花慧莲, 金涛, 等. 基于关联规则的骨折患者注射用血栓通 (冻干) 联合用药分析 [J]. *中国药业*, 2022, 31 (14): 122-125.
- [30] 胡晔, 沈婷婷, 王红霞, 等. 基于 Apriori 算法的某医院铂类药物不良反应数据分析 [J]. *实用药物与临床*, 2023, 26 (3): 224-228.
- [31] 吴雨桐, 吴思佳, 杨建卫, 等. 基于 Apriori 算法分析 2021 年山东省医疗器械不良事件的关联性 [J]. *山东大学学报 (医学版)*, 2022, 60 (12): 111-118.
- [32] 李志优, 田波, 姚闽. 基于数据挖掘技术分析艾迪注射液不良反应 [J]. *药品评价*, 2021, 18 (7): 390-395.
- [33] Thakrar BT, Grundschoiber SB, Doessegger L. Detecting signals of drug-drug interactions in Spontaneous reports database [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2007, 64 (4): 489-495.
- [34] 罗宝章, 钱轶峰, 叶小飞, 等. 联合用药不良反应信号检测的两种基线模型及应用 [J]. *中国卫生统计*, 2009, 26 (6): 586-591.
- [35] <https://who-umc.org/pv-products/vigilyze/>.
- [36] <https://who-umc.org/research/vigimethods/>.
- [37] <https://who-umc.org/research/data-driven-discovery/>.
- [38] Uppsala Monitoring Centre. VigiGroup in action-new method identifies groups of related reports [EB/OL]. Technology (2022-02-08) [2025-8-15]. <https://luppsalareports.org/articleshvigigroup-in-action-new-method-identifies-groups-of-related-reports>.

(收稿日期: 2025-08-20; 修回日期: 2025-10-15)

三维分析框架下我国儿童药研发政策文本分析

胡皓钰, 陈永法* (中国药科大学国际医药商学院, 南京 211198)

摘要: **目的** 为我国儿童药研发政策的制定和完善提供参考。**方法** 采用政策工具理论和内容分析法, 搭建“政策工具-政策目标-政策类型”三维分析框架, 对 2011 年 7 月以来国家层面的儿童药研发政策文本进行编码与分析。**结果** 共纳入 34 条政策文本。在政策工具维度, 环境型、供给型、需求型分别占 73.53%、17.65%、8.82%; 在政策目标维度, 6 个政策目标中加快申报审评这一目标出现频数最多, 达 61.76%; 在政策类型维度, 解释引导类、法律规范类、计划行动类分别占 67.65%、20.59%、11.76%。**结论** 现阶段我国儿童药研发政策侧重于营造良好研发环境, “工具-目标-类型”间的协同效应尚未得到充分释放, 当前儿童药研发政策布局呈现碎片化。建议加强供给型工具和需求型工具的运用, 丰富环境型工具, 增强“工具-目标-类型”的协同作用, 以儿童用药立法为抓手推进政策矩阵建设, 采取激励与强制相结合的举措。

关键词: 儿童药; 研发; 政策工具; 文本分析

中图分类号: R956

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)12-3770-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.048

Text analysis of research and development policy for China's pediatric drug by a three-dimensional analytical framework

HU Haoyu, CHEN Yongfa* (*School of International Pharmaceutical Business, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198*)

Abstract: Objective To provide reference for the establishment and improvement of policies regarding the research and development (R&D) of pediatric drugs in China. **Methods** Policy tools, goals and types were used to construct a three-dimensional analysis framework of “policy tools-policy goals-policy types”, in order to encode and analyze the national level R&D of pediatric drug policy texts since July 2011. **Results** Totally 34 policy texts were included. As for policy tools, environment-oriented, supply-oriented and demand-oriented policy tools accounted for 73.53%, 17.65% and 8.82%, respectively. Concerning policy goals, speeding up the registration review process had the highest frequency of occurrence among the six policy goals, accounting for 61.76%. As for policy types, interpretation and guidance, laws and norms, plans and actions policies accounted for 67.65%, 20.59% and 11.76%, respectively. **Conclusion** At present, China's pediatric drug R&D policies focus on creating a favorable environment. The synergistic effect among “tools-goals-types” has not yet been fully exploited. The current distribution of pediatric drugs R&D policies remains fragmented. We should strengthen the use of supply-oriented and demand-oriented policy tools, enrich environment-oriented policy tools, enhance the synergistic effect of “tools-goals-types”, advance the development of a policy matrix by leveraging legislation on pediatric drugs, and combine incentives with enforcement.

Key words: pediatric drug; research and development; policy tool; text analysis

作者简介: 胡皓钰, 女, 硕士研究生, 主要从事医药政策与法规方面的研究, email: huhaoyu0712@163.com *通信作者: 陈永法, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事医药政策与法规方面的研究, email: cyf990@163.com

近年来,我国陆续出台多部与儿童药有关的政策文件,然而,我国儿童药领域仍有诸多临床需求未被满足,如专用品种少、适宜剂型少等问题^[1-2]。研发是药品供应保障体系的源头环节,也是当下制约儿童药供给的核心环节^[3]。政策对药品研发起到至关重要的激励和导向作用。为提升儿童用药可及性,近年来学者们基于政策工具理论搭建政策工具单维度分析模型^[4]、“政策工具-政策目标”^[5-6]、“政策工具-政策体系”^[7]二维分析框架,对儿童药开展政策研究。但是不同政策类型在激励强度和执行效力上存在固有差异,政策工具、政策目标与政策类型的不同组合会产生差异化的实施效果,现有分析框架在剖析政策的层次性和系统性、识别政策聚焦及分析协同作用方面存在不足。鉴于此,本研究扩展传统“政策工具-政策目标”二维分析框架,引入政策类型维度,构建三维分析框架,对我国儿童药研发政策进行文本分析,探讨政策的侧重与不足,提出优化建议,为完善我国儿童药研发政策体系提供参考。

1 资料与方法

表 1 我国儿童药研发相关政策文件

Tab 1 Policy documents related to the pediatric drug R&D in China

标题	发文机构	发布日期
关于深化药品审评审批改革进一步鼓励药物创新的意见	食药监总局	2013 年 2 月 22 日
关于保障儿童用药的若干意见	卫计委、发改委、工信部、人社部、食药监总局、中医药局	2014 年 5 月 21 日
关于加强儿童医疗卫生服务改革与发展的意见	卫计委、发改委、教育部、财政部、人社部、中医药局	2016 年 5 月 13 日
关于印发“十三五”深化医药卫生体制改革规划的通知	国务院	2016 年 12 月 27 日
关于深化审评审批制度改革鼓励药品医疗器械创新的意见	中共中央办公厅、国务院办公厅	2017 年 10 月 8 日
关于鼓励药品创新实行优先审评审批的意见	食药监总局	2017 年 12 月 21 日
关于开展儿童白血病救治管理工作的通知	卫健委、发改委、人社部、医保局、中医药局、药监局	2018 年 8 月 23 日
关于开展儿童血液病、恶性肿瘤医疗救治及保障管理工作的通知	卫健委、民政部、医保局、中医药局、药监局	2019 年 7 月 31 日
中华人民共和国药品管理法	全国人民代表大会常务委员会	2019 年 8 月 26 日
药品注册管理办法	市监局	2020 年 1 月 22 日
中国儿童发展纲要(2021—2030 年)	国务院	2021 年 9 月 8 日
“十四五”国家药品安全及促进高质量发展规划	药监局	2021 年 12 月 30 日
深化医药卫生体制改革 2023 年下半年重点工作任务	卫健委、发改委、财政部、人社部、医保局、药监局	2023 年 7 月 21 日
关于推进儿童医疗卫生服务高质量发展的意见	卫健委、发改委、教育部、工信部、财政部、人社部、医保局、中医药局、疾控局、药监局	2024 年 1 月 2 日

1.2 研究方法

1.2.1 研究思路 本研究主要采用内容分析法,对政策文件的内容进行系统且量化的研究。研究思路如下:①依据不可细分原则从纳入分析的政策文件中提取政策文本,即相同含义的语句或语段为一个政策文本,若具有不同含义则进行拆

1.1 资料来源

2011 年 7 月,国务院颁布《中国儿童发展纲要(2011—2020 年)》,将“推动儿童药研发和生产”提升至国家层面,该文件对我国后续布局儿童药政策起到关键指导作用^[8],因此本研究选择 2011 年 7 月至 2024 年 12 月我国与儿童药研发有关的政策文件进行研究。政策文件的纳入排除标准如下:

① 纳入标准:国务院、各部委及直属机构等国家层面出台的文件;政策文本涉及儿童药研发且有实质内容,能够直接体现政府目的及政策内涵;政策类型包括法规、通知、规划、意见、办法等。

② 排除标准:仅出现关键词而无实质内容的文件;政策解读、工作情况报告、已废止的文件、征求意见稿、答复意见等文件;技术规范、指南、目录等内容过于单一的文件。

根据纳入排除标准,最终纳入 14 份政策文件(见表 1),其中专门针对儿童制定的文件共 6 份(42.86%)。

分^[9];②构建儿童药研发政策的三维分析框架;③依据三维分析框架对政策文本的节点进行编码;④根据编码结果进行政策文本分析;⑤在分析结果的基础上辅以文献资料,提出政策优化建议。

1.2.2 三维分析框架的建立(见图 1)

① X 维度 政策工具:政策工具划分方式多

样，本研究选择目前认可度最高、应用范围最广的 Rothwell 和 Zegveld 的理论模型^[5, 10]，将政策工具分为供给型、需求型和环境型三大类，并依据政策文本和文献资料，进一步细分出政策工具子类。供给型工具指作用于供给端，对儿童药研发具有直接推动力的政策。需求型工具指作用于需求端，从需求层面提高各方研发儿童药的积极性，是具有拉动力度的政策。环境型工具指政府着眼于整体，营造有利于儿童药研发的宏观环境，从而起到间接推动作用。

② Y 维度 政策目标：本研究基于政策文件中指明的政策目标，参考我国儿童药短缺原因相关研究结果^[3, 11-14]，将政策目标分类归集为以下六种：加快申报审评；提高受试者参与度；保障研发主体合理收益；确保研发的质量和规范；增强产业自主创新的内生动力；引导研发主体精准聚焦研发方向。

③ Z 维度 政策类型：根据现有政策文件种类及其他学者研究^[10, 15]，本研究将政策类型分为三大类：法律规范类、计划行动类、解释引导类。法律规范类为长期有效的法律、条例、办法等，为政府各项工作提供标准；计划行动类是对一定

时期内需要完成的工作的全面部署，具有明显的时效性，主要包括规划、纲要等；解释引导类着重就某项具体政策目标加以阐释并提出相应的解决办法，主要包括意见、通知等。

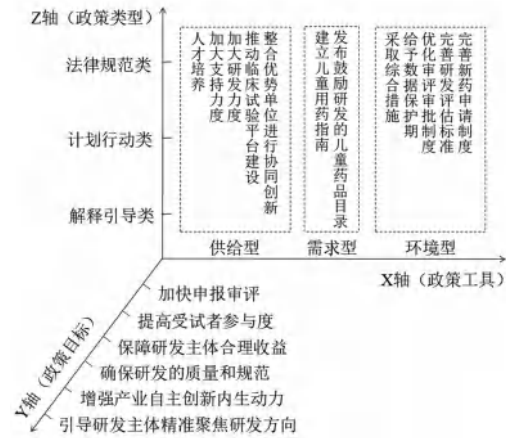


图 1 儿童药研发政策三维分析框架
Fig 1 Three-dimensional analytical framework for pediatric drug R&D policy

2 分析结果

根据不可细分原则处理前述 14 份儿童药研发有关政策文件，共得到 34 个内容分析单元，依据三维分析框架对其编码，获得 34 条编码，编码示例见表 2。

表 2 政策文本编码示例
Tab 2 Example of policy text encoding

政策名称	内容分析单元	节点编码
关于深化药品审评审批改革 进一步鼓励药物创新的意见	① 进一步加快创新药物审评；② 鼓励以临床价值为导向的药物创新；③ 对重大疾病、罕见病、老年人和儿童疾病具有更好治疗作用、具有自主知识产权和列入国家科技计划重大专项的创新药物注册申请等，给予加快审评	政策工具→环境型→优化审评审批制度 政策目标→加快申报审评 政策类型→解释引导类
深化医药卫生体制改革 2023 年下半年重点工作任务	① 推进医药领域改革和创新发展；② 支持药品研发创新；③ 继续发布鼓励研发申报儿童药品清单和鼓励仿制药品目录	政策工具→需求型→发布鼓励研发的儿童药品目录 政策目标→引导研发主体精准聚焦研发方向 政策类型→计划行动类

2.1 单维度

2.1.1 X 维度分析 X 维度（政策工具）的分析结果如表 3 所示。在 34 条编码中，环境型工具、供给型工具、需求型工具的使用占比由高到低，分别为 73.53%、17.65%、8.82%。环境型工具下有 5 个子类，其中优化审评审批制度占比最高，达 58.82%；供给型工具下的 5 个子类中加大支持力度占比最高，达 5.88%，其余 4 个子类各占 2.94%；需求型工具下的 2 个子类各占 5.88% 和 2.94%。由此可见，我国儿童药研发政策综合运用三种政策工具，但使用分布存在明显偏向，偏好使用发挥间接推动作用的环境型工具，辅以具有直接推动作用的供给型工具和直接拉动作用的需求型工具，同时，名种政策工具子类的运用也

有所侧重，聚焦优化审评审批制度，其余子类的使用存在不足。总体来看，我国儿童药研发政策文本的政策工具使用存在结构失衡现象。

2.1.2 Y 维度分析 Y 维度（政策目标）的分析结果如表 4 所示。加快申报审评这一政策目标的出现频数远超其他 5 个目标，高达 21 次，占比为 61.76%，可见我国儿童药研发政策的目标导向鲜明，该目标是当下核心目标，对其余政策目标的关注则较少，不利于儿童药行业的长足发展。

2.1.3 Z 维度分析 Z 维度（政策类型）的分析结果如表 5 所示。我国儿童药研发政策的形式主要为解释引导类，占比为 67.65%，在其所含的 2 个子类政策类型中，意见类政策文本最多，占全部 34 条编码的 61.76%；其次分别为法律规范类和

表 3 政策工具维度分析结果

Tab 3 Analysis of policy tools dimension			
工具类型	子类	频次 (%)	合计频次 (%)
供给型	整合优势单位进行协同创新	1 (2.94)	6 (17.65)
	推动临床试验平台建设	1 (2.94)	
	加大研发力度	1 (2.94)	
	加大支持力度	2 (5.88)	
	人才培养	1 (2.94)	
需求型	发布鼓励研发的儿童药品目录	2 (5.88)	3 (8.82)
	建立儿童用药指南	1 (2.94)	
环境型	优化审评审批制度	20 (58.82)	25 (73.53)
	完善研发评估标准	2 (5.88)	
	完善新药申请制度	1 (2.94)	
	给予数据保护期	1 (2.94)	
	采取综合措施	1 (2.94)	

计划行动类，各占 20.59% 和 11.76%，各含 2 个和 3 个子类。值得注意的是，在法律规范类中没有儿童药专项政策文件。由此可见，当下我国主要通过对于儿童药某一具体事项或环节加以方向性的阐释，提出相应解决办法加以引导来推动其发展，这在我国儿童药面临起步晚、研发难等诸多困境的发展背景下^[1, 7, 16]，具有一定的合理性和必要性。此外，从本维度分析结果中还发现，我国儿童药研发政策体系的顶层设计尚不周全。

2.2 交叉维度

2.2.1 X-Y 二维交互分析 X 维度（政策工具）和 Y 维度（政策目标）交叉分析的结果如表 6 所示。从政策工具角度看，环境型工具的政策目标

表 4 政策目标维度分析结果

Tab 4 Analysis of policy goals dimension			
政策目标	含义	参考来源	频次 (%)
加快申报审评	包括优化审评审批制度，聚焦提高行政效率以缩短研发周期	丁瑞琳 ^[3] ，刘敬峰 ^[13]	21 (61.76)
提高受试者参与度	通过建设临床试验平台和提升研究团队能力，增强受试者及其监护人参与临床试验的意愿，降低受试者招募难度和脱落率	王璐 ^[12] ，蒋建东 ^[14] ， 丁瑞琳 ^[3]	2 (5.88)
保障研发主体合理收益	通过给予数据保护期等政策工具，改善儿童药研发高成本低收益的现状	何思颐 ^[11]	2 (5.88)
确保研发的质量和规范	如完善研发评估标准，强化研发全流程的质量控制和技术规范	丁瑞琳 ^[3] ，刘敬峰 ^[13]	2 (5.88)
增强产业自主创新内生动力	如整合优势单位协同创新研发，提升企业创新能力、推动产业转型升级	政策文本	4 (11.76)
引导研发主体精准聚焦研发方向	通过建立儿童用药指南和鼓励研发的儿童药品目录，明确儿童药研发方向	何思颐 ^[11]	3 (8.82)

表 5 政策类型维度分析结果

Tab 5 Analysis of policy types dimension			
政策类型	子类	频次 (%)	合计频次 (%)
解释引导类	意见	21 (61.76)	23 (67.65)
	通知	2 (5.88)	
计划行动类	规划	2 (5.88)	4 (11.76)
	纲要	1 (2.94)	
	任务	1 (2.94)	
法律规范类	法律	1 (2.94)	7 (20.59)
	管理办法	6 (17.65)	

覆盖面最广，涉及全部 6 个目标中的三项，供给型工具次之，需求型工具则仅涉及一个目标；从政策目标角度看，各政策目标均仅运用三种政策工具中的一种，在政策工具选择上表现出明显的倾向性。由此可见，我国儿童药研发各政策目标的实现路径存在明显的局限性，这可能会阻碍各大目标的有力有序推进。

2.2.2 X-Z 二维交互分析 X 维度（政策工具）和 Z 维度（政策类型）交叉分析的结果如表 7 所示。从政策工具角度看，三种政策工具中仅环境型工具涉及全部政策类型，供给型工具仅涉及解释引导类政策，需求型工具未涉及法律规范类政策；

表 6 “政策工具 - 政策目标”二维交叉分析结果 [n(%)]
Tab 6 Cross-tabulation analysis of “policy tools-policy goals” dimensions [n(%)]

政策目标	供给型	需求型	环境型
加快申报审评	0 (0.00)	0 (0.00)	21 (100.00)
提高受试者参与度	2 (100.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
保障研发主体合理收益	0 (0.00)	0 (0.00)	2 (100.00)
确保研发的质量和规范	0 (0.00)	0 (0.00)	2 (100.00)
增强产业自主创新内生动力	4 (100.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
引导研发主体精准聚焦研发方向	0 (0.00)	3 (100.00)	0 (0.00)

从政策类型角度看，解释引导类政策涵盖最广，涉及全部三种政策工具，法律规范类政策则仅涉及环境型工具。由此可见，相较环境型工具，供给型和需求型工具的法律效力与号召能力较弱，这可能会增加其执行与落实的难度。

表 7 “政策工具 - 政策类型”二维交叉分析结果 [n(%)]
Tab 7 Cross-tabulation analysis of “policy tools-policy types” dimensions [n(%)]

政策工具	解释引导类	计划行动类	法律规范类
供给型	6 (100.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
需求型	2 (66.67)	1 (33.33)	0 (0.00)
环境型	15 (60.00)	3 (12.00)	7 (28.00)

2.2.3 Y-Z 二维交互分析 Y 维度（政策目标）和 Z 维度（政策类型）交叉分析的结果如表 8 所示。从政策目标角度看，仅加快申报审评涉及全部政策类型，有 4 个政策目标仅在解释引导类政策中出现，且出现频数远不及前者；从政策类型角度看，解释引导类政策涉及全部政策目标，更高层次的计划行动类和法律规范类分别涉及 2 个及 1 个目标。由此可见，加快申报审评外的 5 个政策目标缺少层次分明、系统全面的政策布局。

表 8 “政策目标 - 政策类型” 二维交叉分析结果 [n(%)]
Tab 8 Cross-tabulation analysis of “policy goals-policy types” dimensions [n(%)]

政策目标	解释引导类	计划行动类	法律规范类
加快申报审评	11 (52.38)	3 (14.29)	7 (33.33)
提高受试者参与度	2 (100.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
保障研发主体合理收益	2 (100.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
确保研发的质量和规范	2 (100.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
增强产业自主创新内生动力	4 (100.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
引导研发主体精准聚焦研发方向	2 (66.67)	1 (33.33)	0 (0.00)

我国儿童药研发政策“工具 - 目标 - 类型”的总体分布情况详见图 2。图 2 从左到右的 3 个节点分别为政策工具、政策目标、政策类型，通过线条的粗细以及流向直观地反映三者间的分布情况。

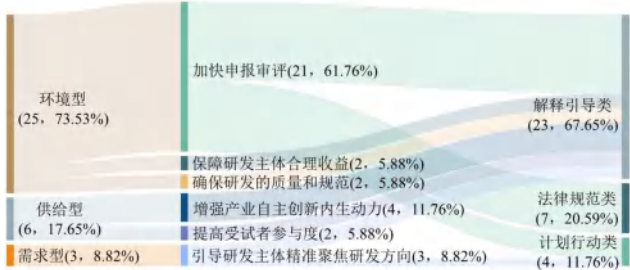


图 2 我国儿童药研发政策“工具 - 目标 - 类型”分布情况
Fig 2 Distribution of “tools-goals-types” related to pediatric drug R&D policy

3 结论

3.1 现阶段我国儿童药研发政策侧重于营造良好研发环境

X 维度分析结果显示，我国儿童药研发政策存在政策工具使用欠缺协调性和互补性的现象，偏好环境型工具，较少运用供给型和需求型工具。此外，纳入分析的 14 份政策文件的发布时间跨度逾十年，其中仅 2 份文件未使用环境型工具，有 10 份文件仅采用环境型工具，说明多年来我国都更侧重于从宏观层面着手，以期通过各项利好政策塑造儿童药研发优良环境，进而间接提高药企研发动力。本研究推测我国儿童药研发政策偏重环境型工具的原因可能有以下三方面：一是成效可观，形成

路径依赖，实践证明以优化审评审批为代表的环境型工具成效可观^[17-18]，成为我国推动创新药行业发展的重要抓手，在我国创新药政策中使用过半^[19]；二是执行成本低且回报周期短，人才培养等供给型工具需投入大量人力、物力及时间；三是易执行且灵活，环境型工具侧重行政程序的优化，较其他两类工具更易落实且灵活性高。

环境型工具在营造优良行业生态上具有明显优势，然而其仅能起到间接推动作用，不仅缺少供给型工具和需求型工具所具有的直接作用力，且不具备强制性，政策受众拥有较大的自主选择空间，加之编码政策文本时发现部分政策工具子类过于笼统和宽泛，在政策文件中缺少进一步解读和阐述，这或削弱政策工具的实施效果。

3.2 “工具 - 目标 - 类型” 间的协同效应尚未得到充分释放

当前我国儿童药研发政策体系中，“工具 - 目标 - 类型”三者间的协同效应有待进一步提升。一方面，从 X-Y 二维交互分析结果可以看出，我国儿童药研发政策目标在政策工具选择上较为单一，各政策目标的推进仅依托某一类政策工具，这种局限性降低了政策实施的灵活性，有碍于政策目标的实现。另一方面，Y-Z 二维交互分析结果显示，有 4 个政策目标仅见于政策效力最低的解释引导类文件，与加快申报审评这一在所有政策类型中均被强调的政策目标相比，现有政策目标普遍缺少多层次、系统性的政策支持。政策目标、政策工具、政策类型三者间协调不足的现状在一定程度上制约着儿童药行业的长期稳定发展，因此有必要提升其协同效应，构建政策效能更高的儿童药研发政策体系。

3.3 当前儿童药研发政策布局呈现碎片化

我国相继发布了一系列涉及儿童药研发的政策文件，然而，当前政策布局，尤其是顶层设计尚需优化。一方面，处理政策文本时发现，现有儿童药研发政策分散在各类型、各层级的政策文件中，专项法律法规缺位，且政策的连贯性、系统性和精准性仍待加强，尚未形成标准法律体系^[16, 20-22]。另一方面，经文献研究发现，针对儿童药注册申报的指导性文件仍存在缺位现象，临床试验、资金支持、税收优惠、注册审批等方面有待增设政策支撑^[3]。这一现状导致我国儿童药研发缺少系统性政策支持，零散且协同不足的政策文本难以形成共促儿童药发展的合力，或导致儿童药研发有关政策的实施成效欠佳。

4 建议

儿童用药短缺是全球范围内普遍存在的困境,各国政府多措并举寻求突破。美国和欧盟构建了“激励-强制”多种性质政策相辅相成的儿童药研发政策体系^[22],实践表明该体系成效可观,其中强制性政策的成效尤为突出^[14]。日本对儿童药采取价格激励措施,实践表明可显著提升药企的研发积极性^[23]。本研究基于前述研究成果,借鉴欧美国家和日本的经验,就完善我国儿童药研发政策提出以下建议:

① 加强税收优惠、宣传示范、国际交流合作等供给型工具和需求型工具的运用,构建多元、灵活的政策工具体系,充分发挥两者所具有的直接推动作用和直接拉动作用,并在政策文件中对各子类工具的内涵进行必要的解读和阐述,为政策执行提供精准、清晰的指导。

② 强化价格激励、给予上市独占期等环境型工具的运用,破解儿童药研发高成本低收益的困境,提升药企研发意愿。

③ 根据我国儿童药行业发展的阶段性特点,科学把握各发展阶段中“工具-目标-类型”三者的组合使用,增强协同作用,提升政策合力和政策实效,例如将当下亟待突破的政策目标纳入更高层级的法律规范类和计划行动类文件中,并灵活选用不同政策工具推动其实现。

④ 针对儿童药出台专用法律,并配套发布实施条例、监督管理办法等不同层级的具体细则,以儿童用药立法为抓手搭建系统化、网络化的政策矩阵,可改善研发政策呈碎片化的现状,更好地就行业发展梗阻所在持续发挥政策效力。

⑤ 可参考欧美国家采取的激励与强制有机结合的举措,在持续完善激励性政策的同时,依据我国儿童药行业发展现状逐步探索、稳步推进强制性政策,譬如要求药企申请新药上市时提交儿科研究计划。

参考文献

- [1] 王轩,董凌云,钱莉苹,等.我国相关法规建设对促进儿童用药研发的探究[J].中国药事,2023,37(2):134-141.
- [2] 张花香,王晓玲,华雪蔚,等.中国儿童用药的政策文本研究[J].中国医药工业杂志,2023,54(2):283-288.
- [3] 丁瑞琳,白铭钰,付佳男,等.我国儿童药研制的制约因素分析及政策建议——基于医药企业的视角[J].中国卫生政策研究,2024,17(2):59-65.

- [4] 荣红国,李琪,董玥,等.基于政策工具的我国儿童用药政策分析[J].中国药房,2022,33(14):1665-1670.
- [5] 李新宇,邵蓉,白铭钰,等.我国儿童药保障政策文本量化分析——基于政策工具、政策目标的二维框架[J].中国卫生政策研究,2022,15(8):68-73.
- [6] 陆信,杨勇,黄坚,等.基于政策工具视角下我国儿童用药领域相关政策文本分析[J].药事管理,2025,44(6):1010-1016.
- [7] 朱卓辉,姚东明,江海兰.政策工具视角下我国儿童药物政策文本分析[J].中国医疗管理科学,2024,14(3):19-25.
- [8] 颜建周,邵蓉.为儿童药供应保障政策现状“画像”[J].中国卫生,2022(6):80-83.
- [9] 宋佳,范成鑫,王婉晨,等.利益相关者视角下我国药品集中带量采购政策研究——基于政策工具的文本分析[J].中国卫生政策研究,2022,15(2):11-17.
- [10] 赵玉攀.基于三维框架的中国省级政府数据开放政策分析[J].图书馆学研究,2020(13):40-48,83.
- [11] 何思颐,刘佳宁,李海龙,等.中国儿童药品短缺原因分类体系的系统评价[J].中国循证医学杂志,2024,24(9):1030-1037.
- [12] 王璐,黄哲.真实世界证据改善儿童药物临床试验障碍的对策研究[J].中国新药杂志,2022,31(19):1872-1875.
- [13] 刘敬峰,肖英屹,李新宇,等.国内外儿童抗癫痫药研发上市现状研究及对我国的启示[J].中国药科大学学报,2025,56(5):661-666.
- [14] 蒋建东.我国儿童药品研发与临床用药安全展望[J].中国药物警戒,2023,20(1):1-6.
- [15] 熊维清,卞一州,李光宇,等.我国省级职业健康政策文本量化研究——基于政策工具、责任主体和政策类型的三维框架[J].中国卫生政策研究,2023,16(6):66-72.
- [16] 陈敬,魏国旭,柏林,等.我国儿童用药立法的必要性和可行性研究[J].中国药事,2020,34(7):737-743.
- [17] 高磊,邸云瑞,黄清竹.我国药品注册优先审评制度的进展与相关考量[J].中国新药杂志,2017,26(22):2656-2663.
- [18] 邵蓉,谢金平.《药品管理法》颁布四十年来我国罕见病用药审评审批的改革成效[J].中国药学杂志,2024,59(18):1679-1685.
- [19] 蔡静,杨晴,曾贱吉.基于政策工具的我国创新药政策文本分析[J].广东药科大学学报,2025,41(2):55-61.
- [20] 许淑红,张琦,张林琦,等.探讨我国儿科用药的发展现状及政策层面的思考[J].中国临床药理学杂志,2020,36(12):1760-1767.
- [21] 王晓雅.基于可及性角度的儿童用药品现状研究[D].南昌:江西中医药大学,2020.
- [22] 李勇,胡培杰,张乐彤.国内外儿童用药研发现状及激励政策比较[J].中国药物评价,2023,40(1):12-16.
- [23] 张宸,凡馨,金秋晨,等.日本儿童药定价及价格激励政策对我国的启示[J].中国药房,2021,32(23):2822-2827.

(收稿日期:2025-03-18;修回日期:2025-05-30)

纠正与预防措施来源、管理流程与实施要点及常见问题分析

张平, 林艳君 (国家药品监督管理局食品药品审核查验中心, 北京 100076)

摘要: 纠正与预防措施 (CAPA) 系统是药品生产质量管理体系中的基本质量保证要素之一, 为持续改进药品生产企业质量管理体系提供保障和动力。本文结合国内外药品生产质量管理相关法规指南要求和检查工作实践, 系统梳理了药品生产质量管理中常见 CAPA 来源、管理流程和实施要点; 同时收集分析了近年来国内外药品生产检查 CAPA 管理相关缺陷主要情形和典型问题, 分析原因并提出了 CAPA 管理的改进建议, 以期为药品生产企业提升 CAPA 系统的管理和有效运行提供参考。

关键词: 纠正与预防措施; 实施流程与要点; 常见问题; 改进建议

中图分类号: R95

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2025)12-3776-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2025.12.049

Sources, implementation process, key points and common issues of corrective and preventive actions

ZHANG Ping, LIN Yanjun (*Center for Food and Drug Inspection, National Medical Products Administration Bureau, Beijing 100076*)

Abstract: The corrective and preventive actions (CAPA) system is a fundamental quality assurance within the pharmaceutical quality management system, providing both assurance and impetus for the continuous improvement of the quality management system in pharmaceutical manufacturing enterprises. This article systematically outlined the sources, management processes, and key implementation points of CAPA by integrating relevant requirements of domestic and international regulatory guidelines and inspection practices. We also collected and analyzed the main types of CAPA-related deficiencies and typical problems in recent pharmaceutical manufacturing inspections globally. Furthermore, the article proposed suggestions for enhancing the CAPA system, aiming to provide reference for pharmaceutical manufacturers in optimizing the CAPA system management and its effective operation.

Key words: corrective and preventive action; implementation process and key point; common issue; improvement suggestion

纠正与预防措施 (corrective and preventive actions, 简称“CAPA”)是药品生产质量管理体系中的基本质量保证要素之一, 通过系统性识别和分析已发生的偏离、非预期或潜在风险, 针对根本原因采取纠正与预防措施, 以消除或控制潜在风险, 防止其转化为实际偏差或偏差重复发生的管理工具。我国《药品生产质量管理规范》(GMP)明确规定, 企业应建立 CAPA 系统, 对投诉、召回、偏差、自检及外部审计等进行调查并采取 CAPA^[1]; 美国食品药品监督管理

局 (FDA) 的《质量体系规范》、欧洲药品管理局 (EMA) 和国际药品检查合作计划 (PIC/S) GMP 指南、国际人用药品注册技术协调会 (ICH) Q10 指南、世界卫生组织 (WHO) 986 号技术报告附录 2 等国际法规和指南也明确药品生产企业须具备识别问题、制定并实施 CAPA、评价效果的完整能力, 同时强调 CAPA 系统应与质量风险管理相结合^[2-6]。CAPA 系统与其他质量保证要素相互关联, 为持续改进药品生产企业质量管理体系提供动力^[7-8]。

与此同时,如何保障 CAPA 系统有效运行,长期以来都是药品生产企业质量管理的难点,在多个国内外官方检查和研究中持续被提及^[9-12]。本文结合国内外药品生产质量管理规范相关法规要求和检查工作实践,系统梳理了药品生产企业相关的 CAPA 来源、管理流程和实施要点,同时汇总分析了近年来国内外药品生产检查相关缺陷主要情形和典型问题,提出了改进建议,以期为药品生产企业提升 CAPA 系统管理和有效运行提供参考。

1 CAPA 来源与启动因素

药品生产和质量管理活动中,对于已发生的质量事件或潜在的风险预警等多种情形应根据企业质量管理模式,基于质量风险管理原则,在适宜的质量保证要素下制定并实施 CAPA。实践中,常见关联 CAPA 的要素主要包括内外部审计/检查发现缺陷、偏差、检测结果超标(OOS)、投诉、退货、召回、监测数据趋势分析或产品年度质量回顾分析超趋势或预期等。

内外部审计/检查发现缺陷是 CAPA 的重要来源。无论是企业内部的定期自检、现场质量保证人员(QA)日常监督巡视、邀请第三方或集团开展的审计,还是监管机构检查发现的缺陷,基于风险将相应整改纳入 CAPA 系统管理,对保障整改全面系统以及防止类似问题再次发生尤为重要。否则,整改极可能局限于表面或“点对点整改”,原因调查不全面深入,导致制定的 CAPA 不充分、实施不及时或有效性评价缺失。部分缺陷的整改措施包括对已有程序或设施设备进行变更的,应关联启动变更控制程序,实现 CAPA 与其他保证要素的互联。

偏差是 CAPA 的常见来源之一。偏差发生时,须及时启动偏差处理程序,立即采取措施进行纠正,开展全面的调查以确定根本原因和对评估的影响,进而制定措施纠正与预防类似偏差重复发生。偏差处理时效性强,相关 CAPA 及其有效性评估可在偏差管理本身的流程中完成;如涉及 CAPA 及其有效性确认耗时长,或质量管理各要素程序设计要求等,也可在偏差调查锁定根本原因后,关联启动单独的 CAPA 管理程序,制定并持续追踪 CAPA 实施和有效性确认情况。具体采用哪种方式需结合偏差处理时限、CAPAs 复杂程度、偏差和 CAPA 程序的设计,但总体来说,偏差调查锁定原因后关联启动 CAPA 程序的管理方式更有利于 CAPA 实施追踪、有效性确认和回顾分析^[7]。值得注意的是,部分偏离了规定的操

作或结果被定义为“异常事件”而非偏差,这种管理方式存在部分“异常”不能被充分调查、及时纠正预防,导致更大的偏离发生的风险,如采用,须非常清晰且合理地说明“异常事件”的具体情形、判定依据和审核流程。

OOS,需启动调查,分析根本原因,并采取针对性 CAPA^[13],尤其在确认是系统性问题(如方法或仪器缺陷等)时。相应 CAPA 的制定、实施和有效性评价的管理方式与偏差来源的 CAPA 类似,可选择在 OOS 流程中完成,但仍推荐确定原因后启动 CAPA 程序管理,更有利于 CAPAs 执行情况的追踪、评价和回顾分析。部分企业将实验室管理或检验过程发生的偏离定义为实验室“异常事件”,独立于偏差体系管理,如上文所述,该种管理方式存在风险,应有明确情形界定、判定依据和审核流程,如已采用,应对其调查和 CAPAs 的充分性进行重点审核。

在监测数据趋势分析和产品年度质量回顾方面,当数据分析揭示出产品关键质量属性的不良趋势、工艺参数漂移、重复性偏差或投诉率升高等系统性问题时,需要启动 CAPA。企业要注重及时对各类关键数据进行收集和趋势分析,如关键物料、中间产品和成品检验、稳定性考察、环境和工艺用水监测、关键工艺参数和中间过程控制等数据;同时,对设备故障、维修频率和原因,偏差、OOS/超趋势(OOT)、投诉等发生的频率、类型、严重程度及涉及的批次、工序或设备等,变更类型、数量和实施情况,供应商的审计情况和物料验收合格率等也应定期进行分析。上述分析如识别到不良趋势或潜在风险,应及时调查和采取 CAPA,保障工艺受控和产品质量稳定。

此外,当患者或医疗机构投诉反馈的产品质量问题(如包装破损、异物混入)或药品不良反应,或者因药品质量问题发起退货或召回时,须对药品生产、储存、发运等各个环节进行调查,找出根本原因并采取 CAPA。另外,在开展质量风险评估(QRA)后,当识别出的中/高风险因素缺乏充分控制措施,必须输出 CAPA 来降低风险至可接受水平;在质量管理评审(QMR)中,基于质量保证和实现要素等输入和审议,若发现质量方针目标未达成、体系流程存在漏洞或资源调配不足等战略性或系统性问题,管理层应决策发起 CAPA,以确保质量管理体系(QMS)的持续改进。

尽管 CAPA 的来源涉及多个方面,但自检或集团审计、质量相关的数据趋势分析和回顾、质

量风险评估和管理评审等确是企业自主预防和持续改进质量管理核心要素。

2 CAPA 管理流程与实施要点

系统的 CAPA 管理流程一般分为 CAPA 启动与分析、CAPA 制定与实施、CAPA 有效性评价和 CAPA 回顾分析四个阶段（见图 1）。

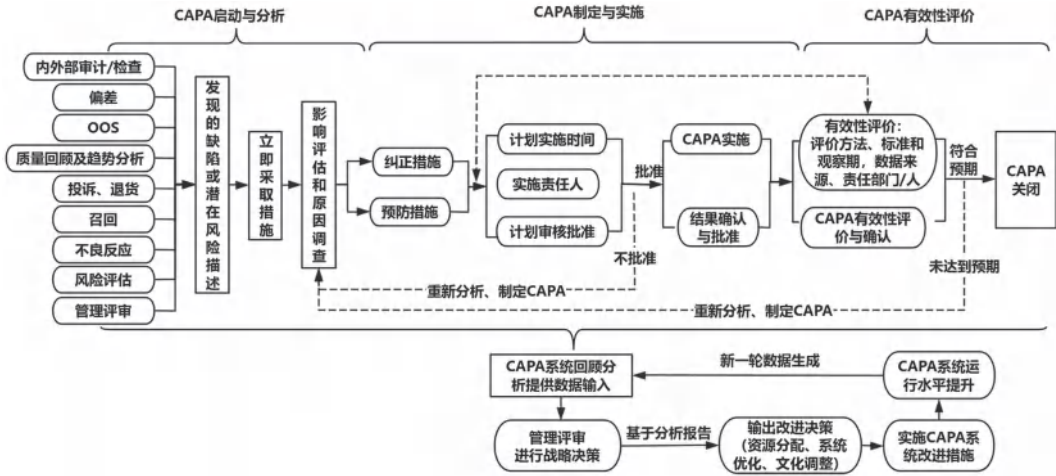


图 1 基于持续改进的 CAPA 管理流程模型

Fig 1 CAPA management process model based on continuous improvement

2.1 CAPA 启动与分析阶段

当上述来源关联的 CAPA 启动和分析时，一是要详细记录缺陷或潜在的风险来源、问题描述、发生时间、涉及产品、工序或环节等信息。当生产偏差或设施设备故障后，相关岗位人员常会在现场立即采取措施防止事件的进一步发展，这些立即采取的措施也应被详细记录；二是影响评估，需判断问题的严重程度和影响范围，包括对产品质量和有效性直接影响（质量属性、稳定性等），以及对已放行/上市产品、相关批次/产品、验证状态（如工艺、清洁和分析方法）、文件/记录/数据可靠性、质量管理体系和法规符合性的影响等；三是根本原因调查与分析，这是质量管理事件处理中最关键、最具挑战性的环节，必须通过严谨的数据分析和逻辑推理，运用各种工具（如 5Why、鱼骨图、因果矩阵和故障模式与影响分析等），从“人、机、料、法、环、测、管理系统（资源分配、质量文化、变更控制、风险管理和关联 CAPA 的有效性）”等方面深入调查分析。应注意，影响评估和根本原因调查绝非简单的“合格/不合格”判断、猜测或归咎于“人为失误”，而是一个基于风险，由多部门参与，并有充分证据支持的科学决策过程。这个评估和调查过程必须被完整、清晰地记录，其结论应由有资质的质量人员批准。对于内外部审计/检查缺陷、趋势分析和回顾等启动的 CAPA，需按上述开展系统的影响评估和原因调查，但对于偏差、OOS 或投诉等来源的 CAPA，影响和原因调查已在相应质量要素中完成，在 CAPA 记录中只需进行结果描述和关

联桥接即可。

2.2 CAPA 制定与实施阶段

该阶段需针对根本原因制定纠正措施和预防措施，尤其要注意 CAPA 的充分性和完整性，多部门和多领域专家的共同参与是重要保障。制定的实施计划需明确责任部门/人、完成时限，计划需经审核批准后实施，CAPA 的实施计划应基于质量风险管理原则，需优先保障高风险相关的 CAPA 实施；进入实施阶段，严格按照计划执行纠正预防措施，有专人持续跟踪实施情况，并对实施结果进行审核确认和收集相关证据材料。

2.3 CAPA 有效性评价阶段

CAPA 实施完成后，要对措施的有效性进行跟踪和确认，该阶段是决定 CAPA 成功与否、能否关闭的关键环节。开展有效性确认，应预先确定评价方法、标准和观察期，尽可能使用具体的、可量化的和多维度的方法和指标（如偏差再发率、检测合格率等数据对比或现场确认等方式），并明确有效性评价的数据来源、收集责任部门/人，同时要确保足够的、与风险相匹配的观察期，避免“立即检查评价”。在预定的观察期内，指定的负责人应根据指定的方法收集客观数据和证据，并及时将收集到的数据、现场确认的情况与预设的标准进行比对分析，同时检查是否对其他相关流程产生了积极的效应或未预期的负面影响。如果观察期内，检查发现不符合预设评价标准或 CAPA 对其他流程产生负面影响的情况，则说明 CAPA 措施可能未能针对真正的根本原因制定，或措施本身存在缺陷，应重新进行评

估、调查、制订措施并实施，直至问题得到有效解决。只有观察期结束且所有收集客观数据均证明 CAPA 有效性符合预期，方可批准关闭 CAPA。有效性评价的过程、收集的数据、分析的结果和最终的结论都必须被完整、清晰地记录并按规定存档，形成可追溯的证据链。

2.4 CAPA 回顾分析阶段

CAPA 系统的运行情况需定期回顾分析。分析内容可以考虑：CAPA 来源和数量，相应趋势变化和变化原因（如问题增多、监测能力增强等）；CAPA 周期（开启至关闭时间）及瓶颈阶段，按时完成率及超期的主要原因（资源、技术难度、优先级等）等执行效率分析；根本原因分布、调查工具应用、问题重复发生率、有效性评价通过率等 CAPA 系统总体运行和有效性分析项。我国 GMP 指南提到了集中型管理和分散型 CAPA 管理策略^[7]，其中，集中型管理策略对 CAPA 的回顾分析更具优势，但实际执行层面，多数药品生产企业 CAPA 管理采用两者混合型方式。企业需建立 CAPA 台账并设置专人管理，基于企业部门设置、人才资源等因素在 CAPA 管理规程中明确管理模式和策略。采用分散型或混合型管理策略的，在分析和评价 CAPA 系统运行情况时，不能忽略分散在其他要素中的 CAPA 执行、完成和有效性确认情况，要通过流程明确收集分析这类 CAPA 的具体周期和方法，并明确责任部门或负责人。

CAPA 执行回顾分析情况应提交管理高层进行质量管理评审，从资源分配、流程方法、技术工具、文化调整等方面输出管理改进策略和具体措施，促进 CAPA 系统管理运行水平持续提升。

3 CAPA 管理常见问题

本文收集整理了国内外药品生产企业检查^[9-12]CAPA 相关问题 365 项，分类整理出现问题主要集中在 CAPA 识别与分析不足、CAPA 制定与实施不足、CAPA 有效性评价不足、CAPA 回顾分析不足四个方面（见图 2）。由于缺陷合并和组合的原因，部分缺陷同时涉及多个方面，故各类缺陷占比总和为 108.77%，也表明相关方面缺陷之间关联性较大。

3.1 CAPA 识别与分析

约 28% 缺陷来源于 CAPA 识别与分析不足，典型缺陷为：① 多要素识别风险或缺陷未关联启动 CAPA 程序，如质量回顾发现不良趋势，投诉、外部审计、自检、QA 日常现场监督等方面发现问题的整改未纳入 CAPA 进行管理，进而导致整改措施的执行追踪和有效性不足，问题重复发生；② CAPA 管理文件规定不明确，如未定义和区分

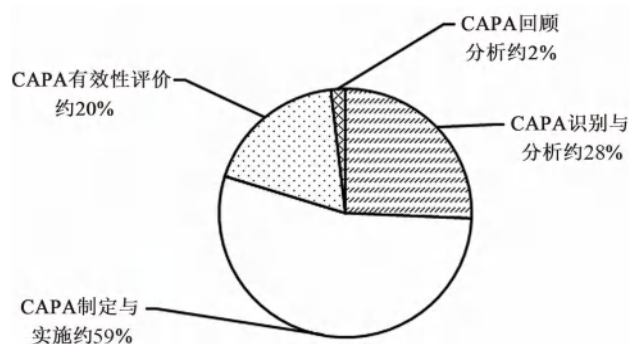


图 2 CAPA 管理常见问题分布情况

Fig 2 Distribution of common issues on CAPA management

纠正措施和预防措施、未明确 CAPA 执行职责、CAPA 台账缺失或未受控等；③ 自检和外部审计缺陷相关 CAPA 根本原因调查分析或影响评估不足等，表现为调查仅停留在表面原因，未追溯至管理体系或工艺设计层面；④ 未对 CAPA 来源进行风险评估和分级管理。

3.2 CAPA 制定与实施

约 59% 缺陷为 CAPA 制定与实施不足，占比最大，典型缺陷为：① CAPA 措施缺失或不完整，如缺少纠正措施或预防措施，或制定的 CAPA 措施不全面，如执行了调整参数 / 更换设备的措施，但未对调整参数 / 更换设备后的功能进行确认等；② CAPA 措施缺乏针对性或不合理，如未针对根本原因制定 CAPA 措施，CAPA 措施制定不合理，CAPA 本身评估不足或依据不足等；③ CAPA 执行效率不足，如未明确 CAPA 执行时限导致 CAPA 执行不及时，未按计划执行 CAPA 措施，随意延期执行某项 CAPA 措施等；④ CAPA 记录不完善，未附 CAPA 措施执行和有效性评价的证据材料；⑤ CAPA 流程多个环节的审核不到位，如未对 CAPA 执行结果进行确认，评估内容和 CAPA 输出措施不一致，变更 CAPA 措施未制定计划，在 CAPA 措施执行中再次发生问题时未重新评估原有措施的充分性等；⑥ CAPA 与其他质量要素脱节，如 CAPA 涉及变更的，未能及时启动变更控制。

3.3 CAPA 有效性评价

约 20% 缺陷为 CAPA 有效性评价存在不足，虽然该部分占比不是最大，但实际该类问题却是导致大多数企业问题重复发生的关键一环，需引起重视，其中典型缺陷为：① 有效性评价缺失，问题重复发生，CAPA 措施执行完成当天即认为 CAPA 有效，关闭了 CAPA；② 未制定合理的 CAPA 有效性评估周期和内容，有效性评价指标和标准未明确或不合理；③ CAPA 有效性评价数据跟踪确认不及时、有效性评价证据不足，确认时间已到期，但未及时收集数据并进行评价，部分问题重复发生等。

3.4 CAPA 回顾分析

CAPA 回顾分析方面典型缺陷主要表现为：①未按规定回顾 CAPA、未建立 CAPA 定期跟踪机制；②缺少 CAPA 回顾内容和周期；③未建立有效的 CAPA 回顾分析或趋势分析机制，以及 CAPA 系统数据趋势分析不足，仅关注单个问题的解决，缺乏对历史数据的汇总分析，难以识别潜在的风险，如某设备在 1 年内发生多次轻微故障，每次均被单独处理，未通过相关 CAPA 趋势分析发现设备老化等系统性问题。

4 总结与建议

药品生产企业执行 CAPA 对于保障药品质量、确保生产合规性以及提升企业质量管理水平具有至关重要的意义。然而，从当前国内外检查情况来看，企业在 CAPA 识别与分析、措施制定与实施、有效性评价、回顾和趋势分析等方面存在诸多问题，究其原因主要与企业质量文化与水平、资源不足等有关。为了改进这些问题，建议药品生产企业：

一是提高对 CAPA 管理重视程度，真正认识到其对于药品质量和企业发展的重要性，强调 CAPA 的目的是改进，而非追究责任，倡导“不惩罚报告”文化。积极、有序、有效地开展 CAPA 回顾和分析，并将相关结果纳入管理评审，通过数据趋势分析提前识别潜在风险，实现从“被动应对”到“主动预防”的转变，并基于质量风险管理原则决策资源分配，如分析显示 CAPA 管理和调查人员不足，则应考虑增加质量管理人员数量、加强相关技术人员培训、引入外部专家资源或发起对 CAPA 系统本身的优化项目；如果分析表明某个领域（如陈旧的生产线或设备）是导致频发偏离和 CAPA 的根本原因，管理层应决策批准额外的预算启动技术升级或改造项目。二是建立健全清晰和实操性强的 CAPA 管理相关流程文件、记录和系统；明确各部门和人员在执行过程中的职责和时限，以及 CAPA 执行和有效性评价证据收集等要求；基于知识管理科学说明根本原因分析和风险评估工具的使用要求，并提供最佳实践案例；在根本原因调查和影响评估、制定 CAPA 措施和 CAPA 有效性评价方法标准等关键环节建立跨部门和主题专家评审机制。三是考虑适时实施电子化的 CAPA 管理系统，实现 CAPA 管理预设关键节点自动提醒、周期跟踪、数据自动分析和仪表盘展示，提升管理效率和可视化程度；同时考虑将电子化的 CAPA 系统与偏差、投诉、审计等其他质量管理要素打通，自动关联和集成数据，便于分析趋势和追溯。总之，CAPA 的本质是“以问题为导向的持续改进”，药品生产企业需将其从

“被动合规”转变为“主动提升”的工具，通过闭环管理和持续改进不断提升药品生产质量管理水平。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 药品生产质量管理规范（2010 年修订）（卫生部令第 79 号）[EB/OL]. (2011-01-17) [2025-09-10]. <https://www.nhc.gov.cn/wjw/bmgz/201102/62dcfa1956c347759674547dcaead345.shtml>.
- [2] FDA. FDA 21CFR Part 820 Quality System Requirements [EB/OL]. (1997-06-01) [2025-09-10]. <https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-H/part-820/subpart-J>.
- [3] ICH. ICH Q10 Pharmaceutical Quality System [EB/OL]. (2008-06-04) [2025-09-10]. <https://database.ich.org/sites/default/files/Q10%20Guideline.pdf>.
- [4] PIC/S. PIC/S Guide To Good Manufacturing Practice For Medicinal Products Part I [EB/OL]. (2023-08-25) [2025-09-10]. <https://picscheme.org/docview/6606>.
- [5] European commission. EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use [EB/OL]. (2023-08-25) [2025-09-10]. https://health.ec.europa.eu/document/download/e458c423-f564-4171-b344-030a461c567f_en?filename=vol4-chap1_2013-01_en.pdf.
- [6] WHO. WHO TRS 986-Annex 2: WHO good manufacturing practices for pharmaceutical products: Main principles [EB/OL]. (2014-10-01) [2025-09-10]. <https://www.who.int/publications/m/item/trs986-annex2>.
- [7] 国家药品监督管理局食品药品审核查验中心. 药品 GMP 实施指南 [M]. 第 2 卷. 第 2 版. 北京: 中国医药科技出版社, 2023: 237.
- [8] 宁希. 成功实施 CAPA 管理的 12 条策略 [J]. 上海质量, 2024 (8): 28-31.
- [9] 浙江省药品监督管理局. 《检查工作案例释疑（二）药品生产 CAPA 有效性探析》[EB/OL]. (2024-04-07) [2025-09-10]. https://mpa.zj.gov.cn/art/2024/4/7/art_1229893274_5657536.html.
- [10] 国家药品监督管理局. 《2016 年度药品检查报告》[EB/OL]. (2017-06-01) [2025-09-10]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/gzgj/gzgjyp/20170601170701261.html>.
- [11] 国家药品监督管理局. 《浙江省药品生产企业飞行检查情况通报（2018 年第一期）》[EB/OL]. (2018-10-22) [2025-09-10]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/ypggtg/ypgmprzh/ypgmprzhgg/ypgmprshj/20181022000001554.html>.
- [12] FDA. WARNING LETTER Gussyup LLC dba Private Label Grooming MARCS-CMS 709488—JULY 09, 2025 [EB/OL]. (2025-07-09) [2025-09-10]. <https://www.fda.gov/inspections-compliance-enforcement-and-criminal-investigations/warning-letters/gussyup-llc-dba-private-label-grooming-709488-07092025>.
- [13] ICH. ICH Q7 Good Manufacturing Practice Guide For Active Pharmaceutical Ingredients [EB/OL]. (2000-11-10) [2025-09-10]. <https://database.ich.org/sites/default/files/Q7%20Guideline.pdf>.

（收稿日期：2025-09-16；修回日期：2025-10-22）



科技期刊世界影响力指数 (WJCI) 报告 (2024)

收录证书

This is certificate for

中南药学

(ISSN 1672-2981 CN 43-1408/R)

to be indexed in

*World Journal Clout Index(WJCI) Report of
Scientific and Technological
Periodicals(2024)*

项目联合研发单位 Project research units:

中国科学技术信息研究所 Institute of Scientific and Technical Information of China

《中国学术期刊 (光盘版) 》电子杂志社有限公司 Chinese Academic Journal(CD Edition)

Electronic Publishing House Co.Ltd

清华大学图书馆 Library of Tsinghua University

万方数据有限公司 Wanfang Data Co.Ltd

中国高校科技期刊研究会 Society of China University Journals

中国科学技术期刊编辑学会 China Editology Society of Science Periodicals

DMT 7500 二维液相色谱微型质谱仪

血药浓度利器 门诊化床旁化质谱系统

可移动至临床科室

反应速度快，工作曲线长期稳定

极简样品处理

湖南德米特仪器有限公司成立于2014年12月，是一家致力于自动化色谱与质谱生产、二维色谱柱体系研制、生物测定方法提供以及临床药物检测整体化方案设计的高新技术企业。公司历经数年研发，掌握色谱与质谱控制性技术，持续进行尖端临床色谱质谱技术研制。

DMT 7500 拥有高稳定的质谱分析能力，测定种类含括 250 多种药物；并具备仪器、色谱柱、试剂、质控完整的医械与 IVD 资质，符合我国 2018 年颁布的《医疗器械分类目录》中的要求。

DMT 7500 微型化机身对实验室占地更加友好，移动式机身让床旁化快速测定成为可能；DMT 7500 具备 30min 冷开机发放首报告的快速反应能力，是门急诊 TDM 项目开展的首选利器！

- ||| 关键流动相产品标准化
- ||| 质量体系：质控校准品溯源体系标准化
- ||| 高端自动化技术
- ||| 高效能测定能力
- ||| 床旁化测定技术
- ||| 专利核心技术
- ||| 全面合规产品系统



Demeter 德米特®

湘械广审(文)第260202-23163号

官方网站: <https://www.hndemeter.com>

服务热线: 4000-176-898 董经理: 137-8718-7146

电子邮箱: market@anax.com.cn

版本号: 2024.05.06



德米特公众号