



中南药 学

ZHONGNAN YAOXUE

月刊 2003年4月创刊 第22卷 第6期(总第221期) 2024年6月20日出版

目 次

顾问

周宏灏

主编

李焕德

社长

张毕奎

编辑部主任

邬志娟

主管单位

湖南省食品药品监督管理局

主办单位

湖南省药学会

编辑: 中南药 学编辑委员会

地址: 长沙市人民 中路 139 号中南

大学湘雅二医院内

出版: 《中南药 学》编辑部

发行: 湖南省报 刊发行局

印刷: 长沙建 华印务有限公司

订阅: 全国各地 邮局

定价: 每期 30.00 元, 全年 360.00 元

邮编: 410011

电话: (0731) 82258487/84895602

传真: (0731) 82258487

邮发代 号: 42-290

投稿网 址: <http://znyx.cbpt.cnki.net>

email: znyxzz2003@vip.163.com

广告经 营许可 证: 4300004000764

中国标 准连续 出版物 号

ISSN 1672-2981

CN43-1408/R

2024 年 版 权 归 《 中 南 药 学 》

编辑 部 所 有

研究论文

- (1399) 脑络欣通抗缺血性脑卒中后脂质过氧化和对线粒体损伤的保护作用研究 江慧慧, 洪璐, 刘明明, 等
- (1406) 基于UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS技术的静宁方入脑、入肠及粪便成分分析 胡盼祥, 张萍芝, 阮意丹, 等
- (1412) 钩藤内生放线菌 *Streptomyces* sp. IMW-B19 化学成分研究 郭永华, 赵中振, 徐畅, 等
- (1418) 基于LC-MS/MS法的芍药苷在正常和肝内胆汁淤积大鼠体内的药代动力学比较研究 杨梦换, 蒋罡, 陈卫东, 等
- (1423) UPLC-Q-TOF-MS 联合网络药理学探究苦参治疗湿疹的作用机制 史晓璇, 李茗晞, 王艳, 等
- (1429) 抗 TREM2 抗体的制备及生物学活性的初步研究 胡钰清, 冯艳平, 梁家蓓, 等
- (1435) 红景天苷脂质体的构建及其对高糖诱导 ARPE-19 细胞氧化损伤的保护作用 丁文华, 汪凯康, 贾文, 等
- (1441) 基于代谢组学的五味子贮藏后挥发性成分变化研究 鲁瑶, 宋奇, 杨迪, 等
- (1449) 新型丙烯酸类 GPR40 激动剂的结构优化及其生物活性研究 郭凯蕾, 魏朝, 张东旭, 等
- (1456) 桔梗药渣衍生的活性炭对亚甲基蓝的吸附研究 刘寒蒙, 吴晶, 赵娟娟, 等
- (1462) 新型缓释盐酸安非他酮包衣微囊的制备、表征与体外评价 杨泉竹, 韩美苹, 陈天祥, 等
- (1470) 聚乙二醇修饰的树状大分子负载卡巴他赛的制备工艺优化及抗肿瘤活性研究 滕艺, 韩尚聪, 孙勇
- (1479) 盐酸氮萘斯汀鼻喷雾剂仿制药与原研药喷雾特性的比较研究 李文博, 童颖
- (1484) 新型布鲁顿氏酪氨酸激酶蛋白水解靶向嵌合体 (BTK PROTAC) 的设计合成及活性评价 许子威, 周卯, 高安慧, 等
- (1491) 坦度螺酮透皮贴剂的制备及评价 符渝昕, 杜卓芳, 程泽能

《中南药学》杂志第五届编委会

主编

李焕德

副主编 (按姓氏笔画排列)

王 玉 向大雄 刘 韶 刘芳群
孙国祥 孙铁民 苏薇薇 张毕奎
范国荣 赵志刚 原永芳 潘卫三

编委 (按姓氏笔画排列)

丁劲松 于海洋 马恩龙 王 玉
王 峰 王 珊 王立辉 王永军
王淑梅 王朝辉 文晓柯 方平飞
尹 桃 邓银华 左美玲 左笑丛
卢海儒 史志华 冯 星 边 原
吕永宁 朱运贵 朱荣华 向大雄
刘 娜 刘 韶 刘文虎 刘艺平
刘芳群 刘茂柏 刘建平 刘高峰
刘塔斯 刘雁鸣 汤海峰 孙 进
孙平华 孙国祥 孙铁民 劳海燕
苏薇薇 李 昕 李 勇 李文龙
李文莉 李顺祥 李晓宇 李健和
李湘平 杨志平 杨星钢 杨献文
肖 雪 肖贵南 何 丹 何江江
何鸽飞 余自成 谷福根 张 俐
张 峻 张毕奎 张洪文 陈 力
陈 琦 陈 碧 陈卫东 陈西敬
陈勇川 武新安 范国荣 金鹏飞
周 权 屈 建 孟宪生 赵立波
赵志刚 姜志平 姜德建 娄月芬
宫 建 祝德秋 秦红岩 袁 成
袁 易 贾素洁 夏道宗 原永芳
徐 珽 徐 萍 徐必学 徐华丽
高利臣 郭 韧 郭怀忠 郭建军
唐 芳 曹 玲 常福厚 章越凡
巢志茂 彭文兴 董亚琳 董得时
蒋孟良 覃 丽 傅 强 温金华
谢 诚 谢奕丹 睢大策 肇丽梅
翟 青 黎 敏 颜 苗 潘卫三
魏高文

- (1498) 氯吡格雷阿司匹林片制备及体外溶出一致性评价
..... 钱方, 伍贤志
- (1505) 白藜芦醇对血虚证小鼠模型的改善作用及诱导红系分化机制研究
..... 李佳奇, 何睿, 张一童, 等
- (1512) 吡非尼酮亚微乳的制备与评价..... 王欣茹, 田葳, 孟扬, 等
- (1520) 基于蛋白降解靶向嵌合体的 IRAK4 降解剂的设计、合成及生物
活性评价 孙自由, 周卯, 白海云, 等
- (1528) 新型大环 Bcl-2 抑制剂的设计合成及生物活性评价
..... 查永骏, 杨灿, 白海云, 等
- (1537) 三叶片抑制金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌作用的关键组分挖掘
..... 米卓鑫, 齐育麟, 李玉红, 等
- (1544) 基于血清药物化学和网络药理学研究双虎肿痛宁酞剂抗炎镇痛的
药效物质和作用机制 黄欣, 黄晓梅, 梁芬兰, 等
- (1550) 基于指纹图谱、网络药理学预测黄芪“补气升阳”功效的质量标
志物 王七龙, 王育朋, 井亚江, 等
- (1558) 欣力康胶囊对血液性肿瘤细胞的增殖抑制作用研究
..... 唐欣欣, 胡小蓓, 苏明波, 等
- (1566) 芹菜素对 MHCC97H 源性球细胞对 5- 氟尿嘧啶敏感性的影响
..... 乐伊婕, 曹建国, 杨小红, 等
- (1571) 羟基积雪草苷通过抑制 NF- κ B/NLRP3 细胞焦亡通路缓解间质性
膀胱炎 李琪, 浦东, 王思思, 等
- (1577) 二维液相色谱检测脑胶质瘤患者同步放化疗及辅助化疗期间的血
浆替莫唑胺峰浓度 李琳琳, 张升申, 马辉辉, 等
- (1582) 新型 GPR40 激动剂 ADD-16 及其钠盐平衡溶解度和油水分配系
数的研究 马丽莎, 林佳艳, 李琦, 等

综述

- (1587) 食欲素受体激动剂研究进展..... 夏立博, 任吉祥
- (1594) 线粒体在脂肪细胞功能中的相关研究进展
..... 郭雪莹, 黄春晓, 相新新
- (1602) 中药在控制耐药菌 *Acinetobacter baumannii* 繁殖中的研究进展
..... 杨运, 刘娅, 彭春红, 等
- (1609) 降糖西药治疗非酒精性脂肪性肝病并发 2 型糖尿病的研究进展
..... 李海洋, 熊媛琴, 王景淑, 等
- (1615) 天麻素药理作用及临床应用研究进展
..... 刘潇聪, 张玉苗, 潘亚磊

青年编委 (按姓氏笔画排列)

丁 晓 于世慧 王 刚 王 洪
 王春江 方伟进 孔维军 兰丽丽
 朱志红 刘 宏 刘心如 刘丽华
 刘宏飞 刘剑敏 刘梦扬 孙 逸
 孙万阳 孙丙军 孙晓慧 苏 丹
 杜恩明 李 丹 李 娟 李语玲
 李新刚 肖朝江 吴成军 邱玉玲
 何 艳 邹振兴 张 弘 张 凭
 张妙红 张纯刚 张程亮 陈 倩
 陈 璐 陈国宁 陈富超 呼庆勋
 罗 聪 金 锐 周志旭 赵 亮
 赵 娣 胡 楠 姜 雷 贾王平
 徐 硕 徐文峰 郭海彪 黄 芳
 黄亚辉 梅升辉 龚力民 梁光平
 寇龙发 董德刚 蒋跃平 蒋德旗
 韩立峰 韩晓芳 韩晓鹏 舒 畅
 曾贵荣 蒙光义 廖德华 潘 昊
 魏 博

编辑: 邬志娟 彭金飞 李 科
 陆窈窈

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。

(1621) 间充质干细胞治疗脓毒症性急性肺损伤的基础研究和临床应用进展 刘艺, 卢旖妮, 张雄, 等

中药与临床

(1628) 基于体质与证候辨析的痰湿体质主药主方筛选 黄博臻, 宋姗姗, 王亮, 等

(1633) 国家中药复方专利治疗肾结石的用药规律分析 叶雯佳, 黄念文, 于珊珊, 等

(1638) 基于 Apriori 算法与网络关联的含桃仁方剂应用规律探析 邹远荣, 夏泽冰, 黄建萍, 等

医院药学

(1645) 基于集成学习的万古霉素血药浓度及不良反应预测研究 黄魏, 李逃明, 路经纬, 等

(1652) 优化后的触发器在心血管疾病患者不良事件监测中的适用性分析 林晓霞, 李佳, 杨亚军

(1658) 112 例新型冠状病毒感染患者使用阿兹夫定片的不良反应分析 兰博, 李桂德, 李伟斯, 等

(1662) 奈玛特韦 / 利托那韦潜在药物相互作用对新型冠状病毒感染治疗的影响: 基于倾向评分匹配的回顾性研究 王璐, 曾露, 桂玲, 等

(1668) 甘精胰岛素生物仿制药与原研药治疗 2 型糖尿病临床有效性及安全性的 Meta 分析 刘群, 朱明亮, 金秋阳, 等

药事管理

(1674) 湖南省药物临床试验机构首次检查回顾分析及工作建议 杨泽华, 李丹, 王弼君, 等

药品不良反应

(1678) 托珠单抗致严重皮肤反应的病例分析及文献回顾 郑高峰, 邱瑞, 李金兰

(1682) 白蛋白结合型紫杉醇疑致神经性耳聋 1 例 刘尧, 杨进, 任常谕, 等

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*b*A4*286*zh*P*30.0*45*2024-6

本期责任编辑: 陆窈窈, 彭金飞, 邬志娟, 李科

英文编辑: 周静

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 22, Number 6 June 20 2024

Consultant

ZHOU Hong-hao

Editor-in-Chief

LI Huan-de

Chief of Editorial Office

ZHANG Bi-kui

Chief of Editorial Department

WU Zhi-juan

Directed by

Food and Drug Administration of
Hunan Province

Edited by

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

Tel

(0731) 82258487/84895602

Fax

(0731) 82258487

Website of Authors

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

Email

znyxzz2003@vip.163.com

Advertisement Publishing Certification

4300004000764

CONTENTS IN BRIEF

- (1399) Effect of NaoluoXintong on anti-lipid peroxidation injury and mitochondrial damage after ischemic stroke
..... *JIANG Hui-hui, HONG Lu, LIU Ming-ming, et al.*
- (1406) Brain, intestinal and feces components of Jingning formula based on UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS technology
..... *HU Pan-xiang, ZHANG Ping-zhi, RUAN Yi-dan, et al.*
- (1412) Chemical components of endophytic actinomycetes *Streptomyces* sp. IMW-B19 from *Uncaria rhynchophylla*
..... *GUO Yong-hua, ZHAO Zhong-zhen, XU Chang, et al.*
- (1418) Pharmacokinetics of paeoniflorin in normal and intrahepatic cholestatic rats by LC-MS/MS
..... *YANG Meng-huan, JIANG Gang, CHEN Wei-dong, et al.*
- (1423) UPLC-Q-TOF-MS combined with network pharmacology for the mechanism of action of *Sophora flavescens* in the treatment of eczema
..... *SHI Xiao-xuan, LI Ming-xi, WANG Yan, et al.*
- (1429) Preparation of anti-human TREM2 antibody and preliminary study of its biological activity
..... *HU Yu-qing, FENG Yan-ping, LIANG Jia-bei, et al.*
- (1435) Construction of salidroside liposomes and their protective effects on oxidative damage in ARPE-19 cells induced by high glucose
..... *DING Wen-hua, WANG Kai-kang, JIA Wen, et al.*
- (1441) Volatile metabolomics of *Schisandra chinensis* before and after the storage
..... *LU Yao, SONG Qi, YANG Di, et al.*
- (1449) Structural optimization and bioactivity of a novel acrylic GPR40 agonist
..... *GUO Kai-lei, WEI Zhao, ZHANG Dong-xu, et al.*
- (1456) Adsorption of methylene blue by activated carbon derived from *Platycodon grandiflorus* residue
..... *LIU Han-meng, WU Jing, ZHAO Juan-juan, et al.*
- (1462) Preparation, characterization and in vitro evaluation of a novel sustained-release bupropion hydrochloride coated microcapsules
..... *YANG Quan-zhu, HAN Mei-ping, CHEN Tian-xiang, et al.*
- (1470) Optimization of preparation and antitumor activity of PEGylated dendrimer loaded cabazitaxel
..... *TENG Yi, HAN Shang-cong, SUN Yong*

Postal code

42-290

PublishEditorial Department of Central
South Pharmacy**Subscribe**Post office nationwide for
subscription please contact the
Publishing House of our journal**Price**

¥ 30.00 an issue

¥ 360.00 a year

CSSN

ISSN 1672-2981

CN43-1408/R

**Copyright 2024 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.

- (1479) Spray characteristics between generic and original azelastine hydrochloride nasal spray *LI Wen-bo, TONG Ying*
- (1484) Design, synthesis and biological evaluation of novel compounds of BTK PROTAC *XU Zi-wei, ZHOU Mao, GAO An-hui, et al.*
- (1491) Preparation and evaluation of tandospirone transdermal patches *FU Yu-xin, DU Zhuo-fang, CHENG Ze-neng*
- (1498) Preparation and in vitro dissolution consistency of clopidogrel and aspirin tablets *QIAN Fang, WU Xian-zhi*
- (1505) Effect of resveratrol on mouse model with blood deficiency syndrome and mechanism in inducing erythroid differentiation of K562 cells *LI Jia-qi, HE Rui, ZHANG Yi-tong, et al.*
- (1512) Preparation and evaluation of pirfenidone submicroemulsion *WANG Xin-ru, TIAN Wei, MENG Yang, et al.*
- (1520) Design, synthesis and biological evaluation of IRAK4 degraders based on proteolytic targeting chimera *SUN Zi-you, ZHOU Mao, BAI Hai-yun, et al.*
- (1528) Evaluation of design, synthesis and biological activities novel macrocyclic Bcl-2 inhibitors *ZHA Yong-jun, YANG Can, BAI Hai-yun, et al.*
- (1537) Key antimicrobial components of Sanye tablets against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* *MI Zhuo-xin, QI Yu-lin, LI Yu-hong, et al.*
- (1544) Pharmacodynamic material basis and mechanisms of anti-inflammation and analgesic property of Shuanghu Zhongtongning tincture based on serum pharmacology and network pharmacology *HUANG Xin, HUANG Xiao-mei, LIANG Fen-lan, et al.*
- (1550) Quality markers for *Astragalus membranaceus* in tonifying qi and lifting yang based on fingerprint and network pharmacology *WANG Qi-long, WANG Yu-peng, JING Ya-jiang, et al.*
- (1558) Inhibitory effect of Xinlikang capsules on the proliferation of hematological tumor cells *TANG Xin-xin, HU Xiao-bei, SU Ming-bo, et al.*
- (1566) Apigenin up-regulates expression of miR-34a-5p and enhances sensitivity to fluorouracil in MHCC97H-derived spheres *LE Yi-jie, CAO Jian-guo, YANG Xiao-hong, et al.*
- (1571) Madecassoside alleviates interstitial cystitis by inhibiting the pyroptosis of NF- κ B/NLRP3 pathway *LI Qi, PU Dong, WANG Si-si, et al.*
- (1577) Peak concentration of plasma temozolomide in patients with glioblastoma during concurrent chemoradiation and adjuvant chemotherapy by two-dimensional liquid chromatography *LI Lin-lin, ZHANG Sheng-shen, MA Hui-hui, et al.*
- (1583) Equilibrium solubility and oil-water partition coefficients of novel GPR40 agonist ADD-16 and its sodium salt *MA Li-sha, LIN Jia-yan, LI Qi, et al.*

- (1587) **Research progress in orexin receptor agonists**
..... *XIA Li-bo, REN Ji-xiang*
- (1594) **Role of mitochondria in the function of adipocytes**
..... *GUO Xue-ying, HUANG Chun-xiao, XIANG Xin-xin*
- (1602) **Research progress of traditional Chinese medicine in controlling the proliferation of drug-resistant bacteria *Acinetobacter baumannii***
..... *YANG Yun, LIU Ya, PENG Chun-hong, et al.*
- (1609) **Research progress in hypoglycemic agents for nonalcoholic fatty liver disease complicated with type 2 diabetes mellitus**
..... *LI Hai-yang, XIONG Yuan-qin, WANG Jing-shu, et al.*
- (1615) **Advances in pharmacological action and clinical application of gastrodin**
..... *LIU Xiao-cong, ZHANG Yu-miao, PAN Ya-lei*
- (1621) **Basis and clinical progress in mesenchymal stem cells for acute lung injury caused by sepsis** *LIU Yi, LU Yi-ni, ZHANG Xiong, et al.*
- (1628) **Core medicinals and formulas for phlegm-dampness body constitution based on constitution and pattern differentiation**
..... *HUANG Bo-zhen, SONG Shan-shan, WANG Liang, et al.*
- (1633) **Medication rules of traditional Chinese medicine compounds with national patents for kidney stones**
..... *YE Wen-jia, HUANG Nian-wen, YU Shan-shan, et al.*
- (1645) **Prediction of vancomycin plasma concentration and adverse reactions based on ensemble learning**
..... *HUANG Wei, LI Tao-ming, LU Jing-wei, et al.*
- (1652) **Applicability of optimized triggers in monitoring adverse events in patients with cardiovascular diseases** *LIN Xiao-xia, LI Jia, YANG Ya-jun*
- (1658) **112 cases of adverse drug reactions induced by azvudine tablets in patients with COVID-19** *LAN Bo, LI Gui-de, LI Wei-si, et al.*
- (1662) **Nirmatrelvir/ritonavir potential drug-drug interactions and their impact on patients with COVID-19: a retrospective study based on propensity score matching** *WANG Lu, ZENG Lu, GUI Ling, et al.*
- (1668) **Meta-analysis of clinical efficacy and safety of generic and original insulin glargine for type 2 diabetes mellitus**
..... *LIU Qun, ZHU Ming-liang, JIN Qiu-yang, et al.*
- (1674) **Retrospective analysis and work suggestions for the first examination of drug clinical trials in Hunan**
..... *YANG Ze-hua, LI Dan, WANG Bi-jun, et al.*

研究论文

脑络欣通抗缺血性脑卒中后脂质过氧化和对线粒体损伤的保护作用研究

江慧慧¹, 洪璐¹, 刘明明¹, 赵雨彤¹, 张涵智¹, 何玲^{1, 2, 3}, 陈卫东^{1, 4, 5, 6*} (1. 安徽中医药大学, 合肥 230012; 2. 新安医学教育部重点实验室, 合肥 230012; 3. 上海中医药大学科技人文研究院, 上海 200120; 4. 中药复方安徽省重点实验室, 合肥 230012; 5. 中药资源保护与开发研究所, 合肥 230012; 6. 中药饮片制造新技术安徽省重点实验室, 合肥 230012)

摘要: **目的** 探究脑络欣通抗缺血性脑卒中后脂质过氧化损伤和对线粒体损伤的保护作用。**方法** 取 SPF 级雄性 SD 大鼠采用线栓法制备大鼠脑缺血再灌注模型, 按照 Zea Longa 评分标准进行神经功能评分。将评分 2 ~ 3 分的模型动物随机分为模型组, 脑络欣通低、中、高剂量组, 另设正常组和假手术组。造模 24 h 后开始灌胃给药, 早晚各一次, 连续 7 d, 正常组和假手术组灌胃生理盐水。观察脑络欣通对大鼠生活状态、体重、神经功能评分、脑组织病理学、脂质过氧化物 (LPO) 含量、4-羟基烯醛 (4-HNE) 水平、线粒体形态结构和缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α) 表达的影响。**结果** 与模型组相比, 脑络欣通可提高大鼠生活质量, 增加大鼠体重, 提高神经功能评分, 减少 LPO、4-HNE、HIF-1 α 的累积, 并对脑组织病理学损伤和线粒体结构有一定的保护作用。**结论** 脑络欣通可以通过抑制缺血性脑卒中后的脂质过氧化以及保护线粒体损伤从而发挥神经保护作用。

关键词: 脑络欣通; 缺血性脑卒中; 线粒体; 脂质过氧化; 缺氧诱导因子-1 α

中图分类号: R285, R286 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)06-1399-07
doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.001

Effect of Naoluoxintong on anti-lipid peroxidation injury and mitochondrial damage after ischemic stroke

JIANG Hui-hui¹, HONG Lu¹, LIU Ming-ming¹, ZHAO Yu-tong¹, ZHANG Han-zhi¹, HE Ling^{1, 2, 3}, CHEN Wei-dong^{1, 4, 5, 6*} (1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Key Laboratory of Xin'an Medicine, Ministry of Education, Hefei 230012; 3. Research Institute of Science, Technology and Humanities, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200120; 4. Anhui Province Key Laboratory of Chinese Medicinal Formula, Hefei 230012; 5. Institute of Traditional Chinese Medicine Resources Protection and Development, Hefei 230012; 6. Anhui Province Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Decoction Pieces of New Manufacturing Technology, Hefei 230012)

Abstract: Objective To determine the protective effect of Naoluoxintong (NLXT) on lipid peroxidation injury and mitochondrial damage after ischemic stroke. **Methods** SPF male SD rats were used to establish the cerebral ischemic/reperfusion model by suture method. The neurological function was evaluated according to Zea Longa standards. The model animals with scores of 2 ~ 3 were randomly divided into a model group, and NLXT low, middle, and high dose groups. A sham operation group and a normal group were also established. The rats were treated with NLXT for 7 days, meanwhile, rats in the normal and the sham-operated groups were gavaged with saline. The effect of NLXT on

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (No. 82204671); 安徽省高校自然科学研究重点项目 (No. KJ2021A0574)。

作者简介: 江慧慧, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药药代动力学研究, email: jhh121389@163.com * **通信作者:** 陈卫东, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事药代动力学、药学和药剂学相关研究, email: wdchen@ahtcm.edu.cn

living condition, body weight, neurological function score, brain histopathology, lipid peroxide (LPO) content, 4-hydroxyenal (4-HNE) level, mitochondrial morphology and hypoxia inducible factor-1 α expression were observed. **Results** Compared with the model group, NLXT improved the rat's quality of life, increased the body weight and their neurological function, reduced the accumulation of LPO, 4-HNE and HIF-1 α , and protected against the pathological damage of the brain tissue and the structure of mitochondria. **Conclusion** NLXT plays a neuroprotective role by inhibiting lipid peroxidation and protecting mitochondrial damage after ischemic stroke.

Key words: Naoluoxintong; ischemic stroke; mitochondrial; lipid peroxidation; hypoxia inducible factor-1 α

脑卒中是威胁人类生命健康的重大疾病,具有发病率高、致残率高、致死率高等特点,包括缺血性脑卒中和出血性脑卒中,其中缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)占87%^[1]。现有治疗IS的方法均基于溶栓或外科手术治疗,在短时间内恢复缺血区域的脑血流,挽救缺血半暗带中的神经元,防止缺血核心进一步发展,但其治疗窗狭窄,对于轻型非致残卒中患者及重型卒中患者单独使用溶栓治疗往往难以得到非常好的预后效果^[2],因此寻找治疗IS安全有效且不良反应少的药物以及更多治疗靶点是十分迫切的。

中药复方由于多成分多靶点多通路的协同作用在治疗IS中有着悠久的历史,脑络欣通是治疗IS有效的临床验方,疗效显著。既往的研究主要集中在脑络欣通对于神经干细胞增殖、分化^[3],以及炎症反应^[4]的影响等方面,对IS后的细胞器损伤的研究仍有不足。在脑缺血再灌注的病理情况下,高度有害的活性氧和活性氮会攻击脑细胞膜及细胞器膜的不饱和脂肪酸,引发膜的脂质过氧化^[5-6]。线粒体由于含有大量的不饱和脂肪酸以及含有过氧化作用依赖的血红素蛋白而容易受过氧化作用^[7-8],而线粒体是细胞的能量代谢中心,参与细胞凋亡、自噬、坏死等细胞死亡形式的调控,因此线粒体结构对于维持神经元的存活和神经系统功能的改善至关重要。有研究表明,HIF-1 α 在维持线粒体结构功能中发挥着重要的作用^[9]。本研究拟采用大鼠脑缺血再灌注模型(MCAO)来考察脑络欣通对于IS后脂质过氧化诱导的线粒体损伤的保护作用及其潜在的治疗靶点,为脑络欣通的临床使用提供科学理论依据。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级雄性SD大鼠80只,体重220~250g[辽宁长生生物技术股份有限公司,动物许可

证号:SCXK(辽)2020-001]。饲养于安徽中医药大学,饲养环境室温为(25±2)℃,相对湿度60%~70%,12h昼夜循环饲养,喂食普通饲料,自由进食、饮水,动物实验经安徽中医药大学实验动物伦理委员会批准,伦理批件号:AHUCM-rats-2023094。

1.2 仪器

病理切片机(上海徠卡仪器有限公司),脱水机、包埋机、冻台(武汉俊杰电子有限公司),烤箱(上海福玛实验仪器有限公司),脱色摇床(江苏新康医疗器械有限公司),涡旋混合仪(SCILOGEX),正置光学显微镜(日本尼康),透射电子显微镜(HITACHI),电泳仪、化学发光仪(上海天能生命科学有限公司),MCAO线栓(北京吉泰远成科技有限公司),moorFLPI-2散斑血流实时成像系统(吉安得尔科技有限公司)。

1.3 试药

黄芪(批号:20160128)、三七(批号:20160128)、川芎(批号:20160128)、天麻(批号:20160128)、当归(批号:20160128)、红花(批号:20160128)和蜈蚣(批号:20160128)(亳州成源中药饮片有限公司,均经安徽中医药大学何玲副教授鉴定为正品);电镜固定液(武汉塞维尔生物科技有限公司),无水乙醇、丙酮(国药集团化学试剂有限公司),钼酸(Ted Pella Inc),DAB显色试剂盒(DAKO),HRP标记二抗(Abcam),牛血清蛋白、兔血清、脂质过氧化物(LPO)含量检测试剂盒(Solarbio),缺氧诱导因子1 α (HIF-1 α)抗体(成都正能生物技术有限责任公司),4-羟基烯醛(4-HNE)抗体(北京博奥森生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 脑络欣通的制备

按照黄芪:三七:川芎:天麻:当归:红花:蜈蚣=15:3:5:5:5:5:2的比例分别称取黄芪

30 g, 三七 6 g, 川芎 10 g, 天麻 10 g, 当归 10 g, 红花 10 g, 混匀后加入 8 倍量超纯水, 浸泡 30 min, 加热煮沸 10 min, 转文火继续煎煮 1 h, 过滤出煎煮液, 继续向药渣中加入 6.4 倍超纯水进行第二次煎煮, 加热煮沸后保持微沸 50 min, 弃去药渣, 合并两次水煎液。将 4 g 蜈蚣研磨成粉, 加入煎煮液中趁余温不断搅拌。混匀后的水煎液经过低速离心、过滤后, 按照所需浓度进行浓缩, 脑络欣通低、中、高剂量分别为每 1 mL 药液含生药 0.5 g、1 g、2 g^[10]。

2.2 MCAO 大鼠模型制备

采用改良线栓法制作 MCAO 大鼠模型: 大鼠手术前 12 h 禁食, 保持在室温条件下, 采用戊巴比妥钠 ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 麻醉大鼠, 用镊子钝性分离出左侧颈总动脉 (CCA)、颈内动脉 (ICA)、颈外动脉 (ECA)。结扎 CCA 后采用动脉夹夹闭 ICA, 在 CCA 剪出一个切口, 线栓自 CCA 插入 ICA, 插入深度约 20 mm, 随后用缝合线进行结扎, 消毒并缝合切口。预留 1~2 cm 线拴在皮肤外, 2 h 后将线栓拔出 10 mm 左右, 以实现再灌注损伤。手术结束后腹腔注射 0.1 mL 庆大霉素防止伤口感染。假手术组大鼠进行相同的操作, 但颈部切开后仅钝性分离血管, 不进行结扎, 也不插线栓和再灌注等操作。

在线栓插入时采用 MoorFLPI-2 散斑血流实时成像系统对大鼠脑血流量进行实时监测, 当观察到大鼠对侧脑血流量下降 70% 及以上时, 视为 MCAO 模型建立成功^[11]。

2.3 大鼠神经功能评分

按照 Zea Longa 评分标准进行神经功能评分^[12]。0 分: 无明显神经缺损症状; 1 分: 不能完全伸展对侧前肢; 2 分: 行走时向偏瘫侧转圈; 3 分: 行走时向偏瘫侧倾倒; 4 分: 不能自发行走、意识障碍; 5 分: 大鼠死亡。

2.4 分组和给药

按照大鼠神经功能评分结果, 取得分为 2~3 分的大鼠随机分为模型组及脑络欣通低、中、高剂量组, 每组 15 只大鼠。在手术 24 h 后开始给药, 脑络欣通低、中、高剂量组大鼠每日早晚按照 1 mL/100 g 灌胃脑络欣通药液, 正常组和假手术组大鼠按照 1 mL/100 g 灌胃生理盐水, 持续 7 d。

2.5 一般临床观察

每日观察实验动物的生活状态, 包括大鼠的脖颈处伤口情况、日常行为活动、毛发、粪便等, 每日末次灌胃后给各组动物称重, 观察大鼠体重

变化趋势。

2.6 脑组织病理学检查

7 d 后取大鼠缺血侧脑组织置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h, 依次进行脱水包埋, 切片, 脱蜡后进行 HE 染色, 随后置于电子显微镜下观察脑组织的病理变化。

2.7 脑组织中 LPO 的含量检测

取大鼠缺血侧脑组织 100 mg, 加入 1 mL 提取液, 冰水浴匀浆后 $8000 \text{ g } 4^\circ\text{C}$ 离心 10 min, 按照试剂盒说明书测定各样本在 532 nm 和 600 nm 处的吸光度, 计算 LPO 含量。

2.8 脑组织中 4-HNE 的含量检测

将包埋好的大鼠脑组织切成约 $5 \mu\text{m}$ 的薄片, 进行 4-HNE 染色。具体操作方法如下: 将石蜡切片进行常规脱水后置于 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 枸橼酸缓冲液, 于微波炉加热进行抗原修复, 山羊血清白蛋白封闭完成后滴加 4-HNE 抗体 (稀释比例为 1:400), 在 4°C 环境下孵育过夜后 PBS 清洗 3 次, 加入山羊抗兔 IgG 的二抗, 常温孵育 60 min, DAB 显色, 镜下控制反应时间, 染色完成后, 自来水冲洗, 苏木素复染, 梯度脱水, 中性树胶封片。阳性信号为棕黄色, Image-Pro Plus 软件测定阳性信号的平均光密度 (IOD) 值。

2.9 脑组织中线粒体的形态观察

取大鼠海马区域脑组织 1 mm^3 , 经戊二醛固定、室温脱水、渗透、包埋、聚合、超薄切片、醋酸铀-枸橼酸铅双染色后, 在透射电子显微镜下观察线粒体形态, 采集图像。

2.10 脑组织中 HIF-1 α 蛋白的检测

取大鼠缺血侧脑组织, 加入含蛋白酶抑制剂的裂解液后提取总蛋白, 使用 BCA 蛋白分析试剂盒测定蛋白浓度。采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺 (SDS) 凝胶电泳法分离蛋白, 用 PVDF 膜进行蛋白印迹, 使用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后用 PBS 洗涤 3 次, 孵育 HIF-1 α 一抗 (1:1000), 4°C 过夜后室温孵育二抗 (1:10000) 2 h, 将条带经 TBST 洗膜后, 常温避光配制 ECL 发光液, 现配现用, 将条带浸泡在配制的 ECL 发光液中后, 应用 Tanon 5200 化学发光成像系统显影, 采集图像后用 Image J 软件进行分析。

2.11 统计方法

采用统计学软件 SPSS 21.0 对实验数据进行统计学分析, 采用 Graphpad Prism 9.5 软件图像绘制。符合正态分布的计量资料结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较

时，符合方差齐性检验的资料采用 LSD 法；非正态分布的资料组间比较采用非参数检验法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 MCAO 大鼠模型的建立

通过激光散斑血流仪观察脑梗死区的血流变化，结果显示模型组左侧大脑血流灌注量下降 70% 及以上，说明造模成功（见图 1）。

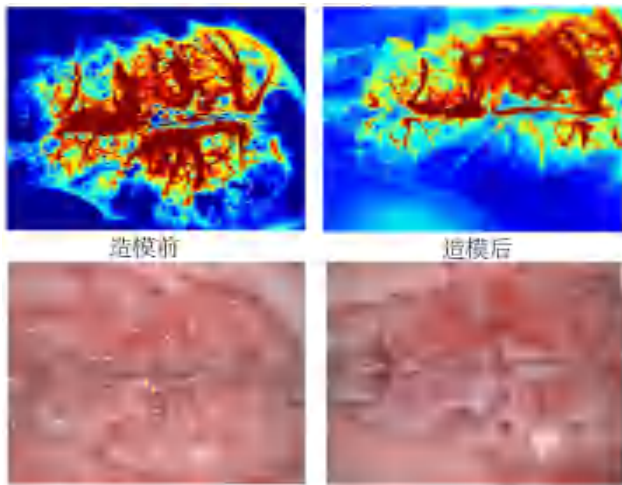


图 1 激光散斑血流实时成像系统检测大鼠脑组织血流量
Fig 1 Blood flow in rat brain tissue by laser scatter blood flow real-time imaging system

3.2 一般体征观察

与正常组大鼠相比，假手术组大鼠除颈部伤口处有痛痒之外，未见明显改变。而模型组大鼠可观察到大鼠自主活动减少，食欲减退，毛发枯燥、黯淡，并伴有轻微腹泻。在脑络欣通干预后各组大鼠逐渐恢复自主活动并主动进食，体重有逐渐恢复的趋势。

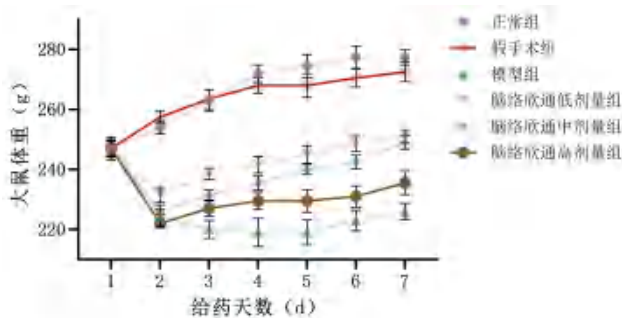


图 2 脑络欣通对大鼠 7 d 体重的影响
Fig 2 Effect of NaoluoXintong on body weight of rats

3.3 脑络欣通对大鼠神经功能的影响

与正常组大鼠相比，假手术组大鼠在术后 7 d 的神经功能评分并未受到影响，而模型组大鼠神经功能评分均有所升高 ($P < 0.001$)。与模型组大鼠相比，脑络欣通低剂量组大鼠仍然存在向外侧转圈的行为，

而脑络欣通中剂量和高剂量给药后可以显著改善大鼠的神经功能评分 ($P < 0.01$, $P < 0.001$)，具体表现为大鼠对侧前爪逐渐伸展自如，向外侧转圈的行为为改善，行走时向对侧倾倒的频率减少。

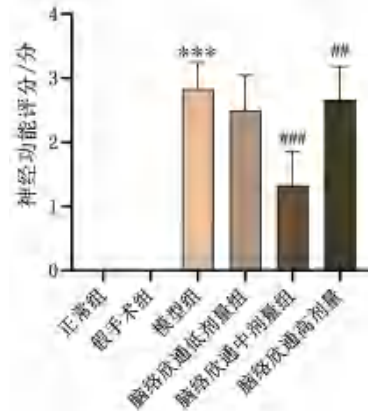


图 3 脑络欣通对 MCAO 大鼠神经功能评分的影响
Fig 3 Effect of NaoluoXintong on the neurological function score of MCAO rats

注：与正常组比较， $***P < 0.001$ ；与模型组比较， $###P < 0.01$ ， $###P < 0.001$ 。
Note: Compared with the normal group, $***P < 0.001$; compared with the model group, $###P < 0.01$, $###P < 0.001$.

3.4 脑络欣通对模型大鼠脑组织病理学改变的影响

与正常组大鼠相比，假手术组大鼠脑组织并无明显损伤，而模型组大鼠脑皮质出现了大面积坏死，有明显的梗死灶和炎性细胞浸润现象，细胞排列紊乱，细胞数目减少且水肿，细胞核淡染固缩，边缘出现空泡。与模型组相比，脑络欣通组细胞变性坏死减轻，细胞水肿和空泡程度减轻，炎性细胞浸润减轻，梗死灶相对较小。

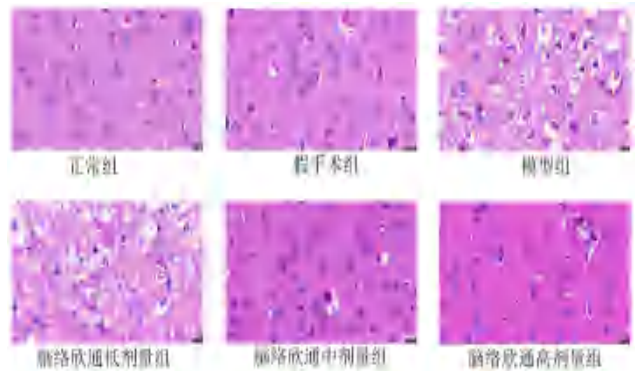


图 4 脑络欣通对 MCAO 大鼠脑组织病理改变的影响 (HE, $\times 100$, 标尺为 $10 \mu\text{m}$)
Fig 4 Effect of NaoluoXintong on the pathological changes in the brain tissue of MCAO rats (HE, $\times 100$, Scale bar = $10 \mu\text{m}$)

3.5 脑组织中 LPO 的含量检测

与正常组相比，假手术组大鼠脑组织中的 LPO 含量无显著变化；模型组大鼠脑组织中 LPO

含量显著上升 ($P < 0.001$)。与模型组相比, 脑络欣通干预后大鼠脑组织中的 LPO 含量呈现不同程度的下降, 其中脑络欣通低剂量组对 LPO 含量的影响最小, 而脑络欣通中剂量组和高剂量组之间对 LPO 的改善作用无明显差异 (见图 5)。

3.6 免疫组化检测 4-HNE

与正常组相比, 假手术组 4-HNE 含量无明显差异, 而模型组中 4-HNE 含量显著增加, 经过脑络欣通干预后, 4-HNE 含量明显减少 ($P < 0.001$), 但脑络欣通中剂量组和高剂量组之间无明显差异 (见图 6)。

3.7 透射电镜检测线粒体形态

透射电镜下观察到正常组和假手术大鼠神经元中的线粒体结构完整, 而模型组大鼠神经元线粒体形态发生明显改变, 具体表现为线粒体数量变少,

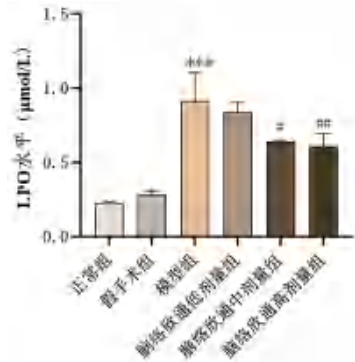


图 5 脑络欣通对 MCAO 大鼠脑组织中 LPO 含量的影响
Fig 5 Effect of Naoluoxtong on the content of LPO in brain tissue of MCAO rats

注: 与假手术比较, *** $P < 0.001$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

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

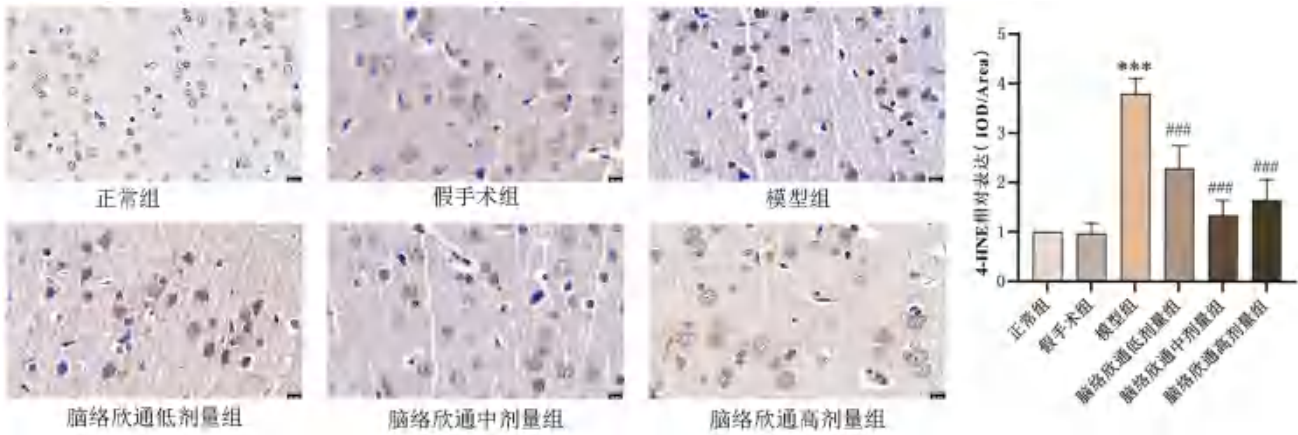


图 6 脑络欣通对 MCAO 大鼠脑组织 4-HNE 含量的影响 ($\times 100$, 标尺为 $10 \mu\text{m}$)

Fig 6 Effect of Naoluoxtong on the content of 4-HNE in brain tissue of MCAO rats ($\times 100$, Scale bar = $10 \mu\text{m}$)

注: 与假手术组比较, *** $P < 0.001$; 与模型组比较, ### $P < 0.001$ 。

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

外膜破裂, 体积变小, 线粒体嵴减少、消失; 脑络欣通低剂量干预后线粒体仍然存在空泡现象, 线粒体嵴减少断裂的情况并未明显得到改善; 脑络欣通中剂量和高剂量干预后可见线粒体外膜相对完整, 嵴减少的情况显著得到改善 (见图 7)。

3.8 Western blot 检测 HIF-1 α 的表达

实验结果表明, 与正常组和假手术组大鼠相比, 模型组大鼠 HIF-1 α 表达水平显著上升 ($P < 0.01$), 脑络欣通治疗后抑制了 HIF-1 α 的异常升高, 使其逐渐恢复到基线状态 (见图 8)。

4 讨论与结论

中医药治疗 IS 已经有很长的历史, 根据中医的观念, 脑卒中属中医“中风”范畴, 中风的本质是脑之脉络的病变, 气血运行紊乱以致脑之脉络损伤; 血行不畅、脉络痹阻则发病为缺血性

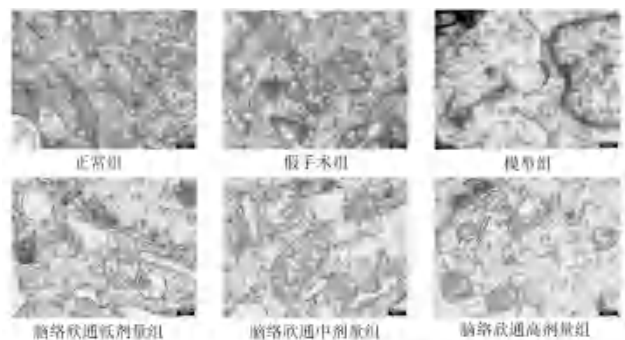


图 7 脑络欣通对 MCAO 大鼠脑组织神经元线粒体的影响 ($\times 20000$, 标尺为 500nm)

Fig 7 Effect of Naoluoxtong on the neuronal mitochondria in brain tissue of MCAO rats ($\times 20000$, scale bar = 500nm)

中风^[13]。作为安徽中医药大学第一附属医院治疗 IS 的院内制剂之一, 脑络欣通被收入 IS 的“临床诊疗路径”中, 整方针对气虚血瘀之症, 主在补

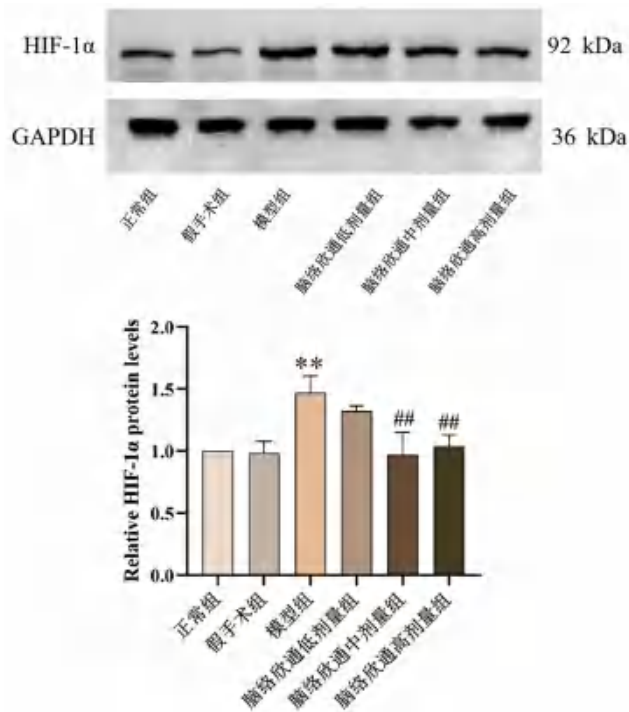


图 8 脑络欣通对 MCAO 大鼠脑组织中 HIF-1 α 表达的影响
Fig 8 Effect of NaoluoXintong on the expression of HIF-1 α in brain tissue of MCAO rats

注：与假手术组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，## $P < 0.01$ 。

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

元气，固生机，以助血行，继而活血脉，以畅气机，通血络，以促进神经功能恢复，治疗缺血性脑血管病临床效果显著^[14]。

IS 对患者的生活水平有明显的不良影响，主要后遗症就是神经功能障碍^[15]。本研究通过术后每日观察大鼠生活状态，包括伤口情况、四肢活动情况以及情绪状态等，采用 Zea Longa 评分法评价各组大鼠的神经功能，发现脑络欣通能改善动物的生活状态、神经功能评分以及恢复术后大鼠的体重，但在实验过程中我们也观察到低、高剂量组大鼠的神经功能相较于中剂量组仍然有一些差距，且高剂量组大鼠毛发黯淡，体重恢复幅度较小，可能是由于高剂量的浓度给大鼠造成了一定的负担，HE 染色结果细胞核固缩、水肿等情况也进一步证明脑络欣通中剂量的效果要优于低、高剂量组。

当大脑的结构和功能受到影响时，活性氧大量增加，过量的氧自由基堆积促进脂质过氧化反应^[16-17]。LPO 是不饱和脂肪酸链经自由基或活性氧作用后形成带有过氧基的脂质，在病理情况下，脂质过氧化反应增强可导致 LPO 升高。结果显示模型组大鼠中 LPO 含量显著增加，LPO

升高可对细胞及细胞膜的结构和功能造成种种损伤^[18]。然而 LPO 是不稳定的，其可分解形成一系列复杂的混合物，其中 4-HNE 也是脂质过氧化程度的标志物^[19]。4-HNE 免疫组化染色结果与预期一致，模型组大鼠 4-HNE 表达水平显著提升，在脑络欣通的治疗下，LPO 和 4-HNE 均有所下降，这也表明脑络欣通可以对抗 IS 后的脂质过氧化损伤。线粒体不仅是产生活性氧的场所也更容易受到过氧化损伤^[20-21]，因此本研究通过透射电镜观察了大鼠脑组织中神经元线粒体形态发现，IS 后线粒体膜有明显的破裂，线粒体数量减少以及嵴消失，而脑络欣通对线粒体形态也具有一定的保护作用。

HIF-1 α 广泛存在于哺乳动物细胞中，是低氧状态下调控血管新生和稳定细胞内环境和氧平衡的核心调控因子，是介导低氧信号的转导中枢^[22]。大量研究通过其转录活性发现 HIF-1 α 在细胞功能和功能障碍中的重要作用，且 HIF-1 α 是影响线粒体自噬的重要转录因子，其表达和活性受到细胞氧浓度的密切调控^[23-24]。有研究表明，激活 HIF-1 α 能稳定线粒体的结构和功能，并增强线粒体呼吸功能和呼吸酶的活性而保护细胞^[25-26]。因此本研究检测了大鼠脑组织中的 HIF-1 α 表达情况，结果表明，IS 后 HIF-1 α 存在显著蓄积情况，经不同浓度脑络欣通治疗后 HIF-1 α 的表达均显著降低，这一作用可能与脑络欣通对线粒体的保护作用密切相关。

综上所述，脑络欣通可以通过抑制 IS 后的脂质过氧化，调控 HIF-1 α 保护线粒体损伤从而发挥脑保护作用，本研究可为脑络欣通的临床应用提供药理学依据。

参考文献

- [1] Mozaffarian D, Emelia JB, Alan SG, et al. Heart disease and stroke statistics-2016 update: a report from the american heart association [J]. Circulation, 2016, 133 (4): e38-360
- [2] Jolugbo P, Ariens RAS. Thrombus composition and efficacy of thrombolysis and thrombectomy in acute ischemic stroke [J]. Stroke, 2021, 52 (3): 1131-1142.
- [3] Hong L, Jiang HH, Liu MM, et al. Investigation of NaoluoXintong on the neural stem cells by facilitating proliferation and differentiation in vitro and on protecting neurons by up-regulating the expression of nestin in MCAO rats [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 299: 115684.
- [4] 王丽娜, 曹健, 朱国旗, 等. 脑络欣通降低局灶性脑缺血再灌注大鼠额顶叶皮质 TLR4 及 TRAF6 和 TNF- α 蛋

- 白的表达[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2018, 34 (8): 702-707.
- [5] Gribbe P, Ryba MS, Debicki GS, et al. Changes in oxidative stress in the rat brain during post-cardiac arrest reperfusion, and the effect of treatment with the free radical scavenger idebenone [J]. Resuscitation, 1998, 39 (1-2): 107-13.
- [6] Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 482 (3): 419-425.
- [7] Sadžak A, Mravljak J, Maltar-Strmečki N, et al. The structural integrity of the model lipid membrane during induced lipid peroxidation: the role of flavonols in the inhibition of lipid peroxidation [J]. Antioxidants (Basel), 2020, 9 (5): 430.
- [8] Song JX, An JR, Chen Q, et al. Liraglutide attenuates hepatic iron levels and ferroptosis in db/db mice [J]. Bioengineered, 2022, 13 (4): 8334-8348.
- [9] He QK, Xu CL, Li YP, et al. Captan exposure disrupts ovarian homeostasis and affects oocytes quality via mitochondrial dysfunction induced apoptosis [J]. Chemosphere, 2022, 286 (Pt 1): 131625.
- [10] 谭辉, 王健, 尹婷婷, 等. 基于肝功能安全剂量选择的脑络欣通复方对脑缺血再灌注模型大鼠血管新生及局部脑血流量的影响[J]. 中医杂志, 2016, 57 (14): 1231-1236.
- [11] Wei X, Zhu QF, Liu N, et al. Neuroprotective effects and mechanisms of Zhenlong Xingnao capsule in in vivo and in vitro models of hypoxia [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 1096.
- [12] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20 (1): 84-91.
- [13] 王健, 何玲. 新安医家验方脑络欣通改善缺血性中风作用机制研究的思路与方法 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32 (5): 1921-1925.
- [14] 谭辉, 尹婷婷, 邓勇, 等. 益气活血中药脑络欣通促进脑缺血气虚血瘀证大鼠脑血管再生及机制 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2020, 36 (8): 712-718.
- [15] Zandvliet SB, Meskers CG, Nijland RH, et al. The effect of cerebellar transcranial direct current stimulation to improve standing balance performance early post-stroke, study protocol of a randomized controlled trial [J]. Int J Stroke, 2019, 14 (6): 650-7.
- [16] Kim S, Lee W, Jo H, et al. The antioxidant enzyme Peroxiredoxin-1 controls stroke-associated microglia against acute ischemic stroke [J]. Redox Biol, 2022, 54: 102347.
- [17] Gebicki JM. Oxidative stress, free radicals and protein peroxides [J]. Arch Biochem Biophys, 2016, 595: 33-39.
- [18] Colares JR, Hartmann RM, Schemitt EG, et al. Melatonin prevents oxidative stress, inflammatory activity, and DNA damage in cirrhotic rats [J]. World J Gastroenterol, 2022, 28 (3): 348-364.
- [19] Breitzig M, Bhimineni C, Lockey R, et al. 4-Hydroxy-2-nonenal: a critical target in oxidative stress? [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2016, 311 (4): C537-C543.
- [20] Li K, Cui YC, Zhang H, et al. Glutamine reduces the apoptosis of H9C2 cells treated with high-glucose and reperfusion through an oxidation-related mechanism [J]. PLoS One, 2015, 10 (7): e0132402.
- [21] Ren XM, Ren LQ, Wei Q, et al. Advanced glycation end-products decreases expression of endothelial nitric oxide synthase through oxidative stress in human coronary artery endothelial cells [J]. Cardiovasc Diabetol, 2017, 16 (1): 52.
- [22] Semenza GL, Roth PH, Fang HM, et al. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1 [J]. J Biol Chem, 1994, 269 (38): 23757-63.
- [23] Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine [J]. Cell, 2012, 148 (3): 399-408.
- [24] Lee JW, Bae SH, Jeong JW, et al. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) alpha: its protein stability and biological functions [J]. Exp Mol Med, 2004, 36 (1): 1-12.
- [25] Yang L, Xie P, Wu JJ, et al. Sevoflurane postconditioning improves myocardial mitochondrial respiratory function and reduces myocardial ischemia-reperfusion injury by up-regulating HIF-1 [J]. Am J Transl Res, 2016, 8 (10): 4415-4424.
- [26] Selak MA, Armour SM, Mackenzie ED, et al. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase [J]. Cancer Cell, 2005, 7 (1): 77-85.

(收稿日期: 2024-01-17; 修回日期: 2024-04-09)

基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术的 静宁方入脑、入肠及粪便成分分析

胡盼祥, 张萍芝, 阮意丹, 姚爱娜, 朱倩, 史文娟, 尹兴斌, 曲昌海, 董晓旭*, 倪健* (北京中医药大学 中药学院, 北京 102488)

摘要: 目的 基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术对静宁方给药后的大鼠入脑、入肠及粪便中的成分进行分析和鉴定。方法 采用 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS, 以 0.1% 甲酸-乙腈 (A) 和 0.1% 甲酸-水 (B) 为流动相进行梯度洗脱, 流速 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量 $5 \mu\text{L}$, 加热电喷雾离子化源 (HESI), 正、负离子扫描。结合对照品比对、文献报道、数据库比对等方式对成分进行分析鉴定。结果 共鉴定出 42 种成分, 其中脑、回肠、结肠、粪便中分别鉴定出 9、33、20、27 种成分。结论 本实验初步阐明静宁方入脑、入肠及粪便成分, 为阐明其药效物质基础及作用机制提供了依据。

关键词: 静宁方; UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS; 入脑成分; 入肠成分; 粪便成分

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)06-1406-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.002

Brain, intestinal and feces components of Jingning formula based on UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS technology

HU Pan-xiang, ZHANG Ping-zhi, RUAN Yi-dan, YAO Ai-na, ZHU Qian, SHI Wen-juan, YIN Xing-bin, QU Chang-hai, DONG Xiao-xu*, NI Jian* (School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488)

Abstract: Objective To identify and analyze the components in the brain, intestine and feces of rats after the administration of Jingning formula by UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS technology. **Methods** UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS was used. The mobile phase was 0.1% formic acid-acetonitrile (A) and 0.1% formic acid-water (B) with gradient elution, the flow rate was $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, and the injection volume was $5 \mu\text{L}$. The mass spectrometry conditions were included both positive and negative ion scannings, and the ion source was heated with electrospray ionization. The chemical compositions were analyzed by comparison with reference materials, literature reports and databases. **Results** Totally 42 components were identified, of which totally 9, 33, 20, and 27 components were identified in the brain, ileum, colon and feces, respectively. **Conclusion** The compositions of Jingning formula into the brain, intestine and feces are elucidated, which provides a basis for clarifying the material basis and action mechanism of Jingning formula.

Key words: Jingning formula; UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS; brain component; intestinal component; feces component

静宁方为北京中医药大学东直门医院王俊宏 黄、枸杞子、五味子、远志、石菖蒲、茯苓等药
主任医师的临床经验方, 全方由太子参、熟地 味组成, 具有益气养阴、安神定志的功效, 对于

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81973492)。

作者简介: 胡盼祥, 女, 硕士研究生, 主要从事中药制药新技术与新剂型, email: hpx804@163.com *通信作者: 倪健, 男, 教授, 主要从事中药新剂型与新技术研究, email: njtcm@263.net; 董晓旭, 男, 副教授, 主要从事中药新剂型与新技术研究, email: dxiaoxv@163.com

气阴两虚型注意缺陷多动障碍 (attention deficit hyperactivity disorder, ADHD) 疗效确切^[1]。静宁方具有多成分多途径多靶点的作用特点, 其可能的作用机制包括调节单胺类神经递质平衡^[2]、抗氧化应激^[1]、改善肠道微生物群, 调节脑肠肽水平等^[3], 而目前其药效物质基础尚不够明确。课题组前期对静宁方药物成分及口服吸收入血成分进行鉴定, 初步鉴定出 127 种药物成分和 46 种入血成分^[4]; 并以“微生物-脑肠轴”为切入点探究静宁方改善 ADHD 症状的作用机制, 结果发现静宁方可通过改善大鼠菌群结构, 上调有益菌的丰度, 明显改善 ADHD 大鼠的自发活动、焦虑状态及学习记忆能力。而关于入血成分是否可以通过血脑屏障进入脑组织发挥作用, 其他未入血成分体内吸收代谢情况及发挥作用途径还不清楚。本研究在课题组前期研究基础上, 拟采用 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术检测静宁方给药后的大鼠入脑、入肠及粪便中的成分, 进一步探究静宁方中药物成分发挥作用的方式, 为揭示其药效物质基础及作用机制提供依据。

1 材料

1.1 仪器

Ultimate 3000 型超高效液相色谱仪 (美国 Dionex 公司); Thermo Q-Exactive Plus 型高分辨质谱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); ME104/02 型电子天平 [0.1 mg, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]; MM400 型冷冻混合研磨仪 (德国 Retsch 公司); Centrifuge 5810 R 型低温冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); CentriVap 型真空离心浓缩仪 (美国 Labconco 公司); MilliQ IQ 7000 型实验室超纯水机 (德国默克公司)。

1.2 试药

静宁方提取物 (批号: 20200115, 实验室自制, 含量标准见“2.2”项下)。戊巴比妥钠 (批号: Y2015012102, 上海曦耀生物科技有限公司); 甲醇、乙腈 (质谱级、色谱级, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。太子参环肽 B、毛蕊花糖苷、戈米辛 D、五味子醇甲、五味子乙素、五味子酯乙、远志吡啶酮 III、3, 6'-二芥子酰基蔗糖、远志蔗糖酯 B、远志糖苷 C、西伯利亚远志糖苷 A5 (纯度均 $\geq 98\%$, 上海源叶生物科技有限公司), 西伯利亚远志糖苷 A6 (纯度 $\geq 95\%$) (上海源叶生物科技有限公司); 戈米辛 J、细叶远志苷 A (纯度均 $\geq 98\%$, 成都德思特生物技术有限公司); 细叶远志皂苷 (纯度: 100%, 上海诗丹德标准技术

服务有限公司)。

1.3 动物

SHR 大鼠 [许可证号: SCXK (京) 2019-0010] 12 只, SPF 级, 雄性, 体重 50 ~ 60 g, 购自斯贝福 (北京) 有限公司。

2 方法

2.1 色谱和质谱条件

Ultimate 3000 型超高效液相色谱, ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm); 流动相为 0.1% 甲酸-乙腈 (A) 和 0.1% 甲酸-水 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 100%B; 10 ~ 20 min, 100% ~ 70%B; 20 ~ 25 min, 70% ~ 60%B; 25 ~ 30 min, 60% ~ 50%B; 30 ~ 40 min, 50% ~ 30%B; 40 ~ 45 min, 30% ~ 0%B; 45 ~ 60 min, 0%B; 60 ~ 60.1 min, 0% ~ 100%B; 60.1 ~ 70 min, 100%B); 流速: 0.2 mL · min⁻¹; 柱温: 35 °C; 进样量: 5 μL 。

Thermo Q-Exactive Plus 型高分辨质谱; 离子源为加热电喷雾离子化源 (HESI); 鞘气流量 40 arb, 辅助气体流量 15 arb, 毛细管温度 320 °C, 辅助气体加热器温度 350 °C, 正喷雾电压 3.2 kV, 负喷雾电压 3.0 kV。MS 的分辨率为 70 000, MS/MS 的分辨率为 17 500, 扫描方式为全扫模式, 正、负离子模式同时检测, 质谱记录正离子谱扫描范围 m/z 100 ~ 1500。

2.2 静宁方提取物制备方法

五味子粉碎成粗粉, 10 倍量 60% 乙醇加热回流提取 3 次, 每次 2 h, 滤过后合并滤液, 浓缩, 减压干燥, 粉碎成细粉; 石菖蒲水蒸气蒸馏提取挥发油 (8 倍量水, 加热蒸馏 8 h), 挥发油用环糊精包合 (油: β -CD 比例为 1 : 8, 40 °C 搅拌 2 h, 冷藏, 滤过), 干燥, 粉碎成细粉; 蒸馏后的水溶液另取容器保存, 药渣加 8 倍量水煎煮 1 h, 滤过, 滤液与提取挥发油后的水溶液合并, 备用; 太子参、熟地、枸杞、茯苓、远志加 12 倍量水煎煮 3 次, 每次 1.5 h, 滤过, 合并滤液, 与上述药液合并, 60 °C 减压浓缩至相对密度为 1.15 ~ 1.20 的清膏, 加乙醇使含醇量为 60%, 搅匀, 静置。取上清液, 60 °C 减压浓缩至相对密度为 1.25 ~ 1.35 的稠膏, 减压干燥, 粉碎成细粉。上述细粉混匀, 即得。

2.3 对照品溶液的配制

精密称定太子参环肽 B、毛蕊花糖苷、戈米辛 D、五味子醇甲、五味子乙素、五味子酯乙、远志吡啶酮 III、3, 6'-二芥子酰基蔗糖、远志蔗糖酯 B、远志糖苷 C、西伯利亚远志糖苷 A5、西伯

利亚远志糖苷 A6、戈米辛 J、细叶远志苷 A、细叶远志皂苷对照品适量，甲醇溶解稀释，配制成质量浓度均为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.4 样品采集和前处理

大鼠适应性饲养 7 d 后，随机分为给药组和空白组，每组 6 只。药物采用 1.5%CMC-Na 混悬，给药剂量按生药计，为 $10.12 \text{ g} / (\text{kg} \cdot \text{d})$ ，空白组给予 1.5%CMC-Na，每日称量体重后分两次灌胃，连续给药 7 d。末次给药 1 h 后腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 ($0.04 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) 麻醉，腹主动脉取血，脱颈处死，取脑、回肠、结肠组织，生理盐水清洗干净，滤纸擦干，取盲肠中粪便，自然风干后称重， -80°C 保存。为避免个体差异，将每组 6 只大鼠的样品合并。

精密称取组织/粪便样品，加入氧化锆研磨珠，浸入液氮中冷冻，研磨仪（频率 25 Hz，5 min，研磨两次）将组织/粪便匀浆，加入 10 倍量的 80% 甲醇-乙腈溶液，涡旋 1 min，超声 20 min，再次涡旋 1 min， 4°C 、 $13\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min，取上清液，旋转浓缩仪浓缩。150 μL 80% 甲醇复溶，涡旋 5 min，超声 20 min，在 4°C 、 $13\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min，取上清液；再次离心，取上清液进行分析。

3 结果

3.1 大鼠脑、回肠、结肠及粪便中的成分分析

正、负离子模式下各样品总离子流图见图 1~4。根据保留时间、相对分子质量、二级碎片离子等信息，结合对照品比对、文献报道、数据库比对等方式对化学成分进行辨识分析，共鉴定出 42 种成分，其中脑中鉴定出 9 种成分，主要来源于远志和五味子；回肠中鉴定出 33 种成分，主要来源于熟地黄、远志、五味子和茯苓；结肠中鉴定出 20 种成分，主要来源于茯苓和五味子；粪便中鉴定出 27 种成分，主要来源于茯苓和五味子。具体结果见表 1。

3.2 成分鉴定实例以五味子乙素和细叶远志皂苷为例

3.2.1 五味子乙素 在正离子模式下，准分子离子 $[M + H]^+$ 为 401.1955，保留时间为 44.55 min，与五味子乙素对照品基本一致。二级质谱图主要碎片离子 m/z 为 386、331、300、285。二级质谱特征碎片 m/z $386[M + H - \text{CH}_3]^+$ 为准分子离子失去甲基形成；碎片 m/z $331[M + H - \text{C}_5\text{H}_{10}]^+$ 由八元环断裂，准分子离子峰丢失 C_5H_{10} 产生，之后该碎片继续丢失甲氧基和甲基形成碎

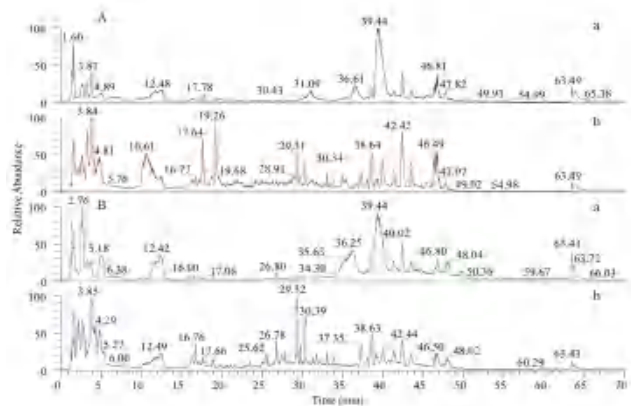


图 1 正 (A)、负 (B) 离子模式下空白脑组织 (a) 和含药脑组织 (b) 的总离子流图

Fig 1 Total ion current plots of blank brain tissue (a) and drug-containing brain tissue (b) in positive (A) and negative (B) ion modes

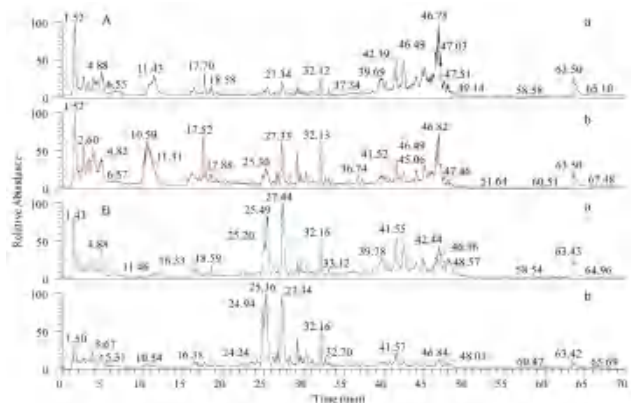


图 2 正 (A)、负 (B) 离子模式下空白回肠组织 (a) 和含药回肠组织 (b) 的总离子流图

Fig 2 Total ion current plots of blank ileum tissue (a) and drug-containing ileum tissue (b) in positive (A) and negative (B) ion modes

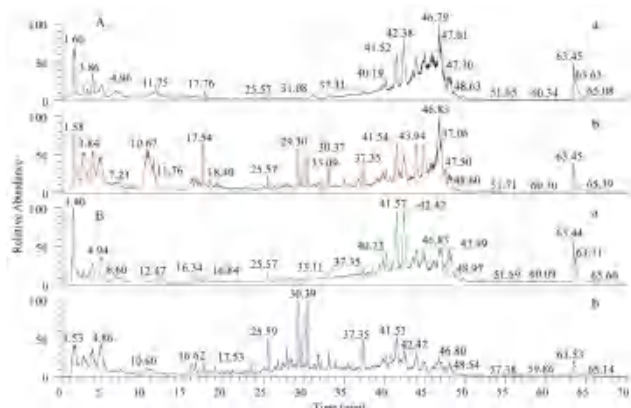


图 3 正 (A)、负 (B) 离子模式下空白结肠组织 (a) 和含药结肠组织 (b) 的总离子流图

Fig 3 Total ion current plots of blank colon tissue (a) and drug-containing colon tissue (b) in positive (A) and negative (B) ion modes

片 m/z $300[M + H - \text{C}_5\text{H}_{10} - \text{OCH}_3]^+$ 和 m/z $285[M + H - \text{C}_5\text{H}_{10} - \text{OCH}_3 - \text{CH}_3]^+$ [5]。与五味子乙素质谱行为数据一致，故鉴定该化合物为五味子乙素。其二级质谱图与裂解途径见图 5~6。

表 1 静宁方入脑、入肠及粪便成分鉴定结果

Tab 1 Identification of components in the brain, intestine and feces from Jingning formula

No.	化合物	分子式	误差 / × 10 ⁻⁶	理论值 (m/z)	实测值 (m/z)	t _R /min	离子 模式	碎片离子 (m/z)	分布				来源
									脑	回肠	结肠	粪便	
1	奎宁酸	C ₇ H ₁₂ O ₆	-0.98	192.0632	191.0559	1.63	[M-H] ⁻	85		+			熟地黄
2	水苏糖	C ₂₄ H ₄₂ O ₂₁	-0.71	666.2214	665.2141	2.62	[M-H] ⁻	383/221/179/161/ 143/113/101		+			熟地黄
3	地黄苷 D	C ₂₇ H ₄₂ O ₂₀	-0.34	686.2267	731.2249	16.38	[M+FA-H] ⁻	505/179		+			熟地黄
4	甲基咖啡酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	-1.82	194.0576	193.0503	22.05	[M-H] ⁻	149		+	+	+	熟地黄
5	咖啡酸	C ₉ H ₈ O ₄	-1.51	180.0420	179.0347	21.63	[M-H] ⁻	135		+		+	熟地黄
6	太子参环肽 B [#]	C ₄₀ H ₅₈ N ₈ O ₈	-0.86	778.4371	779.4444	27.67	[M+H] ⁺	751/405/138/70		+	+	+	太子参
7	pseudostellarin B	C ₃₃ H ₄₆ N ₈ O ₈	-1.97	682.3425	683.3502	26.14	[M+H] ⁺	302/399/513/570		+			太子参
8	细叶远志苷 A [#]	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₇	0.34	682.2111	681.2039	23.55	[M-H] ⁻	443/239/179/137/93		+	+	+	远志
9	细叶远志皂苷 [#]	C ₃₆ H ₅₆ O ₁₂	-0.41	680.3769	679.3696	28.17	[M-H] ⁻	455/425		+	+	+	远志
10	presenegenin	C ₃₀ H ₄₆ O ₇	-1.98	518.3233	517.3161	30.46	[M-H] ⁻	499/487/469/423		+	+	+	远志
11	3, 6'-二芥子酰基蔗糖 [#]	C ₃₄ H ₄₂ O ₁₉	-0.74	754.2315	753.2242	22.68	[M-H] ⁻	547/529/367/205		+			远志
12	西伯利亚远志糖 A5 [#]	C ₂₂ H ₃₀ O ₁₄	-1.23	518.1629	517.1556	19.01	[M-H] ⁻	193/175/160		+			远志
13	西伯利亚远志糖 A6 [#]	C ₂₃ H ₃₂ O ₁₅	-0.42	548.1739	547.1666	19.19	[M-H] ⁻	223/205/190/175		+			远志
14	远志蔗糖酯 B [#]	C ₃₀ H ₃₆ O ₁₇	-0.03	668.1952	667.1880	21.65	[M-H] ⁻	461/239/205		+			远志
15	西伯利亚远志吡酮 B	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₄	-0.88	538.1318	537.1245	20.77	[M-H] ⁻	387/315/285		+			远志
16	6'-sinapoyl sucrose	C ₂₃ H ₃₂ O ₁₅	-1.47	548.1733	547.1661	20.03	[M-H] ⁻	367/223/205/190/175		+			远志
17	3, 4, 5-trimethoxycinnamic acid	C ₁₂ H ₁₄ O ₅	-3.28	238.0833	237.0761	19.47	[M-H] ⁻	193/163/133/130				+	远志
18	五味子乙素 [#]	C ₂₃ H ₂₈ O ₆	-1.00	400.1882	401.1955	44.55	[M+H] ⁺	386/331/300/285		+	+	+	五味子
19	戈米辛 J [#]	C ₂₂ H ₂₈ O ₆	-1.04	388.1882	389.1955	34.35	[M+H] ⁺	287/227		+	+	+	五味子
20	五味子酚	C ₂₃ H ₃₀ O ₆	-1.01	402.2038	403.2111	29.49	[M+H] ⁺	340/302		+		+	五味子
21	五味子甲素	C ₂₄ H ₃₂ O ₆	-1.25	416.2194	417.2267	43.37	[M+H] ⁺	402/347/316/301		+			五味子
22	五味子甲素 -CH ₂ + O ₂	C ₂₃ H ₃₀ O ₈	-0.92	434.1937	417.1904	26.11	[M+H-H ₂ O] ⁺	399/359/327/313/ 296/281/253		+	+	+	五味子
23	五味子甲素 -CH ₂	C ₂₃ H ₃₀ O ₆	-0.81	402.2039	403.2112	39.03	[M+H] ⁺	388/302/287		+	+	+	五味子
24	五味子醇乙 -CH ₂	C ₂₂ H ₂₆ O ₇	-1.24	402.1674	403.1746	23.20	[M+H] ⁺	385/271/345/330/313		+	+	+	五味子
25	五味子醇甲 [#]	C ₂₃ H ₃₂ O ₇	-1.13	432.2143	415.2107	32.98	[M+H-H ₂ O] ⁺	384/369/346		+	+		五味子
26	五味子醇乙 -OCH ₂ + carbonyl formation	C ₂₂ H ₂₄ O ₇	-1.35	400.1517	401.1589	33.98	[M+H] ⁺	383/368/352/341/326			+	+	五味子
27	五味子甲素 -2CH ₂	C ₂₂ H ₂₈ O ₆	-0.94	388.1882	387.1810	35.37	[M-H] ⁻	357/326/311				+	五味子
28	阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	-1.51	194.0576	193.0503	22.00	[M-H] ⁻	178/134		+	+	+	远志 / 枸杞
29	对羟基肉桂酸	C ₉ H ₈ O ₃	-1.02	164.0472	163.0399	21.36	[M-H] ⁻	119/93		+	+	+	远志 / 枸杞
30	芥子酸	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	-0.86	224.0683	223.0610	22.04	[M-H] ⁻	149/121		+			远志 / 枸杞
31	16α-hydroxytrametenolic acid + O ₂	C ₃₀ H ₄₆ O ₆	-0.73	502.3291	501.3218	33.39	[M-H] ⁻	441		+	+	+	茯苓
32	茯苓酸 B	C ₃₀ H ₄₄ O ₅	-1.28	484.3183	485.3255	25.89	[M+H] ⁺	467/449/439				+	茯苓
33	茯苓酸 B + O	C ₃₀ H ₄₄ O ₆	-1.41	500.3131	501.3203	30.43	[M+H] ⁺	483/465/455/437		+	+	+	茯苓
34	trametenolic acid + O ₂ -2H	C ₃₀ H ₄₆ O ₅	-0.76	486.3342	487.3414	35.43	[M+H] ⁺	469/451/433		+	+	+	茯苓
35	茯苓酸 B-O + 2H	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	-0.51	470.3394	471.3467	35.17	[M+H] ⁺	453/435/407			+	+	茯苓
36	茯苓酸 -2H-C ₂ H ₂ O	C ₃₁ H ₄₈ O ₄	-0.85	484.3549	485.3621	35.25	[M+H] ⁺	469/451				+	茯苓
37	茯苓酸 B-O + 4H	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	-0.38	472.3551	473.3625	32.55	[M+H] ⁺	455/427/299				+	茯苓
38	茯苓酸 B-2H	C ₃₀ H ₄₂ O ₅	-2.73	482.3019	483.3092	34.09	[M+H] ⁺	465/447/437				+	茯苓
39	茯苓酸 B + O-2H	C ₃₀ H ₄₂ O ₆	-0.89	498.2977	499.3050	31.19	[M+H] ⁺	481/453/435/311/293				+	茯苓
40	茯苓酸 G	C ₃₀ H ₄₆ O ₅	-1.32	486.3339	485.3266	35.46	[M-H] ⁻	423		+	+	+	茯苓
41	α-asarone + O	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	-0.96	224.1046	225.1119	19.94	[M+H] ⁺	210/193		+	+	+	石菖蒲
42	α-asarone-2H + O	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	-1.27	222.0889	223.0962	24.35	[M+H] ⁺	195		+			石菖蒲

注 (Note): [#]. 经对照品验证 ([#]. verified by reference)。

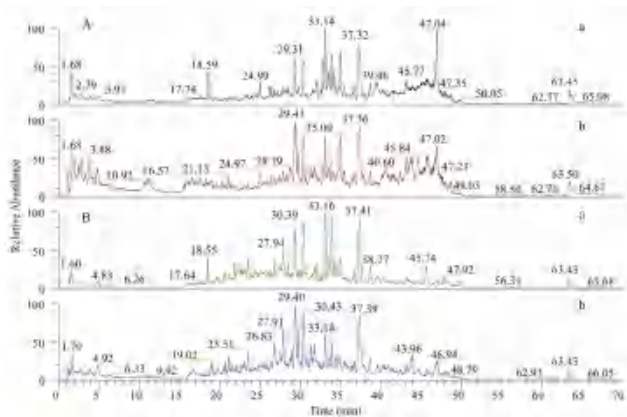


图 4 正 (A)、负 (B) 离子模式下空白粪便组织 (a) 和含药粪便组织 (b) 的总离子流图

Fig 4 Total ion current plots of blank feces tissue (a) and drug-containing faeces tissue (b) in positive (A) and negative (B) ion modes

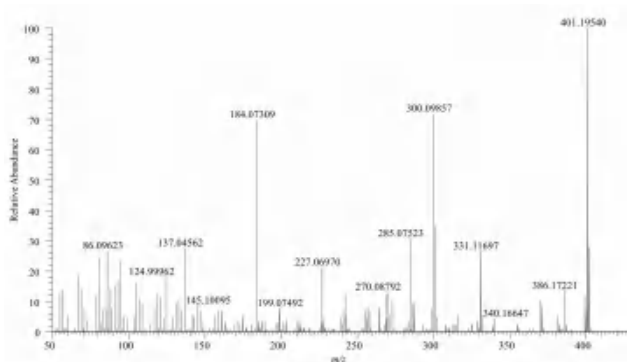


图 5 五味子乙素二级质谱图

Fig 5 Secondary mass spectrum of schisandrin B

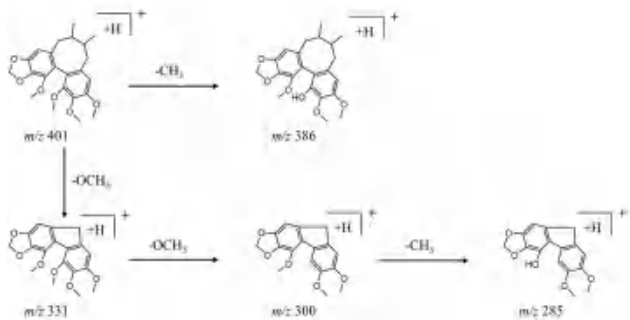


图 6 五味子乙素可能的质谱裂解途径

Fig 6 Possible mass spectrometric cleavage pathways of schisandrin B

3.2.2 细叶远志皂苷 在负离子模式下, 细叶远志皂苷产生准分子离子峰 m/z 679.3696 $[M-H]^-$ 。二级质谱图主要碎片离子 m/z 为 455 和 425。C-3 位的葡萄糖与 C-23 位的羧基在偶联下发生断裂, 脱去一分子葡萄糖和 H_2O 、 CO_2 , 得特征碎片离子 m/z 455 $[M-H-Glc-H_2O-CO_2]^-$; 在此基础上, C-14 位的 CH_2OH 发生断裂, 脱去 CH_2O , 得特征碎片离子 m/z 425 $[M-H-Glc-H_2O-CO_2-CH_2O]^-$ ^[4]。与细叶远志皂苷质谱行为数据一致, 故鉴定该化合物为细叶远志皂苷。其二级质谱图与裂解途径见图 7。

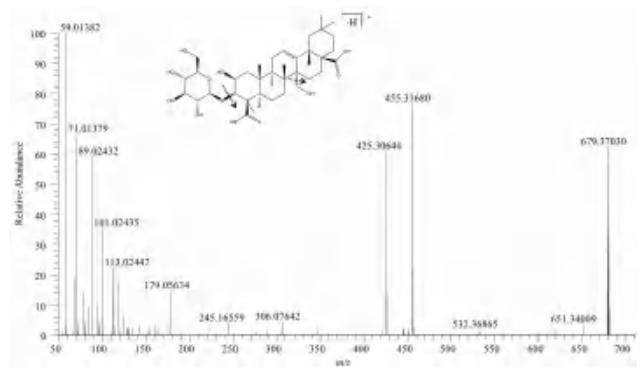


图 7 细叶远志皂苷可能的裂解途径和二级质谱图

Fig 7 Possible cleavage pathways and secondary mass spectrum of tenuifolioside

4 讨论

课题组前期研究发现远志蔗糖酯类、远志吡啶酮类、寡聚糖类、皂苷类以及五味子中的木脂素类成分可以原形吸收入血, 在本实验中进一步在脑内检测到远志中的细叶远志皂苷、细叶远志苷 A、Presenegenin 以及五味子中的五味子乙素和戈米辛 J。研究表明, 细叶远志皂苷和细叶远志苷 A 具有改善认知障碍、提高学习能力、保护神经细胞等作用^[6-7], 五味子木脂素可以调节神经递质、抗氧化应激、抑制神经炎症^[8], 这些入脑成分可能是该方治疗 ADHD 的重要药效物质基础^[8]。中药皂苷类成分往往口服生物利用度较低, 难以通过血脑屏障到达脑组织, 但在本研究的脑组织部位中可检测到细叶远志皂苷, 推测可能是本方中作为佐使药的石菖蒲有效促进了细叶远志皂苷入脑, 提高了其脑靶向性^[9], 这体现了静宁方药物配伍协同作用特点。

熟地黄补血滋阴、益精填髓, 是临床治疗 ADHD 的高频使用药材, 也是静宁颗粒的君药。毛蕊花糖苷等苯乙醇类化合物是熟地黄中重要的活性成分。有研究发现, 毛蕊花糖苷可改善 $A\beta_{1-42}$ 诱导的认知功能障碍, 减少淀粉样蛋白沉积, 并逆转中枢胆碱能功能障碍^[10]。毛蕊花糖苷还具有抗抑郁作用, 可显著改善小鼠焦虑、抑郁样行为和学习记忆能力, 其作用机制可能与调节神经递质和抑制炎症反应等有关^[11]。前期血浆中检测到毛蕊花糖苷, 但在后续药动学研究中其血药浓度低于检测下限, 未能绘出其药物浓度-时间曲线^[4]。本次在回肠和粪便中检测到咖啡酸和甲基咖啡酸两种毛蕊花糖苷肠内菌代谢成分, 推测毛蕊花糖苷在体内部分以原形入血, 部分在胃肠道发生代谢。此外, 在回肠中还检测到奎宁酸、水苏糖和地黄苷 D 这 3 种熟地黄原形成分, 未见吸

收入血。其中水苏糖可调节大鼠肠道菌群结构,显著降低拟杆菌属丰度^[12]。说明本方中熟地黄可通过入血、调节肠道菌群等途径发挥其作用。

静宁方中存在茯苓酸、茯苓酸 B、松苓新酸等多种三萜酸类化合物,而前期在入血成分中并未检测到这类成分,但本实验在粪便中检测到 8 种茯苓三萜酸类成分代谢产物,茯苓酸 B + O、trametenolic acid + O₂-2H、茯苓酸 B-O + 2H 在肠组织中可以检测到,推测其可能为肠道菌群代谢产物,茯苓酸 B-2H 等可能为肝脏代谢产物^[13-14]。有研究发现,茯苓三萜类成分可以改善慢性肾病大鼠肠道菌群失衡,而另一项研究显示,三萜类成分显著改变了小鼠肠道代谢物中短链多肽的含量,降低了脾脏和肝脏中的肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平,但并不会改变小鼠肠道菌群结构和组成^[15-16]。因此,本课题组推测静宁方中茯苓三萜类成分在体内是转化成了其他代谢产物发挥作用的,但其作用机制尚不确定,后续可进一步探究其作用途径。

综上所述,本研究对静宁方的入脑、入肠及粪便成分进行了鉴定,初步探究了其治疗 ADHD 的药效物质基础。静宁方中太子参、茯苓和枸杞子均含有大量多糖类成分,但本研究中未能对这些多糖类成分进行鉴定分析,后续可针对多糖类成分建立分析方法,补充本研究的不足之处,进一步阐明静宁方的药效物质基础。

参考文献

- [1] 杨春静, 时正媛, 续茜桥, 等. 静宁颗粒对 H₂O₂ 诱导的原代皮层神经元氧化应激的保护作用研究 [J]. 陕西中医, 2022, 43 (2): 145-150.
- [2] 方琼杰, 王俊宏, 丁一芸, 等. 静宁颗粒对注意力缺陷多动障碍模型大鼠认知功能及纹状体单胺类的影响 [J]. 世界中西医结合杂志, 2020, 15 (2): 273-277.
- [3] 于庆洋. 基于脑肠轴探讨静宁颗粒对 ADHD 胃肠功能的影响及其作用机制 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.
- [4] Yang CJ, Yin XB, Dong XX, et al. Determination of the phytochemical composition of Jingning formula and the vivo pharmacokinetics of its metabolites in rat plasma by UPLC-MS/MS [J]. J Chromatogr B, 2017, 1067: 71-88.
- [5] 李颖, 孟璐, 郭彩会, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的五酯胶囊及其入血原型木脂素类成分快速鉴定分析 [J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41 (13): 1299-1304.
- [6] Wang L, Jin GF, Yu HH, et al. Protective effects of tenuifolin isolated from *Polygala tenuifolia* Willd roots on neuronal apoptosis and learning and memory deficits in mice with Alzheimer's disease [J]. Food Funct, 2019, 10 (11): 7453-7460.
- [7] Yu BY, Dong XZ, Hu Y, et al. Tenuifoliside A inhibits corticosterone-induced neurotoxicity of rat glioma cells via ERK pathway [J]. Acta Pharmacol Sin, 2013, 34: 119.
- [8] Wang MY, Li N, Jing S, et al. Schisandrin B exerts hypnotic effects in PCPA-treated rats by increasing hypothalamic 5-HT and γ -aminobutyric acid levels [J]. Exp Ther Med, 2020, 20 (6): 142.
- [9] 汪鼎. 定志小丸中石菖蒲促进 5 种皂苷类成分“脑靶向”特性的研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2019.
- [10] Shiao YJ, Su MH, Lin HC, et al. Acteoside and isoacteoside protect amyloid β peptide induced cytotoxicity, cognitive deficit and neurochemical disturbances in vitro and in vivo [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18 (4): 895.
- [11] 薛晓燕, 潘瑾, 施会山, 等. 基于 RNA-Seq 探讨毛蕊花糖苷抗抑郁的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28 (14): 148-157.
- [12] 王露. 地黄水苏糖对糖尿病小鼠肠道菌群的影响 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2013.
- [13] 冯桂芳. 基于质谱技术的定志小丸治疗阿尔兹海默症的体内外化学物质组研究 [D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2019.
- [14] 杨林. 基于肠道菌群转化及血清药物化学的开心散药效物质研究 [D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2023.
- [15] Feng YL, Cao G, Chen DQ, et al. Microbiome-metabolomics reveals gut microbiota associated with glycine-conjugated metabolites and polyamine metabolism in chronic kidney disease [J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76 (24): 4961-4978.
- [16] Lai Y, Yu HL, Deng HL, et al. Three main metabolites from (F. A. Wolf) Ryvarden & Gilb regulate the gut microbiota in mice: a comparative study using microbiome-metabolomics [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 1-15.

(收稿日期: 2024-01-19; 修回日期: 2024-03-01)

钩藤内生放线菌 *Streptomyces* sp. IMW-B19 化学成分研究

郭永华¹, 赵中振¹, 徐畅¹, 刘莹¹, 张媛¹, 王贵阳^{2*}, 张薇^{1*}, 魏胜利^{1*} (1.北京中医药大学 中药学院, 北京 102488; 2.中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要: **目的** 研究钩藤内生放线菌 *Streptomyces* sp. IMW-B19 发酵产物的次生代谢产物及部分化合物的生物活性。**方法** 该菌株的发酵产物采用 ODS、Sephadex LH-20、半制备 HPLC 等色谱技术进行分离纯化, 并采用 ESI-MS 和 NMR 鉴定化合物的化学结构。使用人肝癌 HepG2 细胞评价化合物 **1** 对 11 β -羟类固醇脱氢酶 1 活性的影响。**结果** 共分离得到 11 个化合物, 经多种波谱数据分析和文献对比, 分别鉴定为 actiphenol (**1**)、苯甲酸薄荷酯 A (**2**)、cyclo (L-Pro-L-Phe) (**3**)、胸苷 (**4**)、11-hydroxy-4-amorphen-15-oic acid (**5**)、3-吲哚甲酸甲酯 (**6**)、苯乙酸 (**7**)、1-(3-ethylphenyl)-ethane-1, 2-diol (**8**)、亚油酸 (**9**)、亚油酸甲酯 (**10**) 和 2-氨基-4-甲氧基苯甲酸 (**11**)。化合物 **1** 对 11 β -羟类固醇脱氢酶 1 具有明显的抑制作用, 在 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 抑制率达到 86.01%。**结论** 从钩藤内生放线菌 *Streptomyces* sp. IMW-B19 发酵产物中共分离得到 11 个化合物, 其中化合物 **4**、**5**、**8** 为首次从链霉菌属的放线菌中分离得到。化合物 **1** 对 11 β -羟类固醇脱氢酶 1 具有明显的抑制作用。

关键词: 钩藤; 内生放线菌; 化学成分; 次生代谢产物; 11 β -羟类固醇脱氢酶 1

中图分类号: Q946.91, R283 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)06-1412-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.003

Chemical components of endophytic actinomycetes *Streptomyces* sp. IMW-B19 from *Uncaria rhynchophylla*

GUO Yong-hua¹, ZHAO Zhong-zhen¹, XU Chang¹, LIU Ying¹, ZHANG Yuan¹, WANG Gui-yang^{2*}, ZHANG Wei^{1*}, WEI Sheng-li^{1*} (1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488; 2. Institute of Pharmaceutical Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050)

Abstract: Objective To determine the chemical components and their bioactivity of secondary metabolites from fermentation products of *Streptomyces* sp. IMW-B19 from *Uncaria rhynchophylla*. **Methods** The fermentation products of this strain were separated and purified by ODS, Sephadex LH-20, semi-prepartic HPLC and other chromatographic techniques, and the chemical structures of the compounds were identified by ESI-MS and NMR. Human liver cancer (HepG2) cells were used to evaluate the effect of compound **1** on the activity of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 (11 β -HSD1). **Results** Totally 11 compounds were obtained and identified as actiphenol (**1**), menthyl phenatate A (**2**), cyclo (L-Pro-L-Phe) (**3**), thymidine (**4**), 11-hydroxy-4-amorphen-15-oic acid (**5**), methyl indole-3-carboxylate (**6**), phenylacetic acid (**7**), 1-(3-ethylphenyl)-ethane-1, 2-diol (**8**), linoleic acid (**9**), methyl linoleate (**10**) and 2-amino-4-methoxybenzoic acid (**11**). Compound **1** greatly inhibited 11 β -HSD1, and the inhibition rate reached 86.01% at the concentration of 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. **Conclusion** Totally 11 compounds have been obtained, and compounds **4**, **5** and **8** are isolated from actinomycetes of the genus *Streptomyces* for the first time. Compound **1** shows obvious inhibition on 11 β -HSD1.

Key words: *Uncaria rhynchophylla*; endophytic actinomycete; chemical constituent; secondary metabolite; 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases 1

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.81803687)。

作者简介: 郭永华, 男, 硕士研究生, 主要从事内生菌代谢产物与发现研究, email: 17685931606@163.com *通信作者: 王贵阳, 男, 副研究员, 主要从事微生物天然产物研究, email: wangguiyang@imb.pumc.edu.cn; 张薇, 女, 副教授, 主要从事中药药效物质和作用机制研究, email: zhangwei_bucm@163.com; 魏胜利, 男, 教授, 主要从事精准药材定向培育研究, email: wsl7491@126.com

钩藤 *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil. 为茜草科 (Rubiaceae) 钩藤属 (*Uncaria*) 植物, 在我国为常用中药, 具有息风定惊、清热平肝之功效, 临床常用于肝风内动、惊痫抽搐、高热惊厥、感冒夹惊、小儿惊啼、妊娠子痫、头痛眩晕等^[1]。现代研究表明钩藤具有多种药理作用, 如降压、抗心律失常等^[2], 广泛用于治疗高血压等心血管疾病^[3]。钩藤所含化学成分类型丰富, 目前已从钩藤的带钩茎枝、叶和根的乙醇、甲醇提取物及水煎液中提取分离得到生物碱、黄酮、三萜及皂苷等不同结构类型的上百种化学成分, 其中多种成分被证明是钩藤治疗各类心血管疾病的活性物质^[4-5]。

植物内生菌与宿主长期协同进化过程中能够产生代谢产物来促进宿主生长和抗病能力, 因此具有重要的研究价值。一方面, 植物内生菌是发现天然活性物质和新药开发的重要源泉, 如我国学者从植物内生菌中发现了新型抗流感病毒化合物 APL-16-5^[6]; 另一方面, 内生菌与植物次生代谢物在很多方面都密切相关, 植物内生菌的研究能够促进其宿主植物中活性代谢产物的研究与开发, 如刘欣等^[7]从喜树内生放线菌中发现了抗肿瘤的化合物 10- 羟基喜树碱。目前, 国内外对钩藤内生菌的研究报道很少, 且主要集中在钩藤内生真菌方面^[8-9], 针对钩藤内生放线菌的研究目前仍处于空白。而放线菌是临床使用微生物药物的重要来源, 目前常用的万古霉素、红霉素等均来源于放线菌。为了探索和发掘钩藤内生放线菌资源, 本课题组前期从钩藤茎叶中分离得到一系列内生菌, 通过对菌株的 16S rDNA 筛选, 发现其中一株内生放线菌 *Streptomyces* sp. IMW-B19。在此基础上, 本课题组对该菌株进行了代谢产物化学多样性和生物活性研究, 并从中分离得到了 11 个化合物, 其中化合物 1 对 11 β - 羟类固醇脱氢酶 1 (11 β -HSD1) 具有明显的抑制活性。现报道如下。

1 材料与与方法

1.1 仪器与试剂

AVANCE NEO 400 核磁共振仪、AVANCE NEO 600 核磁共振仪、Bruker ESQUIRE-LC 型质谱仪 (美国 Bruker 公司); VG-ZAB-HS 型质谱仪 (英国 VG 公司); LTQ-Orbitrap XL 质谱仪 (美国赛默飞世尔科技公司); HJ-6A 型数显恒温多头磁力搅拌器 (常州荣华仪器制造有限公司); EYELA 旋转蒸发仪 N-1210 (日本东京理化器械株式会社); GZX-9070 MBE 电热鼓风干燥箱 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂); BSA223S 电子天平 (赛多利斯科学仪器北京有限公司); HZQ-311C 落地

振荡器 (上海一恒科学仪器有限公司); 分析色谱柱用 ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μ m) (日本 Nacalai 公司); Agilent 1260 型高效液相色谱仪、半制备色谱柱用 Cosmosil 5C₁₈-MS-II (10 mm×250 mm, 5 μ m) (美国 Agilent 公司); 硅胶 GF₂₅₄ 预制薄层板 (20 cm×20 cm)、硅胶 (80 ~ 100 目、200 ~ 300 目) (青岛海洋化工厂); Sephadex LH-20 (美国 Pharmacia 公司); ODS (50 μ m, 日本株式会社 YMC); AB-8 型大孔吸附树脂 (天津南开大学化工厂); 葡萄糖 (北京兰博利德商贸有限公司); 可溶性淀粉 (北京奥博星生物技术有限责任公司); 蛋白胨、可的松、氢化可的松 (上海源叶生物科技有限公司); 甘草酸 (成都乐美天医药科技有限公司); 碳酸钙和硫酸镁 (天津市致远化学试剂有限公司); 氯化钠 (国药集团化学试剂有限公司); 甲醇、乙腈为色谱纯 (美国 Fisher 公司), 其余化学试剂均为市售分析纯; HepG2 细胞 (中国科学院细胞库)。

1.2 菌种来源

菌株 *Streptomyces* sp. IMW-B19 分离自钩藤植株 *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil 茎叶部。

Streptomyces sp. IMW-B19 分离自广西产钩藤植株, 通过形态学对比 (见图 1), 结合 16S rDNA 基因测序 (Genebank No.OR995660), 进行系统发育树分析 (见图 2), 发现该菌属于放线菌目链霉菌亚目链霉菌科链霉菌属。菌株现保存于北京中医药大学精准中药实验室。



图 1 *Streptomyces* sp. IMW-B19 在 TCG 培养基上的菌株状态

Fig 1 Strain morphology of *Streptomyces* sp. IMW-B19 on TCG medium

1.3 培养基及培养条件

种子培养基: 葡萄糖 4 g, 酪蛋白 5 g, 蛋白胨 3 g, 加蒸馏水定容至 1.0 L。

发酵培养基: 可溶性淀粉 20 g, 葡萄糖 10 g, 蛋白胨 5 g, 酵母粉 5 g, NaCl 4 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, CaCO₃ 2 g, pH 7.0, 加蒸馏水定容至 1.0 L。

配制 50 mL 种子液培养基, 121 $^{\circ}$ C、100 kPa 高压灭菌 20 min, 室温冷却得种子液。无菌条件下于超净台中挑选单克隆菌落接种到液体种子液培养基中, 220 r · min⁻¹、28 $^{\circ}$ C 恒温摇床振荡培养 72 h 后得种子液。配制 500 mL 发酵培养基,



图2 基于16S rDNA菌株 *Streptomyces* sp. IMW-B19 系统发育树
Fig 2 Phylogenetic tree based on 16S rDNA strain *Streptomyces* sp. IMW-B19

121 °C、100 kPa 高压灭菌 20 min，室温冷却得到发酵液。超净台中，按照比例吸取种子液（4 mL 种子液接种到 100 mL 发酵液）至装有发酵培养基的锥形瓶中，放置摇床中 220 r · min⁻¹，28 °C 发酵 7 d，共发酵 20 L。

1.4 提取与分离

发酵完成后，经离心处理（4000 r · min⁻¹，10 min，室温）分别获得发酵液上清液和菌体沉淀。上清液倒回三角瓶中，沉淀合并，加入甲醇溶液，置摇床上振荡洗脱 3 次，每次 3 h。与此同时，将菌液加入 AB-8 大孔树脂（3 g/50 mL）进行吸附后以甲醇洗脱得到粗提物 1，菌体沉淀以甲醇洗脱得到粗提物 2。合并粗提物后用乙酸乙酯进行萃取，减压浓缩，得总提取物 5.003 g。

总提取物经 ODS 中压柱色谱分离，甲醇-水（2%→4%→8%→20%→37%→47%→65%→85%→100% MeOH）梯度洗脱，减压回收溶剂得到组分 F2 ~ F37。F2 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离（甲醇洗脱），通过薄层色谱检识，合并得到亚组分 F2M1 ~ F2M6，F2M2 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离（甲醇-水 = 80 : 20 洗脱），通过薄层色谱检识，合并得到 12 个不同组分（F2M2 H1 ~ F2M2 H12），F2M2 H9 通过半制备高效液相色谱（甲醇-水 = 10 : 90）制备得到化合物 7（40.0 mg， $t_R = 20$ min）和化合物 11（3.6 mg， $t_R = 52$ min）。F3 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离（甲醇洗脱），通过薄层色谱检识，合并得到亚组分

F3M1 ~ F3M7，F3M7 通过半制备高效液相色谱（甲醇-水 = 20 : 80）制备得到化合物 3（1.2 mg， $t_R = 15$ min）。F6 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离（甲醇洗脱），通过薄层色谱检识，合并得到亚组分 F6M1 ~ F6M12，F6M4 通过半制备高效液相色谱（甲醇-水 = 45 : 55）制备得到化合物 8（3.5 mg， $t_R = 20$ min）和化合物 4（13.5 mg， $t_R = 36$ min）。F10 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离（甲醇洗脱），通过薄层色谱检识，合并得到亚组分 F10M1 ~ F10M21，F10M18 经过半制备高效液相色谱（甲醇-水 = 50 : 50）制备得到化合物 6（0.6 mg， $t_R = 10$ min）。F14 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离（甲醇洗脱），通过薄层色谱检识，合并得到亚组分 F14M1 ~ F14M13，F14M5 通过半制备高效液相（甲醇-水 = 60 : 40）制备得到化合物 1（3.6 mg， $t_R = 25$ min），F14M10 通过半制备高效液相（甲醇-水 = 60 : 40）制备得到化合物 2（0.7 mg， $t_R = 30$ min）。F19 通过半制备高效液相（甲醇-水 = 80 : 20）制备得到化合物 5（0.6 mg， $t_R = 20$ min）。F21 通过半制备高效液相色谱（甲醇-水 = 90 : 10）制备得到化合物 9（32.0 mg， $t_R = 23$ min）和化合物 10（18.6 mg， $t_R = 30$ min）。

1.5 HepG2 细胞中 11 β -HSD1 的活性测定

HepG2 细胞培养后，用胰蛋白酶-EDTA 消化后铺于 6 孔板中，每孔 1.5×10^6 个细胞。24 h 后，6 孔板中分别加入底物可的松（10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ）和不同浓度（0.1、1、10、20、50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ）药物（11 β -HSD1）及阳性药甘草酸（20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ）处理 12 h 时。取上清液，12 000 r · min⁻¹ 离心 5 min，采用高效液相色谱法（流动相为甲醇-水 = 54 : 46，流速为 1.0 mL · min⁻¹，检测波长为 240 nm；柱温为 25 °C）检测上清液中 11 β -HSD1 催化产物氢化可的松（DHC）和底物可的松（CORT）的量，并计算 DHC 与 CORT 比值来反映细胞内 11 β -HSD1 活性，反映药物对 HepG2 细胞 11 β -HSD1 活性的影响^[10]。酶的还原活性（%）= CORT 浓度 / DHC 浓度 × 100%。

2 结果与分析

2.1 结构鉴定

化合物 1 ~ 11 的化学结构如图 3 所示。

化合物 1：淡黄色粉末（丙酮）；ESI-MS： m/z 276.1 [M + H]⁺（分子式：C₁₅H₁₇NO₄，分子量 275.1）；¹H-NMR（600 MHz，CD₃COCD₃） δ ：7.64（1H，s，H-5），7.26（1H，s，H-3），3.30（2H，d， $J = 6.7$ Hz，H-8），2.84（1H，m，H-9），2.77（2H，dd， $J = 17.3, 4.3$ Hz，H-10、H-14），2.48（2H，dd， $J = 17.3, 10.8$ Hz，H-10、H-14），2.26

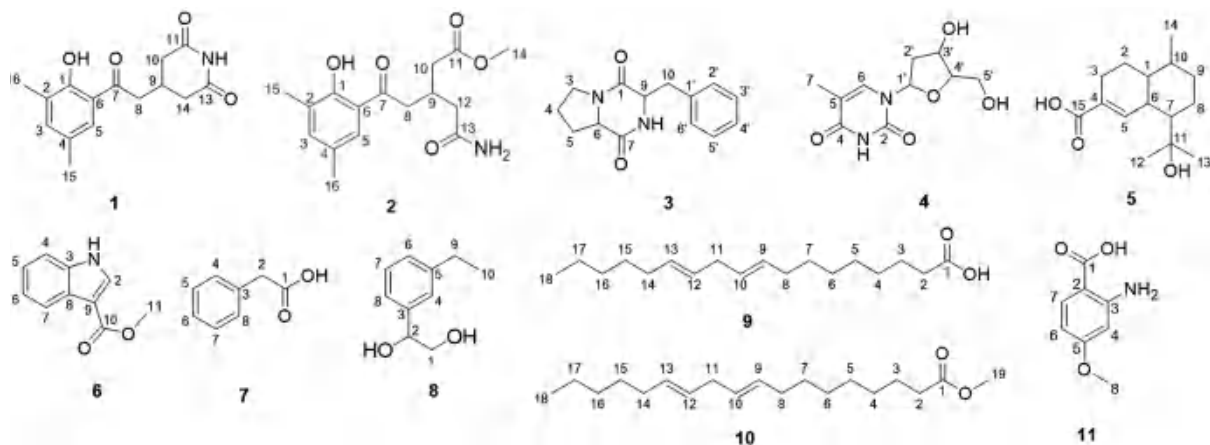


图 3 化合物 1 ~ 11 的化学结构

Fig 3 Chemical structures of compounds 1 ~ 11

(3H, s, H-16), 2.18 (3H, s, H-15)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3COCD_3) δ : 206.3 (C-7), 172.8 (C-11), 172.8 (C-13), 159.3 (C-1), 139.2 (C-3), 128.6 (C-4), 128.6 (C-5), 127.6 (C-2), 119.3 (C-6), 43.3 (C-8), 38.1 (C-10), 38.1 (C-14), 27.4 (C-9), 20.4 (C-16), 15.6 (C-15)。以上数据与文献^[11]对照, 鉴定化合物 1 为 actiphenol。

化合物 2: 淡黄色粉末 (丙酮); ESI-MS: m/z 308.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (分子式: $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_5$, 分子量 307.1); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3COCD_3) δ : 7.71 (1H, s, H-5), 7.26 (1H, s, H-3), 3.62 (3H, s, H-14), 3.29 (2H, m, H-8), 2.95 (1H, m, H-9), 2.53 (2H, m, H-10), 2.40 (2H, m, H-12), 2.28 (3H, s, H-16), 2.27 (3H, s, H-15)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3COCD_3) δ : 207.4 (C-7), 174.3 (C-13), 173.3 (C-11), 159.6 (C-1), 139.1 (C-3), 128.8 (C-5), 128.2 (C-4), 127.4 (C-2), 119.3 (C-6), 51.6 (C-14), 42.7 (C-8), 39.5 (C-12), 38.2 (C-10), 30.4 (C-9), 20.4 (C-16), 15.4 (C-15)。以上数据与文献^[11]对照, 鉴定化合物 2 为苯甲酸薄荷酯 A。

化合物 3: 白色粉末 (甲醇); ESI-MS: m/z 267.1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (分子式: $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$, 分子量 244.1); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.30 (3H, s, H-3', H-4', H-5'), 7.18 (1H, s, H-2', H-6'), 4.20 (1H, m, H-6), 3.52 (1H, m, H-9), 3.35 (1H, m, H-3), 3.18 (1H, m, H-10), 2.59 (1H, m, H-3), 2.98 (1H, m, H-10), 2.02 (1H, m, H-5), 1.89 (1H, m, H-5), 1.66 (2H, m, H-4)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 171.4 (C-1), 170.3 (C-7), 136.9 (C-1'), 131.3 $\times 2$ (C-3', C-5'), 129.7 $\times 2$ (C-2', C-6'), 128.5 (C-4'), 59.8 (C-6), 59.1 (C-9), 46.2 (C-3), 41.0 (C-10),

29.8 (C-5), 22.5 (C-4)。以上数据与文献^[12]对照, 鉴定化合物 3 为 cyclo (L-Pro-L-Phe)。

化合物 4: 白色粉末 (甲醇); ESI-MS: m/z 265.1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (分子式: $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5$, 分子量 242.1); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.80 (1H, d, $J = 1.4$ Hz, H-6), 6.28 (1H, t, $J = 6.8$ Hz, H-1'), 4.39 (1H, dt, $J = 6.5, 3.4$ Hz, H-3'), 3.90 (1H, m, H-4'), 3.78 (1H, dd, $J = 12.0, 3.7$ Hz, H-5'), 3.72 (1H, dd, $J = 12.0, 3.7$ Hz, H-5'), 2.22 (2H, m, H-2'), 1.87 (3H, d, $J = 1.1$ Hz, H-7)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 167.1 (C-4), 152.9 (C-2), 138.1 (C-6), 111.6 (C-5), 88.8 (C-4'), 86.3 (C-1'), 72.2 (C-3'), 62.9 (C-5'), 41.2 (C-2'), 12.5 (C-7)。以上数据与文献^[13]对照, 鉴定化合物 4 为胸苷。

化合物 5: 白色粉末 (甲醇); ESI-MS: m/z 251.2 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (分子式: $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_3$, 分子量 252.2); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 5.24 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-5), 2.50 (1H, m, H-6), 2.19 (2H, H-2), 1.89 (2H, m, H-3), 1.61 (2H, m, H-1, H-10), 1.33 (2H, m, H-9), 1.26 (2H, m, H-8), 0.92 (6H, H-12, H-13), 0.92 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-14)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 175.2 (C-15), 139.5 (C-5), 128.8 (C-4), 72.0 (C-11), 52.7 (C-7), 41.6 $\times 2$ (C-1, C-6), 34.8 (C-9), 30.9 (C-12), 30.2 (C-13), 29.7 (C-10), 25.9 (C-2), 23.7 (C-8), 20.5 (C-3), 15.1 (C-14)。以上数据与文献^[14]对照, 鉴定化合物 5 为 11-hydroxy-4-amorphen-15-oic acid。

化合物 6: 白色粉末 (甲醇); ESI-MS: m/z 174.1 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (分子式: $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_2$, 分子量 175.1); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 8.58 (1H, s, H-2), 8.04 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-6), 7.44 (1H,

d, $J = 7.2$ Hz, H-4), 7.19 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-5), 7.19 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-7), 3.88 (3H, s, H-11)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 170.3 (C-10), 138.7 (C-2), 133.2 (C-8), 123.7 (C-9), 122.5 (C-4), 121.9 (C-5), 113.7 (C-7), 113.0 (C-6), 107.6 (C-3), 51.4 (C-11)。以上数据与文献^[15]对照, 鉴定化合物 **6** 为 3-吡啶甲酸甲酯。

化合物 **7**: 淡黄色粉末 (甲醇); ESI-MS: m/z 137.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (分子式: $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2$, 分子量 136.1); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.32 ~ 7.23 (5H, s, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8), 3.52 (2H, s, H-2)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 177.0 (C-1), 136.9 (C-3), 130.2 $\times 2$ (C-4, C-5), 129.6 $\times 2$ (C-6, C-7), 127.9 (C-8), 43.4 (C-2)。以上数据与文献^[16]对照, 鉴定化合物 **7** 为苯乙酸。

化合物 **8**: 淡黄色晶体 (甲醇); ESI-MS: m/z 189.1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (分子式: $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_2$, 分子量 166.1); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.35 ~ 7.05 (4H, H-4, H-6, H-7, H-8), 4.67 (1H, m, H-2), 3.60 (2H, m, H-1), 2.65 (2H, q, $J = 7.2$ Hz, H-9), 1.24 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, H-10); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 145.5 (C-5), 143.3 (C-3), 129.3 (C-7), 128.0 (C-6), 126.9 (C-8), 124.8 (C-4), 76.1 (C-2), 68.8 (C-1), 29.9 (C-9), 16.2 (C-10)。以上数据与文献^[17]对照, 鉴定化合物 **8** 为 1-(3-ethylphenyl)-ethane-1, 2-diol。

化合物 **9**: 淡黄色油状物 (甲醇); ESI-MS: m/z 279.2 $[\text{M-H}]^-$ (分子式: $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$, 分子量 280.2); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 5.36 (2H, m, H-10, H-12), 4.88 (2H, m, H-9, H-13), 2.79 (2H, t, $J = 6.1$ Hz, H-11), 2.33 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H-2), 2.08 (4H, m, H-8, H-14), 1.62 (2H, m, H-3), 1.32 (14H, m, H-4, H-5, H-6, H-7, H-15, H-16, H-17), 0.92 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, H-18)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 175.1 (C-1), 130.9 $\times 2$ (C-10, C-12), 129.1 $\times 2$ (C-9, C-13), 35.2 (C-2), 32.7 (C-16), 30.7 (C-7), 30.5 (C-15), 30.3 (C-6), 30.2 (C-5), 28.2 $\times 3$ (C-4, C-8, C-14), 26.6 (C-11), 23.6 $\times 2$ (C-3, C-17), 14.5 (C-18)。以上数据与文献^[18]对照, 鉴定化合物 **9** 为亚油酸。

化合物 **10**: 淡黄色油状物 (甲醇); ESI-MS: m/z 294.3 $[\text{M-H}]^-$ (分子式: $\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{O}_2$, 分子量 295.3); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 5.36 (4H, m, H-9, H-10, H-12, H-13), 3.66 (3H, s, H-1'), 2.79 (2H, t, $J = 6.1$ Hz, H-11), 2.33 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H-2), 2.08 (4H, m,

H-8, H-14), 1.62 (2H, m, H-3), 1.32 (14H, m, H-4, H-5, H-6, H-7, H-15, H-16, H-17), 0.92 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, H-18)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ : 176.0 (C-1), 130.9 $\times 2$ (C-10, C-12), 129.1 $\times 2$ (C-9, C-13), 52.0 (C-1'), 34.8 (C-2), 32.7 (C-2), 30.7 (C-11), 30.5 (C-5), 30.3 (C-4), 30.2 $\times 2$ (C-8, C-14), 28.2 (C-15), 28.1 (C-7), 26.5 (C-6), 26.0 (C-16), 23.6 (C-17), 14.4 (C-18)。以上数据与文献^[19]对照, 鉴定化合物 **10** 为亚油酸甲酯。

化合物 **11**: 白色粉末 (甲醇); ESI-MS: m/z 166.1 $[\text{M-H}]^-$ (分子式: $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_3$, 分子量 167.1); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ : 7.46 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-7), 7.39 (1H, d, $J = 8.3$, 2.1 Hz, H-6), 6.80 (1H, m, $J = 8.3$ Hz, H-4), 3.89 (3H, s, H-8)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CD_3OD) δ : 172.4 (C-1), 170.6 (C-5), 149.2 (C-3), 130.7 (C-7), 125.1 (C-2), 116.1 (C-6), 112.2 (C-4), 56.4 (C-8)。该化合物的氢谱数据与文献^[20]报道的数据基本一致, 鉴定化合物 **11** 为 2-氨基-4-甲氧基苯甲酸。

2.2 化合物 **1** 对 $11\beta\text{-HSD1}$ 的活性影响

内源性 $11\beta\text{-HSD1}$ 和 $11\beta\text{-HSD2}$ 是参与调节细胞内糖皮质激素水平的最重要的一类酶^[21]。其中, $11\beta\text{-HSD1}$ 在肝脏中能够将无活性的糖皮质激素皮质酮转化为活性糖皮质激素皮质醇^[22]。因此选择性 $11\beta\text{-HSD1}$ 抑制剂可通过调节人体内糖皮质激素水平进而在人体内发挥特定的生理作用, 如治疗心血管系统疾病、肥胖和代谢综合征等^[23]。本研究检测了不同浓度化合物 **1** 对 HepG2 细胞中 $11\beta\text{-HSD1}$ 的抑制活性, 结果显示化合物 **1** 具有较好的 $11\beta\text{-HSD1}$ 抑制作用, 且在 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 抑制率达到了 86.01%, 结果见图 4。

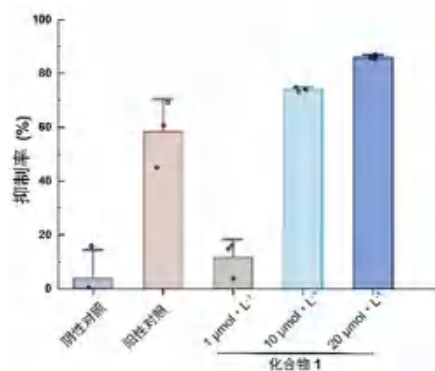


图 4 化合物 **1** 对 HepG2 细胞 $11\beta\text{-HSD1}$ 的活性影响

Fig 4 Effect of compound **1** on $11\beta\text{-HSD1}$ in HepG2 cells

3 讨论

本文从菌株 *Streptomyces* sp. IMW-B19 的液体

发酵物中共分离和鉴定了 11 个化合物, 化合物类型丰富, 包括 5 个生物碱、4 个有机酸、1 个芳香醇、1 个酯类成分。其中化合物 4、5、8 为首次从链霉菌属的放线菌中分离得到。此外, 生物活性研究发现化合物 1 对 11 β -HSD1 具有抑制作用。选择性 11 β -HSD1 抑制剂被认为是治疗心血管系统疾病和代谢综合征的重要手段, 但目前尚无 11 β -HSD1 抑制剂类药物上市。因此寻找和发现活性好、选择性高的 11 β -HSD1 抑制剂非常重要^[24]。化合物 1 对 11 β -HSD1 的抑制作用的相关研究此前未见报道, 后续可进一步研究。此外, 文献报道化合物 7 是一种天然存在的弱活性植物生长素^[25], 化合物 10 则具有明显抑制色素产生的作用^[26]。这些发现也侧面验证了内生菌能够通过释放植物激素等代谢产物来调控宿主植物的生理过程^[27]。

目前对于钩藤内生放线菌的研究处于空白, 按照“内共生”理论, 植物内生放线菌能产生与宿主相同或者类似的代谢产物^[28], 钩藤富含结构类型多样、生物活性广泛的化学成分, 钩藤内生菌也可能产生结构多样的生物活性物质, 对新药开发具有重大意义。本研究填补了钩藤内生放线菌的研究空缺, 为从钩藤内生放线菌中发现具有重要生物活性的次级代谢产物提供了借鉴。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 11.
- [2] 韦芳芳, 曾常青, 赵宇红, 等. 钩藤神经保护机制的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2014, 39 (14): 2603-2607.
- [3] 刘碧崇, 王强. 钩藤活性成分研究进展[J]. 成都大学学报(自然科学版), 2018, 37 (3): 269-272.
- [4] Ndagijimana A, Wang XM, Pan GX, et al. A review on indole alkaloids isolated from *Uncaria rhynchophylla* and their pharmacological studies[J]. Fitoterapia, 2013, 86: 35-47.
- [5] 张建钢, 陈纪军, 耿长安. 《中国药典》记载的钩藤基原植物吲哚生物碱研究进展[J]. 中国中药杂志, 2019, 44 (4): 685-695.
- [6] Zhao JY, Wang J, Pang X, et al. An anti-influenza A virus microbial metabolite acts by degrading viral endonuclease PA[J]. Nat Commun, 2022, 13 (1): 2079.
- [7] 刘欣, 许丽. 产抗肿瘤活性物质喜树内生菌分离鉴定[J]. 生物技术, 2023, 33 (4): 442-447, 475.
- [8] 曾慧婷, 叶琳, 易维婷, 等. 钩藤内生真菌 *Talaromyces* sp. 次级代谢产物研究[J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34 (10): 1707-1712.
- [9] 喻奕虎, 陈嘉怡, 易维婷, 等. 钩藤内生真菌 *Hypoxyylon* sp. HD-2014 化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 47 (14): 3816-3821.
- [10] 俞进, 楼宜嘉. α -甘草酸对肾 11 β -羟基类固醇脱氢酶的抑制作用[J]. 浙江医学, 2005, 27 (4): 263-265.
- [11] Cheenpracha S, Borris RP, Tran TT, et al. Three new amides from *Streptomyces* sp H7372 [J]. J Braz Chem Soc, 2011, 22 (2): 223-229.
- [12] 罗小卫, 林秀萍, 周雪峰, 等. 中国南海深海真菌 *Penicillium brocae* SCSIO 05793 的次级代谢产物研究[J]. 中国海洋药物, 2017, 36 (3): 23-28.
- [13] 黄胜阳, 石建功, 杨永春, 等. 长苞凹舌兰化学成分研究[J]. 药学学报, 2002, 37 (3): 199-203.
- [14] Brown GD. The sesquiterpenes of *Fabiana imbricate* [J]. Photochemistry, 1994, 35 (2): 425-433.
- [15] 邹吉斌, 张鹏, 安巧, 等. 越南槐种子化学成分的分离与鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28 (1): 165-172.
- [16] 郑茜, 张庆贺, 卢丹, 等. 吉林产玛咖的化学成分研究[J]. 中草药, 2014, 45 (17): 2457-2460.
- [17] Yang XQ, Yang YB, Zhao LX, et al. A novel tetrahydrofuran fatty acid from a new microbial isolate, *Pestalotia* sp. YIM 69032 cultivated in extract of potato [J]. J Am Oil Chem Soc, 2013, 90: 159-162.
- [18] 马迎聪, 俞静, 王家鹏, 等. 韭菜根的化学成分研究[J]. 中国药理学杂志, 2016, 51 (12): 972-975.
- [19] 罗影子, 黄明进, 沈寿茂, 等. 蜜环菌发酵液及其菌丝体的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35 (7): 1183-1190, 1162.
- [20] 姜建辉, 王咏梅, 陈新萍. 2-氨基-4-甲氧基苯甲酸的合成研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38 (33): 18636-18637.
- [21] Funder JW, Pearce PT, Smith R, et al. Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated [J]. Science, 1988, 242 (4878): 583-585.
- [22] Gathercole LL, Lavery GG, Morgan SA, et al. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1: translational and therapeutic aspects [J]. Endocr Rev, 2013, 34 (4): 525-555.
- [23] Shao SY, Zhang XJ, Zhang MX. Inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 ameliorates obesity-related insulin resistance [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 478 (1): 474-480.
- [24] 张雷, 张飞龙, 刘育, 等. 哌嗪脲类选择性 11 β -羟基类固醇脱氢酶 1 抑制剂的设计、合成及生物活性研究[J]. 中国药物化学杂志, 2017, 27 (5): 341-348.
- [25] 彭耀东, 黄英金, 何宽信, 等. 苯乙酸对烟草单倍体植株叶脉组织培养一步成苗的效应研究[J]. 中国烟草学报, 2004, 10 (2): 30-37.
- [26] Huh S, Kim YS, Jung E, et al. Melanogenesis inhibitory effect of fatty acid alkyl esters isolated from *Oxalis triangularis* [J]. Biol Pharm Bull, 2010, 33 (7): 1242-1245.
- [27] 张国壮. 产 ACC 脱氢酶根际促生菌的分离鉴定及其接种对小麦乙烯代谢和生长的效应[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2014.
- [28] 赵珂. 攀西地区药用植物内生及根际放线菌的多样性与抗菌活性研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2010.

(收稿日期: 2024-01-21; 修回日期: 2024-03-09)

基于 LC-MS/MS 法的芍药苷在正常和肝内胆汁淤积大鼠体内的药代动力学比较研究

杨梦换^{1,2}, 蒋罡^{1,2}, 陈卫东^{1,2}, 张善堂^{1,3*}, 王汝琳^{1,2*} (1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2. 省部共建安徽道地中药材品质提升协同创新中心, 合肥 230012; 3. 安徽省立医院药剂科, 合肥 230001)

摘要: 目的 比较正常和 17 α -乙炔基雌二醇诱导的胆汁淤积性肝损伤大鼠体内芍药苷的药代动力学过程的差异。方法 采用 LC-MS/MS 法检测给药后不同时间点大鼠血浆样本中芍药苷的含量, DAS 2.0 软件测算两组的药代动力学参数, 并进行统计学分析。结果 与正常大鼠相比, 胆汁淤积性肝损伤发生后, 芍药苷的 $t_{1/2Z}$ 、 $MRT_{0\sim\infty}$ 、 AUC 和 V_z/F 明显增加, 而 CL_z/F 显著降低。结论 与正常大鼠相比, 胆汁淤积模型大鼠体内芍药苷的浓度更高、消除速度更缓慢。

关键词: 芍药苷; 17 α -乙炔基雌二醇; 胆汁淤积性肝损伤; 药代动力学

中图分类号: R284.1, R932.5 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)06-1418-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.004

Pharmacokinetics of paeoniflorin in normal and intrahepatic cholestatic rats by LC-MS/MS

YANG Meng-huan^{1,2}, JIANG Gang^{1,2}, CHEN Wei-dong^{1,2}, ZHANG Shan-tang^{1,3*}, WANG Ru-lin^{1,2*} (1. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Ministry of Education-Anhui Joint Collaborative Innovation Center for Quality Improvement of Anhui Genuine Chinese Medicinal Materials, Hefei 230012; 3. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of USTC, Anhui Provincial Hospital, Hefei 230001)

Abstract: Objective To compare the pharmacokinetic process of paeoniflorin in normal rats and rats with 17 α -ethinylestradiol-induced cholestatic liver injury. **Methods** The content of paeoniflorin in the rat plasma samples at different time points after the administration was detected by LC-MS/MS. The pharmacokinetic parameters of the two groups were analyzed by DAS 2.0 software. **Results** The pharmacokinetic behaviors of rats changed after the development of cholestatic liver injury as compared to those of normal rats. Specifically, $t_{1/2Z}$, $MRT_{0\sim\infty}$, AUC and V_z/F of paeoniflorin were obviously increased, while CL_z/F was greatly decreased. **Conclusion** Compared with the normal rats, the concentration of paeoniflorin is higher and the elimination rate slower in the cholestatic model rats.

Key words: paeoniflorin; 17 α -ethinylestradiol; cholestatic liver injury; pharmacokinetics

芍药苷 (paeoniflorin, PF) 是一种单萜糖苷类化合物, 已被证明对于多种肝脏疾病具有药理活性, 其中对胆汁淤积性肝损伤也表现出治疗潜力。根据现有文献, PF 对 α -异硫氰酸萘酯 (α -naphthylisothiocyanate, ANIT) 诱导的胆汁淤积性肝损伤^[1], 胆管结扎 (bile duct ligation,

BDL) 导致的胆汁淤积性肝损伤^[2] 和 17 α -乙炔基雌二醇 (17 α -ethinylestradiol, EE) 诱导的胆汁淤积性肝损伤^[3] 等均表现出药理活性。然而, 尚未见关于 PF 在 EE 诱导的胆汁淤积大鼠体内药物代谢过程的报道, 且缺乏相关体内的药代动力学研究。因此, 本研究通过比较正常大鼠和 EE 诱导

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (No.82104517)。

作者简介: 杨梦换, 女, 硕士, 主要从事药物制剂方面的研究, email: angenghuan3@163.com *通信作者: 王汝琳, 女, 副教授, 主要从事中药药代动力学方面的研究, email: wangrulin@ahtcm.edu.cn; 张善堂, 男, 主任药师, 主要从事药剂学方面的研究, email: zhangshantang@163.com

的胆汁淤积性肝损伤大鼠在给予 PF 后的药代动力学参数的差异, 深入了解 PF 的体内代谢过程, 为进一步推动 PF 的临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 Sprague-Dawley 大鼠, 体重 180 ~ 220 g [辽宁长生生物技术股份有限公司, 动物许可证号: SCXK (辽) 2020-0001]。实验经安徽中医药大学实验动物中心批准 (批件号: AHUCM-rats-2023096)。

1.2 试药

PF (陕西百川生物科技有限公司, 纯度 > 98.0%, 批号: BCSW20230815-2); 栀子苷 (GEN, 上海源叶生物科技有限公司, 纯度 > 98.0%, 批号: S17O11Y127293); EE (上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 纯度 > 98.0%, 批号: I220243)。

1.3 仪器

SCIEX Triple Quad™ 4500 LC-MS/MS 联用仪 (美国 SCIEX 公司); AB135-S 型十万分之一电子分析天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司); TG16-WS 型台式高速离心机 (长沙湘仪离心机仪器有限公司); XW-80A 型微型涡旋混合器 (上海沪西分析仪器厂有限公司); MTN-2800D 氮吹浓缩装置 (天津奥特塞斯仪器有限公司)。

2 方法

2.1 溶液的制备

2.1.1 灌胃液 精密称取 PF, 加入适量的生理盐水溶解, 得到 $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 PF 灌胃液。

2.1.2 PF 及内标储备液 精确称取 PF 和内标 GEN 5.00 mg, 分别加入甲醇定容到 5 mL, 得到质量浓度均为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 PF 和 GEN 储备液, 于 4°C 储存备用。

2.2 分组与给药

实验前先适应性喂养大鼠 7 d。然后, 将大鼠随机分为两组, 分别为正常组和模型组, 每组 6 只。连续 5 d 皮下注射给予模型组大鼠 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量的 EE, 以诱导大鼠肝脏发生胆汁淤积性肝损伤。给药前禁食 12 h, 自由饮水。

2.3 血浆样品采集

在给予 PF 后的不同时间点 (0.083、0.25、0.5、0.75、1、2、4、6、8、10、12 h), 通过眼眶取血采集大鼠全血加入含有肝素的离心管中, $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 取上清液, 得到大鼠血浆样品。

2.4 样品处理

吸取 $90 \mu\text{L}$ 含药血浆, 加入离心管中, 再加入 $10 \mu\text{L}$ 的内标溶液 ($500 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), 将内标与

血浆涡旋混合后, 加入乙腈 $300 \mu\text{L}$, 充分涡旋混匀, 待蛋白质完全沉淀后, $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min。取上清液置于另一离心管中, 氮气吹干, 残余物加入 $100 \mu\text{L}$ 流动相, 涡旋使其充分溶解, $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液进行定量分析。

2.5 测定条件

2.5.1 色谱条件 采用 Hypersil GOLD 色谱柱 ($2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$, $1.9 \mu\text{m}$), 流动相为乙腈 (A) - 0.1% 甲酸 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 4.5 min, 10%A; 4.5 ~ 5.5 min, 10% ~ 90%A; 5.5 ~ 9.5 min, 90%A; 9.5 ~ 11 min, 90% ~ 10%A); 流速: $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量: $3 \mu\text{L}$, 柱温: 35°C 。

2.5.2 质谱条件 气动辅助电喷雾离子源 (ESI), 采用多重反应监测 (MRM) 模式进行检测。碰撞气压为 Medium, 气帘气压为 10 psi, 离子源气体压力为 55 psi, 离子喷射电压为 -4500 V 。采用选择负离子扫描模式, 待测成分及内标化合物的离子对质荷比 (m/z) 分别为 PF $525.2 \rightarrow 448.9$ 和 GEN $433.3 \rightarrow 225.0$ 。

2.6 方法学考察

2.6.1 专属性 分别取空白血浆、空白血浆 + PF + GEN 组、正常组血浆和模型组血浆, 按照“2.5”项下方法测定血浆中 PF 的含量。

2.6.2 线性关系 取 PF 储备液和空白血浆, 制备质量浓度分别为 9.7656 、 19.5313 、 39.0625 、 156.25 、 625 、 1250 、 $2500 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 含药血浆样品, 按“2.4”项下方法处理后进样测定。以 PF 和 GEN 的峰面积之比为纵坐标 (Y), 以 PF 的质量浓度为横坐标 (X), 进行线性回归 (权重为 $1/x^2$)。

2.6.3 精密度与准确度 在空白血浆中加入适量的对照品溶液, 制成低、中、高 3 种质量浓度分别为 25.00 、 937.50 、 $1875.00 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的工作溶液。按“2.4”项下方法处理, 每种质量浓度取 6 份质控样品, 连续 3 d 进样分析, 评价日内、日间的精密度和准确度。

2.6.4 稳定性 制备 6 份低、中、高质量浓度的质控样品, 分别进行以下处理: 自动进样器放置 24 h、 4°C 储存 14 d、室温放置 6 h、 -20°C 储存 30 d 以及反复冻融 3 次, 然后进样分析, 记录峰面积, 计算准确度。

2.6.5 基质效应和提取回收率 按“2.4”项下方法处理低、中、高质量浓度的质控样品各 6 份, 再按“2.5”项下方法进样, 记录峰面积为 A ; 另取空白血浆, 按“2.4”项下方法处理后, 低、中、高质量浓度的对照品溶液分别加在残渣中, 测定后记录峰面积为 B , 计算提取回收率 (A/B); 另

取低、中、高质量浓度的对照品溶液各 6 份，按“2.4”项下方法处理，测定后记录峰面积为 C ，计算基质效应 (B/C)。

2.6.6 残留效应 取定量上限的血浆样品和空白血浆样本，按“2.5”项下条件进样分析，计算残留效应。

2.7 数据分析与处理

使用 DAS 2.0 软件进行药代动力学参数计算，使用 Origin 软件绘制药物浓度 - 时间曲线，并使用 IBM SPSS Statistics 26 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 专属性

如图 1 所示，在血浆中 PF 和内标 GEN 与杂峰和其他内源性物质有很好的分离效果，表现出优异的专属性。

3.2 定量下限和线性范围

血浆中 PF 的标准曲线方程为 $Y = 0.0288X + 0.314$ ，线性范围为 $9.7656 \sim 2500 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ， r 为 0.9991，定量下限为 $9.7656 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，说明该成分的线性关系良好，并且具有较高的灵敏度。

3.3 准确度和精密度

如表 1 所示，低、中、高浓度水平 PF 日内、日间准确度均 $> 96\%$ ， RSD 均小于 10% 。结果表明该方法的准确度、精密度均满足了对生物样品的分析要求。

表 1 PF 的日内及日间准确度和精密度 ($n = 6$)
Tab 1 Inter- and intra-day accuracy and precision of PF ($n = 6$)

质量浓度 / ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	日内			日间		
	测定质量浓度 / ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	准确度 / %	RSD / %	测定质量浓度 / ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	准确度 / %	RSD / %
25.00	25.70 ± 1.28	102.76	5.0	24.78 ± 0.81	99.13	3.3
937.50	905.39 ± 46.85	96.57	5.2	936.46 ± 40.91	99.89	4.4
1875.00	1837.68 ± 105.35	98.01	5.7	1912.70 ± 64.50	102.01	3.4

3.4 稳定性

如表 2 所示，在血浆样品中，PF 的稳定性的准确度在 $95.41\% \sim 103.34\%$ ，这表明在实验过程

中 PF 能够保持稳定。为保证结果准确，应及时对样品进行前处理，以保证血浆中 PF 含量的稳定。

表 2 PF 的稳定性 ($n = 6$)
Tab 2 Stability of PF ($n = 6$)

质量浓度 / ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	自动进样器放置 24 h		4 °C 储存 14 d		室温放置 6 h		- 20 °C 储存 30 d		反复冻融 3 次	
	准确度 / %	RSD / %	准确度 / %	RSD / %	准确度 / %	RSD / %	准确度 / %	RSD / %	准确度 / %	RSD / %
25.00	97.53 ± 4.53	4.6	102.26 ± 9.72	8.5	99.34 ± 7.54	7.6	96.54 ± 6.83	7.1	101.27 ± 7.30	7.2
937.50	103.24 ± 8.76	8.5	96.12 ± 4.14	4.3	99.49 ± 6.65	6.7	97.98 ± 6.45	6.6	96.28 ± 4.37	4.5
1875.00	100.85 ± 6.06	6.0	103.34 ± 8.54	8.3	97.83 ± 6.84	7.0	95.41 ± 6.41	6.7	98.81 ± 7.46	7.6

3.5 基质效应和提取回收率

如表 3 所示，低、中、高浓度 PF 的基质效应分别为 103.89% 、 104.40% 和 101.11% ，提取回收率分别为 96.47% 、 95.32% 和 94.31% ，表明该方法可满足生物样品分析对提取回收率和基质效应的要求。

表 3 PF 的提取回收率和基质效应 ($n = 6$)
Tab 3 Extraction recovery and matrix effect of PF ($n = 6$)

质量浓度 / ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	提取回收率 / %	RSD / %	基质效应 / %	RSD / %
25.00	96.47 ± 5.38	5.6	103.89 ± 7.48	7.2
937.50	95.32 ± 6.83	7.2	104.40 ± 5.89	5.6
1875.00	94.31 ± 6.15	6.5	101.11 ± 5.37	5.3

3.6 残留效应

PF 及 GEN 的残留均 $< 5\%$ ，残留效应满足实验要求。

3.7 药代动力学研究

给药后不同时间点血浆样品中的 PF 浓度进行测定，绘制药物浓度 - 时间曲线图 (见图 2)。采用非房室模型方法，分析 PF 的药代动力学参数，包括末端消除半衰期 ($t_{1/2z}$)、平均驻留时间 (MRT)、药时曲线下面积 (AUC)、达峰时间 (t_{max})、达峰浓度 (C_{max}) 等。结果如表 4 所示，除 t_{max} 外，其他药代动力学参数的差异具有统计学意义。在大多数监测时间点上，胆汁淤积肝性损伤大鼠体内的 PF 浓度高于正常组。此外，与正常组大鼠相比，胆汁淤积性肝损伤大鼠体内 PF 的 $t_{1/2z}$ 和 $MRT_{0 \sim \infty}$ 明显延长， AUC 和 V_z/F 显著增加，而 CL_z/F 显著降低，说明在 EE 致胆汁淤积性肝损伤的病理条件下，PF 的体内药物代谢过程与正常大鼠有显著差异。

4 讨论

药物在体内的分布受到多种因素的影响，其

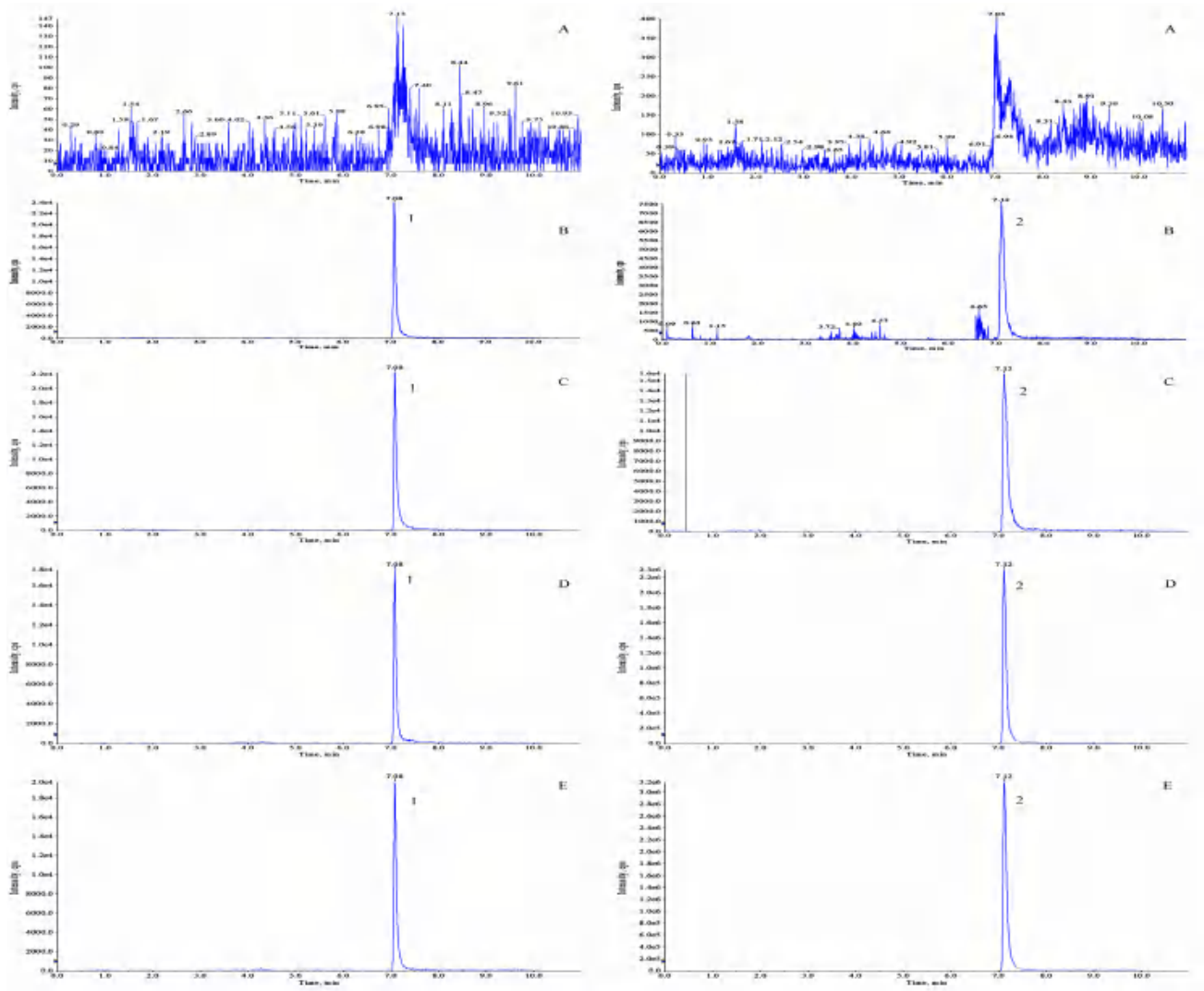


图 1 血浆中 PF 和 GEN 的液质联用色谱图

Fig 1 LC-MS/MS chromatogram of PF and GEN in the plasma

A. 空白血浆 (blank plasma); B. 空白血浆加入 PF 和 GEN (blank plasma with PF and GEN); C. 血浆中 PF 的定量下限 (lower limit of quantification of PF in the plasma); D. 正常组血浆 (plasma in normal group); E. 模型组血浆 (plasma in model group); 1. 栀子苷 (geniposide); 2. 芍药苷 (paeoniflorin)

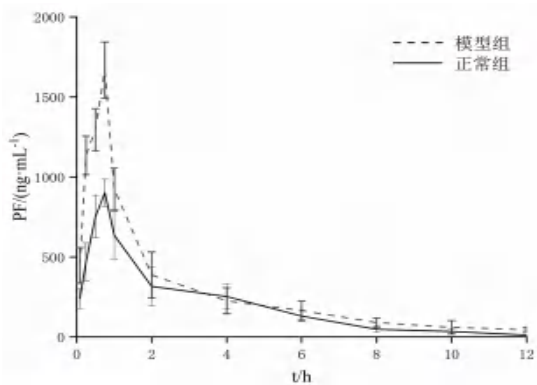


图 2 正常组和模型组大鼠体内的药物浓度 - 时间曲线

Fig 2 Plasma drug concentration-time curves of rats in the normal and model groups

中机体的疾病状态是重要因素之一。在病理生理状态下，不同组织器官的功能和代谢状态发生变

表 4 大鼠血浆的药代动力学参数

Tab 4 Plasma pharmacokinetic parameters of rats

参数	正常组	模型组
$AUC_{0\sim t}$ / (mg · h · L ⁻¹)	2352.436 ± 220.499	3322.228 ± 329.373 ^{***}
$AUC_{0\sim\infty}$ / (mg · h · L ⁻¹)	2378.804 ± 223.736	3568.377 ± 427.572 ^{***}
$MRT_{0\sim t}$ / h	2.886 ± 0.181	2.776 ± 0.194
$MRT_{0\sim\infty}$ / h	3.022 ± 0.184	3.761 ± 0.553 [*]
$t_{1/2}$ / h	1.673 ± 0.140	3.686 ± 0.722 ^{**}
t_{max} / h	0.667 ± 0.129	0.708 ± 0.102
$CL_z/F/[L/(h \cdot kg)]$	0.169 ± 0.016	0.114 ± 0.015 ^{***}
$V_z/F/[L/(h \cdot kg)]$	0.407 ± 0.031	0.597 ± 0.094 ^{**}
C_{max} / (mg · L ⁻¹)	911.487 ± 77.756	1669.113 ± 175.355 ^{***}

注：与正常组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ ，^{***} $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the normal group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$.

化，这是导致药物在体内的分布和蓄积出现差异的原因之一^[4]。药代动力学是研究药物体内剂量 -

时间关系的重要手段,也是深入理解药物在机体发挥作用的重要途径^[5-6]。从药代动力学角度开展药物研究,对阐明药物在体内吸收、分布、代谢和排泄的过程,了解药物在体内的分布,特别是在病理生理状态下的分布,对于保证安全用药和药物开发具有重要的意义。

在预实验中,对正、负离子扫描方式进行了比较分析。结果表明,在负离子模式下,PF的质谱响应更好。为保证分析结果的准确性,本研究选择了化学性能稳定、检测信号强、可与PF完全分离的GEN为内标。优化血浆样品的前处理方法^[7-9],发现以乙腈为沉淀剂的蛋白质沉淀法是一种较为理想的血浆样品处理方法。经过对比几种不同的色谱体系及洗脱模式,确定以乙腈-0.1%甲酸为液相体系的梯度洗脱法,能够获得较好的分离度,且保留时间稳定。

有研究发现PF在正常大鼠中达峰时间短,且血药浓度达峰后迅速消除,MRT较短^[10-13]。在四氯化碳诱导的急性肝损伤^[14]和ANIT诱导的急性淤胆型肝炎为模型^[15]的研究发现在肝损伤疾病状态下,药物消除更慢,体内滞留时间更长。此外,PF灌胃给药后在正常大鼠中主要经粪便排出体外^[16],而在胶原诱导性关节炎大鼠模型中主要排泄途径为经胆汁排泄^[17],说明PF在不同的生理病理下的药代动力学行为存在差异,目前尚未见文献报道PF在EE诱导的胆汁淤积性肝损伤大鼠中的体内药代动力学行为。

在胆汁淤积状态下,机体对药物的处置可能发生较大的改变,进而影响到药物的疗效和安全性^[18]。本文的研究结果证明PF在正常大鼠和EE诱导的胆汁淤积性肝损伤模型大鼠体内的药代动力学参数存在明显差异。与正常组相比,模型组的血浆药物代谢过程显示出较高的 $t_{1/2\alpha}$ 、AUC、 $MRT_{0-\infty}$ 、 C_{max} 和 V_z/F 值,而 CL_z/F 数值明显降低。这说明了模型组PF的吸收水平较高,代谢速度相对较慢,导致PF在体内滞留时间延长,从而增加了其在体内的暴露程度,表明病理状态会影响机体对PF的吸收和代谢。在本研究的基础上,课题组将进一步深入研究胆汁淤积状态导致PF代谢差异的原因,为PF的临床用药提供科学依据,并为其应用开发提供新的思路和方法。

参考文献

[1] Chen LS, Zhao X, Wei SZ, et al. Mechanism of paeoniflorin on anit-induced cholestatic liver injury using integrated metabolomics and network pharmacology [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 737630.
[2] Wei SZ, Ma X, Niu M, et al. Mechanism of paeoniflorin

in the treatment of bile duct ligation-induced cholestatic liver injury using integrated metabolomics and network pharmacology [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 586806.
[3] Wang RW, Yuan TT, Sun J, et al. Paeoniflorin alleviates 17 α -ethinylestradiol-induced cholestasis via the farnesoid X receptor-mediated bile acid homeostasis signaling pathway in rats [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 1064653.
[4] 张青, 李梦婷, 李梅, 等. 杜仲提取物多次给药后在正常大鼠和SHR模型体内的药代动力学比较研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32 (1): 41-47.
[5] Yin P, Han X, Yu L, et al. Pharmacokinetic analysis for simultaneous quantification of saikosaponin a-paeoniflorin in normal and poststroke depression rats: a comparative study [J]. J Pharm Biomed Anal, 2023, 233: 115485.
[6] 刘玉峰, 孙珊珊, 朱丽君, 等. 赤芍中芍药苷和芍药内酯苷的代谢及药代动力学研究进展 [J]. 辽宁大学学报 (自然科学版), 2018, 45 (4): 296-303.
[7] 利玲, 胡秀, 利莉. 达原饮中芍药苷和黄芩苷在大鼠体内药代动力学研究 [J]. 中国药物应用与监测, 2020, 17 (1): 19-23.
[8] 韩瑞伟, 何礼, 田明. 蜗牛酶改善芍药苷在比格犬体内肠道水解和生物利用度研究 [J]. 世界临床药物, 2020, 41 (4): 261-265, 306.
[9] 曾洁, 华丽萍, 黄彬, 等. 白芍中芍药苷和芍药内酯苷在大鼠血浆中含量测定及药代动力学研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25 (2): 89-94.
[10] Liu RC, Liang HL, Li Z, et al. Study on the pharmacokinetic profiles of three ingredients in qilong capsules and their potential interactions in rats by LC-MS/MS [J]. J Chromatogr Sci, 2022, 60 (2): 186-193.
[11] 范艳芳, 周华, 何华红, 等. 大鼠血浆中芍药苷的UHPLC-MS/MS法测定及其药代动力学研究 [J]. 分析试验室, 2017, 36 (9): 1080-1083.
[12] 章芳珍, 吴德玲, 赵宏苏, 等. 苯甲酰芍药苷灌胃给药的代谢产物芍药苷的药代动力学研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30 (12): 1490-1496.
[13] 霍晓光, 王琨, 冯心池, 等. 基于UPLC-MS/MS的芍药苷及其代谢产物在大鼠体内药代动力学研究 [J]. 中草药, 2017, 48 (17): 3582-3586.
[14] 陶西雨, 程晓羽, 魏真真, 等. 白芍总苷中4个活性成分在正常和四氯化碳诱导的急性肝损伤大鼠体内药代动力学比较研究 [J]. 中草药, 2023, 54 (13): 4224-4232.
[15] Jiang FJ, Zhao YL, Wang JB, et al. Comparative pharmacokinetic study of paeoniflorin and albiflorin after oral administration of radix paeoniae rubra in normal rats and the acute cholestasis hepatitis rats [J]. Fitoterapia, 2012, 83 (2): 415-421.
[16] 陈新则, 马浩玲, 丁丽琴, 等. UPLC-MS/MS法同时测定大鼠血浆中赤芍提取物三种单萜类成分及其药代动力学研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45 (3): 590-595.
[17] 马喆, 宋志敏, 韩雅馨, 等. 白芍总苷对胶原诱导性关节炎大鼠长期给药的分布研究 [J]. 中草药, 2023, 54 (10): 3167-3178.
[18] 张程亮. 黄芩苷在雌激素诱导肝内胆汁淤积大鼠中的干预机制和药代动力学研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2019.
(收稿日期: 2024-01-05; 修回日期: 2024-03-06)

UPLC-Q-TOF-MS 联合网络药理学探究 苦参治疗湿疹的作用机制

史晓璇^{1,4}, 李茗晞^{1,4}, 王艳^{1,4*}, 郭若曦², 郭浩², 王鹏², 张晗², 李雪³ (1. 天津中医药大学, 天津 301617; 2. 天津尚美化妆品有限公司, 天津 300385; 3. 天津医科大学总医院核医学科, 天津 300052; 4. 现代中医药海河实验室, 天津 301600)

摘要: **目的** 采用 UPLC-Q-TOF-MS 和网络药理学方法, 从分子水平揭示苦参经皮给药对湿疹的潜在作用机制。**方法** 采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术, 结合文献数据鉴定化学成分。通过 Swiss Target Prediction 数据库预测作用靶点, Cytoscape 3.9.0 构建蛋白质相互作用 (PPI) 网络图, 利用 Metascape 数据库对靶点进行 GO 注释和 KEGG 通路分析。**结果** 小鼠经皮给药后推测出 14 个皮肤滞留原形成分, 7 个入血原形成分。网络药理学研究得到肿瘤坏死因子 (TNF)、血管内皮生长因子 A (VEGFA)、表皮生长因子受体 (EGFR) 等苦参治疗湿疹的核心靶点。KEGG 富集分析显示与血清素能突触信号通路、花生四烯酸代谢等信号途径密切相关。**结论** 通过 UPLC-Q-TOF-MS 结合网络药理学进一步阐明苦参外用治疗湿疹的主要靶点和通路, 为后续深入研究提供参考。

关键词: 苦参; 湿疹; 经皮吸收; UPLC-Q-TOF-MS; 网络药理学

中图分类号: R285, R283 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)06-1423-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.005

UPLC-Q-TOF-MS combined with network pharmacology for the mechanism of action of *Sophora flavescens* in the treatment of eczema

SHI Xiao-xuan^{1,4}, LI Ming-xi^{1,4}, WANG Yan^{1,4*}, GUO Ruo-xi², GUO Hao², WANG Peng², ZHANG Han², LI Xue³ (1. *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617*; 2. *Tianjin Shang Mei Cosmetics Co., Ltd., Tianjin 300385*; 3. *Department of Nuclear Medicine, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052*; 4. *Haihe Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin 301600*)

Abstract: Objective To determine the potential mechanism of transdermal administration of *Sophora flavescens* on eczema at molecular level with UPLC-Q-TOF-MS and network pharmacology. **Methods** The chemical compositions were identified by UPLC-Q-TOF-MS technique and literature data. The target was predicted by Swiss Target Prediction database, the protein interaction (PPI) network map was established by Cytoscape 3.9.0, and the target was analyzed by GO annotation and KEGG pathway with Metascape database. **Results** After transdermal administration of the drug in mice, 14 components of the skin retention prototype and 7 components of the blood prototype were inferred. The core targets of *Sophora flavescens* treatment for eczema, such as tumor necrosis factor, vascular endothelial growth factor A and epidermal growth factor receptor, were identified by network pharmacology. KEGG enrichment analysis showed close relation to serotonergic synaptic signaling pathway and arachidonic acid metabolism. **Conclusion** UPLC-Q-TOF-MS combined with network pharmacology is used to further elucidate the main targets and pathways of *Sophora flavescens* for the treatment of eczema.

Key words: *Sophora flavescens*; eczema; transdermal absorption; UPLC-Q-TOF-MS; network pharmacology

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (No.81602773)。

作者简介: 史晓璇, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药产品开发研究, email: shixiaoxuan12@163.com *通信作者: 王艳, 女, 教授, 主要从事中药产品开发研究, email: paozhijiaoxue@126.com

湿疹是一种常见的炎症性皮肤病，有易渗出、瘙痒剧烈、反复发作等特点^[1]。国外研究显示，湿疹在发达国家成人中的发病率约为 10%^[2]。湿疹病因复杂多样，西医认为湿疹是由多种内外因素引起的皮肤炎症^[3]。中医认为湿疹早期症状表现为脾胃失健，湿邪内生，郁结成热。而后湿热内蕴，风湿热邪淫溢于皮肤，瘙痒不止，病久耗伤阴血^[4-5]。但无论内因还是外因，都与风、湿、热等因素密不可分。湿为本，热为表，急性发作多伴有风邪^[6]。目前临床上治疗药物大多数是抗组胺药、静脉注射钙剂、注射皮质类固醇等^[7]，但有些药物长期使用会产生皮肤萎缩等不良反应，使用不当可能会加重病情。中药在治疗湿疹上具有数千年历史和良好的临床疗效，在改善湿疹症状方面有一定效果，在湿疹的治疗上越来越受到重视。

中药外用是较为常见的治疗皮肤疾病的方法，具有方便使用、直接作用于疾病部位的优点^[8]。贯晶等^[9]在挖掘中药外用治疗湿疹时发现，苦参为外用治疗湿疹处方中使用频次最高的单味药。苦参味苦，性寒。具有清热，燥湿，杀虫之功效^[10]。现代药理研究表明，苦参具有抗炎、抗菌、抗病毒等药理作用^[11-12]。但是苦参外用给药潜在有效成分及作用机制尚不明确，为了进一步明确苦参经皮给药后发挥药效的物质，本研究选择检测涂抹苦参乳膏后药物入血原形成分和皮肤滞留原形成分。使用 UPLC-Q-TOF-MS 技术对生物样品进行定性分析，结合网络药理学探究苦参治疗湿疹的潜在靶点和作用机制。

1 材料

1.1 仪器

Q-TOF-MS、超高效液相色谱系统、ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)(美国 Waters 公司)，氮吹仪 (杭州奥盛仪器有限公司)。

1.2 试药

苦参 [批号: 220804101, 达仁堂 (天津) 中药饮片有限公司, 经天津中医药大学第一附属医院王中华副主任药师鉴定为豆科植物 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥根], 甲酸、乙腈 (质谱级, 赛默飞世尔科技有限公司), 甲醇 (质谱级, 美国 Fisher 公司), 超纯水 (屈臣氏集团有限公司)。

1.3 动物

SPF 级 ICR 雄性小鼠 10 只, 体重 20~25 g, 周龄 5 周 [北京华阜康生物科技有限公司, 许可证号: SCXK (京) 2019-0008]。该实验符合天津中医药大学实验动物伦理委员会制订的伦理标准,

动物实验伦理批件号为: TCM-LAEC2022073。实验开始前, 在实验动物中心适应性饲养一周。饲养期间正常喂养, 饲养温度 20~26℃ (日温差 ≤ 4℃), 相对湿度 35%~60%。

2 方法

2.1 苦参提取液及外用制剂制备

称取苦参 50 g, 加入 8 倍量的水提取两次, 每次 1.5 h, 合并滤液。利用旋转蒸发器进行减压浓缩至提取液质量浓度为 1 g·mL⁻¹。

称量鲸蜡硬脂醇 2.6 g, 甘油脂肪酸酯 2.0 g, 液体石蜡 3.5 g, 棕榈酸乙基己酯 3.5 g, 角鲨烷 3.0 g, 辛酸/癸酸甘油三酯 3.0 g, 聚二甲基硅氧烷 1.5 g, 维生素 E 0.5 g, 多元醇防腐剂 0.5 g, 月桂醇磷酸酯钾 2.2 g, 于 75℃ 水浴加热完全熔化, 为 A 相; 称量甘油 6.0 g, 丁二醇 2.0 g, 黄原胶 0.25 g, 加入水 62.45 g, 搅拌均匀, 为 B 相; 称取苦参提取液 10 g 于 95℃ 水浴加热, 为 C 相。将 B 相和 C 相混合, 均质机边搅拌边加入 A 相, 搅拌均匀放置, 待乳膏温度降至室温即得, 配方由天津尚美化妆品有限公司提供。

2.2 样本采集

10 只 ICR 雄性小鼠随机分为: 空白基质组和苦参组, 每组 5 只。造模前 1 日, 剃毛刀剃去小鼠背部毛发, 使用脱毛膏脱去背部稀碎毛发, 区域为 4 cm×2 cm。苦参组分别涂抹 0.1 g 含药量 10% 苦参乳膏, 空白基质组涂抹 0.1 g 空白基质乳膏。中药乳膏剂在皮肤科用药频率以每日两次最为常见, 每日涂抹两次 (每日 9:30、17:30), 连续涂抹 7 d, 第 7 日涂抹药物后 2 h 取材^[13]。每组小鼠眼眶取血, 置于抗凝血真空采血管 (含有抗肝素) 中, 4℃、12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 得到淡黄色上清液, 即为血浆样本。并用镊子小心剥离小鼠背部涂抹药物皮肤区域, 将皮肤置于冰板上用刮刀将皮下组织及脂肪刮净, 生理盐水冲洗后放于 -80℃ 冰箱保存。

2.3 样本制备

2.3.1 血浆样本 分别精密吸取 300 μL 空白血浆和含药血浆于 2 mL 离心管, 加入 3 倍量甲醇, 涡旋 2 min, 静置 10 min, 4℃、12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液 37℃ 氮气吹干。残渣用 100 μL 70% 甲醇复溶, 涡旋 2 min, 超声 10 min, 4℃、12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 供 UPLC-Q-TOF-MS 分析。

2.3.2 皮肤样本 取皮肤 0.1 g, 加入 5 倍量乙腈后剪碎, -50℃ 匀浆后涡旋 2 min, 超声 10 min, 4℃、12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清

液 37 °C 氮气吹干。残渣用 100 μ L 70% 甲醇复溶, 涡旋 2 min, 超声 5 min, 4 °C、12 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液用 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 供 UPLC-Q-TOF-MS 分析。

2.4 UPLC-Q-TOF-MS 分析方法

2.4.1 质谱条件 离子源为 ESI 源, 正、负离子模式检测: 脱溶剂气流速为 800 $L \cdot h^{-1}$, 脱溶剂气温度为 450 °C, 锥孔气体流量为 50 $L \cdot h^{-1}$, 源温度为 120 °C, 正离子毛细管电压为 3 kV, 负离子毛细管电压为 2 kV, 锥孔电压为 40 V。

2.4.2 色谱条件 色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m), 流动相为 0.05% 甲酸水溶液 (A) - 乙腈溶液 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 5 min, 5% ~ 20%B; 5 ~ 15 min, 20% ~ 42%B; 15 ~ 27 min, 42% ~ 71%B; 27 ~ 30 min, 71% ~ 85%B); 流速为 0.2 $mL \cdot \text{min}^{-1}$; 进样量为 2 μ L; 柱温为 30 °C。

2.5 化合物结构分析

通过检索文献, 将已有文献报道的苦参成分汇总整理, 包括化合物名称、分子式、化学结构、分子离子及碎片离子信息, 自建苦参质谱数据库。通过 Masslynx 4.1 对图谱数据进行解析。不同样品中具有相同的保留时间 t_R 值和 m/z 值则被认为是同种化合物。

2.6 网络药理学分析

2.6.1 苦参皮肤滞留及入血成分靶点预测 将 UPLC-Q-TOF-MS 分析所得的苦参皮肤滞留原形成分及入血原形成分进行网络药理学分析。利用 PubChem 数据库获取 SMILE 结构式, 并作为输入文件提交至 SWISS 靶点预测数据库 (Swiss Target Prediction), 以 $\text{probability} > 0$ 作为阈值获得靶点, 汇总去除重复项, 得到药物活性成分对应靶点。

2.6.2 获取湿疹的靶点信息 通过 Genecard (<https://www.genecards.org/>) 和 OMIM (<https://www.omim.org/>) 数据库, 以 “eczema” 为关键词进行检索, 下载靶点信息, 去除重复项, 合并后即为本研究的疾病靶点。

2.6.3 PPI 网络构建及网络拓扑分析 通过 STRING (<https://string-db.org/>) 平台, 导入药物 - 疾病交集靶点, 对象为 homo sapiens, 蛋白交互参数评分值 (minimum required interaction score) > 0.9 , 隐藏游离基因节点, 得到蛋白互作关系, 文本结果以 TSV 的格式导出。结果导入 Cytoscape 3.9.0 软件中作图。

2.6.4 GO 和 KEGG 富集分析 将 “2.6.3” 项下

得到的靶点作为输入文件, 采用 Metascape 进行 GO 富集分析, 分别从生物进程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF)、细胞组分 (cellular component, CC) 3 个方面进行阐释, 并进一步进行 KEGG 富集分析, 初步探究苦参对湿疹进程生物学功能的影响。

3 结果

3.1 UPLC-Q-TOF-MS 色谱图采集

通过 UPLC-Q-TOF-MS 技术对皮肤滞留原形成分和含药血浆原形成分进行定性分析, 得正、负离子模式下含药皮肤和含药血浆的基峰强度色谱图, 见图 1。

3.2 苦参在正常小鼠皮肤中滞留原形成分定性分析

通过 UPLC-Q-TOF-MS 技术对皮肤滞留原形成分进行定性分析。依据质谱数据分析确定了 14 种皮肤滞留原形成分, 见表 1。

3.3 苦参在正常小鼠血浆中原形成分定性分析

通过 UPLC-Q-TOF-MS 技术对血浆原形成分进行定性分析。依据质谱数据分析确定了 7 种血浆原形成分, 见表 2。

3.4 苦参外用治疗湿疹的网络药理学分析

3.4.1 苦参和湿疹相关靶点 根据 SWISS 靶点预测数据库预测所得靶点基因合集进行去重, 共获得 244 个成分靶点基因。在数据库中获得湿疹靶点进行去重后得到 4143 个疾病潜在靶点。利用 Venny 在线平台将苦参的潜在活性成分作用靶点和疾病的靶点进行交集, 共得到 79 个共同靶点。

3.4.2 PPI 网络 and 核心靶点 将 Venny 分析获得的 79 个靶点导入 STRING 数据库, 进行 PPI 网络分析。最终得到 78 个靶蛋白节点, 442 条边的 PPI 网络模型。图中节点形状越大, 颜色越深, 表示靶点的度值越高, 该靶点在网络中越重要, 见图 2。以度值排名, TNF、VEGFA、EGFR、SRC、ESR1 为排名前 5 位的靶点位, 认为这些靶点可能是苦参治疗湿疹的核心靶点。

3.4.3 靶点功能富集分析 GO 功能富集分析从 BP、CC 和 MF 这 3 个方面进行了注释。GO 分析得到 BP 条目 349 个, 分别涉及细胞外基质拆解、胶原蛋白分解代谢过程、循环系统中血管过程等; 得到 CC 条目 236 个, 主要涉及膜筏、膜微区、膜区域等; 得到 MF 条目 291 个, 主要涉及内肽酶活性、金属蛋白酶活性、丝氨酸型肽酶活性等, 见图 3。

KEGG 富集分析得到 190 条信号通路, 选取前 10 条主要通路绘图, 颜色越红, 富集显著性越大, 圆圈形状越大, 富集在该通路基因数目越

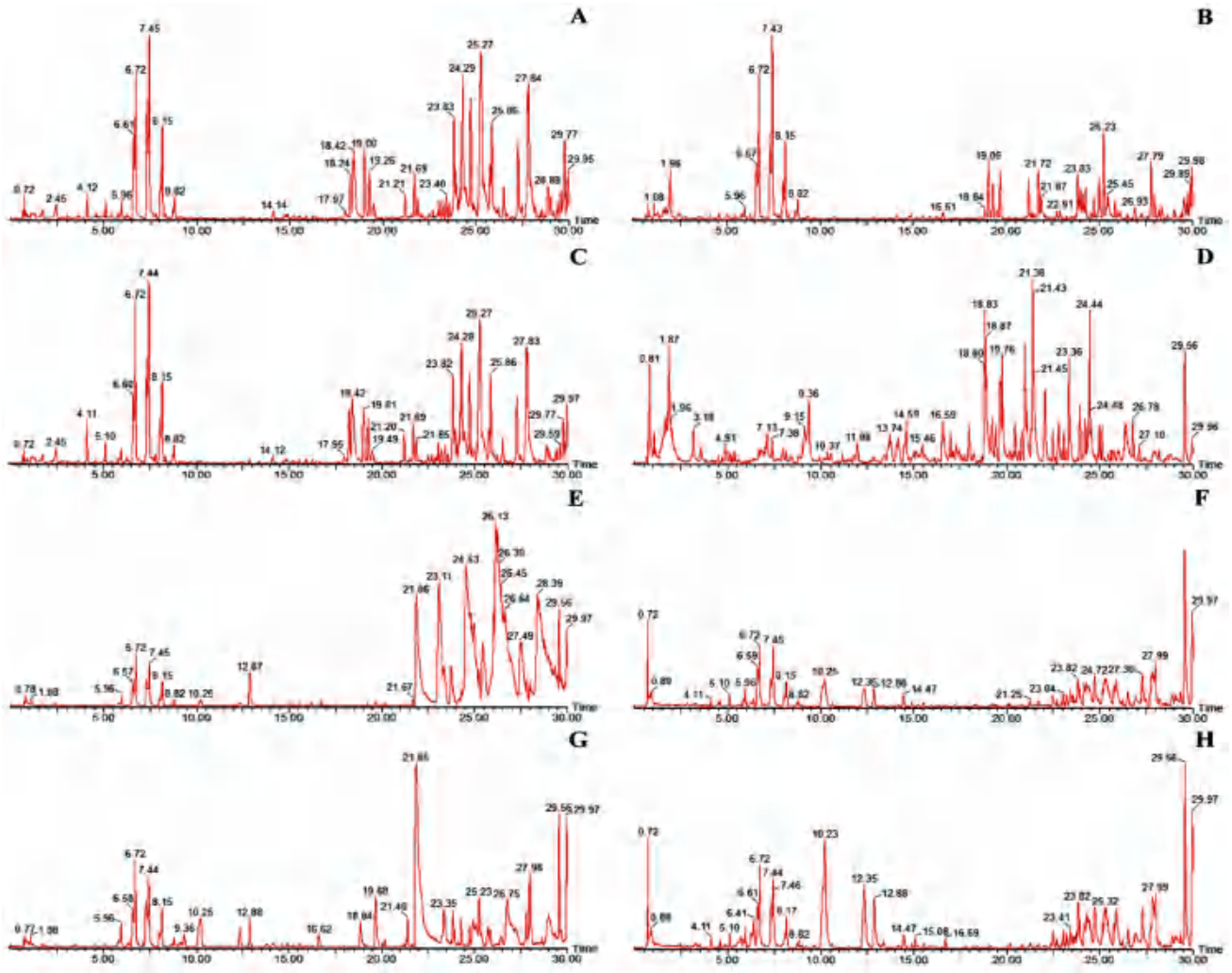


图 1 正离子和负离子模式总离子流图

Fig 1 Total ion flow diagram of positive and negative ion modes

A. 空白皮肤正离子模式 (blank skin in the positive ion mode); B. 空白皮肤负离子模式 (blank skin in the negative ion mode); C. 空白血浆正离子模式 (blank plasma in the positive ion mode); D. 空白血浆负离子模式 (blank plasma in the negative ion mode); E. 皮肤滞留正离子模式 (skin retention in the positive ion mode); F. 皮肤滞留负离子模式 (skin retention in the negative ion mode); G. 含药血浆正离子模式 (drug-contained plasma in the positive ion mode); H. 含药血浆负离子模式 (drug-contained plasma in the negative ion mode)

表 1 皮肤滞留原形成分

Tab 1 Prototype chemical compounds of skin

No.	t_R /min	实测值	模式	误差	二级碎片	分子式	鉴定成分
1	1.08	191.1184	[M + H]	3.1394	133.0328, 162.1132, 146.1201, 148.0096, 122.0718	$C_{11}H_{14}N_2O$	金雀花碱
2	1.08	205.1341	[M + H]	2.9249	205.1347, 146.0546, 117.0753, 104.0543	$C_{12}H_{16}N_2O$	N-甲基金雀花碱
3	1.34	245.1654	[M + H]	2.4473	245.1651, 169.9915, 148.9370, 98.3337	$C_{15}H_{20}N_2O$	臭豆碱
4	1.68	247.1810	[M + H]	0.0000	247.1827, 176.4937, 150.0638, 136.0766	$C_{15}H_{22}N_2O$	槐果碱
5	1.70	249.1967	[M + H]	2.4077	249.1976, 231.0091, 135.9475, 150.0675	$C_{15}H_{24}N_2O$	苦参碱
6	1.70	249.1967	[M + H]	2.4077	150.0675, 247.1822, 249.1967	$C_{15}H_{24}ON_2$	槐定碱
7	1.91	263.1760	[M + H]	0.0000	263.1770, 150.0640, 148.1120	$C_{15}H_{22}N_2O_2$	氧化槐果碱
8	1.98	265.1916	[M + H]	0.0000	247.1842, 205.0982	$C_{15}H_{24}N_2O_2$	氧化苦参碱
9	1.98	265.1916	[M + H]	1.8854	247.1842	$C_{15}H_{24}O_2N_2$	槐醇
10	1.98	265.1916	[M + H]	1.8854	166.0881, 96.9657	$C_{15}H_{24}N_2O_2$	羽扇豆碱
11	8.94	283.0606	[M - H]	0.0000	283.0611, 255.1590, 117.8196, 268.1180	$C_{16}H_{12}O_5$	高丽槐素
12	13.01	353.1389	[M - H]	1.6991	353.1390	$C_{21}H_{22}O_5$	异黄腐醇
13	15.47	437.1964	[M - H]	- 1.1436	327.2178	$C_{26}H_{30}O_6$	苦参啶
14	27.16	339.1232	[M - H]	- 1.7693	339.2326, 265.1540, 151.0666, 176.4572, 133.0428	$C_{20}H_{20}O_5$	去甲基黄腐醇

表 2 血浆中原形成分

Tab 2 Prototype chemical compounds of plasma							
No.	t_R /min	实测值	模式	误差	二级碎片	分子式	鉴定成分
1	1.08	191.1184	[M + H]	3.1394	191.1186, 148.0972, 120.3288, 189.0444, 161.0150, 132.1034	$C_{11}H_{14}N_2O$	金雀花碱
2	1.08	205.1341	[M + H]	2.9249	205.1274, 146.0971, 117.9849, 104.0544	$C_{12}H_{16}N_2O$	N-甲基金雀花碱
3	1.54	247.1810	[M + H]	0.0000	247.0103, 176.9728, 150.1615, 136.8914	$C_{15}H_{22}N_2O$	槐果碱
4	1.62	249.1967	[M + H]	2.4077	249.1973, 231.0742, 148.0811, 135.0125, 191.0935, 231.0742, 173.1165, 150.9771	$C_{15}H_{24}N_2O$	苦参碱
5	1.93	263.1760	[M + H]	0.0000	263.1770, 150.0684, 148.7369	$C_{15}H_{22}N_2O_2$	氧化槐果碱
6	1.97	265.1916	[M + H]	1.8854	247.1842	$C_{15}H_{24}O_2N_2$	槐醇
7	2.01	265.1916	[M + H]	0.0000	265.1914, 247.1802, 205.0991, 150.0637, 188.0722, 162.1090	$C_{15}H_{24}N_2O_2$	氧化苦参碱



图 2 靶点 PPI 网络互作图
Fig 2 Protein-protein interaction network of the targets

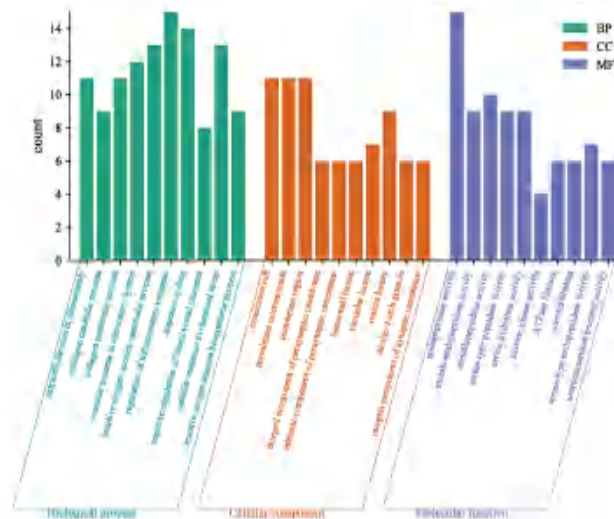


图 3 GO 功能富集分析结果
Fig 3 GO functional enrichment analysis

多, 见图 4。结果可知, 主要涉及的通路有血清素能突触通路、花生四烯酸代谢通路、IL-17 信号通路等。由此提示苦参可通过作用多条通路发

挥治疗湿疹的作用。

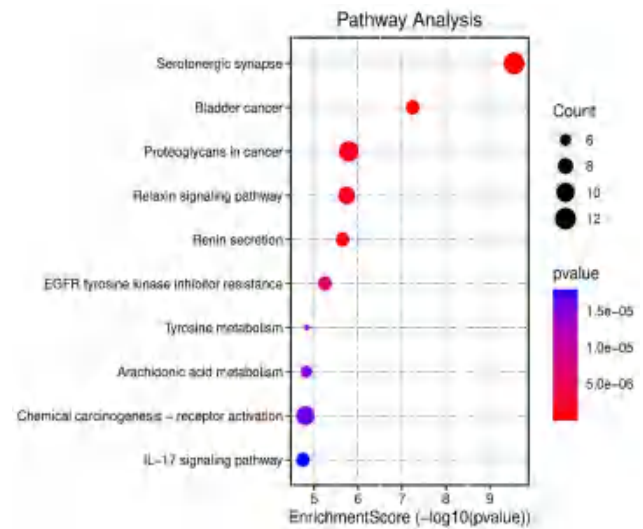


图 4 KEGG 通路富集结果
Fig 4 KEGG pathway enrichment

4 讨论

中医理论中, 湿疹的病位在表, 病灶外露。经皮给药的方式可以在局部释放更多的药物, 直达病灶, 且毒副作用小、对胃肠道无损伤等优点。中药外用不仅使药物有效成分透达腠理, 还能通过药物对特定部位进行刺激, 从而疏通经络, 调理经气而发挥局部治疗作用^[14]。基于上述思考本实验通过 UPLC-Q-TOF-MS 技术检测苦参经皮给药后原形入血成分和皮肤滞留原形成分, 共鉴定出 14 种原形皮肤滞留成分和 7 种原形入血成分, 皮肤样品中检出的成分多为苦参碱类。

通过网络药理学共得到 244 个成分靶点基因, 与疾病数据库筛选的湿疹靶点交集得到 79 个共同靶点。结果提示苦参碱和氧化苦参碱在调控网络中影响程度较高。苦参碱可能通过抑制 IL-17R 表达, 阻止 p38 MAPK 磷酸化发挥抗炎作用^[15]。氧化苦参碱能改善小鼠慢性湿疹的炎症症状, 降低炎症性细胞浸润, 减轻水肿症状^[16]。通过 STRING

数据库构建靶点 PPI 网络, 筛选出 TNF、VEGFA、EGFR、SRC、ESR1 等核心靶点。湿疹患者血清中 TNF- α 因子高度表达, 使炎症部位血管通透性增加, 导致湿疹皮损处炎症反应增加^[17]。苦参碱可以抑制 TNF- α 的分泌, 减少炎症反应^[18]。基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 存在于细胞外基质中。在痤疮患者皮损组织中, MMP-9 呈现高表达, MMP-9 的高表达会破坏基底膜成分, 加速皮肤胶原纤维降解, 损坏角质形成细胞, 导致皮损^[19-20]。

GO 生物过程分析提示, 苦参治疗湿疹可能涉及金属内肽酶的活性、金属蛋白酶的活性、胶原蛋白代谢的过程、活性氧化物代谢过程等多种生物学功能进程。KEGG 通路富集分析提示苦参治疗湿疹可能主要与血清素能突触信号通路、酪氨酸代谢途径信号通路、花生四烯酸代谢信号通路、IL-17 信号通路等密切相关。花生四烯酸代谢通路的激活, 其可转变成具有生物活性的代谢产物, 如前列腺素、白三烯、血栓素等, 这些代谢产物参与湿疹的发生发展。前列腺素可能通过增加血管通透性造成湿疹患者疱疹、红斑及渗出等表现^[21]。湿疹患者血液中可检测到大量白三烯释放, 促进干扰素和 IL-2 等因子的产生, 从而导致多种炎症性疾病^[22]。IL-17 主要来源于各种免疫细胞, IL-17 刺激皮肤的角质形成细胞分泌多种炎症因子, 并能增强角质 T 细胞的毒性和黏附性, 进而放大 T 细胞的炎症反应。在急性湿疹和慢性湿疹患者表皮角质形成细胞和真皮浸润淋巴细胞中均有表达, 且湿疹患者体内 IL-17 水平与湿疹严重程度成正相关^[23-24]。

综上所述, 本研究运用 UPLC-Q-TOF-MS 技术及网络药理学分析, 对苦参治疗湿疹的有效成分和作用机制进行了初步预测, 为苦参外用治疗湿疹提供了理论依据。但本研究结论目前还停留在理论层面, 尚需通过动物实验、细胞实验等进行进一步验证。

参考文献

- [1] 刁庆春, 刘毅. 湿疹(湿疮)中医诊疗专家共识[J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志, 2021, 20(5): 517-521.
- [2] Rodríguez E, Baurecht H, Herberich E, et al. Meta-analysis of filaggrin polymorphisms in eczema and asthma: robust risk factors in atopic disease [J]. J Allergy Clin Immunol, 2009, 123(6): 1361-1370. e7.
- [3] 郭善怡, 张明. 中医药治疗湿疹临床进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(3): 240-244.
- [4] 陈兴, 王梅, 黄丽霞, 等. 基于网络药理学探讨当归苦参丸治疗湿疹的作用机制[J]. 沈阳药科大学学报, 2021, 38(8): 845-854.
- [5] 赵艳霞, 王雅莉, 李彤彤, 等. 湿疹患者中医体质、辨证分型、西医分期的年发病次数分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(6): 101-107.
- [6] 王奕霖. 湿疹的中医病因病机[J]. 长春中医药大学学报, 2018, 34(1): 79-81, 108.
- [7] 李剑光, 刘瓦利. 湿疹的西医治疗[J]. 中国临床医生, 2011, 39(2): 21-23.
- [8] 陆亚琪. 中药外用制剂在皮肤科的应用与展望[J]. 中医药管理杂志, 2023, 31(9): 210-212.
- [9] 贯晶, 李忻红. 外用中药治疗湿疹的用药规律探讨[J]. 亚太传统医药, 2019, 15(4): 163-166.
- [10] 董晓龙, 沈佳捷, 朱佳钰, 等. 苦参的指纹图谱建立及差异性成分含量测定[J]. 中国药房, 2023, 34(3): 298-302.
- [11] 马雪宁, 杨素清, 张君成, 等. 苦参药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(1): 152-156.
- [12] 苏丽丽. 苦参的化学成分及药理作用研究进展[J]. 化学工程师, 2021, 35(3): 58-61.
- [13] 陈军, 梁秉文, 乔鹏丽, 等. 中药外用制剂研究概述与展望[J]. 南京中医药大学学报, 2022, 38(1): 1-8.
- [14] 张优琴, 方霞, 周明华. 湿疹的中医药治疗进展[J]. 东南国防医药, 2015, 17(3): 301-303, 316.
- [15] 孙创斌, 胡晋红, 朱全刚, 等. 苦参碱对皮肤角质形成细胞 IL-17R、p-p38 MAPK 和炎症因子的影响[J]. 中国药理学杂志, 2010, 45(7): 506-509.
- [16] 张丽华, 陈燕, 方雪梅, 等. 氧化苦参碱软膏对小鼠慢性湿疹的影响[J]. 中国药师, 2017, 20(1): 46-49.
- [17] 杨苏琴, 吴云翔. 祛痒化湿方熏洗坐浴联合常规肛周封闭治疗肛周湿疹瘙痒(脾虚湿热型)的效果及对血清 IFN- γ 、TNF- α 、IL-18 水平的影响[J]. 中国医学创新, 2023, 20(12): 90-94.
- [18] 张康洁, 孙麦青, 曹会云, 等. 健脾清湿汤联合舒耳膏耳部透药治疗外耳湿疹脾虚湿热证的疗效及对 TNF- α 、IL-4、IgE 的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(8): 1371-1375.
- [19] 刘婧, 朱鹏, 郑婷, 等. 黄芩素对痤疮模型大鼠局部组织 IL-4、MMP-9 的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(10): 1572-1574, 1609.
- [20] 闫晋起. 皮损部位 HIF-1 α 、MMP-9 水平与寻常性银屑病患者病情程度的相关性[J]. 中国民康医学, 2023, 35(7): 162-164, 168.
- [21] 李胜, 杜江. 自拟苦参汤治疗肛周湿疹疗效观察[J]. 内蒙古中医药, 2017, 36(12): 112-113.
- [22] 孙占学. 凉血祛湿止痒汤对小鼠特异性皮炎模型血清 IL-2、IL-4 及皮损白三烯 B₄ 的影响[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2016, 30(11): 1169-1171, 1210.
- [23] Ando T, Xiao WB, Gao PS, et al. Critical role for mast cell Stat5 activity in skin inflammation [J]. Cell Rep, 2014, 6(2): 366-376.
- [24] 范丽娜, 武亦阁, 贺乙, 等. “血虚风燥型”皮炎-湿疹样病变豚鼠模型的评价指标研究[J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志, 2022, 21(2): 97-101.

(收稿日期: 2023-09-10; 修回日期: 2023-11-20)

抗 TREM2 抗体的制备及生物学活性的初步研究

胡钰清¹, 冯艳平¹, 梁家蓓¹, 郝锋², 宁金鹰², 李莉^{1*} (1. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830017; 2. 康源博创(北京)生物科技有限公司, 北京 100010)

摘要: **目的** 制备抗髓系细胞触发受体 2 (TREM2) 抗体并初步探究其生物学活性。**方法** 采用杂交瘤筛选的方法, 获得稳定分泌抗 TREM2 抗体的杂交瘤细胞株, 并对杂交瘤细胞株分泌的单克隆抗体进行筛选, 选择结合效果最佳的单克隆抗体进行人源化改造得到嵌合抗体; 对嵌合抗体进行进一步的人源化改造, 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 及流式细胞术 (FACS) 检测人源化抗体的抗原抗体结合活性; 采用生物膜干涉技术 (BLI) 检测人源化抗体与人 TREM2 结合动力学; 通过基于报告基因的抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (ADCC) 生物学活性测定方法, 检测人源化抗体的依赖细胞介导的细胞毒效应; 使用免疫缺陷小鼠对人源化抗体进行体内药效实验。**结果** 利用杂交瘤技术成功筛选到稳定表达抗 TREM2 抗体的杂交瘤细胞株, 对杂交瘤细胞株进行进一步人源化改造, 获得纯度高于 95% 的人源化抗体 h7B6-11, 抗体 h7B6-11 与 TREM2-His 蛋白具有高度亲和性, 且对 293T-TREM2 细胞的 ADCC 活性明显强于对照抗体。体内药效实验结果显示, h7B6-11 与程序性死亡受体 1 (PD1) 抗体联合用药抑制肿瘤生长效果明显。**结论** 抗体 h7B6-11 具有高度亲和力和良好的生物学活性, 有望开发成为新一代肿瘤免疫治疗的抗体药物。

关键词: 髓系细胞触发受体 2; 杂交瘤; 单克隆抗体; 人源化抗体; 生物学活性

中图分类号: R943, R96 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)06-1429-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.006

Preparation of anti-human TREM2 antibody and preliminary study of its biological activity

HU Yu-qing¹, FENG Yan-ping¹, LIANG Jia-bei¹, HAO Feng², NING Jin-ying², LI Li^{1*} (1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830017; 2. KYinno Biotechnology Co., Ltd., Beijing 100010)

Abstract: Objective To prepare antibodies against human triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM2) and evaluate their bioactivity. **Methods** Monoclonal antibodies against human TREM2 were obtained by hybridoma technique, and the monoclonal antibodies with the best binding effect were selected and humanized to obtain chimeric antibodies. Subsequently, the chimeric antibodies were humanized, and the binding activity of the antibody to antigen were determined by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. The binding kinetics of the humanized antibody to human TREM2 was detected by bio-layer interferometry. The cell-dependent cytotoxicity of the humanized antibody was evaluated with an antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) biological activity assay based on the reporter gene. In vivo efficacy experiments were conducted in immunodeficient mice. **Results** The hybridoma cell lines stably expressing antibodies against TREM2 were successfully screened by hybridoma technology. The further humanized antibody, h7B6-11, had a purity over 95% and a high affinity with TREM2-His protein. The ADCC activity of the antibody h7B6-11 against 293T-TREM2 cells was much stronger than that of the control antibody. The in vivo efficacy experiments showed that the combination of h7B6/11 and

基金项目: 国家重点研发计划项目 (No.2018YFC1708303)。

作者简介: 胡钰清, 女, 在读硕士研究生, 主要从事治疗性抗体研究, email: h15266780110@163.com *通信作者: 李莉, 女, 教授, 主要从事天然药物分析, email: llxjmu@163.com

programmed cell death protein 1 (PD1) antibody greatly inhibited the tumor growth. **Conclusion** The antibodies possess high binding affinity and excellent bioactivity, which may become prospective therapeutic immunity drugs.

Key words: TREM2; hybridoma; monoclonal antibody; humanized antibody; bioactivity

免疫治疗的一项重要策略是采用免疫检查点抑制剂 (ICIs) 来阻断免疫抑制信号, 激活 T 细胞, 进而增强对肿瘤的免疫应答^[1-2]。然而, 这类药物对很多类型的肿瘤无效, 这是由于肿瘤能够通过多种机制来逃避或破坏抗肿瘤 T 细胞的应答^[3-5]。髓系细胞触发受体 2 (TREM2) 是免疫抑制的肿瘤相关巨噬细胞 (TAM) 的细胞表面受体, 与肿瘤微环境 (TME) 中 T 细胞耗竭有关^[6-8]。当 TREM2 表达下调或缺失时, 可导致巨噬细胞浸润重塑, 进而促进 T 细胞和 NK 细胞的富集和激活^[6, 9]。因此, 通过降低 TREM2 表达水平或应用抗 TREM2 抗体阻断其功能, 驱动肿瘤微环境中髓系细胞组分重塑, 能够促进保护性 T 细胞反应和增强 ICIs (如 PD-1 抑制剂^[10]) 的免疫治疗效果。

为研发高效的新型抗 TREM2 抗体, 本研究采用 TREM2 蛋白对小鼠进行免疫, 成功筛选出 6 株特异性抗 TREM2 单克隆抗体。在这 6 个抗体中, 选取表现出良好抗原特异性和较高亲和力的 2 株进行嵌合抗体改造, 最终选取 c7B6-11 抗体进行人源化改造。同时, 对人源化抗体的生物学活性进行初步研究, 以期为后续的研发工作奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

多功能酶标仪 (BMG LABTECH); CO₂ 培养箱、生物安全柜、PCR 热循环仪 (Thermo Scientific); 流式细胞仪 (Guava); 离心机 (Eppendorf); 倒置显微镜 (Olympus); 高分辨率紫外凝胶分析仪 (北京赛智); 漩涡振荡器 (Vortex Mixer)。

1.2 试剂

293T-TREM2-DAP12、293T-cyno-TREM2-DAP12、HEK293F、Jurkat-NFAT-Luc2-CD16a-F158、Jurkat-NFAT-Luc2-CD16a-V158 细胞 (康源博创生物科技有限公司), 抗原 TREM2-mFc (课题组自制), PE F (ab')₂ Goat anti-human IgG Fc γ Antibody (Biolegend), DMEM 培养基 (Hyclone), RPMI-1640 培养基、磷酸盐缓冲液 (Solarbio), RNA 提取试剂盒 (QIAGEN), 6 \times Protein Loading Buffer (全式金), RNA 反转录试剂盒 (诺唯赞), 胎牛血清、Gluta MAX (GBICO), 96 孔细胞培养板、10 mL 移液管、T25 细胞培养瓶 (Thermo)。

1.3 实验动物

SPF 级 BALB/c 雌性小鼠, 体重约 22 g, 动物许可证号: SYXK (京) 2023-0066 (华卓康, 伦理审查编号 2021S018, 2023F043)。

2 方法

2.1 杂交瘤抗体制备及体外活性验证

取抗原 TREM2-mFc 0.5 mg, 溶于 1 mL 完全弗氏佐剂, 使用漩涡振荡器将抗原充分乳化, 直至形成油包水乳剂, 取 7 只 BALB/c 小鼠, 在每只小鼠后腿肌内、皮下、腹腔同时多点注射, 三部位分别注射 15、15 和 20 μ L, 每只共计注射 50 μ L 免疫抗原。小鼠饲养两周后在相同部位进行第二次免疫, 小鼠后腿肌内、皮下、腹腔三部位分别注射 7.5、7.5 和 10 μ L, 每支抗原总注射量为 25 μ L。小鼠饲养第五周进行第三次免疫, 抗原同不完全弗氏佐剂混匀并完全乳化后使用, 剂量和注射方法与第二次免疫相同。第三次免疫 10 日后, 进行免疫冲击, 方法和剂量同第三次免疫。7 d 后, 小鼠尾部采血, 酶联免疫吸附 (ELISA) 法测定血清效价, 效价大于 72 000 的小鼠符合融合条件。取效价达到预期的小鼠脾细胞, 细胞密度调整为 1×10^7 个 \cdot mL⁻¹, 与骨髓瘤细胞 SP2/0 以 2:1 的比例通过电转进行细胞融合, 电转后补加 RPMI-1640 培养基, 充分混匀。将杂交瘤细胞移至细胞培养瓶中, 待细胞状态稳定后将细胞均匀铺在 96 孔细胞培养板中, 杂交瘤单克隆细胞出现后, 吸取细胞培养上清液, 间接 ELISA 法检测细胞培养上清液中的抗 TREM2 抗体: 包被免疫筛选抗原 TREM2-His, 将抗体进行梯度稀释, 使用 anti-mouse-HRP 二抗进行显色, 酶标仪读取 OD₄₅₀ 值。使用过表达细胞株 293T-TREM2-DAP12、293T-cyno-TREM2-DAP12 对杂交瘤抗体进行流式细胞术 (FACS) 结合检测, 将细胞与梯度稀释的抗体置于 96 孔细胞板中, 孵育 30 min, 用流式细胞仪检测, 根据平均荧光强度 (MFI) 计算抗体半数最大效应浓度 (EC₅₀)。

2.2 人源化抗体的表达

按照标准程序, 从筛选出的阳性杂交瘤细胞株中提取 RNA, 随后逆转录为 cDNA, 测序得到 7B6-11、10B12-2 的重链和轻链可变区序列。将 7B6-11、10B12-2 的重链可变区与人源抗体重链 IgG1 恒定区连接, 将轻链可变区与人源抗体轻链

kappa 恒定区连接, 通过 TA 克隆技术将连接体连接, 在 DH5 α 大肠埃希菌中进行转化, 随后转染至 CHO-S 细胞, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO $_2$ 的摇床上培养约 7 d 后收集上清液, 用亲和层析 protein A 纯化, 得到嵌合抗体 c7B6-11、c10B12-2。对两个嵌合抗体进行亲和力检测后, 选取 c7B6-11 进行进一步的人源化改造。将嵌合抗体 c7B6-11 序列结合 Bioluminate 进行同源建模分析, 选定 CDR 移植区域; 通过数据库 PDB 分析选定 Framework 序列; 确定回复突变位点, 同时结合一些潜在的氧化及糖基化修饰位点, 得到人源化抗体 h7B6-11。

2.3 人源化抗体的鉴定及生物学活性验证

2.3.1 抗体理化性质的评价 将纯化后的抗体进行 SDS-PAGE 凝胶电泳和考马斯亮蓝染色分析, 以确认蛋白的分子量, 在进行 SDS-PAGE 凝胶电泳检测蛋白上样前, 将蛋白于沸水中煮 10 min 使蛋白变性, 样品进胶前电压控制在 100 ~ 200 V, 样品中的溴酚蓝指示剂到达分离胶后, 电压升到 200 V, 电泳过程保持电压稳定, 当溴酚蓝指示剂迁移到距前沿 1 ~ 2 cm 处时停止电泳, 电泳结束后, 使用考马斯亮蓝染色液染色 15 min, 脱色后进行分析。使用 SEC-HPLC 法检测抗体聚集情况, 流动相运行至基线平稳后, 在 Agilent1260 软件中设置样品的运行参数, 色谱柱为 TSK gel G3000SWXL (7.8 mm \times 300 mm), 流动相为 100 mmol \cdot L $^{-1}$ PBS + 150 mmol \cdot L $^{-1}$ NaCl, 流速为 0.6 mL \cdot min $^{-1}$, pH 为 6.8, 检测波长为 215 nm, 柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$, 抗体进样质量浓度为 1.0 mg \cdot mL $^{-1}$, 进样体积为 10 μL 。

2.3.2 抗体与 TREM2 蛋白的结合 将 TREM2-His 蛋白用磷酸盐缓冲液稀释至 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 按照每孔 50 μL 加入 96 孔酶标板, 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜, 洗涤三遍后加入封闭液牛血清白蛋白 (BSA), 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱封闭 1.5 h。将细胞板洗涤后, 加入连续稀释的人源化抗体 h7B6-11 (抗体终质量浓度: 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 起始, 3.16 倍稀释, 10 个梯度), 每孔加入 50 μL , 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h。洗涤后加入 Stretavidin-HRP 标记的抗鼠 IgGFc 二抗, 室温孵育 1 h。再次洗涤后加入 TMB 显色液, 避光条件下孵育 20 min。最后每孔加入 ELISA 法终止液终止显色反应。酶标仪光路调至 450 nm, 读取酶标板 OD $_{450}$ 值。

2.3.3 抗体与过表达 TREM2 细胞株的结合 收集处于对数生长期的 293T-TREM2-DAP12 细胞和 293T-cyno-TREM2-DAP12 细胞, 以 4 \times 10 5 个/孔的细胞数加入流式深孔板中, 加入抗体 h7B6-11, 抗体最高检测质量浓度为 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 起始, 3.16 倍稀释, 10 个梯度, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。洗

涤细胞板后, 每孔加入 1:100 稀释的 PE 标记的山羊抗人 (免疫球蛋白 G) IgG, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, 再次洗涤细胞后, 用流式细胞仪检测, 根据结果计算抗体 EC $_{50}$ 和 MFI 值。

2.3.4 抗体与 TREM2 蛋白结合的动力学 通过 OctetRed96E 仪器检测人源化抗体与蛋白 TREM2-His 的亲和力。使 Anti-Human Capture Surface Dip 探针在 0.02%PBST 溶液中浸润 10 min, 待基线稳定后将探针浸润至 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的抗体中进行捕获抗体, 信号稳定后再次将探针浸润至 0.02%PBST 进行平衡, 随后探针依次浸润至梯度稀释的 TREM2-His 抗原中, 此时抗体与抗原结合。信号稳定后探针浸润至 0.02%PBST 进行解离。其中捕获时间为 300 s, 结合时间为 300 s, 解离时间为 300 s。检测结束后, 使用 1:1 结合模式进行曲线拟合, 以时间为横坐标, 响应值为纵坐标, 计算亲和力参数。

2.3.5 抗体的 ADCC 活性验证 收集对数生长期的 293T-TREM2-DAP12 靶细胞, 调整细胞浓度至 2 \times 10 4 个/孔, 每孔 45 μL 接种于白色不透明板中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO $_2$ 培养箱中过夜培养, 使细胞贴壁。次日, 将人源化抗体 h7B6/11 配制为 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的抗体药物浓度, 以 3.16 倍进行梯度稀释, 共设 9 个稀释度, 在接种有靶细胞的白色不透明板中每孔加入 10 μL 抗体溶液, 每个抗体浓度设置 3 个复孔, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO $_2$ 培养箱中孵育 30 min。随后每孔加入 45 μL Jurkat-NFAT-Luc2-CD16a-F158 或 Jurkat-NFAT-Luc2-CD16a-V158 效应细胞至板中, 细胞数量为 2 \times 10 4 个/孔。将白色不透明板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO $_2$ 条件下继续培养 6 h, 每孔加入 Bright-Glo 溶液, 读取冷光值, 使用 GraphPad Prism9 软件分析数据, 拟合剂量-效应曲线。

2.4 人源化抗体体内药效实验

提前 2 周复苏 CT26 肿瘤细胞并扩大培养, 将 7 周龄左右的雌性 BALB/c 小鼠适应性培养 1 周后, 进行肿瘤细胞注射。收集 CT26 肿瘤细胞, 浓度调整为 4 \times 10 6 个 \cdot mL $^{-1}$, 与等体积的 Matrigel 混合后, 每只皮下注射 100 μL 细胞混合液。每周测量两次肿瘤大小和小鼠体重, 待肿瘤体积增长至 50 ~ 100 mm 3 , 根据肿瘤体积随机分组, 使每组平均肿瘤体积大致相同。分组后进行抗体给药, 抗体采取腹腔注射的方式, 人源化抗体每 5 日给药一次, 共注射 4 次, PD1 抗体每周两次给药, 共注射两次。阴性对照为注射与人源化抗体相同剂量的磷酸盐缓冲液。

3 结果与讨论

3.1 小鼠血清效价测定

包被抗原为 TREM2-His，以小鼠血清为一抗，用磷酸盐缓冲溶液连续 3 倍稀释为 8 个浓度梯度，以未免疫小鼠血清作为阴性对照，通过间接 ELISA 法进行血清效价测定，结果见图 1，其中 7 号小鼠效价最高，高于 656 100，所以取 7 号小鼠来做细胞融合。

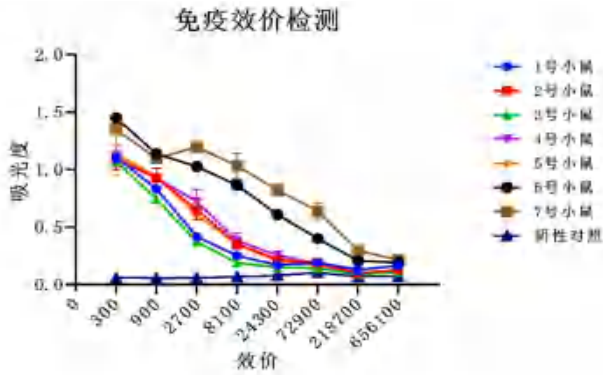


图 1 小鼠血清效价检测
Fig 1 Assay of mouse serum titer

3.2 杂交瘤抗体制备及体外活性验证

ELISA 结果如图 2A 和表 1 所示，筛选得到的 6 株单克隆杂交瘤抗体均与 TREM2-His 蛋白结合， OD_{450} 最大值均在 1.7 以上，其中 7B6-11、10B12-2 的 EC_{50} 值最低，表明杂交瘤抗体对 TREM2-His 有较好的结合能力。通过两个不同种属的 TREM2 过表达细胞进行 FACS 检测 (见表 2)，FlowJo 计算 MFI 值后使用 Graph Pad Prism9 软件进行数据分析，结果见图 2B ~ 2C 和表 2 ~ 3，所筛选的杂交瘤抗体有对细胞表面表达的人源 TREM2 和猴源 TREM2 有特异性结合能力，其中抗体 7B6-11、10B12-2 的结合能力与其他杂交瘤抗体相比较好。可用于后续的人源化改造。

3.3 人源化抗体的纯度鉴定及活性验证

3.3.1 抗体 h7B6-11 纯度鉴定 SDS-PAGE 结果如图 3A 所示，非还原性电泳条带为单一条带，表明抗体纯度较高；还原性电泳条带重链大小约

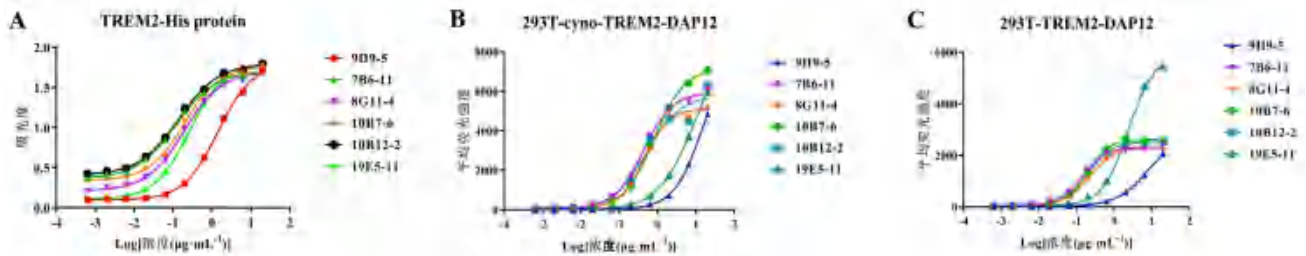


图 2 杂交瘤抗体的结合作用

Fig 2 Binding of hybridoma antibodies

A. ELISA 结合实验 (ELISA binding assay); B. 与细胞 293T-TREM2-DAP12 的 FACS 结合实验 (FACS binding assay with cell 293T-TREM2-DAP12); C. 与细胞 293T-cyno-TREM2-DAP12 的 FACS 结合实验 (FACS binding assay with cell 293T-cyno-TREM2-DAP12)

表 1 杂交瘤抗体的 ELISA 结合实验数据

Tab 1 Data from ELISA binding experiments of hybridoma antibodies

抗体	$OD_{450\text{-Max}}$	$EC_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
9H9-5	1.705	1.4400
7B6-11	1.714	0.1194
8G11-4	1.715	0.1927
10B7-6	1.775	0.1942
10B12-2	1.797	0.1378
19E5-11	1.799	0.2614

表 2 杂交瘤抗体与细胞 293T-TREM2-DAP12 的 FACS 结合实验数据

Tab 2 Data from FACS binding experiments of hybridoma to cells 293T-TREM2-DAP12

抗体	MFI_{Max}	$EC_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
9H9-5	3059	9.3190
7B6-11	2331	0.1427
8G11-4	2324	0.2167
10B7-6	2619	0.1933
10B12-2	2537	0.1897
19E5-11	5859	2.3430

为 55 kDa，轻链大小约为 25 kDa，蛋白大小符合预期，且两条条带清晰无杂带。SEC-HPLC 结果如图 3B 所示，在选择色谱条件下，h7B6-11 主峰保留时间为 13.236 min，出峰时间符合预期且主要成分在样品中的含量较高，显示纯度较好。

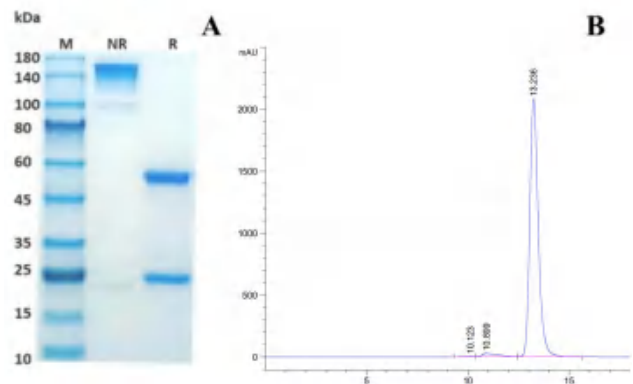


图 3 人源化抗体 h7B6-11 的纯度分析

Fig 3 Purity analysis of the humanized antibody h7B6-11

3.3.2 抗体 h7B6-11 结合活性验证 结果见图

表 3 杂交瘤抗体与细胞 293T-cyno-TREM2-DAP12 的 FACS 结合实验数据

Tab 3 Data from FACS binding experiments of hybridoma to cells 293T-cyno-TREM2-DAP12

抗体	MFI _{Max}	EC ₅₀ / (μg · mL ⁻¹)
9H9-5	8345	15.0710
7B6-11	5968	0.4275
8G11-4	5103	0.4534
10B7-6	7182	0.8162
10B12-2	5795	0.5044
19E5-11	8962	9.3970

4A, 抗体 h7B6-11 与抗原 TREM2-His 有明显的结合且阴性对照抗体无信号, 其 EC₅₀ 为 0.4060 μg · mL⁻¹; 通过 FACS 在 TREM2 过表达细胞上测定抗体 h7B6-11 与细胞结合能力, 结果见图 4B, 其 EC₅₀ 为 1.4350 μg · mL⁻¹, 结合能力较好。通过 BLI 测定抗体 h7B6-11 以及 TREM2-His 蛋白的亲和力, 其参数为 6.83 × 10⁻⁹ M, R² 为 0.9872, 结果见图 4C。三组实验结果显示经人源化后的抗体仍具有良好的结合活性。

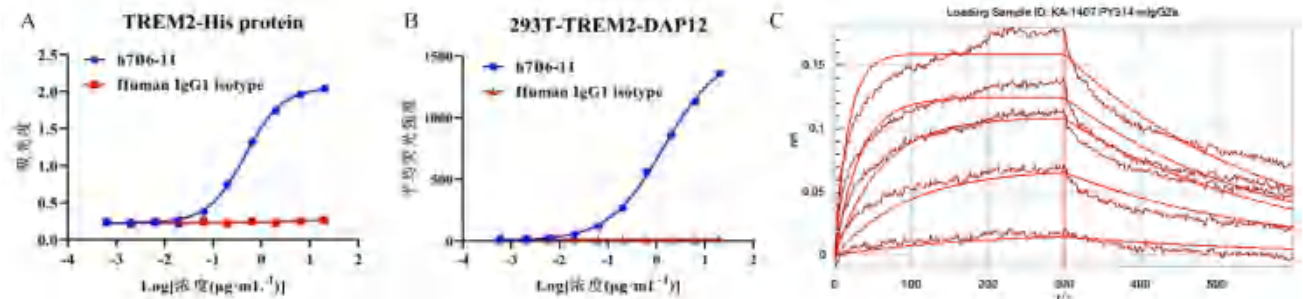


图 4 人源化抗体的结合活性分析

Fig 4 Binding activity analysis of humanized antibodies

A. ELISA 结合实验 (ELISA binding assay); B. 与细胞 293T-TREM2-DAP12 的 FACS 结合实验 (FACS binding assay with cell 293T-TREM2-DAP12); C. 亲和力 BLI 检测 (affinity BLI assay)

3.3.3 抗体 h7B6-11 的 ADCC 活性验证 本实验利用抗体的 ADCC 效应可以激活效应细胞内活化的 T 细胞核内因子 (NFAT) 信号通路的原理, 使效应细胞 NFAT-Luc2 荧光素酶报告基因系统表达荧光素酶基因, 荧光素酶与底物反应产生荧光, 其产生的荧光信号强度可以反映抗体的 ADCC 活性。结果如图 5 所示, 抗体 h7B6-11 与阴性对照相比, 能在两个不同的报告基因效应细胞 Jurkat-NFAT-Luc2-CD16a-F158 和 Jurkat-NFAT-Luc2-CD16a-V158 上均产生作用, 且均呈现良好的剂量效应曲线, 表明抗体具有较好的 ADCC 活性。

3.4 体内药效实验

采用 BALB/c 小鼠皮下接种 CT26 肿瘤细胞为模型, 评价人源化抗体 h7B6-11 与 PD1 抗体联合用药对肿瘤的抑制效果。结果见图 6, 黑色箭头表示抗体 h7B6-11 给药时间点, 红色箭头表示 PD1 抗体给药时间点; 结果显示与 G1 组 (PBS, 10 mg · kg⁻¹, ip, q5d) 注射 PBS 的阴性对照组相比, G2 组 (h7B6-11, 10 mg · kg⁻¹, ip, q5d) 抗体 h7B6-11 单独用药的效果不明显, 而 G4 组 [h7B6-11 + RMP114 (10 mg · kg⁻¹ + 15 mg · kg⁻¹), ip, q5d + biw] 抗体 h7B6-11 与 PD1 抗体联合用药对肿瘤抑制效果显著; 与 G3 组 (RMP114, 15 mg · kg⁻¹, ip, biw) PD1 抗体给药组相比, G4 组联合用药能显著抑制肿瘤生

长, 差异有统计学意义。

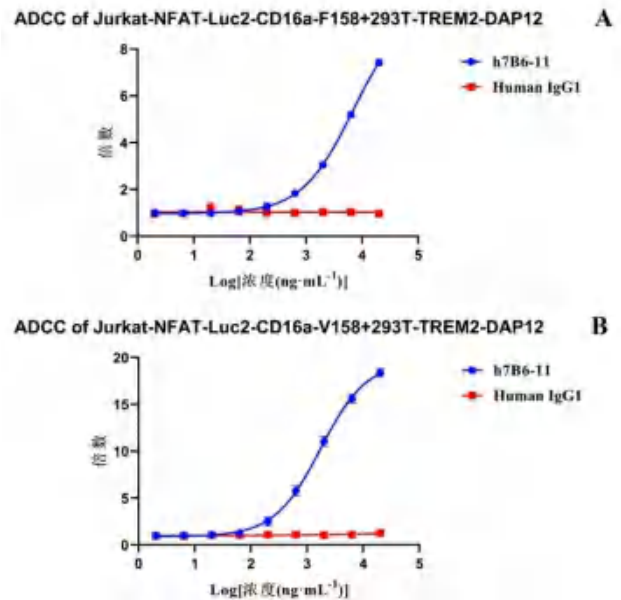


图 5 人源化抗体 ADCC 活性曲线

Fig 5 ADCC activity curves of humanized antibodies

4 讨论

TREM2 作为多种疾病 (包括肿瘤、纤维化和神经退行性疾病) 的治疗靶点备受关注^[11-13]。因此, 特异性针对 TREM2 的临床药物研发成为一种新的治疗策略。靶向 TREM2 并抑制 TREM2 的功能可减少肿瘤微环境中 TAM 数量或调节 TAM

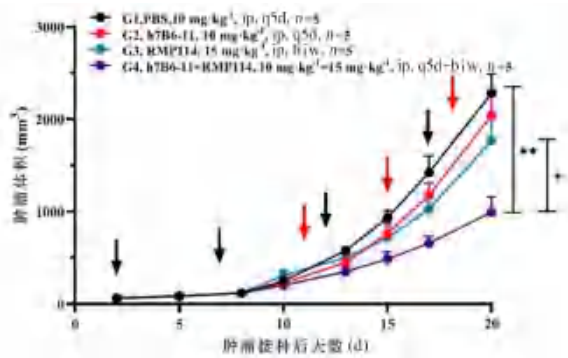


图 6 平均肿瘤曲线对不同给药组的药效评价

Fig 6 Pharmacodynamic evaluation of mean tumor volume curves in different administration groups

注: 与 G4 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the group G4, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

表型和功能, 耗竭肿瘤浸润性巨噬细胞, 可以减少抗原呈递与组织重构, 让早期肿瘤细胞生存和生长能力受损, 进而控制肿瘤增长, 增强对 PD1 的应答, 加强检查点免疫治疗介导的抗肿瘤反应^[14-16]。有多种干预措施可以将 TREM2 通路作为治疗靶点, 其中最突出的方法是用小分子直接靶向受体的活性结构域或使用抗 TREM2 单克隆抗体进行治疗。在单克隆抗体研究中, 通过抗体介导的细胞毒作用的抗 TREM2 单克隆抗体^[7]和 TREM2 拮抗剂的单克隆抗体^[10-11]是逆转髓系免疫抑制环境的两种主要策略。这两种策略被认为是目前肿瘤免疫治疗中有开发前景的方向。

本研究使用免疫抗原重组蛋白 TREM2-mFc 对小鼠免疫, 得到可稳定分泌抗 TREM2 单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 将筛选到的结合活性较好的抗体进行人源化改造, 得到人源化抗体。研究通过多种方法对抗体结合活性进行检测, 结果表明该抗体有较高的亲和力, 且在基于报告基因系统的 ADCC 活性实验中, 人源化抗体以极低的剂量激活两种效应细胞, 表明其在细胞水平上具有良好的生物学功能活性。体内药效实验结果表明抗体 h7B6-11 与 PD1 联合用药可明显抑制肿瘤生长, 这可能与抗体 h7B6-11 在体内靶向 TREM2 后, 通过抑制肿瘤微环境中巨噬细胞中 TREM2 的表达或抑制 TREM2 的功能, 阻断 PD-1/PD-L1 通路, 激活 T 细胞, 增强抗肿瘤活性, 降低肿瘤细胞逃逸概率有关。在下一阶段的研究中, 本课题组将进一步对抗体的 ADCC 活性进行改造和优化, 继续研究抗 TREM2 单克隆抗体与 PD1 免疫检查点抑制剂的联合用药疗效, 并对其药效学进行优化, 探索新型联合治疗模式, 以改善肿瘤免疫治疗的应答率, 为肿瘤免疫治疗和靶向治疗领域提供更好的用药方案。

参考文献

- [1] Zhai Y, Moosavi R, Chen M. Immune checkpoints, a novel class of therapeutic targets for autoimmune diseases [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 645699.
- [2] Li B, Chan HL, Chen P. Immune checkpoint inhibitors: basics and challenges [J]. *Curr Med Chem*, 2019, 26 (17): 3009-3025.
- [3] Molgora M, Colonna M. Turning enemies into allies-reprogramming tumor-associated macrophages for cancer therapy [J]. *Med*, 2021, 2 (6): 666-681.
- [4] Jahchan NS, Mujal AM, Pollack JL, et al. Tuning the tumor myeloid microenvironment to fight cancer [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1611.
- [5] Dannenmann SR, Thielicke J, Stöckli M, et al. Tumor-associated macrophages subvert T-cell function and correlate with reduced survival in clear cell renal cell carcinoma [J]. *Oncoimmunology*, 2013, 2 (3): e23562.
- [6] Binnewies M, Pollack JL, Rudolph J, et al. Targeting TREM2 on tumor-associated macrophages enhances immunotherapy [J]. *Cell Rep*, 2021, 37 (3): 109844.
- [7] Broz ML, Binnewies M, Boldajipour B, et al. Dissecting the tumor myeloid compartment reveals rare activating antigen-presenting cells critical for T cell immunity [J]. *Cancer Cell*, 2014, 26 (5): 638-652.
- [8] 魏思媛, 马芳琪, 李晓伟, 等. 髓样细胞触发受体 TREM 与肿瘤相关巨噬细胞 TAM 在恶性肿瘤中研究进展 [J]. *世界最新医学信息文摘 (连续型电子期刊)*, 2020, 20 (36): 100-102, 111.
- [9] Park DJ, Sung PS, Lee GW, et al. Preferential expression of programmed death ligand 1 protein in tumor-associated macrophages and its potential role in immunotherapy for hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (9): 4710.
- [10] Molgora M, Esaulova E, Vermi W, et al. TREM2 modulation remodels the tumor myeloid landscape enhancing Anti-PD-1 immunotherapy [J]. *Cell*, 2020, 182 (4): 886-900.
- [11] Deczkowska A, Weiner A, Amit I. The physiology, pathology, and potential therapeutic applications of the TREM2 signaling pathway [J]. *Cell*, 2020, 181 (6): 1207-1217.
- [12] 齐书畅, 冯友新, 刘茜茜, 等. 髓系细胞触发受体 2 及其信号通路在恶性肿瘤中作用的研究进展 [J]. *生理科学进展*, 2024, 55 (2): 133-138.
- [13] Ulland TK, Colonna M. TREM2-a key player in microglial biology and Alzheimer disease [J]. *Nat Rev Neurol*, 2018, 14 (11): 667-675.
- [14] Lavin Y, Kobayashi S, Leader A, et al. Innate immune landscape in early lung adenocarcinoma by paired single-cell analyses [J]. *Cell*, 2017, 169 (4): 750-765.e17.
- [15] Wang ML, Pan W, Xu Y, et al. Microglia-mediated neuroinflammation: a potential target for the treatment of cardiovascular diseases [J]. *J Inflamm Res*, 2022, 15: 3083-3094.
- [16] Molgora M, Esaulova E, Vermi W, et al. TREM2 modulation remodels the tumor myeloid landscape enhancing anti-PD-1 immunotherapy [J]. *Cell*, 2020, 182 (4): 886-900.e17.

(收稿日期: 2024-01-08; 修回日期: 2024-02-10)

红景天苷脂质体的构建及其对高糖诱导 ARPE-19 细胞氧化损伤的保护作用

丁文华¹, 汪凯康¹, 贾文¹, 刘家佳^{5, 6}, 高家荣^{3, 4*}, 徐维平^{1, 2, 6*} (1. 安徽中医药大学, 合肥 230012; 2. 中国科学技术大学附属第一医院 老年医学科 (安徽省立医院), 合肥 230001; 3. 安徽中医药大学第一附属医院 药学部, 合肥 230031; 4. 安徽中医药大学 中药复方安徽省重点实验室, 合肥 230012; 5. 中国科学技术大学附属第一医院 (安徽省立医院) 眼科, 合肥 230001; 6. 中国科学技术大学生命科学学院, 合肥 230027)

摘要: 目的 构建红景天苷脂质体 (SAL-LIPS), 对其进行评价, 并研究 SAL-LIPS 在高糖 (HG) 环境下对人视网膜色素上皮 (ARPE-19) 细胞氧化损伤的保护作用。方法 采用乙醇注入法制备 SAL-LIPS, 通过透射电镜观察其形态, 测定粒径、多分散系数 (PDI) 并考察制剂的体外释放及稳定性。HG 诱导 ARPE-19 细胞建立氧化应激细胞模型, 检测不同浓度的 SAL-LIPS 对损伤细胞活力的影响, 并检测不同组别细胞 ROS 水平、MDA 含量、血管内皮因子 (VEGF) 和缺血诱导因子 (HIF-1 α) 的表达。结果 制备的 SAL-LIPS 呈圆球状, 平均粒径为 (112.1 \pm 2) nm, 平均 PDI 为 0.204 \pm 0.02, 与红景天苷原料药相比具有缓释作用, 稳定性较好。在 50 ~ 100 μ mol \cdot L⁻¹ 内 SAL-LIPS 可以显著改善 HG 诱导的 ARPE-19 细胞的活力。与空白对照组比较, HG 组显著升高 ARPE-19 细胞内 ROS 水平、MDA 含量, 同时增强了 VEGF 和 HIF-1 α 的表达; 与 HG 组 ARPE-19 细胞比较, HG + 低浓度 SAL-LIPS 组和 HG + 高浓度 SAL-LIPS 组显著降低了细胞内 ROS 水平、MDA 含量, 同时减少了 VEGF 和 HIF-1 α 的表达。结论 所构建的 SAL-LIPS 具有良好的缓释作用和稳定性, 可以改善 HG 诱导 ARPE-19 细胞发生的氧化应激, 发挥抗氧化作用。

关键词: 红景天苷; 脂质体; ARPE-19; 抗氧化

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)06-1435-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.007

Construction of salidroside liposomes and their protective effects on oxidative damage in ARPE-19 cells induced by high glucose

DING Wen-hua¹, WANG Kai-kang¹, JIA Wen¹, LIU Jia-jia^{5, 6}, GAO Jia-rong^{3, 4*}, XU Wei-ping^{1, 2, 6*} (1. Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Heifei 230012; 2. Anhui Institute of Aging, The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China, Geriatrics (Anhui Provincial Hospital), Heifei 230001; 3. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Heifei 230031; 4. Key Laboratory of Compound Traditional Chinese Medicine of Anhui, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Heifei 230012; 5. Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China (Anhui Provincial Hospital), Heifei 230001; 6. College of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Heifei 230027)

Abstract: Objective To construct salidroside liposomes (SAL-LIPS), evaluate their protective effects against oxidative damage in human retinal pigment epithelial (ARPE-19) cells under high glucose conditions. **Methods** SAL-LIPS were prepared with ethanol injection method. The morphology was observed with transmission electron microscopy, and particle size, polydispersity index (PDI), as well as in vitro release and stability assessed. An oxidative stress cell model was established in

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.52072360)。

作者简介: 丁文华, 女, 硕士研究生, 主要从事药物制剂研究, email: 2558795058@qq.com *通信作者: 高家荣, 男, 主任药师, 博士研究生导师, 主要从事中药物质基础及药理研究, email: zyfygir2006@163.com; 徐维平, 男, 主任药师, 博士研究生导师, 主要从事药剂学及药理学研究, email: weipingx@ustc.edu.cn

ARPE-19 cells induced by high glucose. The effect of different concentrations of SAL-LIPS on the viability of damaged cells was examined, and the expression levels of reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA), vascular endothelial growth factor (VEGF), and hypoxia-inducible factor (HIF-1 α) in different groups were measured. **Results** The prepared SAL-LIPS were spherical with an average particle size of (112.1 \pm 2) nm and an average PDI of 0.204 \pm 0.02, demonstrating a sustained-release effect and better stability compared to the raw material of salidroside. SAL-LIPS greatly improved the viability of ARPE-19 cells induced by high glucose of 50 ~ 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Compared with the blank control group of ARPE-19 cells, the high glucose group obviously increased the levels of intracellular ROS and MDA, along with enhanced expression of VEGF and HIF-1 α . Compared with the high glucose group of ARPE-19 cells, both the low and high concentration SAL-LIPS groups much reduced the levels of intracellular ROS and MDA, and also decreased the expression of VEGF and HIF-1 α . **Conclusion** The constructed SAL-LIPS exhibit good sustained-release effect and stability, which can improve oxidative stress induced in ARPE-19 cells by high glucose, exerting antioxidative effect.

Key words: salidroside; liposome; ARPE-19; antioxidation

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是全球视力丧失最常见的原因之一,也是糖尿病主要微血管并发症之一^[1-2]。目前,DR 的研究都集中在血管异常上,其中视网膜中的视网膜色素上皮 (ARPE-19) 细胞在 DR 的发生中起着重要作用^[3-6]。ARPE-19 细胞位于脉络膜毛细血管和光感受器的外段之间,构成了血视网膜屏障,为视网膜神经细胞层提供必要的营养和代谢支持^[7]。糖尿病患者的高血糖环境会导致活性氧 (ROS) 增多,诱发 ARPE-19 细胞产生氧化应激反应,导致机体处于氧化损伤的状态,进而发生视力下降甚至失明^[8-9]。因此,ARPE-19 的氧化损伤被认为是引起 DR 的一个重要因素。

安全有效的抗氧化剂对于 DR 的治疗受到人们的广泛关注,红景天苷 (salidroside, SAL) 是一种天然的抗氧化剂,是红景天的主要活性成分,主要存在于红景天属的根部^[10-11]。SAL 具有抗氧化、抗炎、抗衰老、抗抑郁等多种药理作用^[12-14]。在细胞的抗氧化研究中,SAL 已被证实能够降低 ROS 及丙二醛 (MDA) 含量^[15-17]。在动物的研究中显示,SAL 能有效下调血管内皮生长因子 (VEGF) 和缺氧诱导因子 (HIF-1 α) 的表达^[18-19]。然而,SAL 的半衰期短、极易溶于水,其生物利用度差、作用迅速,在体内不稳定^[20]。脂质体是由两亲性成分组成的超分子聚集体^[21-22],这些聚集体形成磷脂分子双层结构的球形囊泡,能够包埋脂溶性或水溶性药物,从而提高药物的溶解度和稳定性,增强药物的渗透性和吸收性,并使药物具有缓慢释放的作用^[23-24]。

本研究采用脂质体作为载体,制备红景天苷脂质体 (SAL-LIPS)。通过高糖 (high glucose,

HG) 诱导 ARPE-19 细胞,建立细胞氧化应激模型,研究 SAL-LIPS 对细胞氧化损伤的保护作用。

1 材料

1.1 试药

SAL (纯度: 98%, 成都埃法生物科技有限公司,批号: AFBH2203); 大豆磷脂 (纯度 > 95%, 艾伟拓医药科技有限公司,批号: B61251); 胆固醇 (纯度 > 98%, 上海麦克林生化科技有限公司,批号: A2203126); 无水乙醇 (安徽安特食品股份有限公司,批号: 2211073605); 甲醇 (天津市大茂化学试剂厂,批号: 20230301); 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4, 武汉赛维尔生物有限公司,批号: GA22090454731); CCK-8 试剂盒 (亚科因生物技术有限公司,批号: ATWD24091); DMEM/F12 培养基 (合肥奥秘来生物科技有限公司,批号: 2322157); ROS 检测试剂盒 (biosharp); MDA 含量检测试剂盒 (CheKine); 血管内皮因子 (VEGF)、缺血诱导因子 (HIF-1 α) 酶联免疫分析试剂盒 (上海江莱生物科技有限公司)。

1.2 仪器

ZNCL-DLS130*70 磁力搅拌器 (巩义市予华仪器有限公司); HH 恒温水浴锅 (江苏金坛区中大仪器厂); 超声波破碎仪 (上海达洛科学仪器有限公司); HOKEE 经济型超纯水机 (合肥宏科仪器有限公司); 雷磁 PHS-2FPH 计 (上海仪电科学仪器股份有限公司); HT7700 透射电子显微镜 (日本日立公司); BS 224 S 电子天平 (赛多利斯科学仪器有限公司,精度: 万分之一); Beckman 紫外分光光度计 DU530 (北京兴延诚博科技有限公司); NanoBrook 90PlusPALS 粒径测定仪 (美国布鲁克海文仪器公司); 酶标仪 (安徽艾利尔医

疗科技有限公司); 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.3 细胞

人视网膜色素上皮 ARPE-19 细胞(武汉普诺赛生命科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 SAL-LIPS 的制备

采用乙醇注入法制备 SAL-LIPS^[25-26]。精密称取 114.8 mg 的 SAL 原料药溶于 20 mL 水合介质中配成 A 液, 另精密称取 200 mg 大豆磷脂和 63.7 mg 胆固醇溶于 10 mL 无水乙醇中, 溶解完全配成 B 液。将 A 液放置在磁力搅拌器上以 $566 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 搅拌加热到 $60 \text{ }^\circ\text{C}$, B 液用一次性注射器以 $3 \text{ min} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的速度注入 A 液中。磁力搅拌至无水乙醇全部挥发, 加入适量 PBS 和 0.9%NaCl 将 pH 调节至 $6.5 \sim 7.0$, 渗透压调节至 $280 \sim 310 \text{ mOsm} \cdot \text{L}^{-1}$, 使用超声波破碎仪超声 15 min (以超声 5 s, 暂停 5 s 的方式进行超声), 结束后使用 $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ 无菌微孔滤膜过滤除菌即得到 SAL-LIPS。于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱静置储存。

2.2 SAL-LIPS 理化性质考察

2.2.1 透射电镜形态观察 制备结束后使用透射电镜进行拍摄, 观察 SAL-LIPS 形态。结果如图 1 所示, 透射电镜下脂质体呈现圆球状, 粒径平均在 $85 \sim 175 \text{ nm}$ 。

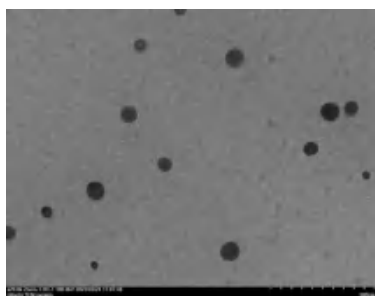


图 1 SAL-LIPS 透射电镜图 ($\times 60 \text{ K}$)

Fig 1 Transmission electron microscopy of SAL-LIPS ($\times 60 \text{ K}$)

2.2.2 粒径及 PDI 使用粒径测定仪对 SAL-LIPS 进行 3 次平行测定, 得到平均粒径和 PDI。得到测定结果, 粒径分别为 110.0 nm 、 112.1 nm 、 113.3 nm , 平均粒径为 $(112.1 \pm 2) \text{ nm}$ 。PDI 分别为 0.226 、 0.183 、 0.204 , 平均 PDI 为 0.204 ± 0.02 。SAL-LIPS 粒径分布图如图 2 所示, 可见粒径基本分布在 $100 \sim 200 \text{ nm}$ 。

2.2.3 体外释放实验 在温度为 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 转速为 $600 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的条件下进行实验, 释放介质是 pH 7.4 的 PBS 溶液, 进行 SAL 和 SAL-LIPS 两组溶液的体外释放实验。每组按照药与 PBS 为 $1:200$ 的体积比进行释放。将药加入透析袋中, 使 PBS 浸没透析袋, 分别在 1、2、4、6、8、10、12、24 h 进行取样。每次取 5 mL 的释放介质, 取出后

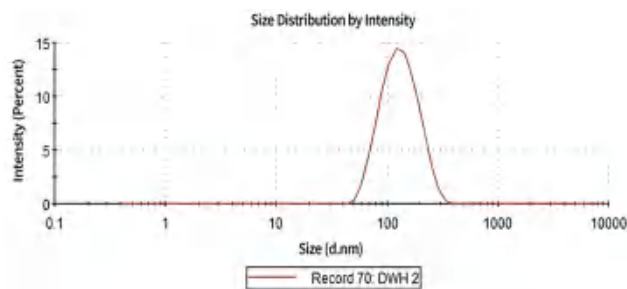


图 2 SAL-LIPS 粒径分布

Fig 2 Size distribution of SAL-LIPS

补充相同体积的 PBS, 紫外分光光度计测定每组吸光度 (A) 值, 通过标准曲线计算其释放浓度。重复实验 3 次, 绘制体外释放曲线。

两组 24 h 内的体外释放曲线如图 3 所示, SAL 原料药在 1 h 的累计释放率达到 55.1% , 4 h 左右基本释放完成, 累计释放率达到 94.8% 。SAL-LIPS 在 1 h 的累计释放率为 24.5% , 释放缓慢, 8 h 后药物释放率趋于稳定, 24 h 药物释放率达到 75.6% 。可见 SAL-LIPS 可以缓慢释放药物, 根据体外释放拟合结果显示: SAL-LIPS 的体外释放符合一级释放方程 ($r = 0.9922$)。

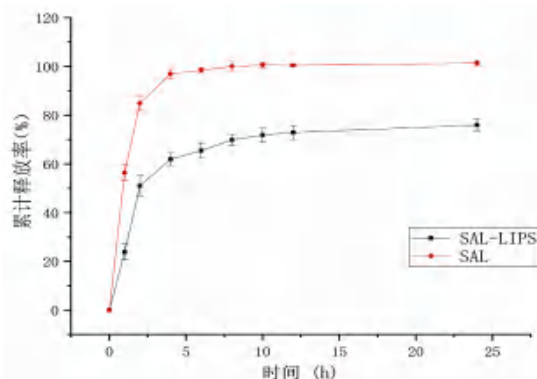


图 3 SAL 和 SAL-LIPS 的体外释放曲线 ($n = 3$)

Fig 3 In vitro release curves of SAL and SAL-LIPS ($n = 3$)

2.2.4 稳定性实验 SAL-LIPS 制备结束后, 分别在第 2、5、8、12、15、20、30、60 日对其进行外观色泽、pH 值、可见异物、粒径的观察和测定。实验结果见表 1, 在第 2、5、8、12、15、20、30、60 日, SAL-LIPS 的外观色泽基本无变化, 一直保持澄清透明, 颜色呈乳白色的状态, 并且无可见异物出现。pH 值随着时间有轻微变化, 粒径随着时间延长增大, 15 d 后粒径变化较小。

2.3 细胞培养

人视网膜色素上皮细胞 ARPE-19 细胞在含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM/F12 培养基中培养, 放置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$ 恒温箱中, 每 2 日左右进行换液或者传代以保证细胞正常生长。

表 1 SAL-LIPS 稳定性考察结果 (n = 3)

Tab 1 Stability of SAL-LIPS (n = 3)

时间 /d	外观色泽	pH 值	可见异物	粒径 /nm
2	澄清透明, 颜色呈乳白色	6.68	无可见异物	123.2
5	澄清透明, 颜色呈乳白色	6.72	无可见异物	137.6
8	澄清透明, 颜色呈乳白色	6.73	无可见异物	153.3
12	澄清透明, 颜色呈乳白色	6.88	无可见异物	192.8
15	澄清透明, 颜色呈乳白色	6.89	无可见异物	198.0
20	澄清透明, 颜色呈乳白色	6.88	无可见异物	200.4
30	澄清透明, 颜色呈乳白色	6.85	无可见异物	202.7
60	澄清透明, 颜色呈乳白色	6.93	无可见异物	211.6

2.4 CCK-8 法检测 SAL-LIPS 对 ARPE-19 细胞活力的影响

培养 ARPE-19 细胞至呈对数增长, 5×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的密度接种在 96 孔板中。把细胞种在 96 孔板后, 在恒温箱培养 24 h 后加药干预, 分为 6 组: 空白对照组、HG (40 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组、HG (40 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) + SAL-LIPS (25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组、HG (40 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) + SAL-LIPS (50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组、HG (40 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) + SAL-LIPS (75 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组和 HG (40 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) + SAL-LIPS (100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组, 每组设置 6 个复孔, 同时设置空白孔。放入恒温箱干预 24 h 后, 每孔加入 10 μL 的 CCK-8 溶液, 恒温箱放置 30 min 后, 在酶标仪 450 nm 处检测吸光度值, 计算细胞活力: 细胞活力 (%) = [(给药组吸光度值 - 空白孔吸光度值) / (对照组吸光度值 - 空白孔吸光度值)] $\times 100\%$ 。

实验结果如图 4 所示, 与空白对照组比较, HG (40 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组显著降低了细胞活力 ($P < 0.001$); 与 HG 组相比, 在 50 ~ 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 SAL-LIPS 显著提高细胞活力 ($P < 0.05$, $P < 0.001$)。由此可知, SAL-LIPS 可以改善 HG 诱导 ARPE-19 细胞活力。

2.5 SAL-LIPS 对 HG 诱导 ARPE-19 细胞内 ROS 水平的影响

ARPE-19 细胞 ROS 水平采用流式细胞仪检测。对数期细胞以 5×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的密度均匀

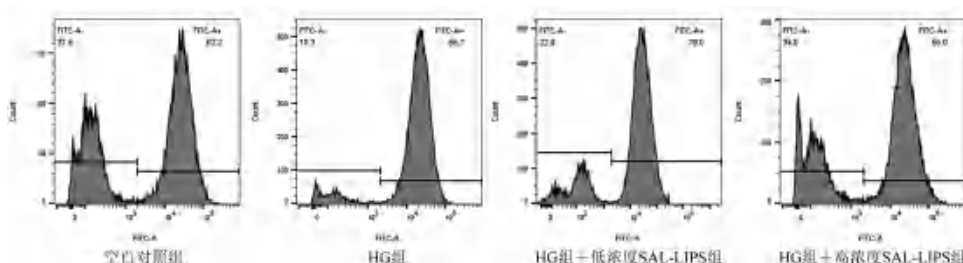


图 5 SAL-LIPS 对 HG 诱导 ARPE-19 细胞的 ROS 水平的影响

Fig 5 Effect of SAL-LIPS on ROS levels in high glucose-induced ARPE-19 cells

注: 与空白对照组相比较, $^{###}P < 0.01$; 与 HG 组相比较, $^*P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$ 。

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

2.6 SAL-LIPS 对 HG 诱导 ARPE-19 细胞内 MDA 含量的影响

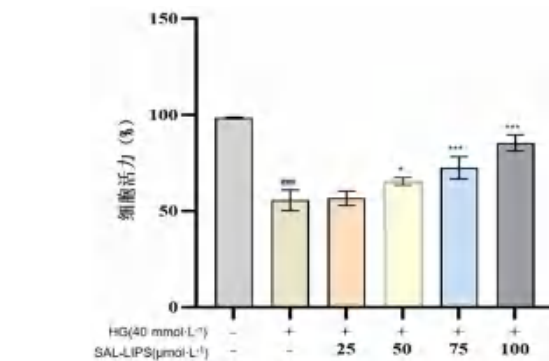


图 4 不同浓度 SAL-LIPS 对 HG 诱导 ARPE-19 细胞活力的影响

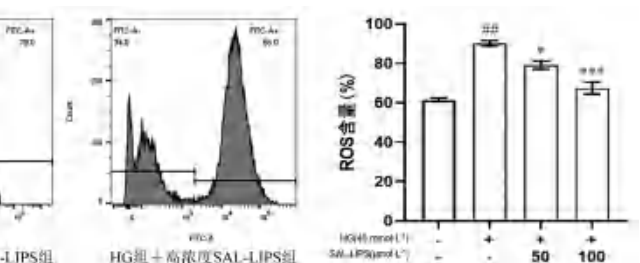
Fig 4 Impact of different concentrations of SAL-LIPS on the viability of ARPE-19 cells induced by high glucose

注: 与空白对照组比较, $^{###}P < 0.001$; 与 HG 组比较, $^*P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$ 。

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

接种在 6 孔板中。实验分为 4 组: 空白对照组、HG (40 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组、HG (40 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) + 低浓度 SAL-LIPS (50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组和 HG (40 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) + 高浓度 SAL-LIPS (100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组, ARPE-19 细胞按照分组加药处理, 并在恒温箱避光孵育 24 h 后, 吸除处理的药物, 加入适当体积稀释好的 H_2DCFDA 工作液。后续按照 ROS 试剂盒说明书装载 ROS 探针, 并使用 488 nm 激发波长, 525 nm 发射波长在流式细胞仪上操作。

结果如图 5 所示, 与空白对照组比较, HG 诱导的 ARPE-19 细胞 ROS 水平显著提升 ($P < 0.01$), 证明 HG 可诱导 ARPE-19 细胞内 ROS 水平升高; 加入低浓度 SAL-LIPS 处理后, 较单独 HG 诱导 ARPE-19 细胞 ROS 水平减弱; 加入高浓度 SAL-LIPS 处理后, 较单独 HG 诱导 ARPE-19 细胞 ROS 水平进一步减弱 ($P < 0.05$, $P < 0.001$), 表明 SAL-LIPS 可以减少 HG 诱导的 ARPE-19 细胞的 ROS 水平。



细胞按“2.5”项下分组并培养 24 h, 超声破碎各组细胞取上清液, 使用 MDA 检测盒, 按照

说明书测定各组细胞 MDA 的含量水平, 在 532 nm 处测定吸光值。

结果如表 2 所示, 相较于空白对照组, 经高糖诱导的 ARPE-19 细胞 MDA 含量显著增高 ($P < 0.01$), 加入低浓度和高浓度 SAL-LIPS 治疗后, MDA 含量明显下降 ($P < 0.01$), 且高浓度 SAL-LIPS 治疗效果更显著。

表 2 各组 ARPE-19 细胞内 MDA 的含量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
Tab 2 Intracellular MDA content in ARPE-19 cells in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	MDA/ (nmol · mL ⁻¹)
空白对照组	1.65 ± 0.25
HG 组	2.58 ± 0.13**
HG + 低浓度 SAL-LIPS 组	2.11 ± 0.20***
HG + 高浓度 SAL-LIPS 组	1.90 ± 0.18***

注: 与空白对照组比较, ** $P < 0.01$; 与 HG 组比较, *** $P < 0.01$ 。

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

2.7 SAL-LIPS 对 HG 诱导 ARPE-19 细胞内 VEGF 和 HIF-1 α 表达的影响

细胞按“2.5”项下分组并培养 24 h, 收集各组细胞的上清液, 在 450 nm 波长处测量各组的吸光值, 每组平行测量 3 次。具体步骤按照 ELISA 说明书稀释样品, 建立标准曲线, 并测量 VEGF 和 HIF-1 α 含量。

结果如表 3 所示, 相对于空白对照组, 经 HG 诱导过 ARPE-19 细胞的 VEGF 和 HIF-1 α 浓度显著增高 ($P < 0.05$); 与 HG 组比较, 低浓度和高浓度 SAL-LIPS 都可以显著降低细胞上清中 VEGF 和 HIF-1 α 浓度 ($P < 0.01$)。说明高浓度 SAL-LIPS 对降低细胞中 VEGF 和 HIF-1 α 浓度比低浓度 SAL-LIPS 效果更好。

表 3 各组 ARPE-19 细胞内 VEGF 和 HIF-1 α 的浓度 ($n = 3$)
Tab 3 Concentration of VEGF and HIF-1 α in ARPE-19 cells in each group ($n = 3$)

组别	VEGF/ (pg · mL ⁻¹)	HIF-1 α / (pg · mL ⁻¹)
空白对照组	335.11 ± 16.55	62.76 ± 2.47
HG 组	612.85 ± 11.98*	144.91 ± 4.24*
HG + 低浓度 SAL-LIPS 组	428.51 ± 15.03***	107.46 ± 3.67***
HG + 高浓度 SAL-LIPS 组	378.43 ± 9.20***	100.85 ± 3.39***

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与 HG 组比较, *** $P < 0.01$ 。

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

2.8 统计学方法

采用软件 SPSS 27.0 版本进行对数据的统计分析, 以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 呈现实验数据, 经过正态分布以及方差齐性的检验后, 再进行单因素方差分析 (ANOVA) 比较组间差异, $P < 0.05$

认为差异具有统计学意义。

3 结论

在现代药物研究领域, SAL 作为一种活性显著的天然化合物, 具有抗氧化、抗炎及神经保护等功效, 可以有效靶向治疗 DR 引起的视网膜氧化应激、炎症反应和神经细胞损伤^[27]。SAL 对于 DR 具有良好的治疗潜力, 但在临床应用中存在一定的局限性, 特别是 SAL 的高水溶性使其在体内代谢速度快, 并且生物利用率低。因此, 本研究运用大豆磷脂和胆固醇作为基础材料, 构建了 SAL-LIPS 以改善 SAL 的缺点。该脂质体系统通过独特的分子结构, 为 SAL 提供了一种高效的载体环境, 不但显著增强了其在生物体内的稳定性和靶向传递能力, 而且可以有效避免 SAL 快速代谢和降解, 实现了药物的控制释放并显著延长了 SAL 在体内的作用时间^[28], 这种载体极大地提升了 SAL 的治疗效能。本文通过乙醇注入法制备了 SAL-LIPS, 实验制备方法简单, 可直接作用于眼部。体外释放实验表明, 在 pH 7.2 的 PBS 中, SAL-LIPS 相较于 SAL 具有更长的释放周期和更为平缓的释放速率, 从而有效改善了 SAL 生物利用度差的局限性。稳定性实验表明, SAL-LIPS 在 60 d 的观察期内性质保持稳定, 未观察到分层、凝聚或乳化破裂等现象。

在 DR 的进展过程中, 越来越多的研究发现 ROS 和 MDA 水平的异常升高会引起 ARPE-19 细胞的氧化应激, 导致细胞结构和功能损伤。这种损伤主要表现为脂质过氧化、蛋白质氧化和 DNA 损伤, 进而可能触发炎症反应、黄斑退化以及视网膜屏障功能的受损^[29-30]。同时在缺氧条件下, ARPE-19 细胞还会产生一种转录因子 HIF-1 α , 它可以反式激活 VEGF 等基因, 而 VEGF 的表达上调会促进异常血管的生长和现有血管的泄漏, 导致视网膜水肿、出血和新生血管的形成, 这些都是 DR 的典型特征^[31]。因此, VEGF 和 HIF-1 在 DR 的发生中起着关键作用, 它们的表达升高不仅是 DR 发展的驱动因素, 也是当前 DR 治疗的主要靶点^[32]。本研究结果显示, SAL-LIPS 对 HG 环境下的 ARPE-19 细胞氧化损伤模型具有显著的保护作用, 同时降低了 ROS 的水平和 MDA 含量, 有效下调了 VEGF 和 HIF-1 α 的表达。这些结果表明 SAL-LIPS 在 ARPE-19 细胞氧化损伤中具有抗氧化作用, 为 SAL 在 DR 治疗领域的应用提供了新的研究思路和实验依据。

参考文献

[1] Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy [J]. Lancet, 2010, 376 (9): 124-136.

- [2] 万光明, 薛榕. 从视网膜氧化应激与微血管改变谈糖尿病视网膜病变的发病机制和防治策略[J]. 眼科新进展, 2022, 42 (7): 505-509.
- [3] Chiu CC, Cheng KC, Lin YH, et al. Prolonged exposure to high glucose induces premature senescence through oxidative stress and autophagy in retinal pigment epithelial cells [J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2023, 71 (1): 21-31.
- [4] Li YN, Lian HW, Zhang CL, et al. Ophthalmic solution of smart supramolecular peptides to capture semaphorin 4D against diabetic retinopathy [J]. Sci Adv, 2023, 10 (3): 136-142.
- [5] Oh S, Kim YJ, Lee EK, et al. Antioxidative effects of ascorbic acid and astaxanthin on ARPE-19 cells in an oxidative stress model [J]. Antioxidants (Basel), 2020, 9 (9): 833.
- [6] Chen J, Li LH, Zhou Y, et al. Gambogic acid ameliorates high glucose and palmitic acid-induced inflammatory response in ARPE-19 cells via activating Nrf2 signaling pathway: ex vivo [J]. Cell Stress Chaperones, 2021, 26 (2): 367-375.
- [7] Mannermaa E, Reinisalo M, Ranta VP, et al. Filter-cultured ARPE-19 cells as outer blood-retinal barrier model [J]. Eur J Pharm Sci, 2010, 40 (4): 289-296.
- [8] Li M, Tian MM, Jiang XL, et al. Inhibition of galectin-3 ameliorates high-glucose-induced oxidative stress and inflammation in ARPE-19 cells [J]. Cutan Ocul Toxicol, 2022, 41 (2): 179-186.
- [9] Bardak H, Uğuz AC, Bardak Y, et al. Selenium protects ARPE-19 and ACBRI 181 cells against high glucose-induced oxidative stress [J]. Molecules, 2023, 28 (16): 59-61.
- [10] Zhang XM, Xie L, Long JY, et al. Salidroside: a review of its recent advances in synthetic pathways and pharmacological properties [J]. Chem Biol Interact, 2021, 339: 109268.
- [11] 余琴, 刘迅, 邢莎莎, 等. 红景天苷在疾病中的作用及机制研究进展 [J]. 中国药师, 2020, 23 (3): 526-529.
- [12] Cheng CC, Wang YH, Sun RY, et al. Salidroside protects against caerulein with the LPS-induced severe acute pancreatitis through suppression of oxidative stress and inflammation in mice [J]. J Funct Foods, 2022, 96 (8): 105179.
- [13] Ding SY, Wang MT, Dai DF, et al. Salidroside induces apoptosis and triggers endoplasmic reticulum stress in human hepatocellular carcinoma [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 527 (4): 1057-1063.
- [14] Zhu LP, Wei TT, Gao J, et al. Salidroside attenuates lipopolysaccharide (LPS) induced serum cytokines and depressive-like behavior in mice [J]. Neurosci Lett, 2015, 606: 1-6.
- [15] Feng TS, Wang L, Zhou NB, et al. Salidroside, a scavenger of ROS, enhances the radioprotective effect of Ex-RAD® via a p53-dependent apoptotic pathway [J]. Oncol Rep, 2017, 8 (5): 3094-3102.
- [16] 李慧, 孙乐栋. 红景天苷抗衰老和抗氧化药理机制研究新进展 [J]. 中国医药导报, 2018, 15 (7): 51-54.
- [17] Zhang BX, Wang YT, Li HY, et al. Neuroprotective effects of salidroside through PI3K/Akt pathway activation in Alzheimer's disease models [J]. Drug Des Devel Ther, 2016, 10: 1335-1343.
- [18] 张佑靖, 杨明. 红景天苷通过激活 PI3K/AKT 通路抑制氧化应激和免疫炎症反应减轻糖尿病大鼠视网膜病变 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2023, 39 (5): 404-409.
- [19] 周争光, 周勇, 常振宇. 红景天苷靶向 VEGF/HIF-1 α 信号通路调控缺氧介导的大鼠肺动脉高压 [J]. 广西医学, 2021, 43 (23): 2834-2837.
- [20] Liang CX, Qi DL, Zhang LN, et al. Preparation and evaluation of a water-in-oil nanoemulsion drug delivery system loaded with salidroside [J]. Chin J Nat Med, 2021, 19 (3): 231-240.
- [21] 顾华芳, 徐歌, 朱柯武, 等. 脂质体主动载药技术研究进展 [J]. 中国药剂学杂志, 2021, 19 (6): 173-185.
- [22] Bunker A, Magarkar A, Viitala T. Rational design of liposomal drug delivery systems, a review: combined experimental and computational studies of lipid membranes, liposomes and their PEGylation [J]. BBA-Biomembranes, 2016, 1858 (10): 2334-2352.
- [23] Abu LA, Ishida T. Liposomal delivery systems: design optimization and current applications [J]. Biol Pharm Bull, 2017, 40 (1): 1-10.
- [24] Li MY, Du CY, Guo N, et al. Composition design and medical application of liposomes [J]. Eur J Med Chem, 2019, 164 (2): 640-653.
- [25] 肖卫红, 徐蕾, 杨爱霞. 乙醇注入法制备高乌甲素脂质体凝胶的工艺研究 [J]. 中国药师, 2018, 21 (12): 2140-2144.
- [26] 常大伟, 闫瑾, 雷琦, 等. 乙醇注入法制备肉桂醛脂质体的工艺优化 [J]. 食品与机械, 2022, 38 (2): 190-196.
- [27] 冯闯, 左中夫, 刘文强, 等. 红景天苷对糖尿病早期大鼠视网膜 Müller 细胞的保护作用 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2020, 26 (5): 609-612.
- [28] Liu P, Chen GL, Zhang JC. A review of liposomes as a drug delivery system: current status of approved products, regulatory environments, and future perspectives [J]. Molecules, 2022, 27 (4): 1372.
- [29] Zha XX, Wu GS, Zhao XP, et al. PRDX6 protects ARPE-19 cells from oxidative damage via PI3K/AKT signaling [J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 36 (6): 27-28.
- [30] 胡晗, 王晓琴, 聂浩. 黄芪含药血清对氯化钴诱导 ARPE-19 细胞缺氧损伤的保护作用 [J]. 国际眼科杂志, 2022, 22 (6): 899-903.
- [31] Du SS, Wang S, Wu Q, et al. Decorin inhibits angiogenic potential of choroid-retinal endothelial cells by downregulating hypoxia-induced Met, Rac1, HIF-1 α and VEGF expression in cocultured retinal pigment epithelial cells [J]. Exp Eye Res, 2013, 116: 151-160.
- [32] Cui JY, Gong R, Hu SQ, et al. Gambogic acid ameliorates diabetes-induced proliferative retinopathy through inhibition of the HIF-1 α /VEGF expression via targeting PI3K/AKT pathway [J]. Life Sci, 2018, 192: 293-303.

(收稿日期: 2023-12-30; 修回日期: 2024-02-24)

基于代谢组学的五味子贮藏后挥发性成分变化研究

鲁瑶¹, 宋奇¹, 杨迪¹, 刘宝峰², 邸学¹, 李思雨¹, 王添敏^{1*} (1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600; 2. 中国科学院长春应用化学研究所, 国家电化学和光谱研究分析中心, 长春 130022)

摘要: **目的** 明确新产与陈储五味子中挥发性成分的差异。**方法** 应用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用技术(HS-SPME-GC-MS)分析3个不同产地的新产、陈储五味子中挥发性成分,结合标准谱图库检索对其挥发性成分进行鉴定,并结合层次聚类分析(HCA),应用主成分分析(PCA)、正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)筛选新、陈五味子中的挥发性差异代谢物。**结果** 检测到五味子中挥发性成分共计165个,鉴定出81种挥发性成分,包括倍半萜类、单萜类、脂肪烃类、芳香醚类、脂肪酮类、脂肪酸类、酯类、脂肪醛类以及芳香醛类。新产与陈储五味子中共筛选出22个差异代谢物,鉴定了18个差异代谢物的结构,其中单萜类成分13个,脂肪醛、烷烃、脂肪酸、芳香醛、芳香醚类成分各1个;18个差异成分在新产五味子中含量较高,乙酸、3-糠醛、壬醛及十二烷4个差异成分在陈储五味子中含量显著升高。通过22个挥发性差异成分能够区分各产地新、陈五味子样品。**结论** 本研究全面地分析了五味子中的挥发性成分,明确了五味子贮藏后挥发性成分的变化,可为基于挥发性成分的五味子质量评价及有效成分研究提供依据。

关键词: 五味子; 挥发油; 贮藏; HS-SPME-GC-MS; 差异代谢物

中图分类号: R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)06-1441-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.008

Volatile metabolomics of *Schisandra chinensis* before and after the storage

LU Yao¹, SONG Qi¹, YANG Di¹, LIU Bao-feng², DI Xue¹, LI Si-yu¹, WANG Tian-min^{1*} (1. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian Liaoning 116600; 2. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Chemistry and Mass Spectrometry, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022)

Abstract: Objective To clarify the difference of volatile components between newly produced and stored *Schisandra chinensis*. **Methods** Head space-solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS) was used to determine the volatile components in newly produced and stored *Schisandra chinensis* from three origins, and the volatile components were identified by matching the mass spectra with the standard spectra database. The differential metabolites between newly produced and stored *Schisandra chinensis* were screened by hierarchical cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). **Results** Totally 165 volatile components were detected in *Schisandra chinensis*, and 81 volatile components were identified, including sesquiterpenoids, monoterpenoids, aliphatic hydrocarbons, aromatic ethers, aliphatic ketones, fatty acids, esters, aliphatic aldehydes and aromatic aldehydes. Totally 22 differential metabolites between newly produced and stored *Schisandra chinensis* were screened out. The structure of 18 differential metabolites, including 13 monoterpenoids, 1 aliphatic aldehyde, 1 alkane, 1 fatty acid, 1 aromatic aldehyde and 1 aromatic ether, were identified. While 18 out of the 22 differential metabolites had a high content in newly produced *Schisandra chinensis*, the other 4 differential metabolites (acetic acid,

基金项目: 辽宁省自然科学基金项目(No.2019-MS-223); 国家自然科学基金项目(No.81703658)。

作者简介: 鲁瑶,女,硕士研究生,主要从事中药品质评价与药效物质基础研究, email: 18841019915@163.com *通信作者: 王添敏,女,教授,主要从事中药品质评价与药效物质基础研究, email: wang_tm@163.com

3-furfural, nonanal and dodecane), had a high content in stored *Schisandra chinensis*. Newly produced and stored *Schisandra chinensis* were differentiated through the 22 metabolites. **Conclusion** The volatile components of *Schisandra chinensis* are clarified the changes in volatile components after the storage, providing useful information for the quality evaluation and active ingredient research of *Schisandra chinensis*.

Key words: *Schisandra chinensis*; volatile oil; storage; HS-SPME-GC-MS; differential metabolite

五味子为常用大宗药材, 主要分布于东北地区^[1], 具有收敛固涩、益气生津、补肾宁心之功效, 常用于久咳虚喘、津伤口渴、心悸失眠等^[2]。五味子中含有木脂素、有机酸、黄酮、花色苷及挥发油等生物活性成分^[3-4], 其中木脂素对肝脏损伤具有很好的保护作用^[5], 因此, 五味子及其提取物也常被用作保健食品^[6]。

五味子来源于木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实, 于果实成熟时采收^[2]。贮存过程中, 其外观颜色由紫红色逐渐变为黑红色^[7-8], 品质发生变化。有学者研究发现影响五味子质量的关键贮藏因素是湿度^[7-9], 其次是温度, 聚乙烯密封袋包装在 5~10℃ 下阴凉存贮的五味子质量较好^[9]; 果实颜色的变化不会影响主要木脂素类成分的含量^[7], 但随着颜色的加深, 5-羟甲基糠醛的含量随之升高^[10]。除颜色变化外, 五味子贮存后原有的香气逐渐变淡。香气主要由挥发性成分产生, 五味子中含约 1% 的挥发油^[10], 其挥发油具有抗氧化、抗菌^[11-12]、抗过敏性哮喘^[13]等生物活性。对五味子挥发性成分的分析表明, 不同提取方法得到的挥发性成分有一定的差异^[14-16], 炮制后挥发油中成分的种类和含量会发生变化^[16], 但未见文献报道贮存后五味子中挥发性成分的变化。

顶空固相微萃取 (headspace solid-phase microextraction, HS-SPME) 结合气相色谱-质谱技术 (gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS) 具有快速、灵敏、重复性好等优点, 已广泛应用于中药和食品中挥发性成分的分析 and 代谢组学研究^[17-19]。因此, 本文采用 HS-SPME-GC-MS 对不同产地新产和陈储五味子中的挥发性成分进行分析, 采用代谢组学研究方法比较新、陈五味子中的差异成分, 现报道如下。

1 仪器与材料

1.1 仪器

JA21002 万分之一电子分析天平 (上海舜宇恒平科学仪器有限公司); SMF2002 型苏泊尔磨粉机 (浙江苏泊尔家居用品有限公司); 5975 型气相色谱-质谱联用仪 (美国安捷伦公司); 手

动固相微萃取 SPME 进样器; 二乙烯基苯/碳分子筛/聚二甲基硅氧烷 (DVB/CAR/PDMS) 萃取头; Agilent 19091 J-416 HP-5MS (60 m×0.32 mm, 0.25 μm) 毛细管色谱柱。

1.2 材料

五味子样品于 2019 年 11 月购自吉林省白山市 (JL1)、吉林省白山市抚松县 (JL2) 及黑龙江省尚志市 (HLJ), 新鲜药材于 50℃ 烘房烘干。各样品经辽宁中医药大学中药鉴定教研室王添敏教授鉴定为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实。正构烷烃 C₅~C₃₀ (Supelco, USA)。

2 方法

2.1 样品分组及前处理

各产地的五味子样品均平分成两份, 一份于 -20℃ 冷冻密封储存, 作为新产样品组 (N); 另一份于室温密封储存, 作为陈储样品组 (O)。每一产地新产和陈储药材均分为 4 个生物学重复, 共得到 24 份五味子样品。新产和陈储样品均外置变色硅胶, 密封于聚乙烯密封袋中, 储存过程中更换变色硅胶以保持密封袋内干燥。

2.2 HS-SPME 条件

参考文献^[20-21]方法建立 HS-SPME 条件, 即取五味子粉末 1.0 g, 精密称定, 置于顶空瓶中, 密封, 60℃ 顶空萃取吸附 40 min, 随后将萃取头迅速插入气相色谱仪进样口, 250℃ 加热解吸附 60 s, 进行 GC-MS 分析。

2.3 GC-MS 条件

2.3.1 色谱条件 Agilent 19091 J-416 HP-5MS 毛细管色谱柱 (60 m×0.32 mm, 0.25 μm); 程序升温: 起始温度控制在 60℃, 维持 3 min 后以 10℃·min⁻¹ 升至 100℃, 再以 5℃·min⁻¹ 升至 200℃, 最后以 10℃·min⁻¹ 升至 280℃, 保持 8 min; 载气为高纯度氦气, 流速 1.0 mL·min⁻¹; 进样口温度 250℃; 分流进样, 分流比 5:1; 总分析时长 43 min。

2.3.2 质谱条件 离子源为电子轰击 (EI) 离子源; 离子源温度 230℃; 电子轰击电压 70 eV; 四极杆温度 150℃; 倍增器电压 1576.5 V; 发射电流 34.610 μA; 全扫描模式: 质量扫描范围 *m/z*

20.0 ~ 550.0 Da。

2.4 数据处理

由 GC-MS 分析得挥发性成分总离子流色谱图，通过 Agilent MassHunter 软件 (B.08.00) 对 24 份新、陈五味子样品的色谱峰进行对齐和积分，检出的各色谱峰按峰面积归一化法确定其相对含量。将各色谱峰的质谱数据同 NIST (MS Search 2.0) 标准谱库中的质谱数据进行匹配，筛选出匹配度大于 80% 的化合物，并计算其保留指数 (RI)^[22]，结合文献 RI 值辅助定性鉴别各化合物。应用 SPSS 25.0 进行单因素方差分析 (ANOVA) 和 *t* 检验，同时运用 MetaboAnalyst (6.0) 在线分析软件进行主成分分析 (PCA)、层次聚类分析 (HCA) 及正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA)，数据采用 Pareto 方法归一化处理，以代谢物对新、陈五味子分组贡献值 $VIP \geq 1.2$ 及组间差异的统计学指标 $P < 0.05$ 为标准，进行新、陈五味子挥发性差异代谢物的筛选。应用 Origin 2022 绘制聚类热图。

3 结果

3.1 挥发性成分分析

应用 HS-SPME-GC-MS 方法对新、陈五味子样品中挥发性成分进行分析，JL1 新、陈五味子样品中挥发性成分的总离子流图见图 1。

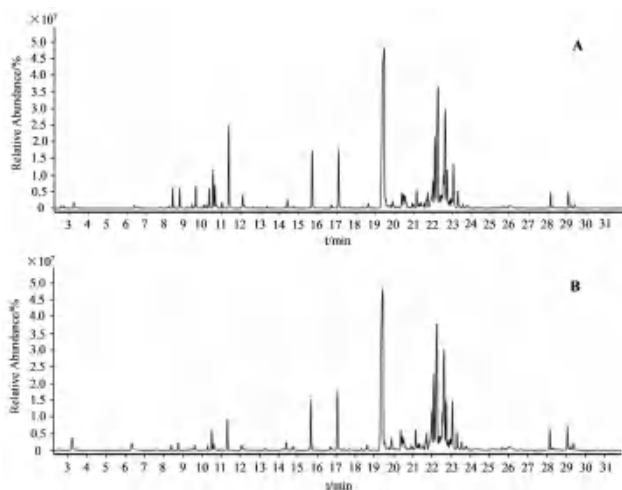


图 1 JL1 新 (A)、陈 (B) 五味子挥发性成分总离子流图
Fig 1 Total ion chromatograms of the volatile oil of newly produced (A) and stored (B) *Schisandra chinensis* samples collected from JL1

结果显示，在五味子样品中共检测到 165 个色谱峰，新、陈五味子样品中的色谱峰数量没有差异。部分色谱峰的峰面积较小，易受其他因素影响而较不稳定，故在对比新、陈五味子差异时排除此类色谱峰，保留峰面积大于 12 000 的色谱峰共 107 个。通过质谱匹配度结合保留指数辅助定性分析，共鉴定出 81 个化合物，结果见表 1。

81 个化合物的结构共可分为 13 类，包括倍半萜类 34 个、单萜类 18 个、倍半萜醇类 6 个、脂肪烃类 5 个、倍半萜酯类 4 个、倍半萜醛类 3 个、芳香醚类 3 个、脂肪酮类 2 个、脂肪酸类 2 个、脂肪醇酯类 1 个、脂肪醛类 1 个、芳香醛类 1 个以及单萜醇类 1 个。JL1 收集的新产五味子样品中，已鉴别色谱峰的面积占有所有色谱峰面积的 90.95%。面积百分比在 4% 以上的化合物有 5 个，分别为依兰烯 (24.183%)、意大利烯 (11.248%)、 α - 卍卜任烯 (8.029%)、 β - 花柏烯 (4.820%)、 γ - 松油烯 (4.445%)。

3.2 新、陈五味子中挥发性差异代谢物的筛选

3.2.1 不同产地五味子样品的差异 本文收集了东北 3 个产地五味子样品，鉴别的 81 个成分峰面积在各产地生物学重复之间的 RSD 平均值为 16.7%，符合植株的个体差异。不同产地五味子中挥发性成分含量也可能具有差异，因此在分析新、陈五味子中差异代谢物前，首先对不同产地样品的差异进行了分析。应用 Metaboanalyst 在线分析软件对 3 个产地新产五味子样品中的 107 个挥发性成分进行 PCA 和 HCA 分析。PCA 结果显示 2 个主成分方差贡献率之和为 81.4%，模型可靠，3 个产地五味子样品在 PCA 得分图中具有分离趋势 (见图 2A)。在 HCA 图中 3 个产地均各自聚为一类，吉林省 2 个产地间距离较近 (见图 2B)。

以上结果证明 3 个产地五味子样品挥发性成分有所不同，因此将 3 个产地单独进行分析，最终取各产地差异代谢物的交集。

3.2.2 新、陈五味子差异代谢物筛选 与 PCA 的无监督模式不同，OPLS-DA 分析是一种有监督的判别分析统计方法，其结果参数 R^2 、 Q^2 越接近 1，证明模型解释与预测能力越好。结果表明各产地新、陈样品均明显不同，以 JL1 样品为例说明 PCA 和 OPLS-DA 分析结果。PCA 结果显示 2 个主成分的贡献率之和为 96.3%，新、陈两组明显分离 (见图 3A)；在 OPLS-DA 分析中， R^2Y 、 Q^2 分别为 0.827、0.751，1000 次置换检验的 R^2Y 、 Q^2 分别为 0.999、0.977， $P = 0.027$ ，说明模型稳定可靠，新、陈样品明显分为两类 (见图 3B)。

对比 107 个色谱峰及其峰面积发现，新、陈样品中挥发性成分种类相同，但各成分含量有所不同。两组样品中 45 个色谱峰的峰面积差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，新 / 陈峰面积的变化倍率范围为 0.3 ~ 26.4，38 个色谱峰在陈五味子中的峰面积变小，说明成分含量降低；7 个色谱峰在陈五味子中的峰面积增大，说明成分含量升高。以 OPLS-DA 中 $VIP \geq 1.2$ 、*t* 检验 $P < 0.05$

表 1 新、陈五味子挥发性成分鉴别结果及相对百分含量

Tab 1 Identification and the relative content of volatile components in newly produced and stored *Schisandra chinensis* samples

t_R /min	鉴别结果	RI	分子式	CAS	匹配度 /%	吉林省白山市平均		化合物类别
						百分含量 /%		
						新产	陈储	
3.253	乙酸	557	C ₂ H ₄ O ₂	64-19-7	98	0.412	1.244	脂肪酸
6.389	3-糠醛	840	C ₅ H ₄ O ₂	498-60-2	98	0.353	0.801	芳香醛
7.760	(Z)-2-甲基-2-丁烯酸	918	C ₅ H ₈ O ₂	565-63-9	95	0.102	0.066	脂肪酸
8.171	1, 7, 7-三甲基三环 [2.2.1.0 (2, 6)]庚烷	938	C ₁₀ H ₁₆	508-32-7	98	0.079	0.022	单萜
8.231	3-崖柏烯	941	C ₁₀ H ₁₆	2867-05-2	97	0.124	0.017	单萜
8.419	α -蒎烯	951	C ₁₀ H ₁₆	80-56-8	98	1.242	0.285	单萜
8.787	(-)-蒎烯	969	C ₁₀ H ₁₆	79-92-5	99	1.270	0.451	单萜
9.319	β -香桉烯	995	C ₁₀ H ₁₆	3387-41-5	98	0.024	0.022	单萜
9.434	(-)- β -蒎烯	1001	C ₁₀ H ₁₆	18172-67-3	97	0.282	0.125	单萜
9.555	6-甲基-5-庚烯-2-酮	1006	C ₉ H ₁₄ O	110-93-0	91	0.101	0.067	脂肪酮
9.627	β -月桂烯	1010	C ₁₀ H ₁₆	123-35-3	97	1.098	0.373	单萜
10.044	(-)- α -水芹烯	1028	C ₁₀ H ₁₆	99-83-2	97	0.171	0.045	单萜
10.183	3-降萜烯	1035	C ₁₀ H ₁₆	13466-78-9	98	0.179	0.052	单萜
10.527	<i>p</i> -伞花烃	1050	C ₁₀ H ₁₄	99-87-6	99	1.824	1.246	单萜
10.624	(R)-(+) - 柠檬烯	1055	C ₁₀ H ₁₆	5989-27-5	97	1.249	0.472	单萜
10.993	β -罗勒烯	1071	C ₁₀ H ₁₆	13877-91-3	97	0.261	0.091	单萜
11.349	γ -松油烯	1087	C ₁₀ H ₁₆	99-85-4	99	4.445	1.873	单萜
12.074	(+) -4-萜烯	1119	C ₁₀ H ₁₆	29050-33-7	96	0.697	0.341	单萜
12.134	1-甲基-3-(1-甲基乙烯基)苯	1121	C ₁₀ H ₁₂	1124-20-5	97	0.143	0.147	单萜
12.382	壬醛	1132	C ₉ H ₁₈ O	124-19-6	86	0.018	0.037	脂肪醛
12.642	(E)-4, 8-二甲基-1, 3, 7-壬三烯	1143	C ₁₁ H ₁₈	19945-61-0	95	0.073	0.045	脂肪烃
13.343	十甲基环戊硅氧烷	1172	C ₁₀ H ₃₀ O ₅ Si ₅	541-02-6	95	0.104	0.107	脂肪烃
14.255	2-茨醇	1211	C ₁₀ H ₁₈ O	507-70-0	97	0.074	0.194	双环单萜醇
14.406	4-松油醇	1217	C ₁₀ H ₁₈ O	562-74-3	99	0.448	0.571	单萜
14.648	十二烷	1227	C ₁₂ H ₂₆	112-40-3	81	0.016	0.069	脂肪烃
14.751	L- α -松油醇	1231	C ₁₀ H ₁₈ O	10482-56-1	97	0.140	0.263	单萜
15.554	2-异丙基-4-甲基-苯甲醚	1264	C ₁₁ H ₁₆ O	31574-44-4	82	0.063	0.062	芳香醚
15.693	2-异丙基-5-甲基-苯甲醚	1270	C ₁₁ H ₁₆ O	1076-56-8	98	2.670	3.066	芳香醚
16.104	乙酸芳樟酯	1287	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	115-95-7	95	0.029	0.029	倍半萜酯
16.708	(Z)-6-十一烯-2-酮	1311	C ₁₁ H ₂₀ O	107853-70-3	94	0.186	0.205	脂肪酮
16.799	1, 4-二甲醇-反式-环己烷-二乙酸酯	1315	C ₁₂ H ₂₀ O ₄	10412-78-9	83	0.077	0.084	脂肪醇酯
17.077	(-)-乙酸龙脑酯	1327	C ₁₃ H ₂₀ O ₂	5655-61-8	97	3.186	3.889	倍半萜酯
17.216	十三烷	1332	C ₁₃ H ₂₈	629-50-5	85	0.014	0.019	脂肪烃
17.379	γ -松油醇	1339	C ₁₀ H ₁₈ O	586-81-2	84	0.061	0.089	单萜
17.687	十二甲基环己硅氧烷	1352	C ₁₂ H ₃₆ O ₆ Si ₆	540-97-6	94	0.080	0.098	脂肪烃
18.321	δ -榄香烯	1377	C ₁₅ H ₂₄	20307-84-0	94	0.085	0.094	倍半萜
18.563	乙酸香茅酯	1387	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	150-84-5	99	0.101	0.068	倍半萜酯
18.624	α -乙酸松油醇酯	1390	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	80-26-2	94	0.278	0.306	倍半萜酯
19.457	依兰烯	1424	C ₁₅ H ₂₄	14912-44-8	98	24.183	26.194	倍半萜
19.790	(-)- β -波旁烯	1438	C ₁₅ H ₂₄	5208-59-3	99	0.128	0.141	倍半萜
19.892	(+)-苜蓿烯	1443	C ₁₅ H ₂₄	3650-28-0	98	0.591	0.969	倍半萜
20.086	(-)-1, 4 (15), 11-三烯-桉叶烷	1451	C ₁₅ H ₂₂	212394-95-1	87	0.112	0.067	倍半萜
20.128	α -古芸烯	1452	C ₁₅ H ₂₄	489-40-7	95	0.101	0.088	倍半萜
20.382	2, 5-二甲氧基- <i>p</i> -伞花烃	1463	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	14753-08-3	97	0.819	1.006	芳香醚
20.460	(E)- β -愈创木烯	1466	C ₁₅ H ₂₄	88-84-6	95	1.078	1.025	倍半萜
20.545	<i>trans</i> - β -古巴烯	1470	C ₁₅ H ₂₄	20479-06-5	81	0.670	0.580	倍半萜
20.605	石竹烯	1472	C ₁₅ H ₂₄	87-44-5	87	0.311	0.334	倍半萜
20.714	α -长叶蒎烯	1477	C ₁₅ H ₂₄	5989-08-2	92	0.054	0.070	倍半萜
20.793	β -古巴烯	1480	C ₁₅ H ₂₄	18252-44-3	96	0.056	0.077	倍半萜
20.926	<i>cis</i> -罗汉柏烯	1486	C ₁₅ H ₂₄	470-40-6	99	0.257	0.260	倍半萜
20.998	γ -菖蒲二烯	1489	C ₁₅ H ₂₄	28400-12-6	88	0.175	0.184	倍半萜
21.155	<i>cis</i> - β -法尼烯	1495	C ₁₅ H ₂₄	28973-97-9	98	1.146	1.152	倍半萜
21.288	α -芹子烯	1501	C ₁₅ H ₂₄	473-13-2	96	0.244	0.381	倍半萜
21.373	(+)- α -雪松烯	1505	C ₁₅ H ₂₄	3853-83-6	98	0.323	0.342	倍半萜
21.409	葎草烯	1506	C ₁₅ H ₂₄	6753-98-6	88	0.203	0.193	倍半萜

续表 1

t_R /min	鉴别结果	RI	分子式	CAS	匹配度 /%	吉林省白山市平均		化合物类别
						百分含量 /%		
						新产	陈储	
21.548	(1 <i>S</i> , 4 <i>S</i> , 4 <i>aS</i>)-1-异丙基-4, 7-二甲基-1, 2, 3, 4, 4 <i>a</i> , 5-六氢萘	1512	C ₁₅ H ₂₄	267665-20-3	91	0.292	0.256	倍半萜
21.669	(1 <i>R</i> , 4 <i>R</i> , 5 <i>S</i>)- α -菖蒲二烯	1517	C ₁₅ H ₂₄	729602-94-2	96	0.424	0.431	倍半萜
21.723	β -菖蒲二烯	1520	C ₁₅ H ₂₄	28477-64-7	97	0.940	0.886	倍半萜
21.862	(+)-异-意大利烯	1526	C ₁₅ H ₂₄	94482-89-0	96	0.311	0.483	倍半萜
22.001	(-)- α -依兰油烯	1532	C ₁₅ H ₂₄	10208-80-7	98	2.320	2.765	倍半萜
22.110	β -花柏烯	1536	C ₁₅ H ₂₄	18431-82-8	95	4.820	5.034	倍半萜
22.261	意大利烯	1543	C ₁₅ H ₂₄	94535-52-1	97	11.248	11.766	倍半萜
22.394	γ -依兰油烯	1549	C ₁₅ H ₂₄	30021-74-0	96	0.764	1.064	倍半萜
22.551	(-)- β -红没药烯	1556	C ₁₅ H ₂₄	495-61-4	96	1.700	1.629	倍半萜
22.641	α -卍卜任烯	1559	C ₁₅ H ₂₄	29621-78-1	99	8.029	8.244	倍半萜
22.744	(<i>R</i>)-花侧柏烯	1564	C ₁₅ H ₂₂	16982-00-6	85	2.398	2.931	倍半萜
22.847	γ -杜松烯	1568	C ₁₅ H ₂₄	39029-41-9	92	0.489	0.471	倍半萜
22.931	β -倍半水芹烯	1572	C ₁₅ H ₂₄	20307-83-9	97	0.588	0.504	倍半萜
22.992	β -杜松烯	1575	C ₁₅ H ₂₄	523-47-7	92	0.536	0.556	倍半萜
23.306	β -雪松烯	1588	C ₁₅ H ₂₄	1461-03-6	97	1.055	0.969	倍半萜
23.385	α -杜松烯	1592	C ₁₅ H ₂₄	24406-05-1	83	0.162	0.185	倍半萜
23.554	β -白菖考烯	1599	C ₁₅ H ₂₀	50277-34-4	90	0.262	0.425	倍半萜
23.759	<i>E</i> -橙花叔醇	1608	C ₁₅ H ₂₆ O	40716-66-3	97	0.156	0.200	倍半萜醇
24.273	表-葑澄茄醇	1631	C ₁₅ H ₂₆ O	38230-60-3	83	0.100	0.107	倍半萜醇
24.484	(-)-斯巴醇	1641	C ₁₅ H ₂₄ O	77171-55-2	87	0.032	0.030	倍半萜醇
25.662	表- α -葑澄茄醇	1694	C ₁₅ H ₂₆ O	19912-67-5	94	0.154	0.206	倍半萜醇
25.983	依兰醇	1709	C ₁₅ H ₂₄ O	41610-69-9	97	0.471	0.409	倍半萜醇
28.152	β -古巴烯-4 α -醇	1815	C ₁₅ H ₂₄ O	124753-76-0	93	0.961	1.008	倍半萜醇
28.303	1-甲基-4-异丙烯基-螺-[4.5]-癸-7-烯-8-甲醛	1823	C ₁₅ H ₂₂ O	352457-39-7	92	0.135	0.131	倍半萜醛
28.399	(+)-cuparenal	1829	C ₁₅ H ₂₀ O	16982-01-7	95	0.046	0.095	倍半萜醛
29.396	依兰醛	1886	C ₁₅ H ₂₂ O	41610-68-8	90	0.345	0.427	倍半萜醛

为标准筛选差异代谢物, JL1 中新、陈样品的挥发性差异代谢物有 36 个(见表 2), 差异代谢物的 VIP 值及其在两组样品中的含量差异如图 4 所示, 大部分差异代谢物(30 个)在新产五味子样品中较高, 仍有部分差异代谢物(6 个)在陈储五味子样品中较高, 差异代谢物的变化倍率分别在 1.2 ~ 26.4 以及 0.3 ~ 0.7, 提示差异代谢物的筛选可靠。

按照同样方法, 得到 JL2 新、陈样品的挥发性差异代谢物有 28 个, 其中新产五味子中含量高的 22 个, 陈储五味子中含量高的 6 个; HLJ 两组样品的挥发性差异代谢物 38 个, 其中新产五味子中含量高的 30 个, 陈储五味子中含量高的 8 个。3 个产地共有的差异代谢物 22 个, 其中 18 个化合物含量在新产五味子中较高, 4 个化合物含量在陈储五味子中较高。鉴别了 22 个差异代谢物中 18 个化合物的结构, 其中单萜类成分 13 个, 还有脂肪醛、烷烃、脂肪酸、芳香醛、芳香醚类成分各 1 个。在陈储五味子中含量升高的 4 个成分为乙酸、3-糠醛、壬醛和十二烷。

3.3 差异代谢物的验证

为了验证 22 个差异代谢物是否能区别新、

陈五味子样品, 将 3 个产地 24 份样品合并, 分为新、陈五味子两组进行 PCA 和 OPLS-DA 分析, 22 个挥发性差异代谢物的 PCA 得分图(见图 5A)显示 2 个主成分的贡献率达 96.8%, 新、陈五味子能明显分离; OPLS-DA 模型的 R^2Y 、 Q^2 分别为 0.942、0.938, 1000 次置换检验的 R^2Y 、 Q^2 分别为 0.992、0.983, $P < 0.001$, 说明该模型能够很好地区分新、陈五味子样品(见图 5B)。基于新、陈五味子样品中 22 个差异代谢物峰面积的聚类热图也表明, 各差异代谢物在两组样品中含量显著不同, 通过差异代谢物能区分新、陈五味子样品, 具有很好的普适性(见图 6)。

4 讨论

4.1 五味子中挥发性成分的鉴别

五味子中的挥发性成分多采用 GC-MS 鉴别, 采用 HS-SPME-GC-MS 鉴别五味子挥发性成分的报道较少^[23]。本文采用 HS-SPME-GC-MS 分析五味子中挥发性成分, 具有快速、节约溶剂等优点, 最终鉴别了五味子中 81 个挥发性成分, 鉴别成分的峰面积占比为 90.95%, 鉴别的成分种类及总量均较高。文献中五味子挥发性成分鉴别的结果不完全一致^[14-16], 包括含量较高的成分也有所不

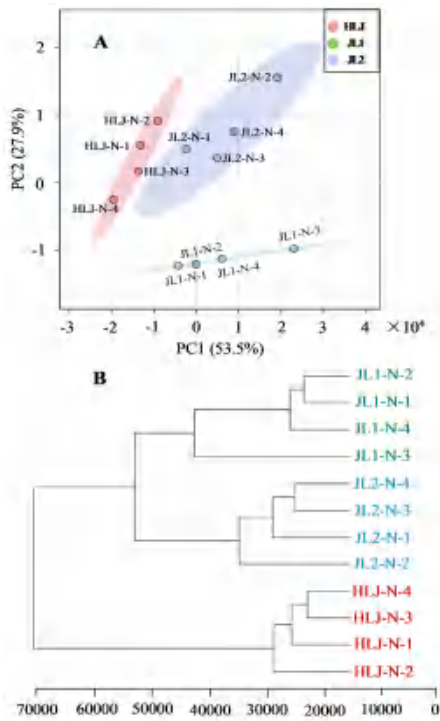


图2 不同产地五味子样品的主成分分析(A)及层次聚类分析(B)
Fig 2 PCA (A) and HCA (B) of *Schisandra chinensis* samples from different origins

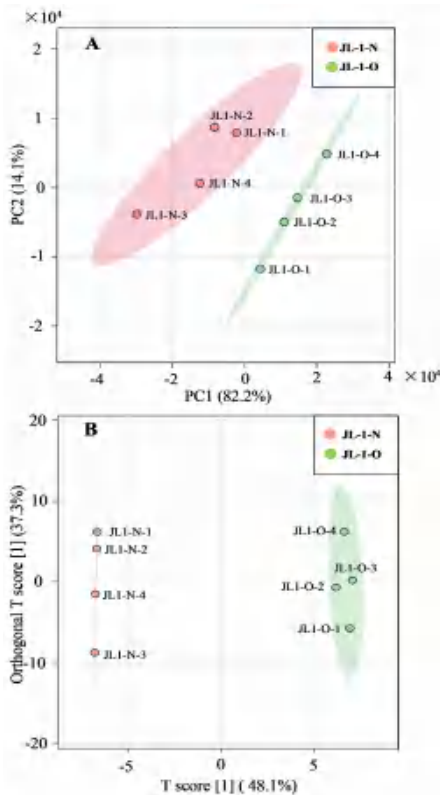


图3 JL1新、陈样品PCA图(A)及OPLS-DA图(B)
Fig 3 PCA (A) and OPLS-DA (B) of newly produced and stored *Schisandra chinensis* samples from JL1

同, 这可能与文献中挥发油的提取方法不同以及产地和采收加工方法不一致有关。本文鉴别结果

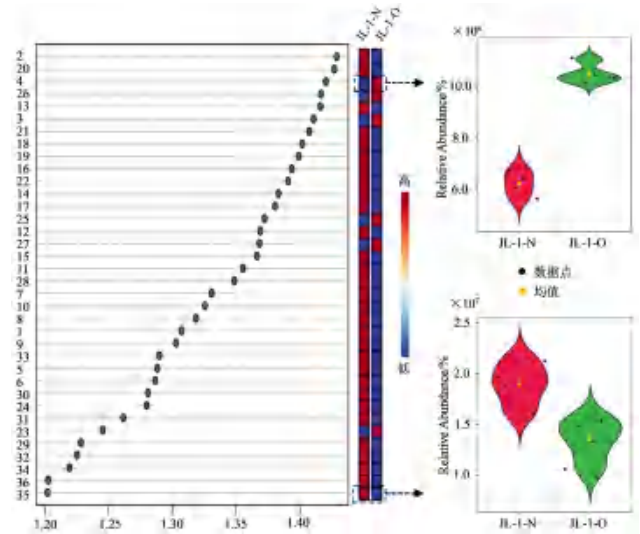


图4 JL1新、陈五味子样品挥发性差异代谢物的VIP值、热图及小提琴图
Fig 4 VIP value, heat map and violin diagrams of differential volatile metabolites between newly produced and stored *Schisandra chinensis* samples from JL1

注: 化合物序号与表2中相同。

Note: The number of compound is same as in table 2.

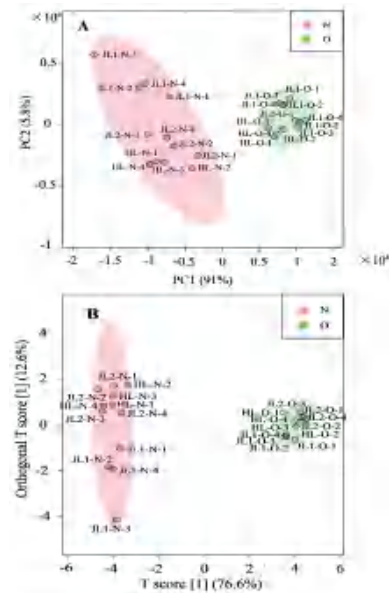


图5 基于22个差异代谢物的新、陈五味子样品PCA(A)及OPLS-DA(B)分析
Fig 5 PCA (A) and OPLS-DA (B) of newly produced and stored *Schisandra chinensis* samples based on 22 differential metabolites

表明五味子中挥发性成分以倍半萜和单萜类成分为主, 含量最高的挥发性成分为依兰烯, 这与宋明杰等^[16, 23]的鉴别结果一致。

4.2 新、陈五味子的差异成分

五味子药材以新产者为佳, 每年秋末产新, 市场上时有久贮五味子销售, 但新、陈五味子化学成分的差异仍不明确。五味子中含有较多挥发性成分, 因其易挥发的特点久贮后含量会降低,

表 2 JL1 新、陈五味子挥发性差异代谢物

Tab 2 Differential volatile metabolites between newly produced and stored *Schisandra chinensis* samples from JL1

No.	t_R /min	鉴别结果	变化倍率 (N/O)	分类
1*	2.58	未鉴别	6.4	—
2*	2.73	未鉴别	26.4	—
3*	3.25	乙酸	0.4	脂肪酸
4*	6.38	3-糠醛	0.6	芳香醛
5	7.76	(Z)-2-甲基-2-丁烯酸	2.1	脂肪酸
6*	8.17	1, 7, 7-三甲基三环 [2.2.1.0 (2, 6)] 庚烷	4.8	单萜
7*	8.23	3-崖柏烯	10.0	单萜
8*	8.41	α -蒎烯	5.8	单萜
9*	8.78	(-)-蒎烯	3.8	单萜
10	9.13	未鉴别	2.6	—
11*	9.43	(-)- β -蒎烯	3.0	单萜
12	9.55	6-甲基-5-庚烯-2-酮	2.0	脂肪酮
13*	9.62	β -月桂烯	3.9	单萜
14*	10.04	(-)- α -水芹烯	5.0	单萜
15*	10.18	3-降薷烯	4.6	单萜
16*	10.32	未鉴别	4.8	—
17*	10.52	<i>p</i> -伞花烃	2.0	单萜
18*	10.62	(<i>R</i>)-(+) -柠檬烯	3.5	单萜
19*	10.72	未鉴别	2.8	—
20*	10.99	β -罗勒烯	3.8	单萜
21*	11.34	γ -松油烯	3.2	单萜
22*	12.07	(+) -4-薷烯	2.7	单萜
23*	12.38	壬醛	0.7	脂肪醛
24	12.64	(<i>E</i>)-4, 8-二甲基-1, 3, 7-壬三烯	2.2	脂肪烃
25	14.25	2-茨醇	0.5	单萜醇
26*	14.64	十二烷	0.3	脂肪烃
27	14.75	L- α -松油醇	0.7	单萜
28*	15.55	2-异丙基-4-甲基-苯甲醚	1.4	芳香醚
29	15.69	2-异丙基-5-甲基-苯甲醚	1.2	芳香醚
30	15.93	未鉴别	1.3	—
31	18.56	乙酸香茅酯	2.0	倍半萜酯
32	18.67	未鉴别	1.3	—
33	19.45	依兰烯	1.2	倍半萜
34	20.08	(-)-1, 4 (15), 11-三烯-桉叶烷	2.2	倍半萜
35	20.46	(<i>E</i>)- β -愈创木烯	1.4	倍半萜
36	20.54	trans- β -古巴烯	1.5	倍半萜

注：“*”为3个产地新、陈五味子的共有差异成分。

Note: “*” represents the common differential metabolites between newly produced and stored *Schisandra chinensis* samples from three origins.

本研究证明了五味子中 18 个挥发性成分在陈储五味子中含量显著降低，通过 GC-MS 鉴别，这些成分主要为易挥发的单萜类成分。同时，陈储五味子中仍有 4 个挥发性成分的含量显著升高，其中 3-糠醛为美拉德反应的中间产物^[24]，陈储五味子颜色变深也提示贮存过程中可能会发生美拉德反应，但仍需进一步研究证明；乙酸的含量在陈储五味子中升高，有文献报道小麦和玉米等农作物的种子中乙酸含量随贮存时间延长而逐渐升高，这与植物材料贮存过程中的好氧稳定性有关^[25]；另外，壬醛和十二烷的含量在陈储五味子中的含量也升高，其原因仍有待进一步研究。五味子的挥发性成分具有抗氧化、抗菌及抗过敏

性哮喘等药理活性^[11-13]，久贮后因其易挥发的特点，其挥发性成分含量降低，含量的变化可能会对其生物活性及品质造成影响。

4.3 不同产地五味子的差异成分

为了明确陈储五味子中挥发性成分的变化，本文于五味子主产区收集了 3 个不同产地的样品，在分析新、陈五味子挥发性成分差异前，比较了不同产地五味子挥发性成分的差异，结果表明不同产地样品间差异明显。但本文收集不同产地的样品数量较少，不足以分析不同产地五味子中挥发性成分的差异。

5 结论

本文全面分析了五味子中的挥发性成分，鉴

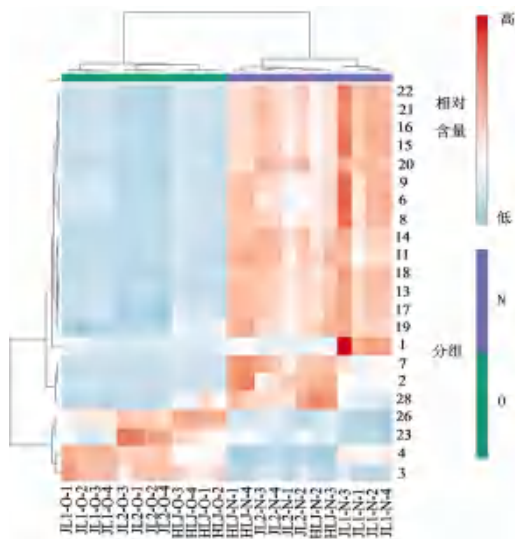


图 6 22 个差异代谢物在 24 组样品中相对含量的热图
Fig 6 Heat map of the relative content of 22 differential metabolites in 24 groups of samples

别了其中 81 个挥发性成分，采用代谢组学方法明确了五味子贮藏后 22 个挥发性成分含量发生变化，鉴别了其中 18 个成分，这些成分含量的变化可能与成分的挥发性以及美拉德反应有关。

参考文献

[1] 解琦, 张群, 谷焯, 等. 北五味子药用价值研究进展[J]. 特种经济动植物, 2020, 23 (3): 25-26.
 [2] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 68.
 [3] 王艳丽, 宁宇, 丁莹. 五味子化学成分、现代药理及临床研究进展[J]. 中医药信息, 2023, 40 (7): 82-85, 90.
 [4] 邢楠楠, 屈怀东, 任伟超, 等. 五味子主要化学成分及现代药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27 (15): 210-218.
 [5] 刘媛媛, 黄仕其, 李玉泽, 等. 五味子属植物木脂素类化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中草药, 2022, 53 (6): 1903-1918.
 [6] 于纯淼, 陈小倩, 廖贤, 等. 五味子药理作用研究进展及在保健食品中的应用[J]. 食品工业, 2022, 43 (11): 221-227.
 [7] 孟祥才, 颜丙鹏, 杨国辉, 等. 不同贮藏条件的五味子的有效成分含量变化的初步研究[J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25 (1): 25-27.
 [8] 中华中医药学会. 中药材商品规格等级五味子[S]. 2018: 2.
 [9] 陈舒好, 石婧婧, 邹立思, 等. 不同贮藏条件对五味子质量的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31 (4): 655-662.
 [10] 吴翠, 高岳瑞, 巢志茂, 等. 五味子中 5-羟甲基糠醛含量

与仓储和色泽的相关性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22 (15): 24-27.
 [11] 黄九林, 刘文文, 韩柯妹, 等. 南北五味子油的成分分析及其生物活性研究[J/OL]. 食品与发酵工业. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.036225>.
 [12] Teng H, Lee WY. Antibacterial and antioxidant activities and chemical compositions of volatile oils extracted from *Schisandra chinensis* Baill. seeds using simultaneous distillation extraction method, and comparison with Soxhlet and microwave-assisted extraction [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2014, 78 (1): 79-85.
 [13] Hui G, Wang X, Yue XY, et al. Impact of volatile oils from processed products of *Schisandra chinensis* fruits on a mouse model of allergic asthma [J]. Pak J Pharm Sci, 2022, 33 (4): 1617-1621.
 [14] 董家潇, 郑巍, 孙亮, 等. 北五味子果实低极性化学成分 GC-MS 分析[J]. 解放军药学学报, 2017, 33 (5): 391-395.
 [15] 刘华, 郭江涛, 王知斌, 等. 五味子挥发油中萜类、芳香族和脂肪族化合物的成分分析[J]. 化学工程师, 2016, 30 (8): 27-29, 32.
 [16] 李晓霞, 刘忠英, 刘舒, 等. 五味子及其炮制品挥发油成分差异研究[J]. 特产研究, 2023, 45 (1): 92-98, 109.
 [17] 张莹, 娄方明, 杨建文, 等. 顶空固相微萃取-气质联用分析黔产圆叶薄荷挥发油[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2022, 54 (6): 44-50.
 [18] 杨天歌, 倪诗婷, 高旭华, 等. HS-GC-MS 法分析醋香附挥发性化学成分[J]. 中南药学, 2021, 19 (5): 865-869.
 [19] Zhou XL, Zhu SY, Wei JN, et al. Volatile metabolomics and chemometric study provide insight into the formation of the characteristic cultivar aroma of *Hemerocallis* [J]. Food Chem, 2023, 404: 134495.
 [20] 叶欣, 卢金清, 曹利, 等. HS-SPME-GC-MS 联用分析醋制南北五味子中挥发性成分[J]. 中国药师, 2016, 19 (7): 1283-1286.
 [21] 吴斌, 黄东梅, 邢文婷, 等. 不同发育期黄金百香果果皮挥发性物质和游离氨基酸成分[J]. 福建农业学报, 2024, 39 (1): 1-9.
 [22] 王凡一, 高如汐, 郑威, 等. HS-GC-MS 结合保留指数法探讨白术麸炒过程中挥发性化学成分的变化规律[J]. 中南药学, 2022, 20 (12): 2877-2886.
 [23] 宋明杰, 滕璇, 刘畅, 等. 基于色谱技术分析不同生长期五味子的物质基础[J]. 中国中药杂志, 2021, 46 (9): 2245-2253.
 [24] 王丹, 况丹妮, 刘若阳, 等. 焦糖化与美拉德反应中 DDMP、HMF 及糠醛的生成研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43 (12): 100-107.
 [25] 洗霖, 杨蒙, 徐凯旋, 等. 贮存时间对小麦和玉米青贮质量的影响[J]. 中国饲料, 2019 (2): 21-24.

(收稿日期: 2024-01-18; 修回日期: 2024-03-20)

新型丙烯酸类 GPR40 激动剂的结构优化及其生物活性研究

郭凯蕾^{1,2}, 魏朝², 张东旭², 张鑫磊², 李琦³, 孙定康¹, 梁佳龙⁴, 马丽莎², 林佳艳², 何金穗¹, 刁春妍², 王斌^{1*}, 刘雪英^{2*} (1. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 空军军医大学药理学系药物化学与药物分析教研室, 西安 710032; 3. 河南大学生命科学学院, 河南 开封 475004; 4. 中国人民解放军陆军第九四六医院医疗保障中心, 新疆 伊宁 835000)

摘要: **目的** 以 HMT-1 为先导化合物, 构建新型丙烯酸类抗 2 型糖尿病药物, 并进行构效关系分析。 **方法** 采用基团替换及同系物原则对 HMT-1 进行结构衍生化设计合成。采用分子对接考察衍生物与 GPR40 的结合作用模式。通过 GPR40 激动活性实验评估目标化合物的生物活性。 **结果** 共设计合成了 6 个丙烯酸类新型 GPR40 激动剂, 体外活性实验发现均具有一定的 GPR40 激动活性, 其中 HMT-5 和 HMT-14 的激动活性与 HMT-1 及阳性药物 TAK-875 接近。其 EC_{50} 分别为 $1.68 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $4.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。 **结论** 构效关系分析发现, 尾部苯环为对位取代, 并在尾部增加氢键供体及连接链为芳香酰胺时可提高活性, 可为开发更高效的抗 2 型糖尿病药物奠定基础。

关键词: GPR40; 糖尿病; 结构优化; 丙烯酸

中图分类号: R14; TQ463 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)06-1449-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.009

Structural optimization and bioactivity of a novel acrylic GPR40 agonist

GUO Kai-lei^{1,2}, WEI Zhao², ZHANG Dong-xu², ZHANG Xin-lei², LI Qi³, SUN Ding-kang¹, LIANG Jia-long⁴, MA Li-sha², LIN Jia-yan², HE Jin-sui¹, DIAO Chun-yan², WANG Bin^{1*}, LIU Xue-ying^{2*} (1. Department of Pharmacy, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712046; 2. Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Air Force Medical University, Xi'an 710032; 3. College of Life Sciences, Henan University, Kaifeng Henan 475004; 4. The 946th Hospital of the People's Liberation Army Ground Force, Yining Xinjiang 835000)

Abstract: Objective To develop novel anti-type 2 diabetes drugs based on HMT-1, and to determine its structure-activity relationship. **Methods** The HMT-1 structural derivatives were synthesized by the principles of group position substitution and homology, followed by investigation of their binding mode with GPR40 through molecular docking. **Results** Six novel acrylic GPR40 agonists were designed and synthesized, and cell experiments demonstrated certain GPR40 agonistic activity. Notably, HMT-5 and HMT-14 exhibited comparable agonistic activity to HMT-1 and the positive control drug TAK-875, with EC_{50} $1.68 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $4.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. **Conclusion** The study of structure-activity relationship has demonstrated that the presence of a para-substituted benzene ring with a hydrogen bond donor as the substituent, coupled with an aromatic amide linker, may effectively enhance GPR40 agonist activity. This research provides a foundation for the development of potential therapeutics for type 2 diabetes.

Key words: GPR40; diabetes mellitus; structural optimization; acrylic acid

基金项目: 陕西省 2021 年创新能力支持计划 (No.2021GCZX-07 号); 陕西省秦创原“科学家+工程师”队伍建设 (No.2023KXJ-080 号)。

作者简介: 郭凯蕾, 女, 硕士研究生, 主要从事计算机辅助药设计、药物结构优化及活性研究, email: 15129565955@163.com

***通信作者:** 刘雪英, 女, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事基于靶标的药物设计合成与活性研究及药物代谢动力学研究, email: xyliu0427@163.com; 王斌, 男, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药药理学研究, email: wangbin812@126.com

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 是一种由胰岛素缺陷或胰岛素抵抗所导致的以高血糖为主要特征的慢性代谢性疾病, 而持续性高血糖会引起一系列并发症^[1-2]。国际糖尿病联盟 (International Diabetes Federation, IDF) 最新数据显示, 全球 DM 患者约有 5.37 亿人, 中国已有 1.4 亿人, 预计这一数字在未来 20 年还将翻倍^[3]。目前临床治疗 DM 药物主要分为两类: 注射类 (如胰岛素、GLP-1 激动剂等) 和口服类 (如二甲双胍、 α -葡萄糖苷酶抑制剂、磺酰脲类等), 但多数药物在降血糖的同时会伴随体重变化、低血糖等风险^[4-6]。

随着对 DM 发病机制研究的深入, 许多新靶标被发现, 其中 G 蛋白偶联受体 40 (G-protein coupled receptor 40, GPR40) 由于具有诸多优势已成为 DM 研究的热门靶标。GPR40 组织分布集中, 主要分布于胰腺 β 细胞、肠道 K 和 L 细胞^[7-8], GPR40 激动剂能有效促进胰岛素分泌, 其降血糖作用是葡萄糖依赖性的, 可有效降低低血糖风险且对体重无明显影响。目前已有一些 GPR40 激动剂进入临床研究, 其中由日本 Takeda 公司研发的 TAK-875 (见图 1) 进入 III 期临床, 但由于不良反应明显而被终止, 因此开发新型 GPR40 激动剂具有重要的临床意义。

课题组前期以 GPR40 为靶点, 通过基于片段的药物设计 (fragment-based drug design, FBDD) 与计算机辅助药物设计 (computer aided drug design, CADD) 相结合的方法筛选出了具有丙烯酸类新型骨架结构的 GPR40 激动剂 HMT-1 ($EC_{50} = 0.36 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 见图 2A)。通过 HMT-1 与 GPR40 的结合作用模式分析发现, 丙烯酸头部为活性必需基团, 连接链影响分子的整体构象, 尾部为疏水基团, 本研究主要探讨连接链与尾部对活性的影响。研究显示连接链引入较大基团会使活性降低, 尾部引入疏水性基团有利于增加活性^[9-10] (见图 2B)。基于此, 本研究通过改变连接位置、长度及柔性, 尾部芳香片段的取代基位置及极性, 并采用基团替换、同系物原则等结构优化策略^[11] 对 HMT-1 进行结构优化, 设计了一系列丙烯酸类化合物, 通过分子对接筛选相互作用模式较好的化合物进行合成, 然后开展体外活性测试, 并初步探索构效关系, 为发现更优的 GPR40 激动剂奠定基础。

1 材料

1.1 仪器与试剂

宝德 PR271ORN 2U 机架式服务器 (英特尔至强 GOLD6248R CPU, 英伟达 V100S 的图形显卡), Discovery Studio 3.5 程序; 试剂均为化学纯或分析纯 (上海泰坦科技有限公司、安耐吉化学试剂有限公司及上海麦克林生化有限公司); AVANCE III 400 核

磁共振波谱仪 (德国 BRUKER), Agilent1100 质谱 (四极杆液质联用仪); FLIPR Tetra 实时高通量荧光检测仪器、Flou-8 钙离子荧光染料 (批号: 318125) (AAT Bioquest), DMEM 高糖基础培养基 (批号: WHB823K171, 武汉普诺赛生命科技有限公司), TAK-875 (批号: 16917, 纯度 $\geq 98\%$, 上海麦克林生化有限公司)。

1.2 细胞

稳定表达 GPR40 的 HEK-293T 细胞 (上海吉满生物有限公司)。

2 方法与结果

2.1 分子对接

通过对 HMT-1 的结构优化共设计了 20 个小分子, 通过分子对接打分及结合作用模式分析, 最终合成 6 个衍生物, 并通过 GPR40 激动实验进行活性评价。

GPR40 蛋白的晶体结构 (PDB ID: 4PHU) 从 Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>) 网站下载得到, 分子对接采用 DS 3.5。对 GPR40 蛋白进行预处理, 修复缺失的残基、去除水分子以及给蛋白体系添加氢原子, 之后在 pH 7.2 的生理环境下对氨基酸进行质子化。活性口袋以晶体复合物中的原始配体 TAK-875 为中心半径 14\AA (10^{-10} m) 范围内。以 6 个衍生物作为对接配体, 通过 Apply Forcefield 给配体小分子赋予力场; 采用 DS 3.5 中的 Ligandfit、CDOCKER、LibDock 三种算法, 分别将 4PHU 晶体复合物结构中阳性分子 TAK-875 与受体蛋白对接, 进行晶体结合模式的验证 ($\text{RMSD} < 2.0 \text{\AA}$), 选用复现结合作用模式最佳的对接算法^[12-13]。CDOCKER 复现晶体复合物的结合作用模式表现最佳, RMSD 值为 0.285\AA (见图 3), 故选用 CDOCKER 的算法进行分子对接, 对接打分结果见表 1, 结合作用模式 3D 图 (见图 4)。通过对 6 个小分子的对接作用分析, 发现 HMT-5、HMT-6、HMT-11、HMT-12 丙烯酸头部均与关键氨基酸残基 Arg-183、Arg-2258、Tyr-91 和 Tyr-2240 产生氢键作用且距离均小于 3\AA ; HMT-13 与 HMT-14 的头部与关键氨基酸残基 Arg-183、Arg-2258 形成氢键且小于 2\AA , 且连接链与氨基酸残基 LEU-138 也形成氢键且小于 3\AA 。结合作用模式均与阳性药 TAK-875 相似 (见图 1A)。

2.2 合成目标化合物

6 个目标化合物分为三类进行合成, 合成方法如图 5 所示。第一类目标化合物以 4-乙腈苯甲酸 **1** 为起始原料, 首先与胺类 **1a** ~ **1b** 缩合得到酰胺类中间体 **1c** ~ **1d**, 然后再与乙醛酸发生 Knoevenagel 缩合得到丙烯酸类目标产物 HMT-5

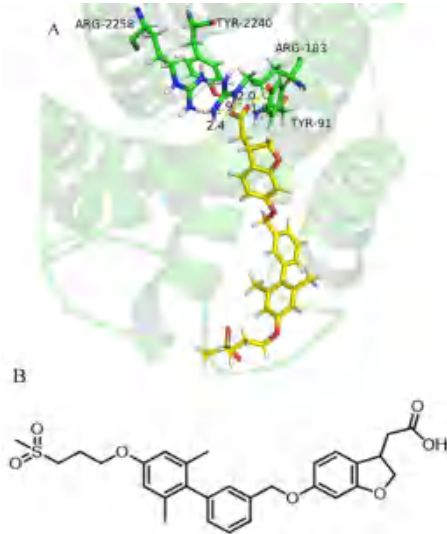


图 1 TAK-875 与 GPR40 的结合作用模式 (A) 及 TAK-875 的结构 (B)
 Fig 1 Binding mode of TAK-875 and GPR40 (A) and structure of TAK-875 (B)

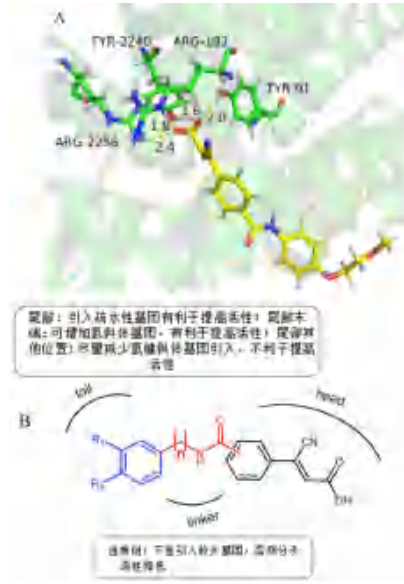


图 2 HMT-1 的结合作用模式 (A) 与构效关系 (B)
 Fig 2 Binding mode (A) and structure-activity relationship (B) of HMT-1

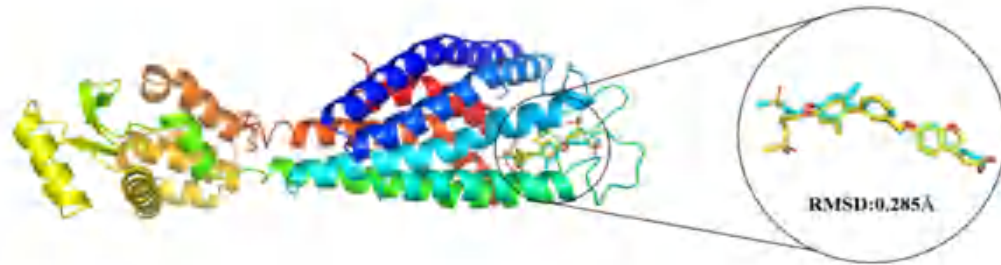


图 3 共结晶分子与对接分子构象叠合图
 Fig 3 Conformational superposition of cocrystalline molecules and docking molecules

注 (Note): 青色表示复合物晶体结构构象; 黄色表示对接配体的构象 (Cyan represents conformation of complex crystal structure; yellow represents conformation of docking ligand)。

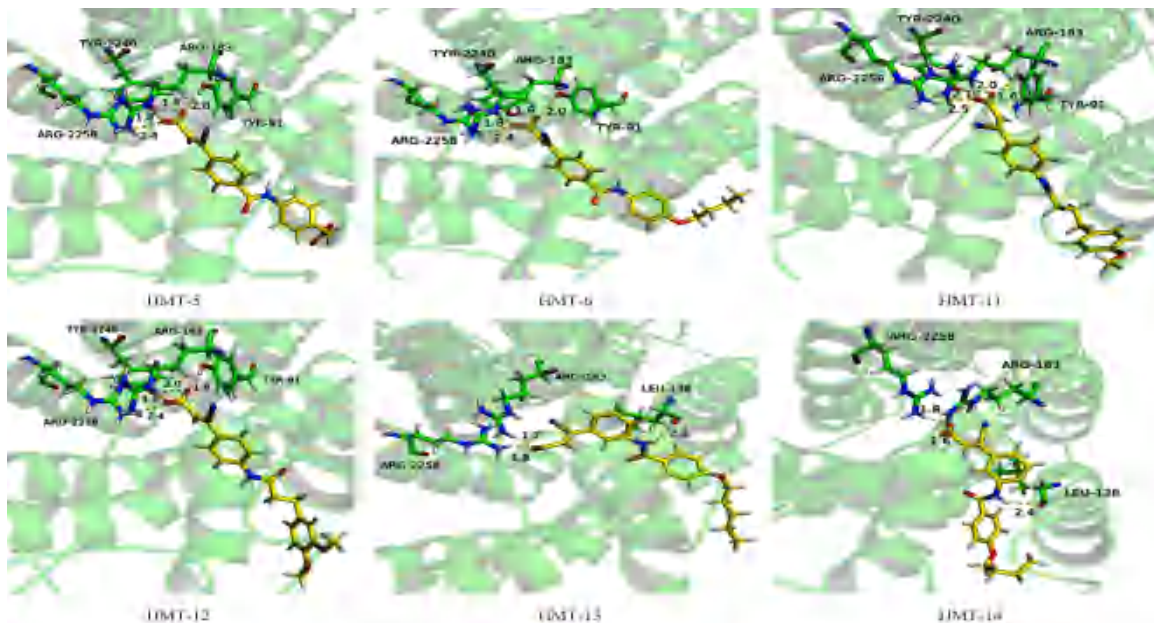


图 4 HMT-1 的 6 个衍生物与 GPR40 受体蛋白的结合作用模式
 Fig 4 Binding modes of 6 derivatives of HMT-1 to GPR40 receptor protein

注 (Note): 黄色代表小分子, 绿色代表 GPR40 的氨基酸残基, 黄色虚线代表氢键 (Yellow represents small molecules, green represents amino acid residues of GPR40, and yellow dashed lines represent hydrogen bonds)。

和 HMT-6。第二类目标化合物以 4-乙腈苯胺 **2** 为起始原料, 首先与羧酸衍生物 **2a** ~ **2b** 缩合得到酰胺类中间体 **2c** ~ **2d**, 以上中间体再与乙醛酸发生 Knoevenagel 缩合得到丙烯酸类目标产物 HMT-11 和 HMT-12; 第三类目标化合物以 3-乙腈

苯胺 **3** 为起始原料, 同样与羧酸衍生物 **3a** ~ **3b** 缩合得到酰胺类中间体 **3c** ~ **3d**, 中间体再与乙醛酸发生 Knoevenagel 缩合得到丙烯酸类目标产物 HMT-13 和 HMT-14。以上所有目标化合物均经过 ^1H NMR、 ^{13}C NMR、HRMS 确认结构。

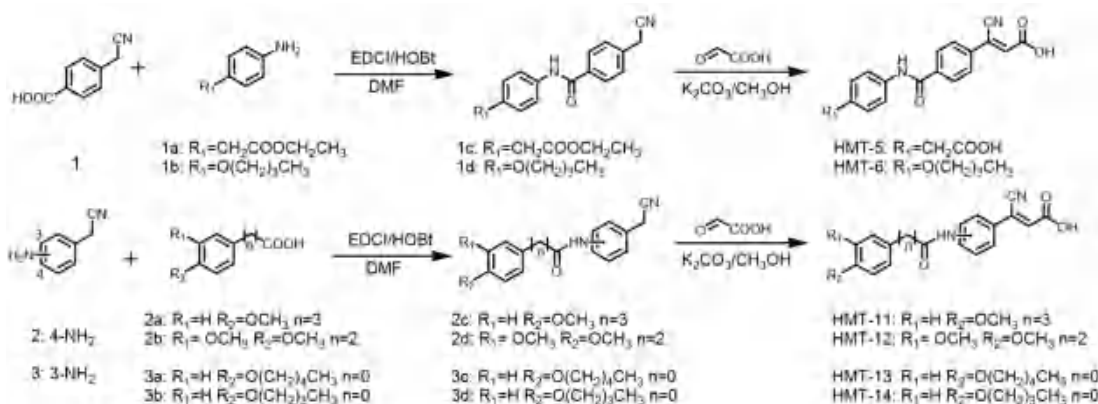


图 5 目标化合物的合成路线

Fig 5 Synthetic routes for target compounds

2.3 中间体与目标化合物的具体合成方法

2-(4-(4-(氰基甲基)苯甲酰胺基)苯基)乙酸乙酯(中间体 **1c**): 25 mL 圆底烧瓶中加入 4-乙腈苯甲酸 (**1**, 0.49 g, 3 mmol), 1-羟基苯并三唑 (HOBt) (3 mmol, 0.41 g), 2-甲基甲酰胺 (DMF) (10 mL), 冰浴搅拌, 再依次加入 **1a** (3 mmol, 0.54 g)、1-乙基-3-(3'-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐 (EDCI) (6 mmol, 1.15 g), 自然升温, 反应 10 h。40 mL 水倾入, 乙酸乙酯 (3×7 mL) 萃取, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 旋干, 60 °C 真空干燥 5 h, 得中间体 **1c** (0.56 g, 白色固体), 收率 58%。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.25 (s, 1H), 7.98 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.71 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.51 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.24 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 4.16 (s, 2H), 4.08 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.63 (s, 2H), 1.19 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H)。HRMS (ESI⁺): m/z calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$, 322.1317; found, 323.1387 [M + H]⁺。

3-(4-((4-(羧甲基)苯基)氨基甲酰基)苯基)-3-氰基丙烯酸(目标产物 HMT-5): **1c** (1 mmol, 0.32 g)、乙醛酸 (1.1 mmol, 0.16 g)、碳酸钾 (1.1 mmol, 0.16 g) 于甲醇 10 mL 中加热回流 12 h, 抽滤, 滤饼溶于 10 mL 水中, 滴入盐酸 (2 mol · L⁻¹) 调 pH 至 3 ~ 4, 乙酸乙酯 (3×5 mL) 萃取, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 旋干, 60 °C 真空干燥 5 h, 得目标产物 HMT-5 (0.14

g, 淡黄色固体, 收率 39%)。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.39 (s, 1H), 8.08 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.96 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.72 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.43 (s, 1H), 7.26 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 3.66 (s, 2H)。 ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 171.67, 164.55, 164.37, 137.65, 136.85, 134.73, 134.42, 129.81, 129.54, 128.53, 126.91, 122.13, 120.43, 115.31, 51.65。 HRMS (ESI⁺): m/z calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5$, 350.0903; found, 349.0829 [M-H]⁻。

N-(4-丁氧基苯基)-4-(氰基甲基)苯甲酰胺(中间体 **1d**): 合成方法参照 **1c**, 棕红色固体 (0.63 g, 收率 68%)。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.13 (s, 1H), 7.97 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.65 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.49 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 6.96 ~ 6.88 (m, 2H), 4.15 (s, 2H), 3.95 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.76 ~ 1.63 (m, 2H), 1.44 (h, $J = 7.4$ Hz, 2H), 0.94 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H)。 HRMS (ESI⁺): m/z calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$, 308.1525, found, 309.1599 [M + H]⁺。

3-(4-((4-丁氧基苯基)氨基甲酰基)苯基)-3-氰基丙烯酸(目标产物 HMT-6): 合成方法参照 HMT-5, 淡黄色固体, 收率 77%。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.19 (s, 1H), 8.00 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.78 (s, 2H), 7.66 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.30 (s, 1H), 6.92 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 3.95 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 1.69

(p, $J = 6.9$ Hz, 2H), 1.47 ~ 1.40 (m, 2H), 0.94 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H)。 ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 212.56, 204.56, 165.12, 164.19, 155.04, 142.87, 131.94, 128.30, 126.03, 121.93, 114.28, 103.61, 67.21, 30.77, 18.73, 13.70, 0.08。HRMS (ESI $^+$): m/z calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$, 364.1423; found, 363.1346 [M-H] $^-$ 。

N-(4-(氰基甲基)苯基)-4-(4-甲氧基苯基)丁酰胺(中间体 **2c**): 25 mL 圆底烧瓶中加入 **2a** (3 mmol, 0.58 g), HOBt (3 mmol, 0.41 g), DMF (10 mL), 冰浴搅拌, 再依次加入 4-乙腈苯胺 (2, 0.40 g, 3 mmol)、EDCI (6 mmol, 1.15 g) 自然升温, 反应 10 h。40 mL 水倾入, 乙酸乙酯 (3×7 mL) 萃取, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 旋干, 60 °C 真空干燥 5 h, 得中间体 **2c** (0.51 g, 淡黄色固体), 收率 55%。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.92 (s, 1H), 7.60 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.25 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.12 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.85 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 3.95 (s, 2H), 3.72 (s, 3H), 2.55 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.30 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.85 (p, $J = 7.5$ Hz, 2H), HRMS (ESI $^+$): m/z calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$, 308.1525, found, 309.1595 [M + H] $^+$ 。

3-氰基-3-(4-(4-(甲氧基苯基)丁酰胺基)苯基)丙烯酸(目标产物 HMT-11): **2c** (1 mmol, 0.31 g)、乙醛酸 (1.1 mmol, 0.16 g)、碳酸钾 (1.1 mmol, 0.16 g) 于甲醇 10 mL 中加热回流 12 h, 抽滤, 滤饼溶于 10 mL 水中, 缓慢滴入盐酸 (2 mol·L $^{-1}$) 调 pH 至 3 ~ 4, 乙酸乙酯 (3×5 mL) 萃取, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 旋干, 60 °C 真空干燥 5 h, 得目标产物 HMT-11 (0.25 g, 淡黄色固体, 收率 69%)。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 13.37 (s, 1H), 10.20 (s, 1H), 7.77 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.73 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 7.16 (s, 1H), 7.12 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 6.85 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 3.72 (s, 3H), 2.56 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.34 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.86 (p, $J = 7.5$ Hz, 2H)。 ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 171.55, 164.72, 157.44, 142.12, 133.39, 129.72, 129.24, 127.74, 125.77, 123.37, 119.10, 115.35, 113.71, 54.94, 35.76, 33.64, 26.76。HRMS (ESI $^+$): m/z calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$, 364.1423; found, 363.1345 [M-H] $^-$ 。

N-(4-(氰基甲基)苯基)-3-(3,4-二甲氧基

苯基)丙酰胺(中间体 **2d**): 合成方法参照 **2c**, 黄色固体 (0.5 g, 收率 51%)。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.96 (s, 1H), 7.59 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.26 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 6.84 (dd, $J = 5.0, 3.1$ Hz, 2H), 6.74 (dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz, 1H), 3.95 (s, 2H), 3.71 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 2.84 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 2.59 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), HRMS (ESI $^+$): m/z calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$, 324.1474, found, 325.1549 [M + H] $^+$ 。

3-氰基-3-(4-(3-(3,4-二甲氧基苯基)丙酰胺基)苯基)丙烯酸(目标产物 HMT-12): 合成方法参照 HMT-11, 淡黄色固体 (0.2 g, 收率 53%)。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 13.36 (s, 1H), 10.24 (s, 1H), 7.77 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.73 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.16 (s, 1H), 6.85 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 6.75 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 2.85 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.64 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H)。 ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 171.05, 164.91, 148.58, 147.10, 141.82, 133.43, 128.76, 127.63, 126.07, 119.94, 119.10, 118.21, 115.56, 112.17, 111.88, 55.48, 55.35, 38.30, 30.32。HRMS (ESI $^+$): m/z calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5$, 380.1372; found, 379.1295 [M-H] $^-$ 。

N-(3-(氰基甲基)苯基)-4-(戊基氧基)苯甲酰胺(中间体 **3c**): 25 mL 圆底烧瓶中加入 **3a** (3 mmol, 0.63 g) HOBt (3 mmol, 0.41 g), DMF (10 mL), 冰浴搅拌, 再依次加入 3-乙腈苯胺 (3, 0.40 g, 3 mmol)、EDCI (6 mmol, 1.15 g) 自然升温, 反应 10 h。40 mL 水倾入, 乙酸乙酯 (3×7 mL) 萃取, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 旋干, 60 °C 真空干燥 5 h, 得中间体 **3c** (0.66 g, 白色固体), 收率 68%。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.18 (s, 1H), 7.96 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.85 (s, 1H), 7.73 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.35 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.11 ~ 6.96 (m, 3H), 4.09 ~ 4.01 (m, 4H), 1.81 ~ 1.68 (m, 2H), 1.36 (dt, $J = 13.9, 6.3$ Hz, 4H), 0.91 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H), HRMS (ESI $^+$): m/z calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$, 322.1681, found, 323.1748 [M + H] $^+$ 。

3-氰基-3-(3-(4-(戊基氧基)苯甲酰胺基)苯基)丙烯酸(目标产物 HMT-13): **3c** (1 mmol, 0.32 g)、乙醛酸 (1.1 mmol, 0.16 g)、碳酸钾 (1.1 mmol, 0.16 g) 于甲醇 10 mL 中加热回

流 12 h, 抽滤, 滤饼溶于 10 mL 水中, 缓慢滴入盐酸 ($2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 调 pH 至 3~4, 乙酸乙酯 ($3 \times 5 \text{ mL}$) 萃取, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 旋干, 60°C 真空干燥 5 h, 得目标产物 HMT-11 (0.17 g, 淡黄色固体, 收率 45%)。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.26 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.96 (t, $J = 7.8 \text{ Hz}$, 3H), 7.44 (d, $J = 5.0 \text{ Hz}$, 2H), 7.14 (s, 1H), 7.06 (d, $J = 8.8 \text{ Hz}$, 2H), 4.06 (t, $J = 6.5 \text{ Hz}$, 2H), 1.80~1.70 (m, 2H), 1.45~1.33 (m, 4H), 0.91 (t, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 3H)。 $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 165.22, 165.03, 161.47, 140.12, 133.27, 129.65, 129.42, 126.41, 121.52, 120.90, 118.04, 116.45, 114.01, 67.72, 28.24, 27.63, 21.85, 13.88。 HRMS (ESI⁺): m/z calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5$, 378.1580; found, 377.1500 [M-H]⁻。

4-丁氧基-N-(3-(氰基甲基)苯基)苯甲酰胺(中间体 3d): 合成方法参照 3c, 白色固体 (0.49 g, 收率 59%)。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.17 (s, 1H), 7.96 (d, $J = 8.9 \text{ Hz}$, 2H), 7.85 (s, 1H), 7.73 (d, $J = 9.1 \text{ Hz}$, 1H), 7.35 (t, $J = 7.9 \text{ Hz}$, 1H), 7.05 (d, $J = 8.3 \text{ Hz}$, 3H), 4.09~4.03 (m, 4H), 1.77~1.68 (m, 2H), 1.45 (h, $J = 7.4 \text{ Hz}$, 2H), 0.95 (t, $J = 7.4 \text{ Hz}$, 3H)。 HRMS (ESI⁺): m/z calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$, 308.1525, found, 309.1599 [M+H]⁺。

3-(3-(4-丁氧基苯甲酰胺基)苯基)-3-氰基丙烯酸(HMT-14): 合成方法参照 HMT-13, 黄色固体 (0.20 g, 收率 54%)。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.31 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.98 (d, $J = 8.9 \text{ Hz}$, 3H), 7.55~7.44 (m, 2H), 7.20 (s, 1H), 7.06 (d, $J = 8.8 \text{ Hz}$, 2H), 4.06 (t, $J = 6.5 \text{ Hz}$, 2H), 1.73 (dt, $J = 14.3, 6.6 \text{ Hz}$, 2H), 1.45 (h, $J = 7.4 \text{ Hz}$, 2H), 0.95 (t, $J = 7.4 \text{ Hz}$, 3H)。 $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 165.08, 164.69, 161.52, 140.24, 132.35, 129.65, 126.32, 122.45, 118.51, 114.04, 67.45, 30.61, 18.67, 13.66。 HRMS (ESI⁺): m/z calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$, 364.1423; found, 363.1343 [M-H]⁻。

2.4 GPR40 激动活性测试

GPR40 被激活后会引引起 $\text{G}\alpha_q$ 蛋白活化, 使胞内 Ca^{2+} 浓度升高^[14]。故利用稳定表达 GPR40 的 HEK-293T 细胞作为研究对象, 通过测定胞内钙离

子变化检测 GPR40 活化状态, 从而对合成的化合物进行活性评价。根据文献方法检测^[14-16]: 首先将稳定转染 GPR40 表达的 HEK-293T 细胞接种于 384 孔培养板, 培养 24 h; 加 Fluo-8 染料, 孵育 60 min; 然后加入不同浓度梯度的化合物、阳性对照 TAK-875 以及阴性对照 DMSO。每组设置 3 个复孔, 用 FLIPR 仪检测并读取荧光值。最后, 根据所测荧光值按以下公式, 使用 GraphPad 计算每个化合物的 EC_{50} 值: 相对激动比率 (%) = (待测化合物的荧光值 - 阴性对照的荧光值) / (激动剂阳性对照的荧光值 - 阴性对照的荧光值) $\times 100\%$; GPR40 激动活性结果见表 1。

表 1 目标化合物 GPR40 激动活性评价 ($n = 3$) 及对接打分
Tab 1 Evaluation and docking scores of the activity of target compound GPR40 ($n = 3$)

化合物	R	对接打分 -CDOCKER ENERGY	hGPR40 EC_{50} / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
HMT-5		28.18	1.68
HMT-6		21.25	57.53
HMT-11		20.89	98.60
HMT-12		18.67	> 193.40
HMT-13		24.05	12.40
HMT-14		24.52	4.90
HMT-1	—	25.57	0.36
TAK-875	—	24.39	0.40

3 讨论

本文对 HMT-1 的连接链与芳香片段尾部进行结构衍生, 采用 CDOCKER 分子对接技术分析结合作用模式, 确定了 6 个目标化合物合成并进行活性测试。通过对 GPR40 激动活性测试, 发现 HMT-5 与 HMT-14 表现出较好的激动活性, 其中 HMT-5 活性与阳性药物 TAK-875 接近。构效关系分析可得出以下结论:

① 如果延长含有芳香基团的头部与尾部之间的连接链 (如引入柔性的亚甲基), 活性会明显

下降(如 HMT-11 与 HMT-12), 可见引入柔性或延长连接链并不利于活性提升。结合分子对接结果发现, 虽然 HMT-11 与 HMT-12 的 -CDOCKER ENERGY 高于候选化合物 HMT-1 及其他衍生物, 但由于连接链延长后使尾部暴露在 GPR40 活性位点外侧, 影响结合稳定性而导致活性降低。

② 以刚性的酰胺键连接丙烯酸头部和芳香尾部可得到活性较好的 GPR40 激动剂, 且酰胺键发生基团翻转或改变酰胺键位置会明显影响活性, 如将 HMT-6 酰胺键翻转并转移至间位, 得到 HMT-14, 激动活性可提高一个数量级。通过结合作用分析发现, 其原因可能是由于间位取代时丙烯酸头部与关键氨基酸形成氢键更近(小于 2Å), 同时酰胺连接链与氨基酸残基 LEU-138 形成新的氢键(小于 2.5Å); 此外, 酰胺键发生基团反转, 改变了化合物整体构象, 使丙烯酸头部与关键氨基酸形成的氢键距离发生变化而影响活性。

③ 对于尾部芳香基团上的取代基, 使用单纯的甲氧基取代活性不佳(HMT-11 与 HMT-12), 若延长末端碳链长度, 可提高活性但不宜过长, 5 个原子范围内对活性有利, 如 HMT-13 活性低于 HMT-14。

④ 尾部脂肪链可通过增加氢键供体来提高生物活性, HMT-1 的脂肪链尾部增加了氧原子(氢键供体), 其活性高于 HMT-6、HMT-13 及 HMT-14。

通过以上构效关系分析, 我们认为将 HMT-6 中丙烯酸头部由对位转移至间位, 很可能会得到 GPR40 激动活性更好的化合物, 相关研究正在进行。

4 结论

综上所述, 本研究以 HMT-1 为先导化合物进行结构衍生化并合成了 6 个化合物, 体外激动活性测试发现化合物 HMT-5 和 HMT-14 的活性与阳性药物 TAK-875 及 HMT-1 接近, 并总结了 HMT-1 衍生物的构效关系: 尾部苯环为对位取代并在尾部增加氢键供体及连接链为芳香酰胺时化合物活性较好, 与课题组前期研究结果一致, 可为后续 HMT-1 的深入研究提供思路。

参考文献

[1] Ben-Shlomo A, Fleseriu M. Diabetes mellitus [J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2016, 45 (4): 13-14.

- [2] Yun JS, Ko SH. Current trends in epidemiology of cardiovascular disease and cardiovascular risk management in type 2 diabetes [J]. *Metabolism*, 2021, 123: 154838.
- [3] Tyagi K, Agarwal NB, Kapur P, et al. Evaluation of stress and associated biochemical changes in patients with type 2 diabetes mellitus and obesity [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2021, 14: 705-717.
- [4] Landgraf R, Aberle J, Birkenfeld AL, et al. Therapy of type 2 diabetes [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2019, 127 (S01): S73-S92.
- [5] Henning RJ. Type-2 diabetes mellitus and cardiovascular disease [J]. *Future Cardiol*, 2018, 14 (6): 491-509.
- [6] Fralick M, Jenkins AJ, Khunti K, et al. Global accessibility of therapeutics for diabetes mellitus [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2022, 18 (4): 199-204.
- [7] Li Z, Zhou ZT, Zhang LY. Current status of GPR40/FFAR1 modulators in medicinal chemistry (2016-2019): a patent review [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2020: 30 (1): 27-38.
- [8] Rodrigues DA, Pinheiro PSM, Ferreira TTDSC, et al. Structural basis for the agonist action at free fatty acid receptor 1 (FFA1R or GPR40) [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2018, 91 (3): 668-680.
- [9] 宋昱, 任聪, 杨彭真, 等. GPR40 受体苯丙酸类激动剂三维定量构效关系研究 [J]. *化学通报*, 2019, 82 (5): 446-451.
- [10] 巨世杰, 魏朝, 郭凯蕾, 等. 新型吡啶二酮类 GPR40 激动剂的结构优化和抗 2 型糖尿病的活性研究 [J]. *中南药学*, 2023, 21 (4): 917-923.
- [11] 盛春泉, 李剑. 药物结构优化 [M]. 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2023: 15-22.
- [12] 杨艺璠, 宋秀庆, 高志明, 等. 基于虚拟筛选和分子动力学模拟发现新型 ULK1 抑制剂 [J]. *化学通报*, 2024, 87 (1): 92-97.
- [13] 赵东升, 程铖, 廖伟科. 基于片段生长技术的 PD-1/PD-L1 小分子抑制剂的设计 [J]. *中南药学*, 2024, 22 (1): 111-115.
- [14] Harunobu N, Osamu M, Tomoya K, et al. SCO-267, a GPR40 full agonist, stimulates islet and gut hormone secretion and improves glycemic control in humans [J]. *Diabetes*, 2021, 70 (4): 2364-2376.
- [15] 沈歆. 新型吡啶二酮类 GPR40 激动剂的发现和抗 2 型糖尿病活性研究 [D]. 西安: 中国人民解放军空军军医大学, 2020.
- [16] Brown SP, Dransfield P, Vimolratana M, et al. Discovery of AM-6226: a potent and orally bioavailable GPR40 full agonist that displays efficacy in nonhuman primates [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2018, 9 (7): 757-760.

(收稿日期: 2024-01-25; 修回日期: 2024-03-07)

桔梗药渣衍生的活性炭对亚甲基蓝的吸附研究

刘寒蒙, 吴晶, 赵娟娟, 邹昌秀 (安徽中医药大学药学院, 合肥 230012)

摘要: **目的** 制备具有高比表面积和发达孔隙结构的桔梗药渣活性炭 (PGAC) 吸附剂, 去除染料废水中的亚甲基蓝 (MB), 并研究 PGAC 对 MB 的吸附性能和吸附机理。**方法** 以桔梗药渣为原料, KOH 为活化剂, 通过简单的高温热解过程得到 PGAC, 对其表面形貌、内部结构和官能团分布等理化性质进行表征。通过改变吸附剂的浓度、MB 的质量浓度、吸附时间和 pH 值, 探究各因素对吸附 MB 性能的影响, 通过等温吸附模型和吸附动力学模型拟合实验过程。**结果** 当吸附剂的质量浓度为 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, MB 的初始质量浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 吸附时间为 1 h, pH 为 6 时, PGAC 对水中 MB 的去除率可达到 99.5%; PGAC 对 MB 的吸附过程符合 Langmuir 模型和准二级动力学模型。**结论** PGAC 对 MB 的吸附以均匀的单层吸附为主, 吸附速率主要受化学吸附机理控制。所制备的 PGAC 具有稳定的孔道结构和大表面积, 能够高效吸附水中的 MB。本研究为中药渣的资源化利用和 MB 印染废水的处理提供了有益参考。

关键词: 桔梗药渣; 活性炭; 亚甲基蓝; 吸附

中图分类号: X703, TQ424.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)06-1456-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.010

Adsorption of methylene blue by activated carbon derived from Platycodon grandiflorus residue

LIU Han-meng, WU Jing, ZHAO Juan-juan, ZOU Chang-xiu (School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012)

Abstract: Objective To prepare Platycodon grandiflorus residue activated carbon (PGAC) adsorbent with high specific surface area and develop pore structure to remove methylene blue (MB) in dye waste water, and to determine the adsorption performance and mechanism of MB in dye wastewater. **Methods** PGAC was obtained through a simple high-temperature pyrolysis process with Platycodon grandiflorus residue as raw material and KOH as activator. The surface morphology, internal structure, and functional group distribution of PGAC were characterized. By changing the concentration of the adsorbent, the mass concentration of MB, adsorption time, pH value, and the influence of various factors on the adsorption performance of MB were studied, and the experimental process fit the isothermal adsorption models and adsorption kinetic models. **Results** When the concentration of the adsorbent was $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the initial concentration of MB was $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the adsorption time was 1 hour, the pH was 6, and the removal rate of MB in waste water by PGAC was 99.5%. The adsorption process of PGAC on MB followed the Langmuir model and pseudo-second kinetic model. **Conclusion** The adsorption of MB by PGAC is mainly dominated by uniform monolayer adsorption, and the adsorption rate is mainly through chemical adsorption mechanism. The prepared PGAC efficiently adsorbs MB in the water due to its stable pore structure and large surface area. This study provides useful references for the resource utilization of traditional Chinese medicine residues and use of MB in the printing and dyeing waste water.

Key words: Platycodon grandiflorus residue; activated carbon; methylene blue; adsorption

基金项目: 安徽省高校自然科学基金项目 (重点) (No. 2023AH050869); 安徽中医药大学高层次人才支持计划项目 (重点) (No. 2022rczd010)。
作者简介: 刘寒蒙, 女, 讲师, 博士, 主要从事纳米材料的制备及其在环境毒素检测和超级电容器中的应用研究, email: hmliu@ahctm.edu.cn

染料是一类有色的有机化合物, 其具有较强的着色能力, 常用于纺织、塑料和化妆品等行业中, 而在这些相关产业的废水中存在着大量染料残留的现象^[1]。亚甲基蓝 (MB) 是一种常见阳离子染料, 其具有稳定的芳香结构, 难以被生物降解且极易在环境中滞留, 对生态环境和人类健康造成了严重的危害^[2]。目前, 对废水中染料的处理方法主要有光催化法^[3]、离子交换法^[4]、吸附法^[5]和电化学降解法^[6]等。其中, 吸附法因简单、成本低、效率高和环境友好等优点, 已普遍应用于有机染料废水处理^[7-8]。

吸附剂的性质对于废水中染料的处理至关重要, 活性炭因其丰富的孔结构、高比表面积以及良好的热稳定性等优势, 具有优异的吸附性能^[9]。其中, 从动、植物衍生出的生物质活性炭, 例如咖啡渣^[10]、芝麻秸秆^[11]、鱼鳞^[12]等衍生的炭材料, 由于其来源广泛、廉价易得等特点, 成为具有前景的吸附材料。中药是我国中医药文化传承的物质基础, 随着中医药产业链的快速发展, 大量排放的中药渣为生态环境也带来了巨大的压力^[13]。中药渣中残留的大量营养物质、矿物元素及其本身的丰富的孔道结构, 其在理论上可以作为一种优异的多孔活性炭前体材料。

本文选用桔梗药渣为原料, 以 KOH 为活化剂, 通过简单的热解过程制备了桔梗药渣衍生的活性炭 (PGAC), 并对其表观形貌、相结构以及比表面积等性质进行表征。进一步将其用作 MB 吸附剂, 通过改变吸附剂的浓度、MB 的质量浓度、吸附时间和 pH 值等因素, 评估所合成的 PGAC 吸附剂对水中 MB 染料的去除效果, 以期中药渣的资源化利用和亚甲基蓝印染废水的处理提供参考。

1 材料

1.1 试药

桔梗药材 [京皖大药房, 批号: 220601, 经安徽中医药大学常相伟研究员鉴定为桔梗科植物桔梗 *Platycodon grandifloru* (Jacq.) A. DC. 的根]; 氢氧化钾、氢氧化钠、亚甲基蓝 (上海麦克林生化科技有限公司); 盐酸 (国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器

BSA124S 电子天平 (精度: 万分之一, 赛多利斯科学仪器有限公司); DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器 (上海力辰邦西仪器科技有限公司); OTF-1200X 管式炉 (合肥科晶材料技术有

限公司); HA-4A 多头磁力搅拌器 (国华仪器制造有限公司); pH 计 (上海雷磁科学仪器厂); 双光束紫外可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限公司); Quattro S 扫描电镜、尼高力 6700 傅里叶变换红外光谱仪、Thermo Fischer DXR 拉曼光谱仪 (赛默飞世尔科技有限公司); D8 X 射线衍射仪 (德国布鲁克公司)。

2 方法

2.1 桔梗药渣衍生活性炭的制备

2.1.1 预处理 将桔梗与水按照 1:8 的质量比置于瓦罐中, 浸泡 30 min, 两次煎煮后冷却至室温, 过滤, 将药渣取出后放入 80℃ 的烘箱中干燥至恒重, 再将干燥后的中药渣打成粉末并过筛, 备用。

2.1.2 预碳化 取一定质量的桔梗药渣粉末放入瓷舟并置于管式炉中, 以一定的流速往管式炉中通氮气, 以 5℃·min⁻¹ 的升温速率升温至 500℃, 保温 1 h。待冷却至室温后, 取出瓷舟, 得到预碳化的桔梗药渣粉末。

2.1.3 活化 将预碳化的桔梗药渣粉末与 KOH 活化剂按质量比为 1:5 充分混合研磨后放入管式炉在 800℃ 下热解 1 h, 冷却至室温后用 1 mol·L⁻¹ 的 HCl 和去离子水洗至中性, 60℃ 干燥至恒重, 得到桔梗药渣衍生的活性炭, 记作 PGAC。

2.2 表征方法

通过扫描电子显微镜 (SEM) 对制备的 PGAC 的形貌进行分析, 傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 对 PGAC 含有的官能团结构进行分析, X 射线衍射 (XRD) 和拉曼光谱对 PGAC 中的晶体结构进行分析, 氮气吸脱附 (BET) 对 PGAC 的比表面积和孔径进行分析。

2.3 MB 标准曲线的测定

分别配制质量浓度为 2、4、6、8 和 10 mg·L⁻¹ 的 MB 溶液, 用双光束紫外可见分光光度计测定, 其最大吸收波长为 664 nm, 在此波长下分别测试上述质量浓度 (C) 的 MB 的吸光度 (A), 绘制 MB 的标准曲线。

2.4 吸附试验

2.4.1 吸附剂浓度对水中 MB 去除效果的影响 固定 MB 的初始质量浓度为 100 mg·L⁻¹, 体积为 100 mL, 吸附时间为 1 h, 配制质量浓度为 100 mg·L⁻¹ 的 MB 溶液, 分别称取质量为 2、3、4、5、6、7、8、9、10 mg 的吸附剂至干燥的锥形瓶中, 再移取 100 mL 上述 MB 溶液于锥形瓶中, 在磁力搅拌器上振荡 1 h 后, 过滤, 通过吸附反应前后吸

光度的变化, 根据式 (1) 和式 (2) 计算 PGAC 对 MB 的吸附量 (q_e , $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 和去除率 (R , %) [14]:

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e) \times V}{m} \quad (1)$$

$$R (\%) = \frac{C_0 - C_e}{C_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中, C_0 、 C_e 为吸附前及吸附平衡时溶液中 MB 的质量浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), m 为 PGAC 的质量 (g), V 为溶液体积 (L)。

2.4.2 亚甲基蓝初始浓度对水中 MB 去除效果的影响 固定吸附剂的质量浓度为 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, MB 的体积为 100 mL , 吸附时间为 1 h , 分别配制质量浓度为 100 、 120 、 140 、 160 、 $180 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MB 溶液, 移取 100 mL 至装有 8 mg 吸附剂的干燥锥形瓶中, 在磁力搅拌器上振荡 1 h 后, 操作同“2.4.1”项下, 过滤、测吸光度。

2.4.3 吸附时间对水中 MB 去除效果的影响 固定吸附剂的质量浓度为 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, MB 的质量浓度为 $120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 体积为 100 mL , 配制质量浓度为 $120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MB 溶液, 移取 100 mL 至装有 8 mg 吸附剂的干燥锥形瓶中, 在磁力搅拌器上分别振荡 2 、 4 、 6 、 8 、 10 、 20 、 30 、 50 、 70 、 90 、 110 、 130 min 后, 操作同“2.4.1”项下, 过滤、测吸光度。

2.4.4 pH 值对水中 MB 去除效果的影响 固定吸附剂的质量浓度为 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, MB 的质量浓度为 $120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 体积为 100 mL , 吸附时间为 1 h , 配制质量浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MB 溶液, 用 NaOH 或 HCl 分别调节 pH 为 2 、 4 、 6 、 8 、 10 、 12 , 移取 100 mL 至装有 8 mg 吸附剂的干燥锥形瓶中, 在磁力搅拌器上振荡 1 h 后, 操作同“2.4.1”项下, 过滤、测吸光度。

3 结果与讨论

3.1 桔梗药渣衍生的活性炭材料的表征

如图 1A 所示, PGAC 表面较为粗糙。图 1B 表明该炭材料表面具有很多致密的孔状结构, 这是由于在高温、惰性气体环境下, KOH 蚀刻桔梗药渣的预炭化产物, 形成致密的孔道结构, 有利于染料废水的吸附。

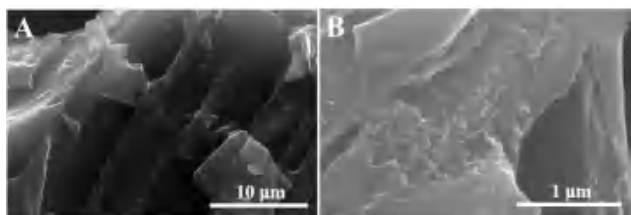


图 1 PGAC 在不同放大倍数下的扫描电镜图

Fig 1 SEM images of PGAC under different magnifications

图 2 为 PGAC 的红外光谱图, 波长为 3440 cm^{-1} 的吸收峰为 $-\text{OH}$ 的特征吸收峰; 1610 cm^{-1} 处的吸收峰归属于 $\text{C}=\text{C}$ 的伸缩振动峰; 在 1480 cm^{-1} 和 1180 cm^{-1} 处的吸收峰归属于 $\text{C}-\text{O}$ 的伸缩振动峰; 在 1380 cm^{-1} 处的吸收峰对应的是 $\text{C}-\text{H}$ 键的弯曲振动峰 [15]。红外光谱表明 PGAC 的表面有羟基等含氧官能团, 具有一定的亲水性, 有利于对有机染料的吸附。

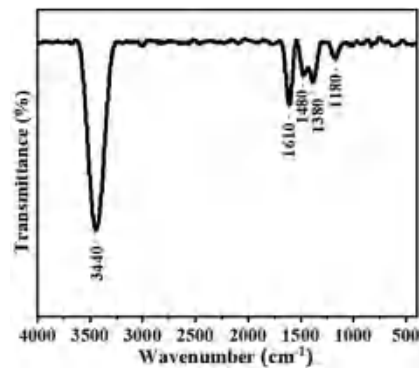


图 2 PGAC 的红外光谱图

Fig 2 FTIR spectra of PGAC

图 3A 和 3B 分别为 PGAC 的 XRD 图和拉曼光谱图。由图 3A 可以看出, PGAC 具有两个较宽的峰, 表明所制备的活性炭为无定形。 23° 和 43° 的衍射峰分别对应类石墨结构的 (002) 晶面和 (100) 晶面 [16]。图 3B 为 PGAC 的拉曼光谱图, 位于 1363 cm^{-1} 和 1570 cm^{-1} 两个位置的特征峰分别对应的是碳材料的 D 带和 G 带。D 带代表材料结构的无序和缺陷, 而 G 带代表石墨碳相的形成 [17], I_D/I_G 的值为 0.99 , 再次验证了所合成的活性炭为无定形。

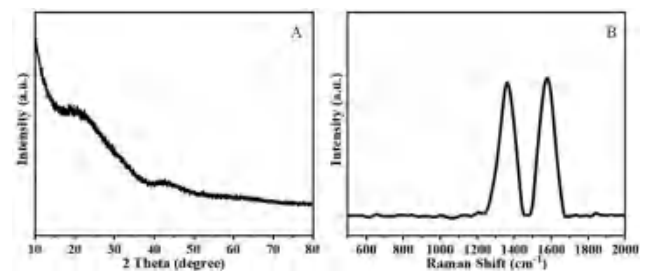


图 3 PGAC 的 XRD 图 (A) 和拉曼光谱图 (B)

Fig 3 XRD pattern (A) and Raman spectrum (B) of PGAC

通过氮气吸附/脱附实验对 PGAC 的比表面积和孔径分布进行表征 (见图 4)。所制备的 PGAC 具有较高的 N_2 吸附能力, 呈现出 I/IV 混合型的吸附等温线特征, 在 $P/P_0 < 0.2$ 区域具有快速而明显的吸附趋势, 表明该材料具有丰富的微孔。在 $P/P_0 > 0.4$ 区域, 等温线有一个滞后回线, 表明结构中存在介孔结构 [18]。其中 $P/$

P_0 表示相对压力, P 为氮气分压, P_0 为吸附温度下氮气的饱和蒸汽压。制备的 PGAC 具有 $343.7 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ 的比表面积, 平均孔径为 3.053 nm , 孔容为 $0.414 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ 。

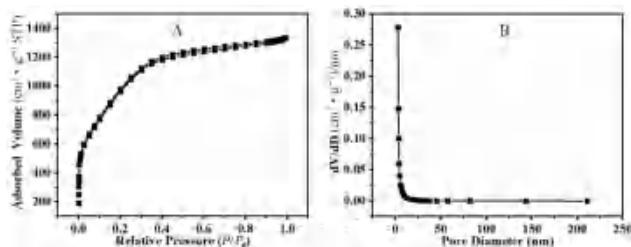


图 4 PGAC 的氮气吸脱附曲线 (A) 和孔径分布图 (B)

Fig 4 N_2 adsorption-desorption isotherm (A) and pore size distribution (B) of PGAC

3.2 MB 的标准曲线

测试不同浓度的 MB 溶液的吸光度, 并对两者间的关系进行线性拟合得到 MB 溶液的标准曲线, 拟合的线性回归方程如下^[19]: $y = 0.123x + 0.0234$, $r = 0.9994$ 。

3.3 吸附条件对吸附性能的影响

3.3.1 吸附剂浓度对水中 MB 去除效果的影响

固定 MB 的初始质量浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 体积为 100 mL , 吸附时间为 1 h , 吸附剂浓度对 MB 去除效果的影响如图 5 所示。当吸附剂的浓度从 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 增加到 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, MB 的去除率从 88.5% 增加到 99.7% ; 当吸附剂的浓度继续增加时, MB 的去除率没有明显的变化。说明当吸附剂的浓度在 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 吸附容量已经达到饱和状态, 继续增加吸附剂的浓度对去除率影响较小。

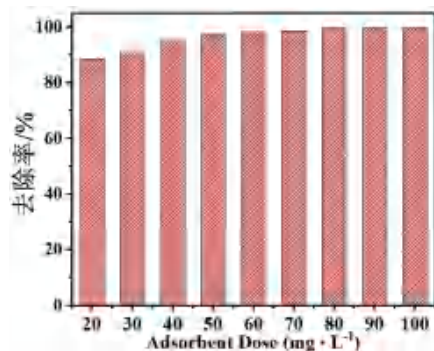


图 5 吸附剂浓度对 MB 去除效果的影响

Fig 5 Effect of adsorbent concentration on methylene blue removal

3.3.2 MB 初始浓度对水中 MB 去除效果的影响

固定吸附剂的质量浓度为 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, MB 的体积为 100 mL , 吸附时间为 1 h , MB 初始浓度对 MB 去除效果的影响如图 6 所示。随着 MB 初始浓度的增加, MB 的去除率下降。当 MB

的初始浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 最大去除率为 99.7% ; 而当 MB 的浓度继续升高, 最大去除率降低。

3.3.3 吸附时间对水中 MB 去除效果的影响 固定吸附剂的质量浓度为 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, MB 的质量浓度为 $120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 体积为 100 mL , 吸附时间对 MB 去除效果的影响如图 7 所示。随着吸附时间的增加, MB 的去除率随之增高。当吸附时间增加至 1 h 时, 曲线变得平缓, 继续增加吸附时间对去除率的影响较小。

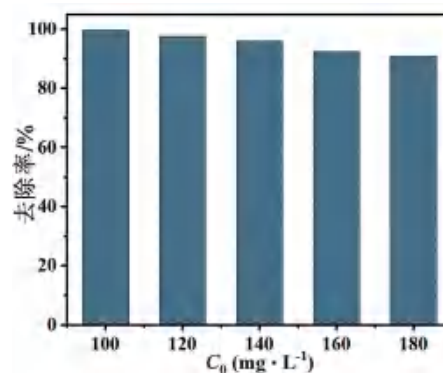


图 6 MB 初始浓度对 MB 去除效果的影响

Fig 6 Effect of methylene blue initial concentration on its removal

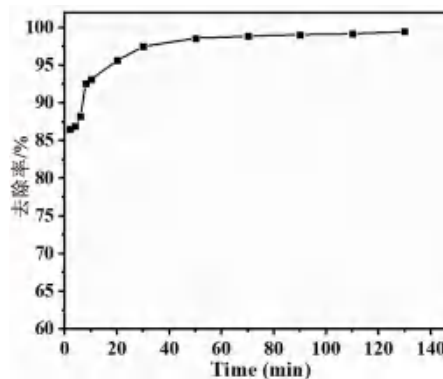


图 7 吸附时间对 MB 去除效果的影响

Fig 7 Effect of adsorption time on methylene blue removal

3.3.4 pH 值对水中 MB 去除效果的影响 按上述实验的考察优选结果, 固定吸附剂的质量浓度为 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, MB 的质量浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 体积为 100 mL , 吸附时间为 1 h , pH 值对 MB 去除效果的影响如图 8 所示。当 pH 值从 2 增加到 6 时, MB 去除率增加, 但随着 pH 的进一步增加, 吸附量略有下降。在 pH 为 6 时, MB 去除率达到 99.5% , 此时溶液体系达到最佳酸度值。

3.4 吸附等温线与吸附动力学分析

3.4.1 吸附等温线分析 分别采用 Langmuir 和 Freundlich 等温吸附模型 [见式 (3)、式 (4) 和式 (5)] 对实验数据进行拟合^[20-21], 计算公式如下:

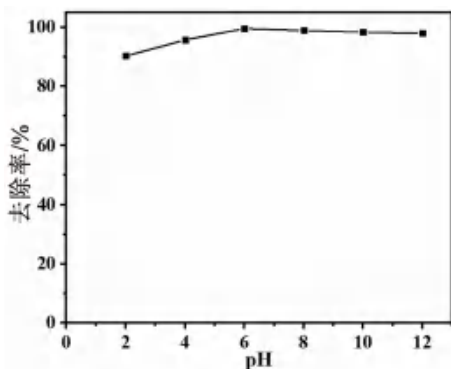


图8 pH值对MB去除效果的影响
Fig 8 Effect of pH value of solution on methylene blue removal

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_m K_L} + \frac{C_e}{q_m} \quad (3)$$

$$\ln q_e = \ln K_F + \frac{1}{n} \ln C_e \quad (4)$$

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L C_0} \quad (5)$$

3.4.2 吸附动力学分析 分别采用准一级动力学方程和准二级动力学方程 [见式 (6) 和式 (7)] 对实验数据进行拟合^[22], 计算公式如下:

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t \quad (6)$$

$$t/q_t = 1/k_2 q_e^2 + t/q_e \quad (7)$$

式中: C_e 为吸附平衡时 MB 的浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); q_m 为最大吸附量 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$); K_L 为 Langmuir 等温吸附方程式常数 ($\text{L} \cdot \text{mg}^{-1}$); R_L 为 Langmuir 模型中的参数, 无量纲; K_F 为 Freundlich 等温吸附方程式常数 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); n 是与吸附容量有关指数。

Langmuir 和 Freundlich 模型的吸附等温线见图 9。在 Langmuir 模型中, q_m 为 $2188 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, K_L 为 $1.4 \text{ L} \cdot \text{mg}^{-1}$, R_L 为 0.007 , R^2 为 0.98 。在 Freundlich 模型中, K_F 为 $1455 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $1/n$ 为 0.138 , R^2 为 0.90 。由上述结果可知, Langmuir 模型线性拟合系数高于 Freundlich 模型, 说明 PGAC 对 MB 的吸附等温线更符合 Langmuir 模型。根据 Langmuir 吸附模型计算得到吸附剂的理论最大吸附量为 $2188 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 这一结果与实验所测值较为接近, 表明所制备的吸附剂含有丰富的孔结构和均匀的吸附点, 其对于 MB 的吸附主要以单层吸附为主^[23]。Langmuir 方程的分离因子 R_L 为 0.007 , 处于 $0 \sim 1$, 说明吸附剂对 MB 属于有利吸附^[24]。

式中: q_t 为 t 时刻的吸附量 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$), k_1 为准一级动力学模型吸附速率常数 (min^{-1}); k_2 为准二级动力学模型吸附速率常数 ($\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)。

准一级动力学和准二级动力学模型拟合曲线见

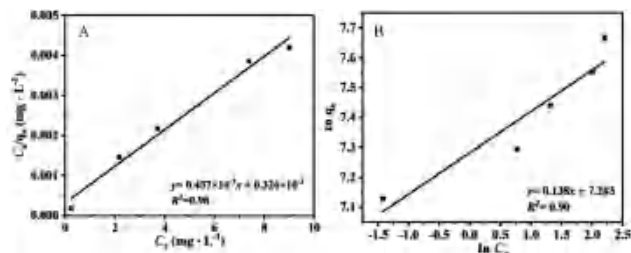


图9 Langmuir (A) 和 Freundlich (B) 的吸附等温线
Fig 9 Langmuir (A) and Freundlich (B) isotherms for the adsorption

图 10, 在准一级动力学中, k_1 为 0.027 min^{-1} , q_e 为 $115.88 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, R^2 为 0.90 。在准二级动力学中, k_2 为 $0.0012 \text{ g} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, q_e 为 $1497 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, R^2 为 0.99 。由上述结果可知, 准二级动力学模型线性拟合系数高于准一级动力学模型, 说明在不同 MB 质量浓度下, PGAC 对溶液中 MB 吸附过程更符合准二级动力学模型, 其吸附速率受化学吸附机理的控制^[25]。

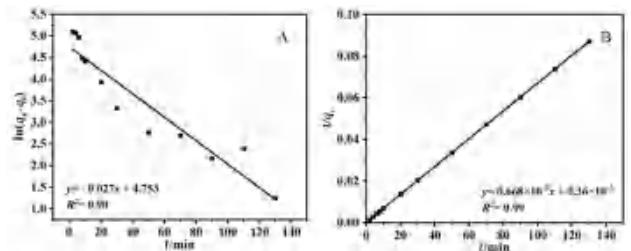


图 10 准一级动力学 (A) 和准二级动力学 (B) 模型拟合曲线
Fig 10 Fitting curves of the pseudo-first-order (A) and pseudo-second-order (B) kinetic models

4 结论

本文以桔梗药渣为前驱体, 通过简单的碳化、高温活化的方式, 合成了桔梗药渣衍生的活性炭材料, 具有高比表面积、发达的孔道结构及丰富的含氧官能团等特征, 在对 MB 处理中呈现优异的吸附性能。合成的 PGAC 对水中 MB 的吸附行为符合准二级动力学模型 ($R^2 = 0.99$), 吸附速率主要受化学吸附机理的控制。吸附等温线符合 Langmuir 模型 ($R^2 = 0.98$), 其吸附过程以均匀的单层吸附为主。本研究为中药渣的资源化利用提供了新思路, 同时对印染废水的吸附处理提供了有益参考。

参考文献

- [1] 张雨薇, 李雪雪, 张晓娟, 等. 改性金刺梨渣生物炭吸附亚甲基蓝性能研究[J]. 辽宁化工, 2023, 52 (12): 1736-1740, 1744.
- [2] 陈钦钰, 张剑剑, 王铎, 等. 桂花树干生物炭对水中亚甲基蓝的吸附性能研究[J]. 技术与市场, 2023, 30 (4): 26-30.

- [3] 王小艳, 杨玲, 田书宁, 等. 水热法制备掺杂钛酸锶及其光催化降解染料废水研究 [J]. 绿色科技, 2023, 25 (8): 178-181.
- [4] Lu CC, Yang JJ, Khan A, et al. A highly efficient technique to simultaneously remove acidic and basic dyes using magnetic ion-exchange microbeads [J]. *J Environ Manage*, 2022, 304: 114173.
- [5] Patra T, Mohanty A, Singh L, et al. Effect of calcination temperature on morphology and phase transformation of MnO₂ nanoparticles: a step towards green synthesis for reactive dye adsorption [J]. *Chemosphere*, 2022, 288: 132472.
- [6] Tang YN, Liu ML, He DL, et al. Efficient electrochemical degradation of X-GN dye wastewater using porous boron-doped diamond electrode [J]. *Chemosphere*, 2022, 307: 135912.
- [7] Hamzezadeh A, Rashtbari Y, Afshin S, et al. Application of low-cost material for adsorption of dye from aqueous solution [J]. *Int J Environ An Ch*, 2022, 102 (1): 254-269.
- [8] Aramesh N, Bagheri AR, Bilal M. Chitosan-based hybrid materials for adsorptive removal of dyes and underlying interaction mechanisms [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 183: 399-422.
- [9] Kumar N, Pandey A, Sharma YC. A review on sustainable mesoporous activated carbon as adsorbent for efficient removal of hazardous dyes from industrial wastewater [J]. *J Water Process Eng*, 2023, 54: 104054.
- [10] 梁波, 王清华, 朱凯, 等. 咖啡渣活性炭对亚甲基蓝吸附特性研究 [J]. 工业用水与废水, 2023, 54 (3): 16-20.
- [11] 张建, 周威远, 王娅娅. 芝麻秸秆活性炭对亚甲基蓝染料的吸附性能研究 [J]. 河南化工, 2022, 39 (2): 25-28.
- [12] Zhu F, Cao WS, Song WH, et al. Biomass-derived carbon prepared through a quadruple-functional-salt approach for application in K-ion capacitors [J]. *Chem Eng J*, 2022, 449: 137561.
- [13] 贺灵芝, 彭栋梁, 梁忠厚. 中药渣开发利用探讨 [J]. 科技创新与生产力, 2021, 10: 42-45.
- [14] Wang QH, Lai ZY, Luo CM, et al. Honeycomb-like activated carbon with microporous nanosheets structure prepared from waste biomass cork for highly efficient dye wastewater treatment [J]. *J Hazard Mater*, 2021, 416: 125896.
- [15] Jawad AH, Abdulhameed AS. Statistical modeling of methylene blue dye adsorption by high surface area mesoporous activated carbon from bamboo chip using KOH-assisted thermal activation [J]. *Energy Ecol Environ*, 2020, 5 (6): 456-469.
- [16] Nanda OP, Badhulika S. Biomass derived nitrogen, sulphur, and phosphorus self-doped micro-meso porous carbon for high-energy symmetric supercapacitor-with a detailed study of the effect of different current collectors [J]. *J Energy Storage*, 2022, 56: 106042.
- [17] Xu H, Wang LY, Zhang Y, et al. Pore-structure regulation of biomass-derived carbon materials for an enhanced supercapacitor performance [J]. *Nanoscale*, 2021, 13 (22): 10051-10060.
- [18] Shu Y, Bai QH, Fu GX, et al. Hierarchical porous carbons from polysaccharides carboxymethyl cellulose, bacterial cellulose, and citric acid for supercapacitor [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 227: 115346.
- [19] 曾艳萍, 黄丹, 张春浩, 等. 四季豆壳基活性炭对亚甲基蓝的吸附性能研究 [J]. 玉溪师范学院学报, 2023, 39 (3): 46-51.
- [20] Gohr MS, Abd-Elhamid AI, El-Shanshory AA, et al. Adsorption of cationic dyes onto chemically modified activated carbon: kinetics and thermodynamic study [J]. *J Mol Liq*, 2022, 346: 118227.
- [21] Kamatchi CI, Arivoli S, Prabakaran R. Thermodynamic, kinetic, batch adsorption and isotherm models for the adsorption of nickel from an artificial solution using chloroxylon swietenia activated carbon [J]. *Phys Chem Res*, 2022, 10 (3): 315-324.
- [22] Deng ZH, Deng Q, Wang LQ, et al. Modifying coconut shell activated carbon for improved purification of benzene from volatile organic waste gas [J]. *Adv Compos Hybrid Ma*, 2021, 4 (3): 751-760.
- [23] Wang MZ, Li YH, Cui MF, et al. Barium alginate as a skeleton coating graphene oxide and bentonite-derived composites: excellent adsorbent based on predictive design for the enhanced adsorption of methylene blue [J]. *J Colloid Interf Sci*, 2022, 611: 629-643.
- [24] Serban GV, Iancu VI, Dinu C, et al. Removal efficiency and adsorption kinetics of methyl orange from wastewater by commercial activated carbon [J]. *Sustainability-Basel*, 2023, 15 (17): 12939.
- [25] Chen J, Tang CH, Li XY, et al. Preparation and modification of rape straw biochar and its adsorption characteristics for methylene blue in water [J]. *Water*, 2022, 14 (22): 3761.

(收稿日期: 2024-01-19; 修回日期: 2024-03-29)

新型缓释盐酸安非他酮包衣微囊的制备、表征与体外评价

杨泉竹¹, 韩美苹¹, 陈天祥¹, 张新¹, 金静维¹, 刘宏飞^{1, 2, 3*} (1. 五邑大学, 广东 江门 529020; 2. 江苏大学, 江苏 镇江 212013; 3. 江门宏晓生物医药科技有限公司, 广东 江门 529000)

摘要: 目的 利用离子交换树脂技术和表面包衣法制备具有缓释效果的盐酸安非他酮包衣微囊 (BH-CM)。方法 以强酸性阳离子交换树脂为载体, 采用静态载药法制备盐酸安非他酮药物树脂复合物 (BH-DRC), 通过 SEM、XRD、FTIR 等对 BH-DRC 进行表征, 并对 BH-DRC 的体外释放影响因素如溶出介质种类、介质浓度、温度、转速、体积等进行了考察。采用表面包衣法对 BH-DRC 进行包裹得到 BH-CM, 并通过单因素试验对 BH-CM 制备工艺进行了优化。结果 最终制备的 BH-DRC 的载药量 (Q_{∞}) 为 0.86 mg/1 mg Amberlite IRP69 树脂, 药物利用率 (E) 为 86.90%。SEM、XRD、FTIR 的结果表明 BH 与离子交换树脂不是简单的物理吸附, 而是通过离子键结合。BH-DRC 体外药物释放结果表明, BH 释放过程受反离子种类、离子强度和转速的影响。采用表面包衣法优化后制备的 3 批 BH-CM 有明显的缓释效果。结论 本试验成功制备了一种新型的具有良好缓释效果的 BH-CM, 可为该药物缓释制剂的研发提供参考。

关键词: 离子交换树脂; 盐酸安非他酮; 表面包衣法; 体外释放; 药物树脂复合物; 包衣微囊
中图分类号: R943, R96 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)06-1462-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.011

Preparation, characterization and in vitro evaluation of a novel sustained-release bupropion hydrochloride coated microcapsules

YANG Quan-zhu¹, HAN Mei-ping¹, CHEN Tian-xiang¹, ZHANG Xin¹, JIN Jing-wei¹, LIU Hong-fei^{1, 2, 3*} (1. Wuyi University, Jiangmen Guangdong 529020; 2. Jiangsu University, Zhenjiang Jiangsu 212013; 3. Jiangmen Hongxiao Biomedical Co., Ltd., Jiangmen Guangdong 529000)

Abstract: Objective To prepare bupropion hydrochloride coated microcapsule (BH-CM) with sustained release by ion exchange resin technology and surface coating method. **Methods** Bupropion hydrochloride resin complex (BH-DRC) was prepared by bath method with highly acidic cation exchange resin as the carrier. The BH-DRC was characterized by SEM, XRD and FTIR, and the factors affecting the release of BH-DRC in vitro were also investigated, such as dissolution medium, medium concentration, temperature, rotation speed and volume. BH-DRC was coated by surface coating method to obtain BH-CM, and BH-CM was optimized by single factor experiment. **Results** The drug loading (Q_{∞}) of BH-DRC was 0.86 mg /1 mg Amberlite IRP69 resin, and the drug utilization rate (E) was 86.90%. The results of SEM, XRD and FTIR showed that BH and ion exchange resin were not simply combined physically, but through ionic bonds. The drug release of BH-DRC in vitro showed that the release process of BH was affected by the kinds of counterion, ionic strength and rotating speed. Three batches of BH-CM with optimized surface coating had obvious sustained release effect. **Conclusion** A novel BH-CM with good sustained-release effect is successfully prepared in this experiment, which provides a new idea for the research and development of bupropion hydrochloride sustained-release preparation.

Key words: ion exchange resin; bupropion hydrochloride; surface coating method; in vitro release; drug resin complex; coated microcapsule

基金项目: 五邑大学科研项目 (No. 2017RC28, No. 2023AL001); 2021 句容市社会发展科技计划项目 (No.ZA42109)。

作者简介: 杨泉竹, 女, 硕士研究生, 主要从事药剂学研究, email: quanzhu_yang1231@126.com * 通信作者: 刘宏飞, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事药剂学研究, email: articlepharmacyliu@163.com

离子交换树脂 (ion exchange resin, IER) 是一种新型的水不溶性、具有多孔道空间结构的高分子聚合物^[1]。IER 活性基团中可交换离子与离子型药物中带有同种电荷的平衡离子进行交换反应 (化学可逆反应), 从而结合成药物树脂复合物 (drug resin complex, DRC)^[2-4]。由于 IER 独特的结构, DRC 进入人体时, 药物的释放仅受胃肠道离子浓度影响, 对比基于物理原理的药物释放, DRC 中的药物能在体内恒定释放, 防止药物突释导致毒性增加。在实际应用中, DRC 可利用包衣材料 (如乙基纤维素、丙烯酸树脂等) 将其制备成包衣微囊以达到预设缓释效果^[5]。

1985 年, 独特的氨基酮类药物安非他酮被批准用于治疗抑郁症, 其化学结构类型不同于市面上其他抗抑郁药物。其作用机制为作为 α -4 β -2 烟碱 (nACh) 拮抗剂, 同时抑制神经元对去甲肾上腺素 (NE) 和多巴胺 (DA) 的再摄取, 增加两者浓度, 从而产生抗抑郁作用^[6]。自 1989 年起, 被 FDA 批准用作治疗重度抑郁症, 最初为速释制剂, 然而安非他酮治疗指数范围相对狭窄, 影响临床医师将其用于治疗难治性抑郁症患者。同时其代谢的个体差异较大, 血药浓度较高, 具有较高的癫痫发作系数^[7], 反复给药可致蓄积中毒。1996 年其缓释制剂的上市, 一定程度上解决了上述问题。但国内外大多数盐酸安非他酮 (bupropion hydrochloride, BH) 缓释片是通过表面薄膜包衣来达到缓释效果, 一旦药片发生挤压等造成包衣膜破裂, 则有可能导致药物发生突释的风险。

本研究提供一种新的具有缓释效果的盐酸安非他酮包衣微囊的制备方法, 以离子交换树脂作为载体, 将药物负载在树脂上。为了达到理想的缓释效果对其进行了表面包衣操作, 并通过表征、体外评价等手段对制备的具有缓释效果的盐酸安非他酮包衣微囊进行了考察, 以期为该药物缓释制剂的研发提供一种新思路。

1 材料

1.1 仪器

SHZ-D (III) 台式循环水式真空泵 (巩义市予华仪器有限责任公司); THZ-82 水浴恒温振荡器 (金坛中大仪器厂); 101 系列数显鼓风干燥箱 (上海叶拓科技有限公司); RCZ-8 型药物溶出度仪 (上海黄海制药有限责任公司); BAS124S 万分之一电子分析天平 (德国 Sartorius 公司); KX-1990QT 机械式超声清洗仪 (北京科玺时代科技有限公司); LC-20AT 液相色谱仪 (日本岛津公司); FE28 型 pH 计 (瑞士 Mettler Toledo 公司); Zeiss Supra55 扫描电子显微镜 (德国 Carl Zeiss);

D8 ADVANCE X 射线衍射仪 (德国 Bruker 公司); AVATAR370 DTGS 傅里叶红外光谱仪 (日本 Shimadzu 公司); Mastersizer 3000 型激光粒度分析仪 (英国 Malvern 公司)。

1.2 试剂

盐酸安非他酮 (BH) (迪嘉药业集团有限公司); Amberlite IRP69、Amberlite IRP64、Amberlite IRP88 (DOW 陶氏公司); Eudragit RS100、Eudragit RL100 (Evonik Nutrition & Care GmbH 公司); PEG 4000 (江西益普生药业有限公司); 甲醇、乙腈为色谱纯; 其他试剂均为市售分析纯。

2 方法与结果

2.1 盐酸安非他酮 UV 分析方法

用去离子水精密配制 $0.15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ BH 母液, 用去离子水稀释成 6、9、12、15、18、21 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BH 溶液, 在 251 nm 波长下测定 BH 的吸光度 (A), 与对应质量浓度 (C , $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 进行线性回归。结果显示 BH 在 6 ~ 21 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与吸光度线性关系良好, 拟合方程为 $A = 0.1228C + 0.1326$ ($R^2 = 0.9999$)。

2.2 盐酸安非他酮 HPLC 分析方法的建立

2.2.1 液相色谱条件 色谱柱为 Agilent Eclipse Plus C18 (4.6 mm \times 100 mm, 3.5 μm); 流动相为 pH 5.8 缓冲溶液 (1 L 水中加入 8.34 g KH_2PO_4 与 0.87 g K_2HPO_4) - 乙腈 (40 : 60); 流速 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温 30 $^\circ\text{C}$; 检测波长 251 nm; 进样体积 10 μL 。

2.2.2 样品溶液的配制

① 空白辅料溶液: 称取适量所有试验用辅料, 用去离子水配制混匀滤过。

② 空白溶剂: 配制 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl、0.15 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、0.15 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 、0.4 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 溶液, 吸取上述溶剂和流动相, 混匀滤过。

③ 对照品溶液: 精密称取 10 mg BH, 用流动相配制成 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BH 溶液滤过。

2.2.3 专属性试验 吸取“2.2.2”项下溶液, 进样检测系统专属性, 结果见图 1。如图 1 所示, 2.41 min 为 BH 的峰, 分离度大于 1.5, 辅料和溶剂对 BH 无干扰, BH 理论塔板数大于 2000, 拖尾因子在 0.95 ~ 1.05, 说明此分析方法系统适用性和专属性良好。

2.2.4 方法学考察 精密称取 1 mg BH 用流动相配制质量浓度为 5、10、15、20、25、30、35、40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BH 对照品溶液, 进样测定, 记录 BH 峰面积 (y), 与对应质量浓度 (x , $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 进行线性回归。结果显示, BH 在 5 ~ 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与峰面积线性关系良好 ($R^2 = 0.9997$), 拟合方程为 $y =$

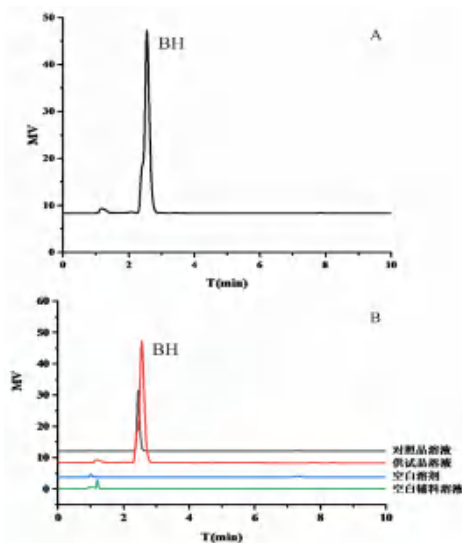


图 1 系统适用性 (A) 和专属性 (B) 色谱图
Fig 1 HPLC chromatogram of system adaptability (A) and specificity (B)

$1.346 \times 10^4 x - 7.028 \times 10^3$ 。5、20、40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BH 溶液进样测定, 连续测定 6 次、连续测定 3 d 分别考察日内、日间精密度 ($n = 6$), 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ BH 溶液室温放置 0、2、4、8、12、24 h, 进样考察稳定性 ($n = 3$)。结果日内、日间精密度和稳定性的 *RSD* 均小于 2%, 满足 HPLC 体外分析法要求。

2.3 静态法制备盐酸安非他酮药物树脂复合物 (BH-DRC)

将离子交换树脂加入药物溶液中搅拌, 定时取样, 过滤稀释, 用 UV 测定 *A*, 计算药物浓度 *C*。当载药达到平衡时, 抽滤、洗涤并干燥, 得到 BH-DRC。根据公式 (1)、(2) 和 (3) 计算药物树脂复合物的载药量 (Q_t)、药物利用率 (*E*) 和载药程度 (*F*)。

$$Q_t = (C_0 - C_t) V / W_R \quad (1)$$

$$E = (C_0 - C_t) / C_0 \quad (2)$$

$$F = Q_t / Q_\infty \quad (3)$$

其中, W_R (mg): 空白离子交换树脂的质量; C_0 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$): 药物的初始浓度; *V* (mL): 溶剂体积; C_t ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$): 在 *t* 时刻时溶液中药物的浓度; Q_t ($\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$): *t* 时刻的载药量; Q_∞ ($\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$): 平衡载药量。

2.3.1 单因素试验筛选制备 BH-DRC 的工艺参数 研究相关因素对静态载药制备 BH-DRC 的影响, 包括树脂类型、反应温度、不同 BH 溶液浓度、不同药物:树脂比例。分别考察了树脂类型 (Amberlite IRP64、Amberlite IRP69、Amberlite IRP88), 反应温度 (25、37、45 $^\circ\text{C}$), 不同 BH 溶液质量浓度 (4、5、7、10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和不同药物:树脂比例 (1:2、1:1、1.4:1、2:1) 对制备 BH-

DRC 的影响。定时取样测样, 以 Q_t ($\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$) 对 *t* 作图, 计算 BH-DRC 的 Q_∞ ($\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$) 和 *E*, 结果见图 2 和表 1。

Amberlite IRP69 树脂载药量最高, 且达到载药平衡的速率最快, 故选 Amberlite IRP69 用于后续静态法载药。温度考察中发现升高温度, Q_∞ 和 *E* 也相应增大, 且载药速率加快, 说明升高温度能促进药物和树脂的离子交换, 故温度选择 45 $^\circ\text{C}$ 。BH 浓度试验中随着 BH 浓度的增加, Q_∞ 相应增加, 但增加为 10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, Amberlite IRP69 中的大部分活性交换基团已被交换完全, *E* 下降。药物浓度为 7 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, Q_∞ 和 *E* 相对较高, 故药物浓度确定为 7 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。在药物定量条件下, 增加树脂的量, Q_∞ 增加, 但 *E* 降低, 说明在药物和树脂比例 1:1 基础上, 增加树脂的量, 但由于药物量一定, 并不会促进药物与 IER 的离子交换。

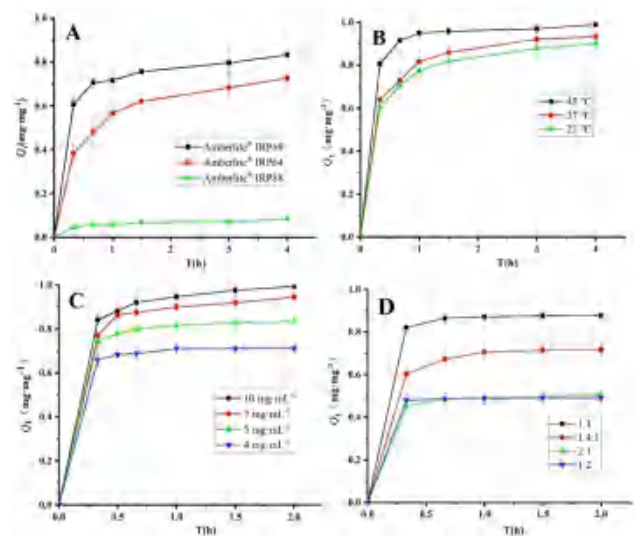


图 2 相关因素的载药曲线 ($n = 3$)

Fig 2 Drug loading curves of related factor ($n = 3$)

A. 树脂类型 (resin type); B. 反应温度 (reaction temperature); C. 不同 BH 溶液浓度 (different BH concentration); D. 不同药物:树脂比例 (drug : resin ratio)

2.3.2 静态法制备 BH-DRC 最终处方工艺的确定 BH-DRC 的最佳静态法制备工艺为: 700 mg Amberlite IRP69, 加入到 100 mL 7 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ BH 溶液中, 45 $^\circ\text{C}$ 搅拌 3 h。BH-DRC 载药量 Q_∞ 为 0.86 mg BH/1 mg Amberlite IRP69 树脂, BH 的 *E* 为 86.90%。

2.4 BH-DRC 表征——结合机制的考察

2.4.1 SEM 将 Amberlite IRP69、BH-DRC 置于样品台上 (导电胶), 真空条件下喷金, 电压为 5 kV 时进行表征并分析^[8], 观察样品的表面形貌, 结果见图 3。Amberlite IRP69 和 BH-DRC 的表面形貌极其相似, 均为不规则的颗粒状, 并且未观察到粉末状 BH 存在于 BH-DRC 的外表层。

表 1 相关因素对 Q_{∞} 和 E 的影响

Tab 1 Effect of related factor on Q_{∞} and E

工艺参数	$Q_{\infty} / (\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1})$	$E/\%$
树脂类型	Amberlite IRP88	0.08
	Amberlite IRP64	0.73
	Amberlite IRP69	0.83
温度 / $^{\circ}\text{C}$	25	0.90
	37	0.93
	45	0.99
BH 浓度 / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	4	0.78
	5	0.82
	7	0.88
药物:树脂	1 : 2	0.48
	1 : 1	0.86
	1.4 : 1	0.68
2 : 1	0.49	

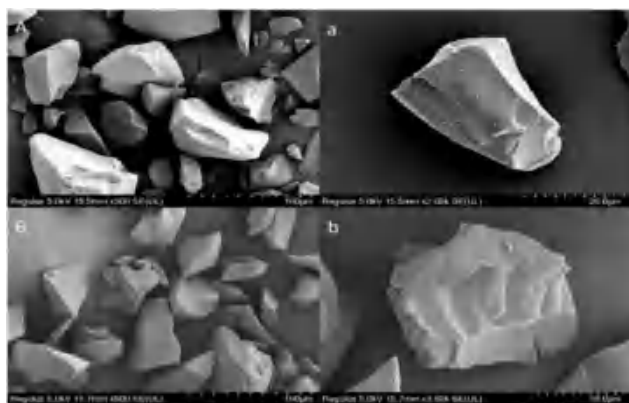


图 3 Amberlite IRP69 (A) 和 BH-DRC (B) 的 SEM 图谱

Fig 3 SEM spectrum of Amberlite IRP69 (A) and BH-DRC (B)

注: 图 3 中 a、b 分别为 A、B 放大拍摄倍数的单个微粒。

Note: In figure 3, a and b are single particles with magnification of A and B respectively.

2.4.2 XRD 取适量的 Amberlite IRP69、BH、BH 与 Amberlite IRP69 的物理混合物 (1 : 1)、BH-DRC 压片制样后的样品进行 XRD 检测。测试条件: 石墨弯晶单色器, 管流 50 mA, 高压 40 kV; 角度测试范围 (2θ): $10^{\circ} \sim 90^{\circ}$; 探测器: 半导体阵列探测器; Cu 靶; 室温; 扫描速度 $5^{\circ}/\text{min}^{[9]}$, 结果见图 4。与 Amberlite IRP69 和 BH 相比, 物理混合物中 BH 结晶峰及其所在位置未发生改变, 仅强度减弱, 而 BH-DRC 的 XRD 图谱中, BH 结晶峰消失, 且图谱整体和 Amberlite IRP69 大体一样, 说明 BH 与树脂的结合非物理吸附^[10-12]。

2.4.3 FTIR 采用 KBr 压片法, 在 $4000 \sim 500 \text{ cm}^{-1}$ 扫描 Amberlite IRP69、BH、BH 与 Amberlite IRP69 的物理混合物 (1 : 1)、BH-DRC, 记录红外光谱图, 结果见图 5。物理混合物与 BH 的图谱对比结果显示, 物理混合物中 BH 的特征吸收峰 (1079 cm^{-1} 芳基氯 C-Cl 伸缩振动的吸收峰; 1558 和 3093 cm^{-1} 芳香族 C-H 伸缩振动的

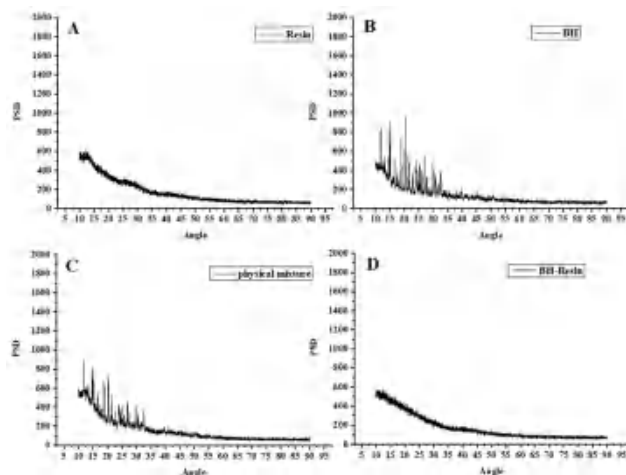


图 4 Amberlite IRP69 (A)、BH (B)、物理混合物 (C) 及 BH-DRC (D) 的 XRD 图谱

Fig 4 XRD patterns of Amberlite IRP69 (A), BH (B), physical mixture (C) and BH-DRC (D)

吸收峰; $2450 \sim 2840 \text{ cm}^{-1}$ 仲胺盐的 N-H 伸缩振动的吸收峰) 未发生改变, 仅是强度减弱, 表明物理混合物中 BH 晶型未改变。BH-DRC 与 Amberlite IRP69 的图谱基本一致, 树脂特征吸收峰 ($829.2 \sim 859.41 \text{ cm}^{-1}$ S = O 伸缩振动的吸收峰, $3059.2 \sim 3487.4 \text{ cm}^{-1}$ 、 999.41 cm^{-1} 苯环上伸缩振动的吸收峰) 未发生改变, BH 的特征吸收峰消失, 结果表明 BH 已进入 Amberlite IRP69 内部结构中。

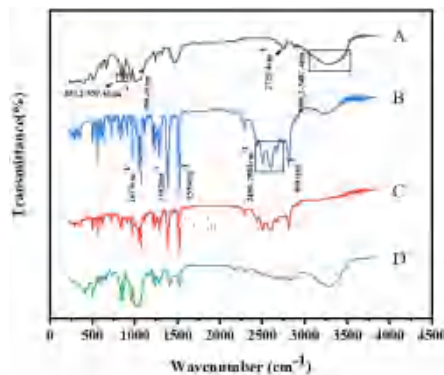


图 5 Amberlite IRP69 (A)、BH (B)、物理混合物 (C)、BH-DRC (D) 的红外图谱

Fig 5 FTIR spectra of Amberlite IRP69 (A), BH (B), physical mixture (C) and BH-DRC (D)

2.5 BH-DRC 的体外释放行为

2.5.1 含量测定 称取一定量 BH-DRC, 置于 100 mL 的量瓶中, 加入 60 mL $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 45°C 水浴搅拌 4 h, 超声 30 min, 冷却至室温, 加 $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 溶液稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 吸取 $10 \mu\text{L}$ 进样测定, 记录峰面积, 用外标法计算出 BH-DRC 中 BH 的含量。

2.5.2 释放度测定条件的确定 药溶液与 IER 结合形成 DRC^[13]。储存过程中,在无离子水系介质中 DRC 中的药物几乎无法释放。DRC 口服后,药物的释放取决于离子类型与强度,药物平衡离子被胃肠道中的反离子通过离子交换从 DRC 的骨架内部扩散到消化液中。与基于物理原理的其他药物递送系统相比,这种释放机制只依赖于胃肠液的离子强度与类型,而不依赖胃肠道部位的酸碱度、酶及其他复杂生理因素等^[14]。

根据《中国药典》2020 年版释放度测定第二法(桨法)操作,取 BH-DRC 适量,溶出介质为 900 mL 0.15 mol · L⁻¹ NaCl,转速为 50 r · min⁻¹,温度为 (37 ± 0.5) °C,在预定时间抽取样品溶液过 0.22 μm 的滤膜,精密吸取续滤液 10 μL 进样测定,记录 BH 峰面积从而计算 BH-DRC 累计释药量。

采用相似因子 (f_2) 评价方法比较 BH-DRC 中药物的体外溶出行为。

$$f_2 = 50 \times \log \left[\left[1 + (1/n) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right] \quad (4)$$

式中 R_t 与 T_t 为 BH-DRC 中 BH 在 t 时刻的平均累计释放度, n 为取样数。 f_2 的范围在 0 ~ 100, f_2 值大于 50, 释放行为相似,越接近 100, 相似度越高^[15]。

2.5.3 单因素考察体外释放因素对 BH-DRC 释药的影响 分别考察了离子类型 (NaCl、HCl), 离子强度 (0.15、0.5、1 mol · L⁻¹), pH 值 (5.8、6.8、7.8), 温度 (25、37、45 °C), 释放介质体积 (500、700、900 mL) 和转速 (25、50、100 r · min⁻¹) 对 BH-DRC 中药物释放的影响, 结果如图 6 和表 2 所示。

BH-DRC 在水中几乎不释放, 且药物释放不受 pH 值的影响; BH-DRC 中 BH 在反离子介质中可被释放出来。且释放曲线显示, Na⁺ 的交换能力最强; Na⁺ 离子浓度增大 BH 的释放稍有加快。又因 0.15 mol · L⁻¹ NaCl 渗透压与血浆渗透压相近^[16], 综合考虑, 选用 0.15 mol · L⁻¹ NaCl 作为溶出介质; 温度的升高和介质体积的增大在一定程度上加快了 BH 的释放速率, 释药总量增多。又因为人体温度维持在 37 °C 且消化液中胃液, 肠液每日分泌量为 1 ~ 2 L, 考虑药物在体内外释放的相关性, 选用 (37.0 ± 0.5) °C 作为介质温度, 900 mL 作为体外溶出介质体积; 随着转速的升高, 药物释放速率加快, 释药总量也相应增加。表明转速影响 BH-DRC 体外释放行为。又因为体外释放测定中, 无特殊要求时, 一般桨法为 50 r · min⁻¹, 转篮法为 100 r · min⁻¹。故本试验的搅拌速度选用 50 r · min⁻¹。

2.5.4 最终确定的 BH-DRC 溶出条件 最终确定 BH-DRC 的溶出条件为: 900 mL 0.15 mol · L⁻¹

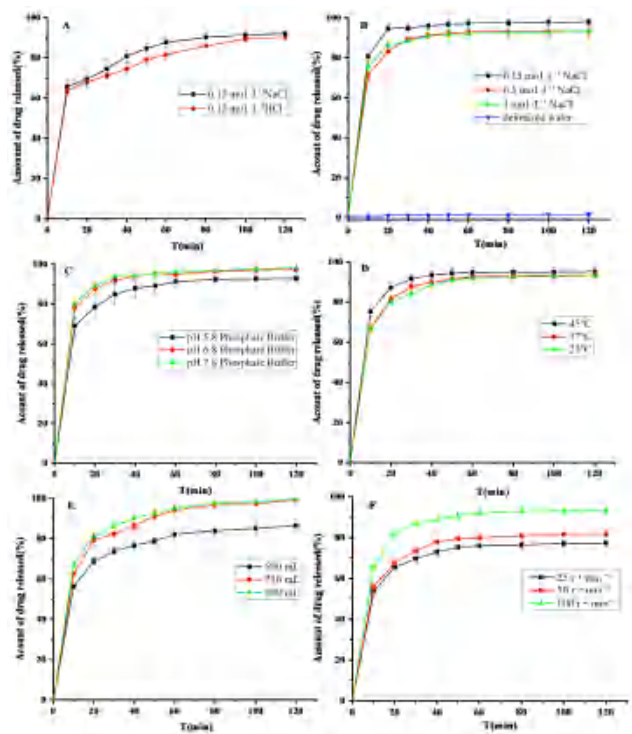


图 6 不同因素对 BH-DRC 体外释放曲线的影响

Fig 6 Effect of differnt factors on the in vitro release curve of BH-DRC
A. 离子类型 (ion type); B. 离子强度 (ion concentration); C. pH 值 (pH value); D. 介质温度 (medium temperature); E. 介质体积 (medium volume); F. 转速 (stirring speed)

表 2 相关因素对 BH-DRC 体外释放的相似性分析

Tab 2 Analog analysis of related factor on the release of BH-DRC in vitro

因素	水平		f_2 (BH-DRC)
	因素 1	因素 2	
离子类型	0.15 mol · L ⁻¹ NaCl	0.15 mol · L ⁻¹ HCl	66
离子强度 / (mol · L ⁻¹)	0.15 mol · L ⁻¹ NaCl	0.5 mol · L ⁻¹ NaCl	57
	0.5 mol · L ⁻¹ NaCl	1 mol · L ⁻¹ NaCl	81
	0.15 mol · L ⁻¹ NaCl	1 mol · L ⁻¹ NaCl	60
pH	5.8	6.8	67
	5.8	7.8	74
	6.8	7.8	89
温度 / °C	25	37	86
	25	45	62
	37	45	67
介质体积 / mL	750	900	76
	500	900	42
	500	750	45
转速 / (r · min ⁻¹)	25	50	67
	25	100	37
	50	100	43

NaCl 为溶出介质, 转速为 50 r · min⁻¹, 温度为 (37 ± 0.5) °C。

2.6 BH-DRC 的浸渍处理

由于 Amberlite IRP69 为凝胶型树脂, 干燥时在水系介质中易吸水膨胀^[17]。故在制备成缓释盐酸安非他酮包衣微囊 (BH-CM) 前, 需对 BH-

DRC 进行浸渍处理, 以避免因树脂膨胀孔道间隙变大导致包衣膜破裂, 药物突释。

2.6.1 浸渍工艺 BH-DRC: PEG4000: 纯水的比例为 1:2:8。具体工艺: 处方量的纯化水中加入 PEG 4000, 45 °C 加热搅拌, 至 PEG 4000 完全溶解后加入处方量的 BH-DRC, 45 °C 连续搅拌 1 h, 室温静置 3 h。抽滤, 50 °C 干燥过夜, 过 80 目筛网得浸渍 BH-DRC。

2.6.2 树脂溶胀度考察 分别称取一定量浸渍后的 BH-DRC、Amberlite IRP69 及 BH-DRC 于 5 mL 小烧杯中, 振荡使微粒层紧实、表面平整, 此时为初始体积 V_0 (mL); 接着加入去离子水 (高于样品约 3 cm), 此时体积为 V (mL), 根据公式 $R = V/V_0$ 计算溶胀度 R 。结果表明, 去离子水中溶胀度最高的是 Amberlite IRP69, R 为 1.61, 而 BH-DRC 的 R 为 1.19, 说明 BH-DRC 树脂骨架中孔道空间已被 BH 填满。浸渍后 BH-DRC 的 R 为 1.01, 表明未经处理的 BH-DRC 还是存在吸水溶胀的风险。上述结果表明浸渍后的 BH-DRC 在水体系中近似不溶胀, 很大程度降低了药物发生泄漏和突释的可能性。

2.6.3 浸渍工艺对 BH-DRC 释药的影响 分别取适量的 BH-DRC 和浸渍后的 BH-DRC, 按“2.5.4”项下方法进行体外溶出度试验, 考察浸渍工艺对 BH-DRC 的释药影响, 结果见图 7。BH-DRC 和浸渍后的 BH-DRC 释放曲线相似, 且相似因子 f_2 为 89, 说明浸渍行为对 BH-DRC 释药速率影响不大。

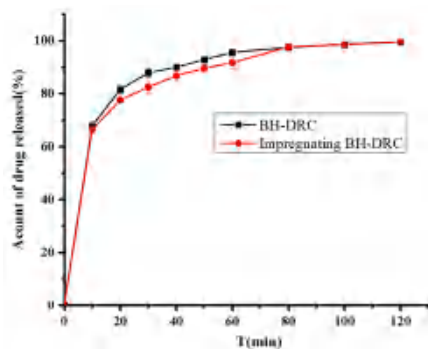


图 7 BH-DRC 与浸渍 BH-DRC 的体外释放情况 ($n = 3$)
Fig 7 In vitro release of BH-DRC and impregnating BH-DRC ($n = 3$)

2.7 表面包衣法制备盐酸安非他酮包衣微囊 (BH-CM)

在 45 °C 适量 95% 乙醇中, 加入 Eudragit RL100 和 Eudragit RL RS100 (1:1), 完全溶解后加入处方量浸渍 BH-DRC, 45 °C 搅拌 3 h, 室温静置 2 h, 抽滤, 50 °C 烘干, 过 80 目筛网得 BH-CM^[18]。

2.7.1 含量和释放度测定方法 称取适量 BH-CM 于 100 mL 量瓶中, 各加入 30 mL 无水乙醇和适量 0.15 mol · L⁻¹ NaCl 溶液, 45 °C 振荡 4 h, 超声 30 min,

再加 0.15 mol · L⁻¹ NaCl 溶液稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 记录 BH-CM 中 BH 峰面积从而计算含量。称取适量 BH-CM, 照“2.5.4”项下方法测定释放度, 记录 BH-CM 中 BH 峰面积从而计算累计释药量。

2.7.2 单因素试验筛选优化 BH-CM 考察阻滞材料的种类 [Eudragit RL100、Eudragit RS100 和 Eudragit RL100: Eudragit RS100 (1:1)]、阻滞材料的浓度 (1.2%、2.2%、4.4%)、反应介质体积比的优化 (阻滞材料浓度: 95% 乙醇分别为 1:5、1:10、1:20) 以及反应温度的优化 (25、37、45 °C)。结果见图 8 和表 3。

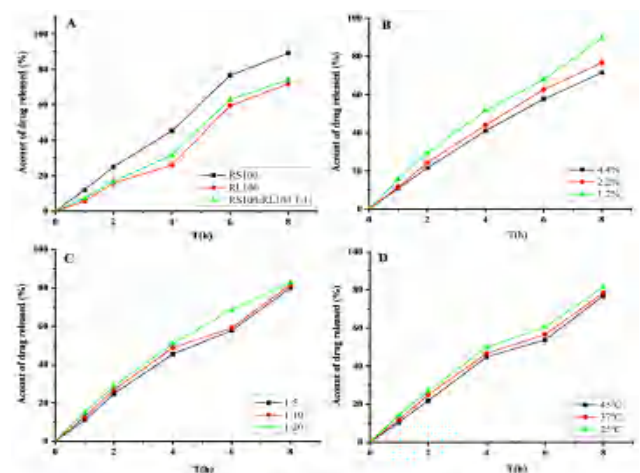


图 8 BH-CM 在不同条件下的体外释放曲线
Fig 8 In vitro release curve of BH-CM at different condition
A. 不同阻滞材料 (different blocking materials); B. 不同浓度阻滞材料 (different concentrations of blocking materials); C. 不同体积反应介质 (different volume of reaction media); D. 不同反应温度 (different reaction temperature)

表 3 相关因素对 BH-CM 体外释放行为的相似性分析

Tab 3 Analog analysis of related factor on the release of BH-CM in vitro

因素	水平		f_2 (BH-CM)
	因素 1	因素 2	
阻滞材料类型	Eudragit RL100	Eudragit RS100	45
	Eudragit RL100	Eudragit RL100 : Eudragit RS100 (1:1)	77
	Eudragit RS100	Eudragit RL100 : Eudragit RS100 (1:1)	50
阻滞材料浓度 /%	Eudragit RL100	Eudragit RS100	45
	1.2	2.2	59
	1.2	4.4	51
反应介质体积比	2.2	4.4	74
	1:5	1:10	85
	1:5	1:20	64
温度 /°C	1:10	1:20	70
	25	37	84
	25	45	68
	37	45	78

不同类型阻滞材料制备的 BH-CM 都具有较好的缓释作用。以 Eudragit RL100 : Eudragit RS100 (1 : 1) 为阻滞材料制备的 BH-CM 释放较单独的 Eudragit RL100 稍快一些, 释放行为相似, 但是 Eudragit RL100 : Eudragit RS100 (1 : 1) 制备的包衣微囊无突释和拐点现象, 故选择 Eudragit RL100 : Eudragit RS100 (1 : 1) 为阻滞材料; BH-CM 中 BH 的释放随阻滞材料浓度的增大和包衣液介质体积的增加而减慢, 结合经济角度和试验的可操作性, 本试验中选择阻滞材料浓度为 2.2%, 反应介质体积比为 1 : 10 制备 BH-CM; 温度对整体制备 BH-CM 的影响不大, 但温度越高, 药物释放得越慢。这是由于包衣液中的季铵盐树脂与药物载体离子交换树脂之间的结合是吸热反应。综上所述, 选择 45 °C 制备 BH-CM。

2.7.3 BH-CM 的最优处方工艺 BH-CM 的最优处方工艺为: 阻滞材料为 Eudragit RS100 : Eudragit RL100 (1 : 1), 阻滞材料浓度为 2.2%, 反应介质体积比 (阻滞材料浓度: 反应介质体积) 为 1 : 10, 温度为 45 °C。

2.8 BH-CM 的质量评价

2.8.1 BH-CM 表面形态 将 BH-DRC、BH-CM 置于样品台上 (导电胶), 真空条件下喷金, 电压为 5 kV 时进行表征并分析, 采用 SEM 观察样品的表面形貌, 见图 9。结果可看出, BH-DRC 经过表面包衣法制备形成 BH-CM 后, 表面包衣膜致密且完整, 未存在粘连成团等现象。



图 9 BH-DRC (左) 和 BH-CM (右) 的 SEM 图
Fig 9 SEM images of BH-DRC (left) and BH-CM (right)

2.8.2 BH-CM 粒径分析 使用激光粒度仪对 BH-CM 的粒度进行测量, 结果见图 10。BH-CM 的粒径分布图接近正态分布, BH-CM 的平均粒径为 95 ~ 105 μm。

2.8.3 BH-CM 的含量测定和释放度考察 取适量按“2.7.3”项下最优工艺制备的 3 批 BH-CM, 按“2.7.1”项下方法测定其含量, 结果可知, BH-CM 的平均含量为 (46.90 ± 0.12) %, 表明 BH-CM 的药物含量均一度良好。

按最优工艺制备 3 批 BH-CM, 按“2.7.1”项下方法对 BH-CM 的体外释放行为考察, 结果见

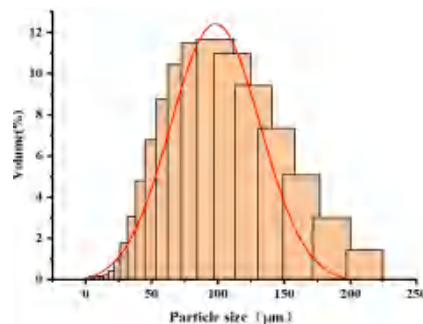


图 10 BH-CM 的粒径分布图
Fig 10 Mean particle size distribution of BH-CM

图 11。3 批 BH-CM 释放曲线高度相似且 f_2 接近 100, 说明最优处方工艺所制备的 BH-CM 拥有良好的工艺重现性。

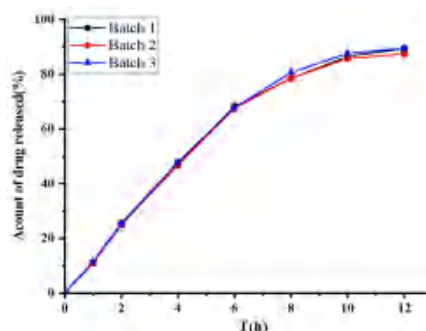


图 11 3 批 BH-CM 的体外释药曲线 (n = 3)
Fig 11 In vitro release curves of 3 batches of BH-CM (n = 3)

2.8.4 BH-CM 的释药机制考察 对最优工艺制备的 BH-CM 释放曲线进行释放方程拟合, 结果见表 4。

表 4 BH-CM 释药曲线拟合
Tab 4 Drug release curve fitting of BH-CM

模型	拟合方程	R ²
零级释方程	$M_t = 25.7 + 3.93t$	0.67
一级释方程	$M_t = 98.5 (1 - e^{-0.19t})$	0.99
Higuchi 方程	$M_t = 23.02x^{1/2} + 0.66$	0.88
Ritger-Peppas 方程	$\ln (M_t/M_\infty) = 0.44\ln t$	0.89

由表 4 可知, 比较 BH-CM 释放曲线拟合过程 R² 的大小, 一级释放的 R² 值最大 (0.99), 表明 BH-CM 释放曲线符合一级释放 (膜控), 释药机制是通过包衣膜来控制包衣微囊中药物的体外释放行为。将 BH-CM 释药曲线用 Ritger-Peppas 方程拟合后得出 $k_1 = 0.44 < 0.45$ 可知, BH-CM 释药符合 Fick 扩散^[19]。

3 讨论

本研究成功制备了 BH-DRC。采用 SEM、XRD、FTIR 对 BH、Amberlite IRP69 空白树脂、物理混合物、BH-DRC 进行表征并分析, 结果表明 BH 与 Amberlite IRP69 并不是简单的物理吸附作用形成的 BH-DRC, 而是以离子键结合为 DRC; 同

时在进行体外释放试验时, BH-DRC 在去离子水中的释放接近于零, 此结果也佐证了 BH-DRC 中的 BH 是通过离子交换释放至溶出介质中, 在无离子环境中几乎不释放。

在体外释放因素考察中, BH-DRC 中 BH 刚进入介质中时释放较快, 这是由于释放介质中的反离子容易与 BH-DRC 表层到中层之间的 BH 平衡离子发生交换反应, 此时树脂孔道造成的空间阻力对药物释放的影响较小, 释放较快; 随着 BH-DRC 表层到中层之间的 BH 平衡离子被完全交换, 这时释放介质中的反离子需进入 BH-DRC 内部。由于 BH-DRC 内部是多孔道结构, 交换反应除了受化学反应力影响外, 还存在空间阻力, 此时药物释放较慢。当 BH-DRC 释放曲线随时间增加而趋于平稳, 说明体外释放过程结束。

采用表面包衣法制备了 BH-CM, 由 SEM 结果可以看出, 表面的包衣膜致密, 无粘连, 大小与 BH-DRC 无异; 相较于乳化溶剂挥发法制备的包衣微囊, 此法制备的包衣微囊无粘连, 无有机溶剂残留, 操作简单; 相较于流化床包衣法制备的包衣微囊^[20], 此法制备的包衣微囊粒径较小, 无需大型设备仪器。

本研究提供一种新的具有缓释效果的盐酸安非他酮包衣微囊的制备方法, 可减少给药次数, 防止反复给药造成的毒副作用, 且在体内可恒定释放, 仅受胃肠道离子影响, 不会因咀嚼等造成药物倾泄, 较好地解决了目前市面上盐酸安非他酮薄膜包衣缓释片因包衣膜意外破损导致的毒副作用。该包衣微囊可用于片剂、液体混悬剂等的制备, 为该药缓释制剂的制备提供参考。

参考文献

- [1] Li CH, Han XL, Hong XX, et al. Study on the complexation and release mechanism of methylphenidate hydrochloride ion exchange resin complex [J]. *Polymers*, 2021, 13 (24): 4394.
- [2] 刘丹, 陈春, 潘卫东, 等. 盐酸左氧氟沙星药物树脂缓释混悬液的制备 [J]. *化学工程与装备*, 2021 (9): 20-22.
- [3] 李用珍, 王利民, 李树英, 等. 离子交换树脂在药物传递系统中的应用 [J]. *齐鲁工业大学学报*, 2017, 31 (6): 33-39.
- [4] 王蔚, 王春红, 袁直. 吸附树脂在生物医药领域的应用 [J]. *化学教育 (中英文)*, 2021, 42 (18): 18-23.
- [5] 胡雪芳, 徐江康, 何淑旺, 等. 基于离子交换树脂的口服液体缓释制剂的研究进展 [J]. *药物生物技术*, 2017, 24 (1): 53-57.
- [6] 刘振江, 秦玲, 徐国良. 盐酸安非他酮和盐酸氟西汀治疗抑郁症的有效性及安全性的 Meta 分析 [J]. *吉林大学学报 (医学版)*, 2015, 41 (1): 140-144.
- [7] Stahl SM. Dextromethorphan/bupropion: a novel oral NMDA (N-methyl-d-aspartate) receptor antagonist with multimodal activity [J]. *CNS Spectr*, 2019, 24 (5): 461-466.
- [8] Ge ZZ, Yang MY, Wang YL, et al. Preparation and evaluation of orally disintegrating tablets of taste masked phenclonate HCl using ion-exchange resin [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2015, 41 (6): 934-941.
- [9] 谢小亚. 盐酸帕罗西汀肠溶缓释混悬液的制备及其体内外评价 [D]. 镇江: 江苏大学, 2021.
- [10] 唐林芳, 杨亚莉, 何淑旺, 等. 阿奇霉素-离子交换树脂复合物的制备及其掩味与调控释药作用 [J]. *中国药科大学学报*, 2023, 54 (2): 180-187.
- [11] Verma U, Mujumdar A, Naik J. Preparation of efavirenz drying resinate by spray using response surface methodology and its physicochemical characterization for taste masking [J]. *Dry Technol*, 2020, 38: 5-6, 793-805.
- [12] Li CH, Han XL, Hong XX, et al. Study on the complexation and release mechanism of methylphenidate hydrochloride ion exchange resin complex [J]. *Polymers (Basel)*, 2021, 13 (24): 4394.
- [13] Khopade AJ, Halder A, Burade V, et al. Ophthalmic suspension of brimonidine for sustained delivery using nano-resin/drug complex technique [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2022, 75: 103594.
- [14] 刘玮, 丁慧, 朱宇涵, 等. 左旋多巴/盐酸苄丝肼复方药物树脂制备 [J]. *实用药物与临床*, 2015, 18 (11): 1346-1350.
- [15] 赖香萍. 盐酸美金刚口服液体缓释给药系统的构建及其体内外评价 [D]. 镇江: 江苏大学, 2022.
- [16] Fuchs A, Dressman JB. Composition and physicochemical properties of fasted - state human duodenal and jejunal fluid: a critical evaluation of the available data [J]. *J Pharm Sci*, 2014, 103 (11): 3398-3411.
- [17] Sharma M, Soni R. Improved therapeutic potential of tapentadol employing cationic exchange resins as carriers in neuropathic pain: evidence from pharmacokinetic and pharmacodynamics study [J]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1): 1-13.
- [18] 黄艳, 陈振阳, 曾环想, 等. 药物树脂复合物的表面包衣法微囊化工艺 [J]. *中国医药工业杂志*, 2020, 51 (3): 381-386.
- [19] Rajesh AM, Popat KM. Taste masking of azithromycin by resin complex and sustained release through interpenetrating polymer network with functionalized biopolymers [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2017, 43 (5): 732-741.
- [20] 陈超. 盐酸可乐定口服液体缓释给药系统的构建及其体内外评价 [D]. 镇江: 江苏大学, 2020.

(收稿日期: 2023-12-15; 修回日期: 2024-03-18)

聚乙二醇修饰的树状大分子负载卡巴他赛的制备工艺优化及抗肿瘤活性研究

滕艺, 韩尚聪*, 孙勇 (青岛大学药学院, 山东 青岛 266071)

摘要: 目的 制备一种高效递送卡巴他赛 (CTX) 的聚乙二醇 (PEG) 修饰树状大分子递送胶束 (mPEG-PAMAM), 优化处方和制备工艺。方法 聚酰胺-胺树状大分子 (PAMAM) 与 PEG 发生迈克尔加成反应得到 mPEG-PAMAM 胶束, 经纳米沉淀法进行药物装载, 通过红外光谱、核磁共振氢谱鉴定合成材料的结构; 通过透射电镜和激光粒度仪观察载药胶束的外貌形态并测定其粒径、电位; 高效液相色谱法测定其载药量、包封率等; 通过 MTT 等实验考察其细胞毒性, 共聚焦显微镜探究其细胞摄取情况; 在动物水平上注射 RM-1 前列腺癌细胞构建小鼠肿瘤模型, 探究其整体抑瘤能力。结果 mPEG-PAMAM@CTX 胶束呈较规则的球形, 平均粒径 (162.8±0.7) nm, 载药量 6.58%, 包封率 61.12%, 48 h 内药物累计释放量达到 86.8%; mPEG-PAMAM@CTX 具有良好的细胞摄取, 能有效地杀伤肿瘤细胞; 在体内动物模型中, CTX 经体内循环, 主要富集在肿瘤部位, 表明 CTX 能够通过 mPEG-PAMAM 胶束高效递送到 RM-1 肿瘤组织, 且肿瘤抑制率为 68.97%。结论 本研究制备的 mPEG-PAMAM@CTX 胶束能够有效提高 CTX 溶解度, 增强肿瘤抑制效果, 为难溶性药物递送的开发提供新的思路。

关键词: 卡巴他赛; 树状大分子; 胶束; 肿瘤抑制

中图分类号: R943, R96 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)06-1470-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.012

Optimization of preparation and antitumor activity of PEGylated dendrimer loaded cabazitaxel

TENG Yi, HAN Shang-cong*, SUN Yong (School of Pharmacy, Qingdao University, Qingdao Shandong 266071)

Abstract: Objective To prepare PEGylated dendrimer delivery micelles (mPEG-PAMAM) with high efficiency delivery of cabazitaxel (CTX), and optimize its formulation and preparation. **Methods** mPEG-PAMAM micelles were obtained by the Michael addition reaction of polyamide-amine dendrimer (PAMAM) with PEG. After the drug loading by nanoprecipitation method, the structure of mPEG-PAMAM was identified by IR and ¹H NMR. The morphology, particle size and potential of the drug-loaded micelles were observed by transmission electron microscope and dynamic light scattering, and the drug loading and encapsulation efficiency were determined by HPLC. The cytotoxicity was determined by MTT assay and the cellular uptake of drug-loaded micelles by confocal microscopy. The mouse tumor model was established by injecting RM-1 prostate cancer cells at the animal level to determine the overall tumor inhibition ability. **Results** mPEG-PAMAM@CTX micelles had regular sphere with an average particle size of (162.8±0.7) nm, drug loading of 6.58%, and encapsulation efficiency of 61.12%. The drug release reached 86.8% within 48 h. mPEG-PAMAM@CTX had good cell uptake and effectively killed tumor cells. In the in vivo animal models, CTX mainly enriched in the tumor site through in vivo circulation, indicating efficient delivery of CTX to RM-1 tumor tissue by mPEG-PAMAM micelles, with the tumor inhibition rate of 68.97%. **Conclusion** The mPEG-PAMAM@CTX micellar prepared in this study can

基金项目: 青岛市关键技术攻关及产业化示范项目 (No.23-3-3-hygg-25-hy)。

作者简介: 滕艺, 女, 硕士, 主要从事胶束载体研发, email: tengtengyiyi@163.com *通信作者: 韩尚聪, 男, 副教授, 主要从事药物研发与工程化研究, email: hsc00111@163.com

effectively improve the solubility of CTX and enhance tumor inhibition, which provides new ideas for the development of drug delivery with poor solubility.

Key words: cabazitaxel; polyamide-amine dendrimer; micelle; tumor inhibition

前列腺癌作为威胁男性健康最常见的恶性肿瘤之一，其发病率逐年增加^[1]。由于前列腺癌的自身限制性，化学疗法成为临床治疗的主要方式。卡巴他赛 (cabazitaxel, CTX) 作为第二代紫杉烷类抗肿瘤药物，是一类半合成紫杉烷衍生物，CTX 与 P-糖蛋白亲和力较低，因此不易产生耐药性，临床上已被批准用于多西他赛 (docetaxel) 化疗失败后的转移性去势抵抗性前列腺癌患者^[2-4]。CTX 除了影响肿瘤细胞有丝分裂，也可以直接促进巨噬细胞进行程序性清除，从而抑制肿瘤细胞的发展和转移^[5]。尽管 CTX 抗肿瘤活性很高，但是其水溶性很差。目前唯一上市的 CTX 的商业产品 JEVTANA，在配方中使用了大量的吐温 80 作为助溶剂以提高 CTX 的溶解性，这大大增加了胃肠道紊乱、中性粒细胞减少和严重过敏的风险^[6-7]，因此构建一种安全递送 CTX 的载体成为了减少临床不良反应的关键。

近年来，随着纳米技术的不断发展，纳米载体被广泛应用于药物递送领域。树枝状聚合物是一种单分散性、高度规则、高度支化的三维结构的大分子^[8-9]，其独特的结构和性质在相关领域备受关注。澳大利亚 Starpharma 公司的 DEP (Dendrimer Enhanced Product) 就基于可生物降解的树状大分子包载和递送药物的技术平台将多个药物推上了临床阶段^[10-11]，DEP 将抗肿瘤药物通过化学链接在五代聚赖氨酸树状大分子上，提高了药物的溶解性，与单纯使用 docetaxel 相比，DEP docetaxel 对乳腺癌、前列腺癌和肺癌等肿瘤的治疗效果更优异，并且降低了由于添加表面活性剂所带来的毒性^[12-14]。

聚酰胺-胺树状大分子 (PAMAM) 是许多分子化合物的首选载体之一，这是因为 PAMAM 具有粒径均一、可修饰性高、水溶性好等特点^[15-16]，既可用于基因传递和免疫传感器，也可以在癌症治疗中作为纳米载体。基于 PAMAM 的纳米载体不仅可以调节药物的药动学特性^[17-18]，还可以为靶向癌症治疗提供机会^[19]。但在 PAMAM 高效的药物递送能力下，其表面氨基所带来的阳离子生物毒性也是不可忽视的^[20-21]，通过对 PAMAM 进行功能化修饰，能够在增加临床作用的同时有效降低毒副作用。

基于以上的研究背景，本课题采用了经 PEG 修饰的第四代 PAMAM 作为药物载体，通过物理包埋的方式递送 CTX 治疗前列腺癌，该递送技

术具有低毒性，增加药物长循环以及增加肿瘤部位的药物蓄积等优点，现报道如下。

1 材料

1.1 试药

PAMAM (威海晨源分子新材料有限公司, G = 4.0, 分子量: 14 215 Da, 批号: 2002, 纯度: 98% ~ 99%); mPEG-NHS (上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 分子量: 2000 Da); 二水合磷酸二氢钠 (CAS: 13472-35-0)、磷酸氢二钠 (CAS: 10039-32-4) (上海麦克林生化科技股份有限公司); CTX (无锡紫杉药业股份有限公司, 批号: 598220301, 纯度: 99.3%); Cy5 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司, CAS: C266403); H&E 染色液、组织固定液 (赛维尔生物科技有限公司); TUNEL 凋亡试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司)。

1.2 仪器

Epsilon 2-4 LSC plus 冷冻干燥机 (德国 Christ 公司); Nicolet iS5 傅里叶红外光谱仪 (Thermo 世尔科技公司); JNM-ECZ600R/S1 核磁共振仪、JSM-6490LA 透射电子显微镜 (日本电子株式会社); Nano ZS90 马尔文激光粒度仪 (英国马尔文帕纳科公司); 1260 Infinity 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); DSC-Q20 差示扫描量热仪 (美国 Waters 公司); 奥林巴斯倒置荧光显微镜 (日本奥林巴斯株式会社); 快速超高分辨率共聚焦显微镜 (德国徕卡生物系统有限公司); 小动物近红外成像系统 (美国 PerkinElmer 公司)。

1.3 动物

40 只 SPF 级健康 BALB/c 雄性小鼠，5 周龄，体重 (19.41 ± 0.41) g [浙江维通利华实验动物技术有限公司，动物生产许可证号: SCXK (浙) 2019-0001]。于青岛大学动物中心喂养，动物房条件，空调温度调节为 (23 ± 1) °C，湿度保持在 (55 ± 5) %。动物实验经青岛大学实验动物福利伦理委员会批准 (20230811BALB/c4020230925124)。

2 方法与结果

2.1 mPEG-PAMAM 的合成

将 PAMAM 与 mPEG-NHS 按照 1 : 64 的摩尔比溶解在磷酸盐缓冲液 (PBS) 中，室温搅拌 48 h，透析除去未反应的 mPEG-NHS，用薄层色谱 (TLC) 监测反应进程^[22]，冷冻干燥回收产物，得到白色疏

松粉末。产物用红外光谱、氢谱表征。如图 1A 所示, 在红外谱图中, mPEG-NHS 在 1769 cm^{-1} 处有羰基吸收峰, 偶联 PAMAM 后, 该峰消失, 与 PAMAM 原有的酰胺结构的吸收峰重叠, 同时在 mPEG-NHS 中 1098 cm^{-1} 与产物 mPEG-PAMAM 中 1101 cm^{-1} 处均出现 PEG 中的醚键特征峰, 证明 mPEG-NHS 与 PAMAM 成功偶联。核磁谱图 1B 显示, 3.66 是 mPEG-NHS 的 $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ 质子化学位移峰, 3.34 为 $-\text{OCH}_3$ 的特征峰; PAMAM 的特征质子峰化学位移值在 $2.38 \sim 2.95$ 。产物的核磁谱图中同时具有 PAMAM 和 mPEG-NHS 的特征质子峰, 结合红外谱图结果可知, 两者已成功偶联。根据峰面积归一化法, 得到 PEG 的接枝率为 92.23% 。

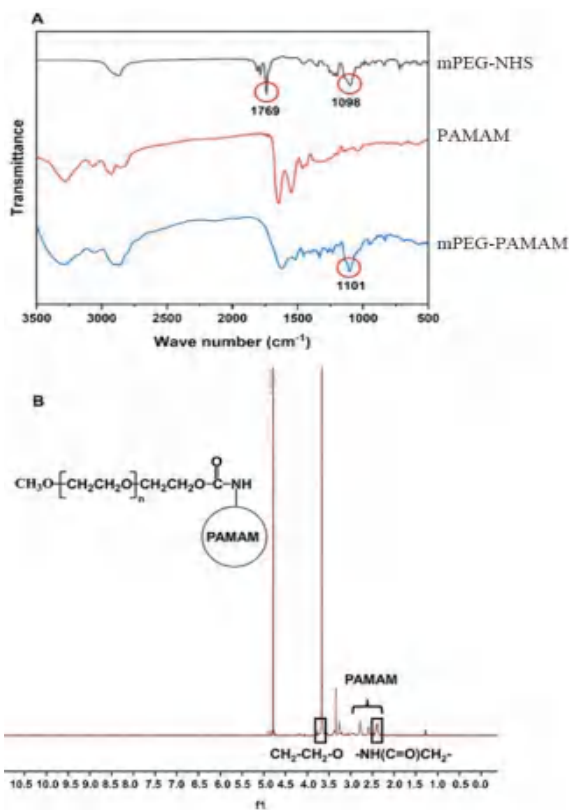


图 1 mPEG-PAMAM 的 FT-IR 光谱 (A) 以及 ^1H NMR 图谱 (B)
Fig 1 FT-IR (A) and ^1H NMR (B) of mPEG-PAMAM

2.2 聚合物载药胶束的制备

采用改进后的纳米沉淀法制备 PEG 修饰的 PAMAM 载药胶束^[23]。将 CTX 溶解在甲醇中, 逐滴加入溶解于水中的 mPEG-PAMAM 中, 室温搅拌 48 h, 减压条件下除掉有机溶剂, 低速离心过滤除未包封的药物, 收集沉淀与上清液。将沉淀冷冻干燥得载药胶束 mPEG-PAMAM@CTX 并于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 密封保存。采用高效液相色谱法 (HPLC) 来检测载药胶束的载药量 (DL) 和包封率 (EE)。 $EE(\%) = (\text{投药量} - \text{游离药物含量}) / \text{投药量} \times 100\%$; $DL(\%) = (\text{投药量} - \text{游离药物含量}) /$

载药胶束总质量 $\times 100\%$ 。

2.3 含量测定

2.3.1 色谱条件 流动相: 乙腈:水 = 60:40; 检测波长: 230 nm ; 色谱柱: Agilent ZORBAXSB-C18 柱 ($4.6\text{ mm} \times 150\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$); 流速: $1.0\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温: $30\text{ }^\circ\text{C}$; 进样量: $20\text{ }\mu\text{L}$ 。

2.3.2 专属性考察 精密量取 CTX 原料药和 mPEG-PAMAM@CTX 胶束溶液到量瓶中, 加甲醇溶解定容配制成 $100\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药物, 同时制备 mPEG-PAMAM 空白胶束样品。按照“2.3.1”项下色谱条件进样检测, 记录相应的色谱图。结果见图 2, CTX 对照品与 mPEG-PAMAM@CTX 在相同时间点出现同一色谱峰, 空白胶束样品无干扰。

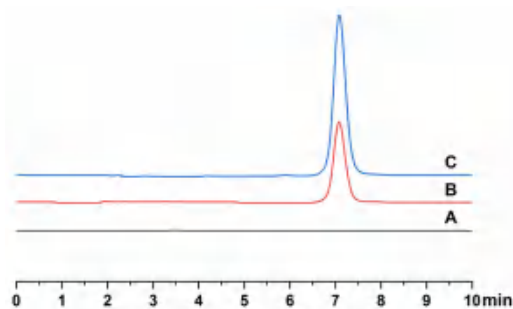


图 2 mPEG-PAMAM (A)、CTX 对照品 (B) 及 mPEG-PAMAM@CTX (C) 的 HPLC 图

Fig 2 HPLC chromatogram of mPEG-PAMAM (A), CTX reference (B), and mPEG-PAMAM@CTX (C)

2.4 载药胶束工艺处方的优化

对方工艺中影响较大的 5 个单因素: 有机溶剂的种类、药载比 (CTX 和 mPEG-PAMAM 的投料比值)、有机相体积、水相体积以及搅拌器的转速进行考察。在保持其他因素条件相同的情况下, 将考察因素作为单一变量因子, 并以载药量和包封率作为评价指标, 结果见表 1。

根据单因素考察结果, 主要影响因素为药质比 (A)、有机相体积 (B)、水相体积 (C) 和转速 (D), 见表 2。为了优化载药胶束的制备处方和工艺, 进行了正交实验。选取的药载比为 9:1、10:1 和 11:1, 有机相体积为 50、100、150 μL , 转速为 800、1000、1200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 水相体积为 10、20、30 mL 为考察对象, 使用 $[\text{L}_9(3^4)]$ 正交表, 设计四因素三水平的正交实验, 以包封率比重的 30% 加载药量比重的 70% 作为综合评价指标进行考察, 结果见表 3。经过极差分析, 各影响因素对载药胶束的影响顺序为 $A > D > B > C$ 。最终确定 mPEG-PAMAM@CTX 载药胶束制备的最佳工艺和处方为 $A_2B_2C_2D_3$, 即 mPEG-PAMAM 与 CTX 的投料质量比例为 10:1, 有机相体积为 $100\text{ }\mu\text{L}$, 转速为 $1000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 水相

体积为 30 mL。按筛选的最佳工艺制备 3 批 mPEG-PAMAM@CTX 载药胶束，得到包封率和载药量分别为 $(61.12 \pm 3.64)\%$ 和 $(6.58 \pm 0.19)\%$ ，表明筛选得到的最佳制备工艺稳定性和重现性良好。

表 1 单因素实验结果
Tab 1 Single factor test

因素	变量	EE/%	DL/%
有机溶剂	乙腈	50.66	5.07
	丙酮	52.90	5.37
	氯仿	59.01	6.16
药载比	甲醇	59.42	6.80
	7 : 1	25.14	3.69
	8 : 1	37.60	2.07
	9 : 1	45.17	5.94
	10 : 1	63.05	6.68
有机相体积 / μL	11 : 1	54.12	4.83
	50	45.37	3.71
	100	43.75	3.98
	150	55.20	5.86
	200	41.04	2.83
水相体积 /mL	250	32.85	2.75
	10	36.41	3.65
	20	46.23	3.58
	30	37.12	3.12
	40	29.18	2.23
转速 / $(\text{r} \cdot \text{min}^{-1})$	50	31.25	2.41
	800	36.12	3.54
	1000	49.58	5.28
	1200	42.35	4.32
	1400	31.69	3.17

表 2 正交实验水平因素表

Tab 2 Level and factor of orthogonal test

水平	因素			
	A. mPEG-PAMAM : CTX	B. 有机相体积 / μL	C. 转速 / $(\text{r} \cdot \text{min}^{-1})$	D. 水相体积 /mL
1	9 : 1	50	800	10
2	10 : 1	100	1000	20
3	11 : 1	150	1200	30

表 3 正交实验结果

Tab 3 Orthogonal test

序号	A	B	C	D	EE/%	DL/%	综合评分
1	1	1	1	1	41.15	4.48	15.48
2	1	2	2	2	38.97	4.03	14.51
3	1	3	3	3	40.66	3.67	14.77
4	2	1	3	2	40.31	6.01	16.30
5	2	2	2	3	58.14	6.53	22.01
6	2	3	1	1	55.42	5.67	20.60
7	3	1	2	3	50.16	5.01	18.56
8	3	2	3	1	50.28	5.87	19.19
9	3	3	1	2	48.44	4.03	17.35
K_1	14.92	16.78	17.81	18.42			
K_2	19.64	18.57	18.36	16.05			
K_3	18.37	17.57	16.75	18.45			
R	4.72	1.79	1.61	2.40			

2.5 载药胶束表征

使用马尔文激光粒度仪 (DLS) 测定 mPEG-PAMAM@CTX 的粒径及电位，结果表明载药胶束的粒径为 (162.8 ± 0.7) nm。透射电子显微镜 (TEM) 观察载药胶束的形态，结果显示 mPEG-PAMAM@CTX 均呈圆整球形或类球形，干态下的胶束粒径约为 20 nm (见图 3A、B)。综合粒径分布和 TEM 结果可知，载药胶束的分散性均较好且无团聚现象。

使用差示扫描量热仪 (DSC) 对载药胶束进行检测，以验证胶束是否成功包载药物。如图 3C 所示，CTX 的吸热峰在 156°C 左右，而 mPEG-PAMAM 在 50°C 左右出现吸收峰，CTX 与 mPEG-PAMAM 的物理混合物在这两处均有吸收峰，表明这两组样品在物理混合过程中未发生相互反应，而 mPEG-PAMAM@CTX 的吸收峰位置与空白胶束大致相同，并且未观察到 CTX 的特征热吸收峰，说明 CTX 已经被成功包载于 mPEG-PAMAM 胶束体系中。

2.6 mPEG-PAMAM@CTX 胶束稳定性和体外释放考察

分别测定 mPEG-PAMAM@CTX 胶束体系在 72 h 内在不同介质 [纯水、PBS 和 10% 胎牛血清 (FBS)] 中的粒径变化，结果见图 4A、B。载药胶束在纯水、PBS 中时，其粒径均未发生明显的变化。mPEG-PAMAM@CTX 在模拟的体内血清环境中也具有相对稳定的粒径变化，表明其保持了良好的分散性和均一性。

根据临床 CTX 注射液溶剂配方 JEVTANA 配制 Tween-80@CTX^[24]。分别探究了 Tween-80@CTX 与 mPEG-PAMAM@CTX 载药胶束的体外释放情况。结果见图 4C，Tween-80@CTX 在模拟体内的生理条件下，12 h 内基本释放完全，而 mPEG-PAMAM@CTX 体系中表现出良好的缓释现象。48 h 约累计释放 86.8% 的药物并开始趋于平稳，依靠这种体内的缓释作用，有利于延长药物在体内的作用时间。

2.7 生物相容性考察

以 0.1% Triton X-100 为阳性对照，生理盐水为阴性对照，结果如图 5A、B 所示。Tween-80@CTX 组在高浓度下具有明显的溶血反应，而 mPEG-PAMAM@CTX 未观察到明显的溶血反应。表明 mPEG-PAMAM@CTX 具有良好的生物相容性，可通过静脉注射的方式给药。

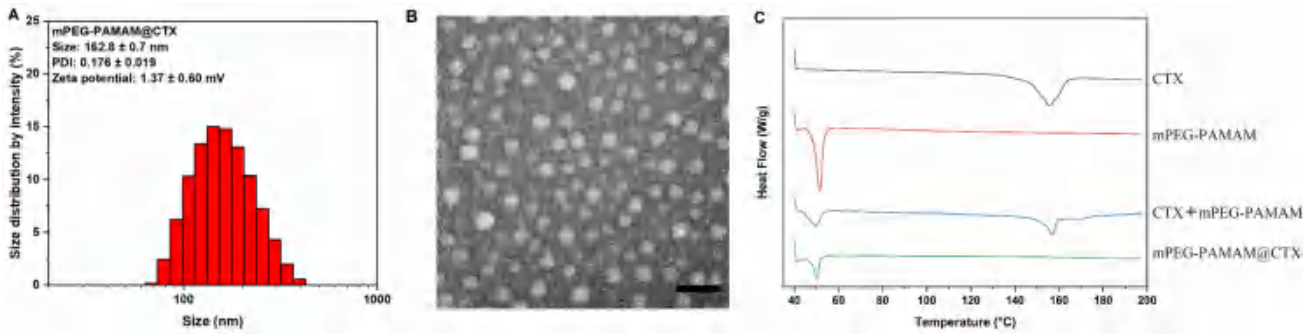


图 3 mPEG-PAMAM@CTX 的表征

Fig 3 Characterization of mPEG-PAMAM@CTX

A. mPEG-PAMAM@CTX 的粒径电位图 (particle size and Zeta potential of mPEG-PAMAM@CTX); B. mPEG-PAMAM@CTX 电镜图, 比例尺为 100 nm (TEM of mPEG-PAMAM@CTX, scale bar was 100 nm); C. 样品的 DSC 曲线 (DSC curves of the samples)

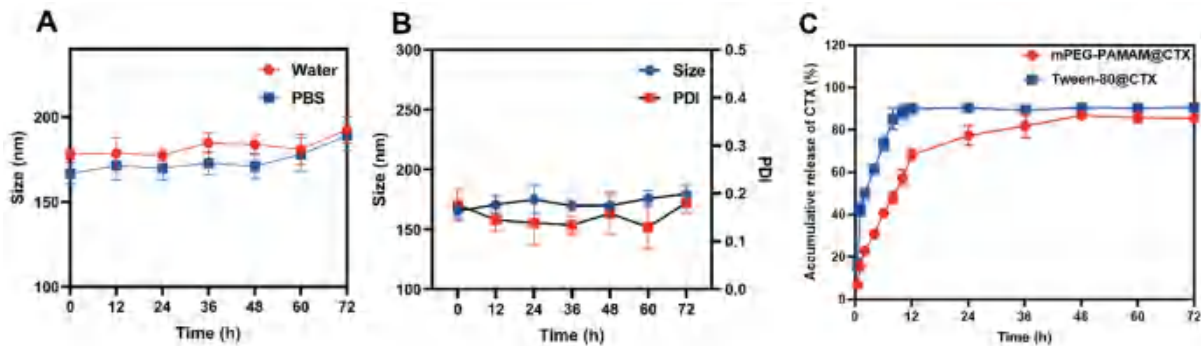


图 4 mPEG-PAMAM@CTX 胶束稳定性和体外药物释放 ($n = 3$)

Fig 4 mPEG-PAMAM@CTX micelle stability and in vitro release ($n = 3$)

A. mPEG-PAMAM 在水和 PBS 中的粒径稳定性 (particle size stability of mPEG-PAMAM in water and PBS); B. mPEG-PAMAM@CTX 在 10%FBS 中的粒径稳定性 (particle size stability of mPEG-PAMAM in 10%FBS); C. 载药胶束的药物释放 (drug release from drug-loaded micelles)

采用 MTT 法测定各制剂组对 RM-1 细胞的细胞毒性。结果如图 5C 所示, Tween-80@CTX 和 mPEG-PAMAM@CTX 对于肿瘤细胞的杀伤作用都随着 CTX 浓度的升高而增大, 具有浓度依赖性。mPEG-PAMAM@CTX 对 RM-1 细胞毒性更大, 说明将 CTX 包封在聚合物胶束里能提高其对肿瘤细胞的杀伤效果, 这可能是由于通过内吞机制增强了被包裹在聚合物纳米胶束中的 CTX 的摄取, 从而增加了细胞质中 CTX 的浓度。

此外, 对 RM-1 细胞进行 Calcein-AM/PI 细胞活死染色法进一步探究各制剂的细胞毒性情况, 结果如图 5D 所示, mPEG-PAMAM@CTX 组红色荧光强于 Tween-80@CTX 组, 表明 mPEG-PAMAM@CTX 组具有更强的细胞毒性, 这与 MTT 实验结果一致。以上结果均表明, mPEG-PAMAM@CTX 通过载体形式提高了 CTX 对肿瘤细胞的杀伤作用, 对于肿瘤治疗有望发挥更加优良的作用。

2.8 细胞摄取能力实验

在 RM-1 细胞中分别加入 5-FAM、Tween-80@FAM 和 mPEG-PAMAM@FAM (5-FAM 质量浓度: $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 待其与细胞分别共孵育 2、4、6 h 后,

加入 DAPI 染色工作液 ($2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 观察细胞对药物的摄取情况。如图 6 所示, 相较于阴性对照组, Tween-80@FAM 及 mPEG-PAMAM@FAM 组观察到较强的绿色荧光, 且 mPEG-PAMAM@FAM 组绿色荧光更强, 表明胶束递送体系具有更优良的被细胞摄取的能力, 且绿色荧光强度随着时间的延长而增加。比较 2 h 和 4 h 的荧光强度, 4 h 时的细胞摄取量明显比 2 h 的高, 说明了细胞摄取具有一定的时间依赖性。这表明了 mPEG-PAMAM 纳米胶束展现出更优良的递送作用, 具备良好的被细胞摄取能力。

2.9 肿瘤模型的构建

20 只 5 周龄的 BALB/c 雌性小鼠待饲养稳定后, 经皮下注射 RM-1 细胞建立小鼠肿瘤模型来研究载药胶束在生物体内的抗肿瘤作用。将 RM-1 细胞以 $100 \mu\text{L}$ 的细胞悬液 (浓度: $1.5 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$) 注射于小鼠右侧腹部股沟的位置, 待肿瘤体积长至 100 mm^3 即为造模成功。

2.10 体内分布评价

为了观察载药胶束在体内的分布情况, 对小鼠尾静脉注射后进行小动物活体成像。分别设置

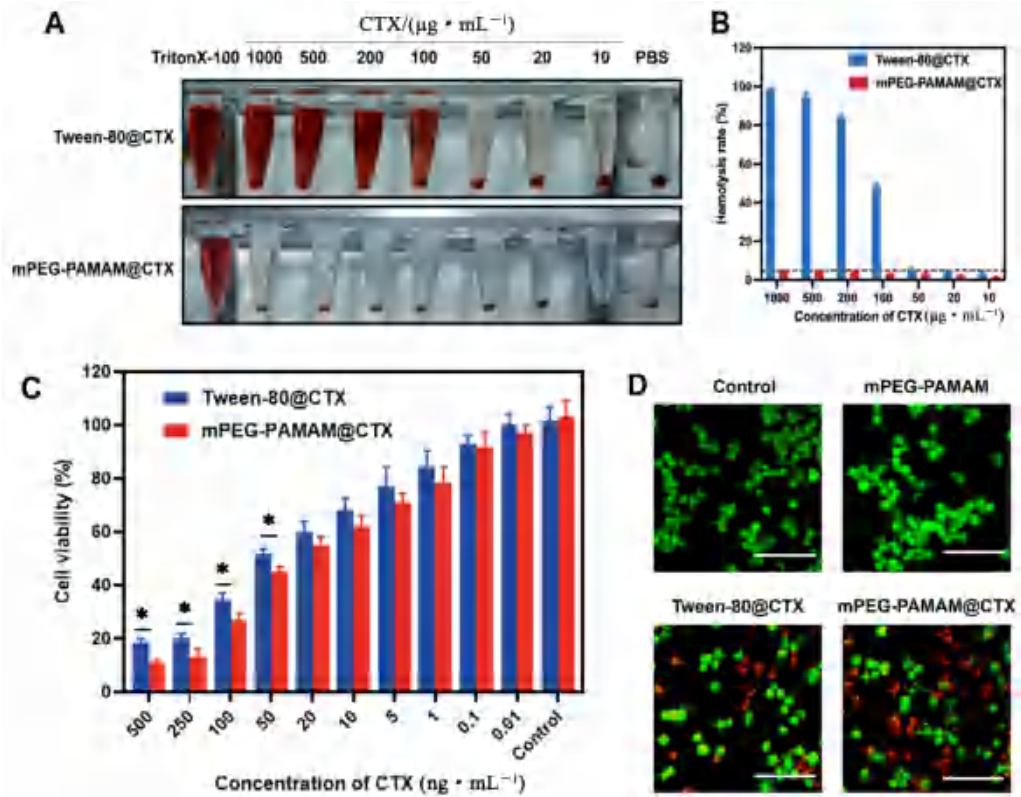


图 5 Tween-80@CTX 和 mPEG-PAMAM@CTX 的生物相容性考察

Fig 5 Biocompatibility of Tween-80@CTX and mPEG-PAMAM@CTX

A. 溶血图片 (picture of hemolysis); B. 溶血率 (hemolysis rate); C. MTT 结果 (MTT results); D. 细胞活死染色图, 比例尺为 100 μm (live and dead staining images, scale bar was 100 μm)

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

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

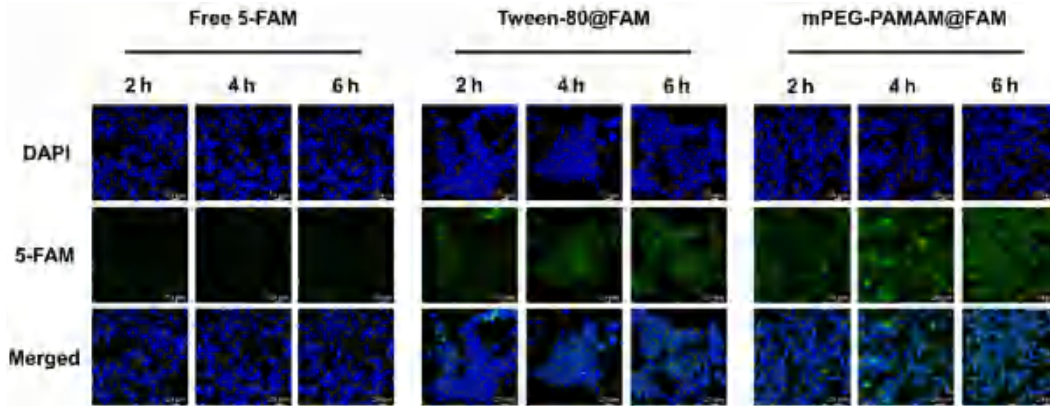


图 6 不同制剂组的细胞摄取共聚焦图片 ($\times 20 \mu\text{m}$)

Fig 6 Confocal images of cell uptake in different preparation groups ($\times 20 \mu\text{m}$)

了 Tween-80@Cy5 组和 mPEG-PAMAM@Cy5 组, 称取 Cy5 用无水乙醇充分溶解形成均一分散液后, 加入 Tween-80 充分混匀, 通过冷冻干燥除掉乙醇, 得到 Tween-80@Cy5 组。将 Cy5 溶解在甲醇中, 逐滴加入到溶解于水中的 mPEG-PAMAM 中, 室温搅拌 48 h, 减压条件下除掉有机溶剂, 低速离心过滤除未包封的 Cy5, 得到 mPEG-PAMAM@Cy5 组通过小动物活体成像系统在 3、6、9、12

和 24 h 观察药物在体内的分布情况。在给药 24 h 后将小鼠脱颈处死, 将主要器官和肿瘤组织取出, 检测药物在主要器官组织内的荧光强度。结果如图 7A 所示, mPEG-PAMAM@Cy5 组在肿瘤部位的富集明显高于 Tween-80@Cy5 组。在给药 24 h 后, 对离体器官进行成像, 如图 7B, 实验结果同体内成像一致, mPEG-PAMAM@Cy5 组在肾脏中也可以观察到荧光信号, 说明 mPEG-PAMAM@

Cy5 载体系统最终可能经过肾脏代谢排出。综合以上实验结果,高渗透长滞留效应(EPR)效应促进了胶束等体系在肿瘤部位的蓄积,表明 mPEG-PAMAM 胶束载体可以发挥靶向作用递送 CTX 到达肿瘤部位。

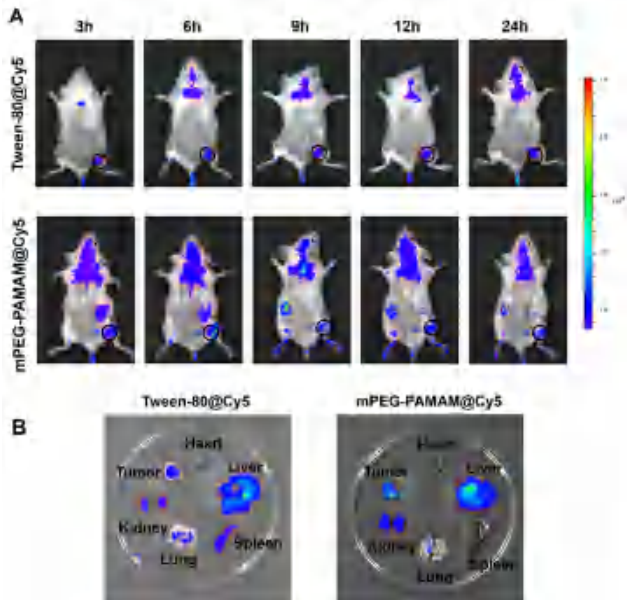


图 7 给药后小鼠体内(A)和离体器官(B)的荧光成像图

Fig 7 Fluorescence imaging of vivo (A) and isolated organs (B) in mice after administration

2.11 体内抗肿瘤作用研究

将荷瘤小鼠随机分为 4 组 ($n = 5$), 分别为 mPEG-PAMAM@CTX 组, Tween-80@CTX 组, mPEG-PAMAM 组和生理盐水 (Saline) 组。分别在第 0、4、8、12、16 日时通过尾静脉注射给予各组溶液 (CTX: $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, mPEG-PAMAM: $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。治疗过程如图 8A 所示, 每两日对小鼠的体重和肿瘤的长与宽进行测量, 计算小鼠的肿瘤体积, 见公式 (1)。实验结束后, 对各组小鼠进行脱颈处死, 取肿瘤组织称取质量并计算肿瘤抑制率, 见公式 (2)。

$$\text{肿瘤体积}(V) = (L_{\text{肿瘤长径}} \times D_{\text{肿瘤短径}}^2) / 2 \quad (1)$$

$$\text{肿瘤抑制率}(\%) = (m_{\text{对照组}} - m_{\text{实验组}}) / m_{\text{对照组}} \times 100\% \quad (2)$$

如图 8B 所示, Tween-80@CTX 组小鼠的体重减轻, 表明 Tween-80 作为助溶剂可能对机体产生了一定的生物毒性, 但 mPEG-PAMAM@CTX 组与 Saline 组相比并未出现体重减轻的现象。肿瘤的生长情况如图 8C、D 所示, mPEG-PAMAM 组同 Saline 组相比在抑制肿瘤生长方面差异无统计学意义, 而 mPEG-PAMAM@CTX 组表现出了显著的肿瘤抑制作用, mPEG-PAMAM@CTX 组的肿瘤质量较 Tween-80@CTX 的肿瘤质量要轻,

进一步表明 mPEG-PAMAM 胶束递药体系发挥出更明显的肿瘤抑制效果。肿瘤抑制率如图 8E 所示, mPEG-PAMAM@CTX 组的肿瘤抑制率高达 68.97%。对肿瘤组织剥离后, 各组肿瘤组织体积如图 8F 所示, mPEG-PAMAM@CTX 组的肿瘤体积最小。

2.12 组织分析

为进一步评价 mPEG-PAMAM@CTX 对肿瘤组织的抑制效果, 取肿瘤切片组织分别进行 H&E 染色、相关的 TUNEL 以及 Ki67 免疫组化染色。如图 9A 所示, Saline 组与 mPEG-PAMAM 组肿瘤细胞的形态完整, Tween-80@CTX 组和 mPEG-PAMAM@CTX 组观察到肿瘤细胞核固缩的现象, 肿瘤细胞的形态发生了改变。Ki67 免疫组化结果显示, mPEG-PAMAM@CTX 组中褐色阳性反应物较少, 表明治疗后肿瘤细胞具有较弱的增殖能力。TUNEL 实验中, mPEG-PAMAM@CTX 组观察到明显的红色荧光的分布, 表明 mPEG-PAMAM@CTX 组促进了肿瘤细胞的凋亡。

剖取小鼠的心、肝、脾、肺、肾, 进行 H&E 染色, 结果如图 9B 所示, 与 Saline 组相比, 各给药组主要器官的组织生理形态并没有发生明显变化, 表明各组体系未发现潜在的生物毒性。

3 讨论

本研究采用纳米沉淀法制备了用于前列腺癌治疗的 mPEG-PAMAM@CTX, 得到的胶束具有较高的载药量 (6.58%) 和包封率 (61.12%), 粒径为 (162.8 ± 0.7) nm, 该尺寸能够有效减少网状内皮系统 (RES) 的摄取, 同时 PAMAM 表面的 PEG 端也可以减少单核吞噬细胞系统对纳米颗粒的清除, 延长抗肿瘤药的血液循环。另外, mPEG-PAMAM@CTX 冻干粉在蒸馏水中分散性良好, 能够形成稳定均匀的溶液, 不含任何有机溶剂和有毒的表面活性剂, 极大地改善了游离 CTX 的溶解度低等问题。因此在静脉注射后, 载药胶束能够通过增强的渗透性和 EPR 效应优先在肿瘤病变部位积累, 靶向到肿瘤组织, 缓慢释放抗肿瘤活性药物, 减少药物对正常组织的暴露, 从而降低全身毒性, 进一步促进 CTX 的剂量强化, 提高对肿瘤的治疗效果。

mPEG-PAMAM@CTX 不仅在体外表现出更好的细胞毒性作用和肿瘤细胞摄取作用。动物实验中在体内抑制肿瘤生长方面也更为有效。此外, 免疫组织化学 H&E、Ki67 以及 TUNEL 研究表明 mPEG-PAMAM@CTX 具有增强的细胞凋亡诱导活

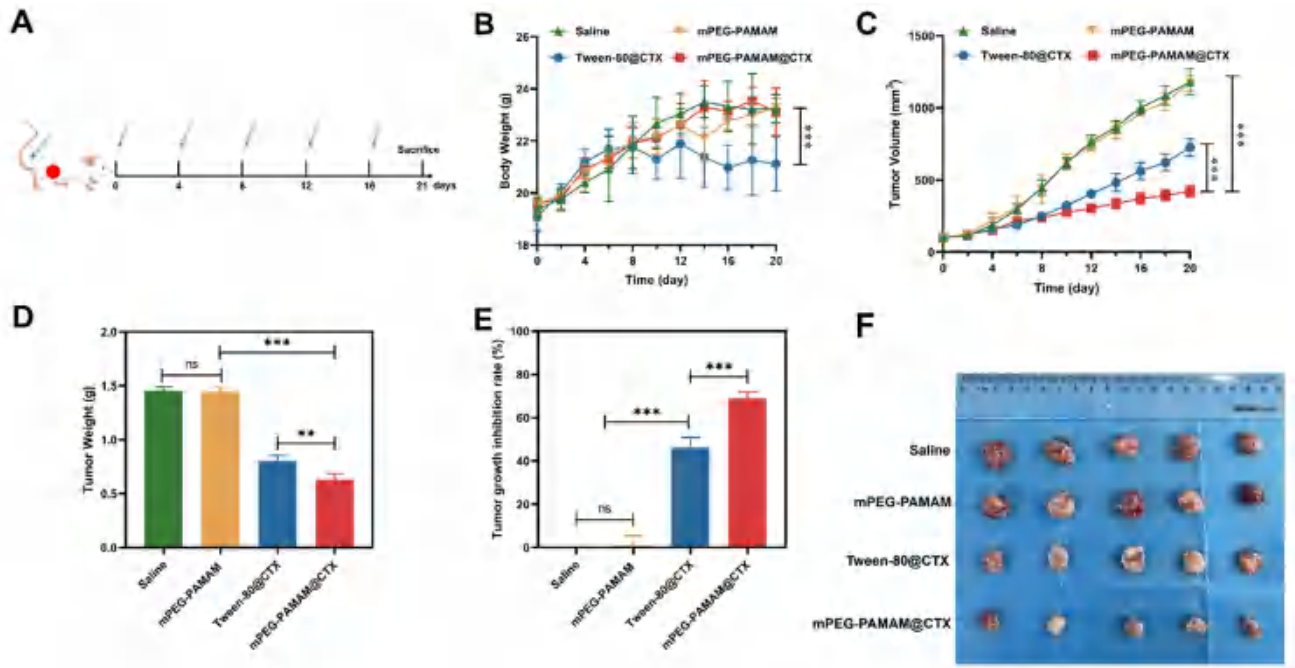


图 8 不同制剂在小鼠体内抗肿瘤作用研究

Fig 8 Antitumor effect in mice in different preparation groups

A. 小鼠皮下瘤治疗示意图 (treatment of subcutaneous tumor in mice); B. 治疗期间小鼠体重变化图 (weight change); C. 肿瘤体积生长图 (tumor volume growth); D. 肿瘤质量 (tumor quality); E. 肿瘤抑制率 (tumor inhibition rate); F. 治疗后各组离体肿瘤组织图 (picture of ex vivo tumor tissues after the treatment)

注: 与生理盐水组比较, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ 。

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

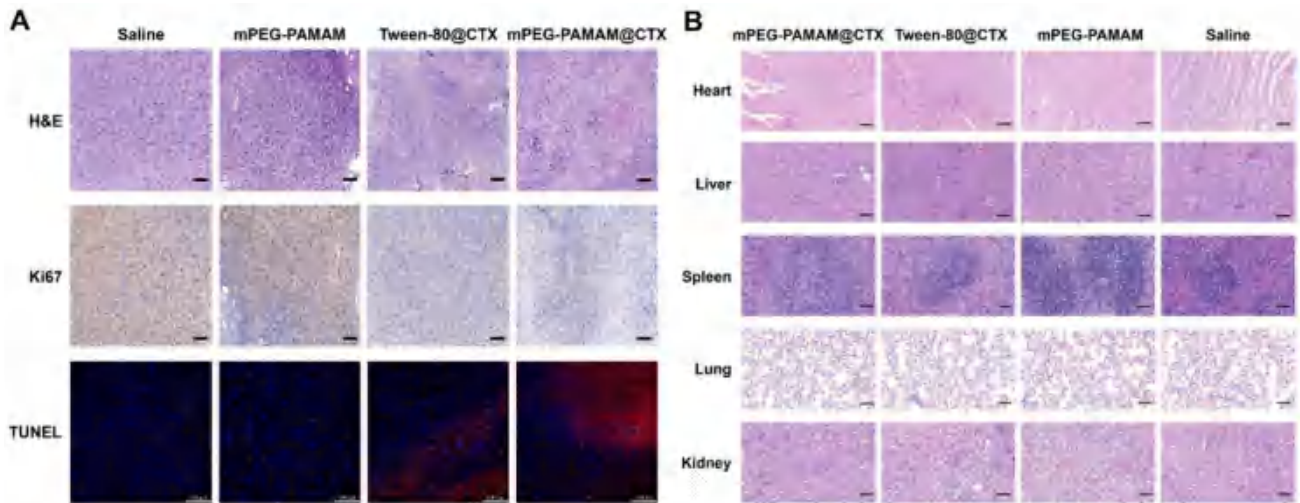


图 9 肿瘤组织的 H&E 染色、Ki67 免疫组化和 TUNEL 荧光的图片 (比例尺为 100 μm)(A) 以及小鼠主要器官的 H&E 组织染色图片 (比例尺为 50 μm)(B)

Fig 9 H&E staining, Ki67 immunohistochemistry and TUNEL fluorescence images of tumor tissue, scale bar was 100 μm (A) and H&E tissue staining images of major mouse organs, scale bar was 50 μm (B)

性。因此, mPEG-PAMAM 是一种高效且生物安全性高的纳米载体, 通过物理包埋 CTX 能够有效抑制前列腺癌细胞的增殖, 从而发挥抗肿瘤作用。

参考文献

[1] Terrisse S, Karamouza E, Parker CC, et al. Overall survival in men with bone metastases from castration-resistant

prostate cancer treated with bone-targeting radioisotopes: a meta-analysis of individual patient data from randomized clinical trials [J]. JAMA Oncol, 2020, 6 (2): 206-216.

[2] Barve A, Jain A, Liu H, et al. Enzyme-responsive polymeric micelles of cabazitaxel for prostate cancer targeted therapy [J]. Acta Biomater, 2020, 113: 501-511.
 [3] 廖蓉惠, 刘喜阳, 李黎, 等. iRGD 肽修饰的卡巴他赛白蛋白纳米粒的制备与评价 [J]. 中国药学杂志, 2023, 58

- (23): 2172-2185.
- [4] Lin JQ, Den RB, Greenspan J, et al. Phase I trial of weekly cabazitaxel with concurrent intensity modulated radiation and androgen deprivation therapy for the treatment of high-risk prostate cancer [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2020, 106 (5): 939-947.
- [5] Cao X, Li BL, Chen J, et al. Effect of cabazitaxel on macrophages improves CD47-targeted immunotherapy for triple-negative breast cancer [J]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9 (3): e002022.
- [6] Wan JQ, Huang LL, Cheng JT, et al. Balancing the stability and drug activation in adaptive nanoparticles potentiates chemotherapy in multidrug-resistant cancer [J]. *Theranostics*, 2021, 11 (9): 4137-4154.
- [7] Liu YT, Wang XH, Wang Z, et al. Reduction-responsive stearyl alcohol-cabazitaxel prodrug nanoassemblies for cancer chemotherapy [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15 (1): 262.
- [8] Li X, Vieweger M, Guo PX. Self-assembly of four generations of RNA dendrimers for drug shielding with controllable layer-by-layer release [J]. *Nanoscale*, 2020, 12 (31): 16514-16525.
- [9] Dao TN, Kim MG, Koo B, et al. Chimeric nanocomposites for the rapid and simple isolation of urinary extracellular vesicles [J]. *J Extracell Vesicles*, 2022, 11 (2): e12195.
- [10] Schito AM, Caviglia D, Piatti G, et al. Efficacy of ursolic acid-enriched water-soluble and not cytotoxic nanoparticles against enterococci [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13 (11): 1976.
- [11] Szota M, Wolski P, Carucci C, et al. Effect of ionization degree of poly (amidoamine) dendrimer and 5-fluorouracil on the efficiency of complex formation-A theoretical and experimental approach [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (1): 819.
- [12] Patterson CM, Balachander SB, Grant I, et al. Design and optimisation of dendrimer-conjugated Bcl-2/x (L) inhibitor, AZD0466, with improved therapeutic index for cancer therapy [J]. *Commun Biol*, 2021, 4 (1): 112.
- [13] Yang H. Targeted nanosystems: advances in targeted dendrimers for cancer therapy [J]. *Nanomedicine*, 2016, 12 (2): 309-16.
- [14] Mignani S, Shi XY, Rodrigues J, et al. First-in-class and best-in-class dendrimer nanoplatfroms from concept to clinic: lessons learned moving forward [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 219: 113456.
- [15] Liu FY, Wang X, Li YZ, et al. Dendrimer-modified gelatin methacrylate hydrogels carrying adipose-derived stromal/stem cells promote cartilage regeneration [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13 (1): 26.
- [16] Oki AT, Seidman D, Lancina MG, et al. Dendrimer-enabled transformation of anaplasma phagocytophilum [J]. *Microbes Infect*, 2015, 17 (11-12): 817-822.
- [17] Chen L, Liang KN, Li JS, et al. Regeneration of biomimetic hydroxyapatite on etched human enamel by anionic PAMAM template in vitro [J]. *Arch Oral Biol*, 2013, 58 (8): 975-980.
- [18] Yang J, Lu WF, Xiao JL, et al. A positron emission tomography image-guidable unimolecular micelle nanoplatfrom for cancer theranostic applications [J]. *Acta Biomater*, 2018, 79: 306-316.
- [19] Zhou ZH, Zhou PL, Yang SP, et al. Controllable synthesis of hydroxyapatite nanocrystals via a dendrimer-assisted hydrothermal process [J]. *Mater Res Bull*, 2007, 42 (9): 1611-1618.
- [20] Czerniecka-Kubicka A, Tutka P, Pyda M, et al. Stepwise glucoheptoamidation of poly (amidoamine) dendrimer G3 to tune physicochemical properties of the potential drug carrier: in vitro tests for cytosine conjugates [J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12 (5): 473.
- [21] Chen DY, Zhang P, Li MH, et al. Hyaluronic acid-modified redox-sensitive hybrid nanocomplex loading with siRNA for non-small-cell lung carcinoma therapy [J]. *Drug Deliv*, 2022, 29 (1): 574-587.
- [22] Lu YP, Han SP, Zheng H, et al. A novel RGDyC/PEG co-modified PAMAM dendrimer-loaded arsenic trioxide of glioma targeting delivery system [J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13: 5937-5952.
- [23] Wang L, Li YZ, Ren MX, et al. pH and lipase-responsive nanocarrier-mediated dual drug delivery system to treat periodontitis in diabetic rats [J]. *Bioact Mater*, 2022, 18: 254-266.
- [24] Shao YJ, Li S, Tian B, et al. Evaluation of the stability and pharmacokinetics of cabazitaxel-loaded intravenous lipid microspheres: beneficial effect of cholesterol [J]. *Eur J Lipid Sci Tech*, 2015, 117 (4): 460-470.

(收稿日期: 2023-12-05; 修回日期: 2024-03-07)

盐酸氮草斯汀鼻喷雾剂仿制药与原研药喷雾特性的比较研究

李文博^{1, 2}, 童颖^{1, 2*} (1. 武汉药品医疗器械检验所, 武汉 430075; 2. 国家药监局药物制剂质量研究与控制重点实验室, 武汉 430075)

摘要: **目的** 研究盐酸氮草斯汀鼻喷雾剂原研药与仿制药的粒径分布、喷雾形态、喷雾模式, 并评价两者喷雾特性的一致性。**方法** 采用激光粒度仪测定雾滴粒径分布, SprayVIEW 激光成像系统研究喷雾模式和喷雾形态。**结果** 原研药和仿制药在检测距离为 6 cm 处的椭圆度分别为: (1.152 ± 0.052) 、 (1.306 ± 0.049) , 喷雾面积分别为 (490.3 ± 43.6) mm²、 (365.6 ± 55.5) mm², 喷雾角度分别为 $(25.5 \pm 1.9)^\circ$ 、 $(22.4 \pm 1.0)^\circ$, 雾滴粒径分布 D_{50} 分别为 (45.01 ± 1.81) μm、 (57.39 ± 3.39) μm, D_{90} 分别为 (81.93 ± 6.83) μm、 (146.47 ± 14.05) μm, 仿制药的喷雾特性与原研药比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 盐酸氮草斯汀鼻喷雾剂原研药具有良好的喷雾特性, 仿制药与原研药存在差异性。

关键词: 盐酸氮草斯汀鼻喷雾剂; 粒径分布; 喷雾形态; 喷雾模式; 一致性

中图分类号: R94

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)06-1479-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.013

Spray characteristics between generic and original azelastine hydrochloride nasal spray

LI Wen-bo^{1, 2}, TONG Ying^{1, 2*} (1. Wuhan Institute for Drug and Medical Device Control, Wuhan 430075; 2. Key Laboratory for Quality Research and Control of Drug Products, National Medical Products Administration, Wuhan 430075)

Abstract: Objective To evaluate consistency in the spray characteristics (droplet size distribution, spray pattern, and plume geometry) of the original and generic azelastine hydrochloride nasal sprays. **Methods** The particle size distribution, spray pattern and plume geometry were determined by laser particle size analyzer and SprayVIEW laser Imaging system, respectively. **Results** The ovality ratio of the original and generic drugs detected at 6 cm distance were (1.152 ± 0.052) vs (1.306 ± 0.049) ; the spray area were (490.3 ± 43.6) mm² vs (365.6 ± 55.5) mm²; the spray angle were $(25.5 \pm 1.9)^\circ$ vs $(22.4 \pm 1.0)^\circ$; the D_{50} and D_{90} were (45.01 ± 1.81) μm vs (57.39 ± 3.39) μm, and (81.93 ± 6.83) μm vs (146.47 ± 14.05) μm, having significant differences ($P < 0.05$), respectively. **Conclusion** The original drug of azelastine hydrochloride nasal spray has a good spraying characteristics. The generic drug needs improvement.

Key words: azelastine hydrochloride nasal spray; droplet size distribution; plume geometry; spray pattern; consistency

鼻喷雾剂是一种利用给药装置将药物运送至鼻腔黏膜进而发挥局部或全身治疗作用的剂型, 属于一种药械组合产品。与其他给药方式相比, 具有能够直接作用于鼻腔黏膜, 起效快且毒副作用小; 无首过效应以及肠道降解效应, 生物利用度高; 使用方便, 患者顺应性强; 可使药物跨过

血脑屏障在脑内发挥作用等优势^[1-3]。

鼻喷雾剂由于给药剂量小, 多应用于局部给药, 常规的体内生物等效性试验难以准确地进行一致性评价, 需要结合一定的体外研究。美国食品药品监督管理局 (FDA) 在《局部作用鼻气雾剂和鼻喷雾剂的生物利用度及生物等效性试验指南》

基金项目: 国家药监局药物制剂质量研究与控制重点实验室开放课题 (No.YWZJQN-202202)。

作者简介: 李文博, 男, 主管药师, 主要从事药物制剂质量研究与控制方面的研究, email: 781623212@qq.com * 通信作者: 童颖, 女, 主管药师, 主要从事药物制剂质量研究与控制方面的研究, email: tongying_cpu@126.com

草案^[4]及《特定药物的生物等效性指导原则》^[5-6]中均建议等效性试验时进行体外研究,其中喷雾特性是重点。另外质量控制方面,美国药典(USP)也将喷雾特性列入质量标准中^[7-9]。目前国内的体外研究主要集中在理化性质,递送均一性,递送总量等方面^[10],尚未将雾滴粒径分布、喷雾模式及喷雾形态等喷雾特性作为评价目标。

盐酸氮草斯汀为H₁受体拮抗剂,具有很强的抗过敏和抗炎作用,其鼻喷雾剂是治疗过敏性鼻炎的一线药物^[11-12]。本研究以盐酸氮草斯汀鼻喷雾剂为研究对象,对其原研药和仿制药的喷雾特性进行测定,以为鼻喷雾剂的质量控制和一致性研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

SprayVIEW 激光成像系统(含 ProverisVereo 自动触发器)(美国 Proveris 公司),HELOS-RODOS 激光粒度仪(含 SPRAYER 分散系统和 Kraftaktuator 自动触发器)(德国 Sympatec 公司),HAAKE MARS III 流变仪(德国 ThermoFisher Scientific 公司)。

1.2 试药

原研药:盐酸氮草斯汀鼻喷雾剂(MEDA Pharma GmbH&Co.KG,规格:10 mg/10 mL;每喷含药 0.14 mg,60 喷;批号:F2202873、F2300990、F2203467),仿制药:盐酸氮草斯汀鼻喷雾剂(国内某厂,规格:10 mg/10 mL;每喷含药 0.07 mg,140 喷;批号:220907、220908、221001)。

2 方法与结果

2.1 雾滴粒径分布

2.1.1 测量方法 雾滴粒径的分布影响鼻喷雾剂的有效性和安全性,粒径过小(< 10 μm)则药物可能被吸入肺中引起安全性问题,粒径过大(> 120 μm)则药物主要沉积于鼻前庭,不能到达药用部位^[2, 13]。主要的测定参数为D₁₀、D₅₀、D₉₀、分布跨度(Span) [(D₉₀ - D₁₀)/D₅₀]及小于10 μm 喷雾液滴所占的百分比。

采用 HELOS-RODOS 激光粒度仪,将鼻喷雾剂弃去前 5 喷,用第 6~8 喷校正喷雾行程,测试第 9~11 喷。触发力启动时间为 0.2 s,维持时间为 0.1 s,镜头参数为 4.5~875 μm,触发力为 50 N,于 3 cm 和 6 cm 处测试。

2.1.2 测量结果 原研药和仿制药各取 3 个批次,每个批次各取 3 瓶,平行测试 3 喷。具体结果见表 1、典型图谱如图 1 所示。由表 1 可知,原研药和仿制药小于 10 μm 喷雾液滴数占百分比均小于 3.0%,说明至少 97.0% 的喷雾液滴大于 10 μm,根据《中国药典》2020 年版对鼻用制剂的要求,鼻喷雾剂喷出的雾滴粒子绝大多数应大于 10 μm^[10],

原研药和仿制药均符合药典的规定。相关研究报告^[13],D₅₀的推荐范围为 30~120 μm,表 1 数据显示,在 3 cm 和 6 cm 检测距离下,原研药和仿制药的 D₅₀ 均在推荐范围内。但在累积分布 D₉₀ 水平上,仿制药的雾滴粒径明显大于原研药,图 1 结果显示,仿制药约有 20% 的雾滴粒径在 120 μm 以上,而原研药的仅约 3%,说明仿制药的大粒径雾滴较多,可能会使部分药液沉积在鼻前庭,降低疗效。Dayal 等^[14]的研究表明,影响雾滴粒径的主要因素有制剂的黏度、喷雾泵、驱动装置等,在这些因素中黏度的影响最大,其次是喷雾泵。随着制剂黏度的增加,雾滴粒径也随之增加,且 D₉₀ 的增加趋势最为明显。喷雾泵直径、形状和长度会影响液体的压缩力、摩擦力和喷射速度等,进而影响其液滴粒径。本研究中原研药和仿制药的黏度分别为 2.4 mPa·s、3.3 mPa·s,仿制药雾滴粒径较大,可能与处方黏度较大有关,可以通过调节处方中各成分的占比,例如降低增稠剂的比例,降低雾滴粒径。Span 作为雾滴粒径分布宽度的指标,可用于评价喷雾剂的质量。较大的跨度值预示着药液的表面张力较高或喷雾装置的分散效率较低,因此可利用分布跨度优化制剂。本研究中,与原研药相比,仿制药的 Span 较大。表 1 的数据显示,检测距离 3 cm 处的 D₁₀、D₅₀、D₉₀ 均大于 6 cm 处的 D₁₀、D₅₀、D₉₀,这一现象与 Dayal 等^[14]的研究结果趋势一致,原因可能是随着检测距离的增加,部分粒径较大的雾滴发生沉降,从测量区溢出,从而导致测定的数值减小。

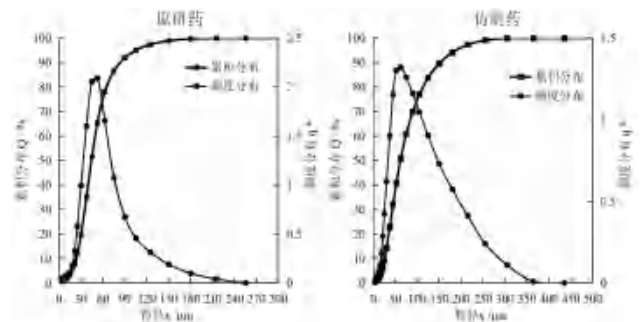


图 1 盐酸氮草斯汀鼻喷雾剂雾滴粒径分布(6 cm)

Fig 1 Droplet size distribution of azelastine hydrochloride nasal sprays (6 cm)

2.2 喷雾模式

2.2.1 测量方法 喷雾模式是以触发器孔口作为喷雾起始点,在距离起始点固定距离处对喷雾水平横断面进行测量,主要测量参数为横断面轮廓内最长轴(D_{max})、最短轴(D_{min})、椭圆度及喷雾面积。其中,椭圆度公式为:椭圆度 = D_{max}/D_{min}。椭圆度越接近于 1,喷雾形状就越接近于圆形,喷雾分布的均匀性就更好。喷雾面积用来描述喷雾的轮廓周长。

表 1 盐酸氮草斯汀鼻喷雾剂雾滴粒径分布测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab 1 Droplet size distribution of azelastine hydrochloride nasal sprays ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

检测距离	批内 / 批间	样品	$D_{10}/\mu\text{m}$	$D_{50}/\mu\text{m}$	$D_{90}/\mu\text{m}$	Span	< 10 μm 占比 /%
6 cm	批内	原研药	23.11 ± 1.12	43.82 ± 1.90	80.20 ± 7.92	1.29 ± 0.10	2.35 ± 0.84
		仿制药	21.80 ± 0.76	56.15 ± 2.89	150.47 ± 7.72	2.29 ± 0.08	2.16 ± 0.25
	批间	原研药	23.53 ± 1.49	45.01 ± 1.81	81.93 ± 6.83	1.23 ± 0.15	2.17 ± 0.93
		仿制药	22.10 ± 2.67	57.39 ± 3.39*	146.47 ± 14.05*	2.14 ± 0.21*	1.89 ± 0.51
3 cm	批内	原研药	24.35 ± 0.63	45.78 ± 5.06	92.41 ± 10.47	1.56 ± 0.06	1.08 ± 0.14
		仿制药	23.58 ± 1.26	69.94 ± 7.71	166.80 ± 14.06	2.30 ± 0.53	0.85 ± 0.10
	批间	原研药	24.27 ± 0.55	47.30 ± 4.87	91.79 ± 8.16	1.68 ± 0.08	1.12 ± 0.21
		仿制药	24.02 ± 1.29	68.39 ± 5.06*	161.41 ± 10.50*	2.82 ± 0.46*	1.03 ± 0.31

注 (Note): 与原研药比较, * $P < 0.05$ (Compared with the original drug, * $P < 0.05$).

参考 FDA 发布的《局部作用鼻气雾剂和鼻喷雾剂的生物利用度及生物等效性试验指南》^[4] 草案, 为区分原研药和仿制药的喷雾能力, 需在喷嘴距离激光束 3 ~ 7 cm 处选择两个位置进行测量, 两个位置之间的间隔不小于 3 cm。调整高清

照相机的位置, 使喷雾面积占整个成像面积的比例不小于 5%, 以保证测量的可靠性。

使用 ProverisVereo 自动触发器和 SprayVIEW 激光成像系统, 在 3 cm 和 6 cm 处分别测定原研药和仿制药的椭圆度、喷雾面积, 实验参数见表 2。

表 2 喷雾模式和喷雾形态的实验参数

Tab 2 Parameters of spray pattern and plume geometry

检测项目	拍摄参数					触发参数			
	相机位置 /cm	相机高度 /cm	镜头光圈	激光位置 /cm	激光深度 /cm	触发速度 / ($\text{mm} \cdot \text{s}^{-1}$)	触发加速度 / ($\text{mm} \cdot \text{s}^{-2}$)	保持时间 /ms	
喷雾模式	3 cm	6	14	2	6	6	50	5000	500
	6 cm	28	10	2	6	6			
喷雾形态	6 cm	22	15	2	6	5.5			

2.2.2 测量结果 原研药和仿制药各取 3 个批次, 每个批次各取 3 瓶, 每瓶弃去前 5 喷, 平行测试 3 喷, 具体结果见表 3, 典型图谱如图 2 ~ 3 所示。另各取原研药和仿制药一瓶, 连续测量 10 喷, 作为精密度结果。原研药和仿制药椭圆度 RSD 在 3 cm 处分别为 1.7% 和 2.7%, 在 6 cm 处分别为 3.1% 和 5.3%, 喷雾面积 RSD 在 3 cm 处分别为 3.6% 和 5.2%, 在 6 cm 处分别为 1.7% 和 8.9%。图 2、3 显示两种鼻喷雾剂的重心 (长径与短径的交点) 都落在喷雾面积的内部, 喷雾横截面都接近圆形, 未出现异形, 说明原研药和仿制药喷雾形状都较规则。由表 3 的数据可知, 原研药的椭圆度小于仿制药 ($P < 0.05$), 原研药的喷雾分布更均匀。目前各国药品标准均没有强制要求椭圆度的范围, 美国药典要求检验机构按照厂家提供的喷雾模式测定方法进行检验^[8], 应满足厂家标准的要求 (例如长轴不能大于 X 毫米, 椭圆度范围应在 1.00 至 1.30)。Chauhan 等^[15] 的研究显示椭圆度主要与产品的喷嘴形状有关, 可以通过把控喷雾装置的质量来提高喷雾的均匀性。表 3 数据显示原研药的喷雾面积显著大于仿制药, 相关的研究表明, 喷雾面积一般与产品的喷雾泵类型以及黏度有关, Dayal 等^[14] 的研究

表明高黏度泵、倒立泵等产生的喷雾面积会远大于其他泵。Trows 等^[13] 的研究表明黏度越大, 喷雾面积越小。本研究中, 仿制药黏度大于原研药, 喷雾面积变化趋势和已有报道一致。精密度结果显示仿制药的 RSD 明显大于原研药, 尤其是 6 cm 处, 原因可能是仿制药的黏度较大, 喷雾角度较小, 在 6 cm 处雾滴融合较多, 形成的大雾滴可能在 6 cm 前沉降, 进而导致仿制药在 6 cm 处峰面积差异较大。综上, 仿制药可以通过选择相适的喷雾泵, 把控喷雾装置的质量以及优化处方黏度, 以期达到原研药的质量。

2.3 喷雾形态

2.3.1 测量方法 喷雾形态是在距离起始点固定距离处对喷雾垂直纵断面进行测量, 主要测量参数为喷雾角度及喷雾宽度。为了和喷雾模式的数据相互补充, 喷雾形态的测定距离一般与喷雾模式相同, 区别是喷雾形态仅需在一个位置进行测定, 根据 FDA 指导原则推荐, 一般选择较远的距离 (6 cm), 测量方法参数见表 2。

2.3.2 测量结果 参照喷雾模式的方法测定喷雾形态, 具体结果见表 4, 典型图谱见图 4。结果显示, 原研药的喷雾角度和喷雾宽度略大于仿制药,

表 3 盐酸氮草斯汀鼻喷雾剂喷雾模式 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Tab 3 Spray pattern of azelastine hydrochloride nasal spray ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

批内 / 批间	样品	3 cm		6 cm	
		椭圆度	喷雾面积 /mm ²	椭圆度	喷雾面积 /mm ²
批内	原研药	1.164 ± 0.039	158.1 ± 12.2	1.183 ± 0.048	485.1 ± 40.2
	仿制药	1.361 ± 0.129*	127.1 ± 20.1*	1.351 ± 0.034*	390.7 ± 52.4*
批间	原研药	1.145 ± 0.041	162.5 ± 19.1	1.152 ± 0.052	490.3 ± 43.6
	仿制药	1.298 ± 0.066*	116.6 ± 21.7*	1.306 ± 0.049*	365.6 ± 55.5*

注 (Note): 与原研药比较, *P < 0.05 (Compared with the original drug, *P < 0.05)。

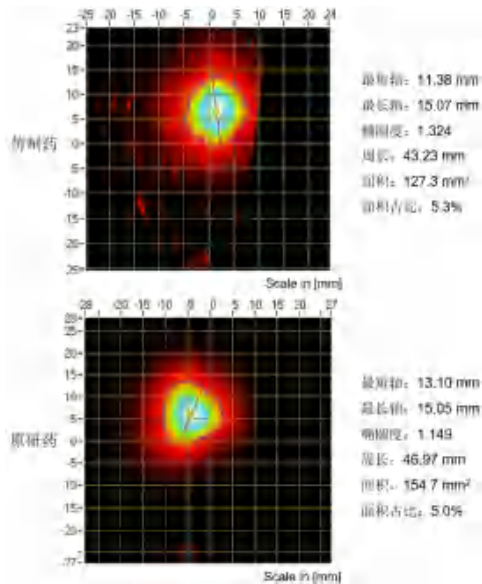


图 2 盐酸氮草斯汀鼻喷雾剂喷雾模式 (3 cm)
Fig 2 Spray pattern of azelastine hydrochloride nasal sprays (3 cm)

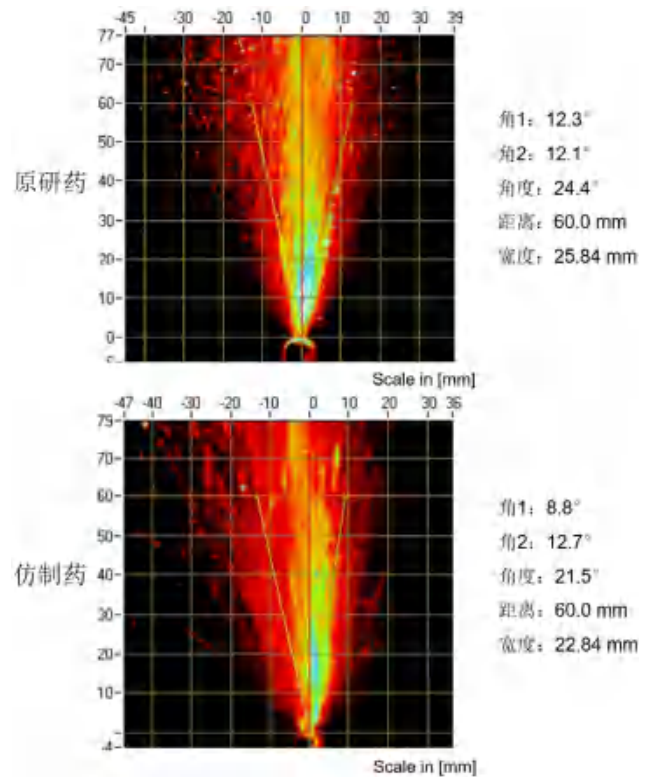


图 4 盐酸氮草斯汀鼻喷雾剂喷雾形态
Fig 4 Plume geometry of azelastine hydrochloride nasal sprays

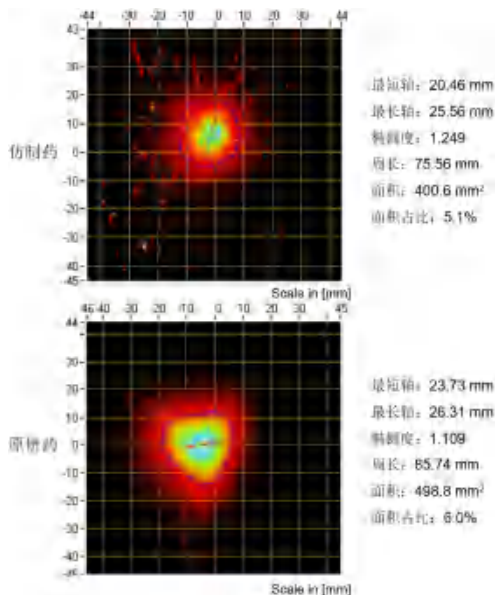


图 3 盐酸氮草斯汀鼻喷雾剂喷雾模式 (6 cm)
Fig 3 Spray pattern of azelastine hydrochloride nasal sprays (6 cm)

其变化趋势及影响因素一般与喷雾面积相同,黏度越大,喷雾角度越小。相关的研究表明^[2],喷雾角度越小,制剂越容易穿过鼻前庭和中庭,增加其在呼吸区的沉积。但在 Wingrove 等^[16]的研

究中,具有更小喷雾角度的鼻喷雾装置,由于分散效率低,形成的液滴较大,在鼻前庭沉积较多。故制剂需要根据药用部位,调整处方理化性质,搭配适宜的喷雾泵,形成合适的喷雾角度。

表 4 盐酸氮草斯汀鼻喷雾剂喷雾形态 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Tab 4 Plume geometry of azelastine hydrochloride nasal spray ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

批内 / 批间	样品	指标	
		喷雾角度 /°	喷雾宽度 /mm
批内	原研药	25.0 ± 2.1	26.6 ± 2.4
	仿制药	20.7 ± 0.8	22.0 ± 0.8
批间	原研药	25.5 ± 1.9	26.9 ± 2.0
	仿制药	22.4 ± 1.0*	23.9 ± 1.2*
瓶内精密度 RSD/%	原研药	4.6	4.6
	仿制药	4.7	4.8

注 (Note): 与原研药比较, *P < 0.05 (Compared with the original drug, *P < 0.05)。

3 讨论

驱动力对鼻喷雾剂喷雾特性的研究至关重要, 相关的研究表明^[14]当驱动力从 30 N 增加至 70 N 时, D_{50} 值减少了 37%。当驱动力增加时, 喷雾面积也会显著增加^[17]。研究时驱动力的选择应首先参考目标人群能正常施加的力, 例如儿童、老人等。Strien 等^[18]的研究显示成人的平均驱动力为 63 N, 儿童的平均驱动力为 31 N。Dayal 等^[14]确定的成人正常驱动力为 45 N。在本研究中, 参照药品使用说明书, 主要适用人群为 12 岁以上儿童及成人, 故考察了粒径分布的驱动力在范围为 40 ~ 60 N $[1 \text{ N} = \text{质量}(\text{kg}) \times 9.81 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}]$ 时的雾滴粒径分布, 经考察, 当驱动力为 50 N 时, 雾滴稳定期时间最长, 结果较稳定。喷雾模式和喷雾形态是采用电子驱动的方式, 不能直接设置驱动力, 通过速度和加速度进行驱动力的控制, 本研究中速度 $50 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$, 加速度 $5000 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-2}$, 约合驱动力 60 N, 与目标人群的驱动力相匹配, 有助于真实模拟出鼻喷雾剂在实际运用时的喷雾模式及喷雾形态。

鼻喷雾剂作为药械结合产品, 其喷雾特性直接关系到雾滴在鼻腔通道内的沉降分布, 进而影响其疗效。因此, 在进行仿制药一致性研究时需将其作为评价指标之一。本研究利用激光成像系统及激光粒度仪, 参考 FDA 对鼻喷雾剂的质量要求及测定方法, 分别测定了盐酸氮草斯汀鼻喷雾剂原研药和仿制药的雾滴粒径分布、喷雾模式及喷雾形态, 并分析了差异性, 研究结果对仿制药优化处方工艺及喷雾装置设计, 改善喷雾特性提供了数据参考, 为国内鼻喷雾剂的开发研究以及质量评价提供参考依据。

参考文献

[1] 于铎, 孙影, 申欣, 等. 鼻喷剂喷雾模式与羽流几何测量方法及其与鼻腔沉积的相关性[J]. 药学报, 2022, 57(7): 2032-2040.

[2] 赵荣军, 陈红叶, 陈祝霞, 等. 鼻喷雾剂雾滴粒径的一致性分析[J]. 中国医药工业杂志, 2022, 53(4): 539-542.

[3] 王森, 贾青, 吴陈亮. 鱼腥草素钠鼻喷雾剂的喷雾特性评价[J]. 中南药学, 2023, 21(5): 1222-1227.

[4] FDA. Guidance document: bioavailability and bioequivalence studies for nasal aerosols and nasal sprays for local action [EB/OL]. (2003-04) [2023-11-25]. [https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioavailability-and-bioequivalence-studies-nasal-](https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioavailability-and-bioequivalence-studies-nasal-aerosols-and-nasal-sprays-local-action)

[aerosols-and-nasal-sprays-local-action](https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioavailability-and-bioequivalence-studies-nasal-aerosols-and-nasal-sprays-local-action).

[5] FDA. Draft guidance on azelastine hydrochloride [EB/OL]. (2022-08) [2023-11-25]. <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda-docs/psg/PSG-213872.pdf>.

[6] FDA. Draft guidance on budesonide [EB/OL]. (2023-08) [2023-11-25]. <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda-docs/psg/PSG-020746.pdf>.

[7] FDA. Guidance document: nasal spray and inhalation solution, suspension, and spray drug products-chemistry, manufacturing, and controls documentation [EB/OL]. (2002-07) [2023-11-25]. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/nasal-spray-and-inhalation-solution-suspension-and-spray-drug-products-chemistry-manufacturing-and>.

[8] USP. Inhalation and nasal drug products: aerosols, sprays, and powders-performance quality tests [EB/OL]. (2021-03-01) [2023-11-25]. <https://doi.usp.org/USPNF/USPNF.M99360-05-01.html>.

[9] USP. Inhalation and nasal drug products-general information and product quality tests [EB/OL]. (2020-12-01) [2023-11-25]. <https://doi.usp.org/USPNF/USPNF.M6156-08-01.html>.

[10] 中国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020: 8, 16.

[11] 陈颖, 冯振华, 马萍萍. 孟鲁司特钠咀嚼片联合盐酸氮草斯汀鼻喷雾剂治疗儿童过敏性鼻炎疗效观察[J]. 儿科药学杂志, 2021, 27(11): 15-18.

[12] 尹志成. 盐酸氮草斯汀鼻喷雾剂的研制及质量研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2015.

[13] Trows S, Wuchner K, Spycher R, et al. Analytical challenges and regulatory requirements for nasal drug products in Europe and the U.S [J]. *Pharmaceutics*, 2014, 6(2): 195-219.

[14] Dayal P, Shaik MS, Singh M. Evaluation of different parameters that affect droplet-size distribution from nasal sprays using the Malvern Spraytec [J]. *J Pharm Sci*, 2004, 93(7): 1725-1742.

[15] Chauhan H, Liao L. Spray pattern as a screening tool during early development of nasal sprays [OL]. *Inhalation*, (2019-06-01) [2023-11-25]. https://www.inhalationmag.com/wp-content/uploads/pdf/inh_20190601_0012.pdf.

[16] Wingrove J, Swedrowska M, Scherließ R, et al. Characterisation of nasal devices for delivery of insulin to the brain and evaluation in humans using functional magnetic resonance imaging [J]. *J Control Release*, 2019, 302: 140-147.

[17] 王妍, 姜锦秀, 胡筱芸, 等. 喷雾模式及喷雾形态用于口腔吸入及鼻用制剂的质量评价[J]. 药物评价研究, 2019, 42(12): 2325-2328.

[18] Strien JV, Petersen P, Lappas P, et al. Spray characteristics from nasal spray atomization [J]. *J Aerosol Sci*, 2022, 165: 106009.

(收稿日期: 2024-02-05; 修回日期: 2024-04-09)

新型布鲁顿氏酪氨酸激酶蛋白水解靶向嵌合体 (BTK PROTAC) 的设计合成及活性评价

许子威^{1, 3}, 周卯^{2, 3}, 高安慧^{3, 5}, 桂双英^{1, 4*}, 白海云^{5*} (1. 安徽中医药大学, 合肥 230012; 2. 沈阳药科大学, 沈阳 110016; 3. 南通市海门长三角药物高等研究院, 江苏 南通 226133; 4. 药物制剂技术与应用安徽省重点实验室, 合肥 230012; 5. 百极弘辉医药科技有限公司, 江苏 南通 226133)

摘要: **目的** 设计合成新型布鲁顿氏酪氨酸激酶蛋白水解靶向嵌合体 (BTK PROTAC), 并在体外评估这些分子对 BTK 蛋白的降解活性。**方法** 以 Nurix Therapeutics 公司临床化合物 NX-5948 为先导化合物, 分析其与靶蛋白的相互作用, 通过引入并环代替吡嗪胺的骨架跃迁思路对其进行结构改造, 成功合成了一系列新型 BTK PROTACs, 通过时间分辨荧光共振能量转移技术 (TR-FRET)、MTS 法和蛋白质免疫印迹法分别测定目标化合物的激酶活性、细胞增殖抑制活性和 BTK 蛋白降解活性。**结果** 共合成 6 个目标化合物 (化合物 B ~ G), 活性测试结果显示, 大部分化合物都具有优异的细胞增殖抑制活性和 BTK 降解活性, 其中化合物 B 表现出较优的 BTK 蛋白降解能力, 其半数最大降解浓度 (DC_{50}) 值约为 $0.1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。**结论** 基于 NX-5948, 通过骨架跃迁的方法设计合成了一类新颖的 BTK PROTAC 化合物, 进行了构效关系的初步探索, 可为 BTK PROTAC 降解剂的进一步研究提供参考。

关键词: 布鲁顿氏酪氨酸激酶; 蛋白水解靶向嵌合体; NX-5948; BTK PROTAC; 抗肿瘤活性
中图分类号: TQ464.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)06-1484-07
doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.014

Design, synthesis and biological evaluation of novel compounds of BTK PROTAC

XU Zi-wei^{1, 3}, ZHOU Mao^{2, 3}, GAO An-hui^{3, 5}, GUI Shuang-ying^{1, 4*}, BAI Hai-yun^{5*} (1. *Anhui University of Chinese Medicine, Hefei* 230012; 2. *Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang* 110016; 3. *Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute, Nantong Jiangsu* 226133; 4. *Anhui Key Laboratory of Pharmaceutical Preparation Technology and Application, Hefei* 230012; 5. *Biopolar Hongye Pharmaceutical Limited Company, Nantong Jiangsu* 226133)

Abstract: Objective To design and synthesize novel Bruton's tyrosine kinase protac (BTK PROTAC) molecules, and evaluate their degradation activity towards BTK protein in vitro. **Methods** With clinical compound NX-5968 from Nurix Therapeutics as a lead compound, its interaction with the target protein was analyzed. A series of novel BTK PROTACs were successfully synthesized by structural modification by introducing a skeleton transition of cyclic substitution for pyrazine amine. The kinase activity, cell proliferation inhibitory activity, and BTK degradation activity of the target compounds were measured by time-resolved fluorescence resonance energy transfer (TR-FRET), MTS and Western blot, respectively. **Results** Totally 6 target compounds were synthesized (compound B ~ G). The activity test showed that most compounds had excellent cell proliferation inhibition and BTK degradation. Compound B presented better BTK degradation ability, with a DC_{50} of about $0.1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$. **Conclusion** Based on NX-5948, a class of novel BTK PROTACs are designed and synthesized by skeleton transition, and their structure-activity relationship is preliminarily explored, providing reference for in-depth research on BTK PROTAC degraders.

作者简介: 许子威, 男, 硕士研究生, 主要从事化学合成研究, email: 1429158274@qq.com *通信作者: 桂双英, 女, 教授, 主要从事制剂技术与新制剂研究, email: guishy0520@126.com; 白海云, 男, 博士, 主要从事化学合成研究, email: hybai@bio-polar.com

Key words: Bruton's tyrosine kinase; protein hydrolysis-targeted chimera; NX-5948; BTK PROTAC; antitumor activity

布鲁顿氏酪氨酸激酶 (BTK) 属于非受体酪氨酸 Tec 家族成员, 也是 B 细胞中受体 (BCR) 信号通路的关键, 对 B 细胞的存活、增殖和分化有调节作用。BTK 的过度表达与许多血液恶性肿瘤的发病机制有关, 如慢性淋巴细胞白血病 (chronic lymphocytic leukemia, CLL)、急性淋巴细胞白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL)、套细胞淋巴瘤 (non-hodgkin lymphoma, NHL) 和弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) 等^[1-3]。

蛋白水解靶向嵌合体 (PROTAC) 是一类能通过泛素-蛋白酶体系统 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 使目标蛋白降解的化合物^[4-5]。PROTAC 该理论自 2001 年由 Crews 和 Deshaies 验证^[6], PROTAC 技术在癌症领域的应用逐渐受到人们重视。

NX-5948 为 Nurix Therapeutics 公司开发的第二款申报临床的 BTK PROTAC 分子。临床前模型显示, NX-5948 能克服 BTKC481S 耐药, 有望突破患者对伊布替尼和其他 BTK 抑制剂的耐药问题^[7]。

与小分子抑制剂相比, PROTAC 降解剂对靶蛋白的高选择性和克服耐药问题上优势明显^[8-9]。因此, 设计合成具有生物活性, 能够降解 BTK 蛋白的 PROTAC 分子对 B 细胞淋巴瘤的治疗和研究有重要意义^[10-11]。本课题以临床化合物 NX-5948 为先导化合物, 通过分析其与靶蛋白的相互作用, 引入吡啶并环代替吡嗪胺的骨架跃迁思路对其进行结构改造, 成功合成了一系列新型 BTK PROTAC 分子。

1 仪器与试剂

RV 3 V-C 旋转蒸发器 (德国 IKA 公司), 85-2A 磁力搅拌器 (上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司), 集热式恒温加热磁力搅拌器 (上海豫康科教仪器设备有限公司), Bruker NMR 400 MHz 核磁共振仪 (德国布鲁克公司), 1260 液相色谱仪、1260-iQ 液质联用仪 (美国安捷伦公司), HPTLC Silica Gel 60 GF254 高效薄层层析硅胶板 (上海皓鸿生物医药科技有限公司), 柱色谱硅胶 (100 ~ 200 目) 及 HSGF254 薄层析硅胶板 (青岛海浪硅胶干燥剂有限公司)。所用试剂或中间体均为市售分析纯或化学纯产品, 均未经特殊处理直接使用。Mino 人外周血套细胞淋巴瘤细胞 (美

国 ATCC 细胞库), 大 B 细胞淋巴瘤细胞 OCI-LY10 由 Dr. Brabander 提供。

试剂盒 (MTS 细胞活性检测试剂, 上海盛兆生物科技有限公司, 货号:G3581)。BTK 抗体 (货号: D3H5, Cell Signaling Technology); GAPDH 抗体 (货号: 60004-1-Ig, Proteintech); 山羊抗鼠 IgG 和山羊抗兔 IgG (货号分别为 111-035-003 和 111-035-144, Jackson IR 公司)。

2 方法与结果

2.1 结构改造

在对 NX-5948 分子结合靶向蛋白的弹头 (warhead) 部分结构特点进行分析后, 发现母核吡嗪上的酰胺结构占据 BTK 激酶铰链区域, 与吡嗪胺基相连的 4- 哌啶苯基片段靠近铰链区域附近的疏水口袋, 通过疏水相互作用和口袋结合^[12], 哌啶及其相连的连接子 (Linker) 片段指向溶剂区。母核吡嗪和与吡嗪相连的胺基附近存在空腔, 在保证能与 BTK 蛋白进行结合的基础上, 作者将吡嗪胺片段替换为 5- 氟吡啶, 吡啶上的氟原子在这里能增强 Ligand 与蛋白的疏水相互作用; 首先设计并合成了化合物 B。为研究不同 Linker 对活性的影响合成了化合物 C ~ G。化合物 B ~ G 结构如图 1 所示。

2.2 合成路线

本课题以专利 WO2021113557A1 中化合物 195 (NX-5948) 为阳性参照物 A, 并根据专利所示路线进行了合成^[13]。化合物 B ~ G 的合成路线如图 2 所示。

2.3 化学合成

2.3.1 中间体 2B 的合成 将 720 mg (4.6 mmol) 2-氨基-4, 5-二氟苯甲腈 (1B) 溶于 15 mL 乙酸中, 加入 1.15 g (5.1 mmol) 碘代丁二酰亚胺, 加热至 60 °C 反应 3 h, 反应完毕。减压蒸除溶剂, 用乙酸乙酯 (30 mL×3) 和 30 mL 饱和碳酸氢钠水溶液萃取, 合并有机层, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压蒸除溶剂, 剩余物经正向硅胶柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯, 体积比 10 : 1), 得到 420 mg 米色固体 (2B), 收率 32%, MS (ESI) m/z : 280.9[M + H]⁺, ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.32 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 4.94 (s, 2H)。

2.3.2 中间体 3B、3E、3G 的合成 (以中间体 3B

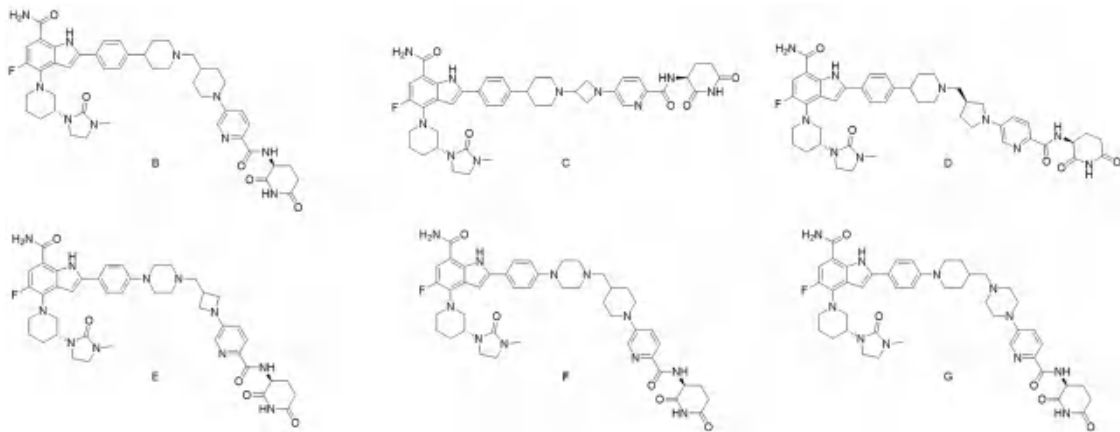


图1 化合物 B ~ G 结构

Fig 1 Structure of compounds B ~ G

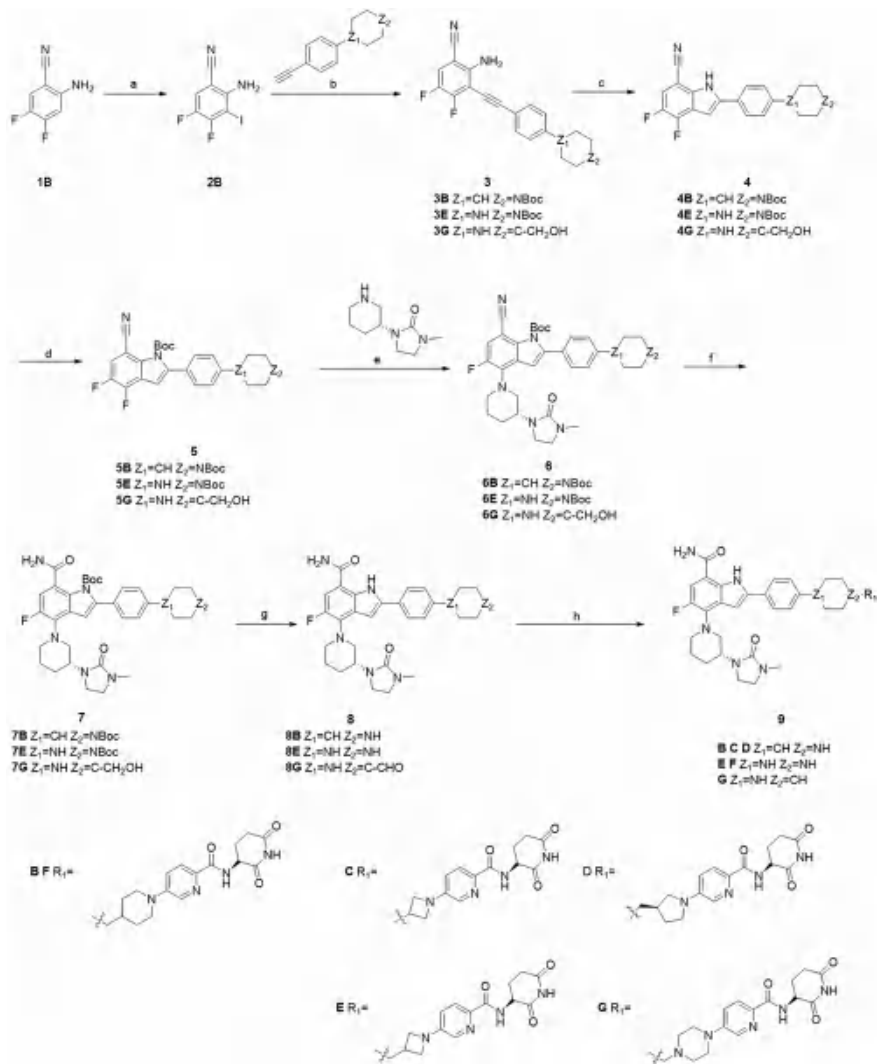


图2 化合物 B ~ G 合成路线及条件

Fig 2 Synthesis route and conditions of compounds B ~ G

注 (Note): a. 碘代丁二酰亚胺, 乙酸, 60 °C (NIS, AcOH, 60 °C); b. 二三苯基磷二氯化钯, 碘化亚铜, 三乙胺, 1, 4-二氧六环, 80 °C [PdCl₂(PPh₃)₂, CuI, TEA, Diox, 80 °C]; c. 叔丁醇钾, *N*-甲基吡咯烷酮, 室温 (t-BuOK, NMP, rt); d. 二叔丁基二碳酸酯, 三乙胺, 4-二甲氨基吡啶, 二氯甲烷, rt [(Boc)₂O, TEA, DMAP, DCM, rt]; e. 碳酸氢钠, 二甲基亚砜, 80 °C (NaHCO₃, DMSO, 80 °C); f. 过氧化氢, 碳酸钾, 二甲基亚砜, rt (H₂O₂, K₂CO₃, DMSO, rt); g. [(8B、8E) 三氟乙酸, 二氯甲烷, rt (TFA, DCM, rt); (8G) 2-碘酰基苯甲酸, 乙酸乙酯, 四氢呋喃, 60 °C (IBX, EA, THF, 60 °C)]; h. 三乙酰氧基硼氢化钠, 1, 2-二氯乙烷, 乙酸, 65 °C (STAB, DCE, AcOH, 65 °C)。

为例) 将 420 mg (1.5 mmol) 中间体 **2B**, 425 mg (1.5 mmol) 4-(4-乙炔基苯基) 哌啶-1-羧酸叔丁酯溶于 15 mL 1, 4-二氧六环中, 加入 105 mg (0.15 mmol) 二三苯基磷二氯化钨、57 mg (0.3 mmol) 碘化亚铜, 通氮气 5 min, 氮气氛围下加入 606 mg (6 mmol) 三乙胺, 加热至 80 °C 反应 16 h, 反应完毕。减压蒸除溶剂, 用乙酸乙酯 (30 mL×3) 和 30 mL 水萃取, 合并有机层, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压蒸除溶剂, 剩余物经薄层层析纯化 (石油醚: 乙酸乙酯, 体积比 5:1), 得到 290 mg 无色油状物 (**3B**), 收率 44%, MS (ESI) m/z : 286.2[M + H]⁺, ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.53 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.49 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.25 (s, 2H), 7.21 (dd, $J = 13.1, 5.0$ Hz, 2H), 4.99 (s, 2H), 4.29 (d, $J = 13.1$ Hz, 3H), 2.83 (t, $J = 11.8$ Hz, 3H), 2.69 (d, $J = 12.1$ Hz, 2H), 1.85 (d, $J = 10.9$ Hz, 3H), 1.65 (dt, $J = 12.9, 8.6$ Hz, 4H), 1.51 (d, $J = 2.0$ Hz, 10H)。化合物 **3E** (收率 31%) 和 **3G** (收率 47%) 分别使用 4-(4-乙炔基苯基) 哌啶-1-羧酸叔丁酯和 1-(4-乙炔基苯基)-4-哌啶甲醛为原料以相同的方法得到。

2.3.3 中间体 **4B**、**4E**、**4G** 的合成 (以中间体 **4B** 为例) 将 290 mg (1.1 mmol) 中间体 **3B** 溶于 5 mL *N*-甲基吡咯烷酮中, 待反应液温度降至 0 °C, 加入 227.4 mg (2.4 mmol) 叔丁醇钾, 加热至室温反应 1 h, 反应完毕。减压蒸除溶剂, 用乙酸乙酯 (10 mL×3) 和 10 mL 水萃取, 合并有机层, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压蒸除溶剂, 得到粗品产物 (**4B**), 无需纯化直接投下一步反应, MS (ESI) m/z : 438.2[M + H]⁺。化合物 **4E** 和 **4G** 以相同的方法得到。

2.3.4 中间体 **5B**、**5E**、**5G** 的合成 (以中间体 **5B** 为例) 将 480 mg (1.1 mmol) 中间体 **4B** 溶于 5 mL 二氯甲烷中, 加入 13 mg (0.1 mmol) 4-二甲氨基吡啶、222 mg (2.2 mmol) 三乙胺、350 mg (1.6 mmol) 二叔丁基二碳酸酯, 室温下反应 3 h, 反应完毕。减压蒸除溶剂, 用二氯甲烷 (20 mL×3) 和 20 mL 水萃取, 合并有机层, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压蒸除溶剂, 剩余物经薄层层析纯化 (石油醚: 乙酸乙酯, 体积比 5:1), 得到 395 mg 米色油状物 (**5B**), 收率 67%, MS (ESI) m/z : 538.2[M + H]⁺, ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 9.20 (s, 1H), 7.70 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.40 ~ 7.35 (m, 3H), 6.96 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 4.31 (d, $J = 13.1$ Hz, 2H),

2.86 (t, $J = 10.8$ Hz, 2H), 2.75 (t, $J = 12.1$ Hz, 1H), 1.89 (d, $J = 12.5$ Hz, 2H), 1.69 (qd, $J = 12.8, 4.3$ Hz, 4H), 1.51 (d, $J = 6.1$ Hz, 10H)。化合物 **5E** (收率 71%) 和 **5G** (收率 55%) 以相同的方法得到。

2.3.5 中间体 **6B**、**6E**、**6G** 的合成 (以中间体 **6B** 为例) 将 395 mg (0.74 mmol) 中间体 **5B**、406 mg (2.22 mmol) (*R*)-1-甲基-3-(哌啶-3-基) 咪唑、373 mg (4.44 mmol) 碳酸氢钠溶于 10 mL 二甲基亚砜中, 加热至 80 °C 反应 1.5 h, 反应完毕。减压蒸除溶剂, 用乙酸乙酯 (15 mL×3) 和 15 mL 水萃取, 合并有机层, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压蒸除溶剂, 剩余物经薄层层析纯化 (石油醚: 乙酸乙酯, 体积比 1:1), 得到 205 mg 米色固体 (**6B**), 收率 40%, MS (ESI) m/z : 701.4[M + H]⁺, ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 9.09 (s, 1H), 7.70 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 7.33 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.15 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H), 6.94 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 4.31 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 4.17 ~ 4.10 (m, 1H), 3.76 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H), 3.67 ~ 3.60 (m, 1H), 3.51 ~ 3.31 (m, 6H), 2.87 ~ 2.80 (m, 6H), 2.78 ~ 2.67 (m, 2H), 2.01 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H), 1.88 (d, $J = 10.1$ Hz, 4H), 1.69 (dd, $J = 12.2, 7.6$ Hz, 6H), 1.52 (s, 10H)。化合物 **6E** (收率 42%) 和 **6G** (收率 37%) 以相同的方法得到。

2.3.6 中间体 **7B**、**7E**、**7G** 的合成 (以中间体 **7B** 为例) 将 205 mg (0.3 mmol) 中间体 **6B**、60 mg (0.44 mmol) 碳酸钾溶于 5 mL 二甲基亚砜中, 冷却到 0 °C 后, 滴加双氧水 (28%, 73 mg, 0.6 mmol), 加热至室温反应 2 h, 反应完毕。冰水浴降温至 0 ~ 5 °C, 加入 5 mL 亚硫酸钠的水溶液 (20%) 淬灭反应, 乙酸乙酯 (15 mL×3) 和 15 mL 水萃取, 合并有机层, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压蒸除溶剂, 剩余物经薄层层析纯化 (石油醚: 乙酸乙酯, 体积比 1:2), 得到米色固体 182 mg (**7B**), 收率 86%, ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 10.53 (s, 1H), 7.73 ~ 7.67 (m, 2H), 7.31 (t, $J = 11.3$ Hz, 2H), 7.14 (d, $J = 13.4$ Hz, 1H), 6.94 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 5.93 (s, 2H), 4.29 (s, 2H), 4.13 (s, 1H), 3.77 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H), 3.64 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H), 3.51 ~ 3.39 (m, 2H), 3.37 ~ 3.21 (m, 4H), 2.88 ~ 2.79 (m, 5H), 2.72 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 2.01 (d,

$J = 9.8 \text{ Hz}$, 1H), 1.94 ~ 1.85 (m, 4H), 1.70 (dd, $J = 12.6, 3.9 \text{ Hz}$, 5H), 1.52 (d, $J = 8.4 \text{ Hz}$, 10H)。化合物 **7E** (收率 71%) 和 **7G** (收率 66%) 以相同的方法得到。

2.3.7 中间体 **8B**、**8E**、**8G** 的合成 (以中间体 **8B** 为例) 将 182 mg (0.3 mmol) 中间体 **7B** 溶于 5 mL 二氯甲烷中, 滴加 0.5 mL (0.4 mmol) 三氟乙酸, 室温下反应 2 h, 反应完毕。减压蒸除溶剂, 剩余物经反相柱层析纯化, 得到 115 mg 浅棕色固体 (**8B**), 收率 74%, MS (ESI) m/z : 519.2[M + H]⁺, ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.97 (s, 1H), 7.84 (d, $J = 8.3 \text{ Hz}$, 2H), 7.61 (d, $J = 14.2 \text{ Hz}$, 1H), 7.35 (d, $J = 8.3 \text{ Hz}$, 2H), 7.05 (s, 1H), 3.86 (s, 1H), 3.53 (t, $J = 10.7 \text{ Hz}$, 2H), 3.37 ~ 3.30 (m, 3H), 3.28 ~ 3.00 (m, 7H), 2.91 (t, $J = 11.9 \text{ Hz}$, 1H), 2.67 (d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 3H), 1.99 (d, $J = 11.9 \text{ Hz}$, 2H), 1.90 ~ 1.70 (m, 6H)。化合物 **8E** (收率 75%) 以相同过程得到。

将 400 mg (0.73 mmol) 化合物 **7G**, 408 mg (1.5 mmol) 2-碘酰基苯甲酸溶于 40 mL 乙酸乙酯和 10 mL 四氢呋喃的混合溶剂中, 加热至 60 °C 反应 6 h, 反应完毕。过滤反应液, 洗涤, 减压蒸除溶剂, 剩余物经薄层层析纯化 (二氯甲烷: 甲醇, 体积比 15 : 1), 得到 223 mg 灰色固体 (**8G**), 收率 55%, MS (ESI) m/z : 547.5[M + H]⁺。

2.3.8 目标化合物 **B** ~ **G** 的合成 (以化合物 **B** 为例)

将 115 mg (0.22 mmol) 中间体 **8B**, 75 mg (0.22 mmol) (*R*)-*N*-(2, 6-二氧代-3-哌啶)-5-(4-甲酰基-1-哌啶)吡啶酰胺溶于 10 mL 二氯甲烷和 1 mL 甲醇的混合溶剂中, 其中 (*R*)-*N*-(2, 6-二氧代-3-哌啶)-5-(4-甲酰基-1-哌啶)吡啶酰胺根据专利 WO2021113557A1 合成。滴加 65 mg (1.1 mmol) 乙酸, 加热至 40 °C 反应 2 h, 待反应液冷却至室温后, 分批加入 95 mg (0.44 mmol) 三乙酰氧基硼氢化钠, 室温下反应 3 h, 反应完毕。加入 2 mL 饱和碳酸氢钠溶液淬灭反应, 用二氯甲烷 (10 mL × 3) 和 10 mL 水萃取, 合并有机层, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压蒸除溶剂, 剩余物经薄层层析纯化 (二氯甲烷: 甲醇, 体积比 15 : 1), 得到 90 mg 目标产物 **B**, 米色固体, 收率 48%, MS (ESI) m/z : 847.5, ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 847.5[M + H]⁺, 10.95 (s, 1H, NH), 10.84 (s, 1H, NH), 8.70 (d, $J = 8.2 \text{ Hz}$, 1H, Ph-H), 8.32 (d, $J = 2.7 \text{ Hz}$, 1H, NH), 7.85 (d, $J = 8.8 \text{ Hz}$, 1H, Ph-H),

7.78 (d, $J = 8.3 \text{ Hz}$, 2H, NH₂), 7.60 (d, $J = 14.0 \text{ Hz}$, 2H, Ph-H), 7.37 (d, $J = 8.3 \text{ Hz}$, 2H, Ph-H), 7.03 (s, 1H, CH = CH), 4.75 (s, 2H), 3.95 (d, $J = 13.2 \text{ Hz}$, 3H), 3.53 (s, 3H), 3.37 (dd, $J = 17.0, 9.7 \text{ Hz}$, 4H), 3.23 (dd, $J = 18.6, 10.0 \text{ Hz}$, 4H), 2.91 ~ 2.80 (m, 4H), 2.67 (d, $J = 6.9 \text{ Hz}$, 4H), 2.33 (s, 1H), 2.05 ~ 1.96 (m, 4H), 1.89 ~ 1.77 (m, 8H), 1.68 (s, 2H), 1.22 (d, $J = 18.2 \text{ Hz}$, 4H)。

以中间体 **8C** ~ **8G** 和不同的 E3 端作为原料以相似过程得到目标化合物 **C** ~ **G**, 其中各 E3 端均参照专利 WO2021113557A1 合成。

目标产物 **C** 为白色固体, 收率 64%, MS (ESI) m/z : 805.4[M + H]⁺, ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.95 (s, 1H, NH), 10.84 (s, 1H, NH), 8.70 (d, $J = 8.4 \text{ Hz}$, 1H, Ph-H), 8.19 (d, $J = 2.0 \text{ Hz}$, 1H, NH), 8.00 (s, 1H, Ph-H), 7.90 ~ 7.81 (m, 2H, NH₂), 7.81 ~ 7.74 (m, 2H, Ph-H), 7.60 (d, $J = 14.2 \text{ Hz}$, 1H, Ph-H), 7.37 (d, $J = 8.3 \text{ Hz}$, 2H, Ph-H), 7.03 (d, $J = 2.3 \text{ Hz}$, 1H, Ph-H), 6.98 ~ 6.90 (m, 1H, CH = CH), 4.20 ~ 4.07 (m, 2H), 3.88 ~ 3.80 (m, 2H), 3.67 ~ 3.59 (m, 2H), 3.57 ~ 3.45 (m, 2H), 3.26 ~ 3.10 (m, 7H), 3.02 ~ 2.93 (m, 2H), 2.70 ~ 2.62 (m, 3H), 2.09 ~ 1.92 (m, 4H), 1.85 (m, $J = 20.1, 13.2, 7.1 \text{ Hz}$, 4H), 1.70 (m, $J = 15.9, 9.7, 7.2 \text{ Hz}$, 4H)。

目标化合物 **D** 为黄色固体, 收率 27%, MS (ESI) m/z : 833.7[M + H]⁺, ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.96 (s, 1H, NH), 10.85 (s, 1H, NH), 8.64 (d, $J = 8.1 \text{ Hz}$, 1H, Ph-H), 8.01 (s, 1H, NH), 7.95 (d, $J = 2.6 \text{ Hz}$, 1H, Ph-H), 7.86 (d, $J = 8.6 \text{ Hz}$, 1H, Ph-H), 7.80 (d, $J = 7.7 \text{ Hz}$, 2H, NH₂), 7.61 (d, $J = 14.3 \text{ Hz}$, 1H, Ph-H), 7.38 (d, $J = 8.1 \text{ Hz}$, 3H, Ph-H), 7.07 (d, $J = 17.2 \text{ Hz}$, 1H, Ph-H), 7.01 (dd, $J = 8.1, 1.8 \text{ Hz}$, 1H, CH = CH), 3.87 (ddd, $J = 13.5, 10.3, 4.8 \text{ Hz}$, 1H), 3.64 ~ 3.35 (m, 8H), 3.28 ~ 3.07 (m, 6H), 2.91 ~ 2.73 (m, 2H), 2.66 (s, 3H), 2.62 ~ 2.52 (m, 2H), 2.32 ~ 1.93 (m, 6H), 1.90 ~ 1.70 (m, 6H)。

目标产物 **E** 为棕色固体, 收率 33%, MS (ESI) m/z : 820.4[M + H]⁺, ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.84 (s, 2H, NH), 8.68 (d,

$J = 8.2$ Hz, 1H, Ph-H), 7.98 (s, 1H, NH), 7.86 ~ 7.79 (m, 2H, Ph-H), 7.70 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, NH₂), 7.56 (d, $J = 14.2$ Hz, 1H, Ph-H), 7.37 (s, 1H, Ph-H), 7.05 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, Ph-H), 6.91 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H, Ph-H), 6.90 (s, 1H, CH = CH), 4.72 (d, $J = 13.0$ Hz, 1H), 4.13 (s, 2H), 3.85 (s, 1H), 3.70 (s, 2H), 3.51 (s, 2H), 3.27 ~ 3.19 (m, 5H), 3.10 (s, 3H), 2.78 (dd, $J = 21.3, 9.3$ Hz, 2H), 2.70 ~ 2.61 (m, 4H), 2.18 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.00 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 1.86 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 1.25 (d, $J = 9.2$ Hz, 3H)。

目标产物 **F** 为白色固体, 收率 25%, MS (ESI) m/z : 848.5[M + H]⁺, ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.83 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, NH), 8.70 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, Ph-H), 8.31 (s, 1H, Ph-H), 7.85 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, NH), 7.69 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, NH₂), 7.55 (d, $J = 14.2$ Hz, 1H, Ph-H), 7.41 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, Ph-H), 7.04 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, Ph-H), 6.89 (s, 1H, CH = CH), 4.74 (t, $J = 12.7$ Hz, 1H), 3.95 (d, $J = 11.5$ Hz, 3H), 3.85 (s, 2H), 3.51 (s, 2H), 3.24 (s, 8H), 3.16 ~ 3.03 (m, 4H), 2.89 (t, $J = 11.9$ Hz, 3H), 2.66 (s, 4H), 2.21 (dd, $J = 18.1, 8.9$ Hz, 4H), 2.02 (d, $J = 5.4$ Hz, 2H), 1.84 (s, 5H), 1.23 (t, $J = 9.5$ Hz, 4H)。

目标产物 **G** 为淡黄色固体, 收率 49%, MS (ESI) m/z : 848.6[M + H]⁺, ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 10.85 (d, $J = 11.6$ Hz, 2H, NH), 8.79 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, Ph-H), 8.43 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, NH), 7.94 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, NH), 7.71 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, Ph-H), 7.56 (dd, $J = 8.5, 5.7$ Hz, 2H, NH), 7.08 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, Ph-H), 6.89 (s, 1H, CH = CH), 4.76 (dd, $J = 12.8, 8.0$ Hz, 1H), 3.86 (d, $J = 11.6$ Hz, 5H), 3.67 (d, $J = 10.3$ Hz, 2H), 3.49 (dd, $J = 28.8, 16.4$ Hz, 4H), 3.41 ~ 3.30 (m, 4H), 3.25 (dd, $J = 14.3, 7.1$ Hz, 4H), 3.18 (d, $J = 10.9$ Hz, 4H), 3.09 (d, $J = 11.7$ Hz, 2H), 2.82 (dd, $J = 24.5, 12.4$ Hz, 3H), 2.66 (s, 3H), 1.86 (d, $J = 6.8$ Hz, 4H), 1.81 ~ 1.59 (m, 4H), 1.37 (d, $J = 9.9$ Hz, 2H)。

2.4 活性测试

2.4.1 抗肿瘤细胞增殖活性评价 大 B 细胞淋巴瘤细胞 OCI-LY10, 以含 20% 胎牛血清和 0.1%

青 - 链霉素混合液的 IMDM 培养基进行培养。套细胞淋巴瘤细胞 Mino 采用含 15% 胎牛血清和 0.1% 青 - 链霉素混合液的 RPMI-1640 培养基进行培养, 细胞在 37 °C、5%CO₂ 和饱和湿度的培养箱中稳定培养。细胞活性检测采用试剂盒测定。

以化合物 NX-5948 作为阳性对照, 采用 MTS 法测定化合物对大 B 细胞淋巴瘤细胞 OCI-LY10 的增殖抑制活性。

操作如下: 采用 96 孔培养板分别设置空白组、阳性对照组和不同给药组。根据大 B 细胞淋巴瘤细胞 OCI-LY10 的生长速率, 每孔接种 2×10^4 个细胞, 加入 80 μ L 完全培养基。给药组和阳性对照组则分别加入 20 μ L 待测中间体, 使用 $20 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的初始浓度, 并进行 5 倍稀释, 得到 8 个不同浓度的给药组。总体积调至 100 μ L。细胞在 37 °C、5%CO₂ 条件下培养 72 h 后, 加入 20 μ L 的 MTS 试剂, 继续孵育 0.5 ~ 1 h, 混匀后使用酶标仪测定 490 nm 和 690 nm 处的吸光值。

通过以下公式计算被测物对肿瘤细胞的存活率 (Activity, %), 其中, OD_1 表示含有细胞的给药孔的吸光值 ($OD_{490} - OD_{690}$), OD_2 表示含有细胞的 DMSO 孔的吸光值 ($OD_{490} - OD_{690}$), OD_3 表示纯培养基的吸光值 ($OD_{490} - OD_{690}$)。

$$\text{存活率} (\%) = (OD_1 - OD_3) / (OD_2 - OD_3) \times 100\%$$

采用对数浓度值绘制存活率图谱, 并通过非线性回归分析得到拟合曲线。使用 GraphPad Prism 8 软件进行 log (inhibitor) vs normalized response-Variable slope 参数设置, 计算得到半数抑制浓度 (IC_{50}) 值。具体结果见表 1。

2.4.2 肿瘤细胞内 BTK 降解作用评价 降解实验步骤如下: 取对数生长期 Mino 细胞, 以 7×10^6 个每孔接种于 12 孔板中, 每孔 900 μ L。向各孔中添加用完全培养基稀释的不同浓度阳性对照和待测中间体 100 μ L (1000、100、10 和 1 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 至终体积为 1 mL。空白对照组使用 0.1% DMSO, 以 NX-5948 作为阳性对照组。培养 24 h 后, 将细胞收集至 2 mL EP 管中 (4 °C, 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min)。加入 1 \times Loading buffer 冰上裂解 45 min 后, 进行金属浴 95 °C 煮 17 min。处理后的样品进行 SDS-PAGE 电泳, 转移到硝酸纤维膜。在室温下用 5% 脱脂奶粉封闭 1.5 h, 随后加入 BTK 和 GAPDH 一抗 (1 : 1000) 4 °C 孵育过夜。清洗 10 min \times 3 次后, 加入相应二抗 (1 : 10 000) 室温孵育 1 h。再次清洗 10 min \times 3 次后, 加入 ECL 显

影液，最后置于凝胶成像仪进行曝光，进行灰度扫描，半定量 BTK 降解活性 [50% 靶蛋白降解时的降解剂浓度 (DC_{50})；可达到的最大降解水平 (D_{max})]。具体结果详见表 1。

表 1 化合物 A ~ G 的降解活性和抑制活性

Tab 1 Degradative and inhibitory activity of compounds A ~ G

化合物	OCI-LY10 $IC_{50}/$ ($nmol \cdot L^{-1}$)	Mino 细胞	
		$DC_{50}/$ ($nmol \cdot L^{-1}$)	$D_{max}/\%$
NX-5948	2.35 ± 0.59	0.65	84.61
B	0.16 ± 0.01	0.1	97.98
C	8.41 ± 0.42	1 ~ 10	90.93
D	2.53 ± 0.08	1 ~ 10	83.12
E	4.27 ± 0.55	≈ 1	85.06
F	2.76 ± 0.24	≈ 1	91.83
G	2.79 ± 0.19	1 ~ 10	88.17

3 结果与讨论

本课题以 Nurix Therapeutics 临床化合物 NX-5948 为先导化合物，通过分析其与靶蛋白的相互作用，在保证能与 BTK 蛋白进行结合的基础上，通过引入 5-氟吡啶代替吡嗪胺的骨架跃迁思路对其进行结构改造，成功合成新型 BTK PROTAC 化合物 **B**，该化合物表现出优异的细胞增殖抑制活性 ($IC_{50} = 0.16 nmol \cdot L^{-1}$) 和较优的 BTK 蛋白降解能力 ($DC_{50} = 0.1 nmol \cdot L^{-1}$)。为研究不同 Linker 对活性的影响，将与吡啶环相连的哌啶环替换为 (*S*)-吡咯烷得到化合物 **D**，细胞增殖抑制活性变弱 ($IC_{50} = 2.53 nmol \cdot L^{-1}$)，BTK 蛋白降解变弱 (DC_{50} 在 $1 \sim 10 nmol \cdot L^{-1}$)；将化合物 **B** 与苯环相连的哌啶环替换为哌嗪环，得到化合物 **F**，细胞增殖抑制活性变弱 ($IC_{50} = 2.76 nmol \cdot L^{-1}$)，BTK 蛋白降解变弱 (DC_{50} 约 $1 nmol \cdot L^{-1}$)；将化合物 **F** Linker 中哌嗪与哌啶的位置互换得到化合物 **G**，化合物 **G** 的细胞增殖抑制活性 ($IC_{50} = 2.79 nmol \cdot L^{-1}$) 与化合物 **F** 相当，BTK 蛋白降解变弱 (DC_{50} 在 $1 \sim 10 nmol \cdot L^{-1}$)；将化合物 **F** Linker 中的哌啶替换为氮杂环丁烷得到化合物 **E**，化合物 **E** 的细胞增殖抑制活性 ($IC_{50} = 4.27 nmol \cdot L^{-1}$)，与化合物 **F** 相当，BTK 蛋白降解变弱 (DC_{50} 约 $1 nmol \cdot L^{-1}$)，与化合物 **F** 相当；将化合物 **B** 与苯环相连的哌啶环替换为氮杂环丁烷并通过减少 Linker 中的亚甲基得到 Linker 明显缩短的化合物 **C**，细胞增殖抑制活性变弱 ($IC_{50} = 8.41 nmol \cdot L^{-1}$)，BTK 蛋白降解变弱 (DC_{50} 在 $1 \sim 10 nmol \cdot L^{-1}$)。

综上所述，通过骨架跃迁改造 Nurix Therapeutics 临床化合物 NX-5948，得到新型的 BTK PROTAC 化合物 **B** ~ **G**，其中化合物 **B** 值得进一步研究。

参考文献

- [1] Wen TY, Wang JS, Shi YK, et al. Inhibitors targeting Bruton's tyrosine kinase in cancers: drug development advances [J]. *Leukemia*, 2021, 35 (2): 312-332.
- [2] Ran FS, Liu Y, Wang C, et al. Review of the development of BTK inhibitors in overcoming the clinical limitations of ibrutinib [J]. *Eur J Med Chem*, 2022, 229: 114009.
- [3] Sořa K, Radek J, David V, et al. 1, 4, 6-Trisubstituted imidazo[4, 5-c]pyridines as inhibitors of Bruton's tyrosine kinase [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 211: 113094.
- [4] Bondeson DP, Smith BE, Burslem GM, et al. Lessons in PROTAC design from selective degradation with a promiscuous Warhead [J]. *Cell Chem Biol*, 2018, 25 (1): 78-87.
- [5] Fisher SL, Phillips AJ. Targeted protein degradation and the enzymology of degraders [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2018, 44: 47-55.
- [6] Sakamoto KM, Kim KB, Kumagai A, et al. Protacs: chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98 (15): 8554-8559.
- [7] Nurix. First disclosure of NX-5948, an oral targeted degrader of Bruton's tyrosine kinase (BTK) for the treatment of B-cell malignancies[EB/OL]. https://www.nurix-tx.com/wp-content/uploads/2023_08.
- [8] Li X, Song YC. Proteolysis-targeting chimera (PROTAC) for targeted protein degradation and cancer therapy [J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13 (1): 50.
- [9] Zou YT, Ma DH, Wang YY. The PROTAC technology in drug development [J]. *Cell Biochem Funct*, 2019, 37 (1): 21-30.
- [10] Lim YS, Yoo SM, Patil V, et al. Orally bioavailable BTK PROTAC active against wild-type and C481 mutant BTKs in human lymphoma CDX mouse models [J]. *Blood Adv*, 2023, 7 (1): 92-105.
- [11] Ma L, Wang JW, Yang Y, et al. BRD4 PROTAC degrader MZ1 exhibits anti-B-cell acute lymphoblastic leukemia effects via targeting CCND3 [J]. *Hematology*, 2023, 28 (1): 2247253.
- [12] Zhang D, Harris HM, Chen J, et al. NRX-0492 degrades wild-type and C481 mutant BTK and demonstrates in vivo activity in CLL patient-derived xenografts [J]. *Blood*, 2023, 141 (13): 1584-1596.
- [13] Kelly S. Bifunctional compounds for degrading BTK via ubiquitin proteasome pathway. WO202111357A1 [P]. 2021-06-10.

(收稿日期: 2024-01-05; 修回日期: 2024-03-02)

坦度螺酮透皮贴剂的制备及评价

符渝昕^{1,2}, 杜卓芳^{1,2}, 程泽能^{1,2*} (1. 中南大学湘雅药学院, 长沙 410000; 2. 湖南慧泽生物医药科技有限公司, 长沙 410000)

摘要: **目的** 制备坦度螺酮透皮贴剂并进行体内外评价。**方法** 合成胆碱-油酸离子液体作为联合促渗剂;通过单因素实验,以外观、累计透过量等为评价指标,筛选优化处方,通过 SD 大鼠实验研究贴剂药动学特征。**结果** 坦度螺酮透皮贴剂处方:10%坦度螺酮,7.5%胆碱-油酸,7.5%肉豆蔻酸异丙酯,75%DURO-TAK 4098。24 h 单位面积累计渗透量为 $(309.33 \pm 45.98) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, 稳态透皮速率为 $(13.43 \pm 1.93) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ 。SD 大鼠实验表明,与坦度螺酮混悬液相比,透皮贴剂具有缓释特征, $T_{1/2}$ 延长至 $(6.37 \pm 4.46) \text{h}$, $MRT_{0 \sim t}$ 约提高 17 倍。**结论** 坦度螺酮透皮贴剂具有缓释效果,有望成为坦度螺酮新型给药制剂。

关键词: 坦度螺酮;透皮贴剂;离子液体;促渗剂

中图分类号: R944

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)06-1491-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.015

Preparation and evaluation of tandospirone transdermal patches

FU Yu-xin^{1,2}, DU Zhuo-fang^{1,2}, CHENG Ze-neng^{1,2*} (1. Xiangya School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410000; 2. Hunan Huize Bio-pharmaceutical Co., Ltd., Changsha 410000)

Abstract: Objective To prepare tandospirone transdermal patches and evaluate their quality. **Methods** Synthesized of choline-oleic acid ionic liquid was used as a combined osmotic promoter. The prescriptions were screened and optimized by a one-way test with appearance and cumulative transmittance as the evaluation indexes. Pharmacokinetic characteristics of the patches were determined by SD rat test. **Results** Tandospirone transdermal patches included: 10% tandospirone, 7.5% choline-oleic acid, 7.5% isopropyl myristate, and 75% DURO-TAK 4098. The 24-hour cumulative permeation was $(309.33 \pm 45.98) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, and the transdermal steady-state flux was $(13.43 \pm 1.93) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$. SD rats experiments showed that tandospirone transdermal patches held slow-release characteristics compared with tandospirone suspension, with $T_{1/2}$ being extended to $(6.37 \pm 4.46) \text{h}$ and $MRT_{0 \sim t}$ increased by 17-folds. **Conclusion** Tandospirone transdermal patches show sustained release effects and become a new drug delivery formulation for tandospirone.

Key words: tandospirone; transdermal patch; ionic liquid; permeation promoter

坦度螺酮 (tandospirone) 于 2004 年在中国上市,被国家药品监督管理局批准用于治疗各种神经症引起的焦虑状态,如广泛性焦虑^[1-2]。它主要作用于 5-羟色胺 1A 受体 (5-HT_{1A}),通过选择性地激动突触后膜的 5-HT_{1A} 受体,抑制 5-羟色胺能神经活动从而发挥抗焦虑作用^[3]。与传统的苯二氮草类抗焦虑药物相比,坦度螺酮副作用小^[4],长期使用无成瘾性^[5]。目前,坦度螺酮的

市售剂型主要是片剂与胶囊剂,而它在人体内主要由细胞色素 P450 3A4 酶 (cytochrome protein 3A4, CYP3A4) 代谢^[6],达峰时间仅 0.5 ~ 2 h,体内消除半衰期为 2 ~ 3 h。因此在临床使用时维持坦度螺酮在体内的有效血药浓度,需要一日给药 3 次,容易导致患者用药顺应性差,血药浓度波动性大。

经皮给药系统 (transdermal drug delivery sys-

作者简介:符渝昕,男,硕士研究生,主要从事新制剂研究, email: 447115932@qq.com *通信作者:程泽能,男,教授,博士生导师,主要从事生物药剂学和药物动力学研究, email: chengzn@csu.edu.cn

tem, TDDS)是指药物经由人体皮肤表面进入或者透过皮肤以达到局部或者全身治疗作用的一种新型给药系统。TDDS与传统口服给药方式相比,避免了首过效应和胃肠道刺激等困扰,同时还可实现持续稳定的药物输送,维持平稳的血药浓度,避免口服给药所导致的“峰-谷”现象^[7]。TDDS特别适合老人和小孩等不能自主服药的患者以及吞咽困难的患者^[8],同时对于那些需要长期维持治疗的慢性病,比如糖尿病、高血压、阿尔茨海默病和广泛性焦虑症等,TDDS具有显著的临床应用优势^[9]。但是,皮肤角质层的高度不透性的“砖-墙(Brick-mortar)”致密结构^[10],组成了药物分子透皮渗透的主要屏障。为了提高药物透过皮肤的能力,如今已经研究出许多促渗方法,包括化学促渗剂、超声、离子导入和纳米给药系统等。

离子液体(ionic liquids, ILs)是由有机阳离子与无机或有机阴离子组成的有机盐,在低于100℃时为液体^[11]。离子液体在合成催化、物质转换、电化学等领域得到广泛应用。在药物递送中,ILs具有增加药物溶解度、提高药物稳定性和促进药物渗透性等作用。因此本研究尝试将坦度螺酮制备成透皮贴剂,使用传统化学促渗剂与ILs作为联合促渗剂增加药物渗透量,对方剂进行优化,以期解决坦度螺酮半衰期短,每日给药次数多的问题,为坦度螺酮后续剂型开发提供参考。

1 材料

1.1 仪器

SQP QUINTIX224-1CN型万分之一天平、SECURA 225D-1CN型十万分之一天平(德国赛多利斯);1200型高效液相色谱仪(美国安捷伦);FE28型pH计(瑞士梅特勒);MMS4Pro型多联磁力搅拌器(浙江群安);BT-50型超声波分散器(丹东百特);C&D360型涂布机(美国禄亘);R-1001VN型旋蒸蒸发仪、SHB-III型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸);DFY-10L/30型低温恒温反应浴(巩义予华);DZF-6020型真空干燥箱(上海一恒);AB 5500型三重四极杆液质联用仪(AB Sciex公司),配有电喷雾电离源及Analys (Version1.6.3/1.7.2)数据处理系统,配有AB Sciex ExionLC AD液相色谱仪(含自动进样器、柱温箱等);Sartorius BS224S型万分之一天平(北京赛多利斯);METTLER TOLEDO XPR2/A型百万分之一天平(METTLER, 瑞士),SYSTEM918-12型透皮扩散实验仪(美国禄亘)。

1.2 试药

坦度螺酮(原料药,湖北科乐精细化工,纯度:98%);枸橼酸坦度螺酮胶囊(四川科瑞德);坦度螺酮-d₈对照品(TLC,批号:2517-046A1;含量:99.9%);DURO-TAK 4098、DURO-TAK 2516、DURO-TAK 2052压敏胶(德国汉高);油酸(药用辅料级,湖南尔康制药);肉豆蔻酸异丙酯(IPM, AR级,阿拉丁,纯度:98%),丙二醇(PG,药用辅料级,湖北人福),甲醇、乙腈(HPLC级,上海星可);三乙胺(AR级,湖南汇虹);冰醋酸(AR级,天津科密欧);乙酸乙酯、氯化钠、磷酸二氢钾、氢氧化钠(AR级,国药集团);乙醇(AR级,成都科隆);盐酸(药用辅料级,湖南尔康,纯度:10.2%);多库酯钠(纯度:98%)、氢氧化胆碱(纯度:44%)(AR级,安耐吉化学);无水硫酸钠(AR级,国药集团);羧甲基纤维素钠(药用辅料级,阿拉丁)。

1.3 实验皮肤

实验用巴马香猪皮(临西县敬德农产品销售有限公司)。

1.4 实验动物

SD大鼠,体重为210~240g,雌性12只。许可证号:SYXK(湘)2020-0019,湖南斯莱克景达实验动物有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent 5 TC-C18柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:水相(0.3%三乙胺溶液,醋酸调pH至3.2)-有机相[乙腈:甲醇(1:2, V/V)](65:35, V/V);检测波长243 nm;流速1.0 mL·min⁻¹;柱温30℃;进样量40 μL。

2.2 坦度螺酮透皮贴剂的制备工艺

将处方量的坦度螺酮、促渗剂、丙烯酸酯压敏胶、乙酸乙酯加入塑料容器,于室温磁力搅拌1 h(600 r·min⁻¹)。搅拌结束后,真空干燥箱脱气。脱气后,设置涂布机涂布厚度0.500 mm,将配制的药液涂布于氟素离型膜。70℃干燥后,层压背衬膜,即得坦度螺酮透皮贴剂。

2.3 体外释放实验方法

将硝酸纤维素膜放入pH 7.4磷酸盐缓冲液(PBS)中活化30 min。将已裁切成15 mm直径大小的坦度螺酮透皮贴剂贴附于硝酸纤维素膜上,放置于Franz扩散池上。向扩散池中加入超声脱气后的接收液(pH 7.4 PBS),设置水浴温度34℃,搅拌速度600 r·min⁻¹,透过面积为1.76 cm²,待扩散池升温至32℃,排出气泡,开始实验。分别

于 1、2、4、6、8 h 取出扩散池内所有接收液，每次取出接收液后立即补加等温、等体积的接收液，取接收液按“2.1”下方法测定样品中坦度螺酮浓度，按照式 (1) 计算单位面积累计释放量 (Q)。

$$Q_t = \frac{C_n \times V + \sum C_{n-1} \times V_n}{A} \quad (1)$$

式中 Q_t 表示 t 时刻单位面积累计释放量 ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)； C_n 表示第 n 个采样点时取样的浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)； V_n 为取样体积 (mL)； A 为扩散池有效透过面积 (cm^2)。对 $Q_t-\sqrt{t}$ 曲线进行线性回归，线性回归曲线的斜率即为药物释放速率^[12]。

2.4 体外渗透实验方法

将巴马香猪皮取出后放入生理盐水中，清洗油脂，静置 30 min 后用滤纸擦干，裁切成 35 mm 大小圆片。将坦度螺酮透皮贴剂裁切成 15 mm 直径大小贴片，贴附于猪皮角质层侧，放置于 Franz 扩散池上，皮肤角质层朝上。向扩散池中加入经超声脱气后的接收液 (pH 7.4 PBS)，水浴温度为 34 °C，搅拌速度为 600 r · min⁻¹，透皮面积为 1.76 cm²，待扩散池升温至 32 °C，排出气泡，开始实验。分别于 1、2、4、6、8、12、24 h 取出扩散池内所有接收液，每次取出接收液后立即补加等温、

等体积的接收液，接收液经 0.45 μm 滤膜过滤后，取滤液按“2.1”下方法测定样品中坦度螺酮浓度，按照式 (2) 计算单位面积累计透过量。

$$Q_t = \frac{C_n \times V + \sum C_{n-1} \times V_n}{A} \quad (2)$$

式中 Q_t 表示 t 时刻单位面积累计透过量 ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)； C_n 表示第 n 个采样点时取样的浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)； V_n 为取样体积 (mL)； A 为扩散池有效透过面积 (cm^2)。对 Q_t-t 曲线进行线性回归，线性回归曲线的斜率定义为稳态透皮速率 J_{ss} ，单位为 [$\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$]。

2.5 离子液体合成与表征

2.5.1 胆碱-油酸离子液体的制备 在室温下，称量油酸至锥形瓶中，加入适量无水乙醇超声溶解，再加入氢氧化胆碱水溶液，室温 350 r · min⁻¹ 搅拌 12 h。其中油酸与胆碱的摩尔比为 2 : 1。反应结束后，加入无水硫酸钠除水，通过 0.45 μm 滤膜过滤后，旋转蒸发除去无水乙醇，放入真空干燥箱 60 °C 干燥 48 h。使用 KingDraw 软件书写合成方程式，胆碱-油酸离子液体 ([Cho][Ole]) 的合成方程式如图 1 所示。

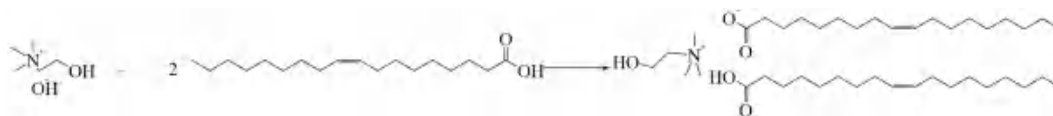


图 1 [Cho][Ole] 的合成方程式

Fig 1 Composition equation of [Cho][Ole]

2.5.2 胆碱-油酸离子液体的结构表征 室温下，合成的 [Cho][Ole] 为淡黄色较黏稠液体，有一定流动性，见图 2 (中间圆圈所示)。使用傅里叶红外光谱仪 (FT-IR) 及核磁共振波谱仪对 [Cho][Ole] 进行结构表征，结果如图 3 所示。



图 2 胆碱-油酸离子液体的外观

Fig 2 Appearance of [Cho][Ole]

图 3A 中 1710 cm⁻¹、1402 cm⁻¹ 对应油酸中羧

基官能团，1244 cm⁻¹ 对应胆碱叔胺基团。图 3B ¹H NMR 谱图中可以看出 5.32 (m, HC = CH)，2.02 (m, -CH₂-)，1.46 (m, -CH₂-)，1.28 (d, -CH₂-)，0.87 (dd, -CH₃) 分别对应油酸双键、油酸双键 α 位亚甲基及羧基 α 位亚甲基、油酸羧基 β 位亚甲基、油酸亚甲基油酸末端甲基信号峰；3.87 (d, -CH₂-)，3.46 (m, N-CH₂)，3.16[s, N-(CH₃)₃] 分别对应胆碱羟基 α 位亚甲基、胆碱羟基 β 位亚甲基、胆碱氮上甲基信号峰。¹H NMR 谱图数据与文献报道一致^[13]，进一步说明成功制备了 [Cho][Ole]。

2.6 坦度螺酮透皮贴剂的处方研究

2.6.1 压敏胶筛选 称取 DURO-TAK 4098、DURO-TAK 2516、DURO-TAK 2052 这 3 种压敏胶，加入坦度螺酮原料药，加入适量乙酸乙酯，搅拌均匀后，涂布干燥制备贴剂，得到载药量为 5% 的透皮贴剂，通过外观以及体外释放实验综合评价以选择出合适的压敏胶型号，结果见表 1。

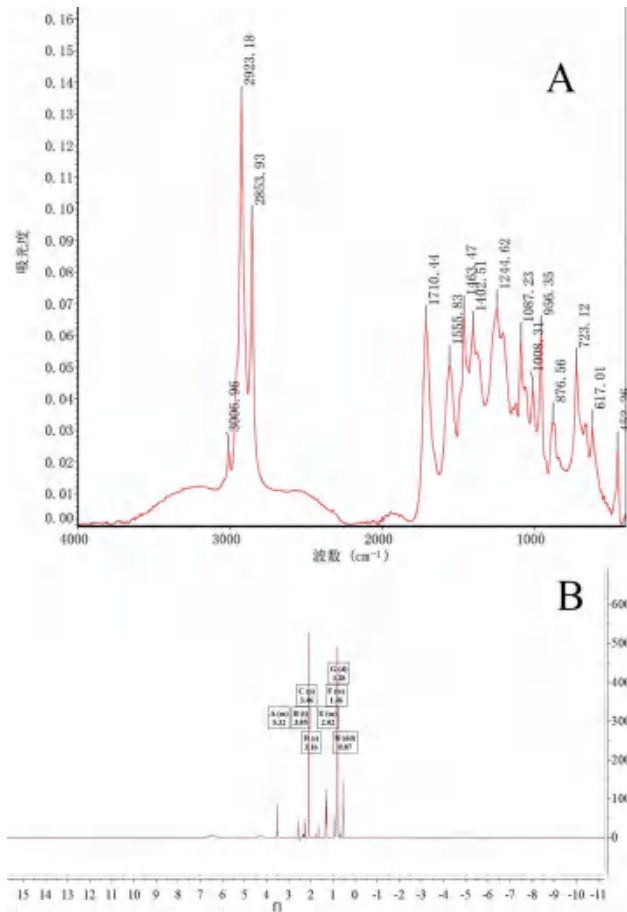


图3 胆碱-油酸的 FT-IR 光谱 (A) 及 ¹H NMR 谱图 (B)
Fig 3 FT-IR spectra (A) and ¹H NMR spectra (B) of [Cho][Ole]

使用不同压敏胶制备坦度螺酮贴剂后, DURO-TAK 2516 组表面有大量白色固体, 坦度螺酮析晶情况严重, 该型号压敏胶载药量较低, 因此未进行体外释放实验。DURO-TAK 4098 与 DURO-TAK 2052 组体外释放实验结果 $R^2 \geq 0.99$, 线性关系良好。DURO-TAK 4098 组的释放速率较 DURO-TAK 2052 组快, Q_{sh} 是 DURO-TAK 2052 组的 1.6 倍。因此, 压敏胶型号确定为 DURO-TAK 4098。

2.6.2 促渗剂筛选 称取坦度螺酮加入容器中, 分别加入不同促渗剂 (PG、[Cho][Ole]、IPM), 再加入 DURO-TAK 4098 压敏胶及乙酸乙酯, 搅拌均匀后, 采用“2.2”项下方法涂布、干燥, 制备 3 种含有不同促渗剂的坦度螺酮透皮贴剂及不含促渗剂的对比贴剂。通过体外经皮渗透实验考察不同种类的促渗剂对坦度螺酮透皮贴剂透过效果的影响, 使用 Graphpad 6.0 软件绘制结果图, 结果见图 4 及表 2。

与无促渗剂的坦度螺酮透皮贴剂组相比, 以上 3 种促渗剂对药物均有促渗作用中, IPM 对坦度螺酮的促渗作用最显著, Q_{24h} 为 $(136.86 \pm 19.89) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, 约为无促渗剂组的两倍。

2.6.3 促渗剂用量考察 称取坦度螺酮加入容器中, 加入不同质量的 IPM, 搅拌均匀后, 采用“2.2”项下方法涂布、干燥, 制备 3 种不同的坦度螺酮透皮贴剂, 载药量为 5%, 促渗剂含量分别为

表 1 不同压敏胶单因素实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab 1 Single factor test for pressure sensitive adhesive type ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	含药量 / %	释放速率 / [$\mu\text{g} / (\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{1/2})$]	$Q_{sh} / (\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2})$	R^2	外观
DURO-TAK 4098 组	5	30.48 ± 0.88	70.32 ± 1.45	0.9985	透明胶体, 无晶体析出
DURO-TAK 2052 组	5	20.17 ± 0.50	43.20 ± 1.44	0.9953	透明胶体, 无晶体析出
DURO-TAK 2516 组	5	/	/	/	表面有大量白色固体

10%、15%、20%。通过体外经皮渗透实验考察不同量的促渗剂对坦度螺酮透皮贴剂透过效果的影响, 结果见图 5 及表 3。

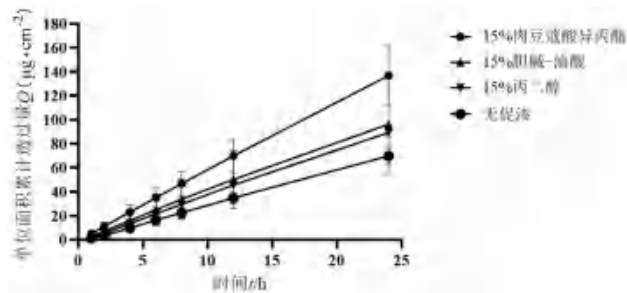


图 4 不同种类促渗剂的坦度螺酮透皮贴剂体外透皮曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig 4 In vitro permeation profiles of tandospirone patches containing different penetration enhancers ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

随着促渗剂含量的增加, Q_{24h} 与 J_{ss} 先增加后降低, 15%IPM 组 Q_{24h} 与 J_{ss} 最高, 20%IPM 组的 Q_{24h} 与 J_{ss} 低于 10%IPM 组。因此, 促渗剂含量确定为 15%。

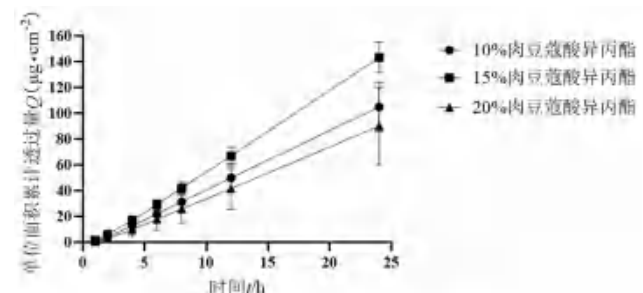


图 5 不同浓度促渗剂的坦度螺酮透皮贴剂体外透皮曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig 5 In vitro permeation profiles of tandospirone patches containing different concentrations of penetration enhancers ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 2 不同种类促渗剂的坦度螺酮透皮贴剂体外渗透实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab 2 In vitro permeation of tandospirone patches containing different penetration enhancers ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	促渗剂含量 /%	载药量 /%	$Q_{24h} / (\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2})$	累计渗透曲线方程	$J_{ss} / [\mu\text{g} / (\text{cm}^2 \cdot \text{h})]$	R^2
IPM 组	15	5	136.86 ± 19.89	$Q = 5.73t + 0.52$	5.73 ± 0.81	0.9995
PG 组	15	5	89.31 ± 2.82	$Q = 3.83t - 1.71$	3.83 ± 0.12	0.9990
[Cho][Ole] 组	15	5	96.16 ± 34.07	$Q = 4.07t - 0.20$	4.07 ± 1.43	0.9971
无促渗剂组	/	5	69.83 ± 5.37	$Q = 3.00t - 1.95$	3.00 ± 0.22	0.9983

表 3 不同浓度促渗剂的坦度螺酮透皮贴剂体外渗透实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab 3 In vitro permeation of tandospirone patches containing different concentrations of penetration enhancers ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	促渗剂含量 /%	载药量 /%	$Q_{24h} / (\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2})$	累计渗透曲线方程	$J_{ss} / [\mu\text{g} / (\text{cm}^2 \cdot \text{h})]$	R^2
10%IPM 组	10	5	104.88 ± 15.69	$Q = 4.56t - 4.91$	4.56 ± 0.65	0.9990
15%IPM 组	15	5	143.28 ± 9.66	$Q = 6.22t - 6.90$	6.22 ± 0.42	0.9992
20%IPM 组	20	5	90.06 ± 24.34	$Q = 3.94t - 5.24$	3.94 ± 1.03	0.9981

2.6.4 载药量考察 分别称取质量为 100、200、300 mg 的坦度螺酮原料药后，依次称取辅料与溶剂，搅拌均匀后涂布干燥制备贴剂，得到载药量为 5%、10%、12.5% 的坦度螺酮贴剂。通过外观评价是否析晶选择合适的处方组合，结果见表 4。

表 4 坦度螺酮透皮贴剂的载药量考察结果

Tab 4 Drug loading test for tandospirone patch

组别	促渗剂种类及用量	载药量 /%	外观
1	15%IPM	5	透明胶体，无析晶
2	15%IPM	10	透明胶体，析晶
3	15%[Cho][Ole]	5	透明微黄胶体，无析晶
4	15%[Cho][Ole]	10	透明微黄胶体，无析晶
5	15%[Cho][Ole]	12.5	透明微黄胶体，析晶
6	7.5%[Cho][Ole] + 7.5%IPM	10	透明微黄胶体，无析晶
7	7.5%PG + 7.5%IPM	10	透明胶体，无析晶

结果表明，IPM 作为单一促渗剂时，在 10% 载药量时会出现析晶现象；[Cho][Ole] 作为单一促渗剂时，在 12.5% 载药量时出现析晶现象；PG 与 IPM 联用、[Cho][Ole] 与 IPM 联用及 [Cho][Ole] 作为单一促渗剂，可使载药量达到 10% 无析晶现象。因此选取表 4 中的组别 4、6、7 进行体外经皮渗透实验，结果见表 5 及图 6。

表 5 坦度螺酮透皮贴剂的体外渗透实验结果

Tab 5 In vitro permeation results of tandospirone patches

组别	$Q_{24h} / (\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2})$	累计渗透曲线方程	$J_{ss} / [\mu\text{g} / (\text{cm}^2 \cdot \text{h})]$	R^2
4	219.18 ± 34.09	$Q = 9.21t - 4.99$	9.21 ± 1.37	0.9997
6	309.33 ± 45.98	$Q = 13.43t - 16.15$	13.43 ± 1.93	0.9982
7	243.22 ± 30.70	$Q = 10.39t - 5.73$	10.39 ± 1.34	0.9998

由表 5 及图 6 结果可知，与使用 [Cho][Ole] 作为单一促渗剂的组别 4 相比，组别 6 和组别 7 的 Q_{24h} 与 J_{ss} 均有所提高，其中组别 6 的 Q_{24h} 达到了 (309.33 ± 45.98) $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ，是组别 4 的 1.5 倍。

2.7 验证实验

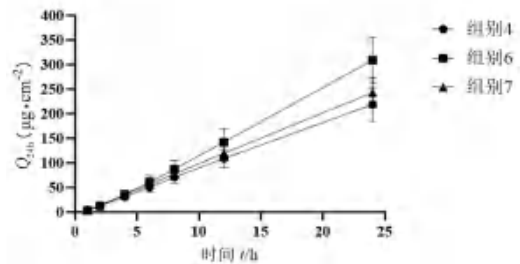


图 6 坦度螺酮透皮贴剂体外渗透曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig 6 In vitro permeation profiles of tandospirone patches ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

根据前期实验结果，按照 10% 载药量，7.5% IPM，7.5% [Cho][Ole]，75%DURO-TAK 4098 制备 3 批贴剂。参照 2020 年版《中国药典》第四部通则含量均匀度检查法对 3 批贴剂进行评价。结果见表 6，3 批制剂 $A + 2S \leq 25$ ，符合药典要求，贴剂的制备工艺稳定可行。累计透过量结果见图 7 及表 7，3 批透皮贴剂的 Q_{24h} 和经皮渗透速率均较为稳定且基本保持一致，经皮渗透效果较为稳定。

表 6 3 批贴剂含量均匀度结果

Tab 6 Drug content uniformity of 3 batches of patches

批次	$A + 2S$	判定结果
1	11.38	均匀
2	14.52	均匀
3	17.24	均匀

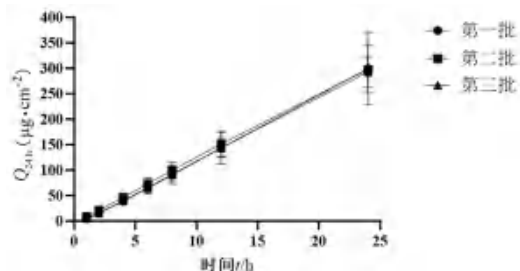


图 7 3 批坦度螺酮透皮贴剂的体外渗透曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig 7 In vitro permeation profiles of 3 batches of tandospirone patches ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 7 3 批坦度螺酮透皮贴剂的体外渗透实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab 7 In vitro permeation of three batches of tandospirone patches ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

批次	$Q_{24h} / (\mu g \cdot cm^{-2})$	累计渗透曲线方程	$J_{ss} / [\mu g / (cm^2 \cdot h)]$	R^2
1	299.62 ± 58.21	$Q = 12.91t - 11.35$	12.91 ± 2.59	0.9997
2	297.83 ± 37.81	$Q = 12.59t - 2.57$	12.59 ± 1.67	0.9997
3	293.17 ± 24.42	$Q = 12.59t - 8.69$	12.58 ± 1.03	0.9999

2.8 坦度螺酮贴剂大鼠体内药动学实验

2.8.1 实验设计及采血 坦度螺酮混悬液配制：将坦度螺酮胶囊内容物全部倒入 0.5% 羧甲基纤维素钠水溶液中，搅拌均匀得到 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的坦度螺酮混悬液。

取雌性 SD 大鼠 12 只，体重为 210 ~ 240 g，大鼠随机分为两组（每组 6 只）。一组口服灌胃给予上述坦度螺酮混悬液，剂量为 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。分别于灌胃前 0.25 h 以及灌胃后 0.083、0.167、0.5、0.75、1.0、1.5、2.0、4.0、6.0、8.0、10 h 通过眼眶采集静脉血 0.3 mL，血浆样品放于含肝素钠的 EP 管中，然后立即以 1700 g、4 °C 离心 10 min，取上清液保存在 -20 °C 冰箱。另一组给予含药量 11 mg 的坦度螺酮贴片，面积约 10 cm²。给药前在大鼠背部确定脱毛区域，小心剔除毛发观察 24 h。实验当日，将贴片贴于大鼠背部皮肤后，手指压覆，使用医用胶带固定贴片位置，防止贴片脱落。分别在给药前 0.25 h，给药后 4、8、12、16、20、24 h（撕下贴片）及 26、28、30、32、34、36 h 采集静脉血 0.3 mL，血浆样品放于含肝素钠的 EP 管中，于 1700 g、4 °C 离心 10 min，取上清液 -20 °C 保存。

2.8.2 检测方法 色谱及质谱条件：色谱柱：Phenomenex Gemini 3 μm C6-Phenyl 110A (150 mm × 4.6 mm, 3 μm)；流动相 A：5 mmol · L⁻¹ 乙酸铵水溶液，流动相 B：甲醇，梯度洗脱 (0 ~ 1.20 min, 50%A, 1.20 ~ 2.50 min, 5%A, 2.51 ~ 3.00 min, 50%A)，流速 0.5 mL · min⁻¹，进样量 10 μL，柱温 30 °C。

离子源：采用离子喷雾离子化 (ESI) 源，正离子方式检测，离子源电压 (IS)：5500 V；离子源温度 (TEM)：500 °C；气帘气 (CUR)：40 psi；雾化气 (GS1)：60 psi；辅助加热气 (GS2)：60 psi；扫描方式：多重反应监测 (MRM)；定量离子对：坦度螺酮 384.0 / 122.3 (DP 100 V, CE 39 eV)，坦度螺酮-d₈ 392.2 / 122.0 (DP 100 V, CE 39 eV)，扫描时间：200 ms。

样品前处理：取分析批样本解冻后涡旋 1 min，取血浆样本 100 μL，加入内标储备液 (坦度螺酮-d₈, 3000 pg · mL⁻¹) 50 μL，加入 300 μL 乙腈沉淀蛋白，

于 4 °C 条件 2450 g 离心 10 min，取上清液待测。

2.8.3 实验结果 经过方法学验证，专属性良好，线性范围为 3.0 ~ 6000.0 pg · mL⁻¹，标准曲线为 $y = 1.5x - 0.0013$ ($r = 0.9983$)，定量下限为 3.0 pg · mL⁻¹，满足样品测定要求。

采用 Phoenix 软件分别计算坦度螺酮透皮贴剂和混悬液的药动学参数 (见表 8)；采用 Graphpad-Prism 6.0 版统计学软件，绘制平均血浆药物浓度 - 时间曲线图，见图 8。

表 8 药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab 8 Main pharmacokinetic parameters ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数	贴剂组	混悬液组
t_{max}/h	21.33 ± 2.07***	0.25 ± 0.25
$t_{1/2}/h$	6.37 ± 4.46***	0.96 ± 0.37
$MRT_{0 \sim t}/h$	16.97 ± 1.60***	0.98 ± 0.29
$AUC_{0 \sim t} / (ng \cdot h \cdot L^{-1})$	691.32 ± 608.21**	246.80 ± 172.22
$C_{max} / (ng \cdot L^{-1})$	54.14 ± 43.58**	274.73 ± 231.01

注：与混悬液组比较，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ 。

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

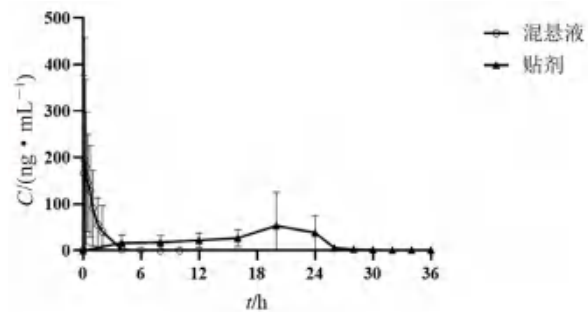


图 8 坦度螺酮平均血浆药物浓度 - 时间曲线图 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig 8 Mean serum concentration-time curve of tandospirone ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

动物实验结果表明坦度螺酮贴剂组与混悬液组的药动学特征有显著差异。给药后，口服混悬液组迅速吸收，0.25 h 左右达到 C_{max} (274.73 ± 231.01) $ng \cdot L^{-1}$ ，而后迅速消除， $t_{1/2}$ 为 (0.96 ± 0.37) h。贴剂组于给药 21 h 左右达到 C_{max} (54.14 ± 43.58) $ng \cdot L^{-1}$ ，且药物消除速度缓慢， $t_{1/2}$ 为 (6.37 ± 4.46) h。坦度螺酮贴剂组的 $MRT_{0 \sim t}$ 约为混悬液组的 17 倍，具有明显缓释特征。

3 讨论

聚丙烯酸酯类压敏胶是应用最广泛的一类压敏胶，具有良好的生物相容性和黏附性，可与大多数药物和辅料相容。通过压敏胶筛选实验发现，携带羟基基团的 DURO-TAK 2510 压敏胶，载药量极低，而携带羧基基团的 DURO-TAK 2052 及无官能团的 DURO-TAK 4098 载药量较好。考虑到药物释放后透皮需要一段时间，使用了释放速

度较快的 DURO-TAK 4098 作为坦度螺酮透皮贴剂的压敏胶基质。通过促渗剂用量考察,发现在一定范围内增加促渗剂的用量,会增加药物的透皮吸收,而超出这个范围继续增加促渗剂的用量,反而会降低药物透皮吸收。

据文献报道,贴剂中药物总量及促渗剂会对药物透过皮肤能力产生影响^[14]。对于难溶性药物的透皮给药,基于胆碱为阳离子的离子液体可以通过增加药物溶解度或作为促渗剂增加药物的透皮吸收^[15-17]。有研究者使用胆碱-氨基酸离子液体、IPM、乙醇的三元体系提高了阿昔洛韦的溶解度,显著提高了阿昔洛韦的透皮吸收^[18]。本研究中合成的 [Cho][Ole],除了具有一定促渗作用外,还具有低毒性、生物相容性和可降解性等优点^[19-20]。单独使用 IPM 作为促渗剂时,贴剂在 10% 载药量会出现析晶现象。[Cho][Ole] 作为单一促渗剂、[Cho][Ole] 与 IPM 联用、PG 与 IPM 联用时,载药量达 10% 时不会出现析晶现象。一方面,PG 本身作为溶剂可能溶解了一部分坦度螺酮,提高了处方的载药量;另一方面,[Cho][Ole] 中的油酸本身可以干扰晶体在贴剂中的形成过程^[21]。体外经皮渗透实验表明,促渗剂联用的促渗效果优于单独使用 [Cho][Ole] 作为促渗剂,而且 [Cho][Ole] 与 IPM 联用,促渗效果优于 PG 与 IPM 联用。验证实验表明,贴剂的制备工艺稳定可行,体外渗透效果稳定。

本研究合成了 ILs,从外观和体外渗透实验考察优化了坦度螺酮透皮贴剂的处方组成,最后通过大鼠体内药动学实验研究了透皮贴剂的药动学特征。贴剂与混悬剂相比,具有缓释特征, $T_{1/2}$ 和 $MRT_{0\sim t}$ 显著延长。综上所述,本研究制备的坦度螺酮透皮贴剂,有望减少给药次数,提高患者用药依从性,为坦度螺酮的长效剂型开发提供了一条新思路。

参考文献

[1] 刘会民. 坦度螺酮的临床应用进展 [J]. 天津药学, 2014, 26 (4): 39-42.
 [2] 张鸿燕, 舒良, 李华芳, 等. 坦度螺酮与丁螺环酮治疗广泛性焦虑症的疗效和安全性比较研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2004, 20 (1): 421-424.
 [3] Huang XF, Yang J, Yang SJ, et al. Role of tandospirone, a 5-HT_{1A} receptor partial agonist, in the treatment of central nervous system disorders and the underlying mechanisms [J]. Oncotarget, 2017, 8 (60): 102705-102720.
 [4] Hu WY, Jia M, He SY, et al. Simultaneous determination of tandospirone and its active metabolite, 1-[2-pyrimidyl]-piperazine in rat plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study [J]. Biomedical

Chromatogr, 2019, 33 (7): e4525.
 [5] Lin JY, Su YA, Wang CX, et al. Effects of tandospirone augmentation in major depressive disorder patients with high anxiety: a multicenter, randomized, parallel-controlled, open-label study [J]. J Psychiatr Res, 2018, 99: 104-110.
 [6] Nishikawa H, Inoue T, Masui T, et al. Pharmacokinetic interaction between tandospirone and fluvoxamine in the rat contextual conditioned fear stress model and its functional consequence: involvement of cytochrome P450 3A4 [J]. Psychiatry Clin Neurosci, 2008, 62 (5): 591-596.
 [7] Guy RH. Transdermal drug delivery [J]. Drug delivery, 2010, 197: 399-410.
 [8] 蒲婷婷. 普拉克索长效经皮给药系统的构建与评价 [D]. 大连: 大连理工大学, 2016.
 [9] Prausnitz MR, Langer R. Transdermal drug delivery [J]. Nat Biotechnol, 2008, 26 (11): 1261-1268.
 [10] Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005, 6 (4): 328-340.
 [11] Gouveia W, Jorge TF, Martins S, et al. Toxicity of ionic liquids prepared from biomaterials [J]. Chemosphere, 2014, 104: 51-56.
 [12] USP. General Chapters 1724: semisolid drug products-performance tests [S]. 2022, PF48 (3).
 [13] Mu LW, Shi YJ, Ji T, et al. Ionic grease lubricants: protic [triethanolamine][oleic acid] and aprotic [choline][oleic acid] [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2016, 8 (7): 4977-4984.
 [14] 黄婷, 张靖, 杨锐, 等. 透皮贴剂的技术及质量控制进展 [J]. 中国药事, 2023, 37 (9): 989-1000.
 [15] Hattori T, Tagawa H, Inai M, et al. Transdermal delivery of nobiletin using ionic liquids [J]. Sci Rep, 2019, 9 (1): 20191.
 [16] Li XD, Ma NN, Zhang LJ, et al. Applications of choline-based ionic liquids in drug delivery [J]. Int J Pharm, 2022, 612: 121366.
 [17] Tanner EEL, Curreri AM, Balkaran JPR, et al. Design principles of ionic liquids for transdermal drug delivery [J]. Adv Mater, 2019, 31 (27): 1901103.
 [18] Islam MR, Chowdhury MR, Wakabayashi R, et al. Choline and amino acid based biocompatible ionic liquid mediated transdermal delivery of the sparingly soluble drug acyclovir [J]. Int J Pharm, 2020, 582: 119335.
 [19] Gomes JM, Silva SS, Reis RL. Biocompatible ionic liquids: fundamental behaviours and applications [J]. Chem Soc Rev, 2019, 48 (15): 4317-4335.
 [20] Ali MK, Moshikur RM, Wakabayashi R, et al. Biocompatible ionic liquid-mediated micelles for enhanced transdermal delivery of paclitaxel [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2021, 13 (17): 19745-19755.
 [21] 刘孟斯, 姜典卓, 罗华菲, 等. 压敏胶在透皮贴剂中的应用及其药学研究探讨 [J]. 中国医药工业杂志, 2021, 52 (7): 863-870.

(收稿日期: 2024-01-03; 修回日期: 2024-03-18)

氯吡格雷阿司匹林片制备及体外溶出一致性评价

钱方^{1, 2, 3}, 伍贤志^{2, 3*} (1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2. 长三角药物高等研究院, 江苏 南通 226133; 3. 江苏万高药业股份有限公司, 江苏 南通 226100)

摘要: **目的** 制备氯吡格雷阿司匹林片, 并对其处方工艺进行优化, 以实现与参比制剂体外溶出行为一致。**方法** 氯吡格雷采用热熔制粒制备工艺, 阿司匹林采用粉末直压、肠溶包衣制备工艺。单因素考察制备过程的关键处方工艺因素, 以获得最优的处方工艺条件。通过高效液相色谱法对氯吡格雷和阿司匹林的溶出度进行测定, 采用相似因子 f_2 法比较自制制剂与参比制剂的溶出曲线。**结果** 经过优化的自制制剂与参比制剂在不同介质中的 f_2 均大于 50, 溶出曲线相似。**结论** 氯吡格雷阿司匹林片自制制剂与参比制剂体外溶出行为一致。

关键词: 氯吡格雷; 阿司匹林; 体外溶出; 热熔制粒; 相似因子

中图分类号: R945 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)06-1498-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.016

Preparation and in vitro dissolution consistency of clopidogrel and aspirin tablets

QIAN Fang^{1, 2, 3}, WU Xian-zhi^{2, 3*} (1. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute, Nantong Jiangsu 226133; 3. Jiangsu Wangao Pharmaceutical Co., Ltd., Nantong Jiangsu 226100)

Abstract: Objective To prepare clopidogrel and aspirin tablets and optimize the formulation process to achieve consistency with the reference preparation on dissolution behavior in vitro. **Methods** Clopidogrel was prepared by hot melt granulation and aspirin was prepared by direct powder compression method and enteric coating. The key formulation factors of the preparation process were determined by single factor to obtain the optimal formulation conditions. The dissolution of clopidogrel and aspirin was determined by high performance liquid chromatography. The dissolution curves of self-made preparation and reference preparation were compared by similarity factor f_2 method. **Results** The f_2 of the optimized self-made preparation and the reference preparation in different media was greater than 50, with similar dissolution curves. **Conclusion** The dissolution behavior of self-made clopidogrel and aspirin tablets in vitro is consistent with that of reference preparation.

Key words: clopidogrel; aspirin; dissolution in vitro; hot melt granulation; similarity factor

心血管疾病是一类严重威胁人类健康的疾病, 在我国疾病死亡构成比中, 心血管疾病居首位^[1]。目前, 阿司匹林和氯吡格雷是心血管疾病治疗中常用的联用药物, 它们分别具有抗血小板聚集和抗凝作用, 两者联用会加强血小板抑制率, 有助于改善患者心功能, 可以改善患者的临床症状^[2-7]。然而, 传统的制剂存在药物释放不稳定、副作用较多等问题^[8]。氯吡格雷阿司匹林片是由赛诺菲研发的一种

复方双层包芯片, 外壳层含有氯吡格雷(规格: 75 mg), 片芯含有阿司匹林肠溶片(规格: 100 mg)。应用于透皮冠状动脉成形术(PCI)的缺血性心脏疾病, 急性冠脉综合征(不稳定型心绞痛、非ST段升高心肌梗死、ST段升高心肌梗死), 稳定型心绞痛、陈旧心肌梗死。双层包芯片是一种新型的药物制剂形式, 与单药联合相比具有生物等效性、降低胃肠道不良反应、提高药物依从性等优点^[9-12]。

作者简介: 钱方, 男, 硕士, 主要从事药物制剂研究, email: 15856782119@163.com *通信作者: 伍贤志, 男, 高级工程师, 硕士研究生导师, 主要从事药物制剂研究, email: wuxianzhi108@163.com

目前国内研究关于氯吡格雷阿司匹林复方片多是双层片,包芯片极少^[13-14]。本文旨在探讨复方氯吡格雷阿司匹林片的制备工艺及体外释放评价,为该药的后续研究提供一定的依据,并为国内类似剂型的研究提供一些参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

ES5200 型百分之一电子天平(天津市德安特);GL124-1SCN 型万分之一天平(赛多利斯);DPL-2A 型多功能制粒包衣机、GZL-125 型移动干湿整粒机(重庆精工制药机械);HS-20 型料斗混合机(常州一步干燥设备有限公司);ZPS8 型旋转式压片机(上海信源制药机械有限公司);YD-35 型片剂硬度仪(天津市天大天发科技有限公司);BGB-5FA 型高效包衣机(浙江小伦制药机械有限公司);FADT-1202RC 型自动溶出仪(富科思);LC-2030C Plus 型高效液相色谱仪(岛津)。

1.2 试药

氯吡格雷阿司匹林片参比制剂(赛诺菲,规格:75 mg/100 mg,批号:1K096A);阿司匹林(山东新华,批号:222062);硫酸氢氯吡格雷(苏州立新,批号:C51-20220902);玉米淀粉(安徽山河,批号:230510);硬脂酸(罗辅,批号:20230117767);胶态二氧化硅(赢创,批号:152022114);微晶纤维素(JRS,批号:66012210207);羟丙基甲基纤维素(湖州展望,批号:20230211);聚乙二醇 6000(南京威尔,批号:20220601B-3);甲基丙烯酸-丙烯酸乙酯共聚物水分散体(Evonik Rohm GmbH,批号:C220314141);滑石粉(广西龙胜华美滑石开发有限公司,批号:202206124);枸橼酸三乙酯(蚌埠丰原涂山制药有限公司,批号:Y57221208-1);无水乳糖(DFE,批号:10922SJ);低取代羟丙纤维素(日本信越,批号:2051201);DL- α -生育酚(天津信诚康达药业,批号:221101);氢化蓖麻油(BASF SE,批号:96555568EO);部分预胶化淀粉(上海卡乐康,批号:1N547287);蔗糖硬脂酸酯(浙江合糖,批号:2022032122);二氧化钛(默克,批号:K51803005);二甲硅油(江西阿尔法药业,批号:20220902);硫酸氢氯吡格雷对照品(江苏万高药业有限公司,批号:RS-C51-20220902,纯度:99.4%);阿司匹林对照品(江苏万高药业有限公司,RS-222062,纯度:99.8%);水杨酸(中国食品药品检定研究院,批号:100106-202106,纯度:99.8%);空白辅料(自制,批号:23050501-KF)。

2 方法与结果

2.1 色谱柱条件

Welch Ultimate LP-C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μ m) 色谱柱,流动相为乙腈-水-磷酸(45:55:2),流速为 1.0 mL·min⁻¹,柱温 20℃,检测波长 235 nm,进样量 10 μ L。

2.2 溶液配制

2.2.1 介质 参考《中国药典》2020 年版^[15] 配制 pH 1.2 盐酸溶液(简称 pH 1.2)、pH 4.5 醋酸盐溶液+0.05% 十二烷基硫酸钠(简称 pH 4.5 + 0.05%SDS)、pH 6.8 磷酸盐溶液+0.15%SDS(简称 pH 6.8 + 0.15%SDS)、pH 6.5 磷酸盐溶液(简称 pH 6.5)、pH 6.8 磷酸盐溶液(简称 pH 6.8)、pH 7.4 磷酸盐溶液(简称 pH 7.4)。

2.2.2 空白辅料溶液 精密称取空白辅料 38 mg,置于 100 mL 量瓶中,加入上述介质,超声 20 min 使其充分溶解,冷却,用介质稀释至刻度线,摇匀,即得。

2.2.3 阿司匹林对照品溶液 精密称取阿司匹林工作对照品 11 mg,置 100 mL 量瓶中,加入甲醇 2 mL 使其得到充分溶解,用介质定容至刻度线,摇匀,即得。

2.2.4 硫酸氢氯吡格雷对照品溶液 精密称取硫酸氢氯吡格雷工作对照品 11 mg,置 100 mL 量瓶中,加入甲醇 2 mL 使溶解,用介质稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.5 水杨酸对照品溶液 精密称取水杨酸 5.5 mg,置 20 mL 量瓶中,加入适量 1% 冰醋酸甲醇溶液使药物充分溶解,定容至刻度线,摇匀,即得水杨酸对照品母液;精密量取水杨酸对照品母液 1 mL,于 50 mL 量瓶中,用介质稀释至刻度,摇匀使其充分溶解,即得。

2.2.6 混合对照品溶液 精密称取阿司匹林工作对照品 11 mg,置 100 mL 量瓶中,加 2 mL 甲醇使溶解,精密量取水杨酸对照品母液 2 mL 于该 100 mL 量瓶中,用介质稀释至刻度线,摇匀,即得。

2.2.7 硫酸氢氯吡格雷母液 精密称取硫酸氢氯吡格雷原料约 110 mg,置 20 mL 量瓶中,加溶剂[乙腈-水-磷酸(45:55:2)]溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.8 阿司匹林母液 精密称取阿司匹林原料约 110 mg,置 20 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3 溶出曲线的测定

依据《中国药典》2020 年版四部通则 0931 第一法^[15]、《普通口服固体制剂溶出曲线测定与比

较指导原则》^[16]，参考《氯吡格雷硫酸盐阿司匹林复合片体外溶出度测定》《复方硫酸氢氯吡格雷阿司匹林双层片的制备和溶出度测定》等^[17-20]相关文献，结合阿司匹林及硫酸氢氯吡格雷在不同介质中的饱和溶解度结果，建立溶出方法。使用篮法，分别以 pH 1.2、pH 4.5 + 0.05% SDS、pH 6.8 + 0.15% SDS 为氯吡格雷层溶出筛选介质；以 pH 1.2 为阿司匹林层耐酸介质，pH 6.5、pH 6.8、pH 7.4 为阿司匹林层溶出筛选介质。温度选择 (37±0.5) °C，溶出介质体积均为 900 mL。pH 4.5 + 0.05% SDS、pH 6.8 + 0.15% SDS 介质中转速为 50 r·min⁻¹，pH 6.5、pH 6.8、pH 7.4 介质中转速为 100 r·min⁻¹，pH 1.2 介质中转速为 75 r·min⁻¹。pH 1.2 时间点为 5、10、15、30、120 min；pH 4.5 + 0.05% SDS、pH 6.8 + 0.15% 取样时间点为 5、10、15、30、45、60 min；pH 6.5 取样时间点为 30、35、40、45、50、60、75、90 min；pH 6.8 取样时间点为 20、25、30、45、60 min；pH 7.4 取样时间点为 15、20、25、30、45、60 min。取 10 mL 补 10 mL，取出液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过，即为供试品溶液。精密量取供试品溶液与对照品溶液，分别注入液相色谱仪，记录色谱图。按外标法以氯吡格雷和阿司匹林峰面积计算每个时间点的累计溶出量，并绘制溶出曲线。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性试验 精密量取“2.2”项下各溶液 10 μL 分别注入液相色谱仪，记录色谱图以及各个样品的出峰时间，考察空白溶剂以及辅料是否会对样品的测定产生干扰。结果显示，在各介质中，空白溶剂及空白辅料均不干扰氯吡格雷、阿司匹林及水杨酸的检测，氯吡格雷峰、阿司匹林峰与水杨酸峰三者分离度较好。

2.4.2 线性试验 使用“2.2”项下不同介质配制不同浓度的阿司匹林、氯吡格雷溶液，进样测定，将药物浓度作为横坐标，峰面积作为纵坐标，拟合出线性方程，计算相关系数 (r)，结果显示，阿司匹林和氯吡格雷在不同 pH 介质中的 r 值均在 0.9993 以上，线性相关性良好。

2.4.3 回收试验 精密称取空白辅料 3.7 mg，置 10 mL 量瓶中，共 9 份，分为 3 组，分别精密加入硫酸氢氯吡格雷母液 0.5、0.8、1.0 mL，阿司匹林母液 0.5、1.0 和 1.5 mL，用介质稀释至刻度，摇匀，滤过，弃 3 mL，取续滤液作为供试品溶液。进样测定，计算回收率及 RSD 值，结果显示，氯吡格雷及阿司匹林在不同介质中的平均回

收率均在 95% ~ 105%， RSD 均不大于 2.0%，显示分析方法的准确度良好。

2.4.4 重复性试验 精密称取空白辅料 3.7 mg，置 10 mL 量瓶中，精密量取硫酸氢氯吡格雷母液及阿司匹林母液各 1.0 mL 置该量瓶中，用介质稀释至刻度，摇匀，滤过，弃 3 mL，取续滤液作为供试品溶液，平行配制 6 份。进样测定，结果显示，氯吡格雷及阿司匹林在不同介质中的平均回收率均在 95% ~ 105%， RSD 均不大于 2.0%，表明该方法的重复性较好。

2.4.5 滤膜吸附 使用“2.2”项下不同介质配制供试品溶液，考察经膜滤过，分别弃去 1、3、5、7 mL 初滤液，通过 HPLC 测定滤膜过滤后药物的浓度，计算回收率，考察滤膜对药物是否有吸附作用。结果显示，药物在不同介质中（除 pH 4.5 + 0.05% SDS 外），供试品溶液经膜滤过，分别弃去 1、3、5、7 mL 初滤液，回收率在 98.0% ~ 102.0%，故滤膜无吸附。pH 4.5 + 0.05% SDS 介质中，供试品溶液经膜滤过，弃去初滤液 1 mL 时，滤膜有吸附，分别弃去 3、5、7 mL，回收率均在 98.0% ~ 102.0%，故需弃去 3 mL 及以上滤膜无吸附。

2.5 评价方法

参照《普通口服固体制剂溶出曲线测定与比较指导原则》，应用相似因子的模型非依赖性方法，采用相似因子 (f_2) 来比较溶出曲线。

计算公式：

$$f_2 = 50 \times \log \{ [1 + (1/n) \sum_{i=1}^n (R_i - T_i)^2]^{-0.5} \times 100 \}$$

其中 R_i 为 t 时间参比制剂平均溶出量， T_i 为 t 时间自制制剂平均溶出量， n 为取样时间点的个数。当 f_2 值大于 50，则可认为参比制剂和自制制剂释放行为相似。当参比制剂和自制制剂在 15 min 的平均溶出量均不低于 85% 时，可认为溶出曲线相似。

2.6 氯吡格雷阿司匹林片的制备

按处方量量取阿司匹林、玉米淀粉、微晶纤维素 (MCC)、胶态二氧化硅、硬脂酸，加入到料斗混合机中混合均匀后得阿司匹林中间体，然后进行压片，直径 7.0 mm，硬度 30 ~ 40 N，最后进行 3.0% 隔离层和 24.0% 肠溶层包衣，得阿司匹林肠溶片。

按处方量量取硫酸氢氯吡格雷、无水乳糖、低取代羟丙纤维素 (L-HPC)、聚乙二醇 6000 (PEG6000)、预胶化淀粉、DL- α -生育酚。先将预胶化淀粉和 DL- α -生育酚混合，过 80 目筛，

然后与其他量取物料加入到料斗混合机中混合均匀，得预混物。预混物加入到流化床中，在 75℃ 条件下热熔制粒 10 min，冷却后取出物料进行干整粒，整粒后与外加物料 MCC、氢化蓖麻油、蔗糖硬脂酸酯混合均匀，得氯吡格雷中间体。

将阿司匹林肠溶片与氯吡格雷中间体压制包芯片，下层填充 185 mg 氯吡格雷中间体，中间填入阿司匹林肠溶片，上层填充 165 mg 氯吡格雷中间体，直径 11.0 mm，硬度 50 ~ 60 N。然后进行 5% 薄膜包衣，得氯吡格雷阿司匹林片。

通过原研相关专利及说明书^[21]，获取处方组成及用量，暂定处方及用量见表 1。

表 1 氯吡格雷阿司匹林片处方组成表

Tab 1 Clopidogrel and aspirin tablet prescription composition table

组成	原辅料	处方占比 /%	
阿司匹林层	阿司匹林	80.86	
	玉米淀粉	8.98	
	硬脂酸	0.45	
	胶态二氧化硅	0.27	
	MCC	9.43	
	氯吡格雷层	硫酸氢氯吡格雷	27.97
		无水乳糖	24.98
		L-HPC	6.94
		PEG6000	6.37
		DL- α -生育酚	0.05
部分预胶化的淀粉		4.14	
MCC		28.00	
氢化蓖麻油		0.94	
蔗糖硬脂酸酯		0.60	

2.7 氯吡格雷层处方工艺筛选

自制制剂与参比制剂需要选择多个 pH 值的溶出介质考察溶出曲线，为节约成本和提高实验效率，选择最具有区分力的溶出介质 pH 6.8 + 0.15%SDS 筛选氯吡格雷层处方工艺，当自制制剂在 pH 6.8 + 0.15%SDS 介质中溶出曲线与参比制剂相似时，再考察其他介质中溶出曲线。

2.7.1 原料粒径考察 将硫酸氢氯吡格雷原料药通过气流粉碎机粉碎，激光粒度仪进行检测，得到四批粒度分布 D_{90} ，分别为 62 μm 、93 μm 、123 μm 和 146 μm 原料药，制备处方，考察粒径对氯吡格雷溶出的影响，结果见图 1。对以上溶出曲线进行相似因子分析，结果显示 f_2 均 > 50 ，说明粒径对溶出影响较小，但 $D_{90} = 62 \mu\text{m}$ 自制制剂前 15 min 快于参比制剂，93 μm 、123 μm 和 146 μm 均慢于参比制剂溶出，故优先使用硫酸氢氯吡格雷 D_{90} 粒径为 62 μm 的原料。

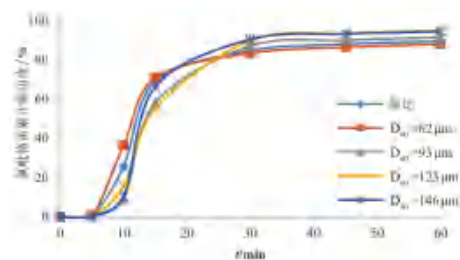


图 1 粒径在 pH 6.8 + 0.15%SDS 介质中对氯吡格雷溶出的影响

Fig 1 Effect of particle size on the dissolution of clopidogrel in pH 6.8 + 0.15%SDS medium

2.7.2 填充剂用量考察 MCC 具有良好的流动性，故选作填充剂，考察 MCC 用量分别为 25.2%、28.0% 和 30.8% 对氯吡格雷溶出的影响，结果见图 2。溶出结果显示 MCC 用量减少溶出变快，但 MCC 用量减少导致中间体流动性变差，故暂定原处方用量为 28%。

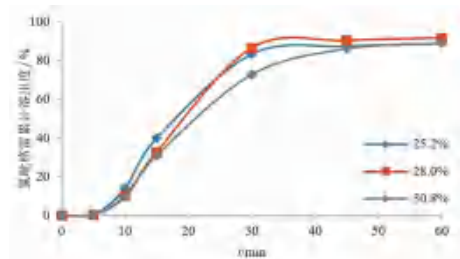


图 2 填充剂用量在 pH 6.8 + 0.15%SDS 介质中对氯吡格雷溶出的影响

Fig 2 Effect of filler dosage on the dissolution of clopidogrel in pH 6.8 + 0.15%SDS medium

2.7.3 黏合剂用量考察 考察黏合剂 PEG6000 用量分别为 5.73%、6.37% 和 7.01% 对氯吡格雷溶出的影响，结果见图 3。结果显示 PEG6000 用量越多溶出越慢，推测是 PEG6000 在处方中作为热熔制粒材料，用量越多制粒效果越好，颗粒越紧实，溶出时崩解和释放也就越慢。故选择 PEG6000 用量为 5.73%。

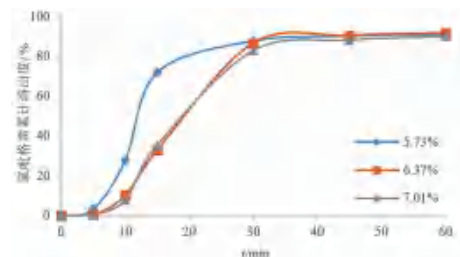


图 3 黏合剂用量在 pH 6.8 + 0.15%SDS 介质中对氯吡格雷溶出的影响

Fig 3 Effect of adhesive dosage on the dissolution of clopidogrel in pH 6.8 + 0.15%SDS medium

2.7.4 崩解剂用量及加入方式考察 考察崩解剂 L-HPC 用量分别为 6.25%、6.94%、7.63%，同时考察 L-HPC 用量为 6.94%，内外加用量分别为 1 : 1、2 : 1 对氯吡格雷溶出的影响，结果见图 4。溶出结

果显示 L-HPC 用量越多溶出越快,崩解剂内外加也能加快溶出。其中 L-HPC 用量为 7.63%、内外加 1:1 和 2:1 溶出曲线与参比制剂进行相似因子分析,结果显示 f_2 分别为 76、81 和 64,均 > 50 。最优处方为内外加 1:1,但考虑到“2.7.3”项下,PEG6000 用量和 L-HPC 用量相近,PEG6000 用量减少 10% 量可加到 L-HPC,故暂时优选 L-HPC 用量为 7.63%。

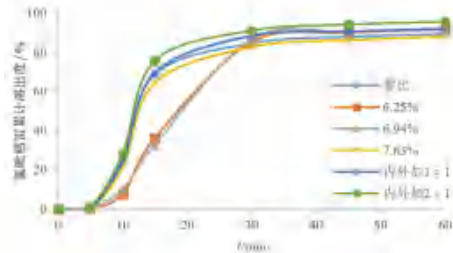


图 4 崩解剂用量及加入方式在 pH 6.8 + 0.15%SDS 介质中对氯吡格雷溶出的影响

Fig 4 Influence of disintegrating agent dosage and adding method on the dissolution of clopidogrel in pH 6.8 + 0.15%SDS medium

2.7.5 硬度考察 氯吡格雷层的硬度大小不仅影响氯吡格雷溶出,还可能导致片芯阿司匹林肠溶层破裂,进而耐酸不合格。制备 50 ~ 60 N 和 70 ~ 80 N 两个处方,考察硬度对溶出的影响,结果见图 5。结果显示硬度越大氯吡格雷溶出越慢,同时观察两批片芯阿司匹林肠溶片,无明显破裂现象,将其放入水中,24 h 后未发现溶胀现象,说明阿司匹林肠溶片完好。综合考虑硬度暂定 50 ~ 60 N。

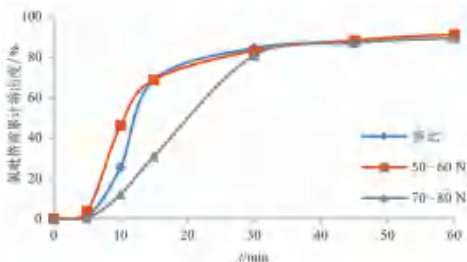


图 5 硬度在 pH 6.8 + 0.15%SDS 介质中对氯吡格雷溶出的影响

2.7.6 热熔制粒工艺考察 热熔制粒工艺是采用固体黏合剂与物料混合,黏合剂在流化床中加热融化,从而黏合物料制成颗粒,冷却后粉末间形成固体架桥。热熔时间、温度等都对溶出有着很大影响。考虑到 PEG6000 熔点约 63 °C,为使 PEG6000 融化完全,设置 (75 ± 5) °C 和 (85 ± 5) °C 两个热熔制粒温度段,同时考察不同时间对氯吡格雷溶出的影响,结果见图 6 ~ 7。结果显示随着热熔时间增加,溶出越慢,推测时间越长,PEG6000 融化越完全,颗粒越均匀,制粒效果越好,溶出也就越慢。对

结果与参比进行相似因子分析, (75 ± 5) °C 制粒 10 min 溶出曲线与参比制剂最相似,故热熔制粒温度定为 (75 ± 5) °C,考虑到实验和放大生产之间差异性,会产生放大效应,暂将实验室批量热熔时间定为 10 min,放大生产批量热熔时间需再考察。

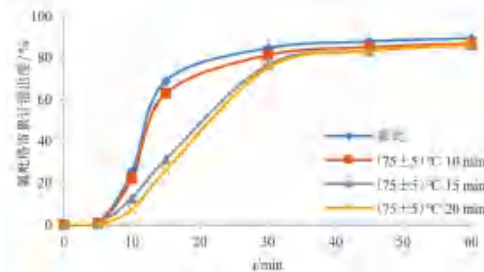


图 6 75 °C 热熔时间在 pH 6.8 + 0.15%SDS 介质中对氯吡格雷溶出的影响

Fig 6 Influence of hot melt time at 75 °C on the dissolution of clopidogrel in pH 6.8 + 0.15%SDS medium

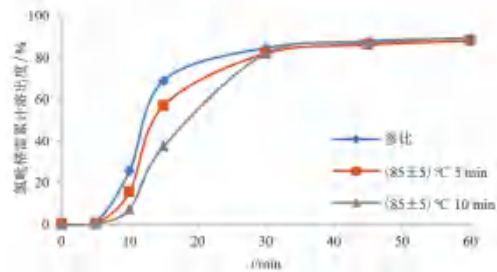


图 7 85 °C 热熔时间在 pH 6.8 + 0.15%SDS 介质中对氯吡格雷溶出的影响

Fig 7 Influence of hot melt time at 85 °C on the dissolution of clopidogrel in pH 6.8 + 0.15%SDS medium

2.8 阿司匹林层处方工艺筛选

在“2.7”项下考察基础上,进行阿司匹林层处方工艺研究,为节约成本和提高实验效率,选择 pH 6.8 作为筛选阿司匹林层处方工艺介质。

2.8.1 原料粒径考察 通过激光粒度仪检测阿司匹林原料粒径,粒度分布 D_{90} 约 200 μm,通过锤式粉碎机粉碎一批原料,粒度分布 D_{90} 约 100 μm,使用两批原料分别制备一批处方,考察原料粒径对阿司匹林溶出的影响,结果见图 8。溶出结果显示原料药粒径越小溶出越慢,通过与参比制剂相比,阿司匹林原料粒度分布 D_{90} 选择为 200 μm。

2.8.2 填充剂型号考察 使用 VIVAPUR 12 (平均粒径 180 μm) 和 VIVAPUR 112 (平均粒径 130 μm) 两种不同型号 MCC 处方制备,考察填充剂型号对阿司匹林溶出的影响,结果见图 9。结果显示 VIVAPUR 12 溶出比 VIVAPUR 112 溶出快,同时观察到 VIVAPUR 12 处方中间体流动性好于 VIVAPUR 112 处方流动性,推测由于粉末直压工艺,填充剂粒径越大流动性越好。故 MCC 型号选择 VIVAPUR 12。

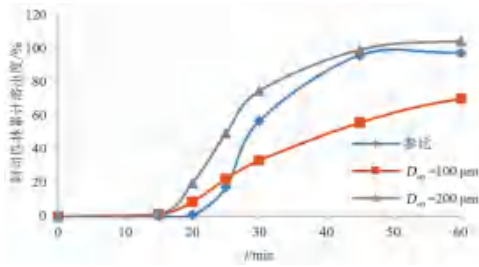


图 8 粒径在 pH 6.8 介质中对阿司匹林溶出的影响
Fig 8 Effect of particle size on the dissolution of aspirin in pH 6.8 medium

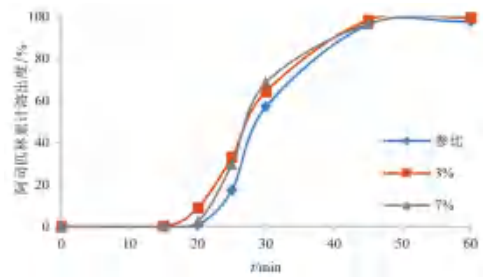


图 11 隔离层增重在 pH 6.8 介质中对阿司匹林溶出的影响
Fig 11 Effect of isolation layer weight gain on the dissolution of aspirin in pH 6.8 medium

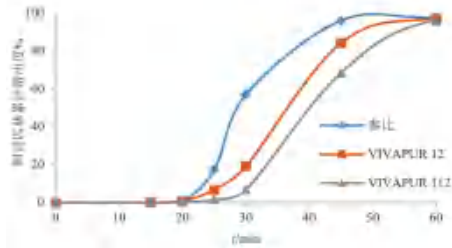


图 9 填充剂型号在 pH 6.8 介质中对阿司匹林溶出的影响
Fig 9 Effect of filling dosage number on dissolution of aspirin in pH 6.8 medium

2.8.3 肠溶层增重考察 对阿司匹林片进行肠溶包衣, 包衣增重为 24%、26% 和 27%, 考察不同肠溶层增重对阿司匹林溶出的影响, 结果见图 10。结果显示肠溶层越厚, 溶出越慢, 肠溶层增重 26% 溶出曲线与参比制剂最相似, 故肠溶层增重定为 26%。

溶出的影响, 自制 1 热熔制粒 20 min, 自制 2 热熔制粒 40 min, 自制 3 热熔制粒 60 min。结果见图 12。氯吡格雷热熔时间为 60 min, 自制制剂与参比制剂在 pH 6.8 + 0.15%SDS 介质中的溶出曲线相似。

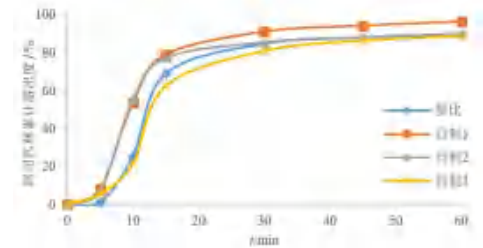


图 12 热熔时间对氯吡格雷在 pH 6.8 + 0.15%SDS 介质中溶出的影响
Fig 12 Influence of hot melt time on the dissolution of clopidogrel in pH 6.8 + 0.15%SDS medium

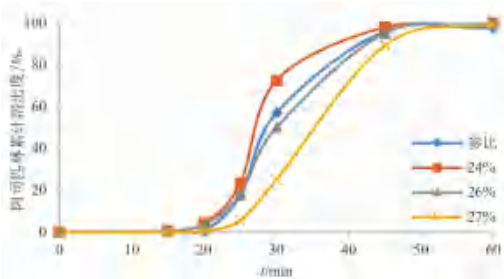


图 10 肠溶层增重在 pH 6.8 介质中对阿司匹林溶出的影响
Fig 10 Effect of enteric layer weight gain on the aspirin dissolution in pH 6.8 medium

2.8.4 内隔离层增重考察 由于阿司匹林与肠溶材料会产生作用, 影响阿司匹林溶出, 通过在中间加入隔离层来阻止阿司匹林与肠溶膜接触。对阿司匹林进行内隔离层包衣, 增重 3% 和 7%, 考察不同内隔离层增重对阿司匹林溶出的影响, 结果见图 11。结果显示内隔离层增重对阿司匹林溶出影响较小, 故内隔离层增重定为 3%。

按照“2.3”项下溶出测定方法, 测定自制 3 制剂与参比制剂在多种介质中的累计溶出度, 并绘制溶出曲线图, 结果见图 13。通过计算相似因子, 评估溶出曲线的相似度, 结果表明, 自制制剂氯吡格雷阿司匹林片在所有介质中的 f_2 值均 > 50, 表明自制制剂与参比制剂在体外的药物释放行为相似。

3 讨论

2.9 自制制剂与参比制剂的溶出曲线比较
按照“2.7”和“2.8”项下确定的处方工艺, 制备 50 000 片批量的氯吡格雷阿司匹林片, 同时进一步考察放大条件下热熔制粒时间对氯吡格雷

氯吡格雷阿司匹林片为双层包芯片, 外层氯吡格雷对水不稳定, 且流动性较差, 故采用热熔制粒工艺; 内层阿司匹林层采用粉末直压工艺, 简化了生产过程, 减少了潜在的交叉污染和稳定性问题, 由于阿司匹林对胃有刺激性, 采用肠溶包衣制成肠溶制剂。由于内外层药物相互影响, 稳定性差, 因此在两种药物之间采用多层包衣, 提高稳定性, 改善可压性。研究发现, 黏合剂、崩解剂用量、硬度、热熔制粒温度和时间对氯吡格雷溶出影响较大; 原料粒径和肠溶包衣增重对阿司匹林溶出影响较大。由于本品种工艺复杂, 步骤多, 两次压片、三次包衣, 导致批内的差异性较大, 故制备过程中, 需严格控制各个步

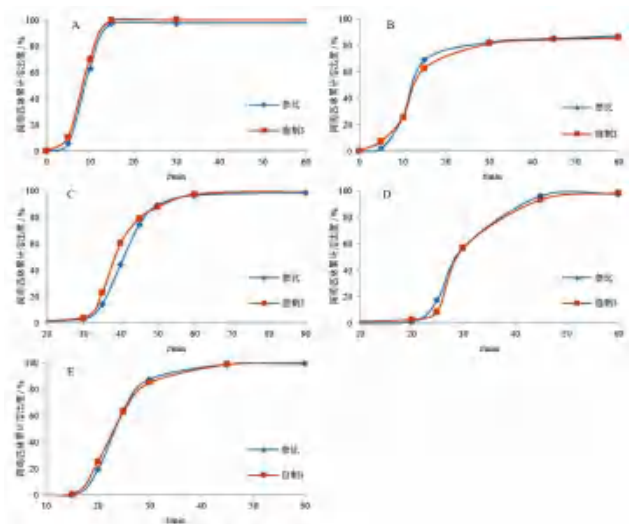


图 13 参比制剂和自制制剂在 pH 1.2 (A)、pH 4.5 + 0.05%SDS (B)、pH 6.5 (C)、pH 6.8 (D)、pH 7.4 (E) 介质中的溶出曲线

Fig13 Dissolution curves of reference preparations and homemade preparations in pH 1.2 (A), pH 4.5 + 0.05%SDS (B), pH 6.5 (C), pH 6.8 (D), and pH 7.4 (E) media

骤，从而保证本品的整体质量。

本研究确定了制备氯吡格雷阿司匹林片的处方工艺，采用相似因子 (f_2) 法对自制制剂与参比制剂进行了溶出行为的比较。结果表明，自制制剂在不同 pH 条件下展示了与参比制剂一致的溶出曲线，显示了良好的体外释放一致性，为本品在人体内的生物等效性 (BE) 试验提供依据，同时为相似复方制剂的研发提供了可行的技术路线和理论支持。

参考文献

[1] 马丽媛, 王增武, 樊静, 等.《中国心血管健康与疾病报告 2022》要点解读[J]. 中国全科医学, 2023, 26 (32): 3975-3994.

[2] 张楠楠, 韩晓燕, 孙玉洁, 等. 血栓弹力图评估阿司匹林及氯吡格雷对冠心病 PCI 术后患者的应用效果[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2023, 26 (6): 616-620.

[3] 陈殿峰, 王琛, 支步胜. 氯吡格雷联合阿司匹林对冠心病经皮冠状动脉介入术患者预后的影响[J]. 临床合理用药, 2023, 16 (21): 75-78.

[4] 卢言雪, 王莹, 窦彩艳. 氯吡格雷治疗冠心病的效果及不良反应分析[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2022, 10 (35): 65-67.

[5] 何湘, 张大钦. 阿司匹林肠溶片联合氯吡格雷治疗冠心病心绞痛的疗效分析[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2022, 10 (32): 106-108.

[6] 宋金山. 硫酸氢氯吡格雷与阿司匹林治疗冠心病的临床

对比研究[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2022, 10 (29): 74-76, 43.

[7] 黄毅, 刘鑫. 阿司匹林肠溶片联合硫酸氢氯吡格雷片治疗心血管疾病的临床效果[J]. 临床医学研究与实践, 2022, 7 (22): 45-48.

[8] 徐亚伟, 张书宁. 氯吡格雷/阿司匹林单片复方制剂抗血小板治疗中国专家共识[J]. 中国介入心脏病学杂志, 2021, 29 (6): 306-312.

[9] 石蕊, 郝颖翠, 李艳华, 等. 硫酸氢氯吡格雷阿司匹林片在健康志愿者中空腹及餐后生物等效性评价[J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43 (21): 2379-2384.

[10] Li Y, Ming JE, Kong FY, et al. Bioequivalence study comparing fixed-dose combination of clopidogrel and aspirin with coadministration of individual formulations in Chinese subjects under fed conditions: a phase I, open-label, randomized, crossover study[J]. Adv Ther, 2020, 37 (11): 4660-4674.

[11] Wang L, Di YJ, Guo TT, et al. Implementation of a reference-scaled average bioequivalence approach for highly variable acetylsalicylic acid in fixed-dose combination with clopidogrel versus enteric aspirin in Chinese subjects under fasting conditions: a phase I, open-label, randomized, crossover study[J]. Adv Ther, 2020, 37 (6): 2696-2709.

[12] Deharo P, Quilici J, Bonnet G, et al. Fixed-dose aspirin-clopidogrel combination enhances compliance to aspirin after acute coronary syndrome [J]. Int J Cardiol, 2014, 172 (1): e1-e2.

[13] 丁备战. 硫酸氢氯吡格雷阿司匹林片的制备及质量控制[J]. 临床医药文献电子杂志, 2016, 3 (27): 5516-5517.

[14] 李欣, 邢雪敏, 颜红. 硫酸氢氯吡格雷阿司匹林片的处方工艺研究[J]. 药学研究, 2015, 34 (10): 584-587.

[15] 中国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020: 425.

[16] 国家食品药品监督管理总局. 普通口服固体制剂溶出曲线测定与比较指导原则[S]. 2016-03-18.

[17] 魏忠莉, 李冰, 何仲贵, 等. 氯吡格雷硫酸盐阿司匹林复合片体外溶出度测定[J]. 中国药剂学杂志(网络版), 2019, 17 (3): 50-57.

[18] 许婷婷, 王宏响, 季金玉, 等. 复方硫酸氢氯吡格雷阿司匹林双层片的制备和溶出度测定[J]. 沈阳药科大学学报, 2015, 32 (2): 85-91.

[19] 国无双, 余东来, 赵春杰, 等. HPLC 法测定硫酸氢氯吡格雷阿司匹林片中氯吡格雷异构体的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2016, 33 (6): 450-453, 458.

[20] 胡敏虹. 硫酸氢氯吡格雷阿司匹林片的质量标准及其稳定性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2022.

[21] 赛诺菲. 包含乙酰水杨酸和氯吡格雷的药物片剂: 201480042849.3 [P]. 2016-03-16.

(收稿日期: 2024-01-17; 修回日期: 2024-02-19)

白藜芦醇对血虚证小鼠模型的改善作用及 诱导红系分化机制研究

李佳奇^{1, 2}, 何睿³, 张一童², 刘海静^{1, 2, 4*}, 王嫦鹤^{1, 2, 4*} (1. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西省食品药品检验研究院, 西安 710065; 3. 西安交通大学附属红会医院 药剂科, 西安 710054; 4. 陕西省食品药品安全监测重点实验室, 西安 710065)

摘要: **目的** 以血虚证小鼠模型和 K562 细胞为对象, 研究白藜芦醇促进骨髓造血恢复及诱导红系分化的作用机制。**方法** 采用环磷酰胺诱导血虚证小鼠模型, BALB/c 小鼠随机分为对照组, 模型组, 白藜芦醇低、中、高剂量组 (50、100、200 mg·kg⁻¹), 每组 8 只, 连续给药 10 d 后, 采用全自动血细胞分析仪检测小鼠外周血常规; 采用酶联免疫法 (ELISA) 分析小鼠血浆中白细胞介素-6 (IL-6)、促红细胞生成素 (EPO) 浓度; 流式细胞术检测不同浓度白藜芦醇对 K562 细胞凋亡、周期分布及细胞表面红系标志蛋白 (CD71、CD235a) 的影响; RT-qPCR 检测红系分化相关基因 (*CD235a*, *CD71*, *GATA1*, γ -*globin*, *HBA1*, *HBB* 和 *ZFPM1*) 的表达, Western blot 法检测 JNK1/2/3 和 ERK1/2 表达。**结果** 与模型组比较, 白藜芦醇可不同程度提高模型组小鼠外周血中白细胞 (WBC)、红细胞 (RBC)、血小板 (PLT)、网织红细胞 (RET) 数量与血红蛋白 (HGB) 浓度 ($P < 0.05$), 升高血浆中的 IL-6、EPO 浓度 ($P < 0.05$)。流式细胞术结果表明, 白藜芦醇能够通过 S 期阻滞抑制 K562 细胞增殖, 诱导其凋亡; 与对照组相比, 白藜芦醇能显著增加红系标志抗原 CD71、CD235a 阳性表达率, 且存在浓度依赖性 ($P < 0.05$)。RT-qPCR 结果表明, 白藜芦醇可呈剂量依赖性上调 *CD235a*、*CD71*、*GATA1*、 γ -*globin*、*HBA1*、*HBB* 等红系分化相关基因的表达 ($P < 0.05$)。Western blot 结果表明, 白藜芦醇可上调 ERK1/2 和 JNK1/2/3 蛋白的磷酸化水平。**结论** 白藜芦醇能够通过调节 JNK 通路和 ERK 通路, 增加细胞表面抗原 CD71、CD235a 阳性表达, 增加红系分化关键基因的表达, 诱导 K562 细胞红系分化, 并能改善小鼠由环磷酰胺所致的血虚证症状, 为白藜芦醇促进造血的作用机制研究奠定基础。

关键词: 白藜芦醇; 血虚证; K562 细胞; 红系分化; ERK 通路; JNK 通路

中图分类号: R286

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)06-1505-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.017

Effect of resveratrol on mouse model with blood deficiency syndrome and mechanism in inducing erythroid differentiation of K562 cells

LI Jia-qi^{1, 2}, HE Rui³, ZHANG Yi-tong², LIU Hai-jing^{1, 2, 4*}, WANG Chang-he^{1, 2, 4*} (1. Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712046; 2. Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710065; 3. Department of Pharmacy, Honghui Hospital Affiliated to Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710054; 4. Shaanxi Key Laboratory of Food and Drug Safety Monitoring, Xi'an 710065)

Abstract: Objective To determine the effect of resveratrol (RES) on the hematopoietic function in mice with blood deficiency syndrome induced by cyclophosphamide, and the mechanism of RES in inducing erythroid differentiation of K562 cells. **Methods** Cyclophosphamide was used to induce the mouse model of blood deficiency syndrome. After the modeling, BALB/c mice were randomly divided into a control group, a model group, and low, medium, and high dose RES groups (50,

基金项目: 陕西省秦创原“科学家+工程师”队伍建设项目 (No. 2023KXJ-128); 陕西省创新能力支撑计划 (No. 2020PT-041)。

作者简介: 李佳奇, 女, 硕士研究生, 主要从事中药化学研究, email: 771318988@qq.com *通信作者: 刘海静, 女, 主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事中药分析及药物质量标准分析, email: 99159512@qq.com; 王嫦鹤, 女, 主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事药品质量控制技术研究, email: sendtoher@126.com

100 and 200 mg · kg⁻¹). The mice were given the drug continuously for 10 days. On the 11th day, the peripheral blood cells of mice were analyzed with a blood cell analyzer. The concentration of erythropoietin (EPO) and interleukin-6 (IL-6) in the plasma of mice were determined by enzyme linked immunosorbent assay. The apoptosis, cell cycle distribution and the expression of erythroid differentiation marker proteins CD71 and CD235a of K562 cells induced by different concentrations of RES were measured by flow cytometry. The mRNA expressions of *CD235a*, *CD71*, *GATA1*, *γ-globin*, *HBA1*, *HBB* and *ZFPM1* were detected by RT-qPCR, and the expressions of JNK1/2 and ERK1/2 were detected by Western blot. **Results** Compared with the model group, the white blood cells, red blood cells, platelets, reticulocyte and hemoglobin in the blood of mice in RES groups were all increased ($P < 0.05$). The expressions of EPO and IL-6 in the RES groups were significantly increased ($P < 0.05$). Flow flow cytometry showed that compared with the control group, RES inhibited the proliferation via S phase block and induced the apoptosis of K562 cells, and greatly increased the positive expression rate of erythroid surface marker proteins CD235a and CD71 in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). RT-qPCR showed that the expressions of erythroid differentiation related genes such as *CD235a*, *CD71*, *GATA1*, *γ-globin*, *HBA1*, and *HBB* in K562 cells were significantly increased after the treatment with different concentrations of RES, also in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). Western blot showed that RES up-regulated the phosphorylation levels of ERK1/2 and JNK1/2/3 proteins. **Conclusion** By regulating JNK pathway and ERK pathway, RES can increase the positive expression of CD71 and CD235a cell surface antigens, increase the expression of key genes of erythroid differentiation, induce K562 cells to differentiate into erythroid cells, and ameliorate the symptoms of blood deficiency syndrome caused by cyclophosphamide in mice. The study lays a foundation for the mechanism of RES promoting hematopoiesis.

Key words: resveratrol; blood deficiency syndrome; K562 cell; erythroid differentiation; ERK pathway; JNK pathway

白藜芦醇 (resveratrol, RES) 是一种天然的多酚类物质, 是植物在应激条件下产生的一种植物源抗菌药物^[1-2], 具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎和保护心血管等^[3-4]多种生物活性。已有研究报道, 白藜芦醇能够诱导白血病细胞株 K562 细胞向红系、粒系和巨核系分化, 其中诱导红系分化作用尤为明显, 且能够增强 K562 细胞合成血红蛋白的能力^[5-6]; 可逆转辐照小鼠的造血功能抑制^[7]; Song 等^[8-9]发现白藜芦醇能够诱导正常个体和β-地中海贫血患者红细胞中的胎儿型血红蛋白增多, 呈时间依赖性诱导血红蛋白 (HGB) 生成, 且可抑制多种骨髓白血病细胞的增殖。这些研究都表明白藜芦醇能促进小鼠造血功能恢复、促进造血祖细胞增殖分化, 但是, 现有研究资料中关于白藜芦醇诱导红系分化的作用机制仍不明确。

血虚证是中医临床常见症候, 表现为血液不足或者血液营养功能低下, 脏腑组织器官失养的病理状态^[10], 环磷酸胺作为细胞毒制剂, 能够抑制造血系统, 降低血细胞生成, 是制备小鼠血虚模型的常用方法, 此方法简单可行, 用量及时间较为灵活^[11]。K562 细胞是一种具有红系、粒系和单核系分化潜能的造血系统细胞系, 因此常用

于人类细胞红系分化等相关研究。红系分化是指骨髓造血干细胞分化为多能祖细胞后, 不断增殖逐步分化为红系祖细胞、红系前体细胞, 最后发育为成熟红细胞并释放到外周血中的过程^[12-13]。促分裂素原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路是真核生物信号传递网络中的重要途径之一, 是细胞增殖、凋亡、分化以及正常条件或病理条件下应激反应的关键信号通路。MAPK 是一组进化保守的丝氨酸-苏氨酸激酶, 可分为细胞外调节蛋白激酶 (ERK)、c-Jun 氨基末端激酶 (JNK)、p38 和 BMK1 四个亚族, 分别代表四条经典的 MAPK 通路。红系祖细胞向红系分化的关键路径之一是通过调节 ERK 信号通路 (RAS-RAF-MEK-ERK), 这条途径可被胞外信号激活, 如生长因子、细胞因子刺激和细胞应激 (渗透压改变、电离辐射等), 通过一系列细胞内蛋白质激酶的磷酸化, 从而传递到细胞核中, 发挥多种生物学功能。这一过程导致细胞发生一系列生理反应: 细胞增殖、凋亡和向红系分化^[14]。JNK 已被证明在多种细胞的凋亡、细胞周期以及红系分化过程中的重要性, 如原代红系祖细胞可能需要 JNK 才能进行红系细胞的早期增殖^[15]。

本实验以环磷酰胺致血虚证小鼠模型为研究对象,观察白藜芦醇对血虚证小鼠血常规及血浆白细胞介素-6(IL-6)、促红细胞生成素(EPO)浓度的影响;采用具有红系分化潜能的K562细胞株为模型,分析白藜芦醇对红系分化关键基因和细胞膜表面红系标志蛋白的影响,以及对JNK/ERK通路的调控作用;探究白藜芦醇对改善小鼠骨髓造血功能及促进红系分化的作用机制,为白藜芦醇促进造血的药理作用研究奠定基础。

1 材料

1.1 实验动物及细胞

SPF级健康BALB/c小鼠,雌雄各半[成都达硕实验动物有限公司,合格证号:SCXK(川)2020-0030]。K562细胞株(CH1104)(无锡欣润生物科技有限公司)。

1.2 试剂

白藜芦醇(纯度:99.4%,批号:111535-201703,中国食品药品检定研究院),胎牛血清(FBS,浙江天杭生物科技股份有限公司),RPMI 1640培养基(赛默飞世尔科技公司),青霉素链霉素混合溶液(北京索莱宝科技有限公司),CCK8试剂盒(博士德生化科技有限公司),10%SDS-PAGE预制胶预混液、Precision Plus Protein Dual Color Standards、ECL化学发光试剂盒(上海伯乐生命医学产品有限公司),动物RNA抽提试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒、RIPA裂解液、Phospho-Erk1/Erk2兔单抗、ERK1/2兔单抗、Phospho-JNK1/2/3兔单抗、JNK1/2/3兔单抗、 β -Actin兔单抗、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔、SYBR Green qPCR Mix (2X, Low ROX)、cDNA第一链合成试剂盒、FITC/碘化丙啶(PI)细胞凋亡双染试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),细胞周期检测试剂盒(杭州联科生物技术股份有限公司);PE偶联CD235a单抗、APC偶联CD71单抗、活力染料506(赛默飞世尔科技公司);小鼠IL-6(批号:MU30044)、EPO ELISA试剂盒(批号:MU30110)(武汉贝茵莱生物科技有限公司)。

1.3 仪器

T20M型台式高速冷冻离心机(湖南赫西仪器装备有限公司),LightCycler96型全自动实时荧光定量PCR仪(上海罗氏制药有限公司),My Cycler Thermal Cycler型PCR仪、HC型高电流电泳仪电源、1704150型全能型蛋白转印仪、SYSTEM ChemiDoc MP成像系统(上海伯乐生命医学产品有限公司);CYT5M-SN型酶标仪(安捷伦科技有限公司),ICTHI-450型流式细胞仪(贝克曼库尔特有限公司),ZCP-Q160型二氧化碳培养箱(上海喆图科学仪器有限公司),DSZ2000X型电子显微镜(重庆澳浦光电技术有限公司),

SW-CJ-1F型单人双面垂直送风净化工作台(苏州天创净化设备有限公司),BC-6000PLUS型全自动血细胞分析仪(深圳迈瑞生物医疗有限公司)。

2 方法与结果

2.1 方法

2.1.1 血虚证小鼠模型的建立及分组给药 将40只BALB/c小鼠随机分为5组,除对照组外,其余小鼠参考程晓妮等^[16]的方法,每日腹腔注射环磷酰胺($75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),连续5 d,诱导血虚证小鼠模型,造模期间自由饮水。将造模成功后的鼠分为模型组,白藜芦醇低、中、高剂量组(50 、 100 、 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,无水乙醇溶解),每组8只。白藜芦醇用羧甲基纤维素钠溶液分散均匀,于第6日灌胃给予白藜芦醇组小鼠 0.2 mL ,对照组和模型组小鼠给予等量羧甲基纤维素钠溶液,每日1次,连续10 d。末次给药24 h后,采集外周血约 1 mL 置EDTA抗凝管中,进行后续检测。

2.1.2 血液指标的检测 取外周血 0.2 mL ,用全自动血细胞分析仪检测白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血小板(PLT)、网织红细胞(RET)数量与HGB含量。

2.1.3 ELISA法检测血浆中IL-6和EPO浓度 将EDTA抗凝管中剩余外周血 4°C 、 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min,收集上清液,采用ELISA试剂盒检测小鼠血浆中IL-6、EPO浓度。

2.1.4 细胞培养 K562细胞用完全培养基(含10%FBS和1%双抗的1640培养基) 37°C 、5% CO_2 恒温培养,每3日传代一次,取对数生长期细胞用于实验。

2.1.5 CCK8细胞增殖实验 收集对数生长期的K562细胞接种于96孔板中,每孔 1×10^4 个,给药组的白藜芦醇浓度分别为 5.48 、 10.95 、 21.9 、 43.8 、 87.5 、 175 、 350 、 $700 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,对照组为含0.5%乙醇的完全培养基,空白孔不加药和细胞,均设5个平行孔,置于 37°C 、5% CO_2 培养箱孵育。孵育48 h后,每孔加入CCK8溶液 $10 \mu\text{L}$ 继续孵育1 h,用酶标仪测定各孔在波长 450 nm 处的吸光度值(A值),实验重复3次,计算细胞增殖抑制率。

2.1.6 流式细胞仪检测

① 细胞周期检测:收集对数生长期的K562细胞接种于6孔板中,每孔 2×10^5 个,给药组的白藜芦醇浓度分别为 5.5 、 11 、 22 、 44 、 $88 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,对照组为含0.5%乙醇的完全培养基,孵育48 h后,取细胞悬液, $1200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min,弃上清液,PBS洗涤并计数,用预冷的75%乙醇 4°C 固定2 h,加入PI,室温避光孵育30 min,采用流式细胞仪检测细胞周期。结果用FlowJo软件分析。

② 细胞凋亡检测:收集对数生长期的K562

细胞接种于 6 孔板中，每孔 2×10^5 个，给药组的白藜芦醇浓度分别为 13.7、27.5、55、110、220 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，对照组为含 0.5% 乙醇的完全培养基，孵育 72 h 后，取细胞悬液， $1200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min，弃上清液，PBS 洗涤并计数，加入 Annexin V-FITC 及 PI，轻轻混匀，室温避光孵育 15 min，采用流式细胞仪检测，结果用 FlowJo 软件分析。

③ 细胞表面抗原检测：细胞接种和分组同“2.1.6”项下，孵育 48 h 后， $1200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min，弃上清液，用预冷的 PBS 洗涤并计数，每管加入适量 Fixable Viability Dye eFluor 506，室温避光孵育 30 min，用预冷的 PBS 洗涤游离染料，每管加入适量 PE-CD235a 和 APC-CD71，轻轻混匀，室温避光孵育 30 min，用预冷的 PBS 洗涤游离染料，重悬在 PBS 中，立即用流式细胞仪检测细胞中 CD71、CD235a 的表达，结果用 FlowJo 软件分析。

2.1.7 RT-qPCR 检测红系分化相关基因表达 引物由生工生物工程(上海)公司设计，序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列
Tab 1 RT-qPCR primer sequence

基因名称	引物序列 (5'-3')	产物长度 /bp
CD235a	F: GGGGTGATGGCTGGTGTATT	144
	R: TCTTCCACATTTGGTTGGTG	
γ -globin	F: CCATAAAGCACCTGGATGATC	101
	R: ATCTGGAGGACAGGGCACTG	
CD71	F: GACTATGAGAGGTACAACAGCCAAC	123
	R: GAAGAAGTCTCCACGAGCAGAATAC	
GATA1	F: AGACGACCACCACGACACTG	150
	R: TTCCAGATGCCTTGC GGTTTC	
HBA1	F: GCCGACAAGACCAACGTCAAGG	126
	R: AGGTGCAAGTGC GGGAAGTAGG	
HBB	F: CGTGGATGAAGTTGGTGGTGAGG	142
	R: GGTTGCCATAACAGCATCAGGAG	
ZFPM1	F: ACAGACGAGAAGCCAAAGAGAC	132
	R: AGGCAGATCAGGCACACGAAG	
STAT5	F: CGTGCTACAGTCCTGGTGTGAG	108
	R: TCCGTGATGGTGGCGTTGAC	
β -actin	F: CCACGAAACTACCTTCAACTCCATC	133
	R: AGTGATCTCCTTCTGCATCCTGTC	

表 2 各组小鼠血常规比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab 2 Blood routine test of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	WBC/ ($\times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$)	RBC/ ($\times 10^{12} \cdot \text{L}^{-1}$)	PLT/ ($\times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$)	RET/%	HGB/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
对照组	3.83 \pm 0.47	11.11 \pm 0.29	913.50 \pm 119.46	0.368 \pm 0.07	171.17 \pm 2.10
模型组	1.58 \pm 0.28 [#]	9.86 \pm 0.26 [#]	492.17 \pm 192.1 [#]	0.26 \pm 0.044 [#]	159.33 \pm 2.62 [#]
白藜芦醇低剂量组	2.49 \pm 0.46 [*]	10.26 \pm 0.27 [*]	950.33 \pm 181.97 [*]	0.492 \pm 0.047 [*]	162.33 \pm 1.97
白藜芦醇中剂量组	2.85 \pm 0.33 [*]	10.64 \pm 0.14 [*]	964.67 \pm 78.08 [*]	0.512 \pm 0.046 [*]	168.67 \pm 3.82 [*]
白藜芦醇高剂量组	3.86 \pm 0.57 [*]	10.91 \pm 0.20 [*]	988.83 \pm 144.46 [*]	0.543 \pm 0.039 [*]	169.17 \pm 2.34 [*]

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

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

2.2.2 ELISA 法检测血浆中 IL-6 和 EPO 表达水平 与对照组小鼠相比，模型组小鼠血浆 IL-6 与 EPO 浓度显著下降。与模型组小鼠比较，白藜芦

醇显著提高了小鼠血浆中 IL-6 和 EPO 浓度，且效果呈剂量依赖性(见表 3)。

细胞接种和分组同“2.1.6”项下，孵育 48 h 后， $1200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min，弃上清液，用 PBS 洗涤两遍，用 RNA 抽提试剂盒抽提总 RNA，检测 RNA 的含量与纯度 ($A_{260}/A_{280} = 1.8 \sim 2.0$) 并定量稀释至浓度一致。使用逆转录试剂盒进行逆转录反应，得到 cDNA。以 cDNA 为模板，加入引物，实时荧光定量 PCR 扩增核酸。反应体系：20 μL ，反应条件：95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min，95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 30 s，共 40 个循环。采用 SYBR Green 作为荧光标记，以 β -actin 作为内参基因，对数据进行分析。

2.1.8 Western blot 法检测相关蛋白表达 细胞接种和分组同“2.1.6”项下，孵育 48 h 后，收集各组细胞，用 PBS 洗涤，加入细胞裂解液，提取总蛋白，采用 BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度，制备蛋白样品，100 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min；蛋白样品经 10% SDS-PAGE，转移至 PVDF 膜；5%BSA 封闭 1 h 后，分别加入 β -actin、JNK1/2/3、p-JNK1/2/3、ERK1/2、p-ERK1/2 一抗 (1 : 500)，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜，TBST 洗涤 3 次，加入二抗 (1 : 1000)，室温孵育 2 h，TBST 洗涤 3 次，将 ECL 曝光液均匀覆盖在膜上，用 ChemiDoc MP 成像系统显影并扫描，采用 Image Lab 软件计算蛋白条带光密度，以 β -actin 为内参，对目的蛋白进行半定量分析。

2.1.9 统计学分析 采用 Graphpad 软件进行数据分析，实验均重复 3 次。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用独立样本 t 检验，组间多重比较采用 Dunnett- t 检验， $P < 0.05$ 表明差异有统计学意义。

2.2 结果

2.2.1 血液指标的检测结果 与对照组比较，模型组小鼠外周血 WBC、RBC、PLT、RET% 和 HGB 指标均显著降低，提示处理后小鼠骨髓严重受损，造模成功；给药 10 d 后，与模型组比较，白藜芦醇低、中、高剂量组的 WBC、RBC、PLT、RET% 和 HGB 指标均有升高，提示白藜芦醇能显著改善环磷酸胺所致的血虚证症状(见表 2)。

表 3 各组小鼠血浆中 IL-6 和 EPO 浓度 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab 3 Levels of IL-6 and EPO in the serum of mice in each group

组别	EPO/ ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-6/ ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
对照组	21 178.723 ± 1266.718	3053.318 ± 69.508
模型组	18 544.726 ± 572.820 [#]	2475.817 ± 73.449 [#]
白藜芦醇低剂量组	19 896.350 ± 728.245	2732.844 ± 66.317 [*]
白藜芦醇中剂量组	20 492.375 ± 960.575 [*]	2750.563 ± 29.302 [*]
白藜芦醇高剂量组	21 077.551 ± 1608.074 [*]	2818.771 ± 33.462 [*]

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

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

2.2.3 CCK8 法检测细胞增殖 白藜芦醇能够显著抑制 K562 细胞生长 ($P < 0.01$)，且呈明显的量效关系。当白藜芦醇浓度在 $700 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，K562 细胞增殖的抑制率为 65%，其 IC_{50} 为 $275.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，见图 1。

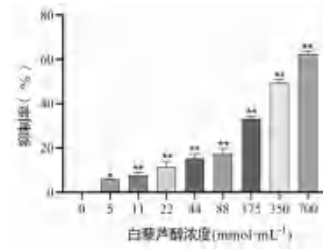


图 1 不同浓度白藜芦醇对 K562 细胞增殖的影响 ($n = 5, ^*P < 0.05, ^{**}P < 0.01$)

Fig 1 Effect of resveratrol at different concentrations on K562 cells proliferation ($n = 5, ^*P < 0.05, ^{**}P < 0.01$)

2.2.4 细胞周期检测 白藜芦醇能够影响 K562 的细胞周期，在一定浓度范围内，随着白藜芦醇浓度的增大，K562 细胞的 G_0/G_1 期细胞比例减少，S 期和 G_2/M 期细胞占比增多，说明白藜芦醇能够使细胞周期阻滞在 DNA 合成期及合成后期，且呈显著量效关系 ($P < 0.05$)，见图 2。

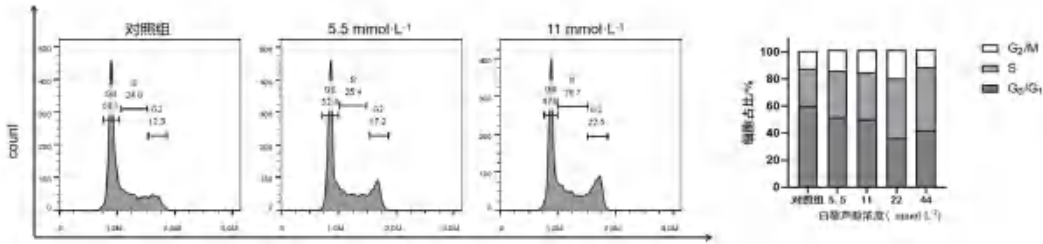


图 2 不同浓度白藜芦醇对 K562 细胞周期的影响 ($n = 3$)

Fig 2 Effect of resveratrol at different concentrations on K562 cell cycle ($n = 3$)

2.2.5 细胞凋亡检测结果 白藜芦醇能够促进 K562 细胞凋亡，当白藜芦醇浓度为 $13.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，可显著促进 K562 细胞凋亡，随着白藜芦醇浓度的增

大，早期和晚期凋亡细胞比例均随之增多，具有浓度依赖性 ($P < 0.01$)，见图 3。

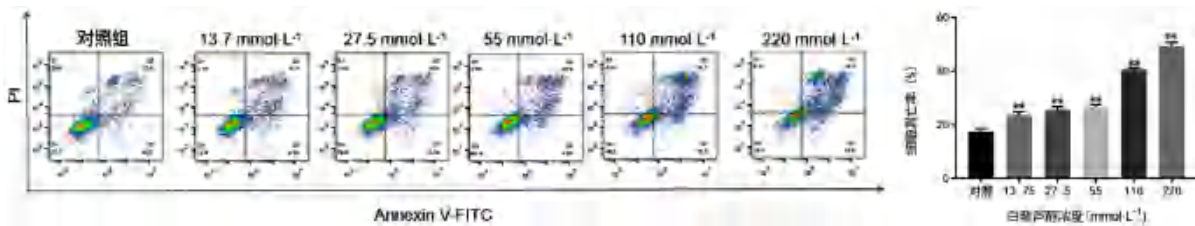


图 3 不同浓度白藜芦醇对细胞凋亡的影响 ($n = 3, ^{**}P < 0.01$)

Fig 3 Effect of resveratrol at different concentrations on apoptosis ($n = 3, ^{**}P < 0.01$)

2.2.6 流式检测细胞表面标志抗原 CD71 和 CD235a 作为人红细胞生成过程中关键的红系分化标志蛋白，采用流式细胞仪对白藜芦醇处理后 K562 细胞这两种细胞表面抗原的表达情况进行检测，结果见图 4。结果表明，在给予 K562 细胞不同浓度白藜芦醇 48 h 后，与溶剂对照组相比，细胞表面 CD235a 和 CD71 表达水平明显升高，且随着白藜芦醇给药浓度的增加呈现先上升再降低的趋势：当白藜芦醇小于 $22 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，CD235a 和 CD71 的表达随着药物浓度的增大而升高；当白藜

芦醇大于 $22 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，CD235a 和 CD71 阳性细胞百分比逐渐下降。说明白藜芦醇在一定浓度范围内可诱导 K562 细胞表面红系分化标志蛋白的增加，促进其向红系分化。

2.2.7 RT-qPCR 检测红系分化相关基因表达 RT-qPCR 数据表明，白藜芦醇作用于 K562 细胞后，红系相关基因 CD71、CD235a、GATA1、 γ -globin、HBA1、STAT5 的相对表达量均呈浓度依赖性升高，见图 5。

2.2.8 Western blot 法检测 JNK1/2/3 蛋白和 ERK1/2 蛋白磷酸化情况 结果表明，随着白藜芦醇给药

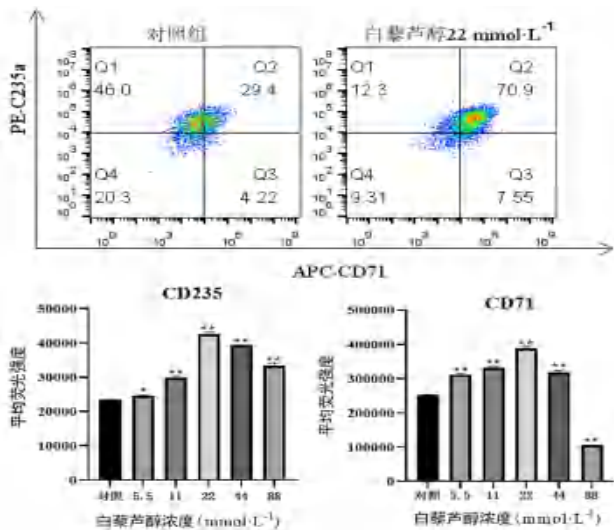


图4 各浓度白藜芦醇对K562细胞CD235a和CD71表达的影响 ($n = 3$, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$)

Fig 4 Effect of resveratrol concentration on CD235a and CD71 expression in K562 cells ($n = 3$, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$)

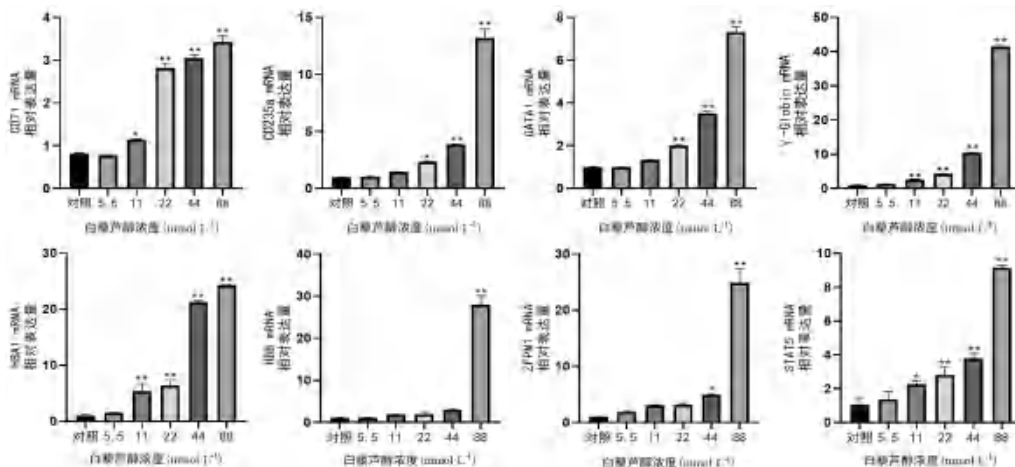


图5 不同浓度白藜芦醇对红系相关基因表达的影响 ($n = 3$, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$)

Fig 5 Effect of resveratrol at different concentrations on expression of erythroid related genes ($n = 3$, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$)

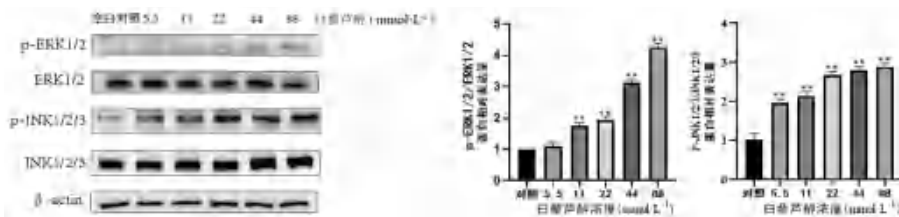


图6 不同浓度白藜芦醇对相关蛋白表达情况的影响 ($n = 6$, $^{**}P < 0.01$)

Fig 6 Effect of resveratrol at different concentrations on expression of related proteins ($n = 6$, $^{**}P < 0.01$)

诱导的小鼠血虚证具有改善作用，后续还将对白藜芦醇改善小鼠血虚证的具体作用机制进一步研究。

在研究 K562 红系分化作用时前期，实验采用常用的细胞助溶剂二甲基亚砜 (DMSO) 溶解白藜芦醇后给药。结果发现 0.9% 的 DMSO 溶剂对照组的 *CD235a* 和 *CD71* 基因的相对表达量显著升高，查阅后发现有关研究报道 DMSO 能够促进 K562 细胞红系分化^[21]，对药物本身的作用产生了很大干扰，导致难以分辨是

浓度的增加，ERK1/2 和 JNK1/2/3 的磷酸化水平呈现上升趋势，提示白藜芦醇能够通过升高 ERK1/2 和 JNK1/2/3 蛋白的磷酸化水平，调控细胞向红系方向分化，见图 6。

3 讨论

IL-6 在维持造血干细胞的存活、自我更新以及早期造血祖细胞的分化中起着重要调控作用^[17]。IL-6 是能够调控造血干细胞的分化与成熟、刺激造血干细胞生长与分化的正向造血调控因子^[18]；EPO 能促进红系祖细胞的增殖、分化和成熟，是红细胞发育过程中最重要的调节因子^[19]，IL-6 和 EPO 的分泌对促进造血功能的产生和恢复具有重要作用^[20]，故本文以 IL-6 和 EPO 含量的变化作为小鼠血液指标之一。实验结果表明，与正常小鼠相比，模型组小鼠血浆中的 IL-6、EPO 含量呈下降趋势，而白藜芦醇给药组能够显著促进小鼠血浆中 EPO 和 IL-6 含量的恢复 ($P < 0.05$)，提示白藜芦醇对环磷酸腺

药物本身的作用还是助溶剂的作用，故本研究选用低浓度的乙醇作为药物助溶剂，并设置溶剂对照组。

在晚期红细胞分化过程中，血红蛋白含量增加，膜蛋白表达发生剧烈变化。*CD71* 和 *CD235a* 作为重要的细胞膜表面标志蛋白，*CD71* 能够特异性结合携带铁的转铁蛋白，主要表达在有核红细胞和增殖细胞的细胞膜上，它更倾向于在红细胞发育的早期阶段增加；*CD235a* 是一种红系特异性蛋白，

是红细胞前体细胞和成熟红细胞中表达的主要唾液酸糖蛋白之一，主要在人晚期红细胞生成过程中表达增加^[22-24]，故本研究将 CD235a 和 CD71 的表达程度作为判断是否向红系分化的关键。

课题组前期对白藜芦醇的作用时间进行了探索，将 K562 细胞分为对照组，白藜芦醇组分别设置 24、48、72 h 这 3 个时间点，采用流式细胞术检测细胞表面抗原，结果表明细胞表面抗原的阳性表达程度与白藜芦醇的作用时间相关。分析后发现，与对照组相比，当药物作用 48 h 时白藜芦醇组的 CD235a、CD71 阳性表达量增加最为明显，随着时间的延长，CD71 阳性表达下降。故本实验选用 48 h 作为研究给 K562 细胞的最佳药物处理时长。

4 结论

本研究发现白藜芦醇能够显著恢复血虚证小鼠外周血中的 WBC、RBC、PLT、RET 和 HGB 水平及血浆中 IL-6、EPO 因子的水平，改善环磷酸胺诱导的小鼠血虚证，恢复小鼠骨髓造血功能；并且进一步通过流式细胞术、RT-qPCR 和 Western blot 等方法，发现白藜芦醇能够通过 S 期阻滞抑制 K562 细胞增殖，诱导其凋亡，能够通过上调 JNK1/2/3 和 ERK1/2 蛋白的磷酸化水平，增加细胞表面红系相关标志物 CD71⁺、CD235a⁺ 的表达，上调红系分化关键基因 *CD235a*、*CD71*、*GATA1*、*γ-globin*、*HBA1*、*HBB*、*STAT5* 的表达，从而诱导 K562 细胞向红系方向分化，为研究白藜芦醇促进红系分化的作用机制提供依据。

参考文献

[1] 陈小林, 张子龙, 高天慧, 等. 白藜芦醇药理作用及机制研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2022, 41 (12): 67-76.

[2] 关正萍, 武佳慧, 关正, 等. 白藜芦醇的生理活性及其研究进展[J]. 农产品加工, 2023 (15): 81-85.

[3] 王琴, 杨斌, 顾健, 等. 中药多酚类成分抗肿瘤表观遗传机制的研究进展[J]. 中草药, 2023, 54 (14): 4722-4731.

[4] Hamide K, Reza HK. Cardioprotective effects of resveratrol following myocardial ischemia and reperfusion [J]. Mol Biol Rep, 2020, 47 (8): 5843-5850.

[5] 赵燕娜, 高瑞兰, 汪丽佩, 等. 白藜芦醇对 K562 白血病细胞抑制增殖和诱导分化的作用[J]. 中国药理学通报, 2014, 30 (6): 853-856.

[6] 朱慧丽, 聂鸿靖, 邓炳楠, 等. 白藜芦醇对 K562 细胞增殖凋亡及分化的影响[J]. 营养学报, 2016, 38 (2): 186-190.

[7] Cunha RL, Nogueira F, Rodrigues GAD, et al. The preventive use of resveratrol increases its antioxidant effect by SIRT1 and subclinical anti-inflammatory action in Neuro-2A cells [J]. In Vitro Cell Dev-An, 2022, 58 (10): 979-986.

[8] Song XR, Cheng YQ, Su DF, et al. The Sirt1 activator resveratrol improved hematopoiesis in pancytopenia mice induced

by irradiation [J]. J Pharmacol Sci, 2019, 140 (1): 79-85.

[9] Fibach E, Prus E, Bianchi N, et al. Resveratrol: antioxidant activity and induction of fetal hemoglobin in erythroid cells from normal donors and β -thalassemia patients [J]. Int J Mol Med, 2012, 29 (6): 974-982.

[10] 方晓艳, 魏珍珍, 白明, 等. 基于中西医临床病症特点的血虚动物模型分析[J]. 中药药理与临床, 2018, 34 (5): 144-149.

[11] 史旭芹, 唐于平, 瞿城, 等. 复合血虚模型中环磷酸胺剂量的探索[J]. 中药药理与临床, 2018, 34 (5): 136-140.

[12] Liu J, Narla M, An XL. Membrane assembly during erythropoiesis [J]. Curr Opin Hematol, 2011, 18 (3): 133-138.

[13] Hu JP, Liu J, Xue FM, et al. Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages: implications for understanding of normal and disordered erythropoiesis in vivo [J]. Blood, 2013, 121 (16): 3246-3253.

[14] Chung E, Kondo M. Role of Ras/Raf/MEK/ERK signaling in physiological hematopoiesis and leukemia development [J]. J Immunol Res, 2011, 49 (1-3): 248-268.

[15] Li Z, Sun MZ, Lu X, et al. ETV6 Regulates hemin-induced erythroid differentiation of K562 cells through mediating the Raf/MEK/ERK pathway [J]. Biol Pharm Bull, 2022, 45 (3): 250-259.

[16] 程晓妮, 倪健, 潘亚磊, 等. 基于环磷酸胺致小鼠损伤保护作用研究正源方前处理工艺[J]. 中南药学, 2021, 19 (9): 1822-1827.

[17] Sasaki Y, Guo YM, Goto T, et al. IL-6 generated from human hematopoietic stem and progenitor cells through TLR4 signaling promotes emergency granulopoiesis by regulating transcription factor expression [J]. J Immunol, 2021, 207 (4): 1078-1086.

[18] Tie RX, Li HH, Cai SY, et al. Interleukin-6 signaling regulates hematopoietic stem cell emergence [J]. Exp Mol Med, 2019, 51 (10): 1-12.

[19] 苗明三, 方晓艳. 当归补血汤多糖对大鼠血虚模型血清 IL-2, IL-6, EPO 水平的影响[J]. 中国现代应用药学, 2004, 21 (3): 179-181.

[20] 田宇楠, 向玉珂, 王涛, 等. 三类传统方剂治疗 5-氟尿嘧啶所致大鼠贫血的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21 (23): 139-144.

[21] 刘含, 杨红兰, 莫晶, 等. 丁酸钠、Hemin 及 DMSO 诱导 K562 红系分化作用的差异[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56 (5): 746-751.

[22] Chen K, Liu J, Heck S, et al. Resolving the distinct stages in erythroid differentiation based on dynamic changes in membrane protein expression during erythropoiesis [J]. PNAS, 2009, 106 (41): 17413-17418.

[23] Yu CH, Wang H, Wang Y, et al. Protease sensitivity and redistribution of CD71 and glycophorin A on K562 cells [J]. Cell Mol Biol, 2017, 63 (9): 40-45.

[24] Chen YT, Xiang J, Qian FH, et al. Epo receptor signaling in macrophages alters the splenic niche to promote erythroid differentiation [J]. Blood, 2020, 136 (2): 235-246.

(收稿日期: 2024-01-31; 修回日期: 2024-04-19)

吡非尼酮亚微乳的制备与评价

王欣茹^{1, 2, 4}, 田葳^{1, 2, 4}, 孟扬^{1, 2, 4}, 徐丽芝^{1, 4, 5}, 杨瑞⁶, 刘彤⁷, 王淑君^{3*}, 叶田田^{1, 3*} (1. 江西中医药大学, 南昌 330004; 2. 长三角药物高等研究院, 江苏 南通 226133; 3. 沈阳药科大学, 沈阳 110016; 4. 江苏艾迪纳米生物医药有限公司, 江苏 南通 226100; 5. 安徽中医药大学, 合肥 230012; 6. 辽宁中医药大学附属第二医院, 沈阳 110034; 7. 辽宁省药品检验检测院, 沈阳 110032)

摘要: **目的** 制备吡非尼酮亚微乳 (pirfenidone submicronemulsion, PFD-SE), 优化 PFD-SE 处方, 并研究其体外释药机制。**方法** 采用高压均质法制备 PFD-SE, 并以离心稳定常数 Ke 为评价指标, 采用 Box-Behnken 效应面法优化 PFD-SE 处方; 以透析法考察 PFD-SE 的体外释药行为。**结果** PFD-SE 的最优处方为 PFD 0.250%, 中链甘油三酯 2.500%, 大豆卵磷脂 S100 0.237%, 聚氧乙烯 40 氢化蓖麻油 0.311%, 超声时间 8.9 min; PFD-SE 体外释药遵从一级动力学方程, 与吡非尼酮溶液相比, PFD-SE 可延长药物在体内的滞留时间。稳定性结果显示 PFD-SE 在常温和 4 °C 条件下稳定性良好。**结论** 本研究制备的 PFD-SE 稳定性良好, 可达到缓释的目的, 为 PFD 新剂型的开发提供了新思路。

关键词: 吡非尼酮; 特发性肺纤维化; Box-Behnken 效应面法; 吸入制剂; 亚微乳

中图分类号: R283.6, R943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)06-1512-08
doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.018

Preparation and evaluation of pirfenidone submicroemulsion

WANG Xin-ru^{1, 2, 4}, TIAN Wei^{1, 2, 4}, MENG Yang^{1, 2, 4}, XU Li-zhi^{1, 4, 5}, YANG Rui⁶, LIU Tong⁷, WANG Shu-jun^{3*}, YE Tian-tian^{1, 3*} (1. Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004; 2. Yangtze Delta Pharmaceutical College (Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute), Nantong Jiangsu 226133; 3. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016; 4. Jiangsu Aidi Nano Biomedical Co., Ltd., Nantong Jiangsu 226100; 5. Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230012; 6. The Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110034; 7. Liaoning Institute for Drug Control, Shenyang 110032)

Abstract: Objective To prepare pirfenidone submicroemulsion (PFD-SE), optimize the prescription of PFD-SE, and determine the mechanism of drug release in vitro. **Methods** PFD-SE was prepared by high pressure homogenization method, and the centrifugal stability constant Ke was used as the evaluation index. The formulation of PFD-SE was optimized by Box-Behnken effect surface method, and the in vitro drug release behavior of PFD-SE was determined by dialysis. **Results** The optimal prescription of PFD-SE was as follows: PFD 0.250%, medium chain triglyceride 2.500%, soybean lecithin S100 0.237%, polyoxyethylene 40 hydrogenated castor oil 0.311%, and ultrasound for 8.9 min. In vitro release of PFD-SE followed the First order kinetic equation, and PFD-SE prolonged the retention time of the drug in vivo compared with pirfenidone solution. The stability test showed that PFD-SE had good stability at room temperature and 4 °C. **Conclusion** PFD-SE prepared in this study has good stability and sustained release, which provides a new idea for the development of new dosage forms of PFD.

Key words: pirfenidone; idiopathic pulmonary fibrosis; Box-Behnken response surface methodology; inhaled formulation; submicroemulsion

基金项目: 军队基础加强计划重点基础研究项目 (No. 2021-JCJQ-ZD-077-11)。

作者简介: 王欣茹, 女, 硕士研究生, 主要从事药剂学研究, email: 2719356635@qq.com * **通信作者:** 王淑君, 女, 教授, 博士研究生导师, 主要从事药剂学研究, email: 1252116911@qq.com; 叶田田, 女, 硕士研究生导师, 主要从事药剂学研究, email: 729587208@qq.com

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是一种常见的、病因和发病机制尚不明确的、慢性进行性纤维化间质性肺病^[1], 其特征是肺泡结构缺失、上皮-间充质转化增加和组织修复异常^[2]。IPF 多发于中老年人, 我国是一个老龄化严重的国家, 保守估计 IPF 患者至少有 50 万, 且发病率逐年上升^[3]。迄今为止还没有能够完全治愈 IPF 的药物, 用于延缓肺纤维化的药物仅有尼达尼布和吡非尼酮。

吡非尼酮 (pirfenidone, PFD) 是吡啶酮类化合物, 可通过抑制致纤维化因子 TGF- β 、血小板衍生生长因子和碱性成纤维细胞生长因子的表达, 达到抑制肺纤维化的目的。吡非尼酮已在临床应用多年, 获得了肯定, 但目前上市的剂型仅有片剂和胶囊剂, 存在严重的胃肠道不良反应、全身性光敏反应、患者的耐受性差、药物的体内半衰期短等问题^[4]。因此我们开发了一种吸入用吡非尼酮亚微乳 (pirfenidone submicronemulsion, PFD-SE) 制剂。

与口服给药方式相比, 肺部给药可直接将药物递送至肺部, 降低了药物的给药剂量并减少了全身给药所带来的不良反应。将水中微溶的 PFD 制备成亚微乳不仅可以提高其溶解度, 还可增加生物利用度、提高疗效和亲脂性药物稳定性^[5]。故本研究基于单因素考察, 应用 Box-Behnken 效应面法优化了 PFD-SE 的处方, 并对其释药机制进行初步探索探讨, 为 PFD-SE 吸入制剂的开发及递送提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AT 高效液相色谱仪 (日本岛津); PX85Z 型分析天平 (奥豪斯仪器有限公司, $d = 0.01 \text{ mg}$); TDZ4K 型离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); FJ200-SH 型数显高速分散均质机 (上海标本模型厂); SCIENCETZ-E 型超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器 (巩义市予华仪器有限责任公司)。

1.2 试药

PFD (北京莱瑞森科技有限公司, 纯度: 99%, 批号: 20220321); 中链甘油三酯 (medium chain triglycerides, MCT) (北京优诺康医药技术服务有限公司, 批号: 594000-2230182); 聚氧乙烯 40 氢化蓖麻油 (PEG-40 hydrogenated castor oil, RH40) (中国巴斯夫有限公司, 批号: 75389809T0)、大豆卵磷脂 (phosphatidylcholine, S100) (德国利宝益

公司, 批号: 579010-1190091-13); 甲醇 (批号: 22045167)、乙腈 (批号: 20220128) (国药集团化学试剂)。液相用试剂级别均为色谱纯, 其他化学试剂级别为分析纯。

2 方法与结果

2.1 PFD-SE 的制备方法

称取处方量的药物及辅料置于西林瓶中, 放入 70 °C 磁力搅拌器中 1000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 搅拌至大豆卵磷脂完全溶解后, 加入 10 mL 纯水乳化 5 min, 再于高压均质机 6000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 均质 2 min, 最后超声细胞粉碎机 300 W 超声 9 min, 过 0.22 μm 水系微孔滤膜后即得。

2.2 PFD-SE 处方及工艺筛选

2.2.1 油相种类和用量的筛选

称取等量的 PFD, 置于等量的不同油相中, 用磁力搅拌先后于室温和 70 °C 条件下搅拌 1 h, 观察 PFD 的溶解情况; 再将载药油相于 4 °C 放置, 观察药物是否析出。综合药物在室温和 70 °C 的溶解情况以及 4 °C 是否析出, 筛选最优油相, 结果见表 1。结果显示 PFD 在 MCT 和蓖麻油中的溶解度较高, 因 MCT 较蓖麻油具有更好的安全性, 故选择的油相为 MCT。依次考察含量为 2.5%、5.0%、7.5%、10.0% 的 MCT 制备的亚微乳的稳定性, 结果见表 2, 随着油相用量的增加, K_e 变大, 稳定性减弱, 当油相用量为 7.5% 时, 制备的亚微乳出现分层现象。结合经济性、安全性和稳定性原则, 优选油相 MCT 用量为 2.5%。

表 1 不同油相中 PFD 的溶解情况

Tab 1 Solubility of PFD in different oil phases

油相	室温溶解程度	70 °C 溶解程度	4 °C 放置是否析出
大豆油	部分溶解	部分溶解	部分析出
玉米油	部分溶解	部分溶解	部分析出
蓖麻油	部分溶解	完全溶解	不析出
MCT	部分溶解	完全溶解	不析出
棉籽油	部分溶解	部分溶解	部分析出

表 2 油相用量对乳剂稳定性的影响

Tab 2 Effect of oil phase dosage on emulsion stability

油相用量 /%	离心试验结果	K_e	粒径 /nm	外观
2.5	不分层	0.032	153.0	乳白, 白色较浅
5.0	不分层	0.093	195.2	乳白, 白色较浅
7.5	轻微分层	0.146	226.2	乳白, 白色较深
10.0	轻微分层	0.247	256.2	乳白, 白色较深, 挂壁

2.2.2 MCT 最适乳化剂 HLB 值测定

分别向等量的 MCT 中加入等量不同 HLB 值的复合乳化剂 (聚山梨酯-80-三油酸山梨坦) 制备乳剂, 4000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 分别取离心前后下层液体

100 μL, 分别加纯水稀释至 10 mL, 测定吸光度 (A)。以 500 nm 处测定的离心前后下层液体的吸光度计算 K_e 。以 600 nm 处测定离心后下层液体的吸光度计算浊度, 计算公式如下所示:

$$HLB_{混} = (HLB_1 \times W_1 + HLB_2 \times W_2) / (W_1 + W_2)$$

(W_1 为乳化剂 1 的质量, W_2 为乳化剂 2 的质量);

$$K_e = (A_0 - A) / A_0$$

(A_0 未离心的制剂的吸光度值, A 离心后的制剂的吸光度值)

$$浊度 (\%) = (100 - 10^{2-A}) \times 100\%$$

K_e 越小, 浊度越高, 乳剂稳定性越高。结果见图 1、2, 当乳化剂 HLB 值为 9 时, 稳定性最好。

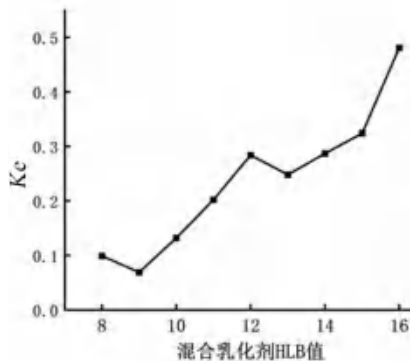


图 1 不同 HLB 值对乳剂 K_e 的影响

Fig 1 Effect of different HLB values on K_e of emulsions

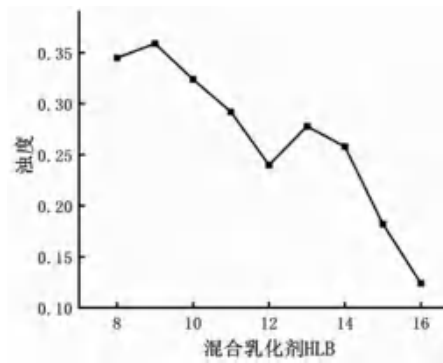


图 2 不同 HLB 值对乳剂浊度的影响

Fig 2 Effect of different HLB values on the turbidity of emulsions

2.2.3 乳化剂的筛选 分别将等量的 MCT 和等量的不同乳化剂混合, 70 °C 条件下观察两者溶解情况, 向纯水中滴加一滴 MCT- 乳化剂混合物, 以其在水中的扩散速度和粒径大小为评价指标, 筛选最优乳化剂, 结果见表 3, 优选 RH40。因为 RH40 的 HLB 值为 14 ~ 16, 而 MCT 的最适 HLB 值为 9, 综合考虑 MCT 最适 HLB 值和体内安全性, 选择 RH40-S100 复合乳化剂进行后续试验。

2.2.4 复合乳化剂比例及用量筛选 分别将等量的 MCT 和不同比例的 RH40-S100 混合乳化剂混匀, 制备成不同 HLB 值的乳剂, 以 K_e 值、离心

表 3 MCT 最适 HLB 值筛选

Tab 3 Screening of optimal HLB value for MCT

乳化剂	溶解或分层	颜色	粒径 /mm	扩散程度	状态
聚山梨酯 -80	相分离	黄白色	> 1	少量沉降、不扩散	浅黄色油滴
油酸山梨坦	无相分离	浅黄色	> 1	不扩散、不沉降	黄白色油滴
三油酸山梨坦	无相分离	浅黄色	> 1	不扩散、不沉降	黄白色油滴
单硬脂酸甘油酯	溶解	浅黄色	> 1	不扩散、不沉降	白色固体
泊洛沙姆 188	溶解	浅黄色	> 1	不扩散, 沉降慢	白色液滴
RH40	无相分离	浅黄色	> 1	扩散慢, 沉降慢	黄白色液滴
S100	溶解	黄白色	> 1	不扩散、不沉降	白色液滴
聚山梨酸酯 -60	无相分离	黄白色	> 1	不扩散、不沉降	黄白色油滴
1, 2- 丙二醇	无相分离	黄白色	> 1	沉降快	白色液滴

后外观和粒径为指标, 筛选制备吡非尼酮最优的复合乳化剂比例 (RH40 : S100), 结果如表 4 所示。当 RH40 与 S100 的比为 6 : 4 时, 乳剂最稳定, 故选用的比例为 RH40-S100 复合乳化剂的比例为 6 : 4。随着复合乳化剂用量的增加, K_e 值变小, 稳定性增大, 同时粒径减小, 当复合乳化剂用量达到 1.5% 时, K_e 值不再变化 (见表 5)。但是因为吸入制剂辅料添加量越少, 产生毒副作用的危险性越小, 故综合考虑乳剂的稳定性和安全性后, 优选复合乳化剂用量为 0.5%。

2.2.5 工艺筛选 分别对乳化时间、乳化温度、

表 4 复合乳化剂比例筛选

Tab 4 Screening of compound emulsifier ratio

乳化剂比例	K_e	离心后外观	粒径 /nm
10 : 0	0.088	轻微分层	166.20
9 : 1	0.165	轻微分层	152.00
8 : 2	0.145	轻微分层	141.60
7 : 3	0.101	轻微分层	120.10
6 : 4	0.000	不分层	97.62
5 : 5	0.024	不分层	86.26
4 : 6	0.017	不分层	91.76
3 : 7	0.000	不分层	115.90
2 : 8	0.112	轻微分层	194.60
1 : 9	0.526	分层	234.50

表 5 复合乳化剂用量筛选

Tab 5 Screening of compound emulsifier dosage

乳化剂用量 /%	Ke	离心后外观	粒径 /nm
0.2	0.275	分层	209.40
0.5	0.079	不分层	166.60
1.0	0.031	不分层	112.00
1.5	0.000	不分层	89.04
2.0	0.000	不分层	65.86

均质功率、均质时间、超声功率、超声时间进行考察，以 Ke 为考察指标，结果见图 3。筛选的制备工艺为 70 °C 乳化 5 min，高压均质机 6000 r · min⁻¹ 均质 2 min，细胞粉碎机 300 W 超声 10 min，过 0.22 μm 微孔滤膜后即得。

2.2.6 Box-Behnken 效应面法优化 根据单因素试验的结果，以乳剂的离心外观、Ke 为指标

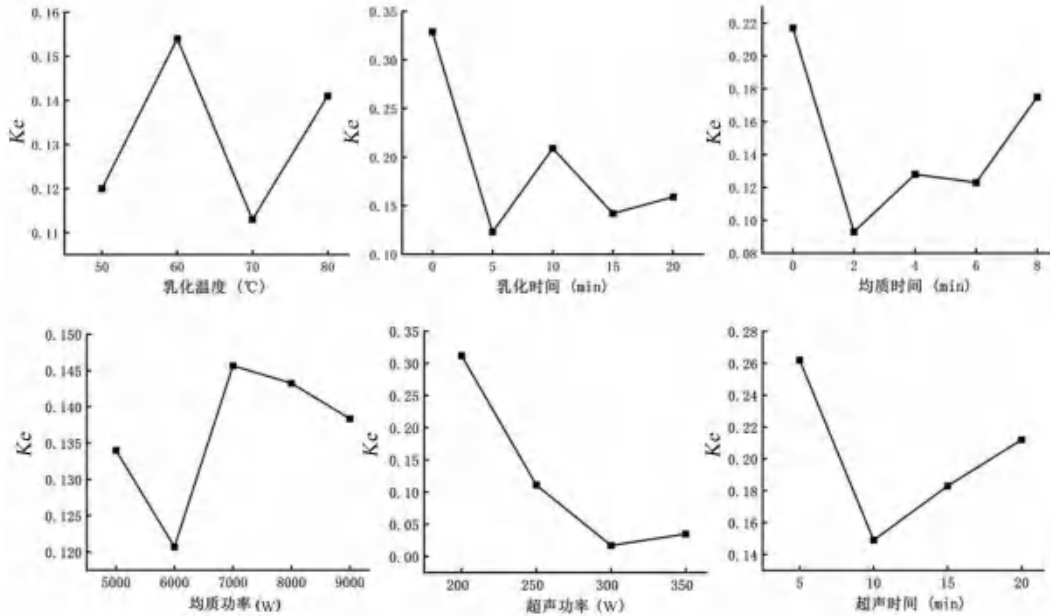


图 3 PFD 乳剂工艺筛选

Fig 3 Process selection of PFD emulsion

筛选处方，选取乳化剂比例 (A)、乳化剂用量 (B)、超声时间 (C) 3 个因素进行考察，乳化剂用量 20 ~ 80 mg，乳化剂比例 (RH40 : S100) 6 : 4 ~ 4 : 6，超声时间为 5 ~ 15 min，以 Ke 为考察指标，使用 Design-Expert 13 软件设计 3 因素 3 水平试验，试验因素水平见表 6，试验设计与结果见表 7。试验中引入了 Ke 的归一值 OD (overall desirability, OD)，来考察指标的综合效果。OD = (X_{max} - X) / (X_{max} - X_{min})，其中，X_{min} 和 X_{max} 分别为数据集中最小值和最大值，X 表示数据集中的任意值，OD 表示归一化后的值。

表 6 水平和因素

Tab 6 Levels and factor

水平	因素		
	乳化剂比例	乳化剂用量 /mg	超声时间 /min
- 1	6 : 4	20	5
0	5 : 5	50	10
1	4 : 6	80	15

应用 Design-Expert 13 软件对试验数据进行拟合，得到 OD 的回归方程为 OD = 0.4387 + 0.0174X₁ -

表 7 Box-Behnken 效应面法试验设计

Tab 7 Design of Box-Behnken response surface methodology

No.	A. 乳化剂比例	B. 乳化剂用量 /mg	C. 超声时间 /min
1	4 : 6	20	10
2	6 : 4	20	10
3	4 : 6	80	10
4	6 : 4	80	10
5	4 : 6	50	5
6	6 : 4	50	5
7	4 : 6	50	15
8	6 : 4	50	15
9	5 : 5	20	5
10	5 : 5	80	5
11	5 : 5	20	15
12	5 : 5	80	15
13	5 : 5	50	10
14	5 : 5	50	10
15	5 : 5	50	10
16	5 : 5	50	10
17	5 : 5	50	10

0.0093X₂ - 0.0051X₃ - 0.0010X₁X₂ + 0.0009X₁X₃ - 0.0004X₂X₃ + 0.0147X₁² + 0.0001X₂² + 0.0015X₃²。表

8 为方差分析结果, 该模型 $P < 0.0001$; 失拟项 $P = 0.2094 > 0.05$, 差异不显著, 表明该模型可信度和拟合度良好, 回归方程可较准确地描述各因素与响应值间的关系。影响因素顺序: 乳化剂用量 > 乳化剂比例 > 超声时间, 试验结果的二维等高线图和三维效应面图如图 4 所示。

表 8 方差分析
Tab 8 Analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.2260	9	0.0251	40.57	< 0.0001
A	0.0305	1	0.0305	49.26	0.0002
B	0.1165	1	0.1165	188.15	< 0.0001
C	0.0035	1	0.0035	5.61	0.0498
AB	0.0139	1	0.0139	22.41	0.0021
AC	0.0002	1	0.0002	0.3115	0.5941
BC	0.0097	1	0.0097	15.61	0.0055
A ²	0.0112	1	0.0112	18.10	0.0038
B ²	0.0340	1	0.0340	54.99	0.0001
C ²	0.0025	1	0.0025	4.08	0.0832
残差	0.0043	7	0.0006		
失拟项	0.0028	3	0.0009	2.39	0.2094
净误差	0.0016	4	0.0004		
总误差	0.2303	16			

2.2.7 优化工艺验证 应用 Design-Expert 13 软件进行优化, 控制乳化剂用量小且 Ke 趋于 0.1, 得到最优处方: MCT 2.500%, PFD 0.250%, RH40 0.311%, S100 0.237%, 超声 8.9 min。按最优处方工艺平行制备 3 份 PFD-SE, 分别测定 OD, 测定结果见表 9, 结果显示, 该模型可靠。

表 9 OD 预测值与实测值比较 (n = 3)

Tab 9 Comparison between predicted value and measured value of OD

编号	OD 预测值	OD 实测值	偏差 / %
1	0.115	0.119	0.28
2	0.115	0.117	0.14
3	0.115	0.121	0.42

2.3 PFD-SE 质量评价

2.3.1 外观、粒径、透射电镜 按照“2.2.7”项下的最优工艺和处方制备的 PFD-SE 为乳白色溶液, 表面无油滴, 如图 5 所示。流动性较好, 放置未出现挂壁、分层现象; 测得其 pH 值为 6.80; PFD-SE 的平均粒径为 (170.3 ± 2.5) nm, PDI 为 (0.096 ± 0.007), PDI 值小, 粒子粒径分布范围窄, 结果见图 6。PFD-SE 的透射电镜图如图 7, 结果显示乳滴分布较均匀, 呈圆形, 粒径大小与动态光散射技术测定结果相一致, 说明 PFD-SE

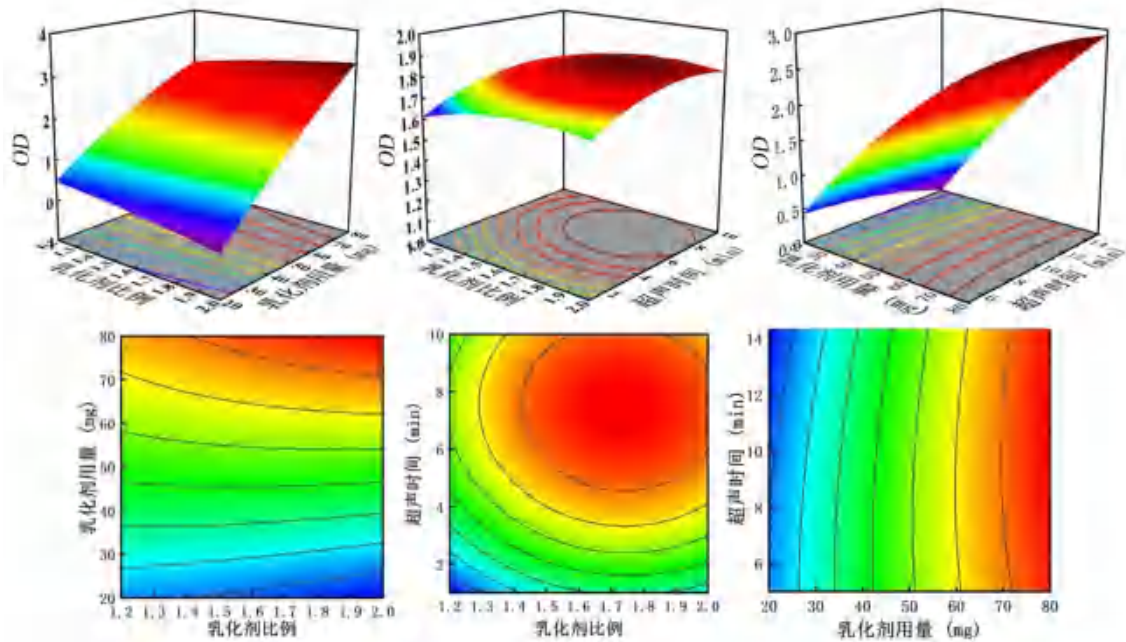


图 4 X_1 、 X_2 、 X_3 对 OD 影响的效应面图与等高线图

Fig 4 Response surface diagram and contour map of the influence of X_1 , X_2 and X_3 on OD

粒径均一, 稳定性较好。

2.3.2 乳剂类型鉴定 向 PFD-SE 中分别加入适量亚甲蓝和甲基红染料, 静置观察两种染料在乳液中的扩散情况。静置 1 h 后, 加亚甲蓝的 PFD-SE 呈均匀的蓝色, 而加甲基红的 PFD-SE 上层为

乳白色, 底部有红色沉淀, 进一步证明该亚微乳为水包油型。

2.3.3 稳定性考察 按照“2.1”项下的最优工艺和处方制备样品。按照“2.2.2”的方法考察其离心稳定性, 平行 3 组; 取 3 份样品室温放置 15 d,



图 5 PFD-SE 外观
Fig 5 Appearance of PFD-SE

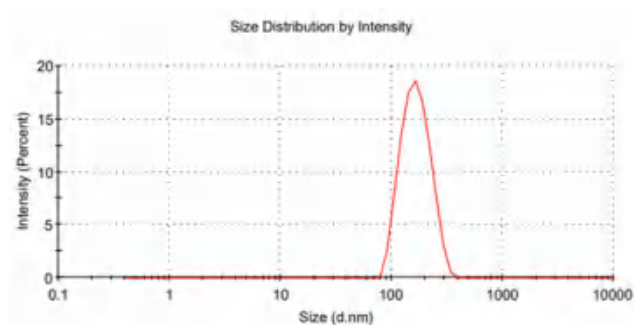


图 6 PFD-SE 粒径
Fig 6 Particle size of PFD-SE

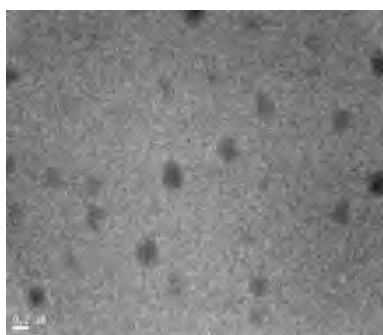


图 7 PFD-SE 透射电镜图
Fig 7 Transmission electron microscopy image of PFD-SE

研究其室温放置稳定性;将 3 组样品先于 2 ~ 8℃ 放置 2 d, 再于 40℃ 条件下放置 2 d, 循环 3 次, 考察低温循环稳定性; 将 3 组样品先于 - 20℃ 放

置 2 d, 再于 40℃ 条件放置 2 d, 考察冻融稳定性。结果如表 10 所示, PFD-SE 低温 (4℃) 和室温条件下有良好的稳定性, 在 - 20℃ 条件下稳定性减弱, 故本品应于室温或者低温条件下存放。

表 10 PFD-SE 稳定性考察 (n = 6)
Tab 10 Stability of PFD-SE (n = 6)

考察项目	pH	平均粒径 /nm	外观	Ke
离心稳定性	6.58 ~ 6.50	170.1 ~ 198.2	未分层	1.14
低温循环稳定性	6.53 ~ 6.56	171.3 ~ 194.7	未分层	1.17 ~ 1.23
室温放置稳定性	6.67 ~ 6.65	168.3 ~ 210.3	未分层	1.12 ~ 1.25
冻融稳定性	6.56 ~ 5.70	未测定	分层	未测

2.4 PFD 含量测定

2.4.1 色谱条件 参照欧洲药典关于吡非尼酮相关规定进行试验, 色谱柱 Diamonsil C8 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.0014 mL·min⁻¹ 三乙胺 (用磷酸调节 pH 3.0) - 乙腈 - 甲醇 (325 : 65 : 110, V/V/V); 检测波长: 220 nm; 柱温: 40℃; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 进样体积: 15 μL。

2.4.2 溶液的配制 精密称取 PFD 对照品适量, 加入纯甲醇涡旋 3 min, 溶解后定容, 配制成 100 μg·mL⁻¹ 的对照品溶液。再取适量 PFD-SE 加入适量甲醇, 超声破乳后定容, 制成 PFD 质量浓度为 100 μg·mL⁻¹ 的供试品溶液。取适量空白乳剂, 配制方法同供试品溶液, 得空白制剂溶液。

2.4.3 仪器精密度 取“2.2.2”项下配制的 PFD 对照品溶液, 连续进样 6 针, 记录 6 次进样的峰面积值, 并计算峰面积值的 RSD。结果显示 RSD 为 0.080% (n = 6), 说明该仪器精密度良好。

2.4.4 专属性 取“2.2.2”项下配制的空白溶剂、空白乳剂、对照品溶液、供试品溶液, 分别进样, 结果见图 8, 结果显示, 空白辅料对 PFD 出峰无影响, PFD 供试品溶液与对照品溶液的出峰时间相同, 峰形良好, 方法专属性良好。

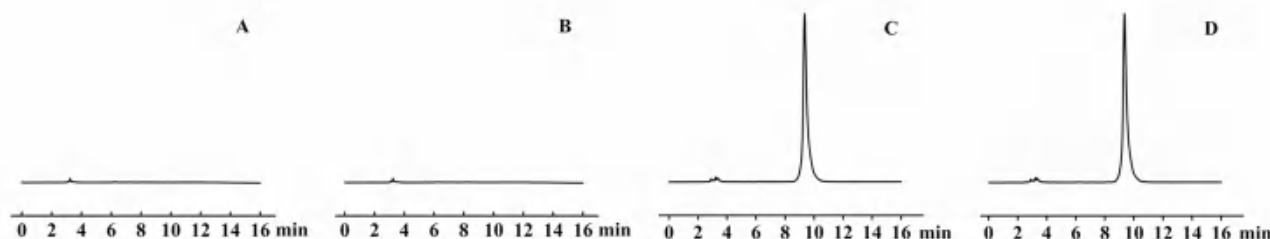


图 8 PFD 方法专属性试验
Fig 8 Specificity test of PFD
A. 空白溶剂 (blank solvent); B. 空白制剂 (blank preparation); C. PFD 对照品 (PFD reference substance); D. PFD 供试品 (PFD test substance)

2.4.5 线性关系考察 称取适量 PFD 对照品, 加甲醇涡旋 3 min, 溶解后定容, 配制成 1 mg·mL⁻¹ 的对照品储备液。再分别量取 0.5、0.8、1.0、1.2、

1.5 mL 的对照品储备液, 置 10 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 分别进样, 记录峰面积。以 PFD 浓度 (X) 为横坐标, PFD 峰面积 (Y) 为纵坐标, 绘

制 PFD 标准曲线。结果显示其线性方程为： $Y = 5.625 \times 10^4 X - 4.106 \times 10^4$ ， $R^2 = 0.9999$ ，表明 PFD 在 $50 \sim 150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与峰面积有良好的线性关系。

2.4.6 加样回收试验 称取 3 份 100% 处方的空白辅料分别置于 10 mL 量瓶中，再分别加入 8.0、10.0、12.0 mg 的 PFD 对照品，加入适量甲醇涡旋 3 min，溶解后定容，得到低、中、高 3 组样品，平行配制 3 份。分别取 1 mL 样品置于 10 mL 量瓶中，定容至刻度，进样分析，计算回收率。结果显示高、中、低 3 组样品的平均回收率均在 98% ~ 101%，且 RSD 均小于 2%，表明该法准确度良好。

2.4.7 PFD-SE 含量测定 取 100 μL PFD-SE 于 25 mL 量瓶中，加入适量甲醇超声破乳后定容，即得 PFD-SE 样品溶液，平行测定 3 次。测得的 PFD 含量为 $(2.53 \pm 0.02) \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.5 体外释放考察

采用透析袋法考察 PFD 的体外释放情况^[6]，分别精密吸取 1 mL PFD-SE 和 PFD 水溶液（同等药物质量浓度）分别置于透析袋内，将透析袋分别放入装有 100 mL pH 5.8 的 PBS 的烧杯中（已满足漏槽条件），采用集热式恒温磁力搅拌器，条件设置为 $100 \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ ，温度为 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 。分别于 0、30 min 和 1、1.5、2、3、4、6、8、10、12、24 h 取 1 mL PBS 溶液，并补充等量的 PBS 溶液，高效液相法测定其浓度，并计算不同时间点 PFD 的累计释放率 (Q_n)。以 Q_n 为纵坐标，时间 (t) 为横坐标绘制累计释放曲线，结果见图 9。结果显示 0 ~ 8 h 为 PFD 水溶液主要的释药阶段，随后趋于平稳；而 PFD-SE 在 24 h 依然未释放完全，所以初步预测 PFD-SE 有缓释作用。将 PFD-SE 累计释放数据分别按 Zero-order、一级方程、Higuchi 动力学方程进行拟合，初步研究 PFD-SE 的体外释药规律，以拟合度 (R^2) 为评价指标确定拟合效果，结果如表 11 所示，其中一级动力学的 R^2 最大，表明 PFD-SE 的体外释药情况更符合一级动力学模型。

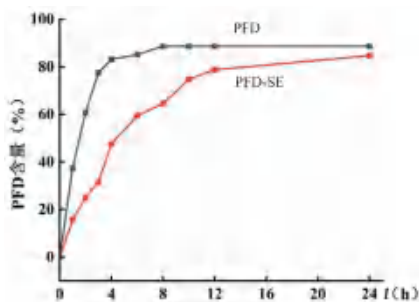


图 9 PFD 溶液和 PFD-SE 体外释放

Fig 9 In vitro release of free PFD and PFD-SE

表 11 PFD-SE 释药动力学模型拟合方程及相关系数

Tab 11 Fitting equation and correlation coefficient of PFD-SE release kinetic model

动力学模型	方程	R^2
Zero-order 方程	$Q_n = 24.23 + 3.42t$	0.6777
一级方程	$Q_n = 87.39 (1 - e^{-0.18t})$	0.9925
Higuchi 方程	$Q_n = 20.02t^{1/2} + 2.26$	0.9087

3 讨论

亚微乳制剂可以增加 PFD 的溶解度，并提高其稳定性，此外将药物做成亚微乳还可提高药物的靶向性，提高药物体内及经皮吸收率。因亚微乳的特殊结构，可将药物包封在乳滴之中缓慢地释放，达到延长药物在体内的作用时间的作用。吸入乳剂，可以通过雾化器产生供吸入用的气溶胶，气溶胶分子以高浓度、恒定的大小分布，可迅速到达病灶部位发挥作用^[7-9]，而且作用方式温和、适用范围广，便于儿童及老人的使用，被广泛应用于临床^[10]。

PFD 在室温条件下在多种油相中的溶解度均较小，但加热至 $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 时，PFD 在蓖麻油和 MCT 中的溶解度显著增大，且冷藏后无药物析出。MCT 和蓖麻油相比，具有更好的流动性和安全性^[11]。此外 MCT 还具有卓越的溶解性、抗氧化性、低凝固点、低黏度、能够降低细菌的耐热性等特性，在药物制剂方面也有广泛的应用，MCT 可作为消化不良或者能量吸收低患者的食物补充剂，当药品采用 MCT 制备成乳剂时，其生物利用率均有很大程度的改善^[6]，故选择的油相为 MCT。

每种油相都有相应的最适 HLB 值，乳化剂的 HLB 值与油相的最适 HLB 值越接近，乳剂越稳定，通常情况下 W/O 型乳剂的 HLB 值为 $3 \sim 8$ ，O/W 型乳剂的 HLB 值为 $8 \sim 18$ ^[12]。RH40 具有良好的溶解性、乳化性和良好的表面活性并且温度和 pH 值的影响较小，有良好的稳定性，常用于乳剂的制备。S100 也是常用的表面活性剂之一，可降低油水界面的表面张力，形成胶束使油水混合物稳定分散还可与一些成分发生相互作用形成络合物，提高乳化剂的乳化能力，将两者合用可以更好地提高乳剂的稳定性，但由于 RH40 与 S100 的 HLB 值均不是定值，可通过调整筛选比例考察 Ke 达到最适 HLB 值^[13]。

以透析袋法考察 PFD-SE 的体外释药行为，结果表明 PFD-SE 可延缓药物释放，预试验中比较了 PFD-SE 在 pH 5.8 和 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中的释放情况，结果显示 PFD-SE 在酸性条件下有更好

的缓释效果,可更好地作用于肺纤维化的酸性微环境^[14]。但是由于透析袋法的静态模型和肺部微环境有所差距,所以 PFD-SE 的生物利用度及体内吸收情况是否理想,还需进行体内药动学试验。

综上,本研究开发了一种用于治疗肺纤维化的新剂型,并通过 Box-Behnken 效应面法优化其处方,将 PFD 制备成乳剂不仅增大了 PFD 的溶解度,还可延长 PFD 作用时间,为 PFD 新剂型研发提供了参考和依据。因为该制剂为吸入制剂,且制剂比表面积和粒径的尺寸对细胞摄取有影响^[15-17],后续还需要开展经雾化器雾化后药物在肺部的沉积情况和稳定性的相关研究^[18]及粒径大小对胞内运输方式、细胞内吞和细胞因子分泌的影响试验。

参考文献

- [1] 胡嘉浩,刘宇晗,潘星明,等.乙磺酸尼达尼布用于特发性肺纤维化治疗的成本-效果分析[J].世界临床药物,2023,44(9):981-989.
- [2] Pattnaik B, Negi V, Chaudhuri R, et al. MiR-326-mediated overexpression of NFIB offsets TGF- β induced epithelial to mesenchymal transition and reverses lung fibrosis[J]. Cell Mol Life Sci, 2023, 80(12): 357.
- [3] Li YJ, Chen RY, Wu JZ, et al. Salvianolic acid B protects against pulmonary fibrosis by attenuating stimulating protein 1-mediated macrophage and alveolar type 2 cell senescence[J]. Phytother Res, 2023, 38(2): 620-635.
- [4] 白子娜,李幸彬.吡非尼酮治疗特发性肺纤维化的研究进展[J].中国新药与临床杂志,2023,42(9):560-565.
- [5] 徐歌,敖莎,陈棵垒,等.明胶修饰的 β -胡萝卜素亚微乳的制备与处方优化[J].中国药剂学杂志(网络版),2023,21(3):117-133.
- [6] 胡艳秋,于莲,胡俊华,等.肺靶向吡非尼酮脂质体的制备及体外释药性质研究[J].黑龙江医药科学,2012,35(3):28-30.
- [7] Fatima N, Kaushik V, Ayoub A. A narrative review of a pulmonary aerosolized formulation or a nasal drop using sera containing neutralizing antibodies collected from COVID-19-recovered patients as a probable therapy for COVID-19[J]. Iran J Med Sci, 2021, 46(3): 151-168.
- [8] Hertel SP, Winter G, Friess W. Protein stability in pulmonary drug delivery via nebulization[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2015, 93: 79-94.
- [9] 章辉.抗耐药细菌性肺炎及急性肺损伤的油脂类药物乳剂雾化吸入溶液的研究[D].合肥:安徽医科大学,2023.
- [10] 卢宇欣,陈雪帆.中链甘油三酯的制备、分析及应用研究进展[J].食品与发酵工业,2022,48(24):352-358.
- [11] 王玉霞,乔虹,刘子侨.蓖麻毒素毒性作用机制及防治研究进展[J].中国药理学与毒理学杂志,2016,30(12):1385-1396.
- [12] 秦云,涂家生,孙春萌.乳化剂乳化性能及其关键质量属性研究进展[J].药学研究,2022,41(4):236-241.
- [13] 种思茹,彭汐涯,王欣茹,等.酮咯酸氨丁三醇鼻用温敏凝胶的制备及体外释放研究[J].中南药学,2023,21(4):857-863.
- [14] Sriramulu DD, Lünsdorf H, Lam JS, et al. Microcolony formation: a novel biofilm model of *Pseudomonas aeruginosa* for the cystic fibrosis lung[J]. J Med Microbiol, 2005, 54(7): 667-676.
- [15] 刘晓琳,谢青昕,李漂,等.流感疫苗脂质体的制备方法及其对免疫原性的影响[J].昆明医科大学学报,2022,43(5):7-11.
- [16] 李静雯,杜美红,杨寅,等.不同粒径的免疫磁珠对食源性致病菌捕获效率的影响[J].食品与生物技术学报,2020,39(9):46-52.
- [17] 岳华,魏炜,岳占国,等.纳微球粒径大小对免疫学效应的影响[A].生物颗粒与粉体制备、应用技术研讨会论文集[C].2010.
- [18] 魏文静,朱梨梨,潘娇娇,等.基于“药辅合一”的甘草次酸-蓖麻油亚微乳研究[J].中南药学,2023,21(4):876-881.

(收稿日期:2023-12-21;修回日期:2024-03-15)

基于蛋白降解靶向嵌合体的 IRAK4 降解剂的设计、合成及生物活性评价

孙自由^{1, 2, 3}, 周卯^{2, 3}, 白海云^{3*}, 钟利^{2, 3*} (1. 安徽中医药大学 药学院, 合肥 230012; 2. 长三角药物高等研究院, 江苏 南通 226133; 3. 百极弘焱(南通)医药科技有限公司, 江苏 南通 226126)

摘要: **目的** 设计并合成具有抗肿瘤活性的白细胞介素-1受体相关激酶4 (IRAK4) 降解剂。**方法** 将 IRAK4 蛋白配体与 E3 连接酶配体经不同类型和长度的连接链进行连接, 合成目标化合物, 其结构经 MS 谱和 ¹H NMR 谱确证。以大 B 细胞淋巴瘤细胞 OCI-LY10 为测试细胞株, 对所合成的目标化合物进行体外抗肿瘤活性评价以及对 IRAK4 的降解测试。**结果** 合成了 9 个靶向 IRAK4 的降解剂, 活性测试结果显示目标化合物均可抑制大 B 细胞淋巴瘤细胞 OCI-LY10 细胞增殖, 其中化合物 III、VII、VIII、IX 对 IRAK4 有较强的降解活性, 半数最大降解浓度 (DC_{50}) 值在 1 ~ 10 nmol · L⁻¹。**结论** 利用蛋白降解靶向嵌合体技术, 通过对 IRAK4 的降解, 实现对肿瘤细胞的增殖抑制, 值得进一步研究。**关键词:** 白细胞介素-1受体相关激酶4; 蛋白降解靶向嵌合体; 合成

中图分类号: R914.5 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)06-1520-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.019

Design, synthesis and biological evaluation of IRAK4 degraders based on proteolytic targeting chimera

SUN Zi-you^{1, 2, 3}, ZHOU Mao^{2, 3}, BAI Hai-yun^{3*}, ZHONG Li^{2, 3*} (1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Drug Research Institute of Yangtze Delta, Nantong Jiangsu 226133; 3. Biopolar Hongye (Nantong) Pharmaceutical Co., Ltd., Nantong Jiangsu 226126)

Abstract: Objective To design and synthesize interleukin-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4) degraders with antitumor activity. **Methods** The target compounds were synthesized by ligating IRAK4 protein ligand and E3 ligase ligand with different types and lengths of linker chains. Their structures were confirmed by MS spectroscopy and ¹H NMR spectroscopy. Large B-cell lymphoma cells OCI-LY10 were used as the test cell line, and the anti-tumor activity of the synthesized target compounds was evaluated in vitro and the degradation of IRAK4 was tested. **Results** Totally 9 degraders targeting IRAK4 were synthesized, and the activity test showed that the target compounds inhibited the proliferation of large B-cell lymphoma cells OCI-LY10 cells, among which compounds III, VII, VIII, and IX had strong degradation against IRAK4, with the DC_{50} value at 1 ~ 10 nmol · L⁻¹. **Conclusion** The use of protein degradation targeting chimera technology to inhibit the proliferation of tumor cells through the degradation of IRAK4 is worthy of further study.

Key words: interleukin-1 receptor-associated kinase 4; proteolytic targeting chimera; synthesis

白细胞介素-1受体相关激酶4 (interleukin-1 receptor-associated kinase 4, IRAK4) 属于 IRAK 激酶家族 (包括 IRAK1、IRAK2、IRAK3 和 IRAK4) 中的一员, 是细胞内一种丝/苏氨酸蛋白激酶^[1]。研究表明, IRAK4 是转导白细胞介素-1受

体 (interleukin-1 receptor, IL-1R) 和 T 淋巴细胞样受体家族 (Toll like receptors, TLRs) 信号的关键节点^[2-3], 在天然免疫信号传导中发挥重要作用^[4]。IRAK4 一方面具有激酶活性, 能够磷酸化下游蛋白 IRF5/7, 使 NF- κ B 和 AMPK 信号通路激活, 最

作者简介: 孙自由, 男, 在读硕士研究生, 主要从事药物化学研究, email: zysun.hm@simm.ac.cn *通信作者: 白海云, 男, 硕士研究生导师, 主要从事药物化学研究, email: hybai@bio-polar.com; 钟利, 女, 高级正研究员, 硕士研究生导师, 主要从事小分子抗肿瘤药物研发, email: lzhong@bio-polar.com

终导致炎症细胞因子的表达,从而参与调控多种肿瘤的发生发展^[5-6];另一方面,IRAK4 发挥支架结构作用,负责组建蛋白多聚体 myddosome 复合物,从而激活下游的信号通路,产生促炎因子(NF- κ B、CREB、AP-1、IRF 等),myddosome 与多种疾病有关,包括自身免疫性疾病、炎症性疾病以及癌症^[7-8]。

目前,开发以 IRAK4 为靶点的抗炎和抗肿瘤研究药物,以小分子抑制剂为主,然而这些抑制剂的作用位点主要集中在 IRAK4 激酶域的 ATP 结合口袋,只能影响或阻断激酶域的功能,不能阻断 IRAK4 非激酶依赖的骨架功能^[9-11]。蛋白降解靶向嵌合体(proteolytic targeting chimera, PROTAC)是一类能够通过诱导靶蛋白的多聚泛素化而导致其降解的化合物^[12-13],是药物研发的一个新兴领域,因此,设计合成能够将 IRAK4 蛋白降解的 PROTAC 分子,来同时阻断激酶依赖的催化功能和非激酶依赖的骨架功能,对 IRAK4 相关疾病的研究具有重要的意义。

本研究将 IRAK4 蛋白配体与 E3 泛素连接酶配体通过连接链进行连接,形成一种双功能的靶向诱导蛋白降解联合体。选取 Degorce 等^[14]报道的化合物作为 IRAK4 蛋白配体,其中哌啶 N 甲基部分暴露在溶剂区,因此该部分可作为 Linker 的连接位点,以度胺类衍生物为 E3 连接酶配体,通过不同类型和长度的连接链进行连接,如图 1 所示,设计了一系列 IRAK4 蛋白降解剂,并研究具有不同连接链的目标化合物对 IRAK4 降解作用与肿瘤细胞增殖抑制活性的影响。

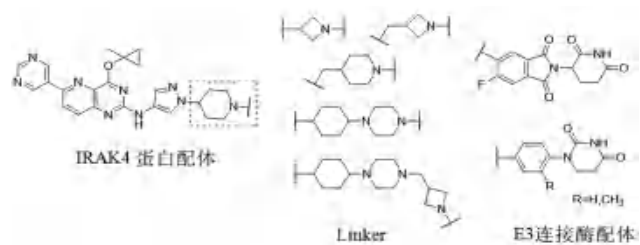


图 1 IRAK4 降解剂设计示意图

Fig 1 Schematic diagram of the design of IRAK4 degrader

1 仪器与试剂

JA5003B 精密天平(上海精密科学仪器有限公司); 85-2A 型磁力搅拌器(上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司); RV8 型旋转蒸发器[艾卡(广州)仪器设备有限公司]; Bruker 400 MHz 型核磁共振仪(DMSO- d_6 为溶剂, TMS 为内标, 瑞士 Bruker 公司); Agilent 1260 Infinity II 液质联用仪(美国安捷伦公司); 多功能酶标仪(PerkinElmer); Cell Titer 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay 试剂盒(MTS 细胞活性检测试剂)(上海盛兆生物

科技有限公司); 抗体 IKAK4 (Cell Signaling Technology); 抗体 β -Actin (Santa Cruz Biotechnology 公司); 山羊抗鼠 IgG 和山羊抗兔 IgG (Jackson IR 公司)。柱层析硅胶(200 ~ 300 目)和薄层层析硅胶板(青岛海洋化工厂); 起始原料 6-氯-2-氰基-3-硝基吡啶、1-Boc-哌嗪、4-硝基吡啶、1-Boc-4-(4-氨基苯基)哌嗪(上海毕得医药科技股份有限公司)。试剂均为市售分析纯或化学纯。

2 方法与结果

2.1 目标化合物的合成路线

以 6-氯-2-氰基-3-硝基吡啶(1)为起始原料,经水解、还原反应得到化合物 2,化合物 2 在碱性条件下分子内成环得到化合物 3,化合物 3 经氯代反应得到化合物 4,化合物 4 与 1-甲基环丙醇在碱性条件下经取代反应得到化合物 5,化合物 5 与嘧啶-5-硼酸噁哪醇酯发生 Suzuki 偶联反应得到化合物 6,化合物 6 与 1-(1-Boc-4-哌啶基)-4-氨基吡啶取代反应,进一步脱除氨基保护基得到化合物 7(合成路线见图 2)。

化合物 7 与化合物 8 在碱性条件下取代得到目标化合物 I。与不同的醛或酮,发生还原胺化反应,得到化合物 9a ~ 9c,再与化合物 8 发生取代反应,得到目标化合物 II ~ IV,化合物 7 直接与化合物 10 发生还原胺化反应得到目标化合物 V、VI(合成路线见图 3)。

由商业可得原料 1-Boc-哌嗪(11)与 4-羟基环己酮发生还原胺化反应,得到化合物 12,在碱性条件下与甲磺酰氯反应得到化合物 13,化合物 13 与 4-硝基吡啶发生取代反应,得到化合物 14,化合物 14 经铁粉还原得到化合物 15,在酸性条件下与化合物 6 发生取代反应得到化合物 16,在酸性条件下脱氨基保护基,发生还原胺化反应,得到化合物 17,再经脱氨基保护基,发生取代反应得到目标化合物 VII(合成路线见图 4)。

由商业可得原料 4-硝基吡啶(18)与醇类化合物发生 Mitsunobu 反应,得到化合物 19,化合物 19 经二异丁基氢化铝(DIBAL-H)还原得到化合物 20,化合物 20 经还原胺化反应得到化合物 21,化合物 21 经铁粉还原得到化合物 22,化合物 22 与化合物 6 在酸性条件下发生取代反应得到化合物 23,化合物 23 在酸性条件下脱氨基保护基,与化合物 8 发生取代反应得到目标化合物 VIII(合成路线见图 5)。

由商业可得原料 1-Boc-4-(4-氨基苯基)哌嗪(24)与丙烯酸发生加成反应,再于尿素分子内成环,后在酸性条件下脱氨基保护基得到化合物 25,化合物 25 与化合物 20 发生还原胺化反应,得到化合物 26,化合物 26 经铁粉还原得到化合物 27,化

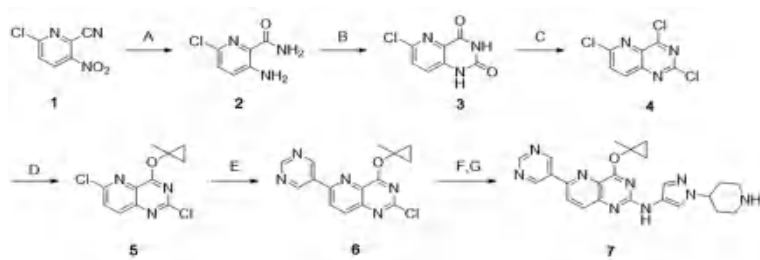


图2 化合物7的合成路线图

Fig 2 Synthesis route of compound 7

A. 氯化亚锡, 乙醇, 90 °C, 回流 (SnCl₂, EtOH, 90 °C, reflux); B. 三光气, 1, 4-二氧六环, 100 °C (BTC, 1, 4-dioxane, 100 °C); C. 三氯氧磷, *N,N*-二异丙基乙胺, 110 °C (POCl₃, DIPEA, 110 °C); D. 1-甲基环丙醇, 氢氧化钠, 四氢呋喃, 0 °C (1-methylcyclopropan-1-ol, NaH, THF, 0 °C); E. 嘧啶-5-硼酸嘧啶醇酯, 四(三苯基膦)钯, 磷酸二氢钾, 1, 4-二氧六环, 水, 60 °C [boronic ester, Pd(PPh₃)₄, KH₂PO₄, 1, 4-dioxane, water, 60 °C]; F. 对甲苯磺酸, 异丙醇, 85 °C (TsOH, iPrOH, 85 °C); G. 三氟乙酸, 二氯甲烷, 室温 (TFA, DCM, rt)

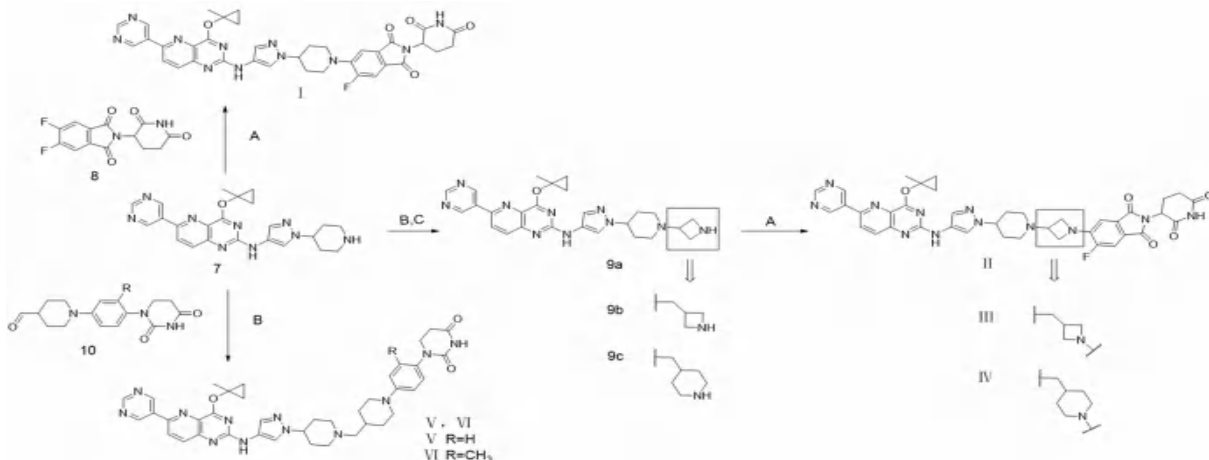


图3 目标化合物 I ~ VI 的合成路线图

Fig 3 Synthesis route of target compounds I ~ VI

A. 碳酸氢钠, *N,N*-二异丙基乙胺, 二甲亚砜, 80 °C (NaHCO₃, DIPEA, DMSO, 80 °C); B. 醋酸硼氢化钠, 醋酸, 1, 2-二氯乙烷, 50 °C [NaBH(OAc)₃, HOAc, DCE, 50 °C]; C. 三氟乙酸, 二氯甲烷, 室温 (TFA, DCM, rt)

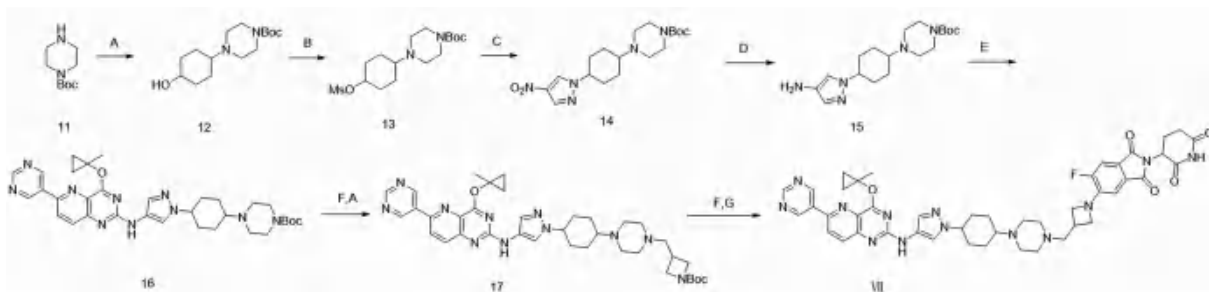


图4 目标化合物VII的合成路线图

Fig 4 Synthesis route of target compound VII

A. 醋酸硼氢化钠, 醋酸, 1, 2-二氯乙烷, 50 °C [NaBH(OAc)₃, HOAc, DCE, 50 °C]; B. 对甲苯磺酰氯, 二氯甲烷, 0 °C (MsCl, DCM, 0 °C); C. 碳酸铯, *N,N*-二甲基甲酰胺, 80 °C (Cs₂CO₃, DMF, 80 °C); D. 铁粉, 氯化铵, 乙醇, 水, 80 °C (Fe, NH₄Cl, EtOH, H₂O, 80 °C); E. 对甲苯磺酸, 异丙醇, 85 °C (TsOH, iPrOH, 85 °C); F. 三氟乙酸, 二氯甲烷, 室温 (TFA, DCM, rt); G. 碳酸氢钠, 二甲亚砜, 80 °C (NaHCO₃, DMSO, 80 °C)

合物 27 与化合物 6 发生取代反应得到目标化合物 IX (合成路线见图 6)。

2.2 化学合成

2.2.1 化合物 2 的合成

将 2-氰基-3-硝基-6-氯吡啶 (2.0 g, 10.9 mmol)、氯化亚锡 (10.0 g, 44.3

mmol) 溶于 20 mL 乙醇中, 并在 78 °C 下搅拌 2 h。反应完成后, 将溶液冷却至室温, 将乙醇蒸发至干。将残余物溶于乙酸乙酯 (50 mL) 中, 用 2 mol·L⁻¹ 氢氧化钠水溶液将混合物的 pH 调节至 8, 过滤并收集有机层, 水层用乙酸乙酯萃取。将有机

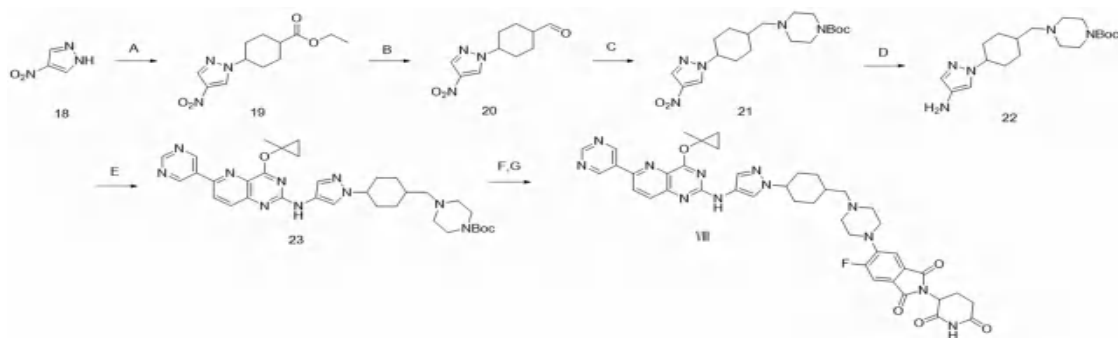


图 5 目标化合物VIII的合成路线图

Fig 5 Synthesis route of target compound VIII

A. 四(三苯基膦)钯, 偶氮二甲酸二异丙酯, 四氢呋喃, 0 °C [Pd(PPh₃)₄, DIAD, THF, 0 °C]; B. 二异丁基氢化铝, 四氢呋喃, 0 °C (DIBAL-H, THF, 0 °C); C. 醋酸硼氢化钠, 醋酸, 1, 2-二氯乙烷, 50 °C [NaBH(OAc)₃, HOAc, DCE, 50 °C]; D. 铁粉, 氯化铵, 乙醇, 水, 80 °C (Fe, NH₄Cl, EtOH, H₂O, 80 °C); E. 对甲苯磺酸, 异丙醇, 85 °C (TsOH, iPrOH, 85 °C); F. 三氟乙酸, 二氯甲烷, 室温 (TFA, DCM, rt); G. 碳酸氢钠, *N,N*-二异丙基乙胺, 二甲基亚砜, 80 °C (NaHCO₃, DIPEA, DMSO, 80 °C)

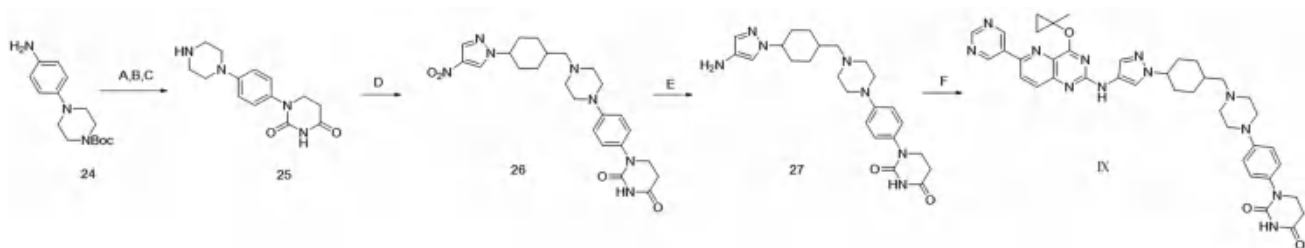


图 6 目标化合物IX的合成路线图

Fig 6 Synthesis route of target compound IX

A. 丙烯酸, 甲苯, 110 °C (acrylic acid, toluene, 110 °C); B. 尿素, 醋酸, 120 °C (urea, AcOH, 120 °C); C. 盐酸, 50 °C (HCl, 50 °C); D. 醋酸硼氢化钠, 醋酸, 1, 2-二氯乙烷, 60 °C [NaBH(OAc)₃, HOAc, DCE, 50 °C]; E. 铁粉, 氯化铵, 乙醇, 水, 80 °C (Fe, NH₄Cl, EtOH, H₂O, 80 °C); F. 对甲苯磺酸, 异丙醇, 85 °C (TsOH, iPrOH, 85 °C)

层合并, 并用饱和食盐水洗涤两次, 用无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩以获得黄色固体的化合物 2 (3.0 g, 收率 80%)。MS (ESI) m/z : 172.6 [M + H]⁺。

2.2.2 化合物 3 的合成 室温下化合物 2 (3.0 g, 17.48 mmol) 溶于 1, 4-二氧六环 (90 mL) 中, 加入三光气 (5.19 g, 17.48 mmol)。在氮气保护下, 将反应混合物在 100 °C 下加热 1.5 h。将反应混合物冷却至室温, 加水淬灭, 过滤收集固体。用乙酸乙酯洗涤固体, 得到化合物 3 (2.5 g, 收率 72%)。MS (ESI) m/z : 198.6 [M + H]⁺。

2.2.3 化合物 4 的合成 将化合物 3 (2.5 g, 12.65 mmol)、POCl₃ (20 mL) 和 DIPEA (4 mL) 的混合物加热回流过夜。在真空中除去 POCl₃, 并将残余物溶解在乙醚中。有机层用饱和食盐水洗涤五次。将有机层干燥并浓缩得到 1.2 g 粗产物, 直接用于下一步反应。

2.2.4 化合物 5 的合成 将化合物 4 (1.2 g, 5.12 mmol)、1-甲基环丙醇 (0.44 g, 6.142 mmol) 溶于四氢呋喃 20 mL 中, 冰浴至 0 °C, 分批加入 NaH (0.12 g, 5.118 mmol), 继续在 0 °C 下反应 30 min, 将反应液滴入水中, 搅拌 30 min 后,

过滤, 收集固体, 得到化合物 5 (1.0 g, 收率 72%)。MS (ESI) m/z : 270.1 [M + H]⁺。

2.2.5 化合物 6 的合成 将化合物 5 (1.0 g, 3.70 mmol)、嘧啶-5-硼酸嘧啶醇酯 (0.55 g, 4.44 mmol)、[1, 1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯 (0.27 g, 0.37 mmol)、碳酸钾 (1.02 g, 7.40 mmol) 溶于 1, 4-二氧六环 (20 mL) 和水 (5 mL) 的混合溶剂中, 置换氮气, 60 °C 反应过夜, 反应完成后, 用乙酸乙酯稀释, 过滤, 滤液用乙酸乙酯萃取, 饱和食盐水洗涤, 有机层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压蒸除溶剂, 剩余物经硅胶柱色谱纯化, 得到白色固体化合物 6 (0.75 g, 收率 64%)。MS (ESI) m/z : 314.3 [M + H]⁺。

2.2.6 化合物 7 的合成 将化合物 6 (500 mg, 1.59 mmol)、1-(1-Boc-4-哌啶基)-4-氨基吡唑 (509 mg, 1.91 mmol)、对甲苯磺酸 (274 mg, 1.59 mmol) 溶于异丙醇 (10 mL) 中, 80 °C 反应 6 h, 反应完成后减压蒸除溶剂, 用二氯甲烷 (10 mL) 溶解, 加入三氟乙酸 (2 mL), 室温下反应 2 h。完成后, 将反应混合物浓缩, 残余物通过硅胶柱色谱纯化, 得到黄色固体化合物 7 (360 mg, 收率

51%)。MS (ESI) m/z : 444.3 [M + H]⁺。

2.2.7 目标化合物 I 的合成 将化合物 **7** (100 mg, 0.23 mmol)、化合物 **8** (73 mg, 0.25 mmol)、碳酸氢钠 (105 mg, 1.25 mmol) 溶于二甲基亚砜 (5 mL) 中, 80 °C 下反应 6 h, 反应完成后, 冷却至室温, 加水稀释, 乙酸乙酯萃取, 有机层经饱和洗涤后, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压蒸除溶剂, 经硅胶柱色谱纯化后得到黄色固体目标化合物 I (收率 47%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.12 (s, 1H), 9.48 (s, 2H), 9.26 (s, 1H), 8.42 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.18 ~ 8.09 (m, 1H), 8.01 (d, $J = 42.8$ Hz, 1H), 7.75 (d, $J = 11.4$ Hz, 2H), 7.54 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 5.12 (dd, $J = 12.9, 5.3$ Hz, 1H), 4.44 (s, 1H), 3.14 (s, 2H), 2.96 ~ 2.80 (m, 1H), 2.57 (dd, $J = 21.5, 10.9$ Hz, 2H), 2.16 (s, 3H), 2.05 (dd, $J = 10.3, 4.9$ Hz, 2H), 1.80 (s, 3H), 1.29 ~ 1.05 (m, 4H), 0.96 ~ 0.78 (m, 2H); MS (ESI) m/z : 718.7 [M + H]⁺。

2.2.8 化合物 9 (以 9a 为例) 的合成 将化合物 **7** (100 mg, 0.23 mmol)、1-Boc-3-氮杂环丁酮 (42 mg, 0.25 mmol)、醋酸一滴, 溶于 1, 2-二氯乙烷 (20 mL) 中, 60 °C 下反应 1 h 后, 分批加入醋酸钠 (96 mg, 0.45 mmol)。50 °C 继续反应 3 h。反应完成后, 冷却至室温, 加入饱和碳酸氢钠水溶液淬灭, 二氯甲烷萃取, 有机层用饱和食盐水洗涤后, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 经硅胶柱色谱纯化后得到黄色固体。用二氯甲烷 (10 mL) 溶解, 加入三氟乙酸 (2 mL), 室温下反应 2 h。完成后, 将反应混合物浓缩, 以得到黄色固体化合物 **9a** (75 mg, 收率 65%)。MS (ESI) m/z : 499.3 [M + H]⁺。

2.2.9 目标化合物 II ~ IV 的合成 参照目标化合物 I 的合成方法, 以 **9a** 为原料制备得到黄色固体目标化合物 II, 收率 52%, ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.09 (s, 1H), 9.48 (s, 2H), 9.26 (s, 1H), 8.42 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 8.01 (d, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.64 (d, 1H), 6.96 (d, 1H), 5.07 (dd, $J = 12.7, 5.5$ Hz, 1H), 4.27 (s, 2H), 4.02 (s, 2H), 3.03 ~ 2.78 (m, 4H), 2.69 ~ 2.55 (m, 2H), 2.02 (d, $J = 14.2$ Hz, 6H), 1.80 (s, 3H), 1.48 (s, 1H), 1.24 (d, $J = 9.7$ Hz, 3H), 1.12 (s, 2H); MS (ESI) m/z : 773.7 [M + H]⁺。

参照目标化合物 I 的合成方法, 以 **9b** 为原料制备得到黄色固体目标化合物 III (收率 57%) ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.08 (s,

1H), 9.48 (s, 2H), 9.25 (s, 1H), 8.42 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.14 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.97 (d, $J = 28.1$ Hz, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.59 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 6.91 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 5.06 (dd, $J = 12.8, 5.4$ Hz, 1H), 4.28 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 4.18 ~ 4.09 (m, 1H), 3.85 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.17 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H), 3.06 ~ 2.79 (m, 4H), 2.66 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.60 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 2.56 (s, 1H), 2.16 (t, $J = 10.5$ Hz, 2H), 2.05 ~ 1.92 (m, 5H), 1.80 (s, 3H), 1.27 ~ 1.19 (m, 2H), 1.12 (s, 1H); MS (ESI) m/z : 787.7 [M + H]⁺。

参照目标化合物 I 的合成方法, 以 **9c** 为原料制备得到黄色固体目标化合物 IV (收率 62%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.11 (s, 1H), 9.48 (s, 2H), 9.26 (s, 1H), 8.42 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.99 (d, $J = 35.8$ Hz, 1H), 7.71 (d, $J = 11.4$ Hz, 2H), 7.45 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 5.10 (dd, $J = 12.8, 5.4$ Hz, 1H), 4.14 (s, 1H), 3.63 (d, $J = 11.5$ Hz, 2H), 2.89 (dd, $J = 21.9, 10.1$ Hz, 4H), 2.65 ~ 2.54 (m, 2H), 2.24 (s, 2H), 2.04 (dd, $J = 14.4, 9.1$ Hz, 6H), 1.85 (d, $J = 12.7$ Hz, 2H), 1.80 (s, 3H), 1.48 (s, 1H), 1.36 ~ 1.27 (m, 2H), 1.23 (s, 3H), 1.12 (s, 1H), 0.90 ~ 0.81 (m, 2H); MS (ESI) m/z : 815.8 [M + H]⁺。

2.2.10 目标化合物 V、VI 的合成 参照目标化合物 **9** 的合成方法, 以化合物 **7**、化合物 **10a** 为原料得到黄色固体目标化合物 V (收率 54%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.26 (s, 1H), 9.49 (s, 2H), 9.26 (s, 1H), 8.42 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 8.27 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H), 8.13 (s, 1H), 8.09 ~ 8.03 (m, 1H), 7.73 (d, $J = 13.4$ Hz, 1H), 7.13 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 6.93 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 3.68 (dd, $J = 17.2, 10.5$ Hz, 4H), 3.05 ~ 2.91 (m, 2H), 2.68 (dd, $J = 8.4, 4.8$ Hz, 4H), 2.28 (ddd, $J = 40.9, 18.5, 8.2$ Hz, 4H), 2.09 ~ 1.90 (m, 6H), 1.80 (s, 3H), 1.55 ~ 1.41 (m, 2H), 1.33 (dt, $J = 22.4, 9.5$ Hz, 4H), 1.12 (s, 2H); MS (ESI) m/z : 729.7 [M + H]⁺。

采用同样的方法以 **10b** 为原料, 得到黄色固体目标化合物 VI (收率 35%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 10.26 (s, 1H), 9.49 (s, 2H), 9.27 (s, 1H), 8.44 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 8.03 ~ 7.91

(m, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.09 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.89 (s, 1H), 6.85 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 3.80 ~ 3.63 (m, 6H), 3.46 (dt, $J = 12.2, 6.0$ Hz, 2H), 3.20 ~ 3.04 (m, 4H), 2.83 ~ 2.62 (m, 4H), 2.30 (d, $J = 18.3$ Hz, 4H), 2.13 (s, 3H), 2.00 (dd, $J = 14.7, 7.0$ Hz, 2H), 1.87 (d, $J = 11.5$ Hz, 2H), 1.81 (s, 3H), 1.41 ~ 1.31 (m, 2H), 1.17 ~ 1.08 (m, 2H); MS (ESI) m/z : 743.7 [M + H]⁺.

2.2.11 化合物 12 的合成 参照目标化合物 I 的合成方法, 以化合物 11, 4-羟基环己酮为原料制备得到白色油状化合物 12 (6.8 g, 收率 89%)。MS (ESI) m/z : 285.2 [M + H]⁺.

2.2.12 化合物 13 的合成 将化合物 12 (6.8 g, 23.91 mmol) 溶于二氯甲烷 (50 mL) 中, 冰浴至 0 °C, 缓慢滴加甲磺酰氯 (3.3 g, 28.70 mmol), 室温下反应 2 h, 反应完成后, 浓缩, 得到 7.0 g 白色油状化合物 13, 直接用于下一步反应。

2.2.13 化合物 14 的合成 将化合物 13 (7.0 g, 19.31 mmol)、4-硝基吡唑 (2.2 g, 19.31 mmol)、碳酸铯 (12.6 g, 38.62 mmol) 溶于 *N, N*-二甲基甲酰胺 (50 mL) 中, 在 80 °C 下反应 12 h。反应完成后, 加水稀释, 乙酸乙酯萃取, 有机层经饱和食盐水洗涤后, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压蒸除溶剂, 经硅胶柱色谱纯化后得到白色油状化合物 14 (4.5 g, 收率 61%)。MS (ESI) m/z : 380.3 [M + H]⁺.

2.2.14 化合物 15 的合成 将化合物 14 (4.5 g, 11.86 mmol)、氯化铵 (3.2 g, 59.30 mmol)、铁粉 (3.3 g, 59.30 mmol)、溶于乙醇和水的混合溶剂中 (60 mL : 20 mL), 80 °C 反应 4 h, 反应完全后, 经硅藻土过滤, 乙酸乙酯萃取, 无水硫酸钠干燥, 浓缩, 经硅胶柱色谱纯化后得到白色油状化合物 15 (3.6 g, 收率 86%)。MS (ESI) m/z : 350.5 [M + H]⁺.

2.2.15 化合物 16 的合成 将化合物 6 (100 mg, 0.28 mmol)、化合物 14 (90 mg, 0.28 mmol)、对甲苯磺酸 (76 mg, 0.28 mmol) 溶于异丙醇 (5 mL) 中, 60 °C 反应 6 h, 反应完成后减压蒸除溶剂, 用二氯甲烷 (10 mL) 溶解, 加入三氟乙酸 (2 mL), 室温下反应 2 h。完成后, 将反应混合物在真空中浓缩, 得到残余物, 经硅胶柱色谱纯化, 得到黄色固体化合物 16 (70 mg, 收率 46%)。MS (ESI) m/z : 627.4 [M + H]⁺.

2.2.16 目标化合物 VII 的合成 参照化合物 II 的合成, 得黄色固体 VII (收率 45%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.09 (s, 1H), 9.48 (s, 2H), 9.26 (s, 1H), 8.42 (d, $J = 8.6$

Hz, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.13 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.59 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 6.90 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 5.06 (dd, $J = 12.8, 5.4$ Hz, 1H), 4.65 (s, 1H), 4.26 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 4.10 (t, 1H), 3.82 (t, 2H), 3.04 ~ 2.90 (m, 2H), 2.89 ~ 2.81 (m, 1H), 2.58 (d, $J = 17.5$ Hz, 4H), 2.43 ~ 2.30 (m, 4H), 2.09 (d, $J = 17.0$ Hz, 2H), 2.05 ~ 1.87 (m, 5H), 1.80 (s, 3H), 1.50 ~ 1.39 (m, 3H), 1.36 ~ 1.31 (m, 2H), 1.30 ~ 1.24 (m, 2H), 1.11 (s, 2H)。MS (ESI) m/z : 870.7 [M + H]⁺.

2.2.17 化合物 19 的合成 将化合物 18 (1 g, 8.84 mmol), 4-羟基环己烷-1-甲酸乙酯 (1.5 g, 8.84 mmol), 四(三苯基膦)钨 (0.20 g, 1.77 mmol), 溶于无水四氢呋喃 (10 mL) 中, 置换氮气, 冰浴至 0 °C, 缓慢滴加 DIAD (3.57 g, 17.68 mmol), 反应 2 h, 反应完成后, 加水, 用乙酸乙酯萃取, 收集有机相, 无水硫酸钠干燥, 浓缩, 通过硅胶色谱柱纯化得到白色油状化合物 19 (1.5 g, 收率 63%)。MS (ESI) m/z : 268.3 [M + H]⁺.

2.2.18 化合物 20 的合成 将化合物 19 (1.5 g, 5.61 mmol), 溶于无水四氢呋喃 (15 mL), 冰浴至 0 °C, 滴加 DIBAL-H (0.80 g, 5.61 mmol), 反应 1 h, 反应完成后用饱和氯化铵溶液淬灭, 乙酸乙酯萃取, 收集有机相, 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 浓缩, 得到白色固体化合物 20。MS (ESI) m/z : 224.4 [M + H]⁺.

2.2.19 化合物 21 ~ 23 的合成 参照化合物 V 的合成方法, 得到白色固体化合物 21。MS (ESI) m/z : 394.5 [M + H]⁺。参照化合物 15 的合成方法, 得到白色固体化合物 22。MS (ESI) m/z : 364.5 [M + H]⁺。参照化合物 16 的合成方法, 得到黄色固体化合物 23。MS (ESI) m/z : 641.6 [M + H]⁺.

2.2.20 目标化合物 VIII 的合成 参照化合物 II 的合成方法, 得到黄色固体化合物 VIII (收率 61%)¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 11.12 (s, 1H), 9.48 (s, 2H), 9.26 (s, 1H), 8.42 (d, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.83 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.62 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 5.13 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.17 (s, 2H), 3.67 (s, 6H), 3.31 (d, $J = 42.5$ Hz, 6H), 3.13 (s, 2H), 2.88 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H), 2.65 ~ 2.56 (m, 1H), 2.17 ~ 1.91 (m, 6H), 1.80 (s, 3H), 1.66 ~ 1.39 (m, 2H), 1.12 (s, 2H); MS (ESI) m/z : 815.7 [M + H]⁺.

2.2.21 化合物 25 的合成 将化合物 24 (1 g, 3.61 mmol), 与丙烯酸 (0.26 g, 3.61 mmol) 溶于甲苯 (10 mL) 中, 110 °C 反应 18 h, 冷却至室温, 浓缩除去溶剂, 溶于醋酸 (10 mL), 加入尿素 (0.26 g, 4.33 mmol), 120 °C 反应 12 h, 反应完成后, 浓缩除去溶剂, 加入 4 mol · L⁻¹ 盐酸 (10 mL), 50 °C 反应 12 h, 反应完成后, 浓缩除去溶剂得到棕色固体化合物 25 粗品 320 mg。MS (ESI) *m/z*: 275.7 [M + H]⁺。

2.2.22 化合物 26 ~ 27 的合成 参照化合物 12 的合成, 得到棕色固体化合物 26。MS (ESI) *m/z*: 481.3 [M + H]⁺。参照化合物 15 的合成, 得到白色固体化合物 27。MS (ESI) *m/z*: 451.5 [M + H]⁺。

2.2.23 化合物 IX 的合成 参照化合物 16 的合成, 得到黄色固体目标化合物 IX (收率 55%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 10.33 ~ 10.26 (s, 1H), 9.49 (s, 2H), 9.27 (s, 1H), 8.43 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.29 (d, *J* = 18.8 Hz, 1H), 8.10 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.22 (dd, *J* = 9.0, 2.3 Hz, 2H), 7.03 (dd, *J* = 9.0, 3.2 Hz, 2H), 4.34 ~ 4.07 (m, 2H), 3.83 (d, *J* = 12.3 Hz, 2H), 3.75 ~ 3.68 (m, 4H), 3.29 ~ 3.01 (m, 7H), 2.69 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.11 (d, *J* = 11.3 Hz, 3H), 1.99 (dd, *J* = 22.3, 8.6 Hz, 3H), 1.80 (s, 3H), 1.77 ~ 1.67 (m, 1H), 1.52 (dd, *J* = 34.8, 27.8 Hz, 2H), 1.12 (s, 2H); MS (ESI) *m/z*: 729.9 [M + H]⁺。

2.3 体外抗肿瘤活性评价

2.3.1 抗肿瘤细胞增殖活性评价 采用 MTS 法测定化合物对大 B 细胞淋巴瘤细胞 OCI-LY10 的增殖抑制活性。具体操作如下: 分别设置空白组和给药组, 根据细胞生长速率, 将大 B 细胞淋巴瘤细胞 OCI-LY10 以 2 × 10⁴ 个 / 孔接种于 96 孔培养板中, 每孔 90 μL, 给药组加入用完全培养基稀释不同浓度的待测化合物 10 μL (采用 10 μmol · L⁻¹ 起, 5 倍稀释成 8 个浓度) 至终体积为 100 μL; 加药后在 37 °C、5%CO₂ 条件下培养 72 h 后, 向每孔中加入 MTS 试剂 20 μL, 37 °C 下孵育 0.5 ~ 1 h, 混匀后用酶标仪测定 490 nm 和 690 nm 处的 OD 值。按下式计算被测物对肿瘤细胞作用后的活性百分数。用 OD₁ 表示含细胞的给药孔的吸光度值 (OD₄₉₀ - OD₆₉₀), OD₂ 表示含细胞的 DMSO 孔的吸光度值 (OD₄₉₀ - OD₆₉₀), OD₃ 表示纯培养基的吸光度值 (OD₄₉₀ - OD₆₉₀)。

化合物作用后细胞活率计算公式:

$$\text{活性百分数 (\%)} = (OD_1 - OD_3) / (OD_2 - OD_3) \times 100\%$$

以浓度的对数值对活性百分数作图, 采用非线性回归算出拟合曲线, 利用 GraphPad Prism 8 软件 log (inhibitor) vs normalized response—Variable slope 参数设置计算得到 IC₅₀ 值 (结果见表 1)。

2.3.2 细胞内 IRAK4 降解作用评价 将目标化合物进行降解实验, 步骤如下: 取对数生长期大 B 细胞淋巴瘤细胞 OCI-LY10, 以 7 × 10⁶ 个 / 孔接种于 12 孔板中, 每孔 900 μL, 加入用完全培养基稀释的不同浓度待测化合物 100 μL (1000、100、10 和 1 nmol · L⁻¹) 至终体积为 1 mL, 以 0.1% DMSO 为空白对照组, 培养 24 h 后收集细胞至 2 mL EP 管中 (4 °C、12 000 r · min⁻¹ 离心 5 min), 加入 1 × Loading buffer 冰上裂解 45 min 后, 金属浴 95 °C 煮 17 min。样品冷却后进行 SDS-PAGE 电泳, 转至硝酸纤维素膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1.5 h, 加入 IRAK4 和 β-Actin 一抗 (1 : 1000) 4 °C 孵育过夜, 清洗 10 min × 3 次后加入相应二抗 (1 : 10 000) 室温孵育 1 h, 清洗 10 min × 3 次后加入 ECL 显影液, 置于凝胶成像仪进行曝光。结果见图 7。通过 Image J 软件对蛋白降解条带进行灰度分析、GraphPad Prism 软件进行数据处理, 得到 DC₅₀ 值。

结果发现部分化合物对细胞的增殖具有一定的抑制活性 (见表 1)。其中, 化合物 III、VII、VIII、IX, 在大 B 细胞淋巴瘤细胞 OCI-LY10 内有明确的降解作用, DC₅₀ 值在 10 nmol · L⁻¹ 以下。

表 1 目标化合物在 OCI-LY10 上的抗肿瘤活性及 IRAK4 降解活性
Tab 1 Antitumor activity and IRAK4 degradation activity of the target compounds in OCI-LY10

化合物	IC ₅₀ / (nmol · L ⁻¹)	DC ₅₀ / (nmol · L ⁻¹)	化合物	IC ₅₀ / (nmol · L ⁻¹)	DC ₅₀ / (nmol · L ⁻¹)
I	9897	> 1000	VI	245	> 1000
II	> 10 000	10 ~ 100	VII	238	1 ~ 10
III	1819	1 ~ 10	VIII	6034	1 ~ 10
IV	4303	10 ~ 100	IX	826	1 ~ 10
V	280	> 1000			

3 讨论

本文基于 PRORAC 技术, 合成了 9 个新型 IRAK4 降解剂分子, 其结构均经 MS 谱和 ¹H NMR 谱确证。细胞内降解活性测试表明, 降解强度与 Linker 的长短、种类以及 E3 连接酶配体的选择有关。Linker 短的化合物, 如化合物 I, 将 IRAK4 蛋白配体直接与 E3 连接酶配体相连接, 降解作用弱, DC₅₀ 值在 1000 nmol · L⁻¹ 以上; 在 Linker 部分引入氮杂环丁烷和亚甲基哌啶 (化合物 II 和 IV), 其降解活性得到明显提升,

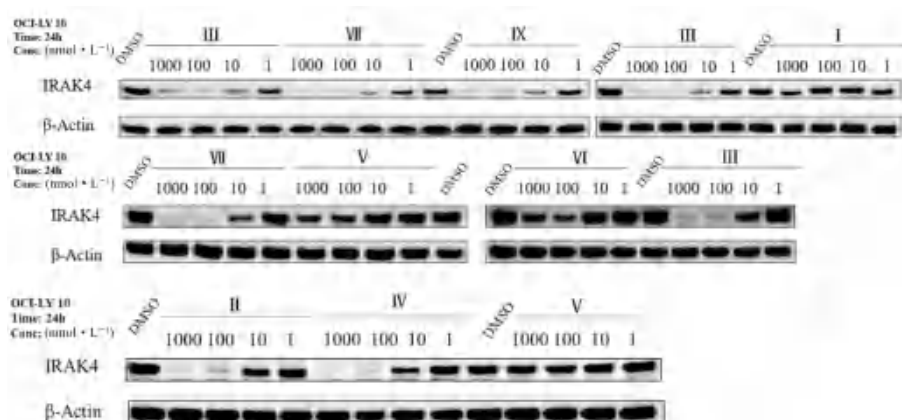


图 7 目标化合物对 IRAK4 的降解

Fig 7 Degradation of IRAK4 by target compounds

DC_{50} 值在 $10 \sim 100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; Linker 保持不变, 如果改变 E3 连接酶配体, 会改变分子的降解能力, 例如将化合物 IV 的结构中 E3 部分的邻苯二甲酰亚胺简化为苯胺 (化合物 V 和 VI), 降解作用明显变弱, DC_{50} 值在 $1000 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上; 考虑到化合物 IV 的结构中, 哌啶与苯环上的 F 存在位阻效应, 该位阻效应影响 E3 部分的自由旋转, 可能增加了三聚体形成的难度, 将哌啶换为氮杂环丁烷 (化合物 III) 之后, 降解作用明显变强, DC_{50} 值在 $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下; 考虑到化合物 IV 的结构中与吡唑相连的哌啶氮原子可能因为与 IRAK4 蛋白形成的氢键作用, 影响三聚体的形成, 作者将该哌啶环变为环己烷得到化合物 VIII, 降解活性得到明显提升, DC_{50} 值在 $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下; 在化合物 VIII 的基础上将邻苯二甲酰亚胺简化为苯胺 (化合物 IX), 其降解效应未受明显影响; 进一步将化合物 VIII 中 Linker 增长得到化合物 VII, 化合物的降解效应未受明显影响。综上所述, 选取合适的 Linker 与 E3 连接酶配体, 对实现 IRAK4 的选择性降解极为重要。本研究可为应用 PROTAC 技术进行靶向降解 IRAK4 蛋白, 进一步设计合成活性更高的靶向分子提供参考。

参考文献

- Chaudhary D, Robinson S, Romero DL, et al. Recent advances in the discovery of small molecule inhibitors of interleukin-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4) as a therapeutic target for inflammation and oncology disorders [J]. *J Med Chem*, 2015, 58 (1): 96-110.
- Otto G. IRAK4 inhibitor attenuates inflammation [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2021, 17 (11): 646.
- Sallman DA, List A. The central role of inflammatory signaling in the pathogenesis of myelodysplastic syndromes [J]. *Blood*, 2019, 133: 1039-1048.

- Barreyro L, Chlon TM, Starczynowski DT, et al. Chronic immune response dysregulation in MDS pathogenesis [J]. *Blood*, 2018, 132: 1553-1560.
- Ratajczak MZ, Bujko K, Cymer M, et al. The Nlrp3 inflammasome as a rising star in studies of normal and malignant hematopoiesis [J]. *Leukemia*, 2020, 34: 1512-1523.
- Brzezinska AA, Johnson JL, Munafo DB, et al. Signaling mechanisms for Toll-like receptor-activated neutrophil exocytosis: key roles for interleukin-1-receptor-associated kinase-4 and phosphatidylinositol 3-kinase but not Toll/IL-1 receptor (TIR) domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) [J]. *Immunology*, 2009, 127 (3): 386-397.
- Smith GF, Altman MD, Andresen B, et al. Identification of quinazoline based inhibitors of IRAK4 for the treatment of inflammation [J]. *Bioorg Med Chem*, 2017, 27 (12): 2721-2726.
- Lye E, Dhanji S, Calzascia T, et al. IRAK-4 kinase activity is required for IRAK-4-dependent innate and adaptive immune responses [J]. *Eur J Immunol*, 2008, 38: 870-876.
- Koziczak-Holbro M, Littlewood-Evans A, Pöllinger B, et al. The critical role of kinase activity of interleukin-1 receptor-associated kinase 4 in animal models of joint inflammation [J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60: 1661-1671.
- Hjortorn K, Hagberg N, Israelsson E, et al. Cytokine production by activated plasmacytoid dendritic cells and natural killer cells is suppressed by an IRAK4 inhibitor [J]. *Arthritis Res Ther*, 2018, 20: 238-249.
- Wang H, Zhou H, Zhang QR, et al. Inhibition of IRAK4 kinase activity improves ethanol-induced liver injury in mice [J]. *J Hepatol*, 2020, 73: 1470-1481.
- Nunes J, McGonagle GA, Eden J, et al. Targeting IRAK4 for Degradation with PROTACs [J]. *ACS Medicinal Chem Lett*, 2019, 10 (7): 1081-1085.
- Kargbo RB. PROTAC degradation of IRAK4 for the treatment of cancer [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2019, 30 (10): 1370-1371.
- Degorce SL, Aagaard A, Anjum R, et al. Improving metabolic stability and removing aldehyde oxidase liability in a 5-azaquinazoline series of IRAK4 inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem*, 2020, 28 (23): 115815.

(收稿日期: 2024-01-09; 修回日期: 2024-02-27)

新型大环 Bcl-2 抑制剂的设计合成及生物活性评价

查永骏^{1, 2}, 杨灿², 白海云^{2, 3*}, 钟利^{1, 2, 3*} (1. 江西中医药大学药学院, 南昌 330004; 2. 长三角药物高等研究院, 江苏 南通 226100; 3. 百极弘焯(南通)医药科技有限公司, 江苏 南通 226100)

摘要: **目的** 为克服 Bcl-2 的基因突变引起的耐药问题, 设计并合成一系列新型 Bcl-2 抑制剂, 并分别评价其对 Bcl-2 以及 G101V、D103Y 两种突变的抑制活性, 探讨初步构效关系。**方法** 通过大环化设计, 合成了一系列新型 Bcl-2 抑制剂, 并通过 ¹H NMR 和 ESI-MS 进行结构确证。采用时间分辨荧光共振能量转移技术 (TR-FRET) 和 MTS 法测定化合物对激酶和肿瘤细胞的抑制活性。**结果** 合成了 1 个阳性化合物和 9 个新型大环 Bcl-2 抑制剂。抑酶活性结果表明化合物 **28c**、**28d**、**28e**、**28f** 具有较强的抑制 Bcl-2 以及 G101V、D103Y 两种突变激酶的活性。**结论** 合成的新型大环 Bcl-2 抑制剂中部分化合物 (**28c**、**28e**、**28g** 和 **28i**) 对肿瘤细胞的增殖具有一定的抑制活性。

关键词: Bcl-2 抑制剂; 细胞凋亡; 抗肿瘤; 合成

中图分类号: R914

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)06-1528-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.020

Evaluation of design, synthesis and biological activities novel macrocyclic Bcl-2 inhibitors

ZHA Yong-jun^{1, 2}, YANG Can², BAI Hai-yun^{2, 3*}, ZHONG Li^{1, 2, 3*} (1. School of Pharmacy, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004; 2. Yangtze Delta Advanced Drug Research Institute, Nantong Jiangsu 226100; 3. Biopolar Hongye (Nantong) Pharmaceutical Co., Ltd., Nantong Jiangsu 226100)

Abstract: Objective To solve the drug resistance problem caused by Bcl-2 mutations, to design and synthesize a series of novel Bcl-2 inhibitors, and evaluate their inhibitory activities against Bcl-2 and the two mutations of G101V and D103Y to determine the preliminary conformational relationship. **Methods** A series of novel Bcl-2 inhibitors were synthesized by macrocyclization design and structurally confirmed by ¹H NMR and ESI-MS. The inhibitory activities of the compounds on kinases and tumor cells were determined with time-resolved fluorescence resonance energy transfer technique (TR-FRET) and MTS. **Results** One positive compound and nine novel macrocyclic Bcl-2 inhibitors were synthesized. Compounds **28c**, **28d**, **28e**, and **28f** possessed strong kinase inhibitory activity against Bcl-2, G101V and D103Y mutations. **Conclusion** Some compounds (**28c**, **28e**, **28g** and **28i**) in the synthesized novel macrocyclic Bcl-2 inhibitors have certain inhibitory activities on the proliferation of tumor cells.

Key words: Bcl-2 inhibitor; apoptosis; antitumor; synthesis

细胞凋亡能够主动清除不需要或异常的细胞, 在胚胎发育、维持内环境稳态以及抵抗病原体等正常生理进程中起到了重要的作用, 是多细胞有机体重要的自稳机制^[1]。该机制的紊乱会诱发各种疾病, 如癌症、自身免疫性疾病、心血管疾病及神经退行性疾病等^[2]。

正常机体细胞凋亡受基因严格调控, 主要有两大途径: 线粒体介导 Bcl-2 蛋白家族调控的内源性凋亡途径和死亡受体 Fas 与其配体 FasL 介导的外源性凋亡途径^[3-4]。Bcl-2 家族蛋白是线粒体凋亡通路的关键调控因子, 它与促凋亡蛋白直接结合可抑制细胞凋亡, 是多种血液恶性肿瘤的发

作者简介: 查永骏, 男, 硕士研究生, 主要从事药物化学研究, email: 1187514492@qq.com *通信作者: 白海云, 男, 硕士研究生导师, 主要从事药物化学研究, email: hybai@bio-polar.com; 钟利, 女, 正高级研究员, 硕士研究生导师, 主要从事小分子抗肿瘤药物研发, email: lzhong@bio-polar.com

病机制之一, 研究表明放化疗药物多是通过诱导细胞凋亡作用实现肿瘤的治疗^[5-6]。恶性肿瘤细胞通常表现为细胞凋亡失调, 其原因与抗凋亡蛋白过度表达密切相关。应用抗凋亡蛋白抑制剂, 可以调控促凋亡蛋白与抗凋亡蛋白之间的平衡, 恢复肿瘤细胞内的正常凋亡功能^[7-8]。因此抗凋亡蛋白 Bcl-2 已成为肿瘤治疗领域新兴的药物靶标。

目前仅有 1 个 Bcl-2 靶点抑制剂获批上市, 多个化合物处于临床研究阶段 (见图 1)。ABT-199 是艾伯维开发的首个 Bcl-2 靶点抑制剂, 于 2016 年被美国 FDA 批准上市用于治疗染色体 17p 缺失引起的慢性淋巴细胞性白血病^[9]。APG-2575 是亚盛医药自主研发的新型口服 Bcl-2 选择性抑制剂, 通过选择性抑制 Bcl-2 蛋白, 恢复肿瘤细

胞的正常凋亡过程, 从而达到治疗肿瘤的目的, APG-2575 在多种血液肿瘤和实体瘤治疗领域具备广阔的单药和联合治疗潜力^[10]。BGB-11417 是百济神州自主研发的一种新型的强效、高选择性 Bcl-2 抑制剂, 在血液肿瘤模型中展现出了抗肿瘤活性, 初步临床数据十分惊艳, 有望实现更深层次的靶标抑制和临床缓解^[11]。然而随着 Bcl-2 抑制剂 ABT-199 临床使用日益增多及用药时间的延长, 肿瘤细胞对 ABT-199 的敏感性逐渐降低以至于产生了耐药^[12], Bcl-2 的基因出现 G101V 突变和 D103Y 突变, 在基于细胞的测定中, 该突变使 Bcl-2 对 ABT-199 的结合亲和力显著降低^[13-15], 因此亟需发现更多的药物, 以解决耐药问题。

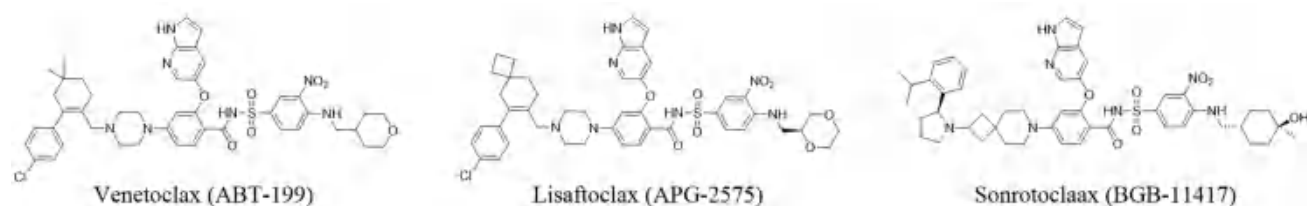


图 1 ABT-199、APG-2575、BGB-11417 结构式

Fig 1 Structures of venetoclax, lisoftoclax and sonrotoclax

近年来研究发现大环化合物不仅能够改善药物的活性, 还能作用于一些难以成药的药物靶标, 具有许多特殊的理化和生物学性质, 在一定程度上突破了熟知的类药五规则^[16]。目前已有多种通过合理药物设计得到的大环类药物获批上市, 如丹诺瑞韦 (danoprevir, 2018 年在中国上市)、劳拉替尼 (lorlatinib, 2018 年在美国上市)、帕瑞替尼 (pacritinib, 2022 年在美国上市) 等^[17-19]。因此, 将大环化技术应用于药物设计是

本课题组前期以上市药物 ABT-199 为先导化合物, 通过查阅相关文献以及专利, 发现目前并没有大环结构的 Bcl-2 靶点抑制剂^[20-24], 选取百济神州有限公司专利中 155 分子为基础进行大环化设计^[20], 首先保留其骨架结构不变, 将氮杂吡啶上的氟原子变换成与其原子半径相近的氢原子, 从而得到阳性化合物 20, 保留化合物 20 的四四螺环侧链结构不变, 将右侧部分大环化, 在大环苯环上引入不同的取代基 R, 从而得到一系列新型的大环结构化合物 (见图 2)。

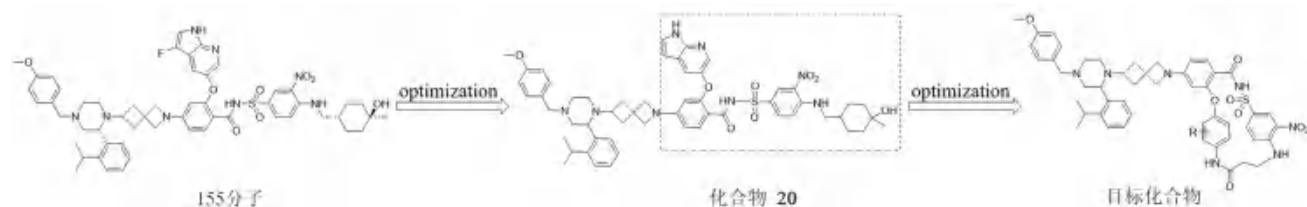


图 2 目标化合物的设计思路

Fig 2 Design idea of target compounds

1 仪器与试药

FA1204 C-SCS 型电子天平 (上海精科天美科学仪器有限公司); 85-2A 型磁力搅拌器 (上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司); RV8 旋转蒸发器 (艾卡仪器设备有限公司); Bruker Avance NEO 400 MHz 型核磁共振仪 [DMSO-*d*₆ 为溶剂, 四甲基硅烷 (TMS) 为内标, 瑞士 Bruker 公司]; Agilent 1260 Infinity II

液相色谱-质谱联用仪 (安捷伦科技有限公司); 细胞培养箱、超低温冰箱 (赛默飞世尔科技有限公司); 荧光倒置显微镜 (德国 Leica 公司); 多功能酶标仪 (PerkinElmer); MTS 细胞增殖检测试剂盒 (美国 Promega 公司); 柱层析硅胶 (100 ~ 200) 和薄层层析硅胶板 (青岛海浪硅胶干燥剂有限公司); 所用试剂均为市售分析纯或化学纯; Bcl-2 蛋白、

Bcl-2 (G101V) 蛋白、Bcl-2 (D103Y) 蛋白、RS4; 11 (Bcl-2) 细胞、RS4; 11 (Bcl-2-G101V) 细胞 [百极弘焯(南通)医药科技有限公司药理学实验室]。

2 方法与结果

2.1 目标化合物的合成路线

2.1.1 中间体 3, 7 和 16 的合成 如图 3 所示合成路线, 以 4-氟-3-硝基苯磺酰胺 (**1**) 为原料, 与 3-氨基丙酸甲酯 (**2**) 进行取代反应得到中间体 **3**; 以 [(4-氧代环己基) 甲基] 氨基甲酸叔丁酯 (**4**) 为原料与格氏试剂甲基溴化镁进行加成反应得到 **5**, **5** 经三氟乙酸脱掉 Boc 保护基得到 **6**, **6** 与 4-氟-3-硝基苯磺酰胺 (**1**) 进行取代反应得到中间体 **7**; 以 2-异丙基苯硼酸 (**8**) 为原料, 与 2-氯吡嗪 (**9**) 进行 Suzuki 偶联得到 **10**, **10** 经还原反应得到 **11**, **11** 与对甲氧基苯甲醛 (**12**) 进行还原胺化得到 **13**, **13** 再与 6-氧代-2-氮杂螺 [3, 3]

庚烷-2-羧酸叔丁酯 (**14**) 进行还原胺化得到 **15**, **15** 通过甲酸脱 Boc 保护基得到中间体 **16**。

2.1.2 阳性化合物的合成 如图 4 所示合成路线, 以 2-[(1H-吡咯并 [2, 3-b] 吡啶-5-基) 氧基]-4-氟苯甲酸甲酯 (**17**) 为原料与中间体 **16** 进行取代得到 **18**, **18** 再经水解得到 **19**, **19** 与中间体 **7** 进行酸胺缩合得到阳性化合物 **20**。

2.1.3 目标化合物的合成 如图 5 所示合成路线, 以 4-氨基苯酚上不同位点的取代基化合物为原料与 4-溴-2-氟苯甲酸甲酯 (**22**) 进行取代、水解, 再与中间体 **3** 进行酸胺缩合, 缩合产物再水解, 然后进行分子内酸胺缩合反应, 得到一系列含溴的大环分子关键中间体, 大环分子关键中间体与中间体 **16** 进行 Buchwald 偶联反应得到化合物 **28a ~ 28i**。

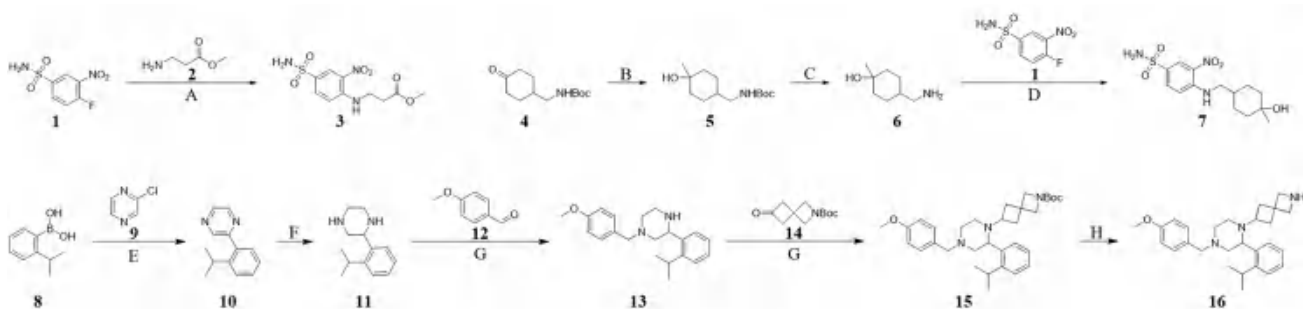


图 3 中间体的合成路线

Fig 3 Synthesis route of intermediates

A. *N, N*-二异丙基乙胺, 二氯甲烷, 室温 (DIPEA, DCM, rt); B. 甲基溴化镁, 四氢呋喃, -78°C (CH_3BrMg , THF, -78°C); C. 三氟乙酸, 二氯甲烷, 室温 (TFA, DCM, rt); D. 三乙胺, 四氢呋喃, 室温 (TEA, THF, rt); E. 四(三苯基膦)合钯, 碳酸钠, 1, 4-二氧六环, 80°C [$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, Na_2CO_3 , 1, 4-dioxane, 80°C]; F. 钯碳, 氢气, 甲醇, 室温 (Pd/C , H_2 , MeOH, rt); G. 三乙酰氧基硼氢化钠, 二氯乙烷, 室温 [$\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, DCE, rt]; H. 甲酸, 室温 (HCOOH , rt)

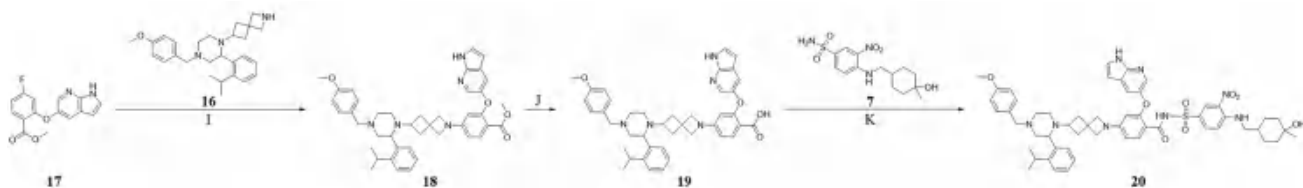


图 4 阳性化合物 (20) 的合成路线

Fig 4 Synthesis route of positive compound (20)

I. 碳酸钠, 乙腈, 100°C (Na_2CO_3 , ACN, 100°C); J. 氢氧化钠, 甲醇, 水, 80°C (NaOH , MeOH, H_2O , 80°C); K. 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐, 4-二甲氨基吡啶, 三乙胺, 二氯甲烷, 50°C (EDCI, DMAP, TEA, DCM, 50°C)

2.2 化学合成

2.2.1 化合物 3 的合成 将 4-氟-3-硝基苯磺酰胺 (**1**, 10.00 g, 45.45 mmol) 和 3-氨基丙酸甲酯盐酸 (**2**, 7.64 g, 54.54 mmol) 溶于 150 mL DCM 中, 室温搅拌条件下滴加 DIPEA (17.59 g, 136.35 mmol), 继续搅拌 16 h 至反应完全。浓缩除去 DCM, 用石油醚 (PE) 和乙酸乙酯 (EA) (体积比 5:1) 打浆纯化, 过滤得到的滤饼烘干后得到

黄色固体 (**3**) 11.5 g, 收率 83.5%, ESI-MS m/z : 304.3 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ 。

2.2.2 化合物 5 的合成 将 [(4-氧代环己基) 甲基] 氨基甲酸叔丁酯 (**4**, 2.00 g, 8.81 mmol) 溶于 40 mL 无水 THF 中, 进行氮气置换, 于 -78°C 搅拌 5 min, 滴加 35 mL 甲基溴化镁, 继续搅拌 2 h, 再缓慢升温至室温, 搅拌 16 h 至反应完全。用饱和氯化铵水溶液进行淬灭, 加入 EA 和水,

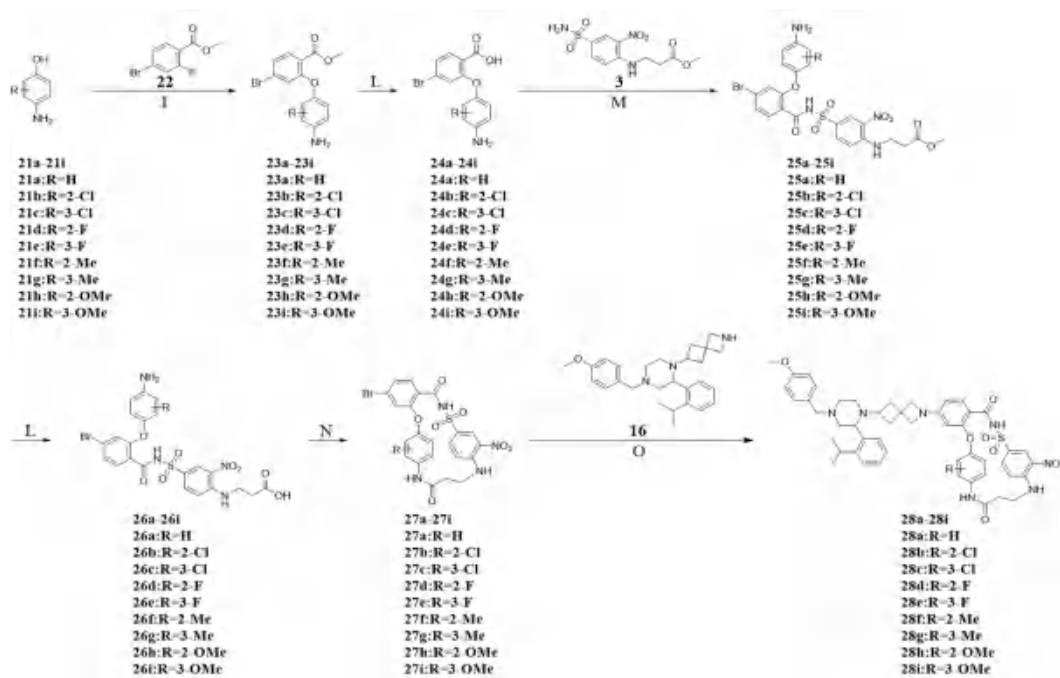


图 5 目标化合物的合成路线图

Fig 5 Synthesis route of target compounds

L. 水合氢氧化锂，水，四氢呋喃，60 °C (LiOH · H₂O, H₂O, THF, 60 °C); M. 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N, N, N', N'-四甲基脲六氟磷酸酯，4-二甲氨基吡啶，三乙胺，二氯甲烷，室温 (HATU, DMAP, TEA, DCM, rt); N. 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N, N, N', N'-四甲基脲六氟磷酸酯，N, N-二异丙基乙胺，二氯甲烷，N, N-二甲基甲酰胺，室温 (HATU, DIPEA, DCM, DMF, rt); O. 三二亚苄基丙酮二钯，碳酸铯，2-二环己基磷-2', 4', 6'-三异丙基联苯，1, 4-二氧六环，90 °C [Pd₂(dba)₃, Cs₂CO₃, X-PHOS, 1, 4-dioxane, 90 °C]

萃取分层，收集有机层，无水硫酸钠干燥，浓缩除去 EA，得到粗品，粗品经柱层析纯化得到黄色油状物 (5) 400 mg，收率 18.7%，ESI-MS *m/z*: 244.3[M + H]⁺。

2.2.3 化合物 6 的合成 将化合物 5 (400 mg, 1.65 mmol) 溶于 20 mL DCM 中，室温下缓慢滴加 2 mL TFA，室温反应 6 h 至反应完全。直接旋干溶剂，得到淡黄色油状物 (6) 320 mg，未进一步纯化，直接用于下一步反应，ESI-MS *m/z*: 144.3[M + H]⁺。

2.2.4 化合物 7 的合成 将化合物 6 (320 mg, 2.24 mmol) 与 4-氟-3-硝基苯磺酰胺 (1, 590 mg, 2.69 mmol) 溶于 15 mL THF 中，滴加 TEA (679 mg, 6.72 mmol)，室温搅拌 16 h 至反应完全。浓缩除去 THF，得到粗品，粗品经柱层析纯化得到黄色固体 (7) 500 mg，收率 65.1%，ESI-MS *m/z*: 344.4[M + H]⁺。

2.2.5 化合物 10 的合成 将 (2-异丙基苯基) 硼酸 (8, 20 g, 122.00 mmol) 和 2-氯吡嗪 (9, 12.5 g, 110.00 mmol) 加入 1, 4-dioxane 和 H₂O (100 mL : 10 mL) 中，室温条件下加入 Pd (PPh₃)₄ (7 g, 6.10 mmol), Na₂CO₃ (25.9 g, 244.00 mmol)，在氮气保护下 90 °C 搅拌 16 h 至反应完全。过滤除去不溶的固体，滤液用硅胶浓缩拌样，经柱层

析纯化，得到黄色油状物 (10) 22 g，收率 91.0%，ESI-MS *m/z*: 199.2[M + H]⁺。

2.2.6 化合物 11 的合成 将化合物 10 (22 g, 111.00 mmol) 溶于 200 mL MeOH 中，室温条件下加入钯碳 (30%, 6.6 g)，在氢气条件下室温搅拌 36 h 至反应完全。过滤除掉钯碳，浓缩除去溶剂，得到橙色油状物 (11) 22.6 g，未进一步纯化，直接用于下一步反应，ESI-MS *m/z*: 205.4[M + H]⁺。

2.2.7 化合物 13 的合成 将化合物 11 (22.6 g, 111.20 mmol) 和 4-甲氧基苯甲醛 (12, 16.6 g, 122.20 mmol) 溶于 100 mL DCE 中，室温下加入 NaBH (OAc)₃ (47.0 g, 222.40 mmol)，继续搅拌 1 h 至反应完全。浓缩除去 DCE，调节 pH 值 > 7，加入 EA 和水，萃取分层，收集有机层，无水硫酸钠干燥，浓缩 EA，得到粗品，粗品经柱层析纯化得到黄色油状物 (13) 10.8 g，收率 30.0%，ESI-MS *m/z*: 325.4[M + H]⁺。

2.2.8 化合物 15 的合成 将化合物 13 (10.8 g, 33.33 mmol) 和 6-氧代-2-氮杂螺环 [3, 3] 庚烷-2-羧酸叔丁酯 (14, 8.4 g, 40.00 mmol) 溶于 50 mL DCE 中，室温下加入 NaBH (OAc)₃ (14.1 g, 66.66 mmol)，60 °C 搅拌 16 h 至反应完全。浓缩除去 DCE，调节 pH 值 > 7，加入 EA 和水，萃取分层，收集有机层，无水硫酸钠干燥，浓缩 EA，得到粗

品, 粗品经柱层析纯化得到黄色油状物 (**15**) 12.9 g, 收率 74.6%, ESI-MS m/z : 520.5[M + H]⁺。

2.2.9 化合物 16 的合成 将化合物 **15** (12.9 g, 24.86 mmol) 加入 10 mL 甲酸中, 室温搅拌 16 h 至反应完全。调节 pH 值 > 7, 加入 EA 和水, 萃取分层, 收集有机层, 无水硫酸钠干燥, 浓缩 EA, 得到粗品, 粗品经反相色谱柱层析纯化, 冻干后得到类白色固体 (**16**) 10.0 g, 收率 96.0%, ESI-MS m/z : 420.5[M + H]⁺。

2.2.10 化合物 18 的合成 将 2-((1H-吡咯并 [2, 3-b] 吡啶 -5-基) 氧基) -4-氟苯甲酸甲酯 (**17**, 100 mg, 0.35 mmol) 和化合物 **16** (293 mg, 0.70 mmol), Na₂CO₃ (218.4 mg, 2.10 mmol) 溶于 10 mL ACN 中, 100 °C 搅拌 24 h 至反应完全。浓缩除去 ACN, 加入 EA 和水, 萃取分层, 收集有机层, 无水硫酸钠干燥, 浓缩 EA, 得到粗品, 粗品经柱层析纯化得到白色固状物 (**18**) 80.0 mg, 收率 34.3%, ESI-MS m/z : 686.3[M + H]⁺。

2.2.11 化合物 19 的合成 将化合物 **18** (80.0 mg, 0.12 mmol) 加入 10 mL MeOH 和 2 mL H₂O 中, 再缓慢加入 NaOH (9.6 mg, 0.24 mmol), 80 °C 搅拌 5 h 至反应完全。旋掉 MeOH, 调节 pH 值 < 7, 加入 EA 和水, 萃取分层, 收集有机层, 无水硫酸钠干燥, 浓缩 EA, 得到粗品, 粗品经柱层析纯化, 得到类白色固体 (**19**) 72.0 mg, 收率 91.7%, ESI-MS m/z : 672.3[M + H]⁺。

2.2.12 化合物 20 的合成 将化合物 **19** (72 mg, 0.11 mmol) 和化合物 **7** (20.6 mg, 0.06 mol) 溶于 10 mL DCM 中, 室温条件下加入 EDCI (63.4 mg, 0.33 mmol)、DMAP (26.8 mg, 0.22 mmol)、TEA (33.3 mg, 0.33 mmol), 50 °C 搅拌 3 h 至反应完全。浓缩除去 DCM, 加入 EA 和水, 萃取分层, 收集有机层, 无水硫酸钠干燥, 浓缩 EA, 得到粗品, 粗品经柱层析纯化得到黄色固体 (**20**) 20.0 mg, 收率 18.3%, ESI-MS m/z : 996.3[M + H]⁺。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.70 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H), 11.05 (s, 1H), 8.62 ~ 8.53 (m, 2H), 8.02 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.80 (dd, *J* = 9.2, 2.3 Hz, 1H), 7.58 ~ 7.49 (m, 2H), 7.46 ~ 7.07 (m, 8H), 6.89 ~ 6.82 (m, 2H), 6.39 (dd, *J* = 3.4, 1.9 Hz, 1H), 6.03 (dd, *J* = 8.7, 2.1 Hz, 1H), 5.48 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 3.95 (s, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.62 ~ 3.43 (m, 7H), 3.25 (t, *J* = 6.3 Hz, 3H), 2.90 (s, 2H), 2.75 ~ 2.65 (m, 1H), 2.58 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H), 2.28 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 2.18 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 2.02 ~ 1.94 (m, 2H), 1.63

(s, 1H), 1.53 (d, *J* = 12.5 Hz, 3H), 1.46 (s, 2H), 1.41 ~ 1.29 (m, 4H), 1.25 (s, 1H), 1.17 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 1.10 ~ 1.01 (m, 6H), 0.84 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H)。

2.2.13 化合物 23a ~ 23i 的合成 (以化合物 **23a** 为例) 将 4-氨基苯酚 (**21a**, 200 mg, 1.83 mmol) 和 4-溴-2-氟苯甲酸甲酯 (**22**, 425 mg, 1.83 mmol) 溶于 10 mL ACN 中, 再加入 Na₂CO₃ (571 mg, 5.49 mmol), 100 °C 搅拌 16 h 至反应完全。浓缩除去 ACN, 加入 EA 和水, 萃取分层, 收集有机层, 无水硫酸钠干燥, 浓缩 EA, 得到粗品, 粗品经柱层析纯化得到白色固体 (**23a**) 550.0 mg, 收率 93.4%, ESI-MS m/z : 322.6[M + H]⁺。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.70 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.31 (dd, *J* = 8.3, 1.9 Hz, 1H), 6.83 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 6.79 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.61 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 5.10 (s, 2H), 3.80 (s, 3H)。

采用同样的方法, 以 **21b ~ 21i** 和 4-溴-2-氟苯甲酸甲酯 (**22**) 为原料制备得到白色固体 **23b ~ 23i**。

2.2.14 化合物 24a ~ 24i 的合成 (以化合物 **24a** 为例) 将化合物 **23a** (550 mg, 1.71 mmol) 与水合氢氧化锂 (359 mg, 8.55 mmol) 加入 15 mL THF 和 3 mL 水中, 60 °C 搅拌 2 h 至反应完全。旋掉 THF, 调节 pH 值 < 7, 加入 EA 和水, 萃取分层, 收集有机层, 无水硫酸钠干燥, 浓缩 EA, 得到粗品, 粗品经柱层析纯化, 得到白色固体 (**24a**) 500 mg, 收率 95.3%, ESI-MS m/z : 308.6[M + H]⁺。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.40 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.12 (dd, *J* = 8.1, 1.9 Hz, 1H), 6.77 ~ 6.71 (m, 2H), 6.67 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 6.62 ~ 6.55 (m, 2H)。

采用同样的方法, 以化合物 **23b ~ 23i** 为原料制备得到白色固体 **24b ~ 24i**。

2.2.15 化合物 25a ~ 25i 的合成 (以化合物 **25a** 为例) 将化合物 **24a** (500 mg, 1.63 mmol) 和化合物 **3** (493.9 mg, 1.63 mol) 溶解于 15 mL DCM 中, 室温条件下加入 HATU (931 mg, 2.45 mmol)、DMAP (298.9 mg, 2.45 mmol)、TEA (493.9 mg, 4.89 mmol), 室温条件下搅拌 3 h 至反应完全。浓缩除去 DCM, 加入 EA 和水, 萃取分层, 收集有机层, 无水硫酸钠干燥, 浓缩 EA, 得到粗品, 粗品经柱层析纯化得到黄色固体 (**25a**) 720.0 mg, 收率 74.8%, ESI-MS m/z : 593.6[M + H]⁺。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.61 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 8.57 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.89 (dd, *J* = 9.2, 2.3 Hz, 1H),

7.40 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.24 ~ 7.18 (m, 2H), 6.82 ~ 6.75 (m, 2H), 6.72 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 6.63 ~ 6.57 (m, 2H), 3.67 (q, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.62 (s, 3H), 2.72 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H)。

采用同样的方法, 以化合物 **24b** ~ **24i** 为原料制备得到黄色固体 **25b** ~ **25i**。

2.2.16 化合物 **26a** ~ **26i** 的合成 (以化合物 **26a** 为例) 将化合物 **25a** (720 mg, 1.22 mmol) 与水合氢氧化锂 (256.2 mg, 6.10 mmol) 加入 15 mL THF, 3 mL 水中, 60 °C 搅拌 2 h 至反应完全。旋掉 THF, 调节 pH 值 < 7, 加入 EA 和水, 萃取分层, 收集有机层, 无水硫酸钠干燥, 浓缩 EA, 得到粗品, 粗品经柱层析纯化, 得到黄色固体 (**26a**) 680 mg, 收率 96.7%, ESI-MS m/z : 579.6[M + H]⁺。¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.84 (s, 1H), 8.45 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.80 (dd, $J = 9.0, 2.2$ Hz, 1H), 7.38 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.10 (dd, $J = 8.2, 1.9$ Hz, 1H), 6.99 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 6.68 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 6.66 (q, $J = 2.1$ Hz, 2H), 6.58 ~ 6.53 (m, 2H), 3.47 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.31 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H)。

采用同样的方法, 以化合物 **25b** ~ **25i** 为原料制备得到黄色固体 **26b** ~ **26i**。

2.2.17 化合物 **27a** ~ **27i** 的合成 (以化合物 **27a** 为例) 将化合物 **26a** (680 mg, 1.18 mmol) 溶于 3 mL DMF 中, 缓慢滴入含有 HATU (672.6 mg, 1.77 mmol) 和 DIPEA (303 mg, 2.35 mmol) 的 50 mL DCM 混合溶液中, 室温搅拌 2 h 至反应完全。浓缩除去 DCM, 得到粗品, 粗品经反相色谱柱层析纯化, 冻干后得到黄色固体 (**27a**) 245 mg, 收率 37.3%, ESI-MS m/z : 561.6[M + H]⁺。¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.66 (s, 1H), 8.49 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H), 8.25 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.65 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.37 (dd, $J = 8.3, 2.0$ Hz, 1H), 7.31 (dd, $J = 9.4, 2.1$ Hz, 2H), 6.73 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 6.40 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 3.86 (d, $J = 11.4$ Hz, 2H), 2.40 (s, 2H)。

采用同样的方法, 以化合物 **26b** ~ **26i** 为原料制备得到黄色固体 **27b** ~ **27i**。

2.2.18 化合物 **28a** ~ **28i** 的合成 (以化合物 **28a** 为例) 将化合物 **27a** (245 mg, 0.44 mmol) 和化合物 **16** (222 mg, 0.53 mmol) 溶解于 10 mL 1, 4-dioxane 中, 室温条件下加入 Pd₂(dba)₃ (40.3 mg, 0.044 mmol)、X-PHOS (42.0 mg, 0.088 mmol) 和 Cs₂CO₃ (430.3 mg, 1.32 mmol), 氮气

保护, 90 °C 条件下搅拌 2 h 至反应完全。浓缩除去 1, 4-dioxane, 加入 EA 和水, 萃取分层, 收集有机层, 无水硫酸钠干燥, 浓缩 EA, 得到粗品, 粗品经柱层析纯化得到黄色固体 (**28a**) 64 mg, 收率 15.9%, ESI-MS m/z : 899.6[M + H]⁺。¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.52 (s, 1H), 9.72 (s, 1H), 8.68 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H), 8.27 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.40 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.29 (dd, $J = 9.3, 2.3$ Hz, 2H), 7.23 (d, $J = 9.0$ Hz, 4H), 7.14 (s, 1H), 6.90 (dd, $J = 15.3, 8.8$ Hz, 3H), 6.39 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 6.15 (dd, $J = 8.6, 2.3$ Hz, 1H), 6.06 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 4.73 ~ 4.57 (m, 1H), 4.48 ~ 4.35 (m, 1H), 4.03 (dd, $J = 11.0, 4.2$ Hz, 1H), 3.89 (dd, $J = 11.1, 6.5$ Hz, 1H), 3.77 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 3.72 (s, 3H), 3.69 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 3.63 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 3.51 (s, 1H), 2.95 (s, 2H), 2.78 (s, 1H), 2.67 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H), 2.38 ~ 2.30 (m, 1H), 2.29 ~ 2.23 (m, 1H), 2.18 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 2.07 ~ 1.94 (m, 2H), 1.72 (s, 1H), 1.37 ~ 1.31 (m, 1H), 1.30 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H), 1.26 (s, 1H), 1.07 (d, $J = 6.7$ Hz, 4H), 0.89 ~ 0.76 (m, 2H)。

采用同样的方法, 以化合物 **27b** 为原料制备得到黄色固体 (**28b**), 收率 9.3%, ESI-MS m/z : 933.5[M + H]⁺。¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.40 (s, 1H), 9.87 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 7.44 (s, 2H), 7.31 (s, 1H), 7.24 (d, $J = 8.0$ Hz, 5H), 7.15 (s, 1H), 6.90 (d, $J = 8.2$ Hz, 3H), 6.16 (dd, $J = 8.7, 2.3$ Hz, 3H), 5.02 ~ 4.54 (m, 1H), 4.51 ~ 4.25 (m, 1H), 3.73 (d, $J = 5.7$ Hz, 8H), 3.65 (s, 2H), 3.63 (s, 1H), 2.98 (s, 2H), 2.70 ~ 2.65 (m, 1H), 2.33 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H), 2.29 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 2.18 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 2.04 ~ 1.97 (m, 2H), 1.74 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 1.37 ~ 1.33 (m, 1H), 1.30 (s, 1H), 1.25 (s, 1H), 1.08 (d, $J = 6.7$ Hz, 5H), 0.87 ~ 0.81 (m, 2H)。

采用同样的方法, 以化合物 **27c** 为原料制备得到黄色固体 (**28c**), 收率 6.8%, ESI-MS m/z : 933.4[M + H]⁺。¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.78 (s, 1H), 10.02 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.44 (s, 2H), 7.35 ~ 7.18 (m, 5H), 7.01 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 6.66 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 6.47 (s, 1H), 6.15 (d, $J = 40.2$ Hz, 2H), 5.32

(dd, $J = 5.4, 4.2$ Hz, 1H), 4.03 (dd, $J = 11.2, 4.2$ Hz, 1H), 3.89 (dd, $J = 11.2, 6.5$ Hz, 1H), 3.74 (d, $J = 19.7$ Hz, 8H), 3.51 (s, 2H), 2.70 ~ 2.63 (m, 1H), 2.33 (p, $J = 1.9$ Hz, 1H), 2.28 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.18 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 1.99 (p, $J = 7.0, 6.6$ Hz, 5H), 1.34 (s, 1H), 1.30 (s, 1H), 1.26 (s, 1H), 1.14 (d, $J = 3.3$ Hz, 2H), 0.88 ~ 0.83 (m, 5H)。

采用同样的方法, 以化合物 **27d** 为原料制备得到黄色固体 (**28d**), 收率 9.7%, ESI-MS m/z : 917.3[M + H]⁺。¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.55 (s, 1H), 9.90 (s, 1H), 8.74 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 7.59 ~ 7.52 (m, 1H), 7.31 (dd, $J = 9.4, 2.2$ Hz, 2H), 7.28 ~ 7.22 (m, 5H), 7.16 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 6.90 (d, $J = 8.4$ Hz, 3H), 6.21 ~ 6.11 (m, 3H), 4.66 (t, $J = 5.1$ Hz, 1H), 4.51 ~ 4.31 (m, 1H), 3.72 (d, $J = 11.2$ Hz, 8H), 3.64 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 3.59 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H), 2.98 (s, 2H), 2.70 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H), 2.31 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H), 2.27 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 2.18 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 2.04 ~ 1.94 (m, 2H), 1.73 (s, 2H), 1.36 ~ 1.31 (m, 1H), 1.30 (s, 1H), 1.25 (s, 1H), 1.08 (d, $J = 6.5$ Hz, 5H), 0.87 ~ 0.77 (m, 2H)。

采用同样的方法, 以化合物 **27e** 为原料制备得到黄色固体 (**28e**), 收率 7.4%, ESI-MS m/z : 917.2[M + H]⁺。¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.78 (s, 1H), 9.47 (s, 1H), 8.70 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H), 8.33 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.78 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.48 ~ 7.20 (m, 5H), 7.18 (s, 1H), 6.91 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.65 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.43 (s, 1H), 6.24 ~ 6.05 (m, 2H), 4.85 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 4.69 ~ 4.53 (m, 1H), 4.06 ~ 3.62 (m, 8H), 3.51 (s, 2H), 3.00 (s, 2H), 2.84 ~ 2.65 (m, 2H), 2.33 ~ 1.93 (m, 5H), 1.49 (dt, $J = 14.2, 7.2$ Hz, 2H), 1.36 ~ 1.33 (m, 1H), 1.30 (s, 1H), 1.26 (s, 1H), 1.08 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H), 0.95 ~ 0.75 (m, 5H)。

采用同样的方法, 以化合物 **27f** 为原料制备得到黄色固体 (**28f**), 收率 9.4%, ESI-MS m/z : 913.4[M + H]⁺。¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.68 (s, 1H), 9.60 (s, 1H), 8.78 (s, 2H), 8.21 (s, 1H), 7.48 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.36 (dd, $J = 18.6, 8.7$ Hz, 5H), 7.28 ~ 7.18 (m, 2H), 7.10 (s, 1H), 7.04 ~ 6.95 (m,

2H), 6.66 (s, 1H), 6.19 ~ 6.06 (m, 2H), 5.32 (t, $J = 4.8$ Hz, 1H), 4.14 (s, 3H), 3.79 (s, 1H), 3.76 (s, 8H), 3.31 (s, 3H), 3.08 (s, 2H), 2.67 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H), 2.33 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H), 2.10 (s, 3H), 2.00 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.71 (t, $J = 10.6$ Hz, 1H), 1.49 (dd, $J = 21.4, 7.1$ Hz, 1H), 1.35 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 1.24 (d, $J = 7.8$ Hz, 5H), 1.12 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H), 0.89 ~ 0.80 (m, 1H)。

采用同样的方法, 以化合物 **27g** 为原料制备得到黄色固体 (**28g**), 收率 7.2%, ESI-MS m/z : 913.5[M + H]⁺。¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.67 (s, 1H), 9.01 (s, 1H), 8.78 (s, 2H), 8.43 (s, 1H), 7.63 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.45 (dd, $J = 33.8, 8.6$ Hz, 5H), 7.26 (s, 2H), 6.79 ~ 6.68 (m, 2H), 6.18 (dd, $J = 20.0, 8.7$ Hz, 3H), 4.85 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 3.92 ~ 3.87 (m, 1H), 3.73 (s, 8H), 3.65 (s, 2H), 3.60 (s, 1H), 3.51 (s, 1H), 2.33 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H), 2.28 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.18 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.03 ~ 1.96 (m, 3H), 1.40 ~ 1.37 (m, 1H), 1.36 ~ 1.32 (m, 2H), 1.30 (s, 1H), 1.26 (s, 1H), 1.15 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.07 (s, 5H), 0.85 (s, 2H)。

采用同样的方法, 以化合物 **27h** 为原料制备得到黄色固体 (**28h**), 收率 4.8%, ESI-MS m/z : 929.7[M + H]⁺。¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.53 (s, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.31 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.37 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.24 (dt, $J = 17.4, 5.9$ Hz, 6H), 6.86 (d, $J = 8.0$ Hz, 3H), 6.15 ~ 6.08 (m, 2H), 6.02 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 5.90 ~ 5.84 (m, 1H), 4.00 (s, 1H), 3.73 (s, 1H), 3.69 (s, 5H), 3.60 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 3.42 (s, 4H), 2.93 (s, 2H), 2.21 (s, 1H), 2.00 ~ 1.92 (m, 2H), 1.32 ~ 1.28 (m, 1H), 1.26 (s, 1H), 1.22 (s, 2H), 1.20 (s, 8H), 1.04 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.85 ~ 0.78 (m, 2H)。

采用同样的方法, 以化合物 **27i** 为原料制备得到黄色固体 (**28i**), 收率 8.5%, ESI-MS m/z : 929.4[M + H]⁺。¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.57 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 8.34 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.41 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.31 ~ 7.13 (m, 6H), 6.89 (d, $J = 8.0$ Hz, 3H), 6.21 ~ 6.11 (m, 2H), 6.05 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 5.94 ~ 5.88 (m, 1H), 4.04 (s, 1H), 3.77 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 3.71 (d, $J = 7.6$ Hz, 5H), 3.64 (d,

$J = 8.6 \text{ Hz}$, 2H), 3.48 (d, $J = 19.5 \text{ Hz}$, 4H), 2.96 (s, 2H), 2.18 (s, 1H), 2.04 ~ 1.91 (m, 2H), 1.37 ~ 1.32 (m, 1H), 1.30 (s, 1H), 1.26 (s, 2H), 1.23 (s, 8H), 1.07 (d, $J = 6.7 \text{ Hz}$, 3H), 0.90 ~ 0.78 (m, 2H)。

2.3 体外抑制激酶活性测试

进行时间分辨荧光共振能量转移技术 (TR-FRET) 竞争结合测定的体外药理学, 以评估化合物与抗凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-2 (G101V) 及 Bcl-2 (D103Y) 的结合亲和力, 以 ABT-199 为对照。① Bcl-2 激酶缓冲液的配制: 配制 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 4-羟乙基哌嗪乙磺酸和 $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠的 $10\times$ 缓冲液母液, 调节 pH 值为 7.5。使用前用超纯水稀释 $1\times$ 缓冲液, 并加入终浓度为 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二硫苏糖醇及 0.01% 吐温 20。② 受试样品的配制: 受试化合物和对照药溶于二甲基亚砜 (DMSO) 配制成 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的母液, 以 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为起始浓度, 以 10 倍梯度稀释成 7 个浓度, 再用水 10 倍稀释成受试样品溶液。③ 抑制酶活性测定: 将不同浓度受试样品溶液加入 384 孔板, 设双复孔, 其中设置空白对照组 (不加受试样品) 和无酶对照组。向各孔加入 Bcl-2 激酶缓冲液室温反应 30 min, 加入稀释后的 Bio-Bim 底物缓冲液, 室温反应 1 h。④ 抗体结合检测: 用 Detection Buffer 稀释 Antihis 和 XL665 抗体, 加入 384 孔板以终止反应, 孵化 18 h, 然后用读板器读取荧光。⑤ 数据读取及处理: 在 Envision 上收集数据, 激发波长为 340 nm, 发射波长为 615 nm 和 665 nm。从 Envision 程序中复制比值 (665 nm/615 nm), 将比率值转换为抑制百分比值。用 GraphPad Prism 8.0 进行数据分析和拟图。测定结果见表 1。发现化合物对 3 种激酶均具有一定的抑制活性, 其中化合物 28c、28d、28e、28f 对三种激酶的抑制活性均优于药物 ABT-199。

表 1 目标化合物对激酶的抑制作用

Tab 1 Inhibitory effect of kinases by the target compounds

化合物	$IC_{50}/(\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1})$		
	Bcl-2	Bcl-2 (G101V)	Bcl-2 (D103Y)
28a	6.00	333.70	12.96
28b	2.80	22.29	5.50
28c	0.50	39.24	1.84
28d	0.63	208.90	0.50
28e	1.80	172.35	4.19
28f	1.98	58.75	1.50
28g	1.68	508.05	25.89
28h	3.13	32.43	15.63
28i	4.48	265.90	13.17
ABT-199	2.78	284.75	243.85
20	0.43	2.76	1.87

2.4 体外抗肿瘤活性测试

采用 MTS 法测定化合物对 RS4; 11 (Bcl-2) 与 RS4; 11 (Bcl-2-G101V) 细胞增殖的抑制作用, 以 ABT-199 为对照。① RS4; 11 (Bcl-2) 和 RS4; 11 (Bcl-2-G101V) 细胞分别培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中。② 将 RS4; 11 (Bcl-2)、RS4; 11 (Bcl-2-G101V) 细胞收集后, 离心, 去上清液, 用 2 mL 完全培养基重悬, 取 $20 \mu\text{L}$ 于计数板上, 稀释到合适的浓度后分别以 20 000 个细胞/孔, 以 $80 \mu\text{L}$ /孔接种于 96 孔板。③ 将化合物以最高浓度 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (DMSO 配制) 5 倍梯度稀释 8 个梯度浓度 (DMSO 配制), 再均使用培养基稀释 100 倍 (DMSO 浓度为 1%)。④ 将稀释好的化合物以 $20 \mu\text{L}$ /孔加入细胞 96 孔板中, 最终起始最高浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (DMSO 浓度为 0.2%)。⑤ 将细胞板在 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 72 h 后, 使用 CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive 细胞增殖试剂盒 (MTS) 进行检测。用酶标仪测量 490 nm 和 650 nm 处的吸收, 用 GraphPad Prism 8.0 计算 IC_{50} 值。测定结果见表 2。部分化合物对肿瘤细胞的增殖具有一定的抑制活性, 其中化合物 28c、28e、28g、28i 对 G101V 突变的肿瘤细胞的增殖抑制活性均优于药物 ABT-199。

表 2 目标化合物的体外抗肿瘤活性

Tab 2 Antitumor activity of the target compounds in vitro

化合物	$IC_{50}/(\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1})$	
	RS4; 11 (Bcl-2)	RS4; 11 (Bcl-2-G101V)
28a	10.98	> 10 000
28b	17.51	> 10 000
28c	1.65	1546
28d	13.98	> 10 000
28e	3.57	3032
28f	12.48	> 10 000
28g	2.77	2515
28h	20.00	> 10 000
28i	3.66	3289
ABT-199	3.79	3581
20	0.69	718

3 讨论及结论

3.1 合成部分

在本文的合成路线中, 部分中间体的制备仅需简单的后处理, 未经柱层析纯化即可直接用于下一步, 操作简便, 收率较高。由于所设计化合物结构较为新颖复杂, 故在路线设计上将其拆分为两个结构单元单独合成, 再通过 Buchwald 偶联得到最终化合物, 该合成方法可为后续此类型大环化合物的合成提供参考。

3.2 活性测试结果分析

从体外抑制激酶活性测试的结果来看, 化合

物 **28b**、**28c**、**28d**、**28e**、**28f** 比无取代基的化合物 **28a** 在两种突变激酶中的活性均有所提高, 初步表明在大环母核位点上引入取代基可提高突变激酶的活性; 从体外抗肿瘤活性测试的结果来看, 3 号位点取代的化合物 **28c**、**28e**、**28g**、**28i** 对突变细胞的增殖抑制效果远优于 2 号位点取代的化合物 **28b**、**28d**、**28f**、**28h**, 表明在大环母核不同位点上引入取代基对突变细胞的增殖抑制效果也是有所不同的。综上所述, 在合适位点上引入合适的取代基对实现大环 Bcl-2 抑制剂克服耐药问题极为重要。该研究结果可为大环 Bcl-2 抑制剂抗肿瘤作用进一步的结构优化提供参考。

参考文献

- [1] Guillem V, Juan JP, Jaime R. A step forward toward selective activation/inhibition of bak, a pro-apoptotic member of the Bcl-2 protein family: discovery of new prospective allosteric sites using molecular dynamics [J]. *J Chem Inf Model*, 2023, 63 (11): 3544-3556.
- [2] Roberts AW. Therapeutic development and current uses of BCL-2 inhibition [J]. *Hematology*, 2020, 2020 (1): 1-9.
- [3] Gimenez-Cassina A, Danial NN. Regulation of mitochondrial nutrient and energy metabolism by BCL-2 family proteins [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2015, 26 (4): 165-75.
- [4] Green DR, Llambi F. Cell death signaling [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015, 7 (12): a006080.
- [5] King LE, Hohorst L, Garcia-Saez AJ. Expanding roles of BCL-2 proteins in apoptosis execution and beyond [J]. *J Cell Sci*, 2023, 136 (22): jcs260790.
- [6] Ashkenazi A, Fairbrother WJ, Levenson JD, et al. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16 (4): 273-284.
- [7] Hitesh J, Narayanan K, Reddy SM, et al. Antiapoptotic Bcl-2 protein as a potential target for cancer therapy: a mini review [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2016, 44 (5): 1212-1221.
- [8] D' Aguanno S, Bufalo DD. Inhibition of anti-apoptotic Bcl-2 proteins in preclinical and clinical studies: current overview in cancer [J]. *Cells*, 2020, 9 (5): 1287-1287.
- [9] Deeks ED. Venetoclax: first global approval [J]. *Drugs*, 2016, 76 (9): 979-987.
- [10] Deng J, Paulus A, Fang DD, et al. Lisoftoclax (APG-2575) is a novel BCL-2 inhibitor with robust antitumor activity in preclinical models of hematologic malignancy [J]. *Clin Cancer Res*, 2022, 28 (24): 5455-5468.
- [11] Li CX, Wei J, Zhou KS, et al. A phase 1 study evaluating the safety, tolerability, pharmacokinetics, and preliminary antitumor activity of Bcl-2 inhibitor BGB-11417 in adult patients with mature B-Cell malignancies: preliminary data [J]. *Blood*, 2022, 140 (S1): 6717-6718.
- [12] Ferrarini I, Rigo A, Visco C. The mitochondrial anti-apoptotic dependencies of hematologic malignancies: from disease biology to advances in precision medicine [J]. *Haematologica*, 2022, 107 (4): 790-802.
- [13] Blombery P, Anderson MA, Gong JN, et al. Acquisition of the recurrent Gly101Val mutation in BCL2 confers resistance to Venetoclax in patients with progressive chronic lymphocytic leukemia [J]. *Cancer Discov*, 2019, 9 (3): 342-353.
- [14] Shanmugapriya T, Byrd JC. Gly101Val BCL2 mutation: one step closer to understanding Venetoclax resistance in CLL [J]. *Cancer discov*, 2019, 9 (3): 320-322.
- [15] Eugen T, William C, Anna D, et al. Venetoclax resistance and acquired BCL2 mutations in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Haematologica*, 2019, 104 (9): e434-e437.
- [16] Sano M, Shimaoka H, Kohira N, et al. Synthesis of novel macrocyclic compounds derived from ceftriaxone: letter [J]. *Chem Lett*, 2020, 49 (12): 1501-1503.
- [17] Anthony M, J SK. Danoprevir: first global approval [J]. *Drugs*, 2018, 78 (12): 1271-1276.
- [18] Basit S, Ashraf Z, Lee K, et al. First macrocyclic 3rd-generation ALK inhibitor for treatment of ALK/ROS1 cancer: clinical and designing strategy update of lorlatinib [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 134348-356.
- [19] NYL. Pacritinib: first approval [J]. *Drugs*, 2022, 82 (7): 831-838.
- [20] 薛海, 郭运行, 王志伟. BCL-2 抑制剂: WO2021 208963 [P]. 2023-09-22.
- [21] 温剑锋, 陈建勇, 周云隆, 等. *N*-(苯基磺酰基)苯甲酰胺类化合物及其中间体的合成方法: CN1138 80834A [P]. 2022-01-04.
- [22] 郭运行, 薛海, 王志伟, 等. Bcl-2 抑制剂: CN1124 37772 [P]. 2023-11-21.
- [23] 刘飞, 丰巍伟, 王斌, 等. 三氟甲基取代的磺酰胺类选择 BCL-2 抑制剂: CN112888687B [P]. 2023-01-24.
- [24] 马大为, 李征, 王开亮, 等. 抗凋亡蛋白 Bcl-2 抑制剂及其制备方法和应用: CN113444078B [P]. 2023-07-07.

(收稿日期: 2024-01-07; 修回日期: 2024-03-15)

三叶片抑制金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌作用的关键组分挖掘

米卓鑫^{1, 2, 3}, 齐育麟^{1, 2}, 李玉红^{1, 2}, 李琳^{1, 2}, 张鹏^{1, 2, 3*}, 赵鑫^{1, 2*} (1. 天津中医药大学组分中药国家重点实验室, 天津 301617; 2. 天津中医药大学方剂学教育部重点实验室, 天津 301617; 3. 天津中医药大学现代中医药海河实验室, 天津 301617)

摘要: **目的** 挖掘三叶片发挥抑制金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S.aureus*) 和大肠埃希菌 (*Escherichia coli*, *E.coli*) 作用的关键组分。**方法** 采用 16S rRNA 测序技术, 在高脂饮食小鼠模型上评价三叶片对肠道菌群的调节作用及对肠道中致病菌 *S. aureus*、*E.coli* 的抑制作用。采用牛津杯法测定三叶片、不同药物组合及其单味药对 *S.aureus* 和 *E.coli* 的体外抑菌活性, 挖掘三叶片中发挥抑菌作用的关键组分, 并采用琼脂稀释法研究三叶片及其关键组分对两种致病菌株的最小抑菌浓度 (MIC)。**结果** 菌群测序结果显示, 三叶片可以上调高脂饮食小鼠肠道菌群物种丰富度和多样性, 降低菌群中包括 *S.aureus*、*E.coli* 等致病菌的丰度。体外抑菌结果显示, 三叶片、丹参赤芍组合以及丹参、赤芍组分对上述细菌均有显著的抑制作用。其中三叶片对 *S.aureus* 的 MIC 为 $0.781\ 25\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 对 *E.coli* 的 MIC 为 $3.125\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。丹参赤芍组合对 *S.aureus* 的 MIC 为 $0.25\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 对 *E.coli* 的 MIC 为 $3.125\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。三叶片中丹参组分可显著抑制 *S.aureus*, 其 MIC 为 $0.125\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 赤芍组分对 *E.coli* 的抑制作用优于其他组分, 其 MIC 为 $3.125\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。**结论** 三叶片能够抑制常见的肠道致病菌如 *S.aureus* 和 *E.coli*, 该方中丹参为抑制 *S.aureus* 的关键组分, 赤芍为抑制 *E.coli* 的关键组分。

关键词: 三叶片; 关键组分; 金黄色葡萄球菌; 大肠埃希菌; 抑菌活性

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)06-1537-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.021

Key antimicrobial components of Sanye tablets against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*

MI Zhuo-xin^{1, 2, 3}, QI Yu-lin^{1, 2}, LI Yu-hong^{1, 2}, LI Lin^{1, 2}, ZHANG Peng^{1, 2, 3*}, ZHAO Xin^{1, 2*} (1. State Key Laboratory of Component-based Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617; 2. Key Laboratory of Pharmacology of Traditional Chinese Medicine Formulae, Ministry of Education, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617; 3. Haihe Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617)

Abstract: Objective To determine the key components of Sanye tablets (SYT) that exert antimicrobial effect on *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Escherichia coli* (*E. coli*). **Methods** The regulatory effects on the gut microbiota of SYT and its antimicrobial activity against *S. aureus* and *E. coli* were evaluated in high-fat diet mice model by 16S rRNA sequencing. The antimicrobial activity of total formula, different component-mixtures, and single component of SYT against *S. aureus* and *E. coli* was investigated by oxford cup method in vitro to determine the key antimicrobial components in SYT. The minimum inhibitory concentration (MIC) of SYT and its key components against these two pathogenic strains were determined with agar dilution method. **Results** Sequencing

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.81830112); 海河一号 (中药组分高通量制备平台) 的研制 (No.22HHZYSS00007); 国家自然科学基金项目 (No.81973792)。

作者简介: 米卓鑫, 女, 硕士研究生, 主要从事中药经肠道菌群作用药效物质研究, email: mizx123@163.com *通信作者: 张鹏, 女, 副研究员, 主要从事中药化学与分析研究, email: zhangpeng@tjutc.edu.cn; 赵鑫, 女, 副研究员, 主要从事肠道微生物研究, email: xinaw26@tju.edu.cn

results showed that SYT improved the species richness and diversity, and reduced the abundance of pathogenic bacteria, including *S. aureus* and *E. coli* in the gut microbiota of high-fat diet mice. The in vitro antimicrobial assay indicated that the SYT, *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* (SMR)-*Radix Paeoniae Rubra* (RPR) co-components, as well as the respective component of SMR and RPR, had significant inhibitory effect on these two pathogenic bacteria. The MIC of SYT against *S. aureus* and *E. coli* were 0.781 25 and 3.125 mg · mL⁻¹, respectively. The combination of SMR and RPR showed MIC of 0.25 mg · mL⁻¹ against *S. aureus* and 3.125 mg · mL⁻¹ against *E. coli*. The SMR showed MIC of 0.125 mg · mL⁻¹ against *S. aureus*. The MIC of the RPR was 3.125 mg · mL⁻¹ against *E. coli*, lower than that of other single components. **Conclusion** SYT shows inhibitory effect on the common intestinal pathogens such as *S. aureus* and *E. coli*. SMR is the key component of SYT against *S. aureus*, and RPR is the key component against *E. coli*.

Key words: Sanye tablet; key component; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*; antimicrobial activity

肠道菌群是一个复杂多样且动态的微生物系统,当机体受到外部环境、饮食、药物等多种因素的影响时,肠道菌群稳态将被打破,其物种多样性及物种丰度会发生变化,益生菌减少、条件致病菌及有害菌异常繁殖,进而使肠道菌群失调,发生代谢紊乱,导致相关代谢疾病的发生^[1]。研究表明,在菌群失调时,肠道中部分致病菌和条件致病菌如金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S.aureus*)和大肠埃希菌(*Escherichia coli*, *E.coli*)的丰度会显著增加,在经过药物治疗后,其丰度会明显下调,不仅有助于提高有益菌的生态占位,还可以调节菌群整体环境^[2-5]。

三叶片是由桑叶、荷叶、山楂叶、丹参、赤芍五味中药组成的中药复方制剂。其中桑叶为君药,荷叶和山楂叶共为臣药,丹参和赤芍为佐药,具有清热养阴、生津止渴、化痰降浊、活血化瘀的功效,临床上主要用于 2 型糖尿病前期合并高脂血症的治疗^[6]。菌群失调会促使代谢疾病的发生,糖脂代谢疾病常伴随肠道菌群失调,两者相互影响^[7]。前期研究表明,三叶片活性成分中桑叶多糖能够通过上调 *Akkermansia* 等有益菌的丰度,修复菌群紊乱,改善糖脂代谢^[8],但三叶片抑制有害菌改善菌群失调的成分尚不明确。

多项研究表明,三叶片中五味中药均显示出抑菌作用。桑叶乙醇提取物^[9]、桑叶黄酮^[10-11]、生物碱^[10]及多糖^[10, 12]均有抑制 *E.coli* 和 *S.aureus* 的作用;荷叶乙醇提取物^[13]、黄酮^[14-15]与生物碱^[14-15]也具有较强的抗菌作用;此外,山楂叶^[16]、丹参^[17-21]、赤芍^[22-23]也均有抑菌作用方面相关的研究。然而,对于三叶片发挥抑菌作用的关键组

分及是否存在多组分协同抑菌作用尚未见系统研究。故本研究以三叶片调节糖脂代谢的功效为背景,从抑制病菌改善菌群的角度出发,研究其对高脂饮食小鼠肠道菌群的调节作用;并以 *S.aureus* 和 *E.coli* 为代表菌株,通过体外实验建立筛选方法,挖掘三叶片中发挥抑菌活性的关键组分,为其基于改善菌群失调治疗糖脂代谢提供科学依据。

1 材料

1.1 实验动物与饲料

50 只雄性 C57BL/6N 小鼠,5~6 周龄[北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCKK(京)2016-0006]。饲养于中国医学科学院放射医学研究所动物中心,自由进食、水,温度 20~26℃,相对湿度 40%~70%,12 h 交替照明的昼夜节律。所有动物实验操作符合中国医学科学院放射医学研究所关于开展动物实验的伦理要求和规定(动物实验伦理号 TCM-LAEC2020050)^[24]。普通饲料(北京斯贝福生物技术有限公司,批号:0506SF0520A);高脂饲料(北京华阜康生物科技股份有限公司,批号:0020200082)。

1.2 实验菌株、试药与仪器

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, ATCC 25923)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*, ATCC 25922)(天津中医药大学微生物实验室);琼脂粉、营养肉汤、LB 肉汤、硫酸卡那霉素、盐酸二甲双胍(北京索莱宝科技有限公司);洁净工作台 SW-CJ-2FD(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司);立式压力蒸汽灭菌器、电热恒温培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);十万分之一电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);涡旋振荡器(美

国 Benchmark Scientific 公司); 智能恒温培养振荡器 HNY-200B (天津欧诺仪器股份有限公司); BLT GelView 6000Plus 智能图像工作站 (广州博鹭腾生物科技有限公司)。

干膏粉 (山东步长神州制药有限公司) 基本信息见表 1。

表 1 实验药品基本信息
Tab 1 Basic information of experimental drugs

药品名称	批号	收膏率/%
桑叶、荷叶干膏粉 (简称桑荷)	M181001	19.75
山楂叶干膏粉 (简称山楂叶)	M181001	6.25
丹参干膏粉 (简称丹参)	M181001	6.30
赤芍干膏粉 (简称赤芍)	M181003	4.70

2 方法

2.1 实验药品及药液配制

三叶片混合干膏粉 (无辅料, 简称三叶片), 混合干膏粉比例为桑荷: 山楂叶: 丹参: 赤芍 = 662: 105: 132: 101, 相当于生药比为桑荷: 山楂叶: 丹参: 赤芍 = 4: 2: 1.5: 1.5。药液配制: 称取三叶片或各组分干膏粉适量, 置于 5 mL 离心管中, 加入无菌水, 涡旋混匀, 超声溶解 30 min, 分别制成所需药液, 现配现用。

2.2 动物分组、给药及粪便采集

5~6 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6N 小鼠, 适应性喂养 1 周后, 按体重随机分为 5 组, 分别为普通饮食组 (Con)、高脂饮食组 (HFD)、二甲双胍组 (MET)、三叶片低剂量组 (SYTL, 临床用量的 0.4 倍)、三叶片高剂量组 (SYTH, 临床用量的 0.8 倍), 每组 10 只。实验前 (0 周), 组间小鼠体重、随机血糖差异无统计学意义。Con 组给予普通饲料, 其他组给予高脂饲料喂养, 小鼠自由摄食、水。同时, MET 组每日给予二甲双胍 100 mg · kg⁻¹, SYTL 组、SYTH 组每日分别给予三叶片 2、4 g 生药 · kg⁻¹ (相当于 0.2、0.4 g 干膏粉 · kg⁻¹, 使用纯净水溶解), Con 组和 HFD 组小鼠给予等容积的纯净水。给药 20 周后, 于无菌条件下收集每只小鼠的新鲜粪便。将小鼠分别单独放入干净的铺有无菌滤纸的笼子里, 小鼠排便后立即用无菌棉签收集新鲜粪便于一次性无菌粪便采集管中, 每管装 2~3 颗, -80 °C 冰箱保存。

2.3 粪便样本高通量测序及分析

通过 CTAB/SDS 法提取粪便样本的基因组 DNA, 定量每个样本 DNA 质量浓度为 1 ng · μL⁻¹, 使用引物 515F 和 806R 进行 PCR 扩增, 后按照 Fu 等^[25]的方法在 Illumina HiSeq250 平台上进行 16S

rRNA V4 区基因组文库的构建、鉴定及测序 (北京诺禾致源科技股份有限公司)。使用 QIIME 软件对序列进行分析, 通过 de_novo_otus.py 比对相似度 ≥ 97% 的序列, 筛选出分类操作单元 (OTU), 然后用 SILVA 数据库进行注释。Alpha 多样性指数 chao1 和 observed-species 反映肠道菌群的物种丰富度和多样性。使用 R 语言 ggcorrplot 软件包 (版本 2.15.3) 计算基于加权 UniFrac 距离的主坐标分析 (PCoA) 用于 Beta 多样性分析。聚类热图体现小鼠肠道菌群种水平的物种丰度。

2.4 三叶片及不同组分的体外抑菌活性检测

2.4.1 菌液制备 取 5 μL *S.aureus* 甘油冻存液、5 μL *E.coli* 甘油冻存液分别置于含 5 mL LB 肉汤培养基的试管中, 在 37 °C、220 r · min⁻¹ 的恒温培养振荡器中过夜培养 18 h, 得到活化后的菌液。

2.4.2 药物抑菌活性检测 按“2.1”项下方法制备不同浓度三叶片、200 mg · mL⁻¹ 的药物组合及单味药药液。以 *S.aureus* 和 *E.coli* 为指示菌株, 采用牛津杯法检测三叶片及其各组分的抑菌活性。无菌条件下, 向培养皿中各加入 15 mL 营养琼脂培养基作为支撑层, 待凝固后放入对应数量牛津杯制备加样孔, 取指示菌悬液于 45 °C 左右的 LB 琼脂培养基中 (1: 2500, V/V), 混匀后倒入平板作为检测层, 于孔内分别加入药液 100 μL, 阴性对照为无菌水 100 μL, 阳性对照为 50 mg · mL⁻¹ 的硫酸卡那霉素溶液 10 μL, 于 37 °C 培养 24 h。培养后使用游标卡尺测量抑菌圈直径, 并在智能图像工作站拍照保存。抑菌活性平行测定 3 次。

2.5 三叶片及关键抑菌组分的最小抑菌浓度 (MIC) 测定

2.5.1 含药培养基的制备 取不同浓度的三叶片、药物组合及丹参、赤芍药液加入已灭菌的 LB 琼脂。分别制备三叶片质量浓度为 1.5625、0.781 25、0.390 625 mg · mL⁻¹ 的含药培养基, 丹参赤芍组合和丹参质量浓度为 0.25、0.125、0.0625 mg · mL⁻¹ 的含药培养基用于涂布 *S.aureus*。制备三叶片、丹参赤芍组合及赤芍质量浓度为 6.25、3.125、1.5625 mg · mL⁻¹ 的含药培养基用于涂布 *E.coli*。

2.5.2 MIC 测定 使用 LB 平板菌落计数法统计每组样品的活菌数。采用 10 倍稀释法对两种菌液进行梯度稀释, 取 50 μL 活化 *S.aureus* 和 *E.coli* 菌液涂布在 LB 琼脂培养基平板上, 于 37 °C 培养 24 h, 统计菌落数 (公式 1), 选择合适的稀释倍数进行后续实验。

菌落总数 (CFU · mL⁻¹) = 菌落数 × 稀释倍数 × 20 (1)

取 50 μL 菌液分别涂布在不同浓度的加药培养基上, 于 37 °C 培养 24 h, 根据菌落数计算不同浓度药物对两种菌的抑制率。对照组为不加药的 LB 琼脂培养基。计算抑制率 (见公式 2)。测试药物对菌株的 MIC 被定义为抑制 90% 以上细菌生长的最低浓度。

抑制率 (%) = (对照菌落总数 - 实验菌落总数) / 对照菌落总数 × 100% (2)

2.6 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析, 数据以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

3 结果

3.1 三叶片下调高脂小鼠模型肠道中 *S. aureus* 和 *E. coli* 的丰度

菌群多样性分析结果 (见图 1A) 显示, 与 Con 组相比, HFD 组的 chao1 和 observed_species 指数有下降趋势, 给药后, MET 组无明显变化, SYTL 组和 SYTH 组两种指数对比 HFD 组均有升高, 表明高脂饮食后小鼠肠道菌群丰富度下调, 三叶片给药后有助于小鼠肠道菌群物种丰富度和多样性上调, 进而改善小鼠肠道菌群。通过 PCoA 分析观察小鼠肠道菌群结构变化, 图 1B 显示, Con 组、HFD 组、MET 组、SYTL 组和 SYTH 组肠道菌群分布有较大差异, 经三叶片干预后, SYTL 组和 SYTH 组微生物群落逐渐趋向 Con 组, 表明三叶片能够改善小鼠肠道菌群的结构。

种水平物种丰度分析 (见图 2) 表明, 三叶片能够降低菌群中 *S. aureus*、*E. coli* 等致病菌的丰度, 对小鼠菌群结构有正向调节作用。图 3 显示, 与 Con 组相比, HFD 组 *S. aureus* 丰度上调了 187.8%, *E. coli* 丰度下调了 25.6%。给药二甲双胍后, *S. aureus* 丰度上调, *E. coli* 丰度下调。而给药三叶片后, SYTL 和 SYTH 组 *S. aureus* 丰度分别下调 91.4% 和 93.8%, *E. coli* 丰度分别上调 2.1% 和下调 9.2%。该结果提示高剂量的三叶片对 HFD 小鼠肠道菌群中的 *S. aureus* 和 *E. coli* 有一定程度的抑制作用。

3.2 体外抑菌实验挖掘三叶片发挥抑菌活性的主要组分

3.2.1 不同浓度三叶片的抑菌活性 根据评价指标: 抑菌圈直径 > 20 mm 为极度敏感, > 15 ~ 20 mm 为高度敏感, 10 ~ 15 mm 为中度敏感, < 10 mm 为耐药, 判断不同浓度三叶片的

抑菌活性, 见图 4、表 2。结果显示三叶片在 *S. aureus* 抑菌实验中, 200、100 mg · mL⁻¹ 表现为高度敏感, 50、25、12.5 mg · mL⁻¹ 表现为中度敏感, 其余浓度表现为无抑菌活性。在 *E. coli* 抑菌实验中, 200 mg · mL⁻¹ 表现为中度敏感, 100、50 mg · mL⁻¹ 三叶片具有耐药作用, 其余浓度无抑菌活性。结果表明三叶片对 *S. aureus* 有较明显的抑制作用, 对 *E. coli* 的抑制作用较弱, 且三叶片抑菌作用具有浓度依赖性, 随三叶片浓度的增加而增加。

表 2 不同浓度三叶片对 *S. aureus* 和 *E. coli* 的抑菌活性 (n = 3)

Tab 2 Antimicrobial activity of different concentrations of SYT against *S. aureus* and *E. coli* (n = 3)

名称	质量浓度 / (mg · mL ⁻¹)	抑菌圈直径 / mm	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
三叶片	200	18.3 ± 0.2	10.8 ± 0.7
三叶片	100	16.5 ± 0.2	9.8 ± 0.3
三叶片	50	14.9 ± 2.6	9.4 ± 0.3
三叶片	25	12.5 ± 0.6	—
三叶片	12.5	10.3 ± 0.2	—
三叶片	6.25	—	—
三叶片	3.125	—	—
无菌水	0	—	—
硫酸卡那霉素	50	29.3 ± 1.3	33.0 ± 0.4

注: “—” 表示无抑菌作用。

Note: “—” means no bacteriostasis.

3.2.2 不同药物组合的抑菌活性 由“3.2.1”项下结果可知 200 mg · mL⁻¹ 三叶片对 *S. aureus* 和 *E. coli* 有明显的抑菌活性, 进一步探究三叶片中发挥抑菌作用的主要组分, 考察不同药物组合对两种菌株的抑菌效果, 结果见表 3。200 mg · mL⁻¹ 的丹参赤芍组合对 *S. aureus* 的抑菌圈直径为 (27.4 ± 0.5) mm, 表现为极度敏感, 对 *E. coli* 的抑菌圈直径为 (11.3 ± 0.6) mm, 表现为中度敏感。该组合的抑菌圈直径均大于三叶片及其他药物组合。根据实验结果, 相同质量浓度下, 当药物组合中含有丹参、赤芍两味药时, 其抑菌圈直径明显大于其他组合。丹参赤芍组合对两种菌株的抑菌活性优于其他组合。提示三叶片中发挥抑菌作用的主要组分来源于丹参、赤芍。

3.2.3 三叶片中单味药的抑菌活性 根据“3.2.2”项下结果可知, 丹参、赤芍两味药对两种菌株抑菌效果较好。进一步明确三叶片中各药抑菌效果, 考察单味药的抑菌活性, 见表 4。丹参对 *S. aureus* 的抑菌圈直径达到 (27.4 ± 0.4) mm, 赤芍对 *E. coli* 的抑菌圈直径为 (10.2 ± 0.3) mm, 明显高于其他单味药。

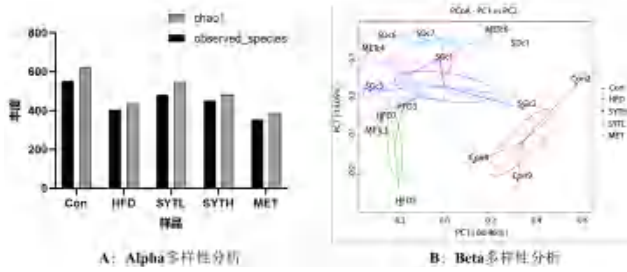


图 1 小鼠肠道菌群的 Alpha 及 Beta 多样性分析
Fig 1 Alpha and Beta diversity analysis of mice intestinal flora

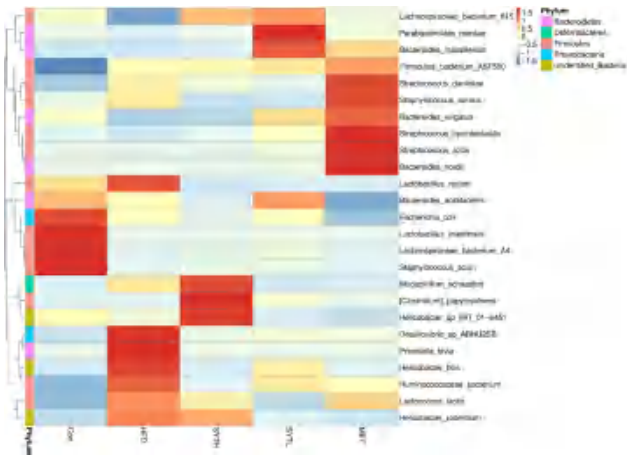


图 2 小鼠肠道菌群种水平物种丰度聚类热图
Fig 2 Cluster heatmap of species abundance at the species level of mice intestinal flora

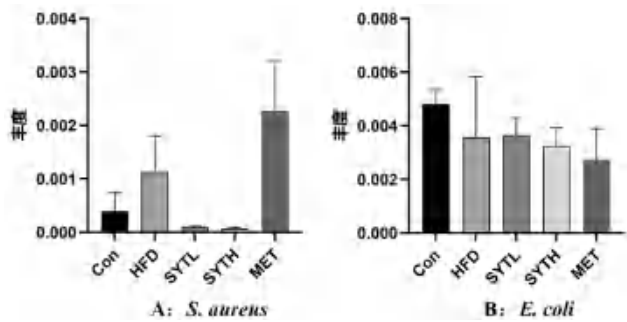


图 3 小鼠肠道菌群中 *S. aureus* 和 *E. coli* 相对丰度
Fig 3 Relative abundance of *S. aureus* and *E. coli* in mice intestinal flora

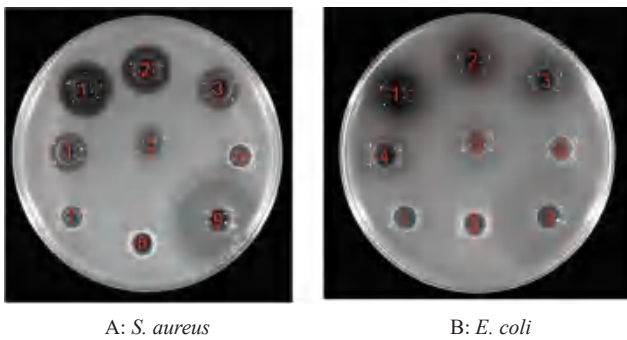


图 4 不同浓度三叶片对 *S. aureus* 和 *E. coli* 的抑菌活性
Fig 4 Antimicrobial activity of different concentrations of SYT against *S. aureus* and *E. coli*

注 (Note): 1 ~ 7 分别为不同质量浓度的三叶片; 8 为无菌水; 9 为硫酸卡那霉素 (1 ~ 7 are SYT with different mass concentrations; 8 is sterile water; 9 is kanamycin sulfate).

表 3 不同药物组合对 *S. aureus* 和 *E. coli* 的抑菌活性 (n = 3)
Tab 3 Antimicrobial activity of different component-mixtures against *S. aureus* and *E. coli* (n = 3)

药物	抑菌圈直径 /mm	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
三叶片	19.9±0.6	9.7±0.4
桑荷山楂叶组合 (生药比 = 2 : 1)	18.6±1.3	9.6±0.2
桑荷丹参组合 (生药比 = 8 : 3)	21.6±0.7	9.7±0.2
桑荷赤芍组合 (生药比 = 8 : 3)	20.5±1.0	9.9±0.2
山楂叶丹参组合 (生药比 = 4 : 3)	26.0±0.9	10.0±0.2
山楂叶赤芍组合 (生药比 = 4 : 3)	22.7±0.9	10.2±0.2
丹参赤芍组合 (生药比 = 1 : 1)	27.4±0.5	11.3±0.6
水	—	—
硫酸卡那霉素	31.8±1.0	32.9±0.4

注：“—”表示无抑菌作用。
Note：“—” means no bacteriostasis.

表 4 各单味药对 *S. aureus* 和 *E. coli* 的抑菌活性 (n = 3)
Tab 4 Antimicrobial activity of single component against *S. aureus* and *E. coli* (n = 3)

药物	抑菌圈直径 /mm	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
三叶片	18.7±0.1	9.4±0.1
桑荷	16.5±0.4	8.9±0.4
山楂叶	15.7±0.3	9.4±0.3
丹参	27.4±0.4	10.0±0.2
赤芍	21.6±0.5	10.2±0.3
水	—	—
硫酸卡那霉素	30.4±0.4	32.2±1.7

注：“—”表示无抑菌作用。
Note：“—” means no bacteriostasis.

因此三叶片中丹参是抑制 *S. aureus* 的主要组分, 赤芍是抑制 *E. coli* 的关键组分。此外, 结合表 3 和表 4 实验结果, 丹参赤芍组合与丹参单味药对 *S. aureus* 的抑菌圈直径均为 27.4 mm, 赤芍为 21.6 mm, 发现丹参对 *S. aureus* 的抑菌效果与丹参赤芍药物组合抑菌效果相当, 丹参赤芍组合对 *E. coli* 的抑菌圈直径为 11.3 mm, 丹参为 10.0 mm, 赤芍为 10.2 mm, 赤芍对 *E. coli* 的抑菌效果弱于丹参赤芍药物组合, 判断丹参、赤芍在抑制 *E. coli* 方面具有协同作用。

3.3 三叶片、丹参、赤芍及丹参赤芍组合的 MIC 测定

通过稀释涂布法确定 *S. aureus* 的适宜稀释倍数为 1×10^7 , *E. coli* 的适宜稀释倍数为 1×10^5 。采用倍数稀释法测定不同浓度的各药物对相应菌的抑制率, 确定其 MIC。结果见表 5。三叶片对 *S. aureus* 的 MIC 值为 $0.78125 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 对 *E. coli* 的 MIC 值为 $3.125 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 丹参赤芍组合对 *S. aureus* 的 MIC 值为 0.25

mg · mL⁻¹, 对 *E. coli* 的 MIC 值为 3.125 mg · mL⁻¹; 丹参对 *S. aureus* 的 MIC 值为 0.125 mg · mL⁻¹, 赤芍对 *E. coli* 的 MIC 值为 3.125 mg · mL⁻¹。随药物浓度增加, 对两种菌株的抑制率也增加。对比三叶片和丹参赤芍组合对 *S. aureus* 的抑制率可以发现丹参的抑菌作用较强。赤芍对 *E. coli* 的抑菌效果优于三叶片, 弱于丹参赤芍组合。进一步证实丹参是三叶片发挥 *S. aureus* 抑菌作用的关键组分, 赤芍是三叶片发挥 *E. coli* 抑菌作用的关键组分, 且丹参、赤芍在抑制 *E. coli* 时具有协同抑菌作用。

表 5 三叶片、丹参赤芍组合、丹参、赤芍对 *S. aureus* 和 *E. coli* 的抑制率 ($n = 3$)

Tab 5 Inhibition of *S. aureus* and *E. coli* by SYT, SMR-RPR co-components, SMR and RPR ($n = 3$)

分类	质量浓度 / (mg · mL ⁻¹)	抑制率 /%	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
三叶片	6.25	—	100.0 ± 0.0
	3.125	—	93.8 ± 1.8
	1.5625	100.0 ± 0.0	47.4 ± 3.0
	0.781 25	91.2 ± 4.9	—
	0.390 625	70.7 ± 8.2	—
丹参赤芍组合 (生药比 = 1 : 1)	6.25	—	100.0 ± 0.0
	3.125	—	99.4 ± 0.6
	1.5625	—	54.7 ± 7.6
	0.5	100.0 ± 0.0	—
	0.25	93.1 ± 2.9	—
丹参	0.125	6.9 ± 7.8	—
	0.25	100.0 ± 0.0	—
	0.125	95.2 ± 1.2	—
赤芍	0.0625	9.7 ± 5.4	—
	6.25	—	100.0 ± 0.0
	3.125	—	98.4 ± 0.4
	1.5625	—	62.8 ± 0.8

注: “—”表示未测定。

Note: “—” means not measured.

4 讨论

结合前期研究, 三叶片可以从两种维度调节菌群, 一是上调优势菌群, 二是下调致病菌及条件致病菌。本研究通过 16S rRNA 菌群测序结果分析, 发现中药复方三叶片能够改善小鼠肠道菌群物种丰度, 调节菌群结构。以 *S. aureus* 和 *E. coli* 为例, 在给药高剂量的三叶片后, 小鼠肠道中这两种菌的丰度均有所下调, 提示三叶片抑制 *S. aureus* 和 *E. coli*, 并进一步揭示了三叶片抑制致病菌的活性成分。给药二甲双胍后 *S. aureus* 丰度有所增加, 有研究表明二甲双胍能够减轻 *S. aureus* 感染引起的气道紧密连接的破坏^[26], 但目前关于二甲双胍对肠道

菌群中 *S. aureus* 丰度的影响尚未见系统研究。

中药具有多成分、多靶点、多通路的特点, 因此在使用中不易产生耐药性, 还可通过多种途径协同作用产生抑菌作用^[27]。文献报道的中药抑菌作用机制主要有以下几种: 破坏细菌细胞壁和细胞膜结构; 影响细菌酶活性; 抑制蛋白质核酸合成^[28]。丹参中主要成分隐丹参酮通过破坏细菌细胞壁和细胞膜, 影响细胞通透性来发挥抑菌作用^[29]。赤芍水提物研究表明其通过抑制 *E. coli* 外排泵, 降低 AcrB mRNA 的表达发挥抑菌活性^[22]。三叶片作为一种中药复方, 其化学成分复杂, 富含黄酮、生物碱、萜类等具有抗菌活性的成分, 可以通过多种通路协同作用, 决定其在抑菌活性发挥方面有较好的效果。

S. aureus 和 *E. coli* 分别是较为常见的革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌菌株, 具有易培养、易鉴别、无固有耐药性的特点。同时结合体内实验三叶片给药后 *S. aureus* 和 *E. coli* 菌群丰度降低的结果, 本研究以 *S. aureus* 和 *E. coli* 为研究对象挖掘三叶片中发挥抑菌作用的主要组分, 通过体外抑菌实验检测了三叶片、不同药物组合及单味药的抑菌活性, 三叶片在体外抑制 *S. aureus* 和 *E. coli* 的效果同在体内的效果一致, 对 *S. aureus* 有显著的抑制作用, 对 *E. coli* 的抑制作用较弱, 均呈现明显的浓度依赖性。丹参赤芍药物组合的抑菌作用优于其他药物组合。丹参、赤芍单味药组分分别对两种菌也表现出了显著的抑制效果, 优于桑荷组分和山楂叶组分。推测可能与三叶片中单味药组分制备方法有关, 丹参、赤芍、山楂叶三种组分均经过大孔树脂除去极性较大的部分, 组分中生物碱、类黄酮、单萜等小分子物质较多, 抑菌活性较好。进一步通过 MIC 挖掘到三叶片复方中发挥对 *S. aureus* 的抑菌作用核心组分为丹参, 发挥对 *E. coli* 的抑菌作用核心组分为赤芍, 丹参和赤芍联用也具有较好的抑菌效果, 抑制率与单味药组分相当, 二者具有协同作用。除此之外, 一些相关的体内实验研究也表明, 丹参和赤芍对于 *S. aureus* 和 *E. coli* 具有优异的抑制效果^[30-32], 验证了本文挖掘方法的可行性及可靠性。

本研究通过建立体外抑菌方法挖掘三叶片复方发挥抑菌作用的关键组分为丹参和赤芍, 为三叶片能够通过抑制致病菌的生长调节肠道菌群来治疗糖脂代谢疾病提供了理论依据, 也为后续其他中药复方抑菌作用关键组分的挖掘及中药复方临床应用的扩展提供思路。

参考文献

- [1] Matthewman C, Narin A, Huston H, et al. Systems to model the personalized aspects of microbiome health and gut dysbiosis [J]. *Mol Aspects Med*, 2023, 91: 101115.
- [2] Gao Q, Han ZY, Tian DF, et al. Xinglou Chengqi decoction improves neurological function in experimental stroke mice as evidenced by gut microbiota analysis and network pharmacology [J]. *Chin J Nat Med*, 2021, 19 (12): 881-899.
- [3] 蔡伟. 蜂胶醇提取物对高脂饮食诱导肥胖小鼠糖脂代谢及肠道菌群的作用 [D]. 南昌: 南昌大学, 2020.
- [4] 黄媛媛, 陈华国, 谢文, 等. 多糖与肠道菌群相互作用及其构效关系研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2022, 49 (6): 2325-2346.
- [5] 张翠兰, 李杨, 苏佩琼, 等. 肥胖 2 型糖尿病患者代谢性手术治疗后肠道菌群的变化 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2021, 16 (3): 348-351, 358.
- [6] 高秀梅, 张伯礼, 刘虹, 等. 一种治疗糖尿病及糖耐量低减的药物组合物及制备方法: 中国. CN1927289 [P]. 2007-03-14.
- [7] Ma QT, Li YQ, Li PF, et al. Research progress in the relationship between type 2 diabetes mellitus and intestinal flora [J]. *Biomed*, 2019, 117: 109138.
- [8] Zhao X, Fu ZF, Yao MH, et al. Mulberry (*Morus alba* L.) leaf polysaccharide ameliorates insulin resistance-and adipose deposition-associated gut microbiota and lipid metabolites in high-fat diet-induced obese mice [J]. *Food Sci Nutr*, 2021, 10 (2): 617-630.
- [9] 高欣妍, 王海英, 刘志明. 桑叶乙醇提取物的体外抗氧化与抑菌活性 [J]. *生物质化学工程*, 2019, 53 (2): 35-40.
- [10] 成少宁, 董文宾, 蔺毅峰, 等. 桑叶活性成分的抑菌作用及稳定性研究 [J]. *中国酿造*, 2021, 40 (2): 140-143.
- [11] Cui H, Lu TH, Wang MX, et al. Flavonoids from *Morus Alba* L. leaves: optimization of extraction by response surface methodology and comprehensive evaluation of their antioxidant, antimicrobial, and inhibition of α -amylase activities through analytical hierarchy process [J]. *Molecules*, 2019, 24 (13): 2398.
- [12] 孙伟, 叶润, 蔡静, 等. 桑叶多糖的分离纯化及其抑菌活性研究 [J]. *食品研究与开发*, 2021, 42 (4): 149-155.
- [13] 陈绮梦, 杨祖伟, 李珍, 等. 荷叶提取液的性能探究 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11 (23): 8715-8720.
- [14] 李亦龙, 尚铂昊, 王建辉, 等. 荷叶活性成分及其药理功能研究进展 [J]. *食品与机械*, 2022, 38 (12): 218-225.
- [15] 谭一丁, 邓放明. 荷叶成分与生物学功能研究进展 [J]. *食品研究与开发*, 2020, 41 (10): 193-197.
- [16] 李杰, 田思雨, 谭怡然, 等. 山楂叶多糖提取工艺优化及体外抗氧化和抑菌活性研究 [J]. *食品工业*, 2023, 44 (4): 91-95.
- [17] 龙旭, 王蕾萌, 龚莉, 等. 丹参总黄酮提取工艺的优化及其抑菌活性研究 [J]. *化学与生物工程*, 2023, 40 (1): 25-29, 47.
- [18] Jiang JM, Chen G, Chen YY, et al. The anti-infective activity of *Salvia miltiorrhiza* against *Staphylococcus aureus* by attenuating accessory gene regulator system-mediated virulence [J]. *Food Funct*, 2022, 13 (9): 5050-5060.
- [19] Luo PP, Huang YQ, Hang XD, et al. Dihydrotanshinone I is effective against drug-resistant helicobacter pylori in vitro and in vivo [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2021, 65 (3): e01921-01920.
- [20] Sieniawska E, Sawicki R, Marchev AS, et al. Tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* inhibit *Mycobacterium tuberculosis* via disruption of the cell envelope surface and oxidative stress [J]. *Food Chem Toxicol*, 2021, 156: 112405.
- [21] 陈颖. 丹参醇提物的抗菌作用研究 [J]. *陕西农业科学*, 2021, 67 (10): 35-40.
- [22] 贾泽, 王春光, 张石磊, 等. 赤芍水提物及芍药苷对大肠埃希菌抗菌增敏活性的影响 [J]. *中国兽医学报*, 2019, 39 (10): 2026-2032.
- [23] 龚怡, 吴泽钰, 王琛, 等. 赤芍的抑菌作用及其防治慢性牙周炎的机制研究 [J]. *口腔医学*, 2021, 41 (5): 391-397.
- [24] Yao MH, Li L, Huang M, et al. Sanye tablet ameliorates insulin resistance and dysregulated lipid metabolism in high-fat diet-induced obese mice [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 713750.
- [25] Fu ZF, Han LF, Zhang P, et al. Cistanche polysaccharides enhance echinacoside absorption in vivo and affect the gut microbiota [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 149 (C): 732-740.
- [26] Kalsi KK, Garnett JP, Patkee W, et al. Metformin attenuates the effect of *Staphylococcus aureus* on airway tight junctions by increasing PKC ζ -mediated phosphorylation of occludin [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23 (1): 317-327.
- [27] 吴秋云, 黄琳, 皮真, 等. 中草药抑菌作用及其机制研究进展 [J]. *中兽医医药杂志*, 2018, 37 (1): 25-29.
- [28] 蒋庆佳, 杨放, 杨安迪, 等. 中药抑菌活性成分及其作用机制研究进展 [J]. *中国抗生素杂志*, 2023, 48 (8): 855-861.
- [29] 李昌勤, 赵琳, 薛志平, 等. 隐丹参酮抑菌作用机制研究 [J]. *中国药学杂志*, 2012, 47 (21): 1706-1710.
- [30] 崔玉梅. 丹参提取物在抗耐药金黄色葡萄球菌感染中的应用 [D]. 长春: 吉林大学, 2021.
- [31] 郭双, 蔡小利, 胡宗福, 等. 赤芍黄柏制剂对致病性大肠埃希菌人工感染雏鸡的肠道菌群多样性的影响 [J]. *畜牧兽医学报*, 2021, 52 (8): 2265-2274.
- [32] 王乐, 陈泓岑, 张永红, 等. 基于网络药理学联合 16S rDNA 高通量测序技术分析丹参对感染大肠埃希菌小鼠肠道菌群的影响 [J]. *畜牧兽医学报*, 2022, 53 (10): 3695-3711.

(收稿日期: 2023-11-05; 修回日期: 2023-12-25)

基于血清药物化学和网络药理学研究双虎肿痛宁酊剂 抗炎镇痛的药效物质和作用机制

黄欣¹, 黄晓梅¹, 梁芬兰¹, 吴慧婕¹, 周艳林², 刘雪梅^{1*}, 王刚^{1, 3*} (1.广西中医药大学, 南宁 530200; 2.桂林三金药业股份有限公司, 广西 桂林 541004; 3.广西壮瑶药工程技术研究中心, 南宁 530200)

摘要: **目的** 基于超高效液相-四极杆飞行时间串联质谱联用技术 (UPLC-Q-TOF-MS/MS) 方法定性鉴定双虎肿痛宁酊剂的入血药效成分, 并结合网络药理学探究其抗炎镇痛的潜在作用机制。**方法** 通过对比含药血清、空白血清的色谱图, 并结合 PubChem、HMDB、MassBank 数据库二级谱图及对照品裂解信息, 分析鉴定双虎肿痛宁酊剂的入血成分。借助相关数据库对入血成分、疾病进行靶点收集筛选, 运用 Cytoscape 软件进行网络可视化处理; 对共有靶点进行基因本体 (GO) 富集分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。**结果** 在给药血清中初步鉴定出阿魏酸、新乌头碱、次乌头碱、4-羟基肉桂酸、甲芬那酸 5 个原形成分; 涉及白细胞介素-17 (IL-17)、肿瘤坏死因子 (TNF) 等信号通路, 改善、调节疼痛和炎症反应等过程, 发挥药理作用。**结论** 本实验通过结合 UPLC-Q-TOF-MS/MS 和网络药理学的方法明确了双虎肿痛宁酊剂的入血成分, 初步阐明了双虎肿痛宁酊剂抗炎镇痛的作用机制, 为临床应用提供了参考。

关键词: 双虎肿痛宁酊剂; 入血成分; 血清药物化学; 网络药理学

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)06-1544-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.022

Pharmacodynamic material basis and mechanisms of anti-inflammation and analgesic property of Shuanghu Zhongtongning tincture based on serum pharmacochemistry and network pharmacology

HUANG Xin¹, HUANG Xiao-mei¹, LIANG Fen-lan¹, WU Hui-jie¹, ZHOU Yan-lin², LIU Xue-mei^{1*}, WANG Gang^{1, 3*} (1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200; 2. Guilin Sanjin Pharmaceutical Company Limited, Guilin Guangxi 541004; 3. Zhuang Yao Medicine Center for Engineering and Technology, Nanning 530200)

Abstract: Objective To identify the compounds of Shuanghu Zhongtongning tincture absorbed into the serum by ultra-high performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS), and to determine the mechanism by network pharmacology. **Methods** By comparing the drug-contained serum and blank serum chromatograms, and combining with the spectrograms of PubChem, HMDB, MassBank and the cracking information of reference substance, the blood components of Shuanghu Zhongtongning tincture were analyzed and identified. The blood components and disease targets were collected and screened by relevant databases. Cytoscape was used for network visualization. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed for the common targets. **Results** Totally 5 components (ferulic acid, neoaconitine, hypaconitine, 4-hydroxycinnamic acid, and mefenamic acid) were identified. Shuanghu Zhongtongning tincture exerted therapeutic effect by regulating interleukin17

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.82060641); 中国博士后面上基金项目 (No.2019M653814XB); 广西教育厅项目 (No.2023KY0323); 广西自然科学基金项目 (No.2023GXNSFAA026387); 广西中医药大学校级课题基金项目 (No.2022JQ002)。

作者简介: 黄欣, 女, 在读硕士研究生, 主要从事药效物质基础研究, email: 3382285607@qq.com *通信作者: 刘雪梅, 女, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药新药研究, email: lenarecome@aliyun.com; 王刚, 男, 副研究员, 硕士研究生导师, 主要从事药物新制剂、新剂型研究与开发, email: 99329388@qq.com

(IL-17) and tumor necrosis factor (TNF) signaling pathways and further improving and regulating inflammatory response. **Conclusion** The blood entry components of Shuanghu Zhongtongning tincture are determined by combining UPLC-Q-TOF-MS/MS and network pharmacology. The action mechanism is preliminarily clarified, which provides a reference for its clinical application.

Key words: Shuanghu Zhongtongning tincture; the absorbed component in the serum; serum pharmacology; network pharmacology

双虎肿痛宁酊剂为桂林三金药业有限公司研发的外用制剂,由壮药搜山虎、黄杜鹃根、乌头等药材合理组方而成,主要用于跌打损伤、扭伤、摔伤、风湿关节痛等疾病的治疗,并可用于骨折及脱臼复位等手术局部麻醉止痛。尽管双虎肿痛宁酊剂上市多年,临床镇痛作用显著,但其物质基础及其发挥药效的作用机制并不明确。因此,本研究基于简单、高效的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 结合网络药理学对双虎肿痛宁酊剂的入血成分进行定性分析,明确其药效物质基础,阐明其潜在的抗炎镇痛的作用机制,为今后研究双虎肿痛宁酊剂提供一定的科学依据。

1 材料

1.1 仪器

Waters ACQUITY UPLC Xevo G₂Q-TOF 液质联用仪、Waters ACQUITY TQD system 三重四极杆液质联用仪、Masslynx 41 数据处理软件(美国 Waters 公司);旋转蒸发仪(巩义市禹华仪器责任有限公司,型号:YRE-2000A);电子天平(广州高铁计量检测股份有限公司,型号:0033591186);离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,型号:H1650-W)。

1.2 试药

双虎肿痛宁酊剂(桂林三金药业股份有限公司,批号:190302,规格:25 mL)。新乌头碱(批号:PU0406,纯度:98.5%)、次乌头碱(批号:191201,纯度:98.5%)、4-羟基肉桂酸(批号:PS1415,纯度:98%)(成都普思生物科技股份有限公司);对羟基苯甲酸(批号:20191229,纯度:99.8%)、甲芬那酸(批号:2190657,纯度:99.9%)(中国食品药品检定研究院);甲醇[赛默飞世尔科技(中国)有限公司,质谱级]。

1.3 实验动物

5 周龄雄性 SD 大鼠,体重 180 ~ 220 g, 30 只, SPF 级[湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(湘)2019-0014,使用许可证号:SYXK 桂 2022-0001]。实验动物

在广西中医药大学 SPF 级动物房饲养,实验通过广西中医药研究院实验动物伦理委员会批准许可(批件号:DW20221120-235),并遵循《实验动物管理条例》3R 原则对实验动物给予人道关怀。

2 方法

2.1 体内分析样品的制备

实验组给予双虎肿痛宁酊剂,取双虎肿痛宁酊剂 0.8 mL (给药剂量 $1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),涂擦于大鼠背部表面皮肤,给药面积 $1.5 \text{ cm} \times 1.5 \text{ cm}$,上方覆盖聚乙烯膜以防止挥发。空白组给等量生理盐水。给药后 0.5、1、2、4 和 8 h 分别于眼眶静脉取血 0.5 mL,血样置于肝素钠离心管中,以 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,上清液于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冷冻保存。精密量取 50 μL 含药血清样品或空白血清,加入 150 μL 甲醇,涡旋混匀 3 min,以 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,取上清液 150 μL ,即得体内分样品。

2.2 检测条件

色谱条件:色谱柱为 Phenomenex C18 ($100 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}$, $2.6 \mu\text{m}$),流动相为甲醇(A)-水(含 0.2% 乙酸)(B),梯度洗脱(0 ~ 3 min, 10% → 60%A; 3 ~ 5 min, 60% → 90%A; 5 ~ 8 min, 90% → 10%A);流速 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;柱温 $40 \text{ }^\circ\text{C}$;进样量 5 μL 。

质谱条件:正离子、负离子模式同时扫描;扫描模式:多反应监测模式;离子源:电喷雾离子源;毛细管电压:4 kV (+), 2 kV (-);锥孔电压:30 V;离子对: m/z 632.307 → 572.242 (新乌头碱), m/z 616.267 → 338.193 (次乌头碱), m/z 162.797 → 118.665 (4-羟基肉桂酸), m/z 192.809 → 133.677 (阿魏酸), 242.886 → 224.867 (甲芬那酸);碰撞能:20 eV;去溶剂温度: $350 \text{ }^\circ\text{C}$;离子源温度: $150 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

2.3 抗炎镇痛靶点的收集

参照《网络药理学评价方法指南》^[1],通过数据库 Gene Cards 和 DisGeNET 以“anti-inflammatory”“analgesia”和“pain”为关键词,收集对应的靶点。所得靶点均转化成 Uniprot ID 格式。

2.4 入血成分靶点的收集

将入血成分分别导入数据库 TCMSP、Pharm Mapper、Swiss Target, 获取各成分靶点, 整理去重后, 所得入血成分靶点均转化成 Uniprot ID 格式。

2.5 PPI 网络构建与分析

利用在线工具 Venny 2.1.0 获取入血成分靶点与疾病靶点的交集靶点。将交集靶点上传至 STRING 数据库进行分析, 设置“highest confidence > 0.4”, 去除游离靶点, 隐藏没有联系的靶点, 其余参数设置为默认值, 所得文件导入 Cytoscape 软件, 通过 Network Analysis 插件对网络拓扑特征进行分析, 得到交集靶点的 PPI 网络图。

2.6 入血成分-疾病-靶点网络构建及分析

将入血成分、疾病及靶点整理并导入 Cytoscape 软件中绘制“入血成分-疾病-靶点”网络图。

2.7 GO 富集分析与 KEGG 通路富集分析

将关键靶点输入至 DAVID 在线分析数据库, 进行 GO 富集分析与 KEGG 通路富集分析。以 $P \leq 0.01$ 为前提进行 GO 的生物过程 (biological process, BP), 细胞组分 (cell component, CC), 分子功能 (molecular function, MF)。KEGG 通路富集分析以 $P \leq 0.01$ 为筛选标准。

2.8 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8 软件进行单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和绘制统计图, 实验数据以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 双虎肿痛宁酊剂入血成分分析

本实验首先采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术分析含药血清样品和空白血清样品, 通过一级扫描筛选响应较高的离子, 进而对其进行二级质谱分析, 结合文献报道^[2], 推测可能含有的入血成分。结果如表 1 所示, 新乌头碱、次乌头碱、4-羟基肉桂酸、阿魏酸和甲芬那酸的裂解行为与文献报道几乎一致, 推测这些成分可能为入血成分。进一步利用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术和对照品比对对这些成分进行分析。结果如图 1 所示, 在 MRM 模式下比对空白血清、含药血清和对照品血清的保留时间, 发现含药血清中存在新乌头碱、次乌头碱、4-羟基肉桂酸、阿魏酸和甲芬那酸的离子对, 而且保留时间与对照品的一致, 在空白血清样品中 5 种成分的保留时间未见相应的色谱峰。以上结果证明该 5 种成分为双虎肿痛宁酊剂透皮吸收入血成分。

表 1 双虎肿痛宁酊剂化学成分解析结果

Tab 1 UPLC-Q-TOF-MS/MS of the chemical composition of Shuanghu Zhongtongning tincture

No.	t_R /min	化合物名	化学式	理论 m/z	实测 m/z	MS/MS (m/z)	误差 $/ \times 10^{-6}$	参考文献
1	2.12	4-羟基肉桂酸	$C_9H_8O_3$	162.7973	162.7670	118.6654	1.3	[2]
2	4.56	甲芬那酸	$C_{15}H_{15}NO_2$	242.8804	242.8801	224.9310, 209.7365, 178.6377, 160.9374, 104.5504	0.45	[2]
3	6.77	阿魏酸	$C_{10}H_{10}O_4$	195.0652	192.8093	177.6969, 148.8300, 133.6678, [M - H] ⁺ 116.8609	-0.9	[3]
4	14.50	次乌头碱	$C_{33}H_{45}NO_{10}$	617.2250	617.1064	556.2686, 524.2563, 338.1925, [M + H] ⁺ 105.0033, 496.2045, 464.1926	3.06	[4]
5	15.74	新乌头碱	$C_{33}H_{46}NO_{11}$	632.1084	632.1086	572.2418, 512.1775, 540.1634, [M + H] ⁺ 480.1655, 354.1652, 105.0693	-4.66	[4]

3.2 双虎肿痛宁酊剂入血成分抗炎镇痛的网络图

通过 TCMSP 和 Pharm Mapper、Swiss Target 数据库检索, 获取入血成分对应的潜在治疗靶点, 共 98 个靶点。通过检索 Gene Cards、DisGeNET 数据库, 共 962 个疾病靶点。将抗炎镇痛靶点与入血成分靶点交集, 共得到 49 个交集靶点。利用 Cytoscape 构建出双虎肿痛宁酊剂入血成分-抗炎镇痛-治疗靶点网络图 (见图 2)。该网络图中共包含 57 条节点数, 641 条边数, 表示入血成分-疾病-靶点相互作用关系。节点形状越大、颜色越深, 表明该节点与其他节点作用关系越密切, 在交集网络中越重要。其中, 甲芬那酸、4-羟基肉桂酸和阿魏

酸是贡献比较大的入血成分, 而白蛋白 (albumin, ALB)、前列腺素内过氧化物合成酶 2 (prostaglandin G/H synthase 2, PTGS2)、基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP9)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、雌激素受体 (estrogen receptor, ESR1) 可能是抗炎镇痛的关键靶点。

3.3 双虎肿痛宁酊剂入血成分抗炎镇痛的靶点 PPI 网络图

将交集靶点上传至 STRING 数据库, 结果导入 Cytoscape 软件进行网络拓扑分析和可视化呈现 (见图 3)。以度值 (degree)、中介中心性 (betweenness

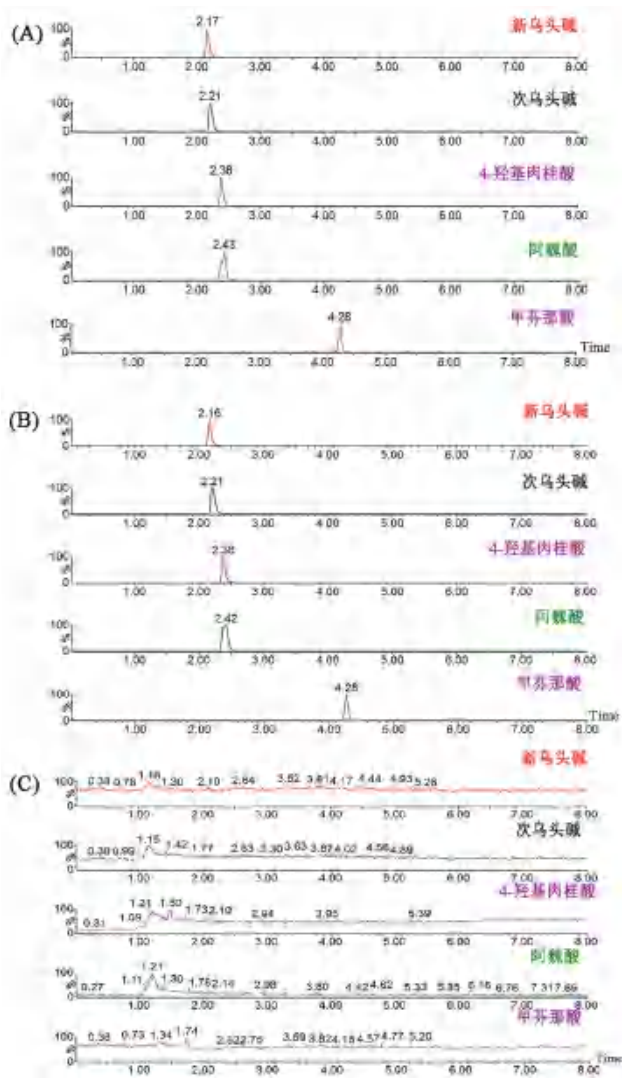


图 1 双虎肿痛宁酊剂含药血清 (A)、对照品血清 (B)、空白血清 (C) 色谱图

Fig 1 Chromatogram of medicated serum (A), reference serum (B) and blank serum (C) of Shuanghu Zhongtongning tincture

centrality, BC)、接近中心性 (closeness-centrality, CC) 为参数进行筛选, 该网络图中包括 49 个节点, 263 条边, 度值 ≥ 18.5 , $BC \geq 88.7$, $CC \geq 0.54$, 其中节点表示蛋白, 每条边表示蛋白与蛋白相互作用关系。排名靠前的 ALB、PTGS2、MMP9、EGFR 和 ESR1 可能是抗炎镇痛作用的关键靶点。

3.4 双虎肿痛宁入血成分抗炎镇痛的靶点富集分析

通过 DAVID 在线分析数据库对双虎肿痛宁酊剂关键抗炎镇痛靶点进行 GO 功能富集分析, 分别选取前 10 个分析条目绘制柱状图 (见图 4)。BP 主要富集在炎症反应的调节、烯烃化合物代谢过程及花生四烯酸代谢过程等。CC 主要涉及在囊腔、分泌颗粒内腔及胞质囊腔等。MF 主要体现在丝氨酸型肽酶活性等, 体现了双虎肿痛宁酊剂能够通过参与多种生物学途径发挥抗炎镇痛的作用。KEGG 通

路富集分析选取前 20 个富集结果绘制气泡图进行展示 (见图 5)。包括 IL-17 信号通路、花生四烯酸代谢、炎症介质对色氨酸通道的调节、TNF 信号通路、磷脂酰肌醇-3-激酶-苏氨酸/丝氨酸蛋白激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase-serine/threonine-protein kinase, PI3K-Akt) 信号通路等, 体现了双虎肿痛宁酊剂发挥抗炎镇痛呈现出多途径的作用特点。

4 讨论

为深入研究双虎肿痛宁酊剂的物质基础, 本研究基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 法的血清药物化学研究定性鉴别出双虎肿痛宁酊剂中 5 个入血化学成分, 分别为阿魏酸、4-羟基肉桂酸、甲芬那酸、新乌头碱和次乌头碱。有研究表明, 入血成分可能为药效成分。其中 4-羟基肉桂酸能够显著抑制细胞分泌 TNF- α 和 IL-6, 而甲芬那酸能够有效降低小鼠的扭体次数, 两者协同发挥镇痛作用^[5-7]。Park 等^[8]发现 4-羟基肉桂酸能使胞外信号炎症蛋白的活性显著降低, 有效抑制气道炎症反应。甲芬那酸是非甾体抗炎药的一种, 作为环氧化酶-2 (COX-2) 的非选择性抑制剂, 它能够显著降低前列腺素 (PGs) 的合成, 进而产生持久的解热抗炎作用^[9]。新乌头碱、次乌头碱为 C19 型二萜生物碱, 其通过趋化因子介导的白细胞趋化作用, 影响前列腺素代谢, 抑制炎症细胞因子的产生, 从而发挥抗炎作用^[10]。有研究表明阿魏酸能够有效抑制细胞因子 TNF- α 、IL-6、炎性介质一氧化氮 (nitric oxide, NO) 和前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2) 合成^[11]。另外, 血药浓度变化与其发挥抗炎镇痛作用成正相关^[12-13], 本课题组前期研究通过药动力学实验发现皮肤给药 5 个入血成分生物利用度优于口服给药, 半衰期均小于 5.4 h, 达峰时间均小于 3.4 h, 说明入血成分快速吸收, 生物利用度较高, 这对发挥抗炎镇痛作用非常关键^[2]。

富集结果显示, 双虎肿痛宁酊剂抗炎镇痛相关的通路主要涉及 IL-17 信号通路、花生四烯酸代谢、炎症介质对色氨酸通道的调节、TNF 信号通路、PI3K-Akt 信号通路等多种生物学过程。其中, TNF 通过调控 TNF 信号通路能够发挥抗炎镇痛的作用^[14]。PI3K-Akt 信号通路通过影响炎症细胞、炎性因子以及下游靶点来调控炎症的反应过程^[15]。IL-17 是通过调节胞内信号传导分子巨噬细胞 NF- κ B 活化因子 1 (nuclear factor kappa B activator 1, ACT1) 和肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (tumor necrosis factor receptor-related factor 6, TRAF6), 进

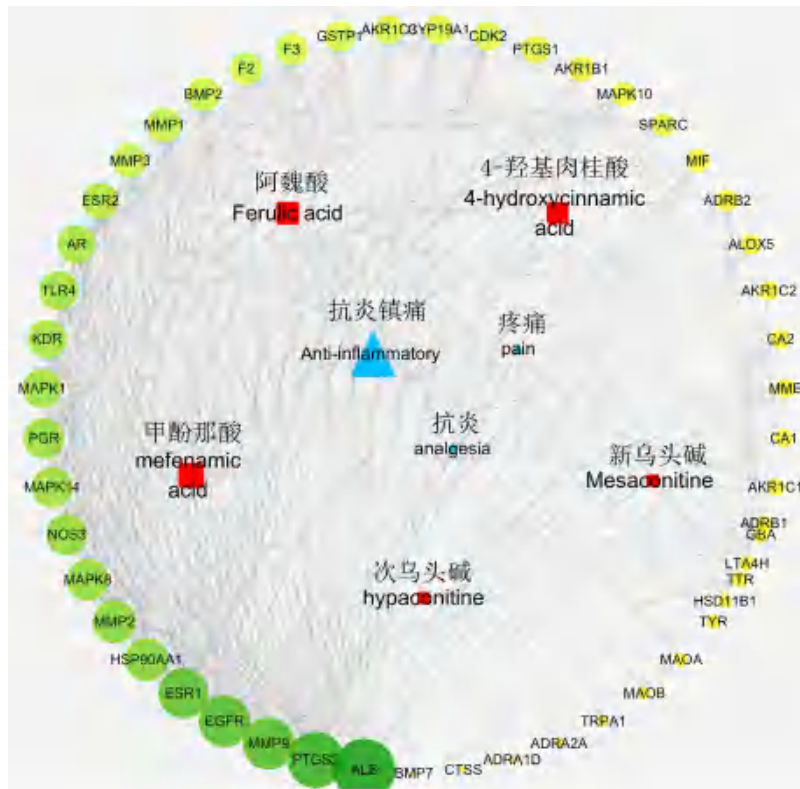


图 2 入血成分-疾病-靶点网络图
Fig 2 Network diagram of blood component-disease-target

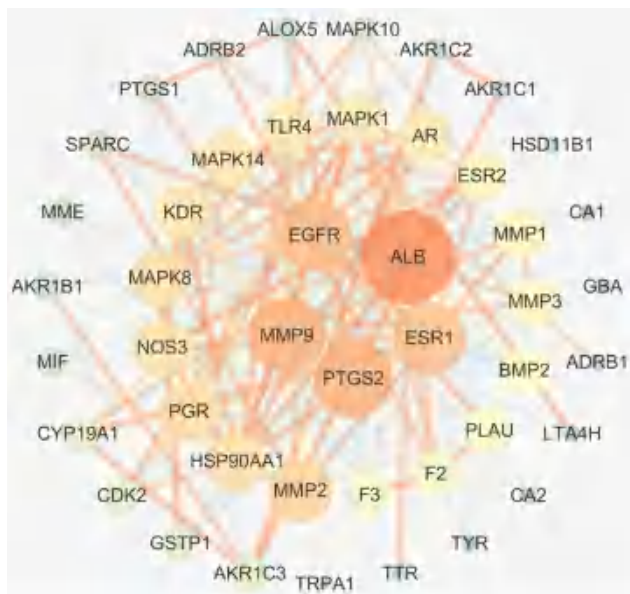


图 3 双虎肿痛宁酊剂抗炎镇痛交集靶点 PPI 网络图
Fig 3 PPI network diagram of Shuanghu Zhongtongning tincture on anti-inflammatory and analgesic

而激活 NF- κ B 通路, 调控机体的炎症反应^[16]。因此, TNF、PI3K-Akt 和 IL-17 可能是双虎肿痛宁酊剂抗炎镇痛的关键通路。

综合“入血成分-疾病-靶点”网络与 PPI 分析结果, 筛选出 ALB、PTGS2、MMP9、EGFR、ESR1 靶点。其中, ALB 为肝脏合成, 当组织损伤或炎症

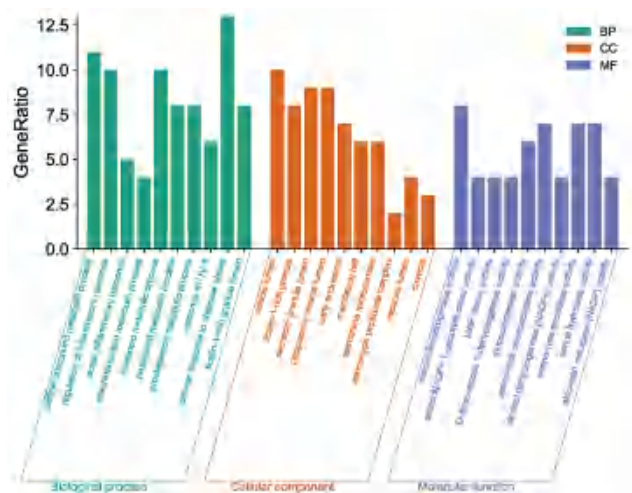


图 4 GO 富集分析
Fig 4 Enrichment analysis diagram of GO

引起的 ALB 分解代谢增加时, 组织渗透压会降低而引起水肿, 因此 ALB 是抗炎镇痛中的关键靶点之一^[17]。PTGS2 是一种 PTGS 的诱导型同工酶 (COX-2), COX-2 是抑制前列腺素介导的炎症反应和疼痛的经典药物靶点^[18]。MMP9 主要表达于炎症反应的中性粒细胞和巨噬细胞中^[19]。EGFR 为表皮生长因子受体, 体内外研究表明, EGFR 可以介导慢性炎症和氧化应激^[20-21]。ESR1 与激素形成激素-受体复合物, 使激素发挥其生物学效应, 且研究发现其在减

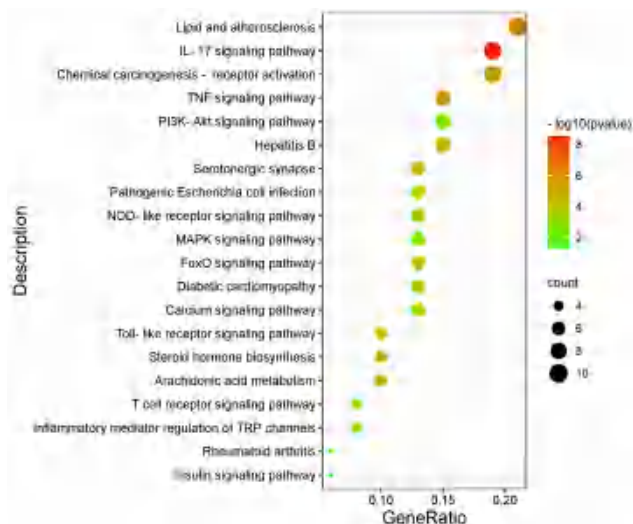


图 5 KEGG 通路富集分析

Fig 5 Enrichment analysis diagram of KEGG

轻肾脏炎症方面发挥着重要作用^[22]。综上所述，双虎肿痛宁酊剂可能是通过入血活性成分阿魏酸、4-羟基肉桂酸、甲芬那酸、乌头碱和次乌头碱，靶向 ALB、PTGS2、MMP9、EGFR、ESR1，进而调控 IL-17 信号通路、花生四烯酸代谢、炎症介质对色氨酸通道的调节、TNF 信号通路、PI3K-Akt 信号通路等发挥抗炎镇痛作用。本研究初步阐释了双虎肿痛宁酊剂抗炎镇痛的物质基础和作用机制，可为今后双虎酊剂的研究提供参考。

参考文献

[1] 网络药理学评价方法指南[J]. 世界中医药, 2021, 16 (4): 527-532.

[2] Jing XR, Lei MY, Qin LX, et al. Development of a UPLC-MS/MS method for the determination of active ingredients of Shuang Hu in rat blood and its application in pharmacokinetics [J] Biomed Chromatogr, 2022, 20: e5533.

[3] 刘燕, 聂黎行, 戴忠, 等. HPLC 和 UPLC 法测定活血止痛制剂中阿魏酸[J]. 药物分析杂志, 2012, 32 (7): 1264-1266, 1271.

[4] 高珊, 唐蕾, 赵伟国, 等. 止痛擦剂中新乌头碱、次乌头碱和乌头碱含量测定研究[J]. 今日药学, 2020, 30 (9): 616-619.

[5] 刘爽, 戴宇滢, 赵爽同, 等. 基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 技术分析桂附地黄丸的化学成分及入血成分[J]. 中南药学, 2023, 21 (8): 2069-2075.

[6] 时潇丽, 马静雅, 刘力. 基于 LC-MS/MS 分析鹿角方的入血移行成分[J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39 (18): 1827-1832.

[7] 王刚, 邹准, 周艳林, 等. 瑶药材搜山虎的化学成分研

究[J]. 中草药, 2021, 52 (21): 6466-6472.

[8] Park SH, Ko JW, Shin NR, et al. 4-Hydroxycinnamic acid protects mice from cigarette smoke-induced pulmonary inflammation via MAPK pathways [J]. Food Chem Toxicol, 2017, 110: 151-155.

[9] 冯小叶. 甲芬那酸通过抑制慢性应激诱导的小胶质细胞激活来缓解神经炎症并改善抑郁症状[D]. 天津: 天津大学, 2019.

[10] 安婧娴, 刘芳, 刘芳, 等. 近年来乌头属植物二萜生物碱化学成分及其镇痛活性研究进展[J]. 中南药学, 2016, 14 (5): 521-525.

[11] 郭振环, 李向辉, 张志强, 等. 羌活活性成分阿魏酸对猪细小病毒增殖及炎症因子表达的影响[J]. 动物医学进展, 2022, 43 (3): 48-52.

[12] Shaheen N, Azam A, Ganguly A, et al. Analgesic activities and anti-inflammatory of black cumin BC, *Nigella sativa* L extracts in in vivo model systems [J]. Bull Natl Res Cent, 2022, 46 (26). doi: 10.1101/2021.06.05.447226.

[13] Guilherme VA, Cunha VRR, De Paula E, et al. Anti-inflammatory and analgesic evaluation of a phytochemical intercalated into layered double hydroxide [J]. Pharmaceutics, 2022, 14 (5): 934.

[14] Du HZ, Hou XY, Guo YJ, et al. Classic mechanisms and experimental models for the anti-inflammatory effect of traditional Chinese medicine [J]. Animal Model Exp Med, 2022, 5 (2): 108-119.

[15] 梁可克, 王志旺, 黄柯婷, 等. PI3K-Akt 信号通路调控慢性阻塞性肺疾病气道炎症反应的研究新进展[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2022, 21 (10): 751-755.

[16] 谢庆云. IL-17 信号通路关键基因 DNA 甲基化在骨关节炎软骨炎症中的作用及机制研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2017.

[17] 柳杨青, 汪艳芳, 郭丽君. 2 型糖尿病患者血清白蛋白水平变化及影响因素分析[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2019, 33 (11): 1085-1088.

[18] Hellmann J, Tang YT, Zhang MJ, et al. Atf3 negatively regulates Ptg2/Cox2 expression during acute inflammation [J]. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2015, 116-117.

[19] 朱文卿, 李玲玉, 张利, 等. 咖啡酰奎宁酸类化合物抑菌活性的网络药理学研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42 (13): 11-20.

[20] Sheng L, Bayliss G, Zhuang S. Epidermal growth factor receptor: a potential therapeutic target for diabetic kidney disease [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 598910.

[21] 刘丽, 杨洋, 张万里, 等. 厄洛替尼治疗晚期 EGFR 敏感突变肺腺癌对血管内皮功能及机体慢性炎症反应的影响[J]. 陕西医学杂志, 2018, 47 (10): 1275-1277.

[22] Ma HY, Chen S, Du Y. Estrogen and estrogen receptors in kidney diseases [J]. Ren Fail, 2021, 43 (1): 619-642.

(收稿日期: 2023-11-20; 修回日期: 2024-01-12)

基于指纹图谱、网络药理学预测黄芪“补气升阳”功效的质量标志物

王七龙¹, 井亚江¹, 黄建萍¹, 王祥¹, 安佳¹, 王育朋², 张岗¹, 彭亮¹, 高静¹, 王昌利¹, 颜永刚^{1*}
(1. 陕西中医药大学药学院/陕西省秦岭中草药应用开发工程技术研究中心/“秦药”研发重点实验室, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西海天制药有限公司, 陕西 咸阳 712000)

摘要: **目的** 基于 HPLC-ELSD 指纹图谱、网络药理学和分子对接技术预测黄芪“补气升阳”相关功效的质量标志物 (Q-marker)。**方法** 针对黄芪“补气升阳”的功效进行药效学实验。应用 HPLC-ELSD 技术建立不同黄芪样品的指纹图谱, 获取黄芪完整的化学成分信息。借助网络药理学研究技术手段, 对多种数据库筛选得到的黄芪化学成分作用靶点与相关通路进行预测分析, 构建蛋白互作网络、“成分-靶点-通路-疾病”图。使用分子对接技术将质量标志物与核心靶点进行对接验证, 预测黄芪发挥“补气升阳”功效的成分。**结果** 药效学实验证明黄芪水煎液可下调机体丙二醛 (MDA)、乳酸 (LD) 积累、肌酸激酶 (CK) 活力、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平; 上调三磷酸腺苷 (ATP)、二磷酸腺苷 (ADP)、脾脏指数、胸腺指数以达到补气、延缓疲劳、抗炎抗肿瘤等“补气升阳”类作用; 黄芪指纹图谱指认了 10 个共有峰, 结合网络药理学方法对候选化学成分进行分析, 筛选获得 14 个核心靶点, 20 条代谢通路。分子对接结果显示, 预测的质量标志物与靶标分子结合良好。**结论** 从质量标志物可测性和有效性的原则出发, 结合药效学实验、指纹图谱、网络药理学、分子对接技术, 将黄芪传统功效与现代疾病紧密联系对应, 初步预测黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、异黄芪皂苷 I 这 5 种成分为黄芪发挥“补气升阳”功效的质量标志物。

关键词: 黄芪; 质量标志物; 指纹图谱; 网络药理学; 分子对接; 药效学

中图分类号: R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)06-1550-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.023

Quality markers for *Astragalus membranaceus* in tonifying qi and lifting yang based on fingerprint and network pharmacology

WANG Qi-long¹, JING Ya-jiang¹, HUANG Jian-ping¹, WANG Xiang¹, AN Jia¹, WANG Yu-peng², ZHANG Gang¹, PENG Liang¹, GAO Jing¹, WANG Chang-li¹, YAN Yong-gang^{1*} (1. Shaanxi University of Chinese Medicine/Shaanxi Qinling Application Development and Engineering Center of Chinese Herbal Medicine/Qin Medicine Research & Development Key Laboratory, Xianyang Shaanxi 712046; 2. Shaanxi Haitian Pharmaceutical Co., Ltd., Xianyang Shaanxi 712000)

Abstract: Objective To determine quality markers for *Astragalus membranaceus* tonifying qi and lifting yang based on HPLC-ELSD fingerprint network pharmacology and molecular docking. **Methods** Pharmacodynamic experiment was conducted. HPLC-ELSD was used to establish fingerprints of different *Astragalus membranaceus* samples and obtain the complete in *Astragalus membranaceus* chemical compositions information. With network pharmacology, the chemical targets and related pathways of *Astragalus membranaceus* were selected from various databases for analysis and established the protein interaction network and the composition-target-pathway-disease graph. Molecular

基金项目: 陕西省中医药管理局专项项目:“第二批省级中医药中青年科技骨干人才项目”(No. 2023-ZQNY-003); 陕西中医药大学“秦药”品质评价与资源开发学科创新团队项目 (No. 2019-QN01); 内蒙古自治区科技重大专项 (No. 2019ZD005)。

作者简介: 王七龙, 男, 硕士研究生, 主要从事中药资源与鉴定方面的研究, email: 330174320@qq.com ***通信作者:** 颜永刚, 男, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药资源与鉴定、中药品种品质与资源开发及中药质量标准方面的研究, email: yunfeng828@163.com

docking was used to verify the quality markers and core targets, and to predict the components of *Astragalus membranaceus* in tonifying qi and lifting yang. **Results** Pharmacodynamic experiments showed that the decoction of *Astragalus membranaceus* down-regulated the levels of malondialdehyde, lactic acid accumulation, creatine kinase activity, and tumor necrosis factor- α , and up-regulated the levels of adenosine triphosphate, adenosine diphosphate, splenic index, and thymus index to tonifying qi and lifting yang, delay fatigue, and exert anti-inflammatory and anti-tumour effects. The fingerprint of *Astragalus membranaceus* identified 10 common peaks. Together with the network pharmacology, the candidate chemical components were analysed and screened to obtain 14 core targets and 20 metabolic pathways. The molecular docking showed that the predicted quality markers bound well to the target molecules. **Conclusion** Based on measurability and validity of quality markers, combining pharmacodynamic experiments, fingerprinting, network pharmacology, and molecular docking, we related the traditional efficacy of *Astragalus membranaceus* to modern diseases, and preliminarily predict that astragaloside, mauritian isoflavone glucoside, astragaloside II, astragaloside III, and isoastragaloside I, are the five core chemical components of *Astragaloside membranaceus*. They tonifying qi and lifting yang through the modulation of multiple target sites and multiple pathways.

Key words: *Astragalus membranaceus*; quality marker; fingerprinting; network pharmacology; molecular docking; pharmacodynamics

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根, 首次记述于《神农本草经》中“气微甘, 微温, 无毒”, 被列为上品^[1]。《本草纲目》中记载黄芪为“补气诸药之最”^[2]。黄芪产区众多, 广泛分布于我国内蒙古、甘肃、新疆、山西等地, 是我国重要的大宗药材。

现代药理研究发现黄芪在抗疲劳、增强免疫力、抗肿瘤等方面发挥作用与其功效“补气升阳”密切相关, 因此本研究建立大鼠“气虚”模型, 对黄芪水煎液进行药效学研究, 以预测黄芪发挥“补气升阳”功效的质量标志物。指纹图谱是一种中药质量控制与检测的重要方法之一, 针对中药及其制剂的“复杂性”与“整体性”特点, 能够较为全面地反映物质的所有信息, 是预测及筛选中药及相关制剂的质量标志物的有效手段^[3]。网络药理学研究思路与结论强调整体、系统与协同^[4]。

中药材产地来源广泛, 成分复杂。且中药质量的评价标准存在单一化、碎片化的倾向^[5]。以《中国药典》^[6]项下关于黄芪含量测定项为例, 药典仅规定黄芪甲苷与毛蕊异黄酮葡萄糖苷两种化学成分的检测限度, 无法全面反映其质量的完整性。中药质量评价中有效性和安全性的逐渐淡化, 割裂了“物-效”之间的关系。针对这些问题, 刘昌孝院士在 2016 年提出中药质量标志物 (Q-marker) 这一质量控制的概念^[7], 确定中药质量标志物的“五原则”理论^[8]。本研究建立不同产

地黄芪的指纹图谱, 获取其成分信息, 结合网络药理学技术和分子对接技术, 从整体观念和分子层面出发, 预测黄芪发挥“补气升阳”这一功效的质量标志物, 研究其对靶点、通路在治疗过程中的作用机制, 为后续完善黄芪质量控制标准提供基础与思路。

1 材料

1.1 仪器

TY2021000834 全波长酶标仪 (美国伯腾仪器有限公司), S3000 高效液相仪 (华谱科仪, 北京科技有限公司), UM5800 plus 蒸发光检测器 (上海通微分析技术有限公司), XWK-III 空气发生器 (天津市津分分析仪器有限公司), SB-5200DT 超声波清洗机 (宁波新芝生物科技股份有限公司), JM-B5002 电子天平 (宁波市纪铭称重设备有限公司), DK-98-II A 电热恒温水浴锅 (天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.2 实验动物

6 周龄 SPF 级 SD 大鼠, 雌雄各半, 体重 (180±20) g [成都达硕实验动物有限公司, 合格证号: SCXK (川) 2020-0030], 饲养于陕西中医药大学中药药理实验室。本实验符合实验动物伦理相关规定和管理条例, 由陕西中医药大学动物伦理委员会批准 (批件号: SUCMDL20230519002)。

1.3 试药

黄芪饮片 (批号: 20230629, 河北省定州市医药有限公司), 阳性药为补中益气丸 (水丸) (每 100 粒重 6 g, 批号: 22082334, 北京同仁堂

科技发展股份有限公司制药厂)。超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、血清乳酸(LD)、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(南京建成生物医学工程研究所);肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、肝脏三磷酸腺苷(ATP)、肝脏二磷酸腺苷(ADP)、肌酸激酶(CK)、白细胞介素2(IL-2)试剂盒(江苏酶免实业有限公司)。

乙腈、甲醇(色谱级,瑞典OCEANPAK公司);无水乙醇、甲酸(分析纯,天津市富宇精细化工有限公司);纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司);毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号:21022604)、芒柄花苷(批号:19071501)、毛蕊异黄酮(批号:21032501)、芒柄花素(批号:20121601)、黄芪甲苷(批号:20072202)、黄芪皂苷Ⅲ(批号:21031806)、黄芪皂苷Ⅱ(批号:20082603)、异黄芪皂苷Ⅱ(批号:21031805)、黄芪皂苷Ⅰ(批号:21022604)(纯度均 $\geq 98\%$,南昌贝塔生物科技有限公司);异黄芪皂苷Ⅰ(批号:P24J10F80493,纯度 $\geq 98\%$,上海源叶生物科技有限公司)。

黄芪药材采于甘肃、陕西、内蒙古、河北各市县共28个样本;黄芪药材及饮片经陕西中医药大学王继涛高级实验师鉴定为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根,见表1。

表1 28批黄芪药材产地信息

Tab 1 Information of 28 batches of *Astragalus membranaceus*

编号	基原	产地	编号	基原	产地
S1	蒙古黄芪	内蒙古鄂尔多斯	S15	蒙古黄芪	内蒙古通辽
S2	蒙古黄芪	甘肃定西	S16	蒙古黄芪	甘肃定西
S3	蒙古黄芪	内蒙古阿拉善	S17	蒙古黄芪	甘肃宕昌
S4	蒙古黄芪	甘肃定西	S18	蒙古黄芪	甘肃定西
S5	蒙古黄芪	内蒙古通辽	S19	膜荚黄芪	甘肃陇南
S6	膜荚黄芪	甘肃陇南	S20	蒙古黄芪	河北保定
S7	蒙古黄芪	内蒙古赤峰	S21	蒙古黄芪	内蒙古兴安盟
S8	蒙古黄芪	内蒙古呼和浩特	S22	膜荚黄芪	甘肃临夏
S9	蒙古黄芪	内蒙古包头	S23	蒙古黄芪	甘肃陇西
S10	膜荚黄芪	陕西宝鸡	S24	蒙古黄芪	甘肃定西
S11	蒙古黄芪	河北安国	S25	膜荚黄芪	甘肃临夏
S12	蒙古黄芪	内蒙古通辽	S26	膜荚黄芪	陕西咸阳
S13	蒙古黄芪	河北邯郸	S27	蒙古黄芪	内蒙古锡林郭勒
S14	膜荚黄芪	甘肃兰州	S28	蒙古黄芪	内蒙古鄂尔多斯

2 方法与结果

2.1 药效学实验

2.1.1 试药的制备 ① 黄芪水煎液:取黄芪饮片,以10倍量水煎煮至微沸1h,滤过,药渣加8倍量水煎煮至微沸45min。滤过,合并两次滤液,浓缩至 $1\text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $-4\text{ }^\circ\text{C}$ 冷藏保存。② 阳

性药的制备:取补中益气丸,捣碎,加水溶解至 $1\text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $-4\text{ }^\circ\text{C}$ 冷藏保存。

2.1.2 大鼠模型的建立及给药 大鼠适应性饲养7d,实验开始前3d于50cm深水桶中适应性游泳5min,分组前1d,进行力竭游泳(大鼠游泳最后沉入水底,鼻尖浸于水面下10s以上不能上浮即为力竭),记录游泳时间,剔除时间差异较大的大鼠。将大鼠随机分为模型组、黄芪水煎液低剂量组(低剂量组)、黄芪水煎液高剂量组(高剂量组)、阳性药组,每组8只,空白组正常饲养,不做特殊处理;其余4组采用“游泳力竭+饮食不节”法^[9]构建气虚动物模型,每日上午7:00在水桶中进行力竭游泳,禁食1d后,隔日限量饲料饲养,造模连续21d。空白组大鼠摄食饮水正常,皮毛顺滑有光泽,精神状态良好,活动正常,反应灵敏,大便成形。模型组大鼠活动能力明显减少,精神萎靡,出现炸毛现象,毛发无光泽,大便出现松软、溏泻现象,上述证候符合中医气虚的辨证诊断,判定为造模成功。每日造模后给药1次,连续21d,阳性组每日灌胃补中益气丸 $1.62\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (以生药量计,蒸馏水溶解),结合临床用量,低剂量组每日灌胃黄芪水煎液 $2.70\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,高剂量组每日灌胃 $10.8\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,空白组按体重给予蒸馏水灌胃。实验过程中观察大鼠精神状态、游泳时间、体重、二便情况、皮毛色泽等的变化。末次给药结束后,记录各组大鼠游泳时间,禁食12h,麻醉后取血以及大鼠胸腺、肝脏、脾脏,用冰冷生理盐水冲洗干净,滤纸吸干水分后迅速称定重量,包裹锡箔纸放入液氮后转移至 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中待用。

2.1.3 指标检测 使用电子天平对各组大鼠的体重、胸腺质量、脾脏质量进行称量,计算得到胸腺指数与脾脏指数;使用计时器对实验大鼠的末次游泳时间进行计时;对大鼠的肝脏做匀浆处理,使用试剂盒检测ATP、ADP等指标;将大鼠的血清与血浆分离,使用试剂盒检测大鼠血清及血浆所含CK、IL-2、LD、MDA、TNF- α 、SOD、LDH等指标,各项指标严格按照试剂盒说明书进行操作。

2.1.4 药效学实验结果 与空白组比较,模型组大鼠在游泳时间、体重、脾脏指数、CK、MDA、LD等指标均具有显著差异;与模型组比较,各给药组的SOD、LDH,低剂量组的胸腺指数和TNF- α ,阳性组的ADP、ATP、IL-2无显著差异,其余指标差异均具有统计学意义(见图1)。

2.2 指纹图谱分析

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Waters C18(4.6mm \times

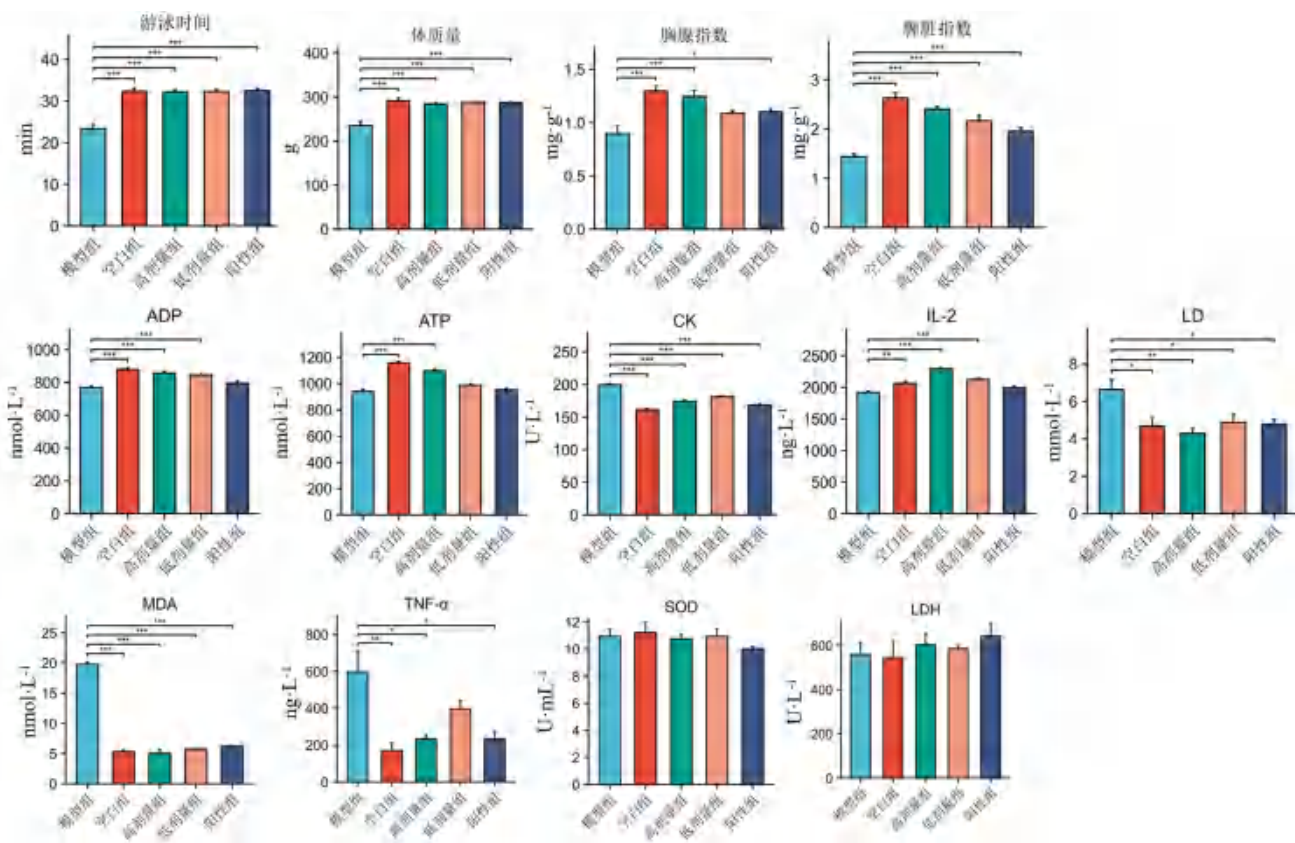


图 1 黄芪水煎液对各指标的影响情况

Fig 1 Effect of *Astragalus membranaceus* decoction on indicators

250 mm, 5 μm) 柱; 流动相: 0.3% 甲酸水 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 13 min, 18%B; 13 ~ 43 min, 18% ~ 30%B; 43 ~ 60 min, 30% ~ 55%B; 60 ~ 70 min, 55% ~ 70%B; 70 ~ 80 min, 70% ~ 100%B; 80 ~ 90 min, 100% ~ 18%B); 流速 1 mL · min⁻¹; 柱温 25 °C; 蒸发光散射检测器; ELSD 漂移管温度 60 °C; 气体流速 2.5 mL · min⁻¹; 信号增益 5; 进样量 10 μL; 供气压力 0.4 MPa。

2.2.2 供试品溶液制备 称定供试品 5 g 于锥形瓶中, 精密加入无水乙醇 100 mL, 冷浸 10 h, 超声 (250 W, 40 kHz) 处理 100 min, 放冷并抽滤。收集滤渣, 加入 50 mL 无水乙醇, 超声 100 min, 抽滤后合并两次滤液, 蒸干, 残渣用甲醇定容至 10 mL 量瓶中。

2.2.3 对照品溶液制备 取黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、异黄芪皂苷 I、异黄芪皂苷 II、黄芪甲苷、芒柄花苷、芒柄花素对照品适量, 甲醇定容于 10 mL 量瓶中, 配成 0.657、0.567、0.509、0.626、0.422、0.150、0.658、0.268、0.615、0.614 mg · mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2.4 精密度实验 取样品 S15 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 以“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 以毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (1 号峰) 为参照峰, 计算各共有峰相对保留时间 RSD 均小于

1.3%, 相对峰面积 RSD 均小于 0.93%。

2.2.5 重复性实验 取样品 S15 按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 以毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (1 号峰) 为参照峰, 计算各共有峰相对保留时间 RSD 均小于 2.6%, 相对峰面积 RSD 均小于 1.4%。

2.2.6 稳定性实验 取样品 S15 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样, 以毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (1 号峰) 为参照峰, 计算各共有峰相对保留时间 RSD 均小于 2.2%, 相对峰面积 RSD 均小于 2.6%。

2.2.7 指纹图谱的建立及评价 色谱结果使用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2012 版分析。设置参照峰, 经多点校正、Mark 峰匹配等操作, 获得叠加指纹图谱, 使用 Origin 2021.9.8.0 软件处理。

2.3 黄芪指纹图谱与共有峰的指认

取 28 批供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 将图谱信息导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2012 版软件分析。以 S7 为参照峰, 经多点校正、Mark 峰匹配、中位数法进行全谱峰匹配, 获得叠加图谱与对照图谱信息, 见图 2。对照指纹图谱与混合对照品图谱见图 3。利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2012 版软件计算 28 批黄芪样品相似度, 结果见表 2。结果显示样品相

似度在 0.858 ~ 0.993, 表明样品总体质量稳定, 所建立的指纹图谱方法能够为黄芪的质量控制和鉴别提供指导。由指纹图谱结果共标定 15 个共有峰。对比混合对照品保留时间, 共指认 10 个色谱峰: 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (1 号峰)、芒柄花苷 (2 号峰)、毛蕊异黄酮 (3 号峰)、黄芪甲苷 (6 号峰)、黄芪皂苷 III (7 号峰)、芒柄花素 (8 号峰)、黄芪皂苷 II (9 号峰)、异黄芪皂苷 II (10 号峰)、黄芪皂苷 I (11 号峰)、异黄芪皂苷 I (12 号峰)。

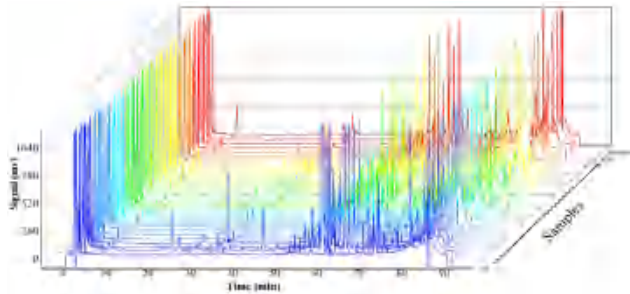


图 2 黄芪样品 HPLC 叠加图谱与对照图谱
Fig 2 Superimposed and comparison fingerprint of *Astragalus membranaceus*

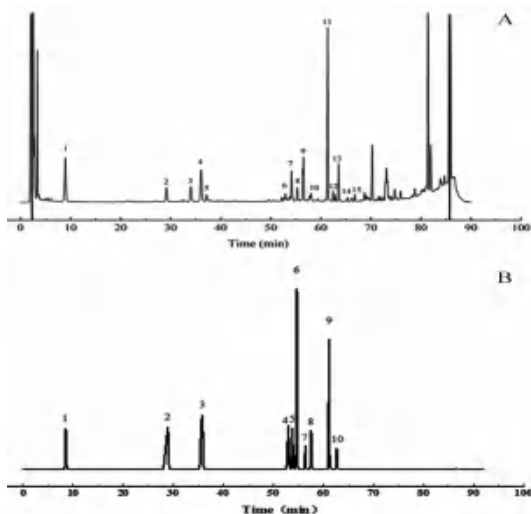


图 3 黄芪样品对照指纹图谱 (A) 与混合对照品图谱 (B)
Fig 3 Comparison fingerprint (A) and chromatogram of reference substance (B) of *Astragalus membranaceus*

1. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (calycosin-7-glucoside); 2. 芒柄花苷 (formononetin); 3. 毛蕊异黄酮 (calycosin); 4. 黄芪甲苷 (astragaloside IV); 5. 黄芪皂苷 III (astragalus saponin III); 6. 芒柄花素 (formononetin); 7. 黄芪皂苷 II (astragalus saponin II); 8. 异黄芪皂苷 II (isoastragalus saponin II); 9. 黄芪皂苷 I (astragalus saponin I); 10. 异黄芪皂苷 I (isoastragalus saponin I)

2.4 网络药理学预测分析

2.4.1 黄芪活性成分与疾病靶点筛选 检索 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、TCMSP (<https://tcmsp-e.com/>)、Swiss astheniatarget (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 数据库, 使用 Uniport (<https://www.uniprot.org/>) 数据库对化合物

表 2 28 批黄芪相似度评价结果

Tab 2 Similarity evaluation of 28 batches of *Astragalus membranaceus*

批次	相似度	批次	相似度
S1	0.925	S15	0.980
S2	0.979	S16	0.993
S3	0.968	S17	0.978
S4	0.980	S18	0.979
S5	0.983	S19	0.989
S6	0.992	S20	0.950
S7	0.962	S21	0.952
S8	0.962	S22	0.976
S9	0.980	S23	0.981
S10	0.902	S24	0.987
S11	0.949	S25	0.981
S12	0.968	S26	0.858
S13	0.964	S27	0.962
S14	0.990	S28	0.955

和基因名进行规范处理, 获得候选成分相关靶点信息。以“asthenia”“diarrhea with spleen asthenia”“Qi asthenia”“malnutrition”为关键词在 GeneCards 数据库获得疾病靶点。通过 Venny 平台 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>), 获取药物 - 疾病交集靶点。以候选成分预测到药物靶点 81 个, 通过 GeneCards 数据库获取疾病靶点 1008 个, 通过 Venny 平台获取交集靶点 26 个。

2.4.2 PPI 网络构建与核心靶点筛选 将筛选到的靶点输入在线 STRING 11.0 (<https://cn.string-db.org/>) 数据库, 选择物种为“人”(homo sapiens), 设置最小交互值 (minimum required interaction score) 为高置信度 (height confidence) 0.7。以 TSV 格式保存后导入 Cytoscape 3.7.2 软件进行拓扑分析, 筛选核心靶点, 并构建 PPI (protein-protein interaction, PPI) 网络, 结果见图 4。在 Cytoscape 3.7.2 软件中设置筛选核心靶点指标: 以度值 (degree) ≥ 6 , 介数中心性 (betweenness centrality) 和接近中心性 (closeness centrality) 均大于中位数为条件, 筛选符合条件的靶点。获得核心靶点 14 个。具体见表 3。

2.4.3 GO 与 KEGG 富集分析 将“2.4.2”项下筛选得到的 26 个核心靶点导入 Metascape (<https://metascape.org/gp/index.html>) 数据库, 进行 GO 功能富集分析与 KEGG 通路富集分析。结果在 GO 功能富集分析中获得了生物过程 (biological process, BP) 26 个, 细胞组分 (cell component, CC) 26 个, 分子功能 (molecular function, MF) 26 个。取前 10 个重要条目作图; KEGG 通路富集分析获得 23 条通路, 取前 20 个作图。这些通路主要富集到苯丙氨酸代谢、缝隙连接、癌症中心碳代谢等。说明核心靶点可能是通过作用这些通路达到黄芪增强机体免疫、抗炎、抗肿瘤的药理作用, 见图 5。

2.4.4 “成分 - 靶点 - 通路 - 疾病”网络构建 将前期

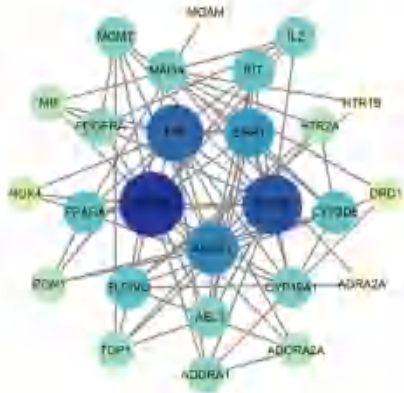


图 4 黄芪“补气升阳”的 PPI 网络
Fig 4 Protein-protein interaction network diagram of *Astragalus membranaceus* tonifying qi and lifting yang

表 3 黄芪“补气升阳”核心靶点

Tab 3 Core targets *Astragalus membranaceus* tonifying qi and lifting yang

No.	靶标	蛋白名	数值	介数中接近中心性	接近中心性
1	VEGFA	血管内皮生长因子 A	16.0	0.189	0.68
2	EGFR	表皮细胞生长因子受体	14.0	0.096	0.60
3	TNF	肿瘤坏死因子	13.0	0.123	0.63
4	ABCB1	ATP 结合盒转运体蛋白 B1	11.0	0.125	0.58
5	ESR1	雌激素受体 1	10.0	0.054	0.57
6	KIT	KIT 原癌基因	7.0	0.005	0.49
7	CYP2D6	细胞色素 P4502D6	7.0	0.137	0.52
8	SLC6A2	血清素转运蛋白溶质载体	7.0	0.124	0.45
9	PPARA	过氧化物酶体增殖物激活受体 α	7.0	0.089	0.49
10	MGMT	甲基鸟嘌呤 -DNA 甲基转移酶	6.0	0.003	0.48
11	ABL1	ABL 原癌基因 1	6.0	0.002	0.48
12	MAOA	单胺氧化酶 A	6.0	0.055	0.41
13	CYP19A1	细胞色素 P450 芳香化酶	6.0	0.027	0.52
14	IL2	白细胞介素 -2	6.0	0.004	0.45

筛选所得的化学成分、核心靶点、通路、疾病，经 Cytoscape 3.7.2 软件处理，建立黄芪“成分-靶点-通路-疾病”网络，结果见图 6，由图 6 可知，黄芪发挥药理作用是多靶点多通路协同作用的结果。

2.5 分子对接验证

在 PubChem 下载核心成分 2D 结构，通过 ChemBio 3D 软件进行 3D 化，加氢等修饰。在 pdb (<https://www.rcsb.org/>) 获取核心靶标 3D 结构，借助 Pymol 与 AutoDock 软件进行去除残基配体，设置活性口袋等操作。对接验证后获取结合能信息，并使用 pymol 进行可视化操作。

2.6 质量标志物成分与靶点蛋白对接结果

分子对接结果显示，黄芪“补气升阳”功效的质量标志物与靶点蛋白具有良好的结合活性（结合能 $< -20.93 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ [10]），见表 4。黄芪发挥“补气升阳”的质量标志物成分中，黄芪甲苷、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、异黄芪皂苷 I 与靶点蛋白 VEGFR、EGFR、ESR1 和 TNF 能较好地结合，取配体分子与 VEGFA 靶蛋白对接图，见图 7。

2.7 统计学处理

采用 SPSS 26.0 软件与仙桃学术 (<https://www.xiantaozi.com/>) 进行数据分析及图表绘制，组间差异使用单因素方差分析 (One-way ANOVA)，以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 讨论

“谷不入半日则气衰”，气虚最直观的表现为机体疲劳。现代研究表明，SOD 与 MDA 指标反映了机体脂质过氧化代谢和活性氧自由基的水平；MDA 升高说明机体可能处于疲劳状态，与此同时

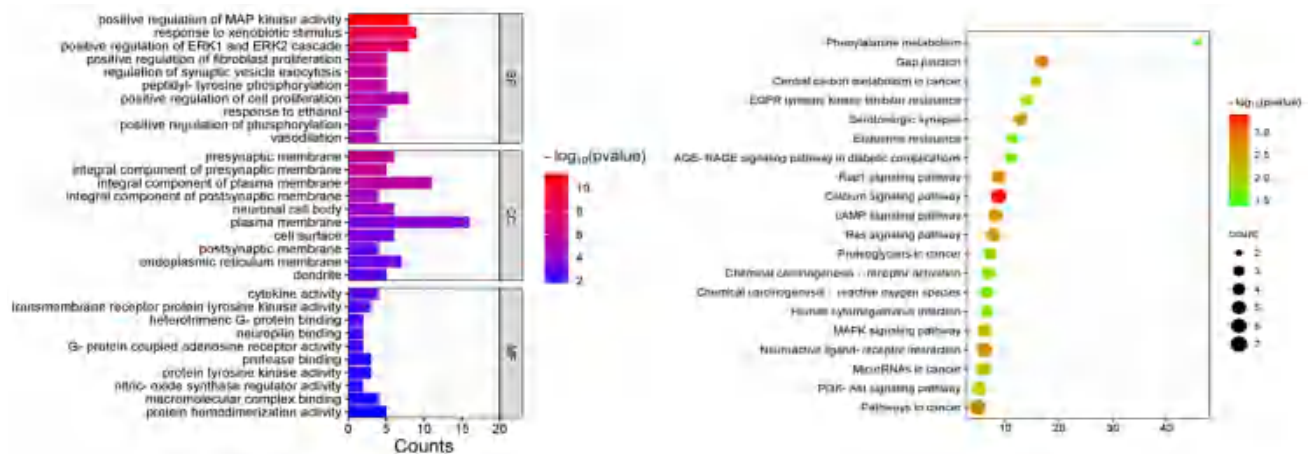


图 5 GO 功能富集与 KEGG 通路富集分析气泡图
Fig 5 GO function enrichment and KEGG pathway enrichment analysis bubbles

疲劳状态下机体内 LD 含量也会升高 [11]。本实验模型组中 MDA 与 LD 较给药组显著升高，黄芪水煎液给药组两指标有下调趋势，与阳性药对比无显著差异。ABCB1 是普遍存在的膜结合蛋白，负责多

种底物跨细胞膜转运，转运过程产生能量消耗，研究表明该蛋白与神经退行性疾病有关，表达下调导致脑部 βA 水平升高，从而导致阿尔茨海默病和帕金森病 [12]，这两种疾病与中医理论的气虚密不可分

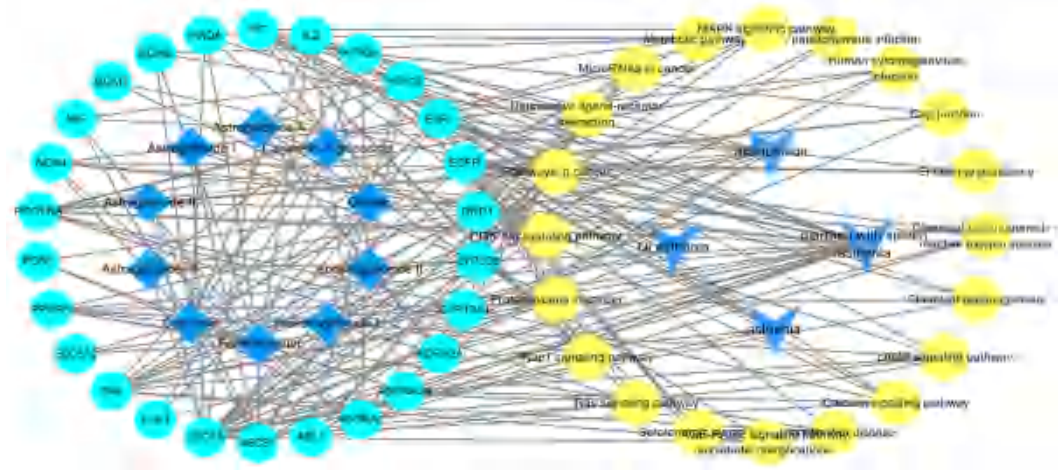


图 6 黄芪成分-靶点-通路-疾病网络

Fig 6 Component-target-pathway-disease network of *Astragalus membranaceus*

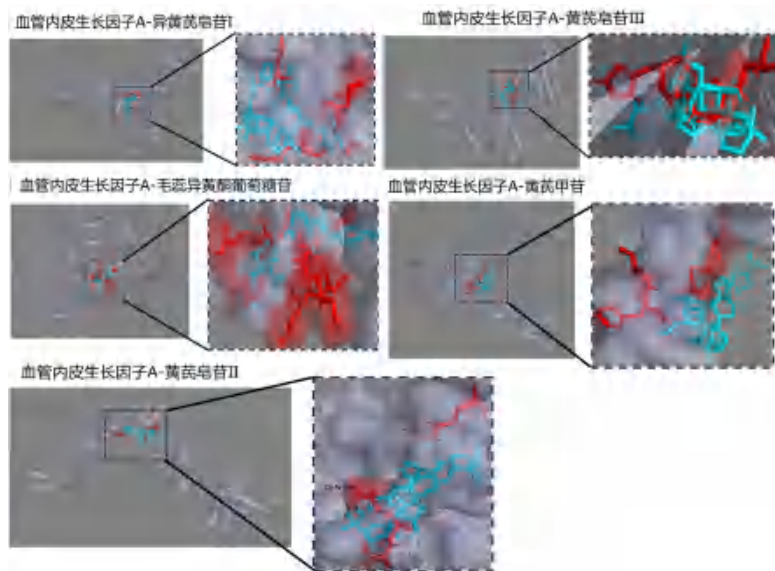


图 7 部分化学成分与关键核心靶点 VEGFA 的分子对接图

Fig 7 Molecular docking diagram of some chemical components and key core targets VEGFA

表 4 黄芪活性成分与核心靶点结合能信息

Tab 4 Binding energy of *Astragalus membranaceus* active ingredients and core targets

靶标	活性成分	结合能 / (kJ · mol ⁻¹)	靶标	活性成分	结合能 / (kJ · mol ⁻¹)
VEGFA	黄芪甲苷	- 34.74	ESR1	黄芪甲苷	- 29.30
	黄芪皂苷 II	- 34.32		黄芪皂苷 II	- 7.60
	黄芪皂苷 III	- 35.58		黄芪皂苷 III	- 7.30
	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	- 37.67		毛蕊异黄酮葡萄糖苷	- 7.20
	异黄芪皂苷 I	- 35.16		异黄芪皂苷 I	- 7.60
EGFR	黄芪甲苷	- 30.98	TNF	黄芪甲苷	- 6.90
	黄芪皂苷 II	- 30.98		黄芪皂苷 II	- 6.70
	黄芪皂苷 III	- 30.56		黄芪皂苷 III	- 7.60
	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	- 30.98		毛蕊异黄酮葡萄糖苷	- 7.00
	异黄芪皂苷 I	- 30.56		异黄芪皂苷 I	- 7.10

分^[13-14]。机体中能量主要依赖 ATP 和 ADP 的相互转化,从而维持细胞功能及机体代谢活动;与空白组相比,模型组 ATP 和 ADP 指标均有降低,经过高剂量黄芪水煎液治疗后,指标均出现上升趋势,且给药组游泳时间较模型组有较显著的提升,具有

一定缓解疲劳的作用,从而起到“补气”的功效。

“阳气者,是故阳因而上,卫外者也”,中医认为阳气能护卫肌表,防御外邪入侵,而阳气不足时防御作用会减弱,脾脏和胸腺是人体内最重要的免疫器官,故脾脏指数和胸腺指数是评价机体免疫的

重要指标^[1], TNF- α 是机体免疫与炎症相关的因子, 可促使炎症产生, 是评价体内炎症的指标, 本实验中模型组胸腺指数和脾脏指数与高剂量给药组相比差异具有统计学意义, 并且通过黄芪水煎液干预能使模型组体内的 TNF- α 水平降低, 抑制炎症的发生, 从而达到提高机体免疫功能等类似“升阳”的功效。

网络药理学分析结果表明, 黄芪甲苷、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、异黄芪皂苷 I、毛蕊异黄酮葡萄糖苷与 VEGFR、EGFR、ESR1 和 TNF 关系密切, 在网络药理学拓扑分析中表现出了较高的度值。黄芪皂苷 II 可能通过激活并增强调控 PI3K-AKT、MAPK、AGE-RAGE 等信号通路上的 TNF、VEGFA 等靶点与相关酶活性, 发挥调节机体免疫功能及影响细胞增殖、分化、凋亡、迁移等作用, 参与机体抗炎、抗氧化^[15]、抗肿瘤^[16]、器官保护过程^[17]。黄芪皂苷 III 通过改变血管内皮细胞中肿瘤坏死因子转换酶活性, 从而影响 EGFR 调控的信号通路过程, 达到对机体心脑血管保护的作用^[18]; 又能通过干扰素 (IFN)- γ 介导免疫调节活性, 促进 T、B 淋巴细胞增殖, 增强机体的抗肿瘤作用^[19]。杨海霞等^[20] 发现黄芪甲苷可能通过上调 VEGFA 的表达来发挥神经保护的作用, 缓解机体由于炎症带来的损伤。吴昌鸿^[21] 发现黄芪甲苷与异黄芪皂苷 I 起到了抑制 HIV-1 病毒整合的作用。何嘉郡等^[22] 发现毛蕊异黄酮葡萄糖苷具有抗炎、免疫抑制、抗氧化的作用, 还能抑制宫颈癌细胞增殖并诱导其凋亡, 可能与调控 ESR1 相关^[23]。分子对接结果也表明, 所预测的质量标志物与相关靶标分子结合能较低, 结合情况良好。

本研究基于 HPLC-ELSD 技术从“可测性”角度出发, 建立黄芪指纹图谱, 确认 4 个不同产地黄芪的 15 个共有峰, 指认其中 10 种成分, 基于“有效性”原则, 将黄芪传统功效与现代疾病紧密联系对应, 通过药效学实验分析, 借助网络药理学技术, 推测黄芪相关质量标志成分及作用靶点。研究结果表明, 黄芪通过多靶点、多通路调控发挥“补气升阳”类功效。初步预测黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、黄芪皂苷 II、异黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 III 这 5 种成分为黄芪发挥“补气升阳”功效的质量标志物, 本实验将中药质量控制标准与药效指标检测联系起来, 强化中药“物-效”关系, 为后续建立黄芪药材的质量评价体系提供了方法与参考。

参 考 文 献

[1] 曹瑛. 神农本草经 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 185-186.
 [2] 李时珍. 本草纲目 [M]. 卷七. 北京: 九州图书出版社, 1999: 737-738.
 [3] 安卓玲. 中药质量标准与现代分析技术在中药指纹图谱中

的应用 [J]. 黑龙江医药, 2007 (1): 45-48.
 [4] 杨阳. 利用网络药理学方法探讨连夏宁心方治疗冠心病痰热证药理学机制的临床与基础研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
 [5] 张铁军, 许浚, 韩彦琪, 等. 中药质量标志物 (Q-marker) 研究: 延胡索质量评价及质量标准研究 [J]. 中草药, 2016, 47 (9): 1458-1467.
 [6] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 315.
 [7] 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.
 [8] 张铁军, 白钢, 陈常青, 等. 基于“五原则”的复方中药质量标志物 (Q-marker) 研究路径 [J]. 中草药, 2018, 49 (1): 1-13.
 [9] 陈银芳, 傅应军, 刘超, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的代谢组学法探索补气干预期虚大鼠的生物学基础 [J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28 (2): 191-195.
 [10] 曾凡, 陈柏屹, 王康, 等. 基于网络药理学探究加味独活寄生合剂对膝骨关节炎作用机制及实验验证 [J]. 中国药理学通报, 2023, 39 (2): 340-347.
 [11] 余意, 胡明华, 张丹丹, 等. 黄芪多糖对气虚大鼠的补气作用及其机制探讨 [J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32 (4): 505-510.
 [12] Lok CH, Halliday G, Kim SW. ATP-binding cassette transporters as possible targets for the intervention of neurodegenerative diseases [J]. Neural Regen Res, 2024, 19 (4): 721-722.
 [13] 程越, 于漫, 王彩霞. 阿尔茨海默病之气血津液辨治 [J]. 中医学报, 2021, 36 (3): 482-485.
 [14] 陆征宇, 张倩茹, 潘露茜, 等. 升陷汤治疗气虚型早期帕金森病自主神经功能障碍的临床观察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29 (2): 119-124.
 [15] 刘子菡, 王喻淇, 杨爱琳, 等. 基于网络药理学研究黄芪增强免疫功能的机制 [J]. 中南药学, 2020, 18 (10): 1661-1667.
 [16] 袁霞, 黄敏, 张尊建, 等. 黄芪及其复方制剂减轻抗肿瘤药物毒副作用的研究进展 [J]. 中南药学, 2022, 20 (7): 1597-1604.
 [17] 赵凯. 黄芪皂苷 II 对肾透明细胞癌凋亡、迁移和侵袭的作用和机制研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2023.
 [18] 万春平. 黄芪皂苷 III 通过 IFN- γ 介导体外免疫调节作用的研究 [J]. 云南中医中药杂志, 2011, 32 (9): 69-71.
 [19] Qin SM, Huang KE, Fang ZG, et al. The effect of Astragaloside IV on ethanol-induced gastric mucosal injury in rats: involvement of inflammation [J]. Int Immunopharmacol, 2017, 52: 211-217.
 [20] 杨海霞, 靳庆玲, 林家静, 等. 黄芪甲苷通过 DNA 甲基化调节 VEGFA 参与急性低氧脑损伤的保护作用 [J]. 包头医学院学报, 2023, 39 (6): 5-9, 19.
 [21] 吴昌鸿. 黄芪提取物对 HIV-1 的抑制作用及机制研究 [D]. 天津: 天津大学, 2022.
 [22] 何嘉郡, 秦晨, 贺廉清, 等. 黄芪黄酮类成分及其药理作用研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2024, 26 (1): 112-119.
 [23] 范静, 陈立锋, 范凌, 等. 黄芪注射液治疗宫颈癌的机制研究 (英文) [J]. 南开大学学报 (自然科学版), 2023, 56 (3): 61-69.

(收稿日期: 2023-10-02; 修回日期: 2023-12-20)

欣力康胶囊对血液性肿瘤细胞的增殖抑制作用研究

唐欣欣^{1, 2, 3}, 胡小蓓⁴, 苏明波^{2, 3}, 张丽娜⁵, 钟利^{1, 2, 3*} (1. 江西中医药大学药学院, 南昌 330004; 2. 长三角药物高等研究院, 江苏 南通 226133; 3. 百极弘焯(南通)医药科技有限公司, 江苏 南通 226126; 4. 中科中山药物创新研究院, 广东 中山 528437; 5. 上海海天医药科技开发有限公司, 上海 200023)

摘要: **目的** 探索欣力康胶囊在血液肿瘤上应用的可能性, 以拓展欣力康胶囊的应用范围。**方法** 采用 MTS 比色法检测欣力康胶囊对 8 株人血液性肿瘤细胞的增殖抑制作用; 采用流式细胞术检测欣力康胶囊对急性髓系白血病 MV-4-11 细胞周期阻滞和凋亡促进的作用; 采用蛋白免疫印迹法检测欣力康胶囊对 MV-4-11 细胞内 pro-Caspase 3、cleaved-Caspase 3 以及 NF- κ B p65 蛋白水平的影响; 依托 MV-4-11 皮下移植瘤裸小鼠模型, 考察欣力康胶囊对荷瘤小鼠肿瘤生长的影响。**结果** 欣力康胶囊对 MV-4-11、RS4; 11、MM.1S、RPMI-8226、Mino、Jeko-1、OCI-LY10 和 TMD8 细胞增殖抑制的 IC_{50} 值分别为 (54.05 \pm 6.33)、(125.33 \pm 2.46)、(655.87 \pm 7.95)、(153.33 \pm 8.50)、(188.70 \pm 9.11)、(180.87 \pm 7.31)、(186.10 \pm 6.55)、(253.53 \pm 8.88) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 欣力康胶囊可促进 MV-4-11 细胞凋亡, 且具有浓度依赖性, 当质量浓度达到 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时凋亡率为 (99.41 \pm 0.36)% ($P < 0.001$), 而对细胞周期影响较弱; 欣力康胶囊可促进 MV-4-11 细胞中凋亡相关蛋白 pro-Caspase 3 的剪切, 下调 NF- κ B p65, 且呈一定的浓度依赖性; 临床用药浓度 (1000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 的欣力康胶囊能够显著抑制荷 MV-4-11 皮下移植瘤小鼠的肿瘤生长, 其抑瘤率为 57.28%。**结论** 欣力康胶囊对 8 种血液性肿瘤细胞株的增殖均有一定的抑制作用, 其中对人急性髓系白血病 MV-4-11 细胞的增殖抑制作用最优, 其机制主要是抑制 NF- κ B 通路以及促进细胞凋亡, 且在体内药效上, 临床用药浓度的欣力康胶囊可显著抑制荷 MV-4-11 皮下移植瘤小鼠肿瘤的生长。以上结果提示欣力康胶囊可用于血液性肿瘤的辅助治疗。

关键词: 欣力康胶囊; 血液性肿瘤; 增殖抑制; 细胞周期; 凋亡

中图分类号: R286

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)06-1558-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.024

Inhibitory effect of Xinlikang capsules on the proliferation of hematological tumor cells

TANG Xin-xin^{1, 2, 3}, HU Xiao-bei⁴, SU Ming-bo^{2, 3}, ZHANG Li-na⁵, ZHONG Li^{1, 2, 3*} (1. School of Pharmacy, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004; 2. Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute, Nantong Jiangsu 226133; 3. Biopolar Hongye (Nantong) Pharmaceutical Co., Ltd., Nantong Jiangsu 226126; 4. Zhongshan Institute for Drug Discovery, Zhongshan Guangdong 528437; 5. Shanghai Haitian Pharmaceutical Technology Development Co., Ltd., Shanghai 200023)

Abstract: Objective To determine the possible application of Xinlikang capsules for hematological tumors. **Methods** MTS assay was used to detect the inhibitory effect of Xinlikang capsule on the proliferation of 8 strains of human hematological tumor cells. Flow cytometry was used to detect the effect of Xinlikang capsules on the cell cycle arrest and apoptosis promotion of acute myeloid leukemia MV-4-11 cells. The protein levels of pro-Caspase 3, cleaved-Caspase 3 and NF- κ B p65 in MV-4-11 cells were detected by Western blot. Based on the mice loaded with MV-4-11 subcutaneous tumor transplantation, the effect of Xinlikang capsules on the tumor growth was studied. **Results** The IC_{50} values of Xinlikang capsules on MV-4-11, RS4; 11, MM.1S, RPMI-8226, Mino, Jeko-

作者简介: 唐欣欣, 女, 在读硕士研究生, 主要从事药理学研究, email: 2464262497@qq.com *通信作者: 钟利, 女, 博士, 高级正研究员, 主要从事小分子抗肿瘤药物开发研究, email: lzhong@bio-polar.com

1, OCI-LY10 and TMD8 were (54.05 ± 6.33) , (125.33 ± 2.46) , (655.87 ± 7.95) , (153.33 ± 8.50) , (188.70 ± 9.11) , (180.87 ± 7.31) , (186.10 ± 6.55) and $(253.53 \pm 8.88) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Xinlikang capsules promoted the apoptosis of MV-4-11 cells in a concentration-dependent manner. When the concentration reached $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the apoptosis rate was $(99.41 \pm 0.36)\%$ ($P < 0.001$), but the effect on cell cycle was weak. Xinlikang capsules promoted the cleavage of pro-Caspase 3 and down-regulate NF- κ B p65 in MV-4-11 cells in a concentration-dependent manner. The clinical drug concentration ($1000 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) of Xinlikang capsules significantly inhibited the tumor growth of mice loaded with MV-4-11 subcutaneous tumor transplantation, with the inhibition rate of 57.28%.

Conclusion Xinlikang capsules can inhibit the proliferation of 8 hematological tumor cell lines. The proliferation inhibition on human acute myeloid leukemia MV-4-11 cells mainly caused by inhibiting the NF- κ B pathway and promoting the cell apoptosis. The clinical concentration of Xinlikang capsules may well inhibit the tumor growth of mice loaded with MV-4-11 subcutaneous tumor transplantation, suggesting Xinlikang capsules may be used as an adjuvant therapy for hematologic malignancies.

Key words: Xinlikang capsule; hematologic tumor; proliferation inhibition; cell cycle; apoptosis

欣力康胶囊是一种由半枝莲、龙葵、蛇莓、轮环藤根、黄芪、红参、雪莲花、当归、郁金和丹参组成的中药复方制剂，是在已有国家标准的药品欣力康颗粒的基础上进行的剂型改进，其处方来源于贵州苗族的经验方。诸药伍用，共奏化痰解毒、理气止痛和补气养血之功。欣力康胶囊采用口服给药方式，一次口服 5 粒，每粒装 0.45 g，一日 3 次，临床上用于癌症放化疗的辅助治疗，且效果显著^[1]。目前已有研究表明，欣力康胶囊对人肺癌细胞 A549、人鳞癌细胞 A431、人卵巢癌细胞 SKOV-3、白血病细胞 HL-60、乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 MCF-7 等肿瘤细胞均有一定的抑制作用^[2]，同时，也有研究表明，欣力康胶囊可以用于多种癌症放化疗的辅助治疗，例如肺癌、乳腺癌、肝癌、大肠癌、食管癌和胃癌^[1, 3-4]。

有研究表明，欣力康胶囊可以通过下调转录因子 NF- κ B 相关信号通路从而抑制人肺癌细胞 A549 的增殖^[5]；欣力康胶囊可以通过抑制 STAT3/NF- κ B 信号通路的激活，抑制膀胱癌 5637 细胞增殖与转移的潜能^[6]，延长 Lewis 肺癌模型小鼠的生存期^[7]。综上，欣力康胶囊可以抑制 NF- κ B 的相关信号通路，从而抑制相关肿瘤细胞的增殖能力。转录因子 NF- κ B 于 1986 年被发现，是一种与活化 B 细胞的免疫球蛋白 κ 轻链增强子元件结合的核因子^[8]，p65 是 NF- κ B 家族的一个亚基，其存在可以激活 NF- κ B 通路^[9]。同样 NF- κ B 信号通路在多种血液性肿瘤中持续激活，参与肿瘤的发生发展，如骨髓增生异常综合征、急性髓系白血病 (AML)、急性淋巴细胞白血病、

慢性粒细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤等^[10]，因此，欣力康胶囊可能具有血液瘤细胞的增殖抑制作用，有望成为临床血液瘤放化疗的辅助治疗用药。

本研究考察了欣力康胶囊对 AML (MV-4-11)、急性淋巴细胞白血病细胞 (RS4; 11)、多发性骨髓瘤细胞 (MM.1S 和 RPMI-8226)、套细胞淋巴瘤细胞 (Mino 和 Jeko-1) 及大 B 细胞淋巴瘤细胞 (OCI-LY10 和 TMD8) 的抑制作用，并进一步探明其对敏感株的周期和凋亡的影响、作用机制以及体内药效，以期为欣力康胶囊的适应证拓展与临床用药提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞株

细胞株 MV-4-11、RS4; 11、MM.1S、RPMI-8226 和 Mino[美国模式培养物研究所 (ATCC)]，细胞株 Jeko-1 (生科院细胞库)，细胞株 OCI-LY10 (芝加哥大学的 Dr. Brabander)，细胞株 TMD8 (由芝加哥大学的 Dr. Y Lynn Wang 提供)。

1.2 实验动物

雌性 NU/NU 小鼠 18 只，6 ~ 8 周龄，体重为 18 ~ 22 g[北京维通利华实验动物技术有限公司，使用许可证号：SYXK (粤) 2020-0239]。

1.3 试剂

欣力康胶囊 (贵阳新天药业股份有限公司，批号：20220601，规格：0.45 g/粒)；阿糖胞苷 (上海皓鸿生物医药科技有限公司，批号：Le1220114575，CAS 号：147-94-4)；卡非佐米 (Biochempartner 公司，批号：20200519，CAS 号：868540-17-4)；生

理氯化钠溶液(四川科伦药业股份有限公司);培养基IMDM和RPMI-1640(Corning公司);胎牛血清(FBS, Sigma公司);CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay 试剂盒(MTS细胞活性检测试剂)(上海盛兆生物科技有限公司);细胞周期阻滞检测试剂盒(碧云天公司);Annexin V-Alexa Fluor 488/PI 细胞凋亡检测试剂盒(翌圣生物公司);Caspase 3 抗体、NF- κ B p65 抗体(美国 CST 公司); β -actin 抗体(Santa Cruz Biotechnology 公司);山羊抗鼠 IgG 和山羊抗兔 IgG (Jackson IR 公司);ECL 显影液(Thermo Scientific 公司)。

1.4 仪器

CO₂ 细胞培养箱(Thermo Scientific 公司);多功能酶标仪(PerkinElmer 公司);流式细胞分析仪(Beckman 公司);电泳仪、凝胶成像仪(Bio-Red 公司);高速冷冻离心机(Scilogex 公司)。

2 方法

2.1 药物配制

欣力康:将欣力康胶囊内容物中冻干粉用二甲基亚砜(DMSO)配制成 250 mg·mL⁻¹ 的储备液,常温超声 20~30 min,直至内容物全部溶解,-80℃储存。阿糖胞苷和卡非佐米:用 DMSO 配制成 20 mmol·L⁻¹ 储备液,-80℃储存。

2.2 细胞培养

MV-4-11 细胞用含 10%FBS 的 IMDM 培养基;RS4;11、MM.1S、RPMI-8226 和 TMD8 用含 10%FBS 的 RPMI-1640 培养基;Mino 用含 15%FBS 的 RPMI-1640 培养基;Jeko-1 用含 20%FBS 的 RPMI-1640 培养基;OCI-LY10 用含 20%FBS 的 IMDM 培养基;在 37℃、5%CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养。根据细胞生长情况,每 2~3 日传代 1 次,取对数生长期且状态良好的细胞用于实验。

2.3 MTS 法检测细胞增殖

根据细胞生长速率,将处于对数生长期的肿瘤细胞,计数后用完全培养基重悬,按 90 μ L/孔接种于 96 孔培养板,铺板密度分别为 3 \times 10⁴ 个/孔(MM.1S 细胞)、2 \times 10⁴ 个/孔(RS4;11、Jeko-1 和 TMD8 细胞)、1.5 \times 10⁴ 个/孔(OCI-LY10 细胞)、8 \times 10³ 个/孔(MV-4-11、RPMI-8226 和 Mino 细胞),置于培养箱中培养 2 h 后加入用完全培养基稀释不同质量浓度的欣力康胶囊(1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625 和 7.8125 μ g·mL⁻¹)至终体积为 100 μ L;同时设置阳性对照组,MV-4-11 和 RS4;11 细胞以不同浓度的阿糖胞苷作为阳性对照,MM.1S、RPMI-8226、

Mino、Jeko-1、OCI-LY10 和 TMD8 细胞上以不同浓度的卡非佐米作为阳性对照。设 0.4%DMSO 溶剂对照以及纯完全培养基对照,同时设无细胞的欣力康胶囊溶液和 DMSO 溶剂对照,以排除欣力康胶囊溶液自身颜色所带来的影响。加药后在 37℃、5%CO₂ 条件下培养 72 h,再向每孔中加入 MTS 试剂 20 μ L,37℃下孵育 2~4 h,混匀后用酶标仪在 490 nm 和 690 nm 波长处检测吸光度,以 OD₄₉₀-OD₆₉₀ 作为各组吸光值,以给药孔的吸光值(OD_{sample})与 DMSO 对照孔的吸光值(OD_{DMSO})的比值计算抑制率,计算公式如下:抑制率(%)=(1-OD_{sample}/OD_{DMSO}) \times 100%。

采用 GraphPad Prism 8.4.3 软件计算 IC₅₀。

2.4 流式细胞术检测欣力康胶囊对 MV-4-11 细胞周期的影响

取对数生长期 MV-4-11 细胞,以 4 \times 10⁵ 个/孔接种于 12 孔板中,加入用完全培养基稀释的不同质量浓度欣力康胶囊(20、50、100、200 和 500 μ g·mL⁻¹)至终体积为 1 mL,以 0.4%DMSO 为对照。培养 24 h 后收集细胞,加入 1 mL 75%乙醇固定过夜,收集固定后的细胞加入 0.5 mL 含 RNaseA 的碘化丙啶(PI)染色液,37℃避光水浴 30 min,用流式细胞仪在 488 nm 波长处激发,在 610~620 nm 处检测红色荧光进行分析。

2.5 流式细胞术检测欣力康胶囊对 MV-4-11 细胞凋亡的影响

取对数生长期 MV-4-11 细胞,以 3 \times 10⁵ 个/孔接种于 12 孔板中,加入用完全培养基稀释的不同质量浓度欣力康胶囊(20、50、100、200 和 500 μ g·mL⁻¹)至终体积为 1 mL,以 0.4%DMSO 为对照。培养 72 h 后收集细胞,加入凋亡检测试剂盒(Annexin V/PI 双染),室温避光反应 15 min,用流式细胞仪在 488 nm 波长处激发,在 610~620 nm 处检测红色荧光,520~530 nm 处检测绿色荧光进行分析。

2.6 蛋白免疫印迹法检测欣力康胶囊对 MV-4-11 细胞内 pro-Caspase 3、cleaved-Caspase 3 和 NF- κ B p65 蛋白水平的影响

取对数生长期 MV-4-11 细胞,以 1 \times 10⁶ 个/孔接种于 6 孔板中,加入用完全培养基稀释的不同质量浓度欣力康胶囊(20、50、100、200 和 500 μ g·mL⁻¹)至终体积为 2 mL,以 0.4%DMSO 为对照。培养 24 h 后收集细胞,加入 Loading buffer 冰上裂解 45 min 后,金属浴 95℃煮 17 min。样品冷却后进行 SDS-PAGE 电泳,转至硝酸纤维素膜,5%脱脂奶粉室温封闭 1.5 h,加入 Caspase 3、NF- κ B

p65 和 β -actin 一抗 4℃ 孵育过夜, 清洗 10 min×3 次后加入相应二抗 (1:10 000) 室温孵育 1 h, 清洗 10 min×3 次后加入 ECL 显影液, 置于凝胶成像仪进行曝光。采用 Image Lab 6.0.1 对结果进行灰度扫描, 计算各组别目标蛋白的相对表达量。

2.7 欣力康胶囊对荷 MV-4-11 细胞皮下移植瘤小鼠的肿瘤生长的影响

2.7.1 药物配制 取欣力康胶囊 3 粒 (0.45 g/粒), 取出内容物, 再缓慢加入 0.5% CMC-Na 溶媒, 研磨溶解后, 得到质量浓度为 100 mg·mL⁻¹ 的给药制剂, 4℃ 储存, 一周后新配。

2.7.2 造模 取对数生长期 MV-4-11 细胞, 接种 NU/NU 裸小鼠右侧腋窝皮下, 接种量为 5×10⁶/只, 待成瘤后, 用游标卡尺测量移植瘤直径, 肿瘤长至 100~300 mm³ 时, 表示造模成功。

2.7.3 给药方案 按小鼠体重和肿瘤体积随机分为两组, 其中溶媒组 12 只, 给药组 6 只。按照动物-人体剂量换算公式, 欣力康胶囊在人体临床上一次口服 5 粒, 一日 3 次, 人体剂量为 0.45 g/粒×5 粒×3 次=6.75 g·d⁻¹, 按照中国成年人平均体重 60 kg 进行计算, 并根据小鼠与人的剂量换算系数 9.1 进行转换, 小鼠每日剂量: 6.75 g/60 kg×9.1≈1000 mg·kg⁻¹。给药剂量及方案见表 1。

表 1 分组与给药
Tab 1 Group and dose

组别	受试药物	给药剂量/ (mg·kg ⁻¹)	给药途径	给药容积/ (mL·kg ⁻¹)	给药方案	动物数
溶媒组	0.5% CMC-Na	—	po	10	qd/21 d	12
给药组	欣力康胶囊	1000	po	10	qd/21 d	6

表 2 欣力康胶囊对血液性肿瘤细胞的增殖抑制活性 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Tab 2 Proliferative inhibitory activity of Xinlikang capsules on hematologic tumor cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

细胞株	组织类型	IC ₅₀		
		欣力康胶囊 / (μg·mL ⁻¹)	卡非佐米 / (nmol·L ⁻¹)	阿糖胞苷 / (nmol·L ⁻¹)
MV-4-11	急性髓系白血病	54.05±6.33	—	1668.00±55.06
RS4; 11	急性淋巴细胞白血病	125.33±2.46	—	9.52±0.39
MM.1S	多发性骨髓瘤	655.87±7.95	4.06±0.19	—
RPMI-8226	多发性骨髓瘤	153.33±8.50	13.18±2.02	—
Mino	套细胞淋巴瘤	188.70±9.11	5.06±1.56	—
Jeko-1	套细胞淋巴瘤	180.87±7.31	3.31±0.27	—
OCI-LY10	大 B 细胞淋巴瘤	186.10±6.55	1.95±0.05	—
TMD8	大 B 细胞淋巴瘤	253.53±8.88	8.48±1.00	—

细胞数显著增加, 且呈浓度依赖性 ($P < 0.001$), 提示欣力康胶囊对细胞周期影响较弱。结果如图 1 和表 3 所示。

3.3 欣力康胶囊对 MV-4-11 细胞凋亡的影响

结果显示, 当欣力康胶囊质量浓度达 200 和

2.7.4 抑瘤评价方法 每周测量两次肿瘤体积 (TV), 同时称量小鼠体重, 通过测量 [TV, TV = (长×宽²)/2], 绘制肿瘤生长曲线。于末次给药后 (第 21 日) 处死小鼠, 称量瘤重, 计算肿瘤生长抑制率 (IR)、相对肿瘤体积 (RTV) 和相对肿瘤增率 (T/C)。计算公式分别为: IR (%) = (溶媒组平均瘤重-给药组平均瘤重)/溶媒组平均瘤重×100%; RTV = 每次测量瘤体积/初次给药瘤体积; T/C (%) = (给药组 RTV/溶媒组 RTV)×100%。疗效评价标准为: T/C > 60 为无效; T/C ≤ 60, 并且 $P < 0.05$ 为有效。

2.8 统计学分析

数据采用 GraphPad Prism 8.4.3 进行统计分析, 结果以均值±标准差表示, 两组以上数据采用方差分析 (ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 欣力康胶囊对不同血液性肿瘤细胞增殖的影响

欣力康胶囊对 MV-4-11、RS4; 11、MM.1S、RPMI-8226、Mino、Jeko-1、OCI-LY10 和 TMD8 这 8 株血液性肿瘤细胞均具有一定的增殖抑制活性, IC₅₀ 值介于 54.05~655.87 μg·mL⁻¹, 其对 MV-4-11 细胞的增殖抑制效果最优, 其 IC₅₀ 值为 (54.05±6.33) μg·mL⁻¹, 故将其确定为细胞周期、凋亡功能评价和体内药效的试验细胞株。结果如表 2 所示。

3.2 欣力康胶囊对 MV-4-11 细胞周期的影响

欣力康胶囊在 20、50 和 100 μg·mL⁻¹ 质量浓度下, 对 MV-4-11 细胞 G₀/G₁ 期有微弱阻滞作用, 在 200 和 500 μg·mL⁻¹ 质量浓度下, Sub-G₁ 期的

500 μg·mL⁻¹ 时, 具有强效的促 MV-4-11 细胞凋亡作用, 且呈浓度依赖性 ($P < 0.001$), 表明在一定浓度下, 欣力康胶囊可以促进 MV-4-11 细胞凋亡。结果如图 2 和表 4 所示。

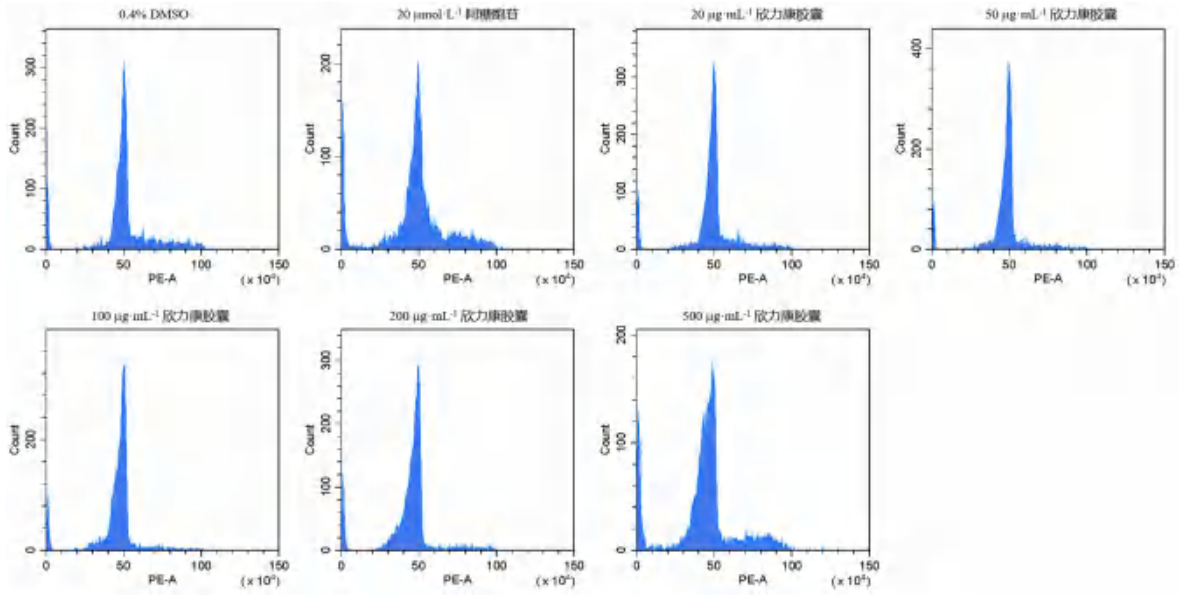


图 1 欣力康胶囊对 AML MV-4-11 细胞周期的影响
Fig 1 Effect of Xinlikang capsules on cell cycle of MV-4-11 cells

表 3 欣力康胶囊处理 24 h 对 MV-4-11 细胞周期不同阶段占比的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab 3 Effect of Xinlikang capsules treated for 24 h on the proportion of MV-4-11 cell in different phases of cell cycle ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	Sub-G ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
0.4% DMSO 组	13.66 ± 0.71	61.28 ± 4.97	17.50 ± 1.65	7.56 ± 3.71
20 μmol · L ⁻¹ 阿糖胞苷组	23.64 ± 2.52**	53.69 ± 4.25	18.45 ± 0.48	4.22 ± 1.67
20 μg · mL ⁻¹ 欣力康胶囊组	11.68 ± 1.35	68.37 ± 4.82	14.55 ± 2.40	5.40 ± 2.92
50 μg · mL ⁻¹ 欣力康胶囊组	16.39 ± 2.61	68.37 ± 6.39	11.73 ± 2.41*	3.50 ± 1.79
100 μg · mL ⁻¹ 欣力康胶囊组	15.04 ± 2.41	74.52 ± 4.58	8.07 ± 2.21***	2.36 ± 0.87*
200 μg · mL ⁻¹ 欣力康胶囊组	23.65 ± 2.23**	67.71 ± 4.35	6.56 ± 2.15***	2.07 ± 0.40*
500 μg · mL ⁻¹ 欣力康胶囊组	36.02 ± 10.64***	48.96 ± 10.84	12.31 ± 1.03*	2.72 ± 0.85

注 (Note): 与 0.4%DMSO 组比较, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (Compared with the 0.4%DMSO group, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001)。

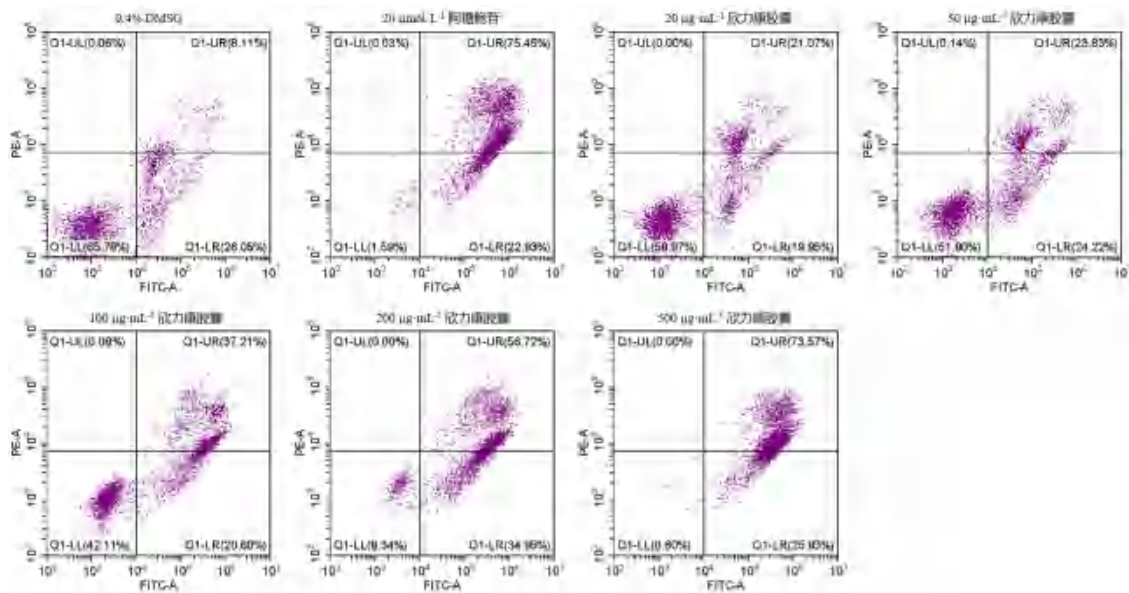


图 2 欣力康胶囊对 MV-4-11 细胞凋亡的影响
Fig 2 Effect of Xinlikang capsule on apoptosis of MV-4-11 cells

表 4 欣力康胶囊处理 72 h 对 MV-4-11 细胞凋亡占比的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab 4 Effect of Xinlikang capsules treated for 72 h on the apoptosis ratio of MV-4-11 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	早调占比 /%	晚调占比 /%	凋亡总占比 /%
0.4% DMSO 组	22.13 ± 3.65	11.83 ± 3.47	33.97 ± 2.65
20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 阿糖胞苷组	23.29 ± 1.24	74.62 ± 1.90***	97.91 ± 0.69***
20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 欣力康胶囊组	18.71 ± 4.70	16.74 ± 5.11	35.46 ± 9.38
50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 欣力康胶囊组	19.02 ± 4.59	19.54 ± 5.09	38.56 ± 9.30
100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 欣力康胶囊组	18.14 ± 2.42	28.17 ± 7.84**	46.31 ± 9.99
200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 欣力康胶囊组	32.39 ± 2.38*	51.24 ± 4.95***	83.63 ± 6.99***
500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 欣力康胶囊组	30.41 ± 4.05	69.00 ± 4.13***	99.41 ± 0.36***

注 (Note): 与 0.4%DMSO 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (Compared with the 0.4%DMSO group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

3.4 欣力康胶囊对 MV-4-11 细胞内 pro-Caspase 3、cleaved-Caspase 3 和 NF- κ B p65 蛋白表达的影响

欣力康胶囊可以促进 pro-Caspase 3 的剪切, 即 cleaved-Caspase 3 蛋白表达增多, NF- κ B p65 下调, 且呈一定的浓度依赖性, 当质量浓度达 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 其具有强效的促 Caspase 3 的剪切作用, 且明显下调 NF- κ B p65, 表明欣力康胶囊可以通过抑制 NF- κ B 通路来抑制 MV-4-11 细胞的增殖以及促进 MV-4-11 细胞的凋亡。结果如图 3 所示。

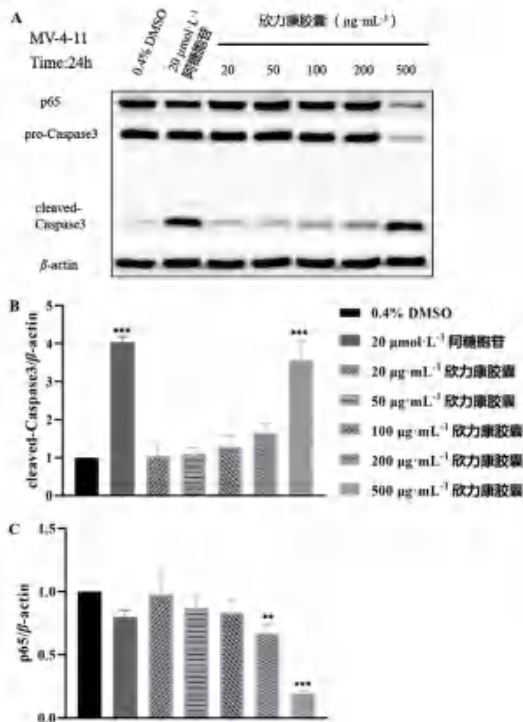


图 3 欣力康胶囊对 MV-4-11 细胞内 pro-Caspase 3、cleaved-Caspase 3 和 NF- κ B p65 蛋白表达的影响

Fig 3 Effect of Xinlikang capsules on the expression of pro-Caspase 3, cleaved-Caspase 3 and NF- κ B p65 in MV-4-11 cell

注 (Note): 与 0.4%DMSO 组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (Compared with the 0.4%DMSO group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

3.5 欣力康胶囊对荷 MV-4-11 细胞皮下移植瘤小鼠的肿瘤生长的影响

口服给予欣力康胶囊 1000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 21 d 后, 荷 MV-4-11 皮下移植瘤小鼠肿瘤的生长被显著抑制, 其 RTV 为 6.60 ± 3.95 ($P < 0.01$), T/C% 可达到 43.02%, 而小鼠的体重基本处于平稳状态; 实验结束后, 取小鼠皮下移植瘤进行分析显示, 空白组的瘤重为 (2.05 ± 0.76) g, 欣力康胶囊给药组的瘤重为 (0.88 ± 0.48) g ($P < 0.05$), 抑瘤率为 57.28%; 以上结果表明, 欣力康胶囊在基本安全的前提下, 对荷 MV-4-11 裸鼠皮下移植瘤肿瘤生长表现出较好的抑制作用。结果如表 5 和图 4 ~ 7 所示。

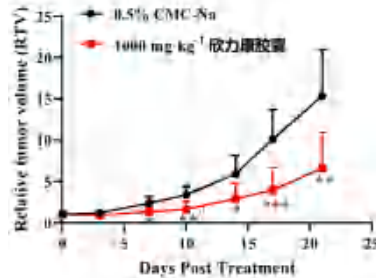


图 4 欣力康胶囊对 MV-4-11 细胞皮下移植瘤各时间点相对肿瘤体积的影响

Fig 4 Effect of Xinlikang capsules on the relative tumor volume of subcutaneous transplantation tumor loaded with MV-4-11 cell at each time point

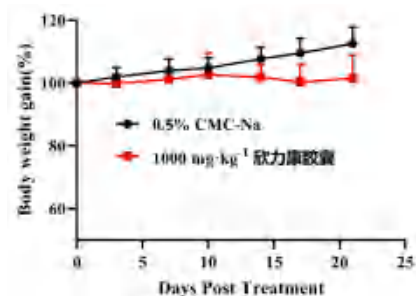


图 5 欣力康胶囊对 MV-4-11 细胞皮下移植瘤各时间点相对动物体重的影响

Fig 5 Effect of Xinlikang capsules on the relative animal weight of subcutaneous transplantation tumor loaded with MV-4-11 cell at each time point

4 讨论

血液肿瘤是指发生在血液系统的恶性肿瘤,

表 5 欣力康胶囊对 MV-4-11 细胞皮下移植瘤生长的影响

Tab 5 Effect of Xinlikang capsule on the growth of subcutaneous transplantation tumor loaded with MV-4-11 cells

组别	动物数量 / 只		体重 / g		体积 / mm ³		相对肿瘤体积	相对肿瘤增长率 / %	肿瘤生长抑制率 / %
	d ₀	d ₂₁	d ₀	d ₂₁	d ₀	d ₂₁			
0.5% CMC-Na 组	12	12	24.7±2.0	27.8±3.4	136±22	2111±924	15.35±5.40	—	—
1000 mg·kg ⁻¹ 欣力康胶囊组	6	6	22.9±1.9	23.0±2.7	130±21	961±679	6.60±3.95**	43.02	57.28

注 (Note): 与 0.5% CMC-Na 组比较, **P < 0.01 (Compared with the 0.5% CMC-Na group, **P < 0.01)。

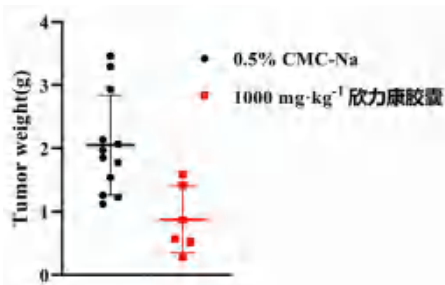


图 6 欣力康胶囊对给药 21 d 后皮下移植瘤组织重量的影响
Fig 6 Effect of Xinlikang capsule weight of the subcutaneously transplanted tumor tissue measured 21 days post drug administration

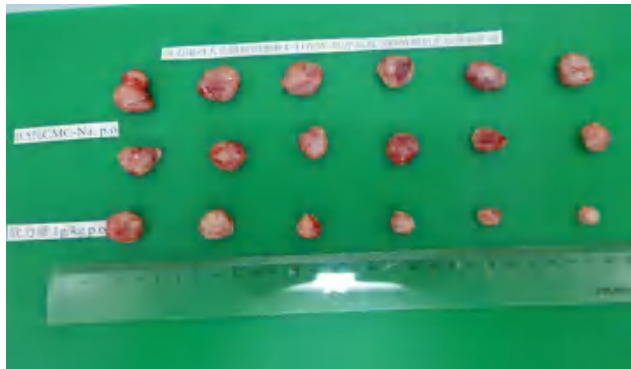


图 7 欣力康胶囊对荷 MV-4-11 细胞皮下移植瘤肿瘤生长的影响
Fig 7 Effect of Xinlikang capsules on tumor growth of subcutaneous transplantation tumor loaded with MV-4-11 cells

以造血干细胞异常分化和过度增殖为特征, 严重威胁人类的健康。常见的血液肿瘤主要包括白血病、淋巴瘤以及多发性骨髓瘤等; 中医认为: 白血病因温毒致病, 属“血癌”范畴; 淋巴瘤因痰毒致病, 属“恶核”范畴; 骨髓瘤因瘀毒致病, 属“髓瘤”范畴^[11]。现代医学手段治疗血液肿瘤具有毒副作用大和复发率高等缺点。现代药理研究发现, 中药组方存在多成分多靶点的特性, 可通过多条信号通路达到较好的治疗效果, 从而改善预后情况^[12]。临床研究发现, 多数老年 AML 患者无法从“3 + 7”标准方案化疗中获益^[13], 后来以地西他滨为代表的去甲基化治疗表现出了更好的耐受性, 成为治疗老年 AML 及复发 / 难治的 AML 的用药选择, 为老年 AML 的治疗带来了曙光。而采用复方君子汤配合地西他滨联合去甲基化治疗与单独使用地西他滨去甲基化治疗相比, 可以提高老年

AML 患者的疾病缓解率, 延长总生存期^[14]。这表明中药复方治疗血液肿瘤, 具有能延长生存时间、提高生存质量和不良反应少等优势, 挖掘中药复方治疗血液肿瘤的临床价值意义重大。

欣力康胶囊目前已在临床上被广泛地应用于各种癌症放化疗的辅助治疗, 例如肺癌、乳腺癌、肝癌、大肠癌、食管癌和胃癌等, 具有增效减毒的作用^[1, 3-4]。同时, 欣力康胶囊组分中的部分中药单体对不同类型的血液肿瘤有一定的治疗效果, 比如黄芪中的黄芪多糖^[15]和黄芪甲苷^[16], 丹参中的丹参酮 II A^[17]、隐丹参酮^[18]和丹参新酮^[19], 蛇莓中的齐墩果酸^[20], 当归中的当归多糖^[21], 龙葵中的龙葵总碱^[22]以及郁金中的姜黄素^[23-24]等。鉴于此, 本研究主要探讨欣力康胶囊在血液性肿瘤的增殖抑制作用, 同时开展初步作用机制探索。

本研究结果显示, 欣力康胶囊对 8 种血液性肿瘤细胞的增殖均有一定的抑制作用, 其 IC₅₀ 值介于 54.05 ~ 655.87 μg·mL⁻¹, 其中对 MV-4-11 细胞的增殖抑制效果最明显, 其 IC₅₀ 值为 (54.05 ± 6.33) μg·mL⁻¹。因此本研究进一步探讨了欣力康胶囊对 MV-4-11 细胞周期和凋亡的影响。

本研究结果显示, 20、50 和 100 μg·mL⁻¹ 质量浓度下欣力康胶囊对 MV-4-11 细胞 G₀/G₁ 期具有较弱的阻滞作用, 且具有一定的浓度依赖性; 而在 200 和 500 μg·mL⁻¹ 质量浓度下, MV-4-11 细胞在 Sub-G₁ 期的细胞数目明显增多, 提示高浓度欣力康胶囊可能具有较强的凋亡促进作用。随即用流式细胞术检测其促凋亡作用, 结果显示 20、50、100、200 和 500 μg·mL⁻¹ 质量浓度下欣力康胶囊对 MV-4-11 细胞有凋亡促进作用, 且呈浓度依赖性; 同时在 200 和 500 μg·mL⁻¹ 欣力康胶囊处理下的 MV-4-11 细胞早期凋亡和晚期凋亡细胞总数显著增加, 表明高浓度欣力康胶囊具有较强的凋亡促进作用。综上所述, 欣力康胶囊对 MV-4-11 细胞的增殖抑制作用主要通过对细胞的凋亡促进作用引起的。随后本研究又使用免疫印迹法检测了欣力康胶囊对 MV-4-11 细胞内 pro-Caspase 3, cleaved-Caspase 3 和 NF-κB p65 蛋白表达的影响, 结果显示, 欣力康胶囊可以促进 pro-Caspase 3 的剪切, 且可以通过抑制

NF- κ B 通路来抑制 MV-4-11 细胞的增殖。

为了确认欣力康胶囊对血液性肿瘤的体内抗肿瘤药效,本研究依托 MV-4-11 细胞皮下移植瘤模型,考察临床用药浓度的欣力康胶囊对荷瘤小鼠肿瘤生长的影响,结果表明,临床用药浓度的欣力康胶囊可显著抑制荷 MV-4-11 皮下移植瘤小鼠肿瘤的生长,其 T/C% 可达到 43.02%,抑瘤率为 57.28%。这提示欣力康胶囊可对血液肿瘤进行辅助治疗,减轻临床症状,从而改善生活质量。

本研究首次聚焦欣力康胶囊对血液性肿瘤细胞增殖的抑制作用,发现欣力康胶囊在体内外水平上均可有效地抑制血液性肿瘤细胞的增殖与生长,并发现其可促进 MV-4-11 细胞凋亡,可以通过抑制 NF- κ B 通路来抑制 MV-4-11 细胞的增殖。本研究为欣力康胶囊在血液性肿瘤的应用提供了实验依据。

参考文献

[1] 袁一帆,翟范.欣力康治疗中晚期癌症 68 例[J].中医杂志,2002,43(9):694.

[2] 沈剑,余晓魁,李定祥,等.欣力康胶囊对肿瘤细胞增殖抑制作用初探[J].中国中西医结合外科杂志,2018,24(1):79-82.

[3] 李定祥,张飞,张杰.欣力康颗粒联合化疗治疗癌症的 20 例[J].中国中医药现代远程教育,2017,15(16):106-108.

[4] 李定祥,张飞,张杰.复方中药欣力康治疗胃癌 30 例[J].中国中医药现代远程教育,2017,15(14):102-103.

[5] 刘硕,胡笑葵,林洪生.欣力康胶囊对肺癌 A549 细胞增殖抑制作用机制及有效成分分析[J].中华肿瘤防治杂志,2019,26(9):613-618.

[6] 李海燕,郑锦羽,王娟,等.欣力康胶囊对膀胱癌 5637 细胞增殖抑制与转移潜能作用机制研究[J].中华肿瘤防治杂志,2019,26(8):529-534.

[7] 王青,阙祖俊,田建辉.欣力康胶囊对 Lewis 肺癌模型小鼠生存期的影响及作用机制初探[J].中国中西医结合外科杂志,2019,25(2):182-186.

[8] Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences [J]. Cell, 1986, 46(5):705-716.

[9] Braun T, Carvalho G, Fabre C, et al. Targeting NF- κ B in hematologic malignancies [J]. Cell Death Differ, 2006, 13(5):748-758.

[10] Fuchs O. Transcription factor NF- κ B inhibitors as single

therapeutic agents or in combination with classical chemotherapeutic agents for the treatment of hematologic malignancies [J]. Curr Mol Pharmacol, 2010, 3(3):98-122.

[11] 李慧,李达.李达从毒辨治血液肿瘤思路与临证经验[J].中华中医药杂志,2019,34(3):1086-1090.

[12] 冯晓卫,胡琦.中药单体及复方调控淋巴瘤相关信号通路分子的研究进展[J].医学研究杂志,2021,50(9):23-26.

[13] Quintás-Cardama A, Ravandi F, Liu-Dumlao T, et al. Epigenetic therapy is associated with similar survival compared with intensive chemotherapy in older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia [J]. Blood, 2012, 120(24):4840-4845.

[14] 梁春灵,廖斌,齐彦,等.中西医结合治疗老年急性髓系白血病疗效及生存预后影响因素分析[J].福建中医药,2022,53(11):30-33,41.

[15] 李清平,刘会群,蔡萼.黄芪多糖抑制多发性骨髓瘤细胞系 U266 增殖、迁移和侵袭[J].基础医学与临床,2020,40(8):1083-1089.

[16] 杨红,贾伟,康佳,等.黄芪甲苷对急性髓系白血病 HL60 细胞系增殖和凋亡的影响[J].宁夏医科大学学报,2021,43(6):590-594,602.

[17] 王叨,丁艳杰,陈娇,等.丹参酮 II A 抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路促进人白血病 NB4 细胞株自噬的实验研究[J].中国小儿血液与肿瘤杂志,2020,25(1):4-8.

[18] 李光慧,王利苹,赵贝,等.隐丹参酮抗肿瘤活性与逆转化疗耐药作用的研究进展[J].中国临床药学杂志,2020,29(2):152-156.

[19] 陈姗姗,朱华魁,董娜,等.丹参新酮对白血病 THP-1 细胞增殖与凋亡的影响[J].中国中药杂志,2022,47(9):2541-2546.

[20] 曾文彬,李铭杰,朱秋花,等.齐墩果酸对荷淋巴瘤小鼠的抑瘤作用[J].中国临床药理学杂志,2020,36(18):2865-2868.

[21] 邓方芳,耿珊,姜蓉,等.当归多糖对人白血病干细胞体外增殖与体内移植模型的影响[J].解剖学报,2021,52(1):41-48.

[22] 刘凯,王跃,聂甜,等.龙葵总碱对人骨髓瘤 RPMI8226 荷瘤裸鼠的抑瘤作用[J].西部中医药,2021,34(11):37-41.

[23] 宋君君,李小雨,秦福丽,等.姜黄素调控 mTOR 信号通路对淋巴瘤细胞 DOHH-2 增殖和凋亡的作用研究[J].山东中医药大学学报,2021,45(5):653-658.

[24] 李莹莹,刘红春,张倾,等.姜黄素对人急性髓系白血病细胞株 K562 增殖、凋亡及细胞周期的影响[J].中国实验血液学杂志,2022,30(5):1343-1347.

(收稿日期:2024-01-02;修回日期:2024-03-06)

芹菜素对 MHCC97H 源性球细胞对 5-氟尿嘧啶敏感性的影响

乐伊婕, 曹建国, 杨小红*, 冯星* (湖南师范大学医学院药理学系, 长沙 410013)

摘要: **目的** 研究芹菜素 (API) 对人肝细胞癌 MHCC97H 源性球细胞 (MH-SFC) 对 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 的敏感性的影响, 并探讨其分子机制。**方法** 应用无血清干细胞培养基超低黏附培养获得 MH-SFC。CCK-8 检测 5-FU 或 API 抑制 MH-SFC 和 MHCC97H 细胞存活力的半数抑制浓度 (IC_{50})。实时定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 分析 miR-34a-5p 表达水平。API (10.0、40.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 预处理或 API (40.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 联合 miR-34a-5p 抑制物 (Anti-34a) 共处理 MH-SFC, 随后测定 5-FU 的 IC_{50} 。Western blot 分析 MH-SFC 的 FoxM1 及 c-Myc 蛋白表达水平。**结果** 与 MHCC97H 细胞相比, MH-SFC 的 5-FU 的 IC_{50} 增高。API 优先抑制 MH-SFC 细胞存活力。API (10.0、40.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 预处理降低 MH-SFC 的 5-FU 的 IC_{50} 。与 MHCC97H 细胞相比, MH-SFC 更低表达 miR-34a-5p, 同时, API 上调 miR-34a-5p 表达。Anti-34a 能消除 API 增强 MH-SFC 的 5-FU 敏感性和上调 miR-34a-5p 表达作用。此外, API (10.0、40.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 下调 MH-SFC 的 FoxM1 及 c-Myc 蛋白表达; Anti-34a 能消除 API 下调 FoxM1 及 c-Myc 蛋白表达效应。**结论** API 增强 MH-SFC 的 5-FU 敏感性, 其分子机制与上调 miR-34a-5p 表达, 继而阻断 FoxM1/c-Myc 通路相关。

关键词: 芹菜素; 肝细胞癌; 肿瘤干细胞; 5-氟尿嘧啶; 化疗敏感性; miR-34a-5p; FoxM1; c-Myc
中图分类号: R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)06-1566-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.025

Apigenin up-regulates expression of miR-34a-5p and enhances sensitivity to fluorouracil in MHCC97H-derived spheres

LE Yi-jie, CAO Jian-guo, YANG Xiao-hong*, FENG Xing* (Department of Pharmaceutical Sciences, Medical College of Hunan Normal University, Changsha 410013)

Abstract: Objective To determine the effect of apigenin (API) on the sensitivity of human hepatocellular carcinoma MHCC97H-derived spheres (MH-SFC) to 5-fluorouracil (5-FU), and related mechanism. **Methods** MH-SFC were obtained from MHCC97H cell line by sphere formation assay with serum-free stem cell medium in ultra low attachment plates. The IC_{50} of 5-FU or API on the cell viability in MH-SFC and MHCC97H cells was assessed by cell counting kit-8 (CCK-8) assay. MiR-34a-5p expression level was measured by qRT-PCR. After pre-treatment with API (10.0 and 40.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) or co-treatment with API (40.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) and miR-34a-3p inhibitor (Anti-34a), IC_{50} of 5-FU was determined in MH-SFC. The expressions of FoxM1 and c-Myc protein were analyzed by Western blot. **Results** IC_{50} of 5-FU was elevated in MH-SFC compared with MHCC97H cells. API preferentially inhibited the cell viability of MH-SFC. IC_{50} of 5-FU was reduced in MH-SFC by pre-treatment of API (10.0 and 40.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). Compared with the MHCC97H cells, MH-SFC had lower expression of miR-34a-5p as well as API up-regulated the expression of miR-34a-5p. Anti-34a rescued the effect of API on the sensitivity to 5-FU and expression of miR-34a-5p in MH-SFC. In addition, API (10.0 and 40.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) down-regulated the expressions of FoxM1

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 82074075)。

作者简介: 乐伊婕, 女, 在读硕士研究生, 主要从事肿瘤药理学研究, email: yueyijie99@163.com *通信作者: 杨小红, 女, 高级实验师, 主要从事肿瘤药理学研究, email: 13844@hunnu.edu.cn; 冯星, 男, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事小分子靶向药物的发现和作用机制研究, email: fengxing@hunnu.edu.cn

and c-Myc protein in MH-SFC. Anti-34a decreased the down-regulation of expressions of FoxM1 and c-Myc protein in MH-SFC by API. **Conclusion** API can enhance the sensitivity of MH-SFC to 5-FU, the mechanism may be associated with up-regulating miR-34a-5p expression, and subsequently interrupting FoxM1/c-Myc signaling pathway.

Key words: apigenin; hepatocellular carcinoma; cancer stem cell; 5-fluorouracil; chemotherapy sensitivity; miR-34a-5p; FoxM1; c-Myc

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是原发性肝癌最常见的病理类型; 居全球发病率的第五位, 5 年生存率仅为 18%, 位列癌症相关死亡原因的第三位^[1]。有研究发现具有肝癌干细胞样细胞性质的 HCC 源性球细胞是 HCC 天然耐药的“根源”^[2-3]。本课题组前期研究表明, 低表达 miR-34a-5p 和过表达 FoxM1 能促成高转移 MHCC97H 细胞系源性球细胞自我更新相关干性形成^[4]。然而, miR-34a-5p/FoxM1/c-Myc 信号通路是否与 MHCC97H 源性球细胞化疗耐药相关有待深入研究。

在体内外, 芹菜素 (4', 5, 7-三羟基黄酮, apigenin, API) 能有效抑制 HCC 细胞增殖和生长^[5-7]。本课题组也证实 API (10、20、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 能减弱 HCC 源性球细胞 (包括高转移 MHCC97H 细胞系源性球细胞) 自我更新相关干性^[8-9]。Erdogan 等^[10] 研究表明 API 能增强人前列腺癌 CD44 阳性球细胞对顺铂的敏感性。Aida 等^[11] 报道 miR-34a-5p 促进 API 处理的肺癌细胞凋亡。Yang 等^[12] 发现 miR-34a-5p 直接靶向抑制 Bcl-2 表达, 并增强索拉菲尼对人 HCC 细胞的敏感性。Chen 等^[13] 发现 miR-375/FoxM1/c-Myc 信号途径导致结肠癌细胞对 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 的耐药。本课题组前期研究结果亦表明 API 糖苷类化合物异牡荆素通过上调 miR-34a-5p 抑制 HCC 的 SK-Hep-1 球细胞自我更新和诱导细胞凋亡^[14]。然而, API 调节 HCC 细胞关键 miRNA (例如 miR-34a-5p) 方面的研究尚不充分, 需要进一步探讨。

基于临床上 5-FU 仍然是 HCC 患者的主要治疗药物之一, 本文旨在确定 API 能否增强 MHCC97H 源性球细胞 (MH-SFC) 的 5-FU 敏感性, 以及其分子机制是否涉及调节 miR-34a-5p/FoxM1/c-Myc 信号途径。

1 材料

MHCC97H 细胞系 (中国科学院细胞库); 24 孔超低黏附培养板 (美国 Corning Inc 公司)。胰岛素、API (批号: 520-36-5)、5-FU (批号: 51-21-8)、牛血清白蛋白 (BSA) 和胰岛素 (美国 Sigma-Aldrich 公司); 青霉素、链霉素、hrEGF、hbFGF、B27、胎牛

血清 (FBS)、Lipofectamine2000、重组人表皮生长因子、重组成纤维细胞生长因子、不含维生素 A 的 B27 添加物 (Invitrogen 公司); 抗 FoxM1、C-Myc 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司); 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二抗 (碧云天生物技术研究); 增强化学发光检测试剂 (美国 Amersham Pharmacia Biotech 公司)。无血清 DMEM/F12、DMEM/F12 培养基 (美国 GIBCO 公司)。CCK-8 试剂盒 (Beyotime)。miRcute miRNA 分离试剂盒 (中国天根生化有限公司); Anti-34a (RiboBio 公司); All-in-One miRNA First-Strand cDNA Synthesis 试剂盒 (美国 Genecopoeia 公司)。

2 方法与结果

2.1 细胞培养

2.1.1 MHCC97H 细胞培养 MHCC97H 细胞用含 10%FBS 的 DMEM 培养基置于 37℃、5%CO₂ 饱和湿度培养箱培养。

2.1.2 MH-SFC 细胞的培养^[9] MHCC97H 细胞用添加 100 IU · mL⁻¹ 青霉素、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素、20 ng · mL⁻¹ hrEGF、20 ng · mL⁻¹ hbFGF、2% B27、0.4% BSA 和 4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 胰岛素的无血清 DMEM/F12, 即肿瘤干细胞培养基, 以每孔 2×10^3 个细胞密度接种于 24 孔超低黏附培养板, 悬浮培养 6 d, 得到 MHCC97H 细胞源性球细胞 (MH-SFC)。

2.2 API 对 MH-SFC 细胞存活力的影响

不同浓度 5-FU (1、3、10、30、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 或 API (10、20、40、80、160、320 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 分别孵育 MH-SFC 和 MHCC97H 细胞 48 h; 以加入溶媒 [0.1% 二甲基亚砜 (DMSO)] 为空白对照组。CCK-8 试剂盒测定细胞存活力 (处理组吸光度 A_{450} 值 / 空白对照组吸光度 A_{450} 值 $\times 100\%$)。利用 GraphPad.Prism.v5.0-IC₅₀ 值计算软件 (<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>) 计算 5-FU 或 API 对细胞存活力的半数抑制浓度 (IC₅₀), 并计算 5-FU 的耐药指数 $[IC_{50}(\text{MHCC97H})/IC_{50}(\text{MH-SFC})]$ 和 API 的敏感系数 $[IC_{50}(\text{MHCC97H})/IC_{50}(\text{MH-SFC})]^{[15-16]}$ 。

结果显示 MHCC97H 细胞呈多边形, 单层贴壁生长。MH-SFC 呈球状悬浮生长; CCK-8 测定结果

显示：与 MHCC97H 细胞 ($10.37 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 相比，5-FU 抑制 MH-SFC 活力的 IC_{50} ($24.26 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 增高 (见图 1)，说明 5-FU 对 MH-SFC 天然耐药，耐药指数为 2.34。

表 1 结果显示：API 能有效抑制 MH-SFC 和 MHCC97H 细胞存活力， IC_{50} 分别为 104.24 、 $181.74 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，表明 API 能优先抑制 MH-SFC 的细胞存活力；其敏感系数为 1.74。

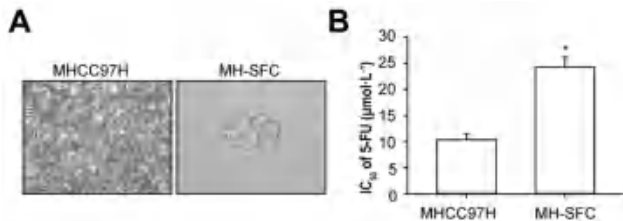


图 1 MHCC97H 细胞 ($\times 100$) 与 MH-SFC 细胞 ($\times 400$) 的形态特征及对 5-FU 的 IC_{50} ($n = 3$)

Fig 1 Morphological characteristic and IC_{50} to 5-FU of MHCC97H cells ($\times 100$) and MH-SFC cells ($\times 400$) ($n = 3$)

注：与 MHCC97H 细胞相比， $^*P < 0.05$ 。

Note: Compared with the MHCC97H cells, $^*P < 0.05$.

表 1 不同浓度 API 对 MH-SFC 细胞存活力的抑制率 ($n = 3$)

Tab 1 Inhibition rate of MH-SFC treated with different concentrations of apigenin ($n = 3$)

API/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	MHCC97H 细胞		MH-SFC 细胞	
	A_{450}	抑制率/%	A_{450}	抑制率/%
0	1.1714 ± 0.1569	—	0.9754 ± 0.1572	—
10	1.1205 ± 0.1423	4.35	0.8840 ± 0.1098	9.37
20	1.0819 ± 0.1268	7.64	0.8240 ± 0.1167	15.52
40	1.0399 ± 0.1373	11.23	$0.7430 \pm 0.0979^*$	23.82
80	$0.8429 \pm 0.1202^*$	27.39	$0.5978 \pm 0.0967^{**}$	38.72
160	$0.7246 \pm 0.0786^{**}$	38.14	$0.3719 \pm 0.0638^{***}$	61.87
320	$0.4316 \pm 0.0566^{***}$	63.16	$0.1535 \pm 0.0229^{***}$	84.27

注：与 $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ API 处理细胞相比， $^*P < 0.05$ ， $^{**}P < 0.01$ ， $^{***}P < 0.001$ 。

Note: vs $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ API, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

2.3 API 对 MH-SFC 细胞的 5-FU 敏感性的影响

CCK-8 检测不同浓度 API (10 、 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 预处理 MH-SFC 细胞 12 h 后联合 5-FU 的 IC_{50} ，结果 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ API (单独孵育 MH-SFC 的细胞存活力抑制率 $< 10\%$) 和 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ API (单独孵育 MH-SFC 的细胞存活力抑制率 $< 25\%$) 有效地降低了 5-FU 抑制 MH-SFC 细胞存活力的 IC_{50} (见图 2)。计算 API 对 MH-SFC 细胞的 5-FU 增敏系数 [$IC_{50}(5\text{-FU}) / IC_{50}(API + 5\text{-FU})$] [16]。结果说明 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ API 对 MH-SFC 细胞有 5-FU 增敏效应，增敏系数分别为 1.23 和 1.68。

2.4 Anti-34a 对 API 增强 MH-SFC 的 5-FU 敏感性作用的影响

参照文献 [4, 14] 方法，用 miRcute miRNA 分

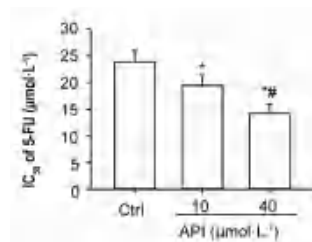


图 2 芹菜素对 MH-SFC 细胞的 5-FU 敏感性的影响 ($n = 3$)

Fig 2 Effect of API on the sensitivity of MH-SFC cell to 5-FU ($n = 3$)

注：与空白对照组比较， $^*P < 0.05$ ；与 $10.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ API 处理组比较， $^{\#}P < 0.05$ 。

Note: Compared with the blank control group, $^*P < 0.05$; compared with the $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ API group, $^{\#}P < 0.05$.

离试剂盒从 MH-SFC (1×10^5) 或 MHCC97H 细胞 (1×10^5) 中制备总 miRNA。依据 All-in-One miRNA First-Strand cDNA Synthesis 试剂盒说明书的步骤，应用 qRT-PCR 分析 miR-34a-5p 表达水平。结果表明 MH-SFC 较 MHCC97H 细胞更低表达 miR-34a-5p (见图 3A)，API (10 、 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理能增高 MH-SFC 的 miR-34a-5p 表达水平 (见图 3B)。

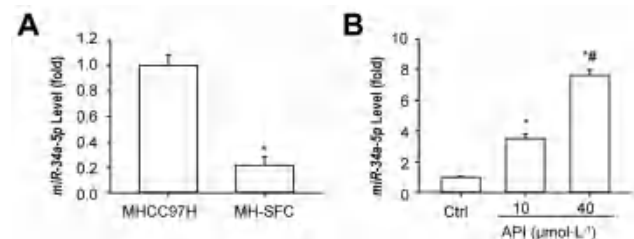


图 3 芹菜素对 MH-SFC 细胞中 miR-34a-5p 表达的影响 ($n = 3$)

Fig 3 Effect of API on the expression of miR-34a-5p in MH-SFC cell ($n = 3$)

注：与 MHCC97H 细胞组相比， $^*P < 0.05$ ；与溶媒 (0.1% DMSO) 对照组比较， $^*P < 0.05$ ；与 $10.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ API 处理组比较， $^{\#}P < 0.05$ 。

Note: Compared with the MHCC97H cell group, $^*P < 0.05$; compared with the solvent (0.1% DMSO) control group, $^*P < 0.05$; compared with the $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ API group, $^{\#}P < 0.05$.

参照文献 [4] 方法，分别用 miR-34a-5p 抑制物 (Anti-34a) 和 miR-34a-5p 阴性对照 (miR-NC) 转染 MH-SFC 细胞。为了测定 API 或 Anti-34a 或两者合用对 MH-SFC 细胞的 5-FU 敏感性的影响，用 API (10.0 、 $40.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 预处理或 Anti-34a 转染与 API ($40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 单独或共处理 MH-SFC 细胞 12 h；随后，检测 5-FU IC_{50} ，分析 miR-34a-5p 表达水平。结果显示 Anti-34a 能消除 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ API 降低 5-FU IC_{50} 和上调 miR-34a-5p 表达的作用 (见图 4)。结果表明 API 可能通过上调 miR-34a-5p 表达，进而增强 MH-SFC 细胞的 5-FU 敏感性。

2.5 Anti-34a 对 API 下调 MH-SFC miR-34a-5p 靶基因产物 FoxM1 和 c-Myc 表达效应的影响

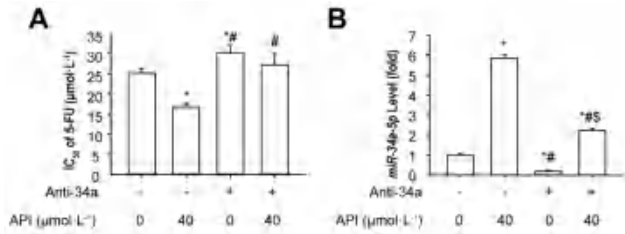


图 4 Anti-34a 对 API 增强 MH-SFC 细胞的 5-FU 敏感性的影响 ($n = 3$)
Fig 4 Effect of Anti-34a on the enhance of API on MH-SFC cell sensitivity to 5-FU ($n = 3$)

注：与对照组相比，* $P < 0.05$ ；与 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ API 处理组相比，# $P < 0.05$ ；与单独用 Anti-34a 转染相比，⁵ $P < 0.05$ 。

Note: vs the control group, * $P < 0.05$; vs the group treated with API (40.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) alone, # $P < 0.05$; vs the group transfected with Anti-34a alone, ⁵ $P < 0.05$.

参照文献^[13]方法，Western blot 分析 API (10、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对 MH-SFC 的 FoxM1 和 C-Myc 蛋白表达的影响。结果证明，API 能降低 MH-SFC 的 FoxM1 和 C-myc 蛋白表达水平 (见图 5)。

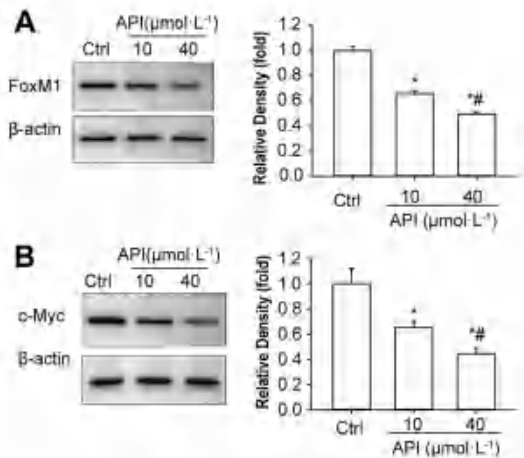


图 5 API 对 MH-SFC FoxM1 (A) 和 c-Myc (B) 蛋白表达的影响 ($n = 3$)

Fig 5 Effect of API on expressions of FoxM1 (A) and c-Myc (B) protein in MH-SFC ($n = 3$)

注：与溶剂处理组 (0.1% DMSO) 比较，* $P < 0.05$ ；与 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ API 处理组比较，# $P < 0.05$ ($n = 3$)。

Note: Compared with the solvent (0.1% DMSO) control group, * $P < 0.05$; compared with the 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ API group, # $P < 0.05$.

按照“2.4”项下方法，用 Anti-34a 和 miR-NC 转染 MH-SFC。实验分成 4 组，第一组为未处理组，第二组为 API (40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 单独处理组，第三组为 mi-RNA-34a 抑制物单独转染组 (Anti-34a)，第四组为 API (40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 与 Anti-34a 联合处理组。随后，各组均处理 MH-SFC 细胞 12 h；Western blot 分析 FoxM1 和 C-Myc 蛋白表达水平。结果表明，Anti-34a 能拮抗 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 API 下调 MH-SFC FoxM1 和 c-Myc 蛋白表达作用 (见图 6)。

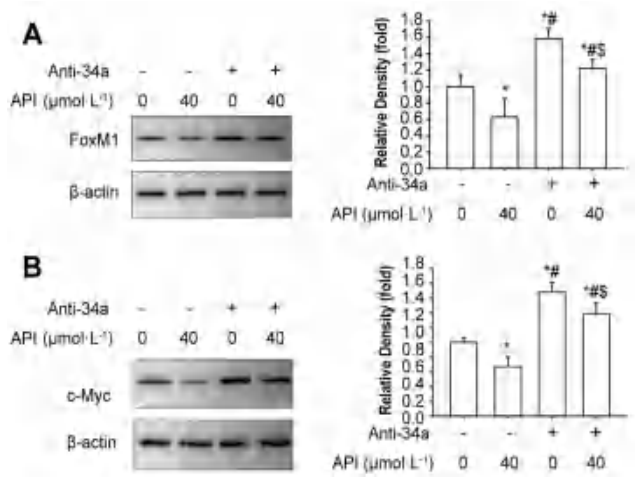


图 6 Anti-34a 对 API 下调 MH-SFC FoxM1 和 c-Myc 蛋白表达作用的影响 ($n = 3$)

Fig 6 Effect of Anti-34a on the down-regulation of FoxM1 and c-Myc protein expressions induced by API in MH-SFC ($n = 3$)

注：与对照组相比，* $P < 0.05$ ；与 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ API 处理组相比，# $P < 0.05$ ；与单独用 Anti-34a 转染相比，⁵ $P < 0.05$ 。

Note: vs the control group, * $P < 0.05$; vs the group treated with API (40.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) alone, # $P < 0.05$; vs the group transfected with Anti-34a alone, ⁵ $P < 0.05$.

2.6 统计学分析

数据用 SPSS 20.0 for windows evaluation 软件分析，表示为均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$)。两组均数的比较用 Student's *t* 检验。多组均数的两两比较用 One Way ANOVA 方差分析的 LSD 法 (方差齐) 或 Dunnett's *t* 检验 (方差不齐)。 $P < 0.05$ ，检验假设有统计学意义。

3 讨论

大量研究结果显示，来自 HCC 细胞系和临床 HCC 患者的原代培养的球细胞具有肿瘤干细胞样细胞特性；可能是 HCC 天然多药耐药的根源^[2-3]。Cao 等^[2]评估 HCC PLC/PRF/5 亲本细胞与第 3 代球细胞对顺铂的敏感性，结果显示 3、5、9 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 顺铂处理球细胞 24 h 后，相对细胞存活率分别增加 1.5 倍、2.1 倍及 2.3 倍。此外，PLC/PRF/5 源性球细胞展示出对氟尿嘧啶、阿糖胞苷、丝裂霉素、索拉非尼的普遍耐药性^[2]。Ma 等^[3]发现相比于各自的亲本细胞，应用体外培养 Huh7 和 Hep3B 源性球细胞对高浓度 5-FU (80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、索拉非尼 (5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和阿霉素 (2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理具有更大的耐受性。本课题组前期研究显示，API 优先抑制 MH-SFC 的细胞存活力和肝癌球形成效率^[9]，本研究结果与之类似：MH-SFC 对 5-FU 天然耐药。通过系统的量效关系研究，进一步确证了 API 对 MH-SFC 细

胞存活力抑制作用更强。同时证明 API 具有增强 5-FU 抑制 MH-SFC 细胞存活力作用。说明 API 能作为靶向肿瘤干细胞样细胞 (MH-SFC) 的化疗增敏剂的优良药效学特性。

MiR-3-5p 是一种与肿瘤发生有关并已经充分研究的 miRNA, 通常在多种恶性肿瘤 (包括骨肉瘤^[17]、结直肠癌^[18] 和 HCC^[4, 14]) 中下调。值得注意的是, miR-34a-5p 能抑制骨肉瘤、结直肠癌和 HCC 肿瘤干细胞样细胞自我更新功能^[4, 14, 17-18]。Zhang 等^[19] 研究表明 miR-34a 模拟物可增强结直肠癌细胞对 5-FU 的敏感性。新近的研究显示 miR-34a-5p-c-MYC-CHK1/CHK2 轴抑制 DNA 损伤反应, 减弱肿瘤干细胞样细胞特性并增强 HCC 放疗敏感性^[20]。本课题组前期研究亦证明: 低表达 miR-34a-5p 和过表达 FoxM1 促成 MH-SFC 细胞自我更新相关干性形成^[4], 同时, 芹菜素糖苷类化合物异牡荆素通过上调 miR-34a-5p 抑制肝细胞癌 SK-Hep-1 球细胞干性和诱导细胞凋亡^[14]。然而, miR-34a-5p 对 MH-SFC 细胞的 5-FU 敏感性的影响及潜在机制值得进一步研究。本文的结果再次验证了 MH-SFC 细胞展示出更低表达 miR-34a-5p 分子表型; 且发现 API 能有效地上调 MH-SFC 细胞的 miR-34a-5p 表达, Anti-34a 几乎能消除 API 上调 miR-34a-5p 表达和增强 MH-SFC 细胞 5-FU 敏感性作用。这提示 API 对天然耐药 MH-SFC 细胞的化疗增敏机制主要通过上调 miR-34a-5p 表达。

FoxM1 是一种与肿瘤干细胞样细胞特性关联的致癌性转录因子^[4]。Huang 等^[21] 报道 CRISPR/Cas9 敲除人结直肠癌 HCT116 细胞 miR-34a/b/c 表达, 上调 miR-34a 靶基因 *FoxM1*, 并诱导 p62 和 ATG9A 表达, 这些分子变动能增加细胞自噬, 随后, 减弱凋亡以赋予 miR-34a/b/c 敲除细胞更趋向 5-FU 耐药。Chen 等^[13] 发现 miR-375/FoxM1/c-Myc 通路导致结直肠癌细胞对 5-FU 耐药。Liu 等^[22] 通过生信学分析指出: 过表达 *FoxM1* 引起包括 c-Myc 在内的多条信号途径失调, 是一个肝内胆管上皮癌预后不良的预测指标。Koo 等^[23] 证实桑根皮素通过活性氧介导 FoxM1/c-Myc 信号的抑制, 促进肿瘤细胞凋亡和抑制有氧糖酵解。本研究结果显示 API 下调 FoxM1 和 c-Myc 蛋白表达, 这些作用能被 Anti-34a 大部分消除。但是关于 API 上调 miR-34a-5p 是否通过直接靶向靶基因 FoxM1 和 c-Myc 增强 MH-SFC 细胞的 5-FU 敏感性的具体机制还有待进一步研究。

综上所述, 本文的结果显示 API 增强 MH-SFC

细胞的 5-FU 敏感性作用涉及上调 miR-34a-5p 表达, 可能通过靶向抑制 FoxM1 表达阻断 FoxM1/c-Myc 信号传导通路。

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. 2022. Cancer statistics, 2022 [J]. CA Cancer J Clin, 2022, 72 (1): 7-33.
- [2] Cao L, Zhou YM, Zhai BB, et al. Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines [J]. BMC Gastroenterol, 2011, 11: 71.
- [3] Ma XL, Sun YF, Wang BL, et al. Sphere-forming culture enriches liver cancer stem cells and reveals Stearoyl-CoA desaturase 1 as a potential therapeutic target [J]. BMC Cancer, 2019, 19 (1): 760.
- [4] Cao XC, Liu LH, Cao XZ, et al. The DNMT1/miR-34a/FoxM1 axis contributes to stemness of liver cancer cells [J]. J Oncol, 2020, 2020: 8978930.
- [5] 高爱梅, 程晓莉. 芹菜素对裸鼠肝癌皮下移植瘤抑制作用的研究 [J]. 中国医药导报, 2017, 14 (26): 9-12.
- [6] 邸金森, 单万亭, 赵娇, 等. 芹菜素联合阿霉素对肝癌 Hep G2 细胞增殖, 凋亡及细胞周期的影响 [J]. 中医药学报, 2021, 49 (5): 31-34.
- [7] Hu XY, Liang JY, Guo XJ, et al. 5-fluorouracil combined with apigenin enhances anticancer activity through mitochondrial membrane potential ($\Delta \Psi_m$)-mediated apoptosis in hepatocellular carcinoma [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2015, 42 (2): 146-53.
- [8] 姜素芳, 许畅, 陈阿, 等. 芹菜素对肝细胞癌 SMMC-7721 细胞系干样细胞自我更新及 CK2 α 表达的影响 [J]. 湖南师范大学学报 (医学版), 2017, 14 (5): 1-3.
- [9] 崔迎红, 陈阿, 许畅, 等. 芹菜素上调 SHP-1 蛋白表达抑制肝癌 MHCC97H 细胞 STAT3 磷酸化及球形成 [J]. 湖南师范大学学报 (医学版), 2018, 15 (5): 1-4.
- [10] Erdogan S, Turkecul K, Serttas R, et al. The natural flavonoid apigenin sensitizes human CD44⁺ prostate cancer stem cells to cisplatin therapy [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 88: 210-217.
- [11] Aida R, Hagiwara K, Okano K, et al. miR-34a-5p might have an important role for inducing apoptosis by down-regulation of SNAI1 in apigenin-treated lung cancer cells [J]. Mol Biol Rep, 2021, 48 (3): 2291-2297.
- [12] Yang F, Li QJ, Gong ZB, et al. MicroRNA-34a targets Bcl-2 and sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to sorafenib treatment [J]. Technol Cancer Res Treat, 2014, 13 (1): 77-86.
- [13] Chen H, Pei LY, Xie P, et al. Circ-PRKDC contributes to 5-fluorouracil resistance of colorectal cancer cells by regulating miR-375/FoxM1 axis and Wnt/ β -catenin pathway [J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 5939-5953.
- [14] Xu C, Cao XC, Cao XZ, et al. Isovitexin inhibits stemness and induces apoptosis in hepatocellular carcinoma

- SK-Hep-1 spheroids by upregulating miR-34a expression [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2020, 20 (14): 1654-1663.
- [15] 武帅, 周灿灿, 韩亮, 等. 白藜芦醇通过抑制 PARP1 促进胰腺癌对吉西他滨的化疗敏感性 [J]. *西安交通大学学报 (医学版)*, 2022, 43 (6): 850-855.
- [16] 来芳芳, 李杰, 季鸣, 等. 奥拉帕尼对 Taxol 抗乳腺癌 4T1 的增敏作用 [J]. *药学学报*, 2016, 51 (6): 907-912.
- [17] Zou YG, Huang YS, Yang JX, et al. miR-34a is down-regulated in human osteosarcoma stem-like cells and promotes invasion, tumorigenic ability and self-renewal capacity [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15 (4): 1631-1637.
- [18] Wang LH, Bu PC, Ai YW, et al. A long non-coding RNA targets microRNA miR-34a to regulate colon cancer stem cell asymmetric division [J]. *Elife*, 2016, 5: e14620.
- [19] Zhang QY, Wang JY, Li N, et al. miR-34a increases the sensitivity of colorectal cancer cells to 5-fluorouracil in vitro and in vivo [J]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8 (2): 280-290.
- [20] Zhao XM, Zhuang Y, Wang B, et al. The miR-34a-5p-c-MYC-CHK1/CHK2 axis counteracts cancer stem cell-like properties and enhances radiosensitivity in hepatocellular cancer through repression of the DNA damage response [J]. *Radiat Res*, 2023, 199 (1): 48-60.
- [21] Huang Z, Kaller M, Hermeking H. CRISPR/Cas9-mediated inactivation of miR-34a and miR-34b/c in HCT116 colorectal cancer cells: comprehensive characterization after exposure to 5-FU reveals EMT and autophagy as key processes regulated by miR-34 [J]. *Cell Death Differ*, 2023, 30 (8): 2017-2034.
- [22] Liu LY, Wu J, Guo Y, et al. Overexpression of FoxM1 predicts poor prognosis of intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *Aging (Albany NY)*, 2018, 10 (12): 4120-4140.
- [23] Koo JI, Sim DY, Lee HJ, et al. Apoptotic and anti-Warburg effect of morusin via ROS mediated inhibition of FoxM1/c-Myc signaling in prostate cancer cells [J]. *Phytother Res*, 2023, 37 (10): 4473-4487.

(收稿日期: 2023-11-24; 修回日期: 2024-01-19)

羟基积雪草苷通过抑制 NF- κ B/NLRP3 细胞焦亡通路 缓解间质性膀胱炎

李琪, 浦东, 王思思, 谢璇, 李霖*, 于锋* (中国药科大学基础医学与临床药学学院, 南京 211198)

摘要: 目的 通过 NF- κ B/NLRP3 介导的细胞焦亡途径探究羟基积雪草苷对间质性膀胱炎的相关作用。方法 通过脂多糖建立体外间质性膀胱炎细胞模型, 使用不同浓度的羟基积雪草苷处理, 采用 MTT、单层细胞划痕伤口实验、实时荧光定量 PCR 和蛋白印迹实验检测羟基积雪草苷对 SV-HUC-1 细胞间质性膀胱炎体外模型中细胞活力, 伤口愈合能力和 NF- κ B/NLRP3 通路介导的细胞焦亡相关蛋白和 mRNA 的表达的作用。结果 体外细胞实验结果显示, 与模型组相比, 羟基积雪草苷能改善细胞活力和伤口愈合能力, 并抑制细胞模型中 NF- κ B/NLRP3 通路介导的细胞焦亡相关蛋白和 mRNA 的表达。结论 在脂多糖诱导的 SV-HUC-1 细胞间质性膀胱炎体外模型中, 羟基积雪草苷可通过抑制 NF- κ B/NLRP3 通路介导的细胞焦亡从而发挥对膀胱上皮细胞的保护作用。

关键词: 间质性膀胱炎; 羟基积雪草苷; NF- κ B/NLRP3; 细胞焦亡

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)06-1571-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.026

Madecassoside alleviates interstitial cystitis by inhibiting the pyroptosis of NF- κ B/NLRP3 pathway

LI Qi, PU Dong, WANG Si-si, XIE Xuan, LI Ji*, YU Feng* (School of Basic Medicine and Clinical Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198)

作者简介: 李琪, 女, 硕士研究生, 主要从事临床药学研究, email: lqi2255@163.com *通信作者: 李霖, 女, 副教授, 主要从事药理学和临床药学研究, email: lijil@cpu.edu.cn; 于锋, 男, 教授, 主要从事药理学和临床药学研究, email: yufeng305cpu@163.com

Abstract: Objective To determine the potential effect of madecassoside on interstitial cystitis (IC) through the pyroptosis mediated by NF- κ B/NLRP3. **Methods** An in vitro IC model induced by lipopolysaccharide in SV-HUC-1 cells was used to evaluate the effect of different concentrations of madecassoside. The protective effects of madecassoside on human ureteral epithelial cells were assessed with the MTT cell viability assay and single-layer cell scratch assay. The inhibitory effects of madecassoside on NF- κ B/NLRP3-mediated pyroptosis were investigated through Western blot and real-time PCR analysis. **Results** Madecassoside enhanced the cell viability and wound healing compared to the model group in vitro. It effectively suppressed the expression of pyroptosis-related proteins and mRNA mediated by the NF- κ B/NLRP3 pathways in the cell model. **Conclusion** Madecassoside demonstrates a protective role in the lipopolysaccharide induced SV-HUC-1 cell model of IC by inhibiting pyroptosis through the NF- κ B/NLRP3 pathways.

Key words: interstitial cystitis; madecassoside; NF- κ B/NLRP3; pyroptosis

间质性膀胱炎 (interstitial cystitis, IC) 是一种具有尿急、尿频、慢性盆腔疼痛等临床表现特征的膀胱慢性炎症疾病^[1], 又称膀胱疼痛综合征 (bladder pain syndrome, BPS)。IC 及其并发症严重影响患者的生活质量, 每年造成巨大的社会负担和经济影响^[2]。据报道, 在全球范围内 IC 患者的人口比例可能在 0.1% ~ 4%, 且由于症状的变化和诊断的困难, 确切的患病率可能被低估^[3-4]。

积雪草 [*Centella asiatica* (L.) Urb.] 是伞形科积雪草属多年生草本植物, 其主要活性成分包括积雪草苷 (asiaticoside, AS)、羟基积雪草苷 (madecassoside, MA) 等^[5]。在临床研究中, 以积雪草为主要组成药味的三金片单独应用或与抗菌药物联用治疗膀胱炎、尿道炎等泌尿系统疾病中均发挥了积极的治疗作用^[6-7]。其中, 积雪草的药理作用体现在清热解毒、利湿通淋以及益肾等方面, 有助于平衡泌尿系统的功能, 对于缓解和治疗泌尿系统疾病具有积极的疗效^[8-9]。MA 是积雪草中含量最高的五环类三萜化合物, 也是药典规定的积雪草的主要质量检测成分之一, 在抗氧化、抗炎、伤口愈合和泌尿系统疾病的治疗等方面具有较广泛的应用^[10-12]。

细胞焦亡 (pyroptosis) 也称为细胞炎症坏死 (cellular inflammatory necrosis), 是一种与炎症过程紧密相关的程序性细胞死亡形式^[13]。广泛认为核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 可以调控含 NLR 家族 Pyrin 域蛋白 3 (NOD-like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3) 等炎症小体相关的信号通路的表达, 从而影响细胞焦亡进程^[14-17]。已有研究发现, 羟基积雪草苷多种药理学活性的发挥依赖于对 NF- κ B 信号通路的调控, 主要通过抑制

NF- κ B 从胞质到核的易位或通过抑制其磷酸化发挥作用, 在抗关节炎、抗神经炎、抗肾毒性等方面均有相关报道^[8, 18]。因此, 羟基积雪草苷在抗感染治疗中的作用值得更进一步的探究。

目前, 羟基积雪草苷治疗 IC 的药理作用及其机制有待进一步探究。基于此, 本研究旨在从 NF- κ B/NLRP3 介导的细胞焦亡反应出发, 探讨 MA 对 IC 可能的抗炎作用及其相关作用机制, 为 MA 的进一步应用以及治疗 IC 可能的新药开发提供启发或新的依据。

1 材料

1.1 细胞及试剂

人输尿管上皮永生化细胞株 (SV-HUC-1, 上海中乔新舟生物科技有限公司), 脂多糖 (LPS, 美国默克公司), MAC (上海麦克林生化科技股份有限公司), DMEM/F12 培养基 (南京凯基生物技术有限公司), 胎牛血清 (苏州双洙生物科技有限公司), RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、p-NF- κ Bp65 (碧云天生物科技有限公司), 0.25% 含 EDTA 胰蛋白酶消化液、SDS-PAGE 上样缓冲液 (苏州新赛美生物科技有限公司), NF- κ Bp65 特异性一抗 (沈阳万类生物科技有限公司), NLRP3 (美国 Selleck 生物科技有限公司), caspase-1、GSDMD、GAPDH 特异性一抗 (武汉三鹰生物技术有限公司), ECL 显影液 (上海天能生命科学有限公司), PCR 扩增引物 (南京金斯瑞生物技术有限公司), 总 DNA 提取试剂、逆转录试剂盒、扩增反应试剂盒 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司)。

1.2 仪器

The StepOne 实时荧光定量 PCR 仪 (美国赛默飞世尔科技公司), 倒置相差显微镜 DMIL LED

DFC425C 型 (莱卡显微系统上海贸易有限公司), EPS300 型电泳仪 (上海天能科技有限公司), 酶标仪 VersaMax™ (美国 Molecular Devices 公司), Nano-100 超微量蛋白核酸测定仪 (杭州奥盛仪器有限公司), 荧光图像分析系统 (上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养、分组及给药

SV-HUC-1 细胞使用含有 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基制成完全培养基进行细胞培养, 胰酶消化后传代。对数期 SV-HUC-1 细胞接种于 6 孔板内, 分别设置为 Control 组、LPS 组 (脂多糖诱导模型组)、给药组。LPS、MA 均使用二甲基亚砜 (DMSO) 作为溶剂配制母液, -20°C 短期保存, 给药时按需使用完全培养基稀释后给药。SV-HUC-1 细胞培养 24 h 后, Control 组使用完全培养基, LPS 组使用含 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS 的完全培养基, 给药组使用含 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS 和不同浓度 MA 的完全培养基继续培养。

2.2 MTT 法检测细胞活力

取 SV-HUC-1 细胞调节密度至 2×10^6 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$, 按照 $150\ \mu\text{L}$ /孔接种于 96 孔细胞培养板内, 使用完全培养基培养 48 h 后, 按照试剂盒说明书采用 MTT 法检测细胞活力并于 $562\ \text{nm}$ 检测光密度 (OD) 值。

2.3 单层细胞划痕伤口实验检测细胞伤口愈合能力

取 SV-HUC-1 细胞调节密度至 2×10^6 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$, 按照 $2\ \text{mL}$ /孔接种于 6 孔细胞培养板内, 使用完全培养基培养至细胞生长密度为 $80\% \sim 90\%$, 使用 $200\ \mu\text{L}$ 的吸头尖端沿着单层细胞上的标尺创建划痕伤口。不同给药处理 36 h, 分别在 0、36 h 使用显微镜拍摄单层细胞伤口。使用 Image J 软件统计伤口愈合面积, 量化伤口愈合过程。

2.4 RT-qPCR 法检测 mRNA 的表达

取 SV-HUC-1 细胞调节密度至 2×10^6 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$, 按照 $2\ \text{mL}$ /孔接种于 6 孔细胞培养板内, 使用完全培养基培养 24 h, 分别给药处理 6 h 后, 使用总 RNA 提取试剂和 SteadyPure RNA 提取试剂盒提取各组细胞总 RNA, 使用 NANO-100 测定总 RNA 浓度。按照 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR 试剂说明对总 RNA 进行逆转录获得样本 cDNA, 逆转录体系反应条件为 $50^{\circ}\text{C}\ 15\ \text{min}$, $85^{\circ}\text{C}\ 5\ \text{s}$ 。按照 AceQ qPCR SYBR Green Master Mix 试剂说明对 cDNA 进行扩增和实时荧光定量分析, 扩增反应条件为 $95^{\circ}\text{C}\ 5\ \text{min}$ 预变性, $95^{\circ}\text{C}\ 10\ \text{s}$ 变性, $60^{\circ}\text{C}\ 30\ \text{s}$ 退火与延伸, 重复 40 个循环。各基因表达水平使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法统计。所有引物序列运用 Primer5 进行设计, DNA 扩增引物序列见表 1。

表 1 DNA 扩增引物序列

Tab 1 DNA amplification primer sequence

基因	上游引物序列 (5' - 3')	下游引物序列 (5' - 3')
<i>NLRP3</i>	GATCTTCGCTGCGATCAACAG	CGTGCATTATCTGAACCCAC
<i>NF-κB</i>	GGTGC GGCTCATGTTTACAG	GATGGCGTCTGATACCAGG
<i>caspase-1</i>	TTTCCGCAAGGTTTCGATTTCA	GGCATCTGCGTCTACCATC
<i>MCP-1</i>	TCTTCATTGACCAAGGAAATCGG	TCCGGGGTGCATTATCTCTAC
<i>IL-18</i>	TTCGACACATGGGATAACGAGG	TTTTTGCTGTGAGTCCCGGAG
<i>IL-1β</i>	CAGCCAGATGCAATCAATGCC	TGGAATCCTGAACCCACTTCT
<i>GAPDH</i>	CTTCTTTGCGTCGCCAGCCGA	ACCAGGCGCCCAATACGACAA

2.5 Western blot 法检测相关蛋白的表达

取 SV-HUC-1 细胞调节密度至 2×10^6 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$, 按照 $2\ \text{mL}$ /孔接种于 6 孔细胞培养板内, 使用完全培养基培养 24 h, 再分别给药处理 24 h 后, 使用 RIPA 细胞裂解液提取各组细胞总蛋白, 使用 BCA 蛋白定量试剂盒检测总蛋白浓度, 加入 $5\times$ loading buffer 蛋白上样缓冲液 95°C 水浴变性 10 min 得到蛋白样品。电泳 ($85\ \text{V}\ 55\ \text{min}$, $120\ \text{V}\ 60\ \text{min}$)、转膜 ($110\ \text{V}\ 75\ \text{min}$)、脱脂牛奶封闭后使用通用型抗体稀释液按照说明比例稀释的一抗 4°C 孵育过夜后, 使用按照说明稀释的二抗室温孵育 2 h 后, 使用发光成像分析仪拍摄蛋白条带。

2.6 统计学分析

每个实验至少重复 3 次, 数据值以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 实验数据使用 GraphPad Prism9 软件进行统计分析, 使用单因素方差分析 (ANOVA) 和 Tukey 检验分析组间差异, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 IC 体外模型建立及 MA 对 SV-HUC-1 细胞活力的影响

本研究使用 LPS 诱导作用于 SV-HUC-1 细胞建立体外的 IC 模型。如图 1 所示, 与 Control 组相比, LPS 组的细胞活力明显下降 ($P < 0.001$); 证明造模成功。同时给予 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS 和 100

$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 或 $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MA 作用 48 h 后, 与 LPS 组相比, 细胞活力均显著提高 ($P < 0.01$, 见图 1A)。单独给予不同浓度 MA 组的细胞活力与 Control 组相比无显著变化 (见图 1B), 结果显示不同浓度 MA 对 SV-HUC-1 细胞无明显毒性作用。以上结果表明 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MA 和 $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MA 对 LPS 诱导 SV-HUC-1 细胞的 IC 体外模型具有稳定的保护作用。

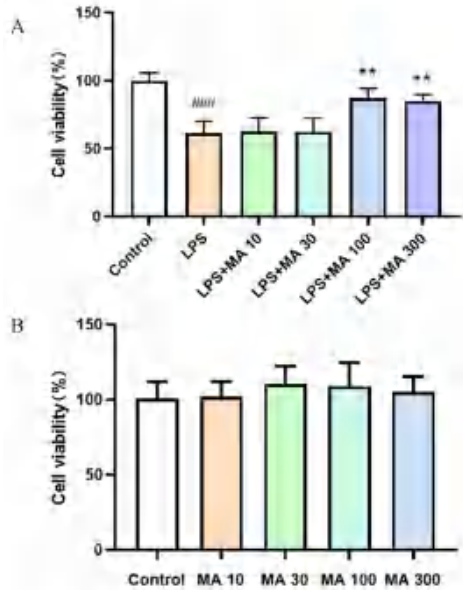


图 1 MA 对 SV-HUC-1 细胞活力的影响 ($n = 4$)
 Fig 1 Effect of MA on the viability of SV-HUC-1 cells ($n = 4$)
 A. 给予 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 和不同浓度 MA 时细胞活力情况 (cell viability under the co-treatment with $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS and various concentrations of MA); B. 单独给予不同浓度 MA 时细胞活力情况 (cell viability under treatment various concentrations of MA)
 注: 与 Control 组相比, ^{####} $P < 0.001$; 与 LPS 组相比, ^{**} $P < 0.01$ 。
 Note: Compared with the Control group, ^{####} $P < 0.001$; compared with the LPS group, ^{**} $P < 0.01$.

3.2 MA 对 IC 体外模型中细胞伤口愈合能力的影响

如图 2 所示, 使用单层细胞划痕伤口实验验证相应处理 36 h 后的细胞伤口愈合能力, 结果与 Control 组相比, LPS 组的伤口愈合能力降低 ($P < 0.01$); 与 LPS 组对比, LPS + MA ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MA) 组的细胞伤口愈合能力有所增加 ($P < 0.001$)。

3.3 MA 对 IC 体外模型中细胞焦亡相关基因表达的影响

如图 3 所示, RT-qPCR 结果显示, 与 Control 组相比, LPS 组的 *NLRP3*、*NF-κB*、*MCP-1*、*caspase-1*、*GSDMD*、*IL-18*、*IL-1β* 等焦亡相关 mRNA 的表达均显著上调; 与 LPS 组相比, LPS + MA ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

MA) 组 *NLRP3*、*NF-κB*、*GSDMD*、*caspase-1*、*IL-18*、*IL-1β* 等焦亡相关 mRNA 的表达有所下降。

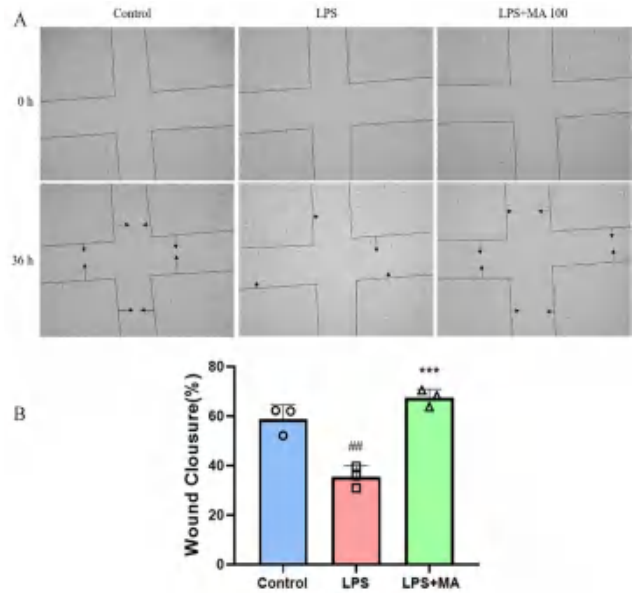


图 2 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MA 对 IC 体外模型中细胞伤口愈合能力的影响 ($n = 3$)
 Fig 2 Effect of $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MA on the wound healing proficiency of IC in vitro model ($n = 3$)
 注: 与 Control 组相比, ^{###} $P < 0.01$; 与 LPS 组相比, ^{***} $P < 0.001$ 。
 Note: Compared with the Control group, ^{###} $P < 0.01$; compared with the LPS group, ^{***} $P < 0.001$.

3.4 MA 对 LPS 诱导的 SV-HUC-1 细胞体外模型中细胞焦亡相关蛋白表达的影响

如图 4 所示, 与 Control 组相比, LPS 组的 p-NF-κB p65 和 NF-κB p65 蛋白表达均有所上升 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 LPS 组相比, $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上的不同浓度 MA 给药后的 p-NF-κB p65 和 NF-κB p65 表达均有所下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.0001$)。

如图 5 所示, 与 Control 组相比, LPS 组的 *NLRP3*、*GSDMD*、*caspase-1* 等焦亡相关蛋白表达有所上升; 与 LPS 组相比, 部分浓度 MA 给药后的 *NLRP3*、*GSDMD*、*caspase-1* 等焦亡相关蛋白表达有所下降。

4 讨论

IC 以尿急、尿痛、盆腔疼痛或不适为主要症状, 在中医治疗中当属“下焦湿热症”。积雪草是三金片的主要组成药味, 是中医治疗下焦湿热症的主要药物^[19]。MA 是积雪草的主要活性成分, 其药理作用体现在清热解毒、利湿通淋以及益肾等方面。本研究使用 LPS 诱导建立体外 IC 细胞模型, 首次聚焦于 MA 通过 NF-κB 信号通路抑制 SV-HUC-1 细胞内 *NLRP3* 相关焦亡蛋白的活性。

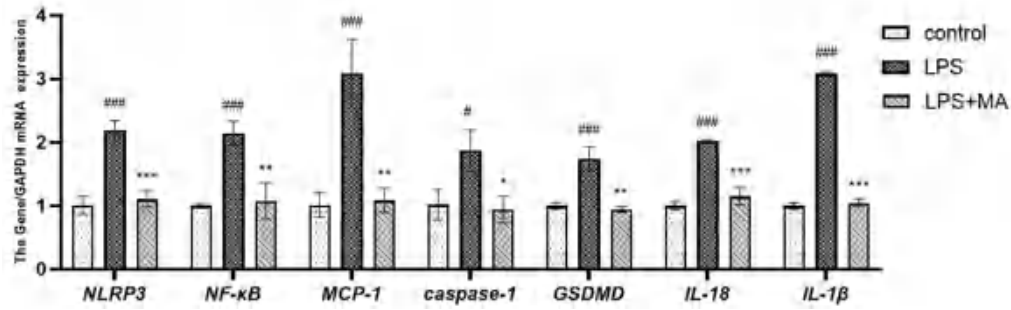


图 3 MA 对 IC 体外模型中细胞焦亡相关基因表达的影响 (n = 3)

Fig 3 Impact of MA on the expression of pyroptosis-related genes in IC in vitro model (n = 3)

注: 与 Control 组相比, #P < 0.05, ##P < 0.01, ###P < 0.001; 与 LPS 组相比, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001。

Note: Compared with the Control group, #P < 0.05, ##P < 0.01, ###P < 0.001; compared with the LPS group, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

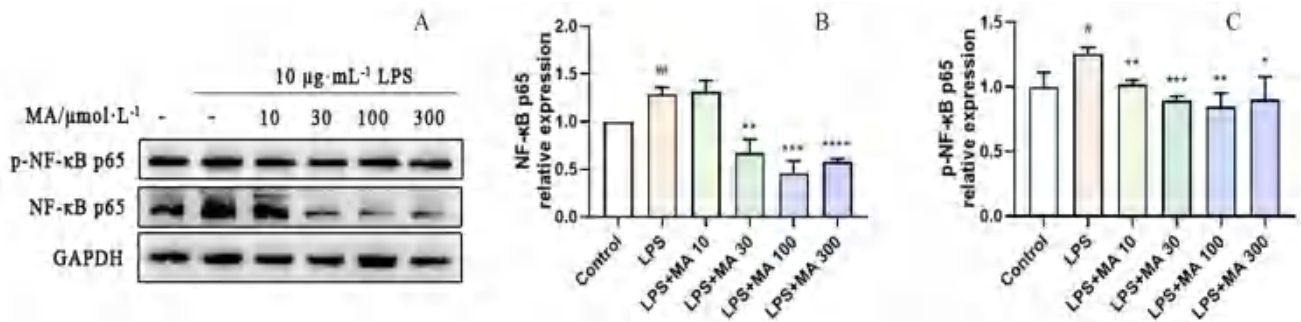


图 4 MA 对 IC 体外模型中 NF-κB 相关蛋白表达的影响 (n = 3)

Fig 4 Effect of MA on the expression of NF-κB protein in IC in vitro model (n = 3)

注: 与 Control 组相比, #P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001。

Note: Compared with the Control group, #P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001; compared with the LPS group, *P < 0.05, **P < 0.001, ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

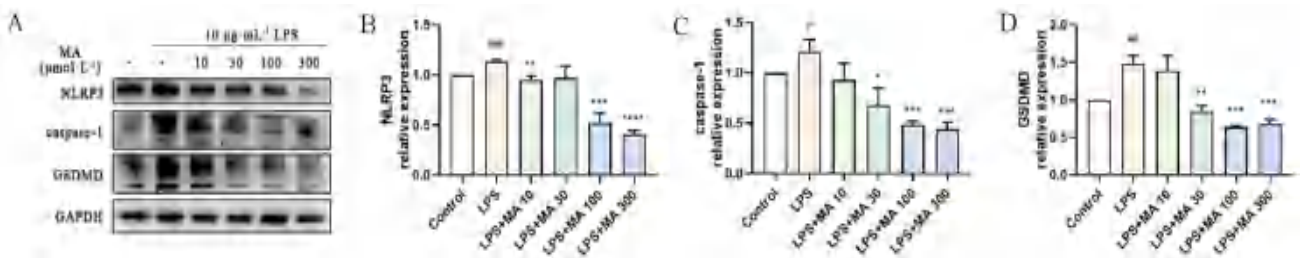


图 5 MA 对 IC 体外模型中焦亡相关蛋白表达的影响 (n = 3)

Fig 5 Effect of MA on the expression of pyroptosis-related protein in IC in vitro model (n = 3)

注: 与 Control 组相比, #P < 0.05, ##P < 0.01, ###P < 0.001; 与 LPS 组相比, *P < 0.05, **P < 0.001, ***P < 0.001, ****P < 0.0001。

Note: Compared with the Control group, #P < 0.05, ##P < 0.01, ###P < 0.001; compared with the LPS group, *P < 0.05, **P < 0.001, ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

研究结果显示, MA 在 IC 体外模型中显著抑制了 NF-κB/NLRP3 介导的经典细胞焦亡信号通路的相关蛋白及基因的表达。

在 IC 发生发展过程中, 持续的炎症和损伤导致受累细胞发生炎症细胞程序性死亡, 这在 IC 的病理机制中扮演重要角色。本实验结果显示, MA 在体外细胞模型中显著抑制 NLRP3 的激活, 减轻细胞炎症程序性死亡进程, 从而显示出对膀胱上皮细胞炎症损伤的保护作用。研究结果也证实 MA 可显著

抑制 caspase-1/GSDMD 通路经典途径介导的细胞焦亡, 从而进一步阻止由细胞焦亡所致的炎症损伤。这些结果表明: 在 LPS 诱导的 SV-HUC-1 细胞 IC 模型中, MA 可通过抑制 NF-κB/NLRP3 介导的细胞焦亡信号通路发挥对膀胱上皮细胞的保护作用。

综上所述, MA 可减轻由细胞焦亡诱导的炎症刺激和异常调控, 这为 MA 应用于 IC 临床治疗提供一定的理论依据, 同时也为治疗 IC 新药开发提供参考。

参考文献

- [1] Akiyama Y, Luo Y, Hanno PM, et al. Interstitial cystitis/bladder pain syndrome: the evolving landscape, animal models and future perspectives [J]. *Int J Urol*, 2020, 27 (6): 491-503.
- [2] Kim MM, Harvey J, Gusev A, et al. A scoping review of the economic burden of non-cancerous genitourinary conditions [J]. *Urology*, 2022, 166: 29-38.
- [3] Peters KM, Carrico DJ, Kalinowski SE, et al. Prevalence of pelvic floor dysfunction in patients with interstitial cystitis [J]. *Urology*, 2007, 70 (1): 16-18.
- [4] Sutherland S, Grace Kelly A, Ryden A, et al. Compensatory coping and depression in women with interstitial cystitis/bladder pain syndrome [J]. *Neurourol Urodyn*, 2023, 42 (1): 322-329.
- [5] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020: 296.
- [6] 侯新, 王丽霞 . 三金片的研究进展 [J]. *中国医院用药评价与分析*, 2016, 16 (8): 1148-1151.
- [7] 李刚, 柳倩 . 左氧氟沙星片联合三金片治疗急性膀胱炎的临床研究 [J]. *中西医结合心血管病电子杂志*, 2019, 7 (33): 40.
- [8] Yu WG, Shen Y, Wu JZ, et al. Madecassoside impedes invasion of rheumatoid fibroblast-like synoviocyte from adjuvant arthritis rats via inhibition of NF-kappaB-mediated matrix metalloproteinase-13 expression [J]. *Chin J Nat Med*, 2018, 16 (5): 330-338.
- [9] Shen XQ, Guo MM, Yu HY, et al. Propionibacterium acnes related anti-inflammation and skin hydration activities of madecassoside, a pentacyclic triterpene saponin from *Centella asiatica* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2019, 83 (3): 561-568.
- [10] He ZL, Hu YY, Niu ZQ, et al. A review of pharmacokinetic and pharmacological properties of asiaticoside, a major active constituent of *Centella asiatica* (L.) Urb [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 302 (Pt A): 115865.
- [11] Shan RR, Yu JT, Zhang SF, et al. Madecassoside alleviates acute kidney injury by regulating JNK-mediated oxidative stress and programmed cell death [J]. *Phytomedicine*, 2024, 123: 155252.
- [12] Leng DD, Han WJ, Rui Y, et al. In vivo disposition and metabolism of madecassoside, a major bioactive constituent in *Centella asiatica* (L.) Urb [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 150 (2): 601-608.
- [13] Rao ZP, Zhu YT, Yang P, et al. Pyroptosis in inflammatory diseases and cancer [J]. *Theranostics*, 2022, 12 (9): 4310-4329.
- [14] Ran YT, Su W, Gao FH, et al. Curcumin ameliorates white matter injury after ischemic stroke by inhibiting microglia/macrophage pyroptosis through NF-kappaB suppression and NLRP3 inflammasome inhibition [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 1552127.
- [15] Luo X, Bao XY, Weng XZ, et al. The protective effect of quercetin on macrophage pyroptosis via TLR2/Myd88/NF-kappaB and ROS/AMPK pathway [J]. *Life Sci*, 2022, 291: 120064.
- [16] Liu ZY, Yao XQ, Jiang WS, et al. Advanced oxidation protein products induce microglia-mediated neuroinflammation via MAPKs-NF-kappaB signaling pathway and pyroptosis after secondary spinal cord injury [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17 (1): 90.
- [17] Teng JF, Mei QB, Zhou XG, et al. Polyphyllin VI induces caspase-1-mediated pyroptosis via the induction of ROS/NF-kappaB/NLRP3/GSDMD signal axis in non-small cell lung cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12 (1): 193.
- [18] Sasmita AO, Ling APK, Voon KGL, et al. Madecassoside activates anti-neuroinflammatory mechanisms by inhibiting lipopolysaccharide-induced microglial inflammation [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41 (5): 3033-3040.
- [19] 高文喜, 韩瑞发, 郭凡, 等 . 中西医结合诊疗间质性膀胱炎专家共识 [J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2022, 28 (6): 757-762.

(收稿日期: 2024-01-02; 修回日期: 2024-03-24)

二维液相色谱检测脑胶质瘤患者同步放化疗及辅助化疗期间的血浆替莫唑胺峰浓度

李琳琳¹, 张升申², 马辉辉³, 张宁³, 蒿玉兴⁴, 王美伦¹, 夏泉², 宋帅^{2*} (1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2. 安徽医科大学第一附属医院药剂科, 合肥 230022; 3. 安徽医科大学第一附属医院放疗科, 合肥 230022; 4. 安徽医科大学第一附属医院神经外科, 合肥 230022)

摘要: **目的** 建立胶质瘤患者血浆替莫唑胺峰浓度的快速测定方法, 并分析同步放化疗及辅助化疗期间其血药浓度分布的特点。**方法** 血浆以盐酸酸化后加冰乙腈去蛋白处理, 离心分取上清。样本经 Aston SNCB 一维色谱柱 (4.6 mm×50 mm, 5 μm) 在线萃取, 在 Aston SBR 二维色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱分离。一维流动相为 MVV-1C 型样本萃取液, 流速为 0.8 mL·min⁻¹; 二维流动相由 OPI-2A 型、BPI-2C 型、API-2C 型、MPI-2A 型样本萃取液组成, 流速为 1.2 mL·min⁻¹; 进样量 200 μL, 柱温 40℃, 检测波长 330 nm。**结果** 血浆替莫唑胺在 0.4 ~ 25.6 μg·mL⁻¹ 与峰面积线性关系良好 ($r = 0.9995$), 转移回收率大于 96.50%, 提取回收率大于 95.72%, 日内、日间准确度和精密度良好。测定 53 例患者血浆样本, 同步放化疗期间患者替莫唑胺剂量标准化平均峰浓度明显大于其辅助化疗期间 (8.25 μg·mL⁻¹ vs 5.82 μg·mL⁻¹); 同步放化疗期间男性剂量标准化平均峰浓度低于女性 (5.86 μg·mL⁻¹ vs 12.33 μg·mL⁻¹)。 **结论** 该方法简便、快速、准确, 适合替莫唑胺血浆峰浓度监测。

关键词: 替莫唑胺; 峰浓度; 血药浓度; 二维液相色谱; 治疗药物监测

中图分类号: R969

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)06-1577-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.027

Peak concentration of plasma temozolomide in patients with glioblastoma during concurrent chemoradiation and adjuvant chemotherapy by two-dimensional liquid chromatography

LI Lin-lin¹, ZHANG Sheng-shen², MA Hui-hui³, ZHANG Ning³, HAO Yu-xing⁴, WANG Mei-lun¹, XIA Quan², SONG Shuai^{2*} (1. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022; 3. Department of Radiotherapy, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022; 4. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract: Objective To rapidly determine the peak concentration of temozolomide in the plasma of patients with glioblastoma, and to analyze the distribution characteristics of its plasma concentration during concurrent chemoradiation and adjuvant chemotherapy. **Methods** The plasma was acidified with hydrochloric acid and deproteinized with glacial acetonitrile before centrifugation to extract the supernatant. The sample was extracted online by an Aston SNCB one-dimensional chromatographic column (4.6 mm×50 mm, 5 μm). The chromatographic separation was done by an Aston SBR two-dimensional chromatographic column (4.6 mm×250 mm, 5 μm). The one-dimensional mobile phase was MVV-1C type sample extraction liquid, at a flow rate of 0.8 mL·min⁻¹. The two-dimensional

基金项目: 安徽省转化医学研究院科研基金项目 (No.2021zhyx-C37); 安徽省高等学校科学研究项目 (No. 2022AH051154); 安徽省“十三五”临床重点专科建设项目 (No. 卫科教秘 [2017]529 号)。

作者简介: 李琳琳, 女, 硕士, 主要从事临床药学工作, email: lllsxkaa@163.com * **通信作者:** 宋帅, 男, 主管中药师, 硕士研究生导师, 主要从事治疗药物监测与药物代谢、中药配伍规律工作, email: vae0558@163.com

mobile phase was composed of OPI-2A, BPI-2C, API-2C, and MPI-2A sample extractions, with a flow rate of $1.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. The injection volume was $200 \mu\text{L}$. The column temperature was $40 \text{ }^\circ\text{C}$, and the detection wavelength was 330 nm . **Results** Plasma temozolomide showed good linearity ($r = 0.9995$) at $0.4 \sim 25.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. The transfer recovery rate was greater than 96.50% , the extraction recovery rate was greater than 95.72% , and the intra-day and inter-day accuracy and precision were all good. The concentrations of temozolomide in 53 patient plasma samples were measured, and the standardized average peak concentration of temozolomide during concurrent chemoradiation was much higher than that during adjuvant chemotherapy ($8.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ vs $5.82 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). The standardized average peak concentration in male during concurrent chemoradiation was lower than that in females ($5.86 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ vs $12.33 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). **Conclusion** The proposed method is simple, rapid, accurate, precise, and appropriate for monitoring the peak concentration of temozolomide.

Key words: temozolomide; peak concentration; plasma drug concentration; two-dimensional high-performance liquid chromatography; therapeutic drug monitoring

替莫唑胺 (temozolomide, TMZ) 是治疗脑胶质瘤的一线化疗药物^[1], 是新型咪唑并四嗪类烷化剂。Stupp 等^[2]首次提出放疗与 TMZ 化疗相结合并由此形成脑胶质瘤的标准治疗方案^[3], 显著提升胶质瘤患者中位生存期和 2 年生存率。TMZ 上市 20 余年, 与手术、放疗并列成为治疗脑胶质瘤的“三驾马车”^[4], 在靶向药物发展日新月异的今天, 依然具有不可取代的重要价值。I 期临床研究证实, TMZ 在治疗剂量 $75 \sim 250 \text{ mg}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ 内呈线性动力学特征^[5], 口服给药的生物利用度

接近 100% 且能够有效穿透血脑屏障, 其中血浆和脑脊液中 TMZ 浓度比在 $28\% \sim 30\%$; 口服达峰时间约 1 h , 生物半衰期为 1.8 h , 因此基本不存在蓄积毒性^[6]。TMZ 在生理 pH 条件下迅速代谢为不稳定活性中间体 5-(3-甲基三氮烯-1-)咪唑-4-酰胺 (MTIC), 并进一步生成 5-氨基-咪唑-4-酰胺 (AIC) 与甲基重氮阳离子 (见图 1), 甲基重氮阳离子可通过 DNA 甲基化导致肿瘤细胞死亡, 其中 O^6 -甲基鸟嘌呤是 TMZ 细胞毒性的主要机制^[7]。

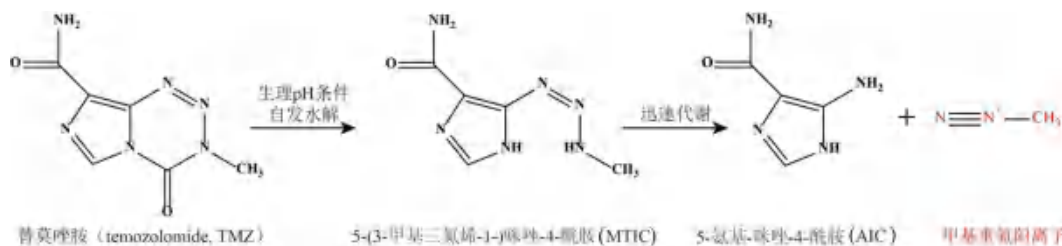


图 1 替莫唑胺的体内代谢过程

Fig 1 Metabolism of temozolomide

在临床上, 随着 TMZ 使用周期延长, 其不良反应发生的风险增加, 甚至因此停药^[8]。TMZ 在体内的治疗浓度范围未有报道, 随着精准医疗的发展, TMZ 个体化用药成为胶质瘤领域值得探索的研究方向^[3]。研究表明, 增加 TMZ 的脑内暴露会提高疗效^[9], 但临床检测抽取脑脊液较为不便, TMZ 相对稳定的血浆/脑脊液浓度比提示可以采用血药浓度监测代替脑脊液药物浓度监测来预测临床疗效。因此, 建立一种简便、快速检测 TMZ 血药浓度的方法, 标准化治疗方案中 TMZ 的血药浓度并分析其特征, 有望为其个体化用药研究提供初步参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

FLC2701 型二维液相色谱耦合仪 (湖南德米特仪器有限公司); BT25S 电子天平 (北京赛多利斯科学仪器有限公司, $d = 0.01 \text{ mg}$); HC-3018R 型高速冷冻离心机、KDC-1044 型低速离心机 (安徽中科中佳科学仪器有限公司); 涡旋混合器 (美国 Labnet 公司)。

1.2 试剂

替莫唑胺对照品 (批号: 2ZH6-66P2, 中国食品药品检定研究院, 纯度: 99.8%); 乙腈 (色谱纯, 美国 Tedia 公司); 双蒸水由我院制剂中心

提供；其他试剂均为市售分析纯。

2 方法

2.1 研究对象

收集我院 2022 年 8 月至 2023 年 7 月住院治疗的 44 例脑胶质瘤患者。本研究经安徽医科大学第一附属医院临床医学研究伦理委员会批准（批件号：PJ2022-05-24），入组患者均签署知情同意书。

纳入标准：符合《中国中枢神经系统胶质瘤诊断与治疗指南》中脑胶质瘤诊断标准^[10]；采用标准治疗方案（术后放疗联合 TMZ 化疗≥6 个周期）；年龄 18~80 岁，生命体征平稳，治疗意愿积极。

排除标准：妊娠及哺乳期妇女；合并其他恶性肿瘤者；合并严重心、肺、肝、肾等功能性障碍疾病；具有不能控制的癫痫或精神疾病者；存在放化疗禁忌证及对 TMZ 或达卡巴嗪过敏；严

重骨髓抑制者；临床资料缺失者。

2.2 样本采集与前处理

TMZ 服药频率为每日一次，综合考虑其临床药代动力学特征，本文研究 TMZ 峰浓度，在患者同步放化疗服药第三周的第三日及辅助化疗第三次的第三日服药 1 h 后采血。血药浓度监测时间点如图 2，具体方案如下：入组患者口服 TMZ 1 h 后采集其静脉血，EDTA 抗凝后立即离心（3000 r·min⁻¹×5 min）分取血浆；加入 2 mol·L⁻¹ 盐酸（1:20, V/V）酸化样本，涡旋混匀后置于-25℃保存。取血浆样本 400 μL 于 EP 管中，加入 1200 μL 乙腈涡旋混合 30 s 后高速离心（14 500 r·min⁻¹×8 min），分取上清液 800 μL 置于进样瓶中，待分析。

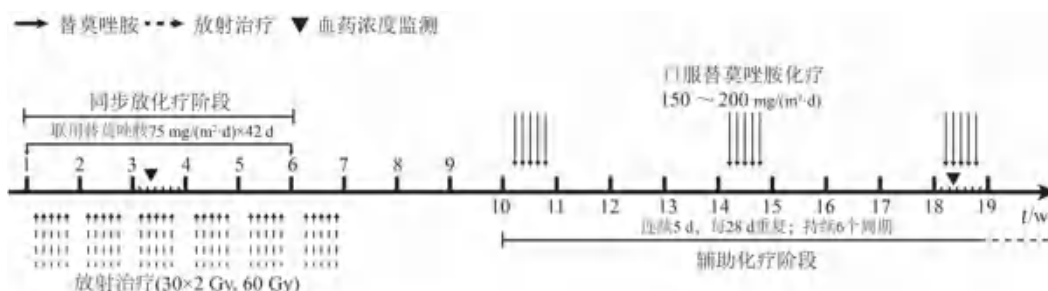


图 2 替莫唑胺血药浓度监测的采血点

Fig 2 Blood sampling for monitoring of temozolomide concentration

2.3 分析方法的建立与验证

2.3.1 工作溶液与质控样本 精密称取 TMZ 对照品 25.60 mg，加 50% 乙腈溶液（pH 1）定容至 5 mL，制得质量浓度为 5120 μg·mL⁻¹ 的储备液，用 50% 乙腈溶液（pH 1）稀释得质控工作液（800、512、32 μg·mL⁻¹）及标准曲线工作液（1024、512、256、128、64、32、16 μg·mL⁻¹）。取上述质控工作液 10 μL 加入 400 μL 空白酸化血浆（pH 1）中，依次得高（20 μg·mL⁻¹）、中（12.8 μg·mL⁻¹）和低（0.8 μg·mL⁻¹）质量浓度质控样本并置-25℃保存备用。

2.3.2 色谱条件 样品进样后先经 Aston SNCB 一维色谱柱（4.6 mm×50 mm，5 μm）进行初步分离，1.5 min 后流路切换转移到第二维色谱柱 Aston SBR（4.6 mm×250 mm，5 μm）进一步色谱分离，其中一维流动相为纯化水-甲醇-乙腈=95:13:13，并用 3.0 mmol·L⁻¹ 的磷酸-氨水缓冲溶液调至 pH 4.8，流速为 0.8 mL·min⁻¹，二维流动相为纯化水-甲醇-乙腈-异丙醇=64:10:7:1，并用 1.0 mmol·L⁻¹ 的磷酸二氢钾-氨水缓冲溶液调至

pH 3.5 流速为 1.2 mL·min⁻¹；柱温为 40℃，检测波长为 330 nm，进样量为 200 μL，分析总时长为 13 min。二维液相色谱仪时间程序见表 1。

表 1 二维液相色谱测定血浆替莫唑胺峰浓度时间程序
Tab 1 Time program for 2D-LC determination of plasma temozolomide peak concentration

流程	时间/min	系统工作状态
工序 1	0~1.5	LC1 色谱柱工作，进行样品初级分离，获取目标组分
工序 2	1.5~3.2	LC1 与 LC2 连通，洗脱样品至 LC2
工序 3	3.2~13.0	样品中目标组分的分离检测

2.3.3 方法学验证 参考《中国药典》2020 年版通则 9012“生物样品定量分析方法验证指导原则”并结合研究实际^[11]，分别进行方法的专属性、定量下限、标准曲线、转移回收率、提取回收率、精密度、准确度和稳定性考察。

2.4 统计学分析

采用统计学软件 SPSS 22.0 对数据进行分析。所有定量数据采用 Kolmogorov-Smirnov 方法检验正态性，符合正态分布者采用均数±标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，否则采用中位数。不符合正态分

布的计量资料采用 Kruskal-Wallis H 秩和检验。单因素分析采用 Logistic 二元回归法进行检验，将单因素分析中可能对结果有影响的变量纳入多因素分析。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 方法学验证

3.1.1 专属性考察 取 8 份不同来源的空白血浆、中浓度质控样本和患者口服 TMZ 胶囊 ($220 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$) 1 h 后血浆样本，按“2.2”项下方法处理，按“2.3.2”项下条件测定。结果 TMZ 保留时间为 7.6 min，峰形良好，在其保留时间处未见明显干扰。色谱图见图 3。

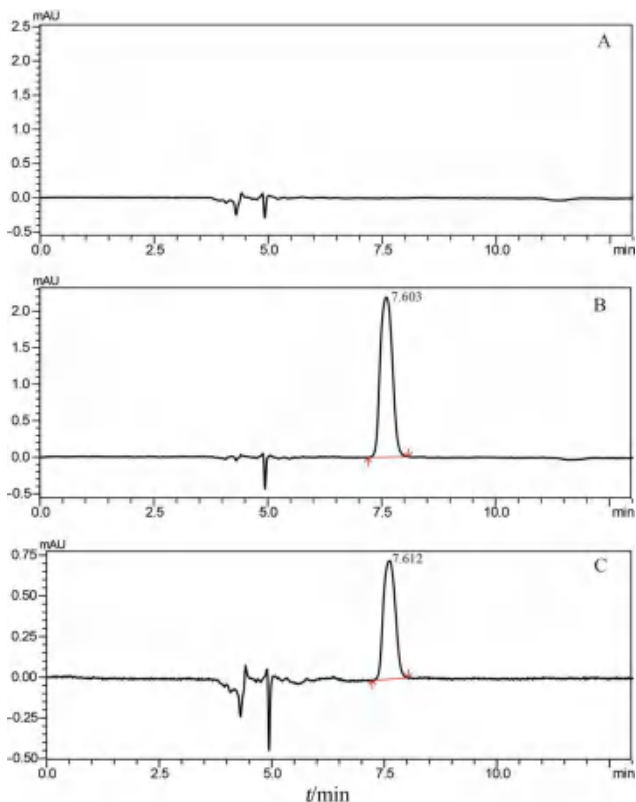


图 3 血浆中替莫唑胺的 2D-HPLC 图

Fig 3 2D-HPLC chromatograms of temozolomide in the plasma
A. 空白血浆 (blank plasma); B. 空白血浆加入替莫唑胺对照品 (blank plasma added with temozolomide); C. 患者口服替莫唑胺胶囊 1 h 的血浆样本 (plasma sample of patient after the administration of temozolomide capsules for 1 h)

3.1.2 线性关系与定量下限 取标准曲线工作溶液 $10 \mu\text{L}$ 加入至 $400 \mu\text{L}$ 空白酸化血浆 ($\text{pH} 1$) 中，按“2.2”项下方法处理后进行测定，以峰面积对质量浓度进行线性回归 (权重为 $1/y^2$)，得回归方程： $Y = 3.390 \times 10^3 X - 576.42$ ($r = 0.9995$)。定量下限为 $0.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，信噪比大于 10。

3.1.3 转移回收率 取低、中、高浓度质控溶液 ($32, 512, 800 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) $10 \mu\text{L}$ 加入至 $400 \mu\text{L}$ 蒸馏水 ($\text{pH} 1$) 中，按“2.2”项下方法处理后分别进

表 2 酸化血浆中替莫唑胺的日内、日间准确度及精密度 ($n = 5$)

Tab 2 Intra-day and inter-day accuracy and precision of temozolomide in acidified plasma ($n = 5$)

质控浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	准确度 RE/%		精密度 RSD/%	
	日内	日间	日内	日间
0.4	99.00	100.17	7.6	7.5
0.8	108.13	103.50	5.2	5.5
12.8	95.13	96.94	2.0	2.0
20.0	103.20	108.33	3.5	3.3

行二维色谱模式和单维色谱模式 (直接进入二维色谱柱) 检测并记录其峰面积 A_1 和 A_2 ，转移回收率 = $A_1/A_2 \times 100\%$ 。结果表明，TMZ 转移回收率大于 96.50% 且 RSD 均小于 4.3%。

3.1.4 提取回收率 取低、中、高浓度质控样本 ($32, 512, 800 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)，按“2.2”项下方法处理后进行测定，记录峰面积为 B_1 ，取酸化血浆 $400 \mu\text{L}$ 于 EP 管中，加入 $1200 \mu\text{L}$ 乙腈涡旋混合 30 s 后，向 EP 管中各加入 $10 \mu\text{L}$ 低、中、高浓度质控工作液后高速离心 ($14\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1} \times 8 \text{ min}$)，分取上清液测定，记录峰面积为 B_2 ，提取回收率 (%) = $B_1/B_2 \times 100\%$ 。结果表明，该方法提取回收率大于 95.72%，且 RSD 均小于 4.3%。

3.1.5 准确度与精密度 取定量下限及低、中、高浓度质控样本 ($32, 512, 800 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)，按“2.2”项下方法处理后进行测定，结果表明该方法的准确度和精密度良好，见表 2。

3.1.6 稳定性 考察低、中、高浓度质控样本 ($32, 512, 800 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 在室温下放置 24 h、 -25°C 反复冻融 3 次、长期冻存 4 周后和处理后样本在自动进样器放置 24 h 的稳定性。不同条件下 TMZ 测定结果的准确度 ($92.50\% \sim 110.80\%$) 和精密度 ($< 4.3\%$) 均符合要求，表明 TMZ 在上述储存及分析过程中保持稳定。

3.2 TMZ 血药浓度监测

共测定 44 例患者的 53 例次血浆样本，患者一般资料如表 3 所示。其中同步放化疗期间样本 19 个，辅助化疗期间样本 34 个。由于每位患者服药剂量不同，且大多数患者服药剂量为 $220 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ ，统一以日剂量 ($220 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$) 对这 53 个血药浓度监测结果进行标准化处理，即 $C_{220 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}} = C_{\text{实际测得}} \times 220 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1} / \text{实际服药剂量}$ ，得到 TMZ 标准化后峰浓度范围为 $0.61 \sim 16.07 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。对比分析性别、年龄、体质量指数 (BMI) 等因素对 TMZ 峰浓度的影响，结果表明同步放化疗期间患者血浆 TMZ 平均峰浓度显著高于辅助化疗期间浓度 ($8.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ vs $5.82 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $P < 0.05$)；同步放

化疗期间，男性患者血浆 TMZ 峰浓度均低于女性 (5.86 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ vs 12.33 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $P < 0.05$)，结果见图 4。将测得的 TMZ 血浆峰浓度、剂量标准化后峰浓度和服药剂量一并纳入与疗效进行 Logistic 二分类回归分析，结果显示测得的 TMZ 血浆峰浓度 $P < 0.05$, $OR > 1$ ，说明 TMZ 实际测得峰浓度在体内暴露越多疗效越好。

表 3 患者一般资料

Tab 3 General information of patients

特征	患者人数
性别 / (男 / 女)	25/19
年龄 / 岁	51 (16, 85)
体重 / kg	60.0 (42, 92.5)
身高 / m	1.62 (1.49, 1.82)
BMI / ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$)	22.89 (15.79, 34.45)
疗效	
完全缓解 (CR)	1
部分缓解 (PR)	19
稳定 (SD)	22
有进展 (PD)	2
治疗阶段	
同步放化疗	19
辅助化疗	34

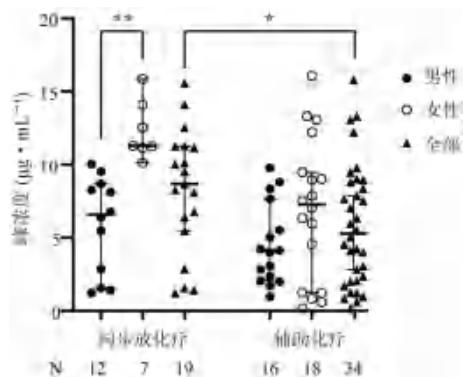


图 4 胶质瘤患者同步放化疗及辅助化疗期间的血浆替莫唑胺峰浓度 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig 4 Peak concentration of plasma temozolomide in patients with glioblastoma during concurrent chemoradiation and adjuvant chemotherapy (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

注 (Note): 图示浓度均为剂量标准化峰浓度 (plasma temozolomide peak concentration for each subject standardized by the administered dose); N 为各组患者人数 (N is the number of samples)。

4 讨论

血浆峰浓度以及曲线下面积是抗肿瘤药物血药浓度监测重要指标^[12]。TMZ 半衰期仅有 1.8 h，因此本研究选择 TMZ 血浆峰浓度评估其在体内药物暴露。Logistic 回归分析结果提示，TMZ 体内峰浓度水平与其疗效成正相关。与既往报道相比，本研究患者平均峰浓度略低^[13]，这可能与本

研究采用剂量标准化浓度有关。多数患者剂量标准化血药浓度范围较为集中，这与 TMZ 线性药动学和非酶代谢特征基本相符^[14]，部分患者峰浓度的个体间差异可能与 TMZ 药物转运体的单核苷酸多态性有关^[15]。本研究亦存在局限性：首先，本研究未对放疗和性别对血浆 TMZ 峰浓度影响进行进一步分析；其次，受限于原发性脑胶质瘤患者的单中心研究，入组患者数量较少。因此，在明确 TMZ 血浆峰浓度监测价值的基础上，进一步扩大样本队列并探索 TMZ 药物转运体单核苷酸多态性对血药浓度及疗效的影响十分必要。

灵敏度是限制血药浓度监测的重要原因^[16]。全自动二维液相色谱不仅具备传统 HPLC 分析的专属性特点，更兼具大体积进样以提升灵敏度的独特优势，目前已在医疗机构中广泛用于血药浓度监测^[17]。为此，本研究首先通过转移回收率试验初步明确二维色谱条件，然后进一步优化样本前处理条件以实现较大体积进样。研究发现，与甲醇、乙腈、高氯酸等蛋白沉淀法相比，冰乙腈可更加高效地去除血浆内源性干扰，保护色谱柱，提升分析效率和灵敏度，更加符合 TMZ 临床血药浓度监测的客观需要。

综上所述，本研究基于二维液相色谱技术建立了一种快速检测替莫唑胺血药浓度的方法，并检测了 53 例次血浆样本浓度。该方法能够满足临床上替莫唑胺的血药浓度监测，可为临床科学合理制订用药方案及实现个体化治疗提供方法学参考。

参考文献

- [1] Strobel H, Baisch T, Fitzel R, et al. Temozolomide and other alkylating agents in glioblastoma therapy [J]. Biomedicines, 2019, 7 (3): 69-85.
- [2] Stupp R, Mason WP, Van Den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma [J]. N Engl J Med, 2005, 352 (10): 987-996.
- [3] Stupp R, Gander M, Leyvraz S, et al. Current and future developments in the use of temozolomide for the treatment of brain tumours [J]. Lancet Oncol, 2001, 2 (9): 552-560.
- [4] Schaff LR, Mellinshoff IK. Glioblastoma and other primary brain malignancies in adults: a review [J]. JAMA, 2023, 329 (7): 574-587.
- [5] Brada M, Judson I, Beale P, et al. Phase I dose-escalation and pharmacokinetic study of temozolomide (SCH 52365) for refractory or relapsing malignancies [J]. Br J Cancer, 1999, 81 (6): 1022-1030.

- [6] Schreck KC, Grossman SA. Role of temozolomide in the treatment of cancers involving the central nervous system [J]. *Oncology (Williston Park)*, 2018, 32 (11): 555-569.
- [7] Ruff MW, Buckner JC, Johnson DR, et al. Neuro-Oncology Clinical Debate: PCV or temozolomide in combination with radiation for newly diagnosed high-grade oligodendro glioma [J]. *Neurooncol Pract*, 2019, 6 (1): 17-21.
- [8] 汪雄, 刁长冬, 朱海霞, 等. 含替莫唑胺化疗方案不良反应发生情况及影响因素分析 [J]. *中国药理学杂志*, 2021, 56 (17): 1414-1419.
- [9] 毕秀丽, 黄桂华, 张娜, 等. 替莫唑胺固体脂质纳米粒在动物体内药理学及组织分布研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2007, 42 (21): 1655-1660.
- [10] 《中国中枢神经系统胶质瘤诊断和治疗指南》编写组. 中国中枢神经系统胶质瘤诊断与治疗指南 (2015) [J]. *中华医学杂志*, 2016, 96 (7): 485-509.
- [11] 中国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 363-368.
- [12] Liston DR, Davis M. Clinically relevant concentrations of anticancer drugs: a guide for nonclinical studies [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23 (14): 3489-3498.
- [13] 陈刚, 王进, 王泽娟, 等. 液质联用测定血浆替莫唑胺的浓度 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34 (9): 1111-1114.
- [14] Di Filippo LD, Azambuja JH, Dutra JAP, et al. Improving temozolomide biopharmaceutical properties in glioblastoma multiforme (GBM) treatment using GBM-targeting nanocarriers [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2021, 168: 76-89.
- [15] Tong SM, Wang Y, Wu J, et al. Comprehensive pharmacogenomics characterization of temozolomide response in gliomas [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 912: 174580.
- [16] Hu SY, Fu XG, Zhang M, et al. Detection of phosphatidylethanol in whole blood by UPLC-MS/MS [J]. *Fa Yi Xue Za Zhi*, 2022, 38 (3): 367-373.
- [17] 肖俊辉, 周玉生, 李卓, 等. 二维高效液相色谱法检测达托霉素血药浓度的可行性考察 [J]. *中国医院药学杂志*, 2024, 44 (2): 191-194.

(收稿日期: 2023-12-11; 修回日期: 2024-02-27)

新型 GPR40 激动剂 ADD-16 及其钠盐平衡溶解度和油水分配系数的研究

马丽莎¹, 林佳艳¹, 李琦², 郭凯蕾³, 何金穗³, 孙定康³, 王庆伟⁴, 刘雪英^{1*} (1. 空军军医大学药学院, 西安 710032; 2. 河南大学生命科学学院, 河南 开封 475004; 3. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046; 4. 西安秦皇医院, 西安 710600)

摘要: **目的** 测定 ADD-16 及其钠盐形式在不同溶剂中的平衡溶解度及油水分配系数, 为其后续的体内研究及制剂开发提供依据。 **方法** 建立 HPLC 法定量测定 ADD-16 及其钠盐含量, 考察 ADD-16 及其钠盐在不同有机溶剂和不同 pH 磷酸缓冲液中的平衡溶解度, 测定 ADD-16 及其钠盐在正辛醇-水体系中的油水分配系数。 **结果** ADD-16 及其钠盐在醇类有机溶剂中的溶解度较高, 尤其在极性较大的甲醇中溶解度最大, 分别为 8.87、333.03 mg · mL⁻¹。 ADD-16 及其钠盐在磷酸缓冲液中的溶解度随 pH 增加而增大, 均在 pH 7.4 的缓冲液中溶解度最大, 分别为 6.63、796.86 μg · mL⁻¹。 ADD-16 及其钠盐形式的油水分配系数分别为 3.29、-0.45。 **结论** ADD-16 及其钠盐的溶解度均受溶剂极性及 pH 影响, ADD-16 成盐后溶解度有显著提高, 且油水分配系数明显下降, ADD-16 钠盐可能有更好的成药性。

关键词: GPR40; 平衡溶解度; 油水分配系数; 高效液相色谱

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)06-1582-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.028

基金项目: 陕西省 2021 年创新能力支持计划 (No.2021GCZX-07 号); 陕西省秦创原“科学家+工程师”队伍建设 (No.2023KXJ-080 号)。
作者简介: 马丽莎, 女, 硕士研究生, 主要从事药物分析与药代动力学研究, email: 18909267701@163.com * **通信作者:** 刘雪英, 女, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事药物设计合成与活性研究及药代动力学研究, email: xylu0427@163.com

Equilibrium solubility and oil-water partition coefficients of novel GPR40 agonist ADD-16 and its sodium salt

MA Li-sha¹, LIN Jia-yan¹, LI Qi², GUO Kai-lei³, HE Jin-sui³, SUN Ding-kang³, WANG Qing-wei⁴, LIU Xue-ying^{1*} (1. Department of Pharmacy, Air Force Medical University, Xi'an 710032; 2. School of Life Sciences, Henan University, Kaifeng Henan 475004; 3. Department of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712046; 4. Xi'an Qinhuang Hospital, Xi'an 710600)

Abstract: Objective To determine the equilibrium solubility and oil-water partition coefficients of ADD-16 and its sodium salt in different solvents, providing a basis for its subsequent in vivo research and formula development. **Methods** HPLC was used to detect the equilibrium solubility of ADD-16 and its sodium salt in different organic solvents and phosphate buffer solutions with different pH values. The method was also used to detect the oil-water partition coefficients of ADD-16 and its sodium salt in the *n*-octanol water system. **Results** The solubility of ADD-16 and its sodium salt in alcohol was high, especially in methanol, with the highest solubility of 8.87 and 333.03 mg · mL⁻¹, respectively. The solubility of ADD-16 and its sodium salt in phosphate buffer increased with pH, and both have the highest solubility (6.63 and 796.86 μg · mL⁻¹, respectively) in a pH 7.4 buffer. The oil-water distribution coefficients of ADD-16 and its sodium salt were 3.29 and - 0.45, respectively. **Conclusion** The solubility of ADD-16 and its sodium salt is influenced by solvent polarity and pH value. After salt formation, the solubility of ADD-16 is obviously improved, and the oil-water distribution coefficient is decreased, indicating better drug formation performance of ADD-16 sodium salts.

Key words: GPR40; equilibrium solubility; oil-water partition coefficient; HPLC

GPR40 受体被证明是 2 型糖尿病的潜在治疗靶点, 主要分布于胰岛 β 细胞及肠道内分泌细胞中^[1], 其所介导的促胰岛素分泌作用具有葡萄糖依赖性, 因此 GPR40 激动剂在没有低血糖风险的同时还可介导肠促胰岛素的分泌, 以达到更好的控制血糖的作用^[2-4]。ADD-16 是基于药效团模型及分子对接的筛选策略合成的新型吡啶二酮母核结构的 GPR40 激动剂, 研究显示 ADD-16 具有促胰岛素分泌作用, 且在治疗浓度下未观察到毒性^[5-6], 但 ADD-16 在常见溶剂中溶解度低, 经结构改造得到 ADD-16 的钠盐形式 (ADD-16 Na), 结构见图 1。

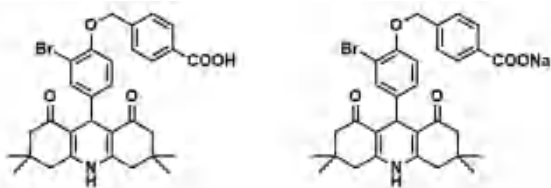


图 1 ADD-16 和 ADD-16 Na 结构式

Fig 1 Structural formulas of ADD-16 and ADD-16 Na

平衡溶解度和油水分配系数是化合物的关键物理化学参数, 对化合物在机体内吸收、分

布、代谢、排泄和毒性 (ADMET), 生物活性及口服生物利用度均有重要影响^[7-9], 也可用于预测化合物在机体内的吸收、分布及跨膜转运等过程^[10-11]。本文在建立 HPLC 定量测定 ADD-16 及 ADD-16 Na 方法的基础上, 结合摇瓶法测定 ADD-16 和 ADD-16 Na 在不同有机溶剂、不同 pH 值的磷酸缓冲液中的溶解度及油水分配系数, 为 ADD-16 和 ADD-16 Na 后续的 ADMET 研究、制剂开发和临床试验提供理论依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪, 包括四元泵 (G1311C), 自动进样器 (G1329B), 柱温箱 (G1316A), 二极管阵列检测器 (G4212B) (美国安捷伦公司); ME204 万分之一天平 (瑞士梅特勒托利多科技有限公司); PHS-3C 型精密酸度计 (上海大普仪器有限公司); SB-100DT 超声波清洗器 (宁波新艺超声设备有限公司); Sorvall ST 40R 冷冻离心机 (美国赛默飞世尔科技有限公司); UPF-H-20L 优普纯水 / 超纯水制造系统 (成都优普仪器设备有限公司); ZWY-100D 恒温培养振荡器 (上海智城分析仪器有限公司)。

ADD-16 对照品 (自制, 纯度: 99%); ADD-16 Na 对照品 (自制, 纯度: 99%); 磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、磷酸二氢钠、氢氧化钠 (分析纯, 天津大茂化学试剂厂); 磷酸氢二钠、磷酸 (分析纯, 天津科密欧试剂厂); 乙酸乙酯、甲酸、正辛醇 (分析纯, 天津市富宇精细化工有限公司); 无水乙醇 (分析纯, 天津市天力化学试剂有限公司); 甲醇、乙腈、异丙醇 (色谱纯, 美国赛默飞世尔科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 空白溶剂的配制 精密量取 7.5 mL 流动相水相置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度线, 摇匀, 作为空白溶剂。

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取 ADD-16 及 ADD-16 Na 对照品, 使用空白溶剂溶解制成 $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.1.3 不同 pH 磷酸缓冲液制备 根据《中国药典》2020 年版第四部 8004^[12], 配制 pH 为 2.0、5.0、5.8、6.5、6.8、7.0、7.4 的磷酸盐缓冲液。

2.1.4 正辛醇-水饱和溶液制备 精密量取 50 mL 纯水与 50 mL 正辛醇置于具塞锥形瓶中, 于 37 °C 恒温振摇 24 h 后, 静置过夜, 分离上层油相为水饱和的正辛醇; 下层水相为正辛醇饱和的水。

2.2 色谱条件与系统适应性试验

色谱柱: Inertsil ODS-3 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.17% 甲酸水溶液 (85 : 15); 流速: $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长: 236 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL 。取“2.1”项下空白溶剂及 ADD-16、ADD-16 Na 对照品溶液进样测定, 色谱图见图 2。在此色谱条件下 ADD-16 及 ADD-16 Na 峰形良好, 保留时间稳定, 且空白溶剂在样品出峰时间无干扰, 说明该方法专属性良好。

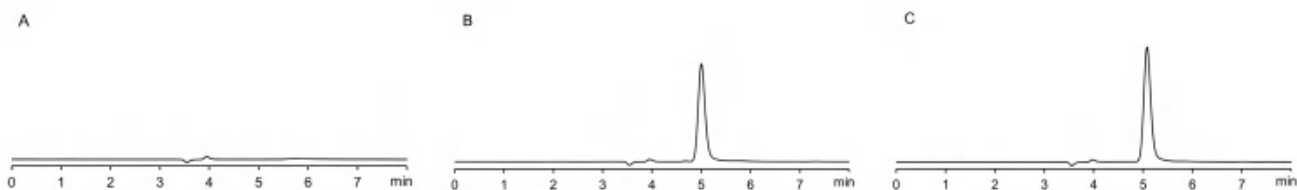


图 2 空白溶剂 (A)、ADD-16 对照品 (B) 和 ADD-16 Na 对照品 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig 2 HPLC chromatogram of blank solution (A), ADD-16 standard solution (B) and ADD-16 Na standard solution (C)

2.3 线性关系考察

取“2.1.2”项下 ADD-16、ADD-16 Na 对照品溶液, 使用空白溶剂稀释得到质量浓度分别为 400、300、200、100、50、25、10、5、1、0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列对照品溶液。按照“2.2”项下色谱条件进样, 测定峰面积 (A), 以 A 为纵坐标 (Y), 以质量浓度为横坐标 (X , $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 绘制标准曲线, 分别得到 ADD-16 线性回归方程为 $Y = 57.611X - 52.957$, $r = 0.9999$; ADD-16 Na 线性回归方程为 $Y = 57.230X - 0.5758$, $r = 0.9998$; 结果表明 ADD-16 及 ADD-16 Na 在 0.5 ~ 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与峰面积线性关系良好。

2.4 精密度试验

分别取高、中、低浓度的 ADD-16 对照品溶液 (300、50、5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和 ADD-16 Na 对照品溶液 (300、50、10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 按照“2.2”项下色谱条件, 每个样品进样 6 次, 记录峰面积, 计算日内 RSD; 连续进样 5 d, 计算日间 RSD。结果 300、50、5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ADD-16 对照品溶液的日内 RSD 依次为 0.36%、0.50%、0.52% ($n = 6$); 日间 RSD

依次为 0.48%、1.5%、0.98% ($n = 5$)。300、50、10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ADD-16 Na 对照品溶液的日内 RSD 依次为 0.33%、0.39%、0.39% ($n = 6$); 日间 RSD 依次为 1.5%、1.5%、1.4% ($n = 5$)。表明该方法精密度良好。

2.5 重复性试验

平行称取 ADD-16、ADD-16 Na 各 6 份, 精密称定, 用空白溶剂溶解得到质量浓度均为 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 按照“2.2”项下色谱条件进样测定, 计算得到 ADD-16、ADD-16 Na 对照品溶液峰面积 RSD 分别为 1.0%、0.77% ($n = 6$)。表明该方法重复性良好。

2.6 稳定性试验

分别取高、中、低浓度的 ADD-16、ADD-16 Na 对照品溶液 (300、50、5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 分别在 0、2、4、8、10、12、24 h 按照“2.2”项下色谱条件进样, 记录峰面积, 计算 RSD。结果 ADD-16 高、中、低浓度样品对应峰面积 RSD 分别为 0.39%、0.50%、0.47% ($n = 5$); ADD-16 Na 高、中、低浓度样品对应峰面积 RSD 分别为 0.44%、0.46%、

0.63% ($n = 5$)。表明 ADD-16 及 ADD-16 Na 溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7 平衡溶解度的测定^[13]

2.7.1 ADD-16 及 ADD-16 Na 在不同有机溶剂中的溶解度 量取 2 mL 不同有机溶剂于 10 mL 离心管中, 分别加入过量的 ADD-16 及 ADD-16 Na, 将过饱和溶液置于 37 °C 恒温振荡器中, 振荡 24 h 后, 12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜, 滤液使用空白溶剂稀释相应倍数后于“2.2”项色谱条件下进样, 记录峰面积并计算 ADD-16 及 ADD-16 Na 在不同有机溶剂中的溶解度, 结果见表 1 和 2。

表 1 质子性溶剂中 ADD-16 及 ADD-16 Na 的溶解度 ($n = 6$, mg · mL⁻¹)

Tab 1 Solubility of ADD-16 and ADD-16 Na in protic solvents ($n = 6$, mg · mL⁻¹)

质子性溶剂	ADD-16	ADD-16 Na
甲醇	8.87 ± 0.360	333.03 ± 6.923
乙醇	8.83 ± 0.138	16.26 ± 0.560
异丙醇	3.01 ± 0.098	4.67 ± 0.084
正辛醇	1.21 ± 0.025	3.10 ± 0.079

表 2 非质子性溶剂中 ADD-16 及 ADD-16 Na 的溶解度 ($n = 6$, μg · mL⁻¹)

Tab 2 Solubility of ADD-16 and ADD-16 Na in aprotic solvents ($n = 6$, μg · mL⁻¹)

非质子性溶剂	ADD-16	ADD-16 Na
乙酸乙酯	447.37 ± 9.413	19.68 ± 0.734
乙腈	74.31 ± 0.991	21.81 ± 1.122

2.7.2 ADD-16 及 ADD-16 Na 在不同 pH 缓冲液中的溶解度 量取 2 mL “2.1.3”项下 pH 为 2.0、5.0、5.8、6.5、6.8、7.0、7.4 的系列磷酸缓冲液于 10 mL 离心管中, 加入过量的 ADD-16 及 ADD-16 Na, 按“2.7.1”项下方法操作, 并计算 ADD-16 及 ADD-16 Na 在不同 pH 缓冲液中的溶解度, 结果见表 3。

由表 3 可知, pH 值对 ADD-16 及 ADD-16 Na 在的溶解度影响较大, 两种化合物均在 pH 2.0 的缓冲液中未能检出, 且在 pH 7.4 的缓冲液中溶解度最大。由溶解度结果可看出, 相同 pH 缓冲液中 ADD-16 Na 的溶解度明显大于 ADD-16。

2.8 油水分配系数的测定^[14]

量取 8 mL 水饱和的正辛醇于 10 mL 离心管中, 分别加入过量的 ADD-16 及 ADD-16 Na, 超声至化合物不再溶解后, 12 000 r · min⁻¹ 离心 5 min, 取上清液 1 mL 置于 10 mL 离心管中, 加入 1 mL 正辛醇饱和的水, 置于 37 °C 恒温振荡器中, 振荡 24 h 后, 再次 12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,

表 3 ADD-16 及 ADD-16 Na 不同 pH 缓冲液中的溶解度 ($n = 6$, μg · mL⁻¹)

Tab 3 Solubility of ADD-16 and ADD-16 Na in different pH buffers ($n = 6$, μg · mL⁻¹)

pH	ADD-16	ADD-16 Na
2.0	ND	ND
5.0	ND	1.35 ± 0.022
5.8	ND	22.95 ± 0.32
6.5	0.398 ± 0.0092	178.93 ± 1.84
6.8	0.964 ± 0.022	216.93 ± 2.40
7.0	2.20 ± 0.038	550.09 ± 2.54
7.4	6.63 ± 0.082	796.86 ± 2.97

分别取上层油相和下层水相, 过 0.22 μm 微孔滤膜后, 使用空白溶剂稀释相应倍数, 于“2.2”项色谱条件下进样, 得到油相峰面积 (A_o) 和水相峰面积 (A_w), 计算得到油相浓度 (C_o) 和水相浓度 (C_w), 再按照公式 $P = C_o/C_w$ 计算得 ADD-16 及 ADD-16 Na 的油水分配系数 (P), 从而求得 $\log P$ 。结果见表 4, ADD-16 成盐后其脂溶性有明显下降。

表 4 ADD-16 及 ADD-16 Na 的油水分配系数 ($n = 6$)

Tab 4 Oil-water distribution coefficients of ADD-16 and ADD-16 Na ($n = 6$)

	P	$\log P$	RSD/%
ADD-16	1949.56 ± 88.37	3.29 ± 0.02	0.60
ADD-16 Na	0.359 ± 0.01	- 0.445 ± 0.01	2.7

3 讨论

本文在建立了 ADD-16 Na 及 ADD-16 的 HPLC 含量测定方法基础上, 测定了 ADD-16 和 ADD-16 Na 的平衡溶解度及油水分配系数, 为其临床前及临床试验提供数据支持。

试验最初使用乙腈作为有机相, 峰形良好但出峰时间较长, 溶解度预试验中发现 ADD-16 和 ADD-16 Na 在乙腈中的溶解度明显小于甲醇, 因此更换甲醇作为有机相, 相同流动相比例下可明显增强样品峰的响应, 提高方法的灵敏度, 扩大方法的线性范围; 试验中尝试使用纯水作为水相发现样品峰明显展宽, 加入 0.17% 甲酸后可明显降低峰宽, 抑制拖尾, 因此使用甲醇: 0.17% 甲酸水 = 85 : 15 作为流动相获得了更好的专属性、灵敏度及线性范围。

化合物的溶解度主要取决于结构, 同时也受外界条件, 如温度、pH 值等因素的影响^[15]。ADD-16 在水中的溶解较差, 尤其在偏酸性的缓冲液中几乎不溶, 这可能是由于其吡啶二酮的大分子结构所导致^[16-17], 并且 ADD-16 结构中含有多个甲基以及吸电子效应较大的溴取代基, 这些基团均可导致其水

溶性的降低^[18-19]；同时 ADD-16 还含有氨基、羧基等极性基团，这可能导致其在极性与非极性溶剂中的溶解度均不理想。ADD-16 成盐后在极性溶剂中的溶解度明显增加，且在不同质子性试剂中的溶解度由大到小依次是：甲醇 > 乙醇 > 异丙醇 > 正辛醇，与四种溶剂的极性由大到小顺序相同；本研究以 pH 2.0 ~ 7.4 的磷酸缓冲液以模拟胃肠道不同部位的 pH 环境^[20-21]，并且结果显示 ADD-16 Na 在缓冲液中的溶解度随 pH 增加而增大，由此可推测经成盐后得到的 ADD-16 Na 将在生物体内弱碱性部位（如肠道），可能有更好的吸收及生物利用度。

在体内具有良好吸收的化合物应具备良好的溶解性及相对合适的脂溶性，脂溶性过低会导致化合物难以透过生物膜，而脂溶性过高的化合物通常溶解度偏低，且具有较高的代谢清除率，从而导致这类化合物的吸收和生物利用度较差^[22]。有研究表明有利于药物吸收的 $\log P$ 的最佳范围为 $-1 < \log P < 2$ ^[23]。结果表明，ADD-16 的 $\log P$ 为 3.29，脂溶性较强，而成盐后，ADD-16 Na 的脂溶性明显降低，其 $\log P$ 为 -0.445，属于最佳范围，证明 ADD-16 Na 的溶解性明显提升的同时有适中的脂溶性，推测其在生物体内有较好的渗透性。

依据本研究结果和 BCS 分类，ADD-16 属于低溶解度、高渗透性的 II 类药物；ADD-16 Na 属于高溶解度、高渗透性的 I 类药物，在体内可能有更好的吸收及生物利用度，初步判断 ADD-16 Na 相对 ADD-16 具有更好的成药性，适合口服给药。

参考文献

- [1] Mahri SA, Malik SS, Ibrahim MA, et al. Free fatty acid receptors (FFARs) in adipose: physiological role and therapeutic outlook [J]. *Cells*, 2022, 11 (4): 750.
- [2] Arora A, Behl T, Sehgal A, et al. Free fatty acid receptor 1: a ray of hope in the therapy of type 2 diabetes mellitus [J]. *Inflammopharmacology*, 2021, 29 (6): 1625-1639.
- [3] Eleazu C, Charles A, Eleazu K, et al. Free fatty acid receptor 1 as a novel therapeutic target for type 2 diabetes mellitus-current status [J]. *Chem Biol Interact*, 2018, 289: 32-39.
- [4] Governa P, Caroleo MC, Carullo G, et al. FFAR1/GPR40: one target, different binding sites, many agonists, no drugs, but a continuous and unprofitable tug-of-war between ligand lipophilicity, activity, and toxicity [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2021, 41: 127969.
- [5] 刘雪英, 沈歆, 刘吉元, 等. 一种吡啶二酮类化合物在制备抗糖尿病药物中的应用: CN111303030B [P]. 2021-06-29.
- [6] 沈歆. 新型吡啶二酮类 GPR40 激动剂的发现和抗 2 型糖尿病活性研究 [D]. 西安: 中国人民解放军空军军医大学, 2020.
- [7] Barrett JA, Yang W, Skolnik SM, et al. Discovery solubility measurement and assessment of small molecules with drug development in mind [J]. *Drug Discov Today*, 2022, 27 (5): 1315-1325.
- [8] Das B, Baidya ATK, Mathew AT, et al. Structural modification aimed for improving solubility of lead compounds in early phase drug discovery [J]. *Bioorg Med Chem*, 2022, 56: 116614.
- [9] Di L, Fish PV, Mano T. Bridging solubility between drug discovery and development [J]. *Drug Discov Today*, 2012, 17 (9-10): 486-95.
- [10] Henchoz Y, Bard B, Guilleme D, et al. Analytical tools for the physicochemical profiling of drug candidates to predict absorption/distribution [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 394 (3): 707-729.
- [11] Vraga C, Nics L, Wagner K H, et al. LogP, a yesterday's value? [J]. *Nucl Med Biol*, 2017, 50: 1-10.
- [12] 中国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 424.
- [13] 陈方梅. 新型抗肿瘤化合物 CNF2 的成药性初讨 [D]. 上海: 上海工程技术大学, 2021.
- [14] 孟利强. 高活性 C-Met 激酶抑制剂的初步成药性研究 [D]. 太原: 山西医科大学, 2019.
- [15] Kerns E, Di L, Carter G. In vitro solubility assays in drug discovery [J]. *Curr Drug Metab*, 2008, 9 (9): 879-885.
- [16] Huuskonen J, Livingstone DJ, Manallack DT. Prediction of drug solubility from molecular structure using a drug-like training set [J]. *Sar Qsar Environ Res*, 2008, 19 (3-4): 191-212.
- [17] Lipinski CA. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability [J]. *J Pharmacol Tox Met*, 2000, 44 (1): 235-249.
- [18] Walker, Michael A. Improvement in aqueous solubility achieved via small molecular changes [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2017: 5100-5108.
- [19] 卡米尔·乔治·沃尔穆什, 沃尔穆什, 蒋华良. 实用药物化学 [M]. 北京: 科学出版社, 2012: 585-621.
- [20] Fallingborg J. Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract [J]. *Dan Med Bull*, 1999, 46 (3): 183.
- [21] Vertzoni M, Augustijns P, Grimm M, et al. Impact of regional differences along the gastrointestinal tract of healthy adults on oral drug absorption: an UNGAP review [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2019, 134: 153-175.
- [22] 爱德华·H. 克恩斯, 邸力, 克恩斯, 等. 类药性质: 概念、结构设计与方法: 从 ADME 到安全性优化 [M]. 2 版, 北京: 科学出版社, 2011: 6-15.
- [23] 汤玉梅, 欧水平, 叶林虎, 等. 甘草香豆素平衡溶解度和油水分配系数的测定 [J]. *中南药学*, 2023, 21 (4): 959-962.

(收稿日期: 2023-11-02; 修回日期: 2023-12-29)

食欲素受体激动剂研究进展

夏立博, 任吉祥* (长春中医药大学, 长春 130000)

摘要: 食欲素是下丘脑分泌的兴奋性神经肽, 具有广泛的生理作用, 包括调节摄食和能量平衡、调节睡眠-觉醒状态、调节成瘾性、调节焦虑及抑郁等。目前关于食欲素受体拮抗剂在治疗失眠方面的研究报道较多, 并制作成药物上市。相比于食欲素受体拮抗剂的研究来说, 食欲素受体激动剂的研究相对较少, 但其发展前景不容忽视, 本文综述了从食欲素发现以来有关食欲素受体激动剂的研究, 发现其在治疗发作性睡病、逆转药物性呼吸抑制、促进肿瘤细胞凋亡等方面的潜在作用。通过综述近年来的研究成果以及对目前存在问题的讨论以期开发新药提供理论依据和研究思路。

关键词: 食欲素; 受体激动剂; 发作性睡病; 呼吸抑制; 肿瘤细胞凋亡

中图分类号: R338

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)06-1587-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.029

Research progress in orexin receptor agonists

XIA Li-bo, REN Ji-xiang* (Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130000)

Abstract: Orexin is an excitatory neuropeptide secreted by the hypothalamus, with many physiological effects, including regulating food intake and energy balance, sleep-wake state, addiction, anxiety and depression, etc. At present, only the complete study of orexin receptor antagonists for insomnia has been reported and made into drugs. Compared with orexin receptor antagonists, research on orexin receptor agonists is still very few, despite its prospect in development. This article reviewed the research on orexin receptor agonists, their potential roles in the treatment of narcoleptic disease, reversal of drug-induced respiratory depression, and promotion of cancer cell apoptosis. This article also reviewed the research in recent years and discussed the existing problems to provide theoretical basis and ideas for the development of new drugs.

Key words: orexin; receptor agonist; narcolepsy; respiratory depression; cancer cell apoptosis

食欲素是一种由下丘脑分泌的兴奋性神经肽, 最早于 1998 年由 Sakurai 等^[1]使用色谱法发现, 因为其具有增强食物摄入的能力, 所以将它命名为食欲素, 随后发现其不仅能增强食物摄入, 还具有广泛的生理功能。近年来对于食欲素的研究多侧重于食欲素受体拮抗剂方面, 尤其是用来治疗失眠, 已经开发了新药并上市。相比于食欲素受体拮抗剂的研究, 食欲素受体激动剂的研究相对较少, 但拥有广阔的发展前景, 尚有许

多作用待挖掘。本文综述了食欲素从发现以来国际上对于食欲素受体激动剂的研究, 并总结研究成果和分析目前存在的问题, 以期为进一步研究提供参考, 为新药开发提供思路。

1 食欲素系统的生理作用

食欲素分为食欲素-A (orexin-A, OXA) 和食欲素-B (orexin-B, OXB), 它们来源于下丘脑神经元分泌的共同前体——前食欲素原^[2]。OXA 由 33 个氨基酸组成, 其 N 端是焦谷氨酰残基, C 端酰

基金项目: 吉林省自然科学基金 (No.YDZJ202301ZYTS184)。

作者简介: 夏立博, 男, 博士研究生, 主要从事中医药研究, email: 1875878987@qq.com *通信作者: 任吉祥, 男, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 主要从事中医药研究, email: renjx2003@163.com

胺化, 4 个半胱氨酸残基形成链内二硫键^[3]。OXB 由 28 个氨基酸残基组成, 它的 C 端与 OXA 相似, 但 N 端有所区别^[4]。OXA 和 OXB 具有 46% 的序列同源性, OXA 的结构在哺乳动物中高度保守, 但是 OXB 氨基酸序列在不同物种间有一定的差异^[5]。

在大鼠大脑中有 3000 ~ 6700 个神经元表达食欲素, 而在人脑中有 50 000 ~ 80 000 个神经元表达食欲素^[6]。这些神经元大多集中在下丘脑的外侧/穹窿周围和背内侧区域^[7], 广泛投射到中枢神经系统, 大多数投射在控制觉醒的区域, 包括蓝斑区、中缝背核区、结核乳头状核区, 同时也投射在基底前脑、嗅觉区等区域^[8-11], 说明食欲素系统除了可以控制觉醒外, 还具有其他功能。

目前已知有两种食欲素受体, 食欲素-1 受体 (orexin 1 receptor, OX1R) 和食欲素-2 受体 (orexin 2 receptor, OX2R)。这两种受体基因高度保守^[12], OX2R 存在于所有脊椎动物中, 而 OX1R 只存在于哺乳动物中, 因此 OX1R 可能是生物进化的产物^[13]。OXA 对两种受体的亲和力相等, 而 OXB 对 OX2R 的亲和力是 OX1R 的 10 倍^[14]。食欲素受体能够与至少 3 个 G 蛋白家族的成员偶联, 通过它们调节非选择性阳离子通道, 进而影响下游通路发挥作用^[15]。食欲素信号通路图见图 1。

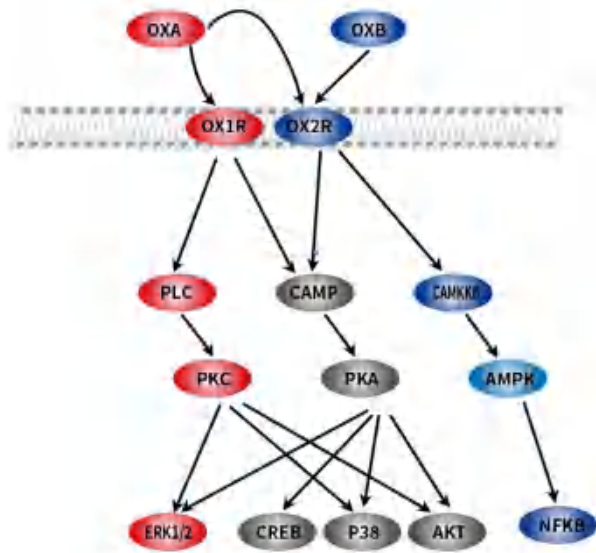


图 1 食欲素信号通路图
Fig 1 Signaling pathway diagram of orexin

食欲素受体广泛存在于中枢神经系统, 其分布与食欲素神经末端的位置大体一致。两种受体虽然有一定程度的重叠, 但分布部位有所差异^[16], OX1R 主要分布于控制摄食、学习记忆和奖励的区域^[17-18], 而 OX2R 主要分布于控制觉醒的区域^[19]。食欲素受体不仅分布于中枢神经系

统, 也分布于外周系统, 例如肾上腺、睾丸、胰腺、脂肪、胃肠道和内分泌系统^[20-23]。从食欲素神经元和受体的分布可以推测出食欲素系统有着广泛的生理功能 (见图 2), 包括调节摄食和能量平衡、调节睡眠-觉醒状态、调节成瘾性、调节焦虑及抑郁等^[24]。



图 2 食欲素生理功能
Fig 2 Physiological functions of orexin

2 食欲素受体激动剂治疗发作性睡病

发作性睡病是一种表现为日间过度嗜睡、发作性猝倒、夜间睡眠紊乱为特点的疾病。食欲素在维持觉醒状态和调节从睡眠状态到觉醒状态的转变中起关键作用^[25-26]。食欲素神经元在清醒时比睡眠时更活跃, 受到一定刺激后会分泌食欲素, 从而可以在几秒钟内导致觉醒^[27]。

一开始在患有嗜睡症的犬中发现了食欲素受体突变^[28]; 后来观察到在敲除小鼠中的食欲素基因后, 小鼠表现出嗜睡与发作性猝倒的症状^[29]。并进一步证明注射食欲素可以改善嗜睡症动物的症状^[30]; 相反, 食欲素受体拮抗剂会促进嗜睡症小鼠睡眠和猝倒的发生^[31]。2000 年, 科学家们发现在患有发作性睡病患者的脑脊液中食欲素浓度明显低于正常人^[32]。随后的研究发现, 发作性睡病患者死后大脑中几乎不存在产生食欲素的神经元^[33-34]。由于超过 90% 的发作性睡病患者表现出脑脊液中 OXA 浓度显著降低, 因此自 2005 年发布的《国际睡眠障碍分类》第 2 版起, 脑脊液中 OXA 浓度被纳入发作性睡病的辅助诊断标准 (脑脊液中 OXA 质量浓度 $\leq 110 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 则被诊断为发作性睡病 1 型)。由此可见食欲素在维持觉醒状态中起着关键作用。

动物实验发现, 在食欲素神经元缺失的发作性睡病小鼠模型体内注射 OXA 能够增加觉醒并抑制猝倒的发生^[35-36], 小鼠发作性睡病和猝倒症

状可以通过注射 OXA 来逆转, 这表明即使是长期食欲素缺乏, 但食欲素受体及其细胞内信号传导和下游神经通路仍然存在, 功能也完好无损。并且研究发现给予 OX2R 缺失的发作性睡病犬注射 OXA 无法逆转其嗜睡和猝倒症状, 说明 OXA 是通过激活 OX2R 来维持觉醒状态的^[37], 因此选择性 OX2R 激动剂在治疗发作性睡病和其他过度嗜睡疾病中存在巨大潜力。

TAK925 是一种 OX2R 选择性激动剂, 其对 OX2R 的结合力是 OX1R 的 5000 倍^[38]。皮下或静脉注射 TAK925 对小鼠和非人灵长类动物有一定的促醒作用^[39]。在发作性睡病的小鼠模型中, TAK925 增加了觉醒, 减少了睡眠-觉醒片段化和猝倒^[40]。在睡眠剥夺的健康成人中进行的一项临床 I 期试验研究表明: 与安慰剂相比, TAK925 具有良好的耐受性, 并可增加觉醒时间^[41]。但是, 由于 TAK925 需要注射给药, 这促使制药公司寻求开发其他更适合临床应用的口服食欲素受体激动剂, 因此未能进行 TAK925 的 II 期临床试验。

TAK994 是一种口服给药的 OX2R 激动剂, 其对 OX2R 的结合力是 OX1R 的 700 倍。研究发现口服 TAK994 可促进正常小鼠觉醒, 但对敲除了 OX2R 的小鼠无促进作用^[42], 进一步说明 OX2R 在促进觉醒中的关键作用。在发作性睡病小鼠模型中给予 TAK994 显著增加了清醒时间^[43], 同时抑制了猝倒发作^[44]并且不会引起睡眠反弹^[45]。目前 TAK994 在健康志愿者中的 I 期临床试验已经开展, 但尚未完成。

3 食欲素受体激动剂逆转药物性呼吸抑制

药物性呼吸抑制是一种严重的不良反应, 由麻醉、重症监护、手术镇静和疼痛管理中使用的系列药物引起^[46]。这些可能引起呼吸抑制的药物包括阿片类、镇静剂(如苯二氮草类)、麻醉剂(如丙泊酚、巴比妥类)等^[47]。呼吸抑制的机制是药物作用于呼吸中枢^[48], 扰乱了呼吸节律发生器, 甚至当使用的药物剂量过高时会导致呼吸暂停, 最终导致心搏骤停, 且这些药物大多数都具有高度成瘾性。

快速、有效地抢救过量使用呼吸抑制剂的患者可以挽救其生命。纳洛酮是逆转阿片类药物引起的呼吸抑制的首选药物, 但对于非阿片类药物, 其效果有限。因此需要研发一种新药来逆转多种类型的呼吸抑制, 动物实验已经证明了食欲素在控制呼吸方面的作用。食欲素基因敲除小鼠在清醒时对 CO₂ 的敏感性显著下降, 但在睡眠时

则没有^[49]。在清醒状态下, 敲除了食欲素基因的小鼠对高碳酸血症(吸入 10% CO₂) 的通气反应比野生型对照小鼠大约降低 50%^[50], 注射 OXA 或 OXB 可以部分恢复这些食欲素缺乏小鼠对于 CO₂ 的敏感性^[51]; 相反, 在脑室内注射 OX1R 拮抗剂(SB-334867) 会降低小鼠的呼吸反射^[52]。人类发作性睡病通常由于食欲素缺乏所引起, 与健康人相对比, 发作性睡病患者经常出现睡眠呼吸暂停现象^[53]。这与食欲素神经元投射到呼吸中枢有关, 并表明了食欲素在通气控制中发挥了兴奋作用^[54]。因此, 外源性食欲素的使用可以刺激呼吸, 逆转呼吸抑制。

食欲素受体激动剂最初被开发用于治疗发作性睡病, 后来发现它不仅能增加觉醒, 还能刺激呼吸^[55]。因此, 它们已成为一类新的呼吸激动剂, 其中, TAK925 是迄今为止在药物诱导的呼吸抑制人体试验中测试的唯一食欲素受体激动剂^[56]; 其在发作性睡病、特发性睡眠过度 and 阻塞性睡眠呼吸暂停中的作用正在深入研究^[57]。在逆转呼吸抑制的临床研究方面, 目前仅有一项 18 名男性志愿者的研究, 结果显示: TAK925 具有逆转瑞芬太尼诱导的呼吸抑制的能力; 瑞芬太尼诱导的中度呼吸抑制(使通气降低 40%) 可被 TAK925 通过增加潮气量和呼吸频率而有效地逆转, 且呈剂量依赖性^[58], 该效应在 TAK925 输注结束后仍能持续一段时间, 并且不会影响瑞芬太尼的缓解疼痛作用。

TAK925 目前正被开发用于在麻醉结束时静脉滴注, 以唤醒患者并且还能刺激呼吸, 但是如果应用于临床救治呼吸抑制患者, 目前的证据还不够, 还需要验证食欲素受体激动剂对于深度呼吸抑制和呼吸暂停是否同样具有良好疗效, 以及进一步的药代动力学和药效学分析来确定其药理学特性。

4 食欲素受体激动剂促进肿瘤细胞凋亡

食欲素的抗肿瘤作用研究开始于 2004 年, 实验确定了包括食欲素在内的多种神经肽和多种肽类激素, 在标准细胞培养条件下对结肠癌细胞系生长的影响。结果显示: 绝大多数肽类物质对结肠癌细胞的生长没有影响, 但是 OXA 和 OXB 能够显著地抑制结肠癌细胞的生长^[59]。这些抑制特性与诱导线粒体凋亡有关^[60], 线粒体凋亡是由 OX1R 和 OX2R 介导的, 但只有 OX1R 在人类消化系统肿瘤中表达, 包括结直肠癌、胰腺癌、肝癌、胃癌、食管癌和胆管癌^[61]。需要注意的是,

OX1R 在相应的健康上皮细胞中不表达^[62]。进一步研究发现：OX1R 还在人类非消化系统肿瘤中表达，包括前列腺癌、神经母细胞瘤、皮质腺瘤、嗜铬细胞瘤和子宫内膜癌等^[63-66]。OX1R 会特异性地在人类肿瘤中表达，并且 OX1R 具有介导线粒体凋亡的生理作用，在理论上说明了可以利用 OX1R 激动剂来促进肿瘤细胞凋亡，这或许是攻克肿瘤疾病的新靶点。

OX1R 系统诱导的肿瘤细胞凋亡机制（见图 3）：首先 OX1R 被 OXA 或 OXB 激活，然后激活 Src 同源 2 结构域蛋白酪氨酸磷酸酶（Src homologous 2 domain protein tyrosine phosphatase, SHP2）募集的信号通路^[67]，最后启动细胞凋亡程序。研究发现：在肿瘤细胞中，食欲素可以通过 OX1R 诱导线粒体凋亡，但这一现象可以被 SHP2 抑制剂（NSC-87877）逆转^[68]。小鼠皮下注射结肠癌细胞数周后诱导实体瘤形成，每日腹腔注射 OXA 能显著降低小鼠的肿瘤体积^[69]，表明 OXA 具有抗肿瘤能力。OXA 还能够从患者身上分离培养的新鲜胰腺癌组织切片中触发 SHP2 依赖性细胞凋亡；在临床前小鼠模型中，小鼠被异种移植了从患者身上分离的胰腺癌细胞，通过注射 OXA 可以缩小肿瘤体积；相反，在不表达 OX1R 的细胞系中，注射 OXA 没有任何效果^[70]。说明 OXA 的抑制肿瘤效果是通过激活 OX1R，进而激活 SHP2 通路实现的。



图 3 OX1R 系统诱导凋亡机制

Fig 3 Mechanism of OX1R system induced apoptosis

注（Note）：ITIM. 基于免疫受体酪氨酸的抑制基序（Inhibition motifs based on immune receptor tyrosine）。

在人体肿瘤环境中没有检测到 OXA 或 OXB^[62]，并且在肿瘤患者的循环系统中 OXA 的水平也非常低（约 $60 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ），不足以激活 OX1R（其亲和力范围为 $5 \sim 10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ）^[71]。这些证据说明内源性 OXA 对肿瘤细胞的凋亡没有内在的作用，由此可以推导出两个结论：① 这一发现为外源性使用食欲素受体激动剂促进肿瘤细胞凋亡提供了理论依据；② 目前研究的 OX1R 促进肿瘤细胞凋亡实验都是体外细胞培养和动物实验，应用于人体是否有效还需要进一步论证与研究。

5 食欲素受体激动剂其他作用

5.1 调节运动平衡

食欲素缺乏会导致猝倒的发生，即肌肉张力

的突然丧失，前庭系统在肌肉张力的调节中起着非常重要的作用。食欲素通过激活 OX1R 和 OX2R 来引起前庭神经元兴奋，并且还通过激活 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交换器和关闭 K^+ 通道来增加敏感性，前庭核的食欲素能传入减少是肌肉张力丧失的原因。在一项评估食欲素作为运动控制障碍治疗靶点的潜力研究中，注射食欲素以剂量依赖的方式调节中枢前庭介导的运动平衡^[72]，而给予食欲素拮抗剂则显著降低这种作用^[73]。

5.2 调节焦虑和抑郁状态

目前大多数关于食欲素与焦虑、抑郁的研究都集中在 OX1R，其具有致焦虑和促抑郁作用，因此采用 OX1R 拮抗剂来阻断焦虑和抑郁症状^[74]。然而，有学者采用一种新的临床前实验模型来测试侧脑室注射 OXA 的效果，该模型由社会压力和决策刺激产生焦虑和抑郁行为，通过十项行为测量，证明了 OX2R 激动剂具有抗焦虑和抗抑郁的作用^[75]。结果表明 OX2R 可能是治疗焦虑和抑郁的药物新靶点。

目前以上研究均处于初步探索阶段，还缺乏完整的证据链，但为今后的研究提供了新思路。

6 总结与展望

目前食欲素受体激动剂在治疗发作性睡病、逆转药物性呼吸抑制、促进肿瘤细胞凋亡方面取得了较大的进展，在调节运动平衡、调节焦虑和抑郁状态等方面开展了初步探索。但是仍有以下问题需要解决：

① 目前的证据均来自动物实验和体外细胞实验，还没有较大样本量的临床研究报告，对于开发新药还停留在理论阶段，还需要更深层次的研究来确定其安全性和有效性。

② 由于食欲素系统具有广泛的生理功能，在使用食欲素受体激动剂时，如何既能治疗本系统疾病还不影响其他系统功能将是下一步研究的重点。例如在应用食欲素受体激动剂治疗癌症时，因为食欲素受体激动剂还具有促进清醒和增加食欲的作用，因此是否会导致癌症患者失眠和进食量增多，睡眠和进食的紊乱是否会导致肿瘤患者原本就虚弱的身体更加虚弱。这些潜在的不良反应需要在新药设计时预先解决。

③ 食欲素受体分为 OX1R 和 OX2R，两者分布既有重合又各有侧重，因此在设计药物时，采用选择性 OX1R 激动剂还是选择性 OX2R 激动剂，亦或是双食欲素受体激动剂还需要进一步探索和论证。

参考文献

- [1] Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior [J]. *Cell*, 1998, 92: 573-585.
- [2] Grady FS, Boes AD, Geerling JC. A century searching for the neurons necessary for wakefulness [J]. *Front Neurosci*, 2022, 16 (4): 930-934.
- [3] Saitoh T, Sakurai T. The present and future of synthetic orexin receptor agonists [J]. *Peptides*, 2023, 16 (7): 171-173.
- [4] Qiao QC, Wen SY, Jiang Y, et al. Orexin recruits non-selective cationic conductance and endocannabinoid to dynamically modulate firing of caudal pontine reticular nuclear neurons [J]. *Physiol*, 2023, 60 (10): 3585-3604.
- [5] Wong KY, Stephanie YL, Lee T, et al. Orexins and their receptors from fish to mammals: a comparative approach [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2011, 17 (4): 124-130.
- [6] Soya S, Sakurai T. Evolution of orexin neuropeptide system: structure and function [J]. *Front Neurosci*, 2020, 14 (7): 689-691.
- [7] Teske JA, Mavan V. Energy expenditure: role of orexin [J]. *Vitam Horm*, 2012, 89: 91-99.
- [8] Li Y, Zhong WX, Wang DQ, et al. Serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus encode reward signals [J]. *Nat Commun*, 2016, 7 (4): 100-105.
- [9] Scammell TE, Winrow CJ. Orexin receptors: pharmacology and therapeutic opportunities [J]. *Annu Rev*, 2011, 51 (13): 243-246.
- [10] Lebow MA, Chen A. Overshadowed by the amygdala: the bed nucleus of the stria terminalis emerges as key to psychiatric disorders [J]. *Mol Psychiatry*, 2016, 21 (12): 450-463.
- [11] Kaminski T, Smolinska N. Expression of orexin receptors in the pituitary [J]. *Vitam Horm*, 2012, 89: 61-73.
- [12] Yin J, Babaoglu K, Brautigam CA, et al. Structure and ligand-binding mechanism of the human OX1 and OX2 orexin receptors [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2016, 23 (8): 293-296.
- [13] Imamura K, Akagi K, Miyanoiri Y, et al. Interaction modes of human orexin 2 receptor with selective and nonselective antagonists studied by NMR spectroscopy [J]. *Structure*, 2024, 18 (9): 255-256.
- [14] Guo X, Wen J, Gao QQ, et al. Orexin-A/OX1R is involved in regulation of autophagy to promote cortisol secretion in adrenocortical cell [J]. *Biochim Biophys*, 2024, 1870 (20): 166-168.
- [15] Tsuneoka Y, Funato H. Whole brain mapping of orexin receptor mRNA expression visualized by branched hybridization chain reaction [J]. *Neuro*, 2024, 152 (10): 168-172.
- [16] Bandarabadi M, Li S, Aeschlimann L, et al. Inactivation of hypocretin receptor-2 signaling in dopaminergic neurons induces hyperarousal and enhanced cognition but impaired inhibitory control [J]. *Mol Psychiatry*, 2023, 16 (8): 38-39.
- [17] Mirbolouk B, Khakpour TB, Rostampour M, et al. Enhanced low-gamma band power in the hippocampus and prefrontal cortex in a rat model of depression is reversed by orexin-1 receptor antagonism [J]. *IBRO Neurosci Rep*, 2023, 15 (7): 386-394.
- [18] Kolmos MG, Arribas AP, Kornum BR, et al. Experimental sickness reduces hypocretin receptor 1 expression in the lateral hypothalamus and ventral tegmental area of female mice [J]. *Eur Neurosci*, 2023, 58 (9): 4002-4010.
- [19] Zamanirad F, Eskandari K, Mousavi Z, et al. Blockade of the orexin-2 receptors within the ventral tegmental area facilitates the extinction and prevents the reinstatement of methamphetamine-seeking behavior [J]. *Physiol Behav*, 2024, 27 (3): 114-118.
- [20] Soejima Y, Iwata N, Nishioka R, et al. Interaction of orexin and bone morphogenetic proteins in steroidogenesis by human adrenocortical cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (10): 187-189.
- [21] Yadav A, Singh SK, Sarkar D. Localization and expression of orexin B (OXB) and its type 2 receptor (OX2R) in mouse testis during postnatal development [J]. *Peptides*, 2023, 16 (4): 170-175.
- [22] Boushra AF, Mahmoud RH, Ayoub SE, et al. The potential therapeutic effect of orexin-treated versus orexin-untreated adipose tissue-derived mesenchymal stem cell therapy on insulin resistance in type 2 diabetic rats [J]. *Diabetes Res*, 2022, 16 (7): 98-102.
- [23] Tunisi L, Forte N, Fernández AC, et al. Orexin—A prevents lipopolysaccharide-induced neuroinflammation at the level of the intestinal barrier [J]. *Front Endocrinol*, 2019, 10 (6): 217-219.
- [24] Xia LB, Liu HY, Wang BY, et al. A review of physiological functions of orexin: from instinctive responses to subjective cognition [J]. *Medicine*, 2023, 10 (2): 42-46.
- [25] Matzeu A, Martin FR. Targeting the orexin system for prescription opioid use disorder [J]. *Brain Sci*, 2020, 10 (9): 224-226.
- [26] Nevárez N, Lecea L. Recent advances in understanding the roles of hypocretin/orexin in arousal, affect, and motivation [J]. *Res*, 2018, 7 (2): 100-103.
- [27] Mahler SV, Moorman DE, Smith RJ, et al. Motivational activation: a unifying hypothesis of orexin/hypocretin function [J]. *Nat Neurosci*, 2014, 17 (4): 298-303.
- [28] Lin L, Faraco J, Li R, et al. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene [J]. *Cell*, 1999, 98: 65-76.
- [29] Mahoney CE, Cogswell A, Korálnik IJ, et al. The neurobiological basis of narcolepsy [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2019, 20 (8): 83-93.
- [30] Kantor S, Mochizuki T, Lops SN, et al. Orexin gene therapy restores the timing and maintenance of wakefulness

- in narcoleptic mice [J]. *Sleep*, 2013, 36 (11): 29-38.
- [31] Black SW, Morairty SR, Fisher SP, et al. Almorexant promotes sleep and exacerbates cataplexy in a murine model of narcolepsy [J]. *Sleep*, 2013, 36 (3): 25-36.
- [32] Nishino S, Ripley B, Overeem S, et al. Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy [J]. *Lancet*, 2000, 355: 39-40.
- [33] Peyron C, Faraco J, Rogers W, et al. A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains [J]. *Nat Med*, 2000, 6 (9): 991-997.
- [34] Baumann CR, Bassetti CL, Valko PO, et al. Loss of hypocretin (orexin) neurons with traumatic brain injury [J]. *Ann Neurol*, 2009, 66 (9): 5-9.
- [35] Kaushik MK, Aritake K, Imanishi A, et al. Continuous intrathecal orexin delivery inhibits cataplexy in a murine model of narcolepsy [J]. *Proc Natl Acad*, 2018, 115 (8): 6046-6051.
- [36] Hara J, Sinton CM, Sakurai T. Orexin peptides prevent cataplexy and improve wakefulness in an orexin neuron-ablated model of narcolepsy in mice [J]. *Proc Natl Acad*, 2004, 101 (12): 4649-4654.
- [37] Fujiki N, Yoshida Y, Ripley B. Effects of IV and ICV hypocretin-1 (orexin A) in hypocretin receptor-2 gene mutated narcoleptic dogs and IV hypocretin-1 replacement therapy in a hypocretin-ligand-deficient narcoleptic dog [J]. *Sleep*, 2003, 26 (10): 953-959.
- [38] Yukitake H, Fujimoto T, Ishikawa T, et al. TAK-925, an orexin 2 receptor selective agonist, shows robust wake-promoting effects in mice [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2019, 187: 17-24.
- [39] Yukitake H, Ishikawa T, Suzuki A. An orexin 2 receptor selective agonist, TAK-925, shows robust wake-promoting effects in mice and non-human primates [J]. *Sleep*, 2018, 42 (12): 11-16.
- [40] Suzuki M, Yukitake H, Ishikawa T. An orexin 2 receptor-selective agonist TAK-925 ameliorates narcolepsy-like symptoms in orexin/ataxin-3 mice [J]. *Sleep*, 2018, 41 (14): 95-98.
- [41] Evans R, Hazel J, Faessel H, et al. Results of a phase 1, 4-period crossover, placebo-controlled, randomized, single dose study to evaluate the safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of TAK-925, a novel orexin 2 receptor agonist, in sleep-deprived, healthy adults, utilizing modafinil as an active comparator [J]. *Sleep Med*, 2019, 64 (16): 106-110.
- [42] Ishikawa T, Suzuki M, Kajita Y. Discovery of a novel orally available orexin 2 receptor-selective agonist, TAK-994, as a therapeutic drug for narcolepsy [J]. *Sleep Med*, 2019, 64 (10): 165-170.
- [43] Tabuchi S, Tsunematsu T, Black SW, et al. Conditional ablation of orexin/hypocretin neurons: a new mouse model for the study of narcolepsy and orexin system function [J]. *Neurosci*, 2014, 34: 6495-6509.
- [44] Kimura H, Ishikawa T, Suzuki M. A novel orally available orexin 2 receptor-selective agonist, TAK-994, ameliorates narcolepsy-like symptoms in narcolepsy mouse models [J]. *Sleep Med*, 2019, 55 (12): 91-99.
- [45] Ishikawa T, Suzuki M, Kimura H. A novel, orally available orexin 2 receptor-selective agonist, TAK-994, shows wake-promoting effects following chronic dosing in an orexin-deficient narcolepsy mouse model [J]. *Sleep*, 2020, 43 (10): 56-64.
- [46] Connors NJ, Nelson LS. The evolution of recommended naloxone dosing for opioid overdose by medical specialty [J]. *Med Toxicol*, 2016, 12 (2): 76-81.
- [47] Montero F, Bourgois P, Friedman J. Potency enhancing synthetics in the drug overdose epidemic: xylazine, fentanyl, methamphetamine, and the displacement of heroin in Philadelphia and Tijuana [J]. *Illicit Econ Dev*, 2022, 4 (3): 204-222.
- [48] Bachmutsky I, Wei XP, Kish E, et al. Opioids depress breathing through two small brainstem sites [J]. *Elife*, 2020, 9 (6): 179-184.
- [49] Kuwaki T, Zhang W, Nakamura A, et al. Emotional and state-dependent modification of cardiorespiratory function: role of orexinergic neurons [J]. *Auton Neurosci*, 2008, 142 (12): 11-16.
- [50] Kuwaki T, Thoreau P. A role for orexin neurons [J]. *Temperature*, 2015, 2 (3): 79-91.
- [51] Spinieli RL, Ben M, Cornelius GJ, et al. Orexin facilitates the ventilatory and behavioral responses of rats to hypoxia [J]. *Am J Physiol*, 2022, 32 (2): 581-596.
- [52] Deng BS, Nakamura A, Zhang W, et al. Contribution of orexin in hypercapnic chemoreflex: evidence from genetic and pharmacological disruption and supplementation studies in mice [J]. *Appl Physiol*, 2007, 103 (7): 2-9.
- [53] Pérez CL, Mignot E, Leschziner G, et al. Understanding and approaching excessive daytime sleepiness [J]. *Lancet*, 2022, 400: 1033-1046.
- [54] Li A, Nattie E. Antagonism of rat orexin receptors by almorexant attenuates central chemoreception in wakefulness in the active period of the diurnal cycle [J]. *Physiol*, 2010, 588 (9): 35-44.
- [55] Ishikawa T, Hara H, Kawano A, et al. Danavorexton, a selective orexin 2 receptor agonist, provides a symptomatic improvement in a narcolepsy mouse model [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2022, 220 (12): 64-67.
- [56] Yin J, Kang Y, McGrath AP, et al. Molecular mechanism of the wake-promoting agent TAK-925 [J]. *Nat Commun*, 2022, 13 (8): 29-32.
- [57] Fujimoto T, Rikimaru K, Fukuda K, et al. Discovery of TAK-925 as a potent, selective, and brain-penetrant orexin 2 receptor agonist [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2022, 13 (7): 457-462.
- [58] Lemmen M, Schrier R, Dahan A, et al. Pharmacology

- of viable mechanism agnostic respiratory stimulants for the reversal of drug-induced respiratory depression in humans [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2023, 19 (8): 671-679.
- [59] Rouet BP, Rouyer C, Jarry A, et al. Orexins acting at native OX (1) receptor in colon cancer and neuroblastoma cells or at recombinant OX (1) receptor suppress cell growth by inducing apoptosis [J]. *Biol Chem*, 2004, 27 (9): 75-86.
- [60] Voisin T, Nicole P, Gratio V, et al. The orexin-A/OX1R system induces cell death in pancreatic cancer cells resistant to gemcitabine and nab-paclitaxel treatment [J]. *Front Oncol*, 2022, 12 (9): 90-97.
- [61] Couvineau A, Voisin T, Nicole P, et al. Orexins: a promising target to digestive cancers, inflammation, obesity and metabolism dysfunctions [J]. *World J Gastroenterol*, 2021, 27: 7582-7596.
- [62] Voisin T, Elav FA, Fasseu M, et al. Aberrant expression of OX1 receptors for orexins in colon cancers and liver metastases: an openable gate to apoptosis [J]. *Cancer Res*, 2011, 71 (12): 41-51.
- [63] Alexandre D, Hautot C, Mehio M, et al. The orexin type 1 receptor is overexpressed in advanced prostate cancer with a neuroendocrine differentiation, and mediates apoptosis [J]. *Eur J Cancer*, 2014, 50 (14): 26-33.
- [64] Spinazzi R, Rucinski M, Neri G, et al. Preproorexin and orexin receptors are expressed in cortisol-secreting adrenocortical adenomas, and orexins stimulate in vitro cortisol secretion and growth of tumor cells [J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90 (8): 4-9.
- [65] Spinazzi R, Andreis PG, Rossi GP, et al. Orexins in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis [J]. *Pharmacol Rev*, 2006, 58 (12): 46-57.
- [66] Dehan P, Canon C, Trooskens G, et al. Expression of type 2 orexin receptor in human endometrium and its epigenetic silencing in endometrial cancer [J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98 (10): 54-57.
- [67] Alain C, Pascal N, Valérie G, et al. Orexins/hypocretins and cancer: a neuropeptide as emerging target [J]. *Molecules*, 2021, 26 (8): 11-15.
- [68] Costagliola A, Lombardi R, Liguori G, et al. Orexins and prostate cancer: state of the art and potential experimental and therapeutic perspectives [J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2023, 20 (8): 637-645.
- [69] Couvineau A, Nicole P, Gratio V, et al. The orexin receptors: structural and anti-tumoral properties [J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13 (9): 93-97.
- [70] Dayot S, Speisky Da, Couvelard A, et al. In vitro, and demonstration of the antitumoral role of hypocretin-1/orexin-A and almorexant in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Oncotarget*, 2018, 9: 6952-6967.
- [71] Arihara Z, Takahashi K, Murakami O, et al. Immunoreactive orexin-A in human plasma [J]. *Peptides*, 2001, 22 (12): 139-142.
- [72] Pan LL, Qi RR, Wang JQ, et al. Evidence for a role of orexin/hypocretin system in vestibular lesion-induced locomotor abnormalities in rats [J]. *Front Neurosci*, 2016, 10 (2): 355-359.
- [73] Zhang J, Li B, Yu L, et al. A role for orexin in central vestibular motor control [J]. *Neuron*, 2011, 69: 793-804.
- [74] Han Y, Yuan K, Zheng YB, et al. Orexin receptor antagonists as emerging treatments for psychiatric disorders [J]. *Neurosci Bull*, 2020, 36 (12): 432-448.
- [75] Summers CH, Yaeger DW, Staton CD, et al. Orexin/hypocretin receptor modulation of anxiolytic and antidepressive responses during social stress and decision-making: potential for therapy [J]. *Brain Res*, 2020, 17 (3): 14-18.

(收稿日期: 2024-01-02; 修回日期: 2024-03-05)

线粒体在脂肪细胞功能中的相关研究进展

郭雪莹¹, 黄春晓², 相新新^{3*} (1. 山东第二医科大学临床医学院, 山东 潍坊 261053; 2. 山东第一医科大学临床医学院, 山东 泰安 271016; 3. 淄博市中心医院转化医学中心, 山东 淄博 255036)

摘要: 线粒体是动态的细胞器, 对于真核细胞的能量产生和稳态维持至关重要。脂肪细胞通常被认为是终末分化的细胞, 成熟脂肪细胞的功能紊乱是肥胖症的特点之一。在脂肪细胞中, 线粒体调节脂肪细胞分化、脂质代谢、产热作用、葡萄糖利用和胰岛素敏感性。而脂肪细胞中线粒体功能障碍与肥胖等代谢性疾病高度相关。所以线粒体可能是治疗肥胖症的潜在重要靶点。本文深入探讨了脂肪细胞中线粒体的功能, 并总结了以线粒体为靶点治疗肥胖的相关药物, 为临床肥胖症的治疗提供新的方向和思路。

关键词: 线粒体; 脂肪细胞; 肥胖

中图分类号: R589.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)06-1594-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.030

Role of mitochondria in the function of adipocytes

GUO Xue-ying¹, HUANG Chun-xiao², XIANG Xin-xin^{3*} (1. School of Clinical Medicine, Shandong Second Medical University, Weifang Shandong 261053; 2. School of Clinical Medicine, Shandong First Medical University, Tai'an Shandong 271016; 3. Translational Medicine Center of Zibo Central Hospital, Zibo Shandong 255036)

Abstract: Mitochondria, the dynamic powerhouses of the cell, play a critical role in energy production and maintaining cellular equilibrium in eukaryotic organisms. Adipocytes, commonly known as fat cells, are considered fully differentiated cells. Mature adipocyte dysfunction is a hallmark of obesity. Within these cells, mitochondria are pivotal in regulating such functions as fat cell differentiation, lipid management, thermogenic processes, glucose utilization, and insulin responsiveness. Additionally, mitochondrial impairments in the adipocytes are closely linked to metabolic disorders, notably obesity, underlining mitochondria's role as a promising target for obesity management. This review explored the critical role of mitochondria in adipocyte operations and highlighted emerging mitochondrial-targeted therapies for obesity, offering novel perspectives and strategies for the clinical management of obesity.

Key words: mitochondria; adipocytes; obesity

线粒体是双层膜包被的椭圆形的细胞器, 广泛分布在真核生物细胞内。线粒体的主要功能是通过三羧酸循环 (tricarboxylic acid, TCA) 和氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation, OXPHOS) 产生三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP)。ATP 为生物体最直接的能源, 由腺嘌呤、核糖和 3 个磷酸基团连接而成, 供能时最后一个磷酸基团水解, 生成二磷酸腺苷 (adenosine diphosphate, ADP) 和大量能量。因此线粒体被称为细胞的“动

力源”。除此之外, 线粒体还在许多生物过程中发挥重要作用, 包括新陈代谢^[1]、细胞凋亡^[2]、炎症^[3]和信号传导^[4]。

哺乳动物中存在两种不同类型的脂肪组织: 白色脂肪组织 (white adipose tissue, WAT) 和棕色脂肪组织 (brown adipose tissue, BAT)。白色脂肪细胞含有单一的大脂滴和少量线粒体, 能将多余的能量储存为三酰甘油 (triglycerides, TG)^[5]。相比之下, 棕色脂肪细胞含有大量的小

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.81600695); 山东省重点研发计划项目 (No.2019GSF108269)。

作者简介: 郭雪莹, 女, 在读硕士研究生, 主要从事内分泌与代谢病学研究, email: guoxueying0217@163.com *通信作者: 相新新, 女, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事内分泌与代谢病学研究, email: xiangxinxin@bjmu.edu.cn

脂滴, 具有丰富的线粒体, 能通过表达高水平的解偶联蛋白 1 (uncoupling protein 1, UCP1), 将氧化磷酸化与 ATP 合成解偶联, 从而促进产热^[6]。米色脂肪细胞是位于 WAT 中的诱导型棕色脂肪细胞, 在功能上与经典棕色脂肪细胞非常相似^[7]。

近年来研究表明, 线粒体稳态对脂肪细胞的生理功能具有重要的调控作用, 包括脂肪细胞分化、脂质代谢、产热作用、葡萄糖利用和胰岛素敏感性。本文综述了线粒体在脂肪细胞中的作用, 强调了其作用机制, 同时总结了靶向线粒体治疗肥胖的药物, 旨在推进抗肥胖药物的研究进程。

1 线粒体对脂肪细胞功能的影响

1.1 线粒体调节脂肪细胞分化

前脂肪细胞分化是脂肪生成的关键阶段, 而线粒体在此过程中起着关键作用。分化是一个非常耗能的过程, 它依赖于正常的线粒体供能。线粒体动力学(融合和裂变)参与脂肪细胞分化过程中线粒体的定量和定性变化, 以迅速满足代谢需求。Forni 等^[8]发现, 线粒体融合蛋白 2 (mitofusin 2, Mfn2) 在脂肪生成阶段上调, 敲除 *Mfn2* 基因会导致脂肪细胞分化能力的丧失, 这表明 *Mfn2* 可促进脂肪分化。同样地, 据报道, 线粒体裂变标志物动力相关蛋白 1 (dynammin-related protein 1, DRP1) 在产热脂肪细胞中高度表达, 并在脂肪细胞分化过程中表达上调; 而在分化的早期阶段抑制 DRP1 会减弱米色和棕色脂肪生成以及脂肪生成相关的线粒体生物发生^[9]。这表明, 线粒体裂变蛋白 DRP1 在棕色和米色脂肪细胞分化过程中也发挥促进作用。此外, 机体还通过线粒体自噬过程分离和消除细胞中受损或功能失调的线粒体, 维持线粒体稳态。据报道, 3T3-L1 前脂肪细胞的分化增加了线粒体自噬^[10]。研究发现, 序列相似性家族 134 成员 B (family with sequence similarity 134 member B, FAM134B) 蛋白能够通过促进线粒体自噬来促进 3T3-L1 前脂肪细胞的分化, 且过表达 FAM134B 的小鼠的性腺 WAT 重量较对照组小鼠增加 78%^[11]。这表明线粒体自噬或许, 发挥促进脂肪细胞分化的作用, 但其具体作用机制仍需进一步研究。

研究发现, 3T3-L1 脂肪细胞分化过程伴随线粒体数量的增加, 线粒体与脂肪分化相关因子如 CCAAT 增强子结合蛋白 (CCAAT enhancer-binding protein, C/EBP)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferation activated receptor γ , PPAR γ) 和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共

同激活剂 1α (PPAR γ coactivator 1α , PGC1 α) 共同参与脂肪分化过程^[12]。其中, 已有文章报道抑制 C/EBP 和 PPAR γ 的基因表达, 可以抑制前体脂肪细胞的分化过程, 这个过程与 Wnt 信号通路密切相关^[13], 表明 C/EBP 和 PPAR γ 可促进脂肪细胞分化。研究发现, PGC1 α 在完全分化的 3T3-L1 (mouse embryonic fibroblast cells, 3T3-L1) 前脂肪细胞中表达上调^[14], 在间充质干细胞分化为脂肪细胞的过程中表达也上调^[15]。冉宏标等^[16]发现 miR-138 可以通过降低 PGC1 α 的 mRNA 表达水平, 从而抑制耗牛肌内前体脂肪细胞分化, 表明 PGC1 α 在脂肪分化过程中发挥促进作用。沉默信息调节因子 5 (silent information regulator 5, SIRT5), 属于 Sirtuins 家族, 是一种线粒体去乙酰化酶, 在调节线粒体呼吸、生物合成等方面发挥关键作用^[17]。Hong 等^[18]发现 SIRT5 通过促进线粒体生物发生对前脂肪细胞分化产生抑制作用。以上这些研究充分证明线粒体生物发生与脂肪细胞分化密不可分。当线粒体发生功能障碍时, 脂肪细胞分化往往受到不利影响。例如, Wu 等^[19]发现, 在人脂肪来源的间充质干细胞成脂分化过程中, 同属于 Sirtuins 家族的线粒体调节因子沉默信息调节因子 3 (SIRT3) 的缺失会使线粒体发生功能障碍, 进而阻碍脂肪分化。敲低脂肪组织中的线粒体转录因子 A (mitochondrial transcription factor A, TFAM) 会导致线粒体损伤并抑制脂肪形成^[20]。Zlatska 等^[21]在体外进行诱导人脂肪干细胞成脂分化实验, 发现氧含量高和低的培养基中较正常组成脂分化效率降低, 这个现象与线粒体功能障碍有关。

呼吸链产生的线粒体活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 是脂肪细胞分化必不可少的因子^[22]。Zhao 等^[23]发现木犀草素通过减少 ROS 的产生来抑制 3T3-L1 脂肪细胞分化, 然而, 高剂量的 ROS 是脂肪细胞增殖和分化的负调节因子^[24]。研究发现, 复合物 II 抑制剂 kuanoniamine C 可增加 ROS 的产生, 从而抑制前脂肪细胞分化为白色脂肪细胞^[25]。G 蛋白偶联受体 PAR2 (protease activated receptor 2, PAR2) 缺乏可促进线粒体 ROS 生成和功能障碍, 从而导致脂肪细胞分化受到抑制^[26]。ROS 对脂肪细胞分化作用的具体机制仍需深入研究。

1.2 线粒体调节脂质代谢

能量消耗和摄入之间的平衡对于全身能量稳态至关重要。多余的能量以 TG 的形式储存在 WAT 中, 防止发生代谢紊乱^[7]。脂质合成过程中, 线粒体提供了关键中间产物 3-磷酸甘油和乙

酰辅酶 A。据报道,用 OXPHOS 复合物 III 抑制剂抗霉素 A (antimycin A, AA) 孵育 3T3-L1 前脂肪细胞,会损害线粒体功能,从而导致脂质过度合成并出现脂肪堆积^[27]。因此,线粒体与脂质合成过程密不可分。

脂肪分解的关键步骤是脂肪酸氧化。线粒体提供了脂肪酸 β 氧化的场所,去除脂肪细胞中多余的脂肪酸,避免脂肪酸从脂肪细胞中外泄。Perilipin (PLIN) 是一种脂滴包被蛋白,是脂质代谢物在脂肪细胞中稳定储存所必需的。研究发现,PLIN1 和 PLIN5 通过调节脂滴与线粒体的相互作用,在脂解过程中发挥相反的作用^[28]。PLIN1 促进脂肪分解,而 PLIN5 则抑制脂肪分解: An 等^[29]发现线粒体二羧酸载体 mDIC 通过从线粒体中转运琥珀酸盐来抑制脂肪分解限速酶-激素敏感脂肪酶 (hormone-sensitive lipase, HSL) 的激活从而抑制脂肪分解。此外,当线粒体氧化磷酸化-ATP 生成关键步骤受阻时,脂解作用被抑制。CHCHD10 是一种核编码的线粒体膜间蛋白,CHCHD10 缺乏会导致脂肪细胞中线粒体嵴结构缺陷,嵴中包含的呼吸链复合物组装受损,从而抑制 ATP 的产生,进而抑制脂肪代谢关键酶-三酰甘油脂肪酶 (adipose triglyceride lipase, ATGL) 的合成,最终对脂肪分解产生不利影响^[30]。据报道,HSL/ATGL 参与调节白色 3T3-L1 脂肪细胞中线粒体轻度解偶联诱导的脂肪分解^[31]。因此,线粒体在脂肪分解过程中发挥独特的作用,线粒体功能障碍会导致脂代谢紊乱。硫氧还蛋白 2 (thioredoxin 2, Trx2) 是一种线粒体抗氧化剂,阻止线粒体 ROS 产生过多来保持线粒体的正常结构和功能^[32]。He 等^[33]发现脂肪细胞 *Trx2* 的缺失会破坏线粒体稳态,从而抑制脂肪生成,增强脂解基因的表达,最终导致能量代谢异常。以上研究表明,线粒体在调节脂质代谢方面具有重要作用。

1.3 线粒体调节产热功能

脂肪组织是能量储存和消耗的调节器,与机体代谢密切相关。在代谢超负荷的情况下,为尽快利用多余的营养成分,脂肪组织的产热功能会被激活。UCP1 是一种存在于线粒体内膜的核编码蛋白,主要负责棕色脂肪细胞和米色脂肪细胞产热^[6]。棕色脂肪细胞通过激活线粒体上的 UCP1,促进线粒体氧化磷酸化解偶联,抑制线粒体膜上 ATP 的合成,以热能的形式消耗能量,以此增强生理状态下机体的产热^[6]。米色脂肪细胞也富含线粒体并表达 UCP1,参与消耗能量的

产热功能^[7]。另外,线粒体在代谢过程中由于其高效的质子梯度建立和电子传递链功能,能够为产热提供必要的能量。相关报道指出,肥胖患者的脂肪细胞中 UCP1 表达下降,而激活 UCP1 有助于抵抗肥胖及其并发症的发生^[34]。例如线粒体蛋白——骨形态发生蛋白 7 (bone morphogenetic protein 7, BMP7) 通过上调 UCP1 提高脂肪细胞的产热能力^[35]。腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 通过激活 UCP1 发挥非依赖性产热作用,促进 WAT 中米色脂肪细胞的产生,从而改善饮食诱导的肥胖^[36]。因此,靶向线粒体激活 UCP1 促进产热被认为是抵抗肥胖症的有效策略。

激活棕色脂肪细胞产热必不可少的因子是 PGC1 α ^[37]。当人体处于寒冷和低温环境中时,正常细胞发生能量危机,细胞内的 ATP 浓度降低,一磷酸腺苷 (adenosine monophosphate, AMP) 浓度升高,AMP/ATP 比值增加。此时,AMPK 被激活并直接磷酸化 PGC1 α ,导致 PGC1 α 表达上调^[38]。从机制上讲,PGC1 α 通过诱导 UCP1 转录促进线粒体生物发生和氧化代谢,并通过与 UCP1 相互作用来启动产热过程^[39]。研究发现,在人类皮下 WAT 中,PGC1 α 过表达导致脂肪细胞呈现 BAT 表型,而在小鼠皮下脂肪组织中,PGC1 α 缺失导致产热和线粒体相关基因表达减少^[40]。因此,PGC1 α 和 UCP1 是 BAT 的标志性生热基因。

SIRT3 优先在包括大脑在内的高代谢需求组织中表达,此过程需要烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) 作为催化活性的辅助因子。SIRT3 通过改变蛋白质乙酰化状态来调节各种过程,如能量稳态、氧化还原平衡、线粒体质量控制、线粒体未折叠蛋白反应、生物发生、动力学和线粒体自噬等^[41]。研究表明,给予小鼠热量限制饮食,可以发现 WAT 和 BAT 中的 SIRT3 表达被激活,此外,寒冷暴露会上调棕色脂肪中 SIRT3 的表达,而气候温度升高会降低表达。而在肥胖小鼠的 BAT 中,SIRT3 与线粒体功能相关的基因 (如 PGC1 α 、UCP1) 表达下调,这表明 SIRT3 能够激活线粒体功能,并促进 BAT 中的适应性产热^[42]。AR-C17 是一种烷基间苯二酚的主要同系物,可以通过与 SIRT3 结合,加速 SIRT3 的合成,上调脂肪细胞中 SIRT3-AMPK-PGC1-UCP1 正反馈环,增加 UCP1 的表达,从而激活生热脂肪细胞,产生更多的热量^[43]。因此,SIRT3 促进脂肪细胞产热。干扰素 α 诱导蛋白 27 (interferon alpha-inducible protein

27, IFI27) 是一种线粒体基质蛋白, 脂肪细胞中 *IFI27* 的缺失会导致线粒体基因表达被广泛抑制。当受到急性寒冷刺激时, *IFI27* 敲除小鼠表现出不良的产热调节能力^[44]。碳水化合物反应元件结合蛋白 (carbohydrate responsive element binding protein, ChREBP) 通常被认为是调节脂质代谢的重要转录因子^[45]。然而, 一项研究指出, 过表达 *ChREBP-β* 可下调与线粒体生物发生、自噬和呼吸相关的基因的表达, 进而导致棕色脂肪白色化^[46]。这表明 ChREBP-β 是 BAT 产热过程中的一个负调节因子, 线粒体参与调节 BAT 产热。视神经萎缩症蛋白 1 (optic atrophy 1, OPA1) 是一种线粒体融合蛋白, 研究发现棕色脂肪细胞中 *OPA1* 的缺失会损害 BAT 的产热能力, 同时改善体温调节并促进小鼠白色脂肪褐变^[47]。然而, 也有研究发现, *OPA1* 的促进作用依赖于尿素循环代谢物 (如富马酸盐) 的白色脂肪细胞褐变^[48], 但 *OPA1* 对白色脂肪褐变的作用及具体机制仍待进一步研究。G 蛋白偶联受体 30 (G protein-coupled receptor 30, GPR30) 通过调节线粒体呼吸负向调控脂肪产热^[49]。除了线粒体融合蛋白, 线粒体裂变蛋白也在脂肪细胞产热中发挥作用。据报道, 在米色脂肪细胞和棕色脂肪细胞中, 当使用 mdivi-1 抑制线粒体裂变蛋白 DRP1 的 GTP 酶活性时, 产热调节因子 UCP1、PRDM16 的表达均下调^[9], 这表明 DRP1 可促进产热。以上研究表明, 线粒体动力学、线粒体自噬及线粒体生物发生都参与调节脂肪细胞产热能力。

1.4 线粒体调节葡萄糖利用和胰岛素敏感性

胰岛素是一种肽类激素, 负责调节能量代谢、细胞生长。循环中葡萄糖水平升高会刺激胰腺 β 细胞释放胰岛素。胰岛素与其受体结合后发生胰岛素受体底物 (insulin receptor substrate, IRS) 的磷酸化, 从而引发一连串的反应, 导致磷脂酰肌醇 3 激酶 / 蛋白激酶 B (phosphatidylinositol3-kinase/protein kinase B, PI3K/AKT) 信号通路的激活, 刺激葡萄糖转运蛋白 4 (glucose transporter 4, GLUT4) 易位到细胞膜, 从而使葡萄糖进入细胞, 发挥降糖作用。胰岛素抵抗伴随 GLUT4 蛋白和 mRNA 表达的下降, 上调脂肪组织中 GLUT4 的表达, 能够改善糖耐量和胰岛素抵抗^[50]。研究发现, 电针可通过上调脂肪组织中 GLUT4 的表达来改善胰岛素抵抗和提高胰岛素敏感性, 从而调节 2 型糖尿病大鼠的糖脂代谢^[51]。

脂肪细胞中的线粒体在调节胰岛素敏感性方面发挥了重要作用。An 等^[29]发现, 线粒体转运

蛋白 mDIC 在白色脂肪细胞中过表达时可以正向调节胰岛素敏感性, 而缺失时会促进胰岛素抵抗。线粒体功能障碍是导致脂肪胰岛素敏感性破坏的关键因素。研究发现 *HTD2* (3-hydroxyacyl-ACP dehydratase, HTD2) 敲低诱导线粒体发生氧化应激后, 前脂肪细胞和成熟脂肪细胞在胰岛素刺激下发生的 AKT 磷酸化、GLUT4 表达和葡萄糖摄取均受到抑制, 进一步支持线粒体功能障碍与促进了脂肪细胞胰岛素抵抗的发生发展^[52]。当使用线粒体呼吸链抑制剂寡霉素 A (oligomycin A) 或 AA 诱导线粒体功能障碍后, Wang 等^[53]发现脂肪细胞中胰岛素信号传导减弱、GLUT4 表达下调以及脂联素分泌减少, 证实线粒体功能障碍会损害脂肪细胞胰岛素敏感性。各种病理条件下, 脂肪细胞中的线粒体结构和功能被破坏, 进一步促进代谢性疾病的发生发展。在高脂肪饮食喂养的大鼠中, 附睾脂肪组织中线粒体生物发生和 mtDNA 拷贝数降低, 并伴有高血糖^[54]。此外, 高水平的葡萄糖和游离脂肪酸诱导了脂肪细胞线粒体功能障碍, 降低了胰岛素作用下的葡萄糖摄取。CR6 结合因子 1 (CR6-interacting factor 1, CRIF1) 是线粒体蛋白翻译的关键调节因子。脂肪细胞中 *CRIF1* 缺乏会抑制线粒体呼吸链复合物功能, 进而导致全身炎症和胰岛素抵抗^[55]。而当线粒体功能改善时, 胰岛素抵抗也随之减轻。D-阿洛酮糖 (D-allulose) 是一种新型天然甜味剂, 可改善线粒体还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NADH) 稳态, 减轻肥胖引起的胰岛素抵抗^[56]。这些研究表明, 线粒体在脂肪细胞中参与调节葡萄糖利用和胰岛素敏感性, 线粒体是维持脂肪细胞代谢稳态必不可少的细胞器 (见图 1)。

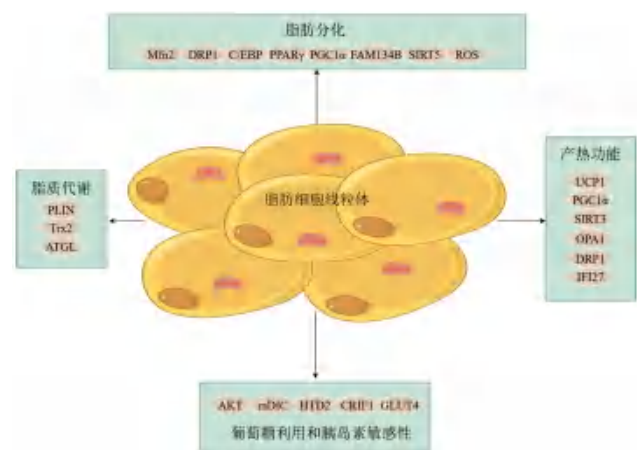


图 1 线粒体在脂肪细胞中的作用

Fig 1 Role of mitochondria in adipocytes

2 靶向线粒体的相关抗肥胖药物的开发

2.1 SGLT2 抑制剂

钠-葡萄糖协同转运蛋白 2 (sodium-dependent glucose transporters 2, SGLT2) 抑制剂通过减少肾脏重吸收和增加尿液排泄来降低血糖, 进而治疗 2 型糖尿病。卡格列净和恩格列净是临床常见的 SGLT2 抑制剂。研究发现卡格列净能通过 AMPK/SIRT1/PGC1 α 信号通路诱导线粒体生物发生, 促进线粒体氧化磷酸化、脂肪酸氧化和产热, 进而加速脂肪细胞的能量消耗, 是治疗肥胖的有效药物^[57]。也有研究结果显示, 卡格列净通过 β_3 -AR-cAMP-PKA 信号通路, 促进脂肪交感神经支配和脂肪动员, 从而增加脂肪组织中的产热和脂解作用, 减少脂肪含量和增加能量消耗^[58]。2021 年, Xu 等^[59] 发现恩格列净可促进线粒体的生物发生和融合, 改善线粒体的完整性和功能, 并促进 3T3-L1 脂肪细胞的褐变。但恩格列净对减肥和代谢稳态的有益作用是通过抑制 SGLT2 还是通过独立机制激活 AMPK 仍有待研究。

2.2 激素类

鸢尾素是一种肌肉分泌激素, 由膜蛋白 FNDC-5 (含纤连蛋白 III 型结构域蛋白 5) 裂解产生, 在 WAT 褐变中发挥了重要作用。研究发现, 鸢尾素在体外和体内均促进 UCPI 表达, 导致线粒体呼吸作用增强, 有效增加能量消耗, 减轻体重并改善饮食诱导的胰岛素抵抗^[60]。

2.3 蒽醌类

抗氧化剂米托醌 (mitoquinone, Mito Q) 通过靶向线粒体发挥抗氧化作用, 增加了肥胖大鼠中线粒体蛋白 Cyclo F (cyclophylin F, Cyclo F) 和 MFN1 的表达, 避免线粒体氧化损伤导致的脂肪细胞功能受损^[61]。因此, Mito Q 在肥胖引起的代谢功能障碍中发挥有益作用。

2.4 线粒体解偶联剂

BAM15 是一种亲脂性弱酸性线粒体解偶联剂, 也是一种自噬诱导剂、PGC1 α 激活剂, 能够增强线粒体自噬, 降低 ROS 水平, 从而改善线粒体功能障碍, 具有减少脂肪堆积、增加能量消耗、改善线粒体功能和改善代谢的作用^[62]。

2.5 中药及天然化合物

Wang 等^[63] 对健脾升清化浊方进行研究, 发现该传统中药方剂可调节 PGC1 α /NRF1/TFAM 信号通路, 促进肝脏线粒体生物发生, 改善肥胖大鼠糖脂代谢, 调节线粒体依赖性细胞凋亡指标 Bcl-2/Bax, 减少肝损伤。因此, 健脾升清化浊方具有抗肥胖作用, 并且与线粒体功能密切相关。

很多天然化合物也可以调节线粒体代谢, 如研究证实, 在 3T3-L1 前脂肪细胞中姜黄素可使

UCPI 和 PGC1 α 的 mRNA 和蛋白表达升高, 改善线粒体呼吸功能和促进脂肪细胞分化^[64]。

二氢杨梅素是一种提取自藤茶的天然生物活性黄酮类化合物, 具有抗炎、抗氧化的作用, 能够预防和治疗肥胖。Xiong 等^[65] 发现通过二氢杨梅素增强线粒体裂变诱导白色脂肪褐变重塑, 从而发挥抵抗肥胖的作用。

盐酸小檗碱是一种拓扑异构酶 I 和 II 双重抑制剂, 研究发现盐酸小檗碱可以上调棕色脂肪细胞中 UCPI 基因的表达, 抑制 ATP 的产生, 促进线粒体解偶联, 启动产热程序减少脂肪细胞中的脂肪滴, 是治疗肥胖的潜在候选药物^[66]。

玉米黄质是一种含氧类胡萝卜素, 是植物来源的强抗氧化剂。Liu 等^[67] 研究发现, 玉米黄质通过激活 AMPK α 1 途径促进 UCPI 和其他棕色脂肪细胞标志物的表达上调, 诱导 mtDNA 含量和线粒体生物发生相关基因的 mRNA 水平的显著增加。玉米黄质还可以抑制脂肪细胞脂质过氧化引起的线粒体氧化损伤, 显著提高线粒体膜电位, 降低 ROS 积累和线粒体超氧化物水平, 增强线粒体生物发生, 并具有促进脂肪细胞褐变作用。此外, 也有研究发现, 玉米黄质具有抗脂肪生成作用^[68]。

吡咯喹啉醌 (pyrroloquinoline quinone, PQQ) 是存在于水果、蔬菜、发酵食品和母乳中的一种维生素, 分子上作为脱氢酶的细菌辅酶, 对身体健康至关重要。研究发现, PQQ 可以通过 AMPK 信号通路调节 PGC1 α 、NRF1 和 TFAM 等基因的表达, 增强线粒体生物发生, 从而抑制脂肪生成, 增强脂肪酸 β 氧化, 发挥抗肥胖作用^[69]。

橙黄决明素是中药决明子的活性成分, 通过在原代棕色脂肪细胞体内和体外激活过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR α), 显著增强线粒体代谢, 并提高 UCPI 的表达, 促进产热和脂质分解^[70]。

上述研究证实, 脂肪细胞中的线粒体对促进脂肪细胞分化、脂质代谢和产热具有重要作用, 因而成为治疗肥胖症的关键靶点。以线粒体为靶点的相关抗肥胖药物的开发总结见表 1。

本文综述了线粒体对脂肪细胞功能的影响, 主要从脂肪生成、脂质代谢、产热作用、葡萄糖利用和胰岛素敏感性等方面进行总结。当发生 ROS 异常增加、线粒体基因组突变、线粒体动力学失调或线粒体自噬受阻时, 脂肪细胞的线粒体会出现功能障碍, 进而影响脂代谢过程。线粒体功能是脂肪细胞健康的基本组成部分, 通过研究线粒体对脂肪细胞功能的调节作用, 可以更好地理解线粒体功能在脂肪细胞中的重要作用。本文

主要关注白色和棕色脂肪细胞中线粒体的功能，脂肪组织的其他组成部分，包括祖细胞、内皮细胞、免疫细胞等，也受到线粒体活性和线粒体动力学的调控，需要进一步探索线粒体在其中的作用机制。此外，线粒体的细胞间转移是目前的研究热点。线粒体细胞间转移参与了线粒体质量控制过程，通过细胞间相互协调作用，共同维持局

部组织或机体整体的线粒体稳态，参与调节脂肪组织正常的生理和功能。这为与线粒体相关的疾病提供了极具前景的治疗靶点。然而，线粒体转移的启动机制和在受体细胞内的作用机制仍旧未知，明确这些细胞生物学过程将有助于研究成果进一步的临床转化。

表 1 靶向线粒体的药物

Tab 1 Drugs targeting to mitochondria

分类	药物	靶向线粒体的作用
SGLT2 抑制剂	卡格列净、恩格列净	促进线粒体生物发生和能量代谢 ^[57-59]
激素类	鸢尾素	增强线粒体呼吸作用 ^[60]
蒽醌类	Mito Q	防止线粒体氧化损伤 ^[61]
线粒体解偶联剂	BAM15	增强线粒体自噬 ^[62]
中药及天然化合物	健脾升清化浊方、姜黄素、盐酸小檗碱、二氢杨梅素、玉米黄质、PQQ、橙黄决明素	增强线粒体功能、调节线粒体代谢、抗氧化、增强线粒体自噬、促进线粒体生物发生 ^[63-67, 69-70]

3 总结

线粒体作为潜在的靶标，为治疗肥胖症的药物研发提供了新策略。在未来的研究中，利用中药及天然化合物靶向线粒体治疗肥胖或许具有良好的前景。如何有针对性和治疗性地改变线粒体功能，以改善肥胖和代谢疾病中的脂肪组织健康仍需要不断探索和研究。

参考文献

- [1] Spinelli JB, Haigis MC. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism [J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20 (7): 745-754.
- [2] Abate M, Festa A, Falco M, et al. Mitochondria as play-makers of apoptosis, autophagy and senescence [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2020, 98: 139-153.
- [3] Andrieux P, Chevillard C, Cunha-Neto E, et al. Mitochondria as a cellular hub in infection and inflammation [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (21): 11338.
- [4] Shen K, Pender CL, Bar-Ziv R, et al. Mitochondria as cellular and organismal signaling hubs [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2022, 38: 179-218.
- [5] Hropot T, Herman R, Janez A, et al. Brown adipose tissue: a new potential target for glucagon-like peptide 1 receptor agonists in the treatment of obesity [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (10): 8592.
- [6] Chouchani ET, Kazak L, Spiegelman BM. New advances in adaptive thermogenesis: UCP1 and beyond [J]. *Cell Metab*, 2019, 29 (1): 27-37.
- [7] Chouchani ET, Kajimura S. Metabolic adaptation and maladaptation in adipose tissue [J]. *Nat Metab*, 2019, 1 (2): 189-200.
- [8] Forni MF, Peloggia J, Trudeau K, et al. Murine mesenchymal stem cell commitment to differentiation is regulated by mitochondrial dynamics [J]. *Stem Cells*, 2016, 34 (3): 743-755.
- [9] Mooli RGR, Mukhi D, Chen Z, et al. An indispensable role for dynamin-related protein 1 in beige and brown adipogenesis [J]. *J Cell Sci*, 2020, 133 (18): jcs247593.
- [10] Goldman SJ, Zhang Y, Jin S. Autophagic degradation of mitochondria in white adipose tissue differentiation [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14 (10): 1971-1978.
- [11] Cai M, Zhao J, Liu Q, et al. FAM134B improves preadipocytes differentiation by enhancing mitophagy [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2019, 1864 (12): 158508.
- [12] Rosen ED, Spiegelman BM. Molecular regulation of adipogenesis [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000, 16: 145-171.
- [13] Yang Loureiro Z, Joyce S, Desouza T, et al. Wnt signaling preserves progenitor cell multipotency during adipose tissue development [J]. *Nat Metab*, 2023, 5 (6): 1014-1028.
- [14] Ijichi N, Ikeda K, Horie-Inoue K, et al. Estrogen-related receptor alpha modulates the expression of adipogenesis-related genes during adipocyte differentiation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 358 (3): 813-818.
- [15] Forni MF, Peloggia J, Trudeau K, et al. Murine mesenchymal stem cell commitment to differentiation is regulated by mitochondrial dynamics [J]. *Stem Cells*, 2016, 34 (3): 743-755.
- [16] 冉宏标, 王会, 柴志欣, 等. miR-138 靶向 PGC-1 α 调控牦牛肌内前体脂肪细胞增殖及分化 [J]. *畜牧兽医学报*, 2022, 53 (10): 3434-3447.
- [17] Tao ZJ, Jin ZH, Wu JB, et al. Sirtuin family in autoimmune diseases [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1186231.
- [18] Hong J, Raza SHA, Ma H, et al. Multiple omics analysis reveals the regulation of SIRT5 on mitochondrial function and lipid metabolism during the differentiation of bovine preadipocytes [J]. *Genomics*, 2024, 116 (1): 110773.
- [19] Wu YT, Chi KT, Lan YW, et al. Depletion of Sirt3 leads

- to the impairment of adipogenic differentiation and insulin resistance via interfering mitochondrial function of adipose-derived human mesenchymal stem cells [J]. *Free Radic Res*, 2018, 52 (11-12): 1398-1415.
- [20] Vernochet C, Mourier A, Bezy O, et al. Adipose-specific deletion of TFAM increases mitochondrial oxidation and protects mice against obesity and insulin resistance [J]. *Cell Metab*, 2012, 16 (6): 765-776.
- [21] Zlatska AV, Vasyliiev RG, Gordiienko I, et al. Effect of the deuterium on efficiency and type of adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells in vitro [J]. *Sci Rep*, 2020, 10 (1): 5217.
- [22] Kramer AH, Kadye R, Houseman PS, et al. Mitochondrial STAT3 and reactive oxygen species: a fulcrum of adipogenesis? [J]. *Jakstat*, 2015, 4 (2): e1084084.
- [23] Zhao LL, Zheng MF, Cai H, et al. The activity comparison of six dietary flavonoids identifies that luteolin inhibits 3T3-L1 adipocyte differentiation through reducing ROS generation [J]. *J Nutr Biochem*, 2023, 112: 109208.
- [24] Boneh A. Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation by second messenger-mediated signal transduction mechanisms [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63 (11): 1236-1248.
- [25] Oki S, Kageyama S, Machihara K, et al. Guanoniamine C suppresses adipogenesis and white adipose tissue expansion by modulating mitochondrial function [J]. *Biol Pharm Bull*, 2023, 46 (12): 1787-1796.
- [26] Park YJ, Lee B, Kim DH, et al. PAR2 deficiency induces mitochondrial ROS generation and dysfunctions, leading to the inhibition of adipocyte differentiation [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 6683033.
- [27] Vankoningsloo S, Piens M, Lecocq C, et al. Mitochondrial dysfunction induces triglyceride accumulation in 3T3-L1 cells: role of fatty acid beta-oxidation and glucose [J]. *J Lipid Res*, 2005, 46 (6): 1133-1149.
- [28] Grisetti E, Bello AA, Bieth E, et al. Molecular mechanisms of perilipin protein function in lipid droplet metabolism [J]. *FEBS Lett*, 2023, 598 (10): 1170-1198.
- [29] An YA, Chen S, Deng YF, et al. The mitochondrial dicarboxylate carrier prevents hepatic lipotoxicity by inhibiting white adipocyte lipolysis [J]. *J Hepatol*, 2021, 75 (2): 387-399.
- [30] Ding M, Ma YJ, Du RQ, et al. CHCHD10 modulates thermogenesis of adipocytes by regulating lipolysis [J]. *Diabetes*, 2022, 71 (9): 1862-1879.
- [31] Demine S, Tejerina S, Bihin B, et al. Mild mitochondrial uncoupling induces HSL/ATGL-independent lipolysis relying on a form of autophagy in 3T3-L1 adipocytes [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233 (2): 1247-1265.
- [32] Sharma I, Yadav KS, Mugale MN. Redoxosome and diabetic retinopathy: pathophysiology and therapeutic interventions [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 182: 106292.
- [33] He F, Huang YR, Song Z, et al. Mitophagy-mediated adipose inflammation contributes to type 2 diabetes with hepatic insulin resistance [J]. *J Exp Med*, 2021, 218 (3): e20201416.
- [34] Cypess AM, Kahn CR. Brown fat as a therapy for obesity and diabetes [J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2010, 17 (2): 143-149.
- [35] Shaw A, Tóth BB, Arianti R, et al. BMP7 increases UCP1-dependent and independent thermogenesis with a unique gene expression program in human neck area derived adipocytes [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2021, 14 (11): 1078.
- [36] Pollard AE, Martins L, Muckett PJ, et al. AMPK activation protects against diet induced obesity through Ucp1-independent thermogenesis in subcutaneous white adipose tissue [J]. *Nat Metab*, 2019, 1 (3): 340-349.
- [37] Uldry M, Yang W, St-Pierre J, et al. Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation [J]. *Cell Metab*, 2006, 3 (5): 333-341.
- [38] Kong SF, Cai BL, Nie QH. PGC-1 α affects skeletal muscle and adipose tissue development by regulating mitochondrial biogenesis [J]. *Mol Genet Genomics*, 2022, 297 (3): 621-633.
- [39] Wu Z, Puigserver P, Andersson U, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1 [J]. *Cell*, 1999, 98 (1): 115-124.
- [40] Kleiner S, Mepani RJ, Laznik D, et al. Development of insulin resistance in mice lacking PGC-1 α in adipose tissues [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109 (24): 9635-9640.
- [41] Mishra Y, Kaundal RK. Role of SIRT3 in mitochondrial biology and its therapeutic implications in neurodegenerative disorders [J]. *Drug Discov Today*, 2023, 28 (6): 103583.
- [42] Shi T, Wang F, Stieren E, et al. SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280 (14): 13560-13567.
- [43] Zhang KL, Li TT, Li Q, et al. 5-heptadecylresorcinol regulates the metabolism of thermogenic fat and improves the thermogenic capacity of aging mice via a Sirtuin 3-adenosine monophosphate-activated protein kinase pathway [J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71 (1): 557-568.
- [44] Cui XA, Liu HJ, Shi T, et al. IFI27 integrates succinate and fatty acid oxidation to promote adipocyte thermogenic adaptation [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2023, 10 (28): e2301855.
- [45] Iizuka K, Takao K, Yabe D. ChREBP-mediated regulation of lipid metabolism: involvement of the gut microbiota, liver, and adipose tissue [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020, 11: 587189.
- [46] Wei CC, Ma XH, Su K, et al. ChREBP- β regulates thermogenesis in brown adipose tissue [J]. *J Endocrinol*, 2020, 245 (3): 343-356.

- [47] Pereira RO, Marti A, Olvera AC, et al. OPA1 deletion in brown adipose tissue improves thermoregulation and systemic metabolism via FGF21 [J]. *Elife*, 2021, 10: e66519.
- [48] Bean C, Audano M, Varanita T, et al. The mitochondrial protein Opal promotes adipocyte browning that is dependent on urea cycle metabolites [J]. *Nat Metab*, 2021, 3 (12): 1633-1647.
- [49] Luo J, Wang Y, Gilbert E, et al. Deletion of GPR30 drives the activation of mitochondrial uncoupling respiration to induce adipose thermogenesis in female mice [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 877152.
- [50] 戴燕铃, 陈雪花, 丁怀利, 等. 薯蓣粥对 2 型糖尿病模型大鼠糖代谢及胰岛功能的影响 [J]. *中医杂志*, 2021, 62 (18): 7.
- [51] Guo CF, Li R, Song SS, et al. Effects of electroacupuncture on the glucose-lipid metabolism and the expression of ZAG and GLUT4 in the femoral quadriceps and adipose tissue in the rats with type 2 diabetes mellitus [J]. *Zhongguo Zhen Jiu*, 2023, 43 (12): 1425-1430.
- [52] Zeng MQ, Xu J, Zhang ZY, et al. Htd2 deficiency-associated suppression of α -lipoic acid production provokes mitochondrial dysfunction and insulin resistance in adipocytes [J]. *Redox Biol*, 2021, 41: 101948.
- [53] Wang CH, Wang CC, Huang HC, et al. Mitochondrial dysfunction leads to impairment of insulin sensitivity and adiponectin secretion in adipocytes [J]. *FEBS J*, 2013, 280 (4): 1039-1050.
- [54] Sutherland LN, Capozzi LC, Turchinsky NJ, et al. Time course of high-fat diet-induced reductions in adipose tissue mitochondrial proteins: potential mechanisms and the relationship to glucose intolerance [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, 295 (5): E1076-1083.
- [55] Ryu MJ, Kim SJ, Kim YK, et al. Crif1 deficiency reduces adipose OXPHOS capacity and triggers inflammation and insulin resistance in mice [J]. *PLoS Genet*, 2013, 9 (3): e1003356.
- [56] Bae HR, Shin SK, Han Y, et al. D-allulose ameliorates dysregulated macrophage function and mitochondrial NADH homeostasis, mitigating obesity-induced insulin resistance [J]. *Nutrients*, 2023, 15 (19): 4218.
- [57] Yang XP, Liu QH, Li YP, et al. The diabetes medication canagliflozin promotes mitochondrial remodelling of adipocyte via the AMPK-Sirt1-PGC-1 α signalling pathway [J]. *Adipocyte*, 2020, 9 (1): 484-494.
- [58] Yang XP, Liu QH, Li YP, et al. Inhibition of the sodium-glucose co-transporter SGLT2 by canagliflozin ameliorates diet-induced obesity by increasing intra-adipose sympathetic innervation [J]. *Br J Pharmacol*, 2021, 178 (8): 1756-1771.
- [59] Xu LX, Xu CF, Liu XY, et al. Empagliflozin induces white adipocyte browning and modulates mitochondrial dynamics in KK Cg-Ay/J mice and mouse adipocytes [J]. *Front Physiol*, 2021, 12: 745058.
- [60] Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis [J]. *Nature*, 2012, 481 (7382): 463-468.
- [61] Marín-Royo G, Rodríguez C, Le Pape A, et al. The role of mitochondrial oxidative stress in the metabolic alterations in diet-induced obesity in rats [J]. *FASEB J*, 2019, 33 (11): 12060-12072.
- [62] Alexopoulos SJ, Chen SY, Brandon AE, et al. Mitochondrial uncoupler BAM15 reverses diet-induced obesity and insulin resistance in mice [J]. *Nat Commun*, 2020, 11 (1): 2397.
- [63] Wang WK, Chen SS, Xu ST, et al. Jianpi Shengqing Huazhuo Formula improves abnormal glucose and lipid metabolism in obesity by regulating mitochondrial biogenesis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 319 (Pt 1): 117102.
- [64] Zhao DD, Pan YY, Yu N, et al. Curcumin improves adipocytes browning and mitochondrial function in 3T3-L1 cells and obese rodent model [J]. *R Soc Open Sci*, 2021, 8 (3): 200974.
- [65] Xiong XW, Xia M, Niu AL, et al. Dihydromyricetin contributes to weight loss via pro-browning mediated by mitochondrial fission in white adipose [J]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 935: 175345.
- [66] Ferdous MR, Abdalla M, Yang M, et al. Berberine chloride (dual topoisomerase I and II inhibitor) modulate mitochondrial uncoupling protein (UCP1) in molecular docking and dynamic with in-vitro cytotoxic and mitochondrial ATP production [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2023, 41 (5): 1704-1714.
- [67] Liu MH, Zheng MZ, Cai D, et al. Zeaxanthin promotes mitochondrial biogenesis and adipocyte browning via AMPK α 1 activation [J]. *Food Funct*, 2019, 10 (4): 2221-2233.
- [68] Liu MH, Liu HM, Xie JH, et al. Anti-obesity effects of zeaxanthin on 3T3-L1 preadipocyte and high fat induced obese mice [J]. *Food Funct*, 2017, 8 (9): 3327-3338.
- [69] Mohamad Ishak NS, Ikemoto K. Pyrroloquinoline-quinone to reduce fat accumulation and ameliorate obesity progression [J]. *Front Mol Biosci*, 2023, 10: 1200025.
- [70] Li YJ, Wu RY, Liu RP, et al. Aurantio-obtusin ameliorates obesity by activating PPAR α -dependent mitochondrial thermogenesis in brown adipose tissues [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2023, 44 (9): 1826-1840.

(收稿日期: 2024-01-24; 修回日期: 2024-04-26)

中药在控制耐药菌 *Acinetobacter baumannii* 繁殖中的研究进展

杨运¹, 刘娅², 彭春红^{3*}, 金涛⁴, 王翠⁵ (1. 贵州中医药大学, 贵阳 550025; 2. 毕节市中医医院, 贵州 毕节 551700; 3. 贵州省人民医院, 贵阳 550000; 4. 贵州大学, 贵阳 550025; 5. 贵州医科大学, 贵阳 550004)

摘要: 鲍曼不动杆菌存在多重耐药性, 感染后可选择抗菌药物有限, 病死率高, 抗鲍曼不动杆菌感染是目前临床研究领域的重点和难点。部分中药表现出抑制鲍曼不动杆菌生长的作用, 但是其抗菌机制尚不清楚。基于此, 本文系统综述了近年来中草药在控制鲍曼不动杆菌感染方面的研究进展, 以为中药抗菌药物的研发提供依据。

关键词: 鲍曼不动杆菌; 多重耐药; 中药; 研究进展

中图分类号: R932, R283 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)06-1602-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.031

Research progress of traditional Chinese medicine in controlling the proliferation of drug-resistant bacteria *Acinetobacter baumannii*

YANG Yun¹, LIU Ya², PENG Chun-hong^{3*}, JIN Tao⁴, WANG Cui⁵ (1. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025; 2. Bijie Traditional Chinese Medicine Hospital, Bijie Guizhou 551700; 3. Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002; 4. Guizhou University, Guiyang 550025; 5. Guizhou Medical University, Guiyang 550004)

Abstract: *Acinetobacter baumannii* has a multiple drug resistance and choice of antibiotics is limited when infected, resulting in a high mortality rate. Treatment of infection becomes a main difficulty in research. Some traditional Chinese medicines have shown inhibitory effects on the growth of *Acinetobacter baumannii*, but the antibacterial mechanism remains unclear. Therefore, the research on Chinese herbal medicine in controlling *Acinetobacter baumannii* infection in recent years was reviewed to provide a basis for the development of antibacterial Chinese medicine.

Key words: *Acinetobacter baumannii*; multiple drug resistance; traditional Chinese medicine; research progress

鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*, Ab) 属于不动杆菌的一类, 是革兰氏阴性条件致病菌, 也是院内感染最主要的病原菌之一, 被列为我国目前最重要的“超级细菌”。近年来, 以 Ab 为代表的多重耐药菌检出率呈快速上升趋势, 其耐药现象在全球日趋严峻^[1]。2021 年我国院内微生物分离报告显示, 革兰氏阴性菌占比高达 71.4%, 其中耐药 Ab 位于第 5 位^[2]。Ab 可引发如呼吸机相关性肺炎、菌血症、脑膜炎等感染, 死亡率高达 40% ~ 50%^[3]。由于 Ab 对包括碳青霉烯类抗菌药

物在内的多数最后一线抗菌药物耐药, 使其在可用抗菌药物的选择上面临着巨大挑战。因此, 寻找更为有效的抗菌药物尤为迫切^[4-5]。中药是新型抗菌化合物的重要来源, 众多研究显示, 中药及其制剂表现出抑制 Ab 生长的特性, 其抗菌成分复杂、作用广泛, 有巨大开发潜力。为深入研究中药抗 Ab 的作用和机制, 推动中药在抗菌方面的发展及新药研发, 本文拟对近年来中药抗 Ab 的研究进行综述。

1 中药对 Ab 生长的影响

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.82260005)。

作者简介: 杨运, 女, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事呼吸系统疾病防治研究, email: 1281404607@qq.com * 通信作者: 彭春红, 女, 主任医师, 主要从事呼吸系统疾病防治研究, email: pchwzc123@163.com

1.1 单味中药

研究发现,不少中药表现出良好的抑菌效果,是天然抑菌或杀菌药物。一项研究将黄芪与抗菌肽联合治疗感染耐药 Ab 的皮肤溃疡,结果发现黄芪组能更好地促进伤口愈合以及降低细菌存活率,说明黄芪在抗菌方面具有一定增效作用^[6]。李凯旋等^[7]对五倍子、鱼腥草、黄连、黄芩等中药抑制 Ab 的作用进行对比,发现五倍子的抑菌效果最强,其最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 最低,其次是黄芩,鱼腥草和黄连则相对较弱。五倍子不仅能抑制 Ab 生长,还能破坏细菌生物膜形成,且呈浓度依赖性^[8]。陈深元等^[9]发现黄芩、夏枯草、半枝莲、黄连能抑制耐碳青霉烯类 Ab,且黄芩的抑菌能力最强。其中,半枝莲还能降低感染 Ab 小鼠肺部的细菌载量,并且明显优于多黏菌素 (替加环素与多黏菌素被认为是广泛耐药 Ab 最后一道防线),这提示半枝莲或可成为治疗 Ab 感染肺炎的替代药物^[10]。李晓君等^[11]观察到黄连、黄芩、五味子、乌梅、连翘等可破坏细菌蛋白和叶酸合成,从而产生不同程度的抗菌效果。此外,黄柏、白头翁、千里光、金银花^[12]、大蒜^[13]等药物也能不同程度地抑制 Ab 生长。

单味中药与抗菌药物联用的抗感染效果也值得注意。如黄芩苷与氨曲南联用对抑制 Ab 具有增效作用,小檗碱与氨曲南和亚胺培南联用也表现出同样的效果,其机制可能与消除细菌耐药质粒有关^[14]。板蓝根、蒲公英与头孢哌酮-舒巴坦联用后抗 Ab 作用有所提高,但连翘和黄芩与头孢哌酮-舒巴坦联用则产生拮抗,其机制未明^[15]。

上述结果表明部分中药具有良好抗菌效果,特别是具有清热解毒功效的药物,详见表 1。

1.2 复方制剂

复方是中医治疗疾病的常用方法,起到增效、减毒等作用。一项研究将夏枯草、黄芩、黄连、半枝莲 4 味药两两组合,发现黄芩与半枝莲组合、黄连与夏枯草组合均能增强抑制 Ab 的效果,以黄芩与半枝莲联用最强^[18]。紫草素是紫草的主要成分,具有抗菌、抗病毒、抗炎等作用^[19]。紫草膏体外能抑制常见耐药菌 (如金黄色葡萄球菌、Ab) 增殖,且明显优于单成分用药^[20]。小柴胡汤具有抗纤维化、抗肿瘤、调节内分泌和提高免疫力等作用^[21],可减轻 Ab 引起的重症肺炎患者肺部及全身炎症状况,并减少住院时间^[22]。体外研究发现小柴胡汤能抑制 Ab 生长,并且与亚胺培南联

表 1 常见抗 *Acinetobacter baumannii* 的单味中药及其 MIC (mg · mL⁻¹)

Tab 1 Single traditional Chinese medicine for *Acinetobacter baumannii* and its MIC (mg · mL⁻¹)

单味中药	类别	实验方法	MIC ₅₀	文献
黄芩	清热燥湿药	体外抑菌实验	3.9	[15]
黄芩	清热燥湿药	体外抑菌实验	3.13	[9]
黄芩	清热燥湿药	体外抑菌实验	15.63	[7]
黄连	清热燥湿药	体外抑菌实验	6.25	[9]
半枝莲	清解热毒药	体外抑菌实验	6.25	[9]
连翘	清解热毒药	体外抑菌实验	3.9	[15]
板蓝根	清解热毒药	体外抑菌实验	62.5	[15]
蒲公英	清解热毒药	体外抑菌实验	62.5	[15]
金银花	清解热毒药	体外抑菌实验	62.5	[16]
鱼腥草	清解热毒药	体外抑菌实验	125	[16]
夏枯草	清热泻火药	体外抑菌实验	6.25	[17]
五味子	敛肺涩肠药	体外抑菌实验	62.5	[17]
乌梅	敛肺涩肠药	体外抑菌实验	62.5	[7]
五倍子	敛肺涩肠药	体外抑菌实验	0.98	[7]
五倍子	敛肺涩肠药	体外抑菌实验	0.78	[8]
五倍子	敛肺涩肠药	体外抑菌实验	62.5	[17]

注 (Note): “MIC₅₀” 表示 50% 抑菌浓度 (“MIC₅₀” means a 50 percent of antibacterial concentration)。

用后效果显著增强,其机制可能是与激活外膜蛋白相关基因 *adeJ*、*CarO* 的表达,破坏细菌的生物膜结构,降低细菌在物体表面的黏附性有关^[23]。小青龙汤具有抑菌、改善气道炎症和抗过敏等作用^[24],将其与替加环素联用治疗 Ab 感染相关肺炎,能迅速改善全身症状,并且降低血清炎症指标^[25]。药理研究发现,小青龙汤中五味子能抑制 Ab 生物膜形成,降低细菌活力^[11];麻黄具有抗菌、抗炎等作用^[26];此外,桂枝中的桂皮醇等成分能通过阻断细胞 DNA 合成、破坏细胞膜结构及代谢等途径抑制细菌活性和繁殖^[27]。丹黄消炎液可增加 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR-4) 表达,释放下游肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白细胞介素- 1β (interleukin- 1β , IL- 1β),从而激活机体免疫反应而使 Ab 大量死亡^[28]。另外,麻黄升麻汤^[29]、清瘟解毒汤^[30]、麻杏饮^[31]、益气活血化痰方^[32]、红藤紫金汤^[33]等经典或自拟方剂,均在一定程度上表现出改善 Ab 感染后相关症状及增加细菌清除率的作用。常见治疗 Ab 的中药复方详见表 2。

注射剂是中药复方的另一种剂型,常与现有的抗菌药物联用干预 Ab。诸如,痰热清注射液与头孢哌酮联用治疗 Ab 相关重症肺炎疗效更为明显,且不良反应发生率更低,细菌清除率也更高^[35],其机制可能与抑制细菌生物膜、外排泵表

表 2 常见抑制 *Acinetobacter baumannii* 的中药复方制剂
Tab 2 Common Chinese herbal for *Acinetobacter baumannii*

中药复方	组成	研究类型	观察指标	文献
紫草膏	紫草、金银花、野菊花	纸片扩散法	抑菌圈 14 mm	[20]
小柴胡汤	柴胡、黄芩、姜半夏、生姜、人参等	临床研究	WBC↓、CRP↓、PCT↓、病原体载量↓等	[22]
小青龙汤	麻黄、桂枝、半夏、细辛、五味子、干姜等	临床研究	WBC↓、CRP↓等	[25]
丹黄消炎液	黄芪、丹参、皂角刺、当归、银花、大黄等	动物实验	TLR-4↓、IL-1β↓	[28]
麻黄升麻汤	麻黄、升麻、桂枝、玉竹、黄芩、知母等	临床研究	IL-6、TNF-α、PCT、CRP、病原体载量↓	[29]
清瘟解毒汤	生石膏、金银花、连翘、浙贝母、薏苡仁等	临床研究	PCT↓、病原体载量↓等	[30]
麻杏饮	麻黄、杏仁、甘草、生石膏等	临床研究	CRP↓、IL-4↓、PCT↓、病原体载量↓等	[31]
益气活血化痰方	黄芪、当归、橘红、茯苓、川贝母、瓜蒌仁等	临床研究	WBC↓、CRP↓、PCT↓等	[32]
红藤紫金汤	红藤、紫花地丁、金银花、连翘等	临床研究	WBC↓、CRP↓、PCT↓、病原体载量↓等	[33]
翘芩清肺剂	黄芩、连翘	纸片扩散法	MIC 2.75 g · mL ⁻¹	[34]
痰热清注射液	黄芩、熊胆粉、山羊角、金银花、连翘	临床研究	CRP↓、WBC↓、PCT↓、病原体载量↓等	[35]
血必净注射液	红花、赤芍、川芎、当归、丹参	临床研究	CRP↓、WBC↓、PCT↓、病原体载量↓等	[36]

注 (Note): ↓表示下调 (↓means decrease); WBC. 白细胞 (white blood cell); CRP. C-反应蛋白 (C-reactive protein); PCT. 降钙素原 (pro-calcitonin); IL-6. 白细胞介素 -6 (interleukin-6)。

达和炎症因子释放有关^[37-38]。血必净注射液联用替加环素改善了 Ab 感染引发的肺部感染和炎症指标, 并且缩短恢复进程^[36]。双黄连粉针剂与头孢哌酮-舒巴坦联用后抑菌效果较单纯用药显著增强^[39]。热毒宁注射液与头孢他啶、亚胺培南联

用不仅增强了抑菌效果, 还减少了抗菌药物使用剂量和不良反应发生率^[40]。中、西药联合抗菌的机制可能涉及抑制生物膜、外排泵形成以及炎症控制等方面, 但需进一步探究。中西药联用后 MIC 的变化详见表 3。

表 3 中药与抗菌药物联用在抑制 *Acinetobacter baumannii* 中的 MIC 研究结果

Tab 3 MIC in the inhibition of *Acinetobacter baumannii* by the combination of traditional Chinese medicine and antibiotics

药物	研究类型	MIC		文献
		单用	联用	
小柴胡汤	微量棋盘稀释法	32 μg · mL ⁻¹	0.25 mg · mL ⁻¹	[23]
亚胺培南		16 μg · mL ⁻¹	0.25 mg · mL ⁻¹	
双黄连粉针剂	肉汤稀释法	6.25 ~ 25 mg · mL ⁻¹	3.12 ~ 12.25 mg · mL ⁻¹	[39]
头孢哌酮-舒巴坦钠		128 ~ 256 μg · mL ⁻¹	32 ~ 64 μg · mL ⁻¹	
热毒宁注射液	肉汤稀释法	400 μL · mL ⁻¹	25 μL · mL ⁻¹	[40]
亚胺培南		128 μg · mL ⁻¹	4 μg · mL ⁻¹	
热毒宁注射液	肉汤稀释法	400 μL · mL ⁻¹	300 μL · mL ⁻¹	[40]
头孢他啶		128 μg · mL ⁻¹	4 μg · mL ⁻¹	
黄连中药根碱	微量肉汤稀释法	3.12 ~ 6.25 mg · mL ⁻¹	3.12 ~ 6.25 mg · mL ⁻¹	[41]
阿米卡星		64 ~ 128 mg · mL ⁻¹	16 ~ 32 mg · mL ⁻¹	
黄芩素	微量肉汤稀释法	50 ~ 100 μg · mL ⁻¹	25 μg · mL ⁻¹	[42]
美罗培南		128 μg · mL ⁻¹	32 ~ 64 μg · mL ⁻¹	

上述结果表明, 一方面由于中药复方成分复杂, 其抗菌途径广泛, 或可从多方面抑制细菌生长和增殖。另一方面, 中西药联用多具有协同作用, 增加抗菌药物选择的同时, 还能减少抗菌药物的使用剂量, 这在一定程度上为新型抗菌药物的研发提供了新思路 and 依据。

1.3 中药活性成分在 Ab 中的研究进展

小檗碱可以影响细菌细胞膜组成相关氨基酸和糖代谢, 进而破坏细胞膜结构而杀菌^[43]。研究显示, 小檗碱可以降低 Ab 生物被膜数量, 抑制

耐药 Ab 的生长和繁殖速度^[44-45]。黄芩素是黄芩中的一类黄酮类物质, 具有明确的抗菌作用^[46]。黄芩素可激活细菌外排泵和外膜蛋白基因表达, 从而对 Ab 产生抑制作用^[42]。苦参中的苦参醇、里查酮也被发现对 Ab 具有较强的抗菌活性^[47]。

此外, 鱼腥草素钠单用表现出微弱的抗 Ab 能力, 但是与阿米卡星^[48]、亚胺培南^[49]等抗菌药物联用后抗菌效果显著增强, 其机制可能与抑制细菌生物膜形成有关^[50-51]。山苍子精油能诱发 Ab 能量合成障碍和氧化应激反应, 破坏细菌结

构及影响其代谢过程而致其死亡，并且在体内也能减轻感染引起的炎症和肝损伤^[52]。薄荷精油可使 Ab 能量合成障碍，细胞内 pH 值和膜电位降低，细胞膜结构遭到破坏而溶解^[53]。

2 中药抗 Ab 的机制

中药的抗菌成分和机制尚未完全清晰，目前的研究主要发现部分中药可能通过以下途径发挥抗菌作用，包括抑制或破坏细菌生物膜形成、调控细菌细胞膜通透性、抑制外排泵表达、消除耐药质粒、影响细菌蛋白分泌和代谢等方面。

2.1 抑制生物膜形成

生物膜是细菌的保护屏障及强毒力因子，是 Ab 重要耐药机制之一。细菌借助生物膜定植在机体表面而难以被清除，并使药物向细菌内扩散受阻而发生耐药^[54]。

细菌在机体表面黏附和聚集后，通过群体感应 (quorum sensing, QS) 系统进行信号传递，从而调控生物被膜形成^[55-56]。Alves 等^[57]发现，芳香醇能降低 Ab 黏附力和数量，减少成熟或未成熟状态生物膜生成，并且首次发现芳香醇抑制了细菌 QS 信号分子的合成能力，这表明芳香醇可能通过干扰 QS 信号分子影响细菌生物被膜形成。咖啡酸、肉桂酸、杨梅素^[58]、五倍子^[8]、茶多酚^[59]等中药单体化合物可影响生物膜形成基因表达而阻断 Ab 生物被膜生成和细菌黏附，其中 BAP 和 aBaI 基因受上述药物共同调控。此外，黄连、五味子、乌梅、黄芩^[11]、辣椒素^[60]、槲皮素二水物、小檗碱、黄芩苷^[43]等药物均可抑制 Ab 菌株繁殖和使生物膜数量减少，细菌活力降低，但机制未明。中药通过影响生物膜途径抗 Ab 的机制见图 1。

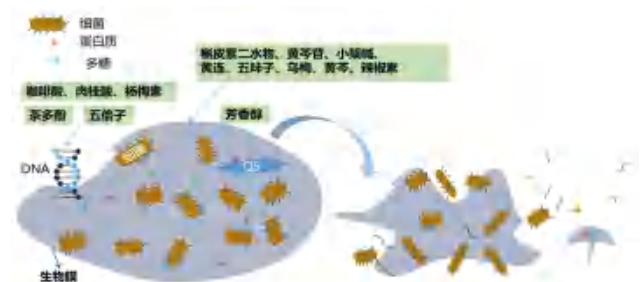


图 1 中药抗鲍曼不动杆菌的机制 (破坏生物膜功能)
Fig 1 Mechanism of traditional Chinese medicine against *Acinetobacter baumannii* (disrupting biofilm function)

2.2 Omps 调控的细胞膜通透性改变

外膜蛋白 (out membrane protein, Omp) 是细菌外膜上的通道蛋白，能调节外膜的通透性。在 Omp 帮助下，细菌可以阻止抗菌药物进入细菌内部，因而产生持久的耐药性^[61]。有研究发

现，外膜蛋白基因 *CarO* 可降低抗菌药物对耐碳青霉烯类 Ab 的穿透力，导致耐药发生^[62]。黄芩素与美罗培南联用后，降低了后者抑制耐碳青霉烯 Ab 的 MIC，并且检测发现 *CarO* 基因的表达出现上调。因此，推测黄芩素降低耐碳青霉烯 Ab 的耐药性与 *CarO* 基因表达有关，但是否是直接通过激活 *CarO* 基因表达实现尚不清楚^[46]。

2.3 抑制主动外排泵

外排泵是细菌细胞膜上的一类活性蛋白，耐药菌可以利用外排泵将抗菌药物快速泵出细胞外，从而增加其耐药性^[63]。近年来研究发现，AdeABC 系统激活是多重耐药 Ab 重要的致病因素，其中 AdeB 基因的过表达与细菌耐药性密切相关^[64-65]。当该系统激活时，抗菌药物被大量排出细胞外而活力下降，而在失活状态下，药物的抗菌活性又能得以恢复^[66]。研究发现，经黄芩苷干预后 Ab 的繁殖受到明显抑制，通过 PCR 检测干预后基因变化，发现 AdeB 基因表达较干预前显著下调，这说明黄芩苷能够影响 AdeABC 外排泵而发挥抑菌作用^[67]。

2.4 消除耐药质粒

质粒含多种类型的耐药和毒力因子基因，这些基因通过质粒在生物之间发生转移并稳定存在^[68]。质粒基因的传递不仅使 Ab 获得强大适应力，也导致耐药菌株大量复制，是 Ab 产生耐药的重要因素^[69]。低浓度黄芩苷可消除部分 Ab 耐药质粒，并提高环丙沙星和庆大霉素的敏感性，但当增加浓度后质粒并未继续减少，这可能与耐药基因表达不同有关^[70]。此外，五倍子可抑制携带不同耐药基因质粒的接合传递，显著抑制 Ab 增殖，可能是通过多靶点发挥作用^[71]。

2.5 抑制细菌蛋白分泌

Ab 中有多种蛋白分泌系统，细菌可借助分泌系统吸取胞外养分而适应环境，并分泌效应蛋白定植到宿主细胞中发挥靶向作用而诱发感染^[72]。巴西苏木素与美罗培南联用时 Ab 生长受到明显抑制，并且两者的 MIC 均降低，检测发现细菌可溶性蛋白分泌量也减少^[73]。

2.6 影响代谢组学

近来研究发现，半胱氨酸与细菌生物膜、耐药性和生长有关，可能是细菌适应环境的重要原因^[74]，而尿苷三磷酸主要参与生命体内 RNA 的合成^[75]。一项研究利用质谱分析黄芩苷和小檗碱对 Ab 代谢的影响，发现黄芩苷减少了 Ab 菌体内的 L-半胱氨酸含量，盐酸小檗碱则降低了 Ab 菌体内

的尿苷三磷酸含量。这说明黄芩苷和小檗碱可通过调节半胱氨酸或氨基糖、嘧啶代谢通路影响细菌繁殖^[76]。中药抗 Ab 的其他机制见图 2。

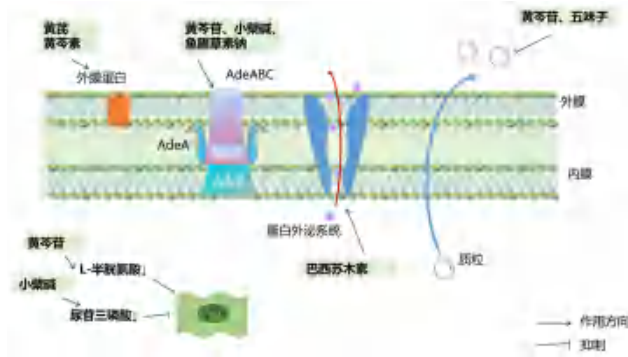


图 2 中药抗鲍曼不动杆菌机制 (非生物膜途径)
Fig 2 Mechanism of traditional Chinese medicine against *Acinetobacter baumannii* (the non-biofilm pathway)

3 总结与展望

随着耐药菌逐年增长, 细菌耐药现象日趋严峻。目前, 中药抑制 Ab 的研究已有一定进展。在类别方面, 单味药多以清热解毒类为主, 如黄芩、黄连、黄柏等, 单体有黄酮类、生物碱类等, 部分复方如小青龙汤、小柴胡汤、痰热清注射液等也具有一定抑菌效果。在机制方面, 多数研究集中于抑制或破坏细菌生物膜、Omps、外排泵等途径, 有部分涉及耐药质粒和细菌代谢, 并且各耐药机制之间并非单一作用, 存在交互介导、影响。但目前的研究多较表浅且单一, 未对相关机制通路进行深入、全面的探究, 且缺乏临床验证, 使得中药在抗菌方面的应用进展缓慢。其中单味中药具有多成分、多途径、多靶点的特点, 可通过调控不同信号途径来发挥作用, 如黄芩苷同时对 Ab 生物膜形成、外排泵表达以及耐药质粒都有一定的调控作用, 因此应对不同药物成分及通路进一步研究与分析。此外, 部分复方在体内可以降低 Ab 引发的炎症反应和细菌载量, 但由于复方药物众多、成分复杂, 且缺乏相关基础实验, 因此应将中医辨证思维与现代技术融合, 并增大样本数据和基础实验对药物之间的相互作用及机制进一步研究, 以期将中药复方制剂推广使用。

综上, 应以多方位、多层次的研究方式为指导, 加深对中药抗菌机制的研究, 对合理开发利用中药资源具有十分重要的意义。

参考文献

[1] Cassini A, Hogberg LD, Plachouras D, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by

infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis [J]. Lancet Infect Dis, 2019, 19 (1): 56-66.

[2] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2021 年 CHINET 中国细菌耐药监测 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2022, 22 (5): 521-530.

[3] Monem S, Furmanek-Blaszczak B, Lupkowska A, et al. Mechanisms protecting *Acinetobacter baumannii* against multiple stresses triggered by the host immune response, antibiotics and outside-host environment [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21 (15): 5498.

[4] Ibrahim ME. Prevalence of *Acinetobacter baumannii* in Saudi Arabia; risk factors, antimicrobial resistance patterns and mechanisms of carbapenem resistance [J]. Ann Clin Microb Anti, 2019, 18 (1): 1.

[5] Theuretzbacher U, Bush K, Harbarth S, et al. Critical analysis of antibacterial agents in clinical development [J]. Nat Rev Microbiol, 2020, 18 (5): 286-298.

[6] 徐阳, 周鑫, 牛欣悦, 等. 黄芪在抗菌肽 Brevinin-2Ta 治疗创面感染耐药鲍曼不动杆菌中的增效机制研究 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2023, 29 (4): 434-439, 433.

[7] 李凯旋, 赵小军, 魏娟, 等. 单味中药对多重耐药鲍曼不动杆菌体外抑菌作用的研究 [J]. 中国微生态学杂志, 2018, 30 (4): 392-394, 397.

[8] 姜茜, 杨翼, 刘大鹏, 等. 五味子水煎剂抑制鲍曼不动杆菌生物膜形成分子机制的研究 [J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40 (20): 2439-2443.

[9] 陈深元, 曾敏敏, 杨焯健, 等. 20 种中药对碳青霉烯耐药鲍曼不动杆菌的体外抑菌作用 [J]. 中国中医药科技, 2020, 27 (3): 370-372.

[10] Tsai CC, Lin CS, Hsu CR, et al. Using the Chinese herb *Scutellaria barbata* against extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: in vitro and in vivo studies [J]. BMC Complem Altern M, 2018, 18: 1-11.

[11] 李晓君, 邓超, 谭俊青, 等. 黄连等五种中药颗粒剂对鲍曼不动杆菌生物膜耐药性及相关基因的作用分析 [J]. 中医药临床杂志, 2022, 34 (2): 313-317.

[12] 赵娜, 农凤鸣, 汤丽霞, 等. 黄连等 6 味中草药对耐药性鲍曼不动杆菌的抑菌作用研究 [J]. 中国中医药科技, 2018, 25 (5): 670-671.

[13] 谭晓宇, 凌寿坚, 钟一梅. 大蒜与含氯消毒剂联用对多重耐药鲍曼不动杆菌体外抑菌的实验研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2021, 48 (7): 179-182.

[14] 张晓玲, 于翠香. 盐酸小檗碱、黄芩苷与抗菌药物联用对多重耐药鲍曼不动杆菌作用研究 [J]. 中南药学, 2014, 12 (5): 411-414.

[15] 马冬梅, 蒋东葵, 相晓波, 等. 板蓝根等 4 种中药单用和与西药联用对广泛耐药鲍曼不动杆菌的抑菌作用 [J]. 检验医学, 2023, 38 (5): 441-445.

[16] 马冬梅, 陶庆春, 蒋东葵, 等. 四种清热解毒类中草药对广泛耐药鲍曼不动杆菌的体外抑菌比较 [J]. 环球中医

- 药, 2021, 14 (7): 1192-1196.
- [17] 王玉春, 唐建红. 8 种单味中药颗粒剂对多重耐药鲍曼不动杆菌的抑菌作用[J]. 中国中医药现代远程教育, 2021, 19 (5): 140-142.
- [18] 陈剑涛, 陈锡娇, 杨雪琼, 等. 4 种中药联用对多重耐药鲍曼不动杆菌的体外抗菌活性研究[J]. 中国中医药科技, 2023, 30 (2): 221-225.
- [19] 王天怡, 张秉新. 紫草制剂外用治疗皮肤病的临床及实验研究进展[J]. 北京中医药, 2022, 41 (3): 339-342.
- [20] 高泽纯, 刘恬, 陈盛林, 等. 复方紫草膏组方的体外抑菌实验研究[J]. 山东化工, 2022, 51 (23): 54-56.
- [21] 张志雄, 刘春芳, 刘明洋, 等. 小柴胡汤的药理作用及临床应用研究进展[J]. 中医药临床杂志, 2021, 33 (3): 580-584.
- [22] 肖秋生, 马明远, 邓梦华, 等. 小柴胡汤加减治疗 ICU 老年患者肺部泛耐药鲍曼不动杆菌感染的疗效观察[J]. 中国中医急症, 2021, 30 (5): 861-864.
- [23] 高吟, 张立红, 张志斌, 等. 小柴胡汤及亚胺培南西司他丁对耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的体外抑菌效果及生物膜清除作用的机制研究[J]. 实用临床医药杂志, 2022, 26 (18): 72-77.
- [24] 雷佩珊. 小青龙汤对 AECOPD 气道炎症影响的临床研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2018.
- [25] 庄雅娟, 李云超, 贯雨娟, 等. 替加环素联合小青龙汤雾化吸入治疗耐药鲍曼不动杆菌致呼吸机相关性肺炎疗效及对血清炎症因子的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2018, 27 (5): 492-494, 570.
- [26] 黄玲, 王艳宁, 吴曙粤. 中药麻黄药理作用研究进展[J]. 中外医疗, 2018, 37 (7): 195-198.
- [27] 韦露玲, 张森, 黄飘玲, 等. 桂枝抗菌活性成分及其作用机制研究进展[J]. 湖北农业科学, 2021, 60 (21): 21-25.
- [28] 徐阳, 王军, 薛田, 等. 丹黄消炎液对皮肤溃疡感染耐药鲍曼不动杆菌及 TLR4 作用[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2018, 24 (6): 723-728.
- [29] 王玉东, 任松涛. 序贯中药辅助治疗 ICU 多重耐药鲍曼不动杆菌肺炎的疗效评价[J]. 辽宁中医杂志, 2020, 47 (7): 87-90.
- [30] 梁洪文, 刘凯, 蔡国锋, 等. 清瘟解毒汤治疗泛耐药鲍曼不动杆菌致痰热壅肺证呼吸机相关性肺炎疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2019, 28 (23): 2509-2513.
- [31] 李俊虎, 张凤雅, 刘士昭, 等. 麻杏饮加减联合替加环素治疗广泛耐药鲍曼不动杆菌致呼吸机相关性肺炎的疗效及对 T 淋巴细胞亚群的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2022, 32 (13): 75-80.
- [32] 迟培枫. 益气活血化痰方治疗耐药鲍曼不动杆菌肺炎的临床研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2022.
- [33] 刘磊, 闫东升, 张志军. 红藤紫金汤联合抗菌素治疗 ICU 多重耐药鲍曼不动杆菌肺炎 45 例[J]. 中医研究, 2019, 32 (4): 22-24.
- [34] 梁慧玲, 韩超, 郑琳颖, 等. 翘苓清肺剂中药免煎颗粒剂与饮片剂的抑菌作用比较[J]. 广州医药, 2021, 52 (3): 112-116.
- [35] 方芳, 李爽, 陈旻, 等. 痰热清注射液联合头孢哌酮舒巴坦治疗耐药鲍曼不动杆菌老年重症肺部感染疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2019, 28 (25): 2791-2793.
- [36] 马新, 郑晶晶, 张杰, 等. 血必净注射液联合替加环素对碳青霉烯耐药鲍曼不动杆菌感染的疗效[J]. 西部中医药, 2020, 33 (7): 110-113.
- [37] 王亮, 陶玉龙, 陈万生. 痰热清注射液化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. 中草药, 2020, 51 (12): 3318-3328.
- [38] 李悦怡, 李贤煜, 杨伟峰, 等. 痰热清注射液与抗菌药物对多重耐药铜绿假单胞菌外排泵的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26 (14): 92-98.
- [39] 马冬梅, 陶庆春. 双黄连粉针剂联合注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠对广泛耐药鲍曼不动杆菌和肺炎克雷伯菌抑菌效果比较[J]. 北京中医药, 2019, 38 (9): 937-940.
- [40] 刘佳, 陶庆春. 热毒宁联合西药对耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌体外抑菌实验研究[J]. 北京中医药, 2019, 38 (1): 35-37.
- [41] 李莹, 施瑜, 段秀杰, 等. 黄连中药根碱分别联合阿米卡星与头孢哌酮/舒巴坦对泛耐药鲍曼不动杆菌的体外抑菌作用[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42 (9): 1079-1083, 1088.
- [42] 郑杨. 黄芩素联合美罗培南对耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌体外抑菌作用及机制研究[D]. 遵义: 遵义医科大学, 2021.
- [43] Wultanska D, Piotrowski M, Pituch H. The effect of berberine chloride and/or its combination with vancomycin on the growth, biofilm formation, and motility of *Clostridioides difficile* [J]. Eur J Clin Microbiol, 2020, 39: 1391-1399.
- [44] 孟千琳, 彭勤, 凌保东. 抗菌药物联合中药单体对泛耐药鲍曼不动杆菌生物被膜的影响[J]. 中国抗菌药物杂志, 2022, 47 (7): 697-702.
- [45] 刘力娟, 马立艳, 孙伟, 等. 盐酸小檗碱对耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌生物膜的作用[J]. 临床检验杂志, 2022, 40 (8): 589-594.
- [46] 蒋庆佳, 杨放, 杨安迪, 等. 中药抑菌活性成分及其作用机制研究进展[J]. 中国抗菌药物杂志, 2023, 48 (8): 855-861.
- [46] 郑杨. 黄芩素联合美罗培南对耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌体外抑菌作用及机制研究[D]. 遵义: 遵义医科大学, 2021.
- [47] 李萍. 苦参抗鲍曼不动杆菌活性成分研究[D]. 济南: 山东大学, 2021.
- [48] 毛建梅. 鱼腥草素钠联合阿米卡星抗多重耐药鲍曼不动杆菌及机制探讨[D]. 南充: 川北医学院, 2021.
- [49] 周孟杰, 毛建梅, 蔡燕. 鱼腥草素钠联合亚胺培南西司他丁钠对碳青霉烯耐药鲍曼不动杆菌体外抑菌作用的研究[J]. 重庆医学, 2022, 51 (7): 1122-1126, 1130.
- [50] Wang TM, Huang WF, Duan QJ, et al. Sodium houttuyfonate in vitro inhibits biofilm dispersion and expression of

- bdIA in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Mol Biol Rep, 2019, 46 (1): 471-477.
- [51] Liu GX, Xiang H, Tang XD, et al. Transcriptional and functional analysis shows sodium houttuynon-mediated inhibition of autolysis in *Staphylococcus aureus* [J]. Molecules, 2011, 16 (10): 8848-8865.
- [52] 郝凯源. 山苍子精油对耐药鲍曼不动杆菌的体内外抗菌活性研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2023.
- [53] 鄂心蕊. 美国薄荷精油对耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌抗菌活性及抗菌机制的研究 [D]. 佳木斯: 佳木斯大学, 2022.
- [54] Law SK, Tan HS. The role of quorum sensing, biofilm formation, and iron acquisition as key virulence mechanisms in *Acinetobacter baumannii* and the corresponding anti-virulence strategies [J]. Microbiol Res, 2022, 260: 127032.
- [55] Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R. Quorum sensing and phytochemicals [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14 (6): 12607-12619.
- [56] Tay SB, Yew WS. Development of quorum-based anti-virulence therapeutics targeting gram-negative bacterial pathogens [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14 (8): 16570-16599.
- [57] Alves S, Duarte A, Sousa S, et al. Study of the major essential oil compounds of *Coriandrum sativum* against *Acinetobacter baumannii* and the effect of linalool on adhesion, biofilms and quorum sensing [J]. Biofouling, 2016, 32 (2): 155-165.
- [58] Zeng L, Lin F, Ling BD. Effect of traditional Chinese medicine monomers interfering with quorum-sensing on virulence factors of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1135180.
- [59] 刘阿龙. 茶多酚对耐药鲍曼不动杆菌生物膜的破坏作用及机制研究 [D]. 广州: 广东药科大学, 2019.
- [60] Guo TT, Li MY, Sun XL, et al. Synergistic activity of capsaicin and colistin against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: in vitro/vivo efficacy and mode of action [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 744494.
- [61] Dolma KG, Khati R, Paul AK, et al. Virulence characteristics and emerging therapies for biofilm-forming *Acinetobacter baumannii*: a review [J]. Biology, 2022, 11 (9): 1343.
- [62] Chen LD, Tan PH, Zeng JM, et al. Impact of an intervention to control imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and its resistance mechanisms: an 8-year survey [J]. Front Microbiol, 2020, 11: 610109.
- [63] Reens AL, Crooks AL, Su CC, et al. A cell-based infection assay identifies efflux pump modulators that reduce bacterial intracellular load [J]. PLoS Pathogens, 2018, 14 (6): e1007115.
- [64] Tiwari V, Patel V, Tiwari M. In-silico screening and experimental validation reveal L-Adrenaline as anti-biofilm molecule against biofilm-associated protein (Bap) producing *Acinetobacter baumannii* [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 107: 1242-1252.
- [65] Shakibaie MR, Modaresi F, Azizi O, et al. Amphiphilic peptide Mastoparan-B induces conformational changes within the AdeB efflux pump, down-regulates *adeB* gene expression, and restores antibiotic susceptibility in an MDR strain of *Acinetobacter baumannii* [J]. Proteins, 2023, 91 (9): 1205-1221.
- [66] Du DJ, Xuan WK, Neuberger A, et al. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation [J]. Nat Rev Microbiol, 2018, 16 (9): 523-539.
- [67] 侯盼飞, 潘艳, 高春艳, 等. 黄芩苷对泛耐药鲍曼不动杆菌抑菌作用研究 [J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2021, 44 (3): 162-164.
- [68] Pitout JDD, Chen L. The significance of epidemic plasmids in the success of multidrug-resistant drug pandemic extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* [J]. Infect Dis Ther, 2023, 12 (4): 1029-1041.
- [69] Maslova O, Mindlin S, Beletsky A, et al. Plasmids as Key Players in *Acinetobacter* adaptation [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23 (18): 10893.
- [70] 汪东海, 陈敏, 姜志强, 等. 黄芩苷消除 Ab 耐药质粒的实验研究 [J]. 中国现代应用药学, 2012, 29 (5): 400-404.
- [71] 陈娇, 刘康, 刘晓庆, 等. 20 种中草药对产不同基因型 ESBLs 鲍曼不动杆菌的抑菌作用的研究 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26 (5): 1108-1110.
- [72] 刘伟, 庞建, 刘占英, 等. 革兰氏阴性细菌蛋白分泌系统研究进展 [J]. 微生物学通报, 2022, 49 (2): 781-793.
- [73] 徐令清, 杜良琴, 袁润奇, 等. 苏木及其活性成分对耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的体外抑制作用研究 [J]. 重庆医学, 2023, 52 (5): 662-666, 671.
- [74] 方金芝, 陈依军, 张洁琳. 半胱氨酸合酶的功能与合成应用研究进展 [J]. 药物生物技术, 2021, 28 (5): 531-536.
- [75] Loan TD, Easton CJ, Alissandratos A. Recombinant cell-lysate-catalysed synthesis of uridine-5-triphosphate from nucleobase and ribose, and without addition of ATP [J]. New Biotechnol, 2019, 49: 104-111.
- [76] 倪建腾, 马致洁, 赵奎君, 等. 基于代谢组学的黄芩苷、盐酸小檗碱抑制鲍曼不动杆菌作用机制的初步研究 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2021, 21 (7): 834-841.

(收稿日期: 2023-12-25; 修回日期: 2024-01-22)

降糖西药治疗非酒精性脂肪性肝病并发 2 型糖尿病的研究进展

李海洋¹, 熊媛琴¹, 王景淑¹, 艾耀伟^{1, 2, 3*} (1. 三峡大学医学院, 湖北 宜昌 443000; 2. 三峡大学第一临床医学院, 湖北 宜昌 443000; 3. 宜昌市中心人民医院, 湖北 宜昌 443000)

摘要: 非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 和 2 型糖尿病 (T2DM) 在临床上都是常见病, 常同时存在或互相影响疾病的发生发展, 胰岛素抵抗 (IR) 可能是它们共同发病的关键机制。近年来, NAFLD 的患病率逐年上升, 已成为发病率第一的肝病。某些降糖药物除了能有效管理血糖, 还能改善肝脏脂肪变性、气球样变、肝纤维化和炎症指标, 可能是治疗 NAFLD 的潜在药物。现就二甲双胍、DPP-4 抑制剂、GLP-1 受体激动剂、SGLT-2 抑制剂、PPAR 激动剂在治疗 NAFLD 合并 T2DM 患者中的作用效果进行综述, 以期为 NAFLD 后续的药物研究和临床治疗提供参考。

关键词: 非酒精性脂肪性肝病; 2 型糖尿病; 降糖药物; SGLT-2 抑制剂

中图分类号: R587.2, R575.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)06-1609-06
doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.032

Research progress in hypoglycemic agents for nonalcoholic fatty liver disease complicated with type 2 diabetes mellitus

LI Hai-yang¹, XIONG Yuan-qin¹, WANG Jing-shu¹, AI Yao-wei^{1, 2, 3*} (1. Medical College of China Three Gorges University, Yichang Hubei 443000; 2. The First College of Clinical Medical Science, China Three Gorges University, Yichang Hubei 443000; 3. Yichang Central People's Hospital, Yichang Hubei 443000)

Abstract: Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and type 2 diabetes mellitus (T2DM) are both common. They often coexist or affect the occurrence and development of other diseases at the same time. Insulin resistance may be the key common pathogenesis. In recent years, the incidence rate of NAFLD has increased year by year. Current studies have shown that some hypoglycemic drugs can not only effectively manage blood glucose, but also improve liver steatosis, ballooning, liver fibrosis and inflammation indicators, which may be potential drugs for NAFLD. This article reviewed the effects of metformin, DPP-4 inhibitors, GLP-1 receptor agonists, SGLT-2 inhibitors, and PPAR agonists on NAFLD patients with T2DM, providing ideas for the treatment of NAFLD and reference for subsequent drug research.

Key words: nonalcoholic fatty liver disease; type 2 diabetes mellitus; antidiabetic drug; SGLT-2 inhibitor

非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是指在排除酒精大量摄入及其他明确的肝损伤因素的基础上, 以肝脏脂肪变性为主要特征的疾病, 组织学上可分为单纯性脂肪肝和非酒精性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH)^[1]。2020 年, 来自 22 个国家的

30 名肝病专家发表共识, 建议将 NAFLD 更名为代谢相关脂肪性肝病 (metabolic associated fatty liver disease, MAFLD), 并提出新的诊断标准, 推荐意见: MAFLD 的诊断标准是肝细胞脂肪聚集的程度, 以组织学、影像学及血液生物标志物为依据, 并有以下三项条件之一: 超重/肥胖、2

基金项目: 湖北省卫生健康委员会联合基金项目 (No.WJ2019H507); 宜昌市医疗卫生研究项目 (No.A20-2-023)。

作者简介: 李海洋, 男, 硕士, 主要从事癌前状态研究, email: 2939397041@qq.com ***通信作者:** 艾耀伟, 男, 硕士研究生导师, 主任医师, 主要从事胃肠和肝胆疾病研究, email: aiyaowei2018@126.com

型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM)、代谢功能障碍^[2]。但因存在争议未正式推行。NAFLD 全球患病率约为 25%，且近年来呈现上升趋势^[3]。NASH 可增加肝硬化、肝细胞癌、心血管疾病和其他恶性肿瘤的风险，且 NASH 可不经肝硬化阶段直接演化为肝癌^[4]。因此，NAFLD 已成为一个危害公众健康的新兴公共问题，但迄今为止，我国尚无批准用于治疗 NAFLD 的药物。NAFLD 与肥胖症、T2DM、代谢综合征 (metabolic syndrome, MetS) 等疾病密切相关。目前国内指南^[5]建议：可以应用降糖药物治疗 NAFLD 合并 T2DM 的患者。本文总结近年来二甲双胍、二肽基肽酶-4 (dipeptidyl peptidase IV, DPP-4) 抑制剂、胰高糖素样肽-1 (glucagon-like peptide 1, GLP-1) 受体激动剂、钠-葡萄糖协同转运蛋白 2 (sodium dependent glucose transporter 2, SGLT-2) 抑制剂、过氧化物酶增殖物激活受体 (peroxisome proliferator activated receptor, PPAR) 激动剂等降糖药物对 NAFLD 的治疗效果，以期对 NAFLD 合并 T2DM 患者的治疗提供新思路。

1 NAFLD 的流行病学进展

NAFLD 的发病机制十分复杂，MetS、胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR)、糖脂代谢的改变、氧化应激、肠道微生物群的变化和遗传因素都与 NAFLD 的发生发展有关^[6]。由于 NAFLD 和 T2DM 具有相似的病理生理过程，其中一个过程可能早于并促进另一个过程。患有 NAFLD 的人群患 T2DM 的风险更大^[7]；同时，T2DM 可导致 NAFLD 的发生发展^[4]。全球成年人 NAFLD 的发病率为 32.4%，而且，近年来呈现上升趋势^[8]。有研究表明 NAFLD 增加了其他疾病发生的风险，其中 NASH、肝硬化和肝细胞癌位居前列，而 NASH 特异性地使约 20% 的患者更易患肝硬化、肝细胞癌、心血管疾病和其他恶性肿瘤^[3-4]。因此，临床上应注意在 T2DM 患者中行 NAFLD 筛查，并明确是否合并 NASH 及肝纤维化，以便于及时干预，延缓或防止进展为肝纤维化、肝硬化和肝癌。

2 降糖药物对 NAFLD 的影响

NAFLD 和 T2DM 之间的作用机制十分复杂，目前尚不完全清晰，但 IR、糖脂代谢紊乱、炎症与氧化应激损伤、遗传因素等被认为是两者发生发展的重要危险因素，尤其是 IR 可能是两者的关键桥梁^[4, 8]。DPP-4 抑制剂、GLP-1 受体激动剂、SGLT-2 抑制剂等新型降糖药物具有改善 IR、糖脂代谢、肝脏脂肪堆积的作用，这可能是延缓

或防止 NAFLD 发生发展的病理生理机制^[9-10]。

2.1 二甲双胍

二甲双胍是治疗 T2DM 的一线药物，其药理机制是通过减少肝糖生成、抑制葡萄糖在肠道吸收，并增加外周组织对葡萄糖的摄取和利用而提高胰岛素的敏感性，改善 IR，从而调控血糖。一项真实世界队列研究分析 T2DM 患者并发 NAFLD 发病的相关性结果显示：二甲双胍治疗 3 年后，二甲双胍使用强度 < 10 限定日剂量 (defined daily dose, DDD) / 月、10 ~ 25 DDD / 月和 < 300 的 1 年累积限定日剂量 (cumulative defined daily dose, CDDD) 的患者发生 NAFLD 的比值比分别为 1.11 (95% CI = 1.06 ~ 1.16)、1.08 (95% CI = 1.02 ~ 1.13) 和 1.18 (95% CI = 1.11 ~ 1.26)。结论表明二甲双胍使用强度 < 10 DDD / 月、10 ~ 25 DDD / 月和 < 300 CDDD 的 T2DM 患者发生 NAFLD 的风险较高^[11]。此外，T2DM 患者二甲双胍使用强度 300 ~ 500 CDDD、> 500 CDDD 和 > 25 DDD / 月对 NAFLD 没有任何保护作用。也有综述表明二甲双胍对 NAFLD 引起的肝纤维化无明显改善作用^[6]。总而言之，根据目前这些数据不推荐二甲双胍用于单纯性 NAFLD 未合并 T2DM 患者的治疗。

2.2 DPP-4 抑制剂

胃肠道是调节糖代谢的重要器官，是外源性葡萄糖的吸收、多种调控血糖激素分泌和作用的主要场所。其分泌的 GLP-1 可通过葡萄糖浓度依赖的方式促进胰岛 B 细胞分泌胰岛素、抑制胰高血糖素分泌来降低血糖。虽然 GLP-1 在血糖的调控中有重要地位，但半衰期很短，可被 DPP-4 水解而丧失生物活性。DPP-4 抑制剂主要通过阻断机体 GLP-1 的分解、提高内源性 GLP-1 以达到降低血糖的作用^[12]。目前我国已上市 DPP-4 抑制剂有利格列汀、沙格列汀、西格列汀、维格列汀、阿格列汀。一项随机双盲前瞻性研究结果显示：替格列汀组 20 mg 治疗 12 周后单纯性 NAFLD 未合并 T2DM 患者的血清谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 基线值分别由 (57.8 ± 11.4) U · L⁻¹、(99.0 ± 34.1) U · L⁻¹ 降至 (45.4 ± 15.5) U · L⁻¹、(75.3 ± 33.0) U · L⁻¹ (P 均 < 0.05)，表明单独使用替格列汀 12 周可显著降低 NAFLD 患者的 ALT、AST 水平^[13]。NAFLD 的发生发展与肝脏中高表达的 DPP-4 密切相关，在肝纤维化小鼠模型中，吉格列汀可通过缓解线粒体功能障碍和氧化应激的产生来改善肝纤维化的进展^[14]。因此，DPP-4 抑制剂未来可能成为 NAFLD 合并 T2DM

的治疗用药,但目前还需更多的临床试验验证。

2.3 GLP-1 受体激动剂

GLP-1 受体激动剂是一种肠促胰素类药物,除了可以有效控制血糖,还具有保护心血管和肾脏、降低体质量指数 (body mass index, BMI) 和血压等作用,因此目前在治疗 T2DM 的领域应用越来越多。目前已上市的 GLP-1 受体激动剂有艾塞那肽、利拉鲁肽、阿必鲁肽、度拉糖肽、利司那肽、司美格鲁肽 (有口服片剂和注射剂两种)、替尔泊肽。近期一项动物实验研究显示利拉鲁肽作用 6 周后模型小鼠的空腹血糖、IR、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、三酰甘油 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、ALT 和体重有明显改善,可能是通过 AMPK/ACC 通路和抑制铁死亡调节小鼠 NAFLD 进展过程中的脂质代谢和糖代谢^[15]。一项前瞻性研究显示利拉鲁肽治疗 12 周后,MAFLD 合并 T2DM 患者的 BMI、TC、TG、糖化血红蛋白 (glycosylated hemoglobin, HbA1c)、胰岛素抵抗指数 (homeostatic model assessment of insulin resistance, HOMA-IR)、AST、ALT、 γ -谷氨酰转氨酶 (γ -glutamyl transferase, GGT)、游离脂肪酸 (free fatty acids, FFA) 水平明显降低 ($P < 0.05$),肝脏脂肪含量从 18.04 (11.08 ~ 27.65) 降低到 7.74 (6.42 ~ 13.49) ($P < 0.001$)^[16]。一项纳入 16 个临床随机试验的荟萃分析显示:试验组有 14 项研究的空腹血糖水平、15 项研究的 HbA1c 水平、13 项研究的 TG 水平、12 项研究的 TC 水平、10 项研究的 ALT 水平低于对照组,结果提示利拉鲁肽可改善或治愈伴有 T2DM 的 NAFLD^[17]。一项单臂研究显示:口服司美格鲁肽 24 周后,NAFLD 合并 T2DM 患者的 TG 水平逐渐下降,从基线的 175 (122 ~ 246) $\text{mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ 显著下降至 128 (113 ~ 200) $\text{mg} \cdot \text{dL}^{-1}$,肝纤维化指数 fibrosis-4 (FIB-4) 和 IV 型胶原的中位数水平分别从基线的 1.42 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 4.1 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 显著下降至 1.10 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 3.5 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,肝脏相关生化指标 (AST、ALT、GGT)、血糖和 HbA1c 均显著下降^[18]。多篇 Meta 分析也表明:GLP-1 受体激动剂可改善 T2DM 和 NAFLD 患者的炎症标志物、血脂血糖等代谢指标、内脏脂肪和 BMI,建议在排除禁忌证的情况下使用 GLP-1 受体激动剂治疗这些疾病^[19-21]。

2.4 SGLT-2 抑制剂

SGLT-2 抑制剂通过减少葡萄糖在近端肾小管的重吸收,促进尿糖排泄,从而降低血糖^[22]。目

前我国已上市的 SGLT-2 抑制剂有恩格列净、达格列净、卡格列净和艾格列净。近期日本一项单中心前瞻性研究 (纳入 25 例 T2DM 患者) 显示:鲁格列净治疗 24 周后,患者 TG、ALT、GGT、富含三酰甘油蛋白残粒、脂肪肝指数 (fatty liver index, FLI)、三酰甘油/高密度脂蛋白胆固醇比值显著降低,高密度脂蛋白胆固醇、载脂蛋白 A-1 水平显著升高^[23]。韩国一项倾向性评分匹配队列研究显示:1:1 匹配后,平均接受 299 d 药物治疗的 25 371 名 NAFLD 合并 T2DM 患者,在组间基线 FLI 相似的情况下,SGLT-2 抑制剂组 FLI 为 (44.4 ± 26.7),DPP-4 抑制剂组 FLI 为 (48.9 ± 27.3) ($P < 0.001$),SGLT-2 抑制剂组比 DPP-4 抑制剂组下降更显著^[24]。印度一项单中心前瞻性队列研究 (100 例患者) 表明:使用达格列净 (6 个月) 能明显改善患者转氨酶、血脂、血糖,降低 BMI,而且肝脏脂肪变性也有明显的缓解 ($P < 0.05$)^[25]。虽然肝瞬时弹性成像肝纤维化评分从 (6.95 ± 1.42) 显著降低到 (6 ± 1.44) kPa ($P < 0.001$),但纤维化 -4 指数 (fibrosis-4 index, FIB-4) 无明显改善 ($P = 0.29$)。但 Arai 等^[26]的一项倾向性评分匹配队列研究 (56 例 NAFLD 合并 T2DM 患者) 显示:SGLT-2 抑制剂组表现出受控衰减参数 (基线时为 312 $\text{dB} \cdot \text{m}^{-1}$,48 周时为 280 $\text{dB} \cdot \text{m}^{-1}$) 和肝脏硬度 (9.1 vs 6.7 kPa) ($P < 0.001$) 显著降低。与对照组相比,SGLT-2 抑制剂组的体重 ($P < 0.001$)、ALT ($P = 0.02$) 和 FIB-4 指数在第 48 周显著降低 (FIB-4 指数较基线下降 $\geq 10\%$, $P = 0.01$)。SGLT-2 抑制剂组 FIB-4 指数改善率为 56.8% (25/44),对照组 FIB-4 指数改善率为 20.5% (9/44)。结果表明 SGLT-2 抑制剂改善 NAFLD 的肝脏脂肪浸润和肝纤维化方面可能优于其他口服降糖药。另一项前瞻性随机对照试验也显示托格列净对肝脏脂肪变性和肝纤维化有改善:40 名符合纳排标准的患者被随机分配接受托格列净 ($n = 21$) 或吡格列酮 ($n = 19$)^[27]。通过磁共振质子密度脂肪分数 (magnetic resonance imaging proton density fat-fraction, MRI-PDFF) 评估治疗 24 周后肝脏脂肪变性的变化,两组结果均显著下降 [吡格列酮组: -7.54% ($P < 0.0001$); 托格列净组: -4.12% ($P = 0.0042$)]。结果表明托格列净治疗 24 周能改善肝脏脂肪变性、肝纤维化,并降低体重。马来西亚吉隆坡大学的一项研究也证实恩格列净可改善 T2DM 合并 NASH 患者的肝脂肪变性、气球样变、纤维化、GGT、空腹血糖、TC 等指

标,减轻体重,其中与安慰剂相比,恩格列净组改善肝脂肪变性(67% vs 26%, $P = 0.025$)、气球样变(78% vs 34%, $P = 0.024$)和纤维化(44% vs 6%, $P = 0.008$)的效果更显著(肝组织学诊断标准由经超声引导下经皮肝穿刺活检制作的病理标本判定)^[28]。该研究的肝组织学病变为病理诊断,结果具有可信度,但该试验样本量较小(9例)。Arase等^[29]的一项回顾性研究也表明:NAFLD合并T2DM患者接受SGLT-2抑制剂(达格列净或卡格列净)治疗24周后,质子磁共振波谱评估的肝脏脂肪质量显著降低(19.1% vs 9.2%, $P < 0.01$),皮下和内脏脂肪质量也显著降低,体脂/体重比下降,肝功能(AST、ALT、GGT)明显好转。一项双盲随机前瞻性试验显示:单独使用达格列净(12周)可显著降低非T2DM的NAFLD的患者ALT水平^[13]。Euh等^[30]的一项倾向性评分匹配队列研究也得出相似的结论:在二甲双胍治疗的NAFLD合并T2DM患者中,添加SGLT-2抑制剂与其他口服降糖药相比显著降低了体重和ALT水平。多篇Meta分析显示SGLT-2抑制剂可显著改善血糖状态、IR、肝脏脂肪含量和肝纤维化,可延缓肝纤维化进展,对NAFLD合并T2DM患者有积极作用^[31-33]。Meta分析研究了不同种类的SGLT-2抑制剂的作用效果,表明达格列净在改善血糖、HbA1c指标和胰岛素敏感性方面更明显,而卡格列净对改善糖尿病患者的肝功能更有效^[34]。也有系统性综述表明,SGLT-2对通过非侵入性方法测量的肝脂肪变性的改善有积极作用,但对肝纤维化的改善作用需进一步研究证实^[35]。造成这种差异的原因可能与随访时间及肝纤维化的评估手段相关。

2.5 PPAR 激动剂

PPAR属于配体激活的核转录因子,有PPAR α 、PPAR δ (或称 β)及PPAR γ 三种亚型。PPAR α 主要起调节血脂的作用;PPAR γ 激动剂也称为噻唑烷二酮类(thiazolidinediones, TZDs)药物,代表药物有吡格列酮和罗格列酮。吡格列酮和罗格列酮通过其噻唑烷二酮环识别靶点,改善机体对胰岛素的敏感性来治疗T2DM。TZDs通过刺激脂肪因子的释放,促进脂肪组织中TG的储存,抑制胰岛素对脂肪分解,从而改善外周胰岛素敏感性,降低血浆FFA和减少肝脏脂质沉积。但由于TZDs不良反应较多而未被广泛使用,例如,体重增加、水肿、骨折、导致膀胱癌和心力衰竭恶化等^[36]。一项多中心随机对照试验表明,在PPAR- α/γ 双重激动剂的干预下,肝脏

脂肪变性和纤维化的非侵入性检查结果均有所改善^[37]。另一项前瞻性随机对照试验也表明吡格列酮24周的干预可改善NAFLD合并T2DM患者的肝脏脂肪变性^[27]:通过MRI-PDFF评估治疗24周后肝脏脂肪变性的变化,吡格列酮组-7.54% ($P < 0.0001$),托格列净组-4.12% ($P = 0.0042$);吡格列酮组体重增加(1.39 ± 2.62) kg (1.7%, $P = 0.0002$)。有Meta分析显示吡格列酮对胰岛素敏感性和肝脏组织学表现有显著改善^[38]。也有动物实验证明TZDs干预可减轻大鼠肝星状细胞活化和纤维化。但有Meta分析表明吡格列酮对肝纤维化没有明显影响^[39]。因其目前数据存在相互矛盾和潜在的不良反应,还需更多可靠的研究来评估其有效性和安全性。

3 结语

NAFLD发病率呈现逐年上升趋势,且与肥胖、T2DM、MetS等代谢性疾病密切相关。NAFLD存在发病机制复杂、疾病异质性、治疗终点不明确等问题,目前我国尚未有被批准用于该病治疗的药物。DPP-4抑制剂可通过抑制GLP-1的分解从而促进胰岛素的分泌,还可改善肝转氨酶和肝纤维化的水平,可能是治疗NAFLD的潜在药物,但目前仍需要更多的大型临床随机对照试验及更可靠的循证学依据。GLP-1受体激动剂是新型降糖药物,目前十分热门,除了能有效改善血糖、IR、糖脂代谢、肝脏脂肪和肝纤维化的作用,其减轻体重的效果也十分显著。美国食品药品监督管理局已认定司美格鲁肽用于NASH的治疗的突破性进展,我国也启动了其治疗NASH的Ⅲ期临床试验(CTR20211818)。GLP-1受体激动剂可能是治疗NAFLD的关键药物,具有美好的前景,但仍需要更多的临床试验验证。同样地,研究表明SGLT-2抑制剂可改善NAFLD患者的肝脏脂肪和纤维化,延缓NAFLD的发生发展^[25-29]。相信在不久的将来降糖西药对于NAFLD的治疗会有突破性的进展。

参考文献

- [1] Khaznadar F, Petrovic A, Khaznadar O, et al. Biomarkers for assessing non-alcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus on sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor therapy [J]. *J Clin Med*, 2023, 12 (20): 6561.
- [2] 薛茵, 范建高. 代谢相关脂肪性肝病新定义的国际专家共识简介 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2020, 36 (6): 1224-1227.
- [3] 王雨涵, 高影. 非酒精性脂肪性肝病并发2型糖尿病

- 诊断和治疗的研究进展[J]. 吉林大学学报(医学版), 2020, 46(6): 1324-1331.
- [4] Sipowicz K, Kosmalski M. Type 2 diabetes mellitus, non-alcoholic fatty liver disease, and metabolic repercussions: the vicious cycle and its interplay with inflammation [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(11): 9677.
- [5] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组, 中国医师协会脂肪性肝病专家委员会. 非酒精性脂肪性肝病防治指南(2018年更新版)[J]. *中华肝胆病杂志*, 2018, 26(3): 195-203.
- [6] Targher G, Corey KE, Byrne CD, et al. The complex link between NAFLD and type 2 diabetes mellitus-mechanisms and treatments [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(9): 599-612.
- [7] 田长林, 李玉琴, 刘洪涛. 新型降糖药治疗非酒精性脂肪性肝病研究进展[J]. *药学与临床研究*, 2022, 30(4): 352-358.
- [8] Kosmalski M, Śliwińska A, Drzewoski J. Non-alcoholic fatty liver disease or type 2 diabetes mellitus-the chicken or the egg dilemma [J]. *Biomedicines*, 2023, 11(4): 1097.
- [9] Kosmalski M, Ziolkowska S, Czarny P, et al. The coexistence of nonalcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus [J]. *J Clin Med*, 2022, 11(5): 1375.
- [10] Diaconu CT, Guja C. Non-alcoholic fatty liver disease and its complex relation with type 2 diabetes mellitus-from prevalence to diagnostic approach and treatment strategies [J]. *J Clin Med*, 2022, 11(17): 5144.
- [11] Huang KH, Lee CH, Cheng YD, et al. Correlation between long-term use of metformin and incidence of NAFLD among patients with type 2 diabetes mellitus: a real-world cohort study [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 1027484.
- [12] Cazac GD, Lăcătușu CM, Ștefănescu G, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists in patients with type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic fatty liver disease-current background, hopes, and perspectives [J]. *Metabolites*, 2023, 13(5): 581.
- [13] Tobita H, Yazaki T, Kataoka M, et al. Comparison of dapagliflozin and teneligliptin in nonalcoholic fatty liver disease patients without type 2 diabetes mellitus: a prospective randomized study [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2021, 68(2): 173-180.
- [14] Bae JC. DPP-4 inhibitor in type 2 diabetes mellitus patient with non-alcoholic fatty liver disease: achieving two goals at once? [J]. *Endocrinol Metab (Seoul)*, 2022, 37(6): 858-860.
- [15] Guo TL, Yan WH, Cui X, et al. Liraglutide attenuates type 2 diabetes mellitus-associated non-alcoholic fatty liver disease by activating AMPK/ACC signaling and inhibiting ferroptosis [J]. *Mol Med*, 2023, 29(1): 132.
- [16] Zhang L, Wu XJ, Li XY, et al. Longitudinal changes in serum adropin levels and liver fat content during liraglutide treatment in newly diagnosed patients with type 2 diabetes mellitus and metabolic dysfunction-associated fatty liver disease [J]. *Acta Diabetol*, 2023, 60(7): 971-979.
- [17] Zhao Y, Zhao WL, Bu HE, et al. Liraglutide on type 2 diabetes mellitus with nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis of 16 RCTs [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2023, 102(6): e32892.
- [18] Arai T, Atsukawa M, Tsubota A, et al. Efficacy and safety of oral semaglutide in patients with non-alcoholic fatty liver disease complicated by type 2 diabetes mellitus: a pilot study [J]. *JGH Open*, 2022, 6(7): 503-511.
- [19] Yuan X, Gao Z, Yang CX, et al. Comparing the effectiveness of long-term use of daily and weekly glucagon-like peptide-1 receptor agonists treatments in patients with non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus: a network meta-analysis [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, 14: 1170881.
- [20] Song TT, Jia YJ, Li ZL, et al. Effects of liraglutide on nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis [J]. *Diabetes Ther*, 2021, 12(6): 1735-1749.
- [21] Zhu Y, Xu J, Zhang D, et al. Efficacy and safety of GLP-1 receptor agonists in patients with type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12: 769069.
- [22] 洪庆霞, 梅文柳, 刘文雅, 等. 钠-葡萄糖协同转运蛋白功能与作用研究进展[J]. *中南药学*, 2021, 19(9): 1757-1765.
- [23] Hajika Y, Kawaguchi Y, Hamazaki K, et al. Beneficial effects of luseogliflozin on lipid profile and liver function in patients with type 2 diabetes mellitus (BLUE trial): a single-center, single-arm, open-label prospective study [J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2023, 15(1): 97.
- [24] Kim J, Han K, Kim B, et al. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors for non-alcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus: a nationwide propensity-score matched cohort study [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2022, 194: 110187.
- [25] Das C, Tripathy D, Swain S, et al. Effect of dapagliflozin on type 2 diabetes mellitus with nonalcoholic fatty liver disease: a single-center survey [J]. *Cureus*, 2021, 13(5): e14974.
- [26] Arai T, Atsukawa M, Tsubota A, et al. Effect of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor in patients with non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus: a propensity score-matched analysis of real-world data [J]. *Ther Adv Endocrinol Metab*, 2021, 12: 20420188211000243.
- [27] Yoneda M, Honda Y, Ogawa Y, et al. Comparing the effects of tofogliflozin and pioglitazone in non-alcoholic fatty liver disease patients with type 2 diabetes mellitus (topind study): a randomized prospective open-label controlled trial [J]. *BMJ Open Diabetes Res Care*, 2021, 9(1):

- e001990.
- [28] Lai LL, Vethakkan SR, Nik Mustapha NR, et al. Empagliflozin for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Dig Dis Sci*, 2020, 65 (2): 623-631.
- [29] Arase Y, Shiraishi K, Anzai K, et al. Effect of sodium glucose co-transporter 2 inhibitors on liver fat mass and body composition in patients with nonalcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus [J]. *Clin Drug Investig*, 2019, 39 (7): 631-641.
- [30] Euh W, Lim S, Kim JW. Sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors ameliorate liver enzyme abnormalities in Korean patients with type 2 diabetes mellitus and nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12: 613389.
- [31] Jin ZJ, Yuan Y, Zheng C, et al. Effects of sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors on liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease patients with type 2 diabetes mellitus: an updated meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *J Diabetes Complications*, 2023, 37 (8): 108558.
- [32] Song TT, Chen SC, Zhao H, et al. Meta-analysis of the effect of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors on hepatic fibrosis in patients with type 2 diabetes mellitus complicated with non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Hepatol Res*, 2021, 51 (6): 641-651.
- [33] Raj H, Durgiah H, Palui R, et al. SGLT-2 inhibitors in non-alcoholic fatty liver disease patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review [J]. *World J Diabetes*, 2019, 10 (2): 114-132.
- [34] Lee KW, Devaraj NK, Ching SM, et al. Effect of SGLT-2 inhibitors on non-alcoholic fatty liver disease among patients with type 2 diabetes mellitus: systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis of randomized clinical trials [J]. *Oman Med J*, 2021, 36 (3): e273.
- [35] Dwinata M, Putera DD, Hasan I, et al. SGLT2 inhibitors for improving hepatic fibrosis and steatosis in non-alcoholic fatty liver disease complicated with type 2 diabetes mellitus: a systematic review [J]. *Clin Exp Hepatol*, 2020, 6 (4): 339-346.
- [36] Ferguson D, Finck BN. Emerging therapeutic approaches for the treatment of NAFLD and type 2 diabetes mellitus [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2021, 17 (8): 484-495.
- [37] Grobbee EJ, de Jong VD, Schrieks IC, et al. Improvement of non-invasive tests of liver steatosis and fibrosis as indicators for non-alcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes mellitus patients with elevated cardiovascular risk profile using the PPAR- α/γ agonist aleglitazar [J]. *PLoS One*, 2022, 17 (11): e0277706.
- [38] Lian JX, Fu JF. Pioglitazone for NAFLD patients with prediabetes or type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12: 615409.
- [39] Said A, Akhter A. Meta-analysis of randomized controlled trials of pharmacologic agents in non-alcoholic teatohepatitis [J]. *Ann Hepatol*, 2017, 16 (4): 538-547.

(收稿日期: 2023-12-26; 修回日期: 2024-03-08)

天麻素药理作用及临床应用研究进展

刘潇聪¹, 张玉苗¹, 潘亚磊^{1, 2*} (1. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西中药资源产业化省部共建协同创新中心, 秦药特色资源研究开发国家重点实验室(培育), 陕西省创新药物研究中心, 陕西 咸阳 712083)

摘要: 天麻素最早分离自植物天麻的根茎, 现临床主要用于治疗中枢系统相关疾病。现代药理学研究表明天麻素具有保护神经细胞及其功能、调节血管、抗炎、抗肿瘤和调节骨代谢等多种作用。临床研究证实, 天麻素用于治疗精神失常、癫痫、偏头痛、脑梗死、眩晕等疾病疗效明显, 且具有多靶点、多途径的特点。本文对近年来天麻素的药理作用和临床应用方面的研究进行综述, 以期开发新型天麻素相关治疗药物提供参考。

关键词: 天麻素; 药理作用; 临床应用; 研究进展

中图分类号: R285, R283 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)06-1615-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.033

Advances in pharmacological action and clinical application of gastrodin

LIU Xiao-cong¹, ZHANG Yu-miao¹, PAN Ya-lei^{1, 2*} (1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xiayang Shaanxi 712046; 2. Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine Resources Industrialization by Shaanxi Province & Education Ministry, Key Laboratory of Research & Development of Characteristic Qin Medicine Resources (Cultivation), Shaanxi Innovative Drug Research Center, Xiayang Shaanxi 712083)

Abstract: Gastrodin was first isolated from the rhizome of *Gastrodia elata* Bl, while currently it is used in clinical practice for central nervous system-related diseases. Modern pharmacological studies have shown that gastrodin has many effects, such as protecting the nerve cells and their function, regulating blood vessels, anti-inflammation, and anti-tumor effect, and regulating bone metabolism. Clinical studies have proved that gastrodin is effective for mental disorders, epilepsy, migraine, cerebral infarction, vertigo and other diseases. Gastrodin has the characteristics of multi-target and multi-pathway. This article reviewed the pharmacological effects and clinical applications of gastrodin in recent years to provide reference for the development of gastrodin related therapeutic drugs.

Key words: gastrodin; pharmacological action; clinical application; research progress

天麻为兰科植物天麻的根茎, 其功效为息风止痉、平抑肝阳、祛风通络。天麻素(4-羟苯醇-4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷)是一种最早分离自天麻的酚类糖苷化合物, 是天麻的主要活性成分, 现以人工合成为主。已被开发为天麻素片和天麻素注射液等药物, 其功效与天麻类似, 临床主要用于治疗中枢系统相关疾病。现代药理学研究表明天麻素对中枢、血管、免疫、代谢等多种系统的相关细胞具有调控作用。临床主要应用于精神失常、癫痫、偏头痛、脑梗死、眩晕等中枢系统疾病。

本文对近年来天麻素的药理作用和临床应用相关研究进行综述, 以期后续开发提供参考。

1 天麻素的药理作用

1.1 中枢系统保护作用

已报道的天麻素的中枢系统保护作用及其机制见表1。细胞水平研究表明, 天麻素可对BV-2小胶质细胞、PC12细胞及神经细胞等具有保护作用, 可提高细胞活性或减少细胞凋亡^[1-6]。动物实验结果也发现, 天麻素具有抗癫痫、改善记忆、改善运动障碍、减轻脑缺血再灌注损伤、镇静、

基金项目: 陕西省教育厅协同创新项目(No.22JY021)。

作者简介: 刘潇聪, 男, 硕士研究生, 主要从事中医骨伤科学研究, email: 1014757072@qq.com *通信作者: 潘亚磊, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药防治代谢性疾病及抗炎免疫药理研究, email: panyalei588@163.com

催眠及抗惊厥等药理作用^[7-15]。网络药理学研究显示天麻素治疗阿尔茨海默病具有多靶点、多途径的特点^[16]。天麻素中枢系统保护作用为其治疗中枢性疾病奠定了基础。

表 1 天麻素发挥中枢系统保护作用

Tab 1 Protective effect of gastrodin on the central nervous system

研究对象	造模方法	作用	机制	参考文献
BV-2 小胶质细胞	D-半乳糖诱导	减轻细胞衰老	提高 SIRT3 蛋白表达, 降低炎症反应	[1]
BV-2 和 PC12 细胞	缺氧/复氧条件诱导	提高细胞存活率	调控 MAPK 信号通路, 降低凋亡蛋白 Bax 和 Caspase-3 表达	[2-3]
神经细胞	谷氨酸诱导	减少细胞氧化损伤	提高谷胱甘肽过氧化物酶和超氧化物歧化酶的活性, 降低丙二醛含量	[4]
神经细胞元	甲基苯丙胺诱导	减少神经细胞凋亡	通过 Akt/mTOR 信号通路调节细胞自噬	[5-6]
C57BL/6 小鼠	戊四氮诱导	抗大鼠癫痫样作用	降低脑内兴奋性氨基酸(谷氨酸)水平, 提高抑制性氨基酸(γ -氨基丁酸)水平	[7]
C57BL/6 小鼠	$A\beta$ (1-42) 诱导	保护神经, 改善记忆	保护小鼠海马神经免受 $A\beta$ 损伤, 促进海马神经齿状回区性别决定区 Y 框蛋白 2 (SOX-2) 和双皮质素阳性细胞数量增加	[8]
SD 大鼠	颈内动脉再灌注诱导	减轻大鼠氧化应激程度	上调核因子红系 2 相关因子 2、血红素加氧酶-1、磷酸化 Akt 和 Bcl-2 的表达, 抑制 Tau 蛋白过度磷酸化, 下调 Bcl-2 相关 X 蛋白和 cleaved Caspase-3 的表达	[9]
SD 大鼠	鱼藤酮诱导	改善帕金森病大鼠运动障碍症状	降低肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6 水平, 减轻帕金森大鼠脑组织 TLR4、NF- κ B p65、p38MAPK 细胞凋亡蛋白表达	[10]
C57BL/6 小鼠	腹腔注射 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶(MPTP) 诱导	减少脑细胞的氧化损伤	调控 Toll 样受体 4-核转录因子 κ B 信号通路, 降低大鼠脑组织炎症因子, 修复多巴胺能神经元免受神经毒性, 减少纹状体内 α -突触核蛋白沉积, 增加纹状体中多巴胺含量, 超氧化物歧化酶的活性, 降低丙二醛含量	[11]
SD 大鼠	阻断颈外动脉及其分支	缓解中风、脑梗死症状	降低脑卒中急性期血清中 C 反应蛋白和 IL-1 β 表达水平, 上调缺血半球 Bcl-2、VEGF 的表达, 下调 BAX 的表达以及抑制 Caspase-3 的表达水平	[12]
SD 大鼠	脑缺血再灌注	抑制炎症反应	下调 IL-1 β 、NF- κ B、TNF- α 、p38 MAPK、PI3K 和 p-Akt 蛋白表达水平, 调节 MAPK 信号通路	[13]
SD 大鼠	脑缺血再灌注	减轻脑细胞死亡	抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路与水通道蛋白 4 表达	[14]
KM 小鼠	氯苯丙氨酸(PCPA) 诱导	镇静、催眠及抗惊厥	调节小鼠脑内 Bcl-2 基因、IL-1 β 及 IL-6 蛋白表达以及 p-ERK/ERK 比值	[15]

1.2 调节血管作用

天麻素具有促进血管新生及保护血管内皮功能。天麻素可缓解缺氧条件下大鼠脑微血管内皮细胞损伤, 提高内皮细胞增殖、侵袭、迁移以及小管形成速率, 促进血管新生, 其作用机制为调控 VEGF/Akt/MAPK 信号通路^[17]。此外, 天麻素亦可通过增强血管内皮细胞自噬, 抑制细胞凋亡, 提高血管内皮生长因子的表达, 促进血管生成^[18]。天麻素还可抑制高糖或同型半胱氨酸对血管内皮细胞的损伤, 维持血管内皮细胞功能, 其作用机制可能是通过上调 PPAR β , 减少氧化应激实现的^[19-20]。天麻素调节血管可恢复局部缺血脑组织的血液供应, 有益于神经功能的恢复及脑功能重塑, 对脑缺血损伤及眩晕等疾病的治疗有重要意义。

1.3 抗炎作用

天麻素不仅在中枢系统抑制炎症反应发挥中枢保护作用, 还在多种器官中具有抗炎作用, 缓解相关病症。褚亚慧^[21]发现天麻素对腺嘌呤和乙

胺丁醇诱导的大鼠尿酸性肾病改善作用显著, 其机制为降低肾脏组织中 TNF- α 和 IL-1 β 水平, 抑制炎症反应。脑缺血可使大鼠心肌组织和肺部出现炎症性损伤, 天麻素可激活神经生长因子/酪氨酸激酶受体通路, 降低 TNF- α 等炎症因子, 进而减轻脑缺血大鼠的心、肺损伤^[22-23]。天麻素在病毒性感染导致的炎症损伤中也具有良好的作用, 可减轻呼吸道合胞病毒感染肺炎大鼠的肺组织炎症损伤并维持 Th17/Treg 细胞平衡等, 其作用机制为抑制 Notch/NF- κ B 信号通路^[24]。此外, I 型干扰素在抗病毒免疫反应中也起着关键作用, 促进 I 型干扰素产生是对抗病毒感染的有效途径, Zhou 等^[25]研究发现天麻素能促进巨噬细胞产生 I 型干扰素进而抑制水疱性口炎病毒和 I 型单纯疱疹病毒感染, 这可能是天麻素抗病毒性炎症的一种机制。

1.4 抗肿瘤作用

细胞水平研究显示, 天麻素可以抑制脑胶质瘤细胞^[26]、肝癌 HepG2 细胞^[27] 和胃癌细胞^[28]

等多种肿瘤细胞的增殖。此外，天麻素还可以增强化疗药物长春新碱的抗肿瘤效果，并缓解长春新碱产生的神经病理性疼痛的不良反^[29]。天麻素抗肿瘤的机制为：抑制 Notch 信号通路的活化，调节 Th1/Th2 平衡，增强机体免疫功能^[29]；激活 NF-κB 信号通路，调控 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞介导的免疫功能^[30]；激活 cAMP/PKA/GRK2 通路，抑制肿瘤细胞增殖，并诱导其凋亡^[26]。

1.5 调节骨代谢作用

人的一生中骨都在进行着新陈代谢，当骨吸收速率长期高于骨形成速率时会发展为骨质疏松症。骨代谢过程包括三个阶段：破骨细胞的形成和骨吸收；骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化；成骨细胞形成新骨基质。体外研究表明，天麻素通过调控骨代谢相关细胞防治骨质疏松症：下调 NFATc1 信号通路，抑制破骨细胞成熟^[31]；

减少活性氧自由基损伤，促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化，抑制其向脂肪细胞分化^[32]；调控 NRF2 信号通路，减少糖皮质激素诱导的成骨细胞凋亡及线粒体损伤，并促进成骨细胞的骨形成作用^[33]。动物实验研究结果显示，天麻素可显著减缓去卵巢、糖皮质激素或糖尿病诱发的骨质疏松症，降低血清骨吸收标志物水平，保护骨小梁的微观结构，提高骨密度，增强骨生物力学性能^[34-35]。

2 天麻素的临床应用

天麻素临床应用剂型有片剂、胶囊和注射液，主要用于精神失常、偏头痛、癫痫、脑梗死和眩晕等疾病。新近研究表明，天麻素联合相关中药或西药治疗中枢神经系统疾病，疗效显著提升，天麻素联合用药及作用见表 2。

表 2 天麻素联合用药治疗中枢神经系统疾病

Tab 2 Gastrodin in combination with other medications for the central nervous system diseases

临床应用	联合用药	作用	参考文献
精神失常	樟柳碱	改善神经功能和认知功能，减少神经损伤	[36]
	阿普唑仑	有效改善神经衰弱，缓解患者焦虑、抑郁情绪，改善和延长睡眠时间，降低患者不良反应发生率	[37]
	舍曲林	调节快速眼动睡眠潜伏期，减少夜间睡醒次数，治疗焦虑睡眠障碍，缓解焦虑情绪	[38]
	舒肝解郁胶囊	改善精神分裂症患者的临床症状，修复神经元损伤，提高认知功能、记忆功能和依从性	[39]
癫痫	氟西汀	治疗卒中后抑郁症的效果明显，降低患者抑郁评分	[40]
	卡马西平	治疗癫痫疗效显著，减轻氧化应激和炎症状态，有效保护神经元，安全性高	[41]
	叶酸、维生素 B ₁₂	有效控制脑卒中后癫痫发作	[42]
	左乙拉西坦	显著降低癫痫发生率	[43]
偏头痛	奥卡西平	共同改善脑组织缺血现象，修复神经组织，降低脑损伤，改善脑细胞功能，减轻炎症反	[44]
	氟桂利嗪	有效缓解疼痛感，降低偏头痛发作持续时间，减少发病次数，提高患者生活质量	[45]
	卡马西平	显著缓解原发性三叉神经痛，提高睡眠质量，减轻炎症反应	[46]
	尼莫地平	显著降低头痛发作频率，缩短头痛持续时间，减轻头痛程度，提高患者生活质量	[47]
脑梗死	阿司匹林、氯吡格雷	改善患者认知及运动功能	[48]
	排风饮加味	降低脑卒中评分，提高昏迷评分，改善日常生活能力	[49]
	阿托伐他汀钙片	改善患者神经功能，降低脑卒中评分，提高昏迷评分	[50]
	血栓通	治疗急性脑梗死	[51]
	丹参注射液	治疗高血压脑出血，提高昏迷评分，降低血肿残余量	[52]
	丁苯酞	改善脑梗死后神经功能和日常生活活动能力	[53]
眩晕症	倍他司汀	改善患者眩晕症状，提高日常生活能力及生活质量，不增加药物不良反应	[54-55]
	柴陈泽泻汤	有效缓解眩晕症状，减轻头晕目眩、视物旋转、耳鸣、恶心呕吐、心悸失眠、纳差等中医证候，安全性高	[56]
	异丙嗪	改善急诊眩晕症	[57]
	氟桂利嗪	改善眩晕症	[58]

2.1 抗精神失常及机制

精神失常是由多种病理因素导致的精神活动障碍的一大类疾病，包括精神分裂症、抑郁症、焦虑症和睡眠障碍等。天麻素注射液可改善精神分裂症患者的认知功能、记忆功能和依从性评分，修复神经元损伤，对患者阳性症状和阴性症状均有改善^[39]。天麻素联合樟柳碱、阿普唑仑、舍曲

林、舒肝解郁胶囊或氟西汀等抗精神失常药物，可显效提高临床疗效，降低不良反应^[36-40]。天麻素治疗精神失常类疾病可能机制主要有：①降低神经损伤标志物中枢神经特异蛋白(S100β)和神经元特异性烯醇化酶的水平^[36]；②提高神经调节蛋白 1 和脑源性神经营养因子水平^[36, 39]；③下调 JAK2-STAT3 信号通路，降低海马体、额叶皮质和

血清中 IL-1 β 、IL-6 等炎症因子表达^[59-60]。

2.2 治疗癫痫及机制

癫痫在临床的症状主要包括惊厥、痉挛、失神、抽搐、视觉以及感觉障碍、头痛等。天麻素注射液联合卡马西平、左乙拉西坦、奥卡西平、叶酸和维生素 B₁₂ 等药物治疗癫痫的临床疗效显著增加,能够减轻患者肌肉强直痉挛、意识障碍等癫痫症状^[41-44]。天麻素治疗癫痫的可能机制包括:①天麻素可以通过提高脑源性神经营养因子、血清同型半胱氨酸水平,激活星形胶质细胞 Nrf2/ARE 通路,减轻海马血管内皮细胞、星形胶质细胞和神经元的损伤,保护脑组织^[41-42];②通过抑制 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-8 等炎症因子水平,而影响神经的电生理活动,明显抑制神经元异常放电的产生、传导以及扩散,进而抑制癫痫的发生发展^[43-44];③降低血清超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、髓过氧化物酶、谷胱甘肽过氧化物酶水平,提高丙二醛水平,减轻氧化应激^[41]。

2.3 治疗偏头痛及机制

偏头痛是最常见的头痛类型,临床上以发作性的中重度、搏动样头痛为主要表现。天麻素可治疗偏头痛,研究发现通过运用天麻素联合氟桂利嗪、卡马西平或尼莫地平等药物,可以显著降低患者在发生偏头痛时的疼痛感,并显著减少患者发生偏头痛的次数^[45-47]。天麻素治疗偏头痛的可能机制为:①通过降低 5-羟色胺、炎症因子 TNF- α 和神经生长因子的高表达水平,降低大脑前动脉和中动脉的平均血流速度^[45-47];②通过抑制降钙素基因相关肽与腺苷 A1 受体表达,减少偏头痛的发生^[61];③抑制酸敏感离子通道,阻断背根神经节神经元疼痛传导^[62]。

2.4 治疗脑梗死及机制

脑梗死在临床上的发病率逐渐升高,并且呈现低龄化趋势,其临床症状主要包括主观症状、脑神经症状以及躯干症状。主观症状主要表现为头晕、恶心、呕吐等;脑神经症状则主要包括面瘫、舌瘫以及假性延髓性麻痹等(如饮水、吞咽困难);躯干症状则主要包括肢体偏瘫、半身不遂、肢体的感觉减退、肢体无力甚至是大小便失禁等。天麻素注射液在治疗脑出血、脑梗死、脑血肿等方面具有一定的疗效,联合阿司匹林和氯吡格雷、阿托伐他汀钙片、排风饮加味、丹参注射液、血栓通或丁苯酞等药物,可提高疗效,改善患者认知功能和自主活动状态,促进患者恢复自理能力^[48-53]。天麻素治疗脑梗死的可能机制包括:

①降低血浆黏度、红细胞比容和红细胞聚集指数,调节机体血流变学指标^[48];②抑制血清内皮素-1 和降钙素原表达,改善患者神经功能^[50];③调控肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体和骨保护素表达,抑制 TNF- α 和 IL-8 等炎症因子的产生^[53]。

2.5 治疗眩晕症及机制

眩晕症是由脑部神经病变、颈椎病、贫血等多种疾病诱发的一种主观感觉障碍,临床表现为患者感到自身或周围环境的旋转或摇动,同时可伴有恶心、呕吐、耳鸣、闭目难立等症状。天麻素注射液治疗眩晕症疗效确切,可显著减轻患者的眩晕和耳鸣等症状。研究显示,天麻素联合柴陈泽泻汤、异丙嗪、氟桂利嗪或倍他司汀等中西药均可显著提高治疗眩晕的临床效果,提高生活质量^[54-58]。眩晕症发病原因复杂,临床以椎-基底动脉供血不足导致前庭神经、脑干及小脑病变最为常见。天麻素治疗眩晕的可能机制为:①降低血浆黏度、红细胞比容和纤维蛋白原浓度,改善血液流变学,提高患者基底动脉血流速度^[54-55, 57];②降低低密度脂蛋白胆固醇、三酰甘油、总胆固醇水平,调节血脂状态^[54];③提高血管扩张因子一氧化氮水平,降低血管收缩因子内皮素-1 含量,保护血管内皮功能,改善椎基底动脉迂曲程度,缩短椎基底动脉管径和长度,改善血管顺应性,提高脑组织供氧^[55, 58];④通过镇静发挥抗眩晕的作用^[16]。

3 结语与展望

综上,天麻素具有保护神经细胞及其功能、调节血管、抗炎、抗肿瘤和调节骨代谢等多种药理作用,为其临床应用奠定了药理学基础。天麻素在临床上用于治疗精神失常、癫痫、偏头痛、脑梗死和眩晕等疾病,疗效显著。近年来,天麻素联合用药逐渐成为研究热点,研究结果显示:天麻素联合相关药物治疗中枢系统疾病疗效显著提升,展现出协同增效的特点,同时降低了不良反应发生率;天麻素联合同一药物可具有多种作用,如联合卡马西平可治疗癫痫及偏头痛,联合氟桂利嗪可治疗偏头痛及眩晕症,体现了天麻素多用途的特点。天麻素临床应用的机制具有多方面,降低炎症因子的水平为治疗各种疾病的共同机制,同时治疗每种疾病还有其特点的途径或靶点,体现了天麻素多靶点的特点。

目前,虽然有关天麻素在药理作用和临床应用的研究较多,但笔者认为仍然需要开展以下几个方面的研究:

第一,天麻素的临床应用主要为治疗中枢系统

疾病,但其药理作用还包括抗炎、抗肿瘤和调节骨代谢等,基于此可继续开展天麻素在治疗癌症和骨质疏松症、关节炎等疾病的临床研究。第二,发挥天麻素多靶点、多治疗途径的优势,联合用药治疗相关疾病。如临床上单独使用天麻素无明显的降压效果,但与其他降压药物合用后具有协同降压,在改善高血压患者临床症状、降低血压波动及缓解西药不良反应等方面的效果更显著^[63]。第三,天麻素存在脂溶性差、活性不高并且容易被代谢等缺点,因此有研究者制备了其衍生物,动物实验研究表明天麻素衍生物在改善记忆功能、预防阿尔茨海默病等方面具有明显效果^[64-65],今后可继续合成新型天麻素衍生物,并评价其安全性和有效性,开发出临床疗效更加显著的新药。

参考文献

- [1] 管桐,高丽莎,隋得志,等.天麻素调控 SIRT3 改善 BV2 细胞衰老和炎症的作用[J].食品工业科技,2022,43(19):410-418.
- [2] Lv Y, Cao H, Chu LZ, et al. Effects of gastrodin on BV2 cells under oxygen-glucose deprivation and its mechanism[J]. Gene, 2021, 766: 145152.
- [3] 冯梦晗,刘洁,刘力榕,等.电化学模拟制备天麻素体内氧化代谢产物及其神经保护作用研究[J].中草药,2023,54(2):569-578.
- [4] 齐宇,李红侠,马骋晨,等.香豆素衍生物联合天麻素在抑制谷氨酸诱导神经细胞损伤中的作用[J].辽东学院学报(自然科学版),2022,29(1):23-28.
- [5] Ma CL, Li L, Yang GM, et al. Neuroprotective effect of gastrodin in methamphetamine-induced apoptosis through regulating cAMP/PKA/CREB pathway in cortical neuron[J]. Hum Exp Toxicol, 2020, 39(8): 1118-1129.
- [6] Yang GM, Zeng XF, Li J, et al. Protective effect of gastrodin against methamphetamine-induced autophagy in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells via the AKT/mTOR signaling pathway[J]. Neurosci Lett, 2019, 707: 134287.
- [7] Chen LM, Liu XN, Wang H, et al. Gastrodin attenuates pentylenetetrazole-induced seizures by modulating the mitogen-activated protein kinase-associated inflammatory responses in mice[J]. Neurosci bull, 2017, 33(3): 264-272.
- [8] Li M, Qian SM. Gastrodin protects neural progenitor cells against amyloid β (1-42)-induced neurotoxicity and improves hippocampal neurogenesis in amyloid β (1-42)-injected mice[J]. J Mol Neurosci, 2016, 60(1): 21-32.
- [9] Wang XZ, Li SY, Ma JB, et al. Effect of gastrodin on early brain injury and neurological outcome after subarachnoid hemorrhage in rats[J]. Neurosci Bull, 2019, 35(3): 461-470.
- [10] 李阳,邵宇.天麻素经 TLR4-NF- κ B 信号通路对帕金森大鼠的干预作用[J].河北医药,2022,44(17):2591-2594.
- [11] 周红平,张三妮,曹栋,等.天麻素对帕金森病小鼠多巴胺能神经元的保护作用[J].现代药物与临床,2020,35(6):1069-1075.
- [12] Wang SQ, Nan YN, Zhu WH, et al. Gastrodin improves the neurological score in MCAO rats by inhibiting inflammation and apoptosis, promoting revascularization[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2018, 11(11): 5343-5350.
- [13] 崔海彬,张倩.天麻素对脑缺血再灌注大鼠大脑皮质的影响及可能机制[J].解剖科学进展,2021,27(3):277-279,283.
- [14] 谢明,朱俊德,邱家媛,等.天麻素对脑缺血再灌注损伤大鼠神经修复及水通道蛋白 4 的影响[J].神经解剖学杂志,2022,38(1):65-73.
- [15] 龙盼,胡晓霞,胡琦兰,等.天麻素对氯苯丙氨酸(PCPA)致失眠小鼠的镇静催眠作用研究[J].中药药理与临床,2021,37(5):33-38.
- [16] 张科.基于网络药理学方法探究天麻素抗阿尔兹海默症的作用机制[J].云南中医中药杂志,2022,43(9):39-46.
- [17] 祝娜.基于血管新生的天麻素与薯蓣皂苷元配伍抗大鼠脑微血管内皮细胞缺氧损伤作用研究[D].北京:中央民族大学,2022.
- [18] Chen HY, Chen BX, Li BL, et al. Gastrodin promotes the survival of random-pattern skin flaps via autophagy flux stimulation[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 6611668.
- [19] 阳创.PPAR β -硝化应激在天麻素保护高糖损伤血管内皮细胞的作用研究[D].重庆:重庆医科大学,2022.
- [20] Chen JY, Huang YL, Hu XC, et al. Gastrodin prevents homocysteine-induced human umbilical vein endothelial cells injury via PI3K/Akt/eNOS and Nrf2/ARE pathway[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(1): 345-357.
- [21] 褚亚慧.天麻素对动物高尿酸血症和尿酸性肾病的改善作用和机制研究[D].北京:北京协和医学院,2022.
- [22] 产翠翠,范心雨,龚鑫.天麻素对脑缺血致心肌损伤及 NGF/TrkA 表达的影响[J].右江民族医学院学报,2022,44(3):341-345.
- [23] 产翠翠,马同军,王继胜,等.天麻素注射液通过 NGF/TrkA 通路减轻大鼠脑缺血所致肺损伤[J].南方医科大学学报,2022,42(1):116-122.
- [24] 冷晓雪,李柏新,陈之光.天麻素抑制 Notch/NF- κ B 信号通路对呼吸道合胞病毒感染大鼠的肺组织损伤及 Th17/Treg 细胞平衡的影响[J].中国病原生物学杂志,2023,18(1):6-11.
- [25] Zhou YL, Li MY, Lv TY, et al. Gastrodin inhibits virus infection by promoting the production of type I interferon[J]. Front Pharmacol, 2021, 11: 608707.
- [26] 滑祥廷,洪文明,张超,等.天麻素调节 cAMP/PKA/GRK2 信号通路对脑胶质瘤细胞增殖、凋亡的影响[J].华中科技大学学报(医学版),2022,51(5):607-611.
- [27] 张恒.天麻素对人肝癌 HepG-2 细胞增殖凋亡的实验研究[D].昆明:昆明医科大学,2022.
- [28] 季蒙蒙,杨金伟,杜斌,等.天麻素对胃癌细胞活力和凋亡的影响[J].现代生物医学进展,2015,15(13):2421-2424.
- [29] 秦冰杰.天麻素对长春新碱抗肿瘤增强效应及其诱导的神经病理性疼痛抑制作用研究[D].宜昌:三峡大学,2020.
- [30] Liu ZY, Wang S, Zhang JS, et al. Gastrodin, a traditional

- Chinese medicine monomer compound, can be used as adjuvant to enhance the immunogenicity of melanoma vaccines [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 74: 105699.
- [31] Zhou F, Shen Y, Liu B, et al. Gastrodin inhibits osteoclastogenesis via down-regulating the NFATc1 signaling pathway and stimulates osseointegration in vitro [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 484 (4): 820-826.
- [32] Huang Q, Shi J, Gao B, et al. Gastrodin: an ancient Chinese herbal medicine as a source for anti-osteoporosis agents via reducing reactive oxygen species [J]. *Bone*, 2015, 73: 132-144.
- [33] 尹秀萍, 许闫严, 刘贤莉. 天麻素通过 Nrf2/Keap1 信号通路促进成骨细胞分化和抑制骨质疏松作用 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36 (16): 2468-2471.
- [34] 张静怡, 李凤兰, 王惠, 等. 天麻素对 2 型糖尿病大鼠种植体周围骨组织影响的初步研究 [J]. *中华口腔医学杂志*, 2022, 57 (9): 938-945.
- [35] 戴厚杰. 天麻素对去卵巢后骨质疏松大鼠骨密度及骨生物力学影响的实验研究 [D]. 桂林: 桂林医学院, 2021.
- [36] 余赛红, 马京京, 张凤, 等. 天麻素联合氢溴酸樟柳碱对老年脑小血管病认知功能障碍患者神经功能的影响 [J]. *中国医院用药评价与分析*, 2022, 22 (8): 931-934.
- [37] 高丽. 阿普唑仑与天麻素联用对神经衰弱患者的临床疗效评价 [J]. *实用中西医结合临床*, 2020, 20 (15): 94-95.
- [38] 欧阳志波, 李孝燕, 王久阳. 天麻素注射液联合舍曲林治疗焦虑症睡眠障碍疗效研究 [J]. *湖北中医药大学学报*, 2023, 25 (4): 60-57.
- [39] 范晨晓, 杨致蓉, 朱佳. 天麻素注射液联合疏肝解郁胶囊对精神分裂症患者认知功能的影响 [J]. *新中医*, 2022, 54 (5): 88-92.
- [40] 杨跃霞. 分析天麻素注射液联合盐酸氟西汀治疗卒中后抑郁的临床效果 [J]. *现代医学与健康研究电子杂志*, 2019, 3 (9): 47-48.
- [41] 薛莉, 王鑫, 李转会, 等. 天麻素联合卡马西平对癫痫患者氧化应激、炎症因子和脑源性神经营养因子的影响 [J]. *神经损伤与功能重建*, 2021, 16 (12): 777-778, 781.
- [42] Zhou H, Wang N, Xu L, et al. The efficacy of gastrodin in combination with folate and vitamin B₁₂ on patients with epilepsy after stroke and its effect on HMGB-1, IL-2 and IL-6 serum levels [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14 (5): 4801-4806.
- [43] 陶琳. 天麻素联合左乙拉西坦对癫痫患者 TNF- α 、CRP、IL-6、IL-8 水平的影响 [J]. *医学理论与实践*, 2021, 34 (12): 2039-2041.
- [44] 邓静静, 李波. 天麻素注射液联合奥卡西平治疗脑梗死后继发癫痫临床观察 [J]. *实用中医药杂志*, 2020, 36 (6): 771-772.
- [45] 徐丽丽. 天麻素联合氟桂利嗪治疗偏头痛的临床效果分析 [J]. *中国现代药物应用*, 2023, 17 (2): 139-142.
- [46] 陈梅花. 天麻素胶囊联合卡马西平治疗原发性三叉神经痛的临床疗效 [J]. *临床合理用药杂志*, 2021, 14 (6): 108-109.
- [47] 张蕴, 徐建可, 张洪阳, 等. 天麻素联合尼莫地平治疗偏头痛急性发作期临床研究 [J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2020, 23 (1): 54-59.
- [48] 司晓燕, 李凯, 李娜. 天麻素联合双抗治疗缺血性脑梗死的效果及对患者运动功能的影响 [J]. *临床医学工程*, 2022, 29 (11): 1535-1536.
- [49] 王小正, 金萍, 沈爱炜, 等. 排风饮加味联合天麻素注射液治疗脑出血临床研究 [J]. *新中医*, 2023, 55 (2): 48-51.
- [50] 谢尚鑫, 俞丽生. 天麻素注射液联合阿托伐他汀钙片治疗急性脑出血临床研究 [J]. *新中医*, 2021, 53 (1): 50-52.
- [51] 王雨来, 周本宏, 陈鹏. 基于 Meta 分析的血栓通联合天麻素注射液治疗急性脑梗塞的临床评价研究 [J]. *时珍国医国药*, 2019, 30 (12): 2935-2939.
- [52] 孙丽娜, 屈涛. 天麻素联合丹参注射液治疗高血压脑出血的临床研究 [J]. *甘肃科技纵横*, 2022, 51 (5): 84-86.
- [53] Wang H, Wang D. Effect of butylphthalide injection combined with gastrodin to improves TRAIL and inflammatory factors in elderly patients with cerebral infarction [J]. *Am J Transl Res*, 2023, 15 (4): 2552-2560.
- [54] 孟杉杉. 天麻素注射液联合倍他司汀对眩晕症患者血流变学及 ADL 评分的影响 [J]. *临床研究*, 2019, 27 (9): 146-147.
- [55] 洪俊峰, 夏海平. 倍他司汀联合天麻素在急诊眩晕症患者中的疗效分析 [J]. *中国医学工程*, 2021, 29 (11): 75-77.
- [56] 杜娟, 王高峰. 柴陈泽泻汤联合天麻素注射液治疗眩晕症临床疗效分析 [J]. *中医临床研究*, 2022, 14 (23): 90-92.
- [57] 闵捷. 天麻素联合异丙嗪治疗急诊眩晕症的价值体会 [J]. *吉林医学*, 2021, 42 (1): 128-129.
- [58] 马聪, 韩莎莎, 刘贤秀. 天麻素胶囊联合氟桂利嗪对椎基底动脉迂曲扩张症合并后循环缺血性眩晕患者血管内皮功能、hs-CRP 及 FIB 的影响 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2019, 28 (28): 3163-3166.
- [59] 王上, 董文娟, 刘鹏亮, 等. JAK2-STAT3 信号通路在天麻素改善小鼠抑郁样行为中的作用研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2021, 21 (19): 3622-3627.
- [60] 孙润珠, 周翠红, 薛姗姗, 等. 天麻素对 CUS 大鼠抑郁样行为及 IL-1 β 和 IL-6 水平的影响 [J]. *神经解剖学杂志*, 2017, 33 (2): 221-224.
- [61] 郑海非, 陈金波, 宋维伟, 等. 天麻制剂通过腺苷途径治疗偏头痛相关的分子机制研究 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2020, 37 (3): 255-260.
- [62] Qiu F, Liu TT, Qu ZW, et al. Gastrodin inhibits the activity of acid-sensing ion channels in rat primary sensory neurons [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 731: 50-57.
- [63] 黄哲女, 谢思维, 刘芳, 等. 天麻素治疗高血压病的临床和作用机制研究进展 [J]. *中国中医药科技*, 2023, 30 (2): 413-415.
- [64] 吴莎, 杨芳, 张六一, 等. 天麻素及其衍生物抗痴呆症的研究进展 [J]. *南通大学学报 (医学版)*, 2022, 42 (4): 343-347.
- [65] 杨婷婷, 周红静, 曾晨叶, 等. 新型天麻素衍生物对阿尔茨海默病模型小鼠的保护作用 [J]. *中国现代应用药学*, 2019, 36 (5): 537-541.

(收稿日期: 2023-09-18; 修回日期: 2023-10-24)

间充质干细胞治疗脓毒症性急性肺损伤的 基础研究和临床应用进展

刘艺¹, 卢旻妮¹, 张雄², 许博成¹, 于锋^{1*} (1. 中国药科大学基础医学与临床药学院, 南京 211198; 2. 南京医科大学附属南京医院(南京市第一医院)药学部, 南京 210006)

摘要: 脓毒症性急性肺损伤是一种严重威胁患者生命的疾病, 其发病率和病死率均较高, 是临床治疗的重点和难点。传统治疗方法存在局限性, 因此迫切需要寻找新的治疗途径。间充质干细胞疗法作为一种有潜力的细胞治疗方法引起了广泛的关注, 研究表明间充质干细胞治疗在人类患者中具有潜在疗效, 且安全性较高。然而, 仍然存在一些挑战和有待解决的问题, 如间充质干细胞的来源和制备、最佳的治疗方案以及治疗机制等。本文主要综述了间充质干细胞治疗脓毒症性急性肺损伤的机制, 临床研究及其临床应用的挑战, 旨在更好地了解间充质干细胞治疗脓毒症性急性肺损伤的前景和潜力, 为临床实践提供新的思路和依据。

关键词: 间充质干细胞; 急性肺损伤; 治疗策略; 临床研究进展

中图分类号: R459.7 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)06-1621-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.034

Basis and clinical progress in mesenchymal stem cells for acute lung injury caused by sepsis

LIU Yi¹, LU Yi-ni¹, ZHANG Xiong², XU Bo-cheng¹, YU Feng^{1*} (1. School of Basic Medicine and Clinical Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198; 2. Department of Pharmacy, The Affiliated Nanjing Hospital of Nanjing Medical University (Nanjing First Hospital), Nanjing 210006)

Abstract: Sepsis acute lung injury is a life-threatening disease with high morbidity and mortality, which is a major difficulty in clinical treatment. There are limitations of traditional treatment methods, so it is urgent to find new therapeutic approaches. Mesenchymal stem cell therapy, as a potentially effective cellular treatment, has attracted much attention. Studies have shown that mesenchymal stem cell therapy has potential therapeutic effects on human patients and is relatively safe. However, there remain some challenges and questions, such as the origin and preparation of mesenchymal stem cells, the best treatment regimen, and the mechanism of treatment. This review summarized the mechanism of mesenchymal stem cell therapy for sepsis-induced acute lung injury, research, and challenges in clinical application, aiming to better understand the prospect of mesenchymal stem cell therapy for sepsis-induced acute lung injury, and provide new ideas for clinical practice.

Key words: mesenchymal stem cell; acute lung injury; treatment strategy; clinical research progress

肺部疾病是一个日益严峻的全球性健康问题, 也是全球发病率和病死率较高的病因之一。脓毒症是由感染引起的全身性炎症反应综合征, 其病理生理过程涉及免疫系统的失调、炎症反应的过度放大以及多个器官的功能障碍, 可导致脓毒性

休克、急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) / 急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS), 甚至死亡^[1]。近年来脓毒症患者逐年增多, 相关流行病学数据显示, 脓毒症在全球范围内发病率均较高, 且每年新发病例呈现

基金项目: 南京医科大学科技发展基金 (No. NMUB20220067)。

作者简介: 刘艺, 女, 硕士研究生, 主要从事药理学研究, email: yaoliliuyi@163.com * 通信作者: 于锋, 男, 教授, 主要从事药理学和临床药学研究, email: yufeng305cpu@163.com

上升趋势^[2]。脓毒症引起的 ALI 是一种危及生命的器官功能障碍，与多种危险因素相关，其临床特征包括肺部炎症、肺水肿、气道狭窄和低氧血症^[3]。ARDS 为脓毒症发生发展过程中最严重的并发症之一，是 ALI 的临床综合征^[4]，以进行性低氧血症和呼吸窘迫为特征。尽管脓毒症性 ALI 防治已经取得了一些进展，但仍然具有挑战性，发病率和死亡率仍然高达 30% ~ 40%^[5]。ALI 的发病机制复杂，目前主要的学说有氧化和抗氧化失衡学说、凝血和纤溶系统紊乱学说、细胞凋亡学说、炎症反应学说、水通道蛋白受损学说等^[6]。在过去的几十年里，传统的 ALI 治疗方法包括液体复苏、抗菌药物治疗、机械通气和支持性治疗等^[7-9]。然而，这些方法并未真正改善患者的生存率，尤其是在重症患者中。因此，亟须寻找新的治疗策略以提高脓毒症性 ALI 患者的生存率和康复机会。近年来，干细胞疗法已成为全球的热门话题，主要应用于炎症性疾病、心血管疾病、肌肉骨骼疾病、外伤、角膜及自身免疫性疾病等，其在 ALI 的应用也越发得到关注。

1 间充质干细胞的基本特征和应用

间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 是一类多能干细胞，存在于脑、肝、肺、肾、胸腺、胰腺、脂肪、骨髓等组织中^[10]，具有自我更新、多向分化的潜力和免疫抑制作用，这使得 MSCs 成为治疗多种疾病和损伤的理想选择。MSCs 可以不断分裂和产生新的干细胞，同时保持其干细胞特性，这种自我更新能力使得 MSCs 能够在体内维持一定数量的干细胞库存，以满足组织修复和再生的需要。在特定情况下，MSCs 可以分化成多种不同类型的细胞，如成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌肉细胞和其他结缔组织^[11]，所以 MSCs 在组织工程和再生医学领域具有广泛的应用前景。MSCs 的免疫调节是通过与免疫细胞相互作用而促进的^[12]，进而抑制 B 细胞和 T 细胞增殖，诱导和调控调节性 T 细胞，抑制 NK 细胞功能以及树突状细胞成熟和活化。由于 MSCs 低表达主要组织相容性复合体 / 人白细胞抗原 (MHC/HLA) I 类，不表达 MHC/HLA II 类，所以 MSCs 具有极低的免疫原性，这种特性可保护 MSCs 免受宿主免疫检测，延长它们在宿主体内的持久性，增强 MSCs 的治疗效果^[13]。细胞疗法对引起脓毒症性 ALI 的病理生理的多个方面均有作用，是一种潜在的新型治疗方法，其中 MSCs 已经成为潜在的治疗候选者。在博来霉素或细菌脂多糖

(LPS) 诱导的 ALI 动物模型研究中，MSCs 通过抑制肺部炎症反应、减轻肺水肿而发挥肺保护作用，提高小鼠的存活率^[14-15]。鉴于 MSCs 在动物模型中对 ALI/ARDS 的良好治疗效果，越来越多的临床试验相继开展，用于检验其在 ALI/ARDS 患者中的安全性和有效性。在一项纳入 24 名 ARDS 患者的双盲、临床 I / II a 期随机对照试验中，MSCs 输注在 ARDS 患者中是安全的，且与对照组相比，MSCs 治疗显著降低严重不良事件发生率和死亡率，缩短恢复时间^[16]。

2 MSCs 治疗脓毒症性 ALI 的机制

2.1 迁移和归巢

MSCs 的治疗效果依赖于它们能够迁移到受损组织并归巢于靶部位。肺组织损伤后释放一系列信号分子激活内皮细胞并诱导黏附分子表达，MSCs 通过滚动结合穿越内皮细胞后选择性地迁移到受损的肺组织从而发挥治疗作用^[17]，整个过程受到多种因素的调控。细胞因子和趋化因子参与了 MSCs 的迁移和归巢，这些信号分子与 MSCs 表面受体结合，促进 MSCs 向肺损伤部位迁移，从而参与肺组织修复过程^[18]。Chen 等^[19]利用慢病毒载体将 *CXCR-4* 基因转染到骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs) 中，结果 *CXCR-4* 基因的过度表达增强了 BM-MSCs 在体内和体外的迁移和归巢能力，且能提高结肠炎的治疗效果。细胞外基质 (ECM) 组分对 MSCs 的迁移和归巢起着重要作用，ECM 中的黏附分子配体与 MSCs 表达的细胞黏附分子相结合，促进 MSCs 向毛细血管壁内皮细胞黏附。非肌性肌球蛋白 II 在脐带间充质干细胞 (WJ-MSCs) 的迁移和黏附过程中起调节作用，抑制非肌性肌球蛋白 II 导致 ECM 和黏附分子基因表达增加，从而减少 WJ-MSCs 迁移^[20]。总之，MSCs 的迁移和归巢是实现其治疗效果的关键步骤，调控其机制对于提高 MSCs 的治疗效果有重要意义。未来的研究应该进一步探索这些机制，并开发相应的策略来优化 MSCs 的迁移和归巢能力。

2.2 抗炎和免疫调节作用

MSCs 具有抗炎和免疫调节作用，这使其成为治疗炎症性疾病和自身免疫性疾病的潜在候选细胞。当肺部受到损伤或感染时，免疫系统会释放炎症介质，导致炎症反应。炎症反应是机体的一种防御反应，促进受损组织的修复，但过度或长期的炎症反应会触发细胞因子风暴，加速局部

组织损伤和全身损伤^[21-22]。MSCs 通过减少促炎细胞因子和增加抗炎细胞因子的释放，抑制炎症反应和免疫细胞的活化，减轻肺部炎症，从而保护因内毒素入血后引起的肺组织免受进一步损伤，并改善肺功能^[23-25]。MSCs 的免疫调节作用是通过抑制先天或适应性免疫活性来实现的，在 ALI/ARDS 的早期阶段，肺泡巨噬细胞被极化为促炎 M1 表型，释放出各种促炎因子并募集中性粒细胞，随着病程的发展，抗炎 M2 表型巨噬细胞在肺部增加，巨噬细胞 M1/M2 表型的平衡可以有效清除体内有害物质和过度产生的促炎细胞因子，促进肺组织损伤修复^[26]。MSCs 通过旁分泌可溶性因子^[27]、线粒体转移的调节^[28]、凋亡和胞饮作用^[29]等机制促进巨噬细胞极化为 M2 表型，提高抗炎细胞因子水平，恢复肺泡巨噬细胞的免疫稳态，从而改善高氧肺损伤、肺部炎症，增加脓毒症诱导的 ALI 小鼠的存活率。因此，MSCs 可能通过抗炎和免疫调节作用在 ALI/ARDS 的治疗中发挥有益作用，未来仍需要更多的临床前和临床研究来证实这一观点。

2.3 抗氧化作用

氧化应激是活性氧 (ROS) 在体内过量积累而引起的一系列病理性氧化损伤，导致细胞功能受损和细胞死亡，研究发现它与多种疾病的发生和发展有关^[30]，包括呼吸系统疾病、心血管系统疾病和神经系统疾病等。MSCs 可以上调超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 和过氧化氢酶 (CAT) 等抗氧化酶以增强抗氧化损伤能力^[31]，防止 LPS 因 ROS 暴露而诱导的肺损伤。近年来，已经有研究者发现 MSCs 释放出细胞外囊泡 (EVs) 作为细胞间通信的重要介质，EVs 内含有与 MSCs 功能相似的生物活性分子。当 EVs 转移到受伤的细胞上时，显著降低了 ALI 上调的氧化应激标志物，同时恢复了 ALI 下调的抗氧化变量^[32]，这证实了 MSCs 对氧化应激的抑制作用可能是通过 EVs 实现的。线粒体是细胞内主要的能量产生器，同时也是 ROS 的主要细胞内来源，细胞间线粒体转移是 MSCs 保护细胞免受氧化损伤的重要机制^[33]。研究表明，线粒体可以通过隧道纳米管道、EVs、细胞融合等多种机制转移到邻近线粒体功能受损的细胞中^[34]，从而对氧化应激引起的细胞损伤发挥保护作用。隧道纳米管道是一种高度敏感的纳米管结构，它的形成有利于线粒体转移，还可以促进 MSCs 释放细胞因子和外泌体到靶细胞中。Li 等^[35]在香烟烟雾

培养基存在下，共培养气道平滑肌细胞 (ASMC) 和诱导多能干细胞衍生的间充质干细胞 (iPSC-MSCs)，减弱了香烟烟雾培养基诱导的 ASMC 线粒体 ROS、细胞凋亡和线粒体膜电位丢失，这可能是线粒体通过隧道纳米管道在 iPSC-MSCs 和 ASMC 之间转移的结果，并且这种转移在烟草刺激存在下增强。内质网作为细胞内蛋白质合成、修饰和分泌的重要细胞器，也参与了氧化应激的调节。在细胞应激和炎症条件下，内质网会启动一系列的应激反应，包括启动内质网应激信号通路、增加抗氧化酶的表达、促进蛋白质的折叠和修复等，内质网还能够通过清除氧化应激产生的 ROS 来维持细胞内稳态^[36]。随着对 MSCs 治疗机制研究的不断深入，细胞信号通路对氧化应激的影响越来越受到关注，如 Nrf2/HO-1、PI3K/AKT、MAPK、NF- κ B 等信号通路^[37-38]。Nrf2/HO-1 是调控抗氧化剂活性的重要防御信号通路之一。Lei 等^[39]给予 LPS 建立脓毒症大鼠模型，结果发现大鼠肺组织中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达明显下调，经 BM-MSCs 处理逆转了这一结果，而 Nrf2 拮抗剂或 HO-1 抑制剂可阻断 BM-MSCs 所具有的抗氧化和抗炎作用，表明 BM-MSCs 介导的肺保护作用是通过激活 Nrf2/HO-1 通路发生的。

2.4 对肺水肿和通透性的调节

在脓毒症诱导 ALI 的过程中，炎症通路的激活导致肺泡上皮细胞破坏，上皮通透性增强，水肿液流入肺泡腔，导致肺水肿，影响气体交换，这严重影响了患者的呼吸功能，甚至危及生命。一方面，MSCs 通过分泌多种细胞因子调节炎症反应和肺泡内外的液体平衡，增强肺水肿的消退，提高肺氧合功能^[40]；另一方面，MSCs 通过调节肺血管通透性，减少血管内液体的渗出，从而改善肺组织的水肿情况^[41-42]。临床研究也证实了 MSCs 调节肺部通透性的潜力：相比于安慰剂，静脉输注 MSCs 48 h 后患者气腔总蛋白显著降低，表明 MSCs 治疗可以改善肺泡蛋白通透性，减轻肺水肿和提高通气功能^[43]。这些研究结果为临床应用 MSCs 治疗肺部疾病提供了有力的支持，MSCs 治疗脓毒症性急性肺损伤的机制汇总见表 1。

3 MSCs 治疗 ALI/ARDS 的临床研究现状

因 MSCs 具有潜在的治疗效果，自 1995 年首次应用于临床试验后已在各种临床疾病中应用，越来越多的研究证明了 MSCs 治疗在呼吸系统疾病、心血管系统疾病、自身免疫性疾病中的有效

表 1 MSCs 治疗脓毒症性 ALI 的机制

Tab 1 Mechanism of MSCs for septic acute lung injury

作用机制	MSCs 源	途径	参考文献
迁移和归巢	BM-MSCs	CXCR-4 基因过表达增强 BM-MSCs 迁移和归巢能力, 提高疗效	[19]
	WJ-MSCs	增加 ECM 和细胞黏附分子的表达, 抑制 WJ-MSCs 迁移和归巢	[20]
抗炎和免疫调节作用	MB-MSCs	降低 IL-1 β 、TNF- α 的表达, 减轻肺损伤和炎症反应	[23]
	BM-MSCs	降低 BALF 中白细胞和中性粒细胞数, 减弱 LPS 诱导的 ALI	[25]
	UCB-MSCs	促进巨噬细胞极化为 M2 表型, 抑制炎症并增强抗炎作用	[27]
	AD-MSCs	促进巨噬细胞 M2 极化, 增加 IL-10 水平, 增加精氨酸酶活性	[29]
抗氧化作用	BM-MSCs	增加抗氧化酶 SOD、CAT、GPx 活性, 缓解氧化损伤	[31]
	HUC-MSCs	激活 Nrf2-HO-1 通路, 恢复 ALI 下调的抗氧化变量	[32]
	HUC-MSCs	调控抗氧化酶活性和 ROS 水平, 抑制氧化应激	[37]
	BM-MSCs	激活 Nrf2/HO-1 通路, 抑制 NLRP3 炎症小体激活	[39]
对肺水肿和通透性的调节	BM-MSCs	恢复人肺微血管内皮细胞的蛋白通透性	[41]
	HP-MSCs	降低 LPS 介导的肺血管内皮通透性, 减轻肺组织损伤程度	[42]
	BM-MSCs	降低肺血管和上皮通透性, 减轻肺水肿, 提高通气功能	[43]

注 (Note): MB-MSC. 月经血间充质干细胞 (menstrual blood mesenchymal stem cells); UCB-MSCs. 脐带血间充质干细胞 (umbilical cord blood mesenchymal stem cells); AD-MSCs. 脂肪间充质干细胞 (adipose-derived mesenchymal stem cells); HUC-MSC. 人脐带间充质干细胞 (human umbilical cord mesenchymal stem cells); HP-MSCs. 人胎盘间充质干细胞 (human placental mesenchymal stem cells)。

性和安全性。许多研究者聚焦于 MSCs 治疗急性慢性肺部疾病, 截至 2023 年 11 月, ClinicalTrials.gov 网站注册的 MSCs 治疗肺部疾病的临床试验约 180 余项, 有 40 余项与 ALI/ARDS 相关。临床前研究评估了不同来源的 MSCs 治疗 LPS 诱导的 ALI/ARDS 的效果, 结果表明 MSCs 可降低肺泡灌洗液和血浆中的炎性细胞因子, 降低中性粒细胞浸润程度, 减轻肺水肿程度, 降低上皮和血管通透性, 同时还可以下调凋亡相关蛋白表达, 促进肺组织修复^[44-46]。目前已经进行了多项临床试验, 以探索 MSCs 在肺部疾病患者中的治疗潜力, 结果显示给予 MSCs 治疗对 ALI/ARDS 患者是安全有效的。He 等^[47]报道的 I 期临床研究证实 MSCs 治疗严重脓毒症患者是安全可行的, 当剂量达到

3×10^6 个 $\cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 患者均未出现相关的严重不良事件。在一项对 MSCs 用于重症 COVID-19 相关的 ARDS 患者的 I / II 期临床研究中, 患者每隔 3 d 静脉输注 3 次骨髓来源的 MSCs [$(1.5 \sim 3) \times 10^6$ 个 $\cdot \text{kg}^{-1}$], 结果表明患者对 MSCs 输注耐受性良好, 未报告相关不良事件, 而且 MSCs 改善了患者肺功能^[48]。在美国进行的一项双盲、随机、安慰剂对照的 II a 期临床试验中, 中度至重度 ARDS 患者接受 BM-MSCs (10×10^6 个 $\cdot \text{kg}^{-1}$) 治疗后, 并未观察到血流动力学或呼吸系统不良反应, 而且 BM-MSCs 改善了患者的氧合指数, 降低了血管生成素-2、血浆蛋白 C 浓度, 表明 MSCs 给药减轻了肺部损伤^[49]。MSCs 治疗 ALI/ARDS 的安全性和有效性的临床试验汇总见表 2。

表 2 MSCs 治疗 ALI/ARDS 的安全性和有效性的临床试验

Tab 2 Clinical trials of the safety and efficacy of MSCs for ALI/ARDS

试验阶段	MSCs 源	患者状态	n	结局	治疗剂量 / (个 $\cdot \text{kg}^{-1}$)	结果	编号	参考文献
I / II 期	同种异体 BM-MSCs	COVID-19	8	安全性	$(1.5 \sim 3) \times 10^6$	ARDS 患者对 MSCs 输注耐受性良好, 未报告相关不良反应	NCT04445454	[48]
		ARDS		第 28 日和第 60 日死亡率 无 ICU 天数 需要机械通气				
II a 期	同种异体 BM-MSCs	中度至重度 ARDS	40	不良事件 第 28 日和第 60 日死亡率	10×10^6	未发生血流动力学或呼吸系统不良事件 静脉注射 MSCs 是安全的	NCT02097641	[49]

4 不同来源 MSCs 的比较

MSCs 可以来源于多种不同的组织, 如骨髓、脂肪组织、胎盘和脐带血等, 不同来源的 MSCs

在治疗 ALI/ARDS 中可能存在一定的差异。

目前关于 BM-MSCs 治疗 ALI/ARDS 的疗效已经得到了验证, 与其他来源 MSCs 相比, BM-

MSCs 具有较强的免疫调节和抗炎作用,可以改善肺水肿,有效减轻 ALI 小鼠的肺部炎症反应和肺损伤^[50]。BM-MSCs 还具有较高的增殖和分化能力,可以在体内持续释放修复因子,促进肺组织的修复和再生^[51]。然而,BM-MSCs 的获取过程较为烦琐,需要进行骨髓穿刺,存在一定的创伤和感染风险,BM-MSCs 的数量和活力也可能受到年龄和疾病状态的影响,限制了其在临床中的应用。脂肪组织也是 MSCs 的重要来源,AD-MSCs 具有较高的分化潜能和促血管生成能力,可以有效修复受损的肺部微血管和肺泡壁^[52]。且 AD-MSCs 的获取过程相对简单,创伤和并发症较少,因此深受研究者喜爱。胎盘和脐带血是相对新兴的 MSCs 源,HP-MSCs 较其他来源的 MSCs 相比,其抗炎能力更强,可以有效调控 ALI 患者的免疫系统和减轻炎症反应^[53]。UCB-MSCs 是目前除胚胎干细胞之外分化潜能最高的 MSCs,一项研究对 AD-MSCs、BM-MSCs 和 UCB-MSCs 三种类型的细胞进行了比较,发现 UCB-MSCs 在创伤修复、免疫治疗等研究领域有更广阔的应用前景^[54]。HP-MSCs 和 UCB-MSCs 可以通过胎盘或脐带血采集而得,较少创伤和风险,但其数量和纯度可能受到采集来源和方法的影响,需要进一步优化和标准化,长期安全性和稳定性也需要更多的临床研究验证。

不同来源的 MSCs 在治疗 ALI/ARDS 中具有各自的优势和不足,因此,在临床应用中需要根据患者的具体情况和病情选择合适的 MSCs 来源,并进一步优化和标准化其获取和应用过程,以实现更好的治疗效果和临床应用前景。

5 MSCs 临床应用的挑战

MSCs 治疗脓毒症性 ALI 面临的主要挑战是安全性和不良反应。尽管早期的临床试验表明 MSCs 治疗在人类患者中是相对安全的^[48],但其长期治疗和大规模应用,仍然需要更多的安全性数据支持。目前尚未确定 MSCs 治疗脓毒症性 ALI 的最佳治疗方案,包括治疗剂量、治疗时机、给药途径等^[55],所以在未来的临床试验中最佳治疗方案的 MSCs 的治疗剂量和途径还有待确定。不同临床试验可能采用不同的方案,这使得结果的比较和方案的推广具有挑战性。目前, MSCs 治疗的持续性和长期效果尚不清楚,需要更多的追踪数据来了解 MSCs 在患者体内的存活时间以及其治疗效果是否能够持续。此外,还需要评估 MSCs 治疗是否可以改善患者的长期生存率和生活

质量,以确定其在长期治疗中的价值。

6 小结

综上所述, MSCs 治疗脓毒症性 ALI 是一个备受关注的研究领域,虽然仍面临一些挑战,但其前景充满希望。它代表了干细胞治疗领域的重要发展方向,临床前实验研究和临床试验的初步结果显示了潜在的疗效,为 ALI 患者提供了新的治疗选择。未来,随着更多临床试验的进行,我们有望更深入地了解 MSCs 治疗的机制和最佳应用策略,从而改善脓毒症性 ALI 患者的预后和生活质量。因此, MSCs 治疗脓毒症性 ALI 的研究和应用具有重要的临床和科学价值,值得继续深入研究和探索。

参考文献

- [1] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3) [J]. *JAMA*, 2016, 315 (8): 801.
- [2] Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NKJ, et al. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. Current estimates and limitations [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2016, 193 (3): 259-272.
- [3] Wang J, Li JR, Lou AN, et al. Sacubitril/valsartan alleviates sepsis-induced acute lung injury via inhibiting GSDMD-dependent macrophage pyroptosis in mice [J]. *FEBS J*, 2023, 290 (8): 2180-2198.
- [4] Bellani G, Laffey JG, Pham T, et al. Epidemiology, patterns of care, and mortality for patients with acute respiratory distress syndrome in intensive care units in 50 countries [J]. *JAMA*, 2016, 315 (8): 788-800.
- [5] Vincent JL, Marshall JC, Namendys-Silva SA, et al. Assessment of the worldwide burden of critical illness: the Intensive Care Over Nations (ICON) audit [J]. *Lancet Respir Med*, 2014, 2 (5): 380-386.
- [6] 杨思豪, 聂洪鑫, 孟辉. 急性肺损伤发病机制相关信号通路及其药物干预的研究现状 [J/OL]. *中国胸心血管外科临床杂志*, <https://kns.cnki.net/kcms/detail/51.1492.R.20230505.1044.002.html>.
- [7] Grissom CK, Hirshberg EL, Dickerson JB, et al. Fluid management with a simplified conservative protocol for the acute respiratory distress syndrome [J]. *Crit Care Med*, 2015, 43 (2): 288-295.
- [8] Peukert K, Fox M, Schulz S, et al. Inhibition of caspase-1 with tetracycline ameliorates acute lung injury [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2021, 204 (1): 53-63.
- [9] Needham DM, Colantuoni E, Mendez-Tellez PA, et al. Lung protective mechanical ventilation and two year survival in patients with acute lung injury: prospective cohort study [J]. *BMJ*, 2012, 344: e2124.
- [10] Moll G, Ankrum JA, Kamhieh-Milz J, et al. Intravascular mesenchymal stromal/stem cell therapy product diver-

- sification: time for new clinical guidelines [J]. *Trends Mol Med*, 2019, 25 (2): 149-163.
- [11] Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8 (9): 726-736.
- [12] Wang Y, Chen XD, Cao W, et al. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications [J]. *Nat Immunol*, 2014, 15 (11): 1009-1016.
- [13] Zhu YQ, Ge JL, Huang C, et al. Application of mesenchymal stem cell therapy for aging frailty: from mechanisms to therapeutics [J]. *Theranostics*, 2021, 11 (12): 5675-5685.
- [14] Zhao YY, McIntyre LA, Moher D, et al. Efficacy of mesenchymal stromal cell therapy for acute lung injury in preclinical animal models: a systematic review [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (1): e0147170.
- [15] Chimenti L, Luque T, Bonsignore MR, et al. Pre-treatment with mesenchymal stem cells reduces ventilator-induced lung injury [J]. *Eur Respir J*, 2012, 40 (4): 939-948.
- [16] Lanzoni G, Linetsky E, Correa D, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells for COVID-19 acute respiratory distress syndrome: a double-blind, phase 1/2a, randomized controlled trial [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2021, 10 (5): 660-673.
- [17] Jiang XP, Jiang X, Qu C, et al. Intravenous delivery of adipose-derived mesenchymal stromal cells attenuates acute radiation-induced lung injury in rats [J]. *Cytotherapy*, 2015, 17 (5): 560-570.
- [18] Aithal AP, Bairy LK, Seetharam RN. Safety and therapeutic potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in regenerative medicine [J]. *Stem Cell Investig*, 2021, 8: 10.
- [19] Chen Z, Chen QQ, Du HT, et al. Mesenchymal stem cells and CXC chemokine receptor 4 overexpression improved the therapeutic effect on colitis via mucosa repair [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16 (2): 821-829.
- [20] Arora S, Saha S, Roy S, et al. Role of nonmuscle myosin ii in migration of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2015, 24 (17): 2065-2077.
- [21] Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19 [J]. *Cell*, 2021, 184 (4): 861-880.
- [22] Tay MZ, Poh CM, Rénia L, et al. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention [J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20 (6): 363-374.
- [23] Ren HT, Zhang Q, Wang JF, et al. Comparative effects of umbilical cord-and menstrual blood-derived mscs in repairing acute lung injury [J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 7873625.
- [24] Harrell CR, Markovic BS, Fellabaum C, et al. The role of interleukin 1 receptor antagonist in mesenchymal stem cell-based tissue repair and regeneration [J]. *Biofactors*, 2019, 46 (2): 263-275.
- [25] Huh JW, Kim WY, Park YY, et al. Anti-inflammatory role of mesenchymal stem cells in an acute lung injury mouse model [J]. *Acute Crit Care*, 2018, 33 (3): 154-161.
- [26] Laskin DL, Malaviya R, Laskin JD. Role of macrophages in acute lung injury and chronic fibrosis induced by pulmonary toxicants [J]. *Toxicol Sci*, 2019, 168 (2): 287-301.
- [27] Kim M, Kwon JH, Bae YK, et al. Soluble PTX3 of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells attenuates hyperoxic lung injury by activating macrophage polarization in neonatal rat model [J]. *Stem Cells Int*, 2020, 2020: 1802976.
- [28] Xia LJ, Zhang CL, Lv NY, et al. ADMSC-derived exosomes alleviate acute lung injury via transferring mitochondrial component to improve homeostasis of alveolar macrophages [J]. *Theranostics*, 2022, 12 (6): 2928-2947.
- [29] Ghahremani PM, Soudi S, Ghanbarian H, et al. Effect of efferocytosis of apoptotic mesenchymal stem cells (MSCs) on C57BL/6 peritoneal macrophages function [J]. *Life Sci*, 2018, 212: 203-212.
- [30] Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, et al. Oxidative stress: harms and benefits for human health [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 8416763.
- [31] Shalaby SM, El-Shal AS, Abd-Allah SH, et al. Mesenchymal stromal cell injection protects against oxidative stress in Escherichia coli-induced acute lung injury in mice [J]. *Cytotherapy*, 2014, 16 (6): 764-775.
- [32] Chen J, Li CH, Liang ZX, et al. Human mesenchymal stromal cells small extracellular vesicles attenuate sepsis-induced acute lung injury in a mouse model: the role of oxidative stress and the mitogen-activated protein kinase/nuclear factor kappa B pathway [J]. *Cytotherapy*, 2021, 23 (10): 918-930.
- [33] Michaeloudes C, Li X, Mak JCW, et al. Study of mesenchymal stem cell-mediated mitochondrial transfer in vitro models of oxidant-mediated airway epithelial and smooth muscle cell injury [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2269: 93-105.
- [34] Paliwal S, Chaudhuri R, Agrawal A, et al. Regenerative abilities of mesenchymal stem cells through mitochondrial transfer [J]. *J Biomed Sci*, 2018, 25 (1): 31.
- [35] Li X, Michaeloudes C, Zhang YL, et al. Mesenchymal stem cells alleviate oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction in the airways [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141 (5): 1634-1645. e1635.
- [36] Huang CY, Deng JS, Huang WC, et al. Attenuation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury by hispolon in mice, through regulating the TLR4/PI3K/Akt/mTOR and Keap1/Nrf2/HO-1 pathways, and suppressing oxidative stress-mediated ER stress-induced apoptosis and Autophagy [J]. *Nutrients*, 2020, 12 (6): 1742-1764.

- [37] Tang Y, Ding FX, Wu C, et al. HUC-MSCs conditioned medium ameliorate lipopolysaccharide-induced acute lung injury by suppressing oxidative stress and inflammation via Nrf2/NF- κ B signaling pathway [J]. *Anal Cell Pathol*, 2021, 2021: 6653681.
- [38] Mizuta Y, Akahoshi T, Guo J, et al. Exosomes from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells ameliorate histone-induced acute lung injury by activating the PI3K/Akt pathway in endothelial cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11 (1): 508.
- [39] Lei LH, Guo YQ, Lin J, et al. Inhibition of endotoxin-induced acute lung injury in rats by bone marrow-derived mesenchymal stem cells: role of Nrf2/HO-1 signal axis in inhibition of NLRP3 activation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 551: 7-13.
- [40] Galipeau J, Sensébé L. Mesenchymal stromal cells: clinical challenges and therapeutic opportunities [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 22 (6): 824-833.
- [41] Ye LF, Song JQ, Zheng YJ, et al. New mechanism for mesenchymal stem cell microvesicle to restore lung permeability: intracellular S1P signaling pathway independent of S1P receptor-1 [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13 (1): 496.
- [42] 徐明均, 李晓国, 马晨, 等. 人胎盘 MSCs 移植对急性肺损伤小鼠肺血管内皮通透性及肺组织损伤修复的影响 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2020, 34 (3): 387-392.
- [43] Wick KD, Leligdowicz A, Zhuo H, et al. Mesenchymal stromal cells reduce evidence of lung injury in patients with ARDS [J]. *JCI Insight*, 2021, 6 (12): e148983.
- [44] Wang LL, Shi M, Tong L, et al. Lung-resident mesenchymal stem cells promote repair of LPS-induced acute lung injury via regulating the balance of regulatory T cells and TH17 cells [J]. *Inflammation*, 2018, 42 (1): 199-210.
- [45] He XQ, Li CY, Yin H, et al. Mesenchymal stem cells inhibited the apoptosis of alveolar epithelial cells caused by ARDS through CXCL12/CXCR4 axis [J]. *Bioengineered*, 2022, 13 (4): 9060-9070.
- [46] Fernández-Francos S, Eiro N, González-Galiano N, et al. Mesenchymal stem cell-based therapy as an alternative to the treatment of acute respiratory distress syndrome: current evidence and future perspectives [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (15): 7850.
- [47] He X, Ai SM, Guo W, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stem (stromal) cells for treatment of severe sepsis: a phase I clinical trial [J]. *Transl Res*, 2018, 199: 52-61.
- [48] Grégoire C, Layios N, Lambermont B, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cell therapy in severe COVID-19: preliminary results of a phase I / II clinical trial [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 932360.
- [49] Matthay MA, Calfee CS, Zhuo H, et al. Treatment with allogeneic mesenchymal stromal cells for moderate to severe acute respiratory distress syndrome (START study): a randomised phase 2a safety trial [J]. *Lancet Respir Med*, 2019, 7 (2): 154-162.
- [50] Soliman MG, Mansour HA, Hassan WA, et al. Mesenchymal stem cells therapeutic potential alleviate lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rat model [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2018, 32 (11): e22217.
- [51] Horie S, Laffey JG. Recent insights: mesenchymal stromal/stem cell therapy for acute respiratory distress syndrome [J]. *F1000 Res*, 2016. doi: 10.12688/f1000research.8217.1.
- [52] Spriet M, Hunt GB, Walker NJ, et al. Scintigraphic tracking of mesenchymal stem cells after portal, systemic intravenous and splenic administration in healthy beagle dogs [J]. *Vet Radiol Ultrasound*, 2015, 56 (3): 327-334.
- [53] Luan XY, Li GY, Wang GY, et al. Human placenta-derived mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation and support the culture expansion of cord blood CD34⁺ cells: a comparison with human bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *Tissue Cell*, 2013, 45 (1): 32-38.
- [54] Oh S, Jang AY, Chae S, et al. Comparative analysis on the anti-inflammatory/immune effect of mesenchymal stem cell therapy for the treatment of pulmonary arterial hypertension [J]. *Sci Rep*, 2021, 11 (1): 2012.
- [55] Wang ZX, Yu T, Hou YP, et al. Mesenchymal stem cell therapy for ALI/ARDS: therapeutic potential and challenges [J]. *Curr Pharm Des*, 2022, 28 (27): 2234-2240.

(收稿日期: 2023-12-07; 修回日期: 2024-03-08)

中药与临床

基于体质与证候辨析的痰湿体质主药主方筛选

黄博臻¹, 宋姗姗¹, 王亮¹, 刘欣茜², 马思懿¹, 姜敏^{1*} (1. 首都医科大学附属北京世纪坛医院, 北京 100038; 2. 北京中医药大学, 北京 100029)

摘要: 鉴于痰湿体质和痰湿证有共性表现, 且冠名相似, 临床上常出现对两者界定不清的情况, 导致遣方用药混淆。但是两者又存在本质上的差异, 因此, 本文从辨识要素、调治目的、用药特点等方面对痰湿体质和痰湿证的区别进行分析, 并对痰湿体质调体主药陈皮、山楂、白术、苍术、茯苓、薏苡仁以及痰湿体质调体主方参苓白术散进行深入探究, 以期为痰湿体质辨体调体思路及其相关疾病的预防提供更多的参考意见, 提高痰湿体质选方用药的准确性与有效性。

关键词: 痰湿体质; 痰湿证; 主药; 主方; 参苓白术散

中图分类号: R283

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)06-1628-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.035

Core medicinals and formulas for phlegm-dampness body constitution based on constitution and pattern differentiation

HUANG Bo-zhen¹, SONG Shan-shan¹, WANG Liang¹, LIU Xin-qian², MA Si-yi¹, JIANG Min^{1*} (1. *Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038*; 2. *Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029*)

Abstract: Given that phlegm-dampness constitution and phlegm-dampness pattern have common manifestations and similar names, there are often unclear definitions of the two, which leads to difficulty in deciding on the right medicinal prescriptions for some practitioners in clinical practice. In fact, there are essential differences between the two. This paper tried to distinguish phlegm-dampness constitution and phlegm-dampness pattern diagnosis from three aspects: essentials for identification, therapeutic purpose and medication feature selection. Characteristics of medicinal combination on phlegm-dampness constitution were analyzed from the properties of core medicinals including Citri reticulatae pericarpium, Crataegi fructus, Atractylodes macrocephala, Atractylodes lancea, Poria cocos, Coicis semen and the main formula Shenling Baizhu powder. We hope to provide clear clinical guidance for the conditioning of phlegm-dampness constitution and prevention of related diseases, and improve the accuracy and effectiveness of medical selection for phlegm-dampness constitution.

Key words: phlegm-dampness constitution; phlegm-dampness pattern; core medicinal; chief formula; Shenling Baizhu powder

体质是个体在先天遗传与后天获得的基础上表现出的形态结构、生理机能和心理状态方面综合的、相对稳定的特质^[1]。证型是疾病过程中某

一阶段的病理概括, 由相对固定、有内在联系且能反映疾病阶段性本质的症状和体征构成^[2]。体质的研究主体是“人”, 通过辨体调体, 以“治未

基金项目: 国家中医药管理局基本中医药循证能力建设(No. 2019XZZX-JB004); 铁道部专项课题(No. J2020Z606); 北京市中医药科技发展资金项目(No. JJ-2020-57)。

作者简介: 黄博臻, 男, 博士, 主要从事中医体质研究、中医药防治内分泌疾病研究, email: bozhenhuang2021@163.com

***通信作者:** 姜敏, 女, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中医体质学、中医内分泌研究, email: jiangmin1965@sina.com

病”为主。证型的研究主体是“病”，通过中医辨证论治，以“治已病”为主^[3]。

关于体质与证候的关系，目前已有较为详细的论述，如王琦等^[4]从 9 个方面对体质和证候的区别作出界定，并根据“形成、性质、转化”论述两者的关系。但是以前的研究多从整体上展开理论探讨，针对体质与相应证型的辨别与调治的深度解读尚不全面。目前关于痰湿体质辨体调体与痰湿证辨证论治的异同及痰湿体质主药主方筛选的内容仍是研究空白，以致许多研究者在两者含义的辨识上出现偏差，进而出现调治时遣方用药互相混淆的问题。因此，笔者从痰湿角度厘清辨体调体与辨证论治的异同，以期为临床工作提供参考。

1 痰湿体质和痰湿证的辨析要点

1.1 辨识要素不同

痰湿体质是由于水液内停、痰湿凝聚，以黏滞重浊为主要特征的体质状态^[5]。痰湿证是由于痰湿内阻，以身体重着、胸膈痞满、头晕目眩等为常见症的证候^[6]。两者的定义貌似一致，但实际上辨识内容迥然不同。时相上，痰湿体质较为稳定，甚可为终身性，短时间内不易改变；痰湿证随病情而改变，变化迅速，病愈则消。程度上，患者痰湿症状不显，仅有体征，甚或“无症状，无体征，有病理”，常考虑为痰湿体质；若患者有明确的不适和痛苦，痰湿症状和体征十分显著，常考虑为痰湿证。

痰湿体质侧重于反映机体的整体特质，其辨识内容主要包括形体特征、常见表现、心理特征、易患疾病、环境适应能力 5 个方面。① 形体特征：体形肥胖，腹部松软；② 常见表现：面部皮肤油脂较多，多汗且黏，胸闷痰多，口黏腻或甜，喜食肥甘，苔腻，脉滑；③ 心理特征：性格偏温和、稳重，多善于忍耐；④ 易患疾病：胸痹、中风、消渴等；⑤ 环境适应能力：对梅雨季节及潮湿环境适应能力差^[7]。

痰湿证侧重于反映疾病演变过程中某阶段的病理特征，其辨识内容主要包括病因、病性、病位及病势 4 个方面^[8]。① 病因：多由内伤而生；② 病性：属于阴证、里证、实证范畴；③ 病位：偏重于某一脏腑，如痰湿蕴肺；④ 病势：痰湿内蕴，可损伤阳气以致阳气日衰，痰湿阻滞亦可造成气滞或血瘀。

1.2 调治目的有异

痰湿体质是在先天因素和后天因素作用下，形

成的相对稳定的体质状态。因此，体质虽可调，但难调，需要较长的调整周期。此外，痰湿体质本身也决定了其患代谢性疾病、心脑血管疾病的倾向性。调理痰湿体质使之趋于平和，旨在避免机体向着疾病发展，是“治未病”的有效干预措施。

痰湿证是疾病进程中的阶段性表现，因病而来、病愈则消、变化较快，相对痰湿体质，其属于疾病短期内的产物。此外，证候与疾病的演变过程密不可分，伴随着疾病的发生发展，相关的症状和体征发生转变后，痰湿证亦可改变，甚或消失。因此，针对痰湿证的治疗，以证候消失为目的，调整周期相对短暂，属于“治已病”的范畴。

体质不仅影响证候的形成与性质，而且时常与证候相兼出现。如痰湿体质患者，平素皮肤油腻、体多黏汗、喜食肥甘，近期出现咳声重浊、痰多质黏、舌苔白腻等痰湿蕴肺的证候表现时，应针对当下这一阶段性病理改变，“急则治其标”，以二陈汤合三子养亲汤化裁进行辨证施治。当痰湿蕴肺的证候消退后，痰湿体质的表现常常存在，“缓则治其本”，此时需长期调理痰湿体质，以防其变生他病。

1.3 用药特点区别

痰湿体质“相对稳定”，短期内难以彻底清除。因此，痰湿体质的调体方药需考虑用药“持久性”以及痰湿“全身性”，遣方用药特点包括以下两个方面：

① 忌用峻剂，王道缓图。痰湿体质者的调体忌用“豁痰”“涤痰”之品。若将此类药物长期用于体质调理，容易造成耗气伤阴。② 健脾温阳，以除痰源。“脾为生痰之源”，痰湿体质的形成，多因脾失健运，津液输布失常，水饮内停所致。痰湿为阴邪，治疗需借助于“温药”以振奋阳气，通调水道，温化饮邪，此即“病痰饮者，当以温药和之”。临床常选用“甘温”或“辛温”之品，如陈皮、白术、苍术等。

痰湿证作为疾病的阶段性病理改变，需要在短期内尽快祛除。因此，痰湿证的辨治方药需考虑用药“短暂性”以及痰湿“局部性”，遣方用药特点包括以下两个方面：

① 攻邪从速，中病即止。痰湿证的治疗中，若痰湿胶着难化，可酌情选用“豁痰”“涤痰”之药以增强疗效，如法半夏、白芥子、牵牛子等。若患者痰湿证渐退，应及时调整药量，甚或停药，以避免损伤气阴，即所谓的“中病即止”。

② 引经报使，专药为先。治疗痰湿证的药物众多，临证时需结合疾病所涉及的脏腑，根据病位针对性用药。例如胸痹痰湿证，瓜蒌为涤痰宽胸的专药；呕吐痰湿证，干姜为化痰止呕的专药；咳嗽痰湿证，紫苏子为止咳化痰的专药。

2 痰湿体质调体主药的筛选

对痰湿体质辨体论治的用药规律进行数据挖掘可知，治疗痰湿体质相关中药共有 99 种，其中排名前 10 的药物分别为茯苓、陈皮、山楂、白术、甘草、半夏、苍术、泽泻、薏苡仁、山药^[9]。去除其中有毒之半夏、性寒之泽泻、祛湿作用不显之山药与甘草，并结合姜敏教授治疗痰湿体质之“顺气”“健脾”“利湿”临证用药法则，筛选出痰湿体质调体常用药物，即陈皮、山楂、白术、苍术、茯苓、薏苡仁，并结合中药性味归经及药物配伍理论，进行全面分析。

2.1 气顺则痰湿可消——陈皮、山楂

陈皮，味苦、辛，性温。《本草汇言》谓其：“味辛善散，故能开气；味苦开泄，故能行痰；其气温平，善于通达”。山楂，味酸、甘，性微温。《新刻药鉴》言之：“利痰消食，下积气，散滞血。”此外，痰湿体质者多肥胖，肥胖之人多血脂异常，而山楂具有化浊降脂之功，切中其体质特点^[10]。陈皮、山楂均为药食同源之品，药力柔和，相辅相成，共奏“理气行滞、燥湿化痰”之功。

体质是先后天因素共同作用下的机体状态，其调理不可一蹴而就，故药物使用上忌用峻剂，陈皮、山楂均药性相对和缓而无过燥之弊。痰湿既成，阻滞气机，随气而升降，气滞则痰聚，气顺则痰消。陈皮、山楂两药祛湿化浊之中寓行运之法，较好地诠释了“治痰先治气，气顺痰自消”的理念。

2.2 脾健则湿邪得化——白术、苍术

白术，味甘、苦，性温。《本草汇言》曰：“白术，乃扶植脾胃，散湿除痹，消食除痞之要药。脾虚不健，术能补之”。苍术，味辛、苦，性温，功擅燥湿运脾。白术、苍术苦温燥湿以祛湿浊，辛香运脾以和脾胃，故均可入中州而健脾燥湿，常相须为用，以增疗效。但两者之间又有区别，即白术擅于健脾，苍术擅于燥湿，两药相合，相得益彰，使脾健则湿邪得化，湿去则脾运有权。

脾居中焦，喜燥而恶湿，脾运不健则湿无以化，聚而成痰，故“脾为生痰之源”，因此调理痰湿体质时应注意健运脾气。同时，湿为阴邪，其性重着黏腻，脾为太阴湿土，“阴脏所感之病，

阴者居多”，湿邪留滞则易影响脾胃气机，此即所谓的“脾苦湿”，故应“急食苦以燥之”。简而言之，痰之因，多因于湿；痰之本，不离乎脾。白术、苍术兼具有健运脾气和燥湿化痰之功，实为调理痰湿体质之佳品。

2.3 利水则湿邪易祛——茯苓、薏苡仁

茯苓，味甘、淡，性平。《本草经疏》言之“生于古松之下，感土木之气而成质”。茯苓寄生在土壤之下、松根之上，汲取土木之精华，故能健固中州、化气制水，况其药性平和，故利水渗湿而不伤正气。薏苡仁，味甘、淡，性凉。《本草新编》强调其“最善利水，不至损耗真阴之气”。薏苡仁为药食两用之品，功擅利水渗湿而不伤气阴，使湿邪从小便而解，水液归于常道。

“凡治病，总宜使邪有出路”，夫痰湿者，乃水液代谢失常，停聚体内而成。已成之痰湿当祛，总不离利水予邪以出路，茯苓、薏苡仁即是代表药物。此两者祛除痰湿之机理，源于甘淡之味，味淡则能利水渗湿，使痰湿从小便而解。味甘则入脾经，助脾土以运化水湿，使痰无以生。

3 痰湿体质调体主方的筛选

痰湿证与痰湿体质的辨识要素不同、调治目的有异、用药特点有别。基于此，筛选痰湿体质的调体主方需契合其体质特点。通过数据挖掘技术^[9]可发现，治疗痰湿体质时所使用的 43 首方剂中，除去自拟方、经验方及含有“毒药”半夏之温胆汤、半夏白术天麻汤后，排名前 7 者尚有平胃散、四君子汤、参苓白术散，其中平胃散含药力峻烈之厚朴，四君子汤则无行气之功，而参苓白术散用药平和，且集“顺气”“健脾”“利湿”为一体，故首选参苓白术散作为痰湿体质的调体主方。临床研究表明，参苓白术散不仅可以调理痰湿体质，还有助于改善痰湿体质易患的胸痹、中风等相关疾病^[11-13]。

3.1 参苓白术散组方结构体现痰湿体质用药特点

参苓白术散源自宋代《太平惠民和剂局方》，由人参、茯苓、白术、白扁豆、莲子、山药、砂仁、薏苡仁、桔梗、炙甘草组成。湿之治，不外乎利水渗湿、健脾燥湿、芳香化湿，本方中所含的茯苓、薏苡仁、白术、砂仁即是此法的具体运用。方中人参、山药、莲子益气健脾，以绝“生痰之源”；白扁豆助茯苓、薏苡仁、白术以健脾渗湿；桔梗、砂仁行气导滞以通调水道；炙甘草健脾和中且调和诸药。综观全方，补中气，渗湿浊，行气滞，“燥湿则痰自化，理气则痰运行”，

终使湿去脾健，滞气得行。调体药物若药性峻烈，则有伤正之虞，从用药特点而言，本方所用药物既无“毒性”，又无辛温燥热之“峻药”，方中药物多为药食同源之品，安全性较好，适合痰湿体质的长期调理。此外，本方注重健脾气以除痰湿，方中砂仁、茯苓、白术等不仅针对痰湿气滞，亦是溯本求源，截断“痰湿之所生”而设。纵观全方，结构严谨，标本兼顾，运脾和胃杜生痰之源，理气祛湿消已成之痰，共奏“祛湿化痰、理气健脾”之功。

此外，使用参苓白术散调体时需要注意以下两个方面：① 本方含有众多补气之品，调体是个长期的过程，应“少火生气”，避免“壮火食气”，故常易“峻补元气”之人参为“缓补中气”之党参、太子参；② “渗湿”为本方主要的祛湿途径，“利小便可实大便”，故易出现大便偏干的症状，对于有便秘倾向的患者，可去补脾止泻之莲子，并建议选用生白术。

3.2 参苓白术散可防治痰湿体质易发病症

体质的差异将导致患者对于某些疾病具有易罹性，调理偏颇体质，改善易患疾病的“体质土壤”，可预防体质相关疾病的发生^[7]，此即所谓的“治未病”。大量流行病学研究显示痰湿体质与胸痹^[14]、中风^[15]、消渴^[16]、癯病^[17]等疾病的发生密切相关。以参苓白术散为主方化裁可调治上述病症，预防疾病的发生，以达到“未病先防”的目的。痰浊上扰，壅塞胸中，胸阳不振，发为胸痹，常配伍桂枝、瓜蒌、薤白以襄助宣痹通阳；痰浊内生，滞留经络，蒙蔽清窍，发为中风，常配伍川芎、当归、赤芍等活血通经药；痰湿蕴结，化热酿毒，煎灼津液，发为消渴，常配伍熟地黄、女贞子、墨旱莲等滋阴清热药；痰流经络，阻滞气机，气滞痰凝，发为癯病，常配伍夏枯草、海藻、昆布等软坚散结之品。

3.3 参苓白术散治疗痰湿体质的临床案例

患者，男，43岁，于2023年6月8日初诊。主诉：“体重异常增加2年余”，现病史：患者素体偏胖，近2年因忙于应酬，体重由82 kg增加至98 kg，通过运动、控制饮食等方式效果均不显，遂欲以中药进行调理。刻下：形体肥胖，面部油脂分泌过多，肢倦乏力，动则气喘，晨起咳痰，嗜食肥甘，大便黏滞，夜寐尚安，舌红苔薄白腻，脉沉滑。体格检查：身高178 cm，体重98 kg，体质指数(BMI) 30.93 kg·m⁻²，腰围108 cm，臀围101 cm，腰臀比(WHR)：1.07。血脂四项：

三酰甘油(TG) 1.76 mmol·L⁻¹，总胆固醇(TC) 6.29 mmol·L⁻¹，高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C) 1.54 mmol·L⁻¹，低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C) 4.87 mmol·L⁻¹。空腹血糖5.8 mmol·L⁻¹。根据《中医体质量表》计算转化分，判定体质为痰湿体质，气虚体质倾向(见表1)。中医诊断：肥胖(痰湿体质，气虚体质倾向)；西医诊断：肥胖症、高脂血症。治法：祛湿化痰、理气健脾，方予参苓白术散化裁。处方：党参12 g，茯苓15 g，炒白术15 g，苍术6 g，白扁豆12 g，砂仁6 g(后下)，桔梗12 g，炒薏苡仁15 g，陈皮15 g，焦山楂12 g，泽泻12 g，荷叶15 g。7付，水煎服，日1剂，早晚分服。嘱清淡饮食，每周进行3次45 min的有氧运动。

2023年6月15日复诊，患者诉体重下降0.8 kg，晨起咳痰有所改善，复测《中医体质量表》(见表1)，判定体质为痰湿体质，气虚体质倾向，BMI有所好转(见表2)。上方桔梗减至10 g，焦山楂加至15 g，患者按照此方自行抓药，继续服用2个月以资巩固。

2023年8月17日三诊，患者诉体重较上次就诊时下降9.1 kg，肢倦乏力、动辄气喘显著缓解，但仍见面部油脂分泌、大便黏滞，复测《中医体质量表》(见表1)，判定体质为痰湿体质倾向，复查血脂四项、BMI、WHR均有所好转(见表2)。上方加茯苓至20 g，继续以此方调理3月余。

2023年11月23日四诊，患者诉体重较上次就诊时下降7.5 kg(测得体重为80.6 kg)，面部油脂分泌过多、大便黏滞均见好转，诸恙皆释。复测《中医体质量表》(见表1)，判定体质为平和体质，复查血脂四项、BMI、WHR可见进一步好转(见表2)。上方易党参为太子参12 g，嘱患者保持良好生活方式，不适随诊。

表1 中医体质评分(分)

Tab 1 Traditional Chinese medicine physical fitness score (score)

时间	平和	气虚	阴虚	阳虚	气郁	血瘀	痰湿	湿热	特禀
2023-06-08	54	36	24	27	18	12	56	23	10
2023-06-15	54	35	25	27	17	12	54	23	10
2023-08-17	57	29	24	27	17	12	41	23	10
2023-11-23	62	27	24	27	15	12	29	23	10

3.4 讨论

该患者为中年男性，平素嗜食肥甘厚味，饮食不节则伤脾，脾失健运而运化水液不利，反酿生痰湿于内，故临床表现为形体肥胖，面部油脂分泌过多，大便黏滞等。“脾气虚弱”则肢倦乏

表 2 辅助检查结果

Tab 2 Ancillary examination results

时间	TG/(mmol·L ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	HDL-C/(mmol·L ⁻¹)	LDL-C/(mmol·L ⁻¹)	BMI/(kg·m ⁻²)	WHR
2023-06-08	1.76	6.29	1.54	4.87	30.93	1.07
2023-06-15	—	—	—	—	30.68	1.07
2023-08-17	1.49	5.78	1.64	4.21	27.81	1.02
2023-11-23	1.40	5.17	1.82	3.17	25.44	0.99

力，动则气喘。况脾为生痰之源，肺为贮痰之器，痰湿壅盛故可见晨起咳痰。经体质判定为痰湿体质，气虚体质倾向，进行辨体论治，予参苓白术散化裁以“祛湿化痰、理气健脾”，方中党参补益脾气，白术、苍术、白扁豆健脾化湿，茯苓、薏苡仁利水渗湿，桔梗通调水道，陈皮、砂仁理气燥湿，山楂、泽泻、荷叶化浊降脂。诸药合用，共奏“健脾”“顺气”“化痰”之功。复诊时，患者体重变化不显，但晨起咳痰有所改善，有形之痰渐退，故桔梗减至 10 g，并焦山楂加量以增化浊降脂之功。三诊时，患者体重明显减轻，肢倦乏力、动辄气喘显著缓解，但仍见面部油脂分泌、大便黏滞，提示脾虚渐复，然湿邪难尽，故加茯苓至 20 g 以增利水渗湿之功。四诊时患者体重进一步减轻，面部油脂分泌过多、大便黏滞均见好转，诸症缓解，原有痰湿体质及气虚体质倾向得以纠正，经体质判定为平和体质，且血脂水平回归正常范围，原方易党参为气阴双补之太子参，以防久服温燥之品耗伤阴液。

4 小结

综上所述，痰湿体质与痰湿证虽冠名类似，但两者辨识要素、调治目的不同，故其用药特点及主药主方的筛选上有很大的区别。辨明两者之间的差异，以“辨体-辨病-辨证”的诊疗模式为指导，从“体、病、证”不同层次认识疾病，以人为本，标本兼治，将有助于提高临床遣方用药的准确性及防治疾病的有效性。其中，痰湿体质的辨识需注意“整体性”，调治目的当体现“预防性”，用药特点应契合“持久性”，故治疗上不可局限于化痰祛湿，更应注重“顺气”“健脾”，且忌用“豁痰”“涤痰”之峻剂，以王道缓图，防其耗气伤阴。基于以上体质特点，从而确立调体主药“陈皮-山楂”“白术-苍术”“茯苓-薏苡仁”以及痰湿体质调体主方参苓白术散，以期为痰湿体质辨体调体思路及其相关疾病的预防提供参考。

参考文献

- 王琦, 王睿林, 李英帅. 中医体质学学科发展述评[J]. 中华中医药杂志, 2007, 22(9): 627-630.
- 陈士奎. 关于“证”及“证候”等概念规范化运用问题的讨论[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(10): 1301-1304.
- 李英帅. 体质与证候关系解析[J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32(3): 156-159.
- 王琦, 高京宏. 体质与证候的关系及临床创新思维[J]. 中医药学刊, 2005, 23(3): 389-392.
- 王琦. 9种基本中医体质类型的分类及其诊断表述依据[J]. 北京中医药大学学报, 2005, 28(4): 1-8.
- 刘艳骄. 中医痰湿体质的若干定义及其相互关系[J]. 中医杂志, 2005, 46(5): 395-396.
- 王琦. 中医体质学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 82-83.
- 李振吉. 中医药常用名词术语辞典[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2001: 197-198.
- 张曾亮. 基于数据挖掘的痰湿体质辨体论治复杂网络研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- 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.
- 焦久存, 王彩娟, 魏晓珊, 等. 中西医结合防治痰湿质脑梗死患者 50 例临床研究[J]. 江苏中医药, 2012, 44(7): 19-20.
- 顾菁, 张美玲. 参苓白术散合五苓散加减治疗痰湿体质冠心病合并高脂血症的临床研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(2): 236-241.
- 方松. 参苓白术散联合贝那鲁肽治疗脾虚湿盛型多囊卵巢综合征的临床观察[D]. 成都: 成都中医药大学, 2021.
- 谢婷婷, 魏岩, 姜丽红. 冠心病中医体质研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2020, 26(10): 1570-1573.
- 周韩, 马钟丹妮, 周德生, 等. 303 例急性脑梗死患者中医体质与危险因素的相关性研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(1): 54-58.
- 陈禹, 李玲孺, 姚海强, 等. 痰湿体质、湿热体质与代谢性疾病关系研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(1): 108-110.
- 陈岳祺, 范源, 阮凌玉, 等. 桥本氏甲状腺炎中医体质分布特征与甲状腺激素相关性研究[J]. 西部中医药, 2020, 33(2): 66-68.

(收稿日期: 2024-01-30; 修回日期: 2024-03-15)

国家中药复方专利治疗肾结石的用药规律分析

叶雯佳¹, 黄念文¹, 于珊珊², 毕焕洲^{2*} (1. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700; 2. 北京中医药大学深圳医院, 广东 深圳 518172)

摘要: **目的** 通过对治疗肾结石中药复方专利的挖掘, 研究其配伍用药规律, 为临床治疗肾结石的遣方用药及新药开发提供参考。**方法** 检索 2013 年至 2023 年国家专利数据库治疗肾结石的中药复方专利, 运用中医传承计算平台 (V3.0), 对复方中药物的药性、药味、功效及中药频次进行统计, 通过关联规则和聚类分析等方法分析中药复方的配伍规律。**结果** 共纳入治疗肾结石中药复方 153 首, 涉及中药 554 味, 使用频次前 6 位分别为金钱草、车前子、海金沙、鸡内金、滑石、牛膝。涉及药物药性以寒为主, 其次为平、温; 药味以甘居多, 其次为苦、辛; 功效以利尿渗湿类为主, 其次为补虚类、清热类; 金钱草-鸡内金药对组合出现频次最高, 关联组合“鸡内金, 滑石→金钱草”的置信度最高; 聚类分析得到治疗肾结石的 4 组核心类方。**结论** 现代医家治疗肾结石用药灵活, 以利尿通淋为核心, 辅以补肾益气、活血化瘀, 常用三金排石汤、八正散等经典名方为基础方加减治疗。

关键词: 肾结石; 利尿通淋; 中药复方专利; 用药规律

中图分类号: R283

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)06-1633-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.036

Medication rules of traditional Chinese medicine compounds with national patents for kidney stones

YE Wen-jia¹, HUANG Nian-wen¹, YU Shan-shan², BI Huan-zhou^{2*} (1. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700; 2. Shenzhen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Shenzhen Guangdong 518172)

Abstract: Objective To determine the traditional Chinese medicine patent compounds for kidney stones, and the rules of medication compatibility, to provide a reference for the new drug development and clinical treatment of kidney stones. **Methods** The patents of traditional Chinese medicine compounds for kidney stones from 2013 to 2023 were retrieved from the national patent database. The Traditional Chinese Medicine Inheritance Calculation Platform (V3.0) was used to analyze the pharmacological properties, flavor, efficacy and frequency of traditional Chinese medicine compounds, and the compatibility of traditional Chinese medicine compounds was analyzed by association rules and cluster analysis. **Results** Totally 153 patented traditional Chinese medicine formulas for kidney stones were included, involving 554 herbs. The top 6 herbs in terms of frequency of use were *Desmodium*, *Plantago asiatica*, *Lygodium japonicum*, Chicken's Gizzard-membrane, Talc, and *Achyranthes bidentata*. The properties of the herbs were mainly coldness, followed by neutrality and warmth in nature. The flavors included predominantly sweet, followed by bitter and spicy. The main effects covered diuresis and dampness dispelling, followed by tonifying deficiency and heat clearing. The combination of “*Desmodium*-Chicken's Gizzard-membrane” appeared most frequently, and the combination with best effect was “Chicken's Gizzard-membrane, Talc → *Desmodium*”. Cluster analysis identified 4 core formula groups for kidney stones. **Conclusion** Contemporary medical practitioners adopt flexible medication combinations for kidney stones, with promoting diuresis as the core. Supplementary measures include tonifying the kidneys, invigorating qi, activating blood circulation, and resolving stasis. Commonly used classic formulas include Sanjin Paishi

作者简介: 叶雯佳, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中西医结合治疗泌尿科疾病研究, email: 13820883389@163.com *通信作者: 毕焕洲, 男, 主任医师, 主要从事中西医结合治疗泌尿科疾病研究, email: bihuanzhou@163.com

decoction, Bazheng powder, and other modified formulations.

Key words: kidney stone; diuresis; patent of traditional Chinese medicine compound; medication rule

肾结石是泌尿系统的常见疾病,是由尿液中的某些晶体物质及有机基质在泌尿系统中的异常积聚引起。近年来随着人们的生活方式、饮食习惯、所处环境的改变^[1],我国肾结石的发病率呈逐年上升的趋势,中国成年人肾结石患病率约为 1/17^[2],且肾结石患者在 5 年内的复发率高达 50%^[3]。肥胖^[4]、糖尿病^[5]、心血管疾病^[6]、代谢综合征^[7]等均是造成结石形成的危险因素,结石会增加患者患高血压、慢性肾病甚至终末期肾病等疾病的风险^[8],给社会经济和医疗造成严重的负担。中医药对肾结石的治疗及预防有一定的优势及良好的效果。因此,本研究通过使用中医传承计算平台(V3.0),采用数据挖掘的方法,收集国家专利数据库治疗肾结石的中药复方专利,对中药复方中的药物进行系统性的分析,为临床在治疗肾结石排石、溶石及预防结石复发 3 个阶段提供更多的治疗思路。

1 资料与方法

1.1 数据来源

登录中国专利公布公告网(<http://epub.cnipa.gov.cn>),点击“高级查询”界面,选中“发明公布”“发明授权”,检索时间为 2013 年 11 月至 2023 年 12 月,将“肾结石 and 中药”“泌尿系结石 and 中药”作为检索式进行检索,初步获得近十年有关治疗肾结石的中药复方 212 首。

1.2 筛选标准

1.2.1 纳入标准 ① 治疗肾结石的中药复方;② 治疗肾结石含中药提取物专利;③ 专利项目名称无治疗肾结石,但专利详情页中表述可治疗肾结石的中药复方。

1.2.2 排除标准 ① 属于食品类的复方;② 属于保健品专利;③ 摘要及说明书中未给出具体药物组成;④ 药物用量及组成相同的复方仅录 1 次。

1.3 数据规范

录入中药名及性味归经等以《中国药典》^[9](2020 年版)为标准,并参考《中华本草》^[10]进行药物名称规范,如“化金丹”改为“响铃草”,“画眉草”改为“星星草”,“竹叶参”改为“竹节参”,“山莴苣”改为“败酱草”等,由于炮制方法不同对药效会产生影响,故保留“生地黄”“熟地黄”等。

1.4 数据分析

根据纳入标准与排除标准,最终筛选出符合条件的 153 首中药复方,采用双人双输入的录入方法,将复方的药物录入 Excel 表中。采用中医

传承计算平台(V3.0)对符合纳入标准的中药复方中的中药进行药物频次分析、药物性味归经分析、聚类分析以及关联分析。

2 结果

2.1 药物频次统计

在 153 个中药复方中,共有 554 味中药,总频次为 1889 次,其中金钱草的使用频次最高,为 85 次(见表 1)。

表 1 治疗肾结石中药复方专利药物频次统计分布(前 20 项)

Tab 1 Frequency of patent of traditional Chinese medicine compound for kidney stones (top 20)

序号	中药名	频次	序号	中药名	频次
1	金钱草	85	11	木通	25
2	车前子	64	12	篇蓄	23
3	海金沙	63	13	黄芪	20
4	鸡内金	59	14	冬葵子	20
5	滑石	47	15	泽泻	20
6	牛膝	45	16	白茅根	19
7	甘草	43	17	大黄	19
8	石韦	37	18	白芍	19
9	瞿麦	28	19	菟丝子	18
10	茯苓	25	20	琥珀	16

2.2 药物药性、药味分布

对所纳入药物进行分析,发现药物药性以寒(760 次)为主,其次为平(350 次)、温(295 次);药物的药味以甘(892 次)为主,其次为苦(635 次)、辛(331 次)。药物的性味分布具体情况见表 2。

表 2 治疗肾结石中药复方专利药物药性、药味分布

Tab 2 Pharmacological properties and flavors of patent of traditional Chinese medicine compound for kidney stones

药性	频次	药味	频次
寒	760	甘	892
平	350	苦	635
温	295	辛	331
凉	29	咸	209
热	17	酸	103

2.3 药物归经统计

对所纳入药物归经进行分析,药物归经以肝、肺、肾经为主,其余依次为胃、脾、膀胱、心、小肠、胆、大肠等(见图 1)。

2.4 药物功效统计

药物的功效归类以《中药学》(第一版)^[11]为标准进行标注。对所纳入药物功效进行分析,发现按功效可将药物分为 19 类,以利尿渗湿类药物使用频次最高,其次以补虚类、清热类、活血

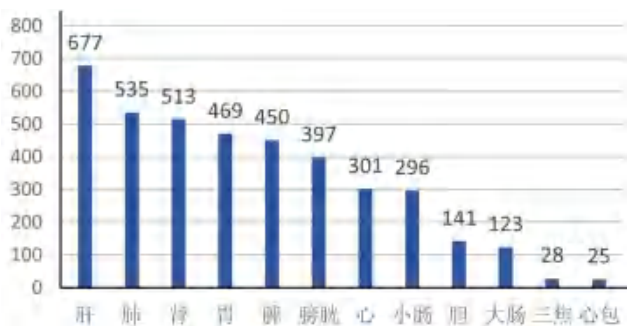


图 1 治疗肾结石中药复方的中药归经频次图
Fig 1 Frequency of traditional Chinese medicine meridian affiliations in patent of traditional Chinese medicine compound

化痰类等药物，药物功效分类前 10 项具体情况可见表 3。

2.5 药物关联规则统计

关联规则主要统计方剂数据中涉及的药物组合累计出现的频次、平台中显示分析的处方数量、涉及的具体药物数量等，主要参数为“支持度个

表 3 治疗肾结石中药复方专利药物功效统计分布 (前 10 项)
Tab 3 Statistical distribution of the efficacy of patent of traditional Chinese medicine compound for kidney stones (top 10)

编号	功效	频次	编号	功效	频次
1	利水渗湿类	444	6	消食类	69
2	补虚类	226	7	解表类	58
3	清热类	216	8	泻下类	42
4	活血化瘀类	137	9	止血类	40
5	理气类	73	10	祛风湿类	38

数”以及“置信度”。设置支持度个数 = 25，置信度为 0.6。在排名前 20 的药对组合中，金钱草 - 鸡内金为使用频次最高的药对，共现度为 50 次，其次分别为金钱草 - 海金沙、金钱草 - 车前子等药对，具体高频药对可见表 4。选择“规则分析”对药对组合进行分析，共提取出 29 条关联规则，其中置信度较高的有“鸡内金，滑石→金钱草”“车前子，鸡内金→金钱草”等，具体关联规则见表 5。选择“网络拓扑”，将出现频次较高的药物、药对、药物组合等以网络图的形式展现，见图 2。

表 4 治疗肾结石中药复方专利使用频次排名前 20 的药对组合 (支持度个数 = 25，置信度 = 0.6)

Tab 4 Frequent combination of patent of traditional Chinese medicine compound for kidney stones (top 20)(support count = 25, confidence = 0.6)

序号	药对组合	频次	序号	药对组合	频次
1	金钱草，鸡内金	50	11	鸡内金，滑石	31
2	金钱草，海金沙	48	12	海金沙，滑石	31
3	金钱草，车前子	45	13	车前子，鸡内金	30
4	海金沙，鸡内金	42	14	金钱草，石韦	29
5	金钱草，滑石	39	15	金钱草，鸡内金，滑石	29
6	金钱草，海金沙，鸡内金	36	16	金钱草，车前子，海金沙	29
7	车前子，海金沙	36	17	金钱草，海金沙，滑石	28
8	金钱草，牛膝	32	18	金钱草，车前子，鸡内金	28
9	车前子，滑石	32	19	海金沙，石韦	27
10	金钱草，甘草	31	20	海金沙，牛膝	27

表 5 治疗肾结石中药复方专利置信度排名前 20 的关联分析 (支持度个数 = 25，置信度 = 0.6)

Tab 5 Association of the top 20 confidence-ranked patent of traditional Chinese medicine compound for kidney stones (support count = 25, confidence = 0.6)

序号	关联规则	置信度	序号	关联规则	置信度
1	鸡内金，滑石→金钱草	0.94	11	金钱草，海金沙→鸡内金	0.75
2	车前子，鸡内金→金钱草	0.93	12	金钱草，滑石→鸡内金	0.74
3	海金沙，滑石→金钱草	0.90	13	石韦→海金沙	0.73
4	海金沙，鸡内金→金钱草	0.86	14	金钱草，鸡内金→海金沙	0.72
5	鸡内金→金钱草	0.85	15	甘草→金钱草	0.72
6	滑石→金钱草	0.83	16	金钱草，滑石→海金沙	0.72
7	车前子，滑石→金钱草	0.81	17	鸡内金→海金沙	0.71
8	车前子，海金沙→金钱草	0.81	18	牛膝→金钱草	0.71
9	石韦→金钱草	0.78	19	石韦→鸡内金	0.70
10	海金沙→金钱草	0.76	20	车前子→金钱草	0.70

2.6 核心药物聚类分析

将所纳入的中药复方进行聚类分析，根据临床经验，将聚类个数设置为 4，得到治疗肾结石中药复方专利 4 个核心类方，聚类分析结果见表 6。

3 讨论

肾结石归属于中医学“石淋”“砂淋”“血

淋”“腰痛”等范畴。《中藏经》云：“虚伤气，邪热渐强。结聚而成砂石，又如水煮盐，火太水少，盐渐成石之类。”肾结石以肾虚为本，以湿、热、滞、瘀为标，多为本虚标实、虚实夹杂。中医药治疗肾结石具有其独特优势，如三金汤加减可通过降低患者体内炎症因子水平、加强尿路平

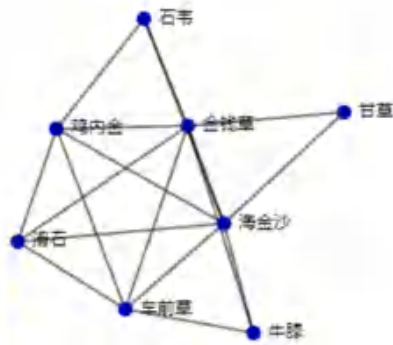


图 2 治疗肾结石中药复方专利关联规则图
Fig 2 Association rules of patent of traditional Chinese medicine compound for kidney stones

表 6 治疗肾结石中药复方专利核心聚类方药组合 (聚类个数 = 4)
Tab 6 Core cluster of patent of traditional Chinese medicine compound for kidney stones (number of clusters = 4)

序号	核心聚类方药组合
1	金钱草, 海金沙, 鸡内金, 石韦, 滑石, 车前子
2	金钱草, 鸡内金, 茯苓, 车前子, 海金沙, 甘草
3	白花蛇舌草, 干姜, 牛膝, 蒲公英, 白茅根, 海金沙
4	金钱草, 车前子, 海金沙, 甘草, 鸡内金, 滑石

滑肌蠕动, 减少患者的炎症反应, 提高患者排石率^[12]。因此对治疗肾结石中药复方专利中的药物进行数据挖掘分析十分必要。

3.1 利尿通淋为核心治法

本研究共纳入 153 个复方, 包含 554 味中药, 19 类药物治法, 可知治疗肾结石用药种类较为广泛。统计分析发现, 淋证的核心法则为利尿通淋, 其核心病机均为水液运行不利^[13]。根据药物频次统计, 前 10 项药物中, 7 项为利尿渗湿类药物, 其中车前子、海金沙、滑石、石韦、瞿麦为利尿通淋类药物, 金钱草、牛膝亦有利尿通淋之功。利尿通淋类药物多为苦、寒或甘、寒, 与本研究统计结果一致。中药复方专利中治疗肾结石的中药药性亦以寒性居多, “热者寒之” “疗热以寒药”, 以寒性药治以热病; 药味以甘、苦居多, 甘能和、能缓, 以调和药性, 缓急止痛; 苦能泻、能燥、能坚, 以清利下焦湿热, 燥湿坚阴。《诸病源候论》中提到: “诸淋者, 由肾虚而膀胱热故也”, 所提及之热为湿热而非实热。利尿通淋类药物既能降泄, 走下焦, 以清利下焦水湿, 水湿去则热无所依; 性多为寒则能清热。

根据药物关联分析可知, 金钱草-鸡内金为治疗肾结石最常见的药对, 其次为金钱草-海金沙。关联规则中频次及置信度排名前 5 的药对均为金钱草、鸡内金、海金沙、车前子、滑石等药物间的配伍。在药物聚类分析中, 可将高频药聚类分析分为 4 个类方, 其中第 1 类、第 2 类、第 4

类均包含金钱草、海金沙、鸡内金及车前子, 充分说明了治疗肾结石的中药复方以利尿通淋类药物最为常见, 利尿通淋是治疗肾结石的核心法则。第 1 个类方中的药物为三金排石汤的核心药物。研究发现, 三金排石汤可缓解因结石对输尿管的刺激产生的炎症反应, 降低尿液中的尿酸和草酸含量, 避免结石进一步增大, 有助于结石的排出, 减缓患者的疼痛, 减少血尿情况的发生^[14]; 还可抑制氧化应激反应以及调节尿液代谢平衡, 进而改善肾结石患者的临床症状, 减少复发率^[15]。

三金排石汤中金钱草为排石要药, 其含黄酮类、生物碱、挥发油类、三萜类、多糖类等成分, 具有抗结石、抗炎、利胆利尿、抗氧化以及保护心脑血管等药理作用^[16]。金钱草总黄酮可通过阻断 p38/MAPK 通路抑制肾小管上皮细胞的过度自噬和凋亡, 减少对肾小管上皮细胞的损伤, 从而抑制泌尿系结石的形成^[17]; 鸡内金又名化石胆, 为鸡的砂囊内膜, 其主要成分包括胃激素、角蛋白等, 可调节胃肠功能^[18], 具有健脾消食, 消积化石之效; 金钱草配伍鸡内金, 具有溶石、动石、排石之功^[19]; 海金沙利尿通淋, 助金钱草排石之功; 车前子清热利尿、渗湿止泻, 可通过抑制肾脏草酸钙结晶沉淀, 预防肾结石的形成^[10]; 石韦利尿通淋, 凉血止血, 具有抗菌、抗病毒、肾保护作用; 滑石利尿通淋, 清热解暑。此方以金钱草、鸡内金、海金沙为君药, 清下焦、膀胱湿热, 利尿通淋化石; 滑石、车前子、石韦清热燥湿、利尿通淋为臣, 从多层次多机制达到利尿通淋、清热排石的功效。在高频药物中, 车前子、滑石、瞿麦、木通、篇蓄、大黄等为八正散加减, 滑石、木通为君, 清热利湿; 篇蓄、瞿麦、车前子为臣, 佐以君药; 大黄泻下, 导湿热外出; 甘草调和诸药, 诸药共奏清热泻火、利尿通淋之效。

3.2 补肾益气为重要治法

中医认为, 肾结石为有形之邪积聚, 堵塞水道, 则水液无以运化。人体的水液代谢有赖于肺之宣发肃降、脾之运化、肾之气化、肝之疏泄条达。肝为风木之脏, 主疏泄, 调畅一身之气机。膀胱气化有赖于肝之疏泄及三焦气化, 肝气郁结或疏泄不及, 均影响三焦气化, 导致水液运行不畅。肺为水之上源, 主治节, 通过肺气宣发肃降, 外宣津液至皮毛, 内降水液以气流转至膀胱, 肺气郁闭则水道不通, 从而影响膀胱气化, 肺气宣则水液得以下^[20]。肾主水, 肾气充足则气化功能正常, 膀胱开阖有度, 水液运行通畅; 肾气亏虚, 气化失司, 水液内停, 久之则郁而化热, 煎熬尿液, 聚之成砂石, 因此在治疗肾结石的任一

阶段, 均当顾护肾气。

中药复方专利中治疗肾结石的药物归经以肝经、肺经、肾经居多, 气行则水行, 通过调畅气机, 促进水液运行通畅, 同时顾护肾气, 温煦、推动三焦通调水道。药味以甘味居多, 甘味能补、能和、能缓, 具有补益肝肾、调和药性以及缓急止痛等功效。补虚类药物以甘草、黄芪、白术补脾益气, 菟丝子、杜仲、续断补益肝肾。理气类药物出现频次最高为香附, 搭配郁金理气疏肝止痛。若肾结石长期反复发作, 则脾肾虚损, 当注重补益。

3.3 活血化瘀为潜在治法

结石为有形之邪, 阻碍气血运行, 导致气滞血瘀或血脉瘀阻。虽临床多数肾结石患者无明显症状, 若肾结石掉落梗阻尿路, 则会出现尿频、尿急、尿痛、尿血等症状。有形之邪阻滞, 不通则痛, 导致血行不畅, 轻则无明显症状, 或隐痛; 重则腰酸背痛, 甚至绞痛频发。活血化瘀则促进气血调达, 从而有利于结石排出及预防结石形成。药味除甘味、苦味外, 以辛味居多, 辛味能散、能行, 具有发散、行气血之效。治疗肾结石药物中活血化瘀类药物占 9.44%, 其中牛膝亦为高频药物之一, “走而能补, 性善下行”, 可活血化瘀、利尿通淋; 在关联规则中, 牛膝亦常与金钱草、海金沙配伍。聚类分析第 3 个类方中, 以海金沙利尿通淋, 蒲公英、白花蛇舌草清热利湿, 牛膝、白花蛇舌草活血化瘀止痛, 白茅根凉血止血, 可用于治疗结石梗阻, 绞痛频发的肾结石。

4 结论

现代医家治疗肾结石以利尿通淋为核心, 辅以补肾益气、活血化瘀, 并依据兼症对组方进行加减化裁, 从而达到溶石、排石以及预防肾结石的形成的作用。湿热蕴结日久, 大量使用清利药物及活血化瘀之品易损伤气阴, 当酌情加入补气、滋阴之品以益气增水行石。

本研究基于中医传承计算平台 (V3.0), 对国家复方专利数据库中治疗肾结石的中药复方专利的用药规律进行分析研究, 展示了治疗肾结石的常用药物及其药味、药性、归经、功效; 通过关联分析、聚类分析得出治疗肾结石中药复方中常用的中药药对、组方用药的倾向规律及核心药物。中药复方专利大部分是医者通过临床经验所得, 多为反复实践且行之有效的复方。亦有少数药物为医者常用经验用药, 如响铃草味苦、微酸、平, 归肺、肝、肾经, 有养肝肾、止咳喘、利湿之效, 亦可消炎、利尿; 星星草味甘、淡、凉, 具有疏风清热、利尿之功效, 常用于膀胱结石、肾结石、肾炎、膀胱炎等。因此本次研究结果更为贴合临

床, 为临床治疗肾结石提供更多的思路, 但实际疗效仍需进一步通过临床实践来验证。

参考文献

- [1] Ferraro PM, Bargagli M, Trinchieri A, et al. Risk of kidney stones: influence of dietary factors, dietary patterns, and vegetarian-vegan diets [J]. *Nutrients*, 2020, 12 (3): 779.
- [2] Ferraro PM, Curhan GC. Long-term adverse outcomes of urolithiasis [J]. *Am J Kidney Dis*, 2018, 72 (6): 774-775.
- [3] Khan SR, Pearle MS, Robertson WG, et al. Kidney stones [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2016, 2: 16008.
- [4] Taylor EN, Stampfer MJ, Curhan GC. Obesity, weight gain, and the risk of kidney stones [J]. *JAMA*, 2005, 293 (4): 455-462.
- [5] Taylor EN, Stampfer MJ, Curhan GC. Diabetes mellitus and the risk of nephrolithiasis [J]. *Kidney Int*, 2005, 68 (3): 1230-1235.
- [6] Ferraro PM, Taylor EN, Eisner BH, et al. History of kidney stones and the risk of coronary heart disease [J]. *JAMA*, 2013, 310 (4): 408-415.
- [7] Wong Y, Cook P, Roderick P, et al. Metabolic syndrome and kidney stone disease: a systematic review of literature [J]. *J Endourol*, 2016, 30 (3): 246-253.
- [8] Zeng GH, Mai ZL, Xia SJ, et al. Prevalence of kidney stones in China: an ultrasonography based cross-sectional study [J]. *BJU Int*, 2017, 120 (1): 109-116.
- [9] 中国药典 2020 年 . 一部 [S]. 2020: 3-402.
- [10] 国家中医药管理局《中华本草》编委会 . 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [11] 高学敏 . 中药学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2004.
- [12] 郝思达, 刘敏, 王业强 . 中频脉冲联合三金汤对输尿管结石碎石术后辅助排石及预后的影响分析 [J]. *中华中医药学刊*, 2023, 41 (8): 145-147.
- [13] 王海林, 庞宗然, 战志华, 等 . 淋证用药配伍规律及祖方探源 [J]. *陕西中医*, 2005, 26 (3): 262-264.
- [14] 叶华, 曹超, 甘晶 . 坦索罗辛胶囊联合三金排石汤治疗输尿管下段结石临床效果 [J]. *深圳中西医结合杂志*, 2022, 32 (21): 44-46.
- [15] 路亚洲, 张磊, 李彬, 等 . 三金排石汤加味对钬激光碎石术后湿热下注证肾结石患者氧化应激及尿液代谢的影响 [J]. *河北中医药学报*, 2023, 38 (6): 19-24.
- [16] 黄盼, 周改莲, 周文良, 等 . 广金钱草的化学成分、药理作用及质量控制研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39 (7): 135-139.
- [17] 解海杰, 高宏伟, 王军, 等 . 金钱草总黄酮对草酸钙结晶肾损伤的作用机制 [J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2018, 24 (1): 58-63.
- [18] 黄伟, 王伽伯, 谭鹏, 等 . 基于消化酶活力检测的鸡内金质量生物检定方法研究 [J]. *药学报*, 2021, 56 (5): 1453-1459.
- [19] 李舒, 刘世鹏, 刘玉姿, 等 . 石志超应用鸡内金经验撷菁 [J]. *吉林中医药*, 2022, 42 (6): 660-663.
- [20] 杨九天, 郭军, 高庆和, 等 . 基于“脏腑别通”理论探讨男性下尿路症状的证治 [J]. *北京中医药大学学报*, 2024, 47 (3): 302-306.

(收稿日期: 2024-01-17; 修回日期: 2024-03-29)

基于 Apriori 算法与网络关联的含桃仁方剂应用规律探析

邹远荣, 夏泽冰, 黄建萍, 井亚江, 王七龙, 颜永刚*, 彭亮, 张岗, 高静, 沈霞, 王红艳*

(陕西中医药大学药学院/陕西省秦岭中草药应用开发工程技术研究中心/“秦药”研发重点实验室, 陕西 咸阳 712046)

摘要: **目的** 运用 Apriori 算法挖掘含桃仁方剂的配伍规律及桃仁炮制品、每日用量与主治病证及病证类型的关联性, 为桃仁的临床实践及现代应用提供参考。**方法** 检索《中医方剂大辞典》中含桃仁的方剂, 运用 Excel 2017、IBMSPPSSModeler 18.0、Cytoscape 3.9.1 软件、Chiplot 网站进行频次统计及关联规则分析。**结果** 共收集含桃仁方剂 1563 首, 多来源于宋朝, 涉及 486 味中药, 以补血药、理气药、温里药为主; 主治病证 366 种, 可归为 30 种病证类型, 高频病证为闭经、跌打损伤、癥瘕积聚等, 高频病证类型为气血津液病证、产后病证、月经病证等; 桃仁炮制品以桃仁为主, 其次为麸炒桃仁、燀桃仁, 其中桃仁关联病证和病证类型最多, 麸炒桃仁与气血津液病证关联性最好; 桃仁每日用量主要分布于 < 3 g、5 ~ 10 g、3 ~ 4.9 g, 其中桃仁 < 3 g 与主治病证跌打损伤、产后腹痛、产后便秘等相关联, 与病证类型产后病证关联性最好; 3 ~ 4.9 g、5 ~ 10 g 与主治病证跌打损伤关联性最好, 与病证类型产后病证、气血津液病证等相关联。通过关联规则分析得到桃仁治疗闭经的核心配伍为当归、大黄、肉桂、川芎, 治疗跌打损伤的核心配伍为当归、红花、大黄、赤芍, 治疗气血津液病证的核心配伍为当归、肉桂、木香、大黄, 治疗产后病证的核心配伍与同气血津液病证相同, 仅有主次之分。**结论** 通过关联规则分析桃仁炮制品、每日用量与主治病证及病证类型间的关系, 揭示了桃仁在具体病证中的应用特点, 结果可为桃仁的临床合理应用及后续新方的研发提供参考与新思路。

关键词: 桃仁; 数据挖掘; 《中医方剂大辞典》; Apriori 算法

中图分类号: R283

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)06-1638-07

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.037

方剂是以中医药理论为指导, 由多味中药配伍而成, 是连接“医”和“药”的媒介, 中药之间的配伍规律是研究方剂的关键, 方剂中各中药的配伍具有复杂性、模糊性、非线性等特点, 难以通过单一方法对其关联性进行分析, 因此需要寻找合适的方法阐明中药配伍关系及方证关系^[1-2]。数据挖掘是指从大量不完整, 模糊且随机的数据中提炼人们事先未知但具有潜在规律性、有价值信息的过程, Apriori 算法不仅能探索中药治疗某种疾病的组方规律, 还能挖掘药物用量、炮制品、剂型等与证型及所治疾病间的联系, 在中医药数据挖掘领域中被广泛应用^[3-5]。

中药桃仁是《古代经典名方目录(第一批)》桃核承气汤及其类方的重要组成部分, 入药最早见于《神农本草经》, 来源于蔷薇科植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch 或山桃 *P. davidiana* (Carr.) Franch. 的干燥成熟种子, 能活血祛瘀、润肠通便、止咳平喘, 在我国应用历史悠久, 具有深入开发和利

用的价值^[6-8]。目前针对含桃仁方剂中桃仁的炮制品、每日用量、配伍规律虽有一定研究, 但两者之间的关联性相对欠缺, 在具体病证中发挥的配伍优势仍有待进一步探索。《中医方剂大辞典》收录了自秦汉以来的 9 万余首方剂, 凝结了中医古代方剂的精华, 书中对方剂的主治病证进行了索引及归类, 是研究主治病证用药规律、中药配伍规律、方剂临床运用等的权威性工具书。本文以《中医方剂大辞典》为数据库, 运用 Apriori 算法及关联网络深入挖掘含桃仁方剂配伍规律及桃仁炮制品、每日用量与具体病证及病证类型的关联性, 以期为中医临床更好地应用桃仁提供参考。

1 资料与方法

1.1 数据来源及筛选

以“桃仁”“桃核仁”为检索词, 收集《中医方剂大辞典》中含有桃仁的方剂。排除标准: ① 中药数 > 20 味的方剂; ② 临证加减中含有桃仁的方剂; ③ 方剂来源、药性缺失者; ④ 方剂含有《中

基金项目: 陕西省中医药管理局项目 (No.2021-GJ-JC004); 国家自然科学基金项目 (No.81973592)。

作者简介: 邹远荣, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药配伍与中药药效成分研究, email: 2112079181@qq.com * **通信作者:** 颜永刚, 男, 教授, 主要从事中药资源开发与中药配伍研究, email: yunfeng828@163.com; 王红艳, 女, 讲师, 主要从事针灸推拿教学工作, email: fengyun8817@163.com

国药典》2020 年版、《中药大辞典》及《中华本草》均不收录的药物；⑤ 主治病证不明确，《中医方剂大辞典》第十一册病证索引页检索不到者。

1.2 数据规范

以《中国药典》2020 年版为标准，参照《中药大辞典》^[9]、《中华本草》^[10]对中药同物异名情况进行规范。药物的不同炮制方法、不同地域及别称均以标准名称规范，如“熟大黄”“醋大黄”规范为大黄，“怀牛膝”“川牛膝”规范为牛膝，“元胡”“玄胡索”规范为延胡索；同种中药炮制前后性味功效发生改变，则按照炮制方法录入，如“生地黄”“熟地黄”；若对性味的描述有修饰词则去除，如微苦、微温等统称为苦、温。

1.3 桃仁用量折算

依据《关于改革中医处方用药计量单位的请示报告的通知》对中药用量进行单位转换^[11]，即 1 斤 = 16 两 = 500 g，1 两 = 10 钱 = 31.25 g，1 钱 = 10 分 = 3.125 g，1 分 = 0.3125 g；依据《中医方剂大辞典》第十一册特殊计量页对用法用量中含有方寸匕、钱匕者进行单位转换，即 1 方寸匕金石药 = 2 g，1 方寸匕草木药 = 1 g，1 钱匕 = 0.7 方寸匕；方剂中以“枚”“粒”“个”为计量单位的中药，参照韩美仙^[12]的实测结果进行单位转换，如 100 枚水蛭 = 163 g，50 粒桃仁 = 13.4 g，70 个杏仁 = 22.7 g；有“等分”“3 至 5 钱”等剂量模糊词则不纳剂量统计范畴。

1.4 方剂主治病证归类

依据《中医方剂大辞典》第十一册病证索引页对检索到的主治病证进行归类，如癥瘕积聚、虚劳、痲疹等归为气血津液病证；产后腹痛、产后恶露不尽、产后恶露不行等归为产后病证；闭经、月经不调、痛经等归为月经病证；类似地，对其他主治病证进行归类。

1.5 统计分析

运用 Excel 软件建立桃仁方剂信息数据库，对方剂朝代、剂型、中药频数、药性、主治病证、桃仁炮制品、每日用量等进行分析。借助 IBM-SPSSModeler18.0 的 Apriori 算法及 Cytoscape3.9.1 软件、Chiotplot 网站 (<https://www.chiotplot.online/>)对方剂用药规律及桃仁炮制品、每日用量与主治病证及病证类型进行关联分析及可视化展示。

2 结果

2.1 方剂朝代及剂型分布

检索发现单用桃仁及药味数在 20 味以上的方剂极少，以 5 ~ 15 味常见，6 ~ 12 味居多，与古代经典名方及现代临床常用方味数相当，因此选择药味数在 20 味以内的方剂进行研究，最终有 1563 首方剂被纳入研究范围。方剂来源整理发现宋朝收录方剂最多，占比 41.33%。剂型分析发现自唐朝以后，有新剂型煮散出现，煮散和丸剂的运用在宋朝达到了鼎盛，占比远大于汤剂，然而自明朝后，应用又显著减少，栓剂、片剂、合剂等新剂型在清朝以后出现，结果见表 1。

表 1 含桃仁的方剂出现的朝代及剂型分布

朝代	剂型频数 / 首												合计 / 首	
	汤剂	煮散	丸剂	散剂	膏剂	酒剂	粥剂	贴剂	栓剂	洗剂	片剂	合剂		其他
东汉	2		3											5
南齐	2													2
唐朝	6	26	23	4	5	1								65
宋朝	10	251	287	74	12	5	3						4	646
元朝	3	5	16	2	1									27
明朝	95	94	107	24	7	2		2						331
清朝	262	17	65	23	4	4	1	2		1			5	384
近现代	51	4	27	6	4				1	2	3	2	3	103
合计 / 首	429	399	528	133	33	12	4	4	1	3	3	2	12	1563

2.2 含桃仁方剂中药频次及药性分布

1563 首方剂涵盖中药 486 味，频数 ≥ 150 的中药有 20 味，参照《中药学》第 10 版教材对其进行功效分类，可分为 10 类，以补血药、理气药、温里药为主，高频配伍中药为当归、肉桂、大黄等，结果见表 2。配伍药物的药性总频次为 9348 次，主要为温性 (60.23%)、平性 (23.79%)、热性 (11.21%)，结果见图 1A；药味总频次为 20 920 次，主要为辛味 (35.15%)、苦味 (30.70%)、甘味 (23.16%)，结果见图 1B；脏腑归经总频次 29 963 次，主要归脾

经 (23.54%)，其次为心、胃经 (频次 > 4000)，结果见图 2。

2.3 主治中医病证及病证类型分布统计

含桃仁方剂主治中医病证 366 种，频数 > 20 的病证有 14 种，排名靠前的为闭经 (5.82%)、跌打损伤 (5.07%)、癥瘕积聚 (3.96%)，结果见表 3。主治病证可归属于 30 种病证类型，频数 > 20 的病证类型有 16 种，排名靠前的为气血津液病证 (20.68%)、产后病证 (12.88%)、月经病证 (11.21%)，结果见表 4。

表 2 含桃仁的方剂高频中药统计分析 (频数 ≥ 150)

药材类别	中药名称	频数	频率 / %	药材类别	中药名称	频数	频率 / %
补气药	甘草	431	3.36	理气药	木香	333	2.60
	人参	162	1.26		陈皮	177	1.38
补血药	当归	826	6.45	枳壳	166	1.30	
	赤芍	284	2.22	青皮	165	1.29	
发散风热药	白芍	229	1.79	清热凉血药	生地黄	308	2.40
	柴胡	152	1.19	牡丹皮	226	1.76	
活血调经药	红花	364	2.84	驱虫药	槟榔	213	1.66
	牛膝	207	1.62	温里药	肉桂	504	3.93
活血止痛药	川芎	430	3.36	干姜	173	1.35	
	延胡索	160	1.25	泻下药	大黄	446	3.48

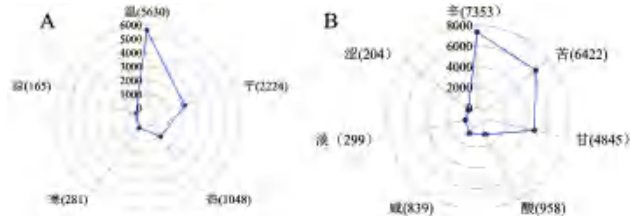


图 1 含桃仁的方剂中药四气 (A) 五味 (B) 的统计分析

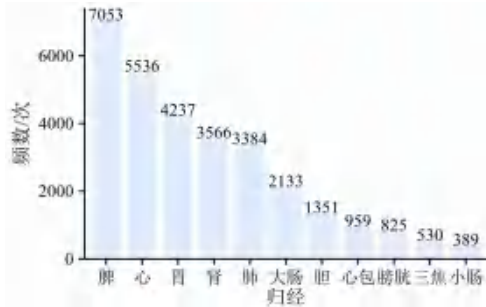


图 2 含桃仁的方剂中药归经的统计分析

表 3 含桃仁的方剂的主治病证 (频数 > 20)

中医病证	频数	频率 / %	中医病证	频数	频率 / %
闭经	94	5.82	腹痛	34	2.11
跌打损伤	82	5.07	产后腹痛	33	2.04
癥瘕积聚	64	3.96	疥癣	31	1.92
便秘	58	3.59	瘀证	30	1.86
疝气	57	3.53	痛经	25	1.55
虚劳	57	3.53	腰痛	24	1.49
月经不调	45	2.79	蓄血证	22	1.36

表 5 桃仁炮制品分布

炮制名称	炮制方法	频数 / 次	频率 / %	炮制名称	炮制方法	频数 / 次	频率 / %
桃仁	—	706	45.17	面炒桃仁	去皮尖, 面炒	3	0.19
麸炒桃仁	去皮尖, 麸炒微黄	364	23.29	桃仁制霜	去皮尖, 取霜	2	0.13
燂桃仁	去皮尖 / 去皮尖研泥	244	15.61	焙桃仁	去皮尖, 焙	1	0.06
炒桃仁	去皮尖, 炒	214	13.69	蛤粉炒	去皮尖, 蛤粉炒	1	0.06
熬桃仁	去皮尖, 熬	17	1.09	其他	吴茱萸炒、盐炒、白术煮等	11	0.70

2.5 桃仁用量分布及与主治病证、病证类型的关联分析

在组方中明确规定桃仁配伍用量的方剂共 1314 首, 其中依据用法用量可转换为每日用量的方剂共 344 首, 占比 26.18%, 由此可知, 绝大多

表 4 含桃仁的方剂主治病证分类 (频数 > 20)

病证分类	频数	频率 / %	病证分类	频数	频率 / %
气血津液病证	334	20.68	痢疽疮疡	49	3.03
产后病证	208	12.88	心系病证	36	2.23
月经病证	181	11.21	儿科病证	34	2.11
脾胃病证	157	9.72	皮肤科病证	32	1.98
外感病证	138	8.54	妇科杂证	27	1.67
肝胆病证	106	6.56	妊娠病证	25	1.55
伤科病证	92	5.70	肺系病证	25	1.55
肢体经络病证	70	4.33	诸寒诸热病证	21	1.30

2.4 桃仁炮制品分布及与主治病证、病证类型的关联分析

1563 首方剂涉及 20 种桃仁炮制品, 除桃仁 (未说明炮制方法) 外, 以麸炒桃仁频次最高, 其次为燂桃仁、炒桃仁, 结果见表 5。分别建立桃仁炮制品 (频数 ≥ 17) 与主治病证及病证类型关联网络, 结果见图 3。由图 3A 知, 桃仁与跌打损伤关联性最高 (关联数为 54), 其次为便秘、闭经 (关联数分别为 41、34), 麸炒桃仁与闭经、癥瘕积聚关联性相同 (关联数为 29)。由图 3B 知, 桃仁与多种病证类型关联性均较好, 包括气血津液病证、产后病证、脾胃病证, 但与气血津液病证关联性次于麸炒桃仁 (关联数为 105), 麸炒桃仁与气血津液病证关联性最高 (关联数为 127), 其次为月经病证、产后病证 (关联数分别为 48、47)。

数方剂对于桃仁的日服用量是未知的, 分析发现此类方剂的用法用量中未涉及每次剂量及日服次数, 或只涉及了每次剂量, 日服次数未涉及或仅标注为“不拘时候”“日服三四次”“食前服”等; 对桃仁配伍用量及已知桃仁每日用量的方剂频数进行朝代分

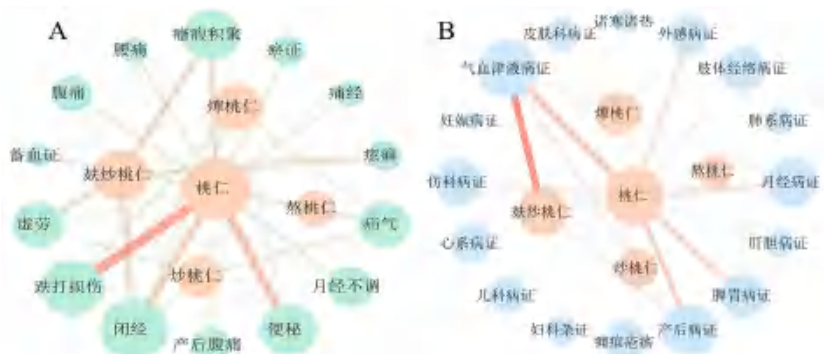


图3 桃仁炮制方法与主治病证(A)及病证类型(B)的关联网络图
注:橘色.桃仁炮制方法;绿色.主治病证;蓝色.病证类型。

布统计,发现对于方剂中桃仁用量能否转换为每日用量影响最大的朝代是宋朝,在此时期,未知桃仁每日用量的方剂占比达 98%,结果见图 4。

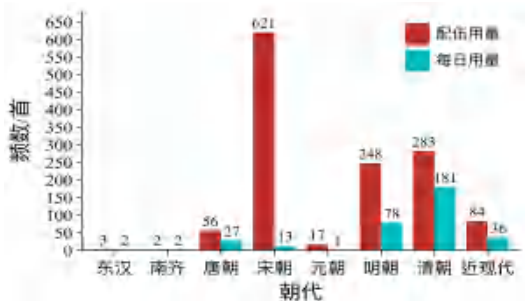


图4 桃仁配伍用量与每日用量的方剂的频数分布

以 344 首可转换为桃仁每日用量的方剂为研究对象,对其进行用量范围统计,包含 8 种用量范围,其中以 < 3 g 频率最高 (29.07%),其次是 5 ~ 10 g (28.20%) 和 3 ~ 4.9 g (25.87%),结果见表 6。分别建立桃仁每日用量范围与主治病证 (频数 > 8) 及病证类型 (频数 > 25) 的关联热图,结果见图 5、6。由图 5 知,桃仁 < 3 g 与主治病证关联性排名靠前的为跌打损伤、产后腹痛、产后便秘 (关联数分别为 8、8、6), 3 ~ 4.9 g 与主治病证关联性排名靠前的为跌打损伤、瘀证 (关联数分别为 8、6), 5 ~ 10 g 与跌打损伤关联性最高 (关联数 9), 其他用量范围应用频次较少。由图 6 知,桃仁用量 < 3 g 与产后病证关联性最高 (关联数 49), 3 ~ 4.9 g 与病证类型关联性排名靠前的为产后病证、气血津液病证、外感病证 (关联数分别为 16、15、12), 5 ~ 10 g 与病证类型关联性排名靠前的为产后病证、气血津液病证、月经病证 (关联数分别为 13、14、12)。

表 6 桃仁每日用量范围分布

桃仁剂量/g	频数	频率/%	桃仁剂量/g	频数	频率/%
< 3	100	29.07	15.5 ~ 20	15	4.36
3 ~ 4.9	89	25.87	20.5 ~ 25	7	2.03
5 ~ 10	97	28.20	26.5 ~ 35	7	2.03
10.5 ~ 15	18	5.24	> 60	11	3.20

2.6 高频病证与病证类型的用药规律分析

在分析主治病证和病证类型时,发现频次靠前的病证和病证类型之间不是对应关系,如频数最高的病证闭经属月经病证,但在病证类型中频数最高的是气血津液病证,病证频数排名第二的跌打损伤也是同理,考虑到研究的完整性和全面性,对排名最高的两种高频病证和病证类型进行组方规律分析。

2.6.1 高频病证用药规律分析 主治闭经、跌打损伤的方剂分别有 94 首、82 首,运用 Apriori 算法,设置置信度为 100%、支持度为 10%、20%、32%,得到治疗这两种病证的常用药物组合。当支持度为 32% 时,含桃仁方剂主治闭经的核心配伍为当归、大黄、肉桂、川芎,主治跌打损伤;核心配伍为当归、红花、大黄、赤芍,可视化网络见图 7、8。

2.6.2 高频病证类型用药规律分析 主治气血津液病证的方剂共 331 首,包括癥瘕积聚、虚劳、瘀癖等;主治产后病证的方剂共 178 首,包括产后腹痛、产后恶露不尽、产后恶露不行等。运用 Apriori 算法,设置置信度为 100%、支持度为 10%、15%、30%,得到治疗这两种病证类型的常用药物组合。当支持度为 30% 时,含桃仁方剂治疗气血津液病证的核心配伍为当归、肉桂、木香、大黄,治疗产后病证的核心配伍为当归、木香、肉桂,可视化网络见图 9、10。

3 讨论

桃仁是临床上常用的活血化瘀药,在中医领域具有较高的使用价值,历代医学家常用其配伍不同类型中药治疗诸多病证。本文对《中医方剂大辞典》中筛选的 1563 首含桃仁方剂进行数据挖掘,中药配伍频次结果表明桃仁常与补血药、理气药、温里药等配伍,高频次配伍药物是当归、肉桂、大黄等。当归归属补血药,与桃仁配伍是经典的相使药对,现代研究表明,当当归配伍用量大于桃仁时,桃仁的有效成分苦杏仁苷的溶出会显著增加,同时其活血化瘀作用也会显



图 5 桃仁每日用量与主治病证的关联热图

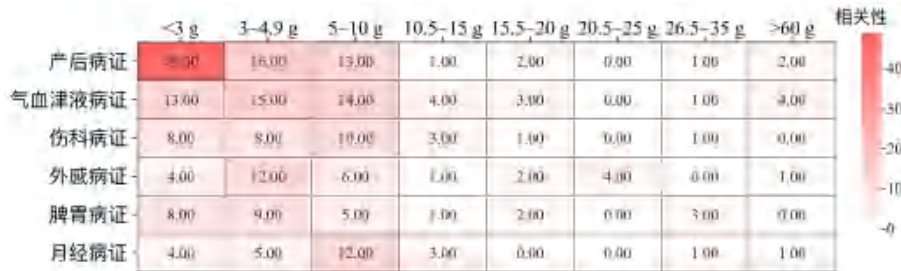


图 6 桃仁每日用量与病证类型的关联热图

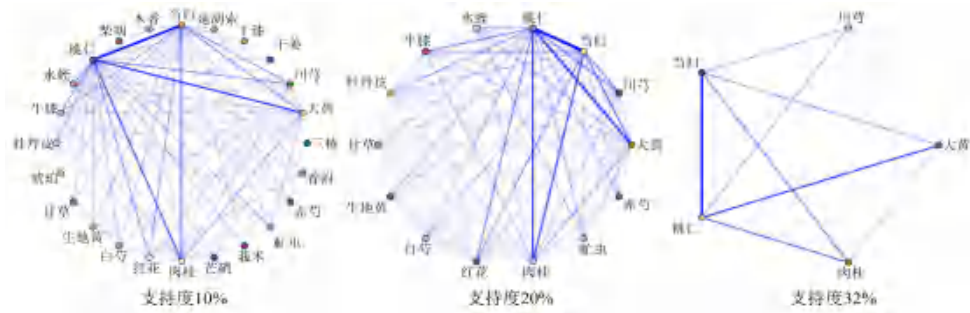


图 7 主治闭经中药的关联网络图

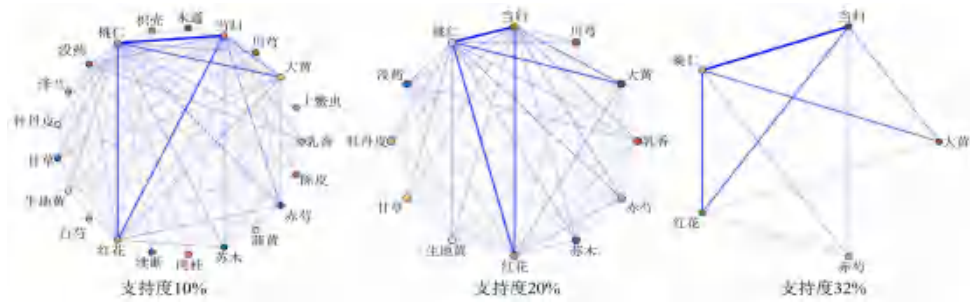


图 8 主治跌打损伤中药的关联网络图

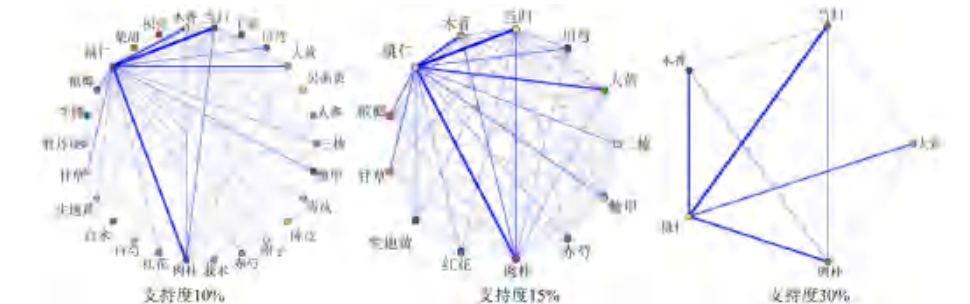


图 9 治疗气血津液病证中药的关联网络图

著增强^[13]。肉桂归属温里药,《景岳全书》曰“若下焦虚寒,法当引火归原者,肉桂为要药”,与桃仁配伍是治疗冲任虚寒,寒凝血滞之经闭的常

用配伍^[14]。大黄归属清热药,与桃仁配伍是桃核承气汤及其类方的核心药对,在临床上常用于治疗瘀热互结所致的各种疾病,如糖尿病及其并发

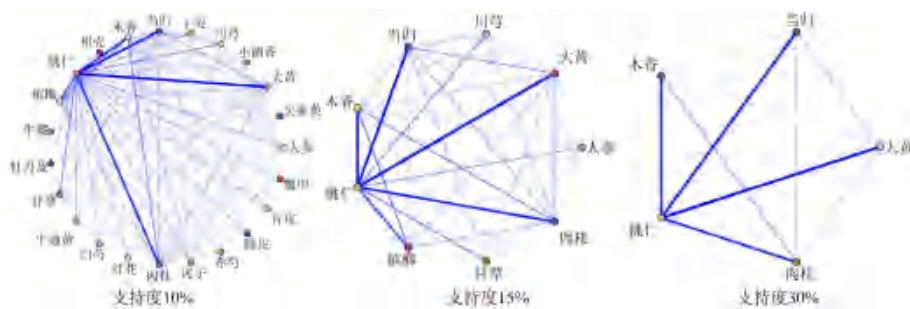


图 10 治疗产后病证中药的关联网络图

症，肝性脑病、脑卒中、重症胰腺炎等^[15-17]。桃仁配伍中药多归脾、心、胃经，心主血脉，心血运于脾，脾的运化依赖于心血的滋养和心阳的推动，心脾功能失调，可致血瘀、心悸健忘、心痛等证^[18]；《脾胃论·脾胃盛衰论》中记载“夫脾胃不足，皆为血病”，脾胃为气血津液生化之源，脾胃纳运失调，一则会使津液的生成或输布障碍导致血虚；二则脾虚不能统血而致血液溢出脉外，引起各种出血病证，加之脾气虚弱，而致血液运行无力或固摄无权而成血瘀证，这与桃仁的主治证候相呼应，体现了药物的归经能反映病位，能为辨证用药提供思路^[19-21]。

《本草纲目》载：“桃仁行血，宜连皮、尖生用。润燥活血，宜汤浸去皮、尖炒黄用，或麦麸同炒，或烧存性，各随本方”，桃仁的炮制品不同，其功效亦不同^[22]。而在本研究中许多方剂并未说明桃仁的炮制方法，未说明桃仁炮制方法的占比接近 50%，这是桃仁关联病证范围较广的主要原因，在 2020 年版《中国药典》中虽记载了桃仁的不同炮制品，但对桃仁不同炮制品的功效异同点却并未涉及，此外，现今中医开处方也极少标注其炮制品，可见从古至今桃仁不同炮制品所发挥的功效并未得到重视，其不同炮制品的优势难以充分发挥。在明确记载桃仁炮制方法中以炒制（麸炒和去皮尖炒）、燂制为主，炒制是在燂制的基础上进行的，燂制是为了杀酶保苷、增效减毒，炒制在现代药理研究中是使得功效偏于缓和，本研究中，麸炒桃仁与病证关联性排名靠前的为闭经、癥瘕积聚、虚劳，与病证类型关联性排名靠前的为气血津液病证、月经病证、产后病证，临床应用时需依据病情进行炮制品的选择^[23-24]。

含桃仁方剂如桃核承气汤、桃红四物汤、身痛逐瘀汤等在临床中能治疗多种病证，应用范围较广，但“中医不传之秘在药量”，方剂中药物的用量与其主治病证有着密切联系，若要更好地应用桃仁，则需要对桃仁的量效关系进行深度挖掘。本研究发现含桃仁方剂的主治病证涉及 366 种，可归属于 30 种病证类型，高频病证为闭经、跌打

损伤、癥瘕积聚等，高频病证类型为气血津液病证、产后病证、月经病证等。桃仁用量分析发现，多数方剂仅在组成中标注了桃仁的配伍用量，对于桃仁每日用量中的日服次数标注甚少，特别是来源于宋朝的方剂，剂型多为丸剂，规格大多为“如梧桐子大”“如绿豆大”，由于组成药物的重量和辅料重量不易确定统一，难以计算丸剂的整体重量，故即使标注了每服量和日服次数，也难以换算出桃仁的每日用量。本研究中共有 344 首方剂可转换为桃仁每日用量，主要分布于 < 3 g、3 ~ 4.9 g、5 ~ 10 g，在相同用量范围下桃仁可关联多种主治病证及病证类型，从侧面反映了桃仁功效的多元性，即在同一剂量下能发挥多种功效；桃仁 < 3 g、3 ~ 4.9 g、5 ~ 10 g 与病证跌打损伤关联性较好，跌打损伤的治则以活血化瘀、消肿止痛、活血通络等为主，《药鉴》中记载桃仁：“多用逐瘀血而止痛，少用生新血而通经”，临床须依据病况适当调整^[25]；桃仁 < 3 g、3 ~ 4.9 g、5 ~ 10 g 与病证类型气血津液病证关联性差异不大，气血津液病证是指机体气、血、津、液生成不足、运化或输布失常的一类病证的总称^[26]，如虚劳，病程初始其主要矛盾为营卫失调或轻微损耗状态，此时重用补益药以调和营卫，而桃仁等活血化瘀药用量较轻；随着病程发展，营卫亏虚日久致有形阴血亏虚，渐而形成瘀血，瘀阻化热，热灼血干，进而形成干血病，此时标重于本，实邪为主要矛盾，多重用桃仁等活血化瘀药以推陈致新^[27-28]；桃仁 < 3 g 与病证类型产后病证关联性最好，这与赵瑞华教授提出的“虚是产后病证的核心，瘀是继发于虚的衍生因素，在治疗中以扶正培元、佐以治瘀”思想相一致^[29]。

闭经始载于《黄帝内经》，其病机包括虚、实两方面，虚者精亏血少，冲任不足，血海空虚；实者外邪阻隔，血行不畅，冲任不通^[30-31]，故而桃仁组方常配伍当归养血而益心脾，使心脾之气血旺盛；配伍大黄以破血逐瘀；配伍肉桂、川芎以扶正助阳，解冲任之虚寒，使活血化瘀之力倍增。跌打损伤归属外伤病证，《伤科补要》记

载：“夫跌打损伤，坠堕磕之证，专从血论”，故桃仁组方常配伍“补血圣药”当归。药理研究表明，当归多糖具有促进体外人成骨细胞增殖的作用^[32]，配伍大黄凉血止血，莛醌与鞣质类是其主要药效成分^[33]，大黄得桃仁既可抑制跌打损伤所致体内外出血，又能推陈致新，荡涤瘀血；配伍赤芍、红花活血生新、消肿止痛。气血津液病证的病机是机体气、血、津、液生成不足，运化或输布失常，故桃仁组方配伍当归以补养气血津液，配伍肉桂以滋肾阴温肾阳强命门火，配伍木香、大黄以理气止痛、活血化瘀。产后病证是指在产褥期内发生与分娩或产褥有关的疾病，妇人在妊娠过程中易耗气伤血，气虚不能固血而致出血，出血不止而成瘀血，所以妇人在产后常表现出气血不足、虚中夹实、气虚血瘀的状态，治疗以扶正培元为先，依据病证辅以活血化瘀药^[34]，通过分析含桃仁方剂治疗气血津液病证和产后病证的药物配伍规律发现，其核心配伍相同，仅有主次之分，均为补养气血、扶正助阳、活血调经、行气止痛等中药。

综上，本文运用 Apriori 算法与网络关联对《中医方剂大辞典》中含桃仁的方剂进行数据挖掘，明确了桃仁的配伍规律、炮制方法、每日用量与主治病证及病证类型的关联性，体现出桃仁在具体病证中的应用特点，对该药的临床应用、配伍机制研究及深入开发提供了科学依据。

参考文献

- [1] 裴志斐, 何庆武, 胡永生, 等. 基于数据挖掘分析含青蒿方剂的配伍规律及应用特点[J]. 井冈山大学学报(自然科学版), 2022, 43(5): 78-85.
- [2] 才让南加, 藏吉, 文成当智, 等. 数据挖掘技术在藏药方剂配伍理论研究中的应用进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2022, 24(12): 4833-4841.
- [3] 白雨鑫, 季欧, 仲瑞雪, 等. 基于数据挖掘的含威灵仙组方用药规律分析[J]. 实用药物与临床, 2023, 26(4): 316-323.
- [4] 吴林伟, 王雁南, 李素丽. 数据挖掘技术在名老中医经验传承中的应用进展[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(4): 115-118.
- [5] 杨峥, 芦煜, 牛婷立, 等. 肝纤维化中药专利复方的用药规律分析[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(5): 1249-1252.
- [6] 国家中医药管理局. 关于发布《古代经典名方目录(第一批)》的通知[EB/OL]. (2018-04-13) [2023-08-14]. https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2018-12/31/content_5429153.htm.
- [7] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 290.
- [8] 朱志飞, 刘有志, 樊启猛, 等. 经典名方身痛逐瘀汤小考[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(4): 958-963.
- [9] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2014.
- [10] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [11] 斛荭. 改革中医处方用药计量单位的意义和内容[J]. 广西中医药, 1978(4): 53.
- [12] 韩美仙. 基于药物重量实测的经方本原剂量研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2011.
- [13] 刘立, 段金庵, 唐于平, 等. 当归-桃仁药对配伍特点及其效应物质基础研究[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(10): 2415-2420.
- [14] 周畅, 刘月, 殷胜骏, 等. 肉桂“引火归原”辨[J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(9): 4059-4062.
- [15] 吴希泽, 康健, 李越, 等. 抵挡汤的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(20): 230-238.
- [16] 周冉冉, 付春梅, 李冉, 等. 桃核承气汤的临床应用研究进展[J]. 现代中医临床, 2020, 27(1): 71-76.
- [17] 段秋雯. 桃核承气汤治疗轻微型肝性脑病(瘀热互结证)的临床观察[D]. 长春: 长春中医药大学, 2019.
- [18] 孔令旗, 孔军辉, 王静, 等. 基于中医整体观探讨“心胃同治”理论[J]. 中国中医基础医学杂志, 2023, 29(8): 1376-1379.
- [19] 黎亚, 戴玉微, 刘琴, 等. 李杲脾胃血瘀证治探讨[J]. 中医药导报, 2017, 23(20): 38-40.
- [20] 林武红. 张仲景脾胃分治理论的研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2022.
- [21] 吕萍, 鲍建敏, 牟重临. 从脏腑的形成论脾胃学说在中医学的核心作用[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2018, 26(8): 710-713.
- [22] 李时珍著. 本草纲目[M]. 北京: 北京出版社, 2007.
- [23] 马艳红, 寇娜娜, 宋婉婷, 等. 基于杀酶保苷的经典名方中“去皮尖研泥”桃仁的炮制工艺研究[J]. 中南药学, 2023, 21(6): 1447-1452.
- [24] 邓静, 叶梦倩, 彭杰, 等. 桃仁炮制历史沿革及现代研究进展[J]. 中成药, 2023, 45(11): 3713-3717.
- [25] 张金龙. 《医林改错》活血化瘀方剂的配伍特点研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2022.
- [26] 张伯礼, 吴勉华. 中医内科学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2017.
- [27] 张晓雪. 基于数据挖掘探析虚劳(重症迁延期)中医证候分布特点及临床用药规律[D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.
- [28] 桑红灵, 戴天木. 《金匱要略》干血病的病机浅析[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(6): 3673-3675.
- [29] 李田田, 赵瑞华. 赵瑞华以虚为本辨治产后病经验[J]. 湖南中医杂志, 2022, 38(6): 56-58.
- [30] 姜德友, 王金贺, 冯晓玲. 闭经源流考[J]. 安徽中医药大学学报, 2021, 40(6): 11-14.
- [31] 焦琳, 余兆吉, 詹兴秀, 等. 《中医方剂大辞典》治疗闭经方剂的用药规律探析[J]. 中国民族民间医药, 2020, 29(15): 8-12.
- [32] 陈超群. 当归多糖对人成骨细胞增殖及凋亡的机制研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2019.
- [33] 朱诗塔, 雷鹏, 李新中, 等. 掌叶大黄不同炮制品指纹图谱与其止血作用的灰关联度分析[J]. 中南药学, 2009, 7(1): 55-58.
- [34] 韩楨, 张岑炜, 杜松, 等. 基于中医古籍的女性产后起居养生思想探析[J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(8): 1225-1227, 1234.

(收稿日期: 2023-12-21; 修回日期: 2024-03-18)

基于集成学习的万古霉素血药浓度及不良反应预测研究

黄魏^{1,2}, 李逃明¹, 路经纬³, 向瑜¹, 李凡¹, 董李晨¹, 谭净文¹, 杨中保^{1,2}, 左美玲^{1,2}, 旷达彬^{1,2*}

(1. 湖南师范大学附属长沙医院, 长沙 410006; 2. 湖南师范大学医学院, 长沙 410006; 3. 中南大学计算机学院, 长沙 410006)

摘要: **目的** 建立万古霉素血药浓度及不良反应预测的集成学习模型, 为万古霉素的个体化用药提供参考。**方法** 采集 2021 年至 2023 年湖南师范大学附属长沙医院患者的相关数据。使用逻辑回归、朴素贝叶斯、随机森林、支持向量机、梯度提升决策树、极端梯度提升 6 种机器学习算法分别建模, 同时构造集成学习模型, 选择最优特征子集, 比较各模型预测能力。**结果** 共纳入 205 例病例, 基于最优特征子集的集成学习模型预测性能最佳。该模型血药浓度预测均方根误差为 7.703, 平均绝对误差为 6.492; 不良反应预测准确度为 0.951, F_1 分数为 0.750, AUC 为 0.959, $AUPR$ 为 0.850。**结论** 基于最优特征子集的集成学习模型可准确预测万古霉素血药浓度及不良反应, 为万古霉素的个体化精准用药提供依据, 确保万古霉素抗感染治疗的有效性及安全性。

关键词: 万古霉素; 血药浓度预测; 不良反应预测; 机器学习; 集成学习; 特征选择

中图分类号: R969.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)06-1645-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.038

Prediction of vancomycin plasma concentration and adverse reactions based on ensemble learning

HUANG Wei^{1,2}, LI Tao-ming¹, LU Jing-wei³, XIANG Yu¹, LI Fan¹, DONG Li-chen¹, TAN Jing-wen¹, YANG Zhong-bao^{1,2}, ZUO Mei-ling^{1,2}, KUANG Da-bin^{1,2*} (1. *Changsha Hospital of Hunan Normal University, Changsha 410006*; 2. *College of Medicine, Hunan Normal University, Changsha 410006*; 3. *School of Computer Sciences and Engineering, Central South University, Changsha 410006*)

Abstract: Objective To establish an ensemble learning model to predict the plasma concentration and adverse reactions of vancomycin, and to provide reference for its individualized medication. **Methods** The related data of patients from Changsha Hospital of Hunan Normal University from 2021 to 2023 were collected. Six machine learning methods, including Logistic Regression, Naive Bayes, Random Forest, Support Vector Machines, Gradient Boosting Decision Tree and Extreme Gradient Boosting, were used for the modeling. Meanwhile, the ensemble learning model was constructed to select the optimal subset to compare the prediction of models. **Results** Totally 205 cases were included, and the ensemble learning model based on the optimal subset predicted best. The root mean square error of this model in plasma concentration prediction was 7.703 and the mean absolute error was 6.492. The prediction accuracy of adverse reactions was 0.951, F_1 score was 0.750, AUC was 0.959, and $AUPR$ was 0.850. **Conclusion** The ensemble learning model based on the optimal subset can accurately predict the plasma concentration and adverse reactions of vancomycin, which provides a basis for precise individualized vancomycin anti-infection treatment effectively and safely.

Key words: vancomycin; plasma concentration prediction; adverse reactions prediction; machine learning; ensemble learning; feature selection

作者简介: 黄魏, 男, 硕士研究生, 主要从事临床药学研究, email: huangwei970107@163.com *通信作者: 旷达彬, 女, 硕士研究生导师, 主要从事临床药理学研究, email: kdb@hunnu.edu.cn

万古霉素具有强大的抗革兰氏阳性菌作用且耐药率低，是治疗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌引起的肺部感染、血流感染及颅内感染的一线药物^[1]。万古霉素治疗窗窄、药动学个体差异大^[2]，因此，临床上建议对万古霉素进行治疗药物监测（therapeutic drug monitoring, TDM）^[3]。

临床上，医师根据经验或利用基于群体药动学（population pharmacokinetic, PPK）模型的万古霉素个体化给药平台为患者制订万古霉素初始用药方案。万古霉素的血药浓度易受患者年龄、肝肾功能、疾病状态等因素的影响，即使是在 TDM 指导下用药，其血药浓度达标率依然不足 50%^[4]。同时，TDM 还受到检测方法、试剂、仪器的限制，目前国内仍然有超过 50% 的医院不具备开展 TDM 的条件^[5]。

机器学习是通过计算机算法从大量历史数据中学习规律并改善自身进行预测的过程^[6]，其可以通过对患者临床数据的多层次挖掘，筛选出与研究目的相关的特征因素，并将其纳入分析，从而构建出准确度更高、实用性更强的模型。作为对万古霉素 TDM 工作的补充，以机器学习模型来引导万古霉素的精准用药，能够将患者、药物和疾病等相关信息整合到一个模型框架中，通过对患者、药物和疾病三者之间的关系进行定量分析，从而实现个体化精准用药^[7-9]。

本研究采用不同机器学习模型对万古霉素的血药浓度及不良反应进行预测，为万古霉素的个体化精准用药提供依据，确保万古霉素抗感染治疗的有效性及其安全性。本研究的工作流程如图 1 所示。

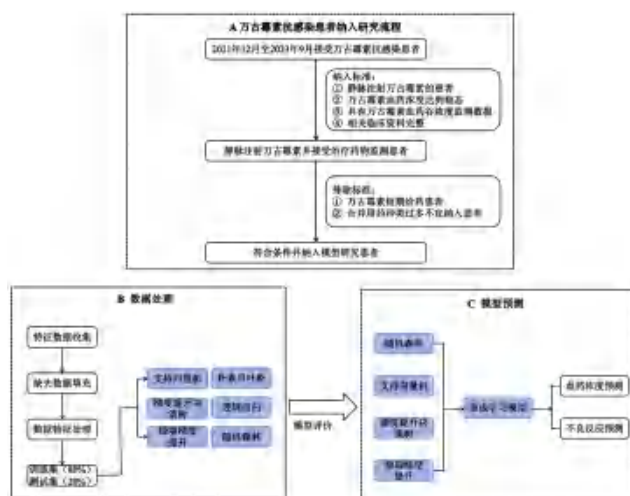


图 1 万古霉素血药浓度及不良反应预测研究工作流程图
Fig 1 Flow chart of the research on vancomycin plasma concentration and adverse reactions

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集 2021 年 12 月至 2023 年 9 月在湖南师范大学附属长沙医院（长沙市第四医院）进行万古霉素抗感染治疗患者的临床资料。纳入标准：① 静脉注射万古霉素的患者；② 万古霉素血药浓度达到稳态；③ 具有万古霉素血药谷浓度监测数据；④ 相关临床资料完整。排除标准：① 万古霉素短期给药患者；② 合并用药种类过多等研究人员认为不适合纳入的患者。

万古霉素达标浓度：对于新生儿和儿童患者，目标谷浓度应该维持在 $5 \sim 15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ；对于普通感染的成人患者，目标谷浓度应该维持在 $10 \sim 15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ；对于严重感染的成人患者，目标谷浓度应该维持在 $10 \sim 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。本研究经长沙市第四医院医学伦理委员会批准（伦理审查编号：CSSDSYY-YXLL-SC-2023-03-42）。

1.2 仪器与软件

Intel i7-11700 处理器；PharmVan 万古霉素个体化给药平台；Mandala 住院电子病历系统；SPSS 26.0；Python 3.8.0；Scikit-learn 1.3.0；Xgboost 1.7.3；Pandas 2.0.3；Numpy 1.24.3；Matplotlib 3.7.3；

1.3 资料收集

根据本院万古霉素用药患者的临床治疗情况及相关文献研究^[10-12]，通过医院住院电子病历系统收集了 28 个可能影响万古霉素血药浓度或引发不良反应的因素，包括患者性别、年龄、感染类型、入院科室、给药日剂量、给药间隔、给药天数、是否合并用药、是否血液透析以及给药前的实验室检测指标结果（总胆红素、直接胆红素、总蛋白、白蛋白、谷丙转氨酶、谷草转氨酶、尿素、肌酐、钠、钾、氯、钙、超敏 C 反应蛋白、降钙素原、白细胞、红细胞、血红蛋白、血小板、中性粒细胞比率），并以此作为模型的输入特征。

以静脉注射万古霉素后达到的稳态血药谷浓度值和治疗过程中是否发生万古霉素相关的不良反应作为模型的输出标签。

1.4 数据预处理

1.4.1 感染类型的分类 收集患者病历资料中临床医师对患者给出的感染诊断结果，根据患者的感染诊断及感染部位进行感染类型分类。在本研究中，将患者的感染类型分为以下 7 类：呼吸系统感染、皮肤软组织感染、心脏与血流感染、中枢神经系统感染、泌尿系统感染、骨关节感染、腹腔与消化道感染。

1.4.2 不良反应的判定 万古霉素临床常见不良反应包括肾毒性、耳毒性、白细胞降低、血清转氨酶升高及类过敏反应等。本研究依据对患者病

历资料的查阅以及 KDIGO 急性肾损伤临床实践指南^[13]、中国药物性肝损伤诊治指南^[14]对患者是否发生万古霉素相关的不良反应进行判定。

1.4.3 缺失数据的处理 由于部分患者病历资料中某些数据存在缺失,为了不丢失这些样本的其他有用数据,确保模型的建立不受到缺失数据的影响,本研究采用了中位数填充的策略来处理缺失值。

1.4.4 数据编码、转换及缩放 为了确保机器学习模型能充分识别及利用数据信息进行有效建模,本研究对不同类型的特征数据进行了编码、转换和缩放等多种处理:对于包含类别信息的特征数据,包括患者性别、感染类型、给药间隔以及入院科室,采用标签编码的方式使每个唯一的特征数据都被映射为一个唯一的整数。对于给药日剂量和给药天数,去除原始数据中的单位,将数值转换为浮点数。对于是否发生万古霉素相关的不良反应、是否合并用药以及是否血液透析,将其编码为二进制值。例如:对于是否发生万古霉素相关的不良反应,如果无则编码为 0,有则编码为 1。

为了使超敏 C 反应蛋白和降钙素原的值更符合正态分布,对其进行对数转换,改善了这两项特征数据的分布特性。对于所纳入的数据中的连续数值,包括总胆红素、直接胆红素、尿素、肌酐、总蛋白、白蛋白、谷草转氨酶、谷丙转氨酶、白细胞、中性细胞比率、超敏 C 反应蛋白、降钙素原、钾、钠、氯、钙、红细胞、血红蛋白、血小板进行特征数据缩放,以确保这些数据的均值为 0,标准差为 1,使模型更容易收敛并提高模型对特征数据的鲁棒性。

1.5 特征选择

特征选择是指在不明显损失样本潜在信息的基础上,从原始全部输入特征中选出部分特征构建最优特征子集,以此来降低输入特征的维度,提高模型的效率和泛化能力^[15]。

本研究通过计算特征与目标变量之间的互信息进行特征选择。互信息用于衡量特征与目标变量之间的关联性,即某个特征能够提供多少关于目标变量的信息,它能解释不同特征对模型决策的影响程度^[16]。对于两个随机变量 X 和 Y ,互信息 $I(X; Y)$ 的计算公式为^[17]:

$$I(X; Y) = \sum_{x \in X} \sum_{y \in Y} p(x, y) \log[p(x, y) / (p(x)p(y))] \quad (1)$$

公式(1)中, $p(x, y)$ 表示 X 和 Y 同时取值 x 和 y 时的联合概率密度函数, $p(x)$ 表示 X 的边缘概率密度函数, $p(y)$ 表示 Y 的边缘概率密度函数。

1.6 基础学习模型

采用多种经典且高效的机器学习算法,包括支持向量机(SVM)、逻辑回归(LR)、随机森林(RF)、朴素贝叶斯(NB)、极端梯度提升(XGBoost)、梯度提升决策树(GBDT),分别建立对万古霉素血药浓度和不良反应预测的基础学习模型。

1.7 集成学习模型

集成学习模型能够通过结合多个基础学习模型的预测能力,从而提高整体模型的鲁棒性和泛化性能。本研究采用投票法构建集成学习模型。在投票法中,每个基础学习模型的预测结果具有相等的权重,具体而言,本研究将 RF、SVM、GBDT 以及 XGBoost 这四个独立的基础学习模型的预测结果进行加和,然后取平均值作为最终的集成预测结果。集成的公式如下^[18]:

$$\text{集成预测} = 1/n \sum_{i=1}^n \text{Model}_i(\text{Input}) \quad (2)$$

公式(2)中, $\text{Model}_i(\text{Input})$ 表示第 i 个模型对输入数据的预测结果。

1.8 模型评价指标

本研究以均方根误差(RMSE)、平均绝对误差(MAE)分别对多个基础学习模型和集成学习模型进行血药浓度预测结果的回归评价。在血药浓度预测中,均方根误差与平均绝对误差的数值越小表示血药浓度预测的结果越准确。平均绝对误差不受误差平方的影响,更注重预测值的绝对准确度。相关计算公式如下^[19]:

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2} \quad (3)$$

$$\text{MAE} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |y_i - \hat{y}_i| \quad (4)$$

公式(3)和公式(4)中, n 表示样本数量, y_i 表示第 i 个样本的实际值, \hat{y}_i 表示第 i 个样本的预测值。

本研究以准确度、 F_1 分数、ROC 曲线下面积(AUC)和 Precision-Recall 曲线下面积(AUPR)分别对多个基础学习模型和集成学习模型进行不良反应预测结果的分类评价。在不良反应预测中,准确度是模型正确预测的样本数量占总样本数量的比例。 F_1 分数是精确度和召回率的调和平均值,它综合考虑了模型的精确性和全面性。AUC 及 AUPR 是综合评价模型分类性能的指标, AUC 与 AUPR 值越高表示模型的性能越好。相关计算公式如下^[20]:

$$\text{准确度} = (TP + TN) / (TP + TN + FP + FN) \quad (5)$$

$$F_1 = 2TP / (2TP + FP + FN) \quad (6)$$

公式(5)和公式(6), TP 表示模型正确预测为有不良反应的样本数量, TN 表示模型正确预测为无不良反应的样本数量, FP 表示模型错误地预测为有不良反应的样本数量, FN 表示模型

错误地预测为无不良反应的样本数量。

1.9 群体药动学模型比较评价

PharmVan 万古霉素个体化给药平台能够基于万古霉素 PPK 模型, 使用贝叶斯算法, 对万古霉素给药方案进行设计与调整, 并预测用药患者血药浓度^[21-22]。因此本研究利用该平台对所纳入的研究对象进行万古霉素血药浓度预测, 且同样以均方根误差、平均绝对误差对 PPK 模型进行血药浓度预测结果评价, 并与集成学习模型血药浓度预测结果作比较。

2 结果

2.1 患者资料与特征

本研究共纳入万古霉素抗感染治疗患者 205 例, 其中男性患者 126 例, 女性患者 79 例; 患者年龄为 (67.76±14.21) 岁; 血药浓度值为 (17.45±10.67) mg·L⁻¹; 在治疗过程中 7.4% 的患者发生了万古霉素相关的不良反应, 其中肾损伤占比 5.4%, 肝损伤占比 1.0%, 出现其他不良反应占比 1.0%; 35.1% 的患者为呼吸系统感染, 5.9% 的患者为腹腔与消化道感染, 详细资料特征见表 1。

2.2 基于全部特征的模型评价

本研究共收集了 28 个可能影响万古霉素血药浓度或不良反应的因素。在以全部特征作为各模型的输入特征时, 发现结合 RF、SVM、GBDT 以及 XGBoost 四个基础学习模型的集成学习模型其对于血药浓度的预测较其他各个基础学习模型有更好的预测表现, 均方根误差为 7.758, 平均绝对误差为 6.539, 但对于不良反应的预测性能仍有较大提升空间。各预测模型的评价结果见表 2、3, ROC 曲线见图 2。因此, 考虑到纳入的 28 个因素中可能存在不相关特征, 其对模型预测性能可能造成较大影响, 进一步对所纳入特征进行因素重要性分析与特征选择。

2.3 特征重要性分析与特征选择

本研究基于互信息值对特征进行重要性分析。在这个过程中, 互信息值越高表明两个变量间的依赖性越强, 值越低则表示它们之间较为独立。结果发现, 对于血药浓度预测模型, 总蛋白、年龄、钙、氯、肌酐、降钙素原、合并用药、尿素、钾、科室、钠、白蛋白、感染类型、谷丙转氨酶与预测性能相关, 提示这些特征可能对万古霉素血药浓度存在较大影响。而对于不良反应预测模型, 谷草转氨酶、性别、给药天数、直接胆红素、总蛋白、感染类型、钾、血液透析、谷丙转氨酶、降钙素原、氯、科室、总胆红素与预测性能相关, 提示这些特征可能影响万古霉素不良反应的发生 (见图 3)。这些特征在模型中起到了关键的作用, 对于准确预测患者的血药浓度和不良反应提供了重要的信息。

表 1 患者的资料特征 ($\bar{x}\pm s$)

项目	类别	结果
基本信息 ($\bar{x}\pm s$)	患者总数 / (男 / 女)	205 (126/79)
	年龄 / 岁	67.76±14.21
	给药日剂量 / g	1.63±0.51
	给药天数 / d	10.72±7.47
	血药浓度 / (mg·L ⁻¹)	17.45±10.67
不良反应 / %	肝损伤	1.0
	肾损伤	5.4
	其他不良反应	1.0
	感染类型 / %	
感染类型 / %	呼吸系统感染	35.1
	皮肤软组织感染	13.6
	心脏与血流感染	13.7
	中枢神经系统感染	11.7
	泌尿系统感染	10.7
	骨关节感染	9.3
	腹腔与消化道感染	5.9
	实验室指标 ($\bar{x}\pm s$)	总胆红素 / (μmol·L ⁻¹)
直接胆红素 / (μmol·L ⁻¹)		8.66±16.24
总蛋白 / (g·L ⁻¹)		59.12±9.46
白蛋白 / (g·L ⁻¹)		30.19±5.25
谷丙转氨酶 / (U·L ⁻¹)		35.83±35.97
谷草转氨酶 / (U·L ⁻¹)		42.28±38.36
尿素 / (mmol·L ⁻¹)		9.58±11.79
肌酐 / (μmol·L ⁻¹)		94.77±92.49
钾 / (mmol·L ⁻¹)		3.99±0.63
钠 / (mmol·L ⁻¹)		138.63±5.62
氯 / (mmol·L ⁻¹)		103.73±5.84
钙 / (mmol·L ⁻¹)		2.14±0.20
超敏 C 反应蛋白 / (mg·L ⁻¹)		109.86±94.41
白细胞 / (×10 ⁹ ·L ⁻¹)		11.52±6.28
中性细胞比率 / %		76.53±19.28
红细胞 / (×10 ¹² ·L ⁻¹)		3.38±0.75
血红蛋白 / (g·L ⁻¹)		98.81±21.67
血小板 / (×10 ⁹ ·L ⁻¹)		210.63±108.32
降钙素原 / (ng·L ⁻¹)		2.69±7.36

表 2 基于全部特征的血药浓度预测模型性能比较

模型	RMSE	MAE
随机森林	8.516	6.850
支持向量机	7.979	6.847
梯度提升决策树	8.785	7.065
极端梯度提升	8.900	7.467
集成学习模型	7.758	6.539

表 3 基于全部特征的不良反应预测模型性能比较

模型	准确度	F ₁	AUC	AUPR
逻辑回归	0.098	0.178	0.236	0.078
朴素贝叶斯	0.634	0.000	0.486	0.113
随机森林	0.854	0.250	0.385	0.189
支持向量机	0.902	0.000	0.757	0.224
梯度提升决策树	0.878	0.000	0.493	0.167
极端梯度提升	0.878	0.000	0.257	0.082
集成学习模型	0.878	0.000	0.351	0.127

在确定了特征重要性后，本研究分别对血药浓度预测模型与不良反应预测模型选取了互信息值最高的前 K 个特征作为候选最优特征子集，其中 K 作为超参数进行调优。通过五折交叉验证法来评估每个不同 K 参数下所形成的特征子集对模型性能的影响。通过一系列实验的结果表明，对于血药浓度预测模型，应选取具有最高互信息值的前 11 个特征构建最优特征子集，包括总蛋白、年龄、钙、氯、肌酐、降钙素原、合并用药、尿素、钾、科室、钠。对于不良反应预测模型，应选取具有最高互信息值的前 8 个特征构建最优特征子集，包括谷草转氨酶、性别、给药天数、直接胆红素、总蛋白、感染类型、钾、血液透析。特征选择能剔除不相关或冗余特征，提高模型的预测性能。

2.4 基于最优特征子集的模型评价

通过特征重要性分析与特征选择，本研究基于最优特征子集对各模型进行了训练。训练后的模型评价结果见表 4、5，ROC 曲线见图 4。在血药浓度预测方面，基于最优特征子集的各基础模型在排除冗余特征之后预测误差均有不同程度的减小，而本研究结合 RF、SVM、GBDT 以及 XGBoost 四个基础学习模型所构建的集成学习模型其预测性能也得到显著提升，其 MAE 仅为 6.492。在不良反应预测方面，特征选择使 GBDT、XGBoost 以及集成学习模型预测性能明显提升，其中集成学习模型预测准确度提高了 7.3%，高达 95.1%，AUC 值为 0.959，AUPR 值为 0.850，提示其综合预测性能极强，且集成学习模型各项评价指标均优于各基础学习模型。

表 4 基于最优特征子集的血药浓度预测模型性能比较

Tab 4 Performance of plasma concentration prediction models based on optimal subsets

模型	RMSE	MAE
随机森林	8.318	6.753
支持向量机	7.832	6.589
梯度提升决策树	8.473	7.169
极端梯度提升	9.674	8.035
集成学习模型	7.703	6.492

表 5 基于最优特征子集的不良反应预测模型性能比较

Tab 5 Performance of adverse reactions prediction models based on optimal subsets

模型	Accuracy	F ₁	AUC	AUPR
逻辑回归	0.098	0.195	0.635	0.361
朴素贝叶斯	0.293	0.216	0.574	0.343
随机森林	0.780	0.471	0.899	0.419
支持向量机	0.902	0.000	0.426	0.105
梯度提升决策树	0.927	0.400	0.912	0.638
极端梯度提升	0.927	0.667	0.899	0.743
集成学习模型	0.951	0.750	0.959	0.850

2.5 群体药动学模型预测评价

本研究利用 PharmVan 万古霉素个体化给药平台对所纳入的研究对象进行万古霉素血药浓度预测，血药浓度预测结果平均值为 (16.15±8.12) mg·L⁻¹，预测均方根误差为 9.545，平均绝对误差为 7.137，该模型预测性能劣于基于最优特征子集的集成学习模型，对比结果如表 6，图 5 所示。

表 6 群体药动学模型与集成学习模型血药浓度预测结果比较

Tab 6 PPK model and ensemble learning model in predicting plasma concentration of vancomycin

模型	RMSE	MAE
群体药动学模型	9.545	7.137
集成学习模型	7.703	6.492

3 讨论

为了建立万古霉素血药浓度及不良反应预测模型，本研究采用多种经典且高效的机器学习算法，首次构建集成学习模型，并对患者特征数据进行重要性分析，以确保能够充分挖掘患者特征数据中的潜在信息，并取得良好的预测性能。研究结果表明，结合 RF、SVM、GBDT 以及 XGBoost 四个基础学习模型所构建的集成学习模型预测性能最为优秀。本研究创新地对万古霉素用药后的血药浓度及不良反应同时进行预测，并以互信息值来度量两个变量之间的依赖关系，构建了基于最优特征子集的集成学习模型，这不仅提高了模型的预测性能，还增强了对模型的解释性。

目前，国内外的研究多采用回归模型、群体药动学模型、生理药动学模型对患者的血药浓度进行预测，这些模型在面对多特征变量、非线性数据的大样本诊疗数据时预测性能往往较差^[23-27]。相比而言，集成学习模型具有对大规模、高维度数据的强大处理能力，可以考虑多种特征变量对预测结果的影响。本研究通过对比 PPK 模型与集成学习模型在万古霉素血药浓度预测中的预测性能，证实了集成学习模型存在明显预测优势。本研究在集成学习模型的构建过程中，将 LR 与 NB 进行了剔除处理，是因为 LR 和 NB 通常用于分类问题，它们的设计和假设更适合处理类别之间的关系，而不是连续数值的预测，因此将 LR 和 NB 纳入集成学习模型同时用于回归与分类问题的预测存在不适用性，且独立测试发现 LR 和 NB 在预测万古霉素不良反应的分类任务中表现不佳。同时，其他四个基础学习模型的权重均为 0.25，通过给予每个模型相等的权重，可以使得集成学习模型具备更好的整体性能，降低过拟合风险，提高模型的泛化性能。其中 RF 对具有大量特征和复杂关系的数据集有较强的鲁棒性，能够提高预

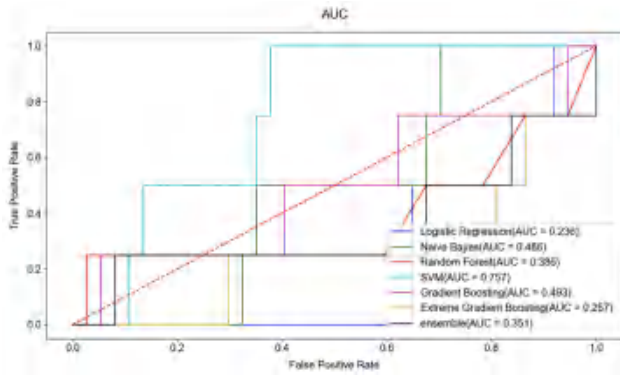


图 2 基于全部特征的不良反应预测模型 ROC 曲线图
Fig 2 Receiver operating characteristic curve of adverse reactions prediction models based on all features

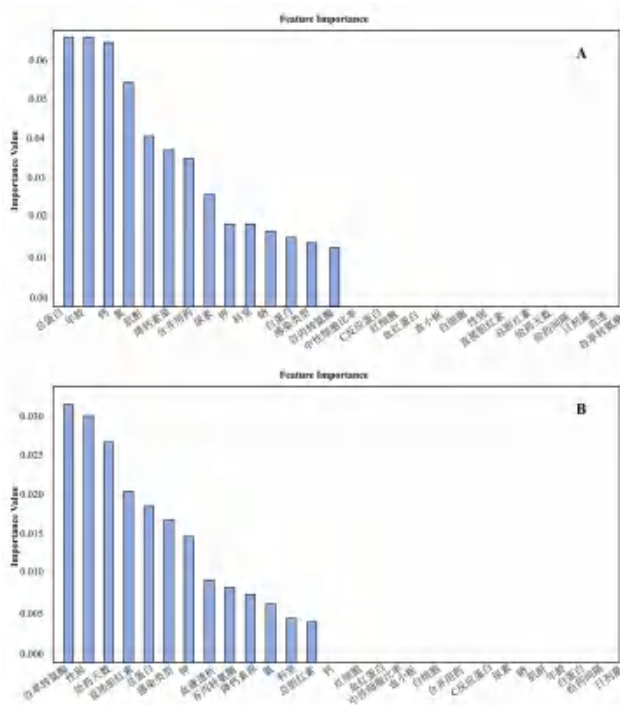


图 3 血药浓度 (A) 及不良反应 (B) 预测模型的特征重要性分析
Fig 3 Feature importance of the plasma concentration (A) and adverse reactions (B) prediction models

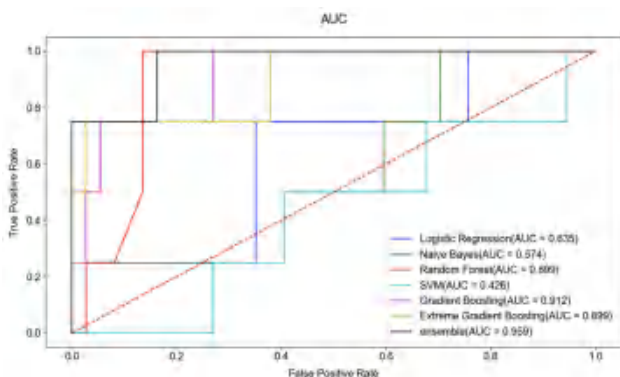


图 4 基于最优特征子集的不良反应预测模型 ROC 曲线图
Fig 4 Receiver operating characteristic curve of adverse reactions prediction models based on optimal subsets

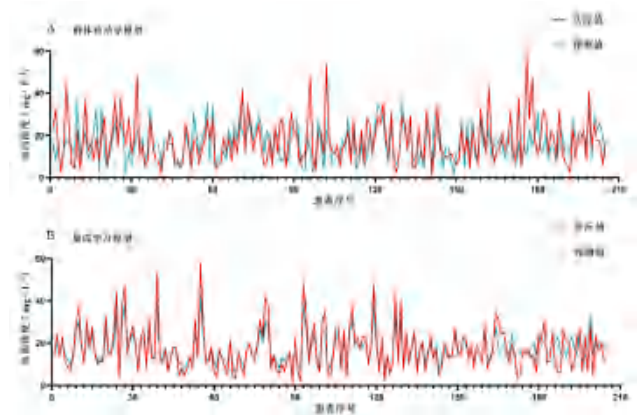


图 5 群体药动学模型与集成学习模型血药浓度预测值与实际值比较
Fig 5 Predicted value and actual value of plasma concentration between PPK model and ensemble learning model

测准确性^[28]；SVM 对于预测连续型输出数据具有明显的优势^[29]；GBDT 能够捕捉输入特征之间的复杂关系并对复杂的非线性关系具有很好的拟合能力^[30]；XGBoost 能通过迭代地添加弱学习器来提高模型性能，在处理大规模数据和高维特征时表现优异^[31]。因此，四个基础学习模型都在集成学习模型中扮演着重要的角色。

在对模型预测性能进行评价时，我们发现可能由于纳入特征的冗余，模型的预测性能并不出色。因此，本研究通过计算特征与目标变量之间的互信息值进行特征重要性分析及特征选择，通过选择与目标变量具有最高互信息的前 K 个特征来降低输入特征的维数，构建了以最优特征子集作为输入特征的集成学习模型。这一改进使模型获得了更为准确、稳定的整体性能，并增强了对模型的解释性。我们发现患者的感染类型，肝肾功能相关指标与患者血药浓度和不良反应的发生均具有较强的相关性，提示临床在使用万古霉素前应充分考虑患者的感染类型以及肝肾功能情况，从而为患者制订个体化的给药剂量，保障用药的有效性及其安全性。这一结果有助于临床医师更好地理解患者特征数据对预测结果的影响趋势，并为临床实践提供更有利的建议。

根据万古霉素治疗药物监测指南中的达标浓度。本研究对收集到的万古霉素血药浓度相关数据进行了分析，发现本院基于经验给予万古霉素用药患者的稳态血药谷浓度达标率仅为 39.02%，这提示有必要探究更为便捷有效的方式为患者及临床医师提供万古霉素个体化精准用药指导。基于最优特征子集的集成学习模型可对万古霉素血药浓度及不良反应进行准确预测，临床医师可通过该模型指导患者个体化用药，保障万古霉素用药的有效性及其安全性。在临床实践过程中，临床

医师可以将患者的相关特征数据输入到本研究的目标模型中,在患者初次给药前就能对该患者的血药浓度及不良反应情况进行预测,为临床调整万古霉素给药方案提供建议。

此外,本研究还存在一些不足。由于本研究所构建的集成学习模型仅纳入了 205 个单中心样本,仅对 28 个特征进行了特征重要性分析,其科学性和可靠性还有待进一步提升。未来,我们将进一步开展多中心、大样本研究以提高模型的泛化能力,同时以构建的集成学习模型为核心制作万古霉素血药浓度及不良反应预测软件,进一步设计前瞻性研究,从而真正实现机器学习模型对患者个体化用药的指导,提高万古霉素抗感染治疗的有效性及其安全性。

参考文献

- [1] 万古霉素临床应用中国专家共识(2011版)[J]. 中国新药与临床杂志, 2011, 30(8): 561-573.
- [2] 李惠英, 张力麟, 茹意. 万古霉素治疗药物监测研究进展[J]. 药物评价研究, 2022, 45(3): 590-595.
- [3] He N, Su S, Ye ZK, et al. Evidence-based guideline for therapeutic drug monitoring of vancomycin: 2020 update by the division of therapeutic drug monitoring, Chinese Pharmacological Society [J]. Clin Infect Dis, 2020, 71(Suppl 4): S363-S371.
- [4] 符祥俊, 肖坚, 王和芳, 等. 某院 2015 年—2020 年万古霉素治疗药物监测分析[J]. 抗感染药学, 2021, 18(5): 737-741.
- [5] 李沐, 张倩, 张爽, 等. 2018 年中国医院治疗药物监测开展状况调查[J]. 中国药学杂志, 2019, 54(24): 2087-2092.
- [6] Badillo S, Banfai B, Birzele F, et al. An introduction to machine learning [J]. Clin Pharmacol Ther, 2020, 107(4): 871-885.
- [7] 张进华, 刘茂柏, 蔡铭智, 等. 模型引导的华法林精准用药: 中国专家共识(2022版)[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2022, 27(11): 1201-1212.
- [8] 罗轶凡, 杨舒, 初阳. 模型引导的精准用药在临床血药浓度预测中的应用[J]. 药物评价研究, 2023, 46(7): 1620-1628.
- [9] Wicha SG, Martson AG, Nielsen EI, et al. From therapeutic drug monitoring to model-informed precision dosing for antibiotics [J]. Clin Pharmacol Ther, 2021, 109(4): 928-941.
- [10] 申庆荣, 李刚, 卢秋玉, 等. 万古霉素血药浓度的影响因素分析[J]. 中国抗生素杂志, 2017, 42(5): 429-434.
- [11] 廖世雄, 刘燕好. 万古霉素血药谷浓度的影响因素及临床药师干预对治疗效果的影响[J]. 中国药物经济学, 2022, 17(12): 94-97.
- [12] Huang XH, Yu Z, Wei X, et al. Prediction of vancomycin dose on high-dimensional data using machine learning techniques [J]. Expert Rev Clin Pharmacol, 2021, 14(6): 761-771.
- [13] Khwaja A. KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury [J]. Nephron Clin Pract, 2012, 120(4): c179-c184.
- [14] 马世武, 刘成海, 刘晓琰, 等. 中国药物性肝损伤诊治指南(2023年版)[J]. 胃肠病学, 2022, 27(6): 341-375.
- [15] 李邳琴, 杜建强, 聂斌, 等. 特征选择方法综述[J]. 计算机工程与应用, 2019, 55(24): 10-19.
- [16] 翟峻仁, 殷柯欣, 谢爱锋, 等. 互信息集成学习特征选择[J]. 长春工业大学学报, 2023, 44(2): 183-188.
- [17] Shannon CE. A mathematical theory of communication [J]. Bell Syst Tech, 1948, 27(3): 379-423.
- [18] Opitz D, Maclin R. Popular ensemble methods: an empirical study [J]. J Artif Int Res, 1999, 11: 169-198.
- [19] Pontius RG, Thontteh O, Chen H. Components of information for multiple resolution comparison between maps that share a real variable [J]. Environ Ecol Stat, 2008, 15: 111-142.
- [20] Taha AA, Hanbury A. Metrics for evaluating 3D medical image segmentation: analysis, selection, and tool [J]. BMC Med imaging, 2015, 15: 1-28.
- [21] 刘雪姣, 岳慧杰, 李玉娇, 等. 个体化给药辅助决策系统 PharmVan、SmartDose 对肾功能亢进患者万古霉素血药浓度预测能力的回顾性评估[J]. 药学与临床研究, 2023, 31(1): 17-20.
- [22] 韩璐, 徐方敏, 张晓珊, 等. 个体化给药辅助决策系统 SmartDose、PharmVan 与 JPKD 对万古霉素血药浓度预测能力的评价[J]. 中华危重病急救医学, 2021, 33(3): 263-268.
- [23] 张靖悦, 冯植, 张佳成, 等. 基于改进曲线回归模型的人全血中环孢素 A 谷浓度预测[J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(15): 1491-1495, 1506.
- [24] Lee SM, Yang S, Kang S, et al. Population pharmacokinetics and dose optimization of vancomycin in neonates [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 6168.
- [25] He CY, Ye PP, Liu B, et al. Population pharmacokinetics and dosing optimization of vancomycin in infants, children, and adolescents with Augmented Renal Clearance [J]. Antimicrob Agents Chemothe, 2021, 65(10): e0089721.
- [26] 杨玉洁, 徐敏, 郝恒, 等. 美罗培南在老年人体中生理药动学模型的建立与应用[J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(21): 2196-2201.
- [27] Huang XH, Yu Z, Bu SH, et al. An ensemble model for prediction of vancomycin trough concentrations in pediatric patients [J]. Drug Des Devel Ther, 2021, 15: 1549-1559.
- [28] 吕红燕, 冯倩. 随机森林算法研究综述[J]. 河北省科学院学报, 2019, 36(3): 37-41.
- [29] 林香亮, 袁瑞, 孙玉秋, 等. 支持向量机的基本理论和研究进展[J]. 长江大学学报(自科版), 2018, 15(17): 48-53.
- [30] Imai S, Takekuma Y, Miyai T, et al. A new algorithm optimized for initial dose settings of vancomycin using machine learning [J]. Biol Pharm Bull, 2020, 43(1): 188-193.
- [31] 李占山, 刘兆赓. 基于 XGBoost 的特征选择算法[J]. 通信学报, 2019, 40(10): 101-108.

(收稿日期: 2024-02-20; 修回日期: 2024-04-12)

优化后的触发器在心血管疾病患者不良事件监测中的适用性分析

林晓霞^{1,2}, 李佳³, 杨亚军^{1*} (1. 广东医科大学药学院, 广东 湛江 524023; 2. 茂名市人民医院药学部, 广东 茂名 525000; 3. 中山大学附属第一医院药学部, 广州 510080)

摘要: **目的** 验证优化后触发器对心血管疾病患者药品不良事件 (ADE) 监测的适用性。**方法** 采用德尔菲法征集专家的意见优化触发器, 根据纳入/排除标准对 2022 年某三级甲等医院心血管内科出院患者进行病历审查, 评价触发器在提高 ADE 检出率的优势。**结果** 240 份病历中, 经触发器检出阳性条目及例次分别为 206 条、169 例患者, 判定为 ADE 条目及例次分别为 107 条、74 例患者, 总体触发器阳性预测值为 51.94% (107/206)。ADE 严重程度分级最多的是 E 级损伤, 占 89.19%; 共累及 9 个系统-器官, 受损伤系统最多的是胃肠系统损伤, 共 55 例次; 代谢和营养障碍次之, 共 18 例次。主动监测检出率为 30.83% (74/240), 该医疗机构同期自主上报率为 0.28% (6/2166), 两者差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 相比于自发上报系统, 优化后的心血管药物触发器设计合理, 可提高 ADE 的检出率。

关键词: 全面触发工具; 德尔菲法; 药品不良事件; 主动监测; 心血管系统药物

中图分类号: R969.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)06-1652-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.039

Applicability of optimized triggers in monitoring adverse events in patients with cardiovascular diseases

LIN Xiao-xia^{1,2}, LI Jia³, YANG Ya-jun^{1*} (1. School of Pharmacy, Guangdong Medical University, Zhanjiang Guangdong 524023; 2. Department of Pharmacy, People's Hospital of Maoming, Maoming Guangdong 525000; 3. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080)

Abstract: Objective To verify the applicability of optimized triggers in monitoring adverse drug events (ADE) in patients with cardiovascular diseases. **Methods** Delphi method was used to collect experts' opinions to optimize the triggers. According to the inclusion/exclusion criteria, medical records of discharged patients from the Department of Cardiovascular Medicine of a Tier III Grade A hospital in 2022 were reviewed to evaluate the advantages of triggers in improving the detection rate of ADE. **Results** Among 240 cases, 206 positive items and 169 patients were detected by the trigger, and 107 items and 74 patients were determined with ADE, with an overall positive predictive value (PPV) of 51.94% (107/206). The most severe ADE severity was grade E damage, accounting for 89.19%. Totally 9 systems-organs were involved, and the most damaged was the gastrointestinal system damage (55 cases), followed by metabolic and nutritional disorders (18 cases). The detection rate of active monitoring was 30.83% (74/240), and the independent reporting rate of the medical institution was 0.28% (6/2166) in the same period, with a significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion** Compared with autonomous reporting system, optimized cardiovascular drug triggers are reasonably designed and effectively improve the detection rate of ADE.

Key words: global trigger tool; Delphi method; adverse drug event; active monitoring; cardiovascular system drug

基金项目: 临床重点药品的使用监测和评价研究专项基金 (No.Y2022FH-YWJP01-203); 茂名市科技计划项目 (No.2023347)。

作者简介: 林晓霞, 女, 硕士研究生, 副主任药师, 主要从事临床药理学研究, email:linxiaoxia615@163.com ***通信作者:** 杨亚军, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事骨质疏松药理学研究, email: yangyajun1@163.com

世界卫生组织 (WHO) 对药品不良事件 (ADE) 定义是药品治疗过程中出现的不良临床事件, 而该类事件不一定与药品治疗有因果关系^[1], ADE 包括药品不良反应 (ADR)、用药错误 (ME)^[2]。ADE 是涉及医疗质量和患者安全的重要风险问题, 特别是心血管疾病患者常因多病共存、多药联用导致 ADE 发生率增加^[3]。目前医疗机构主要采用自愿报告的方式, 上报依赖于呈报人员的自觉性, 存在滞后、随意性强、时效性差、信息不完整、漏报率高等缺陷^[4]。为了全面评估 ADE 的发生情况, 提高检出效率, 2003 年美国健康促进研究所推出全面触发工具 (GTT) 法使用触发器对 ADE 进行主动监测^[5], 并于 2009 年以白皮书的形式发表^[6]。相比目前国内正在使用的自愿呈报系统, 其检出率提高了 10 倍^[7]。白皮书建议触发器应针对不同地区、不同领域 ADE 的发生规律、特点进行改进、调整。国内对 GTT 的研究相对滞后, 尚未建立心血管系统药物的 ADE 触发器。因此, 本研究采用德尔菲法 (Delphi) 优化触发器, 并对其临床适用性进行回顾性研究, 以期为今后心血管疾病患者 ADE 的监测提供参考。

1 资料与方法

1.1 资料来源

1.1.1 自愿上报的 ADE 情况 首先调取本市 2022 年药品不良反应监测系统中本院上报的心血管系统药品不良反应报告表; 然后登录 AEMS 医疗安全不良事件管控平台系统调取 2022 年本院已上报的心血管系统用药错误报告表; 将上述报告信息录入 Excel 电子表格, 筛选得到我院 2022 年自愿上报的心血管系统药物的 ADE 总列表。

1.1.2 抽样方法 从三雅智慧药学平台调取本院 2022 年心血管内科出院患者的信息共 2166 例, 按出院日期进行排序, 按纳入排除标准筛选病历, 并根据 GTT 白皮书^[6]建议, 抽样时每半月随机抽取 10 份病历, 全年拟抽取 240 份病历纳入研究。抽样间隔数确定: 以病历总数除以抽取样本数, 得数取整数, 即为抽样间隔数。本研究抽样间隔数为 9, 即每隔 9 份病历抽取 1 份作为样本。纳入标准: 信息完整的病历; 住院时间 > 24 h; 年龄 ≥ 18 岁。剔除标准: 未进行心血管药物治疗; 主要资料缺项; 曾在重症科和肿瘤科治疗的病历。

1.2 方法

1.2.1 拟订触发器条目 参考 2009 年白皮书的 13 项用药模块触发器^[6], 结合 2022 年本市不良反应监测中心的心血管疾病药物的 ADR 的发生规律和医院实际用药情况, 初步建立本地心血管

系统药物的 35 项触发器, 包括了检验指标、解救用药、临床表现和干预措施四个方面。

1.2.2 调查方法 采用 Delphi 法征询本省的从事心血管相关专业的医护人员的意见。利用“问星星”二维码发放调查表, 一周内回收并进行讨论、统计分析。Delphi 法专家人数一般在 8 ~ 20 人^[8], 可根据课题涉及面的宽窄、复杂程度确定^[9]。

1.2.3 病历审查方法 由 3 名审查员使用医院信息管理系统依据触发条目对随机抽取病历的内容进行审查。1 名初级药师依据优化的触发器审查病历; 1 名高年资临床药师协助病历审查; 1 名高年资临床医师负责解答审查过程中遇到的疑问, 与 2 位评审员的审查结果达成共识。病历审查的内容包括病案首页、出入院记录、用药情况、实验室检查结果、护理文书以及患者的会诊记录等。

1.2.4 ADE 判定与分级 Naranjo 评分法评价标准判定 ADE; 使用美国国家用药差错报告及预防协调委员会 (NCC MERP) 制定的错误分级系统对 ADE 进行严重程度分级。

1.2.5 ADE 累及系统 - 器官分类 根据《WHO 药品不良反应术语集》进行分类和统计。

1.3 数据处理

1.3.1 触发器条目的纳入标准 根据实际调查的反馈意见并参考 Delphi 法相关资料^[10], 纳入标准如下: 第一轮纳入均数 $M_j \geq 4$, 满分比 $K_j \geq 0.5$ 且变异系数 $V_j \leq 0.3$ 的条目; 第二轮纳入均数 $M_j \geq 4$, 满分比 $K_j \geq 0.5$ 且变异系数 $V_j \leq 0.24$ 的触发器条目。

1.3.2 触发器特异性和灵敏度评价 特异性: 阳性预测值 (PPV) = ADE 检出频次 / 触发器阳性频次, PPV 值越高, 特异性高; 灵敏度: 触发器阳性触发率 (%) = 阳性触发的病例数 / 病例总数 × 100%。

1.3.3 ADE 评价指标 ADE 主动监测检出率 (%) = ADE 的患者人数 / 病例数 × 100%; ADE 自发上报率 (%) = ADE 上报例数 / 患者总例数 × 100%。

1.3.4 统计学方法 采用 Microsoft Office Excel 2019 和 SPSS 24.0 版软件对数据进行整理汇总及统计分析, 自愿上报率与触发器检出率的比较采用 χ^2 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Delphi 专家咨询结果

本研究中, 来自广东省 5 个市的 8 家二级以上医院心血管内科的 20 名医师、护士或临床药师参与两轮的调查, 专家调查表两轮的回收率分别为 90.91%、100%。两轮熟悉程度 C_a 分别是 0.75 ± 0.24 、 0.83 ± 0.13 ; 判断的依据 C_r 分别是 0.92 ± 0.09 、 0.92 ± 0.09 ; 专家意见的权威程度 C_r 分

别是 0.83 ± 0.16 、 0.87 ± 0.09 ，两轮的 C_r 均大于 0.7。均数 M_j 分别是 4.33 ± 0.22 、 4.49 ± 0.23 ，满分比 K_j 分别是 0.56 ± 0.11 、 0.64 ± 0.11 。变异系数 V_j 分别是 0.21 ± 0.05 、 0.14 ± 0.04 ，肯德尔和谐系数 W 分别是 0.131、0.149，经检验两轮调查的 W 的 $\chi^2 = 89.018$ 、 $P < 0.001$ ， $\chi^2 = 86.431$ 、 $P < 0.001$ 。根据触发条目纳入标准，第一轮根据专家对各触发器条目反馈建议的评分，共 7 个触发器条目 L1、L8、L11、L12、

L13、T5、T7 的 M_j 、 K_j 、 V_j 不符合入选标准，经讨论保留 L12、L13，修改 L9、L10、L12、T6，见表 1。第二轮专家咨询结果中两个触发器 L12、C2 不符合入选标准，经讨论保留 C2。经过两轮的 Delphi 法专家征询后构建了心血管系统药物的住院患者 ADE 的触发器条目共计 29 项，包括 9 项实验室检查指标、11 项临床表现、6 项解救药物、3 项干预措施。

表 1 专家修改建议

Tab 1 Modification suggestion of expert

编号	原触发器	修改建议
L9	血清尿素氮或肌酐 > 2 倍正常值上限 (ULN)	在 48 h 内，血肌酐上升 $\geq 0.3 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ ($\geq 26.5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)；或推测在 7 d 内，血肌酐升至 ≥ 1.5 倍基线值水平
L10	谷丙转氨酶 (ALT) 或谷草转氨酶 (AST) > 2×ULN，碱性磷酸酶 (ALP) 和总胆红素 (TBil) > 2×ULN	达到下列 3 个标准之一：ALT $\geq 5 \times \text{ULN}$ ；ALP $\geq 2 \times \text{ULN}$ (尤其是伴随 AST 升高且排除骨骼疾病引起的 ALP 水平升高)；ALT $\geq 3 \times \text{ULN}$ 同时 TBil $\geq 2 \times \text{ULN}$
L12	血红蛋白 < $120 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	男性：血红蛋白 < $120 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ；女性 (非妊娠)：< $110 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$
T6	使用谷胱甘肽、双环醇、甘草酸制剂	使用谷胱甘肽、甘草酸类、双环醇、多烯磷脂胆碱

2.2 方案验证及主动监测情况

2.2.1 GTT 法触发器检出情况 根据 Delphi 法确定的 29 项触发器条目，对 2022 年全年合格的 240 份病历进行人工审查。所建立的 29 项触发器中，有 4 项未检出，有 25 项显示阳性。240 份病历中触发器阳性的有 206 条，涉及病例 169 例，阳性触发率为 70.42% (169/240)。其中以“C5 胸闷、心悸、心动过速、心动过缓”触发器检出阳性例次最高，有 49 例次；其次是“C4 呼吸困难、气促、咳嗽、干咳”，有 28 例次，“L13 大便隐血阳性”，有 25 例次 (见表 2)。

2.2.2 ADE 检出情况 通过回顾性审查 240 份心血管内科患者病历，经 Naranjo 评定法判定为 ADE 的阳性触发条目 107 条，涉及病例 74 例，总体触发器阳性预测值 (PPV) 为 51.94% (107/206)；ADE 主动监测检出率为 30.83% (74/240)。其中以“L13 大便隐血阳性” ADE 检出阳性触发例次最高，有 23 例次；其次是“L5 血钾 < $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ”有 15 例次；“C1 头痛、头胀、头晕、失眠、抽搐、嗜睡”“C3 恶心、呕吐、便秘、腹痛、腹胀、反酸”各有 12 例次。此外，在病历审查过程中发现非触发条目尿潜血阳性有 32 例。病历审查过程中未发现用药错误类型的 ADE (见表 2)。

2.2.3 ADE 严重程度分级及分布情况 240 例患者中，ADE 严重程度分级最多的是 E 级损伤，占 89.19%，未发现 G 和 I 级损伤，其中有 1 例由于长期服用阿司匹林 + 氯吡格雷导致患者消化道出血造成 H 级损伤，其他 ADE 导致的都是临时的损伤，没有发现导致永久性损伤或者死亡的 ADE，见表 3。

2.2.4 ADE 相关药物类别、累及系统 - 器官

ADE 共涉及 5 类药物，分别是抗血栓药、降血压药、抗心绞痛、抗心肌缺血药及抗心律失常药物，其中抗血栓形成药占比 61.71%，其次是降血压药 26.66%。本研究 ADE 共累及 9 个系统 - 器官，受损伤最多的是胃肠系统，共 55 例次；代谢和营养障碍次之，共 18 例次，还涉及肝胆、神经、泌尿、皮肤、全身、呼吸、血液和心血管系统等，临床表现多样，见表 4。

2.2.5 ADE 自主上报情况及其与 GTT 法触发器检出率比较 该院在 2022 年期间心血管内科自主上报心血管相关药物的 ADE 为 6 例，自主上报率为 0.28% (6/2166)，而经 GTT 法触发器检出的 ADE 检出率为 30.83% (74/240)，两者使用 SPSS 24.0 版软件进行 χ^2 检验，得 $\chi^2 = 618.997$ ， $P < 0.05$ ，自主上报率与 GTT 法 ADE 检出率相比差异具有统计学意义。

3 讨论

3.1 Delphi 调查的可靠性

本研究中，来自广东省的 20 名心血管内科医护人员参与两轮的调查，人数符合 Delphi 法对专家 8 ~ 20 人的要求，专家调查表两轮的回收率分别为 90.91%、100%，专家亦对调查内容给予重要建议。有研究表明，Delphi 法的调查表回收率超过 75% 可视作一次良好的调查^[11]。Delphi 法中，专家的权威系数 ≥ 0.7 说明专家意见具有科学性、权威性，可以采纳^[12]，两轮调查表调查专家权威系数均大于 0.7，表明专家意见具有权威性应予采纳。专家意见集中程度 M_j 、 K_j 越高，条目与 ADE 关联越重要，第二轮调查触发器条

表 2 心血管疾病药物触发器检出情况

Tab 2 Detection of cardiovascular diseases by drug triggers

类别	编号	触发器	释义	第一轮专家咨询			第二轮专家咨询			触发 频次	ADE 频次	PPV/ %
				M_j	K_j	V_j	M_j	K_j	V_j			
检验指标	L1	白细胞计数 $< 3 \times 10^9 \cdot L^{-1}$	使用白细胞减少的药物	4.05	0.55	0.32	/	/	/	/	/	/
	L2	血小板计数 $< 50 \times 10^9 \cdot L^{-1}$	使用血小板减少的药物	4.45	0.60	0.17	4.35	0.70	0.24	3	3	100
	L3	部分促凝血酶原时间 $> 100 s$	使用肝素过量	4.65	0.70	0.13	4.60	0.65	0.13	2	2	100
	L4	INR > 6	使用华法林过量	4.85	0.85	0.08	4.75	0.75	0.09	1	1	100
	L5	血钾 $< 3 mmol \cdot L^{-1}$	使用致低血钾的药物	4.45	0.55	0.15	4.55	0.65	0.15	17	15	88
	L6	血钾 $> 5.5 mmol \cdot L^{-1}$	使用致高血钾的药物	4.50	0.55	0.13	4.80	0.80	0.09	0	0	0
	L7	血钠 $< 130 mmol \cdot L^{-1}$	使用致低血钠的药物	4.40	0.55	0.19	4.50	0.65	0.13	6	3	50
	L8	肌酸激酶 $> 269 U \cdot L^{-1}$	使用致心脏毒性的药物	3.95	0.40	0.27	/	/	/	/	/	/
	L9	在 48 h 内, 肌酐上升 $\geq 0.3 mg \cdot dL^{-1}$ ($\geq 26.5 \mu mol \cdot L^{-1}$); 或推测在 7 d 内, 肌酐升至 ≥ 1.5 倍基线值水平	使用致肾损伤药物或氨基酸补充 过量	4.30	0.50	0.27	4.70	0.70	0.10	6	2	33
	L10	达到下列 3 个标准之一: ALT $\geq 5 \times ULN$; ALP $\geq 2 \times ULN$ (尤其是伴随 AST 升高 且排除骨骼疾病引起的 ALP 水平升高); ALT $\geq 3 \times ULN$ 同时 TBil $\geq 2 \times ULN$	使用肝损伤药物	4.40	0.50	0.17	4.65	0.65	0.11	7	6	86
	L11	高尿酸血症女性尿酸 $> 360 \mu mol \cdot L^{-1}$, 男 性尿酸 $> 420 \mu mol \cdot L^{-1}$	高尿酸血症	4.20	0.45	0.21	/	/	/	/	/	/
	L12	男性: 血红蛋白 $< 120 g \cdot L^{-1}$; 女性 (非妊娠): $< 110 g \cdot L^{-1}$	贫血	3.90	0.40	0.27	4.00	0.45	0.20	/	/	/
L13	大便隐血阳性	使用致胃肠出血的药物	4.15	0.45	0.22	4.20	0.55	0.20	25	23	92	
临床表现	C1	头痛、头胀、头晕、失眠、抽搐、嗜睡	使用致神经系统症状发生的药物	4.20	0.50	0.24	4.25	0.55	0.19	17	12	71
	C2	肌痛、关节痛	使用致肌肉骨骼系统损害的药物	4.30	0.55	0.23	4.10	0.45	0.20	3	0	0
	C3	恶心、呕吐、便秘、腹胀、反酸	使用致胃肠道系统损害的药物	4.40	0.55	0.17	4.25	0.50	0.20	14	12	86
	C4	呼吸困难、气促、咳嗽、干咳	使用致呼吸系统损害药物	4.20	0.50	0.23	4.20	0.55	0.17	28	0	0
	C5	胸闷、心悸、心动过速、心动过缓	使用致心率及心律失常的药物	4.30	0.55	0.21	4.40	0.65	0.17	49	1	2
	C6	皮疹、瘙痒	使用易引起皮肤反应的药物	4.20	0.50	0.23	4.30	0.50	0.19	5	4	80
	C7	低血压	使用降压的药物	4.45	0.60	0.17	4.45	0.70	0.13	2	2	100
	C8	鼻、眼、结膜出血、牙龈出血	五官出血	4.30	0.55	0.21	4.35	0.60	0.17	1	1	100
	C9	皮肤血肿、瘀斑、出血	皮下出血	4.30	0.50	0.19	4.40	0.60	0.15	3	3	100
	C10	血便、柏油样大便、呕血	消化道出血	4.40	0.55	0.17	4.80	0.80	0.09	4	4	100
C11	潮红	使用扩张血管的药物	4.15	0.50	0.24	4.30	0.55	0.17	0	0	0	
解救用药	T1	使用维生素 K	解救华法林药物过量导致的出血	4.45	0.70	0.21	4.75	0.75	0.09	1	1	100
	T2	使用鱼精蛋白	解救肝素过量	4.65	0.70	0.13	4.80	0.80	0.09	1	1	100
	T3	使用甲氧氯普胺 / 昂丹司琼 / 格拉司琼	解救呕吐症状	4.25	0.60	0.25	4.30	0.50	0.19	1	1	100
	T4	使用肾上腺素	解救药物所致过敏性休克	4.40	0.70	0.24	4.75	0.85	0.08	0	0	0
	T5	使用开塞露 / 乳果糖口服溶液	解救药源性便秘	3.95	0.50	0.30	/	/	/	/	/	/
	T6	使用谷胱甘肽、甘草酸类、双环醇、多烯 磷脂胆碱	解救药源性肝损伤	4.15	0.45	0.22	4.50	0.60	0.15	2	2	100
	T7	使用蒙脱石散 / 复方嗜酸乳杆菌片 / 复方乳 酸菌肠溶胶囊 / 双歧乳杆菌三联活菌片 / 布拉氏酵母菌散	解救腹泻	4.00	0.45	0.27	/	/	/	/	/	/
	T8	使用地塞米松 / 苯海拉明 / 地氯雷他定 / 氯 雷他定 / 氯苯那敏 / 西替利嗪 / 异丙嗪	解救药物过敏	4.45	0.65	0.20	4.70	0.75	0.12	3	3	100
干预措施	I1	突然停药	患者出现 ADE 停药控制或突然 停药导致 ADE	4.45	0.65	0.20	4.50	0.55	0.13	3	3	100
	I2	转至重症监护病房	患者病情严重	4.65	0.75	0.14	4.65	0.70	0.13	0	0	0
	I3	抢救	ADE 导致呼吸心搏骤停需抢救	4.55	0.70	0.18	4.70	0.75	0.12	2	2	100
合计										206	107	51.94

表 3 ADE 严重程度分级及分布情况 [n (%)]

Tab 3 Classification and distribution of severity of ADE [n (%)]

方式	D 级	E 级	F 级	G 级	H 级	I 级
GTT 法	2 (2.70)	66 (89.19)	5 (6.76)	0 (0.0)	1 (1.35)	0 (0.0)
自发上报法	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (83.33)	0 (0.0)	1 (16.67)	0 (0.0)

目的 M_j 、 K_j 均较第一轮升高, 说明专家认为第二轮的触发器条目与 ADE 的关联性比第一轮更重要。专家意见协调程度中第二轮 V_j 比第一轮下降, V_j 越小表明专家对每一条触发器条目的一致性越高, $V_j \leq 0.3$ 协调程度可信可取^[10]。经检验

表 4 ADE 累及的系统及临床表现
Tab 4 ADE involved systems and clinical manifestations

系统	GTT 检出 ADE 的临床表现	自主上报	GTT
代谢和营养障碍	低血钾 (15)、低钠 (3)	1	18
肝胆系统损伤	转氨酶高 (6)	0	6
中枢及外周神经系统损伤	头痛 (3)、头晕 (3)、失眠 (6)	0	12
泌尿系统损伤	肌酐升高 (2)	0	2
皮肤及其附件损伤	皮疹/瘙痒 (4)、皮肤血肿/瘀斑 (3)	0	6
全身损伤	冷热交替 (1)、喉头水肿 (1)	1	2
胃肠系统损伤	大便隐血阳性 (23)、粪血红蛋白阳性 (8)、恶心 (3)、呕吐 (2)、腹痛 (3)、 腹胀 (2)、反酸 (5)、便秘 (1)、血 (黑) 便 (3)、呕血 (4)、呕吐 (1)	2	55
心血管系统一般损伤	低血压 (2)	0	2
血小板、出血和凝血障碍	血小板计数低 (3)、部分促凝血酶原时间延长 (2)、INR 延长 (1)	1	5
呼吸系统损伤	干咳 (0)	1	0
合计		6	108

注：同一 ADE 可能同时有多个临床表现。

Note: The same ADE may have multiple clinical manifestations at the same time.

两轮调查 W 的 $P < 0.001$ ，且第二轮 W 较第一轮升高，说明专家对于触发器条目的一致性程度较高。在征询两轮专家反馈意见的情况下，将不符合条目筛选纳入标准进行剔除，共剔除 6 项触发器，建立了 29 项触发器。

3.2 触发器敏感性与特异性分析

触发器评价指标包括敏感度和特异性。敏感度用阳性触发率表示，触发器阳性率值越大，说明触发器的敏感性越高，设计得越合理；特异性用 PPV 进行评估，表示识别 ADE 的概率，越接近 100%，特异性越好^[13]。本研究通过两轮 Delphi 法优化的 29 项触发器对我院 2022 年 240 例病历进行审查，有 25 项呈阳性触发，触发器阳性触发率为 70.42% (169/240)，提示触发器敏感性较高，设计较合理。只有 4 项触发器在审查中未触发，这可能与审查样本量小有关，需对触发器进行修订并扩大样本量。触发器总 PPV 为 51.94% (107/206)，与其他研究 (29.11% ~ 44.38%) 相比处于中上水平^[14-15]，证实了所建立的本地心血管药物 ADE 的触发器有效性和准确性。其中 PPV 超过 100% 的共有 14 项，触发器检出阳性与 ADE 发生的准确性和特异性好。

3.3 触发器设计情况分析

29 项触发器中“L4 INR > 6”“C8 鼻、眼、结膜出血、牙龈出血”“T1 使用维生素 K”“T2 使用鱼精蛋白”的 PPV 均为 100% (1/1)，属于低频次高相关性触发器，一旦出现触发阳性说明患者极有可能已经发生了 ADE，应引起高度重视。针对“T3 使用甲氧氯普胺/昂丹司琼/格拉司琼”阳性触发少的情况，考虑本研究剔除了肿瘤病历，导致服用格拉司琼、托烷司琼止吐药的情况减少，因此将该触发器改为 T3 使用甲氧氯普胺。此外在病例审查过程中发现有 3 例患者使用华法林后

INR > 4 的情况，患者虽未出现出血的症状，一旦发生出血风险极高，为增加触发阳性率，提高 ADE 的检出率及时采取预防措施，考虑将该触发器改为 INR > 4。

触发器 PPV 低条目的修订，对“C5 胸闷、心悸、心动过速、心动过缓”触发器虽有 49 例次显示阳性，但只有 1 例次检出 ADE，可能大部分患者为其基础疾病心血管疾病本身导致的胸闷、心悸等。“C4 呼吸困难、气促、咳嗽、干咳”有 28 例次显示阳性，但没有检出 ADE，可能原因为患者心血管疾病本身导致的呼吸困难、气促等，且入院时患者合并呼吸系统疾病从而导致虽为阳性触发，但并不是药源性疾病。故为避免因疾病因素导致假阳性的触发，应考虑剔除该两项触发器。在审查病历时发现部分患者在入院时有肾结石、慢性肾衰竭等因素导致肌酐通常超过正常值上限，因此经讨论将触发器 L9 加入患者无肾衰竭病史这个限定条件，减少假阳性触发。

29 项触发器中有 4 项并未检测出阳性，包括“L6 血钾 > 5.5 mmol · L⁻¹”“C11 潮红”“T4 使用肾上腺素”“I2 转至重症监护病房”。L6、C11 未能检出阳性的原因可能是纳入相关病种的病历数少以及药物临床应用少所导致，另外，临床症状的触发器如“C11 潮红”的触发有赖于病程记录，可能存在医务人员认为患者 ADE 临床表现较轻微，可不予特殊处理，未在病历资料中记录，导致病历审查过程中无法触发而漏检 ADE。L6、T4 这两项触发器，考虑 ADE 的发生可能危及生命，风险极高，经讨论考虑上述 4 项触发器对 ADE 的监测具有重要意义，故均予以保留。同时，病历审查中发现高频发生的尿潜血阳性有 32 例，应形成新的触发工具。

3.4 ADE 结果分析

3.4.1 ADE 严重程度等级分析 240 例使用心血管疾病药物患者有 74 例患者发生 ADE，大多数为临时性伤害 D 级、E 级和 F 级。这可能与本研究患者数量少和使用高风险药物较少有关，这也提醒临床药师在心血管内科更应该加强常见药品在住院患者中的药学监护。

3.4.2 ADE 涉及药物、累及器官 - 系统情况分析

ADE 涉及药物以抗血栓药物和降血压药物多见，考虑与心血管疾病患者该类药物的使用疗程过长有关。胃肠系统损伤共 55 例次，其中大便隐血阳性出现与临床治疗中阿司匹林和氯吡格雷等抗血小板药物频繁使用有关，且这部分患者常合并使用抗凝药物和行有创操作，增加了消化道损伤风险^[16]。相关研究发现阿司匹林可使消化道损伤风险增加 2 ~ 4 倍，使消化道出血发生率增加 1.37 倍^[17]。代谢和营养障碍次之，共 18 例次，可能与临床治疗中呋塞米等利尿剂的长疗程、频繁使用有关，研究发现低血钾症也是常见的 ADE，发生率为 14.55%^[18]。

3.5 ADE 自主上报情况及其与 GTT 法触发器检出率比较

触发器检出 74 例 ADE，检出率为 30.83% (74/240)，明显高于心血管内科同期的自主上报率 (0.28%)，说明 GTT 主动监测能较好地弥补自主上报的不足。

3.6 应用前景

本研究经过两轮 Delphi 法优化心血管疾病药物触发器，在对该医疗机构的 ADE 进行主动监测验证有效，其 ADE 检出率更高；本研究在触发器使用过程中进行进一步的优化，为避免因疾病因素导致假阳性的触发，经讨论后已剔除假阳性率高的触发器，且对触发点设置了限制条件，排除了相关疾病因素的影响，能够较为灵敏地发现 ADE，可为后续各类药物警戒、药物上市后再评价提供参考。此外，目前国家试行开展驻科药师工作模式，临床药师亦可参考本类研究结果作为工作的切入点，对于触发器 PPV 高的条目，在制订用药方案时，可充分考虑该不良反应发生后的处理及防范对策，以保障患者的用药安全。

参考文献

[1] WHO. 10 facts on patientsafety [EB/OL]. World Health Organization, 2007.5.8. <http://www.who.int/features/factfiles/>

patient_safety/en.

[2] 顾艳, 鲁毅, 刘朵, 等. 全面触发工具在住院患者药品不良事件监测中的应用评估 [J]. 现代医药卫生, 2021, 37 (24): 4295-4298.

[3] 林鑫, 郭进京, 任慧玲. 基于 WHOART 的我国心血管系统药物致不良反应病例报告分析 [J]. 中国药物警戒, 2019, 16 (3): 157-163.

[4] 吴飞华, 余辉, 王叶遵. 基层医院药品不良反应漏报情况调查与原因分析 [J]. 临床合理用药杂志, 2021, 14 (2): 147-149.

[5] Valkonen V, Haatainen K, Saano S, et al. Evaluation of Global trigger tool as a medication safety tool for adverse drug event detection-across-sectional study in a tertiary hospital [J]. Eur J Clin Pharmacol, 2023, 79 (5): 617-625.

[6] Griffin FA, Resar RK. IHI global trigger tool for measuring adverse events [M]. 2nd ed. Cambridge: Institute for Healthcare Improvement, 2009.

[7] ClassenDC, Resar R, Griffin F, et al. Global trigger tool' shows that adverse events in hospitals may be ten times greater than previously measured [J]. Health Aff (Millwood), 2011, 30 (4): 581-589.

[8] 王春枝, 斯琴. 德尔菲法中的数据统计处理方法及其应用于研究 [J]. 内蒙古财经大学学报, 2011, 9 (4): 92-96.

[9] 林清然. 应用德尔菲法构建预防住院患者跌倒的护士培训课程 [D]. 暨南大学, 2014.

[10] 张颖, 季聪华, 李秋爽, 等. 中医临床实践指南制修订中德尔菲法的统计分析方法 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33 (1): 249-251.

[11] 贺卓卓, 丁樱, 秦阳. 基于德尔菲法确定《儿童紫癜性肾炎中西医结合诊疗指南》临床问题与结局指标 [J]. 中国中医药信息杂志, 2023, 30 (10): 1-5.

[12] 董玉静, 李葆华, 侯淑肖. 应用德尔菲法建立脑卒中患者延续性护理方案 [J]. 中国护理管理, 2013, 13 (10): 34-37.

[13] 彭晓晔. 精神科医院用药风险调查及全面触发工具应用 [D]. 上海: 上海交通大学, 2019.

[14] 陈永, 黎锦健, 梁莹莹, 等. 基于全面触发工具构建 DPP-4 抑制剂药品不良反应主动监测模型 [J]. 今日药学, 2023, 33 (8): 636-640.

[15] 张伟威, 王娜. 全面触发工具在老年住院患者药品不良事件监测中的研究 [J]. 中国药物警戒, 2021, 18 (1): 56-63.

[16] 都丽萍, 师春焕, 唐筱婉, 等. 心血管疾病住院患者阿司匹林使用情况及其消化道损伤情况 [J]. 血管与腔内血管外科杂志, 2023, 9 (1): 7-10, 26.

[17] 抗血小板药物消化道损伤的预防和治疗中国专家共识组. 抗血小板药物消化道损伤的预防和治疗中国专家共识 (2012 更新版) [J]. 中华内科杂志, 2013, 52 (3): 264-270.

[18] 郇晓敏. 心血管内科疾病治疗中利尿剂使用的不良反应分析 [J]. 饮食保健, 2021 (39): 69-70.

(收稿日期: 2024-01-19; 修回日期: 2024-03-06)

112 例新型冠状病毒感染患者使用阿兹夫定片的不良反应分析

兰博, 李桂德, 李伟斯, 周甘平, 林春燕* (广西壮族自治区江滨医院临床药学科, 南宁 530021)

摘要: **目的** 对新型冠状病毒感染 (COVID-19) 患者使用阿兹夫定片发生的不良反应 (ADR) 进行分析, 为临床合理用药提供参考。**方法** 临床药师对我院 2022 年 11 月 1 日至 2023 年 1 月 15 日使用阿兹夫定片的 352 例 COVID-19 患者进行药学监护, 询问患者发生 ADR 的临床表现, 记录患者的一般资料、用药情况、肝肾功能等信息。**结果** 我院使用阿兹夫定片患者的平均年龄为 74.60 岁, 60 岁以上的老年患者占比为 84.09%。352 例患者中发生 ADR 的患者共计 112 例, ADR 总体发生率为 31.82%, 阿兹夫定片 ADR 主要表现为头晕、头痛、恶心、腹痛、转氨酶升高, 其中神经系统 (26.16%)、胃肠系统 (25.00%) 及肝胆系统 (21.51%) 损害占比较高。单因素分析提示转氨酶升高与患者平均年龄和用药时间显著相关。**结论** COVID-19 患者使用阿兹夫定片抗病毒治疗应高度重视相关 ADR 监测, 用药时间超过一周的老年患者发生转氨酶升高的风险较大, 临床需加强相关监测, 确保患者用药安全。

关键词: 新型冠状病毒感染; 阿兹夫定片; 药品不良反应; 转氨酶升高

中图分类号: R969.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)06-1658-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.040

112 cases of adverse drug reactions induced by azvudine tablets in patients with COVID-19

LAN Bo, LI Gui-de, LI Wei-si, ZHOU Gan-ping, LIN Chun-yan* (*Department of Clinical Pharmacy, Jiangbin Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021*)

Abstract: Objective To analyse the adverse drug reactions (ADR) induced by azvudine tablets in patients with COVID-19, to provide reference for rational drug use. **Methods** Clinical pharmacists provided pharmaceutical care for 352 patients with COVID-19 who received azvudine tablets in our hospital from November 1, 2022 to January 15, 2023. They inquired about the clinical manifestations of ADR, and recorded the general information, drug use, and liver and kidney function. **Results** The average age of patients who used azvudine tablets in our hospital was 74.60 years old, and patients over 60 years old accounted for 84.09%. Totally 112 ADR cases reported out of the 352 patients, with overall incidence 31.82%. The ADRs of azvudine tablets mainly included dizziness, headache, nausea, abdominal pain and elevated aminotransferase, among which the damage of the nervous system (26.16%), gastrointestinal system (25.00%) and hepatobiliary system (21.51%) accounted for a relatively high proportion. Univariate analysis indicated that the increase of transaminase was obviously correlated with the mean age and duration of medication. **Conclusion** Close monitoring of ADRs by azvudine tablets in patients with COVID-19 is needed. Elderly patients who take azvudine tablets for more than one week have a greater risk of elevated transaminase, so careful monitoring should be strengthened to ensure medication safety.

Key words: COVID-19; azvudine tablet; adverse drug reaction; elevated transaminase

阿兹夫定是一款附条件批准应用于成年人类点核苷类抗病毒药物, 在体外对 HIV、丙型肝炎免疫缺陷病毒 1 型 (HIV-1) 感染患者的口服双靶病毒 (HCV)、肠道病毒 (EV71) 和乙型肝炎病毒

基金项目: 广西卫健委自筹经费科研课题 (No. Z-A20230225, No. Z20210351)。

作者简介: 兰博, 男, 硕士, 副主任药师, 主要从事临床药学工作, email: 1187274546@qq.com * **通信作者:** 林春燕, 女, 硕士, 副主任药师, 主要从事临床药学工作, email: 59921249@qq.com

(HBV) 等具有显著的抗病毒作用, 并在治疗 HIV 感染的 II 期临床试验展现出良好的药代动力学、疗效和安全性^[1]。随着新型冠状病毒在全球的持续传播^[2], 新的抗病毒治疗方案亟待发现, 2022 年 7 月 25 日, 国家药品监督管理局根据《中华人民共和国药品管理法》相关规定, 按照药品特别审批程序, 进行应急审评审批, 附条件批准阿兹夫定片增加治疗新型冠状病毒感染 (COVID-19) 适应证注册申请, 用于治疗普通型 COVID-19 成年患者^[3], 标志着阿兹夫定成为我国首个自主研发并拥有全球专利的口服小分子 COVID-19 治疗药物。2022 年 8 月 9 日, 国家卫生健康委办公厅、国家中医药局办公室发布《关于将阿兹夫定片纳入新型冠状病毒感染诊疗方案的通知》, 将阿兹夫定纳入国家《新型冠状病毒感染诊疗方案 (第九版)》^[4], 并进入医保结算, 引发社会广泛关注。相较于一盒难求的高价进口药, 大家纷纷把希望转向价格更低的阿兹夫定, 如何安全使用阿兹夫定, 是一个至关重要的问题。目前, 暂未见系统分析 COVID-19 患者使用阿兹夫定片的不良反应 (ADR) 研究, 本研究通过对 112 例 COVID-19 患者使用阿兹夫定片治疗出现 ADR 的病例进行统计分析, 以期临床合理用药提供数据支持。

1 资料与方法

1.1 资料来源

临床药师对我院 2022 年 11 月 1 日至 2023 年 1 月 15 日 COVID-19 患者使用阿兹夫定片的 352 例患者进行药学监护, 询问并记录患者阿兹夫定片相关 ADR 的累及系统 - 器官及临床表现, 利用医院信息管理系统 (HIS) 对患者的一般资料、用药情况、肝肾功能等信息进行检索统计。不良反应评判标准采用国家药品不良反应监测中心药品不良反应关联性评价方法。

1.2 统计方法

使用 SPSS 26.0 软件对数据进行统计分析。计数资料采用百分比进行描述, 两组间比较采用 χ^2 检验。计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 进行描述, 两组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 患者基本情况

352 例患者均使用河南真实生物科技有限公司生产的阿兹夫定片 (国药准字 H20210035, 规格: 1 mg), 每次 5 mg, 每日 1 次。其中男性 234 例, 女性 118 例, 平均年龄为 74.60 岁, 60 岁以上的老年患者占比为 84.09%。发生 ADR 的患者共计 112 例, 其中男性 80 例, 女性 32 例, 平均年龄为 73.67 岁, 60 岁以上的老年患者占比为 86.61% (见表 1)。

表 1 患者年龄和性别分布

年龄 / 岁	纳入患者				发生 ADR 的患者			
	男性	女性	合计	占比 / %	男性	女性	合计	占比 / %
< 30	5	0	5	1.42	3	0	3	2.68
30 ~ 39	4	1	5	1.42	1	0	1	0.89
40 ~ 49	9	5	14	3.98	4	0	4	3.57
50 ~ 59	24	8	32	9.09	6	1	7	6.25
60 ~ 69	40	20	60	17.05	17	9	26	23.21
70 ~ 79	43	30	73	20.74	15	8	23	20.54
80 ~ 89	69	42	111	31.53	25	12	37	33.04
≥ 90	40	12	52	14.77	9	2	11	9.82
合计	234	118	352	100.00	80	32	112	100.00

2.2 ADR 累及系统 - 器官及临床表现

按照 ADR 累及系统 - 器官进行分类, 112 例发生 ADR 的患者共累及 8 个系统 - 器官, ADR 的临床表现共涉及 16 种, 172 例次, 其中排名前三位的分别是神经系统 (45 例次, 26.16%)、胃肠系统 (43 例次, 25.00%) 及肝胆系统 (37 例次, 21.51%), 最常见 ADR 的临床表现为谷丙转氨酶 (ALT) 升高 (21 例次, 12.21%)、头晕 (19 例次, 11.05%) 及恶心 (17 例次, 9.88%) (见表 2)。

表 2 阿兹夫定片所致 ADR 累及系统 - 器官及临床表现

累及系统 - 器官	临床表现 (例次)	合计 / n	构成比 / %
神经系统	头晕 (19)、头痛 (15)、失眠 (11)	45	26.16
胃肠系统	恶心 (17)、呕吐 (8)、腹痛 (12)、腹泻 (6)	43	25.00
肝胆系统	谷丙转氨酶 (ALT) 升高 (21)、谷草转氨酶 (AST) 升高 (16)	37	21.51
血液及淋巴系统	白细胞减少 (10)、中性粒细胞减少 (6)	16	9.30
皮肤及附件损害	皮疹 (8)、瘙痒 (6)	14	8.14
内分泌系统	血糖升高 (9)	9	5.23
心血管系统	心悸 (5)	5	2.91
呼吸系统	呼吸衰竭 (3)	3	1.74
合计		172	100.00

2.3 转氨酶升高单因素分析

COVID-19 患者使用阿兹夫定转氨酶升高的单因素分析结果显示, 两组患者的性别、是否合并糖尿病、基础肝功能、基础肾功能等比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。两组患者的平均年龄、阿兹夫定使用天数比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (见表 3)。

3 讨论

3.1 阿兹夫定片安全性研究进展

表 3 转氨酶升高单因素分析

Tab 3 Univariate analysis of elevated aminotransferase

项目	异常组 (n = 30)	正常组 (n = 82)	χ^2/t	P 值
平均年龄	79.43 ± 11.84	71.56 ± 15.24	2.558	0.012
男性比例	21 (70.00)	59 (71.95)	0.041	0.840
合并糖尿病	18 (60.00)	47 (57.32)	0.065	0.799
阿兹夫定使用天数 /d			8.454	0.004
≤ 7	9	50		
7 ~ 14	21	32		
基础肝功能 / (U · L ⁻¹)				
ALT	44.87 ± 36.68	46.65 ± 39.07	- 0.217	0.829
AST	50.77 ± 43.13	47.91 ± 42.39	0.314	0.754
基础肾功能				
肌酐 (CR) / (μmol · L ⁻¹)	96.03 ± 46.11	84.12 ± 34.67	1.288	0.205
尿素氮 (BUN) / (mmol · L ⁻¹)	8.43 ± 2.82	7.77 ± 2.45	1.212	0.228

目前阿兹夫定片的主要安全性研究数据来源于 4 项关键的 III 临床试验, 分别在巴西 (2 项)、中国 (1 项) 以及俄罗斯 (1 项) 注册完成。一项在巴西注册的研究中^[5] 纳入 172 例中型感染患者, 试验组给予阿兹夫定片 5 mg qd, 对照组给予安慰剂, 研究结果提示阿兹夫定组主要 ADR 为谷氨酰转氨酶 (GGT)、ALT、AST 升高和 1 级头痛, 分别有 13、45、10、8 例, 阿兹夫定组不良反应发生率与安慰剂组无显著差异。另一项在巴西注册的研究^[6] 提示阿兹夫定 ADR 主要为头痛、头晕、AST 升高、恶心、ALT 升高、D-二聚体升高, 分别有 36、35、21、19、14、11 例, 阿兹夫定组 ADR 发生率与安慰剂组无显著差异。在中国^[7] 及俄罗斯^[8] 的 III 期临床试验均提示阿兹夫定的安全性和耐受性良好, 与安慰剂组无显著差异, 并未增加受试者风险。

3.2 发生 ADR 患者的基本情况

本研究纳入的人群大多数为老年患者, 患者的平均年龄为 74.60 岁, 与我院三级老年病专科医院收治人群有关。在 112 例发生 ADR 的患者中, 60 岁以上的老年患者占比为 86.61%, 一方面可能由于老年患者基础疾病多, 联合用药品种多, 另一方面可能与老年患者机体功能衰退带来药物动力学改变有关。阿兹夫定片药品说明书提示: 尚未进行本品对老年患者的用药研究, 且无可靠参考文献。针对 COVID-19 患者的临床试验中纳入了 60 岁及以上的老年患者, 目前研究数据有限, 老年患者的安全性以及是否需要调整用量尚不明确^[8]。因此, 临床在使用阿兹夫定片时, 应对老年患者进行重点监测, 发现 ADR 时应及时采取应对措施。发生 ADR 的病历资料中, 男性患者占比为 71.43%, 高于女性, 但由于病例总

数的局限性, 无法明确判断 COVID-19 患者阿兹夫定片 ADR 的发生与性别是否具有相关性。

3.3 ADR 与用药方案

阿兹夫定片药代动力学研究提示: 阿兹夫定蛋白结合率较低, 进入体内器官分布以胸腺分布最多、脾脏次之, 心、肝、肺等组织较少, 主要以原形经肾脏排泄^[9], 临床研究排除了肾功能不全 (肾小球滤过率 < 70 mL · min⁻¹, 或肌酐超过正常值上限) 及肝功能检查异常 (ALT 和 / 或 AST 超过正常值上限 3 倍, 或总胆红素超过正常值上限的 2 倍) 的患者, 因此药品说明书建议中重度肝、肾功能损伤患者应慎用阿兹夫定治疗。本研究提示在 112 例发生 ADR 的患者中, 肾功能不全患者 29 例 (占比 25.89%), 肝功能异常患者 7 例 (占比 6.25%), 因 COVID-19 初期缺乏相关数据支持, 该部分患者经院内合理用药专家组会诊后仍按 5 mg · d⁻¹ 的标准剂量治疗, 尚不明确患者发生 ADR 与患者肝肾功能不全是否具有相关性, 但已有相关专家建议阿兹夫定片在肾功能受损患者应慎用或减量使用^[10], 由于缺乏相关研究数据, 建议根据肾小球滤过率估算阿兹夫定给药剂量, 中度肾功能不全 [估算肾小球滤过率 (eGFR) 30 ~ 60 mL / (min · 1.73 m²)] 患者减量为每次 3 mg qd; 重度肾功能不全患者慎用。

阿兹夫定为 P-糖蛋白 (P-gp) 底物及弱效 P-gp 诱导剂^[11-12], 合用 P-gp 底物 (地高辛、达比加群酯、秋水仙碱), P-gp 抑制剂 (如环孢素、伊曲康唑、伏立康唑、泊沙康唑、利托那韦、决奈达隆、胺碘酮、维拉帕米、克拉霉素、葡萄柚汁) 及 P-gp 诱导剂 (如利福平、圣约翰草提取物) 时需慎重, 若确需联合使用, 必要时进行血药浓度监测。本次调查报告中, 有 22 例 COVID-19 合并

肺部真菌感染患者在使用阿兹夫定时同时联合使用伏立康唑抗真菌治疗, 3 例患者联合使用胺碘酮治疗, 以上两种联合使用药物均为 P-gp 抑制剂, 可抑制阿兹夫定片体内代谢, 从而使阿兹夫定血药浓度升高, 导致相关不良反应发生。目前阿兹夫定血药浓度监测尚不可及, 故临床医师在使用阿兹夫定时, 应注意相关药物相互作用导致的不良反应, 尤其是长疗程使用糖皮质激素诱发侵袭性真菌病的 COVID-19 患者, 选用抗真菌药物应慎用伏立康唑, 可结合患者真菌感染病原学酌情选用氟康唑、棘白菌素类及两性霉素 B 等抗真菌药物治疗^[13]。

3.4 ADR 累及系统 - 器官、临床表现、处理及转归

阿兹夫定片 ADR 累及的系统以神经系统最常见, 临床表现为头晕、头痛、失眠等, 大多数患者不良反应轻微未予以特别处理, 均可自行好转; 其次累及的系统为胃肠系统, 临床表现为恶心、呕吐、腹痛、腹泻, 经过药物对症治疗或不经治疗均能恢复正常, 多次给药亦未出现严重不良反应。此外, 阿兹夫定片累及肝胆系统 ADR 需引起临床高度重视, 其主要表现为 ALT 及 AST 升高。本研究中, ALT 及 AST 升高的病例中有 16 例 (53.33%) 超过正常值上限 3 倍, 5 例 (16.67%) 升高超过 5 倍, 这些患者在服用护肝药物的同时不得不暂停使用阿兹夫定片, 从而改用其他抗病毒药物治疗, 阿兹夫定片药品说明书修订中, 亦新增 AST 升高的黑框警告^[8]; 阿兹夫定片 ADR 累及的内分泌系统 ADR 中血糖升高常常容易被临床所忽视, 在排除患者糖摄入及药物溶媒等因素的影响下, 也应积极排查阿兹夫定片所致的血糖升高。

3.5 使用阿兹夫定片发生转氨酶升高的危险因素

阿兹夫定片转氨酶升高的单因素分析结果提示, 发生转氨酶升高的 ADR 与患者的平均年龄及阿兹夫定使用天数相关。目前, 尚无专门针对老年患者使用阿兹夫定的研究。虽然针对 COVID-19 患者的临床研究中纳入了 60 岁及以上老年患者, 但研究数据有限, 老年患者的安全性及是否需要调整用量尚不明确^[14]。本研究中发生转氨酶升高 ADR 组的平均年龄为 (79.43 ± 11.84) 岁, 高于对照组的 (71.56 ± 15.24) 岁, 故老年患者尤其是高龄患者使用阿兹夫定片时应密切监测肝功能, 必要时更换其他抗病毒药物治疗。阿兹夫定片治疗 COVID-19 的 III 期临床研究中, 每日口服一次阿兹夫定 (5 mg/次), 最多持续用药 14 d 的安全性和耐受性良好^[7-8], 故阿兹夫定片药品

说明书提示: 患者临床症状改善中位时间为 10 d 左右, 病毒清除时间为 5 d 左右, 疗程至多不超过 14 d, 本研究提示, 随着阿兹夫定使用疗程的延长, 患者发生转氨酶升高的风险亦升高, 故临床使用阿兹夫定需注意动态评估使用疗程。

4 小结

COVID-19 患者使用阿兹夫定片抗病毒治疗时, 医护人员应主动、有针对性地加强重点 ADR 监测, 发现问题及时处理才能确保患者用药安全及抗病毒治疗顺利进行。对于老年患者用药应充分考虑其肝肾功能减退对药物药代动力学的影响, 并注意药物间相互作用, 高龄及长疗程使用患者应密切监测转氨酶。本研究亦存在不足之处, 纳入研究者绝大多数为老年患者, 其发生 ADR 的种类及频次可能区别于无基础疾病的成年患者, 尚需开展多中心研究扩大研究人群以进一步分析阿兹夫定发生 ADR 的危险因素, 为合理用药提供依据。

参考文献

- [1] 王晶, 徐文峰, 金鹏飞. 国内首个自主研发治疗新型冠状病毒肺炎药物——阿兹夫定 [J]. 中国药学杂志, 2022, 57 (23): 2041-2044.
- [2] World Health Organization. Coronavirus Disease (Covid-19) Situation Dashboard [EB/OL]. (2022-12-13) [2022-12-13]. <https://covid19.who.int>.
- [3] 国家药品监督管理局. 国家药监局应急附条件批准河南真实生物科技有限公司阿兹夫定片增加新冠肺炎治疗适应症注册申请 [EB/OL]. (2022-07-25) [2022-08-08]. <https://www.nmpa.gov.cn/yaowen/ypjgyw/20220725165620176.html>.
- [4] 医政医管局. 关于将阿兹夫定片纳入新型冠状病毒肺炎诊疗方案的通知 [EB/OL]. (2022-08-09) [2022-12-02]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202208/33e3ff-4308b4446796c3f315601d436f.shtml>.
- [5] Cabral P, De Souza S, Da Silva R, et al. Serial viral load analysis by ddper to evaluate FC efficacy and safety in the treatment of moderate cases of COVID-19 [J/OL]. Biological Sciences, (2022-11-21) [2023-01-20]. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2273657/v1>.
- [6] Cabral P, Da Silva R, Souza S, et al. Serial viral load analysis by ddper to evaluate FNC efficacy and safety in the treatment of mild cases of COVID-19 [J/OL]. Biological Sciences, (2022-11-21) [2023-01-20]. <https://www.researchsquare.com/article/rs-2273694/v1>.
- [7] 陈艳芳, 邓西龙, 梁嘉碧. 新型冠状病毒肺炎抗病毒治疗临床药学指引 [J]. 今日药学, 2022, 32 (8): 561-572.
- [8] 河南真实生物科技有限公司. 阿兹夫定说明书 [Z]. 2022-07-25.
- [9] Zhang JL, Li YH, Wang LL, et al. Azvudine is a thy-

- mus-homing anti-SARS-CoV-2 drug effective in treating COVID-19 patients [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6: 414.
- [10] 陈勇川, 黄文祥. 阿兹夫定片在新型冠状病毒感染救治中应用的专家共识 [J]. *中国药业*, 2023, 32 (3): 1-6.
- [11] Liu YX, Wang YF, Peng YM, et al. Effects of the antiretroviral drug 2'-deoxy-2'- β -fluoro-4'-azidocytidine (FNC) on P-gp, MRP2 and BCRP expressions and functions [J]. *Pharmazie*, 2018, 73 (9): 503-507.
- [12] Liu YX, Liu BJ, Zhang Y, et al. Intestinal absorption mechanisms of 2'-deoxy-2'- β -fluoro-4'-azidocytidine, a cytidine analog for AIDS treatment, and its interaction with P-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein 2 and breast cancer resistance protein [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2017, 105: 150-158.
- [13] 中国成人念珠菌病诊断与治疗专家共识组. 中国成人念珠菌病诊断与治疗专家共识 [J]. *中华内科杂志*, 2020, 59 (1): 5-17.
- [14] 黄红萍, 陈清心, 于阗, 等. 阿兹夫定片治疗新型冠状病毒感染的安全性分析 [J]. *药物不良反应杂志*, 2023, 25 (1): 17-20.
- (收稿日期: 2023-09-18; 修回日期: 2023-11-02)

奈玛特韦 / 利托那韦潜在药物相互作用对新型冠状病毒感染治疗的影响：基于倾向评分匹配的回溯性研究

王璐, 曾露, 桂玲, 张文婷, 贡雪芃, 刘东, 魏安华* (华中科技大学同济医学院附属同济医院药学部, 武汉 430030)

摘要: **目的** 探讨奈玛特韦 / 利托那韦潜在药物相互作用 (pDDI) 对新型冠状病毒感染患者治疗有效性和安全性的影响。**方法** 回顾性分析 2022 年 12 月 1 日至 2023 年 2 月 28 日期间某院使用奈玛特韦 / 利托那韦治疗新型冠状病毒感染患者 264 例, 根据是否存在奈玛特韦 / 利托那韦 pDDI 分为 DDI 组 ($n = 163$ 例) 和 N-DDI ($n = 101$ 例)。通过倾向评分匹配均衡两组队列的基线特征后, 比较两组病情进展的复合终点 (包括 ICU 入住率、机械通气率和死亡率)、住院时长和不良反应发生率的结局指标。**结果** 奈玛特韦 / 利托那韦总体的 pDDI 发生率为 61.74%, 药物不良反应发生率为 7.95%, 未发生严重不良反应事件。匹配后 DDI 组 ($n = 91$ 例) 和 N-DDI 组 ($n = 101$ 例) 在人口统计、并发症以及治疗前后实验室检查之间的差异无统计学意义, 结局指标病情进展的复合终点 ($P = 0.632$)、住院时长 ($P = 0.459$) 和药物不良反应发生率 ($P = 0.459$) 之间的差异没有统计学意义。**结论** 奈玛特韦 / 利托那韦 pDDI 对新型冠状病毒感染患者病情进展未见显著影响, 因纳入样本量限制, 结论有待进一步确认, 临床仍需警惕严重或发生率较高的 DDI, 确保患者用药安全。

关键词: 奈玛特韦 / 利托那韦; 潜在药物相互作用; 倾向性匹配

中图分类号: R969.3 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)06-1662-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.041

Nirmatrelvir/ritonavir potential drug-drug interactions and their impact on patients with COVID-19: a retrospective study based on propensity score matching

WANG Lu, ZENG Lu, GUI Ling, ZHANG Wen-ting, GONG Xue-peng, LIU Dong, WEI An-hua* (Department of Pharmacy, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030)

作者简介: 王璐, 女, 主要从事临床药学工作, email: 546701548@qq.com *通信作者: 魏安华, 女, 博士, 主要从事临床药学工作, email: ahwei0716@163.com

Abstract: Objective To determine the impact of potential drug-drug interactions (pDDI) of nirmatrelvir/ritonavir on the efficacy and safety of patients with COVID-19. **Methods** A retrospective analysis was conducted on 264 patients with COVID-19 who received nirmatrelvir/ritonavir in a hospital from Dec 1st, 2022 to Feb 28st, 2023. The patients were divided into a DDI group ($n = 163$) and a non-DDI group ($n = 101$) based on the presence of pDDI. After propensity score matching to balance the baseline characteristics of the two groups, the composite endpoint of disease progression (including admission to ICU, mechanical ventilation and mortality), length of hospital stay and incidence of adverse reactions were compared. **Results** The overall incidence of drug interactions was 61.74%, and the incidence of adverse reactions was 7.95%, with no serious adverse reactions. After the matching, no statistical differences were found in demographic characteristics, comorbidities, and laboratory indicators before and after the treatment between the DDI group ($n = 91$) and the non-DDI group ($n = 101$). The composite endpoint of disease progression ($P = 0.632$), length of hospital stay ($P = 0.459$), and incidence of drug adverse reactions ($P = 0.459$) showed no significant difference between the two groups. **Conclusion** The pDDI of nirmatrelvir/ritonavir has no significant impact on patients with COVID-19. Due to the limitation in sample size, the conclusion needs further confirmation, high incidence of pDDI and adverse reactions should be avoided in clinical practice to ensure safe drug use.

Key words: nirmatrelvir/ritonavir; potential drug-drug interaction; propensity score matching

全球针对新型冠状病毒感染 (corona virus disease 2019, COVID-19) 抗病毒治疗的探索, 逐步从超说明书的“老药新用”发展到批准上市的创新药物, 其中小分子口服药奈玛特韦/利托那韦 (nirmatrelvir/ritonavir, 简称“NMV/r”, Paxlovid) 于 2021 年 12 月 21 日由美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准紧急使用授权申请, 用于治疗轻度至中度 COVID-19 感染, 且伴有进展为重症高风险因素的成人和儿童患者 (12 岁以上, 体重 ≥ 40 kg)^[1]。2022 年 3 月 15 日, 国家卫生健康委员会发布《新型冠状病毒感染诊疗方案 (第九版)》, 简称“诊疗方案”^[2], 首次将 NMV/r 纳入抗病毒治疗药物选择。奈玛特韦和利托那韦均为药物代谢酶细胞色素 P450 CYP3A 的底物, 利托那韦本身是 CYP3A 的强效抑制剂, 当多种药物同时使用时, 经 CYP3A 代谢的药物或 CYP3A 抑制剂/诱导剂都可能与 NMV/r 发生潜在药物相互作用 (potential drug-drug interaction, pDDI)^[3], 这种相互作用的临床表现可能无法及时检测, 也可能导致临床相关事件, 甚至严重不良事件。目前真实世界服用 NMV/r 的 COVID-19 患者 pDDI 发生率及其对治疗结局的影响程度尚未有文献报道。本文设计回顾性队列研究, 运用倾向性评分匹配法 (propensity score matching, PSM) 法, 分析 NMV/r 的 pDDI 对 COVID-19 治疗结局的影响

以及药物不良反应 (adverse drug reaction, ADR) 发生情况, 为临床安全用药提供参考。

1 资料与方法

1.1 研究对象及分组

回顾性分析 2022 年 12 月 1 日至 2023 年 2 月 28 日期间在我院因 COVID-19 服用 NMV/r 的患者资料。其中存在 NMV/r 的 pDDI 的患者纳入 DDI 组; 无 pDDI 的患者纳入 N-DDI 组。

纳入标准: ① 确诊 COVID-19 患者且未接受系统治疗; ② 符合《新型冠状病毒诊疗方案 (试行第十版)》NMV/r 治疗适应证患者; ③ 年龄 ≥ 18 岁, 性别不限, 住院患者; ④ 出院时间 2022 年 12 月 1 日至 2023 年 2 月 28 日患者。

排除标准: ① 妊娠期、哺乳期妇女; ② 患有严重精神疾病或其他研究者认为不适合参与本研究的患者; ③ 病历资料不全导致关键信息无法获取的患者。

由 2 位研究者应用自行设计的 Excel 数据提取表, 从医院 HIS 系统中提取并记录患者基本信息、诊断、用药医嘱、实验室检查等信息。研究方案在研究开始前由伦理委员会审查和批准 (批件号: TJ-IRB20230202)。

1.2 pDDI 判定方法

基于 Micromedex 2.0、利物浦药物相互作用数据库、安大略省药物相互作用指引以及美国

国立卫生研究院 (NIH) 网站判定与 NMV/r 存在 pDDI 的药物^[4-6]。基于以上数据库搜集并汇总 NMV/r 存在 pDDI 的药物, 采用德尔菲法 (Delphi technique) 通过院内外多轮次专家咨询讨论, 经过反复征询、归纳和修改, 确定最终 NMV/r pDDI 药物清单, 与纳入病例匹配, 是否含有 pDDI 药物且与 NMV/r 用药时间存在重叠使用的暴露期。其中重叠使用暴露期定义为两种药物至少有 1 d 联合使用。由于禁止联用的药物通过前置审方拦截, 本研究主要包括可通过剂量调整、重点监测或其他无需干预的 pDDI, 不含禁止联用。

1.3 ADR 的判定方法

ADR 关联性评价依据 2012 版《药品不良反应报告和监测管理办法》中的评价标准以及国家药品不良反应监测中心《药品不良反应报告和监测工作手册》依据的五条原则, 将关联性评价分为肯定、很可能、可能、可能无关、待评价、无法评价 6 级^[7]。由研究人员与相关专家对 ADR 进行关联性评价, ADR 分级依据国家药品不良反应监测中心《药品不良反应报告和监测工作手册》标准。

1.4 结局指标

本研究主要结局指标是患者病情进展的复合终点 (包括患者入住 ICU, 或辅以机械通气, 或死亡); 次要结局指标是患者住院时长; 安全性指标为 ADR 发生率。

1.5 统计学方法

应用 SPSS 20.0 软件进行数据处理和分析。对计量资料进行正态性检验 (Shapiro-Wilk 检验), 符合正态分布者用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用独立样本 *t* 检验; 不符合正态分布者用 $M (Q_1, Q_3)$ 表示, 组间比较采用秩和检验。计数资料采用频数 (%) 表示, 组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher 精确检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。基线信息包括患者性别、年龄、合并基础疾病、入院疾病严重程度, 实验室检查指标包括白细胞计数、中性粒细胞计数和百分比、降钙素原、C 反应蛋白、血沉、转氨酶、肌酐水平、估算肾小球滤过率 (eGFR)、纤维蛋白原、活化部分凝血活酶时间等指标、住院时间中位数、联合使用抗新型冠状病毒感染 (COVID-19) 药物、pDDI 数量等。同时采用 PSM 法 (1:1) 进行处理, 采用 Logistic 回归分析各参数与治疗结局的关系。

2 结果

2.1 纳入对象及分组

共纳入 264 例患者 (流程图见图 1), 按照是否发生 NMV/r pDDI 分为 DDI 组 ($n = 163$ 例) 和 N-DDI 组 ($n = 101$ 例), pDDI 总发生率为 61.74%。根据 pDDI 发生频次排序, 前三的药品种类为糖皮质激素、心血管系统药及镇静催眠药, 其次为抗微生物药、免疫抑制剂、镇痛药、泌尿系药、呼吸系统吸入剂、促胃动力药等。按 pDDI 单品种发生频次统计, 前三的药品为地塞米松 (135 例, 82.82%)、硝苯地平 (126 例, 77.30%)、氨氯地平 (100 例, 61.34%)。

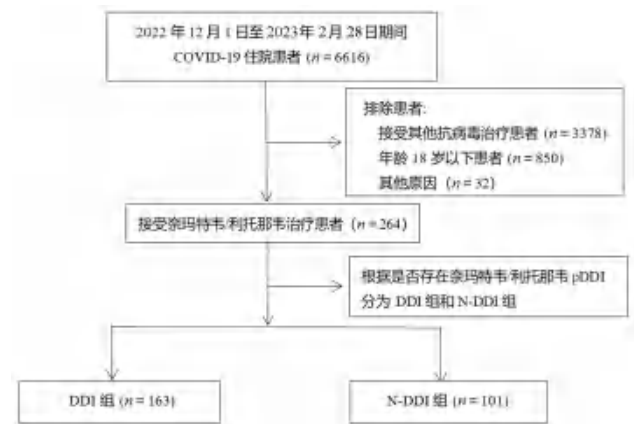


图 1 研究流程图

Fig 1 Flow chart

2.2 患者基本特征

患者人口基线特征包括年龄、性别、合并基础疾病、入院病情严重程度和联合使用抗 COVID-19 治疗药物, 匹配前两组在年龄、是否使用激素方面存在显著性差异, 研究队列患者以老年人为主, DDI 组平均年龄为 (66.91 ± 16.47) 岁, 高于 N-DDI 组的 (61.82 ± 15.52) 岁 ($P = 0.014$), 糖皮质激素用药比例 DDI 组的 87.12% 明显高于 N-DDI 组的 75.25% ($P = 0.013$), 其余变量差异均无统计学意义。PSM 匹配后 DDI 组 91 例, N-DDI 组 101 例, 患者基线差异无统计学意义, 具体见表 1。

2.3 患者实验室指标

研究纳入实验室指标包括血常规、C 反应蛋白、血沉、降钙素原、肝功能、肾功能及凝血功能, 匹配前两组仅纤维蛋白原水平差异具有统计学意义 ($P = 0.045$), DDI 组 $[(4.79 \pm 1.50) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}]$ 高于 N-DDI 组 $[(4.41 \pm 1.25) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}]$, 其余指标差异均无统计学意义。PSM 匹配后指标达到均衡, 见表 2。

2.4 结局指标

结果见表 3, DDI 组与 N-DDI 组在复合终点指标 [$OR 0.847, 95\%CI (0.428, 1.675), P = 0.632$]

表 1 DDI 组和 N-DDI 组一般情况比较

Tab 1 Baseline characteristics between DDI group and non-DDI group

指标	匹配前			匹配后		
	DDI 组 (n = 163)	N-DDI 组 (n = 101)	P 值	DDI 组 (n = 163)	N-DDI 组 (n = 101)	P 值
年龄 / 岁	66.91 ± 16.47	61.82 ± 15.52	0.014	61.77 ± 16.23	61.82 ± 15.53	0.982
性别 [n (%)]			0.312			0.193
男	110 (67.48)	62 (61.39)		64 (70.330)	62 (61.386)	
女	53 (32.52)	39 (38.61)		27 (29.670)	39 (38.61)	
合并基础疾病 [n (%)]						
糖尿病	44 (26.99)	22 (21.78)	0.342	21 (23.077)	22 (21.78)	0.830
肿瘤	30 (18.40)	14 (13.86)	0.336	16 (17.582)	14 (13.86)	0.478
高血压	20 (12.27)	11 (10.89)	0.735	13 (14.286)	11 (10.89)	0.478
心血管疾病	15 (9.20)	12 (11.88)	0.485	5 (5.495)	12 (11.88)	0.120
脑梗死	10 (6.14)	11 (10.89)	0.165	4 (4.396)	11 (10.89)	0.094
慢性肾脏病	38 (23.31)	17 (16.83)	0.208	22 (24.176)	17 (16.83)	0.207
慢性阻塞性肺疾病 (COPD)	5 (3.07)	2 (1.98)	0.593	3 (3.297)	2 (1.98)	0.567
慢性肝病	3 (1.84)	4 (3.96)	0.297	1 (1.099)	4 (3.96)	0.214
入院疾病严重程度 [n (%)]			0.596			0.475
中症	70 (42.94)	40 (39.60)		44 (48.352)	40 (39.60)	
重症	53 (32.52)	39 (38.61)		30 (32.967)	39 (38.61)	
危重症	40 (24.54)	22 (21.78)		17 (18.681)	22 (21.78)	
联合用药 [n (%)]						
巴瑞替尼	5 (3.07)	3 (2.97)	0.964	4 (4.40)	3 (2.97)	0.599
糖皮质激素	142 (87.12)	76 (75.25)	0.013	72 (79.12)	76 (75.25)	0.524
托珠单抗	3 (1.84)	4 (3.96)	0.297	4 (4.40)	3 (2.97)	0.214

表 2 DDI 组和 N-DDI 组实验室检查指标的比较

Tab 2 Laboratory indicators between DDI group and non-DDI group

实验室检查指标	匹配前			匹配后		
	DDI 组 (n = 163)	N-DDI 组 (n = 101)	P 值	DDI 组 (n = 91)	N-DDI 组 (n = 101)	P 值
白细胞计数 / (×10 ⁹ · L ⁻¹)	7.01 ± 4.54	10.16 ± 42.41	0.350	6.608 ± 4.711	10.164 ± 42.406	0.430
中性粒细胞计数 / (×10 ⁹ · L ⁻¹)	5.61 ± 4.38	8.33 ± 37.53	0.363	5.18 ± 4.50	8.330 ± 37.532	0.430
中性粒细胞百分比 / %	74.541 ± 17.15	73.77 ± 13.52	0.705	72.41 ± 19.12	73.769 ± 13.527	0.577
红细胞计数 / (×10 ¹² · L ⁻¹)	3.77 ± 0.90	3.78 ± 0.88	0.942	3.69 ± 0.97	3.782 ± 0.883	0.504
血红蛋白 / (g · L ⁻¹)	114.30 ± 25.80	113.80 ± 26.71	0.881	111.86 ± 27.90	113.80 ± 26.71	0.628
淋巴细胞百分比 / %	14.533 ± 11.79	16.867 ± 10.33	0.108	15.422 ± 13.42	16.867 ± 10.33	0.408
血小板计数 / (×10 ⁹ · L ⁻¹)	184.06 ± 109.03	175.98 ± 102.65	0.555	189.00 ± 120.19	175.98 ± 102.65	0.426
血沉 / (mm · h ⁻¹)	46.086 ± 32.82	36.692 ± 31.68	0.154	52.788 ± 34.885	36.692 ± 31.68	0.047
C 反应蛋白 / (mg · L ⁻¹)	64.650 ± 62.34	52.728 ± 62.14	0.140	58.543 ± 58.815	52.728 ± 62.136	0.516
降钙素原 / (ng · mL ⁻¹)	3.319 ± 18.006	0.340 ± 0.739	0.124	4.570 ± 23.377	0.340 ± 0.739	0.093
谷草转氨酶 / (U · L ⁻¹)	36.18 ± 41.20	45.16 ± 129.02	0.414	36.71 ± 45.04	45.16 ± 129.02	0.557
谷丙转氨酶 / (U · L ⁻¹)	29.39 ± 31.77	42.15 ± 139.44	0.266	30.58 ± 32.15	42.15 ± 139.44	0.444
碱性磷酸酶 / (U · L ⁻¹)	82.26 ± 46.76	83.21 ± 38.16	0.867	79.96 ± 40.90	83.21 ± 38.16	0.576
乳酸脱氢酶 / (U · L ⁻¹)	303.33 ± 126.94	304.59 ± 164.38	0.945	305.19 ± 138.00	304.59 ± 164.38	0.979
eGFR/[mL / (min · 1.73 m ²)]	69.36 ± 30.87	76.30 ± 31.78	0.087	71.60 ± 32.24	76.30 ± 31.78	0.321
肌酐 / (μmol · L ⁻¹)	135.60 ± 161.20	107.97 ± 96.96	0.130	140.64 ± 171.23	107.97 ± 96.96	0.110
总胆红素 / (mmol · L ⁻¹)	10.15 ± 7.36	8.83 ± 4.65	0.116	9.11 ± 6.43	8.828 ± 4.65	0.728
凝血酶时间 / s	17.70 ± 2.23	17.82 ± 1.63	0.676	17.83 ± 2.10	17.82 ± 1.64	0.958
纤维蛋白原 / (g · L ⁻¹)	4.79 ± 1.50	4.41 ± 1.25	0.045	4.62 ± 1.44	4.42 ± 1.25	0.316
活化部分凝血活酶时间 / s	38.06 ± 6.70	38.41 ± 8.07	0.705	38.0 ± 7.03	38.41 ± 8.07	0.771
凝血酶原时间 / s	13.52 ± 1.50	13.45 ± 2.09	0.767	13.42 ± 1.48	13.45 ± 2.09	0.899
国际标准化比值	1.05 ± 0.13	1.04 ± 0.22	0.680	1.03 ± 0.13	1.04 ± 0.21	0.891

及住院时长 [(18.857 ± 11.56) d vs (17.40 ± 15.10) d, $P = 0.459$] 之间均差异无统计学意义。总体的 ADR 发生率为 7.95%，主要累及器官为消化系统 (9 例, 36%)、神经系统 (5 例, 20%)、皮肤及附件 (4 例, 16%) 等，具体见表 4。匹配后 DDI 组 ADR 发生率为 9.89%，N-DDI 组为 6.93%，两组差异无统计学意义 [$OR 1.474, 95\%CI (0.526, 4.133), P = 0.459$]。

表 3 DDI 组和 N-DDI 组临床结局的比较

主要结局指标	DDI 组 ($n = 163$)	N-DDI 组 ($n = 101$)	P 值
复合终点 [n (%)]	19 (20.879)	24 (23.762)	0.632
ADR 发生率 [n (%)]	9 (9.89)	7 (6.93)	0.459
住院时长 /d	18.857 ± 11.56	17.40 ± 15.10	0.459

表 4 ADR 累及系统 - 器官及表现

累及系统 - 器官	ADR 表现 / 例次	例 占比 次 / n (%)
消化系统	腹泻 (3)、腹胀 (2)、饥饿感 (1)、胃不适 (1)、口腔溃疡 (1)、谷草转氨酶升高 (1)	9 36
神经系统	失眠 (2)、烦躁 (2)、头痛 (1)	5 20
皮肤及附件	皮疹 (1)、双下肢水肿 (1)、面部潮红 (1)、皮肤瘙痒 (1)	4 16
心血管系统	心慌 (2)、胸闷 (1)	3 12
泌尿系统	排尿困难 (2)	2 8
全身性损害	乏力 (1)、发热 (1)	2 8
合计		25 100

3 讨论

随着 NMV/r 用药人群逐渐增多，其药代动力学特点及相关的 pDDI 备受关注，目前关于 NMV/r 的 pDDI 研究主要为案例报道、pDDI 的风险及用药管理 [3, 8-10]，尚缺乏 pDDI 对 COVID-19 住院患者治疗影响的临床研究。本研究设计回顾性队列，关注真实世界 NMV/r pDDI 的发生情况，通过 PSM 统计学分析更准确地评估 NMV/r pDDI 对 COVID-19 住院患者治疗结局的影响以及不良反应的发生情况。

3.1 pDDI 发生情况

现有资料显示，与 NMV/r 发生 pDDI 药物种类包括糖皮质激素、降压药、抗心律失常药、降脂药、免疫抑制剂、抗凝药、抗精神疾病药、抗微生物药、降糖药、阿片类镇痛药、支气管扩张剂、抗肿瘤药、促胃动力药、泌尿系统药等 [3]。本研究共纳入 264 例患者，pDDI 发生率为 61.74%，涉及的 pDDI 药物种类涵盖了上述大部分品种。pDDI 发生频次最高为糖皮质激素，由

于大部分糖皮质激素类药物是 CYP3A4 的底物，NMV/r 可增加糖皮质激素的暴露量，一项回顾性研究表明，糖皮质激素联合利托那韦数周后显著增加了严重 ADR 库欣综合征的发生率 [11]，尽管对于 COVID-19 患者 NMV/r 短疗程下联合糖皮质激素发生库欣综合征的风险较低 [3]，但仍建议两者联合使用时加强糖皮质激素相关 ADR 监测，尤其是使用长效糖皮质激素或需要长期使用糖皮质激素患者。其次为降压药，结合纳入患者的基线信息，合并高血压占比仅 12.27%，与降压药发生 pDDI 比例存在较大差异。一项回顾性队列研究表明，COVID-19 可导致收缩压和舒张压升高，并引起新发高血压 [12]。对照研究首次表明，COVID-19 与住院患者血压升高相关，其原因可能是疾病活跃期扩血管因子生成减少，导致血管紧张素转化酶 2 (ACE2) 受体缺乏 [13]。因此 COVID-19 住院患者降压药的使用率明显高于合并高血压患者比例，因此与 NMV/r 发生 pDDI 风险较高，以钙通道阻滞剂 (如硝苯地平或氨氯地平) 和血管紧张素 II 受体拮抗剂 (如缬沙坦或厄贝沙坦) 最为常见，主要因其均通过 CYP3A4 代谢，NMV/r 会导致药物浓度升高，增加相关的 ADR 发生率 [3]。其他 pDDI 关联药物包括抗菌药、镇静催眠药、降脂药、镇痛药、抗心律失常药、抗凝药等，囊括 COVID-19 患者基础疾病或对症治疗药的部分品种，说明真实世界服用 NMV/r 的患者具有较高的 pDDI 发生风险，需引起临床高度重视，尤其是在联用糖皮质激素、心血管系统用药及神经系统药的时候。

3.2 pDDI 对 COVID-19 患者住院治疗结局的影响

研究结果显示，NMV/r 用药患者中，DDI 组患者入住 ICU、机械通气和死亡率的复合终点、住院时长与 N-DDI 组差异无统计学意义，NMV/r 的 pDDI 未显著增加病情进展风险或延长住院时长，对 COVID-19 患者治疗结局无显著影响。同时从患者用药前后实验室指标变化情况来看，差异无统计学意义，说明 NMV/r 对 COVID-19 患者上述指标无显著影响，不增加患者肝功能、肾功能损伤风险。研究队列结果显示，DDI 组血沉显著高于 N-DDI 组 ($P = 0.047$)，COVID-19 作为感染性疾病，炎症反应可能产生大量炎性介质如 C 反应蛋白、血沉、白细胞介素等，尽管目前应用于炎症检验指标较多，但对于 COVID-19 患者并没有较高灵敏度与特异性的指标 [14]，单一血沉加快对于 COVID-19 的影响临床参考意义有限，从疾病进展

复合终点分析, pDDI 对于治疗终点无显著性影响, 而 DDI 组血沉显著高于 N-DDI 组是否与 pDDI 导致 NMV/r 治疗中断有关有待进一步研究。

3.3 pDDI 对 COVID-19 住院患者 ADR 发生率的影响

264 例患者共发生 21 例 (7.95%) ADR, 严重程度均较轻微, 无严重 ADR 事件, 主要累及消化系统、神经系统、皮肤及附件, 其次为心血管系统、泌尿系统及全身性损害, 对症处理或停药可缓解或痊愈。现有文献报道, NMV/r 真实世界人群 ADR 发生率约 16.2%, 多见腹泻、腹痛、恶心、吞咽困难、头痛、头晕、皮肤反应、认知障碍等^[15-16]。一项纳入 23 项研究涉及 314 353 例患者 NMV/r 有效性及安全性报道结果显示, NMV/r 与非 NMV/r 相比, 不增加 ADR 发生率 [OR 2.20, 95%CI (0.42 ~ 11.47), $P = 0.34$]^[17]。本研究队列结果显示, DDI 组 ADR 发生率与 N-DDI 差异无统计学意义, NMV/r pDDI 不增加 ADR 的发生率, 但仍需警惕出现频次较高的 pDDI 药物, 加强用药监护。

4 结论

本研究显示真实世界中 NMV/r 的 pDDI 发生率较高, 涉及药物种类较多, 但对 COVID-19 住院患者病情进展及 ADR 发生率尚无显著影响。本文为回顾性分析, 虽采用 PSM 统计分析处理混杂因素, 但仍存在一定的局限性, 如纳入病例数有限、统计学方法有局限性、混杂因素考虑不全、ADR 主观判定和记录不全以及无法判定 pDDI 程度等。因此, NMV/r 的 pDDI 仍需引起临床重视, 期待开展更大规模的临床研究来探讨。

参考文献

- [1] FDA. Coronavirus (COVID-19) update: FDA authorizes first oral antiviral for treatment of COVID-19[EB/OL]. (2021-12-22) [2023-04-27]. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-first-oral-antiviral-treatment-covid-19>.
- [2] 卫生健康委员会, 国家中医药管理局. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案 (试行第九版)[EB/OL]. (2022-03-14) [2023-03-02].
- [3] Marzolini C, Kuritzkes DR, Marra F, et al. Recommendations for the Management of drug-drug interactions between the COVID-19 antiviral nirmatrelvir/ritonavir (paxlovid) and comedication[J]. Clin Pharmacol Ther, 2022, 112 (6): 1191-1200.
- [4] University Of Liverpool. Liverpool COVID-19 Interactions [EB/OL]. (2022-09-07) [2023-03-02]. <https://www.covid19-druginteractions.org/checker>.
- [5] National Institutes Of Health. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines[EB/OL]. (2022-12-01) [2023-03-02]. <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/>.
- [6] Ontario COVID-19 Drugs and Biologics Clinical Practice Guidelines Working Group, University of Waterloo School of Pharmacy. Nirmatrelvir/Ritonavir (Paxlovid): What prescribers and pharmacists need to know. Ontario COVID-19 Science Advisory Table. [EB/OL]. (2022-06-06) [2023-03-02]. https://hivclinic.ca/downloads/paxlovid/paxlovid_guide_live.pdf.
- [7] 李博, 高蕊, 李睿, 等. 药物临床试验不良反应 / 不良事件关联性判断方法研究探讨[J]. 中国新药杂志, 2014, 23 (12): 1465-1469.
- [8] Prikis M, Cameron A. Paxlovid (nirmatrelvir/ritonavir) and tacrolimus drug-drug interaction in a kidney transplant patient with SARS-2-CoV infection: a case report[J]. Transplant Proc, 2022, 54 (6): 1557-1560.
- [9] Lemaitre F, Grégoire M, Monchaud C, et al. Management of drug-drug interactions with nirmatrelvir/ritonavir in patients treated for COVID-19: Guidelines from the French Society of Pharmacology and Therapeutics (SFPT)[J]. Therapie, 2022, 77 (5): 509-521.
- [10] Shini Rubina SK, Anuba PA, Swetha B, et al. Drug interaction risk between cardioprotective drugs and drugs used in treatment of COVID-19: a evidence-based review from six databases[J]. Diabetes Metab Syndr, 2022, 16 (3): 102451.
- [11] Saberi P, Phengrasamy T, Nguyen DP. Inhaled corticosteroid use in HIV-positive individuals taking protease inhibitors: a review of pharmacokinetics, case reports and clinical management[J]. HIV Med, 2013, 14 (9): 519-529.
- [12] Akpek M. Does COVID-19 cause hypertension?[J]. Angiology, 2022, 73 (7): 682-687.
- [13] Angeli F, Zappa M, Oliva FM, et al. Blood pressure increase during hospitalization for COVID-19[J]. Eur J Intern Med, 2022, 104: 110-112.
- [14] 陈悦, 鲍海咏. NCP 患者超敏 C 反应蛋白及血沉检测的临床意义[J]. 国际感染病学, 2020, 9 (2): 310-311.
- [15] Bihan K, Lipszyc L, Lemaitre F, et al. Nirmatrelvir/ritonavir (Paxlovid®): French pharmacovigilance survey 2022[J]. Therapie, 2023, 78 (5): 531-547.
- [16] Gentile I, Scotto R, Schiano Moriello N, et al. Nirmatrelvir/ritonavir and molnupiravir in the treatment of mild/moderate COVID-19: results of a real-life study[J]. Vaccines (Basel), 2022, 10 (10): 1731.
- [17] Amani B, Amani B. Efficacy and safety of nirmatrelvir/ritonavir (Paxlovid) for COVID-19: a rapid review and meta-analysis[J]. J Med Virol, 2023, 95 (2): e28441.

(收稿日期: 2023-09-21; 修回日期: 2023-10-26)

甘精胰岛素生物仿制药与原研药治疗 2 型糖尿病临床有效性及安全性的 Meta 分析

刘群, 朱明亮, 金秋阳, 刘晓倩, 耿燕楠, 王莹, 陈红, 辛义周* (山东中医药大学附属医院药学部, 济南 250011)

摘要: **目的** 系统性评价甘精胰岛素生物仿制药与原研药治疗 2 型糖尿病的临床有效性与安全性。**方法** 检索国内外相关文献, 系统分析甘精胰岛素生物仿制药与原研药治疗 2 型糖尿病人群的有效性和安全性的区别。**结果** Meta 分析结果显示, 甘精胰岛素生物仿制药与原研品种在降低空腹血糖、糖化血红蛋白 (HbA1c) 水平及 HbA1c 达标率方面差异无统计学意义; 在低血糖发生率及总体不良事件报告率方面差异无统计学意义。**结论** 本研究结果显示, 从有效性和安全性方面考虑, 甘精胰岛素生物仿制药与原研药并无明显差异。但因纳入文献质量和数量有限, 仍需大样本、多中心的随机对照试验来进一步证实该结论。

关键词: 甘精胰岛素; 生物仿制药; 2 型糖尿病; Meta 分析; 疗效; 安全性

中图分类号: R587.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)06-1668-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.042

Meta-analysis of clinical efficacy and safety of generic and original insulin glargine for type 2 diabetes mellitus

LIU Qun, ZHU Ming-liang, JIN Qiu-yang, LIU Xiao-qian, GENG Yan-nan, WANG Ying, CHEN Hong, XIN Yi-zhou* (*Department of Pharmacy, The Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011*)

Abstract: Objective To evaluate the clinical efficacy and safety of original and generic insulin glargine for type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Methods** Domestic and foreign literatures were systematically reviewed. Meta-analysis was used for the evaluation the efficiency and safety. **Results** Meta-analysis showed that there was no significant difference in reducing fasting blood glucose, glycosylated hemoglobin (HbA1c) level and HbA1c compliance rate ($P > 0.05$) between the generic and the original drug. There was no significant difference in the incidence of hypoglycemia and total adverse reactions between domestic and imported insulin glargine ($P > 0.05$). **Conclusion** There is no significant difference between insulin glargine generic and original drugs in the efficacy and safety. However, limited by the quality and quantity of the included literatures, large sample and multi-center RCT are needed to further confirm this conclusion.

Key words: insulin glargine; generic drug; type 2 diabetes mellitus; meta-analysis; efficacy; safety

甘精胰岛素注射液是临床广泛使用的长效胰岛素, 2000 年美国 FDA 和欧洲药品管理局批准其用于治疗 1 型和 2 型糖尿病, 2004 年在中国上市销售。之后陆续有多种甘精胰岛素生物仿制药上市, 一定程度上降低了患者的经济负担^[1-2]。目

前已有多篇关于甘精胰岛素仿制药与原研药物有效性及安全性比较的研究, 但其代表性差, 样本量相对较小, 缺乏系统评价数据。因此, 本研究借助 Meta 分析, 对甘精胰岛素生物仿制药与原研药治疗 2 型糖尿病人群的有效性安全性进行

基金项目: 山东省药品临床综合评价项目 (No.2022YZ003); 山东中医药学会临床药学科专项基金项目 (No.SDACM202204); 山东省医学会临床药学科专项 (No.YXH2022ZX013)。

作者简介: 刘群, 女, 主管药师, 主要从事药物安全性评价及临床药学工作, email: liuliu8891@126.com * **通信作者:** 辛义周, 男, 主任药师, 主要从事医院药学及临床药学工作, email: xyz01010101@163.com

分析,为临床选择甘精胰岛素提供充分的证据。

1 资料与方法

本研究采用 Meta 分析,从有效性、安全性两个维度对甘精胰岛素仿制药及原研药进行评价。

1.1 纳入与排除标准

1.1.1 研究类型 本研究纳入的研究类型为随机对照试验 (randomized controlled trial, RCT),限定中英文文献。

1.1.2 研究对象 本研究纳入的患者符合《中国 2 型糖尿病防治指南 (2020 年版)》中 2 型糖尿病诊断标准。

1.1.3 干预措施 试验组采用任意甘精胰岛素生物仿制药治疗,对照组采用甘精胰岛素原研药物 (商品名:来得时)治疗,不限制用量和疗程。可联合口服降糖药或其他胰岛素。

1.1.4 结局指标 结局指标和安全性评价指标:对于临床疗效结果,比较糖化血红蛋白 (HbA1c)、空腹血糖 (FPG)、试验完成时 HbA1c 达标率的平均差异。以低血糖事件、总体不良事件的发生率来评估不良事件。

1.1.5 排除标准 ① 非随机对照试验研究或 RCT 研究设计存在明显错误;② 无明确糖尿病诊断标准,或诊断不明确的临床研究;③ 纳入 1 型糖尿病,或 2 型糖尿病合并心脑血管疾病、肾功能不全等严重疾病的患者;④ 尚未公开发表或缺乏临床研究数据;⑤ 研究人群非中国人。

1.2 文献检索策略

检索 PubMed、EMBase、Cochrane Library、CNKI、万方数据库和中华医学期刊全文数据库,检索时限从建库至 2023 年 10 月,采用主题词与自由词相结合的方式进行搜索。中文检索词包括甘精胰岛素、糖尿病、来得时;英文检索词包括 insulin glargine、diabetes mellitus、Lantus、Chinese。以 PubMed 为例,具体检索策略为:#1 insulin glargine; #2 diabetes mellitus; #3 Lantus; #4 Chinese; #5 #1AND#2AND#3AND#4。

1.3 文献筛选与资料提取

将所有文献导入 EndNote,删除重复文献,并针对题目和摘要进行初筛,初筛合格的文献纳入全文评估。全文评估阶段,无论样本量大小,只要符合上述标准的关于评价甘精胰岛素生物仿制药与原研药安全性和有效性的文章都被纳入。

两位研究人员独立审查所有标题、摘要和全文,评价员之间的分歧均由研究团队达成共识的

方式解决。两位评价员独立提取作者姓名、发表时间、研究设计、研究人群、干预和对照、结局指标、不良事件等资料。

1.4 纳入文献质量评价

采用 Cochrane 针对 RCT 的偏倚评估工具评价文献质量。根据是否描述和正确使用随机化方法和分配隐藏来评估选择偏倚;是否描述对实施者和测量者的盲法评估实施偏倚和测量偏倚;根据主要终点的数据完整性以及是否清楚地描述缺失数据的解决方法来评估失访偏倚;是否选择性报告研究结果评估发表偏倚;以及其他类型的偏倚来源。

1.5 统计学方法

使用 Rev Man5.4 进行数据处理,对纳入计量采用标准化均数差 (SMD) 合并,计算 95%CI;计数资料使用比值比 (OR) 合并,计算 95%CI;使用 χ^2 检验纳入文献的异质性,不存在统计学异质性 $P > 0.10$ 、 $I^2 \leq 50\%$,使用固定效应模型;存在统计学中等异质性 $P < 0.10$, $50\% < I^2 \leq 75\%$,使用随机效应模型;当异质性过大 $I^2 > 75\%$ 时,查找异质性来源,若无法确定异质性来源,仅进行描述性分析。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。采用逐一剔除法进行敏感性分析;对纳入文献大于 10 篇的结局指标采用漏斗图检验进行发表偏倚分析。

2 结果

2.1 文献检索结果与纳入研究的基本特征

通过检索后,共获得 1732 篇文献。经 EndNote 剔除重复文献,依据纳入排除标准,通过阅读题目和摘要对文献进行初筛,共有 29 篇文献纳入全文评估。其中,3 篇不是 RCT 研究;4 篇 RCT 研究设计存在明显错误;3 篇缺乏所需临床结局指标数据或出现明显错误;1 篇试验对象含 1 型糖尿病患者且未作区分;3 篇文章为已纳入 RCT 研究的延伸报道,无额外本研所需数据。最终有 15 篇文献符合纳入标准 (具体流程见图 1)^[3-17]。

2.2 亚组分析设定

15 篇文献共纳入 15 项 RCT 研究,总样本量 3114 例,其中试验组 1809 例,对照组 1305 例。涵盖了 5 种甘精胰岛素生物仿制药。其中长秀霖 (11 项)^[6-16]、长舒霖 (1 项)^[4]、优乐灵 (1 项)^[3] 已经在中国大陆上市,LY2963016 (1 项)^[5] 和 HS004 (1 项)^[17] 已经在国内完成 III 期临床试验,但尚未在国内上市销售。纳入研究的基本特征见表 1。

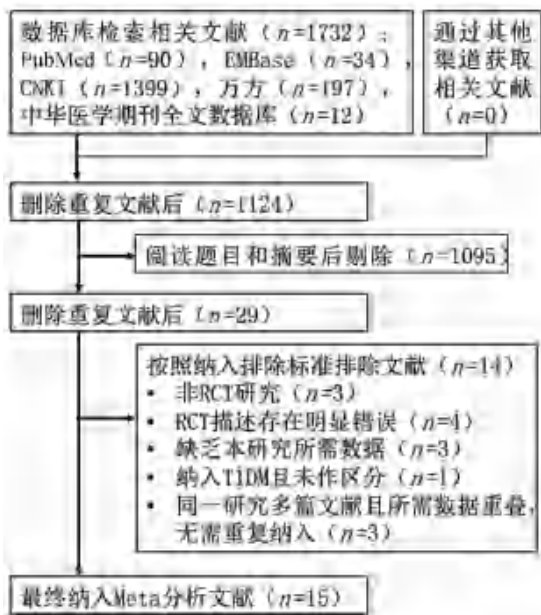


图 1 文献筛选流程图
Fig 1 Flow chart of literature screening

研究中对照组甘精胰岛素(来得时)初始剂量存在差异,有 10 项研究对照组甘精胰岛素初始剂量为 0.2 U/(kg·d)^[3-5, 8-10, 12, 15-17], 5 项对照组甘精胰岛素研究初始剂量为 0.15 U/(kg·d)^[6-7, 11, 13-14]。根据吴护群等^[18]报道,使用不同初始剂量甘精胰岛素治疗 2 型糖尿病患者对空腹血糖的影响差异没有统计学意义,但对空腹血糖达标时间的影响差异有统计学意义。考虑到纳入研究的试验周期不同,评价团队认为 15 项研究中初始甘精胰岛素剂量差异可能会带来方法学异质性,需要进行亚组分析。

2.3 文献的质量评价

随机序列产生方面,15 项研究均采用随机化方法,其中 5 项研究具体描述了随机化方法^[3-5, 9, 17],判定为低风险;2 项采用入院先后顺序分组^[10-11],判定为高风险;其余 8 项均未具体描述随机化方法,判定为风险不清楚。2 项研究实现分配隐藏^[4-5],判定为低风险;其余研究均未

表 1 纳入研究基本信息
Tab 1 Basic characteristics of included studies

作者	例数		干预措施		初始剂量是否一致	结局指标
	试验组	对照组	试验组	对照组		
刘云慧 2014	330	333	优乐灵+原降糖药或胰岛素	来得时+原降糖药或胰岛素	一致	①②③④⑤
Feng 2021	359	177	LY2963016 + 原口服降糖药	来得时+原口服降糖药	一致	①②③④⑤⑥
张婷婷 2020	429	141	长舒霖+原口服降糖药	来得时+原口服降糖药	一致	①②③④⑤⑥
黄万齐 2014	20	20	长秀霖+门冬胰岛素	来得时+门冬胰岛素	一致	①
孙莉 2014	28	28	长秀霖+原有治疗方案	来得时+原有治疗方案	一致	①②④
张钰 2017	48	48	长秀霖+原口服降糖药	来得时+原口服降糖药	一致	①②⑤
任丽媛 2015	29	29	长秀霖+原有治疗方案	来得时+原有治疗方案	一致	①②
宋玉香 2016	39	39	长秀霖+原有治疗方案	来得时+原有治疗方案	不一致	①②⑤
杨奕 2016	54	44	长秀霖+原有治疗方案	来得时+原有治疗方案	不一致	①②⑤
罗旌跃 2016	67	67	长秀霖+短效胰岛素/口服降糖药	来得时+短效胰岛素/口服降糖药	一致	①②⑤
高勋 2017	40	40	长秀霖	来得时	不一致	①⑤
黄建丽 2017	35	35	长秀霖	来得时	不一致	①②⑤
王洋 2017	73	36	长秀霖+门冬胰岛素	来得时+门冬胰岛素	一致	①
张莉 2020	12	12	长秀霖	来得时	不一致	①②
黄洪 2023	273	256	HS004 + 原有治疗方案	来得时	一致	①②③④⑤⑥

注 (Note): ① FBG; ② HbA1c; ③ HbA1c 达标率 (< 7.0%) (HbA1c compliance rate); ④ 总体不良反应事件 (overall adverse reaction events); ⑤ 低血糖事件 (hypoglycaemia); ⑥ 免疫原性 (immunogenicity)。

描述分配隐藏为风险不清楚。全部研究试验药品均采用预填充甘精胰岛素,无法实现盲法,因此全部判定为高风险。纳入研究数据完整,均为低风险。未见存在选择性报告,均为低风险。其他偏倚情况均为风险不清楚,结果见图 2。

2.4 Meta 分析结果

2.4.1 糖化血红蛋白 12 项研究报道了 HbA1c^[3-6, 9-14, 16, 17], 共包含 2912 例患者,其中试验组 1703 例,对照组 1209 例。各研究之间不存

在异质性 ($P = 0.94, I^2 = 0\%$), 采用固定效应模型分析 (见图 3)。结果显示,试验组和对照组患者用药前后 HbA1c 差异无统计学意义 [$SMD = 0.00, 95\%CI 0.00 (-0.07, 0.08), P = 0.91$]。

2.4.2 FBG 达标率 4 项研究报道了 FBG 达标 (HbA1c < 7.0%) 情况^[3-5, 17], 共包含 2298 例患者,其中试验组 1391 例,对照组 907 例。各研究之间不存在异质性 ($P = 0.19, I^2 = 37\%$), 采用固定效应模型分析 (见图 4)。结果显示,试验

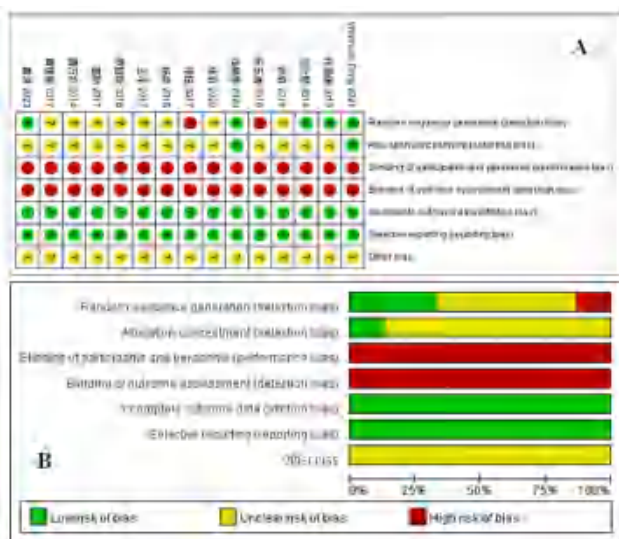


图2 纳入研究质量评价
 Fig 2 Quality evaluation of included studies
 A. 偏倚风险图 (risk of bias graph); B. 偏倚风险总结图 (risk of bias summary)



图3 两组患者 HbA1c 水平的 Meta 分析森林图
 Fig 3 Meta-analysis of HbA1c in both groups

组和对照组患者用药前后 FBG 达标率的差异无统计学意义 [OR = 1.00, 95%CI 1.00 (0.89, 1.13), P = 0.95]。

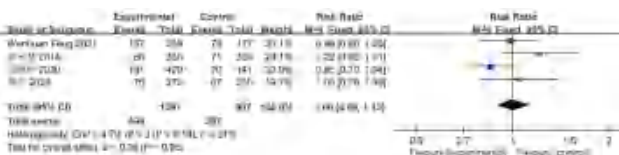


图4 两组患者 HbA1c 达标率的 Meta 分析森林图
 Fig 4 Meta-analysis of HbA1c compliance rate in both groups

2.4.3 FBG 15 项研究均对用药前后患者 FBG 值进行报道^[3-17], 通过异质性评价各研究之间不存在异质性 ($P = 0.02, I^2 = 47\%$), 采用固定效应模型分析 (见图 5)。结果显示, 试验组和对照组患者用药后 FBG 差异无统计学意义 [SMD = 0.02, 95%CI 0.02 (-0.07, 0.12), $P = 0.61$]。通过亚组分析, 两亚组中用药后 FBG 差异均无统计学意义 (见图 6)。

2.4.4 低血糖发生率 共 10 项研究报道了低血糖发生率^[3-5, 7, 10-11, 13-14, 16-17], 包含 2854 例患者, 其中试验组 1674 例, 对照组 1180 例。各研究之

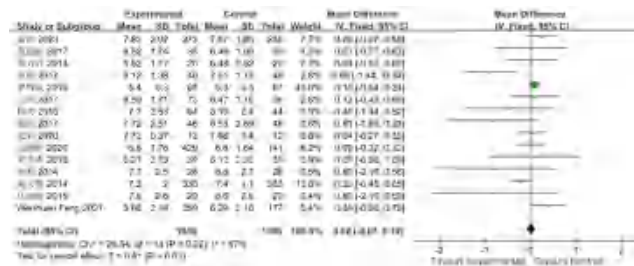


图5 两组患者 FBG 的 Meta 分析森林图
 Fig 5 Meta-analysis of FBG in both groups

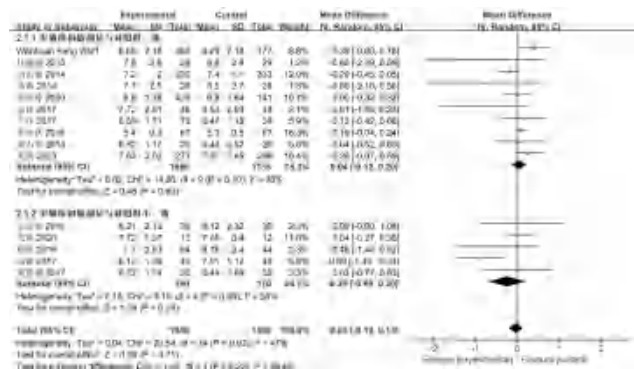


图6 FBG 的 Meta 亚组分析森林图
 Fig 6 Subgroup-analysis of FBG

间不存在异质性 ($P = 0.99, I^2 = 0\%$), 采用固定效应模型分析 (见图 7)。结果显示, 试验组和对照组低血糖发生率的差异无统计学意义 [OR = 0.97, 95%CI (0.89, 1.06), $P = 0.57$]。

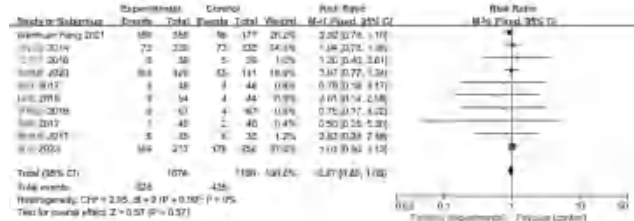


图7 两组患者低血糖发生率的 Meta 分析森林图
 Fig 7 Meta-analysis of incidence of hypoglycemia in both groups

2.4.5 总体不良事件报告率 仅有 5 项研究报道了总体不良事件^[3-5, 12, 17], 共包含 2322 例患者, 其中试验组 1403 例, 对照组 919 例。各研究之间不存在异质性 ($P = 0.68, I^2 = 0\%$), 采用固定效应模型分析 (见图 8)。结果显示, 试验组和对照组总体不良事件报告率的差异无统计学意义 [OR = 1.07, 95%CI 1.07 (0.98, 1.16), $P = 0.13$]。

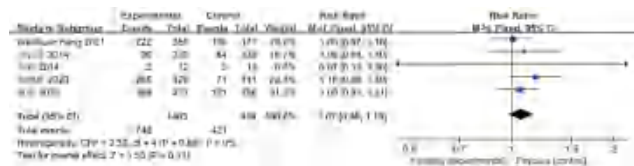


图8 总体不良事件报告率的 Meta 分析森林图
 Fig 8 Meta-analysis of the incidence of adverse reactions in both groups

2.5 敏感性分析

为评价结果的稳定性，依次排除单篇文献进行敏感性分析。结果显示，去除任一文献后对分析结果影响不大，提示本研究结果稳定。

2.6 发表偏倚分析

报道患者用药后 HbA1c^[3-6, 9-14, 16-17]、FBG^[3-17]的研究大于 10 项，通过绘制漏斗图分析发表偏倚（见图 9）。结果显示，纳入研究对患者用药后糖化血红蛋白的报道不存在发表偏倚；而对空腹血糖的报道存在发表偏倚，可能与部分文献质量过低且样本量小有关。

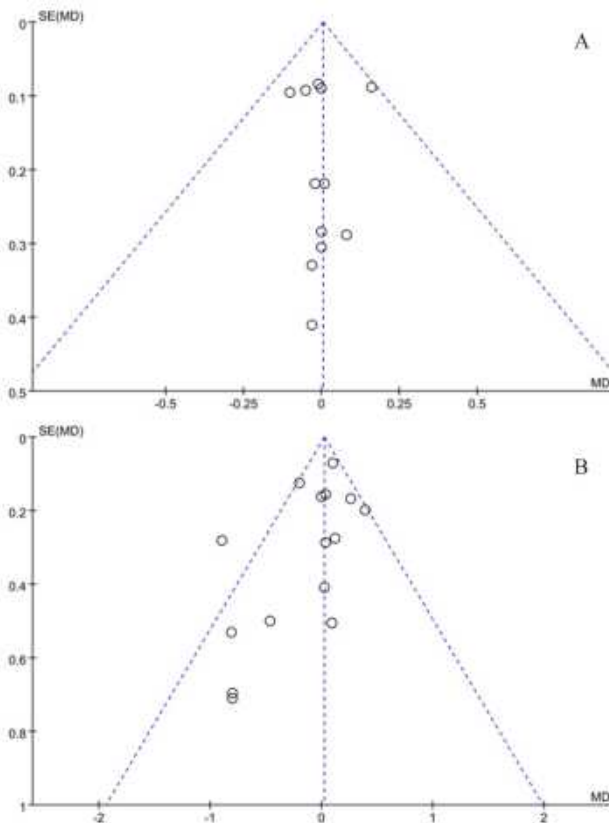


图 9 HbA1c (A) 及 FBG (B) 的 Meta 分析漏斗图
Fig 9 Funnel plots of HbA1c (A) and FBG (B)

3 讨论

2022 年 5 月，国家胰岛素专项集采结果先后落地全国各省，胰岛素价格平均降幅为 48.75%，最高降幅为 73.76%，实现甘精胰岛素仿制药替代治疗可以大幅降低患者医疗负担。但胰岛素作为生物制剂，其仿制药替代难度大过化学药物，部分地区出现胰岛素仿制药集采完成率不足、进度慢的情况^[19]。除了不同品牌胰岛素笔不配套、执行方案有待完善等原因外，胰岛素仿制药的有效性和安全性也是重要原因。因此，开展甘精胰岛素生物仿制药与原研药有效性和安全性的系统评

价十分必要。

Meta 分析结果显示，对于中国 2 型糖尿病患者，甘精胰岛素生物仿制药与原研药在降低患者 FBG、HbA1c 以及 HbA1c 达标率方面与原研药相比差异无统计学意义，说明两者在 2 型糖尿病治疗效果方面水平相当。在安全性方面，低血糖是胰岛素治疗后的常见不良反应，可能引发认知功能障碍、凝血功能异常等多种不良后果。本研究显示甘精胰岛素生物仿制药与原研药在低血糖发生率方面差异无统计学意义；除低血糖外，4 项研究中提到了瘙痒、皮疹、注射部位疼痛等其他怀疑的不良事件，经分析差异也不存在统计学意义。

郭亚慧^[20]研究发现甘精胰岛素生物仿制药重组甘精胰岛素注射液在治疗糖尿病方面，与原研药疗效相当，与本研究结论一致；但他们发现仿制药长秀霖安全性方面优于原研药，与本研究的结论略有差异。这可能与两者纳入的人群和试验对象不同有关。本研究仅纳入了 2 型糖尿病的患者，剔除 1 型糖尿病患者，限定了患者人群；同时，郭亚慧^[20]的研究中只纳入了长秀霖一个品种，而本研究将符合纳入标准的所有厂家的甘精胰岛素生物仿制药进行评价，扩大了试验组的数量，能够为临床提供更为充分的数据支持。考虑到甘精胰岛素的初始剂量对 FBG 达标时间的影响，在研究过程中，根据初始剂量不同进行了亚组分析。起始剂量尤其是起始调量期的胰岛素剂量对于血糖控制达标有深远的影响^[21]。但亚组分析中也并未观察到明显的区别。

综上，通过本研究证实，甘精胰岛素生物仿制药在有效性和安全性方面与原研药差异无统计学意义。但本研究仍存在一些局限性：① 纳入的研究疗程为 2 ~ 28 周，部分缺乏长期的安全性评价，仍需要更多的长疗程研究对结论进行验证；② 纳入研究的 RCT 中的样本量相对不均衡，且部分指标只纳入了 3 ~ 4 项研究，可能会存在发表偏倚，因此仍需要后续研究验证此结论；③ 研究之间的异质性，可能是由于纳入研究的患者年龄、治疗疗程及具体治疗方案存在差异，因素混杂导致出现差异性。因此，建议未来开展高质量的真实世界研究，为临床更新研究结论。

参考文献

[1] Elrishi MA, Jarvis J, Khunti K, et al. Insulin glargine and its role in glycaemic management of type 2 diabe-

- tes [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2008, 4 (8): 1099-1110.
- [2] Wang YY, Zhou Y, Ding JF, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic similarity evaluation between an insulin glargine biosimilar product and Lantus (R) in healthy subjects: pharmacokinetic parameters of both parent insulin glargine and M1 were used as endpoints [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 962201.
- [3] 刘云慧, 侯丽琼, 赵铁耘, 等. 两种甘精胰岛素治疗糖尿病的疗效及安全性比较: 多中心、随机、开放、对照试验 [J]. *中华糖尿病杂志*, 2014, 6 (6): 377-381.
- [4] 张婷婷, 刘晓民, 施秉银, 等. 长舒霖和来得时治疗 2 型糖尿病的有效性和安全性比较: 多中心, 随机, 开放, 平行, III 期临床研究 [J]. *中华内科杂志*, 2020, 59 (12): 960-967.
- [5] Feng WH, Chen W, Jiang S, et al. Efficacy and safety of LY2963016 insulin glargine versus insulin glargine (lantus) in Chinese adults with type 2 diabetes: a phase III, randomized, open-label, controlled trial [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2021, 23 (8): 1786-1794.
- [6] 张莉. 国产重组甘精胰岛素注射液与来得时治疗糖尿病的效果与安全性对比 [J]. *糖尿病天地*, 2020, 17 (11): 47.
- [7] 高勋. 甘精胰岛素注射液 (国产重组)、来得时对糖尿病的治疗效果和安全性比较 [J]. *饮食保健*, 2017, 4 (1): 81-82.
- [8] 黄万齐. 各种胰岛素制剂临床应用疗效分析 [J]. *中国伤残医学*, 2014, 22 (1): 129-130.
- [9] 任丽媛. 国产重组甘精胰岛素注射液和来得时治疗糖尿病的有效性对比 [J]. *中国疗养医学*, 2015, 24 (7): 736-737.
- [10] 张钰, 刘司漩, 薛雁明, 等. 国产重组甘精胰岛素注射液和来得时治疗糖尿病的疗效对比分析 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2017, 17 (97): 75-76.
- [11] 宋玉香. 国产重组甘精胰岛素注射液和来得时治疗糖尿病的安全性对比分析 [J]. *中国实用医药*, 2016, 11 (8): 150-151.
- [12] 孙莉, 何勇. 国产重组甘精胰岛素注射液和来得时治疗糖尿病的疗效和安全性比较 [J]. *浙江临床医学*, 2014, 16 (12): 1874-1875.
- [13] 黄建丽. 国产重组甘精胰岛素注射液与来得时治疗糖尿病的效果和安全性比较 [J]. *河南医学研究*, 2017, 26 (17): 3156-3157.
- [14] 杨奕. 国产重组甘精胰岛素注射液与进口甘精胰岛素制剂治疗糖尿病临床效果分析 [J]. *中国继续医学教育*, 2016, 8 (30): 152-154.
- [15] 王洋, 鲁丽, 孙鑫. 重组甘精胰岛素国产制剂与进口制剂降糖作用比较 [J]. *中国实用乡村医生杂志*, 2017, 24 (10): 45-47.
- [16] 罗旌跃. 重组甘精胰岛素注射液 (国产)、来得时对糖尿病的治疗效果和安全性比较 [J]. *糖尿病新世界*, 2016, 19 (23): 55-56.
- [17] 黄洪, 王海芳, 胡文, 等. 甘精胰岛素注射液 (HS004) 和来得时治疗糖尿病的有效性和安全性比较: 多中心、随机、开放、阳性药平行对照的 III 期临床研究 [J]. *中国临床研究*, 2023, 36 (3): 391-397, 414.
- [18] 吴护群, 陈戈, 卢汶. 甘精胰岛素两种起始剂量调整方案治疗 II 型糖尿病的疗效和安全性比较 [J]. *微量元素与健康研究*, 2010, 27 (1): 1-2.
- [19] 关于明确第六批国家组织药品集中带量采购 (胰岛素专项) 中选结果执行过程中有关事项的通知 [EB/OL]. (2022-11-08) [2023-04-15]. http://ybj.hunan.gov.cn/ybj/first113541/firstF/f3113607/202211/t20221108_29119383.html.
- [20] 郭亚慧. 两种甘精胰岛素制剂对糖尿病患者疗效及安全性的系统评价 [J]. *药品评价*, 2021, 18 (7): 385-389.
- [21] 纪立农. 以始为终——基础胰岛素起始调量期的临床实践模式探索 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2022, 30 (4): 310-312.

(收稿日期: 2023-09-12; 修回日期: 2023-11-05)

药事管理

湖南省药物临床试验机构首次检查回顾分析及工作建议

杨泽华¹, 李丹², 王弼君¹, 李璟兮¹, 管志美^{1*} (1. 湖南省药品审核查验中心, 长沙 410000; 2. 中南大学湘雅医院, 长沙 410000)

摘要: **目的** 总结分析药物临床试验机构新备案机构在首次检查中发现的突出问题, 探讨新机构监管过程中的关注重点。**方法** 对 2023 年湖南省内新备案机构的首次监督检查发现的问题作出汇总和分析。**结果** 机构主体责任意识不强, 内部质量控制环节明显薄弱; 专业科室质量意识较差, 对临床试验质量管理不够重视。**结论** 检查员应关注首次检查重点, 制订针对性检查方案, 对检查结果进行打分分级, 加强对新机构的监督把关。

关键词: 药物临床试验机构; 首次备案检查; 工作建议

中图分类号: R95 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)06-1674-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.043

Retrospective analysis and work suggestions for the first examination of drug clinical trials in Hunan

YANG Ze-hua¹, LI Dan², WANG Bi-jun¹, LI Jing-xi¹, GUAN Zhi-mei^{1*} (1. Hunan Drug Inspection Center, Changsha 410000; 2. Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410000)

Abstract: Objective To summarize the obvious problems in the first inspection of the new filing in the drug clinical trial institutions, and to determine the key points in the supervision of the new institutions. **Methods** The problems in the first supervision and inspection of the new filing institutions of Hunan in 2023 were summarized. **Results** The responsibility consciousness of some institutions was poor, with weak internal quality control. The quality awareness of clinical departments need improvement and clinical departments didn't pay enough attention to the quality management of clinical trials. **Conclusion** Enough attention should be paid to the first inspection, focusing on targeted inspection plans, scores and grades of the inspection results, and strengthening the supervision and control of new institutions.

Key words: drug clinical trial organization; first record inspection; work suggestion

药物临床试验机构(以下简称“机构”)是独立的药物临床试验管理部门,其日常工作由机构办公室全面负责^[1-2]。自 2019 年 12 月 1 日起,机构由资格认定调整为备案管理,对于新备案的药物临床试验机构或者增加临床试验专业、地址变更的,应当在 60 个工作日内开展首次监督检查^[3]。首次监督检查对保证药物临床试验过程规范,数据和结果的真实、可靠、科学性,保护受试者权益和安全具有重要意义^[4-5]。因鲜有关于新机构、新专业首

次监督检查中常见问题的报道,故本研究对湖南省 2023 年药物临床试验机构首次监督检查中发现的问题进行梳理、分析,并提出相关工作建议,以期规范机构备案和提高监管效能提供参考。

1 首次备案检查基本情况

1.1 新增备案机构分布情况

目前,我省在国家药物临床试验机构备案系统中备案的机构共 67 家,2023 年新增机构 10 家,新机构占比 14.93%;已完成 10 家新增机构备案

作者简介:杨泽华,男,硕士研究生,主要从事药物临床试验机构监管方面的研究, email: hnsypshcyzx@163.com *通信作者:管志美,男,主任药师,主要从事药物临床试验机构监管方面的研究, email: 770366320@qq.com

后首次检查，覆盖率 100%。新备案机构三级医疗机构为 9 家，二级医疗机构 1 家，分布涉及 7 个地区，其中长沙 2 家，湘潭 2 家，岳阳 2 家，株洲、娄底、吉首和永州各 1 家，具体信息见表 1。

表 1 2023 年湖南省新备案药物临床试验机构信息
Tab 1 Information of newly filed drug clinical trial institutions in Hunan in 2023

序号	机构名称	机构级别	备案专业	备案专业数量	地区
1	湘西土家族苗族自治州人民医院 (吉首大学第一附属医院)	三级	内科-神经内科专业、肿瘤科、麻醉科、内科-心血管内科专业	4	吉首
2	湖南省血吸虫病防治所附属湘岳医院	三级	内科-消化内科专业、其他-I 期临床试验研究室-生物等效性试验、肿瘤科	3	岳阳
3	湖南航天医院	三级	肿瘤科、皮肤科-皮肤病专业、内科-内分泌专业、内科-心血管内科专业、内科-呼吸内科专业	5	长沙
4	湖南妇女儿童医院	三级	其他-I 期临床试验研究室-I 期药物临床试验、外科-普通外科专业、妇产科-妇科专业、其他-I 期临床试验研究室-生物等效性试验	4	长沙
5	株洲市三三一医院	三级	内科-内分泌专业、肿瘤科、内科-呼吸内科专业、内科-神经内科专业	4	株洲
6	湘潭县妇幼保健院	二级	妇产科-妇科专业、儿科-其他-儿科	2	湘潭
7	娄底市第一人民医院	三级	其他-I 期临床试验研究室-生物等效性试验、内科-心血管内科专业、外科-骨科专业、内科-其他-肿瘤科、内科-内分泌专业	5	娄底
8	永州市第三人民医院(冷水滩区人民医院)	三级	内科-肾病学专业、内科-免疫学专业、内科-血液内科专业、内科-神经内科专业、内科-内分泌专业、内科-心血管内科专业皮肤科-皮肤病专业-皮肤性病专业、肿瘤科	8	永州
9	平江县第一人民医院	三级	肿瘤科	1	岳阳
10	湘潭市中医医院	三级	中医科-肿瘤科专业、中医科-骨伤科专业、内科-内分泌专业	3	湘潭

1.2 机构新增专业情况

2023 年已备案的机构共新增专业 60 个，涵盖 5 类一级诊疗科目、I 期临床试验研究室 4 家。新增专业数量情况如图 1 所示。新增专业数量最多的一级诊疗科目为内科，其对应的的新备案二级诊疗科目情况如图 2 所示。

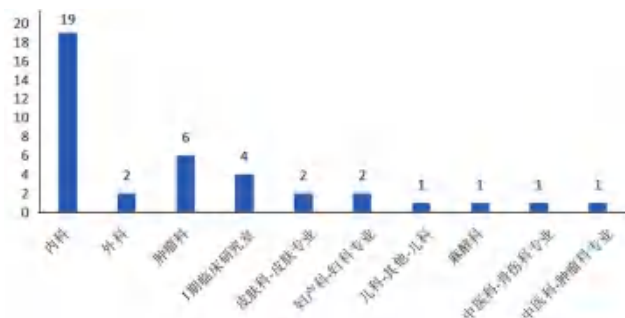


图 1 23 年湖南省药物临床试验机构新增专业数量
Fig 1 Number of newly added specialties in drug clinical trial institutions in Hunan in 2023

1.3 检查结果及缺陷情况

新备案机构中 9 家基本符合要求，后续医疗机构针对机构、伦理和专业相关规定进行整改，整改后符合备案要求；1 家管理部门场地条件及主要研究者 (PI) 资质方面存在明显问题，核查中心将监督检查情况函告省局注册处，省局注册处要求该机构“针对检查发现问题，立即进行整

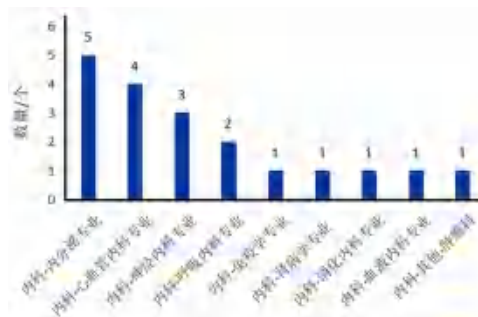


图 2 内科专业新增数量
Fig 2 Number of newly added specialties in internal medicine

改，加强场地建设及 PI 管理”。

2 首次检查问题汇总

2.1 机构常见问题及分析

在新增机构的检查过程中发现的机构(含伦理委员会)的相关问题主要涉及组织管理部门、文件体系、试验用药品管理、资料管理及伦理审查等方面。

2.1.1 相关人员培训不到位 药品管理员/质控员/资料管理员/伦理秘书/伦理委员等人员规范意识欠佳，对工作职责、岗位相关管理制度及标准操作规程(SOP)不熟悉，对《药物临床试验质量管理规范》(GCP)相关内容的掌握程度不足；伦理秘书岗位问题尤其突出。主要问题如下：一是药品管理员对试验用药品的接收、发放、回收、

退回或销毁等工作流程及要求不熟悉；二是质控员对核查研究者试验记录、GCP 中心药房和专业组药品管理相关记录等的要求不了解；三是资料管理员对资料借阅流程不熟悉；四是伦理秘书对伦理审查形式的选择、方案违背/偏离程度判定不了解；五是伦理秘书和伦理委员对伦理审查内容、知情同意书审查重点等不了解。

2.1.2 备案管理不到位 个别机构存在备案信息未及时更新的情况。比如，备案专业仅备案最早任命的 1 名 PI，后续任命的 PI 未及时在备案系统中进行备案。

2.1.3 文件体系欠完善 相关制度文件制订不完善，尤其是关于试验用药品管理、伦理审查、受试者权益保护及生物样本管理等方面，个别新增机构未建立关于临床协调员（CRC）的管理制度。一是试验用药方面，未建立 GCP 药房留样管理、冷链及监控管理、发药处方等制度及 SOP；二是伦理审查方面，未建立严重不良事件（SAE）及可疑非预期严重不良反应（SUSAR）审查、研究者资质审查、医学伦理审核回避、安慰剂伦理审查、人类遗传资源采集/收集/出口/出境伦理审查、突发公共卫生事件伦理审查等制度及 SOP；三是受试者权益保护方面，未建立受试者投诉及处理、受试者补助发放等制度及 SOP；四是生物样本管理方面，未建立生物样本采集、转运、处理、储存、销毁及人类遗传资源信息管理等制度及 SOP；五是相关表格设计不完善，可操作性有待加强，比如机构主任和机构办主任的工作职责中均规定负责签订临床试验合同，《临床试验运行管理制度》中规定由机构办公室报告 SAE 及 SUSAR，《临床试验协调员的职责》中未见领取与回收试验用药品相关内容，安全性事件审查相关管理制度中未规定 SAE 和 SUSAR 由主任委员确定审查方式，临床试验专用领药单未设计核对人签名，伦理审查记录表格中未设计会议记录相关内容，试验用药品出入库记录表格中未设计药物有效期/申办方/项目名称等信息栏，《药物临床试验资料借阅申请表》设计的签字栏与 SOP 规定不一致等。

2.1.4 其他不足 GCP 药房场地条件有限，设施设备不足。比如，未设计留样管理区域，未配备 UPS 电源，未配备转运箱；GCP 药房未建立试验用药品管理台账；GCP 药房未采取温湿度控制措施。

资料室防火措施不到位，且未按规定进行来访人员登记。伦理委员档案中资料不完整。伦理

委员会履职不到位，未对备案专业的 PI 资质进行审查。

2.2 专业常见问题

专业（含项目）相关问题主要涉及专业组的资质条件、文件体系、研究人员、试验用药品管理等方面。

2.2.1 资质条件方面 受试者接待室与主任办公室或资料室共用一间房，但未建立相关的管理制度及 SOP 以保证满足知情和随访的需要，也不能确保受试者的隐私；抢救设施设备配备稍显不足，比如，抢救室未配备除颤仪；部分专业组的设施设备未进行标识及校准，比如，心电图仪、血小板单采机、血压计等未校准；个别机构抢救药品效期管理欠规范，比如，抢救车的抢救药品有效期出现手工修改的情况；且临床试验用仪器设备未设置专人管理，未建立相应的管理台账。

2.2.2 研究人员方面 研究者，尤其是 PI、药品管理员和质控员三个关键角色对试验中的工作职责、角色相关管理制度及 SOP、临床试验相关流程等不熟悉，研究者规范意识欠佳，对 GCP 相关知识，尤其关于安全性事件方面内容掌握不足。

2.2.3 文件体系方面 专业与机构的制度文件有共用现象，照抄套搬居多，尤其关于专业组试验用药品的接收、储存、分发、回收等过程，以及应急预案方面，且专业组文件体系不够完善，不足以满足临床试验开展的需要，尤其关于生物样本处理及管理、临床试验仪器设备管理、受试者生命体征监测等方面。整体来说，文件体系缺少专业特色，可操作性有待加强。

3 机构现状分析

3.1 机构层面

机构主体责任意识不强，内部质量控制环节明显薄弱，对文件体系的修订及完善不够重视，机械性地照搬照抄，应付检查，与自身实际情况脱节，可操作性不强；医疗机构资源普遍紧张，GCP 相关场地条件及设施设备投入有限，尤其是 GCP 药房、GCP 资料室、伦理委员会办公场所及资料室，不能直接产生临床价值和经济效益，能够获得的资源倾斜和资金支持非常有限；GCP 人才建设不够重视，专职人员配备不足，导致关键岗位人员履职能力较差^[6-7]。

3.2 专业层面

专业科室质量意识较差，对临床试验质量管理不够重视，只将精力放在完成临床试验进度上，忽视、轻视临床试验的质量水平；研究者本

身临床诊疗工作繁忙,难以保证充分的时间和精力投入临床试验。同时,研究者的 GCP 培训流于形式,普遍对临床试验相关法规不熟悉,未能充分认识到临床试验工作的严肃性、严谨性,在进行临床试验时仍采取临床诊疗工作的思维方式和习惯,对方案依从性不足,不能契合试验流程,不能满足法规要求,导致临床试验质量较差,规范性问题较多。此外,医务人员的职务晋升、职称评审、绩效考核与临床试验工作关联度不高,导致其重视程度有限^[8-9]。

4 首次检查工作建议

4.1 关注首次检查重点

一是参照《药物临床试验机构监督检查要点和判定原则(征求意见稿)》要求量化指标。重点关注机构、伦理、专业硬件条件配备、相关重点岗位人员配备及能力是否达到履职要求;二是重点关注文件体系适当兼顾科学性,重点检查文件体系制度是否符合机构实际,关键岗位人员是否熟悉各自岗位职责(可以试卷、现场提问等进行现场考核);三是检查机构的质控体系,重点查看质控文件规定、质控频次、相关记录表格检查^[10-11]。

4.2 制订针对性检查方案

根据检查方案,突出组长负责制,为每个机构制订符合特色的检查方案。一是量化分数,制订临床试验机构监督检查评判标准并实行量化打分;二是明确重点,围绕机构、伦理专兼职人员以及 PI 的履职能力,质控保障体系运行情况重点核查^[12-13]。

4.3 对检查结果进行打分分级

全部检查结束后,各检查组原则上按照综合评分排名列出相对排名靠后的机构名单,对机构的整改报告进行综合研究后纳入来年监督检查名单。

参考文献

- [1] 曹彩,熊宁宁.药物临床试验机构的管理[J].中国临床药理学杂志,2011,27(12):5.
- [2] 高荣,李见明.我国药物临床试验机构的发展,定位和职责探讨[J].中国临床药理学杂志,2012,28(9):714-717.
- [3] 国家药品监督管理局.国家药监局(2019年第101号)[EB/OL].(2019-11-29)[2024-01-02].<https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/xzhgfxwj/20191129174401214.html>.
- [4] 蒋发焯,吴一龙,余细勇,等.药物临床试验机构对临床试验的组织管理和质量控制[J].医药导报,2011,30(3):400-403.
- [5] 解琴.我国药物临床试验机构组建的回顾与现状[J].中国临床药理学杂志,2007,23(5):397-400.
- [6] 黄一玲,许莉,康健,等.药物临床试验机构风险管理模式探讨[J].中国新药杂志,2016,25(3):305-309.
- [7] 顾俊,李娜,张志勇,等.浅议药物临床试验机构的风险管理[J].中国新药与临床杂志,2011,30(10):798-800.
- [8] 李江帆,李可欣,武志昂.药物临床试验机构生物等效性试验实施阶段质量风险管理研究[J].中国新药杂志,2018,27(11):1277-1282.
- [9] 张艾一,邵思远,安峥,等.基于文献分析的我国药物临床试验风险影响因素研究[J].中国医学伦理学,2023,36(6):613-617.
- [10] 安晓玲.新政策环境下创新药物临床试验风险管控研究[J].甘肃医药,2022,41(1):66-69.
- [11] 黄一玲,许莉,康健,等.药物临床试验机构风险管理模式探讨[J].中国新药杂志,2016,25(3):305-309.
- [12] 赵扬,尚红,叶杜光,等.部分发达国家(地区)药物临床试验质量检查现状及启示[J].医药导报,2022,41(11):1711-1716.
- [13] 张琼光,王洪,申鸽,等.从检查员视角看新修订《药物临床试验质量管理规范》对研究者的要求[J].中国临床药理学杂志,2021,37(23):3379-3384.

(收稿日期:2024-01-29;修回日期:2024-02-26)

药品不良反应

托珠单抗致严重皮肤反应的病例分析及文献回顾

郑高峰¹, 邱瑞¹, 李金兰^{2*} (1. 简阳市人民医院药学部, 成都 641400; 2. 湖南省肿瘤医院药学部, 长沙 410000)

摘要: **目的** 通过 1 例托珠单抗致严重皮肤反应的病例分析, 总结托珠单抗相关皮肤毒性, 为临床合理用药提供参考。**方法** 对患者治疗进行全程药学监护, 同时检索中国知网、万方、维普和 PubMed 等数据库关于托珠单抗导致皮肤反应的相关文献报道并进行统计分析。**结果** 本案例 1 例 37 岁成人斯蒂尔病女性患者, 接受托珠单抗治疗 5 h 后发生严重皮肤反应, 经药品不良反应关联性评价标准和诺氏评估量表评估, 判断患者的严重皮肤反应很可能由托珠单抗引起, 经停药、对症予以糖皮质激素和中药治疗, 皮肤反应完全消失。通过文献检索托珠单抗致皮肤反应文章 17 篇, 共 18 例, 男性 3 例 (16.7%), 女性 15 例 (83.3%); 发生中位时间为 62 d, 皮肤反应主要通过局部或全身使用糖皮质激素处理, 所有患者的皮肤反应均好转。**结论** 托珠单抗导致严重皮肤反应在临床上不常见, 医师和临床药师应引起重视, 做好该类不良反应的管理, 提高患者的生活质量。

关键词: 托珠单抗; 严重皮肤反应; 病例分析; 文献复习

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2024)06-1678-04

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.044

托珠单抗 (tocilizumab, TCZ) 是一种免疫球蛋白 IgG1 亚型的重组人源化抗人白细胞介素 (IL)-6 受体单克隆抗体, 自 2008 年起, 陆续在日本、欧洲、美国等上市, 2013 年在我国获批上市用于治疗中到重度活动性类风湿关节炎成年患者, 2016 年托珠单抗再次获批用于治疗 2 岁或 2 岁以上儿童的全身型幼年特发性关节炎^[1]。托珠单抗说明书上记载的不良反应主要包括感染、输液反应、实验室检验结果异常 (血液学和中性粒细胞减少症)、免疫原性异常和肝酶异常等^[2]。目前关于托珠单抗导致皮肤相关不良反应的个案报道较少, 国内尚无相关个案报道。本研究对托珠单抗致皮肤不良反应相关个案报道进行回顾性分析, 以期临床合理用药提供参考。

1 病历资料

患者, 女, 37 岁, 主因“发热、皮疹、关节痛 10⁺ d”于 2023 年 6 月 9 日收治入院, 诊断为成人斯蒂尔病。5 年前患者行“甲状腺恶性肿瘤手术”, 术后长期规律口服左甲状腺素钠 50 μg qd 治疗。否认高血压、糖尿病、冠心病史, 否认药物、食物过敏史。

入院查体, 体温 (T): 36.3℃, 心率 (P):

86 次·min⁻¹, 呼吸 (R): 20 次·min⁻¹, 血压 (BP): 112/74 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa); 发育正常, 营养良好, 查体合作。全身皮肤黏膜无黄染, 左侧颈部淋巴结扪及肿大, 余浅表淋巴结未触及肿大。咽部稍充血, 双侧扁桃体无明显肿大。双肺呼吸音清, 未闻及干湿啰音。心律整齐, 各瓣膜区未闻及病理性杂音。腹部平坦, 未见胃肠型及蠕动波。全腹柔软, 肝脾肋下未扪及, 腹部未扪及包块, 无压痛、反跳痛及肌紧张。肠鸣音正常。脊柱、四肢及神经系统未见异常。专科情况: 全身散发水肿性红斑、斑片, 右手第三指关节、右腕关节、右肩关节、双膝关节压痛, 双膝关节轻度肿胀, 屈伸活动受限, 双下肢轻度凹陷性水肿, 四肢肌力、肌张力正常, 生理反射存在, 病理反射未引出。完善相关检查: 白细胞 10.74×10⁹·L⁻¹↑, 红细胞 4.15×10¹²·L⁻¹, 血红蛋白 121 g·L⁻¹, 血小板 292×10⁹·L⁻¹, 中性粒细胞百分比 80.4%↑, 中性粒细胞 8.64×10⁹·L⁻¹↑, 淋巴细胞 1.07×10⁹·L⁻¹↓, 单核细胞 0.78×10⁹·L⁻¹↑, 嗜酸性粒细胞 0.2×10⁹·L⁻¹, 嗜碱性粒细胞 0.05×10⁹·L⁻¹。补体 C4 0.477 g·L⁻¹↑, C 反应蛋白 111

基金项目: 湖南省卫生健康委科研计划项目 (No.202213054953)。

作者简介: 郑高峰, 男, 副主任药师, 主要从事医院药学、临床药学研究, email: 9789470@qq.com *通信作者: 李金兰, 女, 主管药师, 主要从事抗肿瘤药物管理及药物相关不良反应研究, email: lijlan@hnca.org.cn

mg · L⁻¹↑。血沉 76 mm · h⁻¹↑。降钙素原 0.162 ng · mL⁻¹↑。S100 蛋白 0.266 μg · L⁻¹↑。白细胞介素 (IL)-2 0.92 pg · mL⁻¹, IL-4 1.91 pg · mL⁻¹, IL-6 44.69 pg · mL⁻¹↑, IL-10 4.02 pg · mL⁻¹, 肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 1.4 pg · mL⁻¹, 干扰素-γ 0.32 pg · mL⁻¹, IL-17A 5.16 pg · mL⁻¹。铁蛋白 4010 ng · mL⁻¹↑。血液疟原虫、肝肾功能无特殊。

2023 年 6 月 14 日开始静脉滴注托珠单抗注射液 (雅美罗, Chugai Pharma Manufacturing Co., Ltd., 批号: B4022B01) 24 mL 一次, 静脉滴注 5 h 后, 患者四肢出现红斑, 部分融合成片, 压之褪色, 自觉瘙痒, 皮肤相关不良反应 CTCAE (5.0 版) 分级为 1 级。6 月 15 日对症予以葡萄糖酸钙注射液 2 g + 维生素 C 注射液 2 g ivgtt qd、氯雷他定片 10 mg po qn、依巴斯汀片 10 mg po qd 抗过敏治疗。6 月 16 日患者皮疹继续向全身蔓延, 加用炉甘石洗剂外用 tid。6 月 17 日全身泛发红斑、斑片, 累及颜面部、躯干、四肢, 部分融合成片, 压之褪色, 自觉瘙痒 (见图 1D4), 此时皮肤相关不良反应 CTCAE (5.0 版) 分级为 3 级, 加用甲泼尼龙琥珀酸钠 30 mg ivgtt bid。6 月 18 日患者全身皮疹未见明显改善, 将甲泼尼龙琥珀酸钠调整为 80 mg ivgtt qd, 加用消风散 (中药组成为荆芥 30 g、防风 30 g、炒火麻仁 90 g、蝉蜕 30 g、苦参 30 g、鱼腥草 90 g、生地黄 30 g、牡丹皮 30 g、黄芩片 30 g、黄连片 30 g、白茅根 45 g、茵陈 90 g、甘草片 15 g) 1 袋 po tid, 共治疗 3 d。卤米松乳膏局部外用止痒。6 月 22 日患者背部皮疹开始逐渐消退, 将甲泼尼龙琥珀酸钠调整为 40 mg ivgtt qd。6 月 24 日双腿皮疹开始逐渐消退, 将中药调整为消风散合凉血散 [中药组成为生地黄 70 g、牡丹皮 70 g、荆芥 70 g、防风 70 g、金银花 (后下) 210 g、连翘 210 g、赤芍 105 g、黄连片 42 g、炒火麻仁 210 g、蝉蜕 70 g、苦参 70 g、桔梗 70 g、鱼腥草 210 g、炙甘草 70 g] 1 袋 po tid, 共 7 d。6 月 26 日患者腹部皮疹开始逐渐消退, 6 月 27 日患者全身瘙痒明显好转, 6 月 29 日患者皮疹局限在小腿、双手手腕和虎口。6 月 30 日 (见图 1D17) 治疗方案调整为甲泼尼龙片 8 mg po qd、氯雷他定片 10 mg po qn。复查相关检查: 血沉 6 mm · h⁻¹。铁蛋白 502.2 ng · mL⁻¹↑。免疫球蛋白 A 2.17 g · L⁻¹, 免疫球蛋白 G 14.2 g · L⁻¹, 免疫球蛋白 M 1.17 g · L⁻¹, 补体 C3 1.04 g · L⁻¹, 补体 C4 0.244 g · L⁻¹, C 反应蛋白 3.13 mg · L⁻¹。7 月 6 日患者皮疹局限在双膝关节, 将甲泼尼龙片调整为 6 mg po qd。7 月 13 日患者皮疹完全好转。7 月 20 日患者全身有些脱皮, 其他无不适, 将甲泼

尼龙片调整为 4 mg po qd。复查相关检查: 白细胞 9.2 × 10⁹ · L⁻¹, 红细胞 4.54 × 10¹² · L⁻¹, 血红蛋白 136 g · L⁻¹, 血小板 266 × 10⁹ · L⁻¹, 中性粒细胞百分比 66.7%, 中性粒细胞 6.15 × 10⁹ · L⁻¹, 淋巴细胞 2.44 × 10⁹ · L⁻¹, 单核细胞 0.54 × 10⁹ · L⁻¹, 嗜酸性粒细胞 0.03 × 10⁹ · L⁻¹, 嗜碱性粒细胞 0.04 × 10⁹ · L⁻¹。肝肾功能无特殊。2024 年 1 月 4 日回访患者, 患者未再使用托珠单抗, 予以硫酸羟氯喹片 0.2 g po bid、甲氨蝶呤片 10 mg po qw、叶酸片 10 mg po qw、甲泼尼龙片 4 mg po qd 治疗, 患者全身无皮疹, 关节无疼痛。

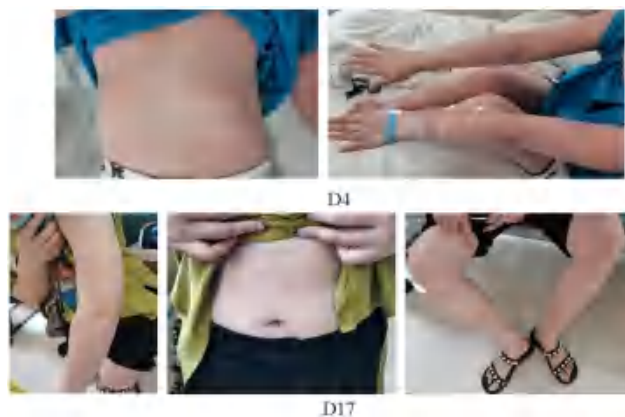


图 1 患者皮肤反应变化过程

2 讨论

2.1 皮肤相关不良反应与托珠单抗的关联性评价

根据《药品不良反应报告和监测管理办法》药品不良反应关联性评价标准, 符合以下几条标准: ① 本例患者出现皮疹和瘙痒不良反应与使用托珠单抗有合理的时间关系; ② 托珠单抗说明书提及该药不良反应包括皮疹、瘙痒, 本例患者的不良反应符合该药的已知反应类型; ③ 停用托珠单抗, 对症予以糖皮质激素、口服中药后, 不良反应症状好转; ④ 停用托珠单抗后未再使用, 不良反应未再发生; ⑤ 患者诊断为成人斯蒂尔病, 伴发皮疹为散在水肿性红斑, 发热时明显, 热退时有所消退; ⑥ 患者使用托珠单抗后出现的皮疹未突出表面, 为全身泛发红斑、斑片, 不随体温进行变化, 两者临床表现不同, 患者无食物、药物过敏史, 该不良反应不能用原患疾病进行解释, 也不能用合并用药、其他治疗解释。因此, 评价本例患者出现上述不良反应与托珠单抗的关联性为“很可能”。根据患者的治疗过程, 采用诺氏评估量表^[3]对托珠单抗与皮疹、瘙痒之间的因果关系进行评分, 得分为 6 分, 很可能有关。综合评价患者出现皮疹和瘙痒很可能由托珠单抗引起。

表 1 托珠单抗致皮肤相关不良反应的诺氏评估量表评分

相关问题	问题分值			得分
	是	否	未知	
1. 该 ADR 先前是否有结论性报告?	+1	0	0	+1
2. 该 ADR 是否是在使用可疑药物后发生的?	+2	-1	0	+2
3. 该 ADR 是否在停药或应用拮抗剂后得到缓解?	+1	0	0	+1
4. 该 ADR 是否在再次使用可疑药物后重复出现?	+2	-1	0	0
5. 是否存在其他原因能单独引起该 ADR?	-1	+2	0	+2
6. 该 ADR 是否在应用安慰剂后重复出现?	-1	+1	0	0
7. 药物在血液或其他体液中是否达到毒性浓度?	+1	0	0	0
8. 该 ADR 是否随剂量增加而加重, 或随剂量减少而缓解?	+1	0	0	0
9. 患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现过类似反应?	+1	0	0	0
10. 是否存在任何客观证据证实该反应?	+1	0	0	0
总分值				6

注: 总分值 ≥ 9 分, 为肯定; 总分值 5 ~ 8 分, 为很可能有关; 总分值 1 ~ 4 分, 为可能有关; 总分值 ≤ 0 , 为可疑。

2.2 托珠单抗相关皮肤反应药物流行病学特点

通过在中国知网、万方、维普、PubMed 等数据库检索托珠单抗皮肤相关不良反应的文献, 结果检索到托珠单抗相关皮肤不良反应文献 17 篇, 共 18 例患者。托珠单抗相关皮肤不良反应的临床表现有肉芽肿性皮炎^[4-10]、脓疱性皮炎^[11-13]、银屑病^[14-16]、红皮病^[17]、丘疹^[18-19]、Wolf 同位反应^[20]。发生时间在用药后 2 d ~ 28 个月, 中位发生时间为 62 d。大部分患者停用托珠单抗, 局部或全身使用糖皮质激素后症状好转。

2.3 托珠单抗引起皮肤不良反应的机制

药物引起皮肤不良反应的机制包括免疫性和非免疫性的。75% ~ 80% 药物不良反应是继发于可预测的非免疫效应, 而其余 (20% ~ 25%) 是由不可预测的效应引起的, 其中一些可能是免疫介导的^[21]。托珠单抗引起皮肤不良反应的机制尚不明确。Kohro-Kawata 等^[13]认为, 托珠单抗抑制 IL-6 受体后, 循环 IL-6 的异常增加可能导致中性粒细胞的表皮内募集和角质形成细胞肥大, 这在银屑病样皮疹和其他形式的皮肤反应中可见。Altemir 等^[4]认为, 免疫复合物可能参与间质性肉芽肿性皮炎的发生, 这些触发器可能会改变真皮胶原的抗原性, 导致免疫复合物的沉积, 从而导致胶原变性和肉芽肿的形成。Pelechas 等^[10]认为, 托珠单抗对 IL-6 受体的抑制可能通过自身

免疫机制促进自身反应性 T 细胞的激活, 从而导致组织损伤。Katsuda 等^[7]认为, 在结节病患者的肉芽肿中, 调节性 T 细胞 (Treg) 可产生多种细胞因子 (如 IL-10), 与血液中正常循环的 Treg 相比, 其抑制能力降低。托珠单抗通过抑制 Treg 向辅助性 T 细胞 17 (Th17) 的转化, 导致 Treg 增加。此外环状肉芽肿中的 Treg 可能参与巨噬细胞的激活, 进一步引起环状肉芽肿的发展。Shono 等^[6]认为, 托珠单抗对 IL-6 途径的抑制可能至少在局部增强了 TNF- α 的产生, 并导致局部皮肤结节病的初始肉芽肿形成。

2.4 托珠单抗导致皮肤相关不良反应的处理

发生药物相关皮肤不良反应后, 首先应停用致敏药物。轻中度反应可选用抗组胺药物、非甾体抗炎药和局部使用糖皮质激素, 如外用丙酸氯倍他索, 口服泼尼松龙或静脉注射苯海拉明等; 严重反应经过仔细评估后可选用全身糖皮质激素或其他免疫抑制剂 (如环孢素、TNF 抑制剂或其他生物疗法)^[20, 22]。托珠单抗导致皮肤反应可以通过对症处理后缓解症状, 通常在停用托珠单抗后数周至数月后消退。

有文献显示发生轻中度皮肤反应, 可在联合局部或全身糖皮质激素治疗基础上, 继续使用托珠单抗^[6, 8, 12]。也有文献报道部分患者再次使用时会出现相同不良反应, 通过减量或局部应用糖皮质激素皮肤反应得到控制^[5, 16]。对于严重的皮肤反应, 根据说明书推荐应立即停止使用托珠单抗, 并永久终止托珠单抗的治疗。

本案例患者在输注托珠单抗 5 h 后发生严重皮肤反应, 停用托珠单抗, 对症予以糖皮质激素和中药治疗 28 d 后, 患者皮肤反应完全消失, 未再使用托珠单抗。

3 总结

托珠单抗导致严重皮肤反应在临床上不常见, 临床医师和药师应及时发现和及时处理该类不良反应。在本例患者的诊疗过程中, 临床药师查阅托珠单抗导致皮肤反应的国内外文献, 结合患者临床情况, 与临床医师协作, 判定皮肤反应“很可能”是托珠单抗引起。临床药师全程对患者进行药学监护, 对患者用药进行指导, 医师和患者接纳临床药师建议, 患者好转出院。本案例提示在临床用药过程中、用药后应加强监测, 出现异常及时予以判别和干预, 避免症状加重, 甚至病情恶化。

参考文献

- [1] 罗林, 张佳颖, 陈力, 等. 基于美国 FAERS 数据库的托珠单抗不良事件信号挖掘 [J]. 中国药房, 2021, 32 (15): 1874-1879.
- [2] 舒冰, 蒋威, 沈爱宗. 托珠单抗致不良反应文献分析 [J]. 中国新药杂志, 2021, 30 (4): 369-376.
- [3] 谢继青, 马晓雯, 王惠霞. 基于诺氏评估量表的氟比洛芬酯与低氧血症昏迷相关性分析 [J]. 中国药业, 2023, 32 (2): 117-119.
- [4] Altemir A, Iglesias-Sancho M, Sola-Casas MLÁ, et al. Interstitial granulomatous dermatitis following tocilizumab, a paradoxical reaction? [J]. *Dermatol Ther*, 2020, 33 (6): e14207.
- [5] Del Giorno R, Iodice A, Mangas C, et al. New-onset cutaneous sarcoidosis under tocilizumab treatment for giant cell arteritis: a quasi-paradoxical adverse drug reaction. case report and literature review [J]. *Ther Adv Musculoskel-et Dis*, 2019, 11: 1759720X19841796.
- [6] Shono Y, Kamata M, Takeoka S, et al. Cutaneous sarcoidosis in a patient with rheumatoid arthritis receiving tocilizumab [J]. *J Dermatol*, 2018, 45 (8): e217-e218.
- [7] Katsuda K, Arase N, Nakagawa Y, et al. Case of granuloma annulare after using tocilizumab [J]. *J Dermatol*, 2020, 47 (4): e117-e119.
- [8] de Perosanz Lobo D, Saceda CD, Ortega QD, et al. Interstitial granulomatous dermatitis and tocilizumab: is this treatment useful for this skin condition? [J]. *Actas Dermosifiliogr (Engl Ed)*, 2020, 111 (4): 343-345.
- [9] Nutz A, Pernet C, Combe B, et al. Sarcoidosis induced by tocilizumab: a paradoxical event? [J]. *J Rheumatol*, 2013, 40 (10): 1773-1774.
- [10] Pelechas E, Papoudou-Bai A, Voulgari PV, et al. Granuloma annulare development in a patient with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab: case-based review [J]. *Rheumatol Int*, 2019, 39 (2): 353-357.
- [11] Sparsa L, Afif N, Bularca S, et al. Réactions cutanées paradoxales sous traitement par tocilizumab [Paradoxical cutaneous reactions associated with tocilizumab therapy] [J]. *Rev Med Interne*, 2014, 35 (9): 613-616.
- [12] Izquierdo JH, Bonilla-Abadía F, Ochoa CD, et al. Acute generalized exanthematous pustulosis due to tocilizumab in a rheumatoid arthritis patient [J]. *Case Rep Rheumatol*, 2012, 2012: 517424.
- [13] Kohro-Kawata J, Kinjo M. Papulopustular rash due to tocilizumab [J]. *Intern Med*, 2019, 58 (24): 3603-3604.
- [14] Palmou-Fontana N, Sánchez Gaviño JA, McGonagle D, et al. Tocilizumab-induced psoriasiform rash in rheumatoid arthritis [J]. *Dermatology*, 2014, 228 (4): 311-313.
- [15] Wendling D, Letho-Gyselinc H, Guillot X, et al. Psoriasis onset with tocilizumab treatment for rheumatoid arthritis [J]. *J Rheumatol*, 2012, 39 (3): 657.
- [16] Laurent S, Le Parc JM, Clérici T, et al. Onset of psoriasis following treatment with tocilizumab [J]. *Br J Dermatol*, 2010, 163 (6): 1364-1365.
- [17] Nakamura M, Tokura Y. Tocilizumab-induced erythroderma [J]. *Eur J Dermatol*, 2009, 19 (3): 273-274.
- [18] Babkooor D, Alshuqayfi A, Alshegaifi N, et al. Tocilizumab-induced dermatosis in a patient with rheumatoid arthritis [J]. *Cureus*, 2022, 14 (12): e32967.
- [19] Yoshiki R, Nakamura M, Tokura Y. Drug eruption induced by IL-6 receptor inhibitor tocilizumab [J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2010, 24 (4): 495-496.
- [20] Lin CH, Chen HC, Gao HW, et al. Wolf's post-herpetic isotopic response to tocilizumab for rheumatoid arthritis [J]. *Australas J Dermatol*, 2018, 59 (2): e135-e137.
- [21] Ramadan F. Adverse cutaneous drug reactions: manifestations, diagnosis and management [J]. *Br J Community Nurs*, 2023, 28 (2): 74-76.
- [22] Del Pozzo-Magaña BR, Liy-Wong C. Drugs and the skin: A concise review of cutaneous adverse drug reactions [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2022, doi: 10.1111/bcp.15490.

(收稿日期: 2023-01-09; 修回日期: 2024-02-07)

白蛋白结合型紫杉醇疑致神经性耳聋 1 例

刘尧¹, 杨进², 任常谕¹, 周后凤¹ (1. 成都市第五人民医院药剂科, 成都 611130; 2. 成都市第五人民医院甲状腺乳腺外科, 成都 611130)

关键词: 抗肿瘤药物; 神经性耳聋; 不良反应; 白蛋白结合型紫杉醇

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2024)06-1682-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.06.045

乳腺癌是中国女性最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率居女性恶性肿瘤之首。目前多选择手术与放化疗联合的方式治疗乳腺癌, 新辅助化疗药物包括蒽环类、紫杉醇类等药物。其中白蛋白结合型紫杉醇以纳米白蛋白为载体, 与传统溶剂型紫杉醇相比, 给药剂量提高, 药物在肿瘤组织中的分布更高, 安全性更好, 且无须药物预处理, 能显著提高肿瘤缓解率, 延长患者生存。但白蛋白结合型紫杉醇在我国上市时间较短, 随着临床广泛应用, 其不良反应也日渐受到关注, 本文就 1 例乳腺癌患者使用白蛋白结合型紫杉醇致神经性耳聋的病例进行分析, 以期为临床安全、合理用药提供参考。

1 病历资料

患者, 女, 46 岁, 身高 150 cm, 体重 71 kg, 因“确诊右乳癌 3 个月, 拟行第 6 周期新辅助化疗”入院。患者于 2023 年 3 月发现无痛性右乳包块就诊我院, 完善右乳及腋窝穿刺后病理诊断: 浸润性癌, 右侧腋窝淋巴结查见转移性癌, 免疫组化: GATA-3 (+)、CK5/6 (-)、P63 (-)、E-ca (膜+)、ER (中-强+, 约 90%)、PR (中-强+, 约 90%)、HER-2 (++)、Ki-67 (+, 约 20%)。FISH: 阴性。诊断为右乳浸润性乳腺癌 (ycT4N1M0 III B 期 luminalB 型)。根据 NCCN 指南, 患者行新辅助化疗: 2023 年 3 月 8 日开始行 AC 方案 (注射用吡柔比星 70 mg ivgtt d1 + 注射用环磷酰胺 0.8 g ivgtt d1) 4 周期后, 于 6 月 3 日序贯白蛋白结合型紫杉醇 400 mg ivgtt d1/q21d 化疗 1 周期。患者诉第 1 周期白蛋白结合型紫杉醇 [广西梧州制药 (集团) 股份有限公司, 批号: 22030109] 化疗 7 d 后右耳听力逐渐下降, 伴耳鸣, 6 月 23 日入院时诉右耳听力丧失。请耳鼻

喉科会诊后, 行双耳听力相关检查: 右耳中度感音神经性听力损失, 左耳轻度感音神经性听力损失。遂停用第 2 周期白蛋白结合型紫杉醇, 立即给予甲钴胺片营养神经、盐酸氟桂利嗪减轻耳鸣等对症治疗, 听力逐渐恢复。7 月行右乳改良根治术, 术后换用多西他赛辅助治疗 3 周期, 未再出现听力丧失情况。

患者既往健康状况良好, 有耳鸣史, 否认高血压、糖尿病病史, 近期无感冒发烧, 除抗肿瘤药物外近期末服用其他药物。

2 分析与讨论

2.1 患者听力损失的原因分析

2019 年开始患者间断有耳鸣情况, 未予以重视, 2023 年 3 月诊断为右乳浸润性乳腺癌, 给予 AC-T (注射用吡柔比星 70 mg ivgtt d1 + 注射用环磷酰胺 0.8 g ivgtt d1- 白蛋白结合型紫杉醇 0.4 g ivgtt d1) 新辅助化疗, 在 6 月序贯使用第 1 周期白蛋白结合型紫杉醇后右耳中度感音神经性听力损失, 遂停用第 2 周期白蛋白结合型紫杉醇, 给予对症治疗。7 月行右乳改良根治术, 右耳听力逐渐恢复。患者既往间断有耳鸣史, 但未出现过听力损失的情况。治疗期间未发生感染, 未行放疗, 且无自身免疫性疾病、神经系统、糖尿病等可能引起听力损失的疾病。头部 MRI 结果排除颅内病变导致耳聋的可能性。梳理患者用药史, 既往曾行 4 周期吡柔比星和环磷酰胺化疗, 化疗期间同时给予格拉司琼注射液、法莫替丁注射液预防恶心呕吐, 院外未服用其他药物, 查阅国内外文献, 目前尚无吡柔比星和环磷酰胺导致听力损伤的报道。

结合患者病史和临床症状, 根据诺氏药物不良反应评估量表, 白蛋白结合型紫杉醇评分为 5 分, 患者听力损伤很可能是该药物引起 (见表 1)。

基金项目: 成都市卫生健康委员会项目 (No.2022540)。

作者简介: 刘尧, 女, 硕士, 主管药师, 主要从事抗肿瘤药物相关临床药学及药品不良反应工作, email: 563085860@qq.com

*通信作者: 周后凤, 女, 主任药师, 主要从事临床药学与药事管理工作, email: 510823751@qq.com

表 1 白蛋白结合型紫杉醇致神经性耳聋诺氏评估量表评分

相关问题	问题分值			得分理由
	是	否	未知	
1. 该 ADR 先前是否有结论性报告?			0	白蛋白结合型紫杉醇无听力损失相关不良反应
2. 该 ADR 是否是在使用可疑药物后发生的?	2			给予白蛋白结合型紫杉醇后出现右耳听力丧失
3. 该 ADR 是否在停药或应用拮抗剂后得到缓解?	1			停药后给予甲钴胺片对症治疗缓解
4. 该 ADR 是否在再次使用可疑药物后重复出现?		- 1		未再使用可疑药物
5. 是否存在其他原因能单独引起该 ADR ?		2		该患者不存在其他因素单独引起听力丧失
6. 该 ADR 是否在应用安慰剂后重复出现?			0	未使用安慰剂
7. 药物在血液或其他体液中是否达到毒性浓度?			0	未测药物在血液或其他体液的浓度
8. 该 ADR 是否随剂量增加而加重, 或随剂量减少而缓解?			0	给药剂量未改变
9. 患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现过类似反应?			0	未曾暴露于同种或同类药物并出现过类似反应
10. 是否存在任何客观证据证实该反应?	1			患者的听力检查报告: 右耳中度听力下降
总分值	5			

2.2 白蛋白结合型紫杉醇引起听力损失的原因

白蛋白结合型紫杉醇是将人血清白蛋白与紫杉醇通过高压振动技术制成的新型紫杉醇纳米制剂, 提高了药物的靶向作用, 且使用前无需使用糖皮质激素或抗组胺药物预防过敏反应, 临床使用更为灵活方便。

普通紫杉醇常见的不良反应有过敏反应、骨髓抑制、肌肉疼痛、关节痛、下肢痛和心功能异常等, 相比于普通紫杉醇, 白蛋白结合型紫杉醇的神经毒性、皮疹的发生率更高^[1-2]。既往若接受过化疗或者在既往化疗中出现过神经系统不良反应的患者也更易出现神经系统病变且病变更严重^[3]。

查阅相关文献, 白蛋白结合型紫杉醇的耳毒性尚未有文献报道, 但由于其与紫杉醇具有相似性, 紫杉醇的耳毒性报道可提供参考。Gogas 等^[4]报告了 2 例糖尿病患者单纯应用紫杉醇后产生了明显的耳中毒反应。有 1 例乳腺癌转移患者联用紫杉醇和长春瑞滨后发生听力损失报道, 但由于长春瑞滨从未见耳毒性的相关报道, 因此考虑紫杉醇引起耳毒性的可能性较大^[5]。董杨等^[6]报告了 2 例多西他赛引起的耳毒性相关报道, 1 例 58 岁的乳腺癌晚期患者在使用了 8 个周期的多西他赛挽救性治疗 ($65 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$) 后, 出现双耳嗡嗡声和口哨声, 听力感知下降, 诊断为感音神经性听力损失。另 1 例为 74 岁的乳腺癌患者术后行 4 周期吡柔比星+环磷酰胺辅助化疗后, 序贯给予第 1 个周期的多西他赛 ($75 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$) 化疗 2 d 后, 患者双耳听力明显下降, 诊断为双耳感音神经性听力损失伴左耳膜穿孔。且 2 例患者在使用多西他赛前均无听力损失症状。而本例患者为中年女性, 序贯行第 1 周期白蛋白结合型紫杉醇后出现听力损失, 但不同的是患者在新辅

助化疗前就间断出现耳鸣, 这可能是她早期出现听力损失的原因之一。

关于紫杉醇类药物引起耳毒性的机制研究也较少。Atas 等^[7]观察了注射紫杉醇对白化瑞士小鼠听觉系统的影响, 发现注射紫杉醇后可引起听功能明显下降。推断紫杉醇引起的中度感音神经性听力损失可能是因为紫杉醇产生了类似于水杨酸或干扰素 α -2a 耳毒性的可逆性退行性病变。Dong 等^[8]对大鼠耳蜗器官型培养物进行研究, 发现紫杉醇在体内达到一定浓度时可导致听力损失, 与毛细胞相比, 紫杉醇对听神经纤维和螺旋神经节神经元 (SGNs) 的毒性更大。紫杉醇诱导的 SGNs 细胞死亡是由半胱天冬酶活性介导的。

但临床使用中紫杉醇总是与其他耳毒性抗肿瘤药物如铂类制剂联合使用, 常常会被其他耳毒性药物引起的内耳损伤所掩盖。此外紫杉醇类药物对外周感觉神经纤维及其髓鞘的破坏作用并不影响听觉系统的感受器电位, 因而其耳毒性作用往往也不易被察觉^[8]。但药物导致的神经性耳聋破坏的是感知声音的部位耳蜗毛细胞, 很难治愈, 目前尚无理想的治疗方法, 所以需早发现、早诊断、早治疗。药物治疗主要是扩血管、改善微循环、营养神经, 有条件的可行高压氧治疗^[9]。因此在使用紫杉醇类药物前, 要充分评估患者的生理状态, 综合考虑患者的年龄和基础疾病。对于有合并耳鸣等不适情况的肿瘤患者, 必须使用紫杉醇类药物时, 临床药师应向患者进行详细的用药教育, 同时密切监测耳鸣、耳朵闷胀、听力不集中等情况, 若出现不适时应及时调整用药, 并给予对症治疗。

3 小结

本案例是 1 例乳腺癌患者使用白蛋白结合型

紫杉醇后出现神经性耳聋的罕见病例。白蛋白结合型紫杉醇临床广泛用于肺癌、乳腺癌等肿瘤疾病的治疗，常见的不良反应有骨髓抑制、肌肉痛、胃肠道反应和神经毒性，对耳毒性不良反应的研究较少。且常与其他耳毒性抗肿瘤药物联合使用，耳毒性作用常常被掩盖。因此对于既往有耳部不适的患者，临床药师和临床医师需密切关注患者耳毒性不良反应，一旦出现幻听、听力下降、耳聋等症状，应根据严重程度，及时停药或减量，积极给予支持对症治疗，并根据患者意愿、生存结局、耳毒性程度等综合考虑是否需继续使用可疑药物或更换其他药物，提高治疗效果。

参考文献

- [1] Meng ZY, Lv QX, Lu J, et al. Prodrug strategies for paclitaxel [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17 (5): e796.
- [2] Lee H, Park S, Kang JE, et al. Efficacy and safety of nanoparticle-albumin-bound paclitaxel compared with solvent-based taxanes for metastatic breast cancer: a meta-analysis [J]. *Sci Rep*, 2020, 10 (1): 530.
- [3] 王尧, 蒋海萍, 徐农. 紫杉醇神经毒性的预测与防治的新认识 [J]. *现代实用医学*, 2013, 25 (1): 1318-1320.
- [4] Gogas H, Shapiro F, Aghajanian C, et al. The impact of diabetes mellitus on the toxicity of therapy for advanced ovarian cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 1996, 61 (1): 22-26.
- [5] Tibaldi C, Pazzagli I, Berrettini S, et al. A case of ototoxicity in a patient with metastatic carcinoma of the breast treated with paclitaxel and vinorelbine [J]. *Eur J Cancer*, 1998, 34 (1): 1133-1134.
- [6] 董杨, 施建蓉, Salvi R, 等. 抗癌药紫杉醇的神经毒性和耳毒性 [J]. *中华耳科学*, 2011, 9 (1): 318-322.
- [7] Atas A, Agca O, Sarac S, et al. Investigation of ototoxic effects of Taxol on a mice model [J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2006, 70 (1): 779-784.
- [8] Dong Y, Ding DL, Jiang HY, et al. Ototoxicity of paclitaxel in rat cochlear organotypic cultures [J]. *Toxicol Appl Pharm*, 2014, 280 (3): 526-533.
- [9] 王凤玲, 尹三. 感音神经性耳聋的误漏诊原因及对策 [J]. *中国社区医师 (医学专业)*, 2011, 13 (2): 102.

(收稿日期: 2023-11-02; 修回日期: 2023-12-20)