



中南药 学

ZHONGNAN YAOXUE

月刊 2003年4月创刊 第22卷 第7期(总第222期) 2024年7月20日出版

目 次

研究论文

- (1685) 蒙自藜芦中的甾体生物碱及抗炎活性研究
..... 高文分, 马金蓉, 刘继华, 等
- (1692) 基于网络药理学从铁死亡途径探究七味参地颗粒治疗慢性肾小球肾炎的作用机制
..... 徐先进, 胡文杰, 秦秀娟
- (1698) 便通凝胶贴膏的制备及药效学评价..... 王兴刚, 付志丽, 蓝俊, 等
- (1705) 基于药效团模型的 PPAR δ 激动剂的筛选及活性研究
..... 李琦, 魏朝, 张鑫磊, 等
- (1712) 黄芪甲苷脂质体原位凝胶眼部给药系统的研究
..... 吕菊芳, 于艺斌, 谢岩, 等
- (1718) 埃索美拉唑药物树脂复合物包衣微囊的制备及评价
..... 茅关兴, 辛渊蓉, 窦玉甜, 等
- (1725) 补肾活血方调控 NF- κ B 信号通路对膝骨关节炎小鼠软骨组织炎症及细胞凋亡的影响
..... 刘小丽, 章铮, 姚金龙, 等
- (1732) 参松养心胶囊中 4 种成分在大鼠血浆中药动学研究
..... 马晨阳, 符子轩, 王哲永, 等
- (1738) 阿提日拉力片的干燥工艺优化
... 阿依仙木·加帕尔, 沙塔尔·帕塔尔, 买买提依力·如尔买提, 等
- (1742) G1- 熵权法结合 Box-Behnken 响应面法优化银星养脑方醇提工艺
..... 熊丹, 蒋翠平, 牛江进, 等
- (1748) 基于网络药理学与体外实验探讨杏仁活性成分治疗血管痉挛的作用机制
..... 武博文, 颜培宇, 武密山
- (1757) 肉桂不同部位挥发油 3 种成分的含量测定及其体外透皮特性研究
..... 陈锋, 罗金荣, 邓聿胤
- (1762) 响应面法优化兰雪醌超声辅助提取工艺的研究
..... 莫秋月, 时晨, 袁慧, 等
- (1767) 虾青素对大鼠心肌梗死后心肌纤维化的影响
..... 余太辉, 鲁锦国, 唐艳红, 等
- (1772) 金嗓散结胶囊对反流性咽喉炎模型大鼠咽喉黏膜屏障保护作用实验研究
..... 赵林涛, 韩曼, 苗彦, 等
- (1779) 乳腺康颗粒的制备工艺研究..... 常婷, 王璐, 孙永慧, 等
- (1785) 甘草查尔酮 A 在比格犬体内的药代动力学研究
..... 杨文娜, 翟亚楠, 邵寒冰, 等
- (1789) 盐酸米安色林鼻用制剂的处方前研究..... 王猜, 谷福根, 杨蕾

顾问

周宏灏

主编

李焕德

社长

张毕奎

编辑部主任

郭志娟

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

《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 姜月芬
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

(1795) 壮药血风藤提取物的抗炎作用及机制研究

..... 陈晓军, 华全东, 农云开, 等

基于中药引经理论的靶向制剂设计基础思考与实践

(1801) 基于中药引经理论的靶向制剂设计基础思考与实践

..... 赵瑞芝, 赵亚, 刘丽娟, 等

(1807) 醋柴胡水提液通过调控细胞内多种转运蛋白影响对底物药物的摄取

..... 冯丽敏, 张娴, 赵瑞芝

(1812) 醋柴胡水提取液不同部位对大黄酸单次给药体内分布影响及其作用

机制初探 赵亚, 王锦秋, 刘丽娟, 等

综述

(1817) 中药新药开发的现状及思考 白洁, 马珂, 谢浏娜, 等

(1822) 玛巴洛沙韦: 首个靶向于 Cap- 依赖性核酸内切酶的抗流感药物

..... 周姝含, 胡长平, 罗平

(1831) 新型钙调神经磷酸酶抑制药伏环孢素临床研究进展

..... 邓伟萍, 胡长平, 罗平

(1838) 调节性细胞死亡在心肌缺血再灌注损伤中的作用研究进展

..... 张思琦, 郭朝瑞, 董志强, 等

(1845) 血根碱在癌症治疗中的抗肿瘤机制研究进展

..... 冉遥, 冷泓旭, 郑凯帆, 等

(1851) 纳米金刚石载药及其抗肿瘤应用研究进展 张丹红

(1856) 不同金属组成的层状双氢氧化物在医药领域的应用进展

..... 耿革霞, 李丽平, 王瑶瑶, 等

(1864) 中药及天然产物治疗高尿酸血症和痛风的作用机制研究进展

..... 李阁, 曹慧雅, 闫思雅, 等

(1872) 溶瘤病毒作为抗肿瘤药治疗肝癌的研究进展

..... 刘英峰, 宋亚刚, 苗明三

(1877) 靶向治疗 HER2 阳性乳腺癌患者的新型抗体药物偶联物: T-DM1 与

T-DXd 何明星, 张露, 谭燕

药物分析与检验

(1883) ICP-MS 法测定香苏正胃丸中朱砂的含量

..... 高立金, 李杰, 张琳, 等

(1886) 直接进样 - 气质联用法测定头孢曲松钠中 10 种残留溶剂及其质量评

价研究 李荣, 王涛, 张亚锋, 等

(1892) 高效液相色谱法测定金莲花软胶囊中有效成分的含量

..... 林凤屏, 翁嘉, 李士明, 等

(1895) 炒制饮片焦栀子中 4 种多环芳烃测定及初步风险评估

..... 王文婷, 郭娅, 阳文武, 等

(1899) 高效液相色谱法测定替戈拉生中有关物质的研究

..... 张磊, 苑艳飞, 林小晖, 等

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。

(1903) 蜈蚣药材、饮片、标准汤剂与配方颗粒的特征图谱相关性研究及量值传递分析 梁素仪, 江斌, 蔡小兵, 等

医院药学

- (1909) 托法替布片药物利用评价标准建立及应用 曹迪, 程军, 张士洋, 等
- (1915) 焦虑 / 抑郁状态影响心脏瓣膜术后华法林抗凝质量的回顾性研究 史金平, 唐亚娟, 张琰, 等
- (1919) 基于 2020 年版《中国药典》一部含毒性动物饮片中成药梳理分析与药学监护要点建立 唐贺, 鞠晓宇, 赵倩, 等
- (1924) 地佐辛、喷他佐辛用于胃癌根治术患者术后镇痛的药物经济学评价 吴廷庆, 肖洋, 牛露露, 等
- (1929) 基于不同年龄段人群的金莲清热制剂不良反应报告分析 张纾, 林翼旻, 张玲萍, 等
- (1934) 《国家基本药物目录》(2012 年版和 2018 年版) 与《世界卫生组织基本药物标准清单》(2023 版) 中眼科用药的比较和分析 刘博, 宋钦, 王雪, 等

临床药师在临床

- (1939) 肝硬化失代偿期合并肺结核的个体化治疗分析与药学监护 邓珍珍, 吴翠芳, 王胜峰
- (1944) 卡泊芬净治疗念珠菌尿路感染 1 例并文献复习 周燕, 卢莹, 邹娅, 等
- (1949) 临床药师参与免疫相关性垂体炎继发肾上腺皮质功能不全诊治的药学实践 周玉冰, 张爱玲, 张文达, 等
- (1953) 1 例暴发性心肌炎行体外膜肺氧合联合连续肾脏替代治疗继发动脉血栓患儿个体化抗栓治疗分析 高年婷, 王欣怡, 李波霞

药事管理

(1957) 污染控制策略在无菌药品参数放行中的应用探讨 汤平, 蒋芙蓉, 陈超, 等

药品不良反应

- (1963) 莫西沙星与非甾体抗炎药潜在药物相互作用致不良反应 1 例 梁兴发, 黄怡新, 尚翔, 等
- (1965) 头孢哌酮钠舒巴坦钠致重度凝血功能障碍伴发心包积液 1 例 薛晓燕, 丁可, 谢海彬, 等
- (1968) 顺铂诱导的抗利尿激素分泌异常综合征致重度低钠血症 1 例 高孟婷, 郑红, 林海霞

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*b*A4*286*zh*P*30.0*52*2024-7

本期责任编辑: 李科, 陆窈窈, 彭金飞, 邬志娟

英文编辑: 周静

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 22, Number 7 July 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

- (1685) Steroid alkaloids in *Veratrum mengtzeanum* Loes. and their anti-inflammatory activity GAO Wen-fen, MA Jin-rong, LIU Ji-hua, et al
- (1692) Mechanism of Qiwei Shendi granules for chronic glomerulonephritis through ferroptosis pathway based on network pharmacology XU Xian-jin, HU Wen-jie, QIN Xiu-juan
- (1698) Preparation and pharmacodynamics of Biantong gel plaster WANG Xing-gang, FU Zhi-li, LAN Jun, et al
- (1705) Screening and activity of PPAR δ agonists based on pharmacophore model LI Qi, WEI Zhao, ZHANG Xin-lei, et al
- (1712) Ocular drug delivery system for astragaloside IV liposome in situ gel LYU Ju-fang, YU Yi-bin, XIE Yan, et al
- (1718) Preparation and evaluation ofesomeprazole drug resin complex coated microcapsules MAO Guan-xing, XIN Yuan-rong, DOU Yu-tian, et al
- (1725) Effect of Bushen Huoxue formula regulating NF- κ B signaling pathway on inflammation and apoptosis of cartilage tissue in mice with knee osteoarthritis LIU Xiao-li, ZHANG Zheng, YAO Jin-long, et al
- (1732) Pharmacokinetics of 4 components of Shensong Yangxin capsules in rat plasma MA Chen-yang, FU Zi-xuan, WANG Zhe-yong, et al
- (1738) Optimization of drying process of Atirilali tablet Ayixianmu Jiapaer, Shataer Pataer, Maimaitiaili Ruermaiti, et al
- (1742) Optimization of alcohol extraction of Yinxing Yangnao formula by G1-entropy weight method combined with Box-Behnken response surface methodology XIONG Dan, JIANG Cui-ping, NIU Jiang-jin, et al
- (1748) Mechanism of action of active components of *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim. mature seed for vasospasm based on network pharmacology and in vitro experiments WU Bo-wen, YAN Pei-yu, WU Mi-shan
- (1757) Content of 3 components of volatile oil from different parts of *Cinnamomum cassia* and its in vitro transdermal permeation CHEN Feng, LUO Jin-rong, DENG Yu-yin
- (1762) Optimization of ultrasound-assisted extraction of plumbagin by response surface methodology MO Qiu-yue, SHI Chen, YUAN Hui, et al
- (1767) Effect of astaxanthin on myocardial fibrosis in the rat model of myocardial infarction YU Tai-hui, LU Jin-guo, TANG Yan-hong, et al
- (1772) Protective effect and related mechanism of Jinsang Sanjie capsules on throat mucosal barrier in reflux pharyngolaryngitis model rats ZHAO Lin-tao, HAN Man, MIAO Yan, et al

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.

- (1779) Preparation process of Ruxiankang granules
..... CHANG Ting, WANG Lu, SUN Yong-hui, et al
- (1785) Pharmacokinetics of licochalcone A in Beagle dogs
..... YANG Wen-na, ZHAI Ya-nan, SHAO Han-bing, et al
- (1789) Preformulation research on the nasal preparation of mianserin hydrochloride
..... WANG Cai, GU Fu-gen, YANG Lei
- (1795) Anti-inflammation effect of the extract of a Zhuang medicine *Ventilago leiocarpa* and its related mechanism
..... CHEN Xiao-jun, HUA Quan-dong, NONG Yun-kai, et al
- (1801) Practice and contemplation in target drug delivery design based on the meridian guide theory of traditional Chinese medicine
..... ZHAO Rui-zhi, ZHAO Ya, LIU Li-juan, et al
- (1807) Effect of the aqueous extract from Vinegar-baked Radix Bupleuri on the uptake of substrates by regulating various drug transporters in cells
..... FENG Li-min, ZHANG Xian, ZHAO Rui-zhi
- (1812) Different parts of Vinegar-baked Bupleuri Radix water extract affect the distribution of rhein and hepatic nuclear factor 1/4 α by single administration
..... ZHAO Ya, WANG Jin-qiu, LIU Li-juan, et al
- (1817) Current situation and reflection on the development of new traditional Chinese medicine
..... BAI Jie, MA Ke, XIE Liu-na, et al
- (1822) Baloxavir marboxil: the first anti-influenza drug targeting Cap-dependent endonuclease
..... ZHOU Shu-han, HU Chang-ping, LUO Ping
- (1831) Research progress in clinical application of a novel calcineurin inhibitor: voclosporin
..... DENG Wei-ping, HU Chang-ping, LUO Ping
- (1838) Research progress in the role of regulated cell death in myocardial ischemia-reperfusion injury
..... ZHANG Si-qi, GUO Chao-rui, DONG Zhi-qiang, et al
- (1845) Antitumor mechanisms and application prospects of sanguinarine in cancer treatment
..... RAN Yao, LENG Hong-xu, ZHENG Kai-fan, et al
- (1851) Research progress in functionalized nanodiamond-related drug delivery for antitumor applications
..... ZHANG Dan-hong
- (1856) Biomedical applications of layered double hydroxides delivery system with different metal compositions
..... GENG Ge-xia, LI Li-ping, WANG Yao-yao, et al
- (1864) Research progress in the mechanism of traditional Chinese medicine and natural products for hyperuricemia and gout
..... LI Ge, CAO Hui-ya, YAN Si-ya, et al
- (1872) Research advance in oncolytic viruses as anticancer agents for hepatocellular carcinoma
..... LIU Ying-feng, SONG Ya-gang, MIAO Ming-san
- (1877) A new type of antibody drug conjugate targeting HER2 therapy for breast cancer: T-DM1 and T-DXd
..... HE Ming-xing, ZHANG Lu, TAN Yan
- (1883) Determination of cinnabar in Xiangsu Zhengwei pills by ICP-MS
..... GAO Li-jin, LI Jie, ZHANG Lin, et al
- (1886) Determination of 10 residual solvents in ceftriaxone sodium and quality evaluation by direct injection gas chromatography-tandem mass spectrometry
..... LI Rong, WANG Tao, ZHANG Ya-feng, et al

- (1892) Content determination of active ingredients in Jinlianhua soft capsules by HPLC LIN Feng-ping, WENG Jia, LI Shi-ming, et al
- (1895) Determination and preliminary risk assessment of 4 polycyclic aromatic hydrocarbons in Gardeniae Fructus Praeparatus WANG Wen-ting, GUO Ya, YANG Wen-wu, et al
- (1899) Determination of related substances in tegoprazan by HPLC ZHANG Lei, YUAN Yan-fei, LIN Xiao-hui, et al
- (1903) Correlation of characteristic spectrum and quantitative value transfer analysis of Scolopendra and its decoction pieces, standard decoction and formula granules LIANG Su-yi, JIANG Bin, CAI Xiao-bing, et al
- (1909) Establishment of drug use evaluation criteria for tofacitinib tablets and application CAO Di, CHENG Jun, ZHANG Shi-yang, et al
- (1915) Retrospective study on the effect of anxiety or depression on the quality of warfarin anticoagulation after heart valve surgery SHI Jin-ping, TANG Ya-juan, ZHANG Yan, et al
- (1919) Key points in pharmaceutical care of Chinese patent medicines containing toxic animal drugs in *China Pharmacopoeia* (2020 Edition, Vol. 1) TANG He, JU Xiao-yu, ZHAO Qian, et al
- (1924) Pharmacoeconomic evaluation of postoperative analgesia in patients undergoing radical gastrectomy with dezocine or pentazocine WU Ting-qing, XIAO Yang, NIU Lu-lu, et al
- (1929) Adverse reactions of Jinlian Qingre preparations in different age groups ZHANG Shu, LIN Yi-min, ZHANG Ling-ping, et al
- (1934) Ophthalmic medications in *List of National Essential Medicines* (Version 2012 and 2018) and *WHO Model List of Essential Medicines* (Version 2023) LIU Bo, SONG Qin, WANG Xue, et al
- (1939) Individualized treatment and pharmaceutical care for a patient with decompensated liver cirrhosis complicated with pulmonary tuberculosis DENG Zhen-zhen, WU Cui-fang, WANG Sheng-feng
- (1949) Pharmaceutical practice in the diagnosis and treatment of adrenal insufficiency secondary to immune-related hypophysitis ZHOU Yu-bing, ZHANG Ai-ling, ZHANG Wen-da, et al
- (1953) Individualized antithrombotic therapy for a child suffering from fulminant myocarditis with arterial thrombosis secondary to extracorporeal membrane oxygenation combined with continuous renal replacement therapy GAO Nian-ting, WANG Xin-yi, LI Bo-xia
- (1957) Application of contamination control strategy in parametric release for sterile drugs TANG Ping, JIANG Fu-rong, CHEN Chao, et al

研究论文

蒙自藜芦中的甾体生物碱及抗炎活性研究

高文分¹, 马金蓉², 刘继华¹, 晏润文¹, 钱敏², 卢富庆², 袁文娟^{2*} (1. 云南省食品药品监督检验研究院 工业和信息化部产业技术基础公共服务平台, 昆明 650106; 2. 云南农业大学理学院, 昆明 650201)

摘要: 目的 研究云南药用披麻草植物资源蒙自藜芦中的甾体生物碱成分及其抗炎活性。方法 采用硅胶柱色谱法、反相柱色谱法、凝胶柱色谱法和高效液相色谱法 (HPLC) 制备等多种分离手段对蒙自藜芦根和根茎的乙醇提取部分进行分离, 根据波谱数据确定所分离得到的甾体生物碱类化合物的结构, 对这些化合物进行抗炎活性初步研究。结果 从蒙自藜芦中分离出了 8 个甾体生物碱, 并通过波谱学数据和理化性质分别鉴定为 3-当归酰基棋盘花胺 (1)、3-藜芦酰基计明碱 (2)、介芬胺 (3)、藜芦嗪 (4)、vermitaline (5)、3-当归酰基棋盘花胺- β -N-氧化物 (6)、环杷明 (7)、藜芦胺 (8)。化合物 2、4、7 为首次从该植物中分离得到。其中, 化合物 8 对脂多糖 (LPS) 诱导的一氧化氮产生有明显的抑制作用, 在 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时一氧化氮生成抑制率为 $(47.01 \pm 0.41)\%$, 且能够降低炎症因子环氧合酶 (COX-2) 和诱导型-氧化氮合酶 (iNOS) 的蛋白表达水平, 并呈剂量依赖性。结论 本研究可为蒙自藜芦的抗炎活性物质基础及开发利用提供科学依据。

关键词: 蒙自藜芦; 藜芦属; 甾体生物碱; 核磁共振波谱; 抗炎活性; 化学成分

中图分类号: R289, R285 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)07-1685-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.001

Steroid alkaloids in *Veratrum mengtzeanum* Loes. and their anti-inflammation activity

GAO Wen-fen¹, MA Jin-rong², LIU Ji-hua¹, YAN Run-wen¹, QIAN Min², LU Fu-qing², YUAN Wen-juan^{2*} (1. Public Service Platform for Industrial Technology Foundation of the Ministry of Industry and Information Technology, Yunnan Institute for Food and Drug Control, Kunming 650106; 2. College of Science, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201)

Abstract: Objective To determine the steroid alkaloids and their anti-inflammation activity in *Veratrum mengtzeanum* Loes., a medicinal herb in Yunnan. **Methods** Column chromatography, reverse phase chromatography, gel chromatography and other separation methods were used to separate and purify the ethanol extract from the roots of *Veratrum mengtzeanum* Loes.. The chemical structures of these alkaloids were determined by spectroscopic data and physical and chemical properties, and their anti-inflammation activity was measured. **Results** Totally 8 steroid alkaloids, including 3-angeloylzygadenine (1), 3-veratroylgemine (2), jervine (3), verazine (4), vermitaline (5), 3-angeloylzygadenine- β -N-oxide (6), cyclopamine (7), and veratramine (8), were isolated and identified from the roots of *Veratrum mengtzeanum* Loes. Compounds 2, 4, and 7 were extracted from this plant for the first time. Notably, compound 8 exhibited obvious inhibition on the production of nitric oxide induced by lipopolysaccharide. At $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, the inhibition rate of nitric oxide

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.32060084); 云南省农业基础研究联合专项重点项目 (No. 202301BD070001-025); 国家大学生创新创业训练计划支持项目 (No. 202210676023, No. 202210676105)。

作者简介: 高文分, 男, 副主任药师, 主要从事中药、化学药品、化妆品质量控制研究, email: 99288342@qq.com *通信作者: 袁文娟, 女, 副教授, 主要从事药用植物化学及生物活性研究, email: 1435648569@qq.com

production was (47.01±0.41)%. Moreover, it effectively reduced the protein expression levels of inflammation factors COX-2 and iNOS in a dose-dependent manner. **Conclusion** This study provides substance basis for the anti-inflammation and utilization of *Veratrum mengtzeanum* Loes..

Key words: *Veratrum mengtzeanum* Loes.; *Veratrum*; steroid alkaloid; NMR; anti-inflammatory; chemical constituent

炎症是由机体内各种免疫细胞应对外界刺激产生的一种自我防御和保护反应^[1]。巨噬细胞能够激活核转录因子- κ B 分泌多种生物活性因子,包括促炎因子如诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和环氧合酶 2(COX-2)、一氧化氮(NO)等^[2],在调节炎症的过程中起到关键作用^[3-4]。然而,巨噬细胞过度活化,也会导致各种炎症相关的急性和慢性疾病,如关节炎、结肠炎、癌症、糖尿病和阿尔茨海默病等^[5]。因此,靶向巨噬细胞是治疗炎症相关疾病的重要策略。天然产物是药物开发的重要源泉,生物碱是具有广泛生物活性的一类植物次生代谢产物,被认为是治疗炎症的潜在先导化合物^[6]。

蒙自藜芦为百合科(Liliaceae)藜芦属(*Veratrum*)多年生草本植物,主要分布于云南、四川、山东、吉林、湖北、辽宁等地区^[7-8]。蒙自藜芦是药用披麻草的基原植物之一^[9-10],民间常用于通经活络,治疗风湿性疼痛、伤口止血,在临床上主治跌打损伤、骨折、创伤出血等^[11-14],是“云南白药”和中药保护品种“一粒止痛丸”^[15-16]的主药,有止血散瘀、镇痛消肿、开窍、祛痰的功效^[17]。现代研究表明,藜芦的主要成分有甾体生物碱、黄酮和二苯乙烯等^[18],其中甾体生物碱是藜芦中抗炎镇痛的主要活性物质基础,具有消炎止痛、抗肿瘤、降高血压、抗血栓等多种药理活性功能^[19-20]。

目前,蒙自藜芦中甾体生物碱成分研究较少,为更好地开发利用这一特色药用披麻草植物资源,进一步阐明蒙自藜芦的抗炎物质基础,本课题组对云南特色植物资源蒙自藜芦开展甾体生物碱成分研究,从其根中分离出 8 个甾体生物碱。对分离得到的甾体生物碱,通过脂多糖(LPS)刺激后对 NO 释放的抗炎活性初步测定,并通过 Western blot 法检测活性化合物 8 作用于 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞后 iNOS 和 COX-2 蛋白的表达,为蒙自藜芦的开发与利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Agilent (6540) 型 Q-TOF 质谱仪、Agilent 1260 高效液相色谱仪(Agilent 公司); AVANCE III-500、600 和 800 型 NMR 仪(Bruker 公司); OSAKA SODA TYPE MG (4.6 nm×250 nm)(OSAKA SODA 公司); SQP 千分之一电子天平(赛多利斯科学仪器); DHP-9272 电热恒温培养箱(一恒科学仪器有限公司); FlexStation 3 多功能酶标仪工作站(Molecular Devices 公司); FST-III-80 普利菲尔超纯水机(富诗特仪器设备公司); DYY-6D 电泳仪(六一仪器厂)。葡聚糖凝胶柱 Sephadex LH-20 (40~70 μ m, Amersham Pharmacia Biotech AB); 反相 RP-18 (40~63 μ m, 德国 Merck 公司); 甲醇和乙腈为 HPLC 级(北京迈瑞达科技); 其他试剂均为市售分析纯。高糖培养基(DMEM)、胎牛血清(FBS)和青霉素-链霉素(BI 公司); LPS(大肠埃希菌 O55:B5)(皓元生物医药科技有限公司); 二甲基亚砜(DMSO, VWR LIFE SCIENCE); 胰蛋白酶-EDTA 消化液、PBS 缓冲液、RIPA 裂解液(索莱宝生物科技有限公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(酷来搏科技有限公司); Griess 试剂、阳性对照药物左旋精氨酸(L-NMMA)(Sigma 公司); iNOS 兔多抗和 COX2/PTGS2 兔单抗(Abclonal 公司)。RAW 264.7 细胞(中科院上海细胞库)。

1.2 植物材料

蒙自藜芦原材料于 2020 年 11 月采自云南省红河哈尼族彝族自治州个旧市,由云南中医药大学李国栋副教授鉴定为蒙自藜芦(*Veratrum mengtzeanum* Loes.)的根及根茎。标本凭证(20200012)存于云南农业大学理学院。

1.3 提取分离

蒙自藜芦干燥的根及根茎 20 kg,粉碎,甲醇提取后浓缩,用 2 倍量的乙酸乙酯萃取,得提取物(600 g)。采用大孔树脂分离(石油醚-乙酸乙酯=50:1、20:1、10:1、5:1、2:1、1:1、0:1)梯度洗脱,TLC 检测将呈现橘红的部分合并浓缩(约 80 g),再用反相硅胶柱色谱(RP-18)分离,以甲醇-水(50:50、70:30、80:20、90:10、100:0)洗脱后,TLC 检测划分为 7 个段。

第 2 段(约 200 mg)用 Sephadex LH-20 葡聚

糖凝胶柱色谱 (2.0 cm×180 cm, 40~70 μm) 分离, 经甲醇洗脱后分成 3 个组分。组分 1 (约 50 mg) 用高效液相色谱纯化, 以乙腈-0.03% 三乙胺 (75:25) 洗脱, 得化合物 1 (6 mg) 及 2 (5 mg)。组分 2 (约 40 mg) 用高效液相色谱分离, 以乙腈-0.03% 三乙胺 (80:20) 洗脱, 得化合物 3 (3 mg)。第 3 段 (约 500 mg) 用 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱色谱 (2.0 cm×180 cm, 40~70 μm) 分离, 经甲醇洗脱, 分为 3 个组分。组分 1 (约 230 mg) 用硅胶色谱以石油醚-乙酸乙酯 (15:1) 洗脱, 得化合物 4 (10 mg)。组分 2 (约 56 mg) 用高效液相色谱经乙腈-0.03% 三乙胺 (80:20) 纯化, 得化合物 5 (3 mg)。第 4 段 (约 550 mg) 用 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱 (2.0 cm×180 cm, 40~70 μm) 分离, 经甲醇洗脱, 分为 5 个组分。组分 1 (约 220 mg) 用硅胶色谱以石油醚-乙酸乙酯 (15:1) 洗脱, 得化合物 6 (12 mg)。第 5 段 (约 590 mg) 用 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱 (2.0 cm×180 cm, 40~70 μm) 分离, 经甲醇洗脱, 分为 4 个组分。组分 1 (约 80 mg) 用硅胶色谱以氯仿-甲醇 (25:1) 洗脱, 得流份 1 (约 35 mg), 再用高效液相色谱经乙腈-0.03% 三乙胺 (85:15) 纯化, 得化合物 7 (2 mg)。组分 2 (约 85 mg) 用硅胶色谱以氯仿-甲醇 (20:1) 洗脱得流份 1 (约 40 mg), 再用高效液相色谱经乙腈-0.03% 三乙胺 (80:20) 纯化, 得化合物 8 (4 mg)。

1.4 细胞培养

RAW 264.7 (小鼠巨噬细胞) 培养在含 10%FBS、1% 抗生素 (100 U·mL⁻¹ 青霉素和 100 μg·L⁻¹ 链霉素) 的 DMEM 培养基中, 在 37℃ 含 5%CO₂ 加湿培养基箱中孵育。

1.5 细胞毒活性实验 (MTT 法)

采用 MTT 法对 8 个化合物的细胞毒性进行评估^[21]。取 RAW 264.7 细胞, 以 1×10⁴/孔的初始密度接种于 96 孔板培养 24 h, 用 50 μmol·L⁻¹ 的化合物 1~8 先处理细胞 2 h, 再用 1 μg·mL⁻¹ LPS 共处理 18 h, 加入 5 mg·mL⁻¹ MTT 在 37℃ 下培养 4 h。弃去培养基, 每孔加 150 μL DMSO 将甲瓩充分溶解, 在 492 nm 波长下测定吸光度值。以磷酸盐缓冲液 (PBS) 为空白, 不作任何处理的 RAW 264.7 细胞作对照, 由公式 (1) 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{OD_{492} - OD_{492}^{\text{blank}}}{OD_{492}^{\text{control}} - OD_{492}^{\text{blank}}} \times 100\% \quad (1)$$

1.6 抑制 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 释放 NO 的活性筛选

用 Griess 试剂测量 NO 浓度^[22]。L-NMMA 作为阳性对照。按 1×10⁴ 个/孔细胞密度接种于 96 孔板中培养 24 h, 在含或不指定浓度 (50 μmol·L⁻¹) 的化合物 1~8 中培养 2 h, 用 LPS (1 μg·mL⁻¹) 共处理 18 h。取 100 μL 含不同化合物的细胞上清液与 100 μL Griess 试剂混合处理。在 570 nm 波长下测定 NO 含量, 并与亚硝酸钠标准校准曲线进行比较。由公式 (2) 计算 NO 生成抑制率。

$$\text{NO 生成抑制率}(\%) = \frac{OD_{570} - OD_{570}^{\text{blank}}}{OD_{570}^{\text{control}} - OD_{570}^{\text{blank}}} \times 100\% \quad (2)$$

1.7 Western blot 法检测活性化合物 8 作用于 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞后对 iNOS 和 COX-2 蛋白的表达

参照 Wang 等^[23]的方法, RAW264.7 细胞接种至大皿, 加入化合物 8 (浓度分别为 2.5、5、10、20、30 μmol·L⁻¹), 设置不含药组 (空白组) 和模型对照组 (LPS, 1 μg·mL⁻¹), 2 h 后用 1 μg·mL⁻¹ LPS 刺激, 共同孵育 18 h, 再用冰的 PBS 冲洗两次, 加入含 1 mmol·L⁻¹ 苯甲基磺酰氟 (PMSF) 的 RIPA 裂解缓冲液后, 立即放在冰上裂解, 30 min 后, 用干净的枪头刮取蛋白, 在 4℃ 离心机中以 1500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液, 用以检测 COX-2 和 iNOS 的蛋白表达情况。

用 BCA 测定法对不同浓度化合物 8 的蛋白浓度定量, 将 35 μg 总蛋白质通过 10%SDS-PAGE 分离并转到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上用于蛋白免疫印迹分析。PVDF 膜在室温下 5% 脱脂奶粉中封闭 2 h, 再用含吐温 20 的 Tris 缓冲盐溶液 (TBST) 洗涤, 铺上一抗在 4℃ 下孵育过夜。24 h 后洗膜, 并在室温下与相应的 HRP 缀合的二抗体结合 2 h, 用 TBST 洗 3 次, 最后用增强的化学发光底物显色并曝光以捕获图像。通过 Image J 可视化免疫反应性条带的密度, 并归一化为 β-tublin。

2 结果

2.1 结构鉴定

化合物 1: 白色无定形粉末, $[\alpha]_D^{20}$: -35.0 (c 0.06, MeOH); 分子式 C₃₂H₄₉NO₈, ESI-MS m/z : 576 [M + H]⁺; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 6.14 (1H, qt, $J = 7.3, 1.5$ Hz, H-3'), 5.00 (1H, d, $J = 4.3$ Hz, H-3), 4.39 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-16), 3.74 (1H, d, $J = 3.4$ Hz, H-15), 2.64 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-26), 2.18 (1H, dd, $J = 15.2, 8.6$ Hz, H-11), 1.96 (3H, dd, $J = 7.3, 1.5$ Hz, H-4'), 1.45 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-17),

1.25 (3H, s, H-21), 1.08 (3H, s, H-5'), 1.01 (3H, s, H-19), 0.88 (1H, d, $J=7.1$ Hz, H-27)。 ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 32.7 (C-1), 26.8 (C-2), 75.3 (C-3), 168.9 (C-1'), 104.4 (C-4), 46.5 (C-5), 28.9 (C-6), 29.7 (C-7), 46.3 (C-8), 96.2 (C-9), 43.9 (C-10), 33.2 (C-11), 44.3 (C-12), 34.1 (C-13), 80.9 (C-14), 70.3 (C-15), 69.8 (C-16), 45.3 (C-17), 61.4 (C-18), 19.0 (C-19), 73.3 (C-20), 20.6 (C-21), 70.2 (C-22), 18.4 (C-23), 31.9 (C-24), 27.4 (C-25), 61.6 (C-26), 17.1 (C-27), 127.5 (C-2'), 139.4 (C-3'), 16.0 (C-4'), 21.5 (C-5')。上述数据与文献中^[24]的数据一致, 故确定为 3-当归酰基棋盘花胺。

化合物 2: 白色无定形粉末, $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -33.2 (c 0.1, MeOH); 分子式 $\text{C}_{36}\text{H}_{51}\text{NO}_{11}$, ESI-MS m/z : 674 $[\text{M} + \text{H}]^+$; ^1H NMR (800 MHz, CDCl_3) δ : 7.68 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 7.55 (1H, m, H-2'), 6.89 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-6'), 5.21 (1H, m, H-3), 4.50 (1H, m, H-7), 4.50 (1H, m, H-16), 3.94 (1H, m, H-4'), 3.93 (1H, m, H-3'), 3.63 (1H, m, H-15), 1.25 (3H, m, H-21), 1.10 (3H, s, H-19), 1.08 (1H, d, $J=7.0$ Hz, H-27)。 ^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3) δ : 32.7 (C-1), 26.7 (C-2), 75.2 (C-3), 105.6 (C-4), 47.7 (C-5), 28.9 (C-6), 67.4 (C-7), 46.4 (C-8), 93.9 (C-9), 44.0 (C-10), 33.1 (C-11), 44.6 (C-12), 33.7 (C-13), 82.9 (C-14), 70.0 (C-15), 69.6 (C-16), 45.6 (C-17), 61.3 (C-18), 19.9 (C-19), 73.2 (C-20), 19.3 (C-21), 73.1 (C-22), 18.4 (C-23), 29.7 (C-24), 27.4 (C-25), 61.4 (C-26), 17.1 (C-27), 166.8 (C = O-1'), 122.4 (C-1'), 112.3 (C-2'), 148.7 (C-3'), 153.4 (C-4'), 110.2 (C-5'), 123.7 (C-6')。上述数据均与文献中^[25]的数据一致, 故确定为 3-藜芦酰基计明碱。

化合物 3: 白色无定形粉末, $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -147 (c 0.1, MeOH); 分子式 $\text{C}_{27}\text{H}_{39}\text{NO}_3$, ESI-MS m/z : 426 $[\text{M} + \text{H}]^+$; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 5.38 (1H, d, $J=5.5$ Hz, H-6), 3.30 (1H, td, $J=10.4, 9.8, 4.0$ Hz, H-23), 3.08 (1H, dd, $J=12.2, 4.0$ Hz, H-26), 2.72 (1H, d, $J=9.2$ Hz, H-22), 2.17, 2.36 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-4), 2.17 (3H, brs, H-18), 1.01 (3H, s, H-19), 0.95 (3H, t, $J=6.6$ Hz, H-21), 0.93 (3H, d, $J=6.6$ Hz, H-27)。 ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 36.8 (C-1), 31.0 (C-2), 71.7 (C-3), 41.4

(C-4), 142.3 (C-5), 121.0 (C-6), 37.0 (C-7), 40.4 (C-8), 62.5 (C-9), 31.6 (C-10), 206.9 (C-11), 137.2 (C-12), 145.8 (C-13), 44.9 (C-14), 24.1 (C-15), 31.2 (C-16), 85.5 (C-17), 12.1 (C-18), 18.5 (C-19), 40.4 (C-20), 10.8 (C-21), 66.6 (C-22), 76.4 (C-23), 38.9 (C-24), 31.6 (C-25), 54.7 (C-26), 18.9 (C-27)。上述数据与文献中^[26]的数据一致, 故确定为介芬胺。

化合物 4: 白色无定形粉末, $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -47.2 (c 0.1, MeOH); 分子式 $\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{NO}$, ESI-MS m/z : 398 $[\text{M} + \text{H}]^+$; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 3.51 (1H, td, $J=10.1, 5.1$ Hz, H-3), 1.36 (3H, m, H-18), 1.06 (3H, m, H-19), 0.93 (3H, m, H-27)。 ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 37.3 (C-1), 32.0 (C-2), 71.8 (C-3), 42.3 (C-4), 140.8 (C-5), 121.7 (C-6), 31.0 (C-7), 31.4 (C-8), 44.7 (C-9), 36.6 (C-10), 31.7 (C-11), 29.7 (C-12), 46.4 (C-13), 50.2 (C-14), 23.4 (C-15), 29.2 (C-16), 44.5 (C-17), 14.1 (C-18), 19.4 (C-19), 43.9 (C-20), 19.2 (C-21), 177.2 (C-22), 29.4 (C-23), 29.2 (C-24), 27.2 (C-25), 57.7 (C-26), 18.2 (C-27)。上述数据均与文献中^[27]的数据一致, 故确定为藜芦嗪。

化合物 5: 白色无定形粉末, $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -45.5 (c 0.1, MeOH); 分子式 $\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{NO}_2$, ESI-MS m/z : 414 $[\text{M} + \text{H}]^+$; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 3.64 (1H, d, $J=11.6$ Hz, H-26), 3.19 (1H, d, $J=1.6$ Hz, H-16), 1.01 (3H, s, H-19), 0.96 (1H, d, $J=9.2$ Hz, H-21), 0.93 (3H, d, $J=6.4$ Hz, H-27), 0.84 (3H, s, H-18)。 ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 37.2 (C-1), 32.8 (C-2), 71.4 (C-3), 42.3 (C-4), 140.8 (C-5), 121.4 (C-6), 31.0 (C-7), 31.4 (C-8), 44.7 (C-9), 36.7 (C-10), 29.7 (C-11), 29.7 (C-12), 46.4 (C-13), 50.1 (C-14), 23.4 (C-15), 71.7 (C-16), 44.5 (C-17), 14.1 (C-18), 19.4 (C-19), 43.1 (C-20), 19.4 (C-21), 174.9 (C-22), 29.4 (C-23), 29.2 (C-24), 27.2 (C-25), 56.0 (C-26), 15.9 (C-27)。上述数据与文献中^[28]的数据一致, 故确定为 verminaline。

化合物 6: 白色无定形粉末, $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -15.5 (c 0.1, MeOH); 分子式 $\text{C}_{32}\text{H}_{49}\text{NO}_9$, ESI-MS m/z : 592 $[\text{M} + \text{H}]^+$; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 6.12 (1H, q, $J=7.3$ Hz, H-3'), 5.00 (1H, d, $J=4.9$ Hz, H-3), 4.78 (1H, s, H-16), 3.76 (1H, d, $J=3.4$ Hz, H-15), 2.74 (1H, d, $J=$

7.4 Hz, H-26), 2.19, 2.50 (1H, d, $J = 11.6$ Hz, H-11), 2.16 (1H, m, H-5), 1.98 (3H, m, H-4'), 1.88 (3H, s, H-5'), 1.27 (3H, s, H-21), 1.25 (3H, m, H-27), 1.00 (3H, s, H-19)。 ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 32.6 (C-1), 26.9 (C-2), 75.2 (C-3), 104.7 (C-4), 46.5 (C-5), 28.7 (C-6), 29.4 (C-7), 44.6 (C-8), 96.2 (C-9), 45.9 (C-10), 33.0 (C-11), 43.7 (C-12), 29.9 (C-13), 80.9 (C-14), 70.0 (C-15), 69.8 (C-16), 43.9 (C-17), 73.0 (C-18), 19.4 (C-19), 74.2 (C-20), 22.6 (C-21), 73.3 (C-22), 18.9 (C-23), 29.8 (C-24), 27.6 (C-25), 72.3 (C-26), 18.8 (C-27), 168.7 (C-1'), 127.5 (C-2'), 139.3 (C-3'), 16.0 (C-4'), 20.6 (C-5')。上述数据与文献中^[29]的数据一致, 故确定为 3-当归酰基棋盘花胺- β - N -氧化物。

化合物 7: 白色无定形粉末, $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -35.7 (c 0.1, MeOH); 分子式 $\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{NO}_2$, ESI-MS m/z : 412 $[\text{M} + \text{H}]^+$; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 5.37 (1H, t, $J = 2.4, 5.3$ Hz, H-6), 3.22 (1H, td, $J = 3.9, 9.9, 13.8$ Hz, H-23), 2.29, 3.07 (1H, dd, $J = 12.6, 4.4$ Hz, H-26), 2.66 (1H, t, $J = 8.8, 18.3$ Hz, H-22), 1.65 (3H, brs, H-18), 0.95 (3H, m, H-19), 0.93 (3H, m, H-21), 0.92 (3H, m, H-27)。 ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 38.2 (C-1), 31.4 (C-2), 71.8 (C-3), 41.5 (C-4),

141.6 (C-5), 126.7 (C-6), 31.1 (C-7), 39.7 (C-8), 52.0 (C-9), 36.5 (C-10), 28.9 (C-11), 142.8 (C-12), 121.9 (C-13), 41.8 (C-14), 24.5 (C-15), 32.0 (C-16), 85.4 (C-17), 13.1 (C-18), 18.7 (C-19), 49.3 (C-20), 10.7 (C-21), 66.3 (C-22), 75.5 (C-23), 39.2 (C-24), 31.7 (C-25), 54.8 (C-26), 18.9 (C-27)。上述数据均与文献中^[30]的数据一致, 故确定为环杷明。

化合物 8: 白色无定形粉末, $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: -55.9 (c 0.5, CHCl_3); 分子式 $\text{C}_{27}\text{H}_{39}\text{NO}_2$, ESI-MS m/z : 410 $[\text{M} + \text{H}]^+$; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.22 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-16), 6.97 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-15), 5.49 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, H-6), 2.30 (3H, brs, H-18), 1.39 (3H, d, $J = 7.3$ Hz, H-21), 1.45 (3H, s, H-19), 0.82 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-27)。 ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 36.9 (C-1), 31.3 (C-2), 71.8 (C-3), 41.2 (C-4), 143.0 (C-5), 122.0 (C-6), 30.4 (C-7), 41.9 (C-8), 56.9 (C-9), 36.1 (C-10), 30.5 (C-11), 140.3 (C-12), 132.7 (C-13), 143.9 (C-14), 119.9 (C-15), 125.3 (C-16), 142.4 (C-17), 15.8 (C-18), 18.8 (C-19), 38.0 (C-20), 19.4 (C-21), 67.0 (C-22), 70.9 (C-23), 44.1 (C-24), 32.2 (C-25), 54.0 (C-26), 19.3 (C-27)。上述数据与文献中^[31]的数据一致, 故确定为藜芦胺。

化合物 1 ~ 8 的结构见图 1。

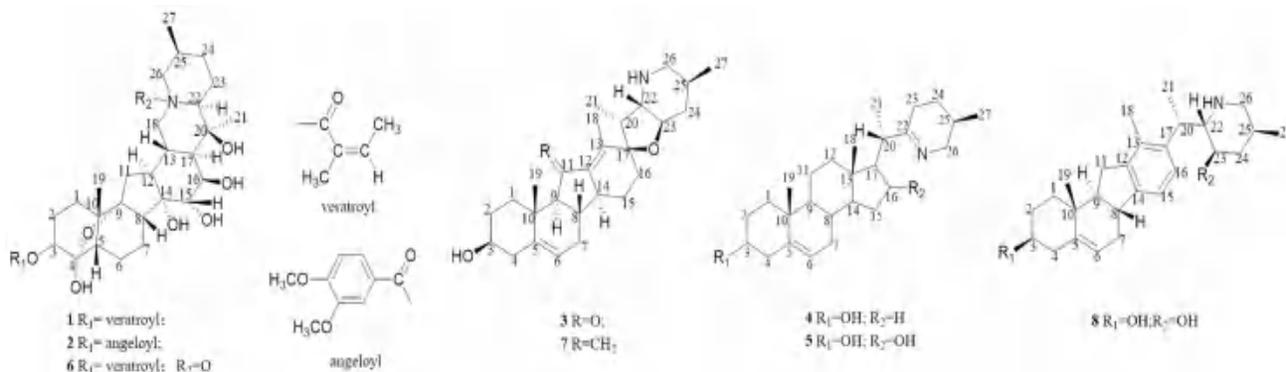


图 1 化合物 1 ~ 8 的骨架类型及结构

Fig 1 Skeleton types and structures of compounds 1 ~ 8

2.2 细胞毒活性初步评价

MTT 法结果显示化合物 1 ~ 8 在 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 对 RAW 264.7 细胞的存活率都在 90% 以上 (见表 1)。因此选择 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度进行抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞释放 NO 的活性筛选实验。

2.3 化合物 8 对 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 释放 NO 的影响

化合物 1 ~ 8 对 NO 生成抑制活性结果见表 2。化合物 8 与阳性药比较, 其 NO 生成抑制率的值接近阳性药, 结果表明化合物 8 在 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时有一定抑制作用。

2.4 化合物 8 对 LPS 诱导的 iNOS 和 COX-2 蛋白表达的影响

iNOS 和 COX-2 是负责产生 NO 的限速酶, 其

表 1 化合物 1 ~ 8 在 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时的细胞存活率

Tab 1 Cell survival of compound 1 ~ 8 at 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	浓度	细胞存活率 / %
空白对照		100.34 ± 1.65*
模型	1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	100.62 ± 1.47*
化合物 1	50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	97.56 ± 1.20*
化合物 2	50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	99.71 ± 3.61*
化合物 3	50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	98.23 ± 1.98*
化合物 4	50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	95.94 ± 0.33*
化合物 5	50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	103.01 ± 3.01*
化合物 6	50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	97.35 ± 2.94*
化合物 7	50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	96.08 ± 1.31*
化合物 8	50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	94.96 ± 2.19*

注: 与空白对照组相比, * $P < 0.05$ 。

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

表 2 化合物 1 ~ 8 对一氧化氮生成抑制率

Tab 2 Inhibition rate of compounds 1 ~ 8 on nitric oxide

化合物	浓度 / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	NO 生成抑制率 / %
L-NMMA	50	56.98 ± 0.90*
化合物 1	50	7.37 ± 0.62*
化合物 2	50	-1.09 ± 1.39*
化合物 3	50	-0.05 ± 1.20*
化合物 4	50	32.93 ± 0.89*
化合物 5	50	6.26 ± 2.05*
化合物 6	50	4.18 ± 1.69*
化合物 7	50	21.94 ± 2.05*
化合物 8	50	47.01 ± 0.41*

注: 与阳性药 L-NMMA 相比, * $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the positive drug L-NMMA, * $P < 0.05$.

通过增强血管通透性和诱导组织损伤因而对炎性疾病的发展至关重要。因此, iNOS 和 COX-2 是治疗炎性疾病的有价值的靶标^[32-33]。在 LPS 激活的 RAW264.7 细胞中, iNOS 和 COX-2 显著升高, 化合物 8 显著抑制 LPS 诱导的 iNOS 和 COX-2 的蛋白表达 (见图 2)。

3 结论

本研究从蒙自藜芦中分离得到 8 个甾体生物碱, 分别为 3-当归酰基棋盘花胺 (1)、3-藜芦酰基计明碱 (2)、介芬胺 (3)、藜芦嗪 (4)、vermitaline (5)、3-当归酰基棋盘花胺 β -N-氧化物 (6)、环杷明 (7)、藜芦胺 (8), 其中化合物 1、2、6 属于西藜芦碱型, 化合物 3、7、8 属于介藜芦胺类, 化合物 4、5 属于维藜芦碱型, 此外化合物 2、4、7 首次从该植物中分离得到。目前从藜芦属植物分离出的甾体生物碱大致可分为 5 种类型, 其中分离得到最多的为西藜芦碱型, 其次是维藜芦碱型、介藜芦碱型、藜芦胺型, 最少的是茄次碱型^[34]。

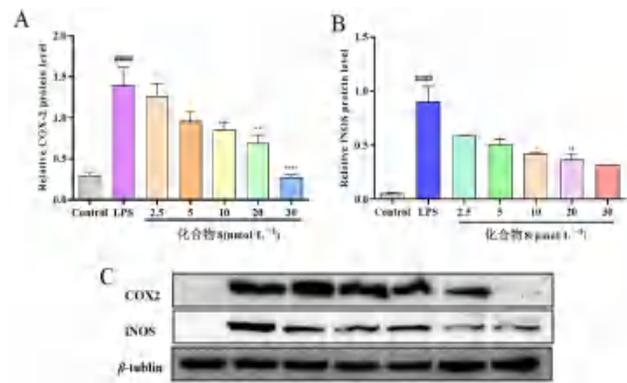


图 2 化合物 8 对 COX-2 和 iNOS 蛋白表达的影响

Fig 2 Protein expression of compound 8 on COX-2 and iNOS at different concentrations

注: 与空白对照组比较, #### $P < 0.0001$; 与模型对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ 。

Note: Compared with the blank control group, #### $P < 0.0001$; compared with the model control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$.

目前以 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞模型, 广泛用于体外的抗炎实验中^[20]。RAW 264.7 细胞经 LPS 刺激后产生炎症, 促使 COX-2、iNOS 表达。而 NO 由 iNOS 合成, 因此 NO 的释放与 iNOS 的表达密切相关^[31-32]。本研究通过建立 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症模型来评价蒙自藜芦中的生物碱体外抗炎活性。首先通过细胞活力测定, 筛选化合物对 RAW 264.7 细胞无毒性的浓度, 并用细胞上清液测定 NO 生成抑制率, 发现化合物 8 在 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时具有明显抗炎活性, 其 NO 生成抑制率为 (47.01 ± 0.41)%, 接近阳性药 (56.98 ± 0.90)%。因此, 选用化合物 8 对 iNOS 和 COX-2 的蛋白表达情况来评价抗炎活性, RAW 264.7 细胞经 LPS 刺激后炎症因子 iNOS 和 COX-2 显著上调, 经化合物 8 处理后, 由 LPS 诱导产生的 iNOS 和 COX-2 过度分泌被明显抑制。结果表明, 化合物 8 对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞炎症模型中 NO 生成、iNOS 和 COX-2 蛋白表达均具有一定的抑制作用, 可能成为治疗炎症的先导化合物, 为蒙自藜芦的开发和利用提供科学依据。

参考文献

- [1] Barton GM. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system [J]. J Clin Invest, 2008, 118 (2): 413-420.
- [2] Mosser DM. The many faces of macrophage activation [J]. J Mol Cell Biol, 2003, 73 (2): 209-212.
- [3] Yoon HJ, Moon ME, Park HS, et al. Chitosan oligosaccharide (COS) inhibits LPS-induced inflammatory effects in RAW 264.7 macrophage cells [J]. Biochem Bioph Res

- Co, 2007, 358 (3): 954-959.
- [4] Yun KJ, Kim JY, Kim JB, et al. Inhibition of LPS-induced NO and PGE2 production by asiatic acid via NF- κ B inactivation in RAW 264.7 macrophages: possible involvement of the IKK and MAPK pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2008, 8 (3): 431-441.
- [5] Tabas I, Glass CK. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities [J]. *Science*, 2013, 339 (6116): 166-172.
- [6] Bai RR, Yao CS, Zhong ZC, et al. Discovery of natural anti-inflammatory alkaloids: potential leads for the drug discovery for the treatment of inflammation [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 213: 113165.
- [7] 汤建, 李慧梁, 黄海强, 等. 藜芦属植物化学成分的研究近况 [J]. *药学进展*, 2006, 30 (5): 206-212.
- [8] 戴利民. 尖被藜芦抗肿瘤活性成分的提取及结构修饰 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2009.
- [9] Liu JJ, Han LJ, Li GD, et al. Transcriptome and metabolome profiling of the medicinal plant *Veratrum mengtzeanum* reveal key components of the alkaloid biosynthesis [J]. *Front Genet*, 2023, doi: 10.3389/fgene.2023.1023433.
- [10] 田星, 刘莹莹, 张颖敏, 等. 藜芦属药用植物的叶绿体基因组比较分析和系统发育研究 [J]. *中草药*, 2022, 53 (4): 1127-1137.
- [11] 江苏新医学院. 中药大辞典 (上册) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1977: 1322-1323.
- [12] 黎光南. 云南中药志 [M]. 昆明: 云南科技出版社, 1990: 346-347.
- [13] Chinese Herbal Dictionary (2006). Nanjing university of traditional chinese medicine. Dictionary of traditional chinese medicine [M]. 2nd Edn. Shanghai (China): Shanghai Science and Technology Publishing House.
- [14] 杨崇仁, 刘润民, 周俊, 等. 蒙自藜芦的甾体生物碱研究 [J]. *云南植物研究*, 1987, 9 (3): 359-364.
- [15] 尹子丽, 谢晖, 张洁. 披麻草生物学特性初步研究 [J]. *云南中医中药杂志*, 2016, 37 (4): 54-57.
- [16] 徐敦海, 徐雅红. 藜芦属植物化学成分和药理作用 [J]. *国外医药·植物药分册*, 2002, 17 (5): 185.
- [17] 云南省食品药品监督管理局编. 云南省中药材标准 [M]. 昆明: 云南美术出版社, 2005.
- [18] Men WX, Song YY, Bian C, et al. The complete chloroplast genome sequence of *Veratrum nigrum* L [J]. *Mitochondrial DNA B*, 2022, 7 (3): 476-477.
- [19] Li HJ, Jiang Y, Li P. Chemistry, bioactivity and geographical diversity of steroidal alkaloids from the Liliaceae family [J]. *Nat Prod Rep*, 2006, 23 (5): 735-752.
- [20] Lu QW, Wang SY, Yin ZL, et al. Identification of veratrum species in pimacao based on ITS2 sequences and steroidal alkaloids by a pseudo-targeted metabolomics method [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 831562.
- [21] 郑洋滨, 刘宁, 周年, 等. 夏枯草提取物含药血清的体外抗炎活性研究 [J]. *药品评价*, 2023, 20 (3): 269-272.
- [22] 曹凡, 宋忠兴, 陈琳, 等. 金茵利胆胶囊的体外抗炎活性评价及其谱效关系 [J]. *海军军医大学学报*, 2023, 44 (4): 418-426.
- [23] Wang L, Jiang Y, Yaseen A, et al. Steroidal alkaloids from the bulbs of *Fritillaria pallidiflora* Schrenk and their anti-inflammatory activity [J]. *Bioorg Chem*, 2021, 112: 104845.
- [24] Gao LJ, Chen FY, Li XY, et al. Three new alkaloids from *Veratrum grandiflorum* Loes with inhibition activities on Hedgehog pathway [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26 (19): 4735-4738.
- [25] Tang J, Li HL, Shen YH, et al. Four new germine esters from *Veratrum dahuricum* [J]. *Helv Chim Acta*, 2007, 90 (4): 769-775.
- [26] Khanfar MA, El Sayed KA. The *Veratrum* alkaloids jervine, veratramine, and their analogues as prostate cancer migration and proliferation inhibitors: biological evaluation and pharmacophore modeling [J]. *Med Chem Res*, 2013, 22: 4775-4786.
- [27] 王斌. 藜芦的化学成分研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2007.
- [28] 汤建. 兴安藜芦抗肿瘤活性成分的发发现及结构修饰 [D]. 上海: 上海交通大学, 2008.
- [29] Zhou CX, Tanaka J, Cheng CH, et al. Steroidal alkaloids and stilbenoids from *Veratrum taliense* [J]. *Planta Med*, 1999, 65 (5): 480-482.
- [30] Oatis JE, Brunsfeld P, Rushing JW, et al. Isolation, purification, and full NMR assignments of cyclopamine from *Veratrum californicum* [J]. *Chem Cent J*, 2008, 2: 1-6.
- [31] Tezuka Y, Kikuchi T, Zhao W, et al. Two new steroidal alkaloids, 20-isoveratramine and verapatuline, from the roots and rhizomes of *Veratrum patulum* [J]. *J Nat Prod*, 1998, 61 (9): 1078-1081.
- [32] De Cássia da Silveira e Sá R, Andrade LN, de Sousa DP. A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes [J]. *Molecules*, 2013, 18 (1): 1227-1254.
- [33] Moncada S, Bolaños JP. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration [J]. *J Neuro Chem*, 2006, 97 (6): 1676-1689.
- [34] Zhang MZ, Gao LJ, Xu SF, et al. Progress in the study of steroidal alkaloids and their pharmacological activities in *Veratrum* spp [J]. *J Tradit Chin Med*, 2020, 45 (21): 5129-5142.

(收稿日期: 2023-12-05; 修回日期: 2024-01-24)

基于网络药理学从铁死亡途径探究七味参地颗粒治疗慢性肾小球肾炎的作用机制

徐先进¹, 胡文杰², 秦秀娟^{2*} (1. 中国科学技术大学附属第一医院离子医学中心(合肥离子医学中心)药剂科, 合肥 230088; 2. 安徽中医药大学第一附属医院 药学部, 合肥 230031)

摘要: **目的** 基于网络药理学和在体实验从铁死亡途径探究七味参地颗粒治疗慢性肾小球肾炎(CGN)的有效性及作用机制。**方法** 运用 GeneCards、OMIM、DrugBank 数据库筛选 CGN 相关疾病靶点, TCMSP、HERB、BATMAN-TCM 数据库筛选七味参地颗粒有效成分和靶标, FerrDb 数据库筛选铁死亡相关靶点, 利用 Cytoscape 软件构建了活性成分-作用靶点和蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络图, 使用 R 语言进行 GO 富集和 KEGG 通路分析, 采用 AutoDockTools 1.5.7 进行分子对接分析, 采用 Western blot 技术检测 CGN 小鼠肾脏组织中 PPARA、MAPK14、HRAS 和 PTGS2 的表达。**结果** 筛选出 1896 个 CGN 疾病靶点, 564 个铁死亡靶点, 33 种七味参地颗粒药物活性成分, 对应 405 个靶标, 三者交集靶点共 17 个。采用 MCODE, Degree, MCC, DMNC, MNC, EPC, EcCentricity, Closeness, Radiality, BottleNeck 10 种算法筛选出 PPARA、MAPK14、HRAS 及 PTGS2 这 4 个核心靶蛋白, 分子对接结果显示七味参地颗粒药物活性成分与核心靶蛋白均有良好的结合能力, 动物实验结果表明七味参地颗粒可逆转 4 个核心靶蛋白的表达。**结论** 七味参地颗粒可能通过调控 PPARA、MAPK14、HRAS 及 PTGS2 从铁死亡途径发挥治疗 CGN 的作用。

关键词: 七味参地颗粒; 慢性肾小球肾炎; 网络药理学; 铁死亡; 分子对接

中图分类号: R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)07-1692-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.002

Mechanism of Qiwei Shendi granules for chronic glomerulonephritis through ferroptosis pathway based on network pharmacology

XU Xian-jin¹, HU Wen-jie², QIN Xiu-juan^{2*} (1. Department of Pharmacy, Hefei Ion Medical Center, The First Affiliated Hospital of USTC, Division of Life Sciences and Medicine, University of Science and Technology of China, Hefei 230088; 2. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031)

Abstract: Objective To determine the effectiveness and mechanism of Qiwei Shendi granules in the treatment of chronic glomerulonephritis (CGN) via ferroptosis based on network pharmacology. **Methods** GeneCards, OMIM, DrugBank, TCMSP, HERB, BATMAN-TCM and FerrDb databases were screened to obtain CGN-related disease targets, active ingredients and targets of Qiwei Shendi granules and ferroptosis-related targets. Cytoscape software was used to construct network of protein-protein interaction (PPI) and active component-action target. GO enrichment and KEGG pathways were conducted with R language. Molecular docking was performed with AutoDockTools 1.5.7. The expression of PPARA, MAPK14, HRAS and PTGS2 were determined in CGN-mice kidney tissues by Western blot. **Results** Totally 1896 CGN-related disease targets, 564 ferroptosis targets, 33 compounds and 405 targets from Qiwei Shendi granules were screened. Totally 17 intersected targets were obtained, which could be potentially therapeutic targets. Four core targets (PPARA, MAPK14, HRAS and PTGS2) in the network were screened with MCODE, Degree, MCC, DMNC, MNC, EPC,

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (No.82104613)。

作者简介: 徐先进, 男, 主要从事药物制剂方面的研究, email: xianjinxu@163.com * **通信作者:** 秦秀娟, 女, 主管药师, 硕士, 主要从事药物制剂方面的研究, email: qxj0716@163.com

EcCentricity, Closeness, Radiality, and BottleNeck algorithms. All docking results showed that the key ingredients in Qiwei Shendi granules had strong binding activity with the core targets. In addition, the four core protein expression changes were reversed in CGN-mice after the treatment with Qiwei Shendi granules. **Conclusion** Qiwei Shendi granules in regulating CGN via ferroptosis may be related to PPARA, MAPK14, HRAS and PTGS2.

Key words: Qiwei Shendi granule; chronic glomerulonephritis; network pharmacology; ferroptosis; molecular docking

慢性肾小球肾炎 (chronic glomerulonephritis, CGN) 简称慢性肾炎 (chronic nephritis, CN), 以肾小球病变为主要病因, 以蛋白尿、血尿、高血压、水肿为主要病理特征^[1-2]。CGN 发病机制复杂, 目前临床多采用免疫抑制剂及降低尿蛋白类西药, 但存在不良反应较大 (如肝功能损伤、骨质疏松、诱发感染)、价格高等问题^[3]。相较于西药仅针对单一靶点作用, 中药复方具有多成分、多靶点、多通路的特点, 已成为目前治疗 CGN 研究的热点^[4-5]。七味参地颗粒由红参、熟地黄、茯苓、醋五味子、桑螵蛸、炒鸡内金、川芎七味中药组合成方, 是由王亿平教授根据清朝新安医学名医程林删定的《圣济总录纂要·卷十三·虚劳门》中的人参汤化裁而成, 是治疗 CGN 的经典名方, 临床治疗安全、有效^[6-7], 但其具体有效成分及干预 CGN 的作用机制尚不明确。

铁死亡 (ferroptosis) 是由脂质过氧化物 (lipid peroxidation, LPO) 积累导致的具有铁依赖性的一种新的细胞死亡方式, 2012 年 Dixon 等^[8]首次发现并提出铁死亡概念。机体内铁代谢稳态破坏, 胞内游离铁离子 (Fe^{2+}) 含量升高引起的胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平升高, 以及铁介导的 LPO 失调都会造成细胞膜及蛋白质氧化损伤, 最终导致细胞铁死亡^[9-10]。已有研究表明, 铁死亡可通过氧化应激、缺血再灌注、肿瘤免疫逃逸等形式对急性肾损伤、糖尿病肾病、多囊肾病、肾脏恶性肿瘤等疾病的发生发展起到一定作用^[11], 但铁死亡与 CGN 发生发展的相关机制研究甚少, 中药七味参地颗粒能否通过调控铁死亡途径进而干预 CGN 尚不明确。

中药网络药理学技术是通过全面挖掘中药有效成分, 进而获取发挥药理作用的治疗靶点, 用于中药作用及分子机制研究^[12-13]。本研究采用网络药理学技术探究“七味参地颗粒有效成分-靶标-CGN-铁死亡”间的网络关系, 进而阐明七味参地颗粒调控铁死亡途径干预 CGN 的作用机制, 以为临床应用提供新的治疗靶点和新思路。

1 材料

1.1 动物

SPF 级, 6~8 周雄性 ICR 小鼠 30 只, 体重 18~22 g, 购自江苏省南京市浦口区莱芙养殖场, 许可证号: SCXK (苏) 2019-0005。饲养环境条件: 室温 (22±2) °C, 湿度 (55±15) %, 光照与黑暗 12 h/12 h 交替, 本研究经安徽中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批件号: AHUCM-mouse-2022079)。

1.2 试剂与仪器

七味参地颗粒 (安徽中医药大学第一附属医院, 批号: 20230114); 腺嘌呤 (Solarbio, 批号: A8330); ECL 超敏发光试剂盒、预染蛋白 Marker (Thermo, 批号: S1257444、00784045); β -actin、山羊抗小鼠 IgG、山羊抗兔 IgG (Zs-BIO, 批号: 19AW0505、142637、139931); PPARA、HRAS、MAPK14、PTGS2 抗体 (Affinity, 批号: 74f6867、84v2118、10y0837、86f4760); 尿蛋白定量试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 货号: C035-2-1); 比色法铁含量检测试剂盒 (DOJINDO, 货号: I291); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (增强型) (碧云天生物技术有限公司, 货号: P0010)。

2 方法与结果

2.1 “七味参地颗粒有效成分-CGN-铁死亡”靶点基因预测与核心靶点的鉴定

利用 GeneCards、OMIM、DrugBank、FerrDb、TCMSP^[14] 数据库, 筛选条件设置为口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$, 药物相似性 (drug likeness, DL) ≥ 0.18 ^[15], 共得到 1896 个 CGN 靶点, 564 个铁死亡相关靶点, 七味参地颗粒 7 味中药共包含 33 种主要活性成分。将相关靶点信息导入 Venny 2.1.0 取交集^[16], 共获得 17 个共同靶点。用 Cytoscape 3.8.2 软件构建“七味参地颗粒-成分-靶点”网络图, 如图 1 所示。将交集靶点信息输入 String 数据库构建 PPI 蛋白相互作用网络^[17], 采用 MCODE、Degree、MCC、DMNC、MNC、EPC、EcCentricity、Closeness、Radiality、BottleNeck 10 种算法, 除 MCODE 算法外, 其他 9 种算法的结果均取排名前 10 的靶点基因, 取交集, 作为“铁死亡-CGN-七味参地颗粒”的核心靶点, 共筛选出

PPARA、MAPK14、HRAS、PTGS2 这 4 个核心靶点。将核心靶点通过 R 语言的“clusterProfiler”包进行 GO、KEGG 富集分析^[18]，GO 主要富集炎症反应的调节、细胞内运输的调节、MAP 激酶活性的调节

等，如图 2A 所示。KEGG 主要富集 VEGF 信号通路、TNF 信号通路以及 IL-17 信号通路等，如图 2B 所示。

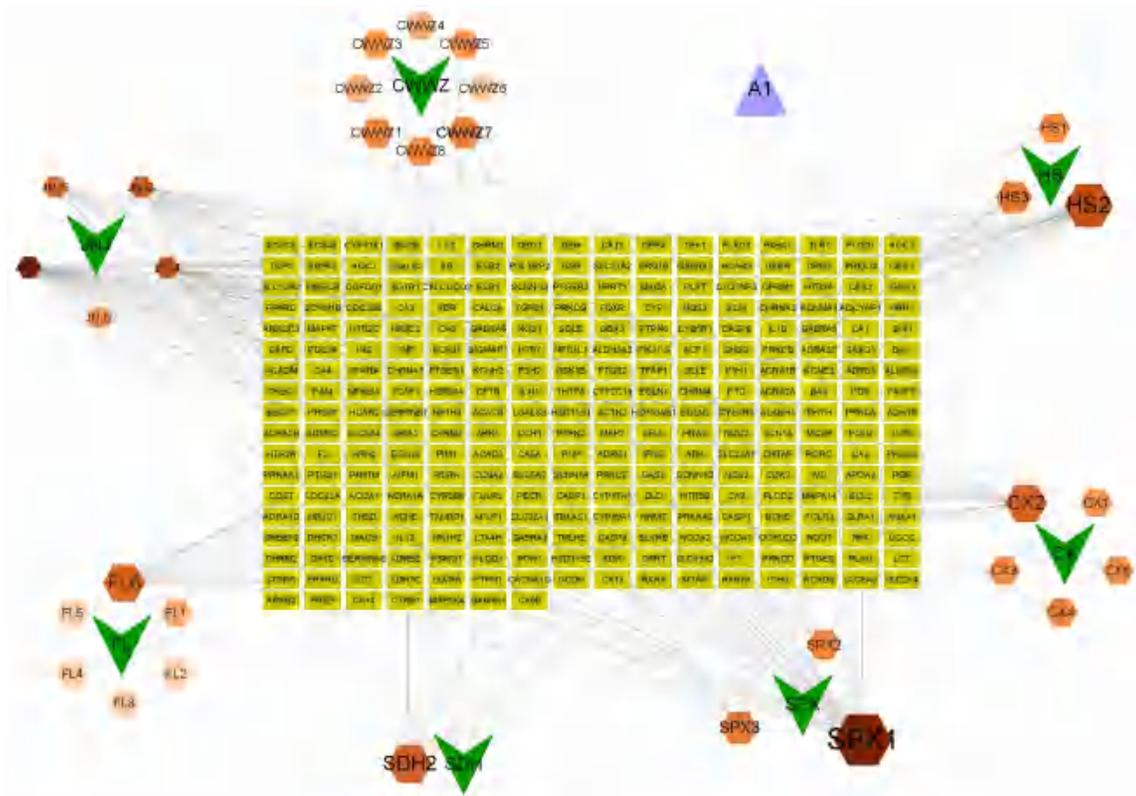


图 1 七味参地颗粒“中药 - 成分 - 靶点”网络图

Fig 1 “Traditional Chinese Medicine-Active Ingredient-Target” network diagram of Qiwei Shendi granules

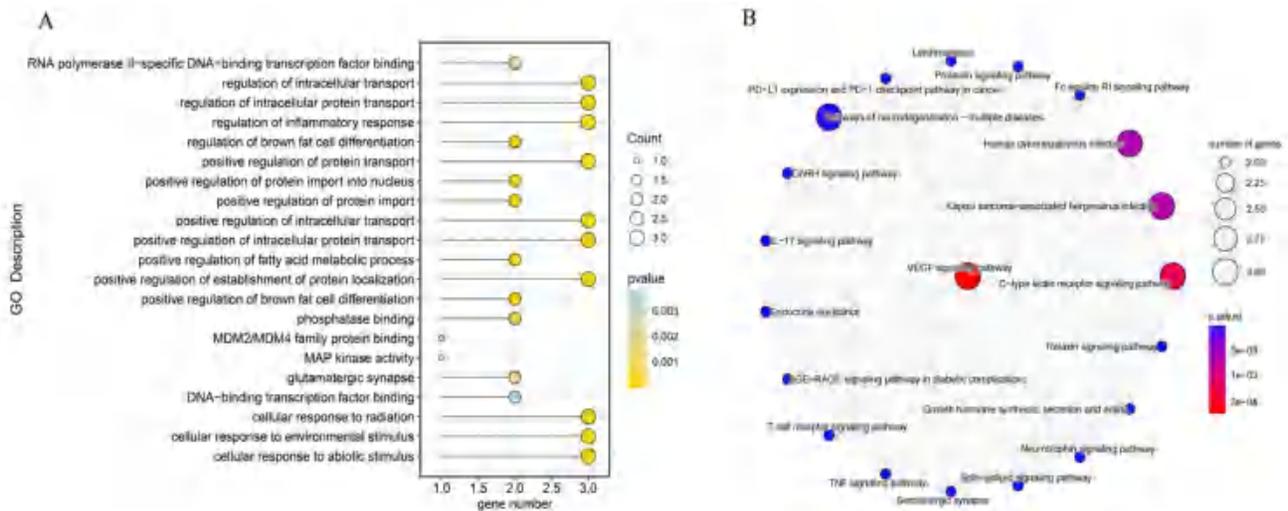


图 2 GO (A) 和 KEGG (B) 通路富集分析

Fig 2 GO (A) and KEGG (B) pathway enrichment analysis

2.2 分子对接

在 Cytoscape 3.8.2 中，将核心靶点及对应药物成分进行分子对接，所有对接方式均采用半柔性对接。结合 Uniprot 和 PDB 数据库，确定蛋白结构，下载为 .pdb 格式。在 TCMSP 中下载 .mol2

格式的药物成分 3D 化学结构，在 AutoDockTools 1.5.7 中和小分子药物进行分子对接。将 PTGS2、MAPK14、PPARA、HRAS 这 4 个核心靶点分别与其相关联的 13 个活性成分分别进行分子对接以验证其活性，共得到 52 种对接结果，见表 1。分子

对接能量低于 $-21 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 为较稳定的对接结果, 对接能量越低, 结果越理想。如表 1 所示, 七味参地颗粒大部分核心成分与核心靶点具有较好的结合活性, 说明药物与蛋白整体对接效果良好, 按能量由小到大展示前 5 个对接结果 (见图 3)。

表 1 七味参地颗粒核心成分与核心靶点对接能量结果 ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)
Tab 1 Molecular docking between the core components and core targets of Qiwei Shendi granules ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)

核心成分	核心靶点			
	PTGS2	MAPK14	PPARA	HRAS
胆固醇	-37.13	-37.55	-32.31	-44.66
人参皂苷	-17.54	-25.45	-19.92	-34.16
亚油酸乙酯	-21.39	-24.32	-26.25	-26.16
杨梅酮	-39.68	-29.93	-30.85	-37.09
五味子乙素	-22.31	-28.88	-28.76	-31.48
五味子素 R	-26.92	-31.02	-34.32	-34.99
豆甾醇	-40.85	-37.76	-36.17	-47.43
烟酸	-20.43	-20.13	-19.21	-24.40
糖蛋白	-21.01	-19.92	-17.75	-22.48
β -甾醇	-43.78	-33.24	-40.85	-46.88
常春藤素	-33.19	-35.71	-32.40	-44.41
川芎嗪	-25.99	-28.71	-27.92	-32.57
川芎萜呔内酯	-26.87	-36.50	-29.09	-41.98

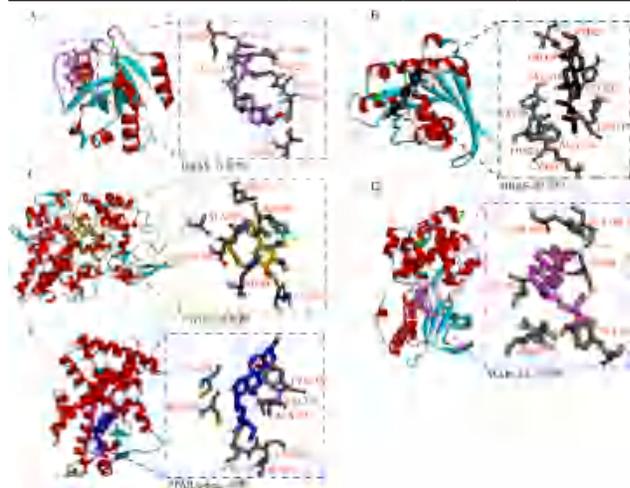


图 3 七味参地颗粒核心成分与核心靶点对接展示图
Fig 3 Docking diagram of core components and core targets of Qiwei Shendi granules by molecular docking

2.3 实验验证

2.3.1 动物建模及给药 ICR 小鼠适应性饲养 1 周后, 采用腺嘌呤 $80 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 连续灌胃 7 d, 复制 CGN 系膜细胞增生小鼠模型 (24 h 蛋白尿含量明显升高, 表示模型复制成功)^[19]。造模成功小鼠随机分为模型组、七味参地颗粒组 ($15.6 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 根据人每日临床剂量, 按照小鼠-人剂量换算), 每组 10 只, 并以正常 ICR 小鼠 10 只为正常对照组。造模后第 7 日, 七味参地颗粒组按 $0.2 \text{ mL}/10 \text{ g}$ 灌胃给予七味参地颗粒, 正常对照组和模型组给予等量溶媒 (0.9% 氯化钠溶液),

每日 1 次, 连续 30 d。给药结束后, 将所有小鼠放入代谢笼, 收集 24 h 尿液。腹腔注射戊巴比妥钠 ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 麻醉小鼠, 眼眦取血, 取相同部位肾小球组织于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

2.3.2 24 h 尿蛋白检测 采用尿蛋白定量试剂盒检测各组小鼠 24 h 尿蛋白水平, 结果如图 4A 所示。与正常对照组比较, 模型组小鼠 24 h 尿蛋白含量明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 灌胃给予七味参地颗粒后, 小鼠 24 h 尿蛋白含量明显降低 ($P < 0.01$)。

2.3.3 Fe^{2+} 浓度水平检测 采用比色法铁含量检测试剂盒检测各组小鼠肾脏组织中 Fe^{2+} 浓度水平, 结果如图 4B 所示。与正常对照组比较, 模型组肾脏组织中 Fe^{2+} 浓度水平显著上升 ($P < 0.01$), 与模型组比较, 七味参地颗粒组肾脏组织中 Fe^{2+} 浓度水平显著下降 ($P < 0.01$)。

2.3.4 Western blot 分析验证 HRAS、MAPK14、PTGS2、PPARA 的表达水平 以 β -actin 为内参, 称取组织, 加入 RIPA 细胞裂解液, $12\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 收集上清液, 经电泳、转膜、封闭、稀释一抗 PPARA (1:1000), HRAS (1:1000), MAPK14 (1:1000), PTGS2 (1:1000), $4\text{ }^\circ\text{C}$ 缓慢摇动孵育过夜。加入二抗山羊抗小鼠 IgG (1:10 000), 山羊抗兔 IgG (1:10 000) 室温孵育 2 h。ECL 超敏发光试剂盒检测蛋白, 采用 Image J 软件对蛋白条带进行量化, 所有实验均重复 3 次。结果如图 4C 所示, 与正常对照组比较, 模型组肾脏组织中 HRAS、MAPK14 及 PTGS2 蛋白表达显著上升 ($P < 0.01$), PPARA 蛋白表达水平则显著下降 ($P < 0.01$), 与模型组比较, 七味参地颗粒组 HRAS、MAPK14 及 PTGS2 蛋白表达显著下降 ($P < 0.01$), PPARA 蛋白表达水平显著上升 ($P < 0.01$)。

3 讨论

CGN 发病隐匿且病因复杂。铁死亡是一种铁依赖性脂质过氧化驱动的细胞死亡, 研究表明, 铁死亡在对抗肾脏损伤中具有重要作用^[20]。中药复方是临床应用中药的主要形式, 多成分、多靶点是其优势和特色所在。中医药在防治 CGN 方面具有独特的优势, 体现了“既病防变”的理念^[21]。七味参地颗粒具有健脾益肾、固摄精微功效, 方中红参补气健脾, 补肾阳; 熟地黄补血滋阴, 益精填髓; 茯苓渗湿健脾, 利水消肿; 醋五味子涩精固脱, 补肾益气; 桑螵蛸固精缩尿, 补肾助阳; 鸡内金涩精止遗; 川芎活血行气, 七味中药相配, 相辅相成, 共奏补肾升阳之效。临床上采用七味参地颗粒治疗 CGN 历史悠久且效果显著^[22], 但其是否通过调控铁死亡干预 CGN 及其具体作用

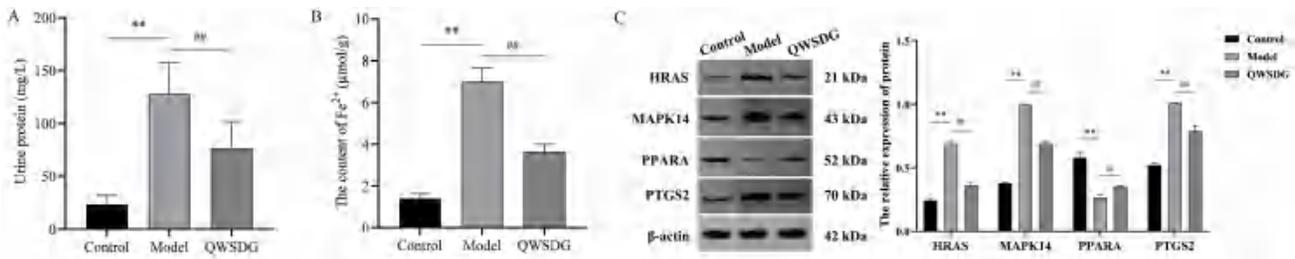


图4 各组小鼠 24 h 尿蛋白 (A)、Fe²⁺ 浓度 (B) 及肾脏组织中 PPARA、HRAS、MAPK14、PTGS2 (C) 蛋白表达水平

Fig 4 24h urine protein quantification (A), Fe²⁺ level (B), and protein expressions of PPARA, HRAS, MAPK14, and PTGS2 (C) in the kidney tissue of CGN mice

注 (Note): 与正常对照组比较, ***P* < 0.01; 与模型组比较, ###*P* < 0.01 (Compared with the normal control group, ***P* < 0.01; compared with the model group, ###*P* < 0.01)。

机制仍未被完全阐明。网络药理学作为一种基于多学科基本理论, 用于中药复方多成分、多靶点、多通路的复杂网络关系的研究, 能够直观地将“药物-成分-基因靶点-疾病”相互作用的关系展现出来, 并找出有效的化学活性成分、作用靶点和相关通路^[23]。在分子水平上研究中药复方多成分协同作用于疾病靶点的作用机制, 也为研究中中药复方在基因分子层面诊治疾病的机制提供了新思路, 以明中医之妙。

本研究通过检索相关数据库, 筛选疾病、成分、铁死亡的作用靶点基因, 七味参地颗粒共筛选出 33 种活性成分, 取三者交集基因利用 10 种算法鉴定出 4 个核心靶点 (PPARA, MAPK14, HRAS, PTGS2), 与 4 个核心靶点相关联的药物有效成分均包含在七味参地颗粒的七味中药中, 体现了七味中药相配, 诸药合用的中药复方特色。通过将 4 个核心靶点分别与其相关联的 13 个活性成分进行分子对接, 红参的主要有效成分β-谷甾醇与 4 个核心靶点对接能量均很低; 熟地黄的主要有效成分豆甾醇和茯苓的主要有效成分常春藤素与 4 个核心靶点对接能量均较低; 桑螵蛸的有效成分胆固醇、五味子的有效成分五味子酯甲、鸡内金的有效成分烟酸与 4 个核心靶点对接能量均较低; 川芎的有效成分川芎萜呋内酯、杨梅酮与 4 个核心靶点对接能量均较低, 体现了七味中药君臣佐使的配伍特点。

PPARA 属于 PPARs 家族中的一个亚型分子, 主要参与转录因子表达的调控, 在细胞分化、发育以及新陈代谢等生理过程中发挥重要作用^[24]。研究发现, 脂质翻转酶溶质载体家族 47 成员 1 (SLC47A1) 是介导细胞铁死亡的关键基因^[25], PPARA 是 SLC47A1 的反式激活转录因子, 测 PPARA 在 CGN 小鼠中表达下调, 会使细胞铁死亡敏感性增加。HRAS 是小 GTP 酶超家族中的一种小的 G 蛋白, 能够与鸟苷三磷酸结合后, 再结

合 Raf 相关激酶, 激活 MAPK 通路。Chang 等^[26]研究发现, MAPK 可通过参与 ROS 的激活过程而引起铁死亡。MAPK14 参与调控细胞的增殖分化及炎症反应, 可介导肾小管细胞炎症反应及细胞增殖分化, 诱导炎症产生和细胞死亡, 从而引起急性肾损伤^[27]。凌磊等^[28]研究表明, MAPK 的过度激活会导致多种炎症反应, 加重肾小管上皮间质损伤, 从而导致肾脏炎症反应。在体实验发现, 模型组 CGN 小鼠的 HRAS 和 MAPK14 的蛋白表达升高, 我们推测 HRAS 可能激活 MAPK 信号通路, 诱导铁死亡的发生, 加重肾小管细胞炎症反应, 促进 CGN 的发生发展。PTGS2 又称环氧合酶 2 (cyclooxygenase, COX-2), 能够反映细胞氧化损伤程度, 研究表明, 靶向抑制 PTGS2 的表达能够抑制细胞铁死亡^[29]。此外, COX-2 能够诱导体内前列腺合成, 参与机体炎症反应和肾素释放, 加重足细胞损伤, 引发蛋白尿^[30]。KEGG 富集分析显示, 七味参地颗粒经铁死亡途径调控 CGN 与 VEGF、TNF、IL-17 等多条信号通路有关。动物实验表明, 模型组 CGN 小鼠的 Fe²⁺ 浓度水平、HRAS、MAPK14 及 PTGS2 蛋白表达显著升高, PPARA 蛋白表达水平显著下降; 给予七味参地颗粒后, 均能逆转其表达水平。综上, 我们推测在 CGN 的发生发展中, 存在铁死亡途径的激活, 诱导细胞铁死亡的发生, 给予七味参地颗粒后, 通过抑制细胞铁死亡, 从而发挥治疗 CGN 的作用。

本研究通过网络药理学结合在体实验验证发现, 七味参地颗粒中七味中药相配, 相辅相成, 共同发挥干预 CGN 的作用, 其机制可能与抑制铁死亡有关, 该研究结果可为七味参地颗粒干预 CGN 的作用机制提供理论支持, 为七味参地颗粒的临床应用与推广提供实验依据。本研究在体实验只验证了核心靶点的表达, 对涉及的铁死亡和相关信号通路未进行验证, 还需要更深入的研究。

参考文献

- [1] Liu T, Zhuang XX, Qin XJ, et al. The potential role of N6-methyladenosine modification of LncRNAs in contributing to the pathogenesis of chronic glomerulonephritis [J]. *Inflamm Res*, 2023, 72 (3): 623-638.
- [2] Gao YC, Jiang NN, Qin XJ, et al. High-throughput data on circular RNA reveal novel insights into chronic glomerulonephritis [J]. *Genes Genomics*, 2023, 45 (4): 475-490.
- [3] 刘丽霞. 自拟保肾汤联合西药治疗慢性肾小球肾炎的临床观察 [J]. *中国民间疗法*, 2020, 28 (16): 78-79.
- [4] Gao JR, Qin XJ, Jiang H, et al. The effects of Qi Teng Xiao Zhuo granules, traditional Chinese medicine, on the expression of genes in chronic glomerulonephritis rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 193: 140-149.
- [5] Wei LB, Gao JR, Gao YC, et al. Effect of the traditional Chinese medicine Qi Teng Xiao Zhuo granules on chronic glomerulonephritis rats studied by using long noncoding RNAs expression profiling [J]. *Gene*, 2020, 728: 144279.
- [6] 金华, 张磊, 王亿平. 参地颗粒对慢性肾炎患者外周血单个核细胞凋亡及 MCP-1 和 TGF- β 1 的干预作用 [J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35 (24): 3060-3065.
- [7] 陈宗禹. 观察参地颗粒对慢性肾炎脾肾亏虚证患者临床疗效及研究 mTORC1-S6/4EBP1 信号通路对 MsPGN 自噬的调节作用 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2021.
- [8] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149: 1060-1072.
- [9] Garcia-Bermudez J, Birsoy K. A mitochondrial gatekeeper that helps cells escape death by ferroptosis [J]. *Nature*, 2023, 593 (7860): 514-515.
- [10] Alvarez SW, Sviderskiy VO, Terzi EM. NFS1 undergoes positive selection in lung tumours and protects cells from ferroptosis [J]. *Nature*, 2023, 551 (7682): 639-643.
- [11] 张楷齐, 吴晶魁, 倪兆慧. 铁死亡在肾脏疾病中的作用研究进展 [J]. *中华肾病研究电子杂志*, 2021, 10 (5): 268-273.
- [12] Zeng JQ, Luo QY, Wang XP. Network pharmacology-and molecular docking-based investigation of the therapeutic potential and mechanism of daucosterol against multiple myeloma [J]. *Transl Cancer Res*, 2023, 12 (4): 1006-1020.
- [13] Huang WJ, Wen F, Ruan S. Integrating HPLC-Q-TOF-MS/MS, network pharmacology and experimental validation to decipher the chemical substances and mechanism of modified Gui-shao-liu-jun-zi decoction against gastric cancer [J]. *J Tradit Complement Med*, 2023, 13 (3): 245-262.
- [14] Ru JL, Li P, Wang JN, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [15] Li H, Luo D, Wei R, et al. Investigating the mechanism of Rhizoma Coptidis-Eupatorium fortunei medicine in the treatment of type 2 diabetes based on network pharmacology and molecular docking [J]. *Biomed Res Int*, 2022, 2022: 7978258.
- [16] Lin DM, Huang WW, Han XF. Potential mechanism of Cistanche deserticola in the treatment of osteoporosis: based on network pharmacology and ovariectomized rat model [J]. *Asian J Surg*, 2023, 46 (5): 2114-2115.
- [17] Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47: D607-D613.
- [18] Zhou YY, Zhou B, Pache L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets [J]. *Nat Commun*, 2019, 10 (1): 1523.
- [19] 余金花, 卫培峰, 高晓庆, 等. 芪萸参方颗粒对腺嘌呤致慢性肾炎小鼠的干预作用 [J]. *中医药导报*, 2017, 23 (1): 27-33.
- [20] Ma LJ, Liu XQ, Zhang MY, et al. Paeoniflorin alleviates ischemia/reperfusion induced acute kidney injury by inhibiting Slc7a11-mediated ferroptosis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 116: 109754.
- [21] 许晴, 徐勤. 慢性肾炎的中药治疗进展 [J]. *华夏医学*, 2020, 33 (4): 202-205.
- [22] 王亿平, 朋红霞, 王东. 参地颗粒对慢性肾炎脾肾亏虚证患者 NF- κ B 信号通路的干预作用参地颗粒对慢性肾炎脾肾亏虚证患者 NF- κ B 信号通路的干预作用 [J]. *中成药*, 2015, 37 (9): 1910-1913.
- [23] Xu LN, Zhao B, Yang LP, et al. Demethylzeylasteral reduces the level of proteinuria in diabetic nephropathy: screening of network pharmacology and verification by animal experiment [J]. *Pharmacol Res Perspect*, 2022, 10 (4): e00976.
- [24] Zhou B, Zhao GJ, Li H, et al. FNDC5/PPAR α pathway alleviates THP-1-derived macrophage pyroptosis and its mechanism [J]. *Altern Ther Health Med*, 2023, 29 (3): 32-42.
- [25] Lin Z, Liu J, Long F, et al. The lipid flippase SLC47A1 blocks metabolic vulnerability to ferroptosis [J]. *Nat Commun*, 2022, 13 (1): 7965.
- [26] Chang WT, Bow YD, Fu PJ, et al. A marine terpenoid, heteronemin, induces both the apoptosis and ferroptosis of hepatocellular carcinoma cells and involves the ROS and MAPK pathways [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 7689045.
- [27] Ortiz A, Husi H, Gonzalez-Lafuente L, et al. Mitogen activated protein kinase 14 promotes AKI [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28 (3): 823-836.
- [28] 凌磊, 张玮, 裘琳琳, 等. 补肾活血汤对系膜增生性肾小球肾炎大鼠肾功能及 JNK/p38 MAPK 信号通路的影响 [J]. *新中医*, 2022, 54 (9): 29-33.
- [29] Gao F, Zhao YC, Zhang B, et al. Suppression of lncRNA Gm47283 attenuates myocardial infarction via miR-706/Ptgs2/ferroptosis axis [J]. *Bioengineered*, 2022, 13 (4): 10786-10802.
- [30] Agrawal S, Guess AJ, Chanley MA, et al. Albumin-induced podocyte injury and protection are associated with regulation of COX-2 [J]. *Kidney Int*, 2014, 86: 1150-1160.

(收稿日期: 2023-10-02; 修回日期: 2023-12-02)

便通凝胶贴膏的制备及药效学评价

王兴刚¹, 付志丽¹, 蓝俊¹, 翟康元², 朱艳华^{3*} (1. 贵州护理职业技术学院, 贵阳 550025; 2. 四川尚锐生物医药有限公司, 成都 610000; 3. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

摘要: **目的** 优化便通凝胶贴膏的制备工艺并研究其对阳虚便秘模型大鼠的作用。**方法** 采用单因素实验和 L₉(3⁴) 正交实验设计优化便通凝胶贴膏的制备工艺。将 40 只大鼠分为空白对照组、模型组、阳性对照组、贴膏组, 除空白对照组外, 其他各组动物采用“白醋+0℃冰水+复方地芬诺酯”灌胃的方法建立阳虚便秘模型; 造模成功后, 空白对照组和模型组大鼠灌胃等体积的生理盐水, 阳性对照组大鼠给予市售的便通胶囊, 每次灌胃 1.2 g/200 g, 每日两次; 贴膏组贴敷制备的便通凝胶贴膏, 每次贴 12 h, 贴于大鼠腹部; 观察大鼠的一般生物学特征、粪便含水量及血清中胃泌素 (Gas)、血管活性肠肽 (VIP)、内皮素 (ET)、胃动素 (MTL) 的含量。**结果** 正交实验的最佳制备工艺为 PVPK90 1.5 g、高岭土 1.0 g、聚丙烯酸钠 1.5 g、羧甲基纤维素钠 0.5 g, 经验证优化后的制备工艺稳定。与空白对照组比较, 模型组大鼠的一般生物学特征、粪便含水量及血清中 Gas、VIP、ET、MTL 的水平均有显著差异, 说明造模成功; 给药后, 阳性对照组与贴膏组各项指标均显著改善。**结论** 优化的便通凝胶贴膏制备工艺可行, 对阳虚便秘大鼠具有良好的治疗效果。

关键词: 凝胶贴膏; 阳虚便秘; 便通凝胶贴膏

中图分类号: R283, R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)07-1698-07
doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.003

Preparation and pharmacodynamics of Biantong gel plaster

WANG Xing-gang¹, FU Zhi-li¹, LAN Jun¹, ZHAI Kang-yuan², ZHU Yan-hua^{3*} (1. *Guizhou Nursing Vocational College, Guiyang 550025*; 2. *Sichuan Shangrui Biomedical Co., Ltd., Chengdu 610000*; 3. *Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040*)

Abstract: Objective To optimize the preparation of Biantong gel plaster and determine its effect on model rats with yang deficiency constipation. **Methods** Single factor experiment and L₉(3⁴) orthogonal experiment design were used to optimize the preparation of Biantong gel plaster. Forty rats were divided into a blank control group, a model group, a positive control group and a plaster group. Except for rats in the blank control group, all rats in other groups were given white vinegar + 0℃ ice water + compound diphenoxylate intragastrically to establish the yang deficiency constipation model. After the model was successfully established, the rats in the blank control group and the model group were given the same volume of normal saline. While the positive control group was given commercial Biantong capsules (1.2 g/200 g, twice a day), and the plaster group was treated with Biantong gel plaster for 12 hours by sticking on the abdomen of the rats. The general biological characteristics, water content in feces and the levels of gastrin, vasoactive intestinal peptide, endothelin, motilin in the plasma were observed. **Results** The optimum preparation conditions included PVPK90 1.5 g, kaolin 1.0 g, sodium polyacrylate 1.5 g, and sodium carboxymethyl cellulose 0.5 g. The optimized preparation was verified to be stable. Compared with the blank control group, obvious differences were found in the biological characteristics, feces water content, and the levels of gastrin, vasoactive intestinal peptide, endothelin, motilin in plasma of rats in each modeling group, indicating

基金项目: 贵州护理职业技术学院硕士基金课题 (No.gzhlyj2022-07); 贵州省科技计划项目 (No.黔科合基础-ZK[2023]一般126); 黑龙江省中医药经典普及化专项课题 (No.ZYW2202-080)。

作者简介: 王兴刚, 男, 硕士, 主要从事中药新产品开发与质量标准研究, email: 1181167707@qq.com *通信作者: 朱艳华, 女, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药新产品开发研究, email: 290471982@qq.com

successful modeling. After the drug administration, all the above indexes of the positive control group and the plaster group were obviously improved. **Conclusion** The optimized preparation of Biantong gel plaster is feasible and shows a good therapeutic effect on rats with yang deficiency constipation.

Key words: gel plaster; yang deficiency constipation; Biantong gel plaster

便秘系指由非器质性原因引起的功能性肠道疾病,是一种常见病^[1]。它不仅影响患者的食欲、精神、睡眠质量,严重者还会引起急性心脑血管等疾病危及患者的生命^[2]。流行病学调查显示,60岁以上患病率达15%~20%,长期卧床护理中的老年人患病率高达80%,并且持续升高^[3]。目前临床上治疗便秘主要是通过药物治疗、物理治疗、手术治疗等手段^[4],但存在口服给药困难、胃肠胀气、并发症、不良反应多等情况。

神阙穴是人体重要穴位,药物贴敷神阙穴可调节脾胃升降、运化等功能^[5]。外敷神阙穴能有效提高肛管运动功能,可治疗老年功能性便秘,且疗效显著^[6-7]。中医在治疗便秘方面讲究标本兼治,以润补为主,通过滋补健肾来达到通便的效果。便通凝胶贴膏的组方来源于《中国药典》2020年版一部记载的中药制剂,由白术(炒)、肉苁蓉、当归、桑椹、枳实、芦荟六味中药组成,具有健脾益肾、润肠通便的功效,对于脾肾不足、肠腑气滞所引起的便秘治疗效果显著^[8-9]。

研究表明,便秘可能与脑肠轴、平滑肌、间质细胞功能、精神及心理等异常有关^[10-11]。便秘的发生与脑肠轴,特别是胃肠激素和神经递质有密切的关系^[12]。本研究选取大鼠血浆中的胃动素(MTL)、胃泌素(Gas)、内皮素(ET)及血管活性肠肽(VIP)的含量为考察指标,观察便通凝胶贴膏对便秘的影响。

1 材料

1.1 动物

普通级健康SD大鼠40只,雌雄各半,体重(200±20)g[黑龙江中医药大学GLP实验室,动物许可证号:SYXK(黑)2020-004]。

1.2 仪器

756PC型紫外可见分光光度仪(上海光谱仪器有限公司);SartoriusBT25S型电子天平(德国Sartorius公司,检定分度值:1mg);QL-902型旋涡混合仪(其林贝尔仪器制造公司);TGL-16G离心机(上海安亭科学仪器厂);HZS-HA型恒温水浴振荡器(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司);DZ-3BC II真空干燥箱(北京恒奥德仪器仪表有限公司)。

1.3 试药

麸炒白术(批号:180702)、当归(批号:181001)、芦荟(批号:180502)、肉苁蓉(批号:180401)、桑椹(批号:180901)、枳实(批号:180802)(哈尔滨普方药业有限公司,均由黑龙江中医药大学孙慧峰教授鉴定,符合2020年版《中国药典》要求)。羧甲基纤维素钠(天津致远化学试剂有限公司,批号:2018070167);聚乙二醇400、聚乙烯吡咯烷酮K90(PVPK90)、氮酮(天津博迪化工股份科技有限公司);高岭土(天津市巴斯夫化工有限公司,批号:20180108);聚丙烯酸钠(辽宁宇兴化工有限公司,批号:I1830044);甘油(天津市富宇精细化工有限公司,批号:20180110);MTL、ET、VIP、Gas ELISA试剂盒(R&DSYSTEMS);复方地芬诺酯(长春长红制药有限公司,批号:20200806);便通胶囊(武汉健民药业集团股份有限公司,批号:20200613,规格:0.35g);山西白醋(山西省尧都泉酿造有限公司,批号:20200904,总酸度:6.00g/100mL)。

2 方法与结果

2.1 药粉的制备

按配方比例称取一定量的药材,按课题组前期实验优化的提取工艺进行提取^[13-14],采用回流法以10倍量的水提取两次,每次提取2h,用纱布滤过后,合并两次提取液,取滤液浓缩成浸膏,真空干燥得干膏,1g干膏约相当于2.5g生药量,研磨成细粉,即得。

2.2 贴膏剂的制备

称取适量高岭土和聚丙烯酸钠于研钵中,依次加入适量甘油、聚乙二醇400,匀速搅拌均匀。另称取适量PVPK90于烧杯中,加20mL蒸馏水使其溶解,再加入适量的羧甲基纤维素钠,溶解搅拌均匀后将其倒入研钵中,研至白色凝胶状加入适量药粉(便通胶囊治疗量同等剂量的提取药粉量,约2.7g),研磨均匀后涂布于背衬材料上,室温晾干后贴上盖衬,即得。

2.2.1 贴膏剂评价方法的建立 采用《中国药典》2020年版四部通则0952项下黏附力测定法,采用滚球斜坡停止法对凝胶贴膏的初黏力进行测

定, 通过综合感官评价对凝胶贴膏剂的外观、基质残留、反复揭贴性、皮肤追随性等方面进行评价, 以凝胶贴膏的感官评价和初黏力为评价指标, 进行综合评分。评分标准见表 1。

表 1 评分标准
Tab 1 Scoring criteria

指标	评价标准	分值
初黏力	膏体表面粘连钢球大小的程度 ($n = 6$, $n \geq 4$ 为合格)	2
外观	膏体表面光滑性、空洞数量、渗出程度	2
基质残留	将药膏揭贴于手背 3 次后观察膏体残留情况	2
反复揭贴性	将药膏反复揭贴于手背 10 次, 记录药膏脱落时揭贴次数	2
皮肤追随性	将药膏贴于手腕处甩 10 次, 记录贴膏被甩脱落时甩手次数	2

2.2.2 单因素实验 通过改变贴膏剂辅料的单一用量来观察对凝胶贴膏的影响, 按表 1 评分标准, 对凝胶贴膏进行打分, 从而确定辅料的用量范围。

① 高岭土添加量的考察: 以聚丙烯酸钠 1.5 g、羧甲基纤维素钠 0.5 g、甘油 3 g、聚乙二醇 400 1 g、PVPK90 1 g 为基础量, 改变高岭土的用量优选出用量范围, 结果见表 2。若不添加高岭土作填充剂, 贴膏剂的均匀性较差, 添加量多时膏体

颜色变浅、黏度降低, 但成型性好。综合考虑高岭土加入量在 0.5 ~ 1.5 g 最好。

② 聚丙烯酸钠添加量的考察: 改变聚丙烯酸钠的用量, 其余条件同①项下, 考察其对凝胶贴膏的影响, 结果见表 3。不添加聚丙烯酸钠制备出来的贴膏没有黏性, 不能摊涂。加入量多时很难摊涂, 并且晾干后贴膏表面较硬, 黏性也降低。综合考虑聚丙烯酸钠的最佳量为 1 ~ 2 g。

③ 羧甲基纤维素钠添加量的考察: 改变羧甲基纤维素钠的用量, 其余条件同①项下, 考察对凝胶贴膏的影响, 结果见表 4。

不添加羧甲基纤维素钠膏体表面光滑、黏性大、背衬有渗出, 随着加入量增大, 贴膏表面变得不平整, 黏性也有所下降, 背衬无渗出。综合考虑, 羧甲基纤维素钠的加入量在 0.5 ~ 1.5 g 最佳。

④ PVPK90 添加量的考察: 改变 PVPK90 的用量, 其余条件同①项下, 考察对凝胶贴膏的影响, 结果见表 5。不添加和添加过量的 PVPK90 对贴膏的黏性无明显影响, 且甘油都会渗出。添加中间量制备出来的贴膏黏性好无渗出。综合考虑后, 确定此实验贴膏剂制备 PVPK90 加入量为 0.5 ~ 1.5 g。

⑤ 聚乙二醇 400 与甘油添加量的考察: 改变

表 2 高岭土不同添加量对凝胶贴膏的影响

Tab 2 Effect of different addition amounts of kaolin on the gel plaster

高岭土添加量 /g	初黏力 / 钢球号数	外观	基质残留	皮肤追随性 / 次	反复揭贴性 / 次	得分
0	8	黏性大, 均匀性差	无	5	7	7.4
1	10	黏性大, 均匀性好	无	8	8	9.2
3	9	黏度低, 均匀性好	无	6	7	7.8

表 3 聚丙烯酸钠不同添加量对凝胶贴膏的影响

Tab 3 Effect of different addition amounts of sodium polyacrylate on the gel plaster

聚丙烯酸钠添加量 /g	初黏力 / 钢球号数	外观	基质残留	皮肤追随性 / 次	反复揭贴性 / 次	得分
0	/	膏体没黏性, 不能摊涂	/	/	/	/
1.5	10	表面光滑, 黏性较好	无	7	8	9.0
3	6	表面较硬, 黏性下降	无	1	2	4.8

表 4 羧甲基纤维素钠不同添加量对凝胶贴膏的影响

Tab 4 Effect of different addition amounts of sodium carboxymethyl cellulose on the gel plaster

羧甲基纤维素钠添加量 /g	初黏力 / 钢球号数	外观	基质残留	皮肤追随性 / 次	反复揭贴性 / 次	得分
0	10	表面光滑, 黏性大, 有渗出	无	6	8	8.2
0.5	10	光滑, 黏性大, 无明显渗出	无	7	8	9.0
2	7	不光滑, 黏性小, 无渗出	无	3	4	6.0

表 5 PVPK90 不同添加量对凝胶贴膏的影响

Tab 5 Effect of different addition amounts of PVPK90 on the gel plaster

PVPK90 添加量 /g	初黏力 / 钢球号数	外观	基质残留	皮肤追随性 / 次	反复揭贴性 / 次	得分
0	10	光滑, 黏性很大, 有渗出	较少	10	10	8.8
1	10	光滑, 黏性大, 无渗出	无	10	10	10.0
2	8	光滑, 黏性略低, 有渗出	无	7	6	7.2

甘油和聚乙二醇 400 的用量，其余条件同①项下，考察对凝胶贴膏的影响，通过实验确定甘油和聚乙二醇 400 的最佳用量，结果见表 6 和表 7。聚乙二醇 400 加入量多少对膏体光滑性无明显影响但黏

性都略有降低，当加入量多时背衬有少量渗出；甘油加入过量时，贴膏背衬有渗出。综合考虑，聚乙二醇 400 加 1.0 g、甘油加 3.0 g 制备出来的凝胶贴膏表面光滑，黏性大且无渗出。

表 6 聚乙二醇 400 不同添加量对凝胶贴膏的影响

Tab 6 Effect of different addition amounts of polyethylene glycol 400 on the gel plaster

PEG400 添加量 /g	初黏力 / 钢球号数	外观	基质残留	皮肤追随性 / 次	反复揭贴性 / 次	得分
0.5	9	光滑，黏性略低，无渗出	无	7	8	8.8
1.0	10	光滑，黏性大，无渗出	无	9	9	9.4
1.5	10	光滑，黏性略低，有少量渗出	无	8	9	9.0

表 7 甘油不同用量对凝胶贴膏的影响

Tab 7 Effect of different addition amounts of glycerin on the gel plaster

甘油 /g	初黏力 / 钢球号数	外观	基质残留	皮肤追随性 / 次	反复揭贴性 / 次	得分
2.0	8	光滑，膏体略干，无渗出	无	7	7	8.6
3.0	10	光滑，黏性好，无渗出	无	9	9	9.4
4.0	10	光滑，黏性略低，有渗出	无	8	8	8.8

2.2.3 正交实验设计 凝胶贴膏剂的黏性是影响药效的主要因素，基于前期单因素考察所得各辅料的最佳用量范围，选择 PVPK90 (A)、高岭土 (B)、聚丙烯酸钠 (C)、羧甲基纤维素钠 (D) 4 个因素，每个因素 3 个水平，进行 $L_9(3^4)$ 正交实验设计，因素水平见表 8，结果见表 9 ~ 11。

表 8 正交实验水平因素表

Tab 8 Level and factor of orthogonal experiment

水平	因素			
	A	B	C	D
	PVPK90/g	高岭土 /g	聚丙烯酸钠 /g	羧甲基纤维素钠 /g
1	0.5	0.5	1.0	0.5
2	1.0	1.0	1.5	1.0
3	1.5	1.5	2.0	1.5

表 9 正交实验得分

Tab 9 Orthogonal experiment score

No.	初黏力 / 钢球号数	外观	基质残留	皮肤追随性 / 次	反复揭贴性 / 次	得分
1	10	光滑度略低，黏性极大，渗出量大	少量	10	10	6.4
2	8	表面光滑，黏性略低，有渗出	无	7	7	7.2
3	3	表面光滑，黏性极低，无渗出	无	1	1	4.5
4	7	表面不光滑，黏性略低，极少量渗出	无	7	6	6.8
5	8	光滑度略低，黏性低，无渗出	无	8	8	8.0
6	7	表面光滑，黏性大，有少量渗出	无	6	7	6.6
7	6	表面光滑，黏性略低，有渗出	无	7	7	6.6
8	8	光滑度略低，黏性大，有极少量渗出	无	7	8	7.6
9	9	表面光滑，黏性大，有极少量渗出	无	8	9	8.4

由表 10 中 R 值的直观分析可知，因素 A (PVPK90)、B (高岭土)、C (聚丙烯酸钠)、D (羧甲基纤维素钠) 添加量对凝胶贴膏的制备工艺都有影响，影响大小顺序为 $A > D > B = C$ ，正交实验优化得到制备工艺为 $A_3B_2C_2D_1$ ，即 PVPK90 1.5 g、高岭土 1.0 g、聚丙烯酸钠 1.5 g、羧甲基纤维素钠 0.5 g；由表 11 方差分析结果可知，各因素在检验水准 $\alpha = 0.05$ 时对实验结果的综合评分均无显著性影响，这可能是考虑到此凝胶贴膏仅贴于神阙穴，所设置的因素水平间距不大，因而所得结果差异不明显。

2.2.4 验证实验 按照以上筛选出的最佳工艺条

件进行 3 次平行验证实验，结果见表 12。3 次平行验证实验所得凝胶贴膏的初黏力、外观、基质残留、皮肤追随性、反复揭贴性均符合使用要求，说明该凝胶贴膏制备工艺稳定可行。

2.3 便通凝胶贴膏对大鼠阳虚便秘模型的作用

2.3.1 大鼠阳虚便秘模型的建立 每日给健康 SD 大鼠灌胃山西白醋 3 mL/200 g，间隔 4 h 后灌胃 0 °C 冰水 5 mL/200 g。在灌胃造模第 10 日后，如果便秘现象不明显，加灌复方地芬诺酯 4 mg/200 g，连续灌胃 5 d，大鼠阳虚便秘模型共计造模 15 d。

2.3.2 实验分组 健康 SD 大鼠 40 只，共分为 4

表 10 正交实验结果

Tab 10 Orthogonal experiment results

No.	A PVPK90/g	B 高岭土/g	C 聚丙烯酸钠/g	D 羧甲基纤维素钠/g	综合 评分
1	1	1	1	1	6.4
2	1	2	2	2	7.2
3	1	3	3	3	4.5
4	2	1	2	3	6.8
5	2	2	3	1	8.0
6	2	3	1	2	6.6
7	3	1	3	2	6.6
8	3	2	1	3	7.6
9	3	3	2	1	8.4
K_1	6.03	6.60	6.87	7.60	
K_2	7.13	7.60	7.47	6.80	
K_3	7.53	6.50	6.37	6.30	
R	1.5	1.1	1.1	1.3	

表 11 方差分析

Tab 11 Analysis of variance

方差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性	P
A	3.620	2	1.989	无	> 0.05
B	2.220	2	1.220	无	> 0.05
C	1.820	2	1.000	无	> 0.05
D	2.580	2	1.418	无	> 0.05
E (误差项)	1.820	2			

组, 每组 10 只, 雌雄各半, 分别为空白对照组、模型组、阳性对照组和贴膏组。其中模型组及给药组按“2.3.1”项下方法进行灌胃造模, 空白对照组按 3 mL/200 g 进行生理盐水灌胃, 与模型组同步, 每日一次, 时间间隔为 4 h。

2.3.3 药物干预及样本采集 造模前, 对各实验组的大鼠进行眼眶取血, 取 1.5 mL 装在含肝素的离

表 12 验证实验结果

Tab 12 Verify of the experiment

No.	初黏力 / 钢球号数	外观	基质残留	皮肤追随性 / 次	反复揭贴性 / 次	得分
1	9	表面光滑, 黏性大, 无渗出	无	8	9	9.0
2	9	表面光滑, 黏性大, 无渗出	无	8	9	9.0
3	9	表面光滑, 黏性大, 无渗出	无	8	9	9.0

心管中, $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心后取上清液冷冻保存待测。造模成功后, 空白对照组和模型组灌等体积的生理盐水; 阳性对照组给市售的便通胶囊, 每次灌胃 1.2 g/200 g, 每日两次; 贴膏组贴敷制备的便通凝胶贴膏, 每次贴 12 h, 贴于大鼠腹部。阳性对照组和贴膏组持续给药, 直至大鼠出现粪便变稀现象。每个实验组给药结束后, 再对大鼠进行眼眶取血 0.5 mL 装在含肝素的离心管中, $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心后取上清液, 冷冻, 保存, 待测。

2.3.4 观察指标及检测项目

① 大鼠一般生物学特征: 观察和记录各组大鼠在造模前、造模中及给药后的进食量、体重、活动情况、毛发的光滑程度及精神状态等的变化情况。

造模前, 先称重和记录各组大鼠体重; 大鼠毛发光泽无异常; 精神状态良好, 没有躁动或萎靡现象; 排便正常, 没有异常死亡和异常活动现象。

造模中, 空白对照组大鼠无异常现象。模型组大鼠在造模后的第 3 日开始, 出现精神状态萎靡, 活动量减少, 饮食量比空白对照组减少的现象。在造模开始的一周之后, 模型组大鼠出现毛发干枯萎黄, 精神状态差, 便秘现象不明显。第 10 日开始, 模型组大鼠出现腹胀明显, 排便减少的现象, 直至第 14 日开始, 模型组大鼠粪便

出现干硬现象, 空白对照组始终无明显变化, 以上情况说明阳虚便秘模型造模成功, 与空白对照组比较, 各造模组大鼠的体重差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 结果见表 13。

表 13 各组大鼠造模前后体重变化情况 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Tab 13 Body weight of rats in each group before and after the modeling ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	造模前 /g	造模后 /g
空白对照组	198 ± 2	227 ± 3
模型组	201 ± 2	213 ± 4*
阳性对照组	196 ± 2	209 ± 3*
贴膏组	198 ± 2	206 ± 4*

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$ 。

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

造模后给药, 阳性对照组大鼠在给药后的第 4 ~ 5 日开始, 出现大便溏稀现象, 粪便呈黏稠状, 较臭, 即停止给药, 大鼠精神状态好转, 毛发干枯状态依然明显, 但与模型组比较, 略有好转; 贴膏组大鼠在给药后的第 7 ~ 9 日开始, 陆续出现粪便变稀的现象后停止给药。贴膏组大鼠停止给药后, 与空白对照组比较, 毛发光泽程度略差; 与阳性对照组比较, 毛发光泽程度较好, 精神状态良好。

② 粪便含水量: 分别收集一定量造模前、造模后和给药后的新鲜粪便, 称重后置于 80 °C 烘箱中

进行烘干, 至粪便重量不再发生变化, 再称量粪便的干重, 计算大鼠的粪便含水量, 计算公式如下: 粪便含水量 (%) = (湿重 - 干重) / 干重 × 100%。

与空白对照组比较, 模型组大鼠的粪便含水量在造模后显著减少 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 贴膏组大鼠的粪便含水量显著增加 ($P < 0.05$), 贴膏组与阳性对照组相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 结果见表 14。

表 14 各组大鼠实验前后粪便含水量情况 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)
Tab 14 Water content of feces before and after the experiment in each group of rats ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	造模前含水量 /%	造模后含水量 /%	给药后含水量 /%
空白对照组	11.0 ± 0.29	11.6 ± 0.28	10.9 ± 0.28
模型组	11.5 ± 0.28	5.3 ± 0.32**	6.5 ± 0.30**
阳性对照组	11.2 ± 0.28	4.9 ± 0.30**	9.3 ± 0.30#
贴膏组	11.9 ± 0.29	4.6 ± 0.28**	10.8 ± 0.31#

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

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

③ 血清中 MTL、Gas、VIP、ET 的水平检测: 将各组采集的冷冻保存的血清, 用 ELISA 试剂盒检测血清中的 MTL、Gas、VIP、ET 的含量, 具体的操作步骤严格按照 ELISA 试剂盒的说明书进行: 室温平衡; 加样; 稀释; 加酶标抗体; 温育; 洗涤; 加底物液显色; 终止反应; 测定各孔吸光度 (OD 值); 计算含量。

与空白对照组相比, 模型组大鼠血清中的 MTL、Gas、VIP、ET 的表达水平在造模后均显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 贴膏组大鼠的 MTL、Gas、VIP、ET 的表达水平均显著升高 ($P < 0.01$), 贴膏组与阳性对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 结果见表 15。

表 15 血清中 MTL、Gas、VIP、ET 的含量 ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}, n = 10, \bar{x} \pm s$)

Tab 15 Level of MTL, Gas, VIP, and ET in the plasma ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}, n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	MTL	Gas	VIP	ET
空白对照组	47.2 ± 0.22	76.3 ± 0.48	10.2 ± 0.37	4.3 ± 0.28
模型组	35.8 ± 0.55**	55.4 ± 1.04**	5.2 ± 0.44**	3.0 ± 0.59**
贴膏组	48.8 ± 0.47###	69.5 ± 0.89###	10.8 ± 1.13###	4.6 ± 0.24###
阳性对照组	49.6 ± 0.33###	74.5 ± 0.53###	11.2 ± 0.32###	4.1 ± 0.46###

注: 与空白对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ### $P < 0.01$ 。

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

2.3.5 统计学方法 统计学方法采用 Excel 表对数据进行归纳、整理, 计算均值和标准差, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。SPSS 22.0 软件进行统计分析, 以

One-Way 方差分析进行多组间均值比较, 方差齐选用 LSD 法, 方差不齐选用 Tamhane's T_2 法。

3 讨论

3.1 便通凝胶贴膏制备

凝胶贴膏中的药物, 预试时加药前后贴膏性能变化不明显, 但考虑到在不同基质处方配比下影响程度仍有可能会有所差异, 故在每一处方中都加入便通胶囊治疗同等剂量的提取药粉量。

在考察各基质辅料用量的过程中, 发现水的用量对贴膏成型也有影响, 当加水量少时制备出来的贴膏膏体较硬, 很难摊涂, 当加水量多时背衬有微量渗出, 尤其是在 6、7、8 月份制备的凝胶贴膏放在室温下, 大概两周, 就会出现轻微的渗透现象, 而在其他月份均没有渗透现象, 可以长期放置。在保证制备工艺标准统一的前提下, 发现在 6、7、8 月份的时候, 空气湿度较大 (均在 60% 以上), 而其他月份空气湿度较小, 说明环境湿度对便通凝胶贴膏的渗透现象影响较大, 这一现象可以为包装选择提供依据; 在研究凝胶贴膏成型工艺的过程中, 发现各基质辅料与药粉的加入顺序会对贴膏成型工艺有影响。主要是对均匀性有影响, 经过实验确定了各基质辅料的正确加入顺序是高岭土、聚丙烯酸钠、甘油、聚乙二醇 400、PVPK90、羧甲基纤维素钠, 匀速搅拌均匀后加入药粉。

3.2 对 SD 大鼠阳虚便秘模型造模因素的评价

借鉴彭成教授创立的 SD 阳虚便秘模型, 根据阳虚便秘的中医病因病机特点和“味过于酸, 脾气乃绝”及“欲令脾实, 食勿太酸”等中医理论, 通过给予健康 SD 大鼠灌胃山西白醋致动物脾虚和冰水致寒积便秘更损阳气的途径来造阳虚便秘动物模型, 因素符合阳虚便秘中医病因理论, 该模型具有复制简单、重复性好、实用、经济、自然恢复较慢等优点^[15]。预实验时, 灌胃首剂量为 5 mL/200 g, 但造模后的第 2 ~ 3 日, 大鼠死亡 2 只, 均为雌鼠, 解剖死亡大鼠, 发现腹中没有食物, 腹胀明显, 分析其原因, 可能是“阳盛阴虚”的缘故, 导致雌鼠死亡较多, 后首剂量均按照 3 mL/200 g 灌胃, 各模型组大鼠均没有死亡。

3.3 对客观指标的评价

基于阳虚便秘与胃肠运动功能情况紧密相关, 故选择胃肠激素 (MTL、Gas、ET) 和 VIP 等与胃肠运动功能关系密切的因素作为指标, 结果显示, 贴膏组大鼠血清中 Gas、VIP、ET、MTL 的

表达水平均显著改善 ($P < 0.01$); 贴膏组与阳性对照组相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 阳性对照组在给药后的第 4~5 日开始出现粪便变稀现象; 贴膏组在给药后的第 7~9 日陆续出现, 与阳性对照组比较, 虽然实验组治疗便秘的效果稍慢, 但通过对各项检测指标的比较, 说明便通胶囊与便通凝胶贴膏均可以纠正大鼠的胃肠激素水平达到正常水平, 对治疗便秘均有一定的治疗作用, 但是毛发的光泽度胶囊组没有贴膏组的好, 可能是因为阳性对照组给药时间较短, 在起到治疗便秘时, 还没有达到治疗虚症的效果, 这也提示医师、药师, 口服便通胶囊治疗阳虚便秘, 不仅是通便即可, 应告知患者按疗程服用, 以达到标本兼治的目的。

4 结论

本次研究通过正交实验确定的便通凝胶贴膏的制备工艺可行, 药效学实验表明虽然凝胶贴膏组治疗便秘起效较慢, 但是与口服的阳性对照组比较, 缓释效果较好, 针对老年便秘而言, 市售的常用泻下药治标不治本, 服用后短期达到治疗便秘的效果, 之后又容易复发。基于此, 便秘患者可以在服用泻药的同时贴敷便通凝胶贴膏, 这样既缓解了短期便秘, 又因为外用贴敷, 达到长时间释放, 减少了老年人的口服用药剂量, 提高患者的顺应性。此外, 中药外用制剂具有携带安全、使用方便、随时终止用药的特点, 增加了患者的依从性, 在临床应用方面具有巨大的发展潜力。

参考文献

[1] 康蕾, 梁磊, 洪关婷, 等. 基于网络药理学及分子对接方法探析厚朴三物汤治疗便秘的机制研究[J]. 现代药物

与临床, 2024, 39 (2): 335-341.

- [2] 席雨婷, 周建平, 张萌萌, 等. 中医补肾疗法治疗肾阳虚型便秘的研究进展[J]. 云南中医中药杂志, 2024, 45 (2): 94-97.
- [3] 史勇, 董岩. 老年慢性便秘临床治疗研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2022, 42 (23): 5897-5903.
- [4] 王宇. 慢性便秘非手术治疗的进展[J]. 医学理论与实践, 2020, 33 (20): 3361-3363.
- [5] 王锐, 刘仍海, 屈映, 等. 中药神阙穴贴敷缓解混合痔术后早期排便困难临床随机对照研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2020, 15 (6): 1114-1117, 1121.
- [6] 冯娟, 陈桂兰. 大黄外敷神阙穴联合胃肠起搏在老年功能性便秘患者中的应用[J]. 中国医药导报, 2020, 17 (36): 159-162.
- [7] 万小波, 肖勇, 方莎. 中药神阙穴贴敷治疗老年便秘临床研究[J]. 实用中医药杂志, 2023, 39 (6): 1225-1227.
- [8] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 1346-1347.
- [9] 戴泽琦, 万楚川, 李文爽, 等. 便通胶囊/片治疗便秘临床综合评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29 (19): 160-167.
- [10] 黄涛, 朱跃坤. 慢传输型便秘分子机制研究及临床应用现状[J]. 中华消化病与影像杂志(电子版), 2024, 14 (1): 82-89.
- [11] 黎彩凤, 高启霞, 沙子珺, 等. 慢性便秘的发病机制及中医药防治概述[J]. 山东中医杂志, 2021, 40 (8): 895-903.
- [12] 李雪. 慢传输型便秘患者结肠动力学与胃肠激素的关系研究[J]. 当代临床医刊, 2023, 36 (3): 13-14.
- [13] 梁志远, 甘秀海, 吴坤, 等. 正交试验优选白术中白术内酯 I 和白术内酯 III 提取工艺[J]. 中成药, 2015, 37 (6): 1356-1360.
- [14] 董佳妮, 赵龙山, 薄彧坤, 等. 响应曲面法联合遗传算法优化天然低共熔溶剂提取肉苁蓉中苯乙醇苷类成分的工艺[J]. 中国药房, 2022, 33 (13): 1605-1611.
- [15] 彭成, 王岚, 赵小梅. SD 大鼠阳虚便秘模型的建立及评价[J]. 中国药理学通报, 2007, 23 (3): 407-409.

(收稿日期: 2024-01-16; 修回日期: 2024-05-13)

基于药效团模型的 PPAR δ 激动剂的筛选及活性研究

李琦^{1,2}, 魏朝², 张鑫磊², 郭凯蕾³, 马丽莎², 何金穗³, 孙定康³, 梁佳龙⁴, 林佳艳², 张澎湃^{1*}, 刘雪英^{2*} (1. 河南大学生命科学学院, 河南 开封 475004; 2. 空军军医大学药理学系, 西安 710000; 3. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046; 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** 筛选具有 PPAR δ 激动活性的化合物。**方法** 通过构建 PPAR δ 药效团模型对 Top Science 数据库中的 780 万个小分子进行筛选, 并采用对接分析通过化合物与受体之间的结合作用模式及其靶点选择性进行筛选; 通过分子动力学模拟的方法, 确定苗头化合物, 进而通过体外活性实验获得 PPAR δ 激动剂。**结果** 通过计算机虚拟筛选获得了 24 个潜在 PPAR δ 激动剂, 分子对接结果表明, 化合物 3、5、9 为潜在的 PPAR δ 选择性激动剂。体外激动活性实验表明化合物 3、5、9 具有一定的 PPAR δ 激动活性。**结论** 与化合物 3、5 相比, 化合物 9 拥有更强的体外激动活性 ($EC_{50} = 17.66 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 后续可进行结构迭代优化, 为进一步开发 PPAR δ 激动剂奠定了基础。

关键词: 虚拟筛选; 药效团模型; 分子对接; 分子动力学模拟

中图分类号: R913

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)07-1705-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.004

Screening and activity of PPAR δ agonists based on pharmacophore model

LI Qi^{1,2}, WEI Zhao², ZHANG Xin-lei², GUO Kai-lei³, MA Li-sha², HE Jin-sui³, SUN Ding-kang³, LIANG Jia-long⁴, LIN Jia-yan², ZHANG Peng-pai^{1*}, LIU Xue-ying^{2*} (1. College of Life Sciences, Henan University, Kaifeng Henan 475004; 2. Department of Pharmacy, Air Force Military Medical University, Xi'an 710000; 3. School of Pharmacy, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712046; 4. Medical Security Center of the 946 Hospital of the Chinese People's Liberation Army, Yining Xinjiang 835000)

Abstract: Objective To screen the compounds with PPAR δ agonizing activity. **Methods** PPAR δ pharmacophore model was established to screen 7.8 million small molecules in the Top Science database. Docking analysis was used to screen the binding mode and target selectivity between compounds and receptors. PPAR δ agonists were obtained by in vitro activity experiment after identifying the hits with molecular dynamics simulation. **Results** Totally 24 potential PPAR δ agonists were obtained by computer virtual screening. Molecular docking indicated that compounds 3, 5, and 9 were potential PPAR δ selective agonists and showed certain PPAR δ activity in the in vitro activity tests. **Conclusion** Compound 9 can be used as a hit for structural iterative optimization, which lays a foundation for further development of PPAR δ agonists with stronger in vitro activity ($EC_{50} = 17.66 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

Key words: virtual screening; pharmacophore model; molecular docking; molecular dynamics simulation

过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferator activated receptors, PPARs) 属于核受体超家族, 有三种亚型: PPAR α 、PPAR γ 和

PPAR δ ^[1]。PPAR α 主要存在于与脂质代谢相关的组织中, 如肝脏及肾脏组织等, 可促进脂肪酸和脂蛋白的代谢^[2]。PPAR γ 是目前研究最广泛的一

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: 李琦, 男, 硕士研究生, 主要从事计算机辅助药设计、药物合成及活性研究, email: 18729936952@163.com *通信作者: 张澎湃, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事生物工程研究, email: bio_apai@163.com; 刘雪英, 女, 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

种亚型，其在脂肪组织中高度表达。PPAR δ 在体内分布广泛、高度表达，是发育和代谢过程中非常重要的调节因子。PPAR δ 可与脂肪酸和花生酸结合，这表明它与脂肪代谢有关^[3-4]。激活 PPAR δ 能够增加胆固醇的逆转运、调节脂质和糖类的代谢、控制能量平衡，从而达到降脂、抗炎、促进伤口愈合、提高高密度脂蛋白胆固醇水平、改善动脉粥样硬化的目的^[5]。此外，研究表明 PPAR δ 和小鼠的胚胎移植以及结肠肿瘤细胞的凋亡有着直接关系。

一直以来，有关 PPAR δ 激动剂的研究备受科研工作者的关注。目前有几种新型的 PPAR δ 激动剂已经获得了专利，并被用于代谢性疾病、心血

管性疾病等领域中。根据文献报道^[6]，美国托力多大学研发了 PPAR δ 激动剂（见图 1），用于治疗 and 预防代谢性骨疾病，化合物 6 可诱导骨的生成与分化，同时促进体内脂肪生成；而化合物 7 可以在促进骨生成的同时几乎不影响脂肪生成。Levy 等^[7] 报道了一个 PPAR δ 激动剂 Seladelpar，该激动剂在治疗原发性胆管炎的同时减轻了患者瘙痒等症状，目前该药已进入 III 期临床阶段^[8]。在治疗糖尿病领域，Ren 等^[9] 开发出一个具有抗糖尿病作用的新药 GFT505，GFT505 为 PPAR α /PPAR δ 双靶点激动剂，其对 PPAR δ 表现出了中等激动活性。

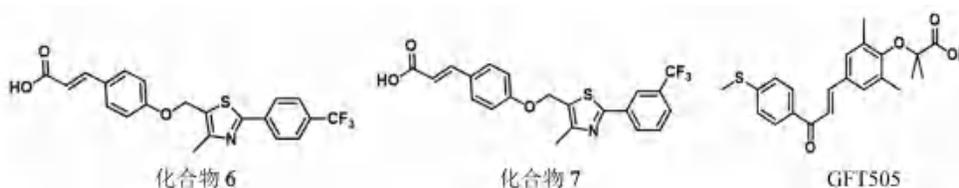


图 1 PPAR δ 激动剂的分子结构

Fig 1 Molecular structure of PPAR δ agonist

本研究拟通过计算机虚拟筛选及体外活性实验筛选出新型 PPAR δ 激动剂，为进一步开发新型 PPAR δ 激动剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 数据来源与实验环境

1.1.1 数据来源 通过对 PDB 数据库中 PPAR δ 不同蛋白晶体结构的分辨率、蛋白长度等参数进行比较，选择了 PPAR δ 激动剂 GW501516 与 PPAR δ 的复合物晶体结构用于构建药效团模型及后续分子动力学模拟研究。该复合物晶体结构在 PDB 数据库中编号为：5U46，分辨率为 2.0 Å。同时选择 PDB 数据库中 PPAR α 与其激动剂 AZ242 复合物晶体结构（PDB ID：1I7G，分辨率：2.2 Å）和 PPAR γ 与其激动剂 BRL 晶体结构（PDB ID：2PRG，分辨率：2.2 Å）用于验证靶点选择性。

1.1.2 实验环境 本实验使用的计算平台为宝德 PR271ORN 2U 机架式服务器，配置英特尔至强 GOLD 6248R CPU 和英伟达 V100S 图形显卡。软件环境包括 Discovery Studio 3.5 和 Schrödinger 2020 版本。

1.2 药效团模型构建及验证

1.2.1 药效团模型的构建 基于受体-配体相互作用的药效团模型具有可靠的筛选精度^[10]。因此，本研究依据解析 5U46 中受体与配体的关键相互作用，利用 Discovery Studio 3.5 中的“Receptor-Ligand Pharmacophore Generation”模块构建基于受体-配体的药效团模型^[11]。参数 Maximum

Pharmacophores 设置为 10，Minimum Features 设置为 4，Maximum Features 设置为 6，其他均设为默认值。基于受体结合口袋中的 3 个关键氨基酸 His287、His413 及 Tyr437 与配体产生的氢键相互作用共构建 10 个药效团模型。

1.2.2 药效团模型的验证 通过测试集分子（测试集包括活性分子、非活性分子）对药效团模型的可靠性进行评价。使用 DUDE 诱饵在线生成器生成 PPAR δ 的测试集分子（测试集分子由 10 个活性分子、100 个非活性分子构成），选取 PPAR δ 的最佳药效团模型用于后续的虚拟筛选。

1.3 基于药效团模型的虚拟筛选

选择约 780 万个分子的 Top Science 数据库作为候选分子库，使用 Discovery Studio 3.5 软件中的 build 3D database 工具进行数据库构建。第一次筛选的原则基于类药五原则（Lipinski rules），剩余小分子数目约 760 万个。随后基于药效团模型进行第二次筛选，利用 Discovery Studio 3.5 中的部分匹配功能，筛选满足药效团的小分子。经过筛选，最后选中 24 个小分子。

1.4 分子对接

使用 Schrödinger 软件中的 Glide 模块将选中的 24 个小分子与 PPAR δ 进行高精度（XP）对接。蛋白质格点文件以 5U46、1I7G 和 2PRG 蛋白结构中的结晶分子为网格中心，网格框定义为 20 Å×20 Å×20 Å，使用 Receptor Grid Generation 生成格点文件用于对接，其他参数保持默认值。设置好合适的参数后，将

晶体结构中的配体分子提取出来重新处理后对接至预先定义好的对接盒子内。将对接后配体与原复合物晶体结构中的配体构象进行对比,通过计算均方根偏差 (root mean square deviation, RMSD) 验证所设定的对接参数的可靠性。

1.5 分子动力学模拟

首先将对接结果的蛋白与小分子配体分离通过 acpype 软件工具创建配体小分子的力场参数,随后合并蛋白和小分子配体的文件,构建复合物的模拟体系。

分子动力学模拟 (molecular dynamics, MD) 采用 Gromacs 2022 程序,在恒温恒压以及周期性边界条件下进行。使用 Amber99sb 力场和 TIP3P 水模型,创建好 15 Å×15 Å×15 Å 溶剂立方盒后,向体系中添加 47 个 Na⁺ 以保持电中性。在 MD 模拟过程中,所有涉及的氢键均采用 LINCS 算法^[12] 进行约束。采用 V-rescale^[13] 温度耦合方法控制模拟温度为 295 K,采用 Berendsen^[14] 方法控制压力为 1 bar。在 295 K 进行 100 ps 的 NVT 与 NPT 平衡模拟,对复合物体系进行 100 ns 的 MD 模拟,使用 RMSD 及均方根波动 (RMSF) 评估体系的动力学稳定性,每 10 ps 保存一次构象,使用 QtGrace 软件对轨迹进行分析。

1.6 PPAR δ 激动活性评价

1.6.1 仪器与试剂 GloMax 20/20 发光检测仪、ONE-Glo EX 检测试剂盒 (美国 Promega 公司); DMEM 高糖培养基 (武汉普诺赛生命科技有限公司); GW501516 (纯度 $\geq 99\%$, 美国 MedChem-Express 公司); 受试化合物 (上海陶术生物科技有限公司); PPAR δ -HEK293 稳转染细胞 (上海吉凯基因科技有限公司)。

1.6.2 方法 通过荧光素酶报告基因检测实验测定受试化合物的半数有效量 (EC_{50})^[2]。各受试化合物及阳性对照 GW501516 均用二甲基亚砜 (DMSO) 配制,并使用培养基稀释成浓度为: 1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-4} mol·L⁻¹ 的工作液; 阴性对照则加入相同体积比的 DMSO。

首先将细胞按 3×10^4 个孔的密度接种至 96 孔板中培养 24 h; 随后弃去培养基并加入上述受试化合物、阳性对照 (PPAR δ 激动剂 GW501516) 及阴性对照,每组设置 3 个平行对照。待药物作用 24 h 后,弃去培养基,并按照 ONE-Glo™ EX 检测试剂盒说明书提供的方法加入检测试剂,使用 GloMax® 20/20 发光检测仪检测荧光强度。最后,根据所测荧光强度按以下公式计算出化合物在每个浓度下的相对活性;并且在 GraphPad 软件中以浓度为横坐标,相对活性为纵坐标拟合曲线,

最终计算出每个化合物的 EC_{50} 值。

$$\text{相对活性} (\%) = (\text{Fold}_{\text{受试化合物}} - \text{Fold}_{\text{阴性对照}}) / (\text{Fold}_{\text{阳性对照}} - \text{Fold}_{\text{阴性对照}}) \times 100\%$$

其中, Fold 为化合物对 PPAR δ 的激活倍数; Fold = 化合物的荧光值 / 阴性对照的荧光值。

2 结果与分析

2.1 PPAR δ 与激动剂的相互作用模式和药效团模型

本研究对 5U46 复合物晶体结构进行了解析,在 PPAR δ 的活性口袋中, GW501516 头部的羧基分别与 His287、His413 及 Tyr437 形成三组氢键相互作用,距离分别为 1.88 Å、1.83 Å、1.91 Å。近端的苯环与 His413 形成一组 π - π 相互作用,距离为 4.55 Å (见图 2)。

根据以上分析的晶体复合物结构中配体分子与受体蛋白质之间相互作用模式,建立 PPAR δ 的药效团模型,共 10 个 (如表 1 所示)。其中 R 表示芳环中心, H 表示疏水特征, A 表示氢键受体特征, N 表示负电离中心。

表 1 PPAR δ 药效团模型构建结果

Tab 1 Establishment of PPAR δ pharmacophore model

模型编号	模型特征	模型编号	模型特征
01	AHHHNR	06	AHHHNR
02	HHHHNR	07	AHHHNR
03	AHHHHN	08	AHHHHN
04	AHHHHN	09	AHHHHN
05	HHHHHN	10	AHHHNR

药效团模型评估结果如表 2 所示,敏感度及特异性的值越高,说明模型区分活性与非活性化合物能力越强。通过综合评估 PPAR δ -08 药效团模型具备良好的筛选活性分子能力。PPAR δ -08 药效团模型见图 3。

表 2 PPAR δ 药效团模型评估结果

Tab 2 Evaluation of PPAR δ pharmacophore model

模型编号	敏感度	特异性	模型编号	敏感度	特异性
01	0.90	0.82	06	0.90	0.86
02	1.00	0.42	07	1.00	0.63
03	0.80	0.86	08	0.90	0.90
04	0.90	0.84	09	0.90	0.80
05	1.00	0.60	10	0.90	0.89

2.2 初步虚拟筛选结果

在 Discovery Studio 3.5 软件中使用 Search 3D database 应用,基于构建的 PPAR δ 最佳药效团模型对 Top Science 数据库中的化合物进行虚拟筛选。得到了 24 个符合药效团模型的化合物。各个化合物结构如图 4 所示。

2.3 分子对接

2.3.1 对接方法验证结果 将共结晶分子的对接构象与原复合物配体构象叠合^[15],并计算其

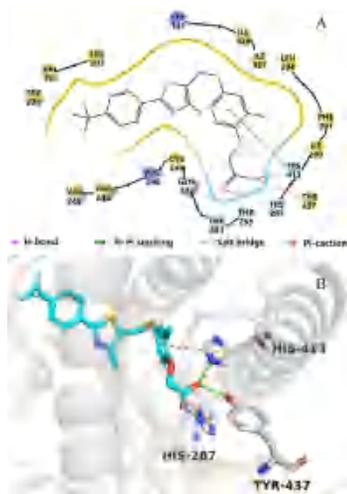


图 2 PPAR δ 与激动剂 GW501516 的 2D (A) 及 3D (B) 结合作用模式
Fig 2 2D (A) and 3D (B) binding modes of PPAR δ with agonist GW501516

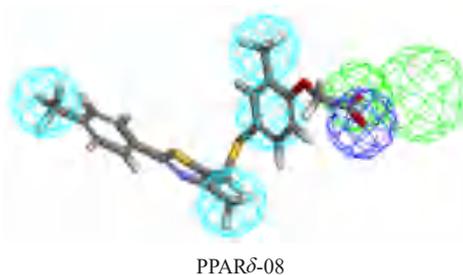


图 3 PPAR δ 最优药效团模型
Fig 3 PPAR δ optimal pharmacophore model

RMSD 值以考察复现率。PPAR α 激动剂 AZ242 对接构象与原始构象的叠合图如图 5A 所示, RMSD 值为 0.229 Å; PPAR γ 激动剂 BRL 与共结晶构象的 RMSD 值为 0.361 Å (见图 5B); 而 PPAR δ 激动剂 GW501516 的对接构象与复合物晶体构象的 RMSD 值为 0.206 Å (见图 5C)。说明本研究采用的对接方法及参数具备可靠性。

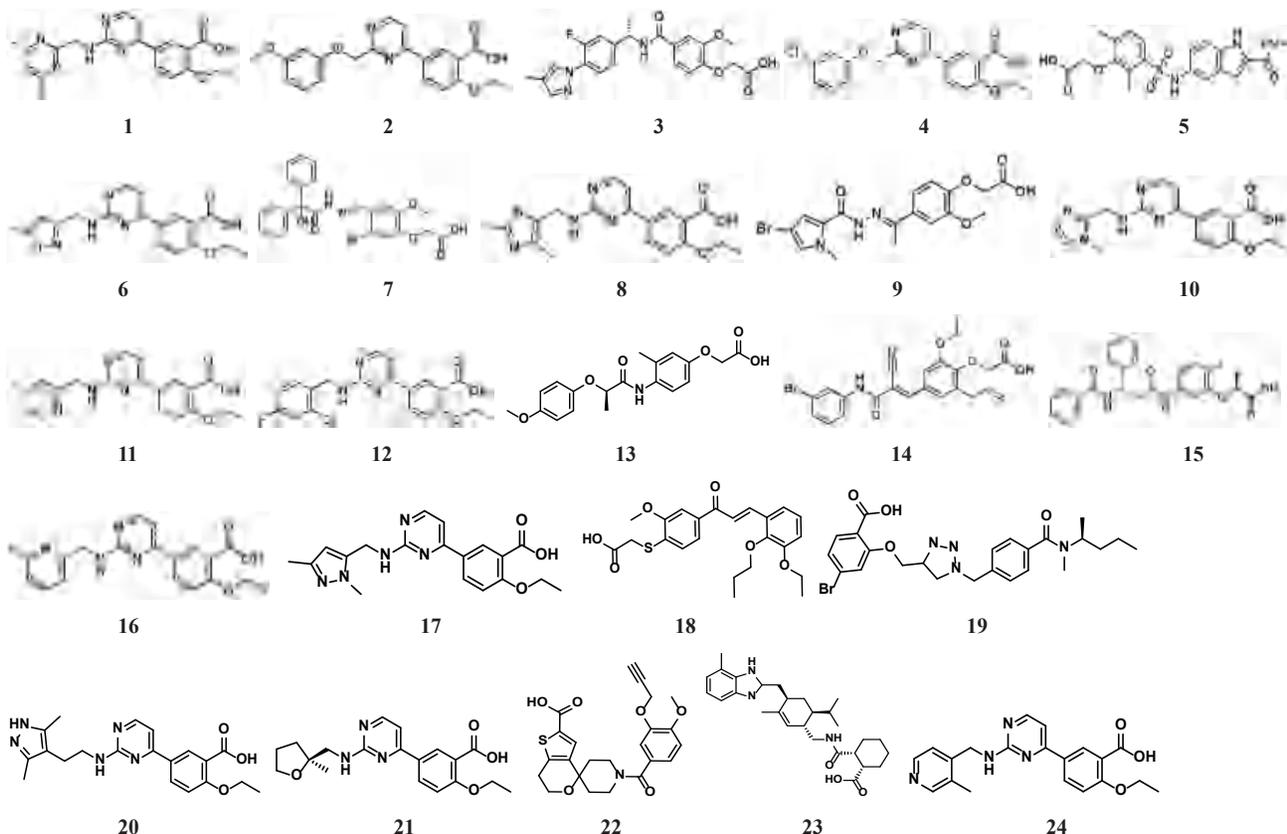


图 4 符合药效团模型的化合物结构
Fig 4 Compounds structures in accordance with pharmacophore model

2.3.2 小分子与 PPAR δ 对接结果分析 使用 Schrödinger 软件中的 Glide XP 模式将药效团模型初筛得到的 24 个化合物与 PPAR δ 对接, 随后使用 PyMol 软件对上述化合物与 PPAR δ 的结合作用模式进行逐一分析, 发现化合物 3、5、9 具有更优异的结合作用模式, 如图 6A ~ 6C 所示。化合物 3 分别与 His287、His413 及 Tyr437 形成三组氢键相互

作用, 键长分别为 2.43 Å、1.67 Å、1.61 Å; 化合物 5 分别与 His287、His413 及 Tyr437 形成三组氢键相互作用, 键长分别为 2.19 Å、2.13 Å、1.80 Å; 化合物 9 分别与 His287、His413 及 Tyr437 形成三组氢键相互作用, 键长分别为 1.94 Å、2.04 Å、1.99 Å。此外, 化合物 3 和 5 头部的苯环与 His413 分别形成了一组 π - π 堆积相互作用。

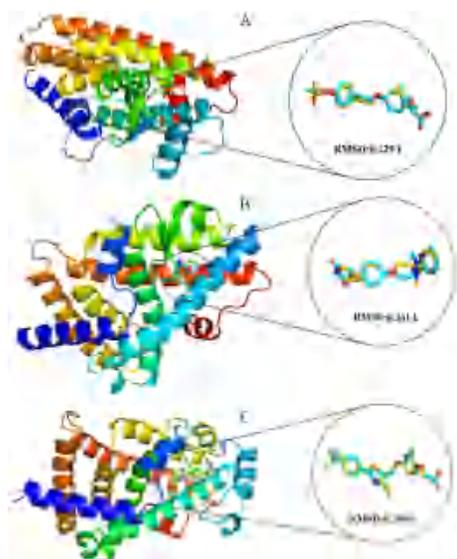


图 5 构象原配体与共结晶分子对接构象叠合图
Fig 5 Conformational overlap diagram of the original conformational ligand and the eutectic molecule

注 (Note): 青色棒代表原配体构象, 黄色棒代表对接配体构象 (The cyan rod represents the original ligand conformation and the yellow rod represents the docking ligand conformation)。

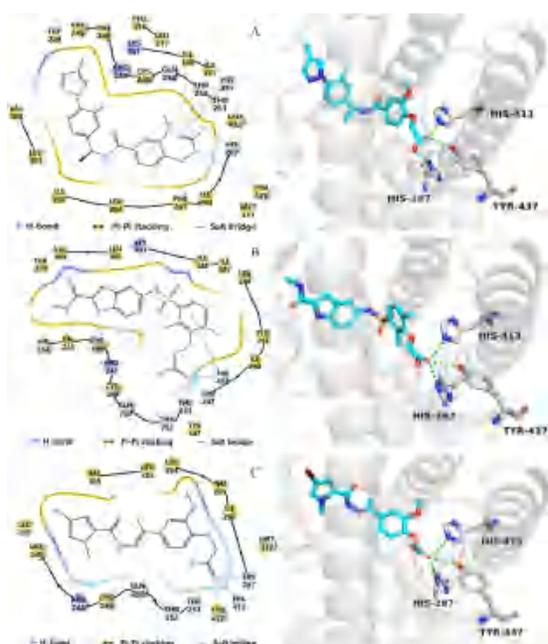


图 6 化合物 3 (A)、5 (B)、9 (C) 与 PPAR δ 结合模式的二维 (左) 及三维图 (右)
Fig 6 2D and 3D binding model diagram of compounds 3 (A), 5 (B), and 9 (C) binding to PPAR δ

2.3.3 靶点选择性分析 由于 PPARs 还存在另外两个亚型——PPAR α 和 PPAR γ , 因此通过分子对接验证了化合物 3、5、9 对这两个靶点的选择性。PPAR α 与原激动剂 AZ242 (阳性对照) 复合物晶体结构中的结合作用模式如图 7A 所示, AZ242 与 PPAR α 关键氨基酸 Ser280、Tyr314、Tyr464 及 His440 形成了四组氢键相互作用。而化合物 3、5、

9 与 PPAR α 的对接结果如图 7B ~ 7D 所示, 通过对接结果可知, 化合物 3、5、9 并未与 PPAR α 的关键氨基酸形成氢键相互作用。

PPAR γ 与其现有激动剂 BRL (阳性对照) 晶体结构中的结合作用模式如图 8A 所示, BRL 与 PPAR γ 关键氨基酸 Ser289、His323 及 Tyr473 形成了三组氢键作用。化合物 3、5、9 与 PPAR γ 的对接结果如图 8B ~ 8D 所示, 分子对接结果显示化合物 3、5、9 未与 PPAR γ 的关键氨基酸形成氢键相互作用。

2.4 分子动力学模拟

RMSD 表示某一时刻的构象与目标构象所有原子偏差的加和, 是衡量体系是否稳定的重要依据 [16]。PPAR δ 与化合物 3、5 和 9 号复合物体系的 RMSD 值随时间变化的结果如图 9A ~ 9C 所示, 在 100 ns 的模拟过程中, 这三个体系均在 20 ns 后波动逐渐趋于平稳, 复合物的 RMSD 值始终稳定在 0.15 ~ 0.23 nm, 波动较小。

复合物体系中氨基酸残基的 RMSF 如图 10 所示, 5U46-3、5U46-5 和 5U46-9 复合物体系结合口袋中氨基酸残基的 RMSF 值较小, 配体与关键氨基酸残基的结合作用稳定。

2.5 PPAR δ 激动活性评价结果

通过上述筛选得到化合物 3、5、9 可能是潜在的 PPAR δ 激动剂, 因此进一步通过 PPAR δ 激动活性评价发现化合物 9 对 PPAR δ 表现出了中等激动活性, EC_{50} 为 $17.66 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结果如表 3 所示。

表 3 化合物 PPAR δ 激动活性评价 ($n = 3$)
Tab 3 Evaluation of compound of the active activity on PPAR δ ($n = 3$)

化合物	结构	EC_{50} / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
GW501516		4.37×10^{-3}
化合物 3		72.15
化合物 5		119.90
化合物 9		17.66

3 讨论

本研究通过虚拟筛选、分子对接和分子动力学模拟及体外激动活性实验的方法, 寻找新型 PPAR δ 激动剂。研究所用的晶体结构中配体与受

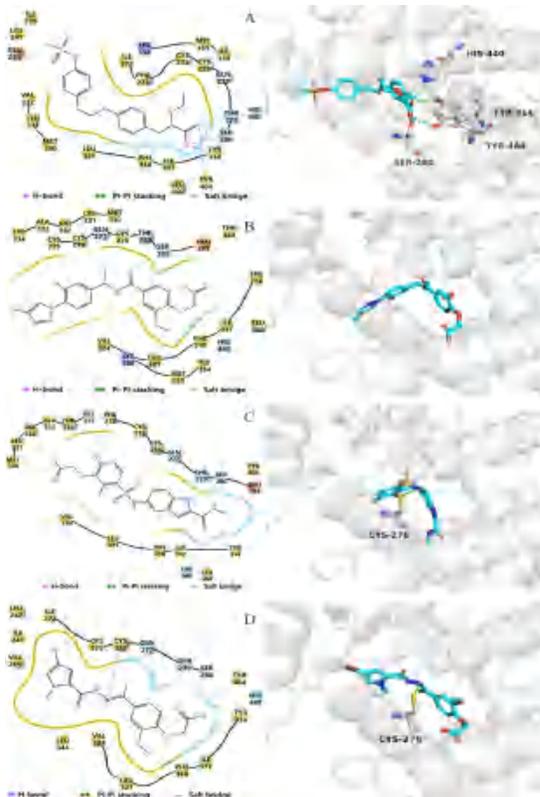


图 7 AZ242 (A) 及化合物 3 (B)、5 (C)、9 (D) 与 PPAR α 结合模式的二维(左)及三维图(右)

Fig 7 2D and 3D binding model diagram of AZ242 (A), compounds 3 (B), 5 (C), and 9 (D) binding to PPAR α

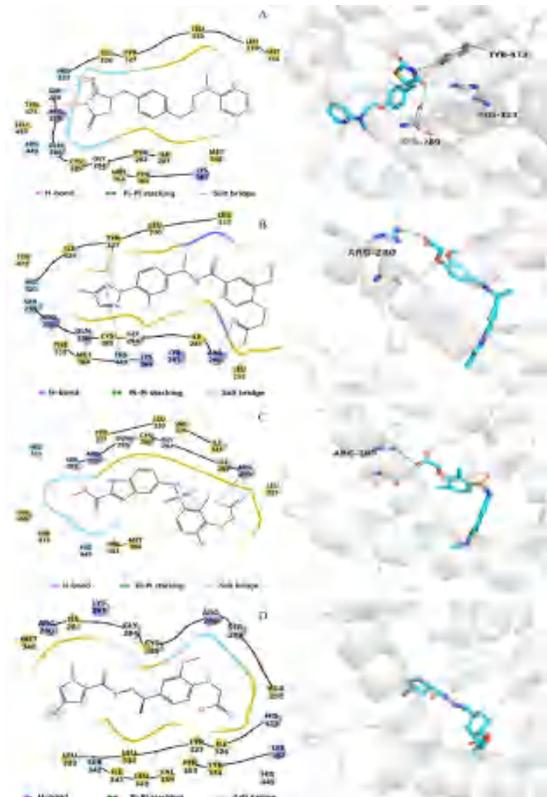


图 8 BRL (A) 及化合物 3 (B)、5 (C)、9 (D) 与 PPAR γ 结合模式的二维(左)及三维图(右)

Fig 8 2D and 3D binding model diagram of BRL (A), compounds 3 (B), 5 (C), and 9 (D) binding to PPAR γ

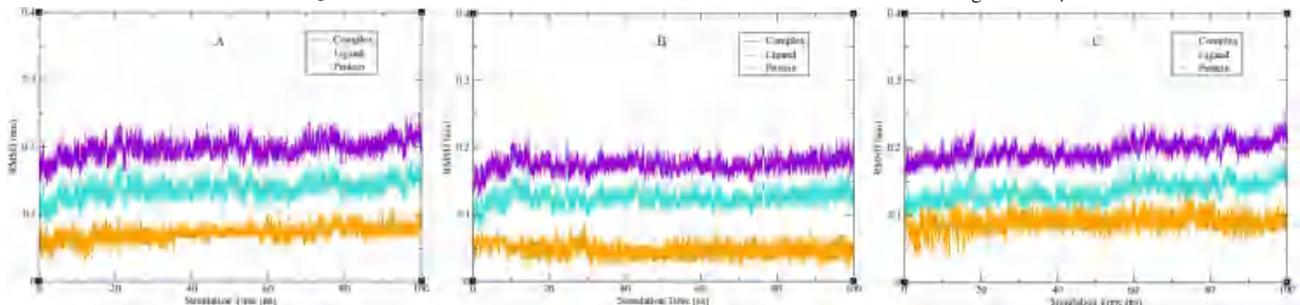


图 9 MD 模拟过程中 PPAR δ 分别与化合物 3 (A)、5 (B) 和 9 (C) 的 RMSD 图

Fig 9 RMSD diagrams of PPAR δ and compounds 3 (A), 5 (B) and 9 (C) respectively in the process of MD simulation

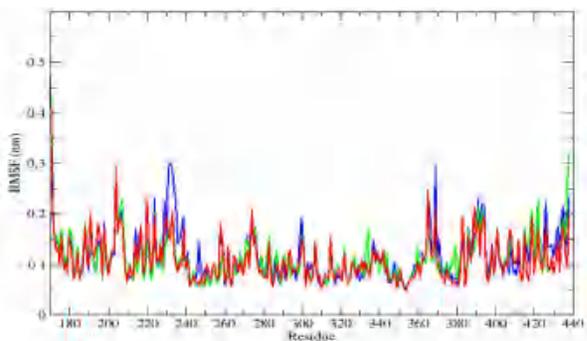


图 10 MD 模拟过程中复合物体系中的氨基酸残基 RMSF 图

Fig 10 Root mean square fluctuation diagram of amino acid residues in the complex system during MD simulation

注 (Note): 蓝色、绿色、红色分别代表 5U46-3、5U46-5 和 5U46-9 复合物体系 (Blue, green and red represent 5U46-3, 5U46-5 and 5U46-9 complex systems, respectively)。

体的相互作用主要是通过氢键结合, 因此在获得的药效团模型中, 氢键特征元素的占比较大, 表明所建药效团与晶体结构具有高度相关性, 模型可靠, 可用于快速准确地筛选先导化合物。通过构建的最佳药效团模型对 Top Science 数据库中的化合物进行初筛后共筛出 24 个与原复合物配体相同的药效团元素特征的小分子。

研究通过对复合物晶体分子的对接构象与原复合物配体构象进行叠合, 结果表明配体对接构象与共结晶构象几乎完全重合, 说明本研究构建的虚拟筛选模型具备可靠性。随后将初筛得到的 24 个小分子进行分子对接并对结合作用模式进行分析, 最终得到了 3 个结合作用模式与现有 PPAR δ 激动剂 (GW501516) 类似的化合物, 因此判断这 3 个化

合物可能具有与阳性激动剂相同的药理作用。此外通过将这 3 个化合物分别与 PPAR α 和 PPAR γ 进行分子对接,以验证这 3 个小分子对靶点的选择性,结果表明化合物 3、5、9 并未与 PPAR α 和 PPAR γ 结合口袋中的关键氨基酸形成氢键相互作用,说明化合物 3、5、9 为潜在的选择性 PPAR δ 激动剂。

采用 Gromacs 进行了 100 ns 的分子动力学模拟,以分析复合物体系的 RMSD 及 RMSF 随模拟时间波动情况。结果发现化合物 3、5、9 与 PPAR δ 蛋白的复合物体系在起始阶段存在一定的波动,推测可能是蛋白结构变化所导致;但随着模拟时间的延长,3 个复合物体系均可达到平衡,这说明了化合物 3、5、9 与蛋白的结合稳定。同时,受体与配体小分子结合的关键作用氨基酸残基有着较低 RMSF 值,说明复合物体系结合紧密。以上结果进一步印证了化合物 3、5、9 可能是潜在的 PPAR δ 激动剂。

由 PPAR δ 激动活性实验结果可看出筛选得到的 3 个化合物中,化合物 9 具有更高的激动活性,然而其激动活性仍低于阳性药物。这可能由以下两个原因所致:① 分子动力学模拟过程中,通过采集稳定构象发现化合物 9 头部的羧基在蛋白的结合口袋中与关键氨基酸只形成了一组氢键,这是由于化合物 9 的连接部分(Linker)较短从而使其头部羧基无法更加深入结合口袋中,活性降低。② 化合物 9 的 Linker 刚性较强,而 PPAR δ 的活性口袋存在一定的二面角,因此刚性较强的 Linker 可能会限制其在结合口袋中有利构象的生成。后期计划对化合物 9 的 Linker 进行进一步的结构衍生来降低该化合物的刚性并且适当增加碳链长度,以获得一系列活性更加出色的 PPAR δ 激动剂。

4 结论

本研究通过构建用于 PPAR δ 激动剂筛选的药效团模型,并对 Top Science 化合物库的 780 万个小分子进行筛选得到 24 个候选化合物;后又使用分子对接及分子动力学模拟筛选得到了具有较高结合稳定性的化合物 3、5、9。最后通过体外活性筛选确定了化合物 9 具有激活 PPAR δ 的作用(EC_{50} 为 $17.66 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

虽然通过分子对接结果来看化合物 9 并未与 PPAR α 和 PPAR γ 的关键氨基酸产生氢键相互作用,说明其可能并不会激活 PPAR α 和 PPAR γ 受体,但后续仍需通过进一步的体外活性试验证明。同时后续将围绕化合物 9 进行进一步结构优化,以获得活性更高的 PPAR δ 激动剂。

参考文献

- [1] Chandra A, Kaur P, Sahu SK, et al. A new insight into the treatment of diabetes by means of pan PPAR agonists [J]. Chem Biol Drug Des, 2022, 100 (6): 947-967.
- [2] 张君. 多靶点 PPARs 激动剂的设计、合成及体外活性评价 [D]. 天津: 天津医科大学, 2019.
- [3] Taygerly JP, Mcgee LR, Rubenstein SM, et al. Discovery of INT131: a selective PPAR γ modulator that enhances insulin sensitivity [J]. Bioorg Med Chem, 2013, 21 (4): 979-992.
- [4] Bajare S, Anthony J, Nair A, et al. Synthesis of N-(5-chloro-6-(quinolin-3-yloxy)pyridin-3-yl)benzenesulfonamide derivatives as non-TZD peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) agonist [J]. Eur J Med Chem, 2012, 58: 355-360.
- [5] Rikimaru K, Wakabayashi T, Abe H, et al. A new class of non-thiazolidinedione, non-carboxylic-acid-based highly selective peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma agonists: design and synthesis of benzylpyrazole acylsulfonamides [J]. Bioorg Med Chem, 2012, 20 (2): 714-733.
- [6] Kim DH, Liu J, Bhat S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist attenuates nicotine suppression effect on human mesenchymal stem cell-derived osteogenesis and involves increased expression of heme oxygenase-1 [J]. J Bone Miner Metab, 2013, 31 (1): 44-52.
- [7] Levy C, Manns M, Hirschfield G. New treatment paradigms in primary biliary cholangitis [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2023, 21 (8): 2076-2087.
- [8] Hirschfield GM, Bowlus CL, Mayo MJ, et al. A phase 3 trial of seladelpar in primary biliary cholangitis [J]. N Engl J Med, 2024, 390 (9): 783-794.
- [9] Ren Q, Deng LM, Zhou ZT, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of novel dual PPAR α/δ agonists for the treatment of T2DM [J]. Bioorg Chem, 2020, 101: 103963.
- [10] 高宇, 王凤雪, 刘海波. 虚拟筛选技术在天然产物新药研发中的应用 [J]. 国际药学研究杂志, 2020, 47 (8): 602-608.
- [11] 王菲, 刘飞远, 王毅, 等. 基于药效团模型的 DNA 错配修复化合物筛选 [J]. 中国药师, 2021, 24 (6): 1018-1025.
- [12] Hess B. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations [J]. J Chem Phys, 1998, 18 (12): 1463-1472.
- [13] Bussi G, Donadio D, Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling [J]. J Chem Phys, 2007, 126 (1): 014101.
- [14] Eslami H, Mojahedi F, Moghadasi J. Molecular dynamics simulation with weak coupling to heat and material baths [J]. J Chem Phys, 2010, 133 (8): 084105.
- [15] 王廷良, 张娜娜, 翁江, 等. 基于结构虚拟筛选发现蛋白质精氨酸甲基转移酶 5 抑制剂 [J]. 化学通报, 2023, 86 (9): 1137-1145.
- [16] 陈双扣, 唐思, 谭小庆, 等. 基于分子对接虚拟筛选铜绿假单胞菌胞外酶 exoS 抑制剂的研究 [J]. 化学研究与应用, 2023, 35 (7): 1624-1634.

(收稿日期: 2024-01-22; 修回日期: 2024-04-02)

黄芪甲苷脂质体原位凝胶眼部给药系统的研究

吕菊芳^{1,2}, 于艺斌³, 谢岩^{1,2}, 何鹏^{1,2}, 陈奋^{2*} (1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600; 2. 辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室, 沈阳 110847; 3. 中国医科大学, 沈阳 110122)

摘要: **目的** 制备黄芪甲苷 (ASIV) 脂质体原位凝胶 (ASIV lips gel), 对 ASIV lips gel 进行制剂学表征及细胞学评价, 探讨 ASIV lips gel 在眼部给药系统的应用潜力。 **方法** 采用乙醇注入法制备黄芪甲苷脂质体 (ASIV lips), 以包封率为考察指标进行 ASIV lips 处方及制备工艺优化, 对最优处方及工艺制得的 ASIV lips 进行表征; 以壳聚糖 (CS) 和甘油磷酸钠 (GP) 为凝胶基质, 通过物理交联制备 CS/GP 凝胶, 对 CS/GP 凝胶进行表征; 将 ASIV lips 载入 CS/GP 凝胶构建 ASIV lips gel, 并对 ASIV lips gel 进行稳定性研究、体外释放研究、细胞毒性及细胞摄取考察。 **结果** 最优处方及工艺制得的 ASIV lips 平均粒径为 (75.09±0.65) nm, 与透射电镜观察到的粒子大小接近, 且粒径分布均匀; 包封率可达 71.68%, 对 ASIV 具有较好的包载效率。红外光谱与 X 射线衍射分析可知已成功制得 CS/GP 凝胶; CS/GP 凝胶在扫描电镜下呈明显的三维网状结构, 35℃ 下胶凝时间为 3 min。ASIV lips gel 连续 7 d 粒径基本无明显变化, 稳定性良好; 体外释放结果表明, 与黄芪甲苷滴眼液相比, ASIV lips gel 有明显的缓释作用。细胞毒性结果显示 ASIV lips gel 对人视网膜色素上皮细胞毒性较低, 细胞相容性较好。分别用荧光显微镜定性观察、流式细胞仪定量分析制剂的细胞摄取情况, 结果表明, 脂质体原位凝胶制剂比滴眼液更易被人视网膜色素上皮细胞摄取。 **结论** 制备的 ASIV lips gel 在眼部温度下可自发成胶, 具有明显的缓释作用, 更易被人视网膜色素上皮细胞摄取, 有作为眼部给药系统的潜力。

关键词: 黄芪甲苷; 脂质体; 原位凝胶

中图分类号: R283.6, R285 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)07-1712-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.005

Ocular drug delivery system for astragaloside IV liposome in situ gel

LYU Ju-fang^{1,2}, YU Yi-bin³, XIE Yan^{1,2}, HE Peng^{1,2}, CHEN Fen^{2*} (1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian Liaoning 116600; 2. Key Laboratory of Ministry of Education for Traditional Chinese Medicine Viscera-State Theory and Applications, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847; 3. China Medical University, Shenyang 110122)

Abstract: Objective To prepare astragaloside IV (ASIV) liposome in situ gel (ASIV lips gel), characterize the formula and evaluate the cytology of ASIV lips gel, and determine the potential application of ASIV lips gel in ocular drug delivery system. **Methods** Astragaloside-IV liposome (ASIV lip) was prepared by ethanol injection. ASIV lips formula and preparation process were optimized with encapsulation efficiency as the evaluation index. ASIV lips with the best formula and process were characterized. Chitosan (CS) and sodium glycerophosphate (GP) were used as the gel matrix, CS/GP gel was prepared by physical crosslinking, and the properties of CS/GP gel were characterized. The ASIV lips were loaded into CS/GP gel to obtain ASIV lips gel, the stability, in vitro release, cytotoxicity and cell uptake of ASIV lips gel were determined. **Results** The average particle size of optimized ASIV lips was (75.09±0.65) nm, which was consistent with the particle size by transmission electron microscopy and the distribution was uniform. The encapsulation efficiency of ASIV lips prepared by the optimal formula

基金项目: 辽宁省自然科学基金博士科研启动项目 (No.2022-BS-146); 辽宁省教育厅面上项目 (No.LJKMZ20221324); 辽宁省科技计划联合计划项目 (No.2023JH2/101700198)。

作者简介: 吕菊芳, 女, 硕士研究生, 主要从事中药新型给药系统研究, email: 1779394425@qq.com ***通信作者:** 陈奋, 男, 博士, 高级实验师, 主要从事中药新型给药系统研究, email: chenfen1121@163.com

and process reached 71.68%, indicating good encapsulation efficiency for ASIV. The CS/GP gel was successfully prepared by infrared spectroscopy and X-ray diffraction. The CS/GP gel showed obvious three-dimensional network structure under scanning electron microscope, and the gelling time was 3 min at 35 °C. ASIV lips gel showed no obvious change in the particle size for 7 consecutive days, suggesting good stability. The in vitro release showed that compared with ASIV eye drops, ASIV lips gel had an obvious sustained-release effect. The cytotoxicity showed that ASIV lips gel had low toxicity to human retinal pigment epithelial cells and good cell compatibility. Liposome in situ gel was more easily absorbed by human retinal pigment epithelial cells than did eye drops. **Conclusion** The prepared ASIV lips gel can spontaneously form gel at eye temperature and has a fair sustained-release effect. It is more easily taken up by human retinal pigment epithelial cells and indicating possible ocular drug delivery system.

Key words: astragaloside IV; liposome; in situ gel

黄芪甲苷 (astragaloside IV, ASIV) 是黄芪的主要有效成分之一, 具有抗炎^[1-2]、抗病毒^[3]、抗肿瘤^[4]、抗纤维化^[5]和心脏保护^[6]等药理作用。研究表明, 黄芪甲苷在年龄相关性黄斑变性等眼后段疾病的治疗中有潜在的应用价值^[7-8]。然而黄芪甲苷水溶性差^[9], 通过眼表途径给药的黄芪甲苷在眼部会受到角膜屏障、结膜屏障等生理屏障的阻碍^[10], 难以到达眼后段靶部位。因此, 黄芪甲苷的眼部生物利用度很低, 在眼后段疾病中的治疗作用受到限制。

脂质体具有优良的生物相容性与生物可降解性, 进入眼部几乎无异物感, 不影响眼睛的正常生理功能。然而, 脂质体的黏度低, 眼用脂质体会受到泪液冲刷与鼻泪管引流的影响, 在眼部滞留时间短^[11]。因此, 眼用脂质体的眼部滞留能力亟待提高。原位凝胶是以溶液状态给药后能在用药部位由液态相变为半固体凝胶态的制剂^[12], 能够延长药物眼部滞留时间, 从而提高药物眼部生物利用度, 已被广泛用于眼部给药系统^[13]。

因此, 本研究利用脂质体与原位凝胶两种制剂手段协同作用, 以期黄芪甲苷治疗眼部疾病的临床应用提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20AT 高效液相色谱仪 (日本岛津公司); Biosafer150-96 超声波破碎仪 (南京赛飞生物科技有限公司); Zetasizer Lab 纳米粒度电位仪 (英国马尔文仪器有限公司); Tecnai G2 F30 高分辨透射电子显微镜 (美国 FEI 公司); D8 AdvanceX 射线衍射仪 (德国布鲁克公司); Apreo 2 超高分辨场发射扫描电镜、Nicolet IS 10 傅里叶变换红外光谱仪 (美国赛默飞世尔科技公司); PB-10 台式酸度计 (德国赛多利斯公司); NDJ-8S 数字式黏度计 (上海精天仪器有限公司); IX71 倒置荧光显微镜 (日

本奥林巴斯公司); FACS Celesta 型流式细胞分析仪 (美国 BD 公司)。

1.2 试剂

黄芪甲苷 (纯度 $\geq 98\%$, 上海易恩化学技术有限公司); 大豆卵磷脂 (上海艾伟拓医药科技有限公司); 胆固醇、壳聚糖 (上海麦克林生化科技有限公司); β -甘油磷酸二钠盐合物 (上海易恩化学技术有限公司); DMEM 细胞培养液、胎牛血清、胰蛋白酶、青霉素及硫酸链霉素 (上海 Invitrogen 贸易有限公司); 香豆素 6 (上海阿拉丁生化科技有限公司); 4% 多聚甲醛溶液、DAPI 染色液、抗荧光淬灭封片液 (北京索莱宝科技有限公司); CCK-8 试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); 甲醇、乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 黄芪甲苷脂质体 (AS IV lips) 的制备

采用乙醇注入法制备 ASIV lips: 将处方量黄芪甲苷、大豆卵磷脂、胆固醇溶于适量无水乙醇, 恒温搅拌, 缓慢注入水相中, 恒温水化, 挥净乙醇, 超声破碎, 0.22 μm 水膜过滤, 即得。

2.2 AS IV lips 包封率和载药量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent 5 TC-C18 (2) (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相 乙腈 - 水 (34 : 66); 检测波长 203 nm, 流速 1.0 mL \cdot min⁻¹; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL 。

2.2.2 标准曲线的建立 配制 500、200、100、50、20、10、5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 黄芪甲苷对照品溶液, 进样测定, 记录峰面积。以黄芪甲苷峰面积 (A) 对质量浓度 (c) 进行线性拟合, 得回归方程 $A = 925.92c + 832.84$ ($r = 0.9995$), 表明黄芪甲苷在 5 ~ 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与峰面积线性关系良好。

2.2.3 ASIV lips 包封率和载药量的测定 取制备好的 ASIV lips 0.5 mL, 加入超滤离心管中离心。

滤液用 0.22 μm 滤器过滤, HPLC 测定黄芪甲苷浓度, 计算总药量 W_{total} 和游离 ASIV 的含量 W_{free} 。包封率 (entrapment efficiency, EE) 和载药量 (drug loading, DL) 按以下公式计算:

$$EE (\%) = (W_{total} - W_{free}) / W_{total} \times 100\%$$

$$DL (\%) = (W_{total} - W_{free}) / W_{lipids} \times 100\%$$

其中, W_{total} 为总药量; W_{free} 为游离药量; W_{lipids} 为制剂中脂质材料总量。

2.3 ASIV lips 处方优化

以 ASIV lips 包封率为考察指标, 选取药脂比、膜材比、水浴温度、水浴时间以及超声功率 5 个因素, 对 ASIV lips 进行处方及制备工艺优化。结果如图 1 所示, 得到 ASIV lips 最优处方及制备工艺如下: 黄芪甲苷 2 mg, 大豆卵磷脂 80 mg, 胆固醇 20 mg, 溶于 5 mL 无水乙醇, 于 40 °C 水浴下, 缓慢注入水相中, 40 °C 水化 30 min, 80 °C 搅拌 20 min 挥净乙醇, 超声破碎 8 min (120 W, 工作 4 s, 间歇 2 s), 过 0.22 μm 水膜, 即得。通过最优处方及工艺制备的 ASIV lips 的包封率和载药量分别为 71.68% 和 1.95%, 表明 ASIV lips 对药物有较好的包载能力。

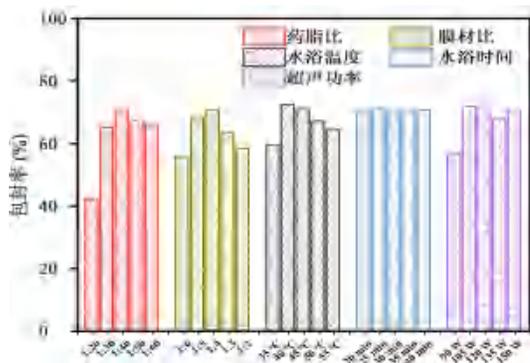


图 1 ASIV lips 处方优化

Fig 1 Optimization of the formulation of ASIV lips

2.4 ASIV lips 的表征

2.4.1 透射电子显微镜 (TEM) 观察 取少量 ASIV lips 样品滴在铜筛网上, 1% 磷钨酸负染色, TEM 观察拍照。结果如图 2 所示, 制备的 ASIV lips 形状较圆整, 平均粒径小于 100 nm, 分布较均匀, 粒子圆整。

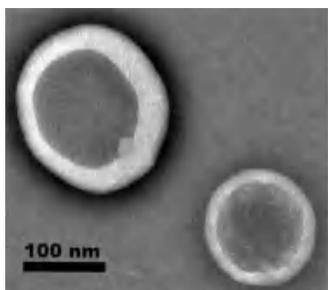


图 2 ASIV lips 的 TME 图

Fig 2 TME of ASIV lips

2.4.2 粒径分布和 Zeta 电位的测定 采用纳米粒度电位仪测定 ASIV lips 的粒径及其分布, 结果如图 3A 所示。平均粒径在 70 ~ 120 nm 的脂质体比较有利于药物在眼部的滞留和吸收^[14], ASIV lips 的平均粒径为 (75.09 ± 0.65) nm, 粒径多分散指数 (PDI) 为 0.16 ± 0.01, 粒径较小, 分布均匀, 适合眼部用药。采用激光粒径仪测定 Zeta 电位如图 3B 所示, 测得 ASIV lips 的 Zeta 电位为一 (6.64 ± 0.35) mV, 表明该脂质体带负电荷。

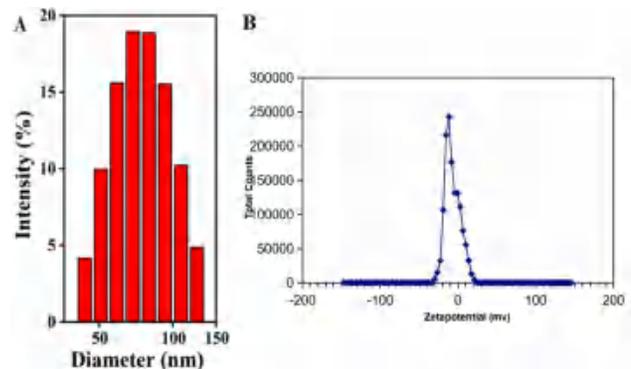


图 3 ASIV lips 的粒径分布图 (A) 和 Zeta 电势图 (B)

Fig 3 Particle size dispersion (A) and Zeta potential (B) of ASIV lips

2.4.3 ASIV lips 稳定性测定 用纳米粒度电位仪测定 ASIV lips 的粒径, 并每隔 24 h 重新测定。ASIV lips 样品在 7 d 内测得粒径为 (68.14 ± 0.95) nm, 没有明显的粒径变化, 表明 ASIV lips 在一周内稳定性良好。

2.5 黄芪甲苷脂质体原位凝胶 (ASIV lips gel) 的制备

2.5.1 CS/GP 凝胶的制备 将适量壳聚糖 (CS) 加入 0.1 mol · L⁻¹ 的醋酸溶液中, 搅拌 24 h 形成澄清的 CS 溶液; 将适量甘油磷酸钠 (GP) 溶于纯净水中形成 GP 溶液备用。然后将 CS 溶液在冰浴中冷却至 4 °C, 并将 GP 溶液滴加到 CS 溶液中, 继续搅拌 30 min 形成凝胶, 4 °C 备用。pH 计测得 CS/GP 凝胶 pH 为 7.31。

2.5.2 ASIV lips gel 的制备 将 CS 醋酸溶液与 ASIV lips 搅拌混匀, 冰浴中冷却至 4 °C, 并将 GP 溶液在搅拌下缓慢滴入, 继续搅拌 30 min, 混合均匀, 即得。

2.6 CS/GP 凝胶的制备及性质研究

2.6.1 处方优化 以 CS/GP 凝胶的黏度与胶凝时间为考察指标, 选取 CS 浓度与 GP 浓度两个因素, 对 CS/GP 凝胶进行处方优化。选取 CS 浓度为 1.8%、2.0%、2.2% 制备 CS/GP 凝胶, 结果如图 4A 所示: 随着 CS 浓度增加, CS/GP 凝胶胶凝时间变短, 黏度增大; CS 浓度为 2.2% 时制得凝

胶由于黏度过大，在 4℃ 保存过夜后发生自然胶凝，故选用 2.0%CS 进行后续实验。固定 CS 的浓度为 2.0%，选用 GP 浓度为 10%、14%、18%、20%、22% 制备 CS/GP 凝胶，结果如图 4B 所示：GP 浓度较低时，胶凝时间较长；随着 GP 浓度增大，胶凝时间变短；当 GP 浓度继续升高，胶凝时间反而增长，这可能是由于 GP 加入量过高导致溶液 pH 呈碱性而影响了胶凝时间^[15]，故 GP 浓度选用 18%。用倒瓶法^[16]测定最优处方 CS/GP 凝胶的胶凝时间为 3 min。

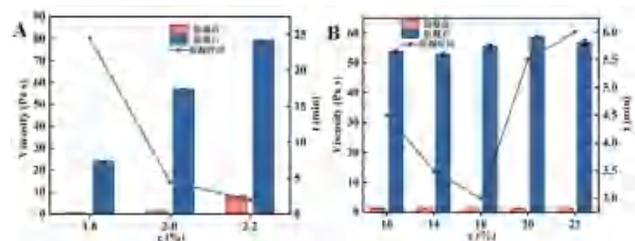


图 4 CS 浓度 (A) 与 GP 浓度 (B) 对 CS/GP 凝胶的影响
Fig 4 Effect of CS concentration (A) and GP concentration (B) on CS/GP gel

2.6.2 傅里叶红外光谱 (FT-IR) 分析 取干燥的 CS、GP 及 CS/GP 凝胶，分别与 KBr 粉末混合，研磨后压片。用红外光谱仪在 4000 ~ 500 cm⁻¹ 内扫描。图 5A 为 CS、GP 及 CS/GP 凝胶的红外光谱图。观察 CS 的谱图，3660 ~ 3000 cm⁻¹ 为 -NH₂、-OH 的伸缩振动峰，2868 cm⁻¹ 是糖环的伸缩振动峰，1588 cm⁻¹ 为 N-H 的弯曲振动峰，1150 cm⁻¹、1023 cm⁻¹ 是 -C-O-C- 的伸缩振动峰。观察 GP 的谱图，1050 cm⁻¹ 为 -P-O-C- 的伸缩振动峰，962 cm⁻¹ 和 519 cm⁻¹ 为 PO₄²⁻ 的伸缩振动峰。观察 CS/GP 的谱图，在 1570 cm⁻¹、966 cm⁻¹ 处分别观察到了 N-H 的弯曲振动峰与 PO₄²⁻ 的伸缩振动峰，以上结果表明，通过 CS 与 GP 的物理交联，成功制备了 CS/GP 凝胶。

2.6.3 X 射线衍射分析 应用粉末 X 射线衍射仪分析两种原料 CS、GP 及 CS/GP 凝胶的晶型情况。如图 5B 所示，CS 在 2θ = 20.03° 和 2θ = 29.43° 处有两个明显的衍射峰，证明了 CS 以结晶态存在；GP 在 2θ = 11.33° 和 12.59° 等有明显的衍射峰，证明了 GP 以结晶态存在；而 CS/GP 凝胶基本观察不到衍射峰，这是因为 CS/GP 发生了物理交联，降低了体系中三维构象的自由度，从而抑制聚合物链的堆积，限制了结晶的形成^[17]。X 射线衍射结果表明已合成了性质与两种原料不同的水凝胶。

2.7 扫描电子显微镜 (SEM) 观察

应用 SEM 对 CS、GP、CS/GP 凝胶与 ASIV lips gel 的形态进行观察。结果如图 6 所示，CS/

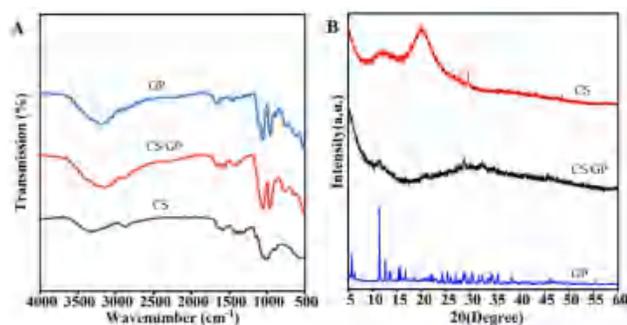


图 5 CS/GP 凝胶的傅里叶红外光谱图 (A) 和 X 射线衍射图 (B)
Fig 5 FTIR spectra (A) and X-ray diffraction patterns (B) of CS/GP gel

GP 凝胶呈明显的三维网状结构，孔径约 45 μm，与原料 CS、GP 的不规则结构明显不同。与 CS/GP 凝胶相比，载入黄芪甲苷形成 ASIV lips gel 并不会破坏 CS/GP 凝胶原有的三维网状结构，ASIV lips gel 仍旧呈现明显的三维网状结构。

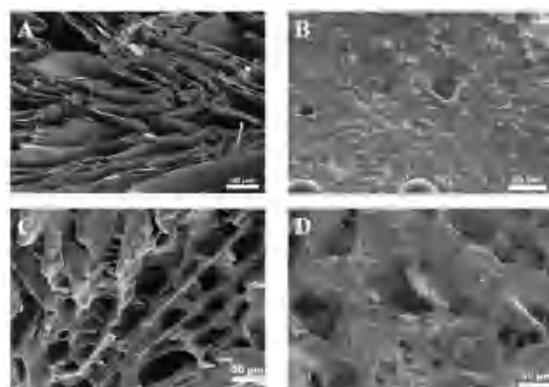


图 6 CS (A)、GP (B)、CS/GP 凝胶 (C) 与 ASIV lips gel (D) 的扫描电镜图

Fig 6 SEM of CS (A), GP (B), CS/GP gel (C) and ASIV lips gel (D)

综上，由表征结果分析可知，已通过物理交联的方法成功制得 CS/GP 凝胶，其孔径约为 45 μm，适合对纳米给药系统进行包载。

2.8 AS IV lips gel 稳定性评价

利用纳米粒度电位仪测定 ASIV lips gel 的粒径，并每隔 24 h 重新测定。ASIV lips gel 在 7 d 内粒径为 (68.06 ± 1.64) nm，没有明显的粒径变化，说明 ASIV lips 载入水凝胶后没有颗粒聚集，表明 ASIV lips gel 在一周内稳定性良好。

2.9 AS IV lips gel 体外释放研究

采用膜透析技术进行 ASIV lips gel 的体外释放研究。释放介质为含 1% Tween 80 的 (pH 7.4) 磷酸盐缓冲液 (PBS)。取 ASIV lips gel 适量装入透析袋 (截留分子量 8000 ~ 14 000)，然后置于盛有 40 mL 释放介质中 (满足漏槽条件)，置于恒温水浴振荡器中，转速为 100 r · min⁻¹，温度为 37℃。分别于特定时间点取样 1 mL，并补充 1 mL 已预热的新鲜介质，0.45 μm 微孔滤膜过滤后

用 HPLC 分析药物浓度及累计释放率。

体外释放结果如图 7 所示, ASIV eye drops 在 60 h 左右基本释放完全, 相同时间内 ASIV lips 和 ASIV lips gel 的释放率分别约为 75% 和 55%, 表明 ASIV lips 较 ASIV eye drops 具有一定的缓释作用, 这是由于药物被包裹于脂质体内, 在组织中能降低扩散, 缓慢释放药物, 从而起到缓释作用。而将 ASIV lips 载入凝胶后, 凝胶内部的三维网状结构时也会对药物起到缓释作用, 因此 ASIV lips gel 缓释效果更明显。

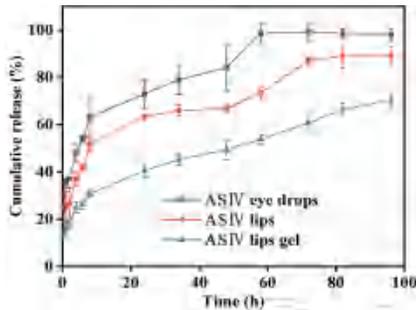


图 7 ASIV 的体外释放 (n = 3)

Fig 7 In vitro release of ASIV lips (n = 3)

2.10 AS IV lips gel 的细胞学评价

2.10.1 细胞培养 -80 °C 冻存的人视网膜色素上皮细胞 (ARPE-19, 美国 ATCC 公司), 复苏后转移至培养瓶中培养, 1 ~ 2 d 后换液, 取对数生长期细胞进行后续实验。

2.10.2 细胞毒性评价 取对数生长期的 ARPE-19 细胞, 胰酶消化后计数。以 1×10^5 个 / 孔的密度接种到无菌 96 孔培养板 (100 μ L / 孔), 孵育 24 h, 弃去培养液, 加入 100 μ L 含如下制剂的新鲜培养液: DMSO、ASIV eye drops、ASIV lips、blank lips、ASIV lips gel、blank lips gel; 以只加培养基作对照, 每个样品重复 5 孔。继续孵育 24 h 后, 每孔加入 10 μ L CCK8 试剂。继续孵育 1.5 h, 酶标仪于 450 nm 处测定吸光度, 计算细胞存活率。结果如图 8 所示, ASIV eye drops 组的细胞存活率小于 50%, 对 ARPE-19 细胞产生明显毒性, 这可能是由于制备 ASIV eye drops 时用到的溶剂 (10% DMSO) 改变了细胞膜的结构, 从而产生明显的细胞毒性。而 ASIV lips、blank lips、ASIV lips gel、blank lips gel 组的细胞存活率均高于 100%, 这可能是由于脂质体处方中的辅料对细胞生长起到了促进作用^[18], 且对 ARPE-19 细胞不会产生细胞毒性, 有作为眼部给药系统的潜力。

2.10.3 细胞摄取评价 将灭菌的盖玻片放入 12 孔培养板中。对数生长期的 ARPE-19 细胞以 1×10^5 个 / 孔的密度接种到 12 孔培养板中 (500 μ L / 孔), 孵育 24 h 后弃去培养基, 加入含有脂溶性染料 C6

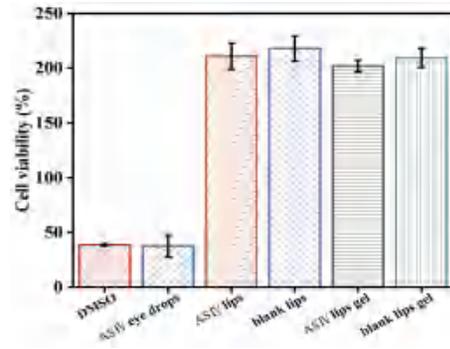


图 8 不同制剂对 ARPE-19 细胞毒性 (n = 5)

Fig 8 Cytotoxicity of different preparations on ARPE-19 (n = 5)

制剂 (eye drops, lips 和 lips gel) 的新鲜培养基 200 μ L, 重复 3 孔, 继续孵育 6 h。PBS 清洗, 常温避光条件下加入 1 mL 4% 多聚甲醛溶液固定细胞 30 min。PBS 清洗后加入适量 DAPI 染色液, 再用 PBS 清洗。随后将盖玻片倒扣在预先滴有抗荧光淬灭封片液的载玻片上, 于荧光显微镜下观察 ARPE-19 细胞对不同制剂的摄取情况。

ARPE-19 细胞对不同制剂的摄取结果如图 9 所示, 其中绿色荧光信号来自脂溶性染料 C6, 绿色荧光的强弱可以反映出 ARPE-19 细胞对制剂的摄取情况。可知 PBS 组无绿色荧光出现, eye drops 组几乎观察不到绿色荧光, 而 lips 组和 lips gel 组的绿色荧光均要显著强于 eye drops 组, 说明药物载入制备的载药体系后有助于被 ARPE-19 细胞摄取。

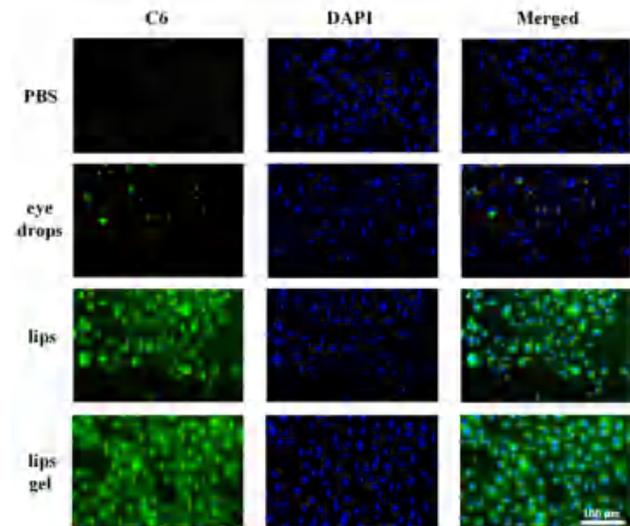


图 9 荧光显微镜观察人视网膜色素上皮细胞对不同制剂的摄取情况

Fig 9 Observation of uptake of different preparations by human retinal pigment epithelial cells using fluorescence microscopy

2.10.4 流式细胞仪考察细胞摄取情况 细胞模型的建立同“2.10.3”项下, ARPE-19 细胞在含有 C6 制剂 (eye drops, lips 和 lips gel) 的培养基中培养 6 h 后, 用 PBS 清洗, 消化后用 PBS 重悬, 采用

流式细胞仪测定细胞中 C6 的荧光强度，并对荧光强度进行定量分析。从图 10 可以看出，流式细胞仪的测定结果与荧光显微镜观察结果一致，lips 组与 lips gel 组的荧光强度要显著高于 eye drops 组 ($P < 0.001$)，进一步证实难溶性药物载入制备的载药体系后有助于被 ARPE-19 细胞摄取。

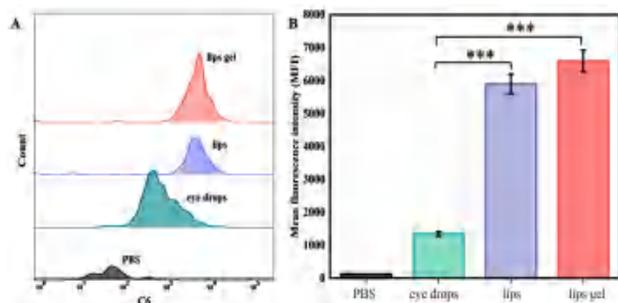


图 10 流式细胞仪定量分析人视网膜色素上皮细胞对不同制剂的摄取情况 (** $P < 0.001$)

Fig 10 Quantitative analysis of uptake of different preparations by human retinal pigment epithelial cells using flow cytometry (** $P < 0.001$)

3 讨论

脂质体具有高渗透性，安全无毒，且对难溶性药物包载效果好等优点。原位凝胶制备简单，易于给药，且能延长药物滞留时间。本研究结合两种剂型的优点，以难溶性药物黄芪甲苷为模型药物制备了新型眼部给药系统，即黄芪甲苷脂质体原位凝胶眼部给药系统，以期改善黄芪甲苷的眼部生物利用度。

在细胞摄取实验中，视网膜色素上皮细胞对 lips 和 lips gel 的摄取效果要好于 eye drops，这可能是因为脂质体的结构与生物膜类似，能够促进包载的药物渗透进入细胞，从而提高细胞对药物的摄取能力。

综上，ASIV lips gel 稳定性良好，缓释效果好，适合眼部用药；且该给药系统安全无毒，视网膜细胞摄取效果良好，因此 ASIV lips gel 有作为眼部给药系统的潜力。

参考文献

[1] Feng H, Zhu XY, Tang Y, et al. astragaloside IV ameliorates diabetic nephropathy in db/db mice by inhibiting NLRP3 inflammasome-mediated inflammation [J]. *Int J Mol Med*, 2021, 48 (2): 164.

[2] Jin HF, Jiao Y, Guo LN, et al. astragaloside IV blocks monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension by improving inflammation and pulmonary artery remodeling [J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47 (2): 595-606.

[3] Indu P, Arunagirinathan N, Rameshkumar MR, et al. Antiviral activity of astragaloside II, astragaloside III and

astragaloside IV compounds against dengue virus: computational docking and in vitro studies [J]. *Microb Pathog*, 2021, 152: 104563.

[4] Liu W, Chen H, Wang DS. Protective role of astragaloside IV in gastric cancer through regulation of microRNA-195-5p-mediated PD-L1 [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2021, 43 (4): 443-451.

[5] Wei YC, Wu Y, Feng K, et al. astragaloside IV inhibits cardiac fibrosis via miR-135a-TRPM7-TGF- β /Smads pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 249: 112404.

[6] Zhang XQ, Qu HY, Yang T, et al. astragaloside IV attenuate MI-induced myocardial fibrosis and cardiac remodeling by inhibiting ROS/caspase-1/GSDMD signaling pathway [J]. *Cell Cycle*, 2022, 21 (21): 2309-2322.

[7] Song QT, Zhao Y, Yang YR, et al. astragaloside III protects against retinal iron overload toxicity through iron regulation and the inhibition of MAPKs and NF- κ B activation [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2021, 410: 115361.

[8] Peng XR, Zhang TT, Wu YJ, et al. mPEG-CS-modified flexible liposomes-reinforced thermosensitive sol-gel reversible hydrogels for ocular delivery of multiple drugs with enhanced synergism [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2023, 231: 113560.

[9] Sun R, Zhang AA, Ge Y, et al. Ultra-small-size astragaloside-IV loaded lipid nanocapsules eye drops for the effective management of dry age-related macular degeneration [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2020, 17 (9): 1305-1320.

[10] 彭后平, 孙丽萍, 李晓林, 等. 眼表局部给药的屏障及克服屏障的方法研究进展 [J]. *药学进展*, 2021, 45 (11): 835-847.

[11] He W, Guo XX, Feng M, et al. In vitro and in vivo studies on ocular vitamin A palmitate cationic liposomal in situ gels [J]. *Int J Pharm*, 2013, 458 (2): 305-314.

[12] Eleraky NE, El-Badry M, Omar MM, et al. Curcumin transferosome-loaded thermosensitive intranasal in situ gel as prospective antiviral therapy for SARS-Cov-2 [J]. *Int J Nanomedicine*, 2023, 18: 5831-5869.

[13] Wu YM, Liu YY, Li XY, et al. Research progress of in-situ gelling ophthalmic drug delivery system [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2019, 14 (1): 1-15.

[14] Kaur IP, Garg A, Singla AK, et al. Vesicular systems in ocular drug delivery: an overview [J]. *Int J Pharm*, 2004, 269 (1): 1-14.

[15] 刘敏杰, 臧圣奇, 苗英, 等. 高温高压对壳聚糖/甘油磷酸钠温敏凝胶释药性能的影响 [J]. *临床口腔医学杂志*, 2015, 31 (1): 3-5.

[16] Deng AP, Kang X, Zhang J, et al. Enhanced gelation of chitosan/ β -sodium glycerophosphate thermosensitive hydrogel with sodium bicarbonate and biocompatibility evaluated [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 78: 1147-1154.

[17] 辛宝萍, 李晓娟, 郭亚可. 壳聚糖温敏凝胶的研究进展 [J]. *广州化工*, 2017, 45 (24): 47-49.

[18] 于世慧. 奈帕芬胺纳米结构脂质载体双敏型水凝胶眼部传递系统的设计与评价 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2018.

(收稿日期: 2023-12-04; 修回日期: 2024-05-23)

埃索美拉唑药物树脂复合物包衣微囊的制备及评价

茅关兴¹, 辛渊蓉², 窦玉甜², 王佳鹏², 刘宏飞^{2, 3*} (1. 上海医药工业有限公司, 上海 200002; 2. 江苏大学, 江苏 镇江 212000; 3. 江苏苏南药业实业有限公司, 江苏 镇江 212000)

摘要: **目的** 采用离子交换技术和流化床包衣技术制备具有肠溶效果的埃索美拉唑药物树脂复合物包衣微囊 (ESO-CM)。**方法** 以多孔阴离子交换树脂为载体, 静态载药法制备 ESO 树脂复合物 (ESO-DRC), 对其进行结合机制表征和体外释放考察。采用流化床包衣技术对 ESO-DRC 进行包衣, 制得 ESO-CM, 观察其形态并考察体外释放过程。**结果** 制备的 ESO-DRC 的载药量为 0.93 mg ESO/1 mg 树脂, 药物利用率为 92.30%。树脂与 ESO 通过离子键结合。在介质为 900 mL 0.15 mol·L⁻¹ NaCl 溶液, 介质温度 (37±0.5) °C, 转速 50 r·min⁻¹ 的体外释放条件下, ESO-DRC 可在 60 min 内释放 90% 左右。ESO-CM 粒径均匀, 表面光滑, 含量均一, 肠溶效果明显。**结论** 本研究成功开发了一种稳定、肠溶效果良好的埃索美拉唑药物树脂复合物包衣微囊。

关键词: 埃索美拉唑; 离子交换树脂; 流化床包衣技术; 肠溶包衣微囊

中图分类号: R944 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)07-1718-07
doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.006

Preparation and evaluation of esomeprazole drug resin complex coated microcapsules

MAO Guan-xing¹, XIN Yuan-rong², DOU Yu-tian², WANG Jia-peng², LIU Hong-fei^{2, 3*} (1. *Shanghai Pharmaceutical Industry Co., Ltd.*, Shanghai 200002; 2. *Jiangsu University, Zhenjiang Jiangsu* 212000; 3. *Jiangsu Sunan Pharmaceutical Industrial Co., Ltd., Zhenjiang Jiangsu* 212000)

Abstract: Objective To prepare esomeprazole drug resin complex coated microcapsules (ESO-CM) with enteric-coating effect through ion exchange and fluidized bed coating. **Methods** ESO drug resin complex (ESO-DRC) was prepared with static drug loading using porous anion exchange resin as the carrier. The binding mechanism and in vitro release were determined. ESO-DRC was coated with fluidized bed coating to prepare ESO-CM, whose morphology and in vitro release was observed. **Results** The drug loading of ESO-DRC was 0.93 mg ESO/1 mg resin, with drug utilization rate at 92.30%. The combination of resin and ESO was achieved through ionic bonds. Under the in vitro release conditions of 900 mL 0.15 mol·L⁻¹ NaCl solution, medium temperature of (37±0.5)°C, and rotation speed of 50 r·min⁻¹, about 90% of ESO-DRC was released within 60 min. ESO-CM had uniform particle size and content, smooth surface, and significant enteric dissolution effect. **Conclusion** This study successfully develops a stable ESO-CM with enteric-coating effect.

Key words: esomeprazole; ion exchange resin; fluidized bed coating; coated microcapsule

胃食管反流病 (gastro esophageal reflux disease, GERD) 是由于胃、十二指肠内物质反流进食管造成的一种消化系统疾病^[1]。质子泵抑制剂类药物抑酸效果持久、起效迅速, 是治疗 GERD 的

选药物^[2]。同其他质子泵抑制剂相比, 埃索美拉唑 (esomeprazole, ESO) 具有肝脏首过效应较低, 清除速率较慢, 生物利用度高, 个体差异小等优点, 抑酸能力更强, 作用更持久^[3-4]; 但是 ESO 在

基金项目: 2021 句容市社会发展科技计划项目 (No.ZA42109)。

作者简介: 茅关兴, 男, 高级工程师, 主要从事新药研发与产业化研究, email: gx701@126.com ***通信作者:** 刘宏飞, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事新药制剂研发、药品一致性评价研究, email: articlepharmacyliu@163.com

酸性环境中非常不稳定, 易在胃中降解失活。目前国内上市的肠溶胶囊、肠溶片剂及注射剂都可以避免药物在胃的高酸性条件下被破坏, 然而现有剂型存在使用不便、难以准确灵活分剂量、注射疼痛等局限性, 极大地限制了儿童患者的应用, 对吞咽困难者更是十分不友好。

离子交换树脂 (ion exchange resin, IER) 自开发以来已经广泛应用于药学领域, 有效解决了诸多制剂问题。当药物与 IER 结合形成药物树脂复合物后, 药物可进入 IER 骨架内部, 减少药物直接与环境接触的机会, 对药物形成有效的保护, 增强了药物稳定性^[5-6]。制备成制剂后, 药物树脂复合物是混悬在没有或仅有少量离子的介质中, 几乎不会有药物被置换下来, 也可避免药物渗漏, 且 IER 表面带有部分相同的电荷, 可在一定程度上降低微粒间的聚集, 从而显著提升制剂的稳定性^[7-8]。

本研究尝试以多孔阴离子交换树脂为药物载体制备 ESO 树脂复合物 (ESO-DRC) 减少药物与胃液接触, 进一步对 ESO-DRC 进行肠溶包衣制得埃索美拉唑药物树脂复合物包衣微囊 (ESO-CM), 实现药物在肠道的定位释放从而减少胃酸对药物的破坏, 为适宜儿童、吞咽困难患者的其他新剂型的开发提供参考。

1 材料

1.1 试药

ESO (上海邦成化工有限公司), 多孔阴离子交换树脂 (实验室自制), 欧巴代 amb II 包衣液 (上海卡乐康包衣技术有限公司), 尤特奇 L100 (赢创工业集团), 甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器

HJ-6B 型磁力搅拌器 (金坛市城西峥嵘实验仪器厂), D8 ADVANCE 型 X 射线衍射仪 (德国 BRUKER 公司), Avatar-370 型傅里叶红外光谱仪 (美国 Nicolet 公司), UV-1800PC 型紫外分光光度计 (上海美谱达仪器有限公司), DZF-6020 型电热恒温真空干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司), RCZ-8 型溶出仪 (上海黄海制药有限公司), SHB-D 型循环水式真空泵 (巩义予华仪器有限公司), BSA124S 万分之一电子天平 (北京赛多利斯科学仪器有限公司), JSM-7800F 场发射扫描电镜 (日本电子株式会社), FE28 pH 计 (梅特勒托利多集团)。

2 方法与结果

2.1 埃索美拉唑体外分析方法建立

2.1.1 紫外检测波长确定 称取 10 mg ESO 于 100 mL 量瓶, 纯水定容至刻度线, 精密吸取 1 mL 溶液稀释 5 倍, 得到质量浓度为 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 ESO 溶液, 进行全波长扫描, 扫描波长范围 200 ~ 400 nm; 取等量自制多孔阴离子交换树脂参照上述条件操作。结果显示, ESO 在 302 nm 处有吸收峰, 且空白树脂在此处附近基本没有吸收, 对 ESO 的检测不存在干扰。故选择 302 nm 作为 ESO 的紫外检测波长。

2.1.2 标准曲线建立 精密量取 0.5、0.75、1.0、1.25、1.5 mL 质量浓度为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 ESO 溶液置于 10 mL 量瓶, 分别以 pH 6.8 PBS、pH 9 NaOH 溶液、pH 12 NaOH 溶液、 $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、 $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、 $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl、 $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CH_3COONa 稀释定容, 得质量浓度为 5、7.5、10、15、20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准溶液, 于 302 nm 测定各浓度标准溶液的紫外吸收, 以吸光度 (A) 对 ESO 质量浓度 (C , $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 进行拟合, 得回归方程结果如表 1 所示。

表 1 ESO 在不同介质中的回归方程

Tab 1 Regression equation of ESO in different medium solution		
介质	回归方程	R^2
H ₂ O	$A = 0.0399C + 0.0071$	0.9997
pH 6.8 PBS	$A = 0.0395C + 0.01358$	0.9991
pH 9 NaOH	$A = 0.03443C + 0.01013$	0.9998
pH 12 NaOH	$A = 0.04056C - 0.0028$	0.9994
$0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl	$A = 0.0422C + 0.0188$	0.9996
$0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl	$A = 0.04704C + 0.0098$	0.9993
$1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl	$A = 0.03792C + 0.0308$	0.9993
$0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl	$A = 0.04704C + 0.0114$	0.9995
$0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CH_3COONa	$A = 0.03792C + 0.0308$	0.9996

由表 1 可知, 在 5 ~ 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的质量浓度范围内, ESO 在各介质中, 药物吸光度与浓度线性关系良好, 符合含量测定要求。

2.1.3 精密性与稳定性 分别配制低、中、高 (5、10、20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 3 种质量浓度的 ESO 溶液, 于当日内重复测定 5 次, 连续 3 d 进行测定, 各时间点平行测样 3 次, 计算各浓度的日间、日内 RSD, 考察精密度。称取定量 ESO, 以不同介质配制质量浓度为 15 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品溶液, 室温避光保存, 分别于 0、1、2、4、6、8、12 h 测定样品溶液的紫外吸收, 各点平行测定 3 次, 计算 RSD, 考察稳定性。

结果低、中、高质量浓度 ESO 溶液的 RSD 均不超过 2%, 证明此方法精密度良好。在室温避光条件下, ESO 在各介质中 12 h 内含量变化较小, RSD 小于 2%, 证明 ESO 在以上介质中的稳定性

良好，满足实验要求。

2.2 ESO-DRC 的制备

将多孔阴离子交换树脂加入制备好的 ESO 溶液中，持续搅拌，在设定时间取样处理，测定吸光度，计算药物浓度。载药平衡时，抽滤，洗涤，干燥即得 ESO-DRC。采用树脂载药量 (Q)、药物利用率 (E)、载药程度 (F) 等指标确定最优的制备工艺，各指标的计算公式如下：

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

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

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

其中， C_0 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)：ESO 初浓度； C_t ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)：ESO 在 t 时刻的浓度； V (mL)：加入 pH 9 NaOH 溶液的体积； W_R (mg)：加入树脂的质量； Q_∞ ($\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$)：载药平衡时树脂的载药量。

2.2.1 单因素法优化制备 ESO-DRC 条件

考察载药介质 pH (pH 6.8、pH 7.0、pH 9.0、pH 12.0)，载药温度 (25、35、45、55 $^\circ\text{C}$)，药物质量浓度 (2、3、4、5、6 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和不同药物:树脂比例 (2:1、1:1、2:3、1:2) 对静态载药法制备 ESO-DRC 的影响。在预定时间点取样处理，测定吸光度并计算。不同因素对载药程度、树脂载药量及药物利用率的影响见图 1。

由图 1A 可知，当载药介质为纯水 (pH 7.0) 或 pH 9.0 NaOH 溶液时，在 120 min 时间内的树脂载药量及药物利用率均较高，在 pH 6.8 介质中载药时上述两指标均略有降低，而当介质为 pH 12.0 NaOH 溶液时，树脂载药量、药物利用率及载药速率均显著降低，说明介质的 pH 对于载药结果会产生重要影响。ESO 在酸中不稳定，故选择 pH 9.0 NaOH 溶液作为载药介质。根据图 1B 可知，温度升高可加速载药过程，树脂更快达到载药平衡；当温度由 25 $^\circ\text{C}$ 升至 35 $^\circ\text{C}$ 时，树脂载药量及药物利用率均有明显提高，但当温度继续上升，树脂载药量及药物利用率均略有下降，故选择在 35 $^\circ\text{C}$ 条件下进行 ESO-DRC 的制备。

由图 1C 可知，在树脂用量一定的情况下，当 ESO 溶液质量浓度由 2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 上升至 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时，树脂载药量提升明显，药物利用率缓慢下降，当继续增大 ESO 浓度时，树脂载药量上升趋势放缓，药物利用率大幅下降。这是因为树脂的功能基团已被药物交换完全。根据图 1D 可知，固定药物溶液质量浓度为 4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，不断增加树脂用量，随着树脂比例的逐渐增大，药物利用率

逐渐升高，但树脂载药量却明显下降，选择药物树脂比例为 1:1 进行药物树脂复合物的制备，树脂载药量及药物利用率均维持在较高水平。

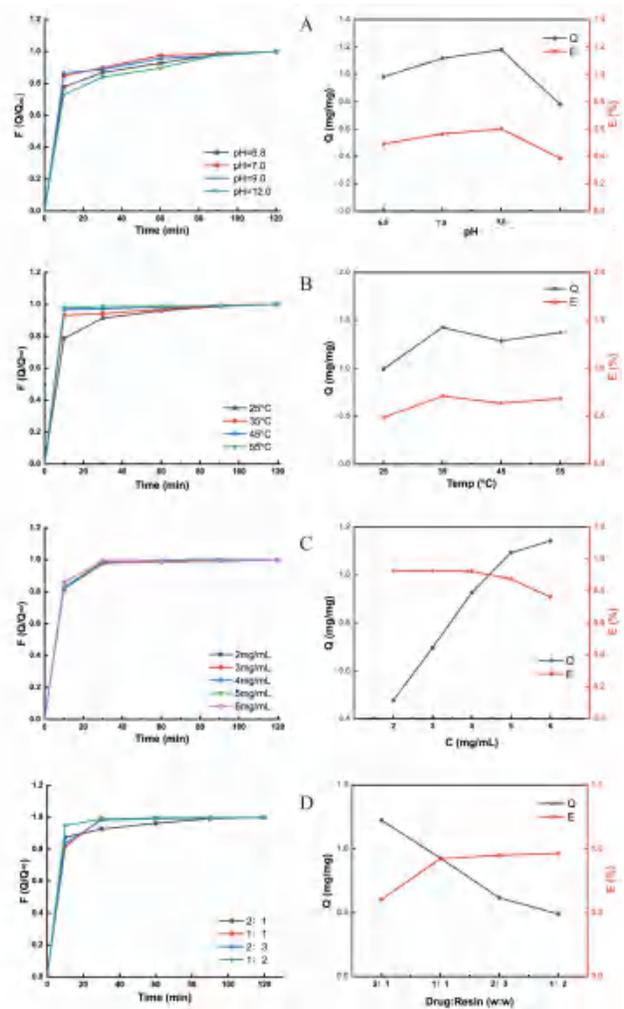


图 1 载药介质 pH (A)、载药温度 (B)、药物质量浓度 (C) 和不同药物:树脂比例 (D) 对载药结果的影响 ($n = 3$)

Fig 1 Influence of pH of drug loading medium (A), temperature (B), ESO mass concentration (C), and the ratio of drug:resin (D) on drug loading results ($n = 3$)

2.2.2 静态载药法工艺确定

根据考察结果最终确定制备 ESO-DRC 的最优工艺如下：精密称取 200 mg ESO 置于 50 mL pH 9.0 NaOH 溶液中，35 $^\circ\text{C}$ 持续搅拌至药物完全溶解，加入与药物等量的多孔阴离子交换树脂，保持温度 35 $^\circ\text{C}$ 继续搅拌 120 min，抽滤，以纯水反复洗涤，洗去药物树脂表面附着的残留药物，35 $^\circ\text{C}$ 真空干燥即得药物树脂复合物。最终所得 ESO-DRC 的载药量为 0.93 mg ESO/1 mg 树脂，药物利用率为 92.30%。

2.3 ESO-DRC 结合机制

通过扫描电镜 (SEM)、傅里叶红外光谱仪 (FTIR)、X 射线衍射仪 (XRD) 等仪器对 ESO-DRC 的结合机制进行表征测试。结果见图 2。

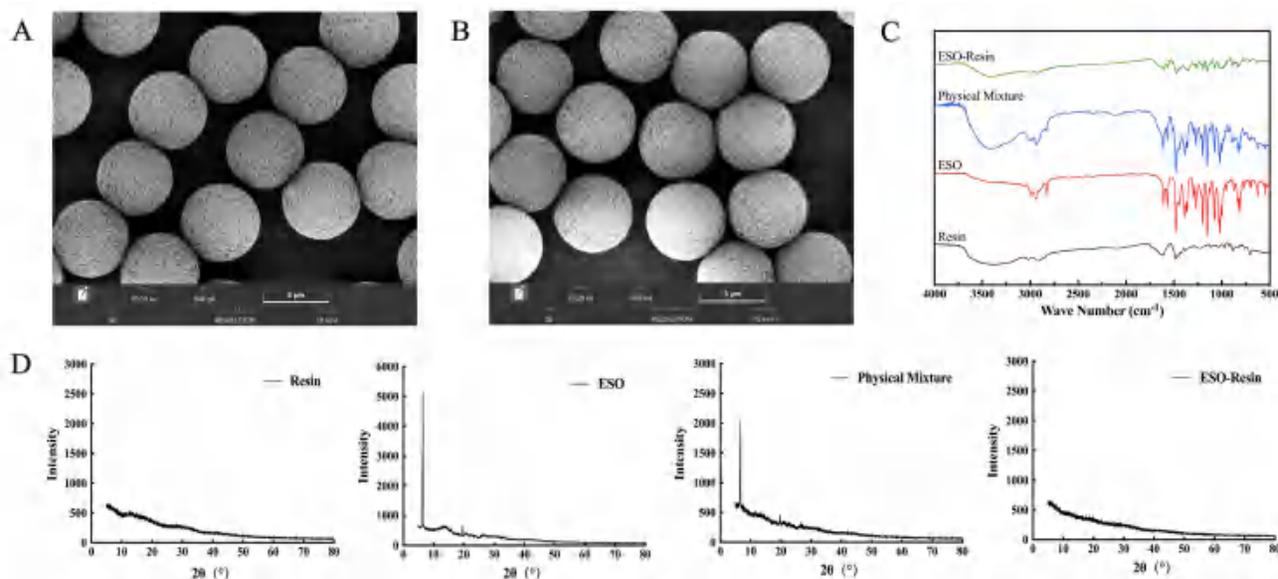


图 2 ESO-DRC 的结合机制表征图

Fig 2 Characterization of binding mechanism of ESO-DRC

A. 空白树脂扫描电镜图 (SEM of blank resin); B. ESO-DRC 扫描电镜图 (SEM images of ESO-DRC); C. 空白树脂、ESO、ESO-DRC 及物理混合物的红外图谱 (FTIR spectra of blank resin, ESO, ESO-DRC and physical mixture); D. 空白树脂、ESO、ESO-DRC 及物理混合物的 XRD 谱图 (XRD of blank resin, ESO, ESO-DRC and physical mixture)

如图 2A、2B 所示，树脂在载药前后形态未发生明显变化，载药后球型良好且表面圆整，与空白树脂形态一致，未见药物黏附的现象。如图 2C 所示，空白树脂在 3387 cm^{-1} 处存在强峰为 N-H 伸缩振动峰对应树脂结构中的季铵基团，ESO 在 1319 cm^{-1} 、 1611 cm^{-1} 存在两处中强峰为药物特征峰。在物理混合物红外图谱中，树脂及药物特征峰均在，可总概括为 ESO 与树脂特征峰的直接叠加；与此相对，在载药树脂图谱中，季铵基团对应的特征峰明显减弱，ESO 在 1319 cm^{-1} 及 1611 cm^{-1} 两处的特征峰基本消失，上述红外光谱的变化均源于树脂中季铵基与 ESO 以离子键结合。由图 2D 可知，ESO 在 $5\sim 10^\circ\text{C}$ 下存在尖锐的结晶态特征峰，空白树脂不存在明显的特征峰，在 ESO 与树脂物理混合的谱图中依然保留药物的结晶态特征峰，峰形及位置与原料药谱图保持一致，仅强度略有降低，而在药物树脂复合物的谱图中，药物的结晶态特征峰完全消失。上述结果证明 ESO 与树脂的结合方式并非简单的物理混合，与红外表征结果一致。

2.4 ESO-DRC 体外释放方法建立

2.4.1 药物含量的测定

精密称取 ESO-DRC 40 mg，加入到 200 mL 浓度为 $0.15\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液中，于 $(37\pm 0.5)^\circ\text{C}$ 避光磁力搅拌 4 h，取一定体积溶液过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 水系滤膜，照“2.1”项下方法测定紫外吸收，并计算药物含量。

2.4.2 释放度测定及释放行为评价

结合《中国药典》2020 年版释放度测定相关要求，拟初步设定溶出条件为：溶出介质 900 mL $0.15\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 溶液，溶出温度 $(37\pm 0.5)^\circ\text{C}$ ，溶出转速 $50\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。称取适量 ESO-DRC 加入溶出杯中，按照预定时间定时吸取溶液 5 mL 并补加相同体积介质，溶液过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜后测定，并计算药物含量。

本研究采用 f_2 相似因子法对 ESO-DRC 的体外释放行为进行评价，计算公式为：

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

式中， n ：取样点数； R_t 、 T_t ： t 时刻 ESO-DRC 分别在两种释放条件下的药物释放量； f_2 ：相似因子。 $f_2 < 50$ 说明 ESO 药物树脂复合物在两种条件下的释放行为存在差异， $f_2 \geq 50$ 时说明 ESO 药物树脂在两种条件下的释放行为相似。

2.5 ESO-DRC 体外释放影响因素考察

通过累计释药量及 f_2 因子等指标，考察介质体积 (50、750、900 mL)，离子类型 (NaCl、KCl、 CH_3COONa)，离子浓度 (0.15 、 0.6 、 $1.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)，温度 (25 、 37 、 50°C)，转速 (50 、 75 、 $100\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$) 对 ESO-DRC 体外释放的影响。结果如图 3 和表 2 所示。

由图 3 和表 2 可知，介质体积逐渐增大时，药物释放度上升，介质体积为 500、750、900 mL 时， f_2 因子均大于 50，表明释药行为均相似，为促进药物释放彻底，选择 900 mL 作为溶出释放

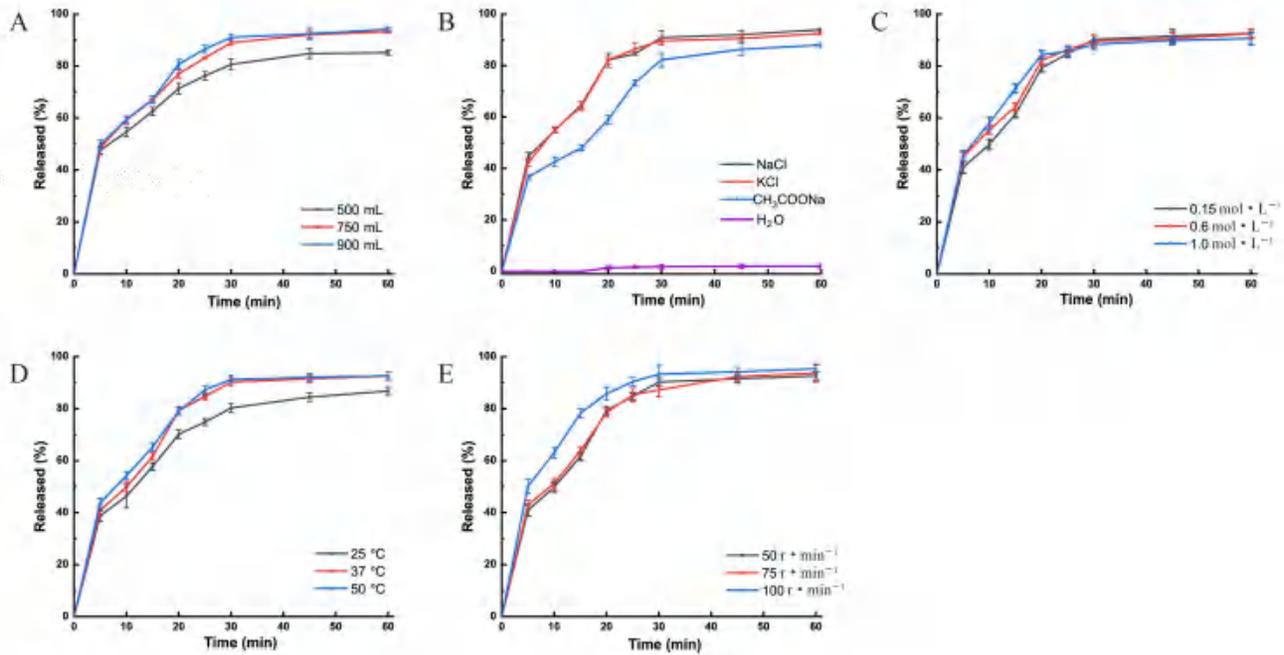


图 3 介质体积 (A)、离子类型 (B)、离子浓度 (C)、介质温度 (D) 和转速 (E) 对 ESO-DRC 体外释放的影响 ($n = 3$)

Fig 3 Effect of medium volume (A), ion types (B), ion concentration (C), medium temperature (D), and rotational speed (E) on ESO-DRC release in vitro ($n = 3$)

表 2 相关因素对 ESO-DRC 体外释放相似性评价

Tab 2 Similarity of related factors on in vitro drug release of ESO-DRC

	因素 1	因素 2	f_2
介质体积 /mL	500	750	60
	750	900	83
	500	900	55
离子类型 ($0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	NaCl	KCl	88
	NaCl	CH ₃ COONa	45
	KCl	CH ₃ COONa	45
离子浓度 (NaCl) / ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.15	0.6	75
	0.15	1.0	64
	0.6	1.0	76
介质温度 /°C	37	50	79
	37	25	57
	25	50	53
转速 / ($\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$)	50	100	52
	50	75	85
	75	100	54

介质体积; 当以纯水为介质时, 药物几乎不释放, 这是因为纯水中几乎不含有可交换的离子, 无法将药物置换下来; ESO-DRC 在 NaCl 和 KCl 介质中释放趋于完全, 但以 CH₃COONa 为介质时, 药物释放量较低, 且与另外两种介质相比 f_2 值均小于 50, 考虑是因为 CH₃COO⁻ 相较于 Cl⁻ 的药物交换能力较差, 且 Na⁺ 在胃肠道中数量最多^[9], 最终选择 NaCl 溶液作为溶出介质。

由图 3 和表 2 可知, 当介质 NaCl 浓度逐渐

增大时, 药物释放速度略有提高, 但释放度差异较小, 释放行为相似, $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 溶液的离子强度足够将药物由 ESO-DRC 中置换下来, 考虑 $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 溶液与人体体液等渗, 体内外相关性更好, 最终介质浓度选择 $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在 $25 \sim 50 \text{ }^\circ\text{C}$ 内, 随着温度升高药物释放速度加快, 累计释放度略有增加, f_2 值均大于 50, 释放行为均具有相似性, 考虑到与正常人体温接近, 最终设定介质温度为 $37 \text{ }^\circ\text{C}$; 随着转速增加, 药物释放速度加快, 累计释药量略有增加, 在 $50 \sim 100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速范围内, f_2 值均大于 50, 体外释放行为具有相似性, 为保证药物体内外释放行为相关性, 更好地模拟人体内环境, 最终确定搅拌转速为 $50 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

最终选择介质为 $900 \text{ mL } 0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 溶液, 介质温度 (37 ± 0.5) $^\circ\text{C}$, 转速 $50 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 作为 ESO-DRC 的体外释放条件, 此条件下药物树脂复合物可在 60 min 内释放 90% 左右。

2.6 ESO-CM 体外测定方法

2.6.1 紫外检测波长确定

称取等量的 ESO-CM 和空白树脂包衣微囊于 100 mL 烧杯中, 各加入少量甲醇用于溶解包衣膜, 再加入 $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 溶液至 50 mL, 在 $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 下持续搅拌 4 h, 取适量溶液过 $0.45 \mu\text{m}$ 水系滤膜后进行全波长扫描, 波长范围 $200 \sim 600 \text{ nm}$, 结果 ESO 由树脂包衣微囊释放

后在 302 nm 左右依然存在较强吸收, 而空白树脂及溶解后的包衣囊材等在此波长附近均无吸收, 不会干扰 ESO 的测定。

2.6.2 含量测定方法 称取定量 ESO-CM, 按照“2.6.1”项下方法溶解囊材后, 溶液过 0.45 μm 水系滤膜后于 302 nm 测定紫外吸收, 计算含量。

2.6.3 体外释放度测定方法 称取适量 ESO-CM, 参照《中国药典》2020 年版释放度测定相关要求, 进行释放度测定。设定温度 37 °C, 转速 50 r · min⁻¹。为减少更换介质产生的误差, 首先以 500 mL NaCl 的盐酸溶液 (1.0 g NaCl、3.5 mL HCl, 加纯水至 500 mL) 作为溶出介质, 在释放 2 h 后, 加入预热至 37 °C 的 400 mL 0.235 mol · L⁻¹ 的磷酸氢二钠水溶液^[10], 保持温度、转速一致, 在设定时间点取样过 0.45 μm 水系滤膜后取续滤液, 于 302 nm 测定紫外吸收, 计算药物累计释放量。

2.7 ESO-CM 的制备及质量评价

2.7.1 ESO-DRC 的浸渍与饱和溶胀度考察 对于干燥的药物树脂复合物, 经包衣进入体内后产生溶胀现象, 出现包衣膜破裂现象, 破坏肠溶效果。为避免上述问题, 需要在包衣前对药物树脂进行浸渍处理: 称取适量 PEG 4000 溶于纯水中得 20% (w/w) 的 PEG 4000 水溶液, 加入适量, 避光环境加热至 40 °C, 持续搅拌 30 min, 抽滤烘干, 即得浸渍 ESO-DRC。

对浸渍 ESO-DRC 的溶胀度进行考察, 具体做法如下: 分别称取相同质量的浸渍前后药物树脂复合物于充足甲苯中溶胀 6 h 至平衡, 采用滤纸吸除树脂表面黏附的甲苯, 对树脂进行称重, 重量记为 W_{∞} , 将溶胀后的树脂置于烘箱内 50 °C 干燥, 至重量不再变化, 称重记重量为 W_0 , 溶胀度计算公式如 (5)。

$$Q = (W_{\infty} - W_0) / W_0 \quad (5)$$

经计算, ESO-DRC 的溶胀度为 0.41, 经浸渍后溶胀度降低至 0.20, 说明浸渍操作能够保证在包衣及混悬剂制备过程中不会过度溶胀, 可在后续工艺中稳定应用。

2.7.2 ESO-CM 的制备 为防止 ESO 药物与肠溶包衣材料直接接触产生相互作用, 在进行肠溶包衣之前, 首先进行隔离层包衣, 包衣液选用欧巴代 amb II 型包衣液, 在此基础上以尤特奇 L100 为肠溶包衣材料, 通过流化床包衣法制得 ESO-CM^[11-12]。

具体工艺方法如下: 30 g 浸渍 ESO-DRC 先后通过流化床进行隔离层包衣和肠溶包衣, 结合预实验结果, 确定流化床粉末包衣工艺, 其中隔离层包衣液为固含量 12% 的 amb II 型欧巴代溶

液, 肠溶包衣液为固含量 20% 的尤特奇 L100 溶液, 溶剂为乙醇 - 二氯甲烷 (1 : 3)。

包衣参数设置: 隔离层包衣时设置包衣温度为 45 °C, 进风量为 30 m³ · h⁻¹, 隔离层包衣液喷雾速率为 1.5 mL · min⁻¹, 待微囊增重至 10% 后停止喷雾, 隔离层包衣完成, 更换肠溶包衣液进行肠溶包衣, 包衣温度降至 40 °C, 进风量保持 30 m³ · h⁻¹, 喷雾速率控制在 1.5 mL · min⁻¹, 持续喷雾包衣至微囊增重 30% 后停止喷雾, 保持包衣微囊在流化床内继续加热 10 min 以利于包衣膜固化闭合^[13]。

2.7.3 ESO-CM 质量评价

① 形貌: 对浸渍 ESO-DRC 和 ESO-CM 真空干燥后, 喷金处理, SEM 拍摄, 观察两者外形貌, 结果如图 4 所示: ESO 药物树脂包衣微囊 ESO-CM 相较于包衣之前的浸渍树脂 ESO-DRC, 表面覆盖完整包衣膜, 明显更为光滑。



图 4 浸渍 ESO-DRC (左) 和 ESO-CM (右) 扫描电镜图
Fig 4 SEM of impregnated ESO-DRC (left) and ESO-CM (right)

② 粒径: 将 ESO-CM 分散于适宜介质中, 超声辅助分散均匀后, 使用激光粒度分析仪测定其粒径, 结果见图 5。ESO-CM 粒径主要分布在 5 ~ 6 μm, 粒径分布均匀。

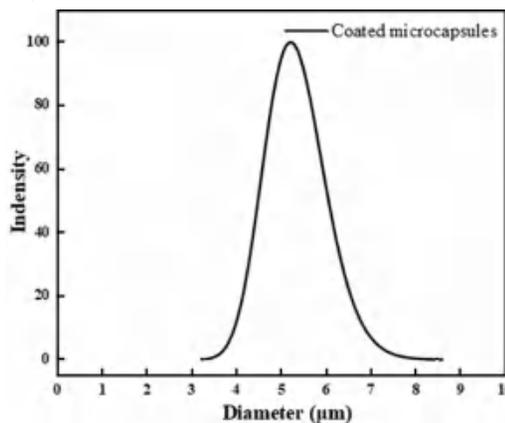


图 5 ESO-CM 粒径分布图
Fig 5 Particle size distribution of ESO-CM

③ 含量测定: 对 3 批 ESO-CM 照“2.6.2”项下方法进行含量测定, 结果显示流化床包衣法制得的 ESO-CM 药物含量为 (21.70 ± 0.5) %, 均一度良好。

④ 体外释放度考察: 照“2.6.3”项下方法对 3 批

ESO-CM 体外释放行为进行考察, 结果见图 6: 3 批 ESO-CM 均具有良好的肠溶效果。3 批微囊之间的 f_2 因子数值均大于 50, 体外释放行为具有相似性。

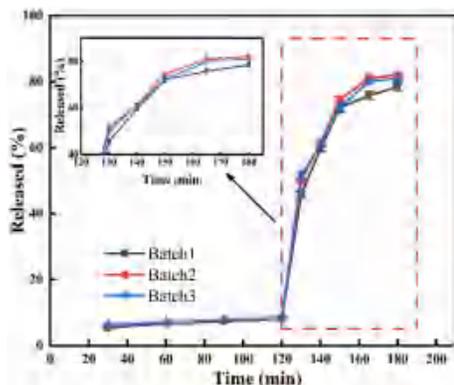


图 6 3 批 ESO-CM 体外释放曲线 ($n = 3$)

Fig 6 In vitro release curve of three batches of ESO-CM ($n = 3$)

3 讨论

本研究以离子交换树脂为载体制备 ESO-DRC, 发挥了树脂掩味、提高药物稳定性的作用^[14]。离子交换树脂具有独特的化学结构, 药物离子与树脂上的活性离子通过离子交换反应实现载药^[15]。载药过程中使用的多孔树脂为碱性阴离子交换树脂, 在溶液中解离出 OH^- , 解离后树脂的正电基团与荷负电药物结合从而完成载药, 当介质离子强度增高或 pH 值较大时, 树脂解离程度降低、速率减慢, 从而导致树脂交换容量下降, 载药性能变差^[16]。药物浓度考察时, 药物浓度过高会使树脂的功能基团逐渐被药物交换完全, 不易结合更多的药物, 过量未被负载的药物使得药物利用率降低。

药物树脂在开始时释放很快, 这是因为当药物与树脂形成药物树脂复合物后, 药物已转化为非晶态形式, 其溶出时无需克服晶格能, 而是直接与溶剂中的离子交换, 立即释放药物, 从而使药物溶出速率提高。在体外释放考察时, 参照模拟人工胃肠液为溶出介质进行考察, 选择最优体外溶出条件^[17]。

本实验将药物树脂复合物通过流化床包衣达到药物所需的肠溶效果, 且包衣微囊含量均一, 肠溶效果明显。后期继续对 ESO-CM 进行制剂研究, 并考察其体外释放、体内药代动力学研究, 以期改善现有固体制剂及注射剂存在的难以吞咽、分剂量困难、注射疼痛使用不便等问题, 提高药物的适用范围及患者的顺应性。

参考文献

[1] Commisso A, Lim F. Lifestyle modifications in adults and

older adults with chronic gastroesophageal reflux disease (GERD) [J]. Crit Care Nurs Q, 2019, 42 (1): 64-74.

[2] 中华医学会消化病学分会. 2020 年中国胃食管反流病专家共识 [J]. 中华消化杂志, 2020, 40 (10): 649-663.

[3] 顾同进, 竺越. 质子泵抑制剂族的新药——埃索美拉唑 [J]. 中国临床药学杂志, 2006, 15 (2): 73-75.

[4] Zheng RN. Comparative study of omeprazole, lansoprazole, pantoprazole and esomeprazole for symptom relief in patients with reflux esophagitis [J]. World J Gastroentero, 2009, 15 (8): 990.

[5] Walsh J, Cram A, Woertz K, et al. Playing hide and seek with poorly tasting paediatric medicines: do not forget the excipients [J]. Adv Drug Deliver Rev, 2014, 73: 14-33.

[6] Sohi H, Sultana Y, Khar RK. Taste masking technologies in oral pharmaceuticals: recent developments and approaches [J]. Drug Dev Ind Pharm, 2004, 30 (5): 429-448.

[7] Kankkunen T, Huupponen I, Lahtinen K, et al. Improved stability and release control of levodopa and metaraminol using ion-exchange fibers and transdermal iontophoresis [J]. Eur J Pharm Sci, 2002, 16 (4-5): 273-280.

[8] Jaskari T, Vuorio M, Kontturi K, et al. Ion-exchange fibers and drugs: an equilibrium study [J]. J Control Release, 2001, 70 (1-2): 219-229.

[9] Aman RM, Meshali MM, Abdelghani GM. Ion-exchange complex of famotidine: sustained release and taste masking approach of stable liquid dosage form [J]. Drug Discov Ther, 2014, 8 (6): 268-275.

[10] 袁鹰, 常晓敏, 肖帆. 奥美拉唑肠溶胶囊的制备研究 [J]. 化学与粘合, 2019, 41 (5): 363-365, 381.

[11] 孟祥欢. 一种新型药用辅料 - 阴离子交换树脂的合成、质量研究及其在洋托拉唑钠液体延释混悬剂中的应用研究 [D]. 镇江: 江苏大学, 2022.

[12] Liu R, Ma GH, Wan YH, et al. Influence of process parameters on the size distribution of PLA microcapsules prepared by combining membrane emulsification technique and double emulsion-solvent evaporation method [J]. Colloids Surf B, 2005, 45 (3): 144-153.

[13] 周伟, 谢欢, 刘姹, 等. 乳化-溶剂挥发法制备更昔洛韦药物树脂缓释微囊 [J]. 中国新药杂志, 2011, 20 (3): 262-266.

[14] Kaushik D, Dureja H. Ion exchange resin complexation technique for pharmaceutical taste masking: an overview [J]. World J Prep Sch, 2015, 4 (6): 600-614.

[15] 刘宏飞, 王铭洲, 潘卫三. 离子交换树脂在药物制剂中的应用 [J]. 中国药理学杂志 (网络版), 2007, 5 (4): 762-764.

[16] 赵妍, 于彬, 邓意辉, 等. 主动载药法制备硫酸长春新碱脂质体及其包封率的测定 [J]. 中国药学杂志, 2005, 40 (20): 1559-1562.

[17] 张珊, 董阳雨, 韩晓鹏, 等. 枸橼酸西地那非掩味树脂复合物的制备及评价 [J]. 中国新药杂志, 2018, 27 (17): 1985-1993.

(收稿日期: 2024-02-03; 修回日期: 2024-04-06)

补肾活血方调控 NF- κ B 信号通路对膝骨关节炎 小鼠软骨组织炎症及细胞凋亡的影响

刘小丽¹, 章铮², 姚金龙¹, 毛滔^{1*} (1. 湖南中医药大学第二附属医院, 长沙 410005; 2. 岳阳市中医医院, 湖南 岳阳 414100)

摘要: **目的** 观察补肾活血方 (BSHXF) 对膝骨关节炎 (KOA) 小鼠软骨组织炎症及细胞凋亡的影响, 探讨 BSHXF 治疗 KOA 的作用机制。 **方法** 将 24 只雄性 BALB/c 小鼠按体重随机分为假手术组、KOA 模型组、KOA 模型 + BSHXF 组, 每组 8 只。造模、灌胃干预后, 小鼠取血, ELISA 检测血清 IL-6、iNOS、COX2 水平; 提取小鼠膝关节软骨组织, HE 染色及番红 O-固绿染色观察软骨组织病理学情况, TUNEL 染色检测软骨组织细胞凋亡情况, Western blot 检测 Cleaved-Caspase-9、Bcl-2、Bax 蛋白表达, qRT-PCR 检测 Collagen II、Aggrecan、ADAMTS-5 mRNA 表达, Western blot 检测核转录因子 κ B (NF- κ B) 信号通路关键蛋白 p-I κ B α 、I κ B α 、p-p65、p65 的表达。 **结果** 与假手术组相比, KOA 模型组小鼠膝关节软骨细胞病理改变明显; 血清炎症细胞因子 IL-6、iNOS 和 COX2 的水平升高, 软骨组织细胞凋亡率增加, Cleaved-Caspase-9、Bax 蛋白表达水平升高, Bcl-2 蛋白表达降低, Collagen II、Aggrecan 的 mRNA 表达水平降低, ADAMTS-5 mRNA 表达升高, p-I κ B α /I κ B α 、p-p65/p65 比值升高。与 KOA 模型组相比, KOA 模型 + BSHXF 组膝关节软骨损伤改善、病理变化减轻, 炎症细胞因子 IL-6、iNOS 和 COX2 的水平降低, 软骨组织细胞凋亡率降低, Cleaved-Caspase-9、Bax 蛋白表达降低, Bcl-2 蛋白表达升高, Collagen II、Aggrecan 的 mRNA 表达升高, ADAMTS-5 mRNA 表达降低, p-I κ B α /I κ B α 、p-p65/p65 比值降低。 **结论** BSHXF 可抑制 NF- κ B 信号通路, 减少炎症因子释放、抑制软骨细胞凋亡及细胞外基质降解, 从而缓解 KOA 疾病进展。

关键词: 补肾活血方; 膝骨关节炎; 软骨组织; 核转录因子 κ B 信号通路

中图分类号: R965.2 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)07-1725-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.007

Effect of Bushen Huoxue formula regulating NF- κ B signaling pathway on inflammation and apoptosis of cartilage tissue in mice with knee osteoarthritis

LIU Xiao-li¹, ZHANG Zheng², YAO Jin-long¹, MAO Tao^{1*} (1. The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410005; 2. Yueyang Traditional Chinese Medicine Hospital, Yueyang Hunan 414100)

Abstract: Objective To determine the mechanism of Bushen Huoxue formula (BSHXF) for treatment of knee osteoarthritis (KOA) and to observe the effect of BSHXF on the apoptosis and inflammation of KOA in mice. **Methods** Totally 24 male BALB/c mice were stratified by body weight and randomly divided into a sham group, a KOA group and a KOA + BSHXF group (8 mice in each group). After the intervention of model building and intragastric administration, the serum was collected and the levels of IL-6, iNOS and COX2 were detected by ELISA. The cartilage tissues of the mice were collected, and the histopathology of the knee cartilage was detected by HE staining and

基金项目: 湖南省中医药管理局一般项目 (No.D2022114); 湖南省中医药管理局一般项目 (No.B2024084); 湖南省中医重点专科建设项目——中药学 (湘中医药函〔2023〕4号); 2024 年湖南省自然科学基金医卫行业联合基金项目 (No.2024JJ9452)。

作者简介: 刘小丽, 女, 主管药师, 主要从事中药药理学研究, email: liuxiaoli0923@sina.com ***通信作者:** 毛滔, 男, 副主任医师, 主要从事中医药防治骨科疾病研究, email: hnszy233@163.com

saffranine O-solid green staining. TUNEL staining was used to detect the apoptosis of the cartilage tissues. The protein expression of Cleaved-Caspase-9, Bcl-2, Bax and p-I κ B α , I κ B α , p-p65 and p65, namely the key proteins in NF- κ B signaling pathway, were detected by Western blot, and the mRNA expressions of Collagen II, Aggrecan and ADAMTS-5 were detected by qRT-PCR. **Results** Compared with the sham group, the pathological changes in the knee cartilage cells in the KOA group were obvious. The serum levels of inflammatory cytokines IL-6, iNOS and COX2 were increased. The apoptosis rate in the cartilage tissue, Cleaved-Caspase-9 and Bax protein expression levels were also increased. Bcl-2, Collagen II and Aggrecan mRNA levels were decreased, while ADAMTS-5 mRNA, the ratios of p-I κ B α /I κ B α and p-p65/p65 were increased. Compared with the KOA group, injuring the knee joint cartilage and pathological changes were improved the levels of inflammatory cytokines IL-6, iNOS and COX2, apoptosis rate in the cartilage tissue, the protein expression levels of Cleaved-Caspase-9 and Bax were all decreased, but Bcl-2, the mRNA levels of Collagen II and Aggrecan were increased, while ADAMTS-5 mRNA and the ratios of p-I κ B α /I κ B α and p-p65/p65 were decreased in the KOA + BSHXF group. **Conclusion** BSHXF may inhibit NF- κ B signaling pathway, reduce the release of inflammatory factors, inhibit chondrocyte apoptosis and extracellular matrix degradation, to alleviate the progression of KOA.

Key words: Bushen Huoxue formula; knee osteoarthritis; cartilage tissue; NF- κ B signaling pathway

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是一种慢性退行性疾病, 以关节软骨退变、滑膜炎等为主要特征^[1]。临床上在老年患者中最常见, 主要有膝关节痛、活动受限等症状, 严重影响患者健康和生活质量。我国 KOA 的患病率为 21.51%^[2], 研究证实年龄是骨关节炎发生发展的单一主要危险因素, 尤其是在髌和膝关节等负重关节^[3-4]。近年来, 我国老龄化趋势日益突出, KOA 给社会和家庭带来了沉重的经济负担^[5]。目前, 临床上主要有抗炎镇痛和外科手术等治疗手段。然而, 抗炎镇痛治疗只能暂缓疼痛, 无法遏止疾病进展; 膝关节置换手术可能出现关节感染等术后风险^[6]。中医药及其相关治疗方法已被证实具有优势, 已成为我国 KOA 的常见补充疗法^[7]。KOA 属于中医“骨痹”“痹证”“痿证”范畴, 肾虚血瘀型为其临床中医辨证分型中的常见证型, 而补肾活血法为其基本治法^[8]。

补肾活血方 (Bushen Huoxue formula, BSHXF) 出自《伤科大成》, 以“肾主骨, 生髓”“血行则瘀自去”等理论为依据, 是治疗筋骨酸痛无力症的经典方剂。已有临床研究证实 BSHXF 治疗 KOA 安全有效^[9-10]。目前, BSHXF 治疗骨关节炎的分子机制研究大多基于 Wnt/ β -catenin 信号通路^[11-13], 基于核转录因子 κ B (nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B) 信号通路研究的报道几乎未见。网络药理学研究 BSHXF 治疗骨关节炎的机制表明, 抗炎、抗氧化、抑制软骨

基质降解和减少软骨下的骨破坏可能是其重要机制, 且 NF- κ B 信号通路可能与其作用机制密切相关^[14]。NF- κ B 信号通路通过多种模式广泛参与骨关节炎的病理过程, 是 KOA 发生与发展的关键环节^[15]。

软骨细胞过度凋亡参与了 KOA 的发生发展^[16], 细胞凋亡途径由 B 细胞淋巴瘤 2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 蛋白家族控制, 该家族促凋亡和促存活成员的平衡决定细胞生死^[17]。线粒体介导的 Caspase 依赖途径可诱导骨关节炎中软骨细胞凋亡^[15], Caspase-9 是哺乳动物内源性凋亡途径的启动者^[18]。此外, 骨关节炎的发生发展与细胞外基质降解密切相关^[19]。天然软骨基质主要由 II 型胶原蛋白 (Collagen II, COL II) 和聚集蛋白聚糖 (Aggrecan, ACAN) 组成, 具有减震能力^[20]。NF- κ B 信号通路可诱导基质降解酶的分泌, 如血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs, ADAMTS), ADAMTS-5 在骨关节炎和健康软骨组织中均表达^[21]。NF- κ B 信号转导通路影响软骨基质重塑、软骨细胞凋亡、滑膜炎^[22]。正常情况下, NF- κ B 在细胞质中与抑制蛋白 (inhibitor of κ B, I κ B) 以无活性形式相结合, 在白细胞介素 (IL) -6 等炎性因子刺激下, 活化的 NF- κ B 从细胞质转入细胞核, 促进骨关节炎相关基因表达, 诱导骨关节炎发生与发展^[23]。RelA (p65) 是 NF- κ B 活化最常见的形式之一^[24], p65 和 I κ B α 磷酸化导致

NF- κ B 转位入核, 调节相关基因转录^[25]。因此, 抑制 NF- κ B 中 p65 和 I κ B α 磷酸化, 可减轻 KOA 的炎症反应。因此, 本研究通过建立 KOA 模型小鼠, 探讨 BSHXF 调控 NF- κ B 对 KOA 小鼠软骨组织细胞损伤、炎症及细胞凋亡的影响及其可能的分子机制, 为该方治疗 KOA 提供新的理论依据。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级雄性 BALB/c 小鼠 24 只, 6 周龄, 体重 (22 \pm 2) g [湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 动物生产许可证号: SCXK (湘) 2019-0004, 动物使用许可证号: SYXK (湘) 2019-0009]。饲养于湖南中医药大学 SPF 级实验动物中心, 且通过动物实验伦理委员会审批。

1.2 试药

BSHXF (熟地黄 10 g、补骨脂 10 g、菟丝子 10 g、杜仲 3 g、枸杞子 3 g、当归尾 3 g、山茱萸 3 g、肉苁蓉 3 g、没药 3 g、独活 3 g、红花 2 g); 药物由湖南中医药大学第二附属医院药剂科提供。取适量处方组成药物置夹层提取罐加水提取两次, 两次药液过滤去渣, 浓缩滤液成每毫升相当于 1.0 g 生药浓度, 灭菌、密封、冷藏备用。IL-6 ELISA 试剂盒 (泉州睿信生物公司); 诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、环氧合酶 -2 (COX2) ELISA 试剂盒 (武汉华美生物公司); TUNEL 试剂盒 (赛维尔生物公司); TRIzol 试剂盒 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 逆转录试剂盒 (广州 GeneCopoeia 公司); BeyoFast SYBR Green qPCR Mix 试剂盒 (上海 Bio-Rad 公司); 超敏 ECL 化学发光试剂盒 (苏州新赛美公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天公司); Cleaved-Caspase-9、p-I κ B α 、I κ B α 抗体 (美国 Affinity 公司); Bcl-2、Bax、p65、GAPDH 抗体 (武汉三鹰公司); p-p65 抗体 (美国 Abcam 公司)。

1.3 仪器

台式高速冷冻离心机 (香港 HealForce 公司); 荧光定量 PCR 仪 (德国耶拿分析仪器有限公司); 酶标仪 (美国 PerkinElmer 公司); 化学发光成像系统 (上海天能科技有限公司); 荧光倒置显微镜 (日本 OLYMPUS 公司)。

2 方法

2.1 动物造模与分组

24 只雄性 BALB/c 小鼠适应性饲养 1 周后, 按照体重随机分为 3 组, 每组 8 只: 假手术组 (Sham 组)、KOA 模型组 (KOA 组)、KOA 模型+

BSHXF 组 (KOA + BSHXF 组)。采用改良人工诱发模型 Hulth 法^[26]建立 KOA 动物模型, 10% 水合氯醛按照 4 mL \cdot kg⁻¹ 剂量腹腔注射麻醉小鼠, 取仰卧位固定, 小鼠右后膝关节剃毛后, 碘伏消毒, 取右后肢膝前正中切口, 长约 1 cm, 剪开皮肤, 分离皮下组织、筋膜、肌肉, 剪断内侧副韧带, 暴露关节间隙, 显微镜下探查膝关节腔, 寻找内侧关节连接半月板状软组织, 全部切除, 仅保留关节软骨面, 进一步切断前后交叉韧带, 止血消毒后, 再将膝关节逐层缝合。Sham 组小鼠只切开皮肤、皮下组织、筋膜, 暴露前后交叉韧带、内侧副韧带, 不进行切断前交叉韧带及内侧副韧带的操作。

2.2 给药及采样

造模 1 周后开始连续灌胃 4 周, 药物剂量参照人与动物之间体表面积折算的等效剂量比值表, 人与小鼠换算系数为 0.0026, KOA + BSHXF 组按照 6.89 g/(kg \cdot d) 剂量灌胃。KOA 组、Sham 组予以等体积的蒸馏水灌胃, 每日 2 次。末次灌胃后 12 h 麻醉小鼠, 腹主动脉采血置入真空采血管内, 低温离心 5 min 后取上层血清, 于 56 $^{\circ}$ C 灭活 30 min 除菌, 放入冰箱保存待检。随后切开小鼠患侧关节皮肤, 取右后膝关节胫骨平台内髌软骨, 将一部分软骨组织标记后立即浸于甲醛中固定; 另一部分软骨组织清洁后无菌纱布吸干, 液氮罐内保存待检。

2.3 检测指标

2.3.1 小鼠膝关节软骨组织病理形态学观察 取各组软骨组织固定后, 经脱钙、脱水和石蜡包埋处理后切片, 再经脱蜡、梯度乙醇复水, 分别进行 HE 染色及番红 O-固绿染色, 封片后采用显微镜观察。

2.3.2 ELISA 检测小鼠血清炎症因子水平 取各组血清样本, 按 ELISA 试剂盒说明书处理样本, 采用酶标仪检测各组 IL-6、iNOS、COX2 水平。

2.3.3 TUNEL 染色检测小鼠膝关节软骨组织细胞凋亡 取各组小鼠膝关节软骨组织切片, 脱蜡、水化处理后 TUNEL 染色, 中性树脂封片后, 采用显微成像系统观察并采集各组软骨组织图像, 运用 Image-Pro Plus 软件分析图像, 定量各组软骨组织细胞凋亡数及总细胞数, 计算凋亡率。

2.3.4 Western blot 检测小鼠膝关节软骨组织凋亡相关蛋白表达 取各组软骨组织, 剪碎并液氮下研碎后提取蛋白, BCA 法测定蛋白含量。SDS-PAGE 电泳后转膜, 封闭 1 h 后 4 $^{\circ}$ C 孵育一抗稀释液 Cleaved-Caspase-9 (1 : 800)、Bcl-2 (1 : 2000)、Bax (1 : 5000)、GAPDH (1 : 50 000) 过夜; 取出

膜，洗涤后封闭，二抗（1：6000）室温孵育 2 h；取出膜，清洗，滴加发光液，曝光显色，获取各蛋白条带灰度值。

2.3.5 qRT-PCR 检测小鼠膝关节软骨组织基质降解相关因子 mRNA 表达 取各组软骨组织，研碎后按照 TRIzol 试剂盒说明书提取总 RNA，并测定 RNA 的浓度和纯度。按照逆转录试剂盒说明书合成 cDNA 并测定浓度。以 GAPDH 为内参，引物由生工生物公司（上海）股份有限公司合成，引物序列如表 1 所示。按照 BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix 试剂盒说明，选择 20 μL 的反应体系，以 cDNA 为模板进行扩增，扩增条件为：预变性 95℃，2 min；变性 95℃，15 s；退火延伸 60℃，30 s；共进行 40 个循环。每组设 3 个复孔，根据 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算各目的基因相对表达量。

表 1 引物序列
Tab 1 Primers sequences

引物	序列 (5'-3')
GAPDH	F: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
	R: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
COL II	F: TGGTGTCTCGGGGTAACGAT
	R: GGCTCCAGGAATACCATCAGT
ADAMTS-5	F: CCACGACCCTCAAGAACTTTT
	R: CTGCATCGTAGTGCTCTTCG
ACAN	F: AGGTGTCGCTCCCAACTAT
	R: CTCACAGCGGTAGATCCAG

2.3.6 Western blot 测定小鼠膝关节软骨组织 NF-κB 通路关键蛋白表达 取各组软骨组织，剪碎并液氮下研碎后提取蛋白，BCA 法测定蛋白含量。SDS-PAGE 电泳后转膜，封闭 1 h 后 4℃ 孵育一抗稀释液 p-IκBα（1：1000）、IκBα（1：1000）、p-p65（1：1000）、p65（1：1000）、GAPDH（1：50 000）过夜；取出膜，洗涤后封闭，二抗（1：6000）室温孵育 2 h；取出膜，清洗，滴加发光液，曝光显色，获取各蛋白条带灰度值。

2.3.7 统计学方法 应用 SPSS 26.0 软件统计分析，实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，方差齐性时，组间比较采用单因素方差分析，多组间比较采用 LSD 法， $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 BSHXF 对 KOA 小鼠膝关节软骨组织病理改变的影响

HE 染色示，Sham 组软骨组织平滑，软骨细胞完整（红色箭头）；与 Sham 组比较，KOA 组软骨组织变薄（蓝色箭头），软骨表面被破坏，软骨细胞丢失（黑色箭头）；与 KOA 组比较，KOA +

BSHXF 组软骨组织表面恢复平滑且厚度增加（蓝色剪头），软骨细胞数量恢复（红色箭头）（见图 1）。番红 O-固绿染色示，Sham 组大部分软骨细胞被染成红色（粉色箭头）；KOA 组软骨组织表面被染成灰绿色（灰色箭头），表明软骨组织中大量胶原纤维。与 KOA 组比较，KOA + BSHXF 组软骨组织中胶原纤维减少（见图 2）。



图 1 各组小鼠软骨组织病理改变（HE 染色，×200）

Fig 1 Pathological changes in cartilage tissue of mice in each group (HE staining, ×200)



图 2 各组小鼠软骨组织病理改变（番红 O-固绿染色，×200）

Fig 2 Pathological changes in cartilage tissue of mice in each group (Safranin O-solid green staining, ×200)

3.2 BSHXF 对 KOA 小鼠血清炎症因子水平的影响
KOA 组小鼠血清中 IL-6、iNOS、COX2 水平均高于 Sham 组 ($P < 0.01$)，而 KOA + BSHXF 组 IL-6、iNOS、COX2 水平均低于 KOA 组 ($P < 0.01$ ， $P < 0.05$)，见图 3。

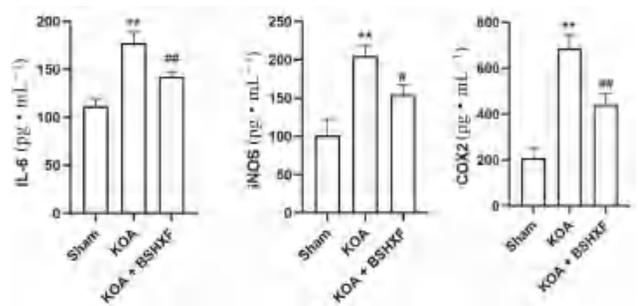


图 3 各组小鼠血清炎症因子水平 ($\bar{x} \pm s$ ， $n = 3$)

Fig 3 Serum levels of inflammatory factor in each group ($\bar{x} \pm s$ ， $n = 3$)

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

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

3.3 BSHXF 对 KOA 小鼠膝关节软骨组织细胞凋亡的影响

TUNEL 染色示，与 Sham 组比较，KOA 组软骨组织细胞凋亡率增加 ($P < 0.01$)；与 KOA 组比较，KOA + BSHXF 组凋亡率降低 ($P < 0.01$)，见图 4。

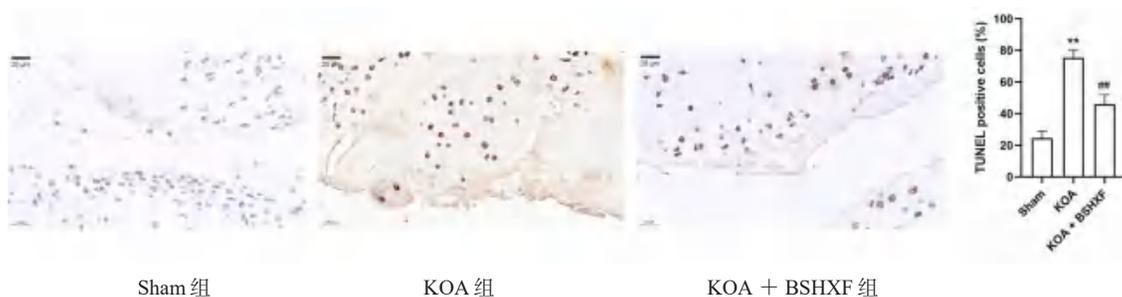


图 4 各组小鼠软骨组织细胞凋亡情况 (TUNEL 染色, $\times 400$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
 Fig 4 Apoptosis in cartilage tissue in each group (TUNEL staining, $\times 400$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

注: 与 Sham 组比较, $**P < 0.01$; 与 KOA 组比较, $^{##}P < 0.01$ 。
 Note: Compared with the Sham group, $**P < 0.01$; compared with the KOA group, $^{##}P < 0.01$.

3.4 BSHXF 对 KOA 小鼠膝关节软骨组织凋亡相关蛋白表达的影响

与 Sham 组比较, KOA 组促凋亡相关蛋白 Cleaved-Caspase-9 和 Bax 表达升高 ($P < 0.01$), 抗凋亡蛋白 Bcl-2 降低 ($P < 0.01$)。与 KOA 组比较, KOA + BSHXF 组 Cleaved-Caspase-9 和 Bax 降低 ($P < 0.01$), Bcl-2 升高 ($P < 0.01$), 见图 5。

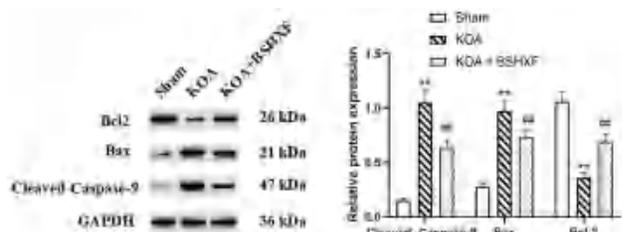


图 5 各组小鼠软骨组织凋亡相关蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
 Fig 5 Expression of apoptotic protein in cartilage tissue in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

注: 与 Sham 组比较, $**P < 0.01$; 与 KOA 组比较, $^{##}P < 0.01$ 。
 Note: Compared with the Sham group, $**P < 0.01$; compared with the KOA group, $^{##}P < 0.01$.

3.5 BSHXF 对 KOA 小鼠膝关节软骨组织细胞中基质降解相关因子 mRNA 表达的影响

与 Sham 组比较, KOA 组 COL II、ACAN mRNA 表达降低 ($P < 0.01$), ADAMTS-5 mRNA 表达升高 ($P < 0.01$)。与 KOA 组比较, KOA + BSHXF 组 COL II、ACAN mRNA 表达升高 ($P < 0.01$), ADAMTS-5 mRNA 表达降低 ($P < 0.01$), 见图 6。

3.6 BSHXF 对 KOA 小鼠膝关节软骨组织 NF- κ B 信号通路蛋白表达的影响

与 Sham 组比较, KOA 组 p-I κ B α /I κ B α 、p-p65/p65 比值升高 ($P < 0.01$); 与 KOA 组比较, KOA + BSHXF 组 p-I κ B α /I κ B α 、p-p65/p65 比值降低 ($P < 0.01$), 见图 7。

4 讨论

4.1 BSHXF 减轻 KOA 膝关节病理退变

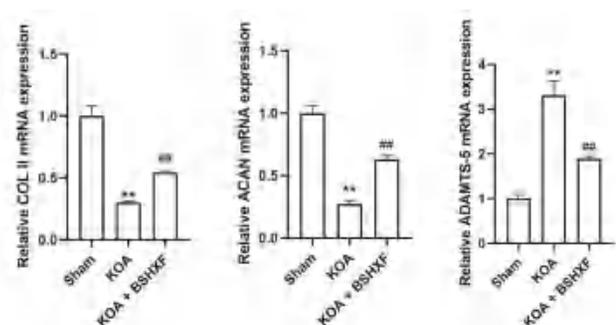


图 6 各组软骨细胞基质降解相关因子 mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
 Fig 6 mRNA expression of matrix degradation-related factors in chondrocytes in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

注: 与 Sham 组比较, $**P < 0.01$; 与 KOA 组比较, $^{##}P < 0.01$ 。

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

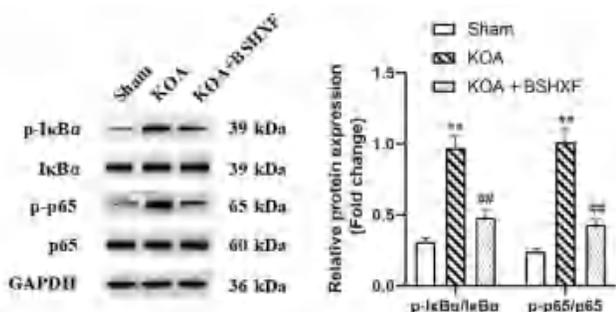


图 7 各组小鼠软骨组织 p-I κ B α /I κ B α 和 p-p65/p65 比值 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
 Fig 7 p-I κ B α /I κ B α and p-p65/p65 ratios of chondrocytes in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

注: 与 Sham 组比较, $**P < 0.01$; 与 KOA 组比较, $^{##}P < 0.01$ 。

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

BSHXF 有补肾活血化瘀的功效, 方中熟地黄、杜仲、枸杞子、补骨脂、菟丝子填精补髓, 壮阳生精, 以补肾为君; 红花、没药、当归尾、独活以活血化瘀、行气止痛为臣, 使“瘀血去, 新血生”, 筋骨得养, 血脉通畅, 而痛自除; 再佐以山茱萸以健脾生血, 使气血生化有源; 使以肉苁蓉润燥、滑肠。诸药配伍, 散中有收, 收中有散, 补泻同施,

以达补肾、活血、化瘀之功。研究表明 BSHXF 能减缓软骨损伤、缓解关节疼痛肿胀、阻止软骨基质破坏,改善关节软骨内代谢环境^[27-28]。本实验中小鼠病理组织切片显示的软骨层厚度、软骨细胞数量等结果,从宏观角度证明了 BSHXF 能减轻小鼠膝关节病理退变,初步验证了其疗效。

4.2 BSHXF 抑制 KOA 炎症反应

研究表明炎症及炎症细胞因子在骨关节炎的发生与发展中起重要作用^[29]。IL-6 是骨关节炎发病机制中最重要的炎症因子之一^[30],其在骨关节炎患者的滑膜液中高表达^[31]。此外,炎症因子激活软骨巨噬细胞,刺激破骨细胞增殖和分化,进而促进代谢介质分解,导致关节炎和疼痛^[32]。巨噬细胞中 iNOS 和 COX2 诱导 NO 过度表达在炎症的发展中起着关键作用^[33]。iNOS 和 COX2 是调控炎症反应的关键因子,iNOS 是 NO 合成的限速酶,主要对机体产生生物学效应,NO 能促进炎症细胞因子 COX2 的释放,而 COX2 是加重炎症反应的关键酶^[34]。在本研究中,BSHXF 可显著降低 KOA 小鼠血清中 IL-6、iNOS 和 COX2 炎症因子水平,说明其缓解 KOA 疾病进展机制与抑制炎症因子表达有关。

4.3 BSHXF 抑制 KOA 软骨组织细胞凋亡及细胞外基质降解

软骨细胞过度死亡和密度降低是骨关节炎的主要病理特征,抑制过度软骨细胞死亡在其治疗中尤为重要^[35]。软骨细胞是软骨中唯一存在的细胞类型,生理状态下其增殖和凋亡处于动态平衡,其存活失调可能导致细胞外基质丢失和软骨的破坏^[36]。软骨细胞在 Caspase、Bcl-2 蛋白家族等媒介下,在 NO、IL-1 β 、TNF- α 等诱导剂作用下,通过 MAPKs、PI3K/AKT、Wnt/ β -catenin、NF- κ B 等通路诱发细胞凋亡,从而促进骨关节炎形成^[37]。Caspase 活化级联参与调控 KOA 软骨细胞凋亡^[38]。本研究发现 BSHXF 通过调控凋亡相关蛋白及软骨细胞基质降解相关因子 mRNA 表达抑制软骨组织细胞凋亡及细胞外基质降解,从而缓解软骨退变。微观角度证明了 BSHXF 能改善 KOA 软骨退变,进一步验证了其疗效。

4.4 BSHXF 通过调控 NF- κ B 通路缓解 KOA 疾病进展

NF- κ B 信号通路参与机体的炎症反应、增殖与凋亡等过程^[39],其异常激活,导致促炎细胞因子过量在破坏膝关节稳态中起关键作用^[36]。因此,本研究进一步对 NF- κ B 通路活化相关蛋白的

表达进行检测,结果发现 BSHXF 可降低 p-I κ B α /I κ B α 、p-p65/p65 值,说明 BSHXF 抑制了 NF- κ B 信号通路的活化水平。基于以上,我们得出结论,BSHXF 通过抑制 NF- κ B 通路,减少炎症因子释放、抑制软骨细胞凋亡及细胞外基质降解,缓解 KOA 疾病进展。

4.5 本研究的不足

本研究具有一定局限性,对 BSHXF 治疗 KOA 未做量效研究,只进行了一个剂量的研究;未考虑其作用于机体的时效性,只进行了单一时间点研究。此外,BSHXF 已有研究证实治疗骨关节炎有效^[27-28],但具体机制尚不清楚,本研究侧重于机制研究,因此未设置阳性对照组。BSHXF 组成成分复杂,相关方药的有效成分对通路的调控机制尚不清楚,仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Sharma L. Osteoarthritis of the knee [J]. *N Engl J Med*, 2021, 384 (1): 51-59.
- [2] Sun X, Zhen X, Hu X, et al. Osteoarthritis in the middle-aged and elderly in China: prevalence and influencing factors [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2019, 16 (23): 4701.
- [3] Allen KD, Thoma LM, Golightly YM. Epidemiology of osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2022, 30 (2): 184-195.
- [4] Giorgino R, Albano D, Fusco S, et al. Knee osteoarthritis: epidemiology, pathogenesis, and mesenchymal stem cells: what else is new? An update [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (7): 6405.
- [5] 冯晓晴,蔡道章,余星磊,等.基于 GBD 大数据中国膝关节炎疾病负担现状与趋势分析 [J]. *现代预防医学*, 2022, 49 (10): 1753-1760.
- [6] 章晓云,曾浩,孟林.膝关节炎疼痛机制及治疗研究进展 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2023, 29 (1): 50-58.
- [7] Wang M, Liu L, Zhang CS, et al. Mechanism of traditional Chinese medicine in treating knee osteoarthritis [J]. *J Pain Res*, 2020, 13: 1421-1429.
- [8] 王俊峰,关雪峰,杨永菊,等.补肾活血法治疗膝关节炎实验研究进展 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2020, 22 (1): 124-127.
- [9] 严华先,刘星,覃利亚.补肾活血方加减治疗膝关节炎肿胀的疗效及对关节功能、血清疼痛-炎症介质的影响 [J]. *中药材*, 2020, 43 (12): 3059-3063.
- [10] 郑陶,许治国,许志宇,等.补肾活血方治疗膝关节炎临床疗效 [J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37 (6): 1506-1509.
- [11] Liu YM, Fu BL, Li XM, et al. Corrigendum: Bushen Huoxue decoction inhibits RANKL-stimulated osteoclastogenesis and glucocorticoid-induced bone loss by modulat-

- ing the NF-kappaB, ERK, and JNK signaling pathways [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1148908.
- [12] 袁琴, 阚卫兵, 宋朋飞, 等. 补肾活血方对大鼠膝关节关节炎滑膜细胞 β -catenin、MMP-7 的影响 [J]. 2012, 25 (9): 761-765.
- [13] 许应星, 吴承亮, 吴岩, 等. Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白在补肾活血颗粒含药血清影响成骨细胞过程中的表达及意义 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2011, 31 (4): 537-541.
- [14] Pang TT, Liu C, Yao JJ, et al. Mechanisms of the Bushen Huoxue formula in the treatment of osteoarthritis based on network pharmacology-molecular targets [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2022, 101 (32): e29345.
- [15] Yao Q, Wu XH, Tao C, et al. Osteoarthritis: pathogenic signaling pathways and therapeutic targets [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8 (1): 56.
- [16] Liu XC, Wang LB, Ma CS, et al. Exosomes derived from platelet-rich plasma present a novel potential in alleviating knee osteoarthritis by promoting proliferation and inhibiting apoptosis of chondrocyte via Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *J Orthop Surg Res*, 2019, 14 (1): 470.
- [17] Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20 (3): 175-193.
- [18] Kesavardhana S, Malireddi R, Kanneganti TD. Caspases in cell death, inflammation, and pyroptosis [J]. *Annu Rev Immunol*, 2020, 38: 567-595.
- [19] 雷宁波, 顾玉彪, 闫文, 等. 细胞外基质与核因子- κ B 信号通路的联系及其对骨性关节炎影响的研究进展 [J]. *中国骨与关节损伤杂志*, 2023, 38 (3): 331-333.
- [20] Huang K, Wu LD. Aggrecanase and aggrecan degradation in osteoarthritis: a review [J]. *J Int Med Res*, 2008, 36 (6): 1149-1160.
- [21] Li T, Peng J, Li QQ, et al. The mechanism and role of ADAMTS protein family in osteoarthritis [J]. *Biomolecules*, 2022, 12 (7): 959.
- [22] Lepetsos P, Papavassiliou KA, Papavassiliou AG. Redox and NF-kappaB signaling in osteoarthritis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 132: 90-100.
- [23] Rigoglou S, Papavassiliou AG. The NF-kappaB signaling pathway in osteoarthritis [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45 (11): 2580-2584.
- [24] Kabacaoglu D, Ruess DA, Ai J, et al. NF-kappaB/Rel transcription factors in pancreatic cancer: focusing on RelA, c-Rel, and RelB [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11 (7): 937.
- [25] Durand JK, Baldwin AS. Targeting IKK and NF-kappaB for therapy [J]. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2017, 107: 77-115.
- [26] Hulth A, Lindberg L, Telhag H. Experimental osteoarthritis in rabbits. Preliminary report [J]. *Acta Orthop Scand*, 1970, 41 (5): 522-530.
- [27] 李兴, 肖方骏, 李震, 等. 补肾活血方干预小鼠膝关节关节炎软骨修复的机制 [J]. *中成药*, 2022, 44 (2): 582-586.
- [28] Liu W, Wu YH, Liu XY, et al. Metabolic regulatory and anti-oxidative effects of modified Bushen Huoxue decoction on experimental rabbit model of osteoarthritis [J]. *Chin J Integr Med*, 2013, 19 (6): 459-463.
- [29] 汪国翔, 章晓云. 骨关节炎病变过程中炎症细胞因子及相关信号通路的作用机制 [J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25 (14): 2266-2273.
- [30] Molnar V, Maticic V, Kodvanj I, et al. Cytokines and chemokines involved in osteoarthritis pathogenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (17): 9208.
- [31] Akeson G, Malmud CJ. A role for soluble IL-6 receptor in osteoarthritis [J]. *J Funct Morphol Kinesiol*, 2017, 2 (3): 27.
- [32] Yu H, Huang T, Lu WW, et al. Osteoarthritis pain [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (9): 4642.
- [33] Fang Y, Yang L, He J. Plantanone C attenuates LPS-stimulated inflammation by inhibiting NF-kappaB/iNOS/COX-2/MAPKs/Akt pathways in RAW 264.7 macrophages [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 143: 112104.
- [34] Yuan Q, Wang J, Guo LC, et al. Neobavaisoflavone ameliorates LPS-induced RAW264.7 cell inflammations by suppressing the activation of NF-kappaB and MAPKs signaling pathways [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2022, 25 (8): 1021-1027.
- [35] Xiang W, Zheng QH, Liu AM, et al. Recent therapeutic strategies for excessive chondrocyte death in osteoarthritis: a review [J]. *Orthop Surg*, 2023, 15 (6): 1437-1453.
- [36] Choi MC, Jo J, Park J, et al. NF-kappaB signaling pathways in osteoarthritic cartilage destruction [J]. *Cells*, 2019, 8 (7): 734.
- [37] Xiao SQ, Cheng M, Wang L, et al. The role of apoptosis in the pathogenesis of osteoarthritis [J]. *Int Orthop*, 2023, 47 (8): 1895-1919.
- [38] Wan C, Zhu XH, Cheng YH, et al. Effects of inner-heat-ing acupuncture on apoptosis of chondrocytes and expression of Caspase-3 and Caspase-9 in rats with knee osteoarthritis [J]. *Zhongguo Zhen Jiu*, 2019, 39 (4): 409-416.
- [39] Shi PF, Xu J, Cui HJ. The recent research progress of NF-kappaB signaling on the proliferation, migration, invasion, immune escape and drug resistance of glioblastoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (12): 10337.

(收稿日期: 2024-01-07; 修回日期: 2024-03-06)

参松养心胶囊中 4 种成分在大鼠血浆中药动学研究

马晨阳^{1,2}, 符子轩¹, 王哲永¹, 赵旻^{1*}, 赵春杰^{1*} (1.沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016; 2.辽宁省肿瘤医院, 沈阳 110042)

摘要: 目的 考察参松养心胶囊中巴马汀、小檗碱、五味子甲素、丹参酮 II A 在大鼠血浆中的药动学过程。方法 大鼠以 $0.43 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 药物剂量给予参松养心胶囊灌胃, 于不同时间点采血。以卡马西平为内标, 建立 LC-MS/MS 法测定大鼠血浆中的巴马汀、小檗碱、五味子甲素、丹参酮 II A 的血药浓度并计算主要药动学参数。结果 巴马汀、小檗碱、五味子甲素、丹参酮 II A 在各自浓度范围内与峰面积比值线性关系良好, 精密性, 准确度, 提取回收率, 基质效应结果均符合测定要求。并根据 PKSolver 分别计算出以上 4 种成分药动学参数 t_{\max} 、 C_{\max} 、 $t_{1/2}$ 、 $AUC_{0 \sim t}$ 、 $AUC_{0 \sim \infty}$ 值。结论 所建立的 LC-MS/MS 分析方法, 可灵敏、快速、准确地应用于大鼠血浆中参松养心胶囊的主要活性成分, 为参松养心胶囊的临床研究和合理用药提供参考。

关键词: 参松养心胶囊; LC-MS/MS; 药动学

中图分类号: R283

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)07-1732-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.008

Pharmacokinetics of 4 components of Shensong Yangxin capsules in rat plasma

MA Chen-yang^{1,2}, FU Zi-xuan¹, WANG Zhe-yong¹, ZHAO Min^{1*}, ZHAO Chun-jie^{1*} (1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016; 2. Liaoning Cancer Hospital & Institute, Shenyang 110042)

Abstract: Objective To determine the pharmacokinetics of palmatine, berberine, schisandrin A, and tanshinone II A in rat plasma of Shensong Yangxin capsules. **Methods** Rats were orally administered with a dosage of $0.43 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ Shensong Yangxin capsules, and blood samples were collected at different time points. Carbamazepine was used as the internal standard. LC-MS/MS method was established to determine the blood drug concentrations of palmatine, berberine, schisandrin A, and tanshinone II A in rat plasma and calculate the main pharmacokinetic parameters. **Results** Palmatine, berberine, schisandrin A, and tanshinone II A showed good linear relationship within their respective ranges. The precision and accuracy, extraction recovery rate, and matrix effect all met the requirements for biological sample determination. The pharmacokinetic parameters t_{\max} , C_{\max} , $t_{1/2}$, $AUC_{0 \sim t}$ and $AUC_{0 \sim \infty}$ of the above 4 components were calculated based on PKSolver. **Conclusion** The established LC-MS/MS analysis method is sensitive, quick, and accurate, and can be applied to the main active ingredients of Shensong Yangxin capsules in rat plasma, providing a reference for research and rational use of Shensong Yangxin capsules.

Key words: Shensong Yangxin capsule; LC-MS/MS; pharmacokinetics

参松养心胶囊是吴以岭教授及其学术团队遵照《黄帝内经》结合临床实践而创制出来的治疗常见的心脏器质与功能性异常的一个有效中成药^[1]。该药由人参、麦冬、山茱萸、丹参、酸枣仁(炒)、

桑寄生、赤芍、土鳖虫、甘松、黄连、南五味子、龙骨共 12 味中药组成, 具有活血通络、益气养阴、安神镇静的作用^[2-3]。因其不良反应相对较少, 安全性较高^[4-6], 近年来被广泛应用于治疗或联合治

作者简介: 马晨阳, 女, 硕士研究生, 主要从事药物分析及静脉用药调配研究, email: 1415529859@qq.com *通信作者: 赵旻, 女, 硕士研究生导师, 主要从事基于组学技术的中药现代化研究与中药辅助化疗药物的减毒增效作用研究, email: zm19871224@sina.com; 赵春杰, 男, 博士研究生导师, 主要从事体内药物分析及中西新药开发研究, email: mail_zcjjjj@sina.com

疗心律失常^[7-9]、心力衰竭^[10-12]、冠心病^[13-14]等心脏疾病。

中药成分复杂, 药物进入体内后还需经过消化道中各种代谢酶、肠道菌群等的作用^[15], 再吸收入血而后发挥药效, 其有效性可以认为是所有活性物质综合作用的结果, 所以配伍后由于多种成分之间很可能会存在相互作用, 就会对成分在体内的代谢行为产生影响^[16-17], 使得中药复方制剂的效应物质的解析更加困难。因此体内药动学是中药研究中十分重要的一环, 有助于阐释多成分之间的相互作用机制, 是研究中药入体后药效、物质基础等方面的有力手段^[18]。

目前参松养心胶囊活性成分在大鼠血浆中的药动学研究仍未有报道, 本实验采用液相色谱-串联质谱 (liquid chromatography-tandem mass spectrometric, LC-MS/MS) 方法进行药动学研究, 在已有研究^[19-20]的基础上选择了巴马汀、小檗碱、五味子甲素、丹参酮 II A (化学结构式如图 1 所示) 4 种活性成分进行研究, 以揭示参松养心胶囊体内过程。其中小檗碱和巴马汀都已被证明可通过多种途径调节导致心血管疾病发生的各种因素而发挥心脏保护作用^[21]; 五味子甲素对心功能不全和慢性心力衰竭具有重塑作用^[22]; 丹参酮 II A 通过 AMPK/mTOR 介导的自噬途径发挥心脏保护作用^[23]。

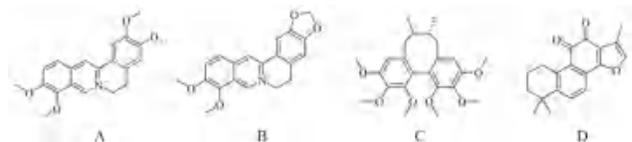


图 1 巴马汀 (A), 小檗碱 (B), 五味子甲素 (C), 丹参酮 II A (D) 的化学结构

Fig 1 Structure of palmatine (A), berberine (B), schisandrin A (C) and tanshinone II A (D)

1 材料

Waters I-Class UPLC 超高效液相色谱仪、Waters Xevo TQ-S 三重四极杆质谱仪 (美国 Waters 公司); TGL-16C 高速离心机 (上海安亭科学仪器厂); ZiGui 干式氮吹仪 (上海梓桂仪器有限公司); XW-80A 微型涡旋混合仪 (上海沪西分析仪器有限公司); KQ3200E 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); BT-25S 电子分析天平 (赛多利斯科学仪器有限公司)。

参松养心胶囊 (北京以岭药业有限公司, 批号: 2103038); 卡马西平对照品 (批号: H07J9L63102, 纯度 $\geq 98\%$, 上海源叶生物科技有限公司); 盐酸巴马汀对照品 (批号: 110732-200907, 纯度 $\geq 86\%$)、

盐酸小檗碱对照品 (批号: 0713-9906, 纯度 $\geq 98\%$)、五味子甲素 (批号: 110764-201915, 纯度 $\geq 99.5\%$)、丹参酮 II A 对照品 (批号: 110766-201520, 纯度 $\geq 98\%$) (中国食品药品检定研究院)。乙腈、甲醇 (质谱级, 美国 Fisher 公司); 甲酸 (色谱纯, 天津科密欧化学试剂有限公司)。纯化水 (杭州娃哈哈集团有限公司)。

健康 SPF 级大鼠 6 只, 雄性, 6 ~ 7 周龄, 体重 (220 ± 20) g [辽宁长生生物技术股份有限公司。使用许可证号: SYXK (辽) 2021-0009, 动物质量合格证号: 210726231101004912]。所有动物实验均严格按照医学伦理委员会的规定进行。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与质谱条件

色谱柱为 Universil XB C₁₈ 色谱柱 (150 mm \times 2.1 mm, 3 μ m)。流动相为乙腈 (A) -0.1% 的甲酸溶液 (B), 梯度洗脱 (0 min, 10%A; 0 ~ 3.0 min, 10% ~ 40%A; 3.0 ~ 10.0 min, 40% ~ 90%A; 10.0 ~ 11.0 min, 90%A; 11.0 ~ 12.0 min, 90% ~ 10%A; 12.0 ~ 15.0 min, 10%A); 流速为 0.2 mL \cdot min⁻¹; 进样量为 2 μ L; 柱温为 35 $^{\circ}$ C, 内标为卡马西平。离子源为电喷雾离子化源 (ESI), 正离子模式监测, 扫描方式为多反应监测 (MRM): 源温度为 150 $^{\circ}$ C, 雾化气体温度为 350 $^{\circ}$ C, 毛细管电压为 3.0 kV, 待测物与内标的质谱检测参数见表 1。

表 1 4 种化合物及内标的 MRM 模式参数

Tab 1 MRM model parameters of 4 compounds and internal standard

待测物	检测模式	离子对	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
卡马西平	[M + H] ⁺	237.20 > 194.20	3	15
巴马汀	[M + H] ⁺	352.07 > 307.94	53	24
小檗碱	[M + H] ⁺	336.07 > 319.95	42	26
五味子甲素	[M + H] ⁺	417.39 > 316.02	53	22
丹参酮 II A	[M + H] ⁺	295.05 > 248.98	44	20

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、五味子甲素、丹参酮 II A 对照品适量, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解, 稀释得 1000 μ g \cdot mL⁻¹ 的各对照品储备液。精密量取上述对照品储备液适量, 加甲醇稀释, 摇匀。制成含巴马汀 (5、10、50、100、200、400、500 ng \cdot mL⁻¹)、小檗碱 (5、10、50、100、200、400、500 ng \cdot mL⁻¹)、五味子甲素 (1、5、10、20、50、100、200 ng \cdot mL⁻¹)、丹参酮 II A (5、10、50、100、200、400、500 ng \cdot mL⁻¹) 的系列混合对照品溶液, 于 4 $^{\circ}$ C 条件下保存备用。

2.2.2 内标溶液 称取适量卡马西平对照品

于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解, 稀释得到 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的内标储备液。取内标储备液, 用甲醇稀释为质量浓度 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的内标溶液, 于 4°C 条件保存。

2.2.3 参松养心胶囊溶液 称取参松养心胶囊内容物粉末 1.8 g 于 50 mL 离心管中, 加入 30 mL 纯净水, 混悬, 配制成 $0.06 \text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的参松养心胶囊溶液。

2.3 给药、采血与处理

2.3.1 给药、采血 健康雄性 Wistar 大鼠 6 只适应性喂养一周, 实验前 12 h 禁食, 自由饮水。按照 $0.43 \text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量给予给药溶液。在给药后 0.083、0.25、0.5、1、1.5、2、3、4、6、8、10、12、24 h 眼眶后静脉丛取血, 采集于肝素钠浸润过的离心管中, $5000 \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 10 min, 分离得到血浆, 于 -20°C 冰箱储存。

2.3.2 血浆样品处理 解冻后吸取 $100 \mu\text{L}$ 血浆样品于 1.5 mL 离心管中, 加入 $10 \mu\text{L}$ 内标溶液, $10 \mu\text{L}$ 甲醇, 涡旋 1 min, 加入 $400 \mu\text{L}$ 乙腈, 涡旋 1 min, $13\ 000 \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。取上清液在氮气流 40°C 下干燥, 将残余物用 $100 \mu\text{L}$ 乙腈/水 (90 : 10, V/V) 复溶, 涡旋 1 min, $13\ 000 \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液, 再次以 $13\ 000 \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液于进样小瓶中进行分析。

2.4 方法学验证

2.4.1 专属性 取 6 只大鼠的空白血浆混合后, 以等体积甲醇代替内标溶液, 按照血浆样品处理方法制作空白血浆样品 (A), 空白血浆中加入浓度为定量下限 (LLOQ) 的巴马汀、小檗碱、五味子甲素、丹参酮 II A 的混合对照品溶液 (B) 以及灌胃参松养心胶囊溶液后 0.5 h 的血浆样品 (C), 均同法处理后测定, 结果如图 2 所示, 血浆中的内源性物质不干扰分析, 4 种成分峰形良好, 表明该方法的专属性良好。内标卡马西平、巴马汀、小檗碱、五味子甲素、丹参酮 II A 的保留时间分别为 6.83、5.01、5.01、12.25、12.69 min。

2.4.2 标准曲线和 LLOQ 取空白血浆 $100 \mu\text{L}$ 共 7 份, 分别加入“2.2.1”项下系列混合对照品溶液 $10 \mu\text{L}$, 按照血浆样品处理方法制成含巴马汀 ($0.5、1、5、10、20、40、50 \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)、小檗碱 ($0.5、1、5、10、20、40、50 \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)、五味子甲素 ($0.1、0.5、1、2、5、10、20 \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)、丹参酮 II A ($0.5、1、5、10、20、40、50 \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的系列样品溶液。以分析物浓度为横坐标 (x), 以待测物与内标的峰面积比值为纵坐标 (y), 用

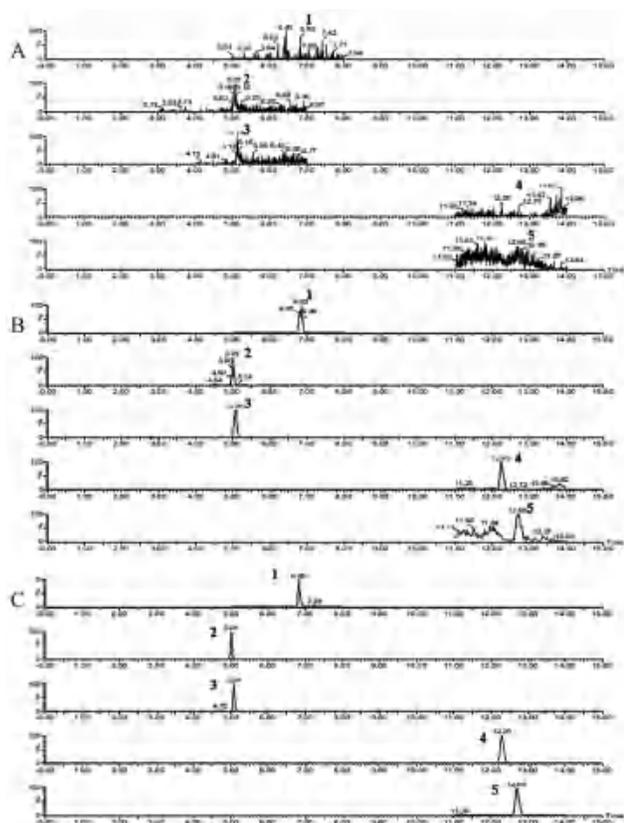


图 2 各待测成分的专属性色谱图

Fig 2 Representative chromatograms each component in plasma

A. 空白血浆 (blank plasma); B. 空白血浆加入待测对照品 (blank plasma spiked with the standards) (LLOQ); C. 口服给药后的血浆样本 (plasma samples taken after the oral administration); 1. 卡马西平 (carbamazepine); 2. 巴马汀 (palmatine); 3. 小檗碱 (berberine); 4. 五味子甲素 (schisandrin); 5. 丹参酮 II A (tanshinone II A)

加权最小二乘法进行线性回归, $1/\chi^2$ 为加权系数, 绘制回归曲线, 线性回归方程和相关系数及 LLOQ 见表 2。结果表明巴马汀在 $0.5 \sim 50 \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 小檗碱在 $0.5 \sim 50 \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 五味子甲素在 $0.1 \sim 20 \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 丹参酮 II A 在 $0.5 \sim 50 \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与峰面积比值线性关系良好。

2.4.3 精密度和准确度 取空白血浆 $100 \mu\text{L}$, 按照“2.4.2”项下方法制备 LLOQ 及低、中、高浓度的质控样品, 即包括巴马汀 ($0.5、1.5、8、42 \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), 小檗碱 ($0.5、1.5、8、42 \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), 五味子甲素 ($0.1、0.3、1.5、16 \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), 丹参酮 II A ($0.5、1.5、8、42 \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)。每个浓度制备 6 份, 与当日标准曲线同批测定, 连续 3 d, 以计算方法的日内和日间精密度和准确度。结果表明, 各浓度的质控样品的日内和日间精密度的 RSD 值分别小于 8.6% 和 8.9%, 日内和日间 RE 分别低于 7.0% 和 6.9%, 符合生物样品测定要求。

2.4.4 提取回收率和基质效应 空白血浆 $100 \mu\text{L}$, 制成 3 个浓度 (低、中、高) 的质控样品, 各制备

表 2 4 种成分的回归方程、相关系数、线性范围及 LLOQ

Tab 2 The regression equations, correlation coefficients, linear ranges and LLOQ of the 4 analytes

成分	回归方程	r	线性范围 / (ng · mL ⁻¹)	LLOQ / (ng · mL ⁻¹)
巴马汀	$y = 8.92 \times 10^{-2}x - 4.0 \times 10^{-3}$	0.9985	0.5 ~ 50	0.5
小檗碱	$y = 5.22 \times 10^{-2}x + 4.80 \times 10^{-3}$	0.9973	0.5 ~ 50	0.5
五味子甲素	$y = 4.20 \times 10^{-2}x + 3.10 \times 10^{-3}$	0.9972	0.1 ~ 20	0.1
丹参酮 II A	$y = 1.25 \times 10^{-2}x + 2.00 \times 10^{-4}$	0.9984	0.5 ~ 50	0.5

6 份进样分析，相应的峰面积的比值为 A。另取空白血浆 100 μL，按“2.3.2”项下血浆样品处理方法，在第一次离心后得到的上清液中加入内标溶液和相应浓度的混合对照品溶液各 10 μL，后同“2.3.2”项下处理，进样分析，获得相应的峰面积的比值 B。另取 3 个浓度（低、中、高）的混合对照品溶液 10 μL 和内标溶液 10 μL，涡旋混合 1 min，后同“2.3.2”项下处理，进样分析，获得相应的峰面积的比值 C。A 与 B 的比值即为提取回收率，B 与 C 的比值即为基质效应。结果表明低、中、高 3 个质量浓度的提取回收率在 86.1% ~ 99.7%，基质效应为 93.4% ~ 101.2%，均符合要求。

2.4.5 稳定性试验 取空白血浆 100 μL，制备 3 个浓度（低、中、高）的质控样品各 3 份，考察在不同的储存条件下的稳定性：室温放置 24 h，-20℃ 下放置 7 d，三次冻融循环（-20℃ - 室温）及处理后样品 4℃ 放置 24 h。试验结果表明，各浓度质控样品在 4 种不同条件下，各浓度 QC 样品的 RSD 均小于 10%，RE 值均介于 ±9%，结果见表 3。证明样品在上述试验条件下稳定性良好。

表 3 4 种分析物在不同条件下的稳定性 (n = 3)

Tab 3 Stability of the 4 analytes under different conditions (n = 3)

成分	质量浓度 / (ng · mL ⁻¹)	稳定性 RSD/%			
		室温放置 24 h	三次冻融循环 (-20℃ - 室温)	处理后样品 4℃ 放置 24 h	-20℃ 下放置 7 d
巴马汀	1.5	3.7	5.9	7.8	6.3
	8	6.9	7.4	5.7	4.6
	42	5.2	8.7	4.5	7.8
小檗碱	1.5	6.4	4.6	8.4	6.5
	8	8.2	7.5	7.9	9.2
	42	6.6	6.8	5.1	8.9
五味子甲素	0.3	3.8	7.3	8.9	7.6
	1.5	7.0	5.8	8.6	3.3
	16	6.4	3.7	6.1	6.8
丹参酮 II A	1.5	5.4	5.1	7.4	7.5
	8	6.3	4.7	8.7	5.2
	42	4.8	6.9	8.8	3.9

2.5 血药浓度和药动学参数

分别分析大鼠灌胃参松养心胶囊溶液后巴马汀、小檗碱、五味子甲素、丹参酮 II A 与内标物

峰面积比，计算得给药后各时间点的血药浓度，巴马汀、小檗碱、五味子甲素、丹参酮 II A 药物浓度 - 时间曲线详见图 3；将测定的血浆样品中的血药浓度数据导入 PKSolver 进行处理，以非房室模型计算药动学参数 t_{max} 、 C_{max} 、 $t_{1/2}$ 、 $AUC_{0 \sim t}$ 、 $AUC_{0 \sim inf}$ ，结果详见表 4。

3 结论与讨论

对内标物质的选择，本研究前期分别采用了氨基比林、氯霉素和卡马西平进行测定。结果显示卡马西平响应较高，峰形较好，比较稳定，因此选择卡马西平作为内标。

本研究前期采用正、负离子模式对巴马汀、小檗碱、五味子甲素、丹参酮 II A 和内标卡马西平进行扫描发现，在正离子模式下，所有待测成分的离子化程度更高，且干扰较少，

流动相组成方面考察了甲醇 - 水和乙腈 - 水系统，结果表明乙腈 - 水体系获得的峰形相对较好，并考察了水相中不同浓度的甲酸（体积分数为 0.05%、0.1%、0.2%）的情况，结果显示当在流动相中使用 0.1% 甲酸可改善峰形且缩短检测时间，同时质谱响应较高，故以乙腈 - 水（体积分数为 0.1% 的甲酸）作为流动相。

该研究考察了去除样品中血浆蛋白的前处理方法，分别采用液液萃取法（乙酸乙酯为溶剂）和蛋白沉淀法（包括甲醇、乙腈作为蛋白沉淀剂）考察去除血浆蛋白的效果。结果表明，液液萃取的处理导致五味子甲素的回收率较低；而蛋白沉淀法中乙腈为蛋白沉淀剂可以提高待测成分的检测灵敏度，更好地降低基质效应的干扰，故最后选用乙腈作为蛋白质沉淀剂。

大鼠血浆中药动学研究结果显示大鼠在灌胃参松养心胶囊后，血浆中的巴马汀和小檗碱的浓度快速升高，均在 0.5 h 左右便达到了最大血药浓度，这说明巴马汀和小檗碱进入大鼠体内后能够被快速吸收，迅速发挥其治疗作用，两种物质的 $t_{1/2}$ 约为 8 h，说明发挥治疗作用的时间相对较长。巴马汀和小檗碱这两种成分可能是由于性质

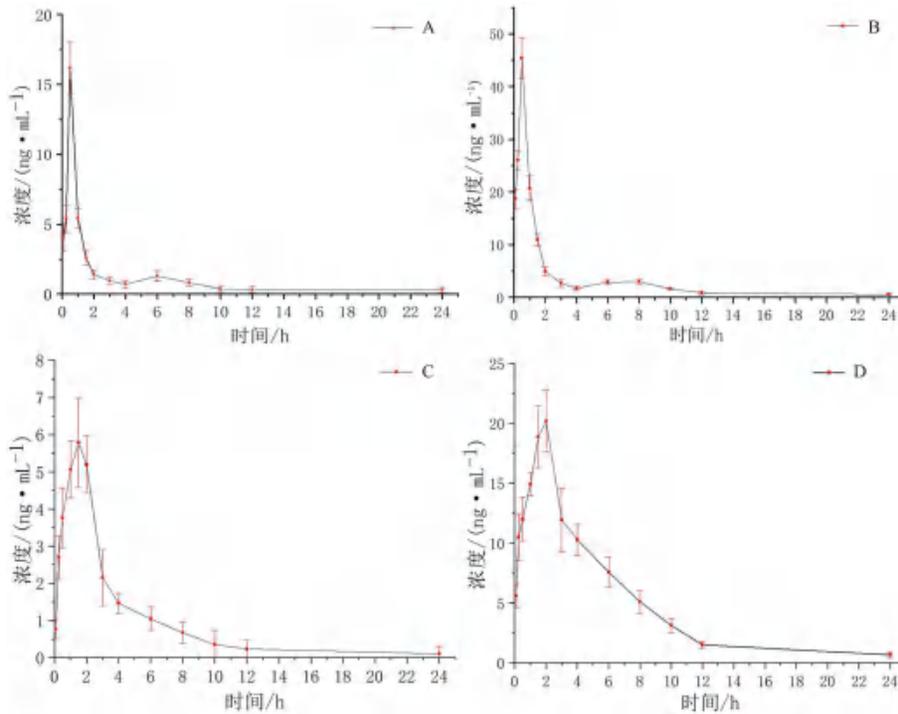


图 3 巴马汀 (A)、小檗碱 (B)、五味子甲素 (C)、丹参酮 II A (D) 在大鼠体内的药物浓度 - 时间曲线 (n = 6)

Fig 3 Drug-time curves of palmatine (A), berberine (B), schisandrin A (C), and tanshinone II A (D) (n = 6)

表 4 巴马汀、小檗碱、五味子甲素、丹参酮 II A 的药动学参数 (n = 6)

Tab 4 Pharmacokinetic parameters palmatine, berberine, schisandrin A, and tanshinone II A (n = 6)

成分	$C_{max}/(ng \cdot mL^{-1})$	t_{max}/h	$t_{1/2}/h$	$AUC_{0 \sim 24}/(ng \cdot h \cdot mL^{-1})$	$AUC_{0 \sim inf}/(ng \cdot h \cdot mL^{-1})$
巴马汀	16.33 ± 2.66	0.5 ± 0.18	8.19 ± 1.17	23.63 ± 6.51	27.09 ± 7.28
小檗碱	45.38 ± 6.83	0.5 ± 0.14	8.20 ± 1.65	74.04 ± 9.87	81.11 ± 13.56
五味子甲素	5.85 ± 1.91	1.5 ± 0.10	8.33 ± 1.31	22.20 ± 5.93	23.29 ± 6.05
丹参酮 II A	20.19 ± 4.17	2.0 ± 0.21	4.88 ± 0.85	113.05 ± 14.67	117.82 ± 17.43

极其相似，药物浓度 - 时间曲线也呈现出大体相同的走势，均产生了双峰的现象，这和文献中的报道一致^[24-25]，推测这种现象可能与肝肠循环有关^[26-27]。临床用药时为防止重吸收导致浓度叠加应考虑用药时间间隔；五味子甲素 t_{max} 约为 1.5 h， $t_{1/2}$ 超过 8 h，说明五味子甲素吸收速度一般，消除比较慢，在其达到最大血药浓度后缓慢降低，发挥治疗作用时间相对较长；丹参酮 II A 在大鼠体内约 2 h 后达到最高血药浓度，其 $t_{1/2}$ 小于 5 h，说明其在大鼠体内能够被快速代谢。五味子甲素和丹参酮 II A 没有出现双峰现象，大鼠体内不存在肝肠循环现象。该研究揭示了参松养心胶囊中 4 种成分在大鼠体内的药动学特征，可为参松养心胶囊在体内的作用规律研究提供依据，为临床用药提供参考。

综上所述，本研究首次采用灵敏的 LC-MS/MS 方法同时对大鼠血浆中的巴马汀、小檗碱、五味子甲素、丹参酮 II A 进行了研究。所建立的

方法可以准确、快速、灵敏地同时测定大鼠血浆中参松养心胶囊的 4 种活性成分的药动学参数，虽然大鼠无法完全等同于人体体内的情况，但对参松养心胶囊的临床研究及用药合理性具有参考价值 and 指导作用。

参考文献

- [1] 张利, 蒋维晏, 刘春援. 参松养心胶囊药理作用及临床应用研究进展 [J]. 江西中医药, 2014, 45 (12): 70-72.
- [2] 何文凤, 薛成, 郑健康, 等. 参松养心胶囊联合沙库巴曲缬沙坦治疗阵发性心房颤动合并慢性心力衰竭对 hs-CRP、BNP、Ang II 及心功能的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2024, 42 (6): 95-98.
- [3] 杜涛, 戴泽亮, 陈芝蕾, 等. 参松养心胶囊联合西药治疗阵发性房颤疗效和安全性的网状 Meta 分析 [J]. 中华保健医学杂志, 2023, 25 (4): 464-466.
- [4] 陈发秀, 游靓, 李强, 等. 参松养心胶囊辅助治疗老年射血分数保留的心力衰竭合并心房颤动的疗效观察 [J]. 江西中医药, 2023, 54 (8): 49-51.
- [5] 陈修芳. 参松养心胶囊联合胺碘酮在老年冠心病室性早搏患者中的应用效果 [J]. 实用中西医结合临床, 2023,

- 23 (12): 98-101.
- [6] 孙志伟, 陈晓娟, 崔明慧, 等. 参松养心胶囊联合西药对阵发性房颤患者 P 波离散度影响及安全性的 Meta 分析 [J]. 中医药临床杂志, 2023, 35 (8): 1543-1548.
- [7] 郝丽丽, 路瑞华, 唐文欣. 参松养心胶囊联合美托洛尔治疗冠心病室性早搏的临床效果 [J]. 中国当代医药, 2022, 29 (1): 60-63.
- [8] Zhao YX, Gao F, Zhang Y, et al. Shensong Yangxin capsules prevent ischemic arrhythmias by prolonging action potentials and alleviating Ca^{2+} overload [J]. Mol Med Rep, 2016, 13 (6): 5185-5192.
- [9] Zhang FX, Zou JG, Yu H, et al. Acute efficacy of a traditional Chinese medicine for treatment of frequent premature ventricular contractions in patients with concomitant sinus bradycardia: results from a double-blind, placebo-controlled, multicentre, randomized clinical trial [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019, 2019: 3917282.
- [10] 苏雅静. 老年慢性心力衰竭应用厄贝沙坦联合参松养心胶囊治疗的临床效果 [J]. 内蒙古中医药, 2023, 42 (7): 2-3.
- [11] 刘志杰, 陶然, 杨非柯. 参松养心胶囊联合胺碘酮治疗心力衰竭合并室性心律失常的疗效 [J]. 临床合理用药, 2023, 16 (6): 8-10, 14.
- [12] 缪国平, 廖望翔, 朱桂枝. 参松养心胶囊联合螺内酯治疗慢性心力衰竭临床观察 [J]. 实用中医药杂志, 2022, 38 (11): 1937-1939.
- [13] 莫建民, 章琪, 齐旭浩. 参松养心胶囊治疗冠心病心绞痛疗效观察 [J]. 辽宁中医杂志, 2022, 49 (11): 115-119.
- [14] Zeng ZC, Zhuang ZJ, He YX, et al. Efficacy and safety of Shen-Song-Yang-Xin capsule for treating arrhythmia in the elderly patients with coronary heart disease: protocol for a systematic review and meta-analysis [J]. Medicine, 2018, 97 (51): e13599.
- [15] 常瑞蕊, 陈卫东, 周婷婷. 肠道菌群调控对药动学特征的影响 [J]. 中国药理学杂志, 2019, 54 (15): 1211-1215.
- [16] 胡江玲, 周睿, 吴睿, 等. 葛根苓连片配伍后葛根素在大鼠体内药动学研究 [J]. 中南药学, 2023, 21 (11): 2932-2937.
- [17] 刘明妍, 冯梦晗, 刘洁, 等. 川芎对天麻中天麻素及其代谢产物体内药动学的影响 [J]. 中成药, 2023, 45 (11): 3513-3519.
- [18] Jin Y, Qu C, Tang YP, et al. Herb pairs containing *Angelicae Sinensis Radix* (Danggui): a review of bio-active constituents and compatibility effects [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 181: 158-171.
- [19] 刘丽伟, 周霖, 李卓伦, 等. 基于超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱技术的参松养心胶囊化学成分研究 [J]. 中草药, 2019, 50 (24): 5930-5940.
- [20] 周霖, 孙志, 王肖辉, 等. 基于 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 的参松养心胶囊化学成分识别及作用机制研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40 (4): 375-380, 396.
- [21] Tan HL, Chan KG, Pusparajah P, et al. Rhizoma Coptidis: a potential cardiovascular protective agent [J]. Front Pharmacol, 2016, 7: 362.
- [22] Gao LJ, Li T, Li SF, et al. Schisandrin A protects against isoproterenol-induced chronic heart failure via miR-155 [J]. Mol Med Rep, 2022, doi: 10.3892/mmr.2021.12540.
- [23] Zhang XF, Wang QY, Wang XP, et al. Tanshinone II A protects against heart failure post-myocardial infarction via AMPKs/mTOR-dependent autophagy pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 112: 108599.
- [24] 李兵杰, 葛文静, 单朋涛, 等. 二妙丸与三妙丸中 4 种生物碱在正常和关节炎模型大鼠体内的药动学与组织分布差异 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48 (7): 1943-1950.
- [25] Xia ZX, Lv L, Di XM, et al. The compatibility of six alkaloids in ermiao pill explored by a comparative pharmacokinetic and network pharmacological study [J]. Biomed Chromatogr, 2019, 33 (5): e4509.
- [26] Durník R, Šindlerová L, Babica P, et al. Bile acids transporters of enterohepatic circulation for targeted drug delivery [J]. Molecules, 2022, 27 (9): 2961.
- [27] 陈娟娟, 贺灵芝, 李翔. LC-MS/MS 技术在天然产物药代动力学研究中的应用 [J]. 科技创新与生产力, 2023, 44 (7): 64-67.

(收稿日期: 2024-01-02; 修回日期: 2024-03-20)

阿提日拉力片的干燥工艺优化

阿依仙木·加帕尔^{1,2}, 沙塔尔·帕塔尔¹, 买买提依力·如尔买提^{1,2}, 霍仕霞^{1,2}, 李治建^{1,2}, 康雨彤^{1,2*}, 海拉提·吐尔逊^{1,2*} (1. 新疆维吾尔自治区维吾尔医医院, 乌鲁木齐 830049; 2. 新疆中药医院制剂循证与转化重点实验室, 乌鲁木齐 830049)

摘要: **目的** 研究院内制剂阿提日拉力片制备过程中流浸膏的最佳干燥工艺, 优化阿提日拉力片的制备工艺。**方法** 采用正交试验设计, 以干燥方法(电热真空干燥、烘箱干燥、常压水浴干燥)、干燥时间(12、24、36 h)、干燥温度(60、70、80 °C)为考察因素, 基于 HPLC 测定的异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 含量的综合评分为评价指标, 优化流浸膏的干燥工艺。**结果** 正交试验结果表明, 阿提日拉力片制备过程中流浸膏的干燥方法和条件对成分含量的影响较小, 其中电热真空干燥, 70 °C, 干燥 24 h 的干燥工艺效果最佳, 干燥后的膏无黏性、粉碎充分。**结论** 院内制剂阿提日拉力片制备过程中流浸膏的最佳干燥工艺可选择电热真空干燥, 70 °C, 干燥 24 h, 本研究旨在为阿提日拉力片制备工艺的优化提供科学依据。

关键词: 院内制剂; 阿提日拉力片; 流浸膏; 干燥工艺; 正交试验; 高效液相色谱

中图分类号: R283

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)07-1738-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.009

Optimization of drying process of Atirilali tablet

Ayixianmu Jiapaer^{1,2}, Shataer Pataer¹, Maimaitiaili Ruermaiti¹, HUO Shi-xia^{1,2}, LI Zhi-jian^{1,2}, KANG Yu-tong^{1,2*}, Hailati Tuerxun^{1,2*} (1. Uyghur Medical Hospital of Xinjiang Uyghur Autonomous Region, Urumq 830049; 2. Xinjiang Key Laboratory of Evidence-Based and Translation, Hospital Preparation of Traditional Chinese Medicine, Urumqi 830049)

Abstract: Objective To optimize the drying process of the liquid extract in the hospital preparation of Atirilali tablets. **Methods** Orthogonal experimental design was adopted. The drying method (electric vacuum drying, oven drying, and atmospheric water bath drying), drying time (12, 24, and 36 h), and drying temperature (60, 70, and 80 °C) were evaluated. The comprehensive scores of isochlorogenic acid A, B, C content determined by HPLC were used as the evaluation index, the drying process of fluid extract was optimized. **Results** The orthogonal test showed that the drying method and conditions of the liquid extract of Atirilali tablets had little effect on the content of the ingredients. In the drying process of the electric vacuum at 70 °C for 24 hours had the best effect. The paste was non-viscous and fully pulverized. **Conclusion** The best drying process of the liquid extract of Atirilali tablets in the hospital include electric vacuum at 70 °C for 24 hours. This study provides a scientific basis for optimization of the preparation process of Atirilali tablets.

Key words: hospital preparation; Atirilali tablet; liquid extract; drying process; orthogonal test; HPLC

白癜风是一种常见的色素脱失性皮肤病, 主要特征是黑色素细胞的减少或功能障碍, 临床表现为皮肤出现白色斑点或斑块^[1], 该症状多发生于阳光

照射的暴露部位, 严重者将导致患者因相貌外观受损而出现精神障碍, 据统计, 其全球患病率约 0.1% ~ 8.0%, 严重影响患者的身心健康^[2]。目前

基金项目: 中国民族医药学会项目 (No.2021M2106-230317); 自治区重点研发项目 (No.2022B03012-4); 自治区天山英才项目 (No.2022TSYCCX0021)。

作者简介: 阿依仙木·加帕尔, 女, 主管药师, 主要从事药物检验及中药民族药制剂研究, email: 342674714@qq.com *通信作者: 康雨彤, 女, 副研究员, 主要从事中药民族药制剂研发方面的研究, email: 526749931@qq.com; 海拉提·吐尔逊, 男, 助理工程师, 主要从事中药民族药制剂配制方面的研究, email: 476091301@qq.com

该病的治疗方案有口服药物、糖皮质激素、光疗、外科手术、脱色等,但尚未取得理想的效果,具有一定的不良反应,且患者接受度较低^[3-4]。因此寻找安全、有效的治疗方案具有重要意义。

阿提日拉力片收载于《新疆维吾尔自治区维吾尔医医疗机构制剂标准》,由驱虫斑鸠菊、阿里红、阿纳其根、茴芹果和荨麻草 5 味药材组成,临床上主要用于治疗白癜风和皮肤白斑^[5-6]。临床研究表明,在白癜风蜜膏、复方驱虫斑鸠菊丸等传统药物治疗的基础上联合使用阿提日拉力片,可显著降低患者的白斑面积和色素再生面积,加快肝脏代谢,且无不良反应发生,患者接受度高,具有很好的临床疗效^[7]。

驱虫斑鸠菊是维吾尔医学中治疗白癜风的核心药物^[8-9],作为该方的君药,占总处方量的 53.76%,主要化学成分有咖啡酰奎宁酸类、黄酮、倍半萜等。蔡良漠等^[10]研究发现,驱虫斑鸠菊酚酸部位的咖啡酰奎宁酸类具有增加毛囊中黑素细胞,促进黑素合成的作用,能够治疗白癜风;刘宗洋等^[11]采用高效液相色谱法(HPLC)同时测定异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 等咖啡酰奎宁酸类成分的含量。

目前,阿提日拉力片的常规制备工艺存在一定的不足,实际操作中常因出膏过多,药材细粉和辅料量较少,达不到手握成团、轻压即散的质软效果,无法制粒压片,影响成品的质量。为此,本研究旨在优化该药的制备工艺,通过增加浸膏干燥工艺,并将干燥后的浸膏粉碎后与上述阿纳其根和阿里红的细粉搅拌均匀加辅料制软材的方法来解决现存的问题。

因此,本研究拟采用正交试验方法优选最佳干燥工艺,以干燥方法、干燥时间和干燥温度作为影响因素,基于 HPLC 法测定的异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 的含量的综合评分作为评价指标,再结合流浸膏干燥标准量化结果,考察该药制备工艺增加浸膏干燥工艺和粉碎工序是否合理可行,为阿提日拉力片的工艺变更提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Shimadzu LC-2030 型高效液相色谱仪(岛津公司); Shim pack GIST-ODS 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)(岛津公司); BSA224S 型电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; KQ-300VDE 型三频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); HHS-21-6 型电热恒温水浴锅(博

讯实业有限公司医疗设备厂); DRF-1 电热真空干燥箱(北京市永光明医疗仪器有限公司); Eco-S15UVF 实验室纯水系统(上海和泰仪器有限公司); BXH-65S 精密程式烘箱(上海博讯医疗生物仪器股份有限公司)。

1.2 试药

异绿原酸 A 对照品(批号: wkq22010609, 纯度 ≥ 98%); 异绿原酸 B 对照品(批号: wkq22012901, 纯度 ≥ 98%); 异绿原酸 C 对照品(批号: wkq22011702, 纯度 ≥ 98%)(四川省维克奇生物科技有限公司); 驱虫斑鸠菊(批号: Z30257204)、茴芹果(批号: Z30505902)(新疆麦迪森维药有限公司); 阿里红(新疆宝康维药有限公司, 批号: ALH-YP-191209); 荨麻草(安徽济善堂中药科技有限公司, 批号: 190701); 甲醇、乙腈(湖北弗顿科学技术有限公司, 色谱级); 磷酸(山东西亚化学有限公司, 色谱级)。

2 方法与结果

2.1 流浸膏的制备

按一定比例称取标准处方量药材,加水煎煮 3 次,每次 1 h,合并煎液,滤过,浓缩为相对密度在 1.2 左右的浸膏。

2.2 基于 HPLC 的含量测定

2.2.1 溶液的制备

① 对照品溶液的制备:精密称定异绿原酸 A、异绿原酸 B 和异绿原酸 C 对照品适量置于量瓶中,加甲醇溶解,分别制成质量浓度为 197、198、201 μg·mL⁻¹ 的溶液,备用。分别精密量取上述异绿原酸 A、异绿原酸 B 和异绿原酸 C 溶液 2.5、5 和 2.5 mL 置于同一个量瓶中,加甲醇混匀,得异绿原酸 A 49.25 μg·mL⁻¹,异绿原酸 B 99.00 μg·mL⁻¹,异绿原酸 C 50.25 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

② 供试品溶液的制备:称取“2.1”项下流浸膏 0.5 g,加 50 mL 甲醇,称定重量,超声 40 min(功率 300 W,频率 50 kHz),放置室温放冷,并用甲醇补足减失的重量,滤过,取续滤液,既得。

2.2.2 色谱条件 色谱柱 Shim pack GIST C18 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇(A)-0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~40 min, 15%~36%B, 40~80 min, 36%B),流速为 1.0 mL·min⁻¹,检测波长为 323 nm,柱温为 30℃,进样量为 10 μL。

2.2.3 系统适用性试验 分别取“2.2.1”项下对照品溶液和供试品溶液适量,按“2.2.2”项下色谱条件进

行检测，以异绿原酸 A 峰计算理论塔板数大于 6000，分离度大于 1.5。对照品及样品的色谱图见图 1。

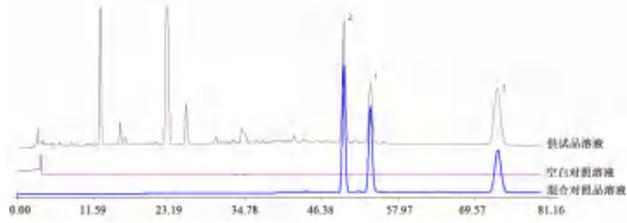


图 1 阿提日拉力片的高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of Atirilali tablet

1. 异绿原酸 A (isochlorogenic acid A); 2. 异绿原酸 B (isochlorogenic acid B); 3. 异绿原酸 C (isochlorogenic acid C)

2.2.4 线性关系考察 取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量，按“2.2.2”项下色谱条件进样测定，以质量浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性关系考察。各成分的回归方程、相关系数及线性范围见表 1。

表 1 线性回归方程

Tab 1 Linear regression equations

成分	回归方程	R^2	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
异绿原酸 A	$Y = 4.624 \times 10^4 X - 1.819 \times 10^4$	0.9999	3.08 ~ 49.25
异绿原酸 B	$Y = 2.840 \times 10^4 X - 2.909 \times 10^4$	0.9995	6.19 ~ 99.00
异绿原酸 C	$Y = 4.110 \times 10^4 X - 2.262 \times 10^4$	0.9999	3.14 ~ 50.25

2.2.5 精密度试验 精密吸取流浸膏供试品溶液，按“2.2.2”项下色谱条件连续进样测定 6 次，记录色谱图，计算得各特征峰的峰面积的 RSD 均小于 2.0%，表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 10 μL ，分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 按“2.2.2”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。计算得各特征峰的峰面积的 RSD 均小于 2.0%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性考察 取“2.1”项下流浸膏 6 份，分别按照“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，按“2.2.2”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。计算得各特征峰峰面积的 RSD 均小于 2.0%，表明重复性良好。

2.2.8 加样回收试验 精密称取“2.1”项下流浸膏 6 份于 25 mL 量瓶中，各 0.25 g，加入等质量的异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 的对照品溶液，按照“2.2.1”项下方法制备成供试品溶液，按“2.2.2”项下色谱条件进样测定，记录峰面积并计算加样回收率。结果显示异绿原酸 A、异绿原酸 B 和异绿原酸 C 的平均加样回收率为 99.40%、99.98%、100.10%， RSD 值分别为 2.1%、1.7%、1.5%，表明所建立的含量测定方法准确性良好。

2.3 正交试验优选流浸膏干燥工艺研究

采用 $L_9(3^4)$ 正交表，根据表 2 的因素水平设计，选择干燥方法、干燥时间、干燥温度作为考察因素，以异绿原酸 A (Y_1)、异绿原酸 B (Y_2) 和异绿原酸 C (Y_3) 的含量的综合评分为评价指标，优选流浸膏最佳干燥工艺。正交试验设计直观分析结果见表 3，方差分析结果见表 4，干燥结果量表见表 5。其中综合评分 = $(Y_1/Y_{1\text{max}}) \times 100 \times 0.4 + (Y_2/Y_{2\text{max}}) \times 100 \times 0.3 + (Y_3/Y_{3\text{max}}) \times 100 \times 0.3$ 。式中 $Y_{1\text{max}}$ 、 $Y_{2\text{max}}$ 、 $Y_{3\text{max}}$ 分别指异绿原酸 A (Y_1)、异绿原酸 B (Y_2) 和异绿原酸 C (Y_3) 含量的最大值^[12]。

表 2 正交试验水平因素表

Tab 2 Level and factor for orthogonal test

水平	因素		
	A. 干燥方法	B. 干燥时间 /h	C. 干燥温度 / $^{\circ}\text{C}$
1	真空干燥	12	60
2	烘箱干燥	24	70
3	常压干燥	36	80

表 3 正交试验直观分析结果

Tab 3 Visual analysis of orthogonal test

序号	A	B	C	空白	异绿	异绿	异绿	综合
					原酸 A	原酸 B	原酸 C	
1	1	1	1	1	0.92	2.05	1.29	137.0
2	1	2	2	2	1.20	2.37	1.57	166.2
3	1	3	3	3	0.83	1.98	1.11	125.9
4	2	1	2	3	1.01	2.13	1.36	145.1
5	2	2	3	1	0.82	1.87	1.02	119.5
6	2	3	1	2	1.05	1.99	1.21	138.0
7	3	1	3	2	1.15	2.16	1.38	152.2
8	3	2	1	3	1.06	2.03	1.27	141.4
9	3	3	2	1	0.73	2.01	1.16	124.3
K_1	143.03	144.76	138.80	126.93				
K_2	134.20	142.36	145.20	152.13				
K_3	139.30	129.40	132.53	137.46				
R	8.833	15.369	12.667	25.20				

表 4 正交试验的方差分析结果

Tab 4 ANOVA of orthogonal test

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	P
A	117.976	2	0.123	19	> 0.05
B	410.029	2	0.472	19	> 0.05
C	240.676	2	0.250	19	> 0.05
误差	961.10	2			

直观分析结果显示，3 个因素的主次关系为干燥方法 > 干燥温度 > 干燥时间，方差分析结果表明 3 个因素对成分指标未见显著的影响，综合评分前三的为 $A_1B_2C_2$ 、 $A_3B_1C_3$ 、 $A_2B_1C_2$ ，再结合干燥结果量表可知， $A_1B_2C_2$ 无黏性、粉碎充分，因此最佳干燥工艺可更改为采用电热真空干燥，70 $^{\circ}\text{C}$ ，干燥 24 h。

表 5 流浸膏干燥结果表
Tab 5 Drying of liquid extract

试验号	A 干燥方法	B 干燥时间/h	C 干燥温度/℃	干浸膏干燥标准量化结果
1	真空干燥	12	60	有黏性; 粉碎不充分
2	真空干燥	24	70	无黏性; 粉碎充分
3	真空干燥	36	80	无黏性; 粉碎充分
4	烘箱干燥	12	70	有黏性; 粉碎不充分
5	烘箱干燥	24	80	无黏性; 粉碎充分
6	烘箱干燥	36	60	无黏性; 粉碎充分
7	常压干燥	12	80	有黏性; 粉碎充分
8	常压干燥	24	60	有黏性; 粉碎不充分
9	常压干燥	36	70	无黏性; 粉碎充分

3 结论

院内制剂作为中药新药转化的源泉, 拥有丰富的人用经验^[13], 阿提日拉力片经临床使用, 发现其具有很好的治疗白癜风的疗效, 且安全性高, 患者接受度强, 但在实际的制备中存在一定的问题, 尚未能很好地满足临床用药的需求, 因此需要对传统制备工艺进行优化, 以期更好地应用于临床。

本研究通过正交试验法, 初步探索出阿提日拉力片流浸膏在电热真空干燥, 70℃、干燥 12 h 条件下能得到粉碎效果较好的干浸膏, 并且不影响指标成分的含量, 又能节约干燥的时间和成本, 可解决传统制备工艺的不足, 可为阿提日拉力片的制备工艺优化和变更提供试验依据和数据基础, 后续可深入研究增加干燥工艺对成型工艺的影响以及探究大批次流浸膏干燥工艺的效果。

参考文献

[1] 任义云, 郭亚南, 程雪, 等. 槐杞黄颗粒联合复方倍他

米松治疗白癜风的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2023, 38(7): 1737-1741.

[2] 冯诗涵, 崔亚玲, 高欢, 等. 川归胶囊质量标准及其治疗白癜风的作用机制研究[J]. 实用药物与临床, 2023, 26(6): 509-515.

[3] 许孟月, 左永杰, 郭菲, 等. 复方卡力孜然酊治疗白癜风的系统评价和试验序贯分析[J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志, 2023, 22(3): 235-246.

[4] 李晓龙, 信如娟, 黄皓, 等. 基于网络药理学和动物实验探讨复方红花补蒺颗粒治疗白癜风的作用机制[J]. 山西医科大学学报, 2023, 54(6): 814-822.

[5] 新疆维吾尔自治区药品监督管理局《新疆维吾尔自治区维吾尔医医疗机构制剂标准》.1. [S]. MZJ-W-0001-2013.

[6] 新疆维吾尔自治区药品监督管理局《新疆维吾尔自治区中药维吾尔药饮片炮制规范》.97 [S]. 2020.

[7] 熊成, 阿肯木江·艾尔肯, 居来提·阿不都瓦衣提, 等. 维吾尔药阿提日拉力片治疗稳定期白癜风的临床疗效观察[J]. 世界最新医学信息文摘(连续型电子期刊), 2020, 20(50): 215-217, 222.

[8] 马晓玲, 罗玉琴, 阿不拉江·图拉克, 等. 基于 AHP-CRITIC 的 D- 最优混料设计优化维药驱虫斑鸠菊乳膏处方研究[J]. 药物评价研究, 2023, 46(4): 721-727.

[9] 周佳, 尚靖, 廖莎, 等. 驱虫斑鸠菊血清药物化学研究[J]. 中南药学, 2011, 9(8): 561-563.

[10] 蔡良谟, 霍仕霞, 林娟, 等. 维药驱虫斑鸠菊化学成分研究[J]. 中成药, 2012, 34(11): 2159-2161.

[11] 刘宗洋, 咎珂, 沙拉麦提·艾力, 等. 驱虫斑鸠菊 HPLC 特征图谱和 6 个成分含量测定[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(4): 910-915.

[12] 胥晨, 纪鹏, 马挺, 等. 鹤榆止泻颗粒剂的成型工艺优化与质量标准研究[J]. 动物医学进展, 2023, 44(8): 65-71.

[13] 刘小雅, 邵明义, 符宇, 等. 中药院内制剂开发的问题与策略[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2023, 25(5): 1782-1787.

(收稿日期: 2024-03-08; 修回日期: 2024-04-16)

G1-熵权法结合 Box-Behnken 响应面法优化银星养脑方醇提工艺

熊丹¹, 蒋翠平¹, 牛江进¹, 严建业², 王平杰², 谢宗明¹, 高明果^{1*}, 陶叶琴^{1*} (1. 浏阳市中医医院, 湖南 浏阳 410300; 2. 湖南中医药大学, 长沙 410006)

摘要: **目的** 优化银星养脑方醇提工艺。**方法** 基于单因素实验, 以乙醇浓度、提取时间、提取溶剂倍数为影响因素, 采用 Box-Behnken 响应面法, 以阿魏酸、3, 6'-二芥子酰基蔗糖、金松双黄酮、异银杏素的转移率和浸膏得率为评价指标, 结合 G1-熵权法计算综合评分, 优选银星养脑方最佳醇提工艺。**结果** 建立了工艺评价函数模型, 模型预测最佳提取工艺为 6 倍量 60% 的乙醇提取 1.4 h, 提取 2 次。**结论** 该提取方法稳定可行, 可为银星养脑方的批量生产提供参考。

关键词: 银星养脑方; 醇提工艺; G1-熵权法; Box-Behnken 响应面法

中图分类号: R283.6

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)07-1742-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.010

Optimization of alcohol extraction of Yinxing Yangnao formula by G1-entropy weight method combined with Box-Behnken response surface methodology

XIONG Dan¹, JIANG Cui-ping¹, NIU Jiang-jin¹, YAN Jian-ye², WANG Ping-jie², XIE Zong-ming¹, GAO Ming-guo^{1*}, TAO Ye-qin^{1*} (1. *Liuyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Liuyang Hunan* 410300; 2. *Hunan University of Chinese Medicine, Changsha* 410006)

Abstract: Objective To optimize the alcohol extraction of Yinxing Yangnao formula. **Methods** Based on the single factor experiments, ethanol concentration, extraction time and times of extraction solvent were used as the influence factors. Box-Behnken response surface methodology was used, and the transfer rates of ferulic acid, 3, 6'-disinapoyl sucrose, sciadopitysin, isoginkgetin and extract yield as evaluation indexes. Combined with G1-entropy weight method, the comprehensive score was calculated to optimize the alcohol extraction of Yinxing Yangnao formula. **Results** The model predicted that the optimal extraction process was extraction with 6 times of 60% ethanol for 1.4 h and 2 extractions. **Conclusion** The extraction method is stable and feasible, which can provide a theoretical basis for the mass production of Yinxing Yangnao formula.

Key words: Yinxing Yangnao formula; alcohol extraction process; G1-entropy weight method; Box-Behnken response surface methodology

银星养脑片是湖南中医药大学附属第二中西医结合医院的院内制剂, 该方为中医治疗血管性痴呆的临床经验方, 主要功效为涤痰醒脑、化痰通络、益气养阴。通过临床经验可知, 本方不仅

能治疗脑血管性痴呆, 而且对弥漫性轴索损伤瘀阻脑络证^[1], 蛛网膜下腔出血介入术后^[2], 风痰瘀阻型脑梗死^[3], 脑动脉硬化症^[4]以及脑外伤后认知障碍^[5]的治疗都有显著影响。该方主要由银

基金项目: 长沙市卫健委中医药科研重点项目 (No.A202304); 湖南省自然科学基金项目 (No.2024JJ9573); 长沙市自然科学基金项目 (No.kq2202497); 湖南省临床医疗技术创新引导项目 (No.2021SK51501)。

作者简介: 熊丹, 女, 硕士, 主要从事医院中药制剂开发研究, email: 631786752@qq.com ***通信作者:** 陶叶琴, 女, 硕士, 主要从事医院中药制剂开发研究, email: 1120965119@qq.com; 高明果, 男, 副主任药师, 主要从事医院中药制剂研究, email: 261759144@qq.com

杏叶、胆南星、川芎、远志、熟地黄、天冬、太子参、制香附、法半夏组成，其中银杏叶中以金松双黄酮、异银杏素为代表的银杏叶双黄酮在抗氧化、抗炎、神经保护等方面药理作用显著^[6-7]，远志中的 3, 6'-二芥子酰基蔗糖具有抗抑郁和神经保护作用，可增强 5-羟色胺 (5-HT) 系统功能，并能够保护受损的神经细胞^[8-9]，川芎中的阿魏酸具有显著的抗炎、抗氧化、抗血栓形成、抑制血小板聚集，以及保护心血管等功效^[10-11]。原方制备方法简单，即大部分药材水提，个别药材打粉，再将两部分混合即得，缺少科学的工艺参数。

本研究前期根据组方药材成分的理化性质，对银杏叶、远志、川芎进行醇提，药渣再与其他药材混合水提。鉴于中药复方制剂多是通过多通道、多靶点综合发挥疗效的特点，本研究采用多指标综合加权评分法进行处方工艺的优选，以金松双黄酮、异银杏素、阿魏酸、3, 6'-二芥子酰基蔗糖的转移率和浸膏得率作为考察指标，采用 G1-熵权法同时对多指标进行赋权计算综合评分，使醇提工艺的评价更为科学合理^[12-14]。在单因素实验基础上，采用 Box-Behnken 响应面法设计实验，建立多元回归方程拟合因素和综合评分之间的函数关系^[15-16]，优选合理、高效、稳定的银星养脑方醇提工艺参数，为银星养脑方的后续研究及新药开发奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

Acquity UPLC HCLAS 超高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); ME204E 万分之一电子分析天平 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]; SY-5000 旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂); YP2002N 电子天平 (上海菁海仪器有限公司); Option R7 ultra AN 超纯水系统 (英国 ELGA LabWaters 公司); KQ-800DE 超声波清洗机 (昆山市超声仪器有限公司); DZTW 调温电热套 (北京市永光明医疗仪器有限公司)。

1.2 试药

本方各味药材均购自安徽鑫泰药业有限公司，银杏叶 (批号: 220301)、蜜远志 (批号: 210403)、川芎 (批号: 220901)，经湖南中医药大学中药鉴定教研室周小江教授鉴定为真品，符合 2020 年版《中国药典》标准; 对照品金松双黄酮 (批号: 521-34-6, 纯度 $\geq 98\%$)、异银杏素 (批号: 548-19-6, 纯度 $\geq 98\%$)、3, 6'-二芥子酰基

蔗糖 (批号: 139891-98-8, 纯度 $\geq 98\%$) (维克奇生物科技有限公司); 阿魏酸 (批号: 110773-201915, 纯度 $\geq 99.4\%$, 中国食品药品检定研究院); 甲醇、乙腈、磷酸为色谱纯，超纯水自制，其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 银星养脑醇提液的制备

称取银星养脑方醇提饮片银杏叶 10.50 g、远志 2.10 g、川芎 5.25 g。乙醇加热回流提取 2 次，滤过，合并滤液，浓缩，定容至 250 mL，即得。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取阿魏酸、3, 6'-二芥子酰基蔗糖、金松双黄酮、异银杏素适量，金松双黄酮加少量二甲亚砜 (DMSO) 溶解，混合后加甲醇超声溶解稀释定容至 20 mL，摇匀，即得 (各对照品质量浓度为阿魏酸 $0.0672 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、异银杏素 $0.1000 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、3, 6'-二芥子酰基蔗糖 $0.1020 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、金松双黄酮 $0.1000 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密吸取“2.1”项下制备的醇提液 5 mL 稀释定容至 10 mL，用 0.22 μm 微孔滤膜过滤，即得。

2.2.3 阴性样品溶液的制备 取不含相应药材的银星养脑方醇提饮片，按“2.1”及“2.2.2”项下方法制备，即得。

2.3 醇提液中指标成分的转移率测定

2.3.1 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱 (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm); 流动相 0.1% 磷酸水溶液 (A) - 乙腈 (B)，梯度洗脱程序 (0 ~ 45 min, 5% ~ 32%B, 45 ~ 90 min, 32% ~ 95%B, 90 ~ 100 min, 95% ~ 5%B)。流速 $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$; 检测波长 321 nm; 进样量 $1 \mu\text{L}$ 。

2.3.2 方法学验证

① 专属性实验: 精密吸取 $1 \mu\text{L}$ 混合对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液，按“2.3.1”项下色谱条件进行定性鉴别。结果如图 1，可见混合对照品溶液与供试品溶液在相同保留时间处有对应色谱峰，阴性无干扰。表明该条件下方法专属性较好。

② 线性关系考察: 精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 1、1、1、3、5 mL，分别加甲醇定容至 20、10、5、5、5 mL，摇匀，制成系列质量浓度，按“2.3.1”项下色谱条件进样测定，以各对照品质量浓度为横坐标 (X)，峰面积积分值为纵坐标 (Y)，进行线性回归方程拟合，考察各成

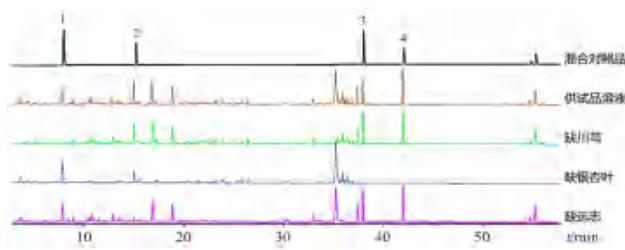


图 1 混合对照品、供试品、缺川芎阴性样品、缺银杏叶阴性样品、缺远志阴性样品的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC of mixed reference substance, sample, negative samples without ligustrum Chuanxiong, negative samples without ginkgo biloba and negative samples without polygalae

1. 阿魏酸 (ferulic acid); 2. 3, 6'-二芥子酰基蔗糖 (3, 6'-disinapoyl sucrose); 3. 异银杏素 (isoginkgetin); 4. 金松双黄酮 (sciadopitysin)

表 1 4 种成分线性范围与回归方程

Tab 1 Linear range and regression equation of 4 components

化学成分	回归方程	R ²	线性范围 / (μg · mL ⁻¹)
阿魏酸	$Y = 14.32 \times 10^3 X - 2.506 \times 10^3$	1.000	3.360 ~ 67.20
3, 6'-二芥子酰基蔗糖	$Y = 5.036 \times 10^3 X - 2.085 \times 10^3$	0.9999	5.100 ~ 102.0
异银杏素	$Y = 7.115 \times 10^3 X - 3.092 \times 10^3$	1.000	5.000 ~ 100.0
金松双黄酮	$Y = 4.578 \times 10^3 X + 1.549 \times 10^4$	0.9982	2.500 ~ 1000

0.27%，表明该色谱条件下方法重复性良好。

⑤ 稳定性实验：取同一份供试品溶液，分别于 0、1、2、4、8、12 h，按“2.3.1”项下色谱条件进样测定，计算得阿魏酸、3, 6'-二芥子酰基蔗糖、异银杏素、金松双黄酮转移率的 RSD 值分别为 1.7%、1.2%、1.5%、1.2%，表明银星养脑醇提液在 12 h 内较为稳定。

2.4 浸膏得率测定

精密吸取“2.1”项下制备的银星养脑醇提液 25 mL，按照浸出物测定法（《中国药典》2020 年版四部 2201）测定，计算浸膏得率 (y₄)。y₄ (%) = [残渣质量 × 提取液总体积 ÷ (移取供试液体积 × 提取药物饮片总质量)] × 100%。

2.5 醇提工艺单因素实验考察

通过查阅文献资料及预实验确定选取提取时间 (A)、乙醇浓度 (B)、液料比 (C) 3 个因素进行单因素考察，以阿魏酸、3, 6'-二芥子酰基蔗糖、银杏叶类 (异银杏素、金松双黄酮) 的转移率以及浸膏得率为提取工艺评价指标，对数据进行分析，优选出最佳的单因素提取工艺。

2.5.1 液料比 按处方称定 5 份药材，以液料比 6 : 1、8 : 1、10 : 1、12 : 1、14 : 1，固定提取时间、提取次数、乙醇浓度，计算提取液中各指标成分的转移率及浸膏得率。随提取溶剂倍数的增加，各指标成分转移率呈上升趋势。考虑到各倍数差别不大，结果见表 2。从省时节能考虑，选择 6 : 1、

分线性关系。结果见表 1，可见各指标成分在给定浓度区间内线性关系良好。

③ 精密度考察：取同一份供试品溶液，按“2.3.1”项下条件重复测定 6 次，记录峰面积，计算得阿魏酸、3, 6'-二芥子酰基蔗糖、异银杏素、金松双黄酮转移率的 RSD 值分别为 1.2%、0.34%、0.51%、0.60%，表明该色谱条件下仪器精密度良好。

④ 重复性考察：按“2.1”项下方法平行制备 6 份醇提液，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.3.1”项下色谱条件检测，计算得阿魏酸、3, 6'-二芥子酰基蔗糖、异银杏素、金松双黄酮转移率的 RSD 值分别为 1.4%、0.27%、0.66%、

8 : 1、10 : 1 液料比进行进一步考察。

表 2 液料比对各指标性成分转移率及浸膏得率的影响 (n = 2)

Tab 2 Effect of liquid-solid ratio on the content of each index component and extract yield (n = 2)

液料比	转移率 / %			浸膏得率 / %
	阿魏酸	3, 6'-二芥子酰基蔗糖	银杏叶类	
6 : 1	0.0141	0.0522	0.1253	36.25
8 : 1	0.0147	0.0535	0.1221	36.97
10 : 1	0.0154	0.0526	0.1149	39.10
12 : 1	0.0163	0.0524	0.1143	38.18
14 : 1	0.0165	0.0520	0.1141	38.36

2.5.2 提取时间 按处方称定 5 份药材，提取时间分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h，固定液料比、提取次数、乙醇浓度，计算提取液中各指标成分的转移率及浸膏得率。随着提取时间不断增加，各指标成分的转移率基本呈上升趋势。其中阿魏酸、3, 6'-二芥子酰基蔗糖、浸膏得率均在 2.0 h 处达到最高值，银杏叶类成分在 1.5 h 处达到峰值，结果见表 3。从省时节能角度出发，故选择 1.0、1.5、2.0 h 进行进一步考察。

2.5.3 乙醇浓度的影响 按处方称定 4 份药材，乙醇浓度分别为 50%、60%、70%、80%，固定提取时间、提取次数、液料比，计算提取液中各指标性成分转移率及浸膏得率。随乙醇浓度升高，各指标成分转移率呈上升趋势，其中阿魏酸、3, 6'-二芥子酰基蔗糖及浸膏得率在 70% 乙醇处达到最高值，银杏叶类成分在 80% 乙醇处达到峰值，结果见表

表 3 提取时间对各指标性成分转移率及浸膏得率的影响 (n = 2)

Tab 3 Effect of extraction time on the content of each index component and extract yield (n = 2)

提取时间 / h	转移率 / %			浸膏得率 / %
	阿魏酸	3, 6'-二芥子酰基蔗糖	银杏叶类	
0.5	0.0099	0.0310	0.1149	19.60
1.0	0.0109	0.0378	0.1123	23.60
1.5	0.0136	0.0478	0.1189	30.22
2.0	0.0147	0.0491	0.1153	34.25
2.5	0.0139	0.0483	0.1132	30.79

4. 故选择 60%、70%、80% 乙醇进行进一步考察。

表 4 乙醇浓度对各指标性成分转移率及浸膏得率的影响 (n = 2)

Tab 4 Effect of ethanol concentration on the content of each index component and extract yield (n = 2)

乙醇浓度 / %	转移率 / %			浸膏得率 / %
	阿魏酸	3, 6'-二芥子酰基蔗糖	银杏叶类	
50	0.0128	0.0385	0.0782	21.76
60	0.0136	0.0474	0.0925	30.68
70	0.0141	0.0496	0.1110	34.25
80	0.0135	0.0384	0.1178	34.09

2.5.4 提取次数的影响 按处方称定 4 份药材, 提取次数分别为 1、2、3、4 次, 固定提取时间、乙醇浓度、液料比。计算提取液中各指标成分的转移率及浸膏得率。各成分的转移率随提取次数增加而不断升高, 但阿魏酸在提取 3 次时达到峰值, 其后下降。浸膏率在提取 2 次时达到最高值。3, 6'-二芥子酰基蔗糖、银杏叶类成分在提取 4 次时达到峰值, 结果见表 5。考虑到工业生产中提取 4 次较难实现, 提取 2 次和 3 次差别不大, 故固定提取次数为 2 次。

表 5 提取次数对各指标性成分转移率及浸膏得率的影响 (n = 2)

Tab 5 Effect of extraction times on the content of each index component and extract yield (n = 2)

提取次数 / 次	转移率 / %			浸膏得率 / %
	阿魏酸	3, 6'-二芥子酰基蔗糖	银杏叶类	
1	0.0088	0.0402	0.0874	23.52
2	0.0141	0.0549	0.1149	34.25
3	0.0143	0.0574	0.1193	33.61
4	0.0122	0.0596	0.1267	33.01

2.6 多指标组合赋权

2.6.1 G1 法 依据银星养脑方配伍原则和功效相关成分, 通过 G1 法对银星养脑醇提液中各评价指标进行主观赋权, 赋权结果为银杏叶类转移率 (y_1) > 阿魏酸转移率 (y_2) > 3, 6'-二芥子酰基蔗糖转移率 (y_3) > 浸膏得率 (y_4)。相邻指标权重评价标度为 r_2 (y_1 与 $y_2 = 1.8$)、 r_3 (y_2 与 $y_3 = 1.4$)、 r_4 (y_3 与 $y_4 = 1.2$)。按公式 (1)、(2) 计算所得权重 W_1 。

$$w_k = (1 + \sum_{k=2}^m \prod_{i=k}^m r_i) \quad (1)$$

$$w_{k-1} = r_k w_k, \quad k = m, m - 1, \dots, 2 \quad (2)$$

2.6.2 熵权法 通过评价数据信息熵值大小以确定各指标在综合评价中的作用大小。采用 EvaGear Version 2.6 软件对银星养脑醇提液中各评价指标进行熵权法赋权, 得到权重 W_2 。

2.6.3 组合权重的确定 以 G1 法、熵权法所得权重, 按公式 (3) 计算组合权重 W 。各评价指标权重见表 6。

$$W_j = W_{1j} W_{2j} / \sum_{j=1}^m W_{1j} W_{2j} \quad (3)$$

表 6 评价指标权重

Tab 6 Evaluation index weight

化学成分	W_1	W_2	W
阿魏酸	0.2433	0.4746	0.4469
3, 6'-二芥子酰基蔗糖	0.1738	0.1335	0.0898
银杏叶类转移率	0.4380	0.2147	0.3640
浸膏得率	0.1448	0.1772	0.0993

2.7 响应面实验及结果分析

2.7.1 响应面设计实验 基于单因素考察结果, 对乙醇浓度 (60%、70%、80%), 提取时间 (1.0、1.5、2.0 h), 液料比 (6 : 1、8 : 1、10 : 1) 进行进一步考察, 每个自变量按低、中、高按 - 1、0、1 编码, 以综合评分 (Y) 为响应值, 进行三因素三水平 Box-Behnken 设计。详见表 7。

表 7 水平因素表

Tab 7 Level and factor table

水平	因素		
	提取时间 / h	乙醇浓度 / %	液料比
- 1	1.0	60	6 : 1
0	1.5	70	8 : 1
1	2.0	80	10 : 1

2.7.2 响应面试验结果与分析 根据 G1 熵权法所得各评价指标综合权重, 按公式 (4) 计算各实验条件下各指标成分的转移率并计算综合评分。实验设计及计算结果如表 8。应用 Design-Expert 12 软件对表中实验数据进行多元回归拟合, 得到综合评分对提取时间 (A)、乙醇浓度 (B)、液料比 (C) 的多元回归方程 $Y = 83.98 + 0.4938A - 4.72B + 0.7737C + 2.64AB - 0.9400AC + 4.71BC - 3.12A^2 + 2.56B^2 - 0.0105C^2$ 。对上述回归模型进行显著性检验, 结果见表 9。

$$P_j = \sum_{j=1}^m (100w_j y_j) / y_j \max \quad (4)$$

表 8 响应面设计方案及结果

Tab 8 Response surface design scheme and results

编号	液料比 C	乙醇浓度 B/%	提取时间 A/h	转移率 /%			浸膏得率 /%	综合评分
				阿魏酸	3, 6'-二芥子酰基蔗糖	银杏叶类		
1	8 : 1	60	1	0.015 63	0.050 73	0.1069	36.41	90.79
2	8 : 1	80	1	0.010 51	0.050 85	0.1046	26.89	73.82
3	8 : 1	60	2	0.014 64	0.038 42	0.1177	29.68	87.50
4	8 : 1	80	2	0.011 56	0.044 61	0.1211	29.69	81.17
5	6 : 1	60	1.5	0.016 59	0.051 24	0.1064	35.29	93.02
6	6 : 1	80	1.5	0.010 42	0.049 01	0.1135	28.57	76.32
7	10 : 1	60	1.5	0.014 11	0.054 54	0.1070	35.29	87.03
8	10 : 1	80	1.5	0.013 56	0.050 31	0.1232	34.73	89.43
9	6 : 1	70	1	0.011 34	0.048 32	0.1132	34.17	80.09
10	6 : 1	70	2	0.012 24	0.056 08	0.1092	31.93	81.99
11	10 : 1	70	1	0.010 43	0.053 05	0.1258	31.93	81.44
12	10 : 1	70	2	0.010 61	0.046 67	0.1159	37.53	79.53
13	8 : 1	70	1.5	0.013 52	0.046 35	0.1113	34.25	85.10
14	8 : 1	70	1.5	0.012 22	0.045 30	0.1124	34.22	81.76
15	8 : 1	70	1.5	0.012 77	0.047 90	0.1122	34.19	83.59
16	8 : 1	70	1.5	0.011 98	0.046 55	0.1128	34.27	81.44
17	8 : 1	70	1.5	0.014 11	0.048 98	0.1129	34.26	87.59

表 9 响应面方差分析

Tab 9 Response surface variance analysis

方差来源	均方和	自由度	离差平方和	F	P
模型	370.55	9	41.17	6.03	0.0136
提取时间 (A)	1.95	1	1.95	0.2855	0.6097
乙醇浓度 (B)	178.23	1	178.23	26.09	0.0014
液料比 (C)	4.79	1	4.79	0.7011	0.4301
AB	27.93	1	27.93	4.09	0.0829
AC	3.53	1	3.53	0.5173	0.4953
BC	88.83	1	88.83	13.00	0.0087
A ²	41.00	1	41.00	6.00	0.0441
B ²	27.64	1	27.64	4.05	0.0842
C ²	0.0005	1	0.0005	0.0001	0.9937
残差	47.82	7	6.83		
失拟项	20.64	3	6.88	1.01	0.4746
纯误差	27.18	4	6.79		
总误差	418.37	16			

由表 9 可知, 二次多元模型 $P < 0.05$, 说明该实验拟合的模型具有显著性。失拟项 $P = 0.4746 > 0.05$, 即失拟不显著, 说明其他因素对实验结果的干扰较小, 残差由随机误差引起, 模型能充分反映各自变量与响应值之间的关系。回归模型中因素 B 的 P 值 < 0.01 , 表明乙醇浓度对银星养脑醇提工艺影响显著。通过各自变量 P 值得出影响银星养脑醇提工艺的因素大小顺序为乙醇浓度 $>$ 液料比 $>$ 提取时间。因素 BC 的 P 值 < 0.01 , 证明乙醇浓度与提取溶剂倍数交互时, 对实验影响较为显著。等高线的形状可以反映出

交互效应的强弱, 越趋向椭圆表示交互作用越强, 越趋向圆形则交互作用越弱, 结果见图 2。根据模型拟合结果结合实际生产考虑, 将银星养脑方最优醇提工艺设为以 6 倍量 60% 的乙醇提取 1.4 h, 提取 2 次。

2.7.3 验证实验 根据优选的提取工艺, 进行了 3 次验证试验, 其综合评分分别为 96.55、97.29、95.85; 平均值为 96.56, $RSD = 0.75\%$, 3 批数据差异无统计学意义, 结果表明优选的工艺参数稳定、合理可行。

3 讨论

银星养脑方中, 银杏叶为君药, 擅长活血止痛, 可祛瘀生新, 促进气血正常运行。川芎活血行气, 祛风止痛; 蜜远志安神益智, 祛痰开窍, 可加强君药功效, 为臣药。参照 2020 年版《中国药典》及相关文献, 阿魏酸、银杏内酯、远志吡啶酮等可作为其指标成分, 但部分对照品未出峰, ELSD 和 PDA 均未检测到色谱峰信号。故对醇提液进行了 LC-MS 分析, 通过 MS 确认分离度好, 峰面积高的色谱峰归属, 结合银星养脑方疗效的物质基础, 最后选择了金松双黄酮、异银杏素、3, 6'-二芥子酰基蔗糖、阿魏酸 4 种成分作为指标成分。现代药理学研究发现, 银杏叶中以金松双黄酮、异银杏素为代表的银杏叶双黄酮, 尤其在缺血性心脑血管方面, 能有效降低血液黏稠度, 抑制血小板聚集和血栓形成, 保护血管内皮细胞, 改善微循环。同时可

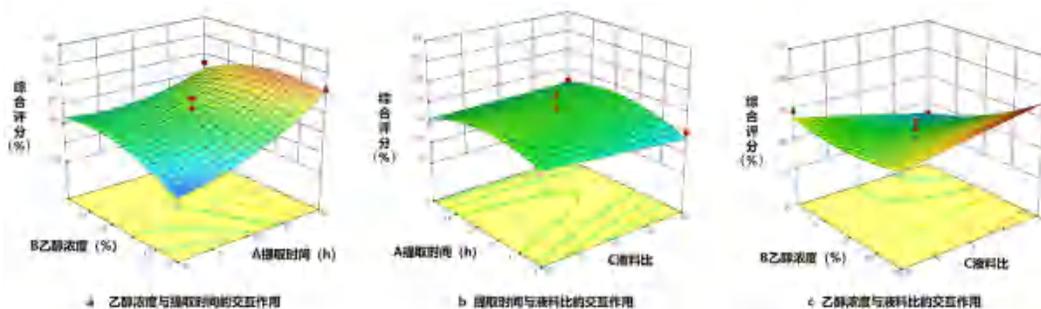


图 2 各因素交互作用的等高线及响应面图

Fig 2 Contours and response surfaces for interaction between factors

显著改善帕金森病小鼠的协调运动能力^[6-7]；远志中的 3, 6'-二芥子酰基蔗糖可增强 5-HT 系统功能，保护受损的神经细胞^[8-9]；川芎中的阿魏酸抗血栓形成和抑制血小板聚集作用显著，能保护心血管和拮抗内皮素生成，减弱中枢损伤、减轻脑损伤、记忆障碍和认知缺陷^[10-11]。故作为银星养脑方工艺研究的指标成分是科学、合理的。

本研究采用 Box-Behnken 响应面法进行实验设计，与正交设计法和均匀设计法相比，Box-Behnken 响应面法实验精度更高，预测值也更接近真实值，适用于连续性的多因素实验分析，且可以和多水平因子分析结合，优化处方预测性良好^[14]。本实验采用 G1 熵权法，结合主观赋权与客观赋权，使实验结果更加科学、可信。通过上述方法优选银星养脑方最佳醇提工艺，所得综合评分高，模型拟合度高，具有良好的预测能力，可为该制备工艺优化提供依据。

参考文献

[1] 尹胡海, 谢聪, 杨年, 等. 银星养脑方治疗弥漫性轴索损伤瘀阻脑络证的临床研究[J]. 中药药理与临床, 2023, 39(2): 71-75.

[2] 王芝平, 吴兵兵, 潘俊安, 等. 银星养脑方对蛛网膜下腔出血介入术后患者的影响[J]. 光明中医, 2022, 37(23): 4312-4315.

[3] 王芝平. 银星养脑方治疗风痰瘀阻型脑梗死的疗效观察[J]. 内蒙古中医药, 2017, 36(4): 40-41.

[3] 苏建斌, 吴铁军, 武华杰, 等. 银星养脑方治疗动脉硬化症疗效观察[J]. 现代医药卫生, 2014, 30(15): 2262-2263.

[5] 李丹, 周兆祥, 邱成元, 等. 银星养脑方结合西药治疗脑外伤后认知障碍的疗效观察[J]. 湖南中医药大学学报, 2013, 33(11): 75-77.

[6] 刘丽娜, 李海亮, 李耀磊, 等. 银杏叶片中 5 种银杏双黄酮类成分同时测定方法的建立[J]. 中国药房, 2022, 33(10): 1220-1224.

[7] 涂清波, 孙云, 许婷, 等. 银杏双黄酮药理作用的研究进展[J]. 山东医药, 2018, 58(19): 112-114.

[8] 赵润清, 胡园, 李牧函, 等. 3, 6'-二芥子酰基蔗糖联合 tenuifoliside A 协同抗抑郁作用及其机制的研究[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(5): 716-722.

[9] 陈旭. 3, 6'-二芥子酰基蔗糖促神经元再生和神经保护发挥抗抑郁作用的机制研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2011.

[10] 关丽, 赵惠茹, 李伟泽, 等. 阿魏酸在阿尔茨海默病领域的研究进展[J]. 中国药物化学杂志, 2021, 31(10): 844-854.

[11] 王立霞, 王枫, 陈欣, 等. 阿魏酸钠的心脑血管药理作用研究进展[J]. 中草药, 2019, 50(3): 772-777.

[12] 刘隆基, 夏建成, 周红玲, 等. 熄风活络胶囊醇提工艺优化[J]. 中成药, 2023, 45(6): 1964-1969.

[13] 赵雪莲, 兰建龙, 杨正明, 等. 基于响应面和 G1-熵权法优选彝药痛风颗粒提取工艺及其药效评价[J]. 中草药, 2022, 53(12): 3653-3661.

[14] 吉部肖情, 李丽, 阮婧华, 等. 正交设计和 BP 神经网络结合 G1-熵权法对比优化羌药刷格痛风颗粒水提工艺[J]. 中草药, 2022, 53(4): 1051-1058.

[15] 徐蓓蕾, 韩晓宇, 刘晶晶, 等. 基于 Box-Behnken 设计-响应面法与质量综合评价优化葛根苓连汤煎煮工艺[J]. 中草药, 2022, 53(22): 7070-7081.

[16] 唐茜, 韩云凤, 石懿, 等. 混合加权法结合响应面法优化视力舒颗粒煎煮工艺[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(4): 480-486.

(收稿日期: 2023-09-02; 修回日期: 2023-11-08)

基于网络药理学与体外实验探讨杏仁活性成分治疗血管痉挛的作用机制

武博文^{1, 2}, 颜培宇^{1, 2*}, 武密山^{1, 2*} (1. 澳门科技大学中医药学院, 澳门 999078; 2. 中药质量研究国家重点实验室, 澳门 999078)

摘要: **目的** 运用网络药理学和体外细胞实验探究杏仁活性成分治疗血管痉挛的潜在作用机制。**方法** 检索 TCMSP 数据库、Genecards 数据库、SwissTargetPrediction 数据库、Drugbank 数据库等, 获得杏仁的活性成分、作用靶点及血管痉挛相应疾病靶点, 并将其作用靶点与获得的疾病靶点的交集作为潜在靶点; 利用 String 平台, 对潜在靶点构建蛋白-蛋白互作 (PPI) 网络; 采用 R 语言软件包对潜在靶点进行基因本体 (GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析, 然后使用 Cytoscape 软件分析其网络拓扑结构, 筛选其核心靶点, 并进行分子对接验证。在此基础上, 通过 MTT 法检测苦杏仁苷对血管紧张素 II 所致血管平滑肌细胞增殖的影响。**结果** 杏仁治疗血管痉挛的主要潜在活性成分有 17 个; 药物-疾病核心靶点有 68 个; 涉及的信号通路主要有钙信号通路、神经活性配体-受体相互作用、鞘脂信号通路、血管平滑肌收缩、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性、松弛素信号通路等; 关键核心靶点与活性成分苦杏仁苷、雌酚酮结合具有稳定构象。体外实验结果表明, 苦杏仁苷能抑制血管紧张素 II 所致血管平滑肌细胞增殖, 其机制可能与其抑制 MAPKs 信号转导通路的活化有关。**结论** 杏仁活性成分可能通过作用于基质金属蛋白酶 9、雌酚酮等靶点治疗血管痉挛, 为杏仁活性成分治疗血管痉挛的作用机制研究提供了参考。**关键词:** 苦杏仁苷; 网络药理学; 分子对接; 血管痉挛; 细胞增殖; 血管平滑肌细胞; 血管紧张素 II
中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)07-1748-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.011

Mechanism of action of active components of *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim. mature seed for vasospasm based on network pharmacology and in vitro experiments

WU Bo-wen^{1, 2}, YAN Pei-yu^{1, 2*}, WU Mi-shan^{1, 2*} (1. Faculty of Chinese Medicine, Macau University of Science and Technology, Macao 999078; 2. State Key Laboratory of Quality Research in Chinese Medicine, Macau University of Science and Technology, Macao 999078)

Abstract: Objective To explore the potential mechanism of the active components of *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim. mature seed for vasospasm by integrating network pharmacology and in vitro cell experiments. **Methods** We searched TCMSP, Genecards, SwissTargetPrediction database, Drugbank database, and other related literatures to obtain active components in *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim. mature seed, action targets Rhizoma, and corresponding disease targets. The intersection of action and disease targets was taken as the potential targets. A protein-protein interaction network (PPI) for potential targets was established based on String platform. R language software package was used to analyze the function of Gene Ontology (GO) and the enrichment of Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), and then Cytoscape software was used to analyze its network topology and further screen core targets. Molecular docking was used to verify the predicted results. Subsequently, the effect of active components in *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim. mature seed on the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) induced by angiotensin II (Ang II)

基金项目: 澳门科技大学研究基金项目 (No. FRG-22-109-FC)。

作者简介: 武博文, 女, 博士研究生, 主要从事中药复方的开发与临床转化, email: BoWen_Wu369@163.com ***通信作者:** 武密山, 男, 副教授, 主要从事中药复方的开发与临床转化, email: MiShan_Wu@163.com

was detected by MTT. **Results** Totally 17 main potential active components of *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim. mature seed in the treatment of vasospasm and 68 drug-disease targets were found. The main signaling pathways include calcium signaling pathway, neuroactive ligand-receptor interaction, sphingolipid signaling pathway, vascular smooth muscle contraction, EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance, relaxin signaling pathway, etc. The stable conformations were formed between the core targets and the active components, amygdalin and estrone. The in vitro results showed that amygdalin inhibited Ang II-induced proliferation and phenotype transformation of VSMCs through inactivating the MAPKs signaling pathways. **Conclusion** Various active components in *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim. mature seed may play a role in vasospasm by acting on targets such as matrix metalloproteinase 9 (MMP9), estrone, etc. The study helps reveal the mechanism of active components of *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim. mature seed in the treatment of vasospasm.

Key words: amygdalin; network pharmacology; molecular docking; vasospasm; cell proliferation; vascular smooth muscle cell; angiotensin II

血管痉挛时血管壁平滑肌强烈收缩，管腔狭窄，造成血流量减少；严重者可造成管腔闭塞。痉挛时间过长，可造成血管栓塞。血管痉挛由众多因素诱发，包括直接血管机械扩张、血管代谢失衡和内环境改变，诱发血管痉挛的因素主要有两类，即神经源性和肌源性^[1]，神经源性血管痉挛是由神经缩血管物质介导的；肌源性血管痉挛是由感应血管壁机械力的血管平滑肌介导的。流行病学数据显示脑血管痉挛作为蛛网膜下腔出血的严重并发症，是患者死亡及残疾的主要原因^[2]。冠状动脉痉挛是急性冠状动脉综合征的危险因素^[3]，尚无有效治疗措施^[4]，血管平滑肌细胞（vascular smooth muscle cells, VSMCs）异常增殖引起的血管腔狭窄和痉挛是多种血管疾病的共同病理基础^[5]。鉴于血管痉挛病理机制的复杂性，单一靶点的药物治疗存在局限性。而中药具有多成分、多靶点的特点，在血管痉挛的预防和治疗中发挥着重要作用。苦杏仁始载于《神农本草经》，归肺、大肠经。味苦，性温，有小毒，有降气、止咳、平喘、润肠通便的功效，能镇咳平喘、抗炎镇痛、抗肿瘤、抗纤维化、调节免疫、降血脂及抗动脉粥样硬化等^[6]。由于杏仁成分复杂和靶点多样，杏仁治疗血管痉挛的作用机制尚不明确。网络药理学遵循“药物-靶点-疾病”的规则，和分子对接技术结合，预测药物靶点能提高药物研发效率^[7-10]。本研究应用网络药理学靶标预测、网络构建及分子对接技术，并结合体外细胞实验探讨杏仁对血管紧张素 II（angiotensin II, Ang II）所致 VSMCs 增殖及信号转导通路作用机制。

1 材料

1.1 试药

胶原酶 II 型（Worthington, USA），胎牛血清（FBS, Hyclone 公司），DMEM 培养基、 α -MEM 培养基、青-链霉素溶液（P/S）、十二烷基磺酸钠

（SDS）、丙烯酰胺、*N, N'*-亚甲双丙烯酰胺、四甲基乙二胺（TEMED）、乙二胺四乙酸（EDTA）、 β -磷酸甘油（ β -GP）、维生素 C（Vit C）、过硫酸铵（Gibco, USA）；胰蛋白酶、Ang II 及 MTT、二甲基亚砜（DMSO）、考马斯亮蓝、噻唑蓝、淋巴细胞分离液（Sigma, USA），BrdU cell proliferation assay 细胞增殖检测试剂盒（Chemicon 公司），苦杏仁苷（批号：A6005, Sigma-Aldrich, 纯度 $\geq 98\%$ ）。

1.2 细胞

VSMCs 细胞株（上海生物细胞研究所），培养于含 10%FBS 的 DMEM 完全培养基的培养瓶，置于 37℃ 含 5%CO₂ 恒温培养箱内。

1.3 仪器

超净工作台（Thermo scientific），JCOA-160 气套式 CO₂ 培养箱（上海剑革电子科技有限公司），Eppendorf 5425R 冷冻离心机（德国艾本德），TGL-16M 细胞/RNA 专用高速冷冻离心机（湖南迈克实验仪器有限公司），多功能酶标仪（Spectra Max ABS plus），倒置显微镜（Olympus SZX10），康宁 Costar 96 孔细胞培养板（上海川翔生物科技有限公司），430165 35 mm 细胞培养皿（康宁 Corning，广州亿宁生物技术有限公司），UV752 型紫外可见分光光度计（AE1104031，上海洪纪仪器设备有限公司），美国伯乐 BIO-RAD GelDoc 2000 凝胶成像系统（型号：GelDoc，美国伯乐 bio-rad），DYY-III-6B 稳压稳流型电泳仪（DYY-6B 型，北京），显微图像分析仪（型号：KCJX-2000，centrmin）。

2 方法

2.1 杏仁活性化学成分收集与靶点预测

应用中药系统药理学数据库与分析平台（TCM-SP）^[11] 搜索查询杏仁活性有效成分，并根据中药药代动力学标准^[12] 以口服生物利用度（OB） $\geq 30\%$ 和化合物类药性（DL） ≥ 0.18 为筛选条件，筛选

杏仁活性有效化学成分；对符合条件的杏仁活性有效成分，根据“Canonical SMILES”，进入“SwissTargetPrediction”数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 中限定人源“Homo sapiens”，选择 P 值 > 0 的数据，导出预测目标靶点 (SwissTargetPrediction)，在 Uniprot 数据库^[13] (<https://www.uniprot.org>) 中限定人源“Human”和已认证“Reviewed”的靶点并下载，在已收集好的杏仁活性有效成分表格中，匹配对应的靶点基因名称，剔除重复值，得到完整的杏仁活性有效成分潜在靶点。

2.2 血管痉挛疾病相关靶点获取

以血管痉挛 (vasospasm) 为检索词，分别在 Genecards 数据库^[14] (<https://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库^[15] (<https://www.omim.org/>)、TTD 数据库^[16] (<https://db.idrblab.net/ttd/>) 和 Disgenet 数据库 (<https://www.disgenet.org/>) 中检索，合并剔除重复值，获得血管痉挛相关靶点。

2.3 杏仁活性成分治疗血管痉挛潜在靶点获取以及蛋白-蛋白互作 (PPI) 网络构建和拓扑分析

将杏仁活性有效成分的作用靶点与血管痉挛的疾病靶点通过 R 语言程序设计软件加载韦恩 (Venn) 程序包，绘制两者的 Venn 图，得到交集靶点。之后将交集靶点输入 String 数据库^[17] (<https://string-db.org/cgi/input.pl>) 进行蛋白互作网络 (PPI) 的构建。将交集靶点通过 R 语言输入命令，通过条件设置度中心性 (DC)、接近中心性 (CC)、特征向量中心性 (EC)、局部连通性 (LAC)、网络中心性 (NC)、介数中心性 (BC)，通过 Network Analyzer 工具进行拓扑分析，根据 Degree 排序，选取分值大于中位值的基因作为关键核心靶点，再将关键核心靶点导入 Cytoscape 3.8.2 中，绘制核心靶点的 PPI 网络图。

2.4 杏仁活性有效成分-血管痉挛靶点网络构建

为了进一步将杏仁活性有效成分与血管痉挛和相应靶点之间的相互关系可视化，将纳入的杏仁活性有效成分、治疗血管痉挛疾病的靶点，导入 Cytoscape 3.8.0 中，绘制杏仁活性有效成分-血管痉挛疾病-靶点网络图。

2.5 关键成分 GO 富集与 KEGG 通路富集分析

将杏仁活性有效成分-血管痉挛疾病的交集靶点进行基因本体 (GO) 的生物过程、分子功能、细胞组分富集分析和根据京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 数据库进行通路富集分析，引用 String 数据库 (<https://string-db.org/>)，将校正 P 值 ≤ 0.05 的项目进行筛选。通过 R 语言程序设计使用 R 3.6.3 软件，加载安装并引用 Cluster Profiler、Enrich plot、Ggplot2 程序包，进行柱状图和气泡图绘制。

2.6 “成分-靶点”分子对接验证

选择杏仁的活性成分苦杏仁苷 (amygdalin)、雌酚酮 (estrone) 和与之对应的核心靶点进行分子对接。首先通过 Uniprot 数据库^[13] (<https://www.uniprot.org>) 搜索靶点的序号，然后下载蛋白质靶点并保存文件。在 Pubchem 数据库里查找活性成分的 2D 结构并下载保存；其次，通过 Chem 3D 软件把 2D 结构优化并转换成 3D 结构。利用 Autodock Tools 软件将靶点加氢得到相应的 pdbqt 文件和 grid 文件，将 Spacing 值设置为 1，最后以 Vina 命令执行分子对接获得成分-靶点结合能；并通过 Pymol 软件去除水分子和小分子配体，然后得到成分-靶点分子对接虚拟图。

2.7 体外验证实验

2.7.1 细胞培养 将 VSMCs 细胞用含 10%FBS 的 DMEM (高糖) 培养基培养，置于 37℃、5%CO₂ 恒温培养箱内，每隔 1 d 观察细胞状态，细胞呈梭形，贴壁生长，并进行换液；待 VSMCs 细胞在培养瓶内占据 70% 左右时进行传代，取对数生长期的 VSMCs 细胞用于后续实验。

2.7.2 VSMCs 培养与实验分组 将 VSMCs 细胞分别以密度为 5×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 接种于 96 孔板中，每孔 100 μL 。随机分为以下 5 组：① 正常对照组 (Control)：DMEM；② Ang II 组：DMEM + Ang II；③ 苦杏仁苷低剂量组：DMEM + 苦杏仁苷 ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + Ang II；④ 苦杏仁苷中剂量组：DMEM + 苦杏仁苷 ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + Ang II；⑤ 苦杏仁苷高剂量组：DMEM + 苦杏仁苷 ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + Ang II。处理组各孔分别加入苦杏仁苷不同浓度药物 100 μL ，正常对照组和 Ang II 组分别添加含 10%FBS 的 DMEM 培养液 100 μL ，各组细胞连续培养，在倒置显微镜下观察细胞生长，收集 VSMCs 用于后续实验。

2.7.3 细胞增殖效应 收集对数生长期 VSMCs，调整细胞悬液浓度，以 5×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 密度接种于 96 孔培养板中，每孔体积 200 μL ；培养 24 h 后，加入 Ang II (1×10^{-6} mmol $\cdot \text{L}^{-1}$) 和苦杏仁苷不同浓度药物处理细胞 48 h 后；每孔加入 20 μL 0.5%MTT 溶液，继续培养，连续 6 d，待终止培养时，吸弃培养孔内培养液；每孔加入 150 μL DMSO，置摇床上低速振荡 10 min，使结晶物充分溶解；在酶联免疫检测仪 570 nm 波长处测量各孔的吸光度值，每次测量 6 个孔计数，连续 6 d，重复连续测量 3 次，读数后取平均值。以培养时间为横轴，细胞数为纵轴，描绘生长曲线图。计算群体倍增时间： $\text{TD} = t [\log 2 / (\log N_t - \log N_0)]$ ， N_0 和 N_t 分别代表接种后和培养 t 小时的细胞数。

2.8 统计学分析

实验数据计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用单因素 (one-way ANOVA) 方差分析， $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 杏仁活性有效成分筛选

最终得到 19 个杏仁活性有效成分。根据文献报道补充了一个苦杏仁苷 (MOL001320, amygdalin, C₂₀H₂₇NO₁₁)^[6], 见表 1。

表 1 杏仁活性成分的基本信息

Tab 1 Basic information on the main active ingredients of *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim. mature seed

编号	化合物名称	口服生物 利用度 (OB) / %	类药 性 (DL)
MOL010921	estrone (雌酚酮)	53.56	0.32
MOL010922	diisooctyl succinate (丁二酸二异辛酯)	31.62	0.23
MOL002211	11, 14-eicosadienoic acid (11, 14-二十碳二烯酸)	39.99	0.20
MOL002372	(6Z, 10E, 14E, 18E)-2, 6, 10, 15, 19, 23-hexamethyltetracos-2, 6, 10, 14, 18, 22-hexaene	33.55	0.42
MOL000359	sitosterol (谷甾醇)	36.91	0.75
MOL000449	stigmasterol (豆甾醇)	43.83	0.76
MOL005030	gondoic acid (二十碳-11-烯酸)	30.70	0.20
MOL000953	CLR (胆甾醇)	37.87	0.68
MOL000211	mairin (白桦脂酸)	55.38	0.78
MOL000492	(+)-catechin[(+)-儿茶素]	54.83	0.24
MOL002311	glycyrol (甘草酚)	90.78	0.67
MOL003410	ziziphin_qt (枣素)	66.95	0.62
MOL004355	spinasterol (菠菜甾醇)	42.98	0.76
MOL004841	licochalcone B (甘草查尔酮 B)	76.76	0.19
MOL004903	liquiritin (甘草苷)	65.69	0.74
MOL004908	glabridin (光甘草定)	53.25	0.47
MOL005017	phaseol (菜豆素)	78.77	0.58
MOL007207	machiline (乌药碱)	79.64	0.24
MOL012922	l-SPD (左旋千金藤碱)	87.35	0.54
MOL001320	amygdalin	4.42	0.61

3.2 杏仁治疗血管痉挛的靶点及其 PPI 网络

在 TCMSP 数据库及文献中检索的上述 20 个杏仁活性有效化学成分, 获取其蛋白质靶点, 整理去除重复后, 得到杏仁活性成分的作用靶点 629 个; 血管痉挛疾病相关靶点 394 个; 杏仁活性成分-血管痉挛交集潜在靶点 68 个。将交集潜在靶点上传到 String11.0 数据库得到潜在靶点互作网络图, 见图 1。然后通过加载 Cytoscape 3.8.2 的插件 CytoNCA, 计算每个节点的打分, 然后利用 R 语言编程软件对打分进行筛选, 各靶点的特征参数分别为: BC ≥ 18.837, CC ≥ 0.478, DC ≥ 10.000, EC ≥ 0.065, LAC ≥ 4.400, NC ≥ 6.255。最后将获取打分高于中位数的节点, 重新导入 Cytoscape 得到 PPI 网络核心, 最终获得 24 个核心靶点, 见图 2。结果分析显示 ACE、EGFR、AGTR1、ESR1、MMP9、MMP2 等是杏仁治疗血管痉挛的核心靶点。其中 68 个交集潜在靶点的特征参数见表 2。



图 1 基于 String 数据库所得杏仁活性有效成分治疗血管痉挛共有交集靶点互作网络图

Fig 1 Interaction network of the co-ownership targets of active ingredients of *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim. mature seed in the treatment of vasospasm

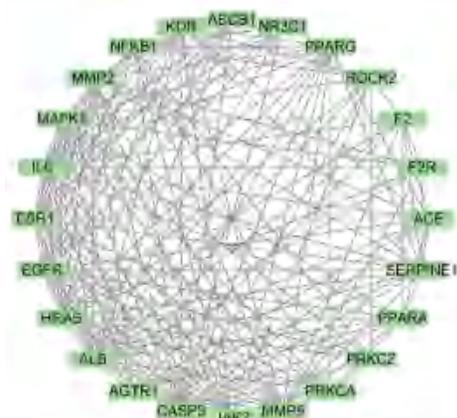


图 2 杏仁活性有效成分治疗血管痉挛的核心靶点 PPI 网络图

Fig 2 PPI network diagram of the core targets of *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim. mature seed components in the treatment of vasospasm

3.3 靶点功能与通路分析

3.3.1 杏仁活性有效成分治疗血管痉挛潜在靶点 GO 富集分析 GO 功能分析共富集得到 425 个条目 ($P < 0.05$), 包括 311 个生物过程、46 个细胞组分、68 个分子功能; 为更直观地了解其基因功能和相关通路, 以 P 值作为参考进行排序, 每一部分选取排名前 20 位的条目, 生成富集分析柱状图和气泡图。其中生物过程、分子功能和细胞组分最显著的前 20 项分别由柱状图与气泡图呈现, P 值的大小由颜色表现, 越红表示 P 值越小, 关系越紧密, 越蓝则反之, 气泡图中的节点大小表示相关基因的数量, 越大表示相关联的基因越多, 越小则反之。杏仁活性有效成分

表 2 杏仁活性有效成分治疗血管痉挛的交集潜在靶点特征参数

Tab 2 Characteristic parameters of ownership targets of *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim. mature seed components in the treatment of vasospasm

名称	BC	CC	DC	EC	LAC	NC	名称	BC	CC	DC	EC	LAC	NC
ALB	677.100	0.702	41	0.274	12.146	33.259	ADCY10	1.279	0.420	2	0.016	0.000	0.000
IL6	489.541	0.680	38	0.266	12.684	32.383	ADORA2A	48.213	0.474	6	0.035	1.000	1.200
OPRD1	4.343	0.366	3	0.007	1.333	2.000	P2RY1	7.335	0.395	3	0.010	0.000	0.000
ACE	341.944	0.605	25	0.184	10.080	17.433	ADRA1A	0.000	0.301	1	0.001	0.000	0.000
EGFR	296.414	0.634	33	0.250	13.090	26.580	TBXA2R	183.066	0.428	9	0.032	0.888	1.875
HMGCR	131.962	0.471	7	0.059	3.142	3.666	ADRA2B	0.000	0.356	2	0.010	1.000	2.000
CASP3	241.103	0.628	33	0.250	13.333	27.621	PPARG	41.090	0.554	19	0.179	11.578	13.376
P2RY12	40.588	0.488	7	0.045	2.285	2.700	ADRA2C	14.606	0.390	3	0.012	0.666	1.000
F2	239.167	0.550	20	0.138	7.400	12.049	NR3C1	39.200	0.503	12	0.102	6.666	8.116
COMT	260.834	0.471	12	0.042	2.500	6.062	KCNMA1	0.000	0.375	2	0.009	1.000	2.000
DRD2	63.841	0.448	8	0.039	3.000	3.997	PTGFR	0.000	0.377	2	0.014	1.000	2.000
ABCC1	3.051	0.478	6	0.059	4.333	5.200	PRKCZ	32.876	0.474	11	0.088	6.909	7.716
AGTR1	226.642	0.545	17	0.150	9.058	11.642	FLT1	0.882	0.488	12	0.133	10.333	11.272
PRKCA	221.700	0.540	17	0.140	8.470	11.389	CCR5	19.578	0.452	6	0.056	3.333	4.300
ABCB1	173.861	0.528	15	0.105	5.866	8.838	MMP2	31.173	0.554	21	0.192	13.047	16.532
HTR2A	4.700	0.455	5	0.029	3.200	4.000	ROCK1	9.515	0.485	12	0.112	8.166	9.254
PRKCB	75.805	0.471	10	0.065	4.400	6.461	SERPINE1	20.363	0.554	20	0.189	13.600	16.460
ESR1	169.690	0.594	27	0.206	11.333	20.220	PLA2G2A	5.641	0.455	5	0.052	2.800	3.750
MMP9	138.995	0.611	29	0.241	14.206	23.892	HRH1	0.000	0.428	2	0.027	1.000	2.000
PLAT	2.117	0.488	11	0.105	9.090	10.000	ESR2	17.118	0.492	9	0.100	6.444	7.250
HRAS	138.025	0.594	27	0.215	12.296	20.797	MMP9	36.565	0.471	10	0.088	5.200	6.255
TNNT2	0.4285	0.442	4	0.036	2.500	3.333	PARP1	8.165	0.481	10	0.105	7.200	8.666
ESR1	134.309	0.573	24	0.203	12.250	17.889	ALDH2	3.795	0.336	4	0.004	1.500	2.833
MMP3	7.247	0.515	14	0.148	10.857	11.853	OPRK1	0.000	0.323	2	0.002	1.000	2.000
PPARA	93.969	0.545	15	0.137	8.533	10.055	BCL2	0.000	0.417	4	0.039	3.000	4.000
ECE1	0.000	0.385	2	0.012	1.000	2.000	BCR	0.000	0.415	3	0.032	2.000	3.000
PDE5A	13.081	0.442	6	0.036	1.333	1.600	ROCK2	19.366	0.492	11	0.094	6.363	7.100
F3	12.068	0.515	14	0.129	9.857	11.255	NFKB1	18.837	0.515	16	0.139	9.875	11.828
EDNRA	65.428	0.488	9	0.065	2.888	4.200	CHRM1	0.650	0.368	3	0.015	1.333	2.000
TNNI3	3.880	0.464	6	0.058	3.333	4.266	CYP51A1	0.000	0.321	1	0.003	0.000	0.000
JAK2	81.990	0.550	20	0.167	10.000	14.270	EPHX2	1.081	0.372	3	0.015	0.666	1.000
KDR	78.074	0.540	22	0.195	12.181	15.820	PLA2G7	0.400	0.415	3	0.028	1.333	2.000
PLG	15.334	0.540	18	0.172	12.777	14.911	IL6ST	0.000	0.431	3	0.033	2.000	3.000
F2R	77.948	0.500	13	0.112	7.230	8.383							

治疗血管痉挛关键靶点 GO 功能富集分析柱状图及气泡图，见图 3。结果显示：① 生物过程包括磷脂酶 C 活化 G 蛋白偶联受体信号通路、胞质钙离子浓度的正调节、正向调控 MAPK 级联、正向调节 ERK1 和 ERK2 级联、对外来刺激的反应、细胞迁移的正向调节、血管收缩的正向调节、对缺氧的反应、炎症反应、血管收缩的调节、平滑肌收缩、细胞增殖的正向调节等；② 细胞组分包括主要通过等离子体膜、突触前膜、突触后膜、树突、膜筏等细胞膜部位进行；③ 分子功能包括蛋白丝氨酸 / 苏氨酸 / 酪氨酸激酶活性、肽链内切酶活性、锌离子结合、RNA 聚合酶 II 转录因子活性，配体激活序列特异性 DNA 结合、丝氨酸型内肽酶活性、G 蛋白偶联受体活性、雌激素反应元件结合、金属内肽酶活性、蛋白酪氨酸激酶活性、钙依赖性蛋白激酶 C 活性最为紧密。

3.3.2 杏仁活性有效成分治疗血管痉挛潜在靶点 KEGG 通路富集分析 KEGG 富集分析得到 115 条

通路，以 P 值作为参考进行排序，选取排前 20 位的条目，生成富集分析柱状图和气泡图，见图 4。靶点富集比较显著的通路有钙信号通路、神经活性配体 - 受体相互作用、鞘脂信号通路、血管平滑肌收缩、HIF-1 信号通路、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性、脂质和动脉粥样硬化、松弛素信号通路等。

3.4 成分 - 靶点网络图分析

将杏仁 20 个活性有效成分（其中 3 个活性有效成分与血管痉挛无交集靶点）、杏仁治疗血管痉挛 68 个潜在交集靶点导入 Cytoscape 3.8.2 软件，构建杏仁治疗血管痉挛的活性有效成分 - 靶点网络图，浅黄色为中药，紫色为中药的活性成分，绿色为中药作用于疾病的靶点，见图 5。杏仁主要活性有效成分有苦杏仁苷 (amygdalin, MOL001320)、雌酚酮 (estrone, MOL010921)、谷甾醇 (sitosterol, MOL000359) 等。其作用核心靶点有 ACE、EGFR、AGTR1、ESR1、MMP9、MMP2 等。

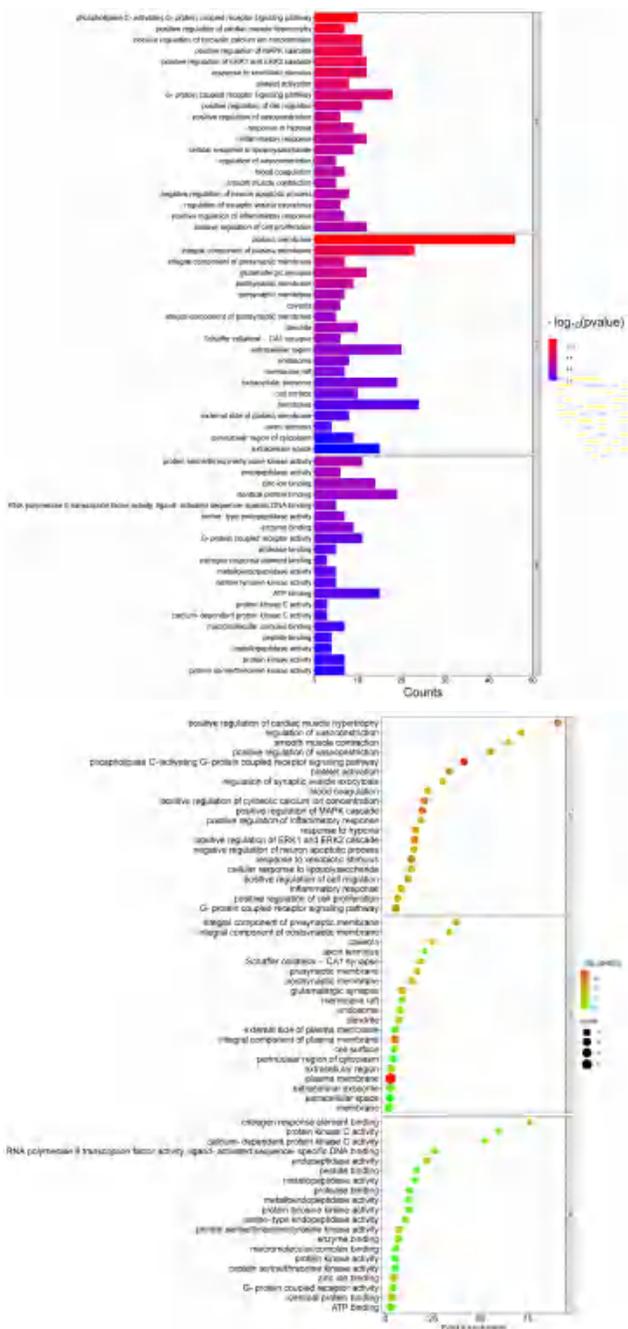


图 3 杏仁活性有效成分治疗血管痉挛关键靶点 GO 功能富集分析柱状图及气泡图

Fig 3 GO function enrichment analysis of the co-ownership targets of active ingredients of *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim. mature seed in the treatment of vasospasm

3.5 分子对接

选择杏仁主要的活性成分苦杏仁苷、雌酚酮与核心靶点进行分子对接, 结果见表 3。活性成分苦杏仁苷、雌酚酮与其对接的核心靶点结合能均小于 $-5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 说明其结合构象稳定(见图 6 和图 7)。苦杏仁苷可能通过作用于基质金属蛋白酶 9 靶点上的 TYR-420、LEU-187、LEU-418、LEU-397、LEU-188 等残基, 与靶点自发结合并借助氢键等分子间作用力形成较为稳定的构象, 以调节靶点的相关功能;

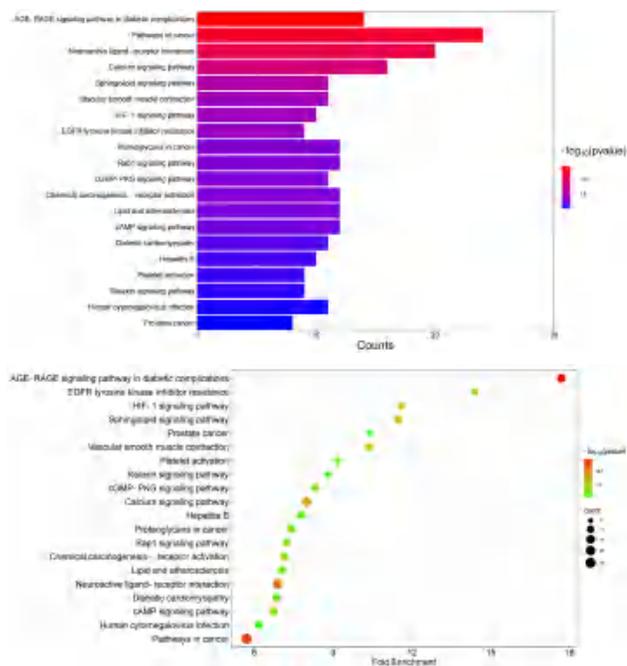


图 4 杏仁活性有效成分治疗血管痉挛关键靶点 KEGG 通路富集分析柱状及气泡图

Fig 4 KEGG pathway enrichment analysis of the co-ownership targets of active ingredients of *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim. mature seed in the treatment of vasospasm

雌酚酮可能通过作用于雌激素受体 1 靶点上的 ALA-350、LEU-384、LEU-346、LEU-387、LEU-525 等基因, 与靶点自发结合并借助氢键等分子间作用力形成较为稳定的构象, 以调节靶点的相关功能。

3.6 体外实验验证结果

苦杏仁苷和雌酚酮对于血管痉挛的核心靶点 MMP9、ESR1 的结合能分别为 $-7.9 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 、 $-8.6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 具有稳定的构象。因此选择杏仁中的单体成分苦杏仁苷进行相应的验证。

如图 8 所示, 与空白组相比, Ang II 模型组给予 Ang II 诱导后, VSMCs 细胞经过 1 d 的潜伏适应期后进入对数生长期, 第 4 日达顶点, 然后进入平台期, 群体倍增时间在 48 h 时 VSMCs 增殖最明显 ($P < 0.01$)。与 Ang II 模型组相比, 苦杏仁苷低浓度组的 VSMCs 生长曲线无明显差异 ($P > 0.05$)。苦杏仁苷中浓度组和苦杏仁苷高浓度组的 VSMCs 生长曲线明显降低 ($P < 0.01$), 提示苦杏仁苷中、高浓度能抑制 Ang II 所致 VSMCs 细胞增殖, 有较强的缓解血管痉挛潜能。

4 讨论

本研究以网络药理学方法获得杏仁治疗血管痉挛的活性成分 17 个, 成分-疾病共同靶点 68 个, 并构建其网络模型。结果发现杏仁主要的活性成分苦杏仁苷、雌酚酮、甘草苷等。杏仁肽抑制血管紧张素转化酶的活性^[18]。扁杏仁谷蛋白肽保护血管内皮功能^[19]。雌酚酮衍生物能阻断钙通道, 开放钾通

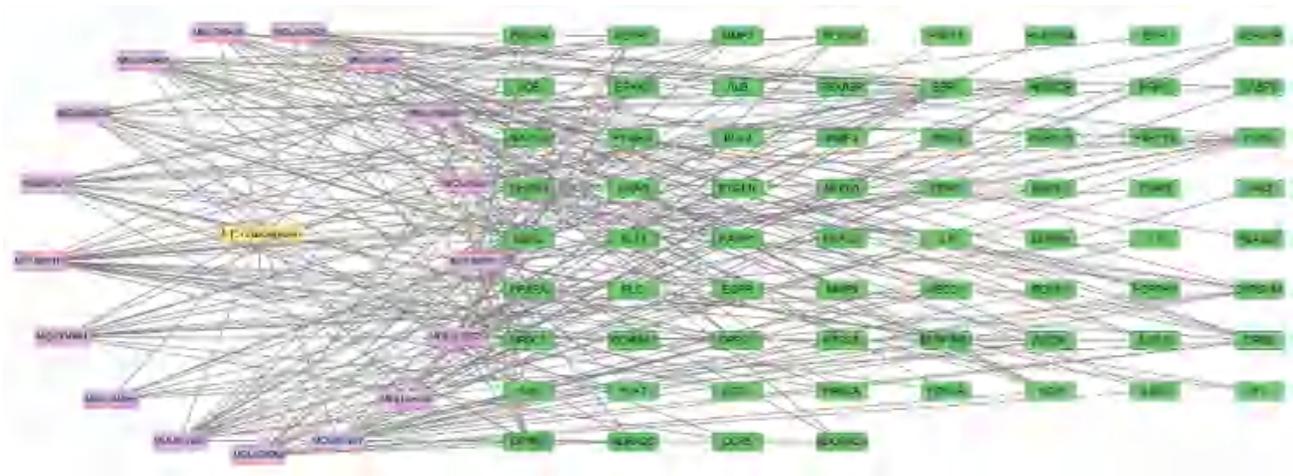


图 5 杏仁活性有效成分治疗血管痉挛的交集靶点网络图

Fig 5 Network diagram of the ownership targets of active ingredients of *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim. mature seed in the treatment of vasospasm

表 3 杏仁活性有效成分 - 靶点分子对接结合能

Tab 3 Binding energy diagram of active ingredients-targets of *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim. mature seed in the treatment of vasospasm

活性成分	编号	靶点	蛋白全称	结合能 / (kJ · mol ⁻¹)
苦杏仁苷	MOL001320	基质金属肽酶 9 (MMP9)	Matrix Metalloproteinase 9	- 7.9
雌酚酮	MOL010921	雌激素受体 1 (ESR1)	Estrogen Receptor 1	- 8.6

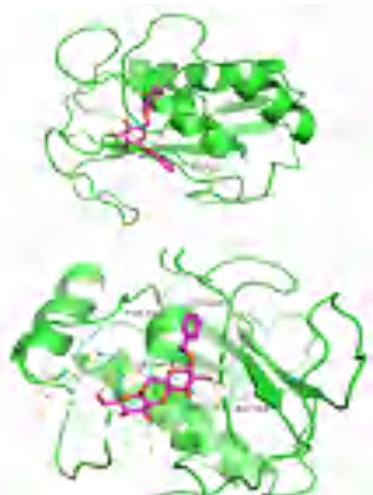


图 6 苦杏仁苷 - 基质金属肽酶 9 (MMP9) 的分子对接结果
Fig 6 Molecular docking of amygdalin-matrix metalloproteinase 9



图 7 雌酚酮 - 雌激素受体 1 (ESR1) 的分子对接结果
Fig 7 Molecular docking of estrone-estrogen receptor 1 (ESR1)

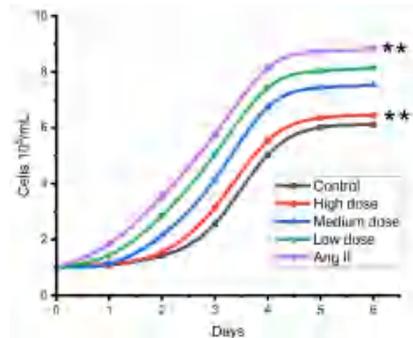


图 8 苦杏仁苷各组的 VSMCs 细胞增殖生长曲线 (**P < 0.01)
Fig 8 Cells growth curve of amygdalin (**P < 0.01)

道, 舒张离体兔血管平滑肌^[20]。雌酚酮衍生物能阻断电压依赖性钙通道, 抑制细胞内钙释放, 舒张肠平滑肌^[21]。甘草苷通过调节 β -catenin/cyclinD1 信号通路, 抑制血管平滑肌细胞增殖^[22]。

本研究获得 24 个核心靶点 (见图 2), 度中心性值排位靠前的是白蛋白 (albumin)、白细胞介素-6 (interleukin 6)、血管紧张素 I 转化酶 (angiotensin I converting enzyme)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor)、凝血因子 II, 凝血酶 (Coagulation Factor II, Thrombin)、血管紧张素 II 受体 1 型 (angiotensin II receptor type 1)、ATP 结合盒 B 亚家族成员 (ATP binding cassette subfamily B member 1)、雌激素受体 1 (estrogen receptor 1)、基质金属肽酶 9 (matrix metalloproteinase 9)、雌激素受体 1 (estrogen receptor 1)、过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferator activated receptor alpha)、Janus 激酶 2 (Janus kinase 2)、激酶插入结构域受体 (kinase insert domain receptor)、基质金属肽酶 2 (matrix metallo-

peptidase 2) 等。通过成分-靶点网络关系分析,发现白蛋白可下调脑缺血早期海马 VEGF 和 flt-1 mRNA 表达,降低海马 VEGF 蛋白表达,改善神经功能缺损^[23]。晚期糖基化终产物修饰人血清白蛋白能抑制内皮细胞增殖,并诱导其凋亡^[24]。静脉留置针刺刺激使 Ang II 和 IL-6 含量增高,引起血管收缩痉挛,促使血管炎症反应,致血管损伤^[25]。Ang II 介导的信号与 MAPKs 激活有关,MAPKs 家族包括 ERK、JNK、MAPK 等^[26]。Ang II 通过与 VSMCs 膜上的 AT1R 结合,启动细胞内转移激活 EGFR,促进酪氨酸磷酸化(酪氨酸激酶激活是有丝分裂信号通路中最基本的),MAPK 信号通路,促进 VSMCs 增殖^[27]。Ang II 刺激主动脉血管平滑肌细胞,p38 MAPK、ERK 及 JNK 激活明显升高^[28]。Ang II 通过 AT1 受体转导激活 EGFR,进一步激活 ERK 而促进冠脉血管平滑肌细胞增殖^[29]。AT1 受体为 G 蛋白耦联受体,EGFR 为受体型酪氨酸激酶,EGFR 在 Ang II 的促细胞增殖中起桥梁作用。AT1 受体诱导 EGFR 转导激活涉及酪氨酸激酶、反应氧家族及金属蛋白酶等机制参与^[30-31]。用 Ang II 刺激血管平滑肌细胞,细胞内钙动员增加,EGFR 激活磷酸化,致 Shc-GRB-2-SOS 复合物形成,调节 Ras-Raf-MAPK 级联信号基因表达,促使细胞增殖^[32]。Ang II 通过 AT1 受体转导激活 EGFR,进一步激活 c-Src 及其下游蛋白酶^[33]促进血管平滑肌细胞增殖。Ang II 通过金属蛋白酶介导 HB-EGF 释放,激活 EGFR,进一步激活 ERK (MAPKs) 通路促进细胞增殖^[34]。Ang II 与 AT1 受体结合,促使 HB-EGF 释放,HB-EGF 与 EGFR 结合,EGFR 发生自身磷酸化,激活启动酪氨酸激酶通路促进细胞增殖。EGFR 转导激活 AT1 受体启动下游信号级联,通过 Ca²⁺ 依赖的金属蛋白酶的作用,金属蛋白酶活化后,引起附着在主动脉血管平滑肌细胞膜上的 HB-EGF 前体裂解而释放 HB-EGF^[35]。Ang II 受体激活金属蛋白酶,促使 EGFR 配体 HB-EGF 的释放,介导 EGFR 转导激活促使血管平滑肌细胞增殖^[36]。动脉成形术使血管平滑肌细胞 EGFR 表达增加,血管平滑肌细胞增殖与 EGFR 促进血管再狭窄^[37]。杏仁肽抑制血管紧张素转化酶的活性^[18]。上述活性成分和靶点可能是杏仁治疗血管痉挛作用机制。

GO 富集分析发现,杏仁活性成分中的靶点主要富集在磷脂酶 C 活化 G 蛋白偶联受体信号通路、胞质钙离子浓度的正调节、正向调控 MAPK 级联、正向调节 ERK1 和 ERK2 级联、对外来刺激的反应、G 蛋白偶联受体信号通路、细胞迁移的正向调节、血管收缩的正向调节、对缺氧的反应、炎症反应、平滑肌收缩、细胞增殖的正向调节等生物过程,这与血管痉挛涉及的病理机制相关。

KEGG 富集分析得到 115 条相关信号通路,在

前 10 条通路中,靶点富集比较集中的通路有钙信号通路、神经活性配体-受体相互作用、鞘脂信号通路、血管平滑肌收缩、HIF-1 信号通路、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性、脂质和动脉粥样硬化、松弛素信号通路等。这些信号通路参与细胞的增殖、分化和细胞运动、迁移等多种生物功能,还与神经信号传导、血管的生成有关。

通过 Autodock-Vina 软件进行分子对接,靶点蛋白与活性成分的结合能均小于 $-5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 结合构象稳定。杏仁通过苦杏仁苷、雌酚酮等活性成分作用于相应靶点蛋白,从而治疗血管痉挛。VSMCs 细胞增殖受到众多与增殖和凋亡相关基因调控,细胞外刺激信号经过 VSMCs 细胞内信号通路将胞外信号转入胞内,进而传递到核内启动基因转录。基于体外 VSMCs 细胞模型,以细胞存活率为检测指标,开展了苦杏仁苷对 VSMCs 细胞模型的舒张作用研究。结果显示,与 Ang II 组相比,苦杏仁苷低浓度组的 VSMCs 生长曲线无显著性差异。苦杏仁苷中、高浓度组的 VSMCs 生长曲线明显降低,研究发现苦杏仁苷中、高浓度能抑制 Ang II 所致血管平滑肌细胞增殖,有较强的缓解血管痉挛作用。

本研究采用网络药理学和分子对接技术,并结合体外实验,发现杏仁可能通过苦杏仁苷、雌酚酮等成分,作用于 MMP9、ESR1 等核心靶点,通过改善神经缩血管物质、缓解血管平滑肌反应等途径发挥治疗血管痉挛的作用,其中苦杏仁苷可能为杏仁治疗血管痉挛主要的药效物质之一,可为以后研究杏仁有效成分治疗血管痉挛提供一定的基础。

参考文献

- [1] 马启明. 皮瓣移植术后血管痉挛机制与解痉药物研究进展 [J]. 中国临床解剖学杂志, 2020, 38 (2): 231-234.
- [2] Marvin DO, Antonella I, Oliver G, et al. Vasospasm-related complications after subarachnoid hemorrhage: the role of patients' age and sex [J]. Acta Neurochir, 2018, 60 (7): 1393-1400.
- [3] Knuuti J, Wijns W, Saraste A, et al. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes [M]. Eur Heart J, 2019, 31: 1-71.
- [4] Amit R, Ajaypaul S, Rahul C, et al. Investigational drugs in phase II clinical trials for acute coronary syndromes [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2020, 29 (1): 33-47.
- [5] Anders S, Bartosz P, Line EH, et al. MFAP4 promotes vascular smooth muscle migration, proliferation and accelerates neointima formation [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2016, 36 (1): 122-133.
- [6] 岳星海, 赵克明. 苦杏仁的药理作用和临床应用研究概况 [J]. 中国民族民间医药, 2023, 32 (2): 45-49.
- [7] Zhang ZM, Yang L, Wan Y, et al. The synergic renoprotective effect of Rehmanniae Radix Preparata and Corni Fructus on adenine-induced chronic kidney disease rats based on

- integrated plasma metabolomics and network pharmacology approach [J]. *Life Sci*, 2021, 278: 119545.
- [8] Chen PY, Yuan C, Hong ZC, et al. Revealing the mechanism of "Huai Hua San" in the treatment of ulcerative colitis based on network pharmacology and experimental study [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 5, 281: 114321.
- [9] Jin D, Zhang JH, Zhang YQ, et al. Network pharmacology-based and molecular docking prediction of the active ingredients and mechanism of ZaoRenDiHuang capsules for application in insomnia treatment [J]. *Comput Biol Med*, 2021, 135: 104562.
- [10] Luo TT, Lu Y, Yan SK, et al. Network pharmacology in research of Chinese medicine formula: methodology, application and prospective [J]. *Chin J Integr Med*, 2020, 26 (1): 72-80.
- [11] Ru JL, Peng Li P, Wang JN, et al. TCMSp: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 16 (6): 13.
- [12] Li JS, Zhao P, Li Y, et al. Systems pharmacology-based dissection of mechanisms of Chinese medicinal formula Bufei Yishen as an effective treatment for chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Sci Rep*, 2015, 15 (5): 15290.
- [13] UniProt C. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47: D506-D515.
- [14] Gil S, Naomi R, Inbar P, et al. The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses [J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2016, 54 (20): 1.30.1-1.30.33.
- [15] Joanna SA, Carol AB, François S, et al. OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: D789-798.
- [16] Wang YX, Zhang S, Li FC, et al. Therapeutic target database 2020: enriched resource for facilitating research and early development of targeted therapeutics [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48: D1031-D1041.
- [17] Damian S, Annika LG, David L, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47: D607-D613.
- [18] 苏娜, 李智娟, 詹汉英, 等. 扁杏仁肽对血管紧张素转化酶的抑制作用研究 [J]. *食品工业科技*, 2015, 36 (24): 128-130.
- [19] 史婷, 郝双利, 张志琪. 扁杏仁肽对血管内皮功能的影响 [J]. *西北药学杂志*, 2016, 31 (3): 267-270.
- [20] 李娟, 付守廷, 李辉, 等. 雌酚酮衍生物 EA204 对离体兔血管平滑肌的舒张作用 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2008, 25 (3): 219-222.
- [21] 朱岚, 付守廷, 陈国良, 等. 雌酚酮衍生物 EA303 对家兔离体空肠平滑肌的舒张作用 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2010, 27 (1): 60-64.
- [22] 陈静, 徐林, 张静, 等. 甘草皂苷抑制血管平滑肌细胞增殖与 β -catenin 信号通路的关系 [J]. *微循环学杂志*, 2013, 23 (4): 12-15.
- [23] 李敏, 苗维, 王敏, 等. 白蛋白治疗对大鼠脑缺血后海马血管内皮生长因子及其受体 1 的影响 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2013, 15 (1): 82-85.
- [24] 林炜栋, 陆树良, 青春, 等. 晚期糖基化终产物修饰人血清白蛋白对人血管内皮细胞的生长抑制作用 [J]. *中华医学杂志*, 2003, 83 (7): 572-576.
- [25] 魏艳艳, 路雪芹, 陈传波. 血管紧张素 II 和白介素 6 在静脉留置针致血管损伤中的作用 [J]. *河南预防医学杂志*, 2014, 25 (4): 252-254.
- [26] Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK and p38 protein kinases [J]. *Science*, 2002, 298 (5600): 1911-1912.
- [27] 尹小龙, 朱艳霞, 姚雨凡, 等. 表皮生长因子受体在血管紧张素 II 促血管平滑肌细胞增殖中的作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, 14 (9): 783-785.
- [28] Eguchi S, Dempsey PJ, Frank GD, et al. Activation of MAPKs by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Metalloprotease-dependent EGF receptor activation is required for activation of ERK and p38 MAPK but not for JNK [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (11): 7957-7962.
- [29] Miura SI, Zhang JL, Matsuo YS, et al. Activation of extracellular signal-activated kinase by angiotensin II-induced Gq-independent epidermal growth factor receptor transactivation [J]. *Hypertens Res*, 2004, 27 (10): 765-770.
- [30] Eguchi S, Inagami T. Signal transduction of angiotensin II type 1 receptor through receptor tyrosine kinase [J]. *Regul Pept*, 2000, 91 (1-3): 13-20.
- [31] Cunnick JM, Dorsey JF, Standley T, et al. Role of tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptor in the lysophosphatidic acid-stimulated mitogen-activated protein kinase pathway [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273 (23): 14468-14475.
- [32] Eguchi S, Numaguchi K, Iwasaki H, et al. Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273 (15): 8890-8896.
- [33] Chen JC, Chen JK, Raymond CH. Angiotensin II induces epithelial-to-mesenchymal transition in renal epithelial cells through reactive oxygen species/Src/caveolin-mediated activation of an epidermal growth factor receptor-extracellular signal-regulated kinase signaling pathway [J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32 (5): 981-991.
- [34] Bukhtiar HS, Kevin JC. A central role of EGF receptor transactivation in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2003, 24 (5): 239-244.
- [35] Kalmes A, Daum G, Clowes AW. EGFR transactivation in the regulation of SMC function [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, 947: 42-54.
- [36] Takaguri A, Shirai H, Kimura K, et al. Caveolin-1 negatively regulates a metalloprotease-dependent epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 50 (3): 545-551.
- [37] 王兵, 李玉莉, 何金, 等. 动脉成形术对血管表皮生长因子受体表达影响的免疫组化研究 [J]. *第二军医大学学报*, 1999, 20 (4): 225-227.

(收稿日期: 2023-10-24; 修回日期: 2023-11-24)

肉桂不同部位挥发油 3 种成分的含量测定及其体外透皮特性研究

陈锋, 罗金荣, 邓聿胤 (广西壮族自治区中医药研究院化学所, 广西中药质量标准研究重点实验室, 南宁 530022)

摘要: 目的 建立同时测定肉桂不同部位挥发油中肉桂酸、桂皮醛、邻甲氧基肉桂醛含量的 HPLC-RID 方法, 并比较它们的体外透皮特性。方法 采用 Franz 扩散池法, 以小鼠皮肤作渗透介质, 分别对桂皮、桂枝、桂叶的挥发油进行体外透皮吸收试验, 采用 Agilent C18 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 乙腈-0.2% 磷酸 (30:70) 为流动相, 流速 0.9 mL·min⁻¹, 示差折光检测器 (RID) 温度 30℃, 柱温 30℃, 同时测定透皮样品中肉桂酸、桂皮醛、邻甲氧基肉桂醛的含量, 计算并分析各成分的累计渗透量和渗透速率。结果 肉桂酸、桂皮醛、邻甲氧基肉桂醛分别在 0.0489 ~ 0.5381 μg、0.1816 ~ 9.9874 μg、0.1142 ~ 1.2566 μg 与峰面积线性关系良好 ($r > 0.999$); 三种成分的 24 h 单位面积累计渗透量, 桂皮油的为 53.84、1228.10、265.29 μg·cm⁻², 桂枝油的为 84.73、2937.69、87.39 μg·cm⁻², 桂叶油的为 67.45、1699.78、347.99 μg·cm⁻²; 三种成分的稳态渗透速率, 桂皮油的为 1.41、96.24、12.77 μg·cm⁻²·h⁻¹, 桂枝油的为 1.97、130.01、4.90 μg·cm⁻²·h⁻¹; 桂叶油的为 0.91、74.85、16.48 μg·cm⁻²·h⁻¹。结论 建立的 HPLC-RID 方法快速简便, 分离度好, 准确度高, 可用于肉桂油的质量控制及其透皮试验研究。挥发油中各指标成分均能透过小鼠离体皮肤, 24 h 累计渗透量和渗透速率的大小顺序均是桂皮醛>邻甲氧基肉桂醛>肉桂酸, 且与成分的浓度成正相关。

关键词: 肉桂油; 肉桂酸; 桂皮醛; 邻甲氧基肉桂醛; HPLC-RID; 体外透皮

中图分类号: R283.69 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)07-1757-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.012

Content of 3 components of volatile oil from different parts of *Cinnamomum cassia* and its in vitro transdermal permeation

CHEN Feng, LUO Jin-rong, DENG Yu-yin (Department of Chemistry, Guangxi Institute of Chinese Medicine & Pharmaceutical Science, Guangxi Key Laboratory of the Quality Standard of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530022)

Abstract: Objective To establish a method to simultaneously determine the content of cinnamic acid, cinnamaldehyde and 2-methoxy cinnamaldehyde by HPLC-RID, and to compare the in vitro transdermal properties of volatile oil from different parts of *Cinnamomum cassia*. **Methods** Mouse skin was used as the permeation medium, the in vitro transdermal absorption experiments of cinnamon bark oil, cassia twig oil and cinnamon leaf oil were conducted with Franz diffusion cells. We simultaneously determined the content of cinnamic acid, cinnamaldehyde and 2-methoxy cinnamaldehyde in transdermal samples by Agilent C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm). Acetonitrile-0.2% phosphoric acid (30:70) was used as the mobile phase, and the flow rate were all at 0.9 mL·min⁻¹. The refractive index detector (RID) was used, and the temperatures of column and detector were all at 30℃. The accumulative permeation and rate of each component were calculated and analyzed. **Results** Cinnamic acid, cinnamaldehyde and 2-methoxy cinnamaldehyde were linear within 0.0489 ~ 0.5381 μg, 0.1816 ~ 9.9874 μg, and 0.1142 ~ 1.2566 μg, respectively ($r > 0.999$). The 24 h accumulative permeation per unit area was 53.84, 1228.10, and 265.29 μg·cm⁻² from the cinnamon bark oil; 84.73, 2937.69, and 87.39 μg·cm⁻² from the cassia twig oil; while

基金项目: 广西科技重大专项 (桂科 AA23023002); 广西中医药适宜技术开发与推广项目 (No.GZSY22-10)。

作者简介: 陈锋, 男, 副主任药师, 主要从事植物化学、药物分析及工艺研究, email: 120765361@qq.com

67.45, 1699.78, and 347.99 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ from the cinnamon leaf oil. The steady-state permeation rates were 1.41, 96.24, and 12.77 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ from the cinnamon bark oil; 1.97, 130.01, and 4.90 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ from the cassia twig oil; and 0.91, 74.85, and 16.48 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ from the cinnamon leaf oil. **Conclusion** The established HPLC-RID method is fast, simple, with good separation and high accuracy, which can be used for the quality control and transdermal testing of cinnamon oil. All these indicator components in these volatile oils can permeate the mice skin in vitro. The accumulative permeation and rate from largest to smallest are cinnamaldehyde, 2-methoxy cinnamaldehyde and cinnamic acid.

Key words: cinnamon oil; cinnamic acid; cinnamaldehyde; 2-methoxy cinnamaldehyde; HPLC-RID; in vitro transdermal

樟科植物肉桂 (*Cinnamomum cassia* Presl.) 是药食同源的常用中药, 其树皮、嫩枝、果实均可入药, 肉桂在我国产量大、用途广、用量多, 主要含有挥发油、萜类、多酚、黄酮、皂苷、糖苷等多类物质, 作为原料用于医药、食品和轻化工业等多方面^[1]。肉桂的树皮、嫩枝和树叶均含有挥发油, 这些部位提取的挥发油所含化学成分多达数十种, 在种类和含量上比较接近, 主要含有桂皮醛、邻甲氧基肉桂醛、肉桂酸等, 这些都是肉桂主要的药效物质, 其中桂皮醛占比最大, 在 75% ~ 90%^[2-4]。中医认为肉桂油具有温中补肾、散寒止痛、活血通络等功效, 临床中用于风寒、关节痛和肠胃不适等疾病, 还具有抗菌、抗炎、抗氧化、降血糖等生物活性, 外用也表现出较好的治疗效果, 具有很好的药用前景^[5]。许多中药挥发油都具有透皮吸收和促进其他药物渗透的作用, 这种经皮给药方式 (TDDS 系统) 不仅无肝首过效应、不良反应少、临床应用方便, 而且还具有降低血药浓度波动、靶向、缓释、增加患者依从性和耐受度的特点, 是继口服、注射之后最有潜力的给药方式之一^[6-7]。肉桂油也是常用的透皮吸收促进剂, 所含的部分成分不仅自身具有皮肤渗透能力, 还能对其他药物产生促透效果, 这种特性在临床中会直接影响血药浓度和药效。药效物质的渗透量和渗透速率是评价经皮制剂质量的重要指标, 中药挥发油成分一般都较为复杂, 其渗透特性受多种因素影响, 如药物浓度、分子量大小、化学性质、促渗剂或阻渗剂、辅料作用和皮肤介质等, 之前研究发现醇类和酮类物质更容易透过皮肤, 而烯类较差^[8-9]。目前, 肉桂化学成分色谱分析手段主要有气相色谱法 (GC、GC-MS) 和基于紫外检测器 (UVD) 的高效液相色谱法 (HPLC-UVD), 尚未有高效液相色谱法联合示

差折光检测器 (HPLC-RID) 进行研究的报道, 也未见同时对肉桂不同部位挥发性成分进行体外透皮渗透的对比研究^[10]。因此, 本文以肉桂不同部位的挥发油为研究对象, 建立了同时测定肉桂酸、桂皮醛、邻甲氧基肉桂醛的 HPLC-RID 方法, 考察了它们的透皮吸收行为并进行对比, 为这些挥发油的测定和相关药物的研发提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); RYJ-12B 型药物透皮扩散试验仪 (上海黄海药检仪器有限公司); XSR205DU 电子天平 (瑞士梅特勒-托利多公司); KS-3200DE 型超声波清洗器 (昆山洁力美超声仪器有限公司)。

1.2 试药

桂皮、桂枝、桂叶 (广西源安堂药业有限公司); 肉桂酸对照品 (纯度: 98.8%, 批号: 110786-201604); 桂皮醛对照品 (纯度: 99.5%, 批号: 110710-202022) (中国食品药品检定研究院); 邻甲氧基肉桂醛 (纯度 $\geq 99\%$, 上海源叶生物科技有限公司, 批号: S28D9G78359); 乙腈 (美国 Fisher 公司) 为色谱纯, 纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司); 其他试剂 (磷酸、氯化钠等) 均为分析纯。

1.3 动物

昆明小鼠 [长沙市天勤生物技术有限公司, 雌雄各半, 体重 20 ~ 25 g, 许可证号 SCXK (湘) 2019-0014]。

2 方法与结果

2.1 不同部位挥发油的提取

分别取粉碎的桂皮、桂枝和桂叶各 500 g, 加 6 倍量水, 用水蒸气回流法提取至挥发油不再增加为止, 收集挥发油, 用无水硫酸钠脱水, 备用。

2.2 HPLC-RID 色谱条件

Agilent C18 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-0.2% 磷酸 (30 : 70), 流速为 0.9 mL·min⁻¹, RID 温度 30 ℃, 柱温 30 ℃, 进样量 10 μL。

2.3 混合对照品溶液

分别取肉桂酸、桂皮醛和邻甲氧基肉桂醛对照品适量, 精密称定, 置于量瓶中, 用乙腈溶解并定容至刻度, 摇匀, 得到含肉桂酸、桂皮醛、邻甲氧基肉桂醛分别为 24.46、453.97、57.12 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液, 过滤, 即得。

2.4 供试品溶液

将挥发油透皮后的接收液全部取出, 用乙腈定容于 10 mL 量瓶中, 摇匀, 微孔滤膜过滤, 即得供试品溶液。

2.5 专属性考察

分别取肉桂不同部位的挥发油及其对应的透皮接收液供试品溶液、混合对照品溶液和空白接收液, 按“2.2”项下色谱条件测定, 结果显示, 供试品溶液中肉桂酸、桂皮醛、邻甲氧基肉桂醛出峰位置与对照品溶液一致, 峰形较好, 且空白接收液无干扰, 表明该方法专属性良好, 色谱图见图 1。

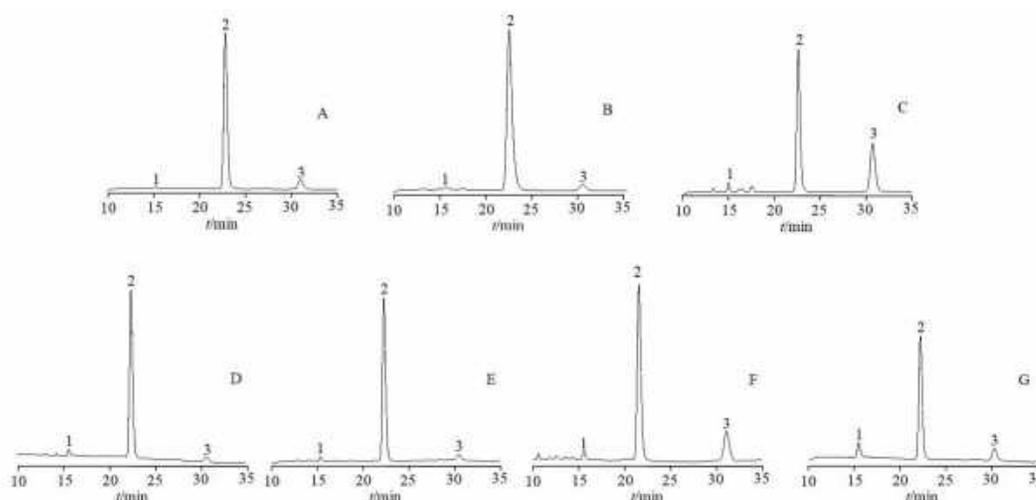


图 1 肉桂各供试品和混合对照品的 HPLC-RID 图

Fig 1 HPLC-RID chromatograms of samples and mixed reference of cinnamon

A. 桂皮油 (cinnamon bark oil); B. 桂枝油 (cassia twig oil); C. 桂叶油 (cinnamon leaf oil); D. 桂皮油透皮接收液 (permeate of cinnamon oil); E. 桂枝油透皮接收液 (permeate of cassia twig oil); F. 桂叶油透皮接收液 (permeate of cinnamon leaf oil); G. 混合对照品溶液 (mixed reference solution); 1. 肉桂酸 (cinnamic acid); 2. 桂皮醛 (cinnamaldehyde); 3. 邻甲氧基肉桂醛 (2-methoxy cinnamaldehyde)

2.6 精密度试验

取“2.3”项下混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 记录肉桂酸、桂皮醛、邻甲氧基肉桂醛的峰面积, 结果各成分的峰面积 RSD 分别为 2.1%、0.59%、1.7%, 表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取室温放置的同一供试品溶液, 在 24 h 内每隔 4 h 重复进样测定, 记录肉桂酸、桂皮醛、邻甲氧基肉桂醛的峰面积, 结果各成分峰面积 RSD 分别为 1.6%、1.3%、2.9%, 表明供试品溶

液在室温状态下 24 h 内稳定性良好。

2.8 线性关系考察

取配制好的混合对照品溶液, 稀释成不同浓度, 按“2.2”项下色谱条件进样测定, 记录各成分峰面积, 以对照品峰面积 (Y) 对进样量 (X, μg) 进行回归, 得到肉桂酸、桂皮醛、邻甲氧基肉桂醛的线性回归方程, 结果见表 1, 说明各成分在各自进样量范围内与峰面积呈良好的线性关系。

表 1 肉桂酸、桂皮醛、邻甲氧基肉桂醛各自的线性关系

Tab 1 Linearity of cinnamic acid, cinnamaldehyde, and 2-methoxy cinnamaldehyde

成分	回归方程	r	线性范围/μg
肉桂酸	$Y = 2.9563 \times 10^5 X + 148.63$	0.9995	0.0489 ~ 0.5381
桂皮醛	$Y = 1.6007 \times 10^5 X + 537.26$	0.9999	0.1816 ~ 9.9874
邻甲氧基肉桂醛	$Y = 1.8300 \times 10^5 X - 176.41$	0.9991	0.1142 ~ 1.2566

2.9 加样回收试验

在已知肉桂酸、桂皮醛和邻甲氧基肉桂醛浓度的透皮接收液中，按 1:1 比例加入混合对照品溶液，平行制备 6 份供试品溶液，进样测定，记录各成分峰面积，计算回收率，结果 3 种成分的回收率在 99.35% ~ 103.98%，RSD 在 0.60% ~ 1.9%。

2.10 体外透皮试验

2.10.1 离体皮肤制备 小鼠脱颈处死，仔细剃去腹部体毛并剥离皮肤，去除皮下脂肪，用生理盐水反复冲洗至干净并浸泡保存，备用。

2.10.2 体外渗透方法 裁剪出大小合适无破损的离体皮肤，角质层朝上固定于扩散池，接收池面积为 2.27 cm²，体积为 6.5 mL。37.0 °C 预热透皮扩散试验仪及接收液并保持恒温，接收池加入 10% 乙腈 - 生理盐水作为接收液，排出池内气泡，开启磁力搅拌，转速为 300 r · min⁻¹。待仪

器平衡后，供给池中分别加入肉桂油、桂枝油、桂叶油各 0.2 mL，使其均匀涂布于皮肤角质层表面，用保鲜膜封闭供给池口。分别于 2、4、6、8、10、12、24 h 时间点将接收液全部取出，并同时用新的接收液补满接收池，取出的接收液照“2.4”项下方法制备供试品溶液，进样测定，同时测定肉桂酸、桂皮醛和邻甲氧基肉桂醛的含量，按下列公式分别计算各自的单位面积累计透过量 (Q_n) 和稳态渗透速率 (J_{ss})^[11]。

$$Q_n = (C_n + \sum_{i=1}^{n-1} C_i) V/A$$

式中 C_n 和 C_i 分别为第 n 、 i 次取样点供试品质量浓度， V 为供试品溶液体积， A 为渗透面积。以 Q 对渗透时间 t 进行回归，所得曲线即为渗透曲线 (见图 2)，所得曲线直线部分的斜率即为 J_{ss} ，成分的表现渗透系数 $P_{app} = J_{ss}/(C \times 3600)$ ，其中 C 为供给池中成分的质量浓度，结果见表 2。

表 2 肉桂不同部位挥发油体外透皮试验相关数据

Tab 2 Related data on in vitro transdermal testing of volatile oil from different parts of cinnamon

部位	成分	$Q_{24h}/(\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2})$	$J_{ss}/(\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1})$	$P_{app}/(\times 10^{-5} \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1})$
桂皮	肉桂酸	53.84	1.41	1.14
	桂皮醛	1228.10	96.24	3.55
	邻甲氧基肉桂醛	265.29	12.77	4.15
桂枝	肉桂酸	84.73	1.97	9.90
	桂皮醛	2937.69	130.01	4.28
	邻甲氧基肉桂醛	87.39	4.90	1.88
桂叶	肉桂酸	67.45	0.91	2.44
	桂皮醛	1699.78	74.85	3.71
	邻甲氧基肉桂醛	347.99	16.48	1.74

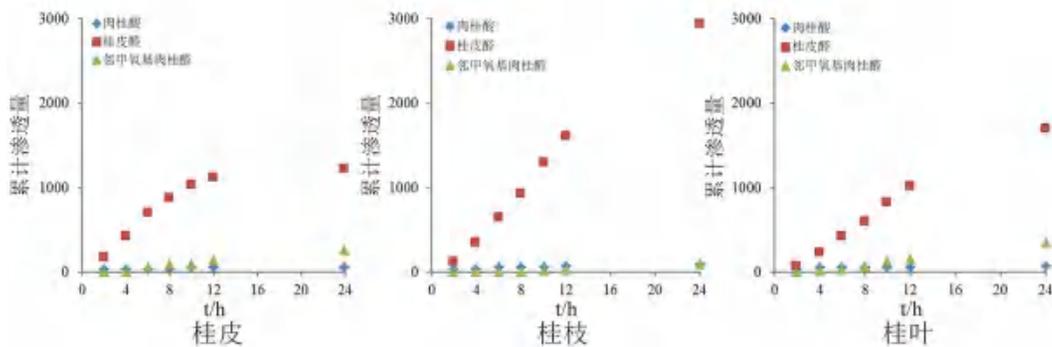


图 2 肉桂不同部位挥发油中 3 个成分的单位面积累计透过量 - 时间曲线

Fig 2 $Q-t$ relationship curve of three components in volatile oil from different parts of cinnamon

3 讨论

HPLC 是中药研究中最常用的分析手段，随着《中国药典》版本的更新，使用 HPLC 检测的品种也逐渐增加。检测器是该系统的关键部件，中药成分复杂多样，根据需求会使用不同类型的检测器，一般与 HPLC 适配的有 UVD、蒸发光散射检测器 (ELSD)、RID、荧光检测器 (FLD)、

电喷雾检测器 (CAD)、质谱检测器 (MSD) 等，为满足更高的测定需求，还可以将不同类型的检测器进行串联或并联使用。本文尝试采用 HPLC-RID 开展研究，RID 通用性强，原理是检测物质与流动相折射率之差，所以对于某些没有或有很弱紫外吸收的物质，能够在一定程度上替代 UVD^[12]。本文建立的 HPLC-RID 法能同时测定肉

桂的指标性成分肉桂酸、桂皮醛和邻甲氧基肉桂醛,该方法分离度好,准确度高,为研究肉桂提供了更多可用的分析手段,适用于成分分析、质量控制及相关透皮试验研究。桂皮醛是肉桂油中含量最高的成分,是重要的质量控制指标,前期研究发现,HPLC 搭配 UVD 时虽然灵敏度更好,但桂皮醛浓度过高时会产生信号过载的情况,而使用 RID 检测时仍能保持较好的峰形,从而获得更宽的线性响应范围^[13],该法可用于同时测定与流动相折射率有差异,且浓度、响应差异较大的化合物群。

在体外透皮试验中,肉桂同一部位挥发油中的各成分在 Q_{24h} 和 J_{ss} 的大小顺序均是桂皮醛 > 邻甲氧基肉桂醛 > 肉桂酸,且与相对含量成正相关,即成分相对含量较大,则 Q_{24h} 和 J_{ss} 也较大,与文献报道一致^[14]。各成分在肉桂不同部位中的比例各不相同,其渗透参数也不同,相互之间可能存在着促渗或阻渗透作用。本试验不同部位挥发油中各成分的 P_{app} 都大于 $1 \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$,说明它们具有较高的皮肤渗透性,不过邻甲氧基肉桂醛在 4 ~ 8 h 后才逐渐透过皮肤^[15]。肉桂不同部位挥发油有着不同的透皮特性,但各成分在同一部位中有相似的渗透规律,这一特点可为相关制剂的研发提供理论依据。通过分析透皮接收液中各成分的含量变化,发现肉桂酸有额外的增加,推测它不仅从肉桂挥发油渗透到了供给池,其中的桂皮醛还会在透皮过程中与蛋白质相结合转化成肉桂酸,而肉桂醇不会发生这样的转化^[16]。另外,桂皮醛在乙腈中相较于甲醇、无水乙醇更稳定,所以该试验均使用乙腈制备对照品和供试品。透皮接收液中含有有机溶剂,如果浓度过高会破坏动物皮肤的角质层,影响离体皮肤的正常生理结构而不利于反映药物的实际透皮特性,而且体外透皮试验时间长、温度高,会导致动物皮肤腐烂,低浓度有机溶剂可起到一定的抑菌作用,所以选择 10% 乙腈 - 生理盐水溶液作为接收液,提高了试验结果的准确性,也起到了一定的防腐作用^[17]。

参考文献

- [1] 杨亚玲, 罗碧, 张红, 等. 肉桂质量研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45 (12): 2792-2799.
- [2] 陈楚文, 许丹芸, 张辉菊, 等. 肉桂与大叶清化桂生理生化特征比较分析 [J]. 现代食品, 2020, 13: 202-207.
- [3] Kumar S, Kumari R, Mishra S. Pharmacological properties and their medicinal uses of cinnamomum: a review [J]. J Pharm Pharmacol, 2019, 71 (12): 1735-1761.
- [4] Waesito W, Murlistyarini S, Suratmo S, et al. Molecular docking compounds of cinnamaldehyde derivatives as anticancer agents [J]. Asian Pac J Cancer P, 2021, 22 (8): 2409-2419.
- [5] 梁晓静, 安家成, 黎贵卿, 等. 肉桂特色资源加工利用产业发展现状 [J]. 生物质化学工程, 2020, 54 (6): 18-24.
- [6] Shashank C, Anuj G. An insight of techniques for the assessment of permeation flux across the skin for optimization of topical and transdermal drug delivery systems [J]. J Drug Deliv Sci Tec, 2021, 62: 102355.
- [7] 马晓辉. 中药透皮给药系统的研究进展 [J]. 中国实用医药, 2015, 10 (2): 246-248.
- [8] 陈锋, 李嘉, 柴玲. 岗松、大叶桉及其药对中挥发油透皮成分的气相色谱 - 质谱联用分析 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38 (11): 1939-1944.
- [9] 王艳宏, 刘书博, 王锐, 等. 中药挥发油透皮吸收及透皮吸收作用的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23 (3): 192-199.
- [10] 郭明里, 李宁, 普俊学, 等. 肉桂质量评价研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2017, 13 (17): 53-58.
- [11] 魏国志, 许飞飞, 李和伟, 等. 不同来源猪皮与重建人类表皮模型对面膜中咖啡因透过性比较研究 [J]. 中中药学, 2023, 21 (8): 2095-2100.
- [12] 邬伟魁, 严倩茹, 宋伟. 液相色谱检测器联用技术在中药分析中的应用进展 [J]. 中国药事, 2022, 36 (5): 569-577.
- [13] Bandini E, Wicht K, Ampe A, et al. Hyphenating temperature gradient elution with refractive index detection through temperature-responsive liquid chromatography [J]. Anal Chim Acta, 2022, 1231: 340441.
- [14] 朱卫丰, 张亚红, 刘红宁, 等. 肉桂酸透皮吸收的试验研究 [J]. 中成药, 2003, 25 (6): 443-445.
- [15] Björn O, Pär M, Christian T, et al. Structural and conformational determinants of macrocycle cell permeability [J]. Nat Chem Biol, 2016, 12: 1065-1074.
- [16] Weibel H, Hansen J. Penetration of the fragrance compounds, cinnamaldehyde and cinnamyl alcohol, through human skin in vitro [J]. Contact Dermatitis, 1989, 20 (3): 167-172.
- [17] 兰颀, 王琼, 安静, 等. 接受液中的乙醇浓度对药物体外透皮试验的影响 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38 (16): 2597-2600.

(收稿日期: 2023-12-01; 修回日期: 2024-01-09)

响应面法优化兰雪醌超声辅助提取工艺的研究

莫秋月¹, 时晨¹, 袁慧¹, 李春霜¹, 姚泽¹, 卢明¹, 罗紫月², 别松涛^{1, 3, 4*} (1. 天津中医药大学中药制药工程学院, 天津 301617; 2. 天津中医药大学中医学院, 天津 301617; 3. 天津中医药大学组分中药国家重点实验室, 天津 301617; 4. 现代中医药海河实验室, 天津 301617)

摘要: **目的** 优化白花丹中兰雪醌超声辅助提取的最佳工艺。**方法** 采用紫外分光光度法分析兰雪醌含量。采用单因素试验考察超声时间、提取温度和料液比对兰雪醌得率的影响, 并在单因素试验的基础上使用 Box-Behnken 响应面法优化得到最佳工艺。**结果** 该模型的调整决定系数 (R_{Adj}^2) 为 0.8394, 回归模型的概率值 ($P < 0.005$) 显示出较高的显著性。通过 Box-Behnke 响应面法得到超声提取兰雪醌的最佳工艺参数为超声时间 41 min, 提取温度 42 °C, 料液比 1 : 23 (g/mL), 预测兰雪醌得率为 1.823%。在最佳条件下进行了 5 次验证试验, 得到兰雪醌平均得率为 1.8941%, 与预测值基本吻合。**结论** 利用超声辅助提取方法提取白花丹中兰雪醌的工艺稳定可靠。

关键词: 白花丹; 兰雪醌; 超声辅助提取; 响应面优化

中图分类号: R284.3, R283 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)07-1762-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.013

Optimization of ultrasound-assisted extraction of plumbagin by response surface methodology

MO Qiu-yue¹, SHI Chen¹, YUAN Hui¹, LI Chun-shuang¹, YAO Ze¹, LU Ming¹, LUO Zi-yue², BIE Song-tao^{1, 3, 4*} (1. College of Pharmaceutical Engineering of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617; 2. College of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617; 3. State Key Laboratory of Component-Based Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617; 4. Haihe Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin 301617)

Abstract: Objective To optimize the ultrasound-assisted extraction of plumbagin from *Plumbago zeylanica* L.. **Methods** Ultraviolet spectrophotometry was used to analyze the content of plumbagin. The effects of ultrasound time, extraction temperature, and material-liquid ratio on the yield of plumbagin were analyzed with a single-factor test. The best extraction process was subsequently optimized with the Box-Behnken response surface methodology, based on single-factor tests. **Results** The adjusted coefficient of determination (R_{Adj}^2) of the model was 0.8394, and the probability value ($P < 0.005$) of the regression model indicated much significance. The optimal conditions for ultrasound-assisted extraction included ultrasound time of 41 min, the extraction temperature at 42 °C, and the material-liquid ratio at 1 : 23 (g/mL). Under the optimal conditions, five tests were conducted to verify the results. The average yield of plumbagin was 1.8941%, which was essentially consistent with the predicted value of 1.823%. **Conclusion** The extraction of plumbagin from *Plumbago zeylanica* L. using ultrasound-assisted extraction is stable and reliable.

Key words: *Plumbago zeylanica* L.; plumbagin; ultrasound-assisted extraction; response surface methodology

基金项目: 天津市科技计划项目 (No.22ZYJDS00100); 现代中医药海河实验室科技项目 (No.22HHZYSS00003)。

作者简介: 莫秋月, 女, 硕士研究生, 主要从事中药药效学研究, email: m90810qy@163.com *通信作者: 别松涛, 男, 硕士研究生导师, 主要从事中药药效学、分子药理学研究, email: song9209@tjutcm.edu.cn

白花丹 (*Plumbago zeylanica* L.) 又称猛老虎、一见消等, 主要分布在我国广西、海南、云南等西南一带, 是我国壮医、黎医、维医、傣医等民族医学常用药材^[1-4]。白花丹常用于治疗跌打损伤、风湿骨痛、肝脾肿大、白癜风、牛皮癣等^[1, 5-6], 现代药理研究表明白花丹具有抗氧化、抗炎、抗菌、抗肿瘤等生物活性^[7-10], 具有极大的药用和开发价值。白花丹所含化学成分主要有萘醌类、香豆素类、黄酮类、有机酸类、生物碱类等, 其中, 兰雪醌 (又称白花丹醌) 是白花丹的主要活性成分^[5, 7, 11]。

天然来源萘醌类化合物广泛分布于自然界中, 具有多种生物活性^[12-16], 因其功能和临床应用的特性, 该类化合物受到国内外学者的高度关注, 而高效、稳定的制备方法能够为其进一步的研究和开发提供有力的支撑。兰雪醌是一种天然 α -萘醌类小分子化合物 (见图 1), 易溶于乙醇等有机溶剂, 基于实际应用中毒性、成本等重要因素^[17], 本研究选择 95% 乙醇提取兰雪醌。在以往的研究中, 白花丹的常用提取方法有回流提取法、水蒸气蒸馏法、索氏回流提取法等^[18], 这些方法具有溶剂消耗大、操作烦琐、需要高温、提取时间长等特点, 而长时间高温提取可能会促使兰雪醌降解^[19]。超声辅助提取是利用超声波空化作用加速原料中活性成分溶出的方法, 具有有机溶剂消耗少, 无需超高温, 提取时间短, 目标组分提取率高等优点^[20-22], 具有广阔的应用前景。响应面法是一种传统与数学相结合的技术, 广泛应用于改善和优化试验条件, 可在确定最佳条件的前提下减少所需试验次数^[23]。因此, 本研究以兰雪醌的得率为指标, 通过单因素试验、响应面优化试验对白花丹的超声提取工艺进行探索优化, 以期掌握白花丹的最佳提取工艺。

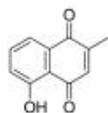


图 1 兰雪醌结构

Fig 1 Structure of plumbagin

1 材料

白花丹干燥根, 购自安徽亳州康美中药市场, 经天津中医药大学中药鉴定教研室宋新波教授鉴定为蓝雪属植物白花丹 (*Plumbago zeylanica* L.) 的干燥根; 兰雪醌对照品 (批号: L2102054, 纯度: 98%, 上海阿拉丁生物化学试剂有限公司); 乙醇 (批号: 20230222, 纯度: 95%, 朝阳

赫成化学试剂有限公司)。

CP1003 电子天平 (奥豪斯仪器常州有限公司); 4500Y 型高速粉碎机 (永康市嘉贝五金制品有限公司); KQ-500DE 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); GFL-230 电热鼓风干燥箱 (天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司); 高速台式离心机 (长沙高新技术产业开发区湘仪离心机仪器有限公司); Cary 8 紫外分光光度计 (美国安捷伦公司)。

2 方法与结果

2.1 兰雪醌线性关系考察

精密称取兰雪醌对照品 5 mg 于 10 mL 棕色量瓶中, 加入 95% 乙醇溶解并定容, 即得兰雪醌对照品溶液。取兰雪醌对照品溶液 0.04、0.08、0.12、0.16、0.2 mL 置于 10 mL 棕色量瓶中, 95% 乙醇定容, 于 265 nm 波长处测定吸光度。以兰雪醌质量浓度 (X) 为横坐标, 吸光度 (Y) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得线性回归方程: $Y = 62X + 0.0138$ ($R^2 = 0.9990$), 兰雪醌在 $2 \sim 10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与吸光度线性关系良好。

2.2 供试品溶液制备

取干燥白花丹根 500 g 放入高速粉碎机内进行粉碎, 重复 3 次粉碎操作, 过 3 号筛。粉末状样品避光放置阴凉通风干燥处, 备用。精密称量白花丹干燥粉末 1 g 置于 50 mL 棕色具塞试管中, 按照常规条件 (超声时间 40 min、提取温度 40°C 、料液比 1:30) 进行提取, 提取结束后 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液。残渣以相同条件再提取 1 次, 合并上清液即得白花丹根中兰雪醌提取液。准确吸取 0.5 mL 提取液置于 10 mL 棕色量瓶中, 95% 乙醇定容, 得供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 按“2.1”项下方法制备兰雪醌对照品溶液 3 份, 265 nm 处测试吸光度。结果平均吸光度为 0.25, $RSD = 0.16\%$, 表明本试验精密度良好。

2.3.2 重复性试验 按“2.2”项下方法制备供试品溶液 6 份, 265 nm 处测试吸光度。结果平均吸光度为 0.37, $RSD = 0.79\%$, 可知该方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 于 0、2、4、6、8、10、12 h 时测量 265 nm 处的吸光度。结果平均吸光度为 0.37, $RSD = 1.6\%$, 说明供试品溶液在 12 h 内比较稳定。

2.3.4 加样回收试验 精密称取 1 g 白花丹干燥药材粉末 6 份, 加入适量对照品, 按“2.2”项

下方法制备供试品溶液，在 265 nm 处测试吸光度，并计算回收率。结果平均回收率为 110.52%，RSD = 1.8%，表明本方法回收率良好。

2.4 白花丹中兰雪酩得率测定

按照“2.2”项下方法制备供试品溶液，测定吸光度，每个试验重复 3 次。相应试剂作为空白。按以下公式计算兰雪酩得率：

$$\text{兰雪酩得率}(\%) = (C \times V \times D) / m \times 100\%$$

式中：C 为提取液浓度；V 为提取液定容体积；D 为稀释倍数；m 为粉末质量。

2.5 单因素试验

采用单因素试验设计考察超声时间、提取温度、料液比对兰雪酩得率的影响。通过改变常规条件中的一个独立参数，其他参数不变，用紫外分光光度法定量兰雪酩，以选择显著影响兰雪酩得率的相关独立参数，结果见图 2。

当提取温度为 40℃，料液比为 1:20 时^[24]，兰雪酩得率在提取时间 20~30 min 内显著增加，40 min 时达到峰值，而超声时间过长可能导致兰雪酩结构遭到破坏，因此，超声时间选择 40 min。

当超声时间为 40 min，料液比为 1:20 时，提取温度在 20~60℃ 内兰雪酩的得率随温度升高呈现先增加后下降的趋势，温度升高可加快分子的扩散速率^[24]，40℃ 的兰雪酩得率最大，继续升高温度则兰雪酩分子可能会被高温破坏，从而降低兰雪酩得率，因此，选择提取温度为 40℃。

当超声时间为 40 min，提取温度为 40℃ 时，兰雪酩得率随溶剂体积的增加呈现先增加后下降的趋势，其中料液比为 1:20 时得率最高，而当料液比为 1:30、1:40、1:50 时，兰雪酩得率呈现略微下降趋势，因此，选择料液比为 1:20。

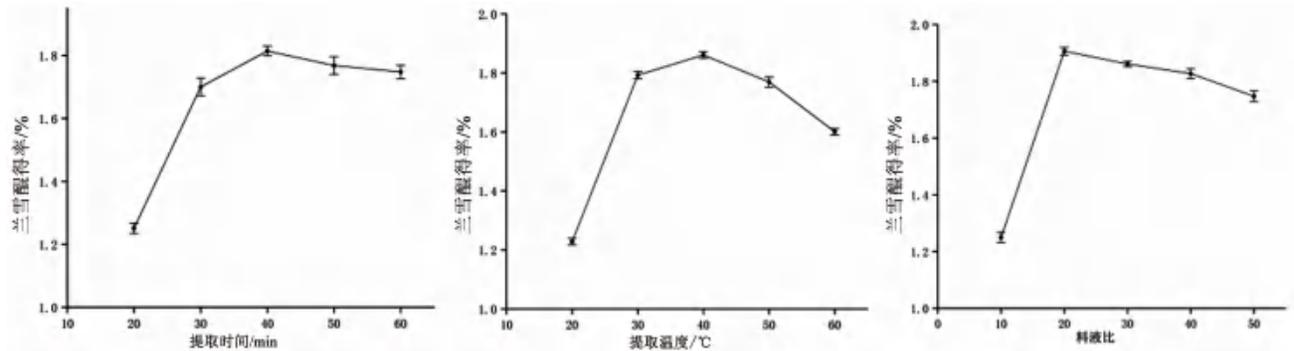


图 2 不同因素对兰雪酩得率的影响

Fig 2 Effect of different factors on the yield of plumbagin

2.6 响应面法优化兰雪酩提取工艺

综合各单因素试验结果，依据 Box-Behnken 组合试验设计原理，以时间 (A)、温度 (B)、料液比 (C) 为自变量，以兰雪酩得率 (Y) 为响应值，设计 3 因素 3 水平的响应面分析试验，因素及水平如表 1 所示。

表 1 响应面设计因素及水平

Tab 1 Factors and levels for response surface design

因素	水平		
	-1	0	1
A. 时间 /min	30	40	50
B. 温度 /°C	30	40	50
C. 料液比	1:10	1:20	1:30

试验中每组数据均由 3 次重复试验所得，各组试验获得的数据用平均值表示。采用 Origin 2022 软件进行显著性分析、统计分析并绘制图表，响应面分析结果利用 Design-Expert 13.0 提供的 Box-Behnken 模型进行分析，结果见表 2。

应用 Design Expert 软件对表 2 中的数据进行回归拟合，得到以兰雪酩得率 (Y) 为响应值的回归方程： $Y = -1.35310 + 0.066595A + 0.077145B + 0.016260C - 0.000088AB + 0.000342AC + 0.000398BC - 0.000863A^2 - 0.000983B^2 - 0.001023C^2$ 。经回归模型方差分析结果见表 3，模型 $F = 10.29$ ， $P < 0.005$ ； $R^2 = 0.9297$ ，失拟项 $P > 0.05$ 不显著（见表 3），说明回归模型拟合程度较高，对实际拟合误差小；模型的矫正决定系数 $R_{Adj}^2 = 0.8394$ ，表明该模型可以解释兰雪酩得率的变化有 83.94% 来自超声时间、提取温度和料液比。综上所述可知，该回归模型拟合度好，试验操作可信度高，可用于兰雪酩得率的分析和预测。

根据 F 检验和 P 值检查每个系数的显著性，结果见表 3。一次项 C 显著，A、B 均不显著；交叉项 AB、AC、BC 均不显著；二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 均极显著；由此可知，各因素对响应值兰雪酩得率的影响大小为 $C > B > A$ ，即料液比 > 提取温

表 2 响应面试验结果

Tab 2 Response surface test				
No.	A	B	C	兰雪酞得率/%
1	1	0	-1	1.551
2	0	0	0	1.891
3	-1	-1	0	1.585
4	0	0	0	1.794
5	-1	0	-1	1.587
6	0	1	1	1.724
7	1	-1	0	1.607
8	0	0	0	1.741
9	0	1	-1	1.555
10	-1	0	1	1.627
11	0	-1	-1	1.578
12	0	0	0	1.832
13	0	0	0	1.801
14	-1	1	0	1.665
15	1	1	0	1.652
16	0	-1	1	1.588
17	1	0	1	1.728

表 3 兰雪酞提取响应面方差分析

Tab 3 ANOVA of response surface test for plumbagin extraction rate					
差异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.1683	9	0.0187	10.29	< 0.01
A	0.0007	1	0.0007	0.3768	0.5587
B	0.0071	1	0.0071	3.90	0.0889
C	0.0196	1	0.0196	10.79	< 0.05
AB	0.0003	1	0.0003	0.1686	0.6937
AC	0.0047	1	0.0047	2.58	0.1521
BC	0.0063	1	0.0063	3.48	0.1044
A ²	0.0313	1	0.0313	17.25	< 0.01
B ²	0.0407	1	0.0407	22.38	< 0.01
C ²	0.0440	1	0.0440	24.24	< 0.01
残差	0.0127	7	0.0018		
失拟项	0.0006	3	0.0002	0.0649	0.9757
纯误差	0.0121	4	0.0030		
合计	0.1810	16			
R ²	0.9297				
R _{Adj} ²	0.8394				

度>超声时间。

基于各因素对兰雪酞得率影响绘制响应曲面图如图 3 所示，响应面图的坡度越陡表示两个因素之间交互作用越大^[25]。响应面曲线最陡的是超

声温度和料液比，说明对兰雪酞得率影响最显著的是超声温度和料液比的交互作用；超声时间和料液比交互作用的显著程度次之；超声时间和提取温度坡度最平缓，说明超声时间和提取温度交互作用的程度最小，与表 3 结果一致。

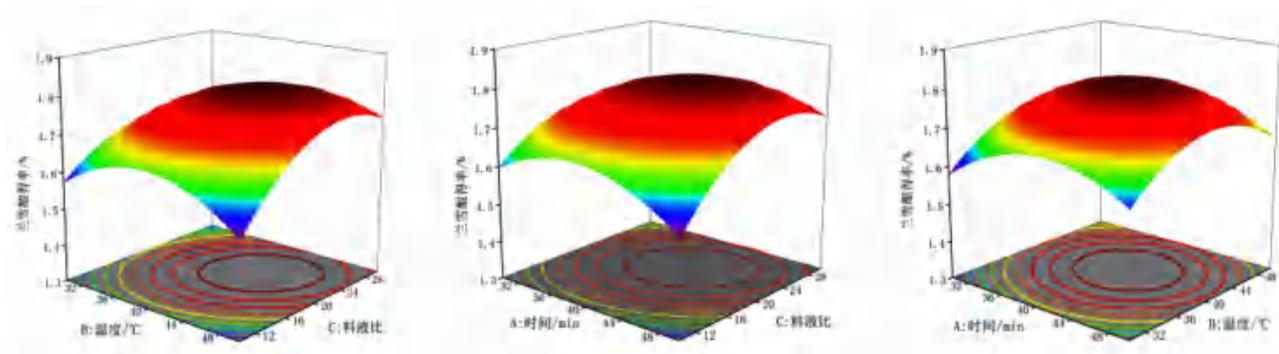


图 3 各因素对兰雪酞得率影响的响应曲面图

Fig 3 Response surface of the effect of various factors on the yield of plumbagin

通过响应面试验结果和回归方程，根据 Design Expert 13.0 软件分析，预测兰雪酞得率的最佳条件：超声时间为 41.026 min，提取温度为 42.071 °C，料液比为 1 : 22.993，在此条件下兰雪酞得率预测值为 1.823%。为验证模型的有效性，根据实际情况将条件调整为超声时间 41 min，温度 42 °C，料液比 1 : 23，在此条件下进行兰雪酞提取试验 5 次，兰雪酞得率分别为 1.86%、1.89%、1.90%、1.92%、1.89%，平均得率为 1.8941%，与预测值较接近（相对误差为 3.7%），说明该响应模型能够充分反映预期的优化效果，证实了响应面分

析方法在优化兰雪酞提取工艺的有效性和可行性。

3 讨论与结论

本研究采用响应面法对超声辅助提取白花丹根中兰雪酞的工艺条件进行了优化，获得一个最佳提取条件：超声时间 41 min、温度 42 °C、料液比 1 : 23，并在该优化条件下得到兰雪酞实际得率为 1.8941%，基本符合预期结果，表明该优化模型设计合理。该优化提取工艺在技术和经济上可行性高，且具有试验效率高、节约成本的优势，对白花丹根中兰雪酞的提取工艺具有实际指导意义。

参考文献

- [1] 吕超, 毛德文, 石清兰, 等. 广西地区少数民族常用护肝药物研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35 (7): 3545-3549.
- [2] 谭小玉. 海南黎药白花丹药材质量标准研究 [J]. 中国民族民间医药, 2016, 25 (24): 21-24.
- [3] 帕合尔丁努尔拉江, 依甘拜尔迪麦提艾力. 维吾尔医常用药材白花丹的形状及显微鉴别研究进展 [J]. 中国民族医药杂志, 2018, 24 (7): 57-58.
- [4] 张薇. 基于数据挖掘傣医治疗风湿病文献及康朗香辨治风湿病的经验研究 [D]. 昆明: 云南中医药大学, 2020.
- [5] 李文娟. 中药白花丹化学成分及药理作用研究进展 [J]. 大众科技, 2020, 22 (6): 47-50.
- [6] 林世源, 黄慧琳, 陈卉, 等. 白花丹巴布剂的基质处方优选及其体外透皮吸收研究 [J]. 中国现代应用药学, 2020, 37 (16): 1963-1967.
- [7] 王培红, 周健. 白花丹中酚类成分及其抗氧化活性研究 [J]. 中草药, 2019, 50 (22): 5419-5423.
- [8] 梅敦成, 黄恒, 杨庆红. 白花丹素对类风湿关节炎大鼠 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2022, 24 (6): 2302-2308.
- [9] 王文静. 白花丹素对白色念珠菌和新生隐球菌的抗真菌活性及其作用机制研究 [D]. 西安: 陕西科技大学, 2022.
- [10] 周雄明. 白花丹素通过调控糖酵解过程抑制舌鳞癌细胞侵袭和迁移的作用机制研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2021.
- [11] 唐晓光, 王超, 马骏驰, 等. 白花丹地上部分的化学成分研究 [J]. 中药材, 2016, 39 (7): 1541-1544.
- [12] 李常康, 苏现明, 李锋华, 等. 天然来源萘醌类化合物及其药理活性的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43 (18): 3644-3651.
- [13] 张宇驰, 葛鹏玲, 陈家红, 等. 青龙衣萘醌类化学成分及其抗癌活性研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50 (9): 2251-2256.
- [14] 牧丹, 陈永福, 布仁, 等. 紫草炭制前后萘醌类化合物含量变化及止血作用研究 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2020, 22 (7): 2540-2547.
- [15] 薛泽森. 抗肿瘤活性萘醌类二萜 Pleurotin 的合成研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2023.
- [16] 梁俸铭, 邵利辉, 付毅红, 等. 合成源 1, 4-萘醌类化合物抑菌活性研究进展 [J]. 化学通报, 2022, 85 (5): 575-582.
- [17] 杜泽乡, 谭宁昌, 罗朝晖. 不同溶剂索氏提取的白花丹叶中白花丹醌的含量测定 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40 (5): 2628-2629, 2639.
- [18] 杜泽乡. HPLC 测定不同方法提取白花丹叶中白花丹醌的含量 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40 (7): 4063-4064.
- [19] Paiva SR de, Lima LA, Figueiredo MR, et al. Plumbagin quantification in roots of *Plumbago scandens* L. obtained by different extraction techniques [J]. An Acad Bras Ciênc, 2004, 76: 499-504.
- [20] 李杨, 张伟, 赫雪峰, 等. 响应面法优化超声提取甘青铁线莲总黄酮工艺 [J]. 中南药学, 2018, 16 (6): 745-748.
- [21] Li JC, Chen ZX, Shi HM, et al. Ultrasound-assisted extraction and properties of polysaccharide from *Ginkgo biloba* leaves [J]. Ultrason Sonochem, 2023, 93: 106295.
- [22] Shen LP, Pang SX, Zhong MM, et al. A comprehensive review of ultrasound assisted extraction (UAE) for bioactive components: principles, advantages, equipment, and combined technologies [J]. Ultrason Sonochem, 2023, 101: 106646.
- [23] Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry [J]. Talanta, 2008, 76 (5): 965-977.
- [24] 叶丽, 艾朝晖, 邢青荟, 等. 翅茎白粉藤总黄酮的超声提取工艺优化及其抗氧化活性研究 [J]. 中南药学, 2020, 18 (12): 2001-2004.
- [25] 李洁, 石晓峰, 叶倩女, 等. Plackett-Burman 设计结合 Box-Behnken 响应面法优化紫斑牡丹籽壳中低聚芪类和单萜苷类化合物的超声提取工艺 [J]. 中国现代应用药学, 2023, 40 (1): 68-74.

(收稿日期: 2023-10-10; 修回日期: 2023-12-02)

虾青素对大鼠心肌梗死后心肌纤维化的影响

余太辉¹, 鲁锦国¹, 唐艳红², 方婷婷^{1*} (1. 湖北省中西医结合医院心血管内科, 武汉 430015; 2. 武汉大学人民医院心血管内科, 武汉 430060)

摘要: **目的** 探讨虾青素对大鼠心肌梗死后心肌纤维化的影响及可能机制。**方法** 心肌梗死组和天然虾青素组大鼠结扎冠脉血管前降支制成心肌梗死模型; 而假手术组仅开胸处理不结扎冠脉血管。虾青素组在术前一日开始按 100 mg/(kg·d) 剂量灌胃虾青素。而心肌梗死组和假手术组灌胃等量的蒸馏水。在 28 d 后用 Masson 染色检测心肌纤维化并计算胶原容积分数, 采用 Western blot 检测心肌梗死周边的 I 型胶原蛋白、MMP-9 及 p38 通路蛋白的表达情况。**结果** 与心肌梗死对照组相比, 虾青素组的胶原容积分数明显减少, I 型胶原蛋白、MMP-9 蛋白、磷酸化 p38 的表达明显减少。**结论** 虾青素可能通过抑制 p38 的磷酸化从而抑制心肌梗死周边的心肌纤维化。

关键词: 虾青素; 心肌梗死; 心肌纤维化; p38

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)07-1767-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.014

Effect of astaxanthin on myocardial fibrosis in the rat model of myocardial infarction

YU Tai-hui¹, LU Jin-guo¹, TANG Yan-hong², FANG Ting-ting^{1*} (1. Department of Cardiology, Hubei Hospital of Integrated Chinese Medicine and Western Medicine, Wuhan 430015; 2. Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060)

Abstract: Objective To determine the effect of astaxanthin on myocardial fibrosis after the myocardial infarction (MI) and its possible mechanism. **Methods** The MI model was established in the astaxanthin (ASX) group and the MI group rats by ligation of the coronary artery. In the sham-operation (Sham) group pericardiotomy was performed, but not ligation. The rats were dosed with astaxanthin [the ASX group, 100 mg/(kg·d)] or distilled water (the Sham group and the MI group) by lavaging daily 1 day before the operation. Myocardial fibrosis was observed by Masson staining 28 days post-operatively. Type I collagen matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and p38MAPK protein expression were detected at the infarcted border zone by Western blot. **Results** Compared with the MI group, astaxanthin reduced the collagen volume fraction, decreased the expression of MMP-9, type I collagen and phosphorylated p38 (P-p38). **Conclusion** Astaxanthin may affect myocardial fibrosis post MI in rats, likely through the inhibition of phosphorylated p38.

Key words: astaxanthin; myocardial infarction; myocardial fibrosis; p38

心肌梗死后导致心肌缺血, 同时炎症反应、细胞因子、肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RASS系统)等多种因素促使心脏重构。心脏的重构最终会引起心脏形态结构等变化, 促使心肌梗死后心力衰竭的发生发展。组织重构和神经重构是心室重塑的主要部分, 然而组织重构即心肌的病理改变是心室重塑的基础。心肌梗死后组

织重构的表现为心肌纤维化, 主要表现为胶原含量的升高及异常沉积或胶原比例的失调等^[1]。胶原蛋白的改变会引起心室重塑, 进而加速心肌梗死后心功能不全, 且严重影响了心肌梗死的远期预后。研究报道心肌梗死行心室肌切片发现有胶原蛋白的沉积改变, 心肌的纤维化增加, 并且还发现有心功能不全, 包含心脏舒张末压的升高及

作者简介: 余太辉, 男, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事冠心病、心律失常相关基础与临床研究, email: 80259658@qq.com *通信

作者: 方婷婷, 女, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事心律失常基础与临床研究, email: 44062446@qq.com

射血分数的下降等^[2]。血管紧张素转化酶抑制剂 (ACEI) 以及血管紧张素 II 受体拮抗剂 (ARB) 药物在心肌梗死后心力衰竭的治疗中有重要意义, 可通过抑制 RASS 系统, 减轻心肌纤维化, 从而改善心功能^[3]。故在心肌梗死治疗中抑制心肌纤维化改善心室重塑具有非常重大的现实作用。

虾青素主要存在于海洋中的藻类及浮游生物体内, 是天然存在的一种类胡萝卜素。有研究显示虾青素可以抗肿瘤^[4], 增加干细胞潜能^[5], 抗氧化、抑制肾细胞凋亡^[6]等, 且抗氧化作用比其他的类胡萝卜素强^[7]。通过影响氧化应激反应等, 虾青素减少了炎症因子, 在伤口愈合的早期可以减轻声带瘢痕^[8]。虾青素可通过影响 NF- κ B 信号通路抑制相关的炎症因子, 减轻眼部的炎症反应^[9]。此外, 虾青素通过积极地调度脂肪细胞以及相关的巨噬细胞等, 减轻脂质以及蛋白质的氧化作用, 从而对心血管病有较好的治疗作用^[10]。虾青素可能通过抗氧化和抑制补体系统激活, 在动物的心肌缺血再灌注模型里可减少心肌梗死面积^[11]。虾青素通过影响肾上腺交感神经系统, 进而发挥神经保护以及拮抗血压升高作用^[12]。本课题组前期研究也发现虾青素在心肌梗死治疗中有抗神经重构的作用^[13], 然而虾青素对心肌梗死后心肌纤维化的研究仍相对比较少。丝裂原活化蛋白激酶 (MAPKs) p38 是心肌梗死后心室重塑相关的一个共同信号通路。本研究通过大鼠心肌梗死模型观察虾青素对心肌梗死后心肌纤维化及 p38 通路的影响, 并提示可能的相关机制。

1 材料

天然虾青素 (w/w, 2.0%; 荆州市天然虾青素有限公司); 一抗: collagen I (货号: ab129991, 美国 Abcam 公司); MMP-9 (货号: SC-8012)、 β -actin (货号: SC-1622R) (美国 Santa 公司); p38 (货号: 2263-1, 美国 EPI 公司); P-p38 (货号: 9210, 美国 CST 公司)。山羊抗兔二抗 (货号: 111-035-003)、山羊抗鼠二抗 (货号: 115-005-003)、HRP 抗体 (美国 Jackson 公司)。

SPF 级成年雄性 SD 大鼠 60 只, 体重 250 ~ 280 g, 动物合格证号: 42000600002096。

2 方法

2.1 心肌梗死模型制作及给药方案

60 只大鼠随机均分为 3 组: 假手术组 (Sham), 心肌梗死组 (MI), 虾青素组 (ASX)。术前 1 日 ASX 组给予 100 mg/(kg·d) 的虾青素灌胃处理^[8], 其余两组大鼠同时灌胃给予等量的蒸馏水。大鼠常

规腹腔注射 3% 的戊巴比妥钠 (30 mg·kg⁻¹) 麻醉后, 连接心电图, MI 组和 ASX 组结扎冠状动脉前降支制作心肌梗死模型。Sham 组只开胸剪开心包膜但不结扎冠脉血管。每日灌胃 (虾青素或等量蒸馏水) 处理 28 d 后, 处死大鼠取出心脏组织, 将一半心脏组织浸泡于 4% 多聚甲醛溶液里行石蜡包埋后检测, 另一半心脏组织取心肌梗死周边部位立即速冻于一 80 °C 冰箱, 进一步行 Western blot 检测。

2.2 病理切片

常规制作石蜡切片后, 经过脱蜡、冲洗、脱水、封片等处理, 最终制作 Masson 染色切片, 60 °C 烘干, 在光镜下观察心肌梗死心肌的胶原纤维。然后使用 Imager 软件对胶原纤维进行定量分析计算胶原容积分数 (collagen volume fraction, CVF)。

2.3 采用蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 I 型胶原蛋白 (collagen I)、MMP-9、p38 蛋白的表达

采用常规 Western blot 检测, 依次加入一抗、二抗后, 经过底物显色等处理, 胶片扫描后用软件对条带进行半定量分析, 以 β -actin (分子量 42 kDa) 作为内参。

2.4 统计学处理

本实验使用统计软件 (SPSS 19.0) 分析比较所有数据。采用单向方差分析进行组间差异比较, 计量资料是以均数 \pm 标准差表示, 均以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 虾青素减少了心肌梗死周边区的胶原纤维

Masson 染色切片中蓝色部分为胶原纤维成分, 蓝褐色的是细胞核物质, 而染成红色的为肌纤维和红细胞成分。切片显示在 MI 组胶原纤维的增生, 以及排列紊乱情况非常明显, 而 ASX 组纤维增生的情况较 MI 组有所减轻, Sham 组纤维增生情况则表现不明显 (见图 1A)。与假手术组相比, MI 组 CVF 显著增加 ($P < 0.05$), 而 ASX 组较 MI 组 CVF 明显减小 ($P < 0.05$) (见图 1B)。

3.2 虾青素降低心肌梗死周边区域 collagen I 表达

Western blot 结果显示 collagen I 的表达情况。结果显示 MI 组 collagen I 比 Sham 组显著增加 ($P < 0.05$), 而虾青素治疗后 collagen I 显著减少 ($P < 0.05$) (见图 2)。

3.3 虾青素减少心肌梗死周边区 MMP-9 蛋白的表达

采用 Western blot 方法检测心肌梗死周边区 MMP-9 蛋白的相关表达, 结果显示 MI 组的 MMP-9 比 Sham 组明显增高 ($P < 0.05$), 而 ASX 组的 MMP-9 较 MI 组明显降低 ($P < 0.05$) (见图 3)。

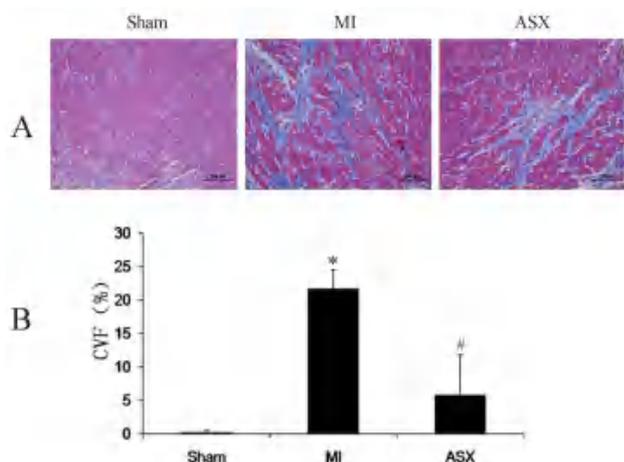


图 1 虾青素对心肌纤维化及胶原容积分数的影响
Fig 1 Effect of astaxanthin on myocardial fibrosis and collagen volume fraction

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

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

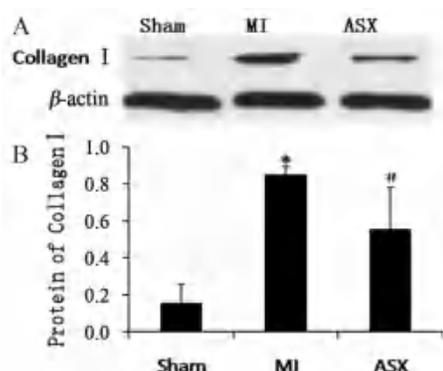


图 2 虾青素对心肌梗死周边区 I 型胶原蛋白的影响
Fig 2 Effect of astaxanthin on collagen I at the infarcted border zone

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

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

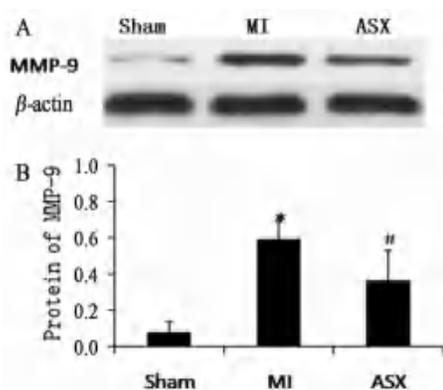


图 3 虾青素对心肌梗死周边区 MMP-9 的影响
Fig 3 Effect of astaxanthin on MMP-9 at the infarcted border zone

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

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

3.4 虾青素抑制心肌梗死周边区 p38 通路蛋白的表达

为了研究虾青素对心肌梗死后心肌纤维化的相关机制，采用 Western blot 法检测 p38 MAPKs 通路相关蛋白的表达情况。本研究显示 MI 组磷酸化的 p38 显著增多 ($P < 0.05$)，而 p38 总蛋白水平没有变化。然而虾青素使用后明显抑制了 p38 的磷酸化 ($P < 0.05$)，但对总蛋白并没有影响 (见图 4)。

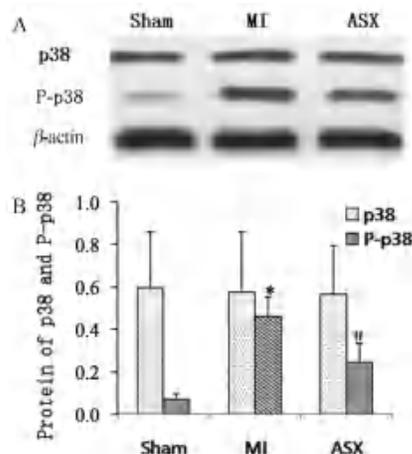


图 4 虾青素对心肌梗死周边区 p38 通路的影响
Fig 4 Effect of astaxanthin on p38 MAPKs at the infarcted border zone

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

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

4 讨论

在心肌梗死治疗中抑制心脏重构的药物由于其不良反应 (如 ACEI 药物有咳嗽、致畸、高钾血症等)，所以寻找天然的、独特作用机制的药物对心肌梗死的治疗有重大意义。目前很多实验报道虾青素在心血管疾病中有着积极的作用^[14-15]。鉴于抑制心肌纤维化改善组织重构在心肌梗死治疗中的重要作用，本实验是首次研究虾青素对心肌梗死后心肌纤维化的影响。本研究证实心肌梗死后出现了心肌纤维化，而虾青素则抑制了心肌梗死后心肌纤维化的改变，表现为胶原容积分数的减小，梗死周边 collagen I 及 MMP-9 的表达减少。进一步研究考虑虾青素抑制心肌纤维化极有可能是通过抑制心肌梗死后 p38 蛋白的磷酸化。这些发现支持虾青素有改善心肌梗死后的心室重塑等积极作用。

心肌梗死后出现的心室重塑情况是触发心肌梗死后心力衰竭的极其重要因素。心室的顺应性下降是由于心肌细胞的胶原蛋白的异常改变引起，且是加重心力衰竭的一个重要作用^[16]。Collagen I 及 collagen III 是占胶原总量的 75%，是心脏间质网络结构中的最主要成分。而 collagen I 因为伸展性和

回缩性等因素所以促使心肌的僵硬程度改变^[17]。心肌梗死后 collagen I 和 collagen III 比例改变,且增加的胶原蛋白会让心肌的僵硬程度增大,促使心脏扩大且顺应性下降等,最后会导致心功能不全等^[2, 18]。心肌细胞胶原比例改变和细胞外的胶原蛋白增多等会引起心肌的纤维化。已有报道表明,在心肌梗死后 collagen I 影响了心肌的纤维化,增大心室僵硬程度,进而增加心脏破裂风险^[19]。在本研究中观察到大鼠心肌梗死后纤维化的变化,胶原纤维明显增加,且心肌梗死后 collagen I 的表达也明显增加,证实了心肌梗死后心肌的纤维化明显增加。而虾青素治疗后心肌梗死大鼠胶原纤维明显减少, collagen I 的水平也明显下降,表明虾青素改善了心肌梗死后心肌纤维化情况。考虑虾青素可能通过影响胶原占比,抑制了心肌梗死后的心肌纤维化。

基质金属蛋白酶(MMPs)在心脏中的作用主要是促进细胞外间质蛋白的降解^[20]。有报道显示 MMPs 参与了心肌梗死后心室的重塑过程^[21],且使用 MMP 抑制剂可减轻心肌梗死后心室重塑^[22]。MMP-9 是 MMPs 其中的一个酶,研究显示 MMPs 参与了细胞外基质重建, MMP-9 是重建的重要因素^[1]。有研究显示,心肌梗死后 MMP-9 蛋白的表达显著增多,从而降解正常胶原蛋白,促进心室重塑,导致心脏扩大、心力衰竭^[21, 23]。MMP-9 表达的降低可防止心肌梗死后的心脏破裂等^[24]。此外有研究表明 MMP-9 基因缺陷小鼠心肌梗死后左心室轻度扩张,而胶原蛋白的沉积反而减少,心功能有好转^[23]。有报道短期给予 MMPs 抑制剂在小鼠心肌梗死后的早期阶段是有利的,最终提高了生存率,且逆转了心室重塑^[25]。因此有理由认为 MMP-9 对于心肌梗死后心室重塑有着极其重要的作用,是逆转重构的潜在治疗位点。在本研究中显示 MI 组 MMP-9 表达水平明显增多,而在给予虾青素后 MMP-9 表达明显下降,进而表明了虾青素可能抑制 MMP-9 激活逆转了心肌梗死后发生的心室重塑等。

MAPKs 作为信号蛋白在调节体内的应激反应有着重要作用。目前研究证实,心肌梗死后相关的炎症反应、心肌肥大以及心肌纤维化等都有 p38 MAPKs 相关蛋白通路的加入,该通路是在心室重塑中有着重大作用^[26-27]。而 p38 信号通路是心肌梗死后心室重塑中的共同通路。研究显示在心肌梗死、增高压力负荷以及相应的缺血再灌注损伤以后,心肌内 p38 的活性升高^[28-29]。实验表明给予 p38 MAPK 抑制剂后心肌梗死大鼠的心肌间质

纤维化有所减轻,而且左心功能得到了改善^[30]。在小鼠心肌梗死模型中 p38 基因敲除小鼠相较其他小鼠的心肌梗死面积减少,心功能指标也明显好转^[31]。还有研究表明抑制心肌梗死大鼠 p38 活性后,心肌梗死面积较小,心肌纤维化有所减轻,最终延缓了心力衰竭的进展^[32]。本研究显示梗死后 p38 蛋白质的磷酸化水平增加,而虾青素抑制了 p38 相应的磷酸化。而研究发现 p38 通路可激活 MMP-9^[33]。因此,考虑虾青素可能通过抑制 p38 的磷酸化,减少 MMP-9 的表达,抑制心肌梗死后心肌纤维化,改善了心肌梗死后心室重塑。

综上所述,本研究显示虾青素可抑制了梗死后心肌纤维化,改善心室重塑。而使用抑制心室重塑的药物(如卡托普利等)可改善心肌梗死远期预后。虾青素可减少体内脂质的氧化作用等,且显示对缺血再灌注损伤引起的心肌梗死面积有积极的作用。前期发现虾青素减轻心肌梗死后交感神经重构。因此虾青素有希望成为心肌梗死等心血管疾病的潜在治疗药物,本研究发现虾青素可抑制心肌梗死后的心肌纤维化,考虑是通过抑制 p38 通路从而改善心室重塑。

参考文献

- [1] Martos R, Baugh J, Ledwidge M, et al. Diastolic heart failure: evidence of increased myocardial collagen turnover linked to diastolic dysfunction [J]. *Circulation*, 2007, 115 (7): 888-895.
- [2] Jugdutt BI, Joljart MJ, Khan MI. Rate of collagen deposition during healing and ventricular remodeling after myocardial infarction in rat and dog models [J]. *Circulation*, 1996, 94 (1): 94-101.
- [3] 苏莉. 急性心肌梗死后不同剂量血管紧张素 II 型受体拮抗剂早期干预对心功能和神经激素的影响 [J]. *临床荟萃*, 2008 (7): 482-484.
- [4] Nagendraprabhu P, Sudhandiran G. Astaxanthin inhibits tumor invasion by decreasing extracellular matrix production and induces apoptosis in experimental rat colon carcinogenesis by modulating the expressions of ERK-2, NFkB and COX-2 [J]. *Invest New Drugs*, 2011, 29 (2): 207-224.
- [5] Kim JH, Nam SW, Kim BW, et al. Astaxanthin improves stem cell potency via an increase in the proliferation of neural progenitor cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2010, 11 (12): 5109-5119.
- [6] 谢潮鑫, 孟猛, 殷先锋, 等. 天然虾青素对抗肾纤维化及细胞凋亡的作用 [J]. *南方医科大学学报*, 2013, 33 (2): 305-308.
- [7] Spiller GA, Dewell A. Safety of an astaxanthin-rich haematococcus pluvialis algal extract: a randomized clinical trial [J]. *J Med Food*, 2003, 6 (1): 51-56.

- [8] Mizuta M, Hirano S, Hiwatashi N, et al. Effect of astaxanthin on vocal fold wound healing [J]. *Laryngoscope*, 2014, 124 (1): E1-7.
- [9] Suzuki Y, Ohgami K, Shiratori K, et al. Suppressive effects of astaxanthin against rat endotoxin-induced uveitis by inhibiting the NF-kappaB signaling pathway [J]. *Exp Eye Res*, 2006, 82 (2): 275-281.
- [10] Inoue M, Tanabe H, Matsumoto A, et al. Astaxanthin functions differently as a selective peroxisome proliferator-activated receptor γ modulator in adipocytes and macrophages [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 84 (5): 692-700.
- [11] Lauver DA, Lockwood SF, Lucchesi BR. Disodium disuccinate astaxanthin (cardax) attenuates complement activation and reduces myocardial injury following ischemia/reperfusion [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 314 (2): 686-692.
- [12] Hussein G, Goto H, Oda S, et al. Antihypertensive potential and mechanism of action of astaxanthin: III. Antioxidant and histopathological effects in spontaneously hypertensive rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29 (4): 684-688.
- [13] 余太辉, 李乐, 雷玉华, 等. 虾青素抑制 NF- κ B 的激活减轻大鼠心肌梗死后的交感神经重构的研究 [J]. *中南药学*, 2014, 12 (9): 855-859.
- [14] Fassett RG, Coombes JS. Astaxanthin in cardiovascular health and disease [J]. *Molecules*, 2012, 17 (2): 2030-2048.
- [15] 李佳玲, 李亚, 马于林, 等. 虾青素防治冠心病作用机制的研究进展 [J]. *中国心血管病研究*, 2020, 18 (11): 1030-1034.
- [16] Jessup M, Abraham WT, Casey DE, et al. 2009 focused update: ACCF/AHA guidelines for the diagnosis and management of heart failure in adults: a report of the american college of cardiology foundation/american heart association task force on practice guidelines: developed in collaboration with the international society for heart and lung transplantation [J]. *Circulation*, 2009, 119 (14): 1977-2016.
- [17] Schumacher D, Curaj A, Staudt M, et al. Endogenous modulation of extracellular matrix collagen during scar formation after myocardial infarction [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (23): 14571.
- [18] Boyle AJ, Kelly DJ, Zhang Y, et al. Inhibition of protein kinase c reduces left ventricular fibrosis and dysfunction following myocardial infarction [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2005, 39 (2): 213-221.
- [19] Hofmann U, Bonz A, Frantz S, et al. A collagen $\alpha 2$ (i) mutation impairs healing after experimental myocardial infarction [J]. *Am J Pathol*, 2012, 180 (1): 113-122.
- [20] Souders CA, Bowers SL, Baudino TA. Cardiac fibroblast: the renaissance cell [J]. *Circ Res*, 2009, 105 (12): 1164-1176.
- [21] Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart [J]. *Circ Res*, 2002, 90 (5): 520-530.
- [22] Yarbrough WM, Mukherjee R, Escobar GP, et al. Selective targeting and timing of matrix metalloproteinase inhibition in post-myocardial infarction remodeling [J]. *Circulation*, 2003, 108 (14): 1753-1759.
- [23] Ducharme A, Frantz S, Aikawa M, et al. Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction [J]. *J Clin Invest*, 2000, 106 (1): 55-62.
- [24] Heymans S, Lutun A, Nuyens D, et al. Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure [J]. *Nat Med*, 1999, 5 (10): 1135-1142.
- [25] Spinale FG, Escobar GP, Hendrick JW, et al. Chronic matrix metalloproteinase inhibition following myocardial infarction in mice: differential effects on short and long-term survival [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 318 (3): 966-973.
- [26] Zhao YG, Tan Y, Xi SG, et al. A novel mechanism by which sdf-1 β protects cardiac cells from palmitate-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis via CXCR7 and AMPK/p38 MAPK-mediated interleukin-6 generation [J]. *Diabetes*, 2013, 62 (7): 2545-2558.
- [27] Meyer-ter-Vehn T, Han H, Grehn F, et al. Extracellular matrix elasticity modulates TGF- β -induced p38 activation and myofibroblast transdifferentiation in human tenon fibroblasts [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52 (12): 9149-9155.
- [28] Takeshima H, Kobayashi N, Koguchi W, et al. Cardioprotective effect of a combination of rho-kinase inhibitor and p38 MAPK inhibitor on cardiovascular remodeling and oxidative stress in dahl rats [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2012, 19 (4): 326-336.
- [29] Luosujärvi H, Aro J, Tokola H, et al. A novel p38 MAPK target dyxin is rapidly induced by mechanical load in the heart [J]. *Blood Press*, 2010, 19 (1): 54-63.
- [30] Lei J, Xue SN, Wu W, et al. Sdc1 overexpression inhibits the p38 mapk pathway and lessens fibrotic ventricular remodeling in MI rats [J]. *Inflammation*, 2013, 36 (3): 603-615.
- [31] Ren J, Zhang SS, Kovacs A, et al. Role of p38alpha MAPK in cardiac apoptosis and remodeling after myocardial infarction [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2005, 38 (4): 617-623.
- [32] Pan ZW, Zhao WM, Zhang XY, et al. Scutellarin alleviates interstitial fibrosis and cardiac dysfunction of infarct rats by inhibiting TGF β 1 expression and activation of p38-MAPK and ERK1/2 [J]. *Br J Pharmacol*, 2011, 162 (3): 688-700.
- [33] Khadjavi A, Valente E, Giribaldi G, et al. Involvement of p38 MAPK in haemozoin-dependent MMP-9 enhancement in human monocytes [J]. *Cell Biochem Funct*, 2014, 32 (1): 5-15.

(收稿日期: 2023-10-25; 修回日期: 2024-01-14)

金嗓散结胶囊对反流性咽喉炎模型大鼠咽喉 黏膜屏障保护作用实验研究

赵林涛¹, 韩曼¹, 苗彦², 张红^{1*} (1.陕西省中医药研究院, 西安 710003; 2.西安碑林药业股份有限公司, 西安 710048)

摘要: **目的** 通过复制反流性咽喉炎大鼠模型, 观察金嗓散结胶囊对反流性咽喉炎的作用。**方法** 对大鼠进行切除下食道括约肌手术进行造模, 12 周后, 将造模组大鼠分为 5 组, 即模型组, 金嗓散结胶囊高剂量组、中剂量组、低剂量组, 阳性组, 各组大鼠给予相应剂量药物经口灌胃治疗 4 周, 进行反流体征评分, ELISA 法检测大鼠血清白细胞介素 (IL)-6、肿瘤坏死因子 (TNF)- α 、IL-1 β 、IL-10、IL-13 含量; HE 染色检测大鼠声带和食道组织病理变化; 免疫荧光、RT-PCR 技术以及 Western blot 法检测声带和食道组织紧密连接蛋白 Claudin-3、Occludin、ZO-1 的基因和蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 金嗓散结胶囊可以减轻模型大鼠的声音沙哑, 喉部等症状, 降低反流体征评分, 减轻声带和食道的病理, 显著降低模型大鼠血清中 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 的含量, 上调 IL-10、IL-13 的含量, 并显著增加模型大鼠 Claudin-3、Occludin、ZO-1 蛋白及其基因表达。**结论** 金嗓散结胶囊治疗大鼠反流性咽喉炎可能通过抑制大鼠血清中炎症因子, 上调血清抑炎因子, 增强声带和食道中紧密连接蛋白表达, 从而减轻反流性咽喉炎症状, 修复咽喉黏膜的屏障系统, 值得进一步研究。

关键词: 反流性咽喉炎; 金嗓散结胶囊; 白细胞介素; 肿瘤坏死因子- α

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)07-1772-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.015

Protective effect and related mechanism of Jinsang Sanjie capsules on throat mucosal barrier in reflux pharyngolaryngitis model rats

ZHAO Lin-tao¹, HAN Man¹, MIAO Yan², ZHANG Hong^{1*} (1. Shaanxi Academy of Traditional Chinese Medicine Laboratory, Shaanxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710003; 2. Xi'an Beilin Pharmaceutical Co., Ltd., Xi'an 710048)

Abstract: Objective To determine the effect and mechanism of Jinsang Sanjie capsules on reflux pharyngolaryngitis rat model by replicating the rat model of reflux pharyngolaryngitis. **Methods** Rats models was established by removing the underwent lower esophageal sphincter. After 12 weeks, the model rats were divided into five groups, namely a model group, a high-dose, a medium-dose, a low-dose Jinsang Sanjie capsule group, and a positive group. The rats were given corresponding doses of drugs orally for 4 weeks, and the reflux signs were scored. ELISA was used to detect the serum content of interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-1 β , IL-10, and IL-13 contents. HE staining was used to detect the histopathological changes in the vocal cords and esophageal tissue. Immunofluorescence, RT-PCR and Western blot were used to detect the gene and protein expression of tight junction proteins Claudin-3, Occludin and ZO-1 in the vocal cords and esophageal tissue. **Results** Compared with the model group, Jinsang Sanjie capsules alleviated symptoms such as hoarseness and throat discomfort in model rats, lowered reflux sign scores, alleviated the pathological symptoms of the vocal cords and esophagus, and reduced the content of IL-6, TNF- α and IL-1 β ,

基金项目: 陕西省“秦药”研发重点实验室 (No.2021-QYPT-001)。

作者简介: 赵林涛, 男, 助理研究员, 主要从事中药药效及物质基础研究, email: zzzlt@hotmail.com *通信作者: 张红, 女, 研究员, 主要从事中药药效及物质基础研究, email: zhanghong919919@163.com

increased the content of IL-10 and IL-13, which significantly increased Claudin-3, Occludin, and ZO-1 protein and gene expression of the model rats. **Conclusion** The mechanism of action of Jinsang Sanjie capsules for reflux pharyngolaryngitis in rats may be through inhibiting inflammatory factors in the rat serum, upregulating serum anti-inflammatory factors, and enhancing the expression of tight junctions in the vocal cords and esophagus to alleviate the symptoms of reflux pharyngolaryngitis. Repairing the barrier system of the throat mucosa needs further study.

Key words: reflux pharyngolaryngitis; Jinsang Sanjie capsule; interleukin; tumor necrosis factor- α

反流性咽喉炎 (reflux pharyngolaryngitis, LPR) 是一种常见咽喉疾病, 是胃内容物经食道逆流至咽喉部, 而咽喉部黏膜缺少针对胃酸 - 胃蛋白酶的保护机制, 导致与胃酸接触的黏膜产生病理改变^[1], 引起慢性咽喉炎、声带小结、声带息肉、喉接触性肉芽^[2], 临床表现主要为反流、烧心、干咳、咽喉疼痛、声音嘶哑、吞咽不畅等症状, 其发病率逐年升高, 严重影响患者日常生活和工作。各项循证医学实验以及 Meta 分析已证实反流性咽喉炎可能作为一种协同因素与声带白斑、癌前病变存在关联^[3-4]。临床治疗反流性咽喉炎以抑制其反流, 减轻酸性内容物刺激为原则, 多采用雷贝拉唑等质子泵抑制剂, 缓解反流及咽喉症状, 并配合促胃动力药促进胃排空, 但部分患者治疗效果不甚理想^[5-7]。金嗓散结胶囊为西安碑林药业研发上市的中成药, 功能主治为清热解毒、活血化瘀、利湿化痰, 用于热毒蓄结、气滞血瘀而形成的慢喉暗 (声带小结、声带息肉、声带黏膜增厚) 及由此而引起的声音嘶哑等症。金嗓散结胶囊多年来在临床上广泛用于治疗慢性喉炎, 并有多位学者对其进行了临床观察的研究^[8-9], 证实其联合质子泵类药物对反流性咽喉炎有较好的治疗效果, 但相关作用机制少有报道。因此, 本研究拟通过复制反流性咽喉炎模型大鼠, 探讨金嗓散结胶囊对大鼠反流性咽喉炎的治疗作用, 现将结果报道如下。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 84 只, 体重 180 ~ 220 g [西安交大医学院动物实验中心, 动物合格证号: NO1939, 许可证号: SCXK (陕) 2018-001]。实验动物购回后适应性喂养 7 d, 动物室温度保持在 20 ~ 25 °C; 相对湿度保持在 45% ~ 70%。保持门窗密闭, 使用空气净化系统, 送风机隔日换气一次。实验过程中对受试动物的所有处理及操作符合动物实验伦理要求 [伦理审查批件号为

(2021) 伦审第 (44) 号]。

1.2 试药

金嗓散结胶囊 (西安碑林药业股份有限公司, 批号: JA121070803, 规格: 每粒 0.4 g); 清咽利喉颗粒 [桂龙药业 (安徽) 有限公司, 批号: 20210805, 规格: 每袋 10 g]。Claudin-3 抗体 (HUABIO 公司, 货号: ER63024); Occludin 抗体 (Engibody 公司, 货号: AT0651); ZO-1 抗体 (Affinity 公司, 货号: ERC003); 肿瘤坏死因子 (TNF)- α 、白细胞介素 (IL)-10、IL-13、IL-1 β 、IL-6 ELISA 试剂盒 (武汉贝茵莱生物科技有限公司, 货号分别为 RA20035、RA20090、RA20034、RA20020、RA20607)。

1.3 仪器

LEICA RM2235 型组织切片机 (德国徕卡公司); YB-7LF 型包埋机 (孝感市亚光医用电子技术有限公司); MULTISKAN SKY 型酶标仪 (美国赛默飞公司); E200 型生物显微镜 (日本 NiKon 公司); IX71 荧光倒置显微镜 (日本奥林巴斯公司); 蛋白转印系统、ChemiDoc Touch 化学发光成像仪 (美国伯乐公司)。

2 方法

2.1 建立动物模型^[10]

将 84 只雄性 SD 大鼠, 适应性喂养一周后, 按体重均衡原则随机分为空白组和造模组, 空白组 10 只, 造模组 74 只。将造模组大鼠按如下方法造模: 用 10% 的乌拉坦按 1 g · kg⁻¹ 剂量麻醉大鼠, 大鼠进入深度睡眠后, 将四肢固定在手术台上, 腹部备皮, 消毒铺巾, 上腹部正中切口, 分离皮下组织及腹直肌直达腹膜, 切开腹膜进入腹腔, 找到食道和胃结合处膨大部即为下食道括约肌, 分离切断食道末端 360 度肌纤维, 肌纤维切断长度为 1.5 cm, 缝合腹膜、肌肉、皮肤。空白组不进行食道括约肌切除, 其余操作同造模组。

2.2 分组与给药

从造模 10 周后开始, 模型组大鼠在抓取时均有声音沙哑症状, 而空白组则无此症状, 随着造

模后时间的延长,声音沙哑的症状加剧,症状也符合咽喉炎的症状,视为造模成功。造模 12 周后,将造模组 50 只(造模期间死亡 24 只)大鼠分为 5 组,即模型组,金嗓散结胶囊(JSSJ)高剂量组、中剂量组、低剂量组,阳性组。根据临床人用量比表面积换算,金嗓散结胶囊(JSSJ)高、中、低剂量组给药剂量分别为 0.67、0.33、0.17 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,相当于临床人用量的 12.6、6.3、3.15 倍,阳性组给予清咽利喉颗粒(QYLH,剂量为 1.58 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$),相当于临床人用量的 6.3 倍,空白组和模型组每日灌胃给予等体积的纯净水,各组给药体积为 10 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,每日给药 1 次,共给药 4 周。每周对所有大鼠称重,并根据体重适当调节药物剂量。

2.3 组织样本采集

大鼠末次给药结束后,禁食不禁水 12 h,用 1 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 乌拉坦麻醉,行腹主动脉采血,室温静置,经离心取血清,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。切取喉部开声带部分,纵切一半置 4%多聚甲醛固定,供组织病理学及免疫荧光检测用;其余部分置 EP 管中冻存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱,备用。

2.4 一般状态观察以及反流体征评分^[11]

给药过程中观察各组大鼠行为学,包括体重、皮毛、声音。对大鼠反流症状进行评分,根据声音沙哑和咳嗽的严重程度分别进行 0~4 分的评分,并计算总分。

2.5 血清 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、IL-13 的含量测定

采用 ELISA 法检测大鼠血清中 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、IL-13 水平。严格按 ELISA 试剂盒说明书操作, MULTISKAN SKY 型酶标仪测各指标吸光度,通过标准曲线计算含量。

2.6 组织病理学检查

取大鼠喉部声带及食道组织,置于 4%多聚甲醛中固定 48 h 后横切 1 cm 取材,随后进行乙醇梯度脱水,二甲苯透明,石蜡浸蜡,包埋机包埋,用组织切片机 4 μm 切片,进行 HE 染色,生物光学显微镜下观察组织病理学变化。

2.7 RT-PCR 检测食道和声带组织中 Claudin-3、Occludin、ZO-1 基因表达

使用 Trizol 总 RNA 提取试剂从食道、声带组织中提取总 RNA,用反转录试剂盒合成 cDNA,将含有 Sybr Green 的 PCR 试剂与 cDNA 混合,经过 95 $^{\circ}\text{C}$ 20 s 变性、55 $^{\circ}\text{C}$ 20 s 退火、72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s 延伸的热循环过程,实时检测荧光信号强度,求

Ct 值。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析目的基因在对照组和各实验组之间的表达差异,计算出 Claudin-3、Occludin、ZO-1 的相对表达量。组织 RT-PCR 所使用的引物由上海生工公司 Primer Premier 5.0 软件设计、合成,以管家基因 GAPDH 为内参。引物序列见表 1。

表 1 Real-time PCR 引物序列
Tab 1 Primer of Q-PCR

引物	序列 (5'-3')	PCR 产物大小 /bp
GAPDH (Rat) -RT-F	ACAGCAACAGGGTGGTGGAC	252
GAPDH (Rat) -RT-R	TTTGAGGGTGCAGCGAACTT	
Occludin (Rat) -F	GACAGAGCCTATGGAACG	216
Occludin (Rat) -R	AATGACGCTGGTAACAAA	
Claudin-3 (Rat) -F	GCGGCTGTGCTCACCTTA	111
Claudin-3 (Rat) -R	CAACCCAGTTCCCATCTC	
ZO-1 (Rat) -F	CAAGAAGGATGTGAATGA	140
ZO-1 (Rat) -R	CTGGGAGCCTGTAGAGTG	

2.8 Western blot 法检测大鼠声带和食道组织 Claudin-3、Occludin、ZO-1 蛋白表达

将声带和食道组织块用预冷的 PBS 洗涤 3 次,加入 RIPA 裂解液(使用前数分钟内加入蛋白酶抑制剂),4 $^{\circ}\text{C}$ 匀浆,取上清液。用 BCA 蛋白浓度测定蛋白浓度,取 50 μg 的蛋白样品上样进行 SDS-PAGE 电泳,通过湿式蛋白电转到 PVDF 膜,使用 5% 的脱脂奶粉 TBST 中进行避光封闭 1 h,洗涤之后加入一抗稀释溶液(Claudin-3、Occludin、ZO-1 以及内参 β -actin 按照 1:1000 比例进行稀释),在 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,洗涤后加入二抗稀释溶液(1:5000)在温床中孵育 1 h 后用 TBST 再次洗涤,加入发光液 ECL,在化学发光成像仪上显色。使用 AlphaEase FC 软件分析蛋白条带灰度值,以目的蛋白灰度值和内参灰度值的比值作为统计数据。

2.9 免疫荧光检测声带和食道组织中 Claudin-3、Occludin、ZO-1 蛋白表达

将固定好的声带和食道组织经过乙醇梯度脱水、二甲苯透明,石蜡浸蜡,包埋机包埋,组织切片机切片(切片厚度 4 μm),脱蜡后,将切片浸泡在抗原修复液中微波炉低火 15 min 进行抗原修复,PBS 洗涤,5%BSA 封闭,加一抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, PBS 洗涤,二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBS 洗涤,滴加 Hoechst 溶液室温放置 15 min,进行核染, PBS 漂洗 5 min 重复 3 次;擦干组织周围水分,浸泡无水乙醇 1 min 后取出,待切片干燥后,在载玻片非组织一侧用记号笔标记组织部位,再抗荧光淬灭封片剂封固,荧光显微镜观察并拍照。

2.10 统计方法

采用 Graphpad Prism 9.0 软件进行统计学分析。计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。数据如果符合正态分布且方差齐, 组间比较采用 One-way ANOVA 单因素方差分析, 不符合则使用非参数检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 一般状态观察

造模 8 周后, 造模组动物在抓取过程中声音开始出现沙哑, 毛色发黄, 发怒等症状; 造模 12 周后, 声音严重沙哑, 伴随有咳嗽, 反流体征评分显著升高 ($P < 0.01$), 判断造模成功。给药过程中, 空白组大鼠精神状态良好, 毛色有光泽, 声音洪亮, 模型组大鼠声音沙哑, 毛色发黄症状未消失, 金嗓散结胶囊高、中、低剂量组及阳性组随着给药的进行, 声音沙哑, 毛色发黄, 易怒症状均有所改善。与空白组比较, 模型组评分显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 金嗓散结胶囊高、中、低剂量组及阳性组给药后评分降低 ($P < 0.01$)。结果见表 2。

表 2 大鼠反流体征评分 ($\bar{x} \pm s$)
Tab 2 Rat reflux sign score ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量	n	反流体征评分	
			给药前	给药后
空白组	—	10	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
模型组	—	9	3.4 ± 0.5 ^{△△}	3.9 ± 0.8 ^{△△}
金嗓散结高剂量组	0.67 g · kg ⁻¹	10	3.5 ± 0.5	2.1 ± 0.6 ^{**}
金嗓散结中剂量组	0.33 g · kg ⁻¹	9	3.4 ± 0.5	2.2 ± 0.7 ^{**}
金嗓散结低剂量组	0.17 g · kg ⁻¹	10	3.4 ± 0.7	2.9 ± 0.6 ^{**}
阳性组	1.58 g · kg ⁻¹	9	3.3 ± 0.7	2.3 ± 0.7 ^{**}

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

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

3.2 组织病理学检查

光学生物显微镜下可见空白组大鼠声带黏膜结构正常, 无炎细胞浸润、水肿、变性、坏死; 食道组织上皮组织结构正常, 角化层结构正常。模型组大鼠声带黏膜组织脱落, 上皮组织变性、坏死, 黏膜下层可见炎细胞浸润, 腺体增生, 出血; 食道组织上皮细胞有变性、坏死、炎细胞浸润, 角化层部分消失、断层。金嗓散结胶囊高、中、低剂量组和阳性组与模型组比较声带黏膜组织脱落症状减轻, 炎细胞浸润程度减轻, 淋巴细胞数量减少, 腺体增生数量减少, 出血点减少; 食道组织上皮角化层未见断层 (见图 1)。

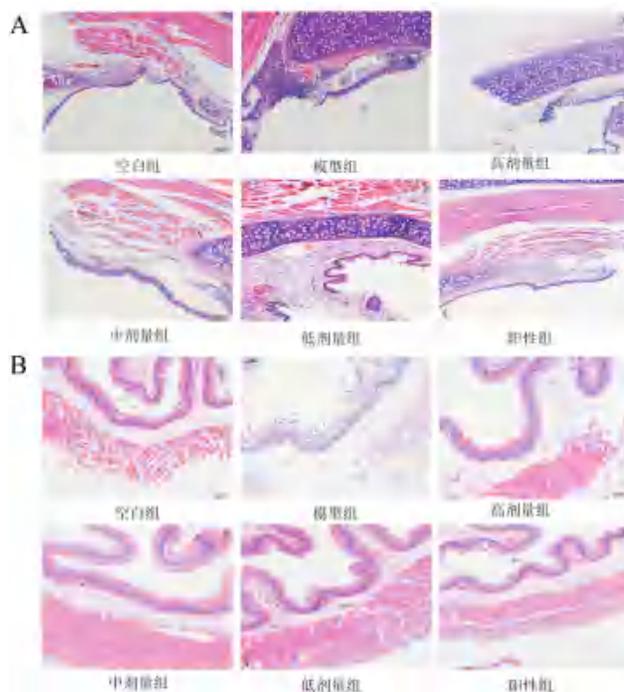


图 1 各组大鼠声带 (A) 及食道 (B) 组织病理图 (HE, ×100)
Fig 1 Histopathological pictures of the vocal cords (A) and esophagus (B) of rats in each group (HE, ×100)

3.3 血清 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、IL-13 含量

与空白组比较, 模型组血清 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 含量升高, IL-10、IL-13 含量降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 金嗓散结胶囊高、中、低剂量组及阳性组 TNF- α 、IL-1 β 量降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 高剂量组、中剂量组、阳性组 IL-6 含量降低 ($P < 0.05$); 高剂量组、中剂量组、阳性组 IL-13 含量升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 高剂量组、中剂量组、低剂量组、阳性组 IL-10 含量升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 结果见表 3。

3.4 RT-PCR 检测结果

与空白组比较, 模型组声带及食道组织中的 Claudin-3、Occludin、ZO-1 的基因表达量显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 金嗓散结胶囊高剂量组、中剂量组及阳性组声带和食道组织中的 Claudin-3、Occludin、ZO-1 的基因表达量显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果见图 2。

3.5 Western blot 检测大鼠声带和食道组织 Claudin-3、Occludin、ZO-1 蛋白表达的结果

与空白组比较, 模型组的声带及食道组织中的 Claudin-3、Occludin、ZO-1 蛋白表达量显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 金嗓散结胶囊高、中剂量组及阳性组声带和食道组织中的 Claudin-3、Occludin、ZO-1 的蛋白表达量显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果见图 3 ~ 4。

表 3 反流性咽喉炎模型大鼠血清 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、IL-13 ($\bar{x} \pm s$, pg \cdot mL $^{-1}$)

Tab 3 Serum IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-10, and IL-13 in reflux pharyngolaryngitis model rats ($\bar{x} \pm s$, pg \cdot mL $^{-1}$)

组别	剂量	n	IL-1 β	TNF- α	IL-6	IL-10	IL-13
空白组	—	10	78.78 \pm 19.96	143.27 \pm 22.08	138.05 \pm 22.01	163.32 \pm 31.12	49.04 \pm 9.48
模型组	—	9	105.46 \pm 10.91 $\Delta\Delta$	181.42 \pm 24.98 $\Delta\Delta$	170.89 \pm 23.988 $\Delta\Delta$	125.94 \pm 18.64 $\Delta\Delta$	34.32 \pm 9.76 $\Delta\Delta$
金嗓散结高剂量组	0.67 g \cdot kg $^{-1}$	10	88.69 \pm 12.69**	148.14 \pm 25.27**	144.05 \pm 24.53*	152.23 \pm 8.34**	44.04 \pm 8.74**
金嗓散结中剂量组	0.33 g \cdot kg $^{-1}$	9	94.59 \pm 9.65*	149.25 \pm 38.06*	145.48 \pm 13.41*	149.68 \pm 25.79*	43.45 \pm 7.24*
金嗓散结低剂量组	0.17 g \cdot kg $^{-1}$	10	95.36 \pm 10.49*	157.36 \pm 10.20*	156.00 \pm 18.91	143.18 \pm 17.61*	39.01 \pm 12.41
阳性组	1.58 g \cdot kg $^{-1}$	9	91.01 \pm 17.28*	153.89 \pm 22.91*	146.44 \pm 23.08*	145.79 \pm 13.55*	42.31 \pm 5.58*

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

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

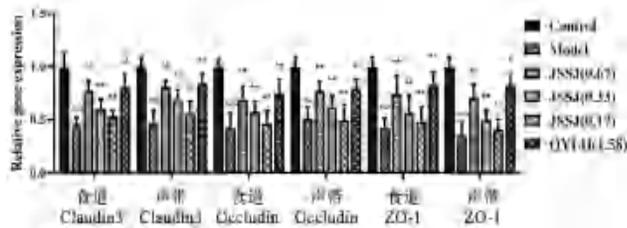


图 2 各组大鼠声带和食道组织基因表达分析图 (n = 5)

Fig 2 Gene expression plots of the vocal cords and esophageal tissues in each group of rats (n = 5)

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

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

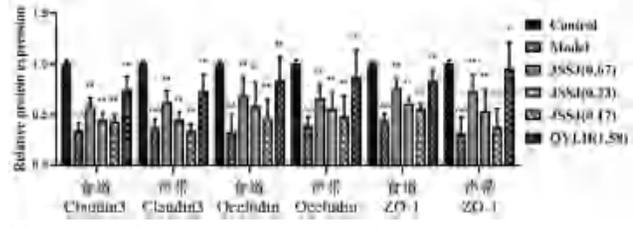


图 4 各组大鼠声带和食道组织蛋白表达灰度值比较

Fig 4 Gray values of the vocal cords and esophageal tissue protein expression in each group of rats

注：与空白组比较， $\Delta\Delta P < 0.01$ ，与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ (n = 5)

Note: Compared with the blank group, $\Delta\Delta P < 0.01$, compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (n = 5)

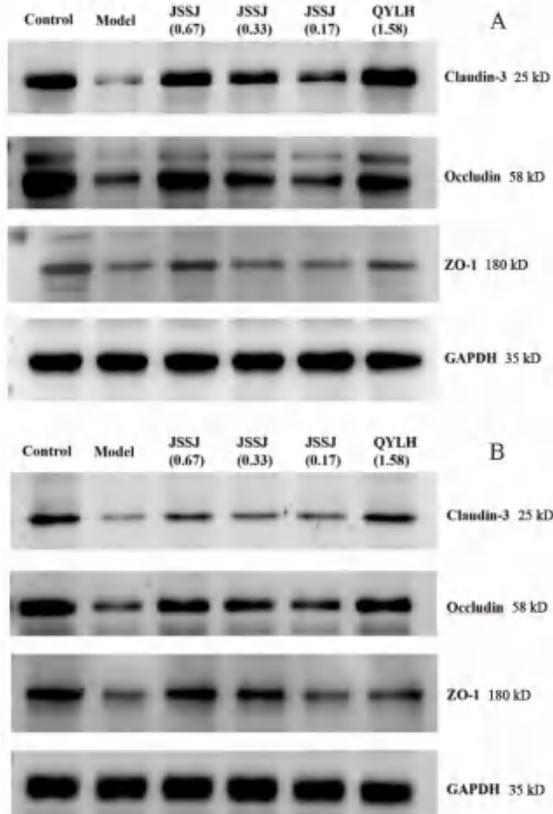


图 3 各组大鼠声带 (A) 及食道 (B) 组织蛋白印迹图

Fig 3 Western blot of rat vocal cord tissue (A) and esophageal tissue (B) in each group of rats

3.6 免疫荧光检测声带和食道组织中 Claudin-3、Occludin、ZO-1 蛋白表达的结果

Claudin-3、Occludin、ZO-1 蛋白普遍存在于食道以及声带黏膜上皮，红色区域为阳性表达，与空白组比较，模型组的声带及食道组织中的 Claudin-3、Occludin、ZO-1 蛋白表达降低；与模型组比较，金嗓散结胶囊高、中剂量组及阳性组声带及食道组织中的 Claudin-3、Occludin、ZO-1 的蛋白表达升高。免疫荧光结果见图 5 及图 6。

4 讨论

反流性咽喉炎由胃内容物反流至咽喉部，反流物与喉部黏膜接触产生一系列炎症，这个过程机械屏障为下食道括约肌，是食管下段近贲门处的特化环肌，其作用是保持胃食管交界处压力的稳定，从而使近端压力远高于远端或腹腔内压力，防止胃内容物向食管反流^[10]，基于以上文献研究笔者采取了大鼠下食道括约肌全切术复制了大鼠反流性咽喉炎模型，造模 8 周时大鼠开始出现咳嗽，声音沙哑症状，随着造模的时间延长，声音沙哑的症状加剧，符合反流性咽喉炎的症状，而空白组大鼠未出现任何症状，提示造模成功。给药 4 周后，金嗓散结胶囊高、中、低剂量组和阳性组与模型组比较声带黏膜组织脱落以及炎症

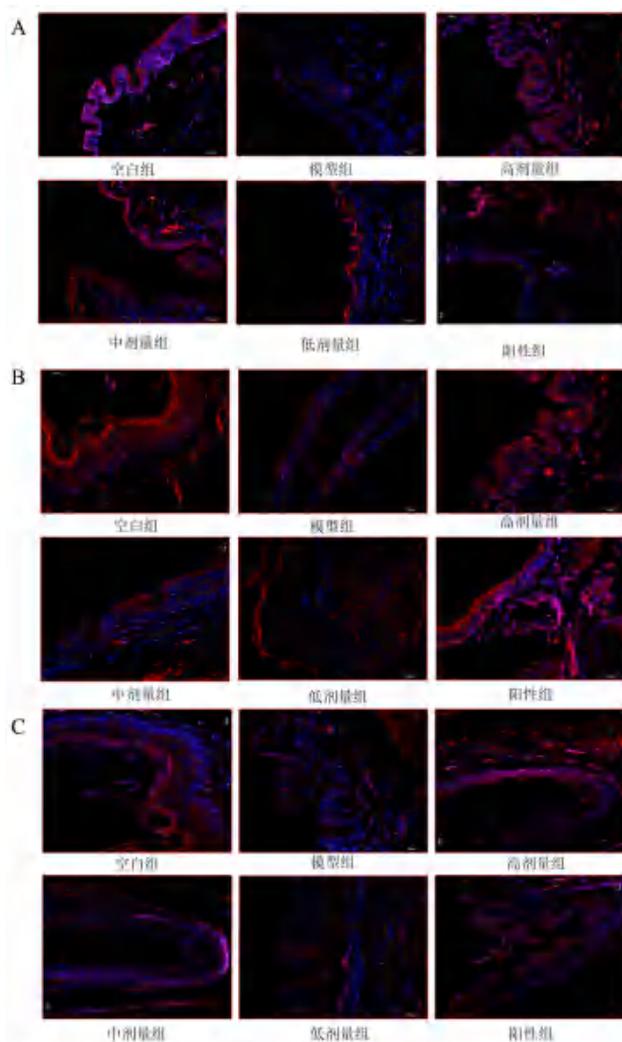


图 5 各组大鼠声带 Claudin-3 (A)、Occludin (B)、ZO-1 (C) 免疫荧光图片 (×100)

Fig 5 Immunofluorescence of Claudin-3 (A), Occludin (B), and ZO-1 (C) of rat vocal cords in each group (×100)

胞浸润程度减轻, 淋巴细胞数量减少, 腺体增生减少, 出血点减少; 食道组织上皮角化层断层消失; 给药组可以降低血清 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 含量, 升高 IL-10、IL-13 含量; Western blot 和免疫荧光结果显示给药组声带及食道组织中的 Claudin-3、Occludin、ZO-1 的蛋白表达量显著升高; PCR 结果显示给药组声带及食道组织中的 Claudin-3、Occludin、ZO-1 的基因表达升高。

IL-1、TNF- α 具有广泛的生物效应, 是重要的炎症介质, 被认为是快速致炎因子, 能诱导单核细胞和多核细胞趋化浸润到炎症局部, 并使其活化释放新的炎症因子, 在宿主防御病原体感染等反应中发挥重要作用^[11-13]。此外, TNF- α 的主要生物学效应还有抗肿瘤作用。IL-6 参与免疫调节和炎症反应, 促进 T、B 淋巴细胞增殖分化和分泌抗体, 激活巨噬细胞和自然杀伤 (NK) 细

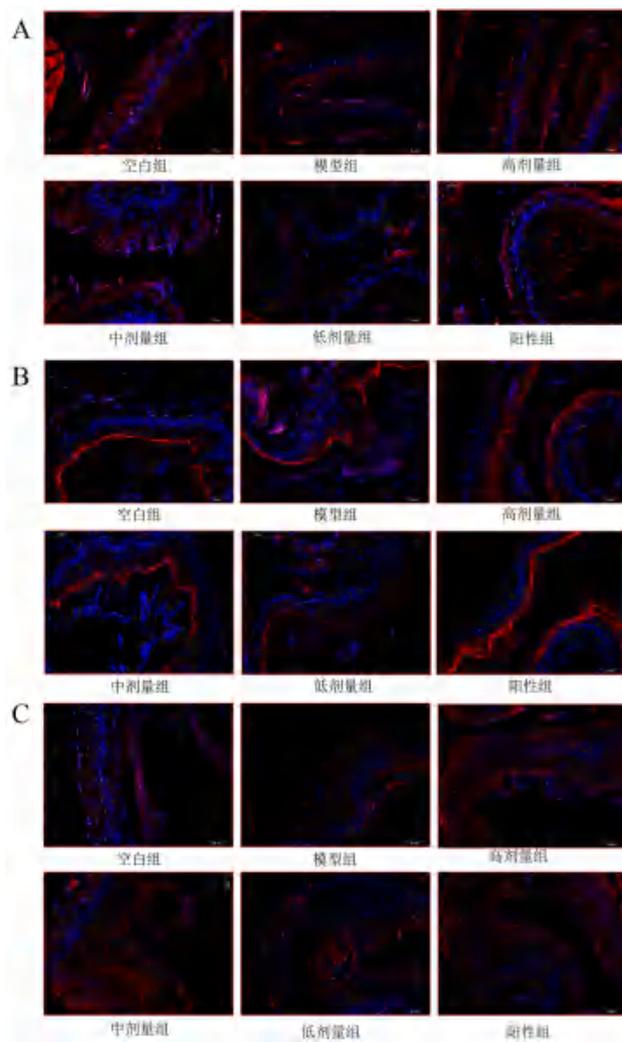


图 6 各组大鼠食道 Claudin-3 (A)、Occludin (B)、ZO-1 (C) 免疫荧光图片 (×100)

Fig 6 Immunofluorescence of Claudin-3 (A), Occludin (B), and ZO-1 (C) of rat esophagus in each group (×100)

胞, 灭活清除病原体及受损的组织细胞^[14]。IL-10 主要由抗原呈递细胞, 如 Th2 细胞和单核巨噬细胞分泌产生, 有抑制活化的 T 细胞, 抑制 NK 细胞活性, 抑制促炎症细胞因子, 刺激 B 细胞分化增殖, 促进抗体生成作用。IL-10、IL-13 均是重要的炎症抑制因子, 在抑制机体过度炎症反应过程中, 起到免疫调节作用^[15]。

本研究发现 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 作为促炎因子, 其表达水平与反流性咽喉炎病理过程相关。金嗓散结胶囊能降低反流性咽喉炎大鼠血清中 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 含量, 上调抑炎因子 IL-10、IL-13 含量, 调整机体免疫平衡^[16-17]。

胃内容物反流至咽部和喉部导致咽喉反流, 随着反流次数增多, 食道或者喉部黏膜抵抗胃内容物侵蚀的防御屏障失衡, 是反流性咽喉炎发生的根本原因。上皮细胞及细胞间的紧密连

接、黏附连接等组成,其中紧密连接又由闭合蛋白 Claudin、咬合蛋白 Occludin 和连接黏附分子 3 种完整的膜蛋白和闭合蛋白(ZO-1、ZO-2 和 ZO-3)等外周胞浆蛋白构成^[18]。紧密连接是黏膜上皮细胞防御屏障的重要组成部分,一旦紧密连接的功能下降,上皮细胞的极性就会破坏,不同液性空间的脂质和蛋白可以自由扩散。紧密连接中起主要作用的是 Claudin 和 Occludin,参与调节黏膜上皮细胞间屏障的完整性,ZO-1 在紧密连接中有着桥梁的作用。本次研究观察到金嗓散结胶囊能增加大鼠声带和食道组织中紧密连接相关蛋白 Claudin-3、Occludin、ZO-1 表达,提示该药有保护喉部食道黏膜屏障的作用。

中医学中并无反流性食管炎及反流性咽喉炎病名的记载,依据其反酸、烧心、咽部异物感、清嗓和声嘶等临床表现当属于中医学“吐酸病”“食管瘴”“梅核气”“喉痹”“声嘶”等范畴。《胃食管反流病中医诊疗专家共识意见(2023 年)》中总结出七型辨证,分别为:①肝胃郁热,治法为疏肝泄热,和胃降逆;②胆火上逆,治法为清化胆热,降气和胃;③气郁痰阻,治法为行气开郁,降逆化痰;④胸阳不振,治法为通阳宣痹,降气化痰;⑤中虚气逆,治法为益气健脾,和胃降逆;⑥脾虚湿热,治法为清化湿热,健脾和胃;⑦胃阴不足,治法为滋养胃阴,和胃降逆。金嗓散结胶囊由马勃、金银花、玄参、红花、板蓝根、浙贝母、鸡内金、木蝴蝶、莪术、桃仁、三棱、丹参、麦冬、泽泻、蝉蜕、蒲公英组成,诸药合用,共奏疏肝健脾和胃、清热解毒利咽、活血化瘀祛痰的功效^[6],符合中医诊疗专家共识意见的辨证归类。

综上,通过复制反流性咽喉炎大鼠模型,使用金嗓散结胶囊进行给药治疗后,大鼠反流性咽喉炎所致的声音沙哑、喉部不适、咳嗽等症状明显减轻,反流体征评分降低,食道及声带的病理得以改善,提示金嗓散结胶囊对反流性咽喉炎有一定的治疗作用,其机制可能与降低大鼠血清中 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 含量,上调抑炎因子 IL-10、IL-13 含量,增加大鼠声带和食道组织中紧密连接相关蛋白 Claudin-3、Occludin、ZO-1 表达有关,从而发挥保护和修复喉部黏膜屏障作用。

参考文献

- [1] 闻静. 梅核气与反流性咽喉炎相关性的研究[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2022.
- [2] 王磊, 吴玮, 王刚. 咽部生化指标诊断咽喉反流性疾病意义探讨[J]. 中华医学杂志, 2018, 98(8): 596-600.
- [3] 曾屹生, 陈宇, 王丽云, 等. 化痰祛瘀配合健脾法治疗声带白斑伴咽喉反流的临床观察[J]. 云南中医中药杂志, 2022, 43(7): 35-37.
- [4] 王磊, 王刚, 孙喆喆, 等. 咽喉反流与声带良性增生性病变、声带白斑、慢性咽喉炎相关性研究[J/OL]. 山东大学耳鼻喉眼学报. <https://link.cnki.net/urlid/37.1437.R.20230913.2042.016>.
- [5] 谢佐君. 雷贝拉唑联合莫沙必利在胃食管反流性咽喉炎中的治疗效果观察[J]. 药品评价, 2019, 16(20): 36, 75.
- [6] 赵晓阳, 郭冰艳, 马凌霄, 等. 金嗓散结胶囊联合西医治疗反流性咽喉炎的临床研究[J]. 河北中医, 2021, 43(1): 92-96.
- [7] 李爽, 李书, 刘倩, 等. 埃索美拉唑联合氟哌噻吨美利曲辛片治疗难治性胃食管反流病的临床研究[J]. 中南药学, 2019, 17(6): 952-955.
- [8] 崔云江. 金嗓散结胶囊联合庆大霉素雾化吸入对慢性喉炎疗效及血清炎性因子的影响[J]. 中国医药科学, 2019, 9(14): 250-253.
- [9] 李海翠, 张雄. 金嗓散结胶囊与金嗓开音胶囊对声带息肉及小结术后复发率 140 例[J]. 云南中医中药杂志, 2015, 36(9): 30-31.
- [10] 胡颖. 咽喉反流动物模型中喉部黏膜屏障的防御机制研究[D]. 上海: 复旦大学, 2014.
- [11] 阮瑶. 结合 RSI 及 RFS、PPI 经验性治疗对疑似咽喉反流性疾病诊断价值探讨[D]. 衡阳: 南华大学, 2019.
- [12] 周中浩. 金嗓利咽胶囊对慢性咽炎大鼠血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的影响的研究[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2021.
- [13] 张众. 苦酒汤对慢性咽炎的药效评价及作用机制研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2023.
- [14] 徐金红. 基于 TLR4/NF- κ B 信号通路探讨紫正地黄汤治疗急性咽炎的机制研究[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2020.
- [15] 李慧芳, 赵阳, 胡远征. 血清 MIP-1 α 、IL-13、IL-6、TNF- α 水平变化与重症哮喘患者肺功能的相关性及其临床意义[J]. 河南医学研究, 2023, 32(8): 1445-1448.
- [16] 冯松柏. 内外联合固定术治疗骨盆骨折的临床疗效及对血清 IL-10、IL-13、TGF- β 、TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 水平的影响[J]. 中国实用医药, 2018, 13(17): 1-5.
- [17] 刘倩, 吕颜露. 咽喉反流通过 NF- κ B 信号通路介导炎症反应对声带黏膜的影响[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2019, 48(1): 32-37.
- [18] 戴伟, 吴海兰, 赵明, 等. COPD 大鼠肠黏膜屏障功能障碍的观察研究[J]. 肠外与肠内营养, 2022, 29(1): 18-23.

(收稿日期: 2023-10-30; 修回日期: 2024-01-24)

乳腺康颗粒的制备工艺研究

常婷, 王璐, 孙永慧*, 张洪财 (黑龙江中医药大学中医药研究院, 哈尔滨 150040)

摘要: **目的** 优选乳腺康颗粒的最佳提取工艺和成型工艺条件。**方法** 通过正交试验设计, 使用高效液相色谱法 (HPLC) 以干浸膏得率和芍药苷、阿魏酸、丹酚酸 B 的含量为评价指标, 考察提取次数、加水量和提取时间 3 个因素对乳腺康颗粒提取工艺的影响, 确定最佳提取工艺。采用响应面优化试验法, 以颗粒的成型率、休止角、吸湿率和溶化率为考察指标, 确定最佳成型工艺。**结果** 乳腺康颗粒最佳的提取工艺为提取 2 次, 第一次用 12 倍量水提取 1.5 h, 第二次用 10 倍量水提取 1 h; 最佳成型工艺: 选择 β -环糊精为辅料, 辅料与药粉比例为 1.8 : 1, 85% 乙醇作为湿润剂, 乙醇加入量为药辅总量的 36%。**结论** 本研究可为乳腺康颗粒进一步的研究提供科学依据, 并为后续的生产工作提供理论参考。

关键词: 乳腺康颗粒; 提取工艺; 成型工艺; 响应面优化

中图分类号: R944, R283 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)07-1779-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.016

Preparation process of Ruxiankang granules

CHANG Ting, WANG Lu, SUN Yong-hui*, ZHANG Hong-cai (*Institute of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040*)

Abstract: Objective To optimize the extraction and molding conditions of Ruxiankang granules.

Methods Through orthogonal experimental design, high performance liquid chromatography (HPLC) was used to evaluate the yield of dry extract and the contents of paeoniflorin, ferulic acid and salvianolic acid B. The effects of extraction times, water amount and extraction time on the extraction process of Ruxiankang granules were determined, as well as the optimal extraction process. The response surface optimization test was used to determine the best forming process with the forming rate, resting angle, moisture absorption rate and dissolubility of the granules as the indexes. **Results** The optimal process of Ruxiankang granules was 2 extractions times, the first time was extracted with 12 times water for 1.5 h, the second time was 10 times of water for 1 h. The optimum molding process was as follows: β -cyclodextrin was selected as the excipient, the ratio of excipient to powder was 1.8 : 1, 85% ethanol as the wetting agent, and the amount of ethanol addition was 36% of the total amount of adjuvant. **Conclusion** This paper provides scientific basis for the further study of Ruxiankang granules and theoretical reference for the subsequent production.

Key words: Ruxiankang granule; extraction process; molding process; response surface optimization

乳腺增生, 又名乳癖, 是临床最常见的良性乳腺疾病, 其临床特点为肿块或乳房结节、乳房触痛和胀痛等。乳腺增生的发病率逐年上升且愈发低龄化, 具有一定的癌变可能, 故早期的诊断治疗十分重要^[1-3]。中成药已成为乳腺增生治疗的一种重要手段, 本研究中的乳腺康处方包含白芍、当归、丹参、延胡索、夏枯草、桃仁、柴胡、

郁金、川楝子、青皮、陈皮、浙贝母、清半夏十三味药材, 方中白芍为君药, 取其养血柔肝、缓中止痛之效^[4], 加以丹参、当归、夏枯草等加强活血化瘀和消癖功效^[5-7], 佐以延胡索、郁金等疏肝解郁、行气散结, 诸药共奏疏肝理气、消痰散结之功效^[8]。针对汤剂煎煮及携带的不便, 本文考虑将其研制开发成便于携带服用的颗粒剂,

作者简介: 常婷, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药药效物质基础研究, email: 2889884371@qq.com *通信作者: 孙永慧, 女, 博士, 副研究员, 主要从事中药药效物质基础研究, email: 458265443@qq.com

考虑到不同提取因素对药效的影响,本文以乳腺康处方中 3 种起主要功效的药材白芍、当归和丹参中的有效成分芍药苷、阿魏酸和丹酚酸 B 的含量及干浸膏得率作为评价指标,用正交试验设计法,对乳腺康处方的最佳水提工艺进行优选。以颗粒的成型率、休止角、吸湿率、溶化率作为考察指标,采用响应面优化试验法,对辅料的种类、用量、润湿剂的浓度及用量进行乳腺康颗粒的成型工艺优化,按照 2020 年版《中国药典》对制得的颗粒进行相关检查^[9],为该药的进一步研究提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

Waters-E2695 (UV) 型高效液相色谱仪 [沃特世科技(上海)有限公司]; SYG-1-4 型电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司); GZX-9070MBE 型电热恒温鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); WIGGENS 型超声波清洗器(长春乐璞科技有限公司); JE502 型百分之一电子天平(上海浦春计量仪器有限公司); ZA2004 型十万分之一电子天平(上海金平科学仪器有限公司); SHZ-D III 型循环水真空泵(河南豫华仪器科技有限公司)。

1.2 试药

白芍、当归、丹参、延胡索等方中所用药材均购自哈尔滨市国郎大药房;芍药苷对照品(批号:110736-202145,纯度:98%)、阿魏酸对照品(批号:110773-201915,纯度:99.4%)、丹酚酸 B 对照品(批号:1115562-201917,纯度:96.6%)(中国食品药品检定研究院);乙腈(色谱纯,DikmaPure);磷酸、乙醇(天津市富宇精细化工有限公司);蔗糖、可溶性淀粉、 β -环糊精、甘露醇、木醇糖(天津市凯通化学试剂有限公司);纯净水(黑龙江娃哈哈饮料有限公司)。

2 方法与结果

2.1 芍药苷、阿魏酸、丹酚酸 B 的含量测定^[9]

2.1.1 色谱条件 使用 Diamonsil (钻石) C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~17 min, 14%A; 17~45 min, 14%~30%A);检测波长(0~18 min, 230 nm; 18~30 min, 316 nm; 30~45 min, 360 nm);流速:1.0 mL·min⁻¹;柱温:35 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L。

2.1.2 溶液的制备 ①精密称取各对照品适量,加甲醇溶解制成质量浓度分别为芍药苷 600

μ g·mL⁻¹、阿魏酸 24.4 μ g·mL⁻¹、丹酚酸 B 2160 μ g·mL⁻¹ 的对照品储备液。精密量取各对照品储备液 1 mL 置于同一 10 mL 棕色量瓶中,用溶剂稀释至刻度并摇匀,制得混合对照品溶液。②取样品干膏适量置于具塞锥形瓶中,精密加入稀乙醇 50 mL,称定重量,超声 30 min,再称定重量,用稀乙醇补足减失的重量,摇匀,即得供试品溶液。③称取不含白芍、当归、丹参的组方药材,按供试品溶液制备方法制备,得阴性样品溶液。

2.1.3 专属性试验 精密量取上述所制备的对照品溶液、供试品溶液与阴性样品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件分别进样测定,记录色谱图,见图 1。

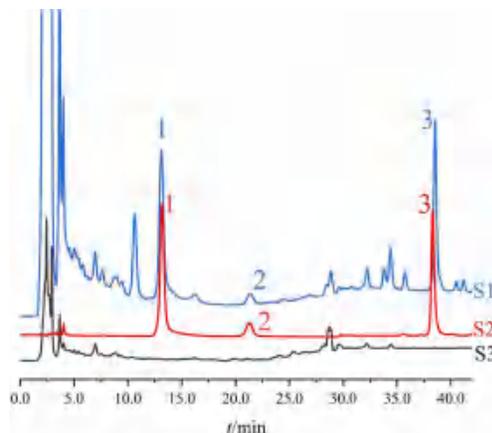


图 1 芍药苷、阿魏酸、丹酚酸 B 的专属性色谱图

Fig 1 Specific chromatogram of paeoniflorin, ferulic acid and salvianolic acid B

S1. 全方样品 (sample of the whole formula); S2. 对照品 (standard); S3. 阴性样品 (negative sample); 1. 芍药苷 (paeoniflorin); 2. 阿魏酸 (ferulic acid); 3. 丹酚酸 B (salvianolic acid B)

2.1.4 线性关系考察 精密称取各对照品适量,甲醇超声溶解,再稀释为不同梯度质量浓度的混合对照品溶液,进样分析,将所得对照品峰面积(Y)对进样量(X)进行线性回归,结果见表 1。

2.1.5 精密度、稳定性、重复性与加样回收试验 精密吸取混合对照品溶液,连续进样 6 次,测定各成分峰面积,计算其 RSD 值,结果见表 1,表明仪器精密度良好。取供试品溶液,在室温下放置 0、2、4、8、12、16、24 h 时分别进样测定,记录峰面积,计算其 RSD 值,结果见表 1,表明样品溶液在 24 h 内稳定性良好。取第四组正交条件下所得干膏 6 份,精密称定,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,进样测定,计算其含量的 RSD,结果见表 1,表明该方法重复性良好。精密称取第四组已知 3 种成分含量的干膏 6 份,取样量为总干膏重量的 1/40,加入质量浓度为 2.72、0.09、6.23

mg · mL⁻¹ 的芍药苷、阿魏酸、丹酚酸 B 对照品溶液各 1 mL, 制备供试品溶液并进样测定, 计算各成分的平均回收率及其 RSD, 结果见表 1, 表明该方法回收率良好, 可满足含量测定要求。

表 1 各成分线性关系

Tab 1 Linearity of various constituents

成分	线性关系			RSD/%			加样回收率/%	
	回归方程	r	线性范围/μg	精密度	稳定性	重复性	平均值	RSD
芍药苷	$Y = 1.565 \times 10^6 X - 9.792 \times 10^3$	0.9998	0.21 ~ 1.26	0.69	1.1	1.3	98.25	1.6
阿魏酸	$Y = 5.737 \times 10^6 X + 6.566 \times 10^3$	0.9998	0.0072 ~ 0.0432	0.81	1.2	1.4	100.87	1.5
丹酚酸 B	$Y = 7.264 \times 10^5 X - 1.916 \times 10^4$	0.9999	0.45 ~ 2.70	0.75	1.2	1.9	100.93	1.2

2.2 正交设计优化提取工艺^[10-11]

2.2.1 出膏率计算 按处方比例称取 10 份全方药材, 每份 57 g, 取一份做吸水性测试, 测得药材最大吸水量为 110 mL, 故药材在提取时应在规定加水量基础上加入最大吸水量进行后续考察。

将剩余 9 份药材按正交试验方案进行提取浓缩, 浓缩液过滤后在 60 °C 减压干燥至恒重^[12]。称定重量, 得总干膏量, 以干膏总量与药材量的比 × 100%, 即得出膏率。

2.2.2 正交试验 以乳腺康提取液中水提干浸膏得率与芍药苷、阿魏酸、丹酚酸 B 的含量作为此方提取工艺的考察标准, 以干浸膏得率与芍药苷含量作为主要指标 (权重系数分别为 0.3), 阿魏酸和丹酚酸 B 的含量作为次要指标 (权重系数分别为 0.2), 即综合评分 = (出膏率 / 出膏率最大值 × 0.3 + 芍药苷含

量 / 芍药苷含量最大值 × 0.3 + 阿魏酸含量 / 阿魏酸含量最大值 × 0.2 + 丹酚酸 B 含量 / 丹酚酸 B 含量最大值 × 0.2) × 100%, 对提取次数 (A)、加水量 (B) 和提取时间 (C) 进行优选, 使用 L₉ (3⁴) 正交试验设计进行考察, 因素水平见表 2。将试验结果使用直观分析和方差分析相结合分析, 数据采用 SPSS 20.0 统计学软件处理, 以 P < 0.05 为差异有统计学意义。正交试验安排和结果见表 3, 方差分析结果见表 4。

表 2 正交试验水平因素表

Tab 2 Levels and factors of orthogonal test

水平	因素		
	A 提取次数 / 次	B 加水量 / 倍	C 提取时间 / h
1	1	8、6、6	1、0.5、0.5
2	2	10、8、6	1.5、1.0、0.5
3	3	12、10、8	2.0、1.5、1.0

表 3 正交试验结果直观分析

Tab 3 Visual analysis of orthogonal test

试验号	试验因素				评价指标				
	A 提取次数	B 加水量	C 提取时间	D 空白	出膏率/%	芍药苷含量/mg	阿魏酸含量/mg	丹酚酸 B 含量/mg	综合评分/%
1	1	1	1	1	10.84	47.46	1.27	119.76	34.36
2	1	2	2	2	21.28	85.97	3.09	197.44	66.18
3	1	3	3	3	22.63	88.94	3.17	207.55	69.12
4	2	1	2	3	27.53	108.73	3.77	248.84	83.58
5	2	2	3	1	27.14	109.15	3.51	228.37	80.83
6	2	3	1	2	25.37	104.30	3.58	241.21	79.20
7	3	1	3	2	30.33	108.29	3.91	271.15	88.15
8	3	2	1	3	27.33	99.91	3.47	223.86	78.43
9	3	3	2	1	32.12	131.09	4.34	318.73	100.00
K ₁	169.66	206.08	191.98	215.19					
K ₂	243.10	225.44	249.76	233.52					
K ₃	266.58	248.32	238.10	231.14					
k ₁	56.56	68.69	63.99	71.73					
k ₂	81.20	75.15	83.25	77.84					
k ₃	88.86	82.77	79.37	77.05					
R	32.31	14.08	19.26	5.31					

分析表 2、3 可知, 各因素的极差大小为 A > C > B > D (误差), 即提取次数对方提取工艺影响最大, 其次为提取时间、加水量, 最优水提

工艺组合为 A₃B₃C₂, A 因素即提取次数对结果具有显著性 (P < 0.05), B、C 因素不显著。对最优工艺组合 A₃B₃C₂ 进行验证发现, 前两次提取的

表 4 综合评分方差分析结果

Tab 4 Comprehensive score analysis of variance

因素	Ⅲ类平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A 提取次数	1709.985	2	854.993	25.816	$P < 0.05$
B 加水量	298.036	2	149.018	4.500	$P > 0.05$
C 提取时间	622.335	2	311.167	9.396	$P > 0.05$
误差	66.237	2	33.118		

干膏重量占总干膏重量(三次提取)的 90.18%、芍药苷含量占总芍药苷量的 93.85%、阿魏酸含量占总阿魏酸苷含量的 95.79%、丹酚酸 B 含量占总丹酚酸 B 含量的 93.92%，从节能、降低成本并保证充分提取的前提下综合分析考虑，最终确定最优提取工艺为 $A_2B_3C_2$ ，即提取 2 次，第一次用 12 倍量水提取 1.5 h，第二次用 10 倍量水提取 1 h。

2.3 验证试验

按照处方比例称取全方药材 3 份，按照最优提取条件，重复试验 3 次，测定样品中的干浸膏得率和芍药苷、阿魏酸、丹酚酸 B 的含量，进行验证。结果平均出膏率为 29.01%，芍药苷、阿魏酸、丹酚酸 B 平均含量分别为 6.73、0.23、16.05 $mg \cdot g^{-1}$ ，综合评分 RSD 值为 2.2%，说明优选条件下提取充分，此优选工艺稳定可行。

2.4 乳腺康颗粒的成型工艺

2.4.1 药材提取物浸膏药粉的制备 按照处方比例称取全方药材，按照最优提取条件进行提取，烘干得总干膏，将干膏粉碎后过五号筛作为药粉，备用。

2.4.2 辅料的确定 本文通过前期试验，发现当

辅料为 β -环糊精时制粒情况良好、相比其他辅料综合评分最高，故确定 β -环糊精为最终辅料。各评价指标权重系数均为 0.25，综合评分 (%) = (成型率 / 最大成型率 $\times 0.25$ + 最小休止角 / 休止角 $\times 0.25$ + 最小吸湿率 / 吸湿率 $\times 0.25$ + 最小溶化率 / 溶化率 $\times 0.25$) $\times 100\%$ 。

2.5 Box-Behnken 响应面法优化成型工艺

2.5.1 响应面因素水平 本文通过前期单因素试验，将药粉与辅料按考察水平混合均匀，加入待考察比例的润湿剂制备颗粒，考察辅料用量、湿润剂浓度与加入湿润剂对颗粒制备的影响，确定响应面试验的因素水平，见表 5。

表 5 响应面水平因素表

Tab 5 Levels and factors of response surface test

水平	因素		
	A. 辅料加入量 / 倍	B. 乙醇浓度 / %	C. 乙醇加入量 / %
1	1	80	30
2	1.5	85	35
3	2	90	40

2.5.2 模型拟合及方差分析 乳腺康颗粒成型工艺条件优化试验设计方案及结果见表 6；回归方程方差分析结果见表 7。

应用 Design-Expert 10V10.0.3 统计软件对试验数据进行回归拟合，得到回归方程： $Y = 89.82 + 2.31A + 0.0125B + 0.8725C - 0.9425AB + 0.8825AC + 0.5475BC - 2.19A^2 - 3.16B^2 - 3.68C^2$ ($R^2 = 0.9732$, $R^2_{Adj} = 0.9388$)，式中：Y 为综合评分 (%), A 辅料加入量 (倍), B 乙醇浓度

表 6 乳腺康颗粒成型工艺条件优化试验设计及结果

Tab 6 Experimental design and results of optimization of molding conditions of Ruxiankang granules

序号	辅料加入量 / 倍	乙醇浓度 / %	乙醇加入量 / %	成型率 / %	流动性 / (°)	吸湿率 / %	溶化性 / %	综合评分 / %
1	1	80	35	91.54	32.69	9.14	16.62	80.84
2	2	80	35	91.49	30.01	8.08	14.73	87.32
3	1	90	35	90.17	31.03	8.87	15.47	83.52
4	2	90	35	90.21	29.66	7.49	16.72	86.23
5	1	85	30	86.06	34.38	9.13	14.43	81.19
6	2	85	30	85.75	33.64	8.75	13.32	84.07
7	1	85	40	94.16	28.25	9.71	18.47	82.08
8	2	85	40	95.95	29.10	6.82	18.36	88.49
9	1.5	80	30	88.79	33.32	8.23	15.04	83.49
10	1.5	90	30	87.88	33.19	8.96	15.18	81.65
11	1.5	80	40	94.58	29.06	8.71	18.52	83.23
12	1.5	90	40	95.19	28.74	8.53	19.03	83.58
13	1.5	85	35	94.09	29.29	7.17	16.12	89.13
14	1.5	85	35	94.15	30.83	6.03	17.03	90.88
15	1.5	85	35	94.07	30.47	7.12	14.67	90.24
16	1.5	85	35	93.76	31.29	7.23	14.79	89.06
17	1.5	85	35	93.41	30.68	6.84	15.37	89.81

表 7 回归方程方差分析结果

项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	188.98	9	21.00	28.28	0.0001
A 辅料加入量	42.69	1	42.69	57.50	0.0001
B 乙醇浓度	0.0013	1	0.0013	0.0017	0.9684
C 乙醇加入量	6.09	1	6.09	8.20	0.0242
AB	3.55	1	3.55	4.79	0.0649
AC	3.12	1	3.12	4.20	0.0797
BC	1.20	1	1.20	1.62	0.2444
A ²	20.16	1	20.16	27.16	0.0012
B ²	42.00	1	42.00	56.57	0.0001
C ²	56.97	1	56.97	76.73	< 0.0001
残差	5.20	7	0.7424		
失拟项	2.84	3	0.9478	1.61	0.3204
净误差	2.35	4	0.5884		
总离项	194.18	16			

(%)，C 乙醇加入量 (%)。方差分析发现回归模型 ($P < 0.001$) 显著相关，失拟项 ($P = 0.3204 > 0.05$)，表明失拟项相对于绝对误差不显著。根据 F 值可知，三因素对乳腺康颗粒成型工艺的影响顺序为辅料加入量 (A) > 乙醇加入量 (C) > 乙醇浓度 (B)，且 A^2 、 B^2 、 C^2 均达到显著水平。

2.5.3 成型工艺响应面结果分析 利用 Design-Expert 10V10.0.3 统计软件绘制各因素的响应曲面与等高线，由图 2 可知，乙醇的加入量与乙醇浓度交互时，响应面表现为相对平缓的坡度，等高线呈现圆形，表明两者的交互作用强度较弱。辅料加入量与乙醇浓度和乙醇的加入量任意一个交互时，交互效应都很显著，表明辅料加入量对综合评分有显著差异。结果见图 2。

经过优化提取条件，得到最佳的成型工艺参数为：辅料加入量 1.836 倍、乙醇浓度 84.596%、乙醇加入量 35.965%，此时颗粒成型综合评分可达到 90.56%。成型工艺优化过程中的颗粒形态对比见图 3。

图 3 可直观体现成型工艺优化的必要性，不经优化的工艺所制颗粒或不易成型易产生细粉，或颗粒结块不易整粒。当使用优化的最佳成型工艺条件制备时，颗粒大小均匀，易整粒，综合评分高。为后续生产方便，最终确定乳腺康颗粒的最佳成型工艺为 β -环糊精为辅料，辅料与药粉比例为 1.8 : 1，85% 乙醇作为湿润剂，乙醇加入量为药辅总量的 36%。

2.6 颗粒验证试验

按照优化的最佳成型工艺，制备 3 批乳腺康颗粒，根据 2020 年版《中国药典》相关项下制剂工艺的规定，对颗粒剂的相关指标 (粒度、溶化

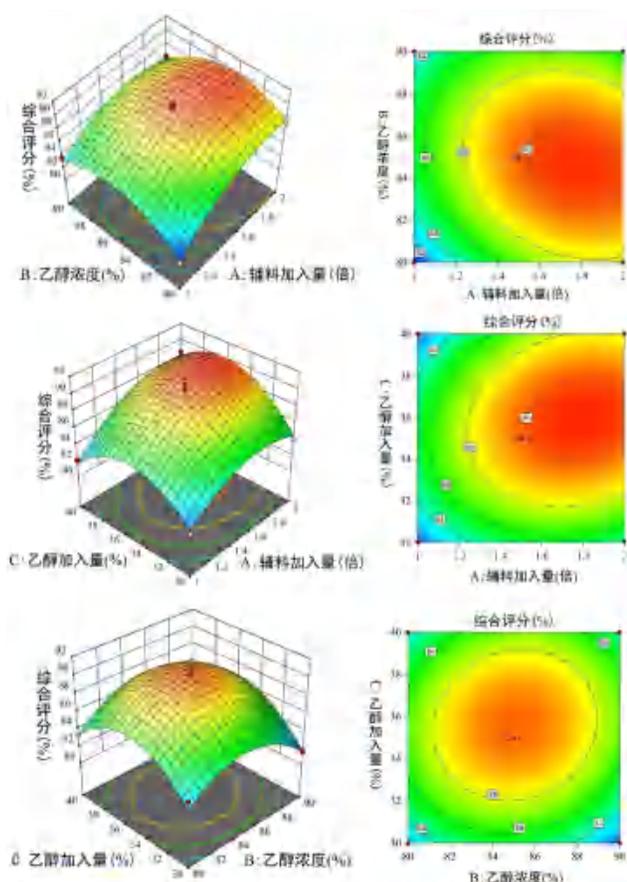


图 2 辅料加入量、乙醇浓度和乙醇加入量对乳腺康颗粒成型工艺综合评分影响的响应曲面与等高线

Fig 2 Response surfaces and contours of the effects of the amount of excipients, the concentration of ethanol and the amount of ethanol on the molding process comprehensive score of Ruxiankang granule



图 3 乳腺康颗粒成型工艺优化过程中的颗粒形态
Fig 3 Particle morphology during the optimization of molding process of Ruxiankang granule

A. 未经优化颗粒细粉多型 (unoptimized fine powder type); B. 最优参数下所制备颗粒 (the particles prepared under the optimal parameters); C. 未经优化颗粒结块型 (not optimized particle agglomeration type)

性、成品率、水分) 进行考察，以验证是否符合相关要求。结果显示，3 批乳腺康颗粒大小、粒度均匀，外观呈米黄色，气微香，溶化性、成品率、水分各项指标均符合 2020 年版《中国药典》相关项下的规定，结果见表 8。

3 讨论

3.1 提取方法的选择

乳腺康颗粒组方药味复杂，在提取方法的选择上，应当根据处方的主治和功用，选择恰当的提取溶媒，确定适宜的提取方法。方中君药白芍

表 8 乳腺康颗粒优化工艺验证

Tab 8 Validation of optimized process for Ruxiankang granule

批号	外观性状	溶化性	成品率 /%	水分 /%
20231001	米黄色颗粒, 粒度均匀, 气微香	全部溶解	95.13	5.24
20231002	米黄色颗粒, 粒度均匀, 气微香	全部溶解	94.28	5.35
20231003	米黄色颗粒, 粒度均匀, 气微香	全部溶解	94.47	5.03

中所含的芍药苷、当归中所含的阿魏酸均为水溶性有效成分, 丹参所含水溶性成分丹参素、丹酚酸具有活血化瘀的功效^[13-14]。故本文针对配伍特点, 分析药物有效成分和药理作用等, 确定本方以水作为乳腺康颗粒的提取溶媒, 不仅节省能源, 还可以降低成本, 适合大工业生产, 实用价值高。煎煮法是最常用的提取方法之一, 提取范围广, 可以不同程度地提取处方中大部分有效成分。综上, 本研究采用水煎煮法对方药材的有效成分进行提取。

3.2 色谱条件的确定

本文使用 HPLC 法测芍药苷、阿魏酸和丹酚酸 B 含量时, 确定流动相为乙腈 (A) 与 0.01% 磷酸溶液 (B), 当梯度洗脱条件为“0 ~ 17 min, 14% A; 17 ~ 45 min, 14% ~ 30% A”时, 3 种成分保留时间合理且各峰形较好, 故确定其为本研究洗脱梯度。芍药苷、阿魏酸、丹酚酸 B 的最大吸收波长分别为 230、316、286 nm, 故选择多波长同时检测法, 分别在各成分对应出峰时间前后使用各自最大吸收波长, 即 0 ~ 18 min, 230 nm; 18 ~ 30 min, 316 nm; 30 ~ 45 min, 286 nm, 结果发现丹酚酸 B 峰形较差且基线不平稳, 当最终调整为 0 ~ 18 min, 230 nm; 18 ~ 30 min, 316 nm; 30 ~ 45 min, 360 nm 时, 各色谱峰分离度适中且色谱峰峰形较好, 故最终选择上述条件作为本研究检测波长。

3.3 成型工艺设计

本研究采用单因素试验结合 Box-Behnken 响应面法优化乳腺康颗粒的成型工艺, 根据回归分析确定影响因子, 以颗粒成型率、流动性、吸湿率和溶化性综合为评价指标作为响应值作响应面和等高曲线图, 可有效减少试验次数, 并可直观体现影响因素之间的交互作用, 以得到一组最优的成型条件^[15]。研究表明, 辅料加入量与乙醇加入量彼此的相互作用最为明显, 对颗粒成型均具有显著影响。试验最终确定了辅料与药粉比例为 1.8 : 1, 85% 乙醇作为湿润剂, 乙醇加入量为药辅总量的 36% 的最佳成型条件。按最佳条件所

制备颗粒成型率高且满足药典要求的标准, 说明所建立的模型精确可靠, 证实响应面法可以实现乳腺康颗粒辅料配合比优化, 具有准确性和科学性, 能有效指导工艺参数的优化, 有利于提高生产效率。

参考文献

- [1] 张董晓, 赵文洁, 黄巧, 等. 中医外科名家房世鸿治疗乳腺增生症经验总结 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35 (9): 4308-4310.
- [2] 唐天乐, 孙阳, 李宇华, 等. 平消胶囊对乳腺增生模型大鼠的药效学研究 [J]. 中南药学, 2020, 18 (11): 1837-1841.
- [3] Danforth DN. Molecular profile of atypical hyperplasia of the breast [J]. Breast Cancer Res Treat, 2018, 167 (1): 9-29.
- [4] 韩荣春, 史素影, 童小慧, 等. 芍药在中国和日本的本草学比较 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36 (2): 1109-1111.
- [5] 潘祥龙, 郝二伟, 谢金玲, 等. 活血化瘀中药调节血瘀证的分子机制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24 (24): 227-234.
- [6] 李伟霞, 泥文娟, 王晓艳, 等. 当归化学成分、药理作用及其质量标志物 (Q-marker) 的预测分析 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40 (6): 40-27, 274.
- [7] 王艳杰, 郝嘉平, 代巧妹, 等. 中药夏枯草药理作用及其分子机制研究进展 [J]. 中医药导报, 2022, 28 (2): 118-122.
- [8] 尚坤, 李敬文, 常美月, 等. 延胡索药理作用研究 [J]. 吉林中医药, 2019, 39 (1): 108-110.
- [9] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 108-109.
- [10] 田欢, 惠荣, 李环娜, 等. 定眩饮颗粒剂的制备工艺考察 [J]. 中国药师, 2022, 25 (6): 1072-1076.
- [11] 卞振华, 张文明, 唐静月, 等. 正交试验优选生津润燥合剂制备工艺 [J]. 中国药师, 2021, 24 (1): 152-155.
- [12] 胡晓红, 刘冬涵, 杨雪颖, 等. 响应面法优化苓桂术甘汤的提取工艺 [J]. 中南药学, 2023, 21 (9): 2367-2372.
- [13] 李国玉, 梁昊都, 管彤, 等. 固肾止遗双子颗粒的制备工艺研究 [J]. 中南药学, 2023, 21 (3): 700-705.
- [14] 马晓晶, 杨健, 马桂荣, 等. 中药丹参的现代化研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47 (19): 5131-5139.
- [15] 刘蕾蕾, 刘冬涵, 张紫薇, 等. Box-Behnken 响应面法优化芍药甘草汤的提取工艺 [J]. 中南药学, 2021, 19 (6): 1113-1119.

(收稿日期: 2023-11-03; 修回日期: 2023-12-28)

甘草查尔酮 A 在比格犬体内的药代动力学研究

杨文娜, 翟亚楠*, 邵寒冰, 卢伟 (沧州市疾病预防控制中心, 河北 沧州 061000)

摘要: **目的** 建立测定比格犬血浆中甘草查尔酮 A 含量的 UPLC-MS/MS 分析方法, 并研究甘草查尔酮 A 单剂量静脉注射和灌胃给药后在比格犬体内药代动力学模式。**方法** 比格犬以 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量分别进行静脉注射和灌胃给药甘草查尔酮 A, 采集不同时间点的血浆样品, 采用 UPLC-MS/MS 方法测定血浆中甘草查尔酮 A 的浓度, 采用 DAS 2.1.1 版软件对血药浓度-时间曲线进行统计矩拟合, 计算甘草查尔酮 A 的药代动力学参数。**结果** 血浆中甘草查尔酮 A 的线性回归方程为: $Y = 0.039X + 0.1959$, $R^2 = 0.9997$, 线性范围为 $2 \sim 2000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。静脉注射甘草查尔酮 A 在血浆中的半衰期 $t_{1/2}$ 为 6.57 h, 药时曲线下面积 ($AUC_{0 \sim t}$) 为 $1665 \text{ h} \cdot \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 平均驻留时间 ($MRT_{0 \sim t}$) 为 5.68 h, 清除率 (CL) 为 $2106 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。灌胃给药甘草查尔酮 A 在血浆中的 $t_{1/2}$ 为 8.23 h, $AUC_{0 \sim t}$ 为 $397 \text{ h} \cdot \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $MRT_{0 \sim t}$ 为 9.35 h, 口服生物利用度为 23.8%。**结论** 甘草查尔酮 A 在血浆的 UPLC-MS/MS 方法具有良好的专属性与灵敏度。灌胃给药甘草查尔酮 A 具有良好的血浆暴露量及口服生物利用度。

关键词: 甘草查尔酮 A; 药代动力学; UPLC-MS/MS; 口服生物利用度

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)07-1785-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.017

Pharmacokinetics of licochalcone A in Beagle dogs

YANG Wen-na, ZHAI Ya-nan*, SHAO Han-bing, LU Wei (Cangzhou Center for Disease Control and Prevention, Cangzhou Hebei 061000)

Abstract: Objective To develop an UPLC-MS/MS to determine the concentration of licochalcone A in the plasma of Beagle dogs and the pharmacokinetics after a single dose intravenous and oral administration of licochalcone A, respectively. **Methods** Beagle dogs were intravenously and orally administered licochalcone A ($3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). The plasma samples were collected at different time spots. UPLC-MS/MS was used to determine the concentration of licochalcone A in the plasma. The plasma concentration-time curves were fit by DAS 2.1.1 software to determine the pharmacokinetic parameters of licochalcone A. **Results** The linear regression of licochalcone A in the plasma was: $Y = 0.039X + 0.1959$, $R^2 = 0.9997$, and the linear range was $2 \sim 2000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. In the intravenous administration model, the half-life ($t_{1/2}$) of licochalcone A in the plasma was 6.57 h, the area under the drug-time curve ($AUC_{0 \sim t}$) was $1665 \text{ h} \cdot \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the mean residence time ($MRT_{0 \sim t}$) was 5.68 h, and the clearance rate (CL) was $2106 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$. While in the oral administration model, the $t_{1/2}$ of licochalcone A in the plasma was 8.23 h, $AUC_{0 \sim t}$ was $397 \text{ h} \cdot \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the $MRT_{0 \sim t}$ was 9.35 h, and the oral bioavailability was 23.8%. **Conclusion** The UPLC-MS/MS method is accurate and applicable for the pharmacokinetic study of licochalcone A in the plasma of Beagle dogs. Licochalcone A shows moderate oral bioavailability.

Key words: licochalcone A; pharmacokinetics; UPLC-MS/MS; oral bioavailability

甘草查尔酮 A (licochalcone A, LCA) 是从甘草根中提取出来的黄酮类化合物, 结构如图 1 所示, 是甘草的主要活性成分之一, 具有多种药

理学活性, 包括抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抗菌、抗寄生虫及成骨活性、免疫调节、解痉等^[1-10]。以往研究证明甘草查尔酮 A 具有良好的药物开发

基金项目: 沧州市科技计划自筹经费项目 (No.222106158)。

作者简介: 杨文娜, 女, 主要从事分析检验研究, email: 604482996@qq.com *通信作者: 翟亚楠, 女, 硕士研究生, 主管检验师, 主要从事分析检验及实验室质量管理, email: ziyanu@163.com

价值, 而药代动力学研究是研究的重要组成部分, 对甘草查尔酮 A 在比格犬模型的药代动力学研究鲜有报道^[11-12]。因此, 课题组在比格犬上采用静脉注射和灌胃两种方式进行甘草查尔酮 A 的给药, 采用 UPLC-MS/MS 方法, 对甘草查尔酮 A 在比格犬体内药代动力学进行研究, 并关注甘草查尔酮 A 的口服生物利用度, 为甘草查尔酮 A 进一步开发提供科学依据与数据支撑^[13-14]。

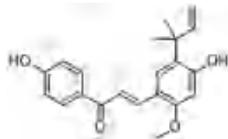


图 1 甘草查尔酮 A 的结构式

Fig 1 Structural formula of licochalcone A

1 材料

1.1 仪器

LC-MS/MS 5500 + AB SCIEX 三重四极杆质谱 (美国 AB SCIEX 公司); XM-1800T 超声细胞粉碎机 (昆山小美超声仪器有限公司); DHJF-2005 低温恒温搅拌反应浴 (郑州长城科工贸有限公司); Allegra 64R Centrifuge 高速冷冻离心机 (美国 Beckman Coulter 公司); DNA120 离心浓缩仪 (美国 Thermo Fisher 公司); Vortex 6 涡旋仪 (海门 Kylin-Bell 公司); EX224 电子天平 (上海奥豪斯仪器有限公司, 精度: 0.1 mg); FC5306 迷你掌中离心机 (上海奥豪斯仪器有限公司)。

1.2 试剂

甘草查尔酮 A (MCE, 纯度 $\geq 99\%$); 盐酸苯海拉明 (纯度: 99.8%)、EDTA-K₂ (上海毕得医药有限公司); 甲醇、乙腈 (色谱纯, 天津康科德公司); 羟丙基 β -环糊精 (药用级, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。

1.3 实验动物

健康雌性比格犬, 体重 12 ~ 16 kg [佳森 (天津) 实验动物有限公司, 生产许可证号: SYXK (津) 2022-0001], 于南开大学实验动物中心进行饲养 [动物使用合格证: SYXK (津) 2019-0001], 适应性喂养 1 周。本动物实验均遵循动物实验伦理要求。

2 方法与结果

2.1 方法条件

2.1.1 色谱条件及质谱条件 色谱柱为 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 mm \times 50 mm, 5 μ m); 柱温 40 $^{\circ}$ C; 进样体积 2 μ L; 流速为 0.4 mL \cdot min⁻¹; 流动相 A: 5% 乙腈-95% 水溶液 (含 0.1% 甲酸); 流动相 B: 乙腈; 梯度洗脱程序为: 10% \rightarrow 95%B (0 ~ 2 min) \rightarrow 95%B (2 ~ 3 min) \rightarrow 95% \rightarrow 10%B (3 ~ 3.1

min) \rightarrow 10%B (3.1 ~ 4 min)。

采用 5500 + AB SCIEX API: TJ-INS-LCMS004 三重四极杆质谱进行检测, 离子源: 电喷雾离子源; 电离模式: 负离子模式; 碰撞气: 8 L \cdot min⁻¹; 气帘气: 35 L \cdot min⁻¹; 离子源气 1 (GS1): 55 L \cdot min⁻¹; 离子源气 2 (GS2): 55 L \cdot min⁻¹; 离子喷雾电压: -4.5 kV; 源温度: 300 $^{\circ}$ C; 操作模式: 多反应监测 (MRM) 模式; 甘草查尔酮 A 的母离子-子离子: m/z 337.1 \rightarrow 118.9; 盐酸苯海拉明的母离子-子离子: m/z 254 \rightarrow 165。甘草查尔酮 A 的 DP 值和 CE 值分别为: -120 V 和 -35 eV; 盐酸苯海拉明的 DP 值和 CE 值分别为: -52 V 和 -17 eV。

2.1.2 对照品溶液配制 精密称取甘草查尔酮 A, 加入 50% 甲醇溶解并定容, 配制成质量浓度为 1 g \cdot L⁻¹ 的甘草查尔酮 A 储备液, 并用 50% 甲醇将储备液稀释为 2、4、20、80、320、800、1800、2000 μ g \cdot L⁻¹ 的系列标准液及 2、6、100、1600 μ g \cdot L⁻¹ 的系列质控工作液, 于 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

精密称取盐酸苯海拉明对照品一份, 用甲醇溶解并定容, 配制为 1 g \cdot L⁻¹ 的盐酸苯海拉明对照品储备液, 并用甲醇稀释为质量浓度为 50 μ g \cdot L⁻¹ 的内标工作液, 于 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.1.3 样品的采集与前处理

① 血浆样品的采集: 精密称量供试品 135.0 mg, 加入 20% 羟丙基 β -环糊精至 45 mL, 混匀, 配制为 3 mg \cdot mL⁻¹ 的灌胃给药溶液。比格犬实验前 12 h 禁食不禁水, 以 3 mg \cdot kg⁻¹ 的剂量尾静脉注射和灌胃给药。每个时间点采集全血约 1 mL, EDTA-K₂ 抗凝, 采集后立即放置于冰上, 采集后 0.5 h 内, 4 $^{\circ}$ C、2000 g 离心 5 min, 吸取全部血浆放置于贴好标签的 EP 管中, 置于冰上, 并于 0.5 h 内 -10 ~ -30 $^{\circ}$ C 冻存在 24 h 后转至 -60 ~ -90 $^{\circ}$ C 冰箱冻存。

② 血浆样品的前处理: 取 30 μ L 空白血浆/血浆样品, 加入 30 μ L 工作液/甲醇, 加入 200 μ L 内标工作液 (甲醇溶液配制), 涡旋 3 min, 4 $^{\circ}$ C、3000 g 离心 10 min, 取上清液 30 μ L 加入 270 μ L 的 50% 甲醇溶液, 混匀, 即可。

2.2 方法学验证

2.2.1 专属性 取空白血浆按照“2.1.3”项下方法前处理, 制备比格犬的空白血浆样品、含内标的血浆样品; 取“2.1.2”项下血浆标准液以及给药后的血浆样品, 按照“2.1.3”项下方法前处理, 制备含对照品的血浆样品和比格犬给药 3 h 后的血浆样品, 进样检测。结果甘草查尔酮 A 和盐酸苯海拉明的血浆典型色谱图见图 2, 甘草查尔酮 A 的保留时间为 4.10 min, 盐酸苯海拉明的保留时间为

2.05 min, 空白血浆中的内源性物质不干扰含量测定, 表明本方法专属性良好, 能满足定量要求。

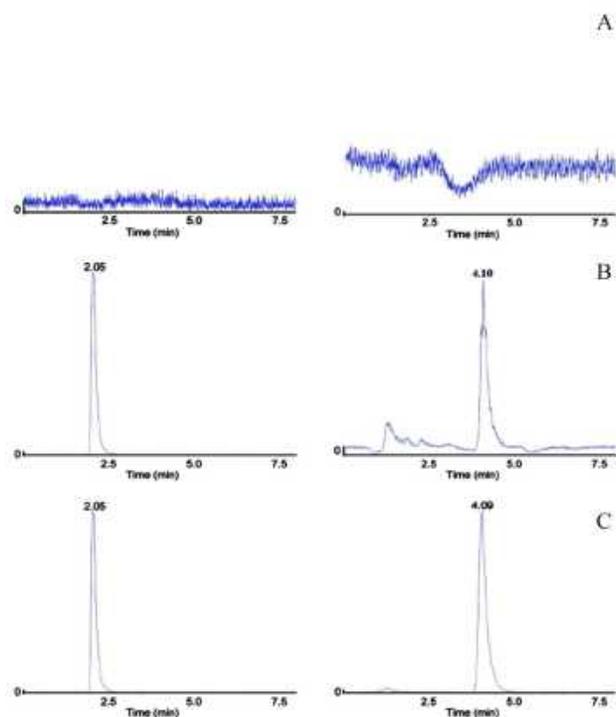


图2 甘草查尔酮A和盐酸苯海拉明典型谱图
Fig 2 Typical LC spectra of licochalcone A and diphenhydramine
A. 空白血浆样品 (blank plasma sample); B. 空白血浆样品中添加甘草查尔酮A和盐酸苯海拉明 (blank plasma sample with licochalcone A and diphenhydramine); C. 灌胃甘草查尔酮A 3 h后血浆样品 (plasma sample of 3 hours after the oral administration of licochalcone A)

2.2.2 线性范围 取“2.1.2”项下血浆系列标准液, 按“2.1.1”和“2.1.3”项下方法进行前处理和测定。以待测物与内标的峰面积比值为纵坐标, 待测物浓度为横坐标, 采用最小二乘法进行线性回归分析, 确定线性范围与定量下限。结果甘草查尔酮A在血浆中的线性回归方程为: $Y = 0.039X + 0.1959$, $R^2 = 0.9997$, 线性范围是 $2 \sim 2000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 定量下限为 $2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2.3 准确度和精密度 取“2.1.2”项下定量下限、低、中、高4个浓度的系列质控工作液按“2.1.3”项下方法处理, 进样测定分析。平行操作6份样本, 测定3 d。根据当日标准曲线, 分别计算质控样品的测得浓度, 与标示浓度对照, 计算准确度, 并计算批内与批间精密度。结果甘草查尔酮A的批内检测准确度在 $97.0\% \sim 106.7\%$, 精密度在 $2.0\% \sim 3.6\%$; 批间检测准确度在 $102.6\% \sim 105.5\%$, 精密度在 $1.0\% \sim 4.3\%$ 。批内和批间的精密度和准确度均满足生物样品测定的相关要求。

2.2.4 提取回收率和稳定性 取“2.1.2”项下低、中、高3个浓度 ($2, 6, 100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的质控标准工作液, 按“2.1.3”项下方法处理后测定, 记录峰

面积 A 。取空白血浆, 按“2.1.3”项下方法进行前处理, 取得上清后, 加入“2.1.1”项下的甘草查尔酮A系列标准液配制成相应浓度, 进样测定, 记录峰面积 B 。按 A/B 计算低、中、高3个质控样品的提取回收率。取“2.1.2”项下 $2, 6, 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 3个浓度的血浆质控标准工作液, -80°C 反复冻融3次, 按“2.1.3”项下方法前处理后进样测定, 测定甘草查尔酮A的含量, 结果见表1, 甘草查尔酮A在比格犬血浆提取回收率在 $93.7\% \sim 94.5\%$, 稳定性在 $94.5\% \sim 97.5\%$ 。均满足生物样品测定的相关要求。

2.3 比格犬体内药代动力学研究

取6只比格犬, 按照“2.1.3”项下方法, 静脉注射实验组分别于给药前、给药后5 min, 0.25、0.5、1、2、4、8、12、24和48 h 静脉取血 $200 \mu\text{L}$; 灌胃实验组分别于给药前、给药后0.25、0.5、1、2、4、8、12、24和48 h 静脉取血 $200 \mu\text{L}$, 所有血样进行前处理, 再按照“2.1.1”项下方法测定含量。将测得的甘草查尔酮A血药浓度-时间曲线数据用 DAS 2.1.1 版进行统计拟合, 采用非房室模型统计矩方法计算得出系列药代动力学参数 $t_{1/2}$ 、 C_{max} 、 $AUC_{0 \sim t}$ 、 $MRT_{0 \sim t}$ 、 CL 、 $F\%$ 等。

结果比格犬体内静脉注射与灌胃给药甘草查尔酮A的血药浓度-时间曲线见图3, 其相关药代动力学参数见表2。

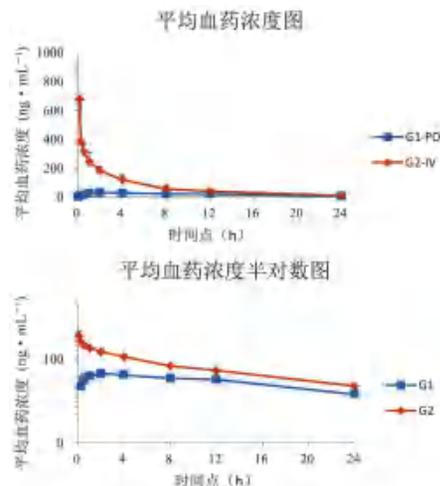


图3 静脉注射和灌胃给药甘草查尔酮A在比格犬体内的血药浓度-时间曲线

Fig 3 Drug time curve of intravenous injection and gavage administration of licochalcone A in Beagle dogs

3 讨论

甘草查尔酮A在治疗病原体感染、抗炎、调节免疫、抗恶性肿瘤等领域均显示出广阔的开发潜力。给药方式与药代动力学的研究是药物开发的重要部分。但是甘草查尔酮A在比格犬上的药代动力学研究, 尤其是口服生物利用度研究目前还没有报道。本文建立一个灵敏度高、专属性良好的

表 1 甘草查尔酮 A 在比格犬血浆中的回收率和稳定性研究

Tab 1 Recovery and stability of licochalcone A in Beagle dogs

配制浓度 / (ng · mL ⁻¹)	回收率			稳定性	
	测定值 / (ng · mL ⁻¹)	回收率 / %	RSD / %	测定值 / (ng · mL ⁻¹)	RSD / %
2	1.89 ± 0.064	94.5	3.4	1.89 ± 0.14	7.4
6	5.62 ± 0.18	93.7	3.2	5.85 ± 0.49	8.3
100	93.7 ± 2.7	93.7	2.9	96.5 ± 6.7	6.9

表 2 静脉注射和灌胃给药甘草查尔酮 A 在比格犬体内的药代动力学参数

Tab 2 Pharmacokinetic parameters of intravenous injection and gavage administration of licochalcone A in Beagle dogs

静脉注射参数		平均值	灌胃给药参数		平均值
$AUC_{0 \sim t} / (h \cdot ng \cdot mL^{-1})$		1665 ± 266	$C_{max} / (ng \cdot mL^{-1})$		29.8 ± 10.1
$AUC_{0 \sim \infty} / (h \cdot ng \cdot mL^{-1})$		1767 ± 304	t_{max} / h		2
$MRT_{0 \sim t} / h$		5.68 ± 0.171	$AUC_{0 \sim t} / (h \cdot ng \cdot mL^{-1})$		397 ± 91.7
$MRT_{0 \sim \infty} / h$		7.26 ± 0.309	$AUC_{0 \sim \infty} / (h \cdot ng \cdot mL^{-1})$		461 ± 109
$t_{1/2} / h$		6.57 ± 0.761	$MRT_{0 \sim t} / h$		9.35 ± 0.448
$CL / (mL \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1})$		2106 ± 360	$MRT_{0 \sim \infty} / h$		13.0 ± 0.500
$V_{ss} / (mL \cdot kg^{-1})$		15 251 ± 2254	$t_{1/2} / h$		8.23 ± 0.648
			$F / \%$		23.8

UPLC-MS/MS 定量方法, 可用于测定静脉注射和灌胃两种给药方式比格犬血浆中甘草查尔酮 A 的含量, 能满足生物样品的分析要求。课题组采用该方法对甘草查尔酮 A 的体内药代动力学进行了初步研究。研究结果显示, 静脉注射甘草查尔酮 A 后即刻达到了最大血药浓度, 呈现单房室模型特点, 属于中等清除速率的药物。灌胃给药甘草查尔酮 A 吸收速率中等, 具有较为良好的血浆暴露行为及口服生物利用度。本研究为甘草查尔酮 A 的药理学研究提供了较可靠的药代动力学数据, 可为药物开发与临床研究提供参考。

参考文献

[1] Laphanuwat P, Kongpetch S, Senggunprai L, et al. licochalcone A induces cholangiocarcinoma cell death via suppression of Nrf2 and NF-κB signaling pathways [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2022, 23 (1): 115-123.

[2] Hao YL, Zhang CP, Sun YY, et al. licochalcone A inhibits cell proliferation, migration, and invasion through regulating the PI3K/AKT signaling pathway in oral squamous cell carcinoma [J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 4427-4435.

[3] Fan XL, Guan GQ, Wang J, et al. licochalcone A induces cell cycle arrest and apoptosis via suppressing MAPK signaling pathway and the expression of FBXO5 in lung squamous cell cancer [J]. Oncol Rep, 2023, 50 (6): 214-219.

[4] Wang LQ, Yang R, Yuan BC, et al. The antiviral and antimicrobial activities of licorice, a widely-used Chinese herb [J]. Acta Pharm Sin B, 2015, 5 (4): 310-315.

[5] Chen XR, Liu ZJ, Meng RZ, et al. Antioxidative and anticancer properties of licochalcone A from licorice [J]. J Ethno Pharmacol, 2017, 198: 331-337.

[6] Liu XH, Ma Y, Wei XD, et al. Neuroprotective effect of licochalcone A against oxygen-glucose deprivation/reperfusion in

rat primary cortical neurons by attenuating oxidative stress injury and inflammatory response via the SIRT1/Nrf2 pathway [J]. J Cell Biochem, 2018, 119 (4): 3210-3219.

[7] 赵虹, 蒋江涛, 郑秋生. 甘草查耳酮 A 药理作用研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2013, 38 (22): 3814-3818.

[8] Bortolotto LF, Barbosa FR, Silva G, et al. Cytotoxicity of transchalcone and licochalcone A against breast cancer cells is due to apoptosis induction and cell cycle arrest [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 85: 425-433.

[9] Lv HM, Ren H, Wang LD, et al. Lico A Enhances Nrf2-Mediated defense mechanisms against t-BHP-induced oxidative stress and cell death via Akt and ERK activation in RAW264.7 cells [J]. Oxid Med Cell Longev, 2015, 2015: 709845-709814.

[10] Egler J, Lang F. licochalcone a induced suicidal death of human erythrocytes [J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 37 (5): 2060-2070.

[11] Weng QH, Chen LG, Ye LX, et al. Determination of licochalcone A in rat plasma by UPLC-MS/MS and its pharmacokinetics [J]. Acta Chrom, 2019, 31 (4): 262-265.

[12] Choi JS, Choi JS, Choi DH. Effects of licochalcone A on the bioavailability and pharmacokinetics of nifedipine in rats: possible role of intestinal CYP3A4 and P-gp inhibition by licochalcone A [J]. Biopharm Drug Dispos, 2014, 35 (7): 382-390.

[13] Dall' Ogllo F, Fabbrocini G, Tedeschi A, et al. licochalcone A in combination with salicylic acid as fluid based and hydroxy-complex 10% cream for the treatment of mild acne: a multicenter prospective trial [J]. Clin Cosmet Linv Derm, 2019, 12: 961-967.

[14] Kulthanan K, Trakanwittayarak S, Tuchinda P, et al. A double-blinded, randomized, vehicle-controlled study of the efficacy of moisturizer containing licochalcone A, decanediol, L-carnitine, and salicylic acid for prevention of acne relapse in Asian population [J]. Biomed Res Int, 2020, 11: 1010-1029.

(收稿日期: 2023-11-07; 修回日期: 2023-12-25)

盐酸米安色林鼻用制剂的处方前研究

王猜^{1, 2}, 谷福根^{2*}, 杨蕾^{1, 2} (1. 内蒙古医科大学药学院, 呼和浩特 010110; 2. 内蒙古医科大学附属医院, 呼和浩特 010050)

摘要: **目的** 研究盐酸米安色林 (MIA) 的平衡溶解度、表观油水分配系数 (P_{app}) 及溶液化学稳定性, 并筛选其经鼻黏膜吸收的理想促渗剂, 为制备该药鼻腔给药新制剂提供理论依据。**方法** 采用 HPLC 法测定 MIA 的含量及其在不同溶剂中的平衡溶解度; 通过摇瓶法测定药物在正辛醇-水及正辛醇-不同 pH 缓冲液体系中的 P_{app} ; 在 80 °C 高温下放置, 测定 MIA 在不同 pH 缓冲液中的降解百分率; 以离体羊鼻黏膜为模型, 采用 Franz 扩散池法完成药物体外渗透试验。**结果** MIA 在不同溶剂中平衡溶解度的大小顺序为: 丙二醇 > 5%DM- β -CD > 5%HP- β -CD > 1%F68 > PEG400 > 5%SBE- β -CD > 水; 药物在酸性与中性 pH 下其平衡溶解度较大, 而在碱性 pH 下很低。在正辛醇-不同 pH 缓冲液体系中, MIA 的 P_{app} 随介质 pH 升高, 呈增大趋势; 此外, 当介质 pH < 6.0 时, MIA 溶液的化学稳定性较差, 当 pH \geq 6.0 时, 其稳定性较好。4 种候选促渗剂对 MIA 经鼻黏膜吸收均有明显促进作用, 以 5%DM- β -CD 的促渗效果最佳。**结论** 3 种 β -CD 水溶性衍生物均可增加 MIA 的溶解度; pH 值对 MIA 的平衡溶解度、 P_{app} 及溶液化学稳定性均有明显影响; DM- β -CD 可能是 MIA 鼻用制剂的理想增溶剂及促渗剂。**关键词:** 盐酸米安色林; 鼻腔给药; 处方前研究; 平衡溶解度; 表观油水分配系数; 溶液化学稳定性; 促渗剂

中图分类号: R94

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)07-1789-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.018

Preformulation research on the nasal preparation of mianserin hydrochloride

WANG Cai^{1, 2}, GU Fu-gen^{2*}, YANG Lei^{1, 2} (1. School of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110; 2. Affiliated Hospital, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050)

Abstract: Objective To determine the equilibrium solubility, apparent oil-water partition coefficient (P_{app}) and solution chemical stability of mianserin hydrochloride (MIA), and to screen the optimal permeation enhancer of the drug absorption via nasal mucosa to provide a theoretical basis for MIA nasal preparation. **Methods** The concentration of MIA and its equilibrium solubility in various solvents were determined by HPLC. The P_{app} values of MIA in the *n*-octanol-water and *n*-octanol different pH buffer systems were measured with the shaking bottle method. The degradation percentage of MIA aqueous solution was also determined under different pHs and at various time intervals after it was placed at 80 °C. Finally, the ideal permeation enhancer of MIA absorption across the nasal mucosa was sieved by Franz diffusion cell method, with in vitro sheep nasal mucosa as the test model. **Results** The equilibrium solubility of MIA in different solvents followed the order below: propylene glycol > 5%DM- β -CD > 5%HP- β -CD > 1%F68 > PEG400 > 5%SBE- β -CD > purified water. Meantime, the equilibrium solubility of MIA was larger at acidic or neutral pH media, but quite low at alkaline pH environment. In *n*-octanol different pH buffer systems, the P_{app} values of MIA generally increased with pH. MIA aqueous solution was less stable in acidic pHs below 6.0, and

作者简介: 王猜, 女, 硕士, 主要从事鼻黏膜给药新剂型研究, email: 849861613@qq.com * 通信作者: 谷福根, 男, 主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事鼻腔给药新剂型研究, email: gfg1968@163.com

most stable at pH ≥ 6.0 . The candidate permeation enhancers all exhibited an obvious permeation-improving effect on MIA absorption through the nasal mucosa, but 5%DM- β -CD proved to be the strongest. **Conclusion** The three water-soluble β -CD derivatives all improve the solubility of MIA. The pH obviously affects the equilibrium solubility of the drug, its P_{app} and aqueous solution chemical stability. DM- β -CD may be an ideal solubilizing agent and permeation enhancer for MIA nasal preparation.

Key words: mianserin hydrochloride; nasal dosing; preformulation study; equilibrium solubility; apparent oil-water partition coefficient; solution chemical stability; permeation enhancer

盐酸米安色林 (mianserin hydrochloride, MIA) 是一种新型四环类抗抑郁药, 为去甲肾上腺素 (NE) 能及特异性 5-HT₂ 受体拮抗剂, 可增加突触间隙 NE 和 5-HT 的浓度, 同时还可阻断 H₁ 受体, 因而具有显著的抗抑郁作用, 良好的镇静催眠和抗焦虑作用^[1]。与三环类抗抑郁药相比, MIA 起效快, 其抗胆碱能不良反应轻, 心脏毒性小, 临床可用于治疗各种类型的抑郁症, 尤其适用于伴有失眠、焦虑的抑郁症和伴有心血管疾病的老年抑郁症患者^[2]。目前, MIA 在国内外上市的制剂仅有片剂, 口服虽易吸收, 但首过效应显著, 生物利用度小, 影响其临床疗效^[3-4]。鼻腔给药具有吸收起效快、无肝首过效应、生物利用度高及脑靶向递药等特点, 是抗抑郁药等中枢神经系统疾病治疗药的理想给药途径, 受到国内外的高度关注^[5-7]。MIA 分子量低, 使用剂量小, 符合鼻用制剂的基本要求, 但其水溶性差, 限制其制成溶液型鼻用制剂。此外, 鼻腔给药要求药物具有适宜的脂溶性及较高的鼻黏膜渗透性。基于上述分析, 本文对 MIA 在不同介质中的平衡溶解度、表观油水分配系数 (P_{app})、溶液化学稳定性及其经鼻黏膜吸收的促渗剂等进行研究, 以期为今后制备该药物的溶液型鼻腔给药新剂型提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AT 高效液相色谱仪 (日本岛津公司); TP-6 智能透皮试验仪 (天津市鑫洲科技有限公司); PHS-3C 型 pH 计 (上海仪电科学仪器有限公司); KQ5200E 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); Arioso UP 900 型超纯水器 (韩国 Human 公司); 101 型电热鼓风干燥箱 (北京市永光明医疗仪器厂); SHZ-88A 型往复水浴恒温振荡器 (江苏太仓实验设备厂); H1750R 离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

1.2 试药

MIA 对照品 (纯度: 99.0%, 批号: 220601, 山东恒尚诺德医药科技有限公司); 羟丙基- β -环糊精 (HP- β -CD, 纯度: 98%, 批号: 202110320, 山东新大精细化工有限公司); 磺丁基- β -环糊精 (SBE- β -CD, 纯度: 99%, 批号: 202009123, 山东新大生物科技有限公司); 二甲基- β -环糊精 (DM- β -CD, 纯度: 98%, 批号: 1708021, 山东滨州智源生物科技有限公司); 泊洛沙姆 188 (F68, 批号: WPAK527B, 德国 BASF 公司); 0.9% 氯化钠注射液 (批号: 2104153404, 石家庄四药有限公司); 正辛醇 (分析纯, 批号: 20201020, 天津市化学试剂有限公司); 丙二醇 (分析纯, 批号: 2018403, 天津市北联精细化学品开发有限公司); PEG400 (分析纯, 批号: 1904325, 天津市信诺威化工有限公司); 水为超纯水, 甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 MIA 含量测定方法的建立

2.1.1 色谱条件^[8-9] 色谱柱: InertSustain C₁₈ 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-水 (90:10); 流速: 1.0 mL \cdot min⁻¹; 检测波长: 279 nm; 柱温: 35 $^{\circ}$ C; 进样量: 10 μ L。

2.1.2 专属性试验 以水为溶剂, 配制质量浓度为 100 μ g \cdot mL⁻¹ 的 MIA 溶液, 取 1 mL 于 10 mL 具塞玻璃试管中, 分别以 0.1 mol \cdot L⁻¹ 盐酸溶液、0.1 mol \cdot L⁻¹ 氢氧化钠溶液、pH 4.0 磷酸盐缓冲液、3% H₂O₂ 溶液以及水稀释至刻度, 其中以 3% H₂O₂ 稀释的样品置于室温、避光下放置, 其余样品均于 80 $^{\circ}$ C 恒温条件下放置, 分别于 0、8、12、24、36、48 h 取样。其中, 以强酸、强碱制备的样品均需用对应相同浓度的碱、酸进行中和后, 按“2.1.1”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图, 结果见图 1。在该色谱条件下, MIA 峰形良好, 保留时间适宜, 且与降解产物分离完全, 表明该方法的特异性强。

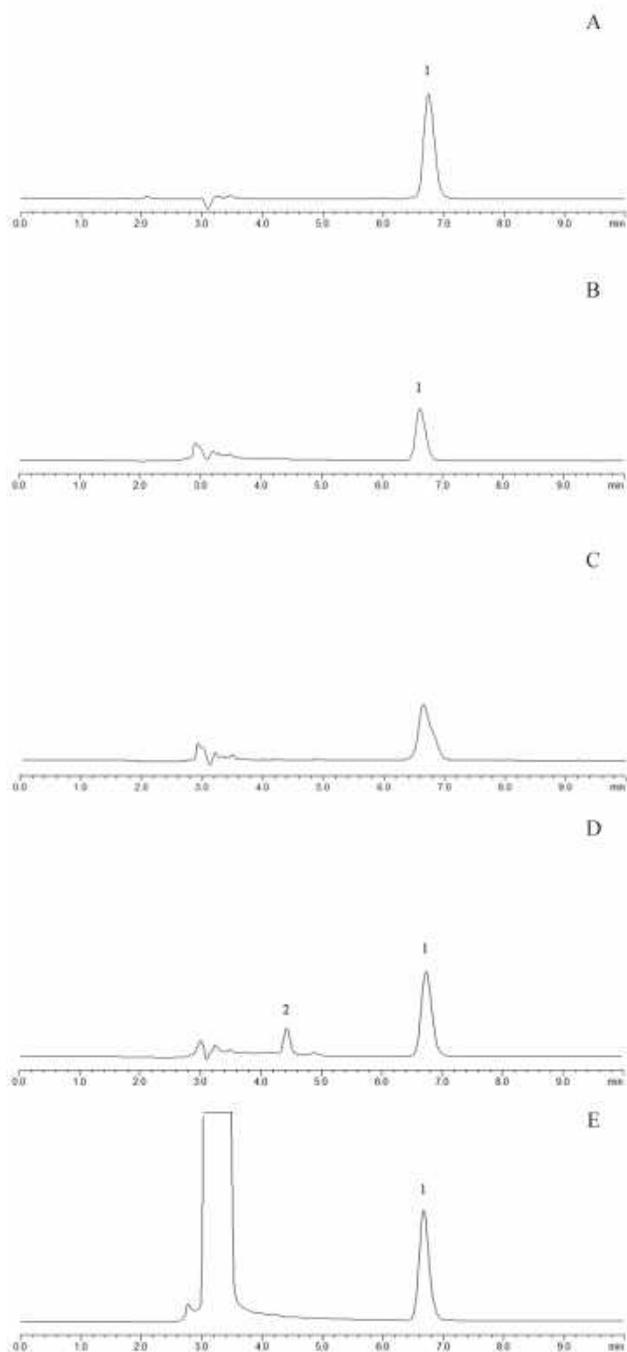


图 1 MIA 的专属液相色谱图

Fig 1 Specific HPLC chromatograms of MIA

A. 水溶液 (aqueous solution); B. 强酸降解 (strong acid degradation); C. 强碱降解 (strong alkaline degradation); D. pH 4.0 磷酸盐缓冲液 (pH 4.0 PBS); E. 氧化降解 (oxidative degradation); 1. 盐酸米安色林 (mianserin hydrochloride); 2. 降解产物 (degradation product)

2.1.3 标准曲线的制备 精密称取 MIA 对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 以水为溶剂, 配制质量浓度为 $1000.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药物储备液。取 MIA 储备液, 以水稀释适当倍数, 分别制得质量浓度为 5.0、10.0、20.0、40.0、60.0、80.0、100.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MIA 系列对照品溶液, 进样分析,

记录峰面积。以药物质量浓度 ($C, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 峰面积 (A) 为纵坐标, 求得回归方程为: $A = 5085.2C + 119.95$ ($r = 0.9999$), 表明 MIA 在 $5.0 \sim 100.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与峰面积呈良好的线性关系。

2.1.4 精密度试验 分别取质量浓度为 10.0、40.0、80.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MIA 对照品溶液, 日内重复测定 5 次, 连续测定 5 d, 计算方法的日内精密度及日间精密度 RSD 值。结果测得方法的日内精密度 RSD 在 $0.10\% \sim 0.24\%$ ($n = 5$), 日间精密度 RSD 在 $0.55\% \sim 1.1\%$ ($n = 5$), 表明该方法的精密度良好。

2.1.5 加样回收试验 配制质量浓度为 20.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MIA 对照品溶液, 分别精密加入质量浓度为 5、25、45 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MIA 对照品溶液, 进样分析, 求得实测浓度并计算加样回收率。结果该方法的加样回收率分别为 99.60%、102.59%、100.78%, RSD 分别为 0.86%、0.64%、1.1% ($n = 3$), 表明该方法的准确度高。

2.2 MIA 平衡溶解度的测定

为考察常用水溶性 β -CD 衍生物和表面活性剂 F68 对 MIA 的增溶作用以及 pH 值对药物溶解度的影响, 分别取水, 5%DM- β -CD 溶液, 5%HP- β -CD 溶液, 5%SBE- β -CD 溶液, 1%F68 溶液, 丙二醇, PEG400 以及 pH 值分别为 2.0、4.0、6.8、8.0、10.0 的磷酸盐缓冲液^[10] 1 mL 于 1.5 mL EP 管中, 均加入过量药物, 超声处理 30 min 后, 再于 30 °C 恒温下振摇 24 h, 使溶解达平衡。取出, 离心 10 min, 取上清液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 弃去初滤液, 取续滤液用水稀释适当倍数后, 进样分析, 求得 MIA 的浓度并计算药物平衡溶解度, 结果见表 1。可见, 在 30 °C 下, MIA 在不同溶剂中的平衡溶解度大小次序为: 丙二醇 > 5%DM- β -CD > 5%HP- β -CD > 1%F68 > PEG400 > 5%SBE- β -CD > 水; 在 pH 2.0、4.0、6.8、8.0、10.0 磷酸盐缓冲液中, MIA 的平衡溶解度在酸性 pH 介质中大于在碱性介质中, 在近中性 pH 值下其平衡溶解度最大 (见表 1)。

表 1 MIA 在不同介质中的平衡溶解度 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 Equilibrium solubility of MIA in different media ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

介质	平衡溶解度 / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	介质	平衡溶解度 / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
水	14.81 ± 1.05	pH 2.0 缓冲液	7.43 ± 0.51
5%SBE- β -CD	15.43 ± 1.01	pH 4.0 缓冲液	6.99 ± 0.57
5%HP- β -CD	28.93 ± 2.14	pH 6.8 缓冲液	20.54 ± 0.27
5%DM- β -CD	32.44 ± 0.65	pH 8.0 缓冲液	0.28 ± 0.11
1%F68	20.89 ± 1.22	pH 10.0 缓冲液	0.01 ± 0.001
丙二醇	118.43 ± 7.86	PEG400	17.58 ± 1.13

2.3 MIA 的 P_{app} 的测定

2.3.1 油相与水相的制备 取水和 pH 分别为 4.0、5.0、6.8、8.0 的缓冲液（水相），置于分液漏斗中，再加入正辛醇（油相），充分振摇，使油、水两相分配达平衡，静置，分离油、水两相，备用。

2.3.2 平衡时间的确定及 P_{app} 的测定 取质量浓度为 $1000.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MIA 储备液 1.0 mL，置于 25 mL 量瓶中，分别加入上述不同水相至刻度，摇匀，即得质量浓度为 $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MIA 系列水相溶液。取 MIA 水相溶液 15 mL，置于具塞锥形瓶中，加入相同体积油相，密塞，置于 25 °C 恒温水浴振荡器中振摇，分别于第 0、15、30、45、60、120、180 min 在水相中取样，用 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤，取续滤液，进样分析，测定水相中 MIA 的浓度，结果见表 2。可见，药物在正辛醇-水及正辛醇-pH 4.0 ~ 6.8 缓冲液系统中，分配平衡时间为 120 min，而在正辛醇-pH 8.0 缓冲液系统中，分配平衡时间仅为 30 min。

表 2 MIA 在正辛醇-水及正辛醇-不同 pH 缓冲液中分配平衡时间
Tab 2 Distribution equilibrium time of MIA in *n*-octanol-water and *n*-octanol different pH buffer systems

时间/min	MIA 浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)				
	pH 4.0	pH 5.0	pH 6.8	pH 8.0	水
0	37.48	38.68	32.83	36.19	31.49
15	23.02	23.75	12.05	1.52	13.94
30	17.43	17.25	8.78	0.87	12.23
45	12.75	11.64	4.60	0.79	11.14
60	9.61	7.90	2.58	—	9.40
120	4.93	2.98	1.03	—	6.87
180	4.52	2.59	1.01	—	6.58

将不同 pH 值的 MIA 水相溶液与相同体积油相混合，在 25 °C 恒温振荡器中振荡，使药物分配达平衡，在水相中取样，同法处理后进样分析，测定不同 pH 水相中药物的浓度。根据公式： $P_{app} = (C_0 - C_1) / C_1$ ，计算药物的 P_{app} 值。式中， C_0 是水相中药物初始浓度， C_1 是分配平衡后水相中药物浓度。可见，MIA 在正辛醇-水中的 P_{app} 为 3.58，而在正辛醇-不同 pH 缓冲液中，其 P_{app} 值随 pH 的增大呈逐渐增大的趋势，结果见表 3。

表 3 MIA 在不同 pH 下的表观油水分配系数

溶液	P_{app}	$\log P_{app}$
pH 4.0	6.60	0.82
pH 5.0	11.98	1.08
pH 6.8	30.87	1.49
pH 8.0	40.60	1.61
水	3.58	0.55

2.4 MIA 溶液化学稳定性的研究

取质量浓度为 $1000.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MIA 储备液 0.1 mL，置于 10 mL 具塞试管中，分别加入 pH 值为 4.0、5.0、6.0、6.8、8.0、10.0 缓冲液至刻度，摇匀，密封，置于 80 °C 恒温条件下，分别于第 0、36、48、60、72 h 取样，放冷至室温后，进样分析，计算反应液中 MIA 的浓度及其降解百分率，结果见图 2。可见，MIA 溶液在 pH 6.0 及以上时，其化学稳定性良好，在 pH 6.0 以下时稳定性变差，在 pH 5.0 时稳定性最差。譬如，在 pH 5.0 时，80 °C 下放置 36 h，约有 20% 的药物发生降解，而在 pH 6.0 及以上时，即使在高温下放置 72 h 仍未见降解产物产生。

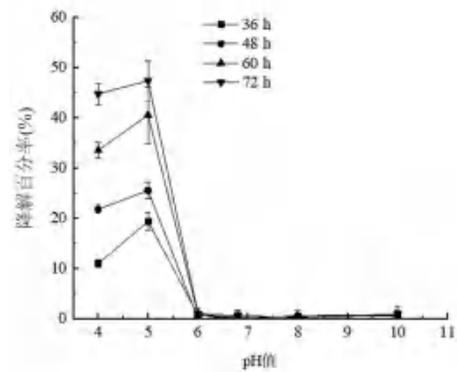


图 2 MIA 溶液在不同 pH 下的降解曲线 ($n = 3$)

Fig 2 Degradation curve of MIA solution under different pH conditions ($n = 3$)

2.5 MIA 经鼻黏膜体外渗透试验

以离体羊鼻黏膜为试验模型，采用 Franz 扩散池法^[11]进行 MIA 体外渗透试验。取新宰杀绵羊头，打开鼻腔，小心分离羊鼻黏膜，洗净后，保存于 4 °C 生理盐水中，备用。

2.5.1 促渗剂种类筛选^[12] 以 DM- β -CD、HP- β -CD、SBE- β -CD 及 F68 为候选促渗剂，试验前将羊鼻黏膜剪成适宜大小，黏膜侧向上，固定于 Franz 扩散池的接口处。供给池内加入质量浓度为 0.1% 的供试液 1.5 mL，内含浓度为 5% 的候选促渗剂，以生理盐水为接收液，测定温度为 34 °C，搅拌速率为 $300 \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ ，分别于 40、60、90、120、180、240 min，从接收池内取样 1.0 mL，立即补充等体积等温生理盐水，测定样品中 MIA 的浓度。MIA 的定量方程为： $A = 5434.3C - 229.28$ ($r = 0.9999$)，在 $0.25 \sim 60.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与峰面积呈良好的线性关系，方法的日内精密度 RSD 在 0.13% ~ 1.7%，日间精密度 RSD 在 0.18% ~ 2.9% ($n = 5$)。

依据药物累计渗透量 ($Q_n, \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$) 计算

公式^[13]: $Q_n = (C_n V_0 + \sum_{i=1}^{n-1} C_i V_i) / A$, 计算不同时间 MIA 的 Q_n 。式中, V_0 为接收液体积 (15.5 mL), C_n 为第 n 个取样点的药物浓度, V_i 为第 i 次取样体积 (1.0 mL), C_i 为第 i 次取样时接收液中药物浓度, A 为有效透过面积 (1.13 cm^2)。最后, 以 Q_n 对时间 t 作图, 绘制 MIA 经羊鼻黏膜的渗透曲线, 结果见图 3。可见, 4 种候选促渗剂对 MIA 经离体羊鼻黏膜的渗透均有明显促进作用。在相同浓度下, DM- β -CD 的促渗效果最强, F68 的促渗效果次之, SBE- β -CD 与 HP- β -CD 的促渗效果相似, 但均大于空白对照组。

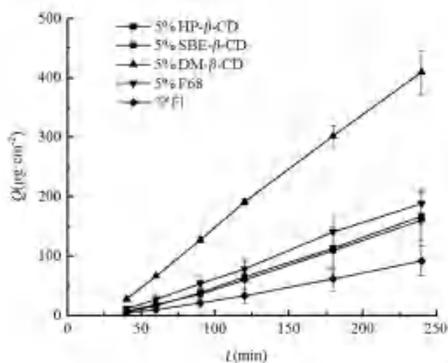


图 3 不同促渗剂对 MIA 经羊鼻黏膜渗透量的影响 ($n = 3$)

Fig 3 Effect of different permeation enhancers on the permeation of MIA across the nasal mucosa of sheep ($n = 3$)

2.5.2 促渗剂浓度的筛选 分别考察浓度为 1.0%、3.0%、5.0%、7.0% 的 DM- β -CD 对 MIA 的促渗效果, 结果见图 4。可见, 当 DM- β -CD 浓度较低时, 随着浓度的增加, 其促渗效果随之增强; 当其浓度为 5.0% 时, 促渗效果达最大。继续增加浓度, 其促渗效果反而降低。因此, 宜选择 5.0% DM- β -CD 作为 MIA 经鼻黏膜吸收的最佳促渗剂。

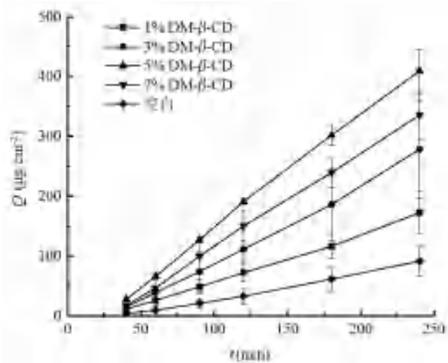


图 4 DM- β -CD 浓度对 MIA 经羊鼻黏膜渗透量的影响 ($n = 3$)

Fig 4 Effect of DM- β -CD concentration on the permeation of MIA across the nasal mucosa of sheep ($n = 3$)

3 讨论

本文建立了一种专属性强、线性范围宽、精

密度与准确度高、操作简单而经济的 MIA 的 HPLC-UV 含量测定方法。在此色谱条件下, 流动相中避免使用磷酸盐缓冲液、辛烷磺酸钠、三乙胺等化学试剂, 也不需调节 pH 值^[9, 14], 药物色谱峰形对称, 保留时间适宜, 且与降解产物分离良好。此外, 专属性试验结果表明, MIA 在强酸、强碱及氧化条件下化学稳定性良好。但在 pH 4.0 弱酸性条件下, MIA 的稳定性较差, 出现降解产物, 且其保留时间较短, 推测其极性较原药明显增大, 结构可能为 8-羟基-MIA^[15], 但产生此特殊现象的原因和药物的降解机制尚不清楚。

MIA 的水溶性较差, 本文考察了鼻用制剂中最常用的 3 种 β -CD 水溶性衍生物 (包括 DM- β -CD、HP- β -CD、SBE- β -CD) 对其平衡溶解度的影响, 研究发现, 上述 3 种 β -CD 衍生物均显示对 MIA 有增溶作用, 其中, 以 DM- β -CD 的增溶效果最好, HP- β -CD 次之, SBE- β -CD 最差, 这可能与 β -CD 母体结构上取代基不同, 导致形成药物-环糊精包合物的难易程度各异有关^[16]。此外, 考虑到 MIA 化学结构上属于强酸弱碱盐, 因此, 考察 pH 值对其平衡溶解度的影响, 结果发现, 该药物在弱酸性 pH 下, 其溶解度较大; 但仍低于在水中的溶解度; 在中性 pH 下, 其溶解度最大, 在弱碱及强碱性 pH 下, 其溶解度很差。这可能与药物同时具有两个 pK_a 值, 在不同 pH 下, 药物的解离形式和解离程度不同有关^[15]。本文还测定了药物在 1%F68 溶液、丙二醇以及 PEG400 中的溶解度, 发现表面活性剂 F68 也有一定增溶作用, MIA 在丙二醇中有良好的溶解度, 而在 PEG400 中的溶解度较差, 仅略高于在水中的溶解度。

MIA 的 P_{app} 测定结果显示, 该药物在正辛醇-pH 4.0 ~ 8.0 缓冲液体系中, 其 P_{app} 随着体系 pH 的升高, 总体呈现增加趋势, 这可能与药物在较高 pH 值时, 其解离程度变小, 主要以分子形式存在, 导致脂溶性增大有关。通常认为, 当药物 $\log P_{app}$ 为 $-1 < \log P_{app} < 2$ 时, 药物易通过被动扩散透过生物膜^[17], 本研究测得 MIA 在正辛醇-水及正辛醇-不同 pH 缓冲液体系中的 $\log P_{app}$ 值均在 0.55 ~ 1.61, 完全落在上述理想油水分配系数范围内, 故可预测该药易于通过鼻黏膜而吸收。

MIA 溶液化学稳定性研究结果显示, 当 pH < 6.0 弱酸性时, 该药物溶液的稳定性较差, 而 pH 在 6.0 及以上时, MIA 溶液的稳定性良好, 这与专属性试验结果一致。药物经离体羊鼻黏膜渗透试验表明, 4 种候选促渗剂均对 MIA 经鼻黏膜吸收有

明显的促进作用,其大小次序为:5%DM- β -CD > 5%F68 > 5%HP- β -CD \approx 5%SBE- β -CD > 空白对照。此外,DM- β -CD 的浓度对其促渗作用也有较大影响,当其浓度在 1% ~ 5%,随着浓度增加,其促渗效果逐渐增加;继续增加浓度至 7%时,其促渗效果反而下降,这与文献报道结果类似^[17],故 5%DM- β -CD 应为该药物经鼻吸收的最佳促渗剂。

为避免对鼻黏膜产生刺激性,鼻用制剂的理想 pH 值应在 4.5 ~ 6.5^[18]。再综合考虑 MIA 的溶解度、油水分配系数及其溶液化学稳定性等因素,制备 MIA 鼻用溶液型制剂的 pH 值选定 6.0 左右为宜。另外,本研究还发现,DM- β -CD 既可作为药物的增溶剂,又可用作理想促渗剂,当其浓度为 5%时,其促渗效果最佳,且此时药物的溶解度可达 32.44 mg · mL⁻¹。目前上市的 MIA 片剂的最小规格为 10 mg,人单侧鼻腔每次最大给药体积为 200 μ L^[19],因此,当处方中含有 5%DM- β -CD 时,药物的溶解度即可满足制备溶液型鼻用制剂的要求,至于其在体内的促渗效果还有待后续体内药动学研究进行验证。综上,本研究为今后研制 MIA 溶液型鼻用新制剂奠定了坚实的理论基础。

参考文献

- [1] 王来海,曾宪奎,原海燕. 盐酸米安色林片[J]. 中国新药杂志, 2002, 11 (11): 891-892.
- [2] 郭放,姚远,易正辉. 米安色林药理学机制及临床应用研究进展[J]. 河北医药, 2022, 44 (22): 3480-3485.
- [3] Nawata S, Kohyama N, Uchida N, et al. The pharmacokinetics of mianserin suppositories for rectal administration in dogs and healthy volunteers: a pilot study [J]. J Pharm Health Care Sci, 2016, 2: 12.
- [4] Timmer CJ, Pourbaix S, Desager JP, et al. Absolute bioavailability of mianserin tablets and solution in healthy humans [J]. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 1985, 10 (4): 315-323.
- [5] Laffleur F, Bauer B. Progress in nasal drug delivery systems [J]. Int J Pharm, 2021, 607: 120994.
- [6] 丛志新,李爽,王毅,等. 氢溴酸西酞普兰鼻用温敏凝胶剂在大鼠体内的药动学及脑内递药研究[J]. 中国药理学杂志, 2020, 55 (17): 1444-1449.
- [7] 李爽,樊慧敏,丛志新,等. 盐酸文拉法辛鼻喷剂在大鼠脑组织内药动学及脑靶向性研究[J]. 中南药学, 2020, 18 (3): 369-372.
- [8] 朱丽,贾首时,张连成. 盐酸米安色林片的 HPLC 法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2014, 45 (6): 570-572.
- [9] Sfair LL, Graeff JS, Paim CS, et al. Photodegradation kinetics, cytotoxicity assay and determination by stability-indicating HPLC method of mianserin hydrochloride [J]. Die Pharmazie, 2012, 67 (6): 490-494.
- [10] 张婷婷,徐文,胡生亮,等. 水飞蓟宾在不同介质中平衡溶解度和表观油水分配系数的测定[J]. 中国药理学杂志, 2006, 41 (20): 1569-1571.
- [11] Salamanca CH, Barrera-Ocampo A, Lasso JC, et al. Franz diffusion cell approach for pre-formulation characterisation of ketoprofen semi-solid dosage forms [J]. Pharmaceutics, 2018, 10 (3): 148.
- [12] 杨蕾,彭俊文,谷福根. 尼可地尔鼻腔给药制剂的处方前研究[J]. 中南药学, 2023, 21 (10): 2591-2596.
- [13] 张灵娜,张敏新,宋洪涛. 聚乙烯醇-盐酸普萘洛尔多孔水凝胶的制备及体外经皮渗透研究[J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39 (17): 1755-1758.
- [14] 陈青,刘明洁,许竹梅. HPLC 法测定盐酸米安色林片含量[J]. 药学研究, 2015, 34 (7): 394-395, 428.
- [15] Sfair LL, Gobetti C, Sangoi MS, et al. Micellar electrokinetic chromatographic method for mianserin hydrochloride and analysis of degradation products by mass spectrometry [J]. Chem Pharm Bull, 2012, 60 (11): 1387-1394.
- [16] Belica-Pacha S, Miłowska K, Ionov M, et al. The impact of β -cyclodextrin on biological and chemical properties of mianserin hydrochloride in aqueous solution [J]. J Mol Liq, 2020, 314: 113589.
- [17] 李爽,谷福根,丛志新,等. 左乙拉西坦 pH 敏感鼻用凝胶的制备及体外质量评价[J]. 中国药理学杂志, 2021, 56 (7): 559-566.
- [18] Behl CR, Pimplaskar HK, Sileno AP, et al. Effects of physicochemical properties and other factors on systemic nasal drug delivery [J]. Adv Drug Deliv Rev, 1998, 29 (1-2): 89-116.
- [19] Bitter C, Katja Suter-Zimmermann K, Surber C. Nasal drug delivery in humans [J]. Curr Probl Dermatol, 2011, 40: 20-35.

(收稿日期: 2023-11-08; 修回日期: 2023-12-28)

壮药血风藤提取物的抗炎作用及机制研究

陈晓军^{1,2}, 华全东¹, 农云开¹, 严克俭^{1*} (1. 广西壮族自治区中医药研究院, 南宁 530022; 2. 广西壮族自治区中药质量标准研究重点实验室, 南宁 530022)

摘要: **目的** 研究壮药血风藤提取物的抗炎作用及其机制。**方法** 采用二甲苯致耳肿胀实验、棉球肉芽肿实验、冰醋酸致腹腔毛细血管通透性实验建立小鼠炎症模型, 设空白组, 地塞米松阳性对照组 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 及血风藤提取物高、中、低剂量组 (8.0 、 4.0 、 $2.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 考察血风藤提取物的抗炎作用。采用脂多糖 (LPS) 建立小鼠急性肺损伤 (ALI) 模型, 分组同上, 另设模型组, 各组小鼠灌胃相应药物, 每日 1 次, 连续 7 d, 末次给药后 1 h, 模型组和各给药组小鼠腹腔注射 LPS ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 以复制小鼠 ALI 模型, 注射 24 h 后, 用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测小鼠血清肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1β (IL- 1β)、核因子 κB (NF- κB) 的含量, 测定小鼠肺组织 TNF- α 含量及肺指数。**结果** 与空白组相比, 血风藤提取物各剂量组可明显降低二甲苯致小鼠耳肿胀度、棉球肉芽肿质量 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 明显降低冰醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组相比, 血风藤提取物各剂量组可明显降低小鼠血清 TNF- α 、IL- 1β 、NF- κB 含量, 肺组织 TNF- α 含量及肺指数 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 壮药血风藤提取物对 3 种炎症模型小鼠具有明显抗炎作用, 其抗炎作用机制可能与降低 TNF- α 、IL- 1β 、NF- κB 含量, 调控 NF- κB 炎症信号通路, 抑制炎症反应有关。

关键词: 壮药; 血风藤; 提取物; 抗炎; 脂多糖; 急性肺损伤; 作用机制

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)07-1795-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.019

Anti-inflammation effect of the extract of a Zhuang medicine *Ventilago leiocarpa* and its related mechanism

CHEN Xiao-jun^{1,2}, HUA Quan-dong¹, NONG Yun-kai¹, YAN Ke-jian^{1*} (1. *Institute of Chinese Medicine and Pharmaceutical Sciences, Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530022*; 2. *Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards, Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530022*)

Abstract: Objective To determine the anti-inflammation effect and mechanism of the extract of a Zhuang medicine *Ventilago leiocarpa*. **Methods** The mouse inflammation model was established by ear swelling induced by xylene, cotton ball granuloma, and peritoneal capillary permeability induced by glacial acetic acid. The mice were divided into a blank group, a dexamethasone positive control group ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), and high-, medium- and low-dose extract groups (8.0 , 4.0 , and $2.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). The mouse model of acute lung injury (ALI) induced by lipopolysaccharide (LPS) was established. The groups were the same as the above, and another model group was set up. The mice in each group were given corresponding medicine intragastrically once daily for 7 consecutive days. One hour after the last administration, the mice in the model group and each medicine group were intraperitoneally injected LPS ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) to replicate the mouse ALI model. Twenty-four hours after the intraperitoneal injection, the contents of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin- 1β (IL- 1β), and

基金项目: 广西中药质量标准研究重点实验室学科重点攻关课题 (No. 桂中重自 201405); 广西科技基地和人才专项项目 (No. 桂科 AD16380013)。

作者简介: 陈晓军, 男, 主任药师, 主要从事中药药理及毒理学研究, email: chenj015@163.com *通信作者: 严克俭, 男, 副主任药师, 主要从事中药资源开发研究, email: 1596947235@qq.com

nuclear factor- κ B (NF- κ B) in the serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The content of TNF- α in the lung tissue and lung coefficient were measured. **Results** Compared with the blank group, the degree of ear swelling and the quality of cotton ball granuloma induced by xylene in the mice was decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the peritoneal capillary permeability induced by glacial acetic acid of mice was significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in each dose group. Compared with the model group, the contents of TNF- α , IL-1 β , and NF- κ B in the serum, the lung coefficient and the contents of TNF- α in the lung tissue were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in each dose group. **Conclusion** The extract of *Ventilago leiocarpa* has significant anti-inflammation effect on three inflammation mouse models. Its anti-inflammation mechanism may be associated with decreasing the contents of TNF- α , IL-1 β , and NF- κ B, regulates NF- κ B inflammatory signaling pathway, and inhibit inflammation reaction.

Key words: Zhuang medicine; *Ventilago leiocarpa*; extract; anti-inflammation; lipopolysaccharide; acute lung injury; mechanism

血风藤为鼠李科植物翼核果 (*Ventilago leiocarpa* Benth.) 的干燥根和根茎, 别名红穿破石、翼核果、铁牛入石、青筋藤、紫九牛等, 是广西壮族民间常用药, 其性甘, 味甜、淡, 微温, 归肝、肾经^[1], 具有祛风毒、除湿毒、清热利湿、舒经络、强筋骨、补气血等功效, 壮族民间常用于治疗跌打损伤、腰肌劳损、风湿、痹病、四肢麻木、贫血、血虚经闭、月经不调、肾结石等病症^[2-3]。血风藤在广西主要分布于金秀、来宾、梧州、宁明、邕宁、忻城等地, 在广东、福建、云南、海南等省亦有分布^[4]。血风藤的化学成分主要有大黄素、大黄素甲醚、翼核果醌、翼核果素、鸢尾苷元、羽扇豆醇、香豆素等蒽醌类、黄酮苷类、酚类、生物碱类化合物^[5-11], 现代药理学研究表明, 血风藤具有抗肿瘤作用, 对 S180 肿瘤细胞、肝癌 HepG2 细胞具有明显的抑制作用^[12-15], 可抑制人慢性髓样白血病细胞 K562 的活性^[16]; 并具有抗氧化、抗肝纤维化、抗酒精所致急性肝损伤等药理作用^[17-21], 然而关于其抗炎作用及机制的研究鲜有报道。本研究采用二甲苯致小鼠耳肿胀实验、小鼠棉球肉芽肿实验、冰醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性实验, 考察血风藤提取物的抗炎活性, 并采用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 建立小鼠急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 模型初步探讨其抗炎作用机制, 为该壮药的进一步开发及临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

FA1004 型电子分析天平 (上海精密科学仪器有限公司天平仪器厂); 722 型可见分光光度计 (上

海精密科学仪器有限公司); Multiskan Go 酶标仪 (Thermo Fisher Scientific 公司); Universal 320R 低温高速冷冻离心机 (Hettich 科学仪器公司); DC-TQNSG30 实验型提取浓缩机 (上海达成实验设备有限公司); RE-2002 型旋转蒸发器 (上海予华仪器设备有限公司); DZF-6210 型真空干燥箱 (上海一恒科学仪器有限公司)。

1.2 试药

血风藤药材购自广西来宾市金秀县, 经广西壮族自治区中医药研究院赖茂祥研究员鉴定为鼠李科植物翼核果 (*Ventilago leiocarpa* Benth.) 的干燥根和根茎。标本保存于广西壮族自治区中医药研究院药材标本馆 (编号: 20150119)。醋酸地塞米松片 (批号: 200307, 规格: 0.75 mg/片, 浙江仙琚制药股份有限公司); 二甲苯 (批号: 20190926, 广东光华科技股份有限公司); 伊文思蓝 (批号: C12962851, 上海麦克林生化科技有限公司); 生理氯化钠溶液 (批号: L220091206, 四川科伦药业股份有限公司); 冰醋酸 (批号: 191026, 广东西陇科学股份有限公司); 乙醚 (批号: 2019110401, 成都市科隆化学品有限公司); LPS (批号: 0000126450, 美国 Sigma 公司); 肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、核因子 κ B (NF- κ B) 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定试剂盒 (武汉菲恩生物科技有限公司)。

1.3 实验动物

SPF 级 KM 小鼠, 体重 18 ~ 22 g [湖南省长沙天勤生物技术有限公司, 动物生产许可证号为 SCXK (湘) 2019-0014]。动物饲养环境温度 22 ~ 25 $^{\circ}$ C, 湿度 50% ~ 70%, 12 h/12 h 明暗光照交替, 小鼠饲养期间自由摄食饮水。

2 方法

2.1 血风藤提取物的制备

取血风藤药材 3.5 kg 切碎, 加 10 倍量水浸泡 1 h 后, 加热煮沸提取 2 h, 过滤, 再每次加入 10 倍量水, 加热煮沸提取 2 次, 每次煮沸提取 2 h, 过滤, 合并 3 次过滤提取液后, 加热浓缩得浓缩液, 加入乙醇使浓缩液乙醇浓度为 70% ~ 75%, 静置 24 h 醇沉后过滤, 得醇沉淀液, 用 70% ~ 75% 乙醇洗涤沉淀 3 次, 过滤, 滤液合并, 用旋转蒸发器减压蒸馏, 浓缩回收乙醇, 得浸膏, 浸膏真空干燥后粉碎, 得血风藤提取物干膏粉 395 g。

2.2 二甲苯致小鼠耳肿胀实验

取雄性 KM 小鼠 50 只, 按体重随机分为空白组, 阳性对照组 (地塞米松 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 及血风藤提取物高、中、低剂量组 (8.0 、 4.0 、 $2.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组 10 只。各给药组小鼠分别灌胃给药, 空白组小鼠灌胃给予等体积蒸馏水, 每日 1 次, 连续 7 d。末次给药 1 h 后, 在各组小鼠右耳内外两面涂抹二甲苯 0.1 mL 致炎, 30 min 后, 脱颈椎处死小鼠, 沿耳廓基线剪下两耳, 用 8 mm 直径打孔器在两耳廓相同部位凿取两圆耳片, 于电子分析天平上精确称取质量, 计算耳肿胀度及耳肿胀抑制率^[22-23]。耳肿胀度 (mg) = 右耳片质量 - 左耳片质量; 耳肿胀抑制率 (%) = (空白组平均耳肿胀度 - 给药组平均耳肿胀度) / 空白组平均耳肿胀度 $\times 100\%$ 。

2.3 小鼠棉球肉芽肿实验

取 KM 小鼠 50 只, 按“2.2”项下方法分组, 每组 10 只 (雌雄各半), 各组小鼠采用乙醚麻醉, 用碘伏消毒小鼠腹部右侧腹股沟处, 切开长 0.5 cm 小口, 用手术镊将经高压灭菌过的 10 mg 棉球植入皮下, 缝合皮肤切口, 手术后次日各组小鼠开始灌胃给药, 按“2.2”项下方法给药, 末次给药 1 h 后, 采用脱颈椎处死小鼠, 打开原切口, 剥离取出棉球肉芽组织, 置 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温烘烤 12 h, 于电子分析天平上精确称取质量, 计算肉芽肿质量及肉芽肿抑制率^[24-25]。肉芽肿质量 (mg) = 带肉芽组织的棉球质量 - 棉球原始质量; 肉芽肿抑制率 (%) = (空白组平均肉芽肿质量 - 给药组平均肉芽肿质量) / 空白组平均肉芽肿质量 $\times 100\%$ 。

2.4 冰醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性实验

取小鼠 50 只, 按“2.2”项下方法分组给药, 每组 10 只 (雌雄各半)。末次给药 1 h 后, 各组

小鼠尾静脉注射 0.5% 伊文思蓝生理盐水溶液 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 腹腔注射 0.6% 冰醋酸溶液 0.2 mL/只 , 20 min 后, 脱颈椎处死小鼠, 腹腔注射生理盐水 6 mL/只 , 轻柔小鼠腹部使腹部内液体充分混匀, 剪开腹腔, 用吸管吸取腹腔液, 收集腹腔液后加入生理盐水定容至 10 mL , 以 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液, 于 590 nm 波长处测定光密度 (OD) 值^[26], 计算光密度抑制率。光密度抑制率 (%) = $(OD_{\text{空白组}} - OD_{\text{给药组}}) / OD_{\text{空白组}} \times 100\%$ 。

2.5 脂多糖 (LPS) 致小鼠急性肺损伤 (ALI) 模型实验

取 KM 小鼠 60 只, 按体重随机分为空白组, 模型组, 阳性对照组 (地塞米松, $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 及血风藤提取物高、中、低剂量组 (8.0 、 4.0 、 $2.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组 10 只 (雌雄各半), 按“2.2”项下方法给药, 空白组和模型组灌胃给予等体积蒸馏水, 每日 1 次, 连续 7 d。末次给药 1 h 后, 除空白组外, 其余各组小鼠均腹腔注射 LPS $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 进行建立小鼠 ALI 模型^[27], 24 h 后, 小鼠摘除眼球取血, 室温静置 1 h, 用低温高速冷冻离心机 $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上层血清, 采用 ELISA 法测定血清 TNF- α 、IL-1 β 、NF- κ B 含量; 动物眼球取血后, 脱颈椎处死小鼠, 解剖打开胸腔, 摘取动物两侧肺脏, 生理盐水清洗血迹, 滤纸吸干, 称量肺湿质量, 计算肺指数: 肺指数 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) = 小鼠两侧肺湿重 / 小鼠体重。称取 100 mg 肺组织, 用手术剪切碎后加入 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 预冷生理盐水, 在匀浆器内充分研磨组织匀浆, 制备 10% 肺组织匀浆, 匀浆于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上清液, 采用 ELISA 法测定肺组织中 TNF- α 的含量。

2.6 统计学方法

使用 SPSS 23.0 软件对数据进行统计分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD- t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 壮药血风藤提取物对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响

结果如表 1 所示, 与空白组比较, 阳性对照组和血风藤提取物各剂量组小鼠耳肿胀度均显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 耳肿胀抑制率均显著升高。

表 1 血风藤提取物对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
 Tab 1 Effect of the extract of *Ventilago leiocarpa* on xylene induced ear swelling in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	耳肿胀度 /mg	耳肿胀抑制率 /%
空白组	—	16.85 ± 3.86	—
阳性对照组	0.005	8.11 ± 2.12**	51.86
血风藤提取物高剂量组	8.0	12.41 ± 2.46**	26.35
血风藤提取物中剂量组	4.0	13.19 ± 2.51*	21.72
血风藤提取物低剂量组	2.0	13.35 ± 2.62*	20.77

注：与空白组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。
 Note: Compared with the blank group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3.2 壮药血风藤提取物对小鼠棉球肉芽肿的影响
 结果如表 2 所示，与空白组比较，阳性对照组和血风藤提取物各剂量组小鼠棉球肉芽肿重量均显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)，棉球肉芽肿抑制率均显著升高。

表 2 血风藤提取物对小鼠棉球肉芽肿的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
 Tab 2 Effect of the extract of *Ventilago leiocarpa* on cotton ball granuloma in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	肉芽肿重量 /mg	肉芽肿抑制率 /%
空白组	—	19.85 ± 4.32	—
阳性对照组	0.005	13.19 ± 2.36**	33.55
血风藤提取物高剂量组	8.0	15.06 ± 2.76**	24.13
血风藤提取物中剂量组	4.0	15.48 ± 3.54*	22.02
血风藤提取物低剂量组	2.0	15.87 ± 3.65*	20.05

注：与空白组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。
 Note: Compared with the blank group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 4 血风藤提取物对 LPS 致 ALI 模型小鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、NF- κ B 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
 Tab 4 Effect of the extract of *Ventilago leiocarpa* on the serum TNF- α , IL-1 β , and NF- κ B contents of ALI model mice induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	TNF- α / ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-1 β / ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	NF- κ B / ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
空白组	—	36.51 ± 12.12	71.16 ± 16.31	65.42 ± 15.58
模型组	—	115.31 ± 26.69**	173.27 ± 32.19**	391.72 ± 88.39**
阳性对照组	0.005	73.23 ± 15.34###	128.15 ± 22.46###	224.89 ± 38.97###
血风藤提取物高剂量组	8.0	81.18 ± 16.17###	133.66 ± 24.32###	286.12 ± 51.51###
血风藤提取物中剂量组	4.0	88.66 ± 17.85#	141.15 ± 26.54#	309.88 ± 51.44#
血风藤提取物低剂量组	2.0	91.39 ± 19.11#	143.25 ± 28.19#	313.78 ± 60.33#

注：与空白组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，### $P < 0.01$ 。
 Note: Compared with the blank group, ** $P < 0.01$ ；compared with the model group, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$.

4 讨论

炎症是机体组织对各种致炎因子刺激或组织损伤后发生的防御反应，炎症可造成组织和细胞的破坏，引起局部或全身性的炎症病变反应，改变机体正常生理指标，诱发多种急慢性炎症疾病^[28]。

LPS 为革兰氏阴性细菌细胞壁的组成成分之一，是内毒素的主要成分，有很强致炎作用，为

3.3 壮药血风藤提取物对冰醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性的影响

结果如表 3 所示，与空白组比较，阳性对照组和血风藤提取物各剂量组能明显降低冰醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性的光密度 (OD) 值 ($P < 0.05, P < 0.01$)，光密度抑制率均显著升高。

表 3 血风藤提取物对冰醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
 Tab 3 Effect of the extract of *Ventilago leiocarpa* on glacial acetic acid induced peritoneal capillary permeability in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	OD 值	抑制率 /%
空白组	—	0.512 ± 0.093	—
阳性对照组	0.005	0.296 ± 0.066**	42.19
血风藤提取物高剂量组	8.0	0.374 ± 0.075**	26.95
血风藤提取物中剂量组	4.0	0.413 ± 0.085*	19.34
血风藤提取物低剂量组	2.0	0.419 ± 0.087*	18.16

注：与空白组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。
 Note: Compared with the blank group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3.4 壮药血风藤提取物对 LPS 致 ALI 模型小鼠的影响

结果如表 4、5 所示，与空白组比较，模型组小鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、NF- κ B 含量明显升高，肺指数、肺组织 TNF- α 含量明显升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，阳性对照组和血风藤提取物各剂量组小鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、NF- κ B 含量明显降低，肺指数、肺组织 TNF- α 含量明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。

可引起炎症反应的重要致炎因子^[29]。ALI 是由直接或间接肺损伤引起的急性肺部疾病，其特点是肺部急性炎症^[30]，用 LPS 诱导的炎症反应可致肺部急性炎症，常用于建立 ALI 模型^[31]。TNF- α 主要由单核巨噬细胞及 T 淋巴细胞产生，IL-1 β 主要由活化的巨噬细胞和淋巴细胞合成并分泌^[32]，TNF- α 、IL-1 β 是重要的促炎细胞因子。

表 5 血风藤提取物对 LPS 致 ALI 模型小鼠肺指数、肺组织 TNF- α 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 5 Effect of the extract of *Ventilago leiocarpa* on the lung coefficient, TNF- α content in lung tissue of ALI model mice induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (g · kg ⁻¹)	肺指数 / (mg · g ⁻¹)	TNF- α / (pg · mL ⁻¹)
空白组	—	6.37 ± 0.53	56.37 ± 13.39
模型组	—	8.62 ± 0.86**	161.53 ± 45.32**
阳性对照组	0.005	7.24 ± 0.61 [#]	87.26 ± 20.65 ^{##}
血风藤提取物高剂量组	8.0	7.46 ± 0.62 [#]	108.74 ± 28.32 ^{##}
血风藤提取物中剂量组	4.0	7.68 ± 0.65 [#]	113.64 ± 32.34 [#]
血风藤提取物低剂量组	2.0	7.75 ± 0.68 [#]	120.74 ± 35.22 [#]

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

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

NF- κ B 广泛存在于各种类型细胞的胞质中，是关键性的核转录因子，具有多向性调节作用，可调节细胞炎症反应、应激反应、免疫应答反应等相关应激反应性基因的转录，通过 NF- κ B 信号通路参与调节炎症等多种疾病的发生、发展过程^[33]。TNF- α 是机体启动炎症反应的关键致炎细胞因子，主要启动炎症相关反应 NF- κ B 信号通路，刺激机体细胞产生各种炎症细胞因子，加剧炎症反应；IL-1 β 是机体重要的致炎细胞因子，具有广泛的生物学效应，能提高其他致炎因子的表达^[34]；NF- κ B 活化后，可使机体细胞释放 TNF- α 、IL-1 β 增多，促进各种细胞炎症因子的合成释放，使炎症反应不断加剧^[33]。本研究采用 LPS 致 ALI 小鼠模型，探讨壮药血风藤提取物的抗炎作用机制，结果显示，血风藤提取物各剂量组可明显降低 ALI 模型小鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、NF- κ B 含量，明显降低 ALI 模型小鼠肺指数、肺组织 TNF- α 含量，可见血风藤提取物其抗炎作用机制可能为降低促炎细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 及 NF- κ B 含量，调控 NF- κ B 炎症信号通路，减轻炎症反应。

综上所述，壮药血风藤提取物对二甲苯致小鼠耳肿胀、小鼠棉球肉芽肿、冰醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性等 3 种炎症模型小鼠具有明显的抗炎作用，其抗炎作用机制可能与降低 TNF- α 、IL-1 β 、NF- κ B 含量，调控 NF- κ B 炎症信号通路，抑制炎症反应有关。

参考文献

[1] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区壮药质量标准第二卷 (2011 年版) [S]. 南宁: 广西科学技

术出版社, 2011: 127-128.

[2] 钟鸣, 黄瑞松, 梁启成. 中国壮药学 [M]. 南宁: 广西民族出版社, 2016: 441.

[3] 钟鸣, 刘布鸣, 黄云峰. 壮瑶药鉴定手册 [M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2021: 418-421.

[4] 黄瑞松. 壮药选编 (上册) [M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2015: 237.

[5] 王雪芬, 卢文洁, 陈家源, 等. 翼核果化学成分的研究 [J]. 药学学报, 1993, 28 (2): 122-125.

[6] 王晓炜, 徐绥绪, 王喆星, 等. 翼核果中的新化合物 [J]. 沈阳药科大学学报, 1997, 14 (4): 296-297.

[7] 王晓炜, 徐绥绪, 王喆星, 等. 翼核果中化学成分研究 I [J]. 沈阳药科大学学报, 1996, 13 (3): 189-191.

[8] 应百平, 韩玖, 利国威, 等. 翼核果中蒽醌的研究 [J]. 药学学报, 1988, 23 (2): 126-129.

[9] 刘欢, 陈献. 红穿破石 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17 (7): 51-52.

[10] 梁冰, 覃兰芳, 赖茂祥, 等. HPLC 法测定广西壮药血风藤中大黄素的含量 [J]. 中医药导报, 2012, 18 (6): 68-69.

[11] 严其伟, 钟惠苹, 黄秋梅, 等. 瑶药紫九牛的化学成分分析及其总酚提取工艺的优化 [J]. 山东化工, 2022, 51 (7): 29-32.

[12] Cheng DH, Liu Y, Wang L. Antitumor effects of ethanol extract from *ventilago leiocarpa* Benth on sarcoma 180 tumor-bearing mice and possible immune mechanism [J]. Chin J Integr Med, 2021, 27 (12): 905-911.

[13] 刘璜, 陆国寿, 卢文杰, 等. 翼核果素对肝癌 HepG2 细胞凋亡及细胞骨架蛋白 F-actin 的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2017, 23 (6): 791-794.

[14] 徐宏, 陈金元, 陆国寿, 等. 翼核果素对人肝癌细胞 HepG2 裸鼠移植瘤的抑制作用及其机制探讨 [J]. 广西医科大学学报, 2020, 37 (2): 224-229.

[15] Liu Y, Cheng DH, Lai KD, et al. Ventilagin suppresses migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma cells by downregulating Pim-1 [J]. Drug Des Devel Ther, 2021, 15: 4885-4899.

[16] 徐绥绪, 王红燕, 王喆星, 等. 翼核果中两个微量新化合物及其生物活性 [J]. 沈阳药科大学学报, 1998, 15 (4): 250-253.

[17] 胡筱希, 陆国寿, 黄周锋, 等. 瑶药翼核果中翼核果素和翼核果醌 - I 的含量测定及抗氧化活性研究 [J]. 中国现代应用药学, 2019, 36 (7): 820-823.

[18] 钟惠苹, 陶彩艳, 蓝峻峰, 等. 瑶药紫九牛总生物碱的提取工艺优化及其抗氧化活性研究 [J]. 广东化工, 2022, 49 (15): 43-47.

[19] 黄建猷, 胡筱希, 黄周锋, 等. 基于化学模式识别法的翼核果指纹图谱及抗氧化活性研究 [J]. 中草药, 2021, 52 (16): 5021-5027.

[20] 周佳宁, 肖倩, 黎芳, 等. 基于 PI3K/AKT/mTOR 信号通路研究瑶药紫九牛醇提取物抗小鼠肝纤维化作用 [J]. 中药材, 2022, 45 (6): 1470-1474.

[21] 黄健, 韦亚军, 韦庆宁, 等. 瑶药紫九牛醇提取物急性毒

- 性及其对乙醇所致急性肝损伤的影响[J]. 右江民族医学院学报, 2014, 36 (3): 323-325.
- [22] 李仪奎. 中药药理实验方法学(第二版)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 767.
- [23] 王绍展, 朱青霞, 陈井霞, 等. 异欧前胡素通过 NF- κ B 和 JAK1/STAT1 信号通路抑制巨噬细胞 M1 极化发挥抗炎镇痛作用[J]. 中南药学, 2023, 21 (8): 1985-1990.
- [24] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 412.
- [25] 丘琴, 刘玉雯, 甄汉深, 等. 龙利叶抗炎活性部位筛选及其作用机制的研究[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38 (4): 37-42.
- [26] 茹丽, 郭起岳, 徐勤, 等. 舒胆胶囊抗炎利胆作用的研究[J]. 中南药学, 2017, 15 (11): 1528-1531.
- [27] 张敏, 许成辰, 徐婷贞, 等. 基于 Nrf2/Keap1/p62 信号通路探讨百合固金汤对 LPS 诱导的小鼠急性肺损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25 (15): 77-82.
- [28] 苏华珍, 唐秀能, 魏江存, 等. 小叶三点金提取物的抗炎作用及其机制研究[J]. 中国药房, 2019, 30 (18): 2532-2536.
- [29] 李倩, 高慧婕, 高沁航. 远志酊对脂多糖致炎小鼠抗炎活性的实验研究[J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39 (4): 361-364.
- [30] Shen BY, Zhang HQ, Zhu ZJ, et al. Baicalin relieves LPS-induced lung inflammation via the NF- κ B and MAPK pathways[J]. Molecules, 2023, 28: 1873.
- [31] Yang B, Gao Z, Li QS, et al. Proteomic analysis and identification reveal the anti-inflammatory mechanism of clofazimine on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice[J]. Inflamm Res, 2022, 71 (10-11): 1327-1345.
- [32] 张积仁, 吴婧. 炎症因子与慢病防控[M]. 北京: 科学出版社, 2019: 113-114.
- [33] 唐朝克. 炎症与动脉粥样硬化[M]. 北京: 科学出版社, 2018: 171-182.
- [34] 曾鸿芳, 李小丽, 何起臣, 等. 天抗(TK)对脂多糖诱导小鼠炎症模型的抗炎作用及其机制[J]. 免疫学杂志, 2021, 37 (4): 322-328.
- (收稿日期: 2023-10-11; 修回日期: 2023-12-12)

《中南药学》杂志基金项目论文征稿启事

为促进《中南药学》杂志学术质量提升, 从 2020 年 1 月 1 日开始, 本刊诚征各级基金项目论文, 实行快速发表通道, 并提高基金项目论文奖励:

1. 对基金项目核心研究论文开辟“快速通道”, 以最快的速度发表(4~5 个月见刊)。

2. 对重点基金项目论文(作者须提供项目合同书扫描件)实行奖励, 奖励人为基金项目主持人(第一作者或通信作者):

① 国家级基金项目核心研究论文每篇奖励 1000~2000 元。

② 省部级基金项目核心研究论文每篇奖励 500~800 元。

3. 投稿要求和注意事项

① 投稿请直接登陆官网(<http://znyx.cbpt.cnki.net>)首页, 点击“作者投稿系统”栏, 按要求填写有关内容和项目后直接进行投稿, 注明“基金论文投稿”。

② 论文写作参考本刊投稿须知, 项目要齐全, 包括中英文标题, 中英文作者及作者单位(包括邮编、所在地、单位名称、科室名称), 中英文摘要及关键词, 正文, 图表(图表标题中英文对照); 稿件所附图片一律要求使用原始清晰图片(像素不能低于 200)。

③ 来稿请在署名下标明: 基金项目(项目来源及编号); 作者简介(包括姓名、性别、学位、技术职称、是否为研究生导师、主要研究方向和 email)。

④ 来稿须附单位推荐证明(明确注明“同意推荐、内容真实、无一稿两投、不涉及保密及署名争议问题”)和基金项目合同书扫描件。

基于中药引经理论的靶向制剂设计基础思考与实践

【编者按】

肿瘤为人类第一大杀手，化疗为其主要治疗手段之一。然而，化疗药物体内分布广泛，毒副作用大常导致患者难以耐受，如何增效减毒是临床面临的关键问题。引经药为中医临床常用配伍增效减毒方法，其临床效果类似于现代医学的靶向制剂，然而其作用机制尚不清楚，严重制约了基于中医药理论的靶向制剂开发。阐明引经靶向机制对肿瘤靶向治疗寻找新的给药设计途径，为药性理论研究提供新的方法均具有重要意义。本专栏文章总结了中药引经靶向思路的提出，并给出了验证方法、实验和结果，期望为后续引经药及其他中医药理论的现代研究提供借鉴。

【主持人简介】



赵瑞芝，广州中医药大学研究员，博士研究生导师，博士后合作导师。为广州中医药大学第二附属医院中药药性理论创新团队负责人，长期致力于中药药性理论现代阐释、中药配伍增效机制探讨和复方药效物质基础等研究。主持国家自然科学基金面上项目 4 项，省部级项目多项；发表研究论文 120 余篇，获得专利授权 10 余项，获广东省科技进步一等奖 1 项（排名第三），二等奖 1 项（排名第二）。

基于中药引经理论的靶向制剂设计基础思考与实践

赵瑞芝^{1,2}，赵亚¹，刘丽娟¹，吴亚运¹（1. 广州中医药大学第二附属医院省部共建中医湿证重点实验室，广州 510006；2. 广东省中医证候临床研究重点实验室，广州 510120）

摘要：本文通过回顾引经靶向思想的提出以及利用现代药物动力学、分子生物学等多学科技术方法进行设想验证的过程及结果，指出利用现代科学技术有望阐明中药药性理论的科学内涵，并据此推进临床合理用药、新剂型研制、功能辅料开发等的发展。

关键词：引经药；组织差异；靶向

中图分类号：R283

文献标识码：A

文章编号：1672-2981(2024)07-1801-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.020

Practice and contemplation in target drug delivery design based on the meridian guide theory of traditional Chinese medicine

ZHAO Rui-zhi^{1,2}, ZHAO Ya¹, LIU Li-juan¹, WU Ya-yun¹ (1. State Key Laboratory of Chinese Medicine for Dampness Syndrome, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Clinical Research on Traditional Chinese Medicine Syndrome, Guangzhou 510120)

Abstract: By reviewing the concept of target drug delivery based on median-guide theory and its validation process by pharmacokinetics and molecular biology, this paper indicated that the scientific connotations of Chinese medicine could be explained by modern technology, which may facilitate the development of drug use, new delivery methods as well as development of function excipients.

Key words: meridian guide drug; tissue difference; targeting

基金项目：国家自然科学基金项目（No. 81573612, No.82173981, No.81073063）。

作者简介：赵瑞芝，女，研究员，主要从事中药药性理论和中药新剂型研究，email: 13610241754@163.com

中医药理论是祖国文化的瑰宝，为中华民族的身心健康作出了重大的贡献。然而长期以来，中医术语内涵不清，物质基础不明，导致难以用现代语言对其进行阐释，进而造成传承和进一步发展的困难。一方面中医药理论难以被初学者掌握，极大地影响了临床疗效的发挥，以及医师、患者对于中医药治疗的信心；另一方面中医理论与现代技术的脱节导致大众对中医药难以接受，患者依从性和尝试率不断降低，导致中医药市场严重萎缩。因此，对中医药理论的现代阐释十分重要。

引经理论是中医遣方用药的基础，是中药配伍增效减毒的关键技术，临床应用广泛，是众多医学大家治病救人的法器，并得到了现代医学的证明^[1-3]。本团队前期研究发现，引经药有望成为阐释中药药性理论的一个突破口，因此，课题组在深度解读中医理论的基础上，将其与现代科学技术相结合，开展系列研究，获得了一些有意义的结果。

1 引经靶向设想的提出与验证

2005 年，我们在总结中药归经与药物体内分布的规律时发现，中药的归经与它的药理作用主要部位吻合，其主要活性成分的体内分布与其归经脏器一致，比如大黄的主要成分为游离蒽醌类化合物，其入血成分主要为大黄酸。课题组在对大黄酸的体内分布研究发现，大黄酸在体内主要以Ⅱ相代谢产物存在，而Ⅱ相代谢产物的 60% 位于脾脏，与其归脾经的中医论述完全相符。从引经药的定义及其产生的效果看，引经药类似于现代给药系统中的靶向制剂^[4]，极具开发前景。

由于中医与现代医学为不同的体系，引经药的开发首先需要明确中医脏腑与现代医学脏器之间的关系，这是引经药可否成功用于靶向给药设计的关键。鉴于此，以肝脏为例，我们查阅了历代中医典籍，发现中医理论的肝与现代解剖学的肝脏在解剖部位、外观形态、重量等方面是一致的，只有粗浅与精细之别。《黄帝内经》虽未明言肝的部位，但在其篇章的多处论述中已隐含“肝位于胁下”，如邪在肝，则“两胁中痛”“肝胀者，胁下满而痛引少腹”等，从肝病出现胁下痛，可推知肝位于胁下。《难经》则记载了肝的重量及其形态，“肝重三斤四两”“肝独有二叶”，与现代解剖学的肝脏有两叶认识相同。从疾病上说，中医的肝瘟病、肝虫病等，相当于现代医学的病毒性肝炎、血吸虫病等，而中医的肝痃、肝癆、肝癖（痞）、肝积、肝瘤等则相当于现代医学的肝脓肿、

肺结核、脂肪肝、肝硬化、肝囊肿/肝癌等。因此尽管中医的肝在功能的阐述上与现代医学的肝脏并不完全相同，但可以肯定的是两者的位置、形态是一致的，病变具有相似性，应用引经理论进行靶向制剂的设计是有可行性的。

因此课题组在现代科学研究的基础上，提出了引经药通过改变被引药物体内分布而实现增效减毒作用的假设，以大黄酸、白藜芦醇、氧化苦参碱和龙胆苦苷为模型药物，以肝经引经药醋柴胡为模型引经药进行了引经作用的验证。由于药物剂量可能影响体内分布的结果，笔者设计了引经药的高、中、低剂量以及模型药物的高、低剂量组，通过比较单用模型药物与联用醋柴胡组中模型药物在组织内的分布，评价其引经肝靶向作用。结果显示对于大黄酸、白藜芦醇、氧化苦参碱和龙胆苦苷这四种结构不同、性质各异的模型药物，醋柴胡均可增加其肝内分布，其相对摄取率增加幅度在 79% ~ 260%，同时降低四种模型药物在非靶组织的峰浓度，幅度可达 85%^[5-8]。醋柴胡作用的程度与被引药物的性质、剂量及醋柴胡剂量有关。为了进一步考察醋柴胡作用的广泛性，我们还在大黄酸和氧化苦参碱两种药物的研究中考察了醋柴胡对其代谢产物的影响，结果显示，醋柴胡对于两种药物的代谢产物依然有良好的肝靶向增强作用^[6-7]，证实了我们关于引经药通过影响其他药物的体内分布发挥肝靶向作用的设想。

2 醋柴胡引经肝靶向作用的途径

那么醋柴胡是如何发挥引经作用的呢？细胞膜是制约药物进入细胞的第一道屏障。引导其他药物进入肝脏，应该首先作用于肝细胞膜，因此我们考察了醋柴胡对大鼠肝细胞膜通透性的影响，结果显示醋柴胡可增强正常大鼠肝细胞对大分子物质右旋糖酐的摄入，同时还可降低 P 糖蛋白（P-gp）的表达，减少排出，这与醋柴胡增强药物肝内分布，升高药物肝内峰浓度，降低肝内消除速率常数的动物实验结果相一致^[6]；毒性研究显示，醋柴胡可促进大鼠肝细胞的增殖，说明通透性增加不是细胞膜的破裂造成的。对醋柴胡作用后的细胞表面形态研究发现，醋柴胡可改变细胞膜表面的脂筏形态；进一步机制探讨证实醋柴胡可改变细胞膜脂质的组成^[9]。由于脂筏是细胞控制外来物质进出的开关，是多种转运子影响内源性代谢产物及外源性异物进出细胞内外的通路，且其分布与细胞膜组成关系密切，提示醋柴胡的引经作用可能与膜信号传导有关^[10-11]。

细胞信号的传导依赖于细胞表面存在的多种转运子, 包括摄入型转运蛋白 [如有机阳离子转运蛋白 (OCT)、有机阴离子转运蛋白 (OAT) 和有机阴离子转运多肽 (OATP)], 外排型转运蛋白 [如 P-gp、多药耐药相关蛋白 (MRPs) 和乳腺癌多药耐药蛋白 (BCRP) 等]^[12-13]。不同组织器官转运蛋白的分布不同, 例如 OAT1 在肾脏、脑、子宫均有表达, 而 OCT1 在肝脏优势表达, 在肾脏含量甚微, OAT3 在肾、肝、脑、眼等均有表达, MRP1 在体内广泛表达, 但在肝脏中含量较低等^[12-13]。越来越多的证据显示, 转运蛋白分布及活性是影响药物体内分布的主要因素, 其强度不亚于药物代谢对体内分布的影响, 美国、欧洲和日本等都把新药研发中候选药物对转运蛋白的影响作为必须考察的环节。此外, 转运蛋白还是药物相互作用的重要因素^[14-15]。基于以上研究结果我们大胆设想, 不同化学成分与不同转运蛋白之间的亲和性决定了药物的体内分布或中医理论的归经, 而引经药正是通过影响这些转运子的翻译、转录及活性等, 从而影响其他药物的体内分布。

外排型转运蛋白 P-gp、MRP1、MRP2 和 BCRP 等在正常细胞是负责机体抵御外来毒物, 保护机体微环境的卫士, 可以将过量的毒物排出细胞外, 通常在重要脏器如肝、肾、脑等器官高表达; 然而在肿瘤细胞中, 上述外排型转运蛋白异常高表达, 导致多药耐药的产生。对于正常细胞, 醋柴胡对 P-gp 和 MRP1、MRP2 影响微弱, 甚至可促进其底物摄取^[16-17], 提示其对正常细胞的排毒功能没有影响, 甚至有促进的作用; 然而当上述外排型转运蛋白过表达时, 醋柴胡则显著抑制其表达和活性^[18]。对醋柴胡中皂苷类成分的研究显示, 柴胡皂苷 a、b、c、d 以及从醋柴胡中分离得到的赧桐甾醇、醋柴胡多糖均有调节转运蛋白活性的作用^[19-21], 可显著抑制过表达的耐药蛋白的活性, 其强度可与经典抑制剂如维拉帕米、MK571 媲美, 可能为醋柴胡引经靶向的活性成分。

代谢酶为影响药物体内分布的重要原因, 课题组考察了醋柴胡及其不同部位对 I 相及 II 相代谢酶活性的影响, 结果显示醋柴胡多糖抑制多种药物代谢酶活性, 为影响代谢酶活性的关键部位, 可能是导致药物在肝脏延缓排除的原因之一^[22-23], 于是我们又考察了醋柴胡多糖对羟喜树碱纳米胶束体内分布的影响, 结果显示, 醋柴胡多糖可显著促进羟喜树碱纳米胶束的肝内摄取, 相对摄取率增加 45%^[24], 提示其可能存在与胶束

不同的靶点及途径。

那么这种增加摄取的活性与药效的相关性如何呢? 为了探讨醋柴胡临床应用价值, 本课题组还研究了醋柴胡联用大黄酸抑制急性肝炎的作用, 结果显示联用醋柴胡可显著促进大黄酸的抗肝炎效果, 而且该作用与大黄酸肝内药物增加程度相关^[25]; 而考察醋柴胡联用拉米夫定的结果则显示, 醋柴胡可增强肝内摄取达 2.5 倍 (待发表数据); 从醋柴胡多糖中分离得到的 VRP3-4 可显著促进甲氨蝶呤抗肝癌移植瘤生长的作用 (待发表数据), 三个实验的结果均提示醋柴胡通过影响肝脏优势表达转运蛋白及代谢酶系统发挥引经靶向作用。

为了更进一步明确醋柴胡引经靶向的活性部位和机制, 课题组还分别考察了醋柴胡不同部位对大黄酸、氧化苦参碱的体内分布的影响, 结果发现, 醋柴胡多糖、正丁醇提取部位以及小分子水溶性部位均有一定程度的促进药物肝靶向作用, 然而作用程度却均低于醋柴胡水提取液, 猜想不同部位之间可能存在协同机制。考虑到这点, 课题组考察了醋柴胡多糖对难溶性成分溶解度的影响, 发现醋柴胡多糖可增加多种难溶性成分的溶解度, 对其增溶机制的探讨则显示, 醋柴胡多糖在水溶液中可自发形成类似纳米胶束的聚集体, 实现对难溶性药物的增溶^[26], 提示其可能通过增加柴胡皂苷溶出, 并包载柴胡皂苷至肝细胞, 共同发挥增加摄入型转运蛋白活性、降低外排型转运蛋白表达并抑制药物代谢酶活性的作用, 而从摄入、代谢、排出三个方面增加其他药物的肝内摄取及滞留时间, 进而发挥引经靶向作用。

为了探讨醋柴胡的这种作用是否在引经药中具有普适性, 本课题组还考察了肺经引经药桔梗对于顺铂的肺靶向促进作用, 结果显示桔梗可以提高原位接种 A549 裸鼠的存活率, 缩小肿瘤体积, 改善动物身体机能^[27], 而这种增效作用与其肺内药物浓度的增加相关^[28]。与其他团队的研究结论一致, 如有学者对下肢引经药牛膝的研究也证实牛膝可增加黄柏活性成分小檗碱、抗炎药双氯芬酸钠等关节内浓度而具有增效作用^[29-30]; 研究也证实桔梗对罗红霉素、左氧氟沙星、泰乐菌素等多种结构不同的化合物具有增加肺内药物浓度的作用^[31]。因此, 利用引经药提高临床疗效不仅对中药有效, 对化学药物同样有效。在桔梗增效顺铂的实验中, 桔梗口服给药, 顺铂注射给药, 提示引经药与化学药物的联用的效果可不考

虑化学药物给药途径和包载容量,因此合理使用引经药将有效提高中西医联合用药临床疗效。

3 引经药研究可为靶向制剂的靶点发现、给药系统设计提供线索

3.1 引经药研究为新靶点发现提供线索

肿瘤治疗的难点之一是靶点的发现。目前,药物靶点通常是通过肿瘤生物组织与正常组织的差异性分析来发现的,标本珍贵而稀少,尤其对于尚未达到恶性增殖阶段的前期组织,比如肝炎及肝纤维化为肝癌发生的早期阶段,此阶段早期干预可延缓肝癌的发生,但难以发现可供设计的靶点。柴胡、醋柴胡在治疗肝炎、肝纤维化方面应用广泛,分析醋柴胡研究数据可以看出,柴胡可能靶向目前未知的靶点。因此,以柴胡为线索,可能为肝癌治疗的靶点发现提供线索。引经药不同于一般药物的特征在于其与所归的脏腑具有特异亲和性,从引经药发现的靶点则可能自带器官靶向性。

3.2 引经药研究为靶向功能辅料开发奠定基础

随着肿瘤发病率的不断提升,如何降低化疗药物毒副作用是临床面临的又一难点,为此人们开发了种类不同,机制多样的靶向给药系统^[32-33]。虽然上述给药系统实验结果呈现出良好的靶向性,但其复杂的制备工艺、新材料面对组织相容性、安全性、溶剂残留、工业化生产、载药容量限制等诸多问题均严重制约其应用,因此,尽管每年有大量靶向制剂的文献报道,但走向临床开发的功能载体却寥寥无几^[34-36]。最新研究显示,工艺烦琐的纳米制剂事实上在近 10 年的时间里靶向效率的提高不尽如人意,仅有 0.7%,存在靶向效率低、花费高、药效提高不明显等问题^[37-39]。因此,人们仍在寻找更高效的靶向给药系统。与传统靶向给药体系不同,引经药的靶向增强作用主要通过影响肝细胞表面转运蛋白的表达及活性,增加摄入或抑制排出而增强药物的细胞内富集,而不受载体容量的限制。更重要的是,基于引经药的靶向增效作用的工艺简单、无污染,生物相容性好,简便易行,价格便宜,开发前景广阔。

除了靶向性问题,肿瘤的多药耐药现象是严重影响患者用药效果的原因之一。与传统的多药耐药抑制剂不同,醋柴胡对多药耐药转运蛋白的作用与其表达量有关,通常正常细胞中的多药耐药转运蛋白具有相对低的表达量,而肿瘤细胞具有相当高的表达量,醋柴胡的作用意味着更有效

地靶向肿瘤细胞而降低对正常细胞的毒性,这是目前多药耐药逆转剂都不具备的优点^[40]。此外,肿瘤细胞中常多种耐药蛋白过表达,同时抑制多种耐药转运蛋白的活性才能从根本上逆转耐药。前期研究发现,醋柴胡多糖对联用药物具有广泛的增效作用,故我们对醋柴胡多糖进行了分离及增效活性的考察,结果发现,某些均一多糖可自组装成粒径在 50 nm 以下的粒子,自带被动靶向属性,同时可抑制多种多药耐药蛋白的作用而具有逆转耐药的特性,有望开发为肝靶向或肿瘤靶向功能辅料。因此基于影响耐药转运蛋白开发新型靶向给药体系的设想极具吸引力,而基于醋柴胡多糖的逆转耐药辅料的开发也极具前景。

4 引经研究对其他研究的启示

4.1 引经药研究对于中药配伍理论研究的提示

以往人们普遍认为中药配伍增效的基础是在于提高活性成分在水煎液中的溶出度、生物利用度和药物代谢酶,引经药的研究则提示配伍增加药物在靶部位分布也是增效的关键因素,而降低药物在非靶部位的分布则是配伍减毒的基础,其作用靶点是细胞膜上的各种转运蛋白。除药物转运蛋白外,其他转运蛋白比如脂质转运蛋白、糖转运蛋白、氨基酸转运蛋白等都可能直接或者间接地影响机体内环境而发挥增效或减毒的作用,提示配伍理论的研究可根据所治疗疾病、药物主要成分、疾病靶部位等信息采用计算化学结合网络药理学、靶药技术等阐明配伍增效的靶点和机制。

4.2 引经药作用原理可用于中药复方活性物质基础研究

中药物质基础研究是制约中药发展的瓶颈因素,如何快速高效地发现中药(复方)药效物质基础一直是业内人士关注的热点问题。从引经药研究我们发现,靶部位药物浓度直接影响药效,通过分析中药(复方)在靶部位药物浓度及与药效的相关性,有望快速发现药效活性成分。我们将这个方法用于寻找醋柴胡引经作用活性成分的研究,结果发现醋柴胡炮制后产生的皂苷为醋柴胡皂苷肝靶向增强作用的主要活性成分^[41]。

4.3 引经理论研究对其他中医药理论研究的提示

中医理论中有很多看似不相关的脏器之间的联系,如“肾开窍于耳”“肝开窍于目”,但其物质基础和科学内涵尚不清楚。通过调研文献,我们发现,顺铂、链霉素是两种有肾毒性和耳毒性的药物,这两种药物都是有机阳离子转运蛋白(OCT)2的底物,且该蛋白在肾脏和耳朵中

都高表达,是造成顺铂和链霉素肾毒性和耳毒性的原因。中医理论认为“肝开窍于目”,现代研究发现眼睛病变与肝功能密切相关,睑黄瘤为位于眼睑上的良性病变,其发生主要相关因素为脂肪肝;大规模人群数据显示眼压与肝功能指标 AST、ALT 成正相关^[42];表现为肝脏脂肪堆积的 Niemann-Pick 病同时眼睛也存在异常^[43],这些现象都说明中医理论的正确性,然而其物质基础是什么,是否与脂质转运蛋白有关尚不明确?揭示其物质基础则有望拓展中医理论的内涵,而通过对其内涵的阐释有望为临床诊断、治疗提供支撑。

寒热温凉、升降浮沉是药性的重要组成部分。有研究显示,细胞膜转运蛋白及组织内代谢酶的活性对机体能量代谢影响巨大,是疾病发生、转归的关键因素^[44-45]。中药通过影响机体能量代谢过程,发挥调节能量代谢作用;通过分析疾病状态、正常动物转录组数据,结合药物影响,有望揭开中医理论病机、病机转变以及药物调控升降的机制;而通过对药物干预前后转录组的分析,还有望获取药物作用的靶蛋白和作用途径;靶药技术可以发现中药或其粗提取物的靶点,再结合质谱鉴定技术,有望发现中药未知的靶点;通过构建靶蛋白过表达以及基因静默实现靶蛋白细胞水平的验证;而通过基因敲除鼠、使用特异性抑制剂和特异性底物可实现动物水平的验证,最终阐释中医病机及中药药性的生物学基础。

5 结语

中医药理论是我国的瑰宝,随着现代科学技术的不断发展,中医药事业迎来了前所未有的发展机遇。将中医药理论与现代科学技术研究结果结合,将药效学与药动学结合,在此基础上开展中药药效物质基础、配伍及引经作用的研究将更有效地阐释中医药配伍理论,为中医药理论的传承与发展奠定基础。

机体内环境变化是疾病发生、发展的基础,通过转录组、代谢组、蛋白质组与机体能量水平的变化,结合病理、药理充分利用现代科学技术进行中医病机、中药药性的其他研究有望实现中医理论的全面阐释,使中医药理论突破理解难、传承难的困境,更好地服务于全社会,创造良好的社会效益和经济效益。

参考文献

[1] 张胜君,苏鑫.《傅青主女科》中引经药应用探析[J].中华中医药杂志,2022,37(4):2345-2347.

[2] 韩露露,黄世敬,潘菊华.从“脑神学说”论应用脑引经药治疗不寐[J].中西医结合心脑血管病杂志,2020,18(13):2174-2176.

[3] 李朝妍,闫晓玲,孙武,等.祁宝玉教授在眼科运用引经药的临床经验[J].中国中医眼科杂志,2021,31(12):159-161.

[4] 赵瑞芝,刘少军.中药引经理论与靶向给药[J].中医杂志,2005,46(9):643-645.

[5] Zhao RZ, Liu SJ, Mao SR, et al. Study on liver targeting effect of vinegar-baked Radix Bupleuri on resveratrol in mice[J]. J Ethnopharmacol, 2009, 126(3): 415-420.

[6] Zhao RZ, Yuan D, Liu SJ, et al. Liver targeting effect of vinegar-baked Radix Bupleuri on rhein in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2010, 132(2): 421-428.

[7] Zhao RZ, Chen YJ, Cai JX. Liver targeting effect of vinegar-baked Bupleuri Radix on oxymatrine in mice [C]. 2011 International conference on bioinformatics and biomedicine workshops, Atlanta, USA, 2011: 740-745.

[8] 赵莹,赵瑞芝,陈有军,等.醋柴胡对龙胆苦苷在小鼠体内分布的影响[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(17):71-74.

[9] Zhao RZ, Liu LJ, Wang YJ, et al. Vinegar-baked Radix Bupleuri modulates the cell membrane constituents and inhibits the P-gp activity in rat hepatocytes[J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14: 357.

[10] Simons K, Sampaio JL. Membrane organization and lipid rafts[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011, 3(10): a004697.

[11] Nieto-Garai JA, Lorizate M, Contreras FX. Shedding light on membrane rafts structure and dynamics in living cells[J]. Biochim Biophys Acta Biomembr, 2022, 1864(1): 183813.

[12] Robert RW, Pluchino KM, Hall MD, et al. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistance cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2018(7): 452-464.

[13] Nigam SK. The SLC22 transporter family: a paradigm for the import of drug transporters on metabolic pathway, signaling and disease[J]. Anna Rev Pharmacol Toxicol, 2018, 58: 663-687.

[14] Liu XD. Transporters-mediated drug-drug interactions and their significance[J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1141: 241-291.

[15] Mao QC, Lai YR, Wang J. Drug transporters in xenobiotic disposition and pharmacokinetic prediction[J]. Drug Metab Dispos, 2018, 46(5): 561-566.

[16] 冯丽敏,张娴,赵瑞芝.醋柴胡对 HEK293 细胞中 MRP1 mRNA、蛋白表达及活性的影响[J].辽宁中医杂志,2014,41(2):310-312.

[17] 冯丽敏,张娴,赵瑞芝.醋柴胡及其不同部位对 BRL3A 细胞摄取顺铂及 Oct2, Mrp2 基因表达的影响[J].时珍国医国药,2015,26(8):1817-1819.

[18] 赵瑞芝,冯丽敏,王银洁,等.P糖蛋白抑制剂: ZL201310060453.9[P].2016-3-23.

- [19] 赵瑞芝, 赵亚, 刘丽娟, 等. 赅酮甾醇作为 P-糖蛋白抑制剂的应用: ZL201510496667. X [P]. 2018-12-28.
- [20] Zhao Y, Feng LM, Liu LJ, et al. Saikosapin b2 enhances the hepatotargeting effect of anticancer drugs through inhibition of multidrug resistance-associated drug transporters [J]. *Life Sci*, 2019, 231: 116557.
- [21] Yu TY, Chen XZ, Wang YJ, et al. Modulatory effects of extract of vinegar-baked Radix Bupleuri and saikosaponins on the activity of cytochrome P450 enzymes in vitro [J]. *Xenobiotica*, 2014, 44 (10): 861-867.
- [22] Chen XZ, Yu TY, Chen ZX, et al. Effect of Saikosaponins and extracts of vinegar-baked Bupleuri Radix on the activity of β -glucuronidase [J]. *Xenobiotica*, 2014, 44 (9): 785-791.
- [23] Wu HY, Yu TY, Tian Y, et al. Enhanced liver targeting via coadministration with vinegar baked Radix Bupleuri [J]. *Phytomedicine*, 2018, 44: 1-8.
- [24] Zhao Y, Wang JQ, Liu LJ, et al. Vinegar-baked radix bupleuri enhances the liver-targeting effect of rhein on liver injury rats by regulating transporters [J]. *J Pharm and Pharmacol*, 2022, 74 (11): 1588-1597.
- [25] Zhao Y, Wan P, Wang JQ, et al. Polysaccharides from vinegar baked radix bupleuri as efficient solubilizer for water-insoluble drugs of Chinese medicine [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 229 (115473): 1-10.
- [26] Li Y, Wu YY, Xia Q, et al. Platycodonis radix increases cisplatin-induced apoptosis in non-small cell lung cancer via PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 120 (109496): 1-8.
- [27] 李杨, 夏琦, 赵瑞芝, 等. 引经药桔梗对顺铂在原位肺癌移植瘤裸鼠体内分布的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2018, 34 (2): 71-75.
- [28] 李兵杰, 葛文静, 单朋涛, 等. 二妙丸与三妙丸中 4 种生物碱在正常和关节炎模型大鼠体内的药动学与组织分布差异 [J]. *中国中药杂志*, 2023, 48 (7): 1943-1950.
- [29] 刘国生, 孙备, 吕凌. 牛膝“引药下行”对双氯芬酸钠抗大鼠急性关节炎作用的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2012, 23 (10): 2443-2445.
- [30] 肖傅文, 赵瑞芝, 胡巧红. 引经药的历史沿革与现代实验研究进展 [J]. *广东药学院学报*, 2016, 32 (1): 76-78.
- [31] Patra JK, Das G, Fraceto LF, et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects [J]. *J Nanobiotechnology*, 2018, 16 (1): 71-71.
- [32] Liang K, Ng S, Lee F, et al. Targeted intracellular protein delivery based on hyaluronic acid-green tea catechin nanogels [J]. *Acta Biomater*, 2016, 33: 142-152.
- [33] Cheng CJ, Tietjen GT, Saucier-Sawyer JK, et al. A holistic approach to targeting disease with polymeric nanoparticles [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14 (4): 239-247.
- [34] Ashique S, Sandhu NK, Chawla V, et al. Targeted drug delivery [J]. *Curr Drug Deliv*, 2021, 18 (10): 387-416.
- [35] Jiang W, Yuan H, Chan CK, et al. Lessons from immuno-oncology: a new era for cancer nanomedicine? [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16 (6): 369-370.
- [36] Stefan W, Anthony JT, Qin D, et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumors [J]. *Nat Rev Materials*, 2016 (1): 1-12.
- [37] Asaoka R, Obana A, Murata H, et al. The association between age and systemic variables and the longitudinal trend of intraocular pressure in a large-scale health examination cohort [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2022, 63 (11): 22.
- [38] Modal K, Mandal N. Role of bioactive sphingolipids in inflammation and eye diseases [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1161: 149-167.
- [39] Li YN, Zhang H. Nanoparticle-based drug delivery systems for enhanced tumor-targeting treatment [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2019, 15 (1): 1-27.
- [40] 徐倩, 赵亚, 刘丽娟, 等. 醋柴胡不同极性洗脱部位对黄芩苷在小鼠体内分布的影响及成分分析 [J]. *中国现代应用药学杂志*, 2021, 38 (8): 912-918.
- [41] Tarling EJ, Vallin TQA, Edwards PA. Role of ABC transporters in lipid transport and human diseases [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2013, 24 (7): 342-350.
- [42] Berg T, Hegelund-Mybärk T, öckinger J, et al. Expression of Mate 1, Pgp, OCTN1 and OCTN2, in epithelial and immune cells in the lung of COPD and healthy individuals [J]. *Resp Res*, 2018, 19 (68): 1-13.
- [43] Peace EJ, Pearce EL. Immunometabolism in 2017, driving immunity: all roads lead to metabolism [J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18 (2): 81-82.
- [44] Stiegar B, Steiger T, Locher KP. Membrane lipids and transporter function [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2021, 1867 (5): 166079.
- [45] Ismail A, Tanasova M. Importance of GLUT transporters in disease diagnosis and treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (15): 8698.

(收稿日期: 2023-12-14; 修回日期: 2024-03-19)

醋柴胡水提液通过调控细胞内多种转运蛋白影响对底物药物的摄取

冯丽敏¹, 张娴¹, 赵瑞芝^{1, 2*} (1. 广州中医药大学第二附属医院省部共建中医湿证重点实验室, 广州 510006; 2. 广东省中医证候临床研究重点实验室, 广州 510120)

摘要: **目的** 考察醋柴胡水提液 (VBRB) 对大鼠肝细胞 BRL3A 以及人胚肾细胞 HEK293 内多种药物转运蛋白的影响以及对相应底物的摄取, 进一步确定醋柴胡引经增效的作用靶点, 为全面解析醋柴胡引经增效的作用机制提供数据支撑。**方法** 分别选用牛磺胆酸钠为 Ntcp、Oatp2 的共同底物, 秋水仙碱、罗丹明 B 作为 MRP1 以及 Pgp 的底物, 通过 HPLC 法或流式细胞术测定细胞内各底物含量; 同时采用 BCA 法测定蛋白浓度, 按蛋白质浓度归一化法计算摄取量; 另分别采用 Western blot 法和 RT-PCR 法分析 VBRB 对细胞中的多种转运蛋白的蛋白表达以及 mRNA 水平的影响。**结果** VBRB 促进 BRL3A 细胞对牛磺胆酸钠摄取, 并升高摄入型转运蛋白 Ntcp 和 Oatp2 的蛋白及 mRNA 水平。与 MRP1 抑制剂 MK571 类似, 经谷胱甘肽刺激后的 HEK293 细胞, VBRB 显著增加细胞对秋水仙碱摄取并降低 MRP1 蛋白表达; 同时, VBRB 显著促进 Pgp 过表达的 HEK293 细胞对罗丹明 B 摄取, 并显著抑制 Pgp 蛋白表达和 mRNA 水平。**结论** 醋柴胡可增强细胞对多种底物的摄取, 与其同时激活细胞内多种摄取型药物转运蛋白和抑制外排型药物转运蛋白活性有关。

关键词: 醋柴胡; 引经增效; Ntcp; Oatp2; MRP1; Pgp

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)07-1807-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.021

Effect of the aqueous extract from Vinegar-baked Bupleuri Radix on the uptake of substrates by regulating various drug transporters in cells

FENG Li-min¹, ZHANG Xian², ZHAO Rui-zhi^{1, 2*} (1. State Key Laboratory of Chinese Medicine for Dampness Syndrome, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Clinical Research on Traditional Chinese Medicine Syndrome, Guangzhou 510120)

Abstract: Objective To determine the effect of aqueous extract from Vinegar-baked Bupleuri Radix (VBRB) on the uptake of drug transporters in BRL3A and HEK293 cells, and corresponding substrates, to elucidate the target for VBRB and provide data support for the action mechanism of VBRB meridian inducing and synergistic effect. **Methods** Sodium taurocholate, colchicine and rhodamine B were used as substrates for Ntcp/Oatp2, MRP1 and Pgp, respectively. The contents of substrates in the cells were determined by HPLC or flow cytometry. The protein concentration was measured by BCA method, and the uptake rate was calculated with the normalization of protein concentration. In addition, the effect of VBRB on the protein expression and mRNA level of drug transporters in the cells were analyzed by Western blot and RT-PCR. **Results** VBRB promoted the uptake of sodium taurocholate in BRL3A cells and increased the protein expression and mRNA levels of Ntcp and Oatp2. Similar to MRP1 inhibitor MK571, VBRB greatly increased the uptake of colchicine and decreased MRP1 protein expression in HEK293 cells when stimulated by glutathione. In addition, VBRB obviously promoted the uptake of Rhodamine B in Pgp-overexpression HEK293 cells, and inhibited the protein expression and mRNA level of Pgp. **Conclusion**

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.81073063, No.82173981, No.81573612)。

作者简介: 冯丽敏, 女, 助理研究员, 主要从事中药作用机制研究, email: fenglm12@163.com *通信作者: 赵瑞芝, 女, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事中药新剂型及相关技术研究, email: 13610241754@163.com

VBRB enhances the uptake of multiple drug transporter substrates, which is related to its simultaneous activation of multiple influx transporters and inhibition of efflux transporters.

Key words: Vinegar-baked Bupleuri Radix; meridian inducing and synergistic effect; Ntcp; Oatp2; MRP1; Pgp

中药引经药作用类似现代药学的靶向制剂概念,可增效减毒。醋柴胡为公认的肝经引经药。课题组前期研究显示,醋柴胡可显著增强大黄酸、氧化苦参碱、龙胆苦苷、白藜芦醇的肝靶向性^[1-4]。药效学研究结果显示,醋柴胡可增强大黄酸抗急性肝炎的效果,其增效作用与大黄酸肝内浓度增高成正相关^[5],提示醋柴胡可能通过影响药物体内分布发挥肝靶向增强作用。转运蛋白是影响药物体内分布的关键因素之一,前期结果也显示醋柴胡水提取液和其中小分子水溶性部位抑制细胞膜上 Pgp 的表达^[6-8],提示其靶向增效作用可能与影响转运蛋白活性相关。因此,为探讨醋柴胡引经靶向作用机制,本文考察了醋柴胡水提取液对有机阴离子转运多肽 2 (Oatp2)、Na⁺-牛磺胆酸共转运多肽 (Ntcp) 以及外排型转运蛋白^[9] (P 糖蛋白, Pgp) 和多药耐药相关蛋白 1 (MRP1) 的影响,结果提示转运蛋白可能是醋柴胡引经增效的靶点。

1 材料

醋柴胡 (广东康美药业有限公司,批号:120100341);人胚肾细胞 HEK293 和大鼠肝细胞 BRL 3A (American Type Culture Collection);胎牛血清 (FBS)、高糖 DMEM 培养基、青霉素-链霉素溶液 (100×)、0.25% Trypsin-EDTA、磷酸盐缓冲液 (PBS) (Gibco 公司);秋水仙碱 (Fluka 公司);维拉帕米、罗丹明 B、MK571 (Sigma 公司);山羊抗小鼠 Pgp 单克隆一抗、山羊抗小鼠 MRP1 单克隆一抗、小鼠抗 Ntcp 多克隆抗体以及 HRP 标记的山羊抗小鼠抗体 (Abcam 公司);家兔抗 Oatp2 多克隆抗体 (Millipore Corporation);抗家兔 GAPDH 一抗、抗家兔二抗 (Cell Signal Technology 公司);牛磺胆酸钠 (TCANa, 上海安研商贸有限公司);TRIzol 试剂、RIPA 细胞裂解液和总蛋白提取液 (Invitrogen 公司);蛋白酶抑制剂 (Roche 公司);RevertAid Frist Strand cDNA 合成试剂盒、Power SYBR Green PCR Master Mix 荧光定量 PCR 试剂盒、DNase/RNase-free H₂O (Thermo Scientific 公司);Western blot 实验所用试剂、垂直电泳及转印系统 (Bio-rad 公司);色谱甲醇 (天津四友精细化学品有限公司);色谱乙腈 (Fisher 公司);氯仿、异丙醇、无水乙醇均为分析纯 (广州化学试剂厂);高效液相色谱仪 (Agilent 公司);7500 型荧光实时定量 PCR 仪 (ABI 公司);FC-500 流式细胞仪 (Beckman Coulter 公司)。

2 方法

2.1 醋柴胡水提取液的制备

醋柴胡药材 1 kg,加入 10 倍量水浸泡 30 min,煎煮 30 min,滤过,滤渣重复煎煮一次;合并两次滤液;减压浓缩至以原药材计算约 1.0 g·mL⁻¹ 质量浓度时即为醋柴胡水提液 (VBRB)。

2.2 TCANa 摄取实验

实验分为对照组 (CTRL)、给药组 (VBRB, 10 mg·mL⁻¹)。BRL3A 细胞接种于六孔板中,于对数生长期加入相应浓度的 VBRB 共孵育 24 h 后, PBS 缓冲液清洗一次,再加入 TCANa (1 mmol·L⁻¹)-KB 缓冲液继续孵育 60 min;然后加入预冷的 BSA-KB 缓冲液终止孵育, PBS 缓冲液清洗 3 次,收集细胞,预冷 PBS 清洗 2 次;加入 200 μL 的细胞裂解液裂解细胞,离心,取上清液。上清液采用 HPLC 法测定细胞内 TCANa 的含量,色谱条件如下: C₁₈ 柱 (100 mm×4.6 mm, 2.6 μm),流动相为甲醇-乙腈 (40:60),柱温为 35℃,流速为 1.2 mL·min⁻¹,检测波长为 205 nm,进样量为 50 μL。

采用 BCA 法测定各组细胞总蛋白含量;具体步骤参照试剂盒操作说明书,所有实验重复 3 次。细胞摄取率表示为每毫克蛋白质中摄取的 TCANa 的微克数。

2.3 秋水仙碱摄取实验

MRP1 能特异地识别和转运与谷胱甘肽 (GSH) 耦合的底物^[9],GSH 的耗竭可降低 MRP1 对底物的转运。本研究探讨了 VBRB 在 GSH 刺激下对 MRP1 的影响。实验分为空白组 (blank),GSH 对照组 (GSH-CTRL),给药组 (VBRB, 10 mg·mL⁻¹) 及 MRP1 抑制剂组 (MK571, 50 μmol·L⁻¹)。HEK293 细胞接种于 100 mm 培养皿中,采用含 GSH (2 mmol·L⁻¹) 的培养基进行培养,于对数生长期时加入相应的药物培养 48 h 后,移除药液, PBS 清洗 1 次;后加入秋水仙碱 (50 μmol·L⁻¹) 与细胞共孵育 30 min,收集细胞,预冷的 PBS 清洗 3 次,加入超纯水重悬细胞,-80℃冻融裂解;15 000 g 离心 15 min,移取上清液,保存于-80℃冰箱备用。精密吸取样品 175 μL,再加入 3 倍量的甲醇涡旋混匀,15 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 后,吸取上清液于一新 EP 管中,挥干,再用 175 μL 流动相复溶。秋水仙碱的含量与蛋白浓度测定方法参照文献^[10],所有实验重复 3 次。

2.4 罗丹明 B 摄取实验

实验分为空白组 (空白载体)、对照组 (Pgp-CTRL)、给药组 (VBRB, $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、Pgp 抑制剂组 ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 维拉帕米)。Pgp-HEK293 细胞 (实验室构建, 方法参照文献^[10]) 接种于六孔板中, 于对数生长期时加入相应的药物培养, 培养 24 h 后移除药液, PBS 清洗 1 次, 随后加入罗丹明 B ($200 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 与细胞避光孵育 30 min; 收集细胞于样品管中, PBS 清洗并重悬细胞; 于流式细胞仪检测过表达 Pgp-HEK293 (hPgp-HEK293) 细胞上罗丹明 B 的相对荧光强度 (检测细胞数固定为 10 000 个)。实验重复 3 次。

2.5 RT-PCR 法测定细胞内药物转运蛋白 mRNA 水平

细胞接种于六孔板中, 待细胞融合度达 70% ~ 80% 时, 移除旧培养基, 加入不同药物进行处理, 终止孵育后, 清洗并收集样品, 随后进行总 RNA 提取、逆转录与实时荧光定量 PCR 扩增, 测定各目标蛋白的 mRNA 水平; 具体操作参照文献^[10], 实验重复 3 次。

所用引物序列如下: 大鼠 *Ntcp* 基因正向引物: 5'-AGCCTCAAAGGACCAAACA-3', 反向引物: 5'-CAGGCCATTAGGGGAAGGAC-3'; 大鼠 *Oatp2* 基因正向引物: 5'-TGAGGCCCCAGGTTCAACCAC-3', 反向引物: 5'-ACTAAGCCATTGAAGCCCCCTGA-3'; 大鼠 *Gapdh* 基因正向引物: 5'-ATGATTCTACCCACGGCAAG-3', 反向引物: 5'-CTGGAAGATGGTGATGGGT-3'。人 *Pgp* 基因正向引物: 5'-ACTTGTCACAATGCAGACAGCAGG-3', 反向引物: 5'-TGTGATCCACGGACTCTCTACG-3'; 人 *MRP1* 基因正向引物: 5'-GGGGGAGAAAAGGTCGGCATCG-3', 反向引物: 5'-GTGCAGGCATCTTGGCGA-3'; 人 *GAPDH* 基因正向引物: 5'-GATCATCAGCAATGCCTCCTGCACC-3', 反向引物: 5'-ACTTGTCACAATGCAGACAGCAGG-3'。

2.6 Western blot 法测定细胞内药物转运蛋白的蛋白表达

细胞接种于 100 mm 培养皿中, 在对数生长期加入药物处理, 孵育结束后收集细胞, 用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, 按试剂盒说明书用 BCA 法定量; 随后进行蛋白免疫印迹分析细胞内目标转运蛋白的表达, 另选 GAPDH 作为内参对照。具体操作参照文献^[10], 实验重复 3 次。

2.7 数据处理

采用 SPSS 17.0 统计分析软件处理, 实验结果以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两两比较采用独立样本 *t* 检验分析; 多组资料比较, 方差齐性时采用最小显著差异法 (LSD) 分析, 方差不齐时采用 Dunnett's

T3 法分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 VBRB 对 BRL3A 细胞摄取 TCANa 的影响

与对照组相比, VBRB ($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 作用于 BRL3A 细胞 24 h 后, 能显著增加细胞内的 TCANa 的含量 (11.4%, $P < 0.05$), 结果见图 1。

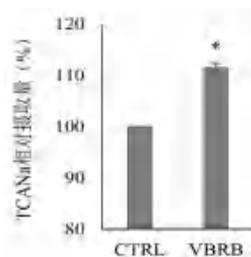


图 1 VBRB 作用 24 h 后对 BRL3A 细胞摄取 TCANa 的影响

Fig 1 Effect of VBRB on the uptaking of TCANa by BRL3A cells after treated for 24 h

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

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

3.2 VBRB 对经 GSH 刺激后的 HEK293 细胞摄取秋水仙碱的影响

与空白组比较, 加入 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH 的 HEK293 细胞对秋水仙碱的摄取降低了 49.1% ($P < 0.01$), 显示 GSH 显著增加了 MRP1 的活性; 在 GSH-HEK293 细胞中, 与 GSH-CTRL 组比较, 给予 VBRB ($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、MK571 ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 作用 48 h 后, 细胞内的秋水仙碱含量分别增加了 92.7% 和 75.6% ($P < 0.01$), 提示醋柴胡抑制了 MRP1 的活性, 结果见图 2。

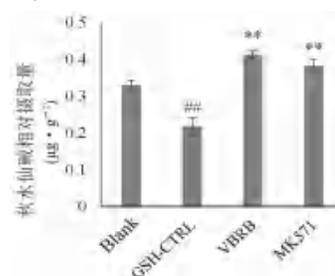


图 2 不同药物作用 48 h 后对 GSH 刺激的 HEK293 细胞摄取秋水仙碱的影响

Fig 2 Effect of different drugs on the uptaking of colchicine by GSH stimulated HEK293 cells

注: 与空白组比较, ### $P < 0.01$; 与 GSH 对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the blank group, ### $P < 0.01$; compared with the GSH-CTRL group, ** $P < 0.01$.

3.3 VBRB 对 Pgp-HEK293 细胞摄取罗丹明 B 的影响

转染 Pgp 后, 细胞摄取罗丹明 B 的能力显著降低 ($P < 0.01$); 与对照组相比, VBRB 和维拉帕米作用 24 h 后, Pgp-HEK293 细胞对罗丹明 B 的摄取依次增加了 30.2% 和 20.5% ($P < 0.01$), 结果见图 3。

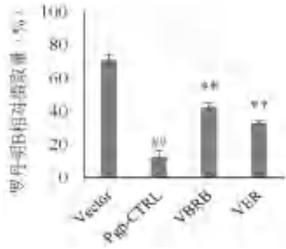


图 3 不同药物作用 24 h 后对 Pgp-HEK293 细胞摄取罗丹明 B 的影响
Fig 3 Effect of different drugs on the uptaking of rhodamine uptake by Pgp-HEK293 cells

注：与 Vector 组比较，^{##}*P* < 0.01；与 Pgp-CTRL 组比较，^{**}*P* < 0.01。

Note: Compared with the Vector group, ^{##}*P* < 0.01; compared with the Pgp-CTRL group, ^{**}*P* < 0.01.

3.4 VBRB 对 BRL3A 细胞中 Ntcp 和 Oatp2 mRNA 及蛋白的影响

如图 4 所示，与 CTRL 组相比，VBRB (10

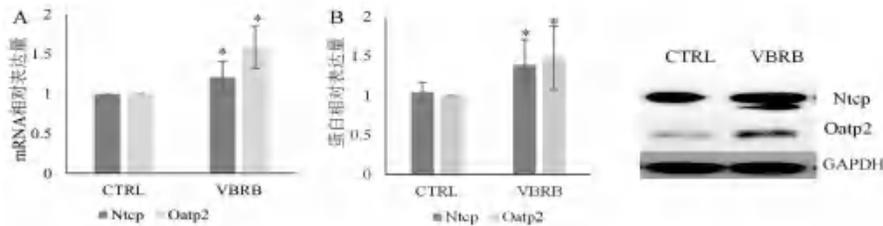


图 4 VBRB 作用 24 h 后对 BRL3A 细胞内 Ntcp 和 Oatp2 mRNA (A) 和蛋白表达 (B) 的影响

Fig 4 Effect of VBRB on the mRNA (A) and protein expression (B) of Ntcp and Oatp2 in BRL3A cells after treated by 24 h

注：与对照组比较，^{*}*P* < 0.05。

Note: Compared with the CTRL group, ^{*}*P* < 0.05.

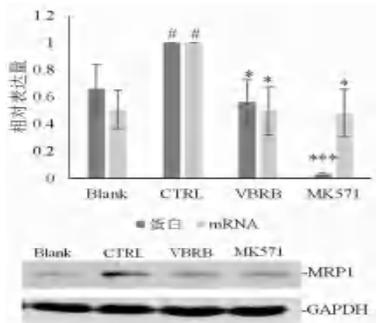


图 5 VBRB 作用 48 h 后对 GSH 刺激的 HEK293 细胞中 MRP1 蛋白及 mRNA 的影响

Fig 5 Effect of VBRB on the mRNA and of protein expression of MRP1 in GSH stimulated HEK 293 cells after treated by 48 h

注：与空白组比较，^{##}*P* < 0.05；与对照组比较，^{*}*P* < 0.05，^{***}*P* < 0.001。

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

3.6 VBRB 对 hPgp-HEK293 细胞中 Pgp mRNA 及蛋白的影响

如图 6 所示，与 hPgp-CTRL 组相比，加入维拉帕米 (VER, 50 μmol·L⁻¹) 或 VBRB (10 mg·mL⁻¹) 与 hPgp-HEK293 细胞孵育 24 h 后，细胞中 Pgp 蛋白

(mg·mL⁻¹) 作用于 BRL3A 细胞 24 h 后，能增加细胞内 Ntcp 和 Oatp2 mRNA 的表达 (*P* < 0.05)；其中 Ntcp 的增幅在 30% 内。与 CTRL 组相比，VBRB (10 mg·mL⁻¹) 作用于 BRL3A 细胞 24 h 后，能增加细胞内 Ntcp 和 Oatp2 蛋白的表达 (*P* < 0.05)。

3.5 VBRB 对 GSH-HEK293 细胞中 MRP1 mRNA 及蛋白的影响

结果见图 5，与空白组相比，CTRL 组细胞的 MRP1 mRNA 表达显著升高 (*P* < 0.05)；MRP1 蛋白表达增加了 33.9% (*P* < 0.05)。与 CTRL 组相比，VBRB (10 mg·mL⁻¹) 和 MK571 (50 μmol·L⁻¹) 作用 48 h 后，细胞内的 MRP1 mRNA 表达依次降低了 50.4% 和 48.5% (*P* < 0.05)，细胞内的 MRP1 蛋白表达分别降低了 45.6% (*P* < 0.05) 和 97.1% (*P* < 0.01)；提示 VBRB 呈现 MRP1 抑制剂样功效。

水平分别降低了 51.8% 和 50.4% (*P* < 0.05)；但对基因的影响弱于其对蛋白的影响。

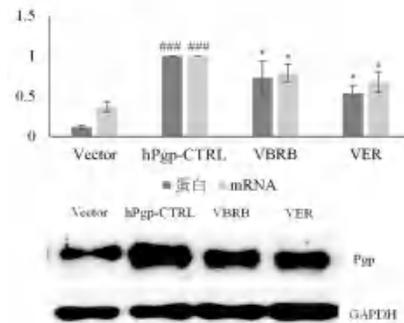


图 6 VBRB 作用 48 h 后 hPgp-HEK293 细胞中 mRNA 及蛋白的影响
Fig 6 Effect of VBRB on the mRNA and of protein expression of Pgp in hPgp-HEK 293 cells after treated by 48 h

注：与 Vector 组比较，^{##}*P* < 0.01；与 hPgp-CTRL 组比较，^{*}*P* < 0.05，^{***}*P* < 0.001。

Note: Compared with the Vector group, ^{##}*P* < 0.01; compared with the hPgp-CTRL group, ^{*}*P* < 0.05, ^{***}*P* < 0.001.

4 讨论

引经理论是中药药性理论的重要组成部分，是中医药通过配伍增效减毒的方法，然而长期以

来其发挥靶向增效作用的机制却不清楚，严重制约了其应用与开发。课题组前期研究显示，醋柴胡含药血清与 VBRB 均可增加大鼠肝细胞对高分子量右旋糖酐的摄取（待发表数据），提示醋柴胡不经体内代谢与经体内代谢后对药物的转运影响相同，因此后续研究直接采用了 VBRB。在探讨醋柴胡影响摄取的因素时发现，VBRB 影响细胞膜表面脂筏，抑制细胞表面的 Pgp，提示转运蛋白可能是醋柴胡增强多种药物在肝脏积累的物质基础。肝脏高表达多种转运蛋白，根据药物分布影响的关键因素和醋柴胡临床应用，本文选择了肝内高表达的药物转运蛋白如 Pgp、Mrp1、Oatp2 和 Ntcp 作为研究对象，期望阐释醋柴胡引经增效的物质基础。

药物剂量和作用是影响药效的关键因素。醋柴胡疗效发挥与其毒性无关，且在作为引经药使用时通常剂量较小，因此首先考察 VBRB 作用 24 h 和 48 h 对多种细胞增殖的影响，选择对增殖无显著影响的剂量和时间作为实验剂量和时间点。

Oatp2 特异性分布于肝脏^[11-12]，是许多内源性化合物和药物从血液进入肝脏的重要转运体；Ntcp 则主要负责将胆汁酸盐从血液中摄入肝细胞^[13]，两者均介入肝脏胆汁酸代谢、脂肪代谢等功能^[14-15]。醋柴胡疏肝解郁作用可能与这两种蛋白相关，因此选用牛磺胆酸钠作为两者的共同底物进行分析。结果显示：VBRB 同时上调 Ntcp 和 Oatp2 的表达并增加肝细胞对牛磺胆酸钠的摄取；提示 VBRB 促进有机阴离子肝脏分布可能与其激活了 Ntcp 介导的 Na⁺ 依赖性摄取和 Oatp 介导的 Na⁺ 非依赖性摄取有关，证实这两种蛋白是醋柴胡疏肝解郁作用的靶点之一。

醋柴胡为肝癌辅助治疗中药常用药物之一，Pgp、MRP1 均为肿瘤组织中高表达蛋白^[16-18]，因此考察了在疾病状态下醋柴胡对耐药性相关转运蛋白的作用。结果显示 VBRB 可显著抑制过表达状态下这两种蛋白的表达，显著增加其细胞内摄取，提示醋柴胡辅助治疗肝癌的靶点可能是 Pgp 和 MRP1，联用醋柴胡有望降低抗肿瘤药物耐药性的产生，从而提高 Pgp 和 MRP1 底物的抗肿瘤效果。

参考文献

[1] Zhao RZ, Liu SJ, Mao SR, et al. Study on liver targeting effect of vinegar-baked Radix Bupleuri on resveratrol in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 126 (3): 415-420.
 [2] Zhao RZ, Yuan D, Liu SJ, et al. Liver targeting effect of vinegar-baked Radix Bupleuri on rhein in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 132 (2): 421-428.
 [3] Zhao RZ, Chen YJ, Cai JX. Liver targeting effect of vine-

gar-baked Radix Bupleuri on oxymatrine in mice [C]. Atlanta, 2011.
 [4] 赵莹, 赵瑞芝, 陈有军, 等. 醋柴胡对龙胆苦苷在小鼠体内分布的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21 (17): 71-74.
 [5] Zhao Y, Wang JQ, Liu LJ, et al. Vinegar-baked radix bupleuri enhances the liver-targeting effect of rhein on liver injury rats by regulating transporters [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2022, 74 (11): 1588-1597.
 [6] 冯丽敏, 张娴, 赵瑞芝. 醋柴胡小分子水溶性部位抑制 HEK293-Pgp 细胞中 P 糖蛋白的外排功能 [J]. *中国药理学通报*, 2013, 29 (12): 1684-1688.
 [7] Zhao RZ, Liu LJ, Wang YJ, et al. Vinegar-baked Bupleuri Radix modulates the cell membrane constituents and inhibits the P-gp activity in rat hepatocytes [J]. *BMC Complement Altern M*, 2014, 14: 357
 [8] 冯丽敏, 张娴, 赵瑞芝. 醋柴胡及其不同部位对 BRL3A 细胞摄取顺铂及 *Oct2*, *Mrp2* 基因表达的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2015, 26 (8): 1817-1819.
 [9] Hanssen KM, Whealty MS, Yu DMT, et al. GSH facilitates the binding and inhibitory activity of novel multidrug resistance protein 1 (MRP1) modulators [J]. *FEBS J*, 2022, 289 (13): 3854-3875.
 [10] Zhao Y, Feng LM, Liu LJ, et al. Saikosaponin b2 enhances the hepatotargeting effect of anticancer drugs through inhibition of multidrug resistance-associated drug transporters [J]. *Life Sci*, 2019, 231: 116557.
 [11] Wang L, Zhou MT, Chen CY, et al. Increased renal clearance of rocuronium compensates for chronic loss of bile excretion, via upregulation of Oatp2 [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 40438.
 [12] Obaidat A, Roth M, Hagenbuch B. The expression and function of organic anion transporting polypeptides in normal tissues and in cancer [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2012, 52: 135-151.
 [13] Yang FJ, Xu WX, Wu LN, et al. NTCP deficiency affects the level of circulating bile acids and induces osteoporosis [J]. *Front Endocrinol (Lansanne)*, 2022, 13: 898750.
 [14] Zhang F, Duan YT, Wei YH, et al. The inhibition of hepatic pxx-Oatp2 pathway mediating decreased hepatic uptake of rosuvastatin in rats with high-fat diet-induced obesity [J]. *Life Sci*, 2020, 257: 118079.
 [15] Qin YJ, Tan JX, Han XM, et al. Effect of Yinzhihuang on alleviating cyclosporine A induced cholestatic liver injury via farnesoid X receptor-mediated regulation of transporters and enzymes in vitro and in vivo [J]. *Biol Pharm Bull*, 2023, 46 (12): 1810-1819.
 [16] Marin JJG, Monte M, Macias R, et al. Expression of chemoresistance-associated ABC proteins in hepatobiliary, pancreatic and gastrointestinal cancers [J]. *Cancers*, 2022, 14: 3524.
 [17] Bukowski K, Kciuk, M, Kontek R, Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 3233.
 [18] Gupta SK, Singh P, Ali V, et al. Role of membrane-embedded drug efflux ABC transporters in the cancer chemotherapy [J]. *Oncol Rev*, 2020, 14 (2): 448.

(收稿日期: 2023-12-15; 修回日期: 2023-02-04)

醋柴胡水提取液不同部位对大黄酸单次给药体内分布影响及其作用机制初探

赵亚¹, 王锦秋², 刘丽娟¹, 胡巧红², 赵瑞芝^{1, 3*} (1. 广州中医药大学第二附属医院省部共建中医湿证重点实验室, 广州 510006; 2. 广东药科大学, 广州 510083; 3. 广东省中医证候临床研究重点实验室, 广州 510120)

摘要: **目的** 考察醋柴胡不同部位对大黄酸在大鼠体内的分布及其对肝核因子 1 α 和 4 α 的影响, 初步探讨醋柴胡肝靶向增强作用的活性部位和调控环节。**方法** 大黄酸分别联用醋柴胡多糖 (PSS)、正丁醇 (BUF)、小分子部位 (MHE) 灌胃大鼠, 给药后分别于 5、15、30、90、210 min 腹主动脉取血和各组织; 测定血浆及组织中大黄酸和 II 相代谢酶的含量, 以相对靶向率 (RTE) 和相对摄取率 (Re) 评价醋柴胡各部位对大黄酸组织靶向作用的影响。**结果** 醋柴胡 3 个部位均可增加大黄酸的肝靶向性, 顺序为 MHE > PSS > BUF。大黄酸给药后 30 min, PSS 和 BUF 部位显著降低了 SULT1A 的活性, MHE 显著升高了肝核因子 HNF1 α /HNF4 α 含量。**结论** 3 个部位均为醋柴胡活性部位, 不同部位具有不同作用机制, 有待进一步探讨。

关键词: 醋柴胡; 肝靶向; 肝核因子; II 相代谢酶

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)07-1812-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.022

Different parts of Vinegar-baked Bupleuri Radix water extract affect the distribution of rhein and hepatic nuclear factor 1/4 α by single administration

ZHAO Ya¹, WANG Jin-qiu², LIU Li-juan¹, HU Qiao-hong², ZHAO Rui-zhi^{3*} (1. *State Key Laboratory of Chinese Medicine for Dampness Syndrome, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006*; 2. *Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006*; 3. *Guangdong Provincial Key Laboratory of Clinical Research on Traditional Chinese Medicine Syndrome, Guangzhou 510120*)

Abstract: Objective To determine the distribution of different parts of Vinegar-baked Bupleuri Radix (VBRB) on rhein in rats and its effect on liver nuclear factor 1 α and 4 α and to preliminarily explore the active sites and regulatory links of the liver targeted enhancement effect of VBRB.

Methods Rhein was orally administered in rats in combination with polysaccharides (PSS), *n*-butanol (BUF), and small molecule fraction (MHE) of VBRB. The blood and tissues were collected from the abdominal aorta at 5, 15, 30, 90, and 210 min after the administration. The contents of rhein and phase II metabolic enzymes in the plasma and the tissues were measured, and the relative targeting rate (RTE) and relative uptake rate (Re) were calculated to evaluate the effects of different parts of VBRB on rhein tissue targeting. **Results** Based on the RTE and Re, all three parts of VBRB increased the liver targeting of rhein in the order of MHE > PSS > BUF. After the administration of rhein for 30 min, PSS and BUF decreased the activity of SULT1A, while HNF1 α /4 α content was increased by MHE. **Conclusion** All three parts are the active parts of VBRB, with different parts aiming different targets, and the mechanism needs verification.

Key words: Vinegar-baked Bupleuri Radix; liver targeting; liver nuclear factor; phase II metabolic enzyme

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.81073063, No.82173981, No.81573612); 广东省科技计划项目 (No. 2023B1212060063)。

作者简介: 赵亚, 女, 副研究员, 主要从事中药新剂型及其相关技术研究, email: zhaoya@gzucm.edu.cn ***通信作者:** 赵瑞芝, 女, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事中药药性理论和新剂型研究, email: 13610241754@163.com

配伍是中医遣方用药的特色与优势,以药性理论为基础,合理配伍既可减轻药物的毒性,又可提高有效成分的靶向性,从而发挥增效减毒的作用^[1-3]。大黄与柴胡是常见的配伍药对,其主要代表方为大柴胡汤,是疏肝利胆、通腑泄热的基本方。柴胡醋制后毒性减弱,疏肝解郁、止痛的作用增强,是经典的肝经引经药。大黄的主要成分为大黄酸,在抗病毒、抗肿瘤、保肝等多方面具有较高的活性^[4-6]。前期研究显示醋柴胡水提取液可增加大黄酸、白藜芦醇等的肝内分布^[7-8],但其具体的活性部位与作用机制并不清楚,为其开发带来了极大的困难。本研究将醋柴胡水提取液分为醋柴胡多糖(PSS)、小分子(MHE)、正丁醇(BUF)几个部位,分别与大黄酸联用,考察醋柴胡不同部位对大黄酸在大鼠体内分布的影响,初步探讨醋柴胡肝靶向增强作用的活性部位;然后通过检测转运蛋白、代谢酶及肝核因子水平等探讨醋柴胡发挥肝靶向促进作用的机制。

1 材料

1.1 实验动物

SD 雄性大鼠,SPF 级,120 只,体重 250~280 g [北京维通利华实验动物中心,动物生产许可证号为 SCXK(京 2016-0011),使用许可证号为 SYXK(粤)2013-0094]。

1.2 试药

大黄酸(HPLC \geq 98%,批号:T30A8F42628,源叶生物有限公司),1,8-二羟基蒽醌(HPLC \geq 98%,批号:PS010565,成都普思生物科技股份有限公司),醋柴胡(批号:180201541,康美药业股份有限公司,由广东省中医院药师陈文良鉴定为北柴胡 *Bupleurum chinense* DC 炮制品)。大鼠 HNF4a ELISA 试剂盒(批号:G1851UMHYP)、大鼠 HNF1a ELISA 试剂盒(批号:1B369WP3R1)(武汉 Elabscience 公司),大鼠 SULT1A ELISA 试剂盒(批号:201806)、大鼠 GST ELISA 试剂盒(批号:201808)(上海酶联),ATP 代谢酶试剂盒(南京建成)。

1.3 仪器

高效液相色谱仪(Agilent 1200),荧光定量 PCR 仪(ABI Quant Studio 7 Flex),高灵敏度化学发光成像仪(美国 Bio-Rad)。

2 方法

2.1 醋柴胡不同部位的制备

称取 300 g 醋柴胡,加入 10 倍量的水提取 3 次,每次 1.5 h,合并提取液,减压浓缩至相当于生药材 1 g \cdot mL⁻¹,得到醋柴胡总提取液^[7-8];取 200 mL 的总

提取液加入 800 mL 的无水乙醇,搅拌,于 4℃ 冰箱中放置过夜,5000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min,下层沉淀部分为 PSS(出膏率为 5.25%),取上清液浓缩至无醇味后,加入 3 倍体积的水饱和的正丁醇进行萃取,直至上层呈淡黄色,萃取液浓缩其中下层为 MHE(出膏率 4.88%),上层为 BUF(出膏率 5.35%)^[9]。

2.2 动物分组与给药

120 只 SPF 级 SD 雄性大鼠饲养一周后,随机分为大黄酸组,大黄酸+PSS 组,大黄酸+BUF 组,大黄酸+MHE 组,共 4 组,每个时间点 6 只大鼠,给药前禁食不禁水 12 h。大黄酸给药剂量为 70 mg \cdot kg⁻¹,醋柴胡各个部位给药剂量相当于醋柴胡 540 mg \cdot kg⁻¹,各组给药后分别于 5、15、30、90、210 min 后腹主动脉取血,置于含有肝素钠的离心管中,与管壁充分混合后在 5000 r \cdot min⁻¹,4℃ 条件下离心 25 min,取上清液于一 80℃ 保存待测。此后,处死动物并摘取心、肝、脾、肺、肾,-80℃ 保存待测。

2.3 分析方法^[9]

色谱柱(250 mm \times 4.6 mm,5 μ m),荧光检测器:激发波长 233 nm、发射波长 519 nm,流动相为甲醇-0.1%甲酸水=85:15,流速 1 mL \cdot min⁻¹,柱温 35℃,进样量 20 μ L,内标物为 1,8-二羟基蒽醌。

2.4 样品预处理及测定^[9]

取 200 μ L 的血浆加入 20.90 μ g \cdot mL⁻¹的 1,8-二羟基蒽醌和 2 mol \cdot mL⁻¹的盐酸各 50 μ L,再加入 1 mL 的乙酸乙酯萃取 2 次,合并乙酸乙酯层,氮气吹干,200 μ L 甲醇复溶,按“2.3”项下条件进样。取心、肝、脾、肺、肾称重,加入 3 倍预冷的生理盐水后匀浆,取 200 μ L 的脏器匀浆分别同上述血浆处理方法处理,得脏器样品液。

2.5 II 相代谢酶的测定

分别取各给药组 5 min 和 30 min 的大鼠肝脏约 100 mg,加 3 倍预冷的生理盐水进行匀浆,14 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,用 ELISA 法在酶标仪下测定吸光度,根据标准曲线计算肝脏中尿苷二磷酸葡萄糖醛酸基转移酶(UGT)、苯酚磺基转移酶(SULT1A)、谷胱甘肽巯基转移酶(GST)的含量。

2.6 肝细胞核因子(HNF1 α /HNF4 α)的测定

分别取各组给药 5 min 和 30 min 的大鼠肝脏约 100 mg,加 3 倍预冷的生理盐水进行匀浆,14 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,按照试剂盒说明书操作,用酶标仪检测浓度。

2.7 靶向性评价方法

参照文献^[7], 采用相对摄取率 (relative uptake ratio, RE) 和相对靶向效率 (relative targeting efficiency, RTE) 进行评价, RE 是指与单用组相比, 联用药物在给定脏器中药物分布的变化, RTE 则是指药物在给定脏器分布占全身分布的百分比与单用组比较的变化。

2.8 数据统计

实验结果用均值 ± 标准差表示, 用 Graph Pad Prism 5 作图, 用 IBM SPSS Statistics 23 统计软件分析, 多组间比较采用单因素 ANOVA 检验和多重比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 醋柴胡对大黄酸在大鼠体内分布的影响

不同时间点组织内药物浓度结果见图 1。大黄酸在血浆中的达峰时间为 5 min, 其药物脏器分布的顺序为: 肾脏 > 血液 > 肺 > 肝 > 心 > 脾; 醋柴胡水提取液的不同部位均影响了大黄酸的体内过程。其中 PSS 增加了各个脏器的药物峰浓度

(C_{max}), 增加幅度在 26% ~ 165%, 以血液中增加最多, 肝脏增加幅度为 82%, 高于脾脏、脾脏和心脏, 但低于血液和肾脏; MHE 部位增加了肝脏和肾脏的药物 C_{max} , 分别增加了 15% 和 102%, 同时还降低了肺脏的 C_{max} , 降低幅度为 26%, 对心脏、脾脏 C_{max} 影响不大。而 BUF 部位增加了大黄酸在脾脏、肾脏的 C_{max} , 增加幅度分别为 15% 和 52%; 降低了其他组织的 C_{max} , 除肾脏外, 组织内均呈现快速吸收、快速消除的模式。醋柴胡三个部位均延缓了大黄酸的消除, 尤其是在肝脏的消除。 $AUC_{0\sim t}$ 数据表明 PSS 部位增加了大黄酸在血浆、肝脏的分布, 分别增加了 35%、60%; 降低了大黄酸在肺脏、肾脏中的分布, 分别为 28%、19%。MHE 部位增加了大黄酸在血浆、肝脏、肾脏中的分布, 分别升高了 37%、93%、40%; 降低了在肺中的分布, 降低幅度为 44%。BUF 部位增加了大黄酸在血浆、肝脏、肾脏中的分布, 分别增加 14%、50%、29%, 降低了在肺脏中的分布, 降低幅度为 39%。

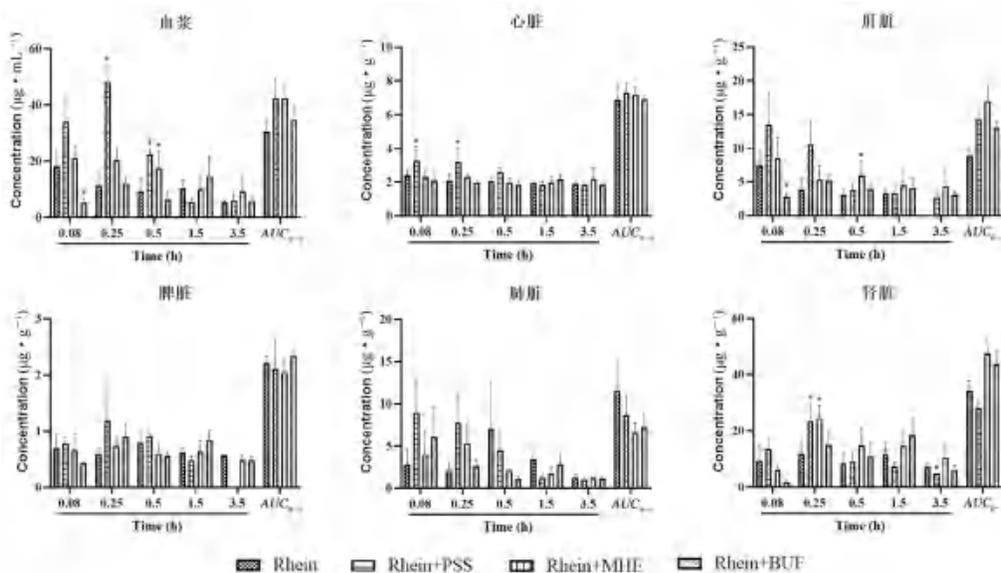


图 1 醋柴胡不同提取部位对大黄酸体内分布的影响 ($n = 6$)

Fig 1 Different part of VBRB water extract on the concentration of rhein in tissues ($n = 6$)

3.2 靶向性评价

RE 和 RTE 是评价药物靶向性的常用指标^[10], 结果见表 1。RE 是同一脏器相对于对照组药物浓度的变化反映, RE 值大于 1 显示靶向性增强, 小于 1 则显示靶向性降低。从表 1 可以看出, 醋柴胡不同部位均可显著增加大黄酸的肝靶向性, PSS、MHE 和 BUF 部位增加幅度分别为 60%、93% 和 50%, 以 MHE 部位作用最强; 三个部位还同时增加了大黄酸在血中的 RE 值, 分别为 35%、37% 和 13%, 显示出不同部位的醋柴胡均增加了大黄酸的

吸收, MHE 和 BUF 部位还增加了肾脏 RE 值, 增加幅度分别为 41% 和 29%, 均低于肝脏部位的增加; 另外, PSS 部位显著降低了肺脏和肾脏的 RE 值, 降低幅度分别为 28% 和 18%; MHE 和 BUF 部位显著降低了肺脏 RE 值, 降低幅度分别为 44% 和 39%。

RTE 反映药物脏器分布占全身占比的变化, 正值显示靶向性增加, 反之, 则显示靶向性降低。PSS、MHE 和 BUF 的肝脏 RTE 分别为 0.49、0.49 和 0.30, 而 PSS 组除血浆外、MHE 组除血

浆和肾脏外、BUF 组除肾脏外，均为负值，进一步显示三个部位均增强了大黄酸的肝靶向性，而降低了其他组织的靶向性。

表 1 醋柴胡水提取液不同部位影响不同脏器的 RE 和 RTE
Tab 1 Different part of VBRB water extract on RE and RTE

部位	PSS + 大黄酸		MHE + 大黄酸		BUF + 大黄酸	
	RE	RTE	RE	RTE	RE	RTE
血浆	1.35	0.26	1.37	0.05	1.13	-0.01
肝脏	1.60	0.49	1.93	0.49	1.50	0.30
脾脏	0.96	-0.11	0.93	-0.23	1.06	-0.07
肺脏	0.72	-0.33	0.56	-0.57	0.61	-0.47
心脏	1.05	-0.02	1.04	-0.20	1.01	-0.12
肾脏	0.82	-0.24	1.40	0.08	1.29	0.12

3.3 醋柴胡不同部位对 II 代谢酶的影响

代谢酶是影响药物体内分布的关键因素之一，大黄酸为 II 相代谢，为探讨醋柴胡不同部位影响药物体内分布的环节，本研究考察了其对肝脏内主要 II 相代谢酶的影响，结果见图 2。在给药 30 min MHE 部位促进了 UGT 和 GST 的活性，其他部位对这两种酶无显著影响，提示影响 UGT 和 GST 不是影响大黄酸肝靶向性的关键环节。

与对 UGT 和 GST 的作用不同，在 30 min 时间点，PSS 和 BUF 均显著抑制 SULT1A，与消除延迟的作用一致，提示 SULT1A 可能是醋柴胡水提取液 PSS 和 BUF 部位肝靶向增强作用的靶点。

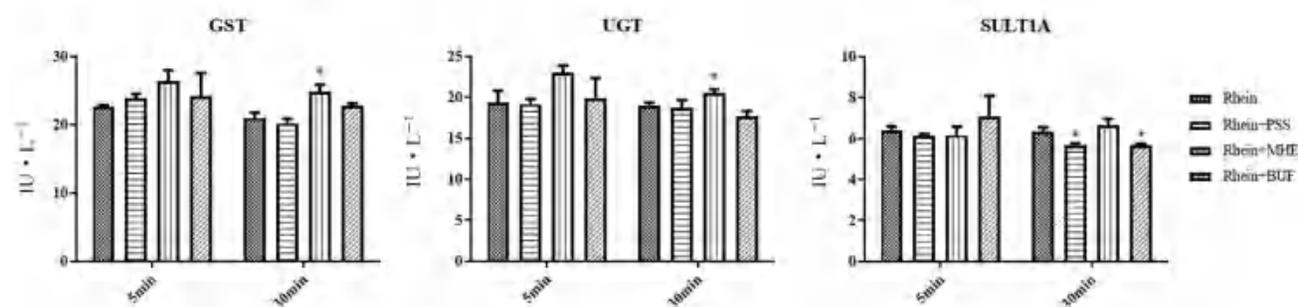


图 2 大黄酸不同部位对肝脏 II 相代谢酶活性影响

Fig 2 Different part of VBRB water extract on the activity of phase II metabolism enzyme

注 (Note): 与大黄酸组比较, * $P < 0.05$ (Compared with the rhein group, * $P < 0.05$).

3.4 醋柴胡不同部位对 HNF1 α /HNF4 α 表达的影响

在 5 min 和 30 min 时间点，PSS 部位不影响 HNF1 α /HNF4 α 表达，MHE 部位在 5 min 时有增加 HNF1 α 表达的趋势，给药 30 min 时可显著增加 HNF4 α 的表达；BUF 部位在给药 5、30 min 对 HNF1 α /HNF4 α 均有提高其表达的趋势。结果见图 3。

4 讨论

引经药的作用类似于现代靶向给药系统，众多临床试验证实其与现代靶向给药系统临床结果，本课题组前期研究也证实醋柴胡的协同增效作用与其增加其他药物的肝内分布相关，是其引经增效作用的主要原因^[11-12]，然而其活性部位尚不清楚。本实验将醋柴胡水提取液分为几个部位考察其对大黄酸在大鼠体内吸收及分布的影响。结果显示，醋柴胡三个部位均增强大黄酸肝靶向作用，MHE 部位作用最强，PSS 部位次之，BUF 部位效果稍弱，三个部位的 RE 和 RTE 值均低于醋柴胡水提取液的相应指标^[7]，提示醋柴胡肝靶向增强作用是三个部位协同作用的结果，后续需要开发针对性方法控制 PSS 和 MHE 部位的质量。

我们分析肝内药物浓度的经时过程时发现，不同部位的影响不同。PSS 部位显著提高大黄酸

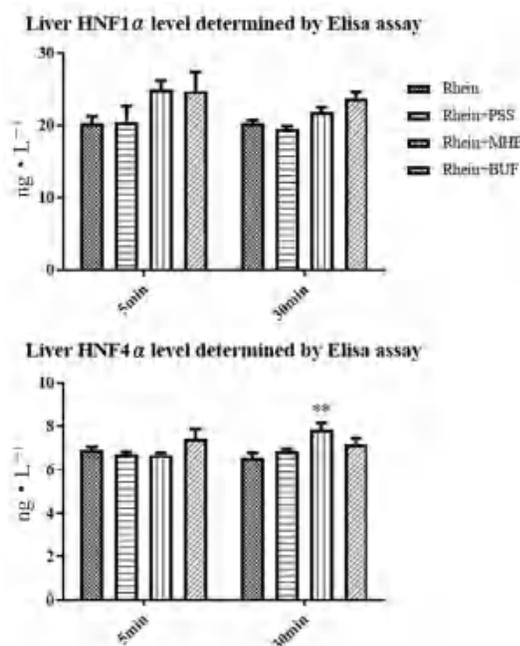


图 3 醋柴胡水提取液不同部位对肝细胞核因子的影响 (** $P < 0.01$)

Fig 3 Effect of different parts of water extract Vinegar-baked Bupleuri Radix on HNF1 α /HNF4 α (** $P < 0.01$)

肝内峰浓度，但给药 0.5 h 前与大黄酸相同，呈现快速吸收、快速消除的模式，0.5 h 之后则呈现缓慢消除的模式；MHE 部位峰浓度增加幅度较小，

BUF 部位不增加大黄酸肝内峰浓度, 这两个部位均存在消除减慢及双峰现象, 说明这两个部位可能促进了排入肠中的大黄酸重新吸收入肝, 也可能主要通过抑制药物肝内清除而实现肝靶向增强作用, 上述结果提示不同部位作用的靶点和环节可能不同。

药物浓度是吸收和清除共同作用的结果, 其中吸收主要与转运蛋白活性有关, 而清除则受药物代谢酶和转运蛋白共同调节, 考虑到延缓消除是三个部位共同的模式, 大黄酸为 II 相代谢, 且体内吸收迅速, 消除迅速, 因此为了探讨醋柴胡不同部位的作用靶点和途径, 本研究考察了峰浓度附近两个时间点主要 II 相代谢酶 UGT、SULT1A、GST 的活性^[13]。结果显示 MHE 对 UGT 和 GST 有促进的趋势, 与其清除减慢的作用不符; PSS 和 BUF 在 30 min 可显著抑制 SULT1A 的活性, 与其肝内消除减慢的作用一致, 提示其可能为两个部位的肝靶向增强作用靶点, 其中 PSS 结果与本项目组前期研究一致^[14]。药物在脏器内浓度变化, 与其摄入与外排型转运蛋白相关, 课题组前期研究显示, 醋柴胡可影响多种转运蛋白活性, 可增加摄入型转运蛋白如 OCT1、OCT2、OAT2 等的活性, 抑制外排型转运蛋白如 Pgp、Mrp2 活性^[15-17]等, 然而大黄酸是何种转运蛋白底物目前尚缺乏文献报道, 因此本文中未进行转运蛋白活性的测试, 详细机制还有待进一步研究。

药物代谢酶的上游调控因素主要有肝细胞核因子 (HNF1 α /HNF4 α), 该因子在肝细胞分化、代谢转录水平调控起重要作用^[18], 为考察醋柴胡不同部位的作用环节, 本研究检测了肝细胞核因子活性, 结果显示醋柴胡不同部位对大鼠肝脏中肝细胞核因子的表达与体内分布及代谢酶表达不完全一致, 提示除肝细胞核因子外, 醋柴胡还可能通过其他环节调控药物相互作用。

醋柴胡不同部位均具有肝靶向增强作用, 若与具有肝毒性的药物配伍, 需要关注肝功能变化。

参考文献

[1] 赵瑞芝, 刘少军. 中药引经理论与靶向给药 [J]. 中医杂志, 2005, 46 (9): 643.
 [2] 李建波, 张莉, 张洁. 药对配伍理论及相关研究概述 [J]. 中医杂志, 2013, 54 (15): 1335-1340.
 [3] 周婧, 何溶溶, 蒋洁君, 等. 中药配伍减毒研究思路与

方法——以蟾酥、牛黄为例 [J]. 南京中医药大学学报, 2018, 34 (4): 330-333.

- [4] Shi P, Huang ZW, Chen GC. Rhein induces apoptosis and cell cycle arrest in human hepatocellular carcinoma BEL-7402 cells [J]. *Am J Chin Med*, 2008, 36 (4): 805-813.
 [5] Zhong XF, Huang GD, Luo T, et al. Protective effect of rhein against oxidative stress-related endothelial cell injury [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 5 (5): 1261-1266.
 [6] Liu S, Wang J, Shao T, et al. The natural agent rhein induces beta-catenin degradation and tumour growth arrest [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22 (1): 589-599.
 [7] Zhao RZ, Liu SJ, Mao SR, et al. Study on liver targeting effect of vinegar-baked Radix Bupleuri on resveratrol in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 126 (3): 415-420.
 [8] 陈有军. 中药引经药醋柴胡对氧化苦参碱小鼠体内分布的影响 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2009.
 [9] 王锦秋. 基于 HNF1 α /HNF4 α 探讨醋柴胡增强大黄酸肝靶向作用 [D]. 广州: 广东药科大学, 2019.
 [10] 赵莹, 赵瑞芝, 陈有军, 等. 醋柴胡对龙胆苦苷在小鼠体内分布的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21 (17): 71-74.
 [11] Chen XZ, Yu TY, Chen ZX, et al. Effect of saikosaponins and extracts of Vinegar-baked Bupleuri Radix on the activity of beta-glucuronidase [J]. *Xenobiotica*, 2014, 44 (9): 785-791.
 [12] Yu TY, Chen XZ, Wang YJ, et al. Modulatory effects of extracts of vinegar-baked Radix Bupleuri and saikosaponins on the activity of cytochrome P450 enzymes in vitro [J]. *Xenobiotica*, 2014, 44 (10): 861-867.
 [13] 杨波, 王静, 丛宇婷, 等. 基于蛋白质组学的药物代谢酶与转运体定量分析研究进展 [J]. 药科学报, 2015, 50 (6): 668-674.
 [14] Wu HY, Yu TY, Tian Y, et al. Enhanced liver targeting via coadministration with vinegar baked Radix Bupleuri [J]. *Phytomedicine*, 2018, 44: 1-8.
 [15] 冯丽敏, 张娴, 赵瑞芝. 醋柴胡小分子水溶性部位抑制 HEK-293-Pgp 细胞中 P 糖蛋白的外排功能 [J]. 中国药理学通报, 2013, 29 (12): 1684-1688.
 [16] Zhao RZ, Liu LJ, Wang YJ, et al. Vinegar-baked Radix Bupleuri modulates the cell membrane constituents and inhibits the P-gp activity in rat hepatocytes [J]. *BMC Complement Altern M*, 2014, 2014: 357.
 [17] Wu YY, Liu LJ, Zhao Y, et al. Polysaccharides of Vinegar-baked Radix Bupleuri promote the hepatic targeting effect of oxymatrine by regulating the protein expression of HNF4 α , Mrp2, and OCT1 [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 267: 113471.
 [18] 郑洁, 董承伟, 蒋吉英, 等. 肝细胞核因子 -1 α 和肝细胞核因子 -4 α 在人肝细胞癌中的表达及意义 [J]. 解剖学报, 2009, 40 (6): 933-937.

(收稿日期: 2023-12-19; 修回日期: 2024-03-18)

中药新药开发的现状及思考

白洁, 马珂, 谢浏娜, 康雅倩, 逯晶* (湖南中医药大学医学院, 长沙 410208)

摘要: 本文根据 2021—2022 年国家药品监督管理局发布的“中药新药获批数据”, 发现上市许可的中药新药数量较少, 而中药新药研发对中药的传承、中医临床治疗的帮助以及药企的生存都至关重要, 因此对中药新药研发的问题、方法与政策等展开研究, 从而提供开发思路。以期新药开发可以秉承“以中医药理论为基础, 以临床价值为导向, 重视人用经验, 全过程质量控制”的理念, 并凸显中药临床优势, 紧跟时代步伐, 创新中医药人才培养新机制, 使中药新药研发领域得到更好的发展。

关键词: 中药新药; 创新; 临床; 政策分析

中图分类号: R28

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)07-1817-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.023

Current situation and reflection on the development of new traditional Chinese medicine

BAI Jie, MA Ke, XIE Liu-na, KANG Ya-qian, LU Jing* (School of Medicine, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208)

Abstract: Based on data released by the National Drug Administration from 2021 to 2022. The number of new traditional Chinese medicine approved for marketing was relatively small. This article reviewed the research and development of new traditional Chinese medicine which play a crucial role in the inheritance of new traditional Chinese medicine, the assistance of clinical treatment with traditional Chinese medicine, and the survival of pharmaceutical enterprises. Therefore, research is conducted on the issues, methods, and policies of new traditional Chinese medicine drug to provide ideas. The development of new drugs is expected to adhere to traditional Chinese medicine theory, guide by clinical value, emphasize human experience, and control the quality in the entire process. The clinical advantages of traditional Chinese medicine were highlighted, to keep pace with the times, innovate new mechanisms for cultivating traditional Chinese medicine talents, and promote faster development of new Chinese medicine.

Key words: new traditional Chinese medicine; innovation; clinic; policy analysis

中药是中华民族的瑰宝, 为维护人类的健康作出了巨大贡献, 在 2020 年突发的新型冠状病毒疫情的抗疫过程中, 中医药人快速响应, 挑选出具有显著疗效的“三药三方”^[1], 彰显了中医药在重大疾病防治中的重要作用。然而, 相对于国内医药生

物制药产业的发展, 中药新药产业近年来发展速度相对缓慢, 新药研发面临着重大压力。近年来, 党中央国务院高度重视中医药和中药创新工作, 在很多国家重点科技计划中都加大了对中医药科技创新的支持力度^[2]。因此, 新时期下中药产业发展机遇

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (No.82104936); 湖南省自然科学基金面上项目 (No.2021JJ30498); 湖南中医药大学中医学国内一流建设学科 (No.49010200002002); 国家中医药管理局中医眼科学重点学科建设项目 (No.49021001005002)。

作者简介: 白洁, 女, 主要从事临床研究, email: 2014726836@qq.com ***通信作者:** 逯晶, 女, 博士, 副教授, 主要从事中西医结合临床研究, email: luj26@qq.com

与挑战并存。本文通过分析近年来我国中药新药研发的现状，明确中药新药研发过程中的不足和困难，梳理与中药发展有关的国家政策，对中药新药研发的要点进行了总结与展望，冀望文章中的分析与思考，能够对未来中药产业更好地发展与创新有所助益，助推中医药优势得到更充分的发挥。

1 中药新药研发的现状

1.1 中药新药审批上市的现状

参考 2014—2022 年度《药品审批报告》，从数据中可以得出，最终只有少数的中药新药获得了批准（见图 1），其约占每年总审批新药数量的 6%（见图 2）。中药新药与化学新药的区别：一是化学成分更为复杂；二是中医药的药理机制尚不清楚，其活性成分的作用多为未知；三是传统的中药药物方剂大都是从实践经验中总结产生的^[3]。中药新药的最终目标是将其运用到临床，并将其转化为上市的药物。然而，因为研发周期长，资金投入巨大，所以很多药物在研发过程中夭折^[4]。从长远来看，中药新药获批率偏低，将严重影响我国中药行业的健康发展，为此，必须进行相关的政策调整。《药品注册管理办法》在 2021 年 3 月 30 日颁布，《中药注册分类及申报资料要求》在 2021 年 10 月颁布，均提出了“坚持中医药发展规律，传承精华，守正创新”的新要求。新的注册条件建议提倡以临床价值为中心，强调方剂的安全、疗效和质量可控^[5]。



图 1 2014—2022 年中药新药审批通过的数量
Fig 1 Number of new Chinese medicine approved from 2014 to 2022

在过去的数十年里，国家加大了对医疗机构的监管力度^[6]，导致传统的中药制剂逐步被淘汰，取而代之的是具有先进的工艺和完善的质量控制系统的现代化制剂^[7]。中药新药研发过程复杂，涉及实验到临床实践的全流程，而实践又是由患者所证实的^[8]。这需要我们关注临床应用人群的体质特点，提高药品品质，使患者获得更好的疗效。中药新药的研发为推动我国药物开发提供了一种有效方法^[9]。

本研究通过对 2017—2022 年上市中药新药进行总结分析可知：中药新药的药剂类型主要为胶囊、颗粒和片剂，也有少量凝胶、口服液、丸剂

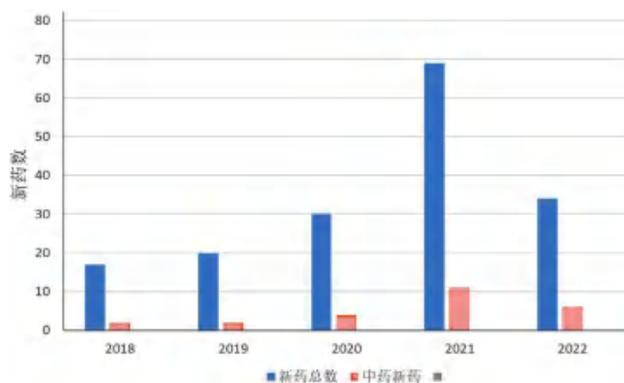


图 2 2018—2022 年审批上市新药总数与中药新药数量
Fig 2 Total number of new drugs approved for marketing and the number of new Chinese medicine drugs from 2018 to 2022

等类型，中药新药的开发更偏向于固体便携的药剂类型（见表 1）。

表 1 2017—2022 年中药新药上市药剂类型

Tab 1 Type of new traditional Chinese medicine drugs from 2017 to 2022

药剂类型	2017	2018	2019	2020	2021	2022	总计
胶囊	—	—	—	—	3	3	6
颗粒	—	2	2	—	4	3	11
片剂	—	—	—	2	3	—	5
凝胶（外用）	—	—	—	1	—	—	1
口服液	1	—	—	—	—	—	1
丸剂	—	—	—	—	1	—	1
总计	1	2	2	3	11	6	—

注（Note）：“—”代表“无”（Stands for "none"）。

由 2017—2022 年上市中药新药适应证的分布可知：中药新药的适应证分布较为广泛，详见表 2。

表 2 2017—2022 年中药新药上市药品适应证分布

Tab 2 Indications of new traditional Chinese medicine drugs from 2017 to 2022

适应证	2017	2018	2019	2020	2021	2022	总计
呼吸	1	—	—	1	—	1	3
妇科	—	2	—	—	1	1	4
五官	—	—	—	—	1	2	3
骨科（关节）	—	—	—	1	1	—	2
风湿免疫	—	—	—	—	1	—	1
肝脏	—	—	—	—	—	0	0
泌尿系统	—	—	—	1	1	2	4
儿科	—	—	2	—	—	—	2
精神类	—	—	—	—	2	—	2
新冠	—	—	—	—	3	—	3
感冒	—	—	—	—	1	—	1
糖尿病	—	—	—	1	—	—	1
总计	1	2	2	4	11	6	—

注（Note）：“—”代表“无”（Stands for "none"）。

1.2 基于 CiteSpace 的中药新药研发的可视化分析

本文运用 CiteSpace^[10-11] 对中药新药关键词及时间进行分析, 并绘制相关科学知识图谱, 使得研究现状和热点、发展趋势得到更好的体现。

1.2.1 关键词共现分析和聚类分析 以中国知网 (China National Knowledge Infrastructure, CNKI) 作为数据来源, 在数据库中检索自 2017 年至 2022 年关于中药新药研发的相关文献, 经检索, 共筛选出 227 篇文献。运用 CiteSpace 软件对关键词进行共现分析和聚类分析。高频关键词可以反映研究领域的核心主题及重要信息^[12]。做关键词共现分析时, 将时间阈值 (Time Slicing) 设为 2017—2022, 时间区间 (Years Per Slice) 设为 1 年, 节点类型 (Node Types) 设为关键词 (Keyword), 如图 3 所示, 运行后, 共现图共有 177 个节点 ($N = 177$)、

394 条连线 ($E = 394$), 网络密度为 0.0253 ($D = 0.0253$), 其中节点越大表明关键词出现频率越高, 连线越多表明两个关键词共现次数越多。为了更加直观地分析中药新药研发的研究热点和趋势, 整理出其主要关键词为中药新药、中药、临床研究、临床试验、新药研发。在已有关键词共现图谱的基础上, 将关键词进行聚类分析。其中 Q (网络模块度)、 S (平均轮廓度) 为评价聚类显著性与合理性的指标, 一般认为 $Q > 0.3$ 表示聚类社团结构显著, $S > 0.5$ 为聚类合理。如图 3 所示, 左上角 $Q = 0.5861$, $S = 0.8909$, 说明每个聚类有较好相似性。本研究形成的聚类大概分为两类: ① #0、#1、#3 针对不同中草药研究新药; ② #2、#4、#5 着重研究新药研发的策略; ③ #6 着重于中药的特点。

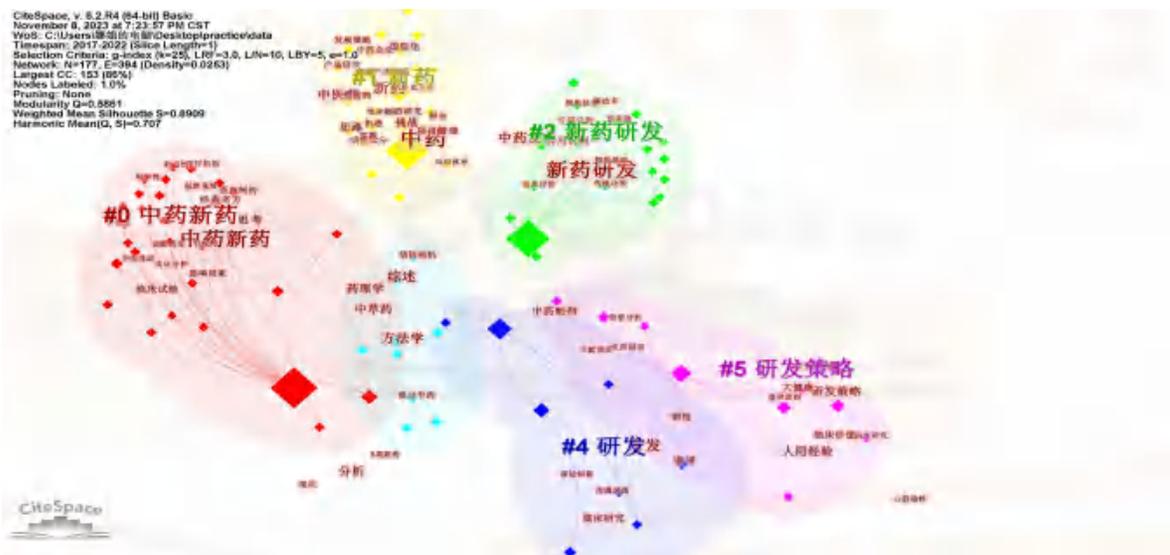


图 3 2017—2022 中药新药研发的关键词共现分析和聚类分析图谱

Fig 3 Key words co-occurrence analysis and cluster analysis of new drug research and development of traditional Chinese medicine from 2017 to 2022

1.2.2 关键词时间线图 将聚类后的关键词绘制时间线图, 各聚类对应的横线长度代表该聚类的时间跨度^[13], 聚类标签为共现图谱中的出现最多的关键词。如图 4 所示, 2017—2020 年, 研究热点主要集中在中药新药的研发和临床试验; 2020—2022 年, 研究热点主要集中在新药的审评和研发策略的解读。

2 中药新药研发的要点

2.1 明确临床定位, 提升临床价值

只有明确了更加清晰的临床定位, 才能利于临床研究的方案设计, 其与纳入和排除的标准、疗效评价指标的选择、疗程的设置等都密不可分^[14-15]。创新药物的临床定位是一个不断优化、推敲、完善的过程, 当我们临床定位越精细、越合理, 中药新药研究和开发的可论证和实践性才越高, 临床的研究的风险才越低, 才能真正运用于临床实践^[16]。

2.2 确保中药新药的疗效一致性

中药成分复杂, 大多从天然物质中提取, 含有多种活性成分, 作用机制尚不完全明确, 因此我们需要了解中药配伍理论, 通过精心挑选, 利用药物性能, 构建出更合理、更安全、更精良的中医配伍方, 增强疗效、减少药物的毒副作用^[17]。

2.3 解决新药开发安全性问题

凡药物皆有偏性, 多用、久用或药不对证, 将导致人体阴阳气血的偏盛偏衰, 甚至出现中毒现象。由此, 我们需要以药材的安全性为切入点, 落实有针对性的毒性机制研究, 不仅可以有效减少医源性和药源性疾病的发生, 还可以使中药的药效得到最大限度发挥^[18]。

3 中药新药研发过程中的不足和困难

由研究调查^[19]可知, 新药研制的不足和困难主要体现在以下几个方面:

3.1 新药研发发展动力不足

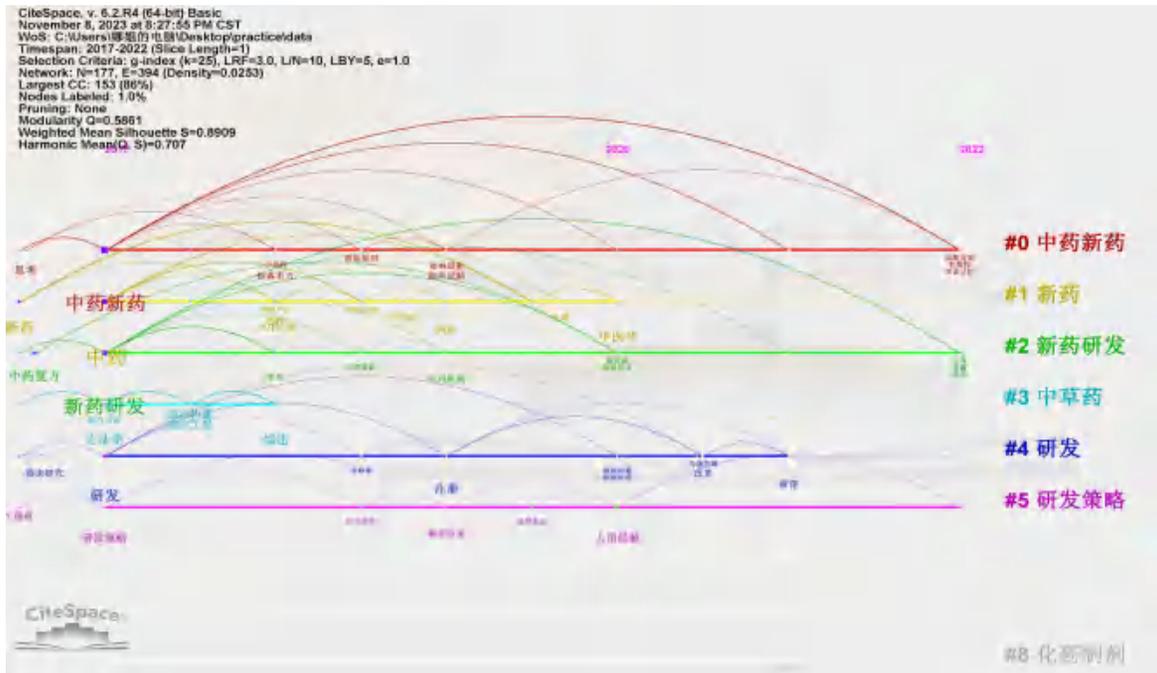


图 4 2018—2023 中药新药研发的关键词时间线图

Fig 4 Key words timeline map of new drug research and development of traditional Chinese medicine from 2018 to 2023

多家医疗机构和制药单位，药物生产有一半以上处于停产状态，而且新药生产面临受到现有药品市场销售强烈冲击、没有规范的生产加工场所和设备以及原辅料无法得到合理供应等问题，导致药品开发四处碰壁甚至停止生产。另外我国大多数中药研制仍然以保障市场供应为主，使生产商一直处于被动服务地位，缺乏主动发展动力^[20]。

3.2 新药申报通过率低

中药新药研发发展定位不清、适应证广泛以及临床药物评价不合规等，导致我国中药新药申报品类良莠不齐^[21]。同时研发人员对知识产权、专利保护和制剂申报要求缺乏关注和了解，导致最终研究成果不符合申报要求。

3.3 人员编制配置受限

从事医疗机构研发制剂的高层次科研人才欠缺，使制剂研制的需求与医疗机构的研究能力难以匹配。同时新药研究多委派研究生作为主力展开，或者委托研究单位一起参与，致使药物研发和人员变动频繁，项目无法顺利跟进，给研究的延续性带来了问题。

3.4 新药开发难以进行疗效评价

每个人的体质、症状不同，使用的中药配伍就不同，故其药物研发不能体现以临床价值为导向。中药新药研发是基于中医药理论和临床实践，中医证候的观察和疗效评价是中药新药临床试验的重要内容之一。中医证候既是目标适应证的纳入标准，也是疗效评价的目标。证候诊断标准是普遍适用的一般性规律，而中药适应证候则体现

了具体药物处方的特殊性^[22]。

4 中药新药研发的研究策略和改进

4.1 加强国家政策法规的支持

中药政策法规的健全与完善，保障了我国中医药新药研发事业的长足发展。例如，为我国中药开发生产工艺的稳步发展，2020 年国家药品监督管理局发布《中药复方制剂生产工艺研究技术指导原则（试行）》^[23]。这些政策的推出，彰显出我国扶持和促进中医药事业发展的决心与实力，新药研发发展才能有根基，有底气。

4.2 合理的资金运作

制药企业和医疗机构应该采用以资本市场的需求为导向，积极争取银行贷款或融合社会各界资金。同时我国政府应当加大可行资金投入和技术服务，为制药企业化解财政危机，积极引导和帮扶整个药物开发行业的可持续发展^[24]。

4.3 加强新药研发立项的研究

研发团队应该在新药申报前期，形成适合中药新药开发的新模式，重点开发经临床实践已验证安全有效的方剂。同时研发团队在日常临床诊疗过程中应该以新药临床价值为重点，观察临床常见病和多发恶性病。但是对于现有处方相似或者功能主治相同的处方，不建议作为立项研究。同时研发团队可以结合自身特色医疗优势，继承创新发展自己的药物品牌。

4.4 新药处方优化

后续需对中药新药研发过程和成果实时监测，针对临床患者的症状改善，用药反馈，有无不良

反应等,进一步优化新药处方工艺,改良药物剂型,更加贴合现代临床药物理念。同时完善、补充、修正药品说明书,以确保其有效性和安全性。

4.5 创新中医药人才培养新机制

中国在中医药教育方面应该做到与时俱进,开拓创新,既要创新课堂教学模式,又要关注学生的思想教育,以积极的学习态度,把创新精神充分运用在中药新药的研发上^[25]。

5 中药新药的展望

5.1 中医药开发体系的完善

关于中药新药研发一直以来还没有可供参考的已经完善的研发模式,通过长期不断地探索,符合中药本身特点的相关措施及指导原则陆续出台,并在持续不断地完善中^[26]。我们要不断健全中医药管理体制,做好中医药发展规划、标准制定、质量管理等工作,完善中医药服务监管机制,促进中医中药协调发展^[27]。

中药的用药方案如今还没有具体的相关指导规范,需要中医在行医过程中不断地总结和思考,从而形成更加完善的应用体系,更好地服务于临床。对于中药新药的药效判断与审评,也缺乏相关的细则和标准。因此,建立合理的用药理论体系和新药评审规则迫在眉睫。

5.2 互联网+中医药

我们正处于一个信息化飞速发展的时代,“互联网+”为人们衣食住行都提供了极大的便利。中医药发展同样跟上了时代快车,建立了中药用药方案经验的数据平台,更好地从根本上明确中医用药的个性化医疗^[28]。二十大报告中强调“集聚力量进行原创性引领性科技攻关”^[29],运用大数据挖掘、机器学习、人工智能、数理统计等相关临床及数学方法,结合循证医学的证据强度,模拟医师诊疗疾病的过程,从而为每个患者提供最佳治疗方案^[30]。

参考文献

[1] 陈凯先,张卫东. 中药现代化与中药创新[J]. 中国食品药品监管, 2022(8): 4-13.
 [2] 中华人民共和国国家发展和改革委员会发布《“十四五”中医药发展规划》的通告[Z]. 2022-06-01.
 [3] 孙昱. 符合中医药特点的中药新药评价思路探讨[J]. 中国药事, 2020, 34(7): 749-753.
 [4] 罗李娜,陈更新. 在药品监管新要求下医疗机构中药新药开发的思考[J]. 中国药事, 2022, 36(3): 251-255.
 [5] 刘建勋,李艳英,付志明. 中药新药传承发展与创新之路[J]. 中国现代中药, 2021, 23(1): 1-4.
 [6] 王嵩,邵庆,罗发珍,等. 基于医疗机构中药制剂的中药新药研发刍议[J]. 上海医药, 2021, 42(1): 6-9, 54.
 [7] 罗李娜,陈更新. 在药品监管新要求下医疗机构中药新药开发的思考[J]. 中国药事, 2022, 36(3): 251-255.

[8] 罗李娜,陈更新. 关于中药新药开发现代化的几点思考[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(11): 4798-4800.
 [9] 李鸿彬,丁文侠,陆文亮. 全球化研发背景下中药新药研发面临的形势和机遇[J]. 中草药, 2020, 51(15): 4092-4097.
 [10] Chen CM. CiteSpace II: detecting and visualizing emerging trends and transient patterns in scientific literature[J]. J Am Soc Inf Sci Technol, 2006, 57(3): 359-377.
 [11] 袁发洪,张家琪,郝运,等. 基于 CiteSpace 的中西医结合治疗新型冠状病毒肺炎研究态势的文献计量学分析[J]. 江汉大学学报(自然科学版), 2023, 51(2): 35-43.
 [12] 王中英,陈偶英,余艳兰,等. 基于 CiteSpace 的中医药干预化疗后周围神经毒性相关研究的可视化分析[J]. 湖南中医杂志, 2023, 39(4): 119-126.
 [13] 方芳,王金星,康焱红,等. 基于 CiteSpace 的癌症患者生育力保存文献计量分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2023, 31(4): 733-738.
 [14] 雷翔,商洪才,高春升,等. 中药新药研发临床定位的相关思考[J]. 中国新药杂志, 2023, 32(17): 1703-1706.
 [15] 王停,林红梅,周刚,等. 基于名老中医经验方的中药新药研发策略分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(14): 1-5.
 [16] 李国信,张颖,尤献民,等. 创新中药研制的关注要点[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2017, 19(9): 1419-1423.
 [17] 孙昱. 符合中医药特点的中药新药评价思路探讨[J]. 中国药事, 2020, 34(7): 749-753.
 [18] 安娜,吕佳康,韩玲. 中药安全性认识和中药新药研发的风险管理策略[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2021, 35(2): 90-95.
 [19] 高敏洁,常云成,高静. 医疗机构制剂研制现状及创新发展路径分析[J]. 中国药事, 2021, 35(9): 1052-1059.
 [20] 崔一然,吴剑坤. 基于名老中医经验处方的医院中药制剂发展现状及转化策略[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(2): 671-674.
 [21] 申琳,陈旭,于震,等. 北京市医疗机构制剂存在问题分析及对策研究[J]. 医院药事, 2015, 19(4): 57-59.
 [22] 凌丽,朱朝军,吕祥. 中药新药研发面临的问题及思考[J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(7): 3217-3220.
 [23] 国家药品监督管理局. 国家药监局药审中心关于发布《中药复方制剂生产工艺研究技术指导原则(试行)》的通告[Z]. 2020-11-26.
 [24] 田慧丽. 我国中药新药研究开发发展战略研究[J]. 中国医药指南, 2015, 13(6): 202-203.
 [25] 王利胜,吴颖,张英丰,等. 我校中药新药研制与开发课程的教学改革[J]. 中国医药导报, 2021, 18(31): 67-70.
 [26] 罗李娜,陈更新. 在药品监管新要求下医疗机构中药新药开发的思考[J]. 中国药事, 2022, 36(3): 251-255.
 [27] 卜令伟. 守正创新促进中医药发展[N]. 友报, 2022-12-23(003).
 [28] 张燕,徐新房,李菲菲,等. 真实世界研究对我国中药新药人用经验合理应用的启示[J]. 中国食品药品监管, 2022, 219(4): 35-42.
 [29] 王延斌,陈曦,赵汉斌. 科技是中医药发展的翅膀[N]. 科技日报, 2022-10-22(004).
 [30] 钟锭,刘金红,周良荣. 中医药政策发展脉络回顾与展望[J]. 中医药管理杂志, 2022, 30(19): 206-209.

(收稿日期: 2023-09-14; 修回日期: 2023-10-29)

玛巴洛沙韦：首个靶向于 Cap- 依赖性核酸内切酶的抗流感药物

周姝含¹, 胡长平^{1*}, 罗平^{2*} (1. 中南大学湘雅药学院药理学系, 长沙 410078; 2. 中南大学湘雅医院药学部, 长沙 410008)

摘要: 玛巴洛沙韦是首个 Cap- 依赖性内切酶抑制剂, 通过抑制流感病毒 RNA 聚合酶酸性蛋白亚基内切酶活性, 从而抑制流感病毒的复制。玛巴洛沙韦于 2022 年 8 月通过美国食品药品监督管理局 (FDA) 审批, 在临床上用于治疗 5 岁及以上、流感症状不超过 48 h 的急性无并发症流感患者, 并于 2023 年 3 月获得中国国家药品监督管理局正式批准。临床试验表明, 玛巴洛沙韦具有单剂量给药、安全性高等优势, 将成为儿童流感患者的替代药物。

关键词: 玛巴洛沙韦; 流行性感胃; Cap- 依赖性核酸内切酶; 抗流感药物; 儿童

中图分类号: R978.7

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)07-1822-09

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.024

Baloxavir marboxil: the first anti-influenza drug targeting Cap-dependent endonuclease

ZHOU Shu-han¹, HU Chang-ping^{1*}, LUO Ping^{2*} (1. Department of Pharmacology, Xiangya School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410078; 2. Department of Pharmacy, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008)

Abstract: Baloxavir marboxil is the first Cap-dependent endonuclease inhibitor, which inhibits the replication of influenza virus by inhibiting the activity of influenza RNA polymerase acidic protein subunit endonuclease. It was approved by the U. S. Food and Drug Administration in August 2022 for acute uncomplicated influenza patients aged 5 years and older with symptoms less than 48 hours. It was officially approved by the National Medical Products Administration of China in March 2023. Clinical trials have shown that baloxavir marboxil, with its advantages of single dose administration and high safety, may become an alternative for drug-resistant pediatric patients.

Key words: baloxavir marboxil; influenza virus; Cap-dependent endonuclease; anti-influenza drug; child

流行性感胃 (influenza virus), 简称流感, 是一种由流感病毒感染引起的急性呼吸道传染病。流感属于自限性疾病, 但流感病毒感染人体后会诱发细胞因子风暴, 导致全身炎症反应, 出现急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS)、休克及多脏器功能衰竭, 儿童可发生急性坏死性脑病^[1-2]。据估计, 在全球范围内流感流行每年造成 300 万~500 万严重病例, 导致 29 万~65 万例与呼吸道疾病相关的死亡^[3]。流感病毒是单链反义 RNA 病毒, 属于正黏病毒科, 分为甲型、

乙型、丙型和丁型四种类型^[4]。目前抗流感病毒药物主要包括神经氨酸酶抑制剂 (neuraminidase inhibitors, NAIs)、血凝素 (hemagglutinin) 抑制剂和 M2 离子通道阻滞剂等^[5-6], 流感病毒传播迅速、变异快, 而安全有效的抗流感病毒药物种类少、靶点单一, 长期使用易产生耐药性, 所以研究直接靶向流感病毒蛋白或基因的药物是抗流感病毒药物研发的有效策略^[7]。

玛巴洛沙韦 (baloxavir marboxil, S-033188) 是由日本研发的首个靶向于 Cap- 依赖性核酸内切酶

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 82173817; No. 82241025); 长沙市自然科学基金 (No. kq2208366)。

作者简介: 周姝含, 女, 硕士研究生, 主要从事心血管药理学研究, email: 227211062@csu.edu.cn *通信作者: 胡长平, 男, 教授, 主要从事心血管药理学和呼吸药理学研究, email: huchangping@csu.edu.cn; 罗平, 女, 主管药师, 主要从事儿童个体化用药研究, email: luoping1011@126.com

(Cap-dependent endonuclease, CEN) 的小分子抗流感病毒药物^[8-9], 其分子式为 $C_{27}H_{23}F_2N_3O_7S$, 分子量为 571^[10], 结构式见图 1。玛巴洛沙韦具有单剂量给药方案、无交叉耐药性等优点, 临床研究发现玛巴洛沙韦治疗流感的效果优于奥司他韦等传统抗流感病毒药物^[11-12], 对奥司他韦耐药的流感病毒仍对玛巴洛沙韦敏感, 使其成为耐药流感病毒的替代治疗药物^[13]。2018 年 2 月 23 日, 玛巴洛沙韦在日本首次获得审批上市, 用于治疗 12 岁及以上、流感症状持续时间不超过 48 h 的急性无并发症流感患者^[14]; 同年 10 月 24 日获得美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准上市^[10]; 2021 年 4 月, 获得中国国家药品监督管理局批准, 用于治疗 12 周岁及以上单纯性甲型和乙型流感患者, 包括存在流感并发症高风险的患者^[15]。FDA 于 2022 年 8 月扩大玛巴洛沙韦的适用人群^[16], 可用于 5 岁及以上、流感症状持续时间不超过 48 h 的急性无并发症流感患者。2023 年 3 月 21 日获得国家药品监督管理局正式批准, 用于治疗既往健康的成人和 5 岁及以上儿童单纯性甲型和乙型流感患者, 或存在流感相关并发症高风险的成人和 12 岁及以上儿童流感患者^[17]。美国疾病控制与预防中心 (Centers for Disease Control and Prevention, CDC)^[18] 推荐玛巴洛沙韦可用于治疗 5 ~ 12 岁且无任何慢性疾病的儿童和所有 12 岁及以上人群的流感。本文对玛巴洛沙韦的作用机制、药代动力学、临床试验研究、安全性和药物相互作用等进行综述。

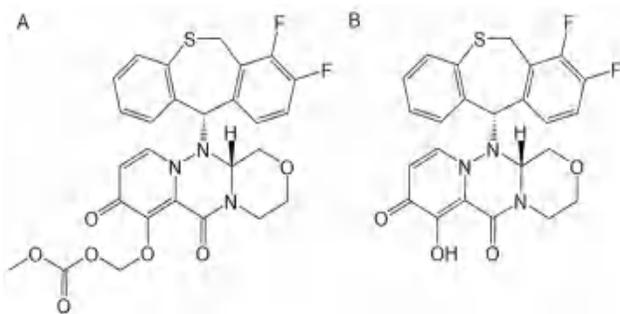


图 1 玛巴洛沙韦 (A) 和巴洛沙韦酸 (B) 的结构式
Fig 1 Structure of baloxavir marboxil (A) and baloxavir acid (B)

1 作用机制

甲型、乙型流感病毒通过血凝素与呼吸道上皮细胞表面的唾液酸受体结合启动感染, 流感病毒进入宿主细胞后, 在细胞核内完成转录复制过程。流感病毒利用夺帽机制启动病毒 mRNA 转录。夺帽机制是指流感病毒 RNA 聚合酶进入宿主细胞核后, 聚合酶酸性蛋白 (polymerase acidic protein, PA) 亚基将宿主细胞 mRNA 5' 末端的 Cap 结构 (约 12 个核苷酸序列) 进行切割, 将切割下来的 Cap 结构与流感病毒的 vRNA 结合, 形成具有 5'

端 Cap 结构的流感病毒 mRNA, 然后被转运至细胞质中, 参与流感病毒蛋白质的合成^[1, 19-20]。夺帽机制是流感病毒繁殖的一个重要环节, 宿主细胞中不存在类似的事件和相应的酶, 因此针对夺帽机制的内切酶抑制剂可以选择性阻断流感病毒的转录过程, 而不影响宿主细胞^[21]。

巴洛沙韦酸 (baloxavir acid, S-033447, 结构式见图 1) 是玛巴洛沙韦的活性形式, 是基于多替拉韦的 2 个金属药效团概念, 经合理分子设计产生的^[22]。为增强巴洛沙韦酸的口服吸收, 通过氯代碳酸二甲酯 (CH_3OCOCH_2Cl) 与羟基发生亲核取代反应, 制备前药玛巴洛沙韦。玛巴洛沙韦作为前药, 口服后被丝氨酸酯酶家族酶芳基乙酰胺脱乙酰酶 (arylacetyl deacetylase, AAD-AC) 迅速水解为活性成分巴洛沙韦酸, 并结合到流感病毒酸性聚合酶内切酶结构域, 通过抑制流感病毒 PA 亚基内切酶活性, 抑制流感病毒的夺帽机制, 导致病毒的复制过程受阻, 从而特异性阻断甲型和乙型流感病毒的增殖过程^[8, 23-24]。因此, 不同于血凝素抑制剂、M2 离子通道抑制剂和 NAIs, 玛巴洛沙韦是一种新作用机制的抗流感病毒药物^[13]。玛巴洛沙韦对甲型流感病毒的各种亚型 (H1N2、H5N1、H5N2、H5N6、H7N9 和 H9N2) 均表现出抑制作用^[25]。巴洛沙韦酸在体外也表现出抗 SARS-CoV-2 病毒活性, 其半数有效浓度 (half effective concentration, EC_{50}) 为 $5.48 \mu mol \cdot L^{-1}$ ^[26]。

2 药代动力学

根据 FDA 批准的玛巴洛沙韦的用法用量, 12 岁以上的青少年和成人剂量为体重 < 80 kg 的患者服用 40 mg, 体重 ≥ 80 kg 的患者服用 80 mg^[10, 23]。群体药代动力学分析表明, 具有一级吸收和滞后时间的二室模型可以较好地描述巴洛沙韦酸的血浆浓度数据^[23, 27]。玛巴洛沙韦口服后主要通过 AADAC 在肠道、血液和肝脏中水解代谢为活性代谢物即巴洛沙韦酸, 血药浓度达峰时间 (t_{max}) 为 4 h^[23, 28]。在禁食状态下, 巴洛沙韦酸在 6 ~ 80 mg 的剂量范围内表现出基本线性的药代动力学特征^[29]。食物抑制玛巴洛沙韦吸收, 峰浓度 (C_{max}) 减少 48%, 药物浓度 - 时间曲线下面积 (AUC) 降低 36%^[10, 29]。食物效应是由胃肠道水解产生的螯合物和食物中含有的金属离子导致巴洛沙韦酸的膜渗透性或溶解度降低引起, 因为巴洛沙韦酸的结构中羟基和酮基彼此相邻, 羟基和酮基容易与金属离子形成螯合物^[23]。Ando 等^[30] 评估了小鼠皮下注射巴洛沙韦酸 (0.125、0.5、2、8 mg $\cdot kg^{-1}$) 的药代动力学, 巴洛沙韦酸的血浆浓度随给药剂量成比例增加, 且皮下注

射 $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 与口服玛巴洛沙韦 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的血药浓度相似, 甚至高于口服, 表明小鼠皮下注射可能优于口服给药。

Koshimichi 等^[23]研究了来自 12 项临床研究中的 1109 名受试者的 8310 个玛巴洛沙韦血浆浓度数据点的群体药代动力学和暴露-效应分析, 剂量组分为 40 mg、80 mg, 体重分析组分为 $< 60 \text{ kg}$ 、 $60 \sim 80 \text{ kg}$ 、 $> 80 \text{ kg}$, 种族分组分为亚洲和非亚洲(美国、英国)。结果表明, 体重和种族是影响玛巴洛沙韦清除和表观分布容积的最重要因素, 在同一剂量组内 C_{max} 、 AUC 、 C_{24} (给药后 20 ~ 28 h 观察到的血浆浓度) 均随着体重的增加而降低, 非亚洲人的 C_{max} 、 AUC 、 C_{24} 低于亚洲人^[23]。巴洛沙韦酸与血浆蛋白结合率高 ($93\% \sim 94\%$), 具有较大的表观分布容积 (1180 L)^[10], 血浆药物呈指数下降^[23], 半衰期长达 79.1 h, 因此可以单剂量给药^[13, 23]。巴洛沙韦酸主要通过尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 1A3 (uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A3, UGT1A3) 和细胞色素 P450 酶 (cytochrome P450, CYP) 3A4 在肝脏中代谢消除^[13], 代谢过程主要由 UGT1A3 代谢为葡萄糖醛酸复合物, 随后由 CYP3A4 代谢为亚砷^[14]。推测药物清除率与种族有关, 其中 UGT1A3 多态性具有种族差异^[23]。巴洛沙韦酸主要通过粪便排泄, 少量通过尿液排泄^[13], 在健康受试者中单次服用 40 mg 放射性标记的玛巴洛沙韦后, 80% 的药物在粪便中回收, 15% 在尿液中回收^[28]。

3 临床研究结果

3.1 12 岁及以上人群的流感治疗效果

目前 FDA 批准的玛巴洛沙韦的唯一适应证是对 5 岁及以上出现症状不超过 48 h 的急性无并发症流感患者的治疗^[13]。玛巴洛沙韦已在不同的动物体内进行了研究, 如免疫缺陷裸鼠^[31-32]、雪貂^[33]等, 也在不同国家进行了研究, 主要是日本、美国^[34-36], 其次在中国^[37]、韩国^[38]等, 结论均表明玛巴洛沙韦对流感病毒有一定的抑制作用, 表现出一定的临床疗效。

2015 年 12 月至 2016 年 3 月进行的一项双盲、随机、安慰剂对照的 II 期临床试验^[39], 研究对象是患有急性流感的 20 ~ 64 岁日本成年人, 分为四组 (患者比例为 1 : 1 : 1 : 1), 分别使用单剂量玛巴洛沙韦 (10、20、40 mg) 与安慰剂, 主要疗效观察终点是患者的流感症状缓解时间 (the time to alleviation of symptoms, TTAS)。结果表明, 玛巴洛沙韦组症状缓解的中位时间 (10 mg 组 54.2 h, 20 mg 组为 51.0 h, 40 mg 组为 49.5 h) 明显短于安慰剂组 (77.7 h), 所有玛巴洛沙韦组的流感病毒滴度均显著低于安慰剂组, 玛巴洛沙韦组

不良反应的发生率 ($23.0\% \sim 27.0\%$) 与安慰剂组 (29.0%) 相比差异无统计学意义。CAPSTONE-1 是 2016 年 12 月至 2017 年 3 月在日本、美国进行的一项 III 期、双盲、安慰剂和阳性对照的随机试验 (NCT02954354)^[39], 研究对象为 12 ~ 64 岁患有急性无并发症的流感患者, 玛巴洛沙韦组为单剂量、基于体重的剂量方案 ($< 80 \text{ kg}$ 患者 40 mg; $\geq 80 \text{ kg}$ 患者 80 mg), 对照组每日 2 次 (bid) 每次 75 mg 口服奥司他韦 5 d, 安慰剂组服用对应剂量的安慰剂, 主要疗效观察终点为 TTAS。结果表明, 玛巴洛沙韦组缓解症状的中位时间为 53.7 h, 优于安慰剂 (80.2 h), 与奥司他韦组相似 (52.8 h), 单剂量玛巴洛沙韦无明显的安全性问题。在上述 II 期和 III 期临床试验中, 分别在 2.2%、9.7% 的玛巴洛沙韦治疗患者中检测到 PA 中存在 I38T/M/F 取代的变异体, 从而降低了患者对玛巴洛沙韦的敏感性。Portsmouth 等^[40]报道了 CAPSTONE-1 的亚组试验结果, 亚组对象为 12 ~ 17 岁青少年, 与安慰剂相比, 玛巴洛沙韦在患有急性流感的健康青少年中显示出更好的临床和病毒学疗效, 未发现安全问题。这些结果与 CAPSTONE-1 中的成年人群相似, 支持玛巴洛沙韦作为青少年的治疗选择。在全球的研究中, 亚洲患者大部分为日本人, 较少有中国人群的临床试验数据, 故 Liu 等^[37]进行了一项随机、开放标签的 I 期临床试验 (NCT03959332), 评估玛巴洛沙韦在 32 名 20 ~ 59 岁健康中国男性志愿者中的药代动力学和安全性, 并用于预测其在中国患者中的疗效。试验者口服单剂量的玛巴洛沙韦 (40 或 80 mg), 在给药前和给药后 14 日的不同时间点采集血液样本, 测定血浆药物浓度, 通过非房室模型分析玛巴洛沙韦和巴洛沙韦酸的药代动力学参数, 记录不良事件, 并对其他方面健康 (OwH) 和高风险 (HR) 的中国和亚洲患者的 TTAS 进行了模拟。结果 32 名男性受试者口服玛巴洛沙韦后, 巴洛沙韦酸血浆浓度 t_{max} 为 4 h, 40 和 80 mg 队列的 C_{max} 分别为 $107.6 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $206.9 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $AUC_{0-\text{inf}}$ 分别为 $6955 \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $9643 \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$; 不良事件轻微且短暂, 没有发现新的安全事件; OwH 和 HR 中国受试者的 TTAS 模拟中值与亚洲患者一致; 中国受试者药代动力学参数与其他研究中亚洲人群相似。全球采用的玛巴洛沙韦给药策略与该人群中所观察到的玛巴洛沙韦安全性情况一致。模拟疗效表明, 玛巴洛沙韦在中国患者和其他亚洲患者之间的临床疗效可能相似。

CAPSTONE-2 是 2017 年 1 月—2018 年 3 月在 12 岁及以上的高危患者中进行的随机、双盲、

双模拟、安慰剂对照和奥司他韦阳性对照的国际Ⅲ期临床试验(NCT02949011)^[41],主要研究玛巴洛沙韦在高危流感相关并发症门诊患者中的疗效,研究对象为患有高并发症风险的流感患者(纳入的高并发症包括哮喘或慢性肺病、内分泌紊乱、心脏病、年龄大于65岁以及代谢紊乱),患者随机分配为三组(分配比例为1:1:1),玛巴洛沙韦组(基于体重的剂量方案),奥司他韦组和匹配的安慰剂组(剂量:75 mg bid, 5 d)。主要终点是患者流感症状的改善时间(the time to improvement of influenza symptoms, TTIS)。结果表明,单剂量玛巴洛沙韦改善高危流感患者症状优于安慰剂;与奥司他韦相比,玛巴洛沙韦显著缩短了甲型和乙型流感感染患者TTIS(81.0 h vs 73.2 h)。这项研究支持对流感并发症高危患者进行早期治疗,以加快临床康复并减少并发症。Yoshino等^[42]在2018年11月—2019年4月对日本东京大学医院门诊就诊的流感患者进行了前瞻性观察研究,评估并比较玛巴洛沙韦、奥司他韦、拉尼米韦治疗季节性流感成年患者的临床疗程和健康相关的生活质量(health-related quality-of-life, HRQOL)。结果表明,玛巴洛沙韦的退热时间(1 d)短于奥司他韦(3 d)和拉尼米韦(2 d),由于玛巴洛沙韦仅需服用一次,患者的依从性较高,因此玛巴洛沙韦可能比其他两种药物更具临床价值。Sato等^[43]分别在甲型H1(22.2%)和H3(50%)亚型流感患者中检测到玛巴洛沙韦治疗后PA中I38T、I38F或A37T氨基酸替代的变异体,但研究患者人数较少,治疗后观察时间短,因此须继续监测使玛巴洛沙韦敏感度降低的变异株。Uehara等^[44]评估了PA/I38X替代病毒出现的动力学、危险因素以及对临床和病毒学结果的影响,认为主要是因为PA(PA/I38X)第38位异亮氨酸的氨基酸取代,这可能与传染性病毒滴度的短暂升高、延长病毒的可检测性(63.1 h vs 49.6 h)、症状缓解的初始延迟以及异常的症状反弹有关。

3.2 < 12岁人群的流感治疗效果

玛巴洛沙韦在<12岁人群中的安全和疗效已经有一系列临床研究报道。Hirotsu等^[36]在2016—2017年间评估了日本流感儿童服用玛巴洛沙韦的安全性和有效性,研究对象为107例1~11岁儿童,给予其单剂量、基于体重剂量的玛巴洛沙韦(5~10 kg: 5 mg; 10~20 kg: 10 mg; 20~40 kg: 20 mg; ≥40 kg: 40 mg)。结果发现,儿童流感患者对口服玛巴洛沙韦耐受性良好。Kakuya等^[45]在2017—2018年对儿童和青少年流感患者(0~18岁)进行了一项前瞻性观察性研究,主要终点为退热时间。研究表明,玛

巴洛沙韦用于乙型流感的退热时间短于NAIs,在甲型流感患者和同时感染甲型和乙型的患者中无明显差异。Yokoyama等^[46]在2017—2018年进行了一项多中心、开放标签的Ⅲ期临床试验,主要评估感染流感病毒的日本儿童(年龄<12岁,体重<20 kg)单剂量口服、基于体重剂量的玛巴洛沙韦颗粒的安全性、药代动力学、临床和病毒学结果。结果表明,玛巴洛沙韦颗粒和基于体重的剂量方案在儿童中具有较好的依从性和耐受性。MiniSTONE-2是一项全球Ⅲ期临床随机、对照研究,旨在调查儿童单剂量玛巴洛沙韦的安全性和有效性(NCT03629184)^[47],纳入的患者为173例1~12岁的儿童,115例接受玛巴洛沙韦,58例接受奥司他韦治疗,两组临床疗效、不良反应相似。这项研究表明,单次口服玛巴洛沙韦耐受性良好,可有效缓解儿童急性流感症状和体征,并可在无并发症的急性流感儿童中快速消除病毒。根据以上临床试验结果,CDC推荐玛巴洛沙韦用于治疗5~12岁且无任何慢性疾病的儿童和所有12岁及以上人群的流感^[18]。

3.3 暴露流感病毒后的预防效果

玛巴洛沙韦已被批准用于流感病毒暴露后的预防。Ikematsu等^[48]进行了一项多中心、双盲、随机、安慰剂对照临床试验,以评估2018—2019年间日本流感确诊患者的家庭服用玛巴洛沙韦的预防效果。在可接受评估的受试者中(玛巴洛沙韦组374人,安慰剂组375人),玛巴洛沙韦组(1.9%)的流感感染风险低于安慰剂组(13.6%),两组不良事件的发生率相似(玛巴洛沙韦组为22.2%,安慰剂组为20.5%)。这项临床试验表明,单剂量玛巴洛沙韦在流感患者的家庭接触者中显示出显著的暴露后预防效果,安全性与安慰剂相似,不仅在未感染的参与者中显示出预防效果,而且还降低了已感染者的症状发展风险。Umamura等^[49]在2018—2019年间进行了一项单中心观察性研究,比较玛巴洛沙韦与奥司他韦在家庭流感病毒传播的二次发病率。结果表明,两者都能预防流感病毒的家庭传播,玛巴洛沙韦可作为奥司他韦的替代疗法,减少流感的家庭传播。

3.4 对不同亚型的流感病毒及其他病毒的疗效

在体外和体内,巴洛沙韦酸和玛巴洛沙韦均表现出对其他流感毒株的显著抗病毒活性,包括各种亚型禽流感病毒毒株以及对奥司他韦耐药的甲型和乙型流感毒株^[14, 28]。Noshi等^[25]对巴洛沙韦酸进行了体外抗病毒试验,结果表明,巴洛沙韦酸对不同类型(H1N2、H5N1、H5N2、H5N6、H7N9和H9N2)流感病毒均具有高效抗病毒活性。Watanabe等^[35]进行了一项随机、双盲、安慰

剂对照的Ⅱ期临床试验,对病毒不同类型或不同亚型的临床疗效进行分析,试验对象为日本季节性流感患者。结果表明,玛巴洛沙韦对甲型流感中 H1N1、H3N2 亚型和乙型流感均有效。Kakuya 等^[50]在 2017—2020 年间进行了流感季节性观察研究,主要临床终点为患者发热时间。结果发现,与奥司他韦相比,玛巴洛沙韦明显缩短流感病毒(甲型和乙型总体)、甲型流感病毒、乙型流感病毒和甲型 H1N1 流感 pdm09 病毒感染患者的发热持续时间,但甲型 H3N2 流感病毒患者的发热时间在两药之间无明显差异。Kiso 等^[51]分别在体内和体外评估玛巴洛沙韦对高致病性 H7N9 病毒的抗病毒疗效。体外试验中,在 40 nmol·L⁻¹和 160 nmol·L⁻¹的巴洛沙韦酸作用下(对照组除无巴洛沙韦酸外,其余条件一致),H7N9 病毒在 24 h、48 h 两个时间点都被完全抑制。同时在感染高致病性 H7N9 病毒的小鼠模型中给予玛巴洛沙韦治疗,试验组口服玛巴洛沙韦(1.5、15、50 mg·kg⁻¹, 单剂量或 bid, 5 d),对照组口服奥司他韦(5 或 50 mg·kg⁻¹, bid, 5 d),结果发现单剂量 15 mg·kg⁻¹的玛巴洛沙韦对高致病 H7N9 病毒的抗病毒疗效最好,并抑制 H7N9 病毒在鼻甲和肺部的复制。

玛巴洛沙韦作为抗病毒药物,对于新型冠状病毒感染(COVID-19)患者也开展了相关研究^[26, 52]。Lou 等^[26]进行了一项探索性随机对照试验,对 30 例 COVID-19 患者进行玛巴洛沙韦和法匹拉韦(favipiravir)疗效和安全性评估,主要观察第 14 日病毒阴性受试者的百分比、临床症状改善时间,还观察了血液药物浓度和临床症状等,综合分析表明,在当前的抗病毒治疗方案中加入玛巴洛沙韦(在第 1 日和第 4 日,剂量为 80 mg, qd; 对于病毒学检测仍呈阳性的患者,可在第 7 日再次给药);或法匹拉韦(第一次剂量为 1600 mg 或 2200 mg, 随后每次 600 mg, tid, 给药时间不超过 14 d),两药均不会给 COVID-19 患者带来额外益处。玛巴洛沙韦对细菌感染无效,但严重的细菌感染可能始于流感样症状,也可能与流感共存或作为流感并发症发生^[28],玛巴洛沙韦可缓解严重流感症状,从而降低对侵袭性曲霉菌共感染的易感性^[53]。

3.5 与 NAIs 等抗流感病毒药的协同作用

玛巴洛沙韦与其他抗流感病毒药物无交叉耐药性,故可用于治疗对 NAIs 耐药的流感病毒感染^[13]。玛巴洛沙韦与 NAIs 的作用靶点不同,因此两者可能在抗病毒治疗中表现出协同作用^[14, 28],但目前的研究只在体外和小鼠模型中证实两者有

协同抗病毒作用,在流感患者的临床试验中并没有发现。Fukao 等^[54]在体外和甲型流感病毒 PR/8/34 (H1N1) 感染小鼠模型中,研究玛巴洛沙韦和 NAIs 联合治疗的疗效。首先在 Madin Darby 犬肾(Madin-Darby Canine Kidney, MDCK)细胞中,巴洛沙韦酸和 NAIs 通过抑制细胞病变效应而显示出对抗病毒复制的协同效力。其次在感染 H1N1 的小鼠模型中进行联合治疗,玛巴洛沙韦单药使用(15 或 50 mg·kg⁻¹, bid)时,28 d 存活率为 100%,相比之下,奥司他韦单用(10 或 50 mg·kg⁻¹, bid) 28 d 存活率分别为 10% 和 40%,两药联用(玛巴洛沙韦 0.5 mg·kg⁻¹, bid; 奥司他韦 50 mg·kg⁻¹, bid)时,28 d 存活率为 90%;玛巴洛沙韦单用或两药联用都能抑制炎症标志物白细胞介素-6(IL-6)和单核细胞趋化蛋白(MCP-1)水平;两药联用与单药治疗相比,可显著降低病毒滴度,防止体重下降、预防肺损伤,表明联合治疗可能对患者有益。Kawaguchi 等^[55]进行了一项 I 期临床试验,关于奥司他韦、玛巴洛沙韦之间的药代动力学与安全性评价,评估玛巴洛沙韦和奥司他韦在体内协同作用的潜力。18 名健康成年人以交叉设计方式如下给药:单次给药 40 mg 玛巴洛沙韦、75 mg 奥司他韦(bid, 5 d)、单次给药 40 mg 玛巴洛沙韦与 75 mg 奥司他韦(bid, 5 d)。结果表明,两药联用对玛巴洛沙韦和奥司他韦的 C_{max} 和 AUC 无明显影响,没有出现药物联用相关性不良事件,推测两药之间不存在有临床意义的药物相互作用。FLAGSTONE 是一项联合使用玛巴洛沙韦和 NAIs 治疗严重流感住院患者的随机、平行、双盲、安慰剂对照、优效性试验(NCT03684044),主要治疗终点是临床改善时间^[56]。结果发现,与标准 NAIs 治疗相比,玛巴洛沙韦与 NAIs 联合用药不会产生更好的疗效。两药联用耐受性良好,无明显不良反应,提示在严重流感住院患者的临床实践中,不必常规联合使用抗病毒药物。

Raf/MEK/ERK 信号通路在病毒复制中起重要作用。因此,Hamza 等^[57]在体外研究巴洛沙韦酸与 MEK 抑制剂 ATR-002 联合使用是否具有协同抗甲型流感病毒作用。结果发现,ATR-002 对不同亚型的巴洛沙韦酸耐药甲型流感病毒复制具有显著的剂量依赖性抑制作用;带有 PA-I38T 突变的巴洛沙韦酸耐药甲型流感病毒显示出对巴洛沙韦酸耐药,但仍然对 ATR-002 敏感;ATR-002 和巴洛沙韦酸合用具有协同抗病毒作用。

玛巴洛沙韦临床试验汇总情况见表 1。

表 1 玛巴洛沙韦临床试验汇总

Tab 1 Clinical trials of baloxavir marboxil

临床试验	试验人群	试验组	对照组	结果 (主要终点)	安全性	试验时间
II 期试验 ^[39]	20 ~ 64 岁急性流感患者 (n = 389)	单次口服玛巴洛沙韦 (10, 20, 40 mg)	安慰剂	玛巴洛沙韦各剂量组症状缓解的中位时间 (10 mg 组 54.2 h, 20 mg 组 51.0 h, 40 mg 组 49.5 h) 明显短于安慰剂组 (77.7 h)	玛巴洛沙韦组不良反应的发生率 (23.0% ~ 27.0%) 与安慰剂组 (29.0%) 差异无统计学意义	2015 年 12 月—2016 年 3 月
III 期试验 ^[39]	12 ~ 64 岁患有 (CAPSTONE-1, NCT02954354) 急性无并发症的流感患者 (n = 1366)	根据体重单次服用玛巴洛沙韦 (< 80 kg, 40 mg; ≥ 80 kg, 80 mg)	奥司他韦 (75 mg bid, 5 d) 或者对应剂量的安慰剂	玛巴洛沙韦组缓解症状的中位时间为 53.7 h, 优于安慰剂 (80.2 h), 与奥司他韦 (52.8 h) 相似	无明显的安全性问题	2016 年 12 月—2017 年 3 月
I 期试验 ^[37]	20 ~ 59 岁健康 (NCT03959332) 中国男性志愿者 (n = 32)	单剂量口服玛巴洛沙韦 (40, 80 mg)	无对照组	根据观察到的 PK 和模拟疗效的相似性, 中国受试者药代动力学参数与其他研究中亚洲人群相似	所有的不良事件轻微且短暂, 没有发现新的安全事件	2019 年 4 月—2019 年 12 月
III 期试验 ^[41]	12 岁及以上患有高并发症风险的流感患者 (CAPSTONE-2, NCT02949011) (n = 2184)	根据体重单次口服玛巴洛沙韦 (< 80 kg, 40 mg; ≥ 80 kg, 80 mg)	奥司他韦或者对应剂量的安慰剂 (75 mg bid, 5 d)	与奥司他韦 (81.0 h) 和安慰剂 (102.3 h) 相比, 玛巴洛沙韦 (73.2 h) 显著缩短了甲型和乙型流感感染患者的流感症状的改善时间	玛巴洛沙韦组的不良事件发生率为 25%, 安慰剂组为 30%, 奥司他韦组为 28%	2017 年 1 月—2018 年 3 月
前瞻性观察研究 ^[42]	季节性流感成年患者 (n = 43)	单剂量口服玛巴洛沙韦 (40, 80 mg)	奥司他韦 (75 mg bid, 5 d), 单剂量拉尼米韦 (40 mg)	玛巴洛沙韦的平均退热时间 (1 d) 短于奥司他韦 (3 d) 和拉尼米韦 (2 d)	无报道	2018 年 11 月—2019 年 4 月
流感儿童服用玛巴洛沙韦的安全性和有效性 ^[36]	1 ~ 11 岁日本流感患儿 (n = 107)	根据体重单次口服玛巴洛沙韦 (5 ~ 10 kg, 5 mg; 10 ~ 20 kg, 10 mg; 20 ~ 40 kg, 20 mg; ≥ 40 kg, 40 mg)	无对照组	玛巴洛沙韦 TTIA 的中位时间为 44.6 h	34.6% 的患者报告了不良事件, 最常见的是呕吐 (7.5%), 无严重不良事件或导致停药的不良事件	2016—2017 年
III 期试验 ^[46]	< 12 岁日本流感患儿 (n = 33)	根据体重单次口服 2% 玛巴洛沙韦颗粒 (< 10 kg, 1 mg · kg ⁻¹ ; 10 ~ 20 kg, 10 mg · kg ⁻¹)	无对照组	玛巴洛沙韦 TTIA 的中位时间为 45.3 h	54.5% 的患者报告了不良事件, 未报告死亡、严重不良事件或者导致停用的不良事件	2017—2018 年
III 期试验 ^[47]	1 ~ 12 岁流感 (miniSTONE-2, NCT03629184) 患儿 (n = 173)	单剂量口服玛巴洛沙韦 (< 20 kg, 2 mg · kg ⁻¹ ; ≥ 20 kg, 40 mg)	根据体重服用奥司他韦 (bid, 5 d) (< 15 kg, 30 mg; > 15 kg 同时 ≤ 23 kg, 45 mg; > 23 kg 同时 ≤ 40 kg, 60 mg; > 40 kg, 75 mg)	玛巴洛沙韦组 (41.2 h) 和奥司他韦组 (46.8 h) 的发烧持续时间的中位数相似	玛巴洛沙韦组 (46.1%) 和奥司他韦组 (53.4%) 的不良反应发生率相似, 最常见的是呕吐	2018—2019 年
家庭接触者预防流感 ^[48]	流感患者的家庭接触者 (n = 749)	根据体重单次口服玛巴洛沙韦 [12 岁及以上患者 (< 80 kg, 40 mg; ≥ 80 kg, 80 mg); 12 岁以下患者 (< 10 kg, 1 mg · kg ⁻¹ ; 10 ~ 20 kg, 10 mg; 20 ~ 40 kg, 20 mg; ≥ 40 kg, 40 mg)]	安慰剂	玛巴洛沙韦组 (1.9%) 发生流感感染风险明显低于安慰剂组 (13.6%)	玛巴洛沙韦组 (22.2%) 和安慰剂组 (20.5%) 不良反应的发生率相似	2018—2019 年
FLAGSTONE ^[56]	确诊流感并住院的 12 岁及以上患者 (n = 366)	在第 1 日和第 4 日服用玛巴洛沙韦 (< 80 kg, 40 mg; ≥ 80 kg, 80 mg); 若到第 5 日临床症状无改善, 则在第 7 日服用	安慰剂 (奥司他韦, 扎那米韦和帕拉米韦)	与单独服用 NAIs 治疗相比, 玛巴洛沙韦联合 NAIs 治疗无明显临床获益	玛巴洛沙韦与 NAIs 联合用药耐受性良好, 无明显不良反应	2019 年 1 月 8 日至 2020 年 3 月 16 日

续表 1

临床试验	试验人群	试验组	对照组	结果 (主要终点)	安全性	试验时间
II 期试验 ^[35]	日本季节性流感患者	单次口服玛巴洛沙韦 (10, 20, 40 mg)	安慰剂	对于 A/H1N1pdm 患者, 玛巴洛沙韦各剂量组的中位 TTAS 均显著短于安慰剂组。在 A/H3N2 和 B 型病毒患者中, 玛巴洛沙韦高剂量组与安慰剂组的中位 TTAS 差异无统计学意义。3 个剂量的玛巴洛沙韦在第 2 日比安慰剂降低了更大程度的病毒滴度	不良事件一般为轻度或中度	2015 年 12 月至 2016 年 4 月
季节性流感的前瞻性观察研究 ^[50]	3~18 岁流感患者 (n = 235)	玛巴洛沙韦 (标准剂量)	奥司他韦 (标准剂量)	与奥司他韦相比, 玛巴洛沙韦显著缩短流感病毒 (甲型和乙型总体)、甲型流感病毒、乙型流感病毒和甲型 H1N1 流感 pdm09 病毒感染患者的发热持续时间, 但甲型 H3N2 流感病毒患者的发热时间两药之间无明显差异	无明显不良反应	2017—2020 年
探索性随机对照试验 ^[26]	成年 COVID-19 住院患者 (n = 30)	第 1 日和第 4 日单次口服 80 mg; 对于病毒学检测仍呈阳性的患者, 可在第 7 日再次口服 80 mg	法匹拉韦组; 法匹拉韦与抗病毒治疗联合使用。第一次口服 1600 mg 或 2200 mg, 随后每次 600 mg tid, 给药时间不超过 14 d。对照组: 现有抗病毒治疗 ^a	将玛巴洛沙韦或者法匹拉韦联合标准抗病毒治疗中, 并没有为 COVID-19 患者提供额外的益处	除了 14 例患者发生呼吸衰竭, 其他不良事件一般为轻、中度	2020 年 2 月开始

注 (Note): ^a 现有抗病毒治疗为 lopinavir/ritonavir (400 mg/100 mg bid po) 或者 darunavir/cobicistat (800 mg/150 mg qd po) 和 arbidol (200 mg tid po) [The existing antiviral treatment is lopinavir/ritonavir (400 mg/100 mg bid po) or darunavir/cobicistat (800 mg/150 mg qd po) and arbidol (200 mg tid po)]; 所有这些药物均与吸入干扰素联合使用 (all these drugs were used in combination with interferon- α inhalation)(100 000 IU, tid 或 qd)。

4 安全性

单剂量玛巴洛沙韦相较于其他抗流感病毒药物, 安全性更高^[30]。成人临床试验中与玛巴洛沙韦治疗相关的常见不良反应包括腹泻 (3%)、支气管炎 (2%)、鼻咽炎 (1%)、头痛 (1%) 和恶心 (1%)^[28]。

Hirotsu 等^[36]评估了 107 名日本儿童单剂量使用玛巴洛沙韦的安全性, 不良反应发生率为 34.6%, 最常见的为呕吐 (7.5%), 未发生严重不良反应。Yokoyama 等^[46]在 33 名儿童 (年龄 < 12 岁, 体重 < 20 kg) 中进行了玛巴洛沙韦颗粒的 III 期临床研究, 未报告严重不良反应或导致研究试验中止的不良反应, 不良反应发生率为 54.5%, 均属于轻度和中度不良事件, 呕吐 (18.2%) 是最常见的不良反应。MiniSTONE-2 试验中, 在研究期间 84 例儿童共报告了 122 例不良反应, 发生率为 48.6%, 最常见的不良反应为呕吐或腹泻, 未报道死亡或者严重不良反应^[47]。综上, 玛巴洛沙韦安全性较高, 且在儿童试验与成人无明显差异, 玛巴洛沙韦可作为儿童抗流感治疗的选择。由于缺乏玛巴洛沙韦在妊娠期和哺乳期妇女的安全性和有效性数据, 目前不建议在这些人群中使用^[58]。

5 药物相互作用

玛巴洛沙韦酸结构中的羟基和酮基很可能与

金属离子形成螯合物, 因此应该避免与乳制品、钙强化饮料、含多价阳离子的泻药、抗酸药或口服金属离子补充剂 (如钙、铁、镁、硒或锌) 一起服用^[10, 13]。巴洛沙韦酸主要通过 UGT1A3 和 CYP3A4 在肝脏中代谢消除, 但玛巴洛沙韦与强 CYP3A 抑制剂 (如伊曲康唑) 或 UGT 抑制剂 (如丙磺舒) 联合用药时, 未观察到显著的临床相互作用^[10]。玛巴洛沙韦与鼻内流感减毒活疫苗 (intranasal live attenuated influenza vaccine, LAIV) 同时使用尚未评估, 联合使用抗病毒药物可能会抑制 LAIV 的病毒复制, 从而降低 LAIV 疫苗接种的有效性。LAIV 的处方信息表明, 如果在疫苗接种前 48 h 内或接种后 2 周内服用对甲型、乙型流感病毒有效的抗病毒药物, 可能会降低 LAIV 的有效性, 应在适当时考虑重新接种^[28]。

6 总结与展望

玛巴洛沙韦已完成了一系列治疗甲型和乙型流感病毒方面的相关临床试验, 结果均证实其作为首个靶向于 Cap- 依赖性核酸内切酶的抗流感药物, 与传统的 NAIs 或 M2 通道抑制剂相比, 抗病毒疗效和耐受性更好, 可用于对传统抗流感药物已产生耐药性的流感病毒, 成为 NAIs 的替代药物。但其会产生 PA 中 I38T、I38F 或 A37T

氨基酸替代的变异体,使其对玛巴洛沙韦敏感性降低,后续还需进一步研究。玛巴洛沙韦在 12 岁以上儿童群体的抗病毒疗效已被证实,安全性良好,但其上市时间较短,现有的国内临床试验较少,后续还需要更多的临床试验对该药的疗效与安全性进行评价。

参考文献

- [1] 流行性感冒诊疗方案(2018年版修订版)[J]. 传染病信息, 2018, 31(6): 500-504.
- [2] Pleschka S. Overview of influenza viruses [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2013, 370: 1-20.
- [3] World Health Organization (WHO). Influenza (Seasonal) [EB/OL]. (2018-03-31) [2024-06-05]. [https://www.who.int/zh/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/zh/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)).
- [4] Hutchinson EC. Influenza virus [J]. *Trends Microbiol*, 2018, 26(9): 809-810.
- [5] 朱艳慧, 刘雅琳, 祝侠丽, 等. 抗流行性感病毒药物研究进展 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2022, 36(2): 129-140.
- [6] 修思雨, 张健, 鞠翰, 等. 抗流感病毒药物靶标及其小分子抑制剂的研究进展 [J]. *药学学报*, 2020, 55(4): 611-626.
- [7] Gasparini R, Amicizia D, Lai PL, et al. Compounds with anti-influenza activity: present and future of strategies for the optimal treatment and management of influenza. Part II: future compounds against influenza virus [J]. *J Prev Med Hyg*, 2014, 55(4): 109-129.
- [8] Hou LX, Zhang Y, Ju H, et al. Contemporary medicinal chemistry strategies for the discovery and optimization of influenza inhibitors targeting vRNP constituent proteins [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(4): 1805-1824.
- [9] 王磊, 姜正羽, 尤启冬. 2018年首创新型小分子药物研究实例浅析 [J]. *药学学报*, 2019, 54(7): 1145-1156.
- [10] US Food and Drug Administration (FDA). Xofluza (baloxavir marboxil) [EB/OL]. (2018-10-24) [2024-06-05]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/210854s000lbl.pdf.
- [11] Fujita J. Clinical application of baloxavir marboxil in the treatment of influenza [J]. *Respir Investig*, 2020, 58(5): 301-304.
- [12] Dronova M, Ikeoka H, Itsumura N, et al. Cost-effectiveness of baloxavir marboxil compared with laninamivir for the treatment of influenza in patients at high risk for complications in Japan [J]. *Curr Med Res Opin*, 2021, 37(7): 1135-1148.
- [13] Yang T. Baloxavir Marboxil: the first Cap-dependent endonuclease inhibitor for the treatment of influenza [J]. *Ann Pharmacother*, 2019, 53(7): 754-759.
- [14] Heo YA. Baloxavir: first global approval [J]. *Drugs*, 2018, 78(6): 693-697.
- [15] National Medical Products Administration [EB/OL]. (2021-04-29) [2024-06-05]. <https://www.nmpa.gov.cn/zlfw/sdxx/sdxxyp/yppjfb/20210429162506168.html>.
- [16] US Food and Drug Administration (FDA). New drug therapy approvals 2022 [EB/OL]. (2023-1-10) [2024-06-05]. www.fda.gov/drugs/new-drugs-fda-cders-new-molecular-entities-and-new-therapeutic-biological-products/new-drug-therapy-approvals-2022.
- [17] National Medical Products Administration [EB/OL]. (2023-03-23) [2024-06-05]. <https://www.nmpa.gov.cn/zlfw/sdxx/sdxxyp/yppjfb/20230323153644131.html>.
- [18] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Baloxavir marboxil [EB/OL]. (2022-09-07) [2024-06-05]. <https://www.cdc.gov/flu/treatment/baloxavir-marboxil.html>.
- [19] Brownlee GG, Sharps JL. The RNA polymerase of influenza a virus is stabilized by interaction with its viral RNA promoter [J]. *J Virol*, 2002, 76(14): 7103-7113.
- [20] Boivin S, Cusack S, Ruigrok RW, et al. Influenza a virus polymerase: structural insights into replication and host adaptation mechanisms [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(37): 28411-28417.
- [21] 连雯雯, 刘艾林, 杜冠华. 流感病毒 RNA 聚合酶 PA 亚基: 潜在抗流感药物靶点 [J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(3): 297-302.
- [22] Johns BA, Kawasuji T, Weatherhead JG, et al. Carbamoyl pyridone HIV-1 integrase inhibitors 3. a diastereomeric approach to chiral nonracemic tricyclic ring systems and the discovery of dolutegravir (S/GSK1349572) and (S/GSK1265744) [J]. *J Med Chem*, 2013, 56(14): 5901-5916.
- [23] Koshimichi H, Tsuda Y, Ishibashi T, et al. Population pharmacokinetic and exposure-response analyses of baloxavir marboxil in adults and adolescents including patients with influenza [J]. *J Pharm Sci*, 2019, 108(5): 1896-1904.
- [24] Shirley M. Baloxavir marboxil: a review in acute uncomplicated influenza [J]. *Drugs*, 2020, 80(11): 1109-1118.
- [25] Noshi T, Kitano M, Taniguchi K, et al. In vitro characterization of baloxavir acid, a first-in-class Cap-dependent endonuclease inhibitor of the influenza virus polymerase PA subunit [J]. *Antiviral Res*, 2018, 160: 109-117.
- [26] Lou Y, Liu L, Yao HP, et al. Clinical outcomes and plasma concentrations of baloxavir marboxil and favipiravir in COVID-19 patients: an exploratory randomized, controlled trial [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2021, 157: 105631.
- [27] Koshimichi H, Ishibashi T, Wajima T. Population pharmacokinetics of baloxavir marboxil in Japanese pediatric influenza patients [J]. *J Pharm Sci*, 2019, 108(9): 3112-3117.
- [28] Baker DE. Baloxavir marboxil [J]. *Hosp Pharm*, 2019, 54(3): 165-169.
- [29] Koshimichi H, Ishibashi T, Kawaguchi N, et al. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of the novel anti-influenza agent baloxavir marboxil in healthy adults: phase I study findings [J]. *Clin Drug Investig*, 2018, 38(12): 1189-1196.
- [30] Ando Y, Noshi T, Sato K, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of baloxavir marboxil, a novel Cap-dependent endonuclease inhibitor, in a murine model of influenza virus infection [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2021, 76(1): 189-198.
- [31] Kiso M, Yamayoshi S, Murakami J, et al. Baloxavir marboxil treatment of nude mice infected with influenza a virus [J]. *J Infect Dis*, 2020, 221(10): 1699-1702.
- [32] Fukao K, Ando Y, Noshi T, et al. Baloxavir marboxil, a

- novel Cap-dependent endonuclease inhibitor potently suppresses influenza virus replication and represents therapeutic effects in both immunocompetent and immunocompromised mouse models [J]. *PLoS One*, 2019, 14 (5): e0217307.
- [33] Kitano M, Matsuzaki T, Oka R, et al. The antiviral effects of baloxavir marboxil against influenza a virus infection in ferrets [J]. *Influenza Other Respir Viruses*, 2020, 14 (6): 710-719.
- [34] Nakazawa M, Hara K, Komeda T, et al. Safety and effectiveness of baloxavir marboxil for the treatment of influenza in Japanese clinical practice: a postmarketing surveillance of more than 3000 patients [J]. *J Infect Chemother*, 2020, 26 (7): 729-735.
- [35] Watanabe A, Ishida T, Hirotsu N, et al. Baloxavir marboxil in Japanese patients with seasonal influenza: dose response and virus type/subtype outcomes from a randomized phase 2 study [J]. *Antiviral Res*, 2019, 163: 75-81.
- [36] Hirotsu N, Sakaguchi H, Sato C, et al. Baloxavir marboxil in Japanese pediatric patients with influenza: safety and clinical and virologic outcomes [J]. *Clin Infect Dis*, 2020, 71 (4): 971-981.
- [37] Liu YM, Retout S, Duval V, et al. Pharmacokinetics, safety, and simulated efficacy of an influenza treatment, baloxavir marboxil, in Chinese individuals [J]. *Clin Transl Sci*, 2022, 15 (5): 1196-1203.
- [38] Kim Y, Lee S, Kim Y, et al. Pharmacokinetics and safety of a novel influenza treatment (baloxavir marboxil) in Korean subjects compared with Japanese subjects [J]. *Clin Transl Sci*, 2022, 15 (5): 422-432.
- [39] Hayden FG, Sugaya N, Hirotsu N, et al. Baloxavir marboxil for uncomplicated influenza in adults and adolescents [J]. *N Engl J Med*, 2018, 379 (10): 913-923.
- [40] Portsmouth S, Hayden FG, Kawaguchi K, et al. Baloxavir treatment in adolescents with acute influenza: subgroup analysis from the CAPSTONE-1 trial [J]. *J Pediatric Infect Dis Soc*, 2021, 10 (4): 477-484.
- [41] Ison MG, Portsmouth S, Yoshida Y, et al. Early treatment with baloxavir marboxil in high-risk adolescent and adult outpatients with uncomplicated influenza (CAPSTONE-2): a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial [J]. *Lancet Infect Dis*, 2020, 20 (10): 1204-1214.
- [42] Yoshino Y, Kitazawa T, Ota Y. Clinical efficacy of baloxavir marboxil in the treatment of seasonal influenza in adult patients: a prospective observational study [J]. *Int J Gen Med*, 2020, 13: 735-741.
- [43] Sato M, Takashita E, Katayose M, et al. Detection of variants with reduced baloxavir marboxil and oseltamivir susceptibility in children with influenza a during the 2019—2020 influenza season [J]. *J Infect Dis*, 2021, 224 (10): 1735-1741.
- [44] Uehara T, Hayden FG, Kawaguchi K, et al. Treatment-emergent influenza variant viruses with reduced baloxavir susceptibility: impact on clinical and virologic outcomes in uncomplicated influenza [J]. *J Infect Dis*, 2020, 221 (3): 346-355.
- [45] Kakuya F, Haga S, Okubo H, et al. Effectiveness of baloxavir marboxil against influenza in children [J]. *Pediatr Int*, 2019, 61 (6): 616-618.
- [46] Yokoyama T, Sakaguchi H, Ishibashi T, et al. Baloxavir marboxil 2% granules in Japanese children with influenza: an open-label phase 3 study [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2020, 39 (8): 706-712.
- [47] Baker J, Block SL, Matharu B, et al. Baloxavir marboxil single-dose treatment in influenza-infected children: a randomized, double-blind, active controlled phase 3 safety and efficacy trial (miniSTONE-2) [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2020, 39 (8): 700-705.
- [48] Ikematsu H, Hayden FG, Kawaguchi K, et al. Baloxavir marboxil for prophylaxis against influenza in household contacts [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383 (4): 309-320.
- [49] Umemura T, Mutoh Y, Kawamura T, et al. Efficacy of baloxavir marboxil on household transmission of influenza infection [J]. *J Pharm Health Care Sci*, 2020, 6: 21.
- [50] Kakuya F, Okubo H, Fujiyasu H, et al. Clinical effectiveness of baloxavir marboxil against influenza in three seasons [J]. *Pediatr Int*, 2022, 64 (1): e15169.
- [51] Kiso M, Yamayoshi S, Furusawa Y, et al. Treatment of highly pathogenic H7N9 virus-infected mice with baloxavir marboxil [J]. *Viruses*, 2019, 11 (11): 1066.
- [52] Geisler BP, Zahabi L, Lang AE, et al. Repurposing existing medications for coronavirus disease 2019: protocol for a rapid and living systematic review [J]. *Syst Rev*, 2021, 10 (1): 143.
- [53] Seldeslachts L, Jacobs C, Tielemans B, et al. Overcome double trouble: baloxavir marboxil suppresses influenza thereby mitigating secondary invasive pulmonary aspergillosis [J]. *J Fungi (Basel)*, 2021, 8 (1): 1.
- [54] Fukao K, Noshi T, Yamamoto A, et al. Combination treatment with the Cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir marboxil and a neuraminidase inhibitor in a mouse model of influenza A virus infection [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2019, 74 (3): 654-662.
- [55] Kawaguchi N, Koshimichi H, Ishibashi T, et al. Evaluation of drug-drug interaction potential between baloxavir marboxil and oseltamivir in healthy subjects [J]. *Clin Drug Investig*, 2018, 38 (11): 1053-1060.
- [56] Kumar D, Ison MG, Mira JP, et al. Combining baloxavir marboxil with standard-of-care neuraminidase inhibitor in patients hospitalised with severe influenza (FLAGSTONE): a randomised, parallel-group, double-blind, placebo-controlled, superiority trial [J]. *Lancet Infect Dis*, 2022, 22 (5): 718-730.
- [57] Hamza H, Shehata MM, Mostafa A, et al. Improved in vitro efficacy of baloxavir marboxil against influenza a virus infection by combination treatment with the MEK inhibitor ATR-002 [J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 611958.
- [58] Chow EJ, Beigi RH, Riley LE, et al. Clinical effectiveness and safety of antivirals for influenza in pregnancy [J]. *Open Forum Infect Dis*, 2021, 8 (6): ofab138.

(收稿日期: 2023-06-05; 修回日期: 2023-10-07)

新型钙调神经磷酸酶抑制药伏环孢素临床研究进展

邓伟萍¹, 胡长平^{1*}, 罗平^{2*} (1.中南大学湘雅药学院药理学系, 长沙 410078; 2.中南大学湘雅医院药学部, 长沙 410008)

摘要: 伏环孢素是一种口服新型钙调神经磷酸酶抑制药, 是环孢素 A 的衍生物, 主要用于治疗自身免疫性疾病, 如银屑病、非感染性葡萄膜炎和器官移植后排斥反应。2021 年 1 月, 基于两个 II 期和 III 期临床试验的积极结果, FDA 批准伏环孢素与标准治疗方案联合用于治疗成人活动性狼疮肾炎。目前, 也有研究在探索伏环孢素用于新型冠状病毒感染的肾移植患者。本文对伏环孢素的作用机制、药动学和药效学、用法用量、联合用药和疾病中应用进行归纳总结, 为其临床用药提供参考。

关键词: 伏环孢素; 狼疮肾炎; 钙调神经磷酸酶抑制药; 新型冠状病毒感染

中图分类号: R96 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)07-1831-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.025

Research progress in clinical application of a novel calcineurin inhibitor: voclosporin

DENG Wei-ping¹, HU Chang-ping^{1*}, LUO Ping^{2*} (1. Department of Pharmacology, Xiangya School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410078; 2. Department of Pharmacy, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008)

Abstract: Voclosporin, an analogue of cyclosporine A, is an oral novel calcineurin inhibitor for autoimmune diseases such as plaque psoriasis, non-infectious uveitis and prevention of renal transplant rejection. Based on positive results from two pivotal phase II and III clinical trials, voclosporin was approved by FDA in January 2021 for adult patients with active lupus nephritis in combination with a standard treatment regimen. Recently, voclosporin has been explored for kidney transplant recipients with corona virus disease 2019 (COVID-19). This article summarized the mechanism of action, pharmacokinetics and pharmacodynamics, dosage, co-administration and in-disease application of voclosporin in clinical treatment.

Key words: voclosporin; lupus nephritis; calcineurin inhibitor; corona virus disease 2019

伏环孢素 (voclosporin) 是一种口服的新型钙调神经磷酸酶抑制药 (calcineurin inhibitor)^[1], 由 Isotechnika 公司研发, 在欧盟、澳大利亚、加拿大、日本、摩洛哥、新西兰、巴基斯坦、南非、韩国和美国等多个国家和地区获得专利, 用于预防器官移植后排斥反应和治疗自身免疫性疾病^[2]。伏环孢素最早用于治疗斑块型银屑病, 后续发现其在非感染性葡萄膜炎和狼疮肾炎 (lupus nephritis) 中具有治疗作用^[3-5]。基于两个关键的 II 期^[6]

(AURA-LV) 和 III 期临床试验^[7] (AURORA-1) 的积极结果, 伏环孢素于 2021 年 1 月 22 日经 FDA 批准用于治疗成人活动性狼疮肾炎, 是第一个被批准用于与免疫抑制药联合治疗狼疮肾炎的口服钙调神经磷酸酶抑制药^[8]。

1 化学结构与作用机制

伏环孢素是环孢素 A 的衍生物, 分子量为 1214.6, 分子式为 C₆₃H₁₁₁N₁₁O₁₂, 结构见图 1^[9-10]。环孢素 A 是第一个选择性免疫抑制药, 广泛用于

基金项目: 国家自然科学基金 (No.82173817, No.82241025); 长沙市自然科学基金 (No.kq2208366)。

作者简介: 邓伟萍, 女, 硕士, 主要从事临床药学研究, email: 1302139519dwp@gmail.com *通信作者: 胡长平, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事心血管药理学研究, email: huchangping@csu.edu.cn; 罗平, 女, 博士, 主管药师, 主要从事临床药学、药物经济学研究, email: luoping1011@126.com

器官移植, 然而肾毒性、肝毒性等严重不良反应限制了其临床应用。在肾移植患者中环孢素 A 诱导的肾毒性是最常见的临床并发症^[11]。与环孢素 A 相比, 伏环孢素在环孢素 A 的 1 位苏氨酸残基侧链上增加了一个双键。氨基酸 -1 是环孢素代谢的主要位点, 该位点修饰后, 伏环孢素的代谢位点转移至氨基酸 -9。X 射线晶体学研究表明, 伏环孢素的氨基酸 -1 侧链修饰改变了亲环素和伏环孢素结合形成的异二聚体复合物与钙调神经磷酸酶的结合方式^[12]。该结合方式的改变, 提高了伏环孢素与钙调神经磷酸酶的结合率和酶抑制效力, 并加快其代谢物的消除, 改善分子稳定性^[3]。环孢素 A 在体内产生高浓度的肾毒性代谢物 AM9, 加重肾损伤^[11, 13]。与伏环孢素 A 相比, 伏环孢素引起高血压、牙龈增生、多毛症、高钾血症和肾等不良反应更少^[1, 14]。因此氨基酸 -1 的结构修饰使伏环孢素更安全有效, 可促进其在肾脏疾病中的应用^[14]。

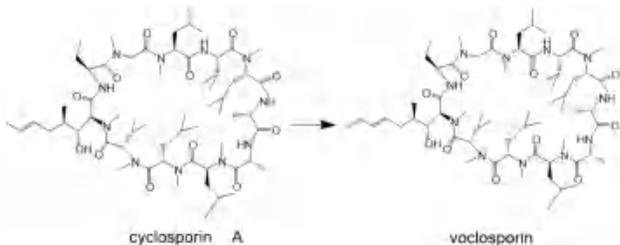


图 1 环孢素 A 和伏环孢素的分子结构

Fig 1 Molecular structure of cyclosporin A and voclosporin

目前, 伏环孢素抑制钙调神经磷酸酶的作用机制尚未完全明确^[2]。T 细胞激活时细胞内钙浓度增加, 钙与钙调神经磷酸酶调节位点结合, 激活钙调素结合催化亚单位, 通过去磷酸化激活转录因子活化 T 细胞核因子 (nuclear factor of activated T-cell cytoplasmic, NFATc)。在 T 细胞中, 伏环孢素与亲环素结合形成的异二聚体复合物, 可通过结合钙调神经磷酸酶, 抑制其酶活性, 抑制活化 NFATc 去磷酸化, 从而抑制淋巴细胞增殖、T 细胞细胞因子产生和 T 细胞活化表面抗原的表达^[2, 15]。抑制钙调神经磷酸酶可稳定足细胞肌动蛋白细胞骨架和应力纤维, 增加肾小球足细胞的完整性^[15]。

2 药动学和药效学

2.1 药动学

伏环孢素是一种大分子、高亲脂性的口服制剂, 其 C_{max} 和 AUC 值随剂量增加而增加^[16]。有研究显示, 18 名健康受试者在空腹、低脂和高脂饮食后单次口服 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 伏环孢素, 结果与空腹服用伏环孢素组相比, 低脂饮食组和高脂

饮食组伏环孢素的 C_{max} 分别降低了 29% 和 53%, AUC 分别降低了 15% 和 25%^[16]。因此伏环孢素需空腹服用, 在空腹服用时其平均达峰时间为 1.5 h^[17]。由于 300 mg 伏环孢素与相同剂量的环孢素 A 的 C_{max} 和 AUC 相似, 因此预测伏环孢素的口服生物利用度约为 50%^[18]。伏环孢素的表观分布体积为 2154 L, 蛋白结合率达 97%, 广泛分布在红细胞内, 在全血和血浆中的分布依赖于浓度和温度^[17]。伏环孢素在肝脏中主要由 CYP3A4/5 代谢, 原药是主要的循环成分, 药理活性主要归因于原药分子。伏环孢素的主要代谢产物占总暴露量的 16.7%, 效力比原药分子低。伏环孢素的终末半衰期约 30 h (24.9 ~ 36.5 h), 稳态表观清除速率平均为 $63.6 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ ^[17, 19]。口服放射性标记伏环孢素 70 mg, 92.7% 放射标记可在粪便中回收, 只有 2.1% 在尿液中回收^[17]。基于年龄 (18 ~ 66 岁)、性别、种族 (高加索人、黑人、亚洲人或其他) 或体重 (37 ~ 133 kg) 的研究发现, 伏环孢素的药动学没有显著临床差异^[17]。

Mayo 等^[16]研究了健康受试者单次服用伏环孢素的药动学, 但未明确临床标准剂量 $0.35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (即 23.7 mg) 的消除半衰期。因此 Abdel-Kahaar 等^[18]根据已有的 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 伏环孢素的消除动力学研究结果, 分析血药浓度-时间半对数图和 Michaelis-Menten 模型, 推断临床单剂量 23.7 mg 口服时, 伏环孢素的 $t_{1/2}$ 可能为 3 h; 间隔 12 h 的连续用药, $t_{1/2}$ 可增至 7 h; 每日两次 23.7 mg 伏环孢素的目标峰浓度范围为 $50 \sim 70 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 目标谷浓度为 $10 \sim 20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; 抑制 50% 钙调神经磷酸酶活性, 所需伏环孢素的最小药物浓度估计为 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; 抑制 5% 钙调神经磷酸酶活性, 所需血药浓度估计为 $5.2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。该研究还指出, 当伏环孢素血药浓度大于 $482 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 可能产生更多不良反应。这为 23.7 mg 每日两次的给药方案提供了合理性依据。

伏环孢素仅有 2.1% 在肾脏中代谢。轻、中度肾损伤患者在多次使用 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的伏环孢素后, 其 C_{max} 和 AUC 与正常组几乎一致。但多次给药后, 随着肾损伤程度的增加, 伏环孢素尿排泄量和肾清除率降低。严重肾损伤患者 [肾小球滤过率 (estimated glomerular filtration rate, eGFR) $< 30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$] 使用伏环孢素后 C_{max} 和 AUC 分别增加 1.5 倍和 1.7 倍。轻、中度肝损伤患者使用相同剂量的伏环孢素后其 C_{max} 和 AUC 增加 1.5 ~ 2 倍^[20]。终末期肾病或不伴血液透析以及严重肝损伤对伏环孢素的药动学的影响未知^[17]。

2.2 药效学

在健康志愿者中每日口服两次伏环孢素后，观察到浓度依赖性钙调神经磷酸酶抑制作用。达到最大药物浓度时间和达到最大钙调神经磷酸酶抑制时间之间几乎没有滞后时间。在达到最大剂量 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时，伏环孢素以剂量依赖性方式抑制钙调神经磷酸酶，此时终末半衰期可达 $30 \text{ h}^{[18]}$ 。肾移植患者服用伏环孢素，在第 5 日达到 $35 \sim 60 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 理想的谷浓度范围，可最大限度地降低移植后新发糖尿病的风险^[21]。研究指出，基于体表面积的给药方式对临床应用伏环孢素具有积极意义^[22]。对 1000 例肾移植患者进行 PK-PD 模型的模拟预测，为使第 5 日达到目标治疗浓度 ($35 \sim 60 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的人群最大化，建议伏环孢素初始剂量设为 $30 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ 每日两次。当伏环孢素初始剂量设为 $40 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ 每日两次时，可使钙调神经磷酸酶维持在 $0.9 \sim 1.2 \text{ pmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ ，降低移植后患糖尿病风险^[22]。

表 1 基于 eGFR 变化调整伏环孢素剂量

Tab 1 Modification of voclosporin dose based on eGFR

eGFR 水平 $[\text{mL}/(\text{min} \cdot 1.73 \text{ m}^{-2})]$	eGFR 下降*	剂量调整	两周内再评估 eGFR 水平后的剂量调整
45 ~ 60	20% ~ 30%	当前剂量减 7.9 mg	eGFR 下降仍大于 20%，剂量再减 7.9 mg
	$\geq 30\%$	暂停使用伏环孢素	eGFR 恢复至基线 80%，以每日两次 7.9 mg 启动伏环孢素
≤ 45		不推荐使用伏环孢素	

注：* 定义为 $\text{eGFR} \leq 60 \text{ mL}/(\text{min} \cdot 1.73 \text{ m}^{-2})$ ，比较用药前 eGFR 水平的降幅。

Note: * Defined as $\text{eGFR} \leq 60 \text{ mL}/(\text{min} \cdot 1.73 \text{ m}^{-2})$, which evaluates the reduction in eGFR level from baseline.

3.2 联合用药

伏环孢素经口服给药后，99% 的药物在肝脏中通过 CYP3A4/5 代谢^[19]。CYP3A4/5 抑制剂和诱导剂以及 P-糖蛋白抑制剂（酮康唑、利福平、维拉帕米、地高辛）与伏环孢素联用时发生药物相互作用，影响伏环孢素的暴露^[19]。在体内，与酮康唑联用时，伏环孢素的 AUC 增加了 18.55 倍，从而增加其肾毒性风险；与维拉帕米联用时，伏环孢素 AUC 增加了 2.71 倍^[23]。伏环孢素对中、强 CYP3A 诱导剂同样敏感。与利福平和依非韦伦联用时，伏环孢素的 AUC 分别降低了 87% 和 70%^[23]。因此，伏环孢素禁止与强 CYP3A4 抑制剂（如酮康唑、伊曲康唑、克拉霉素）联合使用，避免与强、中度 CYP3A4 诱导剂联合给药；与中度 CYP3A 抑制剂联合应用时，伏环孢素早晚剂量依次应为 15.8 mg 和 7.9 mg；与弱 CYP3A 抑制剂联用未显著增加伏环孢素的 AUC，因此不建议调整伏环孢素剂量^[17, 23]。体外研究显示除 CYP3A 外，P-糖蛋白亦为伏环孢素底物^[19]。治疗窗窄的 P-糖蛋白底物地高辛与伏环孢素联用，伏环孢素的 AUC 增加了 1.25 倍，故在与地高辛联用时应进

3 用法用量与联合用药

3.1 用法用量

FDA 批准伏环孢素与吗替麦考酚酯（mycophenolate mofetil, MMF）、类固醇联合，用于治疗成人活动性狼疮肾炎患者。推荐起始剂量 23.7 mg 每日两次，空腹口服，两次剂量间隔 8 h 或 12 h。对于伴轻度和中度肝损伤的患者，推荐剂量为 15.8 mg 每日两次，不推荐用于严重肝损伤的患者。对于伴严重肾损伤的患者，推荐起始剂量为 15.8 mg 每日两次。伏环孢素同其他钙调神经磷酸酶抑制药一样，可引起急性/慢性肾毒性，因此在治疗过程中需定期监测 eGFR。在治疗第一个月每两周评估患者的 eGFR，此后每四周评估一次，依据 eGFR 调整伏环孢素的剂量（见表 1）^[17]。在狼疮肾炎的治疗过程中，血压 $> 165/105 \text{ mmHg}$ ($1 \text{ mmHg} = 0.133 \text{ kPa}$) 或有高血压急症的患者，应停用伏环孢素，并进行降压治疗。

行地高辛浓度监测和剂量调整^[23]。

体外研究表明，伏环孢素是有机阴离子转运多肽 OATP1B1 和 OATP1B3 的抑制剂，能增加 OATP1B1 和 OATP1B3 底物（如他汀类药物）的血浆浓度。因此在与 OATP1B1 和 OATP1B3 底物联用时应监测不良反应的发生^[17, 23]。与高钾血症相关的药物联用可能会增加高钾血症的风险，在治疗过程中，应定期监测血钾水平；与导致 QT 间期延长的药物（例如保钾利尿药、血管紧张素转化酶抑制药、血管紧张素受体阻滞药）联用时可能导致 QT 间期延长；此外，在服用伏环孢素时，应避免食用含柚子的食物或饮料^[17]。

一项 I 期临床研究分析了系统性红斑狼疮患者服用霉酚酸酯（MMF）联合伏环孢素的药动学变化。研究发现，是否联合伏环孢素对 MMF 的代谢物霉酚酸的暴露呈相似影响， C_{max} 分别为 $16.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $15.8 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ， $AUC_{0 \sim 12}$ 分别为 $39.1 \text{ g}/(\text{h} \cdot \text{mL})$ 和 $40.8 \text{ g}/(\text{h} \cdot \text{mL})$ ^[24]。与他克莫司相似，伏环孢素不抑制霉酚酸葡萄糖苷酸的胆汁排泄和肝肠循环^[15]，提示 MMF 与伏环孢素联用无需调整剂量^[15, 24]。伏环孢素与环磷酰胺联合使用的安

全性和有效性尚未得到证实,因此不建议使用环磷酰胺的患者同时服用伏环孢素^[17]。

4 伏环孢素在狼疮肾炎的临床研究进展

狼疮肾炎是系统性红斑狼疮死亡的主要危险因素,可产生多种自身抗体,对肾脏造成永久性、不可逆转的损伤^[6, 25]。对于狼疮肾炎患者,治疗的主要目标是预防终末期肾脏疾病和死亡的发展,然而在 6~12 个月的标准治疗后,只有 10%~40% 的患者达到完全肾脏缓解^[6]。因此需要更有效的狼疮肾炎治疗,目前应用的新药包括贝利尤单抗、利妥昔单抗、奥妥珠单抗等^[26]。伏环孢素通过抑制钙调神经磷酸酶活性,减弱 T 细胞反应并保持肾小球足细胞骨架稳定性^[15]。基于 AURA-LV 和 AURORA-1 的大型临床研究^[6-7],伏环孢素在 2021 年成为 FDA 首个获批与背景治疗联合用于治疗狼疮肾炎的口服药物。

4.1 II 期 AURA-LV 临床研究

II 期 AURA-LV (aurinia urinary protein reduction active-lupus with voclosporin) 临床研究是一项 MMF 和类固醇联合使用伏环孢素(低剂量组 23.7 mg 或高剂量组 39.5 mg)治疗狼疮肾炎的随机、双盲、安慰剂对照、多中心、多种族试验(NCT02141672)^[6],主要治疗终点是 24 周肾完全缓解率(complete renal remission, CRR),定义为当前尿蛋白/肌酐比值 $\leq 0.5 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}$, eGFR 低于基线值 $\leq 20\%$,未因治疗失败而进行补救治疗,且连续多天每日类固醇剂量减少 $\leq 10 \text{ mg}$ 。24 周后的结果发现,与安慰剂组比较,低剂量伏环孢素组有更高的 CRR ($OR = 2.03, P = 0.046$),但高剂量伏环孢素组差异无统计学意义($OR = 1.59, P = 0.204$)。在 24 周时低、高剂量组的不同效果原因未知,需要更多临床研究评估伏环孢素的 PK-PD。但在 48 周后(次要终点)再次评估 CRR 时,低、高剂量伏环孢素组的 CRR 均高于未联合伏环孢素的狼疮肾炎患者(低剂量组 49.4%,高剂量组 39.8%,安慰剂组 23.9%, $P \leq 0.026$);与安慰剂组相比,伏环孢素两个剂量组更快达到 CRR ($P < 0.001$);低、高剂量组的抗双链 DNA 抗体和补体水平在 24 周和 48 周的改善差异具有统计学意义($P < 0.001$)。在所有的亚组分析中,无论性别、年龄、种族和 MMF 使用情况如何,使用两种剂量的伏环孢素都比安慰剂组有更好的 CRR。在该试验中,伏环孢素组发生 12 例死亡事件(6.8%),安慰剂组出现 1 例死亡事件(1.1%),但在后续的 III 期临床试验中并没有这么高的死亡率(AURORA-1 研究中伏环孢素仅 0.6% 的死亡率,对照组 2.8% 死亡率)^[6-7, 27]。在 II 期 AURA-LV 临床试验中,联合伏环孢素治疗组不良事件

的发生率比安慰剂组更高,低、高剂量组均出现更严重的不良事件,最常见的不良事件是感染,其次是胃肠道疾病^[6]。

4.2 III 期 AURORA-1 临床研究

基于 II 期 AURA-LV 的结果,对伏环孢素联合 MMF 和快速减量的低剂量口服类固醇治疗狼疮肾炎进行进一步的评估,即 III 期 AURORA-1 临床研究(NCT03597464)^[7]。该试验是一项双盲、随机、多中心、安慰剂对照的临床试验,共有 357 名受试者接受 23.7 mg 每日两次伏环孢素或仅接受 MMF 和类固醇治疗(分别有 179 人和 178 人)。与 II 期 AURA-LV 临床研究相比,该试验评估了更多的次要终点,如部分肾缓解、尿蛋白肌酐比值 $\leq 0.5 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}$ 的时间、比基线尿蛋白肌酐比值减少超过 50% 的时间等。结果显示,52 周时在 MMF 和小剂量类固醇治疗方案中添加伏环孢素可使 CRR 增加 18% ($OR = 2.65, P < 0.0001$)。此外,在伏环孢素治疗 24 周和 52 周的关键次要终点评估中,患者也显著获益($P \leq 0.002$)。无论肾活检类型、年龄、性别、种族、地区以及是否曾使用 MMF,服用伏环孢素的完全肾反应改善趋势一致,均优于安慰剂。该研究两个治疗组均采用低剂量类固醇方案,在第 16 周逐渐减少至 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$,在 52 周时 75% 的伏环孢素组和 73% 的对照组的类固醇剂量 $\leq 2.5 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 。结果显示类固醇累计剂量明显低于以往研究,同时疗效无差异(对照组使用 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 类固醇的 CRR 与以往更高类固醇剂量的狼疮肾炎相关研究一致^[7, 28-30])。上述研究表明联合伏环孢素后能实现类固醇快速减量,可有效治疗狼疮肾炎,降低器官损伤风险和长期使用类固醇的不良反应。

对 II 期 AURA-LV 和 III 期 AURORA-1 两个临床研究数据进行综合分析的结果显示,23.7 mg 的伏环孢素对 III 级狼疮肾炎患者的改善最优($OR = 4.26, P = 0.0054$),对 IV 级狼疮肾炎患者有效率最低(37.5%, $OR = 1.5, P = 0.4090$)。长期使用糖皮质激素增加严重感染和器官毒性的风险,因此在狼疮肾炎中应尽量减少糖皮质激素的剂量^[31]。在这两个研究中,超过 80% 接受 23.7 mg 伏环孢素的患者在 16 周前泼尼松的剂量即下调至 $\leq 2.5 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 。伏环孢素组 1 年时的 CRR 明显高于对照组($OR = 2.76, P < 0.0001$),不良反应发生率相似。伏环孢素治疗狼疮肾炎的不良反应以轻中度为主,最常见的是 eGFR 降低,其次为高血压^[15],因此临床使用伏环孢素时,需监测患者 eGFR 和血压。在 AURA-LV 和 AURORA-1 临床试验中,与

伏环孢素相关的肾脏不良反应主要是由于 eGFR 或潜在狼疮肾炎活动度的降低^[17]。因此需要更长期的研究以确定伏环孢素的慢性肾毒性。

4.3 III 期 AURORA-2 临床研究

一项 III 期 AURORA-2 研究 (NCT03597464) 纳入 216 例 AURORA-1 患者继续进行双盲研究, 持续时间长达 3 年 (1 年 AURORA-1, 2 年 AURORA-2), 以获取伏环孢素联合 MMF 和类固醇的长期安全性和有效性数据, 从而进一步了解该治疗方案在狼疮肾炎的有效性^[32]。AURORA-2 研究的所有患者均接受与 AURORA-1 相同剂量的 MMF 和糖皮质激素的标准治疗, 116 例患者接受伏环孢素治疗, 100 例患者接受安慰剂治疗, 49.1% 的伏环孢素组和 64% 的安慰剂组最终完成了 3 年研究。两组大部分患者在 AURORA-2 结束时仍维持糖皮质激素减量 ($\leq 2.5 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$) 治疗, MMF (平均 1.9 g) 暴露相似。AURORA-2 治疗期间不良反应的总体情况与 AURORA-1 期间相似^[7], 不良反应都以轻中度为主, 发生率逐年降低。伏环孢素组与安慰剂组相比不良反应发生率 (86.2% vs 80.0%) 和严重不良反应发生率 (18.1% vs 23.0%) 相当。与 AURORA-1 研究相比, AURORA-2 的 eGFR 下降和高血压的总体不良反应发生率更低。最常见的不良反应为感染, 但多为标准治疗所引起的, 伏环孢素较安慰剂的严重感染风险低 (12.9% vs 17.0%)。治疗 3 年后, 与安慰剂组相比, 伏环孢素组更多患者达到 CRR (50.9% vs 39.0%, $OR = 1.74$), 实现主要疗效肾反应 (PRR) (74.1% vs 69.0%, $OR = 1.39$) 和尿蛋白肌酐比 $\leq 0.5 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}$ (54.3% vs 43.0%, $OR = 1.66$)。在 3 年的整体研究中, 与安慰剂组相比, 伏环孢素组的尿蛋白肌酐比较基线下降幅度更大, 有更多患者获得了良好的肾脏结局 (66.4% vs 54.0%, $OR = 0.56$, 包括尿蛋白/肌酐比值 $\leq 0.7 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}$ 且无肾病复发), 肾病复发风险相似 (23.8% vs 26.0%, $OR = 1.33$)^[32]。虽然在 AURORA-1 研究中肾功能轻微下降, 但在 AURORA-2 研究的数据表明肾功能整体稳定, 无新的或恶化的不良事件^[32]。伏环孢素组在 AURORA-1 和 AURORA-2 结束时均达到更高 CRR (AURORA-1: 52.6% vs 34%, $OR = 2.30$, $P = 0.004$; AURORA-2: 50.9% vs 39%, $OR = 1.74$, $P = 0.051$), 也表明伏环孢素具有肾脏保护作用^[7, 32]。因此伏环孢素具有良好的有效性和安全性。

4.4 伏环孢素用于狼疮肾炎的其他报道

一项开放标签、II 期的 AURION 研究 (NCT02949973)^[33] 评估了 10 例狼疮肾炎患者使用伏环孢素 (23.7 mg, 每日 2 次) 联合 MMF 和类固醇在第 8 周、24 周和 48 周的临床疗效, 结果

显示在第 8 周时所有患者的尿蛋白肌酐比值均下降 25%, C3、C4 补体恢复至正常水平, 80% 的患者达到肾缓解, 70% 的患者在 24 周达到 CRR, 71% 的患者在 48 周达到 CRR^[33-35]。

基于关键临床研究数据, 美国进行了一项为期 3 年的伏环孢素成本效果分析^[36], 并对 AURORA-LV 和 AURORA-1 临床试验数据进行分析, 结果显示, 与 MMF 和类固醇相比, 进一步联合伏环孢素治疗, 有更长的质量调整预期寿命 (quality-adjusted life years, QALYs) (12.64 年 vs 11.68 年), 每 QALY 获得 15 万美元的增量成本-效果比。在愿意支付每 QALY 15 万美元的阈值下, 伏环孢素有 49% 的可能具有成本效益; 在每 QALY 20 万美元的阈值下, 该概率上升为 79%^[36]。

5 伏环孢素在新型冠状病毒感染中的研究进展

2022 年 Ogando 等^[37] 通过体外实验评估了伏环孢素等钙调神经磷酸酶抑制剂对 SARS-CoV-2 病毒复制的影响, 发现低浓度伏环孢素能抑制人 Calu-3 细胞的 SARS-CoV-2 病毒复制, 其半数有效浓度 (50% effective concentration, EC_{50}) 在亚微摩尔范围 ($< 3.2 \mu\text{m}$), 抑制病毒的浓度较环孢素 A 和他克莫司低。该研究不提倡仅因其潜在的抗病毒特性而使用伏环孢素。同时, 亲环素依赖的伏环孢素对 SARS-CoV-2 感染的肾移植患者有潜在益处, 抑制 SARS-CoV-2 复制的浓度是他克莫司的 1/8^[37]。感染 COVID-19 的肾移植患者, 其使用的免疫抑制剂不仅要能防止肾移植排斥反应, 还需抑制 SARS-CoV-2 病毒复制, 这需要进行进一步临床试验进行评估^[37]。目前已完成感染 SARS-CoV-2 病毒的肾移植患者使用伏环孢素的临床评估 (EudraCT 2020-001467-82), 研究了包括标准治疗与他克莫司联合或不联合伏环孢素治疗肾移植伴 SARS-CoV-2 患者的抗病毒作用, 主要临床研究终点是通过定量逆转录聚合酶链式反应测量 28 d 内 SARS-CoV-2 病毒的减少, 但具体数据未公布^[38]。2024 年公布的一项 AURORA-2 研究数据中, 安慰剂组发生了 3 例因 COVID-19 而死亡的病例, 而伏环孢素组无死亡病例; 但钙调神经磷酸酶抑制剂抑制 SARS-CoV-2 复制的作用和机制仍需进一步研究^[32]。

6 伏环孢素在其他疾病中的临床研究进展

伏环孢素最初在银屑病、非感染性葡萄膜炎和肾移植患者中开展临床研究。但随着研究的深入, 研究者发现低剂量伏环孢素不能较好地渗透皮肤表皮发挥治疗银屑病的作用^[1]。同时, 在治疗银屑病时发现, 伏环孢素的有效率劣于环孢素 A, 第 12 周时达到 0 分或 1 分的静态医师总体

评估的患者分别为 35% vs 53%^[39]。伏环孢素治疗活动性或静止性后葡萄膜炎或活动性前葡萄膜炎有效,但在临床非感染葡萄膜炎患者疗效中,与安慰剂无差异^[1]。在肾移植中证实伏环孢素不劣于他克莫司^[21]。但在 2015 年后未见伏环孢素用于银屑病和葡萄膜炎的研究文献,且目前尚未被 FDA 批准用于银屑病、葡萄膜炎和肾移植术后抗排斥。上述临床研究中发现低剂量(0.2~0.4 mg·kg⁻¹)的伏环孢素对银屑病、葡萄膜炎和肾移植患者无肾损伤作用,为其治疗狼疮肾炎提供了一个新方向^[1]。

暴露于类固醇和大剂量的钙调神经磷酸酶抑制剂(包括他克莫司和环孢素)能引起移植后新发糖尿病(new onset diabetes after transplant, NODAT)的发生^[40-41]。与他克莫司比较,新型钙调神经磷酸酶抑制剂伏环孢素在控制移植排斥反应的同时,能减少 NODAT 的发生率^[21, 42],可能与他克莫司对胰岛素分泌抑制作用更强有关^[42]。伏环孢素浓度<40 ng·mL⁻¹时可能避免 NODAT 的发生^[18]。

7 结论与展望

目前伏环孢素在临床的应用多为狼疮肾炎的联合治疗,其可减少狼疮肾炎患者糖皮质激素用量、控制疾病活动度、延缓肾脏疾病进展及降低复发风险,对糖皮质激素依赖或对标准治疗无效的狼疮肾炎患者有益。伏环孢素的不良反应发生率与标准治疗相似,具有较好的安全性。除此之外,还有研究报道伏环孢素用于肾移植后抗排斥、银屑病、非感染性葡萄膜炎、COVID-19 等,未来仍需要更多前瞻性对照、随机试验证实伏环孢素在上述疾病中的有效性和安全性。

参考文献

- Li Y, Palmisano M, Sun DX, et al. Pharmacokinetic disposition difference between cyclosporine and voclosporin drives their distinct efficacy and safety profiles in clinical studies [J]. *Clin Pharmacol*, 2020, 12: 83-96.
- Heo YA. Voclosporin: first approval [J]. *Drugs*, 2021, 81 (5): 605-610.
- Sin FE, Isenberg D. An evaluation of voclosporin for the treatment of lupus nephritis [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2018, 19 (14): 1613-1621.
- Bissonnette R, Papp K, Poulin Y, et al. A randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial of ISA247 in patients with chronic plaque psoriasis [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2006, 54 (3): 472-478.
- Anglade E, Aspeslet LJ, Weiss SL. A new agent for the treatment of noninfectious uveitis: rationale and design of three luminata (lux uveitis multicenter investigation of a new approach to treatment) trials of steroid-sparing voclosporin [J]. *Clin Ophthalmol*, 2008, 2 (4): 693-702.
- Rovin BH, Solomons N, Pendergraft WF, et al. A randomized, controlled double-blind study comparing the efficacy and safety of dose-ranging voclosporin with placebo in achieving remission in patients with active lupus nephritis [J]. *Kidney Int*, 2019, 95 (1): 219-231.
- Rovin BH, Teng YKO, Ginzler EM, et al. Efficacy and safety of voclosporin versus placebo for lupus nephritis (AURORA 1): a double-blind, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial [J]. *Lancet*, 2021, 397 (10289): 2070-2080.
- Businesswire. FDA approves aurinia pharmaceuticals' lupkynis™ (voclosporin) for adult patients with active lupus nephritis [EB/OL]. (2021-01-23) [2023-08-04]. <https://www.businesswire.com/news/home/20210122005501/en/FDA-Approves-Aurinia-Pharmaceuticals%E2%80%99-LUPKYNIS%E2%84%A2-voclosporin-for-Adult-Patients-with-Active-Lupus-Nephritis>.
- Schultz C. Voclosporin as a treatment for noninfectious uveitis [J]. *Ophthalmol Eye Dis*, 2013, 5: 5-10.
- Su SJ, Bu QW, Sheng CQ, et al. Research progress of cyclic peptide synthesis strategy and its application in new drug development [J]. *Acta Pharm Sin*, 2023, 58 (3): 629-638.
- Patocka J, Nepovimova E, Kuca K, et al. Cyclosporine A: chemistry and toxicity—a review [J]. *Curr Med Chem*, 2021, 28 (20): 3925-3934.
- Kuglstatler A, Mueller F, Kusznir E, et al. Structural basis for the cyclophilin a binding affinity and immunosuppressive potency of E-ISA247 (voclosporin) [J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2011, 67 (Pt 2): 119-123.
- Kempkes-Koch M, Fobker M, Erren M, et al. Cyclosporine a metabolite AM19 as a potential biomarker in urine for CSA nephropathy [J]. *Transplant Proc*, 2001, 33 (3): 2167-2169.
- Kale A, Shelke V, Lei Y, et al. Voclosporin: unique chemistry, pharmacology and toxicity profile, and possible options for implementation into the management of lupus nephritis [J]. *Cells*, 2023, 12 (20): 2440.
- Van Gelder T, Lerma E, Engelke K, et al. Voclosporin: a novel calcineurin inhibitor for the treatment of lupus nephritis [J]. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2022, 15 (5): 515-529.
- Mayo PR, Huizinga RB, Ling SY, et al. Voclosporin food effect and single oral ascending dose pharmacokinetic and pharmacodynamic studies in healthy human subjects [J]. *J Clin Pharmacol*, 2013, 53 (8): 819-826.
- Urinia Pharmaceuticals Inc. Lupkynis™ (voclosporin) capsules, for oral use. 2021. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/213716s000lbl.pdf (accessed on 19 January 2022).
- Abdel-Kahaar E, Keller F. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of voclosporin [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2023, 62 (5): 693-703.
- Ling SY, Huizinga RB, Mayo PR, et al. Cytochrome P450 3A and P-glycoprotein drug-drug interactions with voclosporin [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2014, 77 (6): 1039-1050.
- Ling SY, Huizinga RB, Mayo PR, et al. Pharmacokinetics of voclosporin in renal impairment and hepatic impairment [J].

- J Clin Pharmacol, 2013, 53 (12): 1303-1312.
- [21] Busque S, Cantarovich M, Mulgaonkar S, et al. The promise study: a phase 2b multicenter study of voclosporin (ISA247) versus tacrolimus in de novo kidney transplantation [J]. *Am J Transplant*, 2011, 11 (12): 2675-2684.
- [22] Mayo PR, Ling SY, Huizinga RB, et al. Population PKPD of voclosporin in renal allograft patients [J]. *J Clin Pharmacol*, 2014, 54 (5): 537-545.
- [23] Yu JJ, Wang Y, Ragueneau-Majlessi I. Strong pharmacokinetic drug-drug interactions with drugs approved by the us food and drug administration in 2021: mechanisms and clinical implications [J]. *Clin Ther*, 2022, 44 (11): 1536-1544.
- [24] Van Gelder T, Huizinga RB, Lisk L, et al. Voclosporin: a novel calcineurin inhibitor with no impact on mycophenolic acid levels in patients with SLE [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2022, 37 (5): 917-922.
- [25] Wang WD, Li ZJ, Chen YY, et al. Recent advances in Incrnas and chronic kidney disease [J]. *Acta Pharm Sin*, 2019, 54 (11): 1918-1925.
- [26] Plüß M, Piantoni S, Tampe B, et al. Belimumab for systemic lupus erythematosus-focus on lupus nephritis [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2022, 18 (5): 2072143.
- [27] Mejía-Vilet JM, Romero-Díaz J. Voclosporin: a novel calcineurin inhibitor for the management of lupus nephritis [J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2021, 17 (9): 937-945.
- [28] Zeher M, Doria A, Lan J, et al. Efficacy and safety of enteric-coated mycophenolate sodium in combination with two glucocorticoid regimens for the treatment of active lupus nephritis [J]. *Lupus*, 2011, 20 (14): 1484-1493.
- [29] Furie R, Rovin BH, Houssiau F, et al. Two-year, randomized, controlled trial of belimumab in lupus nephritis [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383 (12): 1117-1128.
- [30] Zeher M, Doria A, Lan J, et al. Efficacy and safety of enteric-coated mycophenolate sodium in combination with two glucocorticoid regimens for the treatment of active lupus nephritis [J]. *Lupus*, 2011, 20: 1484-1493.
- [31] Arriens C, Teng YKO, Ginzler EM, et al. Update on the efficacy and safety profile of voclosporin: an integrated analysis of clinical trials in lupus nephritis [J]. *Arthritis Care Res Hoboken*, 2023, 75 (7): 1399-1408.
- [32] Saxena A, Ginzler EM, Gibson K, et al. Safety and efficacy of long-term voclosporin treatment for lupus nephritis in the phase 3 AURORA 2 clinical trial [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2024, 76 (1): 59-67.
- [33] Yahya R, Gafor A, Huizinga R, et al. AB0419 aurion study: preliminary results of voclosporin in lupus nephritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2016, 75: 1049-1050.
- [34] Huizinga R, Yahya R, Gafor A, et al. 20 Aurion study: 24-week data of multi-target therapy with voclosporin, MMF and steroids for active lupus nephritis [J]. *Lupus Sci Med*, 2017, 4. doi: 10.1136/lupus-2017-000215.20.
- [35] Aurinia Pharmaceuticals. Aurinia highlights 48-week data from open-label aurion study at 12th international congress on SLE (lupus 2017) & the 7th asian congress on autoimmunity (ACA 2017) [EB/OL]. (2017-03-27) [2023-02-06]. <https://www.businesswire.com/news/home/20170327005373/en/Aurinia-Highlights-48-Week-Data-Open-Label-AURION-Study>.
- [36] Mandrik O, Fotheringham J, Ren S, et al. The cost-effectiveness of belimumab and voclosporin for patients with lupus nephritis in the united states [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2022, 17 (3): 385-394.
- [37] Ogando NS, Metscher E, Moes DJAR, et al. The cyclophilin-dependent calcineurin inhibitor voclosporin inhibits SARS-CoV-2 replication in cell culture [J]. *Transpl Int*, 2022, 35: 10369.
- [38] EU Clinical Trials Register. Clinical trials register[EB/OL]. (2020-04-28) [2023-08-04]. <https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/trial/2020-001467-82/NL>.
- [39] Naidoo P, Rambiritch V. Voclosporin (ISA247) for plaque psoriasis [J]. *Lancet*, 2008, 372 (9642): 888-889.
- [40] Vincenti F, Friman S, Scheuermann E, et al. Results of an international, randomized trial comparing glucose metabolism disorders and outcome with cyclosporine versus tacrolimus [J]. *Am J Transplant*, 2007, 7 (6): 1506-1514.
- [41] Porrini E, Moreno JM, Osuna A, et al. Prediabetes in patients receiving tacrolimus in the first year after kidney transplantation: a prospective and multicenter study [J]. *Transplantation*, 2008, 85 (8): 1133-1138.
- [42] Kolic J, Beet L, Overby P, et al. Differential effects of voclosporin and tacrolimus on insulin secretion from human islets [J]. *Endocrinology*, 2020, 161 (11): bqaa162.

(收稿日期: 2023-10-09; 修回日期: 2023-12-04)

调节性细胞死亡在心肌缺血再灌注损伤中的作用研究进展

张思琦¹, 郭朝瑞¹, 董志强², 陆程灿^{2*}, 赵娣^{1*} (1. 中国药科大学基础医学与临床药学院 临床药理研究中心, 南京 211100; 2. 南京医科大学附属江宁医院药学部, 南京 211100)

摘要: 心肌缺血再灌注损伤 (MIRI) 是心肌梗死患者接受再灌注治疗后产生不良预后的主要原因。调节性细胞死亡 (RCD) 是一种有序的细胞主动死亡方式, 在维系正常生命活动中发挥着至关重要的作用。越来越多的证据表明 RCD 高度参与了 MIRI 的发展, 可能成为挽救损伤心肌的关键。本文重点关注细胞凋亡、细胞自噬、细胞焦亡、坏死性凋亡以及铁死亡等 RCD 在 MIRI 发展过程中的作用, 加深对 MIRI 病理过程的理解, 为未来 MIRI 的临床治疗和药物研发提供参考。

关键词: 调节性细胞死亡; 心肌缺血再灌注损伤; 细胞凋亡; 细胞自噬; 细胞焦亡; 坏死性凋亡; 铁死亡

中图分类号: R542 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)07-1838-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.026

Research progress in the role of regulated cell death in myocardial ischemia-reperfusion injury

ZHANG Si-qi¹, GUO Chao-rui¹, DONG Zhi-qiang², LU Cheng-can^{2*}, ZHAO Di^{1*} (1. *Clinical Pharmacology Research Center, School of Basic Medicine and Clinical Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211000*; 2. *Department of Pharmacy, Affiliated Jiangning Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 211000*)

Abstract: Myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) is a major cause of negative consequences for patients with myocardial infarction who undergo reperfusion therapy. Regulated cell death (RCD) is a form of orderly and active cell death that plays a crucial role in sustaining normal life processes. Increasing evidence suggests that RCD is actively involved in the development of MIRI and possible key to rescuing damaged myocardial tissue. This article focused on the roles of various forms of RCD, including apoptosis, autophagy, pyroptosis, necroptosis, and ferroptosis, in the progression of MIRI. By deepening our understanding of the pathophysiological process of MIRI, this article aims to provide reference for future clinical treatments of MIRI and drug development.

Key words: regulated cell death; myocardial ischemia-reperfusion injury; apoptosis; autophagy; pyroptosis; necroptosis; ferroptosis

急性心肌梗死通常由冠状动脉阻塞引起的心肌缺血所致, 为了避免严重后果, 临床上通常使用经皮冠状动脉介入治疗 (percutaneous coronary intervention, PCI) 恢复心肌的血流供应。进行再灌注治疗可从梗死中挽救部分缺血心肌, 但是会引起比再灌注之前更严重的功能障碍^[1], 即心肌

缺血再灌注损伤 (myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)。对于 MIRI 产生的机制, 已经有诸多报道, 例如氧化应激损伤、无菌性炎症、代谢障碍等^[2], 其中心肌细胞死亡是关键环节。鉴于心肌细胞的再生能力极为有限, 心肌细胞的大量死亡会导致严重的心功能不全。因此, 通过阻

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 82200510); 南京市卫生科技发展专项资金一般项目 (No. YKK23223)。

作者简介: 张思琦, 女, 硕士, 主要从事心肌缺血再灌注损伤研究, email: 1748353606@qq.com *通信作者: 陆程灿, 男, 博士, 主管药师, 主要从事临床药理学和心血管药理研究, email: 870014704@qq.com; 赵娣, 女, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事药物代谢动力学研究, email: zh_d99@cpu.edu.cn

止心肌细胞死亡，最大限度地保留心脏功能和延长患者寿命，对于 MIRI 的治疗具有重要意义。

2018 年，细胞死亡命名委员会 (Committee on Cell Death Nomenclature, NCCD) 将细胞死亡按照功能差异分为意外性细胞死亡和调节性细胞死亡 (regulated cell death, RCD) [3]。前者是不可调节的细胞死亡过程，后者与结构紧密的信号级联有关，具有可调节的特点，主要包括细胞凋亡 (apoptosis)、细胞自噬 (autophagy)、细胞焦亡 (pyroptosis)、坏死性凋亡 (necroptosis)、铁死亡 (ferroptosis) 等。大量研究表明，MIRI 导致的心肌细胞的死亡大多数是通过 RCD 来执行的：心肌细胞可以直接发生 RCD 导致 MIRI [4-6]，其他细胞 (例如血管内皮细胞、成纤维细胞等) 的 RCD 也可以推动 MIRI 的发展 [7-11]。RCD 具有可调控的特点，这为挽救心肌细胞提供了干预窗口。本文综述了 MIRI 中的 RCD，包括其具体机制以及最新研究进展，重点关注细胞凋亡、细胞自噬、细胞焦亡、坏死性凋亡、铁死亡，为 MIRI 的相关研究以及药物治疗提供参考。

1 细胞凋亡与 MIRI

细胞凋亡是最早也是最广为人知的 RCD 之一，早在 20 年前，研究者就已经在 MIRI 中观察到了细胞凋亡。凋亡早期细胞具有细胞核皱缩、DNA 片段化等形态学特征，凋亡晚期细胞则会通过出芽的方式形成凋亡小体 (apoptotic body)。根据启动途径不同，细胞凋亡分为外源性途径和内源性途径两种 (见图 1)。外源性途径通过死亡配体和死亡受体的结合形成死亡诱导复合物 (DISC) 来激活 Caspase 8，从而扩大凋亡信号并激活凋亡效应蛋白 Caspase 3 和 Caspase 7，导致细胞凋亡。内源性途径由促凋亡蛋白 BAX 在线粒体外膜上形成孔道，引发线粒体外膜通透化 (MOMP) [12] 并释放细胞色素 C，刺激激活 Caspase 9 和下游的 Caspase 3 与 Caspase 7，导致细胞凋亡 [13]。

细胞凋亡在 MIRI 中的激活与缺血时间相关，主要在再灌注时期发挥作用，还参与了 MIRI 终末期的心脏重塑过程。一项研究通过在犬离体心脏中建立缺血 45 min 或 90 min 再灌注 6 h 的 MIRI 模型来研究细胞凋亡发生的时期，结果表明，心肌在缺血 45 min 以及再灌注 6 h 的过程中和心肌缺血 90 min 时均没有检测到 DNA 链断裂等凋亡标志物。然而，在缺血 90 min 再灌注 6 h 后，心肌细胞和非心肌细胞均出现凋亡 (7.6% 的心肌细胞和 8.3% 的非心肌细胞) [14]。使用生化分析在缺血性心脏病

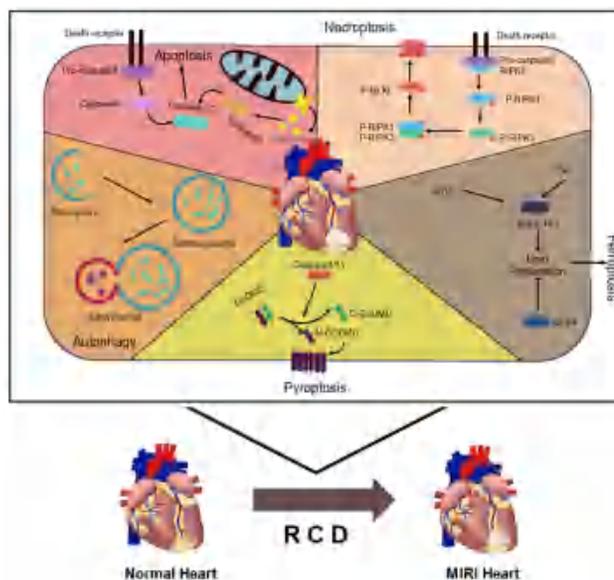


图 1 心肌缺血再灌注损伤中的调节性细胞死亡

Fig 1 Regulated cell death pathways in myocardial ischemia-reperfusion injury

终末阶段的心脏 (来源心脏移植手术) 中观察到细胞色素 C 以及 Caspase 3 积累 [6]。当前，抑制细胞凋亡在部分研究中表现出缓解 MIRI 的效果。一项关于小鼠 MIRI 的研究发现，褪黑素增加了抗凋亡因子 BCL-2 的表达水平，降低了 BAX、Caspase 3 和活化的 Caspase 3 的表达水平 [15]，褪黑素的长期给予减少了 MIRI 所造成的瘢痕面积，改善了心脏功能。在心脏手术 (法洛四联症患者) 收集的心肌组织中发现，应用远端缺血预适应可以通过缓解 BAX 的切割来抑制 MOMP 增加，从而缓解 MIRI [16]。研究发现应用丹皮酚可以显著上调大鼠 MIRI 损伤心肌中抗凋亡因子 BCL-2 蛋白表达，并显著下调大鼠 MIRI 损伤心肌中 Caspase 9 的蛋白表达水平来干预细胞凋亡，从而改善心脏功能 [17]。这些发现强调了细胞凋亡在 MIRI 中的重要性，为未来的研究和治疗提供了重要方向。

简而言之，细胞凋亡在 MIRI 的再灌注时期发生，并且可能参与终末期的心室重塑，抑制细胞凋亡关键蛋白在治疗 MIRI 中获得了显著疗效，因此抑制细胞凋亡可作为一个长期策略应用在 MIRI 的治疗当中。

2 细胞自噬与 MIRI

Christian De Duve 在 1963 年基于对细胞内容物降解机制首次提出了“自噬”概念。细胞自噬通常指创建双层膜结构的自噬体，以包裹并运输受损蛋白至溶酶体进行降解的分子过程 [18]。该过程涉及三种特殊膜结构 (见图 1)：自噬泡 (phagophore)、自噬体 (autophagosome) 和

自噬溶酶体 (autolysosome) [19]。各种刺激促使自噬相关基因及蛋白 (ATGs) 募集到自噬泡组装位点, ATGs 成核形成杯状结构的隔离膜, 即自噬泡。隔离膜伸展封闭形成自噬体, 在该过程中捕获目标蛋白, 与溶酶体融合后, 形成自噬溶酶体, 开始蛋白质的降解过程 [20]。

自噬是 MIRI 中的关键细胞机制, 既有保护作用也有潜在的破坏作用。自噬能够在压力条件下通过将受损蛋白运输至溶酶体中降解来维持细胞稳定性 [21], 但无节制的自噬活动可能诱发细胞死亡 [22]。在 MIRI 的缺氧阶段, 自噬通过清除损伤的细胞器帮助维持细胞能量平衡和结构完整性。研究表明, 在大鼠心肌细胞缺氧期间心肌细胞自噬显著激活 [23]。另一项研究发现, 在猪心肌慢性缺血模型中, 自噬相关蛋白表达在没有细胞凋亡的区域更为明显, 表明自噬有助于抑制细胞凋亡, 维持细胞稳态 [24]。此外, 在大鼠原代心肌细胞缺氧/复氧模型中, 使用自噬抑制剂会增加心肌细胞死亡 [25], 提示在 MIRI 过程中, 细胞自噬可以产生保护作用。然而, 在再灌注或复氧过程中, 过度自噬可能导致关键细胞器的过度消耗, 最终引起细胞死亡。研究发现 MIRI 可在小鼠心肌中诱导自噬促进心肌细胞死亡, 表现为心肌细胞大量空泡和核周间隙的出现以及细胞膜的耗尽。在小鼠心脏缺血再灌注 6 h 后, 从心肌中检测到自噬体的增加, 但使用遗传学和药理学手段抑制自噬可以显著降低心肌梗死面积以及心肌组织中的空泡数量 [26]。此外, 研究还发现天然化合物如橙皮苷和小檗碱能够通过抑制过度自噬来保护心脏 [27-30]。

尽管关于自噬在 MIRI 中的作用已经有广泛的研究, 但其具体作用仍有争议。考虑到自噬流在 RCD 和正常细胞稳态中的动态性, 自噬在 MIRI 中可能既具有保护作用又有潜在的危害。理解自噬如何平衡心脏的保护与损伤, 对未来治疗策略的优化具有重要意义。未来的研究需要更精确地探索自噬的调控机制, 以开发出能够精细调节自噬活动的治疗方法, 使其在保护心脏的同时避免其潜在的危害。

3 细胞焦亡与 MIRI

细胞焦亡是一种引起炎症的 RCD, 以膜穿孔以及细胞肿胀破裂为特征, 其发生依赖于 Gasdermin 蛋白家族成员 (例如 GSDMD) 的剪切。该家族成员由两个功能区组成, 分别是具有膜穿孔活性的 N 端和对 N 端具有抑制作用的 C 端 (见图 1)。在 MIRI 中, 细胞焦亡主要依赖 GSDMD

的切割激活, 释放出 N-GSDMD 并在质膜穿孔导致细胞死亡。

细胞焦亡分为经典和非经典通路两种 [29]。经典通路中细胞焦亡由炎症小体激活的 Caspase 1 介导。Caspase 1 与炎症小体活化相关。研究最为广泛的炎症小体是由 Nod 样受体家族含 pyrin 结构域蛋白 3 (NLRP3)、凋亡相关斑点样蛋白含半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶募集结构域 (ASC) 和 Caspase 1 组成的 NLRP3 炎症小体。在受到如 MIRI 等刺激后, NLRP3 炎症小体在胞内迅速组装并切割活化 Caspase 1 蛋白, 促进 GSDMD 以及白细胞介素 (IL)-1 β 和 IL-18 的剪切, 并通过 N-GSDMD 形成的孔释放到胞外 [21]。研究显示, 在 PCI 术后 24 h 内, 患者血液中 IL-18 与 GSDMD 水平显著升高 [4], 于 12 h 达到峰值并且持续到 24 h [30], 同样在小鼠 MIRI 模型的受损心肌组织 [4] 和缺氧/复氧后的小鼠原代细胞 [30] 中也观察到了 GSDMD 及其活化形式 N-GSDMD 的显著增加。非经典通路由 Caspase 11/Caspase 4/Caspase 5 介导, 这一途径不依赖炎症小体激活, 而是直接通过细胞内感受器的刺激实现 Caspase 11 的自我切割来激活 GSDMD, 导致细胞膜穿孔和 K⁺ 的内流, 刺激 NLRP3 炎症小体的快速组装并启动下游 Caspase 1 的活化 [31]。研究表明, 在小鼠心肌原代细胞的缺氧/复氧模型中, 缺氧/复氧导致的心肌细胞焦亡不由 Caspase 1 执行, 而是由非经典通路中的 Caspase 11 执行 [30], 这表明 Caspase 11 可能是抑制细胞焦亡的关键靶点。但也有研究显示, Caspase 1 与 Caspase 11 在离体小鼠心脏的 MIRI 中均发挥着重要作用 [32]。

NLRP3 炎症小体在细胞焦亡中的作用尚不明确。研究表明, 高血糖诱导的 NLRP3 炎症小体激活可加重糖尿病大鼠的 MIRI, 抑制炎症小体的激活则显著减轻大鼠的 MIRI; 体外研究也显示, 抑制炎症小体激活可减轻高糖和缺氧/复氧诱导的 H9C2 细胞损伤 [33]。此外, 早前研究发现 NLRP3 敲除小鼠的心脏在体外 MIRI 模型中表现出显著的心脏保护作用 [9]。但在后续的研究中却发现 NLRP3 敲除反而增大了体内 MIRI 模型的心肌梗死面积, 这可能与 NLRP3 缺失阻碍了心脏保护通路有关 [34], 提示 NLRP3 炎症小体的激活在一定程度上具有心脏保护作用。

当前关于抑制细胞焦亡对 MIRI 的保护作用仍存在争议。研究者使用大黄素、肉桂酸、右美托咪定对 MIRI 有显著的保护作用, 进一步

研究发现, 这些作用是通过抑制细胞焦亡实现的^[35-37]。但是, 也有证据表明, 相对于野生型小鼠, GSDMD 敲除小鼠在短期 (24 h) 内可以提高 MIRI 后的心脏功能, 但从长期结果来看 (28 d), GSDMD 敲除可能会通过诱导凋亡加剧心脏功能的丧失^[38]。细胞焦亡也可能与其他 RCD 共同作用。有研究发现 N-GSDMD 并不直接作用于细胞膜, 在此之前具有从线粒体转位至细胞质的时间依赖性, 表明 N-GSDMD 可在线粒体膜上形成孔洞, 导致线粒体膜电位降低, 引发线粒体自噬, 最终导致心肌细胞死亡^[39]。

综上, 细胞焦亡在 MIRI 早期被强烈激活, 其经典通路与非经典通路均在 MIRI 中扮演着重要角色, 并且由于细胞焦亡与炎症之间的密切联系, 它可能在 MIRI 的发展中起到比凋亡更重要的作用。目前, 对于抑制细胞焦亡所产生的治疗作用存在争议, 未来的研究需要进一步探讨细胞焦亡通路在 MIRI 中的潜在作用和治疗潜力。

4 坏死性凋亡与 MIRI

以往研究者们认为 MIRI 损伤心肌中的细胞坏死是一种不可控的细胞死亡过程。然而, 近期研究发现, 细胞坏死的某些形式是可调控的, 包括坏死性凋亡^[40]。坏死性凋亡依赖于受体相互作用的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶 3 (receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3, RIPK3) 介导的混合谱系激酶结构域样蛋白 (mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL) 的磷酸化过程。磷酸化后的 MLKL 会进一步寡聚化, 并迁移至质膜内侧执行穿孔, 导致细胞死亡^[41] (见图 1)。关于小鼠 MIRI 模型中坏死性凋亡的关键蛋白 (RIPK1、RIPK3 和 MLKL) 的研究表明, MLKL 蛋白缺失可以改善 MIRI^[42]。MLKL 的磷酸化由包含 RIPK3 和 MLKL 的复合体, 即坏死小体 (necrosome) 执行。

坏死小体形成可由死亡受体介导的细胞外信号激活。细胞外信号由死亡受体传导, 这些受体进一步招募了 RIPK1 和与 Caspase 8 相互作用的衔接蛋白 (如磷酸化 RIPK1), 随后进一步磷酸化 RIPK3 以及 MLKL^[41]。坏死性凋亡与细胞凋亡共享相同的死亡受体介导的激活机制, 但作用完全不同: 在细胞凋亡途径中, RIPK1 通常处于失活状态; 相反, 在坏死性凋亡通路中, RIPK1 激活, 这一改变推动了 MLKL 的磷酸化, 引起膜的破裂导致细胞死亡^[13, 41]。这两种细胞死亡形式不仅在机制通路上存在明显差异, 而且在 MIRI 中存在互补作用。Caspase 8 蛋白在两种 RCD 的信

号级联中均有参与: 在细胞凋亡途径中, Caspase 8 扩大凋亡信号并激活凋亡蛋白 Caspase 3/7; 而在坏死性凋亡途径中, Caspase 8 的存在则会清除 RIPK1, 从而阻断坏死性凋亡的信号传递。临床研究证实, 相较于健康心脏 (样本来源于失败的心脏移植手术), 心力衰竭患者的心脏中的坏死性凋亡相关蛋白, 包括 RIPKs 和磷酸化 MLKL 的表达水平显著上调^[43]。同时, 该研究还发现 Caspase 8 的表达水平降低, 而钙蛋白酶 I (凋亡相关蛋白) 的表达水平保持不变^[43], 这意味着 MIRI 的发展与坏死性凋亡而非细胞凋亡有关。在豚鼠 MIRI 的模型中, 单独应用细胞凋亡抑制剂 (Z-VAD-fmk, 抑制 Caspase 8/3) 显著增加了 RIPK1 的蛋白含量, 证明了两种 RCD 的互补作用。在同一项研究中, 联合应用细胞凋亡抑制剂和坏死性凋亡抑制剂在治疗豚鼠 MIRI 中获得了比单一抑制剂更加显著的疗效^[44]。这种互补关系表明, 两种 RCD 可能在 MIRI 中扮演不同的角色。

需要注意的是, 坏死性凋亡与细胞焦亡在膜穿孔的特征上相似, 但涉及的机制却不同。坏死性凋亡依赖于 MLKL 磷酸化执行穿孔, 而细胞焦亡依赖于 GSDMD 的剪切作用; 两者形成的胞膜孔径不同, 低温电镜观察显示, GSDMA-N 结构域形成的孔径约为 18 nm^[45], MLKL 引起的膜穿孔在 4 nm 左右^[46]。

此外还有研究发现, 在大鼠心肌细胞缺氧/复氧模型中, RIPK3 可以绕开 RIPK1 与 MLKL 直接损伤线粒体, 导致心肌细胞坏死^[47]。尽管已有研究揭示了坏死性凋亡在 MIRI 中的重要性, 但仍需进一步实验来深入理解这种 RCD 在心脏疾病中的确切作用。未来的研究应当评估细胞凋亡与坏死性凋亡之间的相互作用及其对 MIRI 的综合影响, 以深化对心脏病理学的理解, 指导新的治疗策略的开发。

5 铁死亡与 MIRI

铁死亡是在 2012 年被提出的一种细胞死亡方式^[48], 是以细胞膜脂质过氧化物累积为特征的 RCD。铁死亡与细胞凋亡和其他类型的 RCD 在形态上不同, 铁死亡细胞不表现出典型的凋亡特征 (如 DNA 片段化以及凋亡小体形成), 主要表现为线粒体皱缩和线粒体嵴数量减少, 脂质过氧化物积累是铁死亡的关键特征^[48-50]。铁死亡可在 MIRI 中被激活, 通过在小鼠 MIRI 模型中的免疫组化研究, 研究者观察到了铁死亡代谢物的积累, 并与心肌细胞共定位。为了明确各种

RCD 对 MIRI 的贡献程度, 该研究对小鼠进行了各种 RCD 抑制剂的预处理, 建立 MIRI 模型。结果显示, 铁死亡抑制剂 Fer-1 表现出了最显著的心脏保护作用。不同于其他形式的 RCD 的分子机制 (凋亡中依赖凋亡小体的形成, 焦亡中依赖 GSDMD 的活化, 坏死性凋亡中 MLKL 的磷酸化), 铁死亡不依赖于特定的执行蛋白, 而是由铁死亡执行系统和防御系统之间的平衡决定^[3]。

铁死亡执行系统包括多不饱和脂肪酸磷脂 (polyunsaturated fatty acid-containing phospholipid, PUFA-PL) 的合成和过氧化、铁代谢以及线粒体代谢。在富含二价铁离子和活性氧 (ROS) 的条件下, 细胞膜中的 PUFA-PLs 易发生过氧化, 这种脂质过氧化物在细胞膜中的积累最终会破坏膜的完整性, 从而引发铁死亡。PUFA-PLs 的合成是由脂酰辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (ACSL4) 和溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶 3 (LP-CAT3) 介导。游离的二价铁可启动非酶的芬顿反应, 也可以作为花生四烯酸盐脂氧合酶 (ALOXs) 和细胞色素 P450 氧化还原酶 (POR) 的重要辅因子, 促进脂质过氧化。研究发现, 心肌特异性敲除 ALOX15 或使用 ALOX15 抑制剂均观察到小鼠 MIRI 的减轻。在同一研究中, 铁死亡标志物 ACSL4 在再灌注后 24 h 显著升高, 而 Western blot 结果表明, ALOX15 在 MIRI 7 d 后仍然高表达, 这表明铁死亡在 MIRI 后长期发挥作用^[51]。最后, 线粒体代谢会促进 ROS、三磷酸腺苷 (ATP) 的生成, 为铁死亡的发生提供条件。

铁死亡防御系统主要包括谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) - 还原型谷胱甘肽 (GSH) 系统、铁死亡抑制蛋白 -1- 泛素系统、二氢乳清酸脱氢酶 - 系统和 GTP 环羟化酶 -1- 四氢生物蝶呤系统。当铁死亡防御系统无法有效抵御铁死亡执行系统产生的过氧化应激时, 细胞膜的脂质过氧化物将会积累并引发膜破裂^[52]。在铁死亡的概念被提出来之前, 已有研究显示小鼠线粒体特异性过表达 GPX4 能够减轻 MIRI^[53]。在小鼠离体心脏模型中, 通过谷氨酰胺酶抑制剂抑制谷氨酰胺水解来抑制铁死亡能够缓解 MIRI^[54]。此外, 一项使用成年大鼠原代心肌细胞模型的研究发现, 在缺氧和缺氧/复氧条件下, 血红素加氧酶 1 的上调可促进血红素降解并释放二价铁离子引发铁死亡, 而上调胞质 GPX4 (不是线粒体 GPX4) 可以缓解铁死亡引起的损伤^[55]。

铁死亡在 MIRI 中作用极为复杂, 并在 MIRI 的各个阶段都发挥关键作用。鉴于多种因素均可

干扰铁死亡执行系统与防御系统之间的动态平衡, 未来需要进一步研究这些关键分子在维持平衡中的具体作用。

6 讨论与总结

在 MIRI 过程中, 细胞凋亡是最被广泛研究的 RCD 形式, 它在再灌注时期起主要作用。坏死性凋亡与细胞凋亡均由 DISC 触发, 但其下游通路各异, 两者在 MIRI 中呈现出互补作用, 同时抑制坏死性凋亡与细胞凋亡能够最大程度地保护心脏; 适度的自噬在 MIRI 中有助于降解受损细胞器以及蛋白, 可以帮助维持心肌稳态, 但过度的自噬可能加重心肌损伤; 细胞焦亡依赖于关键蛋白 GSDMD 的剪切和其介导的质膜打孔, 其异常激活可能导致 MIRI 早期过度炎症反应引起心肌损伤; 铁依赖性脂质过氧化和失衡的抗氧化系统共同启动铁死亡, 铁死亡可能在中长期发挥主要作用。

鉴于在全球范围内心肌梗死仍然是导致死亡的主要原因之一, 并且在临床样本和动物模型的 MIRI 中都观察到多种形式的 RCD, 以干预 RCD 为靶点的策略在未来 MIRI 治疗中存在巨大的潜力。目前仍需要开展大量研究以深入理解 MIRI 中各种 RCD 的具体作用及调节机制。综上所述, 不同的 RCD 具有一些相似的特征 (例如细胞焦亡和坏死性凋亡都具有成孔的特点), 需要在研究中通过多种方法确认 RCD 途径, 如同时使用电镜观察形态, 结合分子生物学确认 RCD 关键蛋白。MIRI 病理过程复杂, 不同 RCD 在 MIRI 中的作用呈现出阶段性的特点, 因此研究需要根据 MIRI 发展的不同阶段进行全方位研究。这些 RCD 可能共存于 MIRI 心脏中, 甚至可能存在复杂的相互作用 (例如细胞自噬可能抑制细胞凋亡), 在研究中可通过特异性抑制剂或基因敲除等手段明确占主导地位的 RCD。

总之, RCD 在 MIRI 中有关键作用, 但其调节机制尚不明确, 通过干预 RCD 来满足治疗需求, 将基础科研转化为临床实践仍然有很长的一段路要走。

参考文献

- [1] Heusch G. Myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection in perspective [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2020, 17 (12): 773-789.
- [2] Algoet M, Janssens S, Himmelreich U, et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury and the influence of inflammation [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2023, 33 (6): 357-366.

- [3] Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2018 [J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25 (3): 486-541.
- [4] Ye XM, Zhang P, Zhang YT, et al. GSDMD contributes to myocardial reperfusion injury by regulating pyroptosis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 893914.
- [5] Huang KY, Que JQ, Hu ZS, et al. Metformin suppresses inflammation and apoptosis of cardiomyocytes by inhibiting autophagy in a model of ischemia-reperfusion injury [J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16 (14): 2559-2579.
- [6] Narula J, Pandey P, Arbustini E, et al. Apoptosis in heart failure: release of cytochrome C from mitochondria and activation of Caspase-3 in human cardiomyopathy [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1999, 96 (14): 8144-8149.
- [7] Xie SY, Xing Y, Shi WK, et al. Cardiac fibroblast heat shock protein 47 aggravates cardiac fibrosis post myocardial ischemia-reperfusion injury by encouraging ubiquitin specific peptidase 10 dependent Smad4 deubiquitination [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12 (11): 4138-4153.
- [8] Zhang M, Lei YS, Meng XM, et al. Igaratimod alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury through inhibiting inflammatory response induced by cardiac fibroblast pyroptosis via COX2/NLRP3 signaling pathway [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 746317.
- [9] Sandanger Ø, Ranheim T, Vinge LE, et al. The NLRP3 inflammasome is up-regulated in cardiac fibroblasts and mediates myocardial ischaemia-reperfusion injury [J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 99 (1): 164-174.
- [10] Zhang LW, Yuan M, Zhang L, et al. Adiponectin alleviates NLRP3-inflammasome-mediated pyroptosis of aortic endothelial cells by inhibiting FoxO4 in arteriosclerosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 514 (1): 266-272.
- [11] Bai BC, Yang YY, Wang Q, et al. NLRP3 inflammasome in endothelial dysfunction [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11 (9): 776.
- [12] Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, et al. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane [J]. *Cell*, 2002, 111 (3): 331-342.
- [13] Bertheloot D, Latz E, Franklin BS. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18 (5): 1106-1121.
- [14] Freude B, Masters TN, Robicsek F, et al. Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2000, 32 (2): 197-208.
- [15] Zhai ME, Li BY, Duan WX, et al. Melatonin ameliorates myocardial ischemia reperfusion injury through SIRT3-dependent regulation of oxidative stress and apoptosis [J]. *J Pineal Res*, 2017, 63 (2): e12419.
- [16] Liu GY, Lv Y, Wang YT, et al. Remote ischemic preconditioning reduces mitochondrial apoptosis mediated by calpain 1 activation in myocardial ischemia-reperfusion injury through calcium channel subunit Cacna2d3 [J]. *Free Radic Biol Med*, 2024, 212: 80-93.
- [17] Tsai CF, Su HH, Chen KM, et al. Paeonol protects against myocardial ischemia/reperfusion-induced injury by mediating apoptosis and autophagy crosstalk [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 11: 586498.
- [18] Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms [J]. *J Pathol*, 2010, 221 (1): 3-12.
- [19] Tang DL, Kang R, Berghe TV, et al. The molecular machinery of regulated cell death [J]. *Cell Res*, 2019, 29 (5): 347-364.
- [20] Gatica D, Chiong M, Lavandero S, et al. Molecular mechanisms of autophagy in the cardiovascular system [J]. *Circ Res*, 2015, 116 (3): 456-467.
- [21] Davidson SM, Adameová A, Barile L, et al. Mitochondrial and mitochondrial-independent pathways of myocardial cell death during ischaemia and reperfusion injury [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24 (7): 3795-3806.
- [22] Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19 (6): 349-364.
- [23] Yang Y, Li YY, Chen X, et al. Exosomal transfer of miR-30a between cardiomyocytes regulates autophagy after hypoxia [J]. *J Mol Med*, 2016, 94 (6): 711-724.
- [24] Yan L, Vatner DE, Kim SJ, et al. Autophagy in chronically ischemic myocardium [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2005, 102 (39): 13807-13812.
- [25] Valentim L, Laurence KM, Townsend PA, et al. Urocortin inhibits Beclin1-mediated autophagic cell death in cardiac myocytes exposed to ischaemia/reperfusion injury [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, 40 (6): 846-852.
- [26] Nah J, Zhai P, Huang CY, et al. Upregulation of rubicon promotes autophagy during myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *J Clin Invest*, 2020, 130 (6): 2978-2991.
- [27] Li XF, Hu XR, Wang JC, et al. Inhibition of autophagy via activation of PI3K/Akt/mTOR pathway contributes to the protection of hesperidin against myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42 (4): 1917-1924.
- [28] Huang ZQ, Han ZH, Ye BZ, et al. Berberine alleviates cardiac ischemia/reperfusion injury by inhibiting excessive autophagy in cardiomyocytes [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 762: 1-10.
- [29] Broz P, Pelegrín P, Shao F. The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20 (3): 143-157.
- [30] Shi HR, Gao Y, Dong Z, et al. GSDMD-mediated cardiomyocyte pyroptosis promotes myocardial I/R injury [J]. *Circ Res*, 2021, 129 (3): 383-396.
- [31] Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, et al. Non-canonical inflammasome activation targets Caspase-11 [J]. *Nature*, 2011, 479 (7371): 117-121.

- [32] Yang XM, Cohen MV, Sayner S, et al. Lethal Caspase-1/4-dependent injury occurs in the first minutes of coronary reperfusion and requires calpain activity [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (4): 3801.
- [33] Qiu Z, Lei SQ, Zhao B, et al. NLRP3 inflammasome activation-mediated pyroptosis aggravates myocardial ischemia/reperfusion injury in diabetic rats [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 1-17.
- [34] Sandanger Ø, Gao E, Ranheim T, et al. NLRP3 inflammasome activation during myocardial ischemia reperfusion is cardioprotective [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 469 (4): 1012-1020.
- [35] Zhong Y, Li YP, Yin YQ, et al. Dexmedetomidine inhibits pyroptosis by down-regulating miR-29b in myocardial ischemia reperfusion injury in rats [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 86: 106768.
- [36] Ye BZ, Chen XD, Dai SS, et al. Emodin alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting gasdermin D-mediated pyroptosis in cardiomyocytes [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 975-990.
- [37] Luan F, Rao ZL, Peng LX, et al. Cinnamic acid preserves against myocardial ischemia/reperfusion injury via suppression of NLRP3/Caspase-1/GSDMD signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2022, 100: 154047.
- [38] Zhang ZH, Zhang ZG, Chen MW, et al. Inhibition of GSDMD activates poly (ADP-ribose) lation and promotes myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 1-14.
- [39] Yu ZQ, Xiao ZL, Guan LC, et al. Translocation of gasdermin D induced mitochondrial injury and mitophagy mediated quality control in lipopolysaccharide related cardiomyocyte injury [J]. *Clin Transl Med*, 2022, 12 (8): e1002.
- [40] Andreadou I, Bøtker HE, Davidson SM, et al. Interaction of cardiovascular nonmodifiable risk factors, comorbidities and comedications with ischemia/reperfusion injury and cardioprotection by pharmacological treatments and ischemic conditioning [J]. *Pharmacol Rev*, 2023, 75 (1): 159-216.
- [41] Galluzzi L, Kepp O, Chan FKM, et al. Necroptosis: mechanisms and relevance to disease [J]. *Annu Rev Pathol*, 2017, 12 (1): 103-130.
- [42] Newton K, Dugger DL, Maltzman A, et al. RIPK3 deficiency or catalytically inactive RIPK1 provides greater benefit than MLKL deficiency in mouse models of inflammation and tissue injury [J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23 (9): 1565-1576.
- [43] Szobi A, Gonçalvesová E, Varga ZV, et al. Analysis of necroptotic proteins in failing human hearts [J]. *J Transl Med*, 2017, 15 (1): 86.
- [44] Koshinuma S, Miyamae M, Kaneda K, et al. Combination of necroptosis and apoptosis inhibition enhances cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *J Anesth*, 2014, 28 (2): 235-241.
- [45] Ruan JB, Xia SY, Liu X, et al. Cryo-EM structure of the gasdermin A3 membrane pore [J]. *Nature*, 2018, 557 (7703): 62-67.
- [46] Ros U, Peña-Blanco A, Hänggi K, et al. Necroptosis execution is mediated by plasma membrane nanopores independent of calcium [J]. *Cell Rep*, 2017, 19 (1): 175-187.
- [47] Hou HF, Wang YL, Li Q, et al. The role of RIP3 in cardiomyocyte necrosis induced by mitochondrial damage of myocardial ischemia-reperfusion [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2018, 50 (11): 1131-1140.
- [48] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149 (5): 1060-1072.
- [49] Stockwell BR, Friedmann Angeli JP, Bayir H, et al. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease [J]. *Cell*, 2017, 171 (2): 273-285.
- [50] Jiang XJ, Stockwell BR, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22 (4): 266-282.
- [51] Cai WB, Liu L, Shi XL, et al. Alox15/15-HpETE aggravates myocardial ischemia-reperfusion injury by promoting cardiomyocyte ferroptosis [J]. *Circulation*, 2023, 147 (19): 1444-1460.
- [52] Lei G, Zhuang L, Gan BY. Targeting ferroptosis as a vulnerability in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22 (7): 381-396.
- [53] Dabkowski ER, Williamson CL, Hollander JM. Mitochondria-specific transgenic overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (GPX4) attenuates ischemia/reperfusion-associated cardiac dysfunction [J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 45 (6): 855-865.
- [54] Gao MH, Monian P, Quadri N, et al. Glutaminolysis and transferrin regulate ferroptosis [J]. *Mol Cell*, 2015, 59 (2): 298-308.
- [55] Miyamoto HD, Ikeda M, Ide T, et al. Iron overload via heme degradation in the endoplasmic reticulum triggers ferroptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2022, 7 (8): 800-819.

(收稿日期: 2024-02-20; 修回日期: 2024-04-27)

血根碱在癌症治疗中的抗肿瘤机制研究进展

冉遥¹, 冷泓旭², 郑凯帆², 辛贵忠^{2*}, 濮社班^{1*} (1. 中国药科大学中药学院中药资源系, 南京 211198; 2. 中国药科大学中药学院生药学系, 南京 211198)

摘要: 随着癌症发病率的持续升高, 开发新型抗肿瘤药物已成为科研领域的关键方向。血根碱 (sanguinarine), 一种来源于传统中药如白屈菜 (*Chelidonium majus* L.)、博落回 [*Macleaya cordata* (Willd.) R. Br]、血水草 (*Eomecon chionantha* Hance) 和美洲传统草药血根草 (*Sanguinaria canadensis* L.) 等植物的天然生物碱, 由于其在抗肿瘤研究中所展现的显著活性, 已广受学术界关注。本综述文章旨在梳理血根碱在癌症治疗领域内的研究进展, 尤其聚焦其抑制肿瘤增殖、侵袭与转移, 并促进肿瘤细胞凋亡的作用机制。研究显示, 血根碱通过作用于多条信号传导途径及多种分子靶点, 包括 Bcl-2、MAPKs、Akt、NF- κ B、ROS 及微小 RNA 等, 从而发挥其抑制肿瘤的效用。此外, 文章还探讨了血根碱针对乳腺癌、肺癌、肝癌及结直肠癌等多种癌症类型的应用研究。据此, 开发新的给药策略以提升血根碱的临床应用潜力, 成为当前研究的重要课题。未来研究需进一步深化对血根碱抗肿瘤机制的理解, 并通过临床前研究及早期临床试验验证其治疗效果与安全性, 以期为癌症治疗开辟新路径。

关键词: 血根碱; 抗肿瘤机制; 信号通路; 药物开发; 癌症治疗

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)07-1845-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.027

Antitumor mechanisms and application prospects of sanguinarine in cancer treatment

RAN Yao¹, LENG Hong-xu², ZHENG Kai-fan², XIN Gui-zhong^{2*}, PU She-ban^{1*} (1. Department of Chinese Medicine Resources, School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198; 2. Department of Pharmacognosy, School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198)

Abstract: With the continuous rise in cancer incidence, the development of novel anticancer agents has emerged as a pivotal direction in scientific research. Sanguinarine, a natural alkaloid derived from traditional medicinal plants such as *Chelidonium majus* L., *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br, *Eomecon chionantha* Hance, and the North American herb *Sanguinaria canadensis* L., has attracted much attention due to its significant anticancer activity. This paper reviewed the research progress of sanguinarine in cancer treatment, and focused on its mechanisms in inhibiting tumor proliferation, invasion, and metastasis, as well as in promoting tumor cell apoptosis. Studies have demonstrated that sanguinarine exerts its tumoricidal effects by targeting multiple signaling pathways and molecules, including Bcl-2, MAPKs, Akt, NF- κ B, ROS, and microRNAs. Additionally, this article summarized the research on sanguinarine against various cancers, such as breast cancer, lung cancer, liver cancer, and colorectal cancer. Consequently, developing new drug delivery strategies to enhance the clinical application potential of sanguinarine becomes an important research topic. Future studies should better understand the anticancer mechanisms of sanguinarine and validate its therapeutic efficacy and safety through preclinical studies and early clinical trials, to pave new pathways for cancer treatment.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No. 81973577)。

作者简介: 冉遥, 男, 硕士研究生, 主要从事中药药效物质基础研究, email: yran87838@gmail.com *通信作者: 濮社班, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事药用植物种质资源及其质量评价研究, email: pusheban@126.com; 辛贵忠, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事基于功能代谢组学的中药药效物质基础研究, email: xinguihong1984@126.com

Key words: sanguinarine; anticancer mechanism; signaling pathway; drug development; cancer treatment

肿瘤疾病，由细胞异常增生及失控增殖引起，已成为当今人类健康的主要威胁之一。根据世界卫生组织的数据，2020 年全球新诊断肿瘤病例约为 1930 万例，相关死亡病例约为 1000 万例，预计至 2030 年，这一数字将增至 2180 万新病例及 1300 万死亡病例^[1]。肿瘤类型繁多，发病部位各异，常见类型包括肺癌、乳腺癌、肝癌、前列腺癌及结直肠癌等。目前，肿瘤治疗手段多样，主要包括手术切除、化学治疗、放射治疗、内分泌治疗、靶向治疗及免疫治疗等^[2-3]。尽管诊疗技术不断进步，但肿瘤治疗仍面临诸多挑战，如早期发现与诊断难度、高耐药性与复发率、强侵袭性与转移能力，以及显著的治疗副作用等^[4]。因此，开发新型、有效、安全的抗肿瘤药物，已成为迫切的研究需求。

传统中医药中蕴含着众多具备生物活性的化合物，其中不乏展现出抗肿瘤活性的物质，如紫杉醇、雷公藤甲素、白藜芦醇等^[5-7]。血根碱 (sanguinarine) 是一种从植物中提取的天然生物碱，化学结构见图 1，以其显著的药理活性，特别是在抗肿瘤研究中所显示的潜力而备受瞩目。血根碱主要来源于罂粟科植物如白屈菜 (*Chelidonium majus* L.)、博落回 [*Macleaya cordata* (Willd.) R. Br]、血水草 (*Eomecon chionantha* Hance) 和美洲传统植物血根草 (*Sanguinaria canadensis* L.)^[8-11]。除了具有抗菌、抗炎、抗氧化、抗高血压、抗血小板聚集及抗锥虫的作用外^[12-14]，血根碱在抑制肿瘤细胞增殖、侵袭、转移和血管生成，促进肿瘤细胞凋亡、自噬和分化方面也表现出显著效果^[15-17]。其作用机制涉及多种信号通路和分子靶点，包括 Bcl-2、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPKs)、Akt、核因子 κ B (NF- κ B)、活性氧 (ROS) 和微小 RNA (miRNA) 等^[18-23]。血根碱的抗肿瘤作用还涉及肿瘤微环境的调控，特别是通过改变肿瘤细胞与周围免疫细胞的交互作用，从而影响肿瘤免疫逃逸机制^[24-25]。虽然血根碱在肿瘤治疗中展现出巨大潜力，但低生物利用度和潜在的毒副作用限制了其临床应用^[26]。近期研究集中于采用纳米技术和特定的药物载体，如脂质体和纳米粒子，来提高血根碱的溶解度和生物利用度，同时减少对正常细胞的毒性。此外，通过与其他抗肿瘤药物组合使用，血根碱的副作用有望得到进一步降低，同时提升抗肿瘤效率，特别是针对多药耐药性肿瘤的治疗。本文综述了血根碱在肿瘤治疗领

域的研究进展，旨在深入探讨其抗肿瘤机制，并对未来研究方向及临床应用前景进行展望，期望为肿瘤治疗提供新思路。

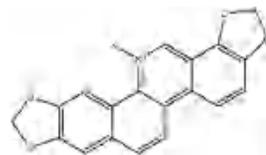


图 1 血根碱 ($C_{20}H_{14}NO_4^+$) 的化学结构

Fig 1 Chemical structure of sanguinarine ($C_{20}H_{14}NO_4^+$)

1 血根碱的化学特性

血根碱是一种异喹啉类生物碱，其分子结构由四个环系统构成，包括一个芳香的喹啉环和三个融合的环，这种独特的结构赋予了其多样的生物活性。血根碱的分子结构中包含一个正电荷的氮原子，这对其与生物大分子的相互作用，特别是与 DNA 和蛋白质的结合能力起着关键作用^[27]。血根碱是一种黄色的固体，具有较强的荧光特性，在不同的溶剂中具有不同的溶解度^[28]。

2 血根碱的抗肿瘤机制 (见图 2)

2.1 促进细胞凋亡

血根碱能够激活细胞内的多个信号通路，触发肿瘤细胞的凋亡。Bcl-2 蛋白家族在细胞凋亡调控中起关键作用，血根碱通过下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的水平，同时上调促凋亡蛋白 Bax 的表达，促使细胞凋亡^[16]。此外，血根碱还能激活包括细胞外调节蛋白激酶 (ERK)、c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 和蛋白激酶 p38 (p38 MAPK) 在内的 MAPKs 通路，促进与细胞凋亡相关的基因表达^[29-30]。通过抑制关键的生存信号通路 Akt，血根碱进一步强化凋亡信号的传导^[31]。同时，血根碱对 NF- κ B 的活性也产生影响，能够抑制癌症中处于激活状态的 NF- κ B，降低其下游抗凋亡基因如 *IAP* 和 *c-FLIP* 的表达，进而促使细胞凋亡^[32-33]。

2.2 抑制肿瘤转移

血根碱不仅在抑制肿瘤细胞增殖和促进细胞凋亡方面显示出显著效果，还对肿瘤的侵袭与转移具有显著抑制作用。血根碱通过调节上皮-间充质转化 (EMT) 过程，显著限制了肿瘤细胞的迁移和侵袭能力^[34]。同时，通过下调基质金属蛋白酶 (MMPs) 的活性，血根碱减弱了细胞外基质的降解，阻碍了肿瘤细胞的迁移路径^[35]。此外，血根碱抑制 NF- κ B 的活性，有效防止了肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭^[36]。血根碱还通过阻止

血管内皮生长因子 (VEGF) 引起的微血管形成, 从而抑制肿瘤血管生成和扩散^[37]。此外, 血根碱能够激活 STAT3 信号, 促进前列腺癌细胞的凋亡, 同时抑制其侵袭与转移^[38]。通过抑制赖氨酸特异性去甲基化酶 1 (LSD1), 血根碱进一步阻断了肿瘤细胞的侵袭和转移过程^[39]。

2.3 促进 ROS 产生

ROS 水平的提高与细胞凋亡之间有着密切的联系。研究发现, 血根碱能够促使 ROS 的生成, 打破细胞内的氧化还原平衡, 引发细胞环境的混乱, 有效地诱导肿瘤细胞凋亡^[40]。血根碱引发的 ROS 增加导致谷胱甘肽 (GSH) 的耗尽, 进而诱导铁死亡的发生^[41]。此外, ROS 的增加亦可抑制 JAK/STAT3 信号通路, 促进细胞凋亡^[22]。同时, 血根碱还能通过提高 ROS 水平, 促使丝氨酸-苏氨酸激酶受体相关蛋白 (STRAP) 与母体胚胎亮氨酸拉链激酶 (MELK) 之间的去磷酸化, 降低 STRAP 与 MELK 的表达关联, 从而促进肿瘤细胞的凋亡^[42]。

2.4 调控 miRNA

小型非编码 RNA 影响基因表达, 血根碱能够通过修改与肿瘤进展相关的 miRNAs 来发挥作用。例如, 血根碱能够促使 *Bcl-2* 基因启动子区域甲基化及 miR-15a/16-1 上调, 引发肿瘤细胞凋亡^[18]。在肝癌中, 血根碱通过调节 miR-497-5p 和 CDK4 的关系抑制肿瘤细胞增殖^[43]。在胃癌中, 血根碱通过下调 miR-96-5p 和 miR-29c-3p, 激活 MAPK/JNK 信号途径, 抑制肿瘤细胞增殖^[44]。此外, 血根碱还能通过 p53 路径上调 miR-16-2 引起肝癌细胞凋亡^[45]。

2.5 调节肿瘤微环境

血根碱能够调节肿瘤微环境, 特别是在调整免疫细胞方面显示出其独特作用。Li 等^[46]发现在刘易斯肺癌小鼠模型中, 血根碱能有效减少髓细胞抑制细胞 (MDSCs) 的比例, 同时促进 T 细胞、巨噬细胞和树突状细胞在脾脏中的增长, 但对某些免疫细胞如 Th17 和 Treg 无明显影响。通过体外实验进一步确认, 血根碱还能通过激活 NF- κ B 途径促进其向有益的免疫细胞如巨噬细胞和树突状细胞转化, 减少免疫抑制因子如精氨酸酶 -1 和一氧化氮合酶的表达, 从而增强 CD8⁺ T 细胞的增殖能力及机体对肿瘤的免疫反应。血根碱还通过调节 CCL2 和 IKBKE/NF- κ B/ERK1/2 信号通路, 抑制肿瘤相关炎症和血管新生, 防止炎症细胞的招募, 从而加强免疫细胞对肿瘤细胞的清除作用^[47]。这些机制的发现不仅揭示了血根碱在抗肿瘤治疗中的潜力, 也为其进一步的应用和机制探索提供了科学依据。

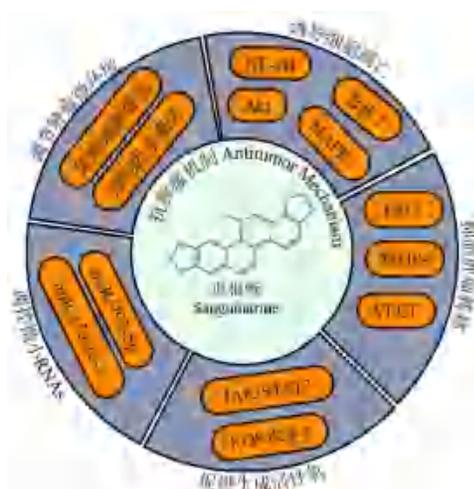


图 2 血根碱抗肿瘤机制示意图

Fig 2 Anticancer mechanism of sanguinarine

血根碱通过多种途径和多个层面影响肿瘤细胞的生长、凋亡及转移, 显示了其作为抗肿瘤药物的巨大潜力。然而, 关于血根碱的抗肿瘤机制, 特别是其在临床应用中的有效性和安全性, 还需要进一步的研究和深入探索。

3 血根碱在不同类型肿瘤中的应用研究

近年来, 血根碱因其广泛的生物活性特别是在抗肿瘤领域的潜力而受到研究者的高度关注。针对不同类型的肿瘤, 血根碱展现出了显著的抑制效果, 在乳腺癌细胞中, 血根碱抑制转移、侵袭, 激活血红素氧合酶 1 (HO-1) 和抑制 NF- κ B 与激活蛋白 -1 (AP-1) 的表达^[35]。在肺癌方面, 血根碱对非小细胞肺癌细胞增殖有明显的抑制作用, 并能促使细胞凋亡^[23]。在肝癌细胞中, 血根碱通过影响 ROS 和 ERK 信号通路, 抑制细胞增殖和促进细胞凋亡^[31]。在结直肠癌细胞中, 血根碱抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路, 减缓肿瘤细胞迁移^[24]。血根碱对不同类型肿瘤细胞的作用如表 1 所示。

4 血根碱的应用挑战

血根碱的化学稳定性受到其结构特性和外部环境因素 (如 pH 值、光照、温度) 的影响。在酸性环境中, 血根碱的稳定性较好, 但在碱性环境下, 其稳定性会降低, 这主要是因为碱性条件下易于发生分子内质子转移, 导致分子结构的改变^[52]。研究者通过化学修饰、纳米技术等方法改善其稳定性和生物利用度, 提高治疗效果^[53]。血根碱虽展现出了显著的抗肿瘤效果, 但其潜在毒性限制了临床应用。研究发现, 含血根碱的漱口水可能与口腔白斑相关, 显示其对正常细胞有损害^[54]。特别是高剂量下, 血根碱可能破坏细胞电位平衡、线粒体功能, 激活 NF- κ B, 诱导细胞周期停滞及凋亡, 甚至引发 DNA 断裂^[55]。动物实

表 1 血根碱对不同类型肿瘤细胞的作用

Tab 1 Effects of sanguinarine on various cancer cell types

癌症类型	靶点	作用	引用文献
乳腺癌	HO-1、MMP-9/COX-2	诱导凋亡、抑制转移与侵袭	[39]
	HIF-1 α /STAT3	诱导凋亡、抑制转移与侵袭	[50]
	EphB4、HIF-1 α /STAT3	诱导凋亡	[51]
	Smad、PI3K/Akt 和 MAPK	诱导凋亡、抑制转移与侵袭	[52]
肺癌	VEGF/Akt/p38	诱导凋亡、抑制转移与侵袭	[41]
	LSD1	诱导凋亡、抑制转移与侵袭	[43]
	ROS	诱导凋亡、抑制转移与侵袭	[23]
	ROS、STAT3/JAK2	诱导凋亡	[34]
	NF- κ B	诱导凋亡、抑制转移与侵袭	[35]
	NF- κ B	诱导凋亡、抑制转移与侵袭	[40]
	ROS、Akt/ERK	诱导凋亡、抑制转移与侵袭	[33]
肝细胞癌	HIF-1 α /TGF- β	诱导凋亡、抑制转移与侵袭	[38]
	miR-497-5p/CDK4	诱导凋亡、抑制转移与侵袭	[47]
	miR-16/ROS	诱导凋亡	[49]
	Wnt/ β -catenin	诱导凋亡、抑制转移与侵袭	[37]
结直肠癌	STRAP/MELK	诱导凋亡	[46]
	ROS/KEAP1-PGAM5-AIFM1	诱导凋亡	[53]
	ROS/Egr-1	诱导凋亡	[54]
	NF- κ B	诱导凋亡	[15]
皮肤鳞状细胞癌	NF- κ B	诱导凋亡	[15]
结肠癌	Bax/Bcl2	诱导凋亡	[16]
宫颈癌	Bax/Bcl2/NF- κ B	诱导凋亡	[17]
	SLC7A11/ROS	诱导细胞铁死亡	[45]
	ROS、STAT3	诱导凋亡	[22]
白血病	MAPK、PI3K/AKT 和 JAK/STAT	诱导凋亡	[19]
黑色素瘤	FAK/PI3K/AKT/mTOR	诱导凋亡、抑制转移与侵袭	[20]
胃癌	DUSP4/ERK	诱导凋亡、抑制转移与侵袭	[36]
	miR-96-5p/miR-29c-3p、MAPK/JNK	诱导凋亡	[48]
前列腺癌	STAT3/JAK2	诱导凋亡、抑制转移与侵袭	[42]
甲状腺乳头状癌	STAT3、ROS	诱导凋亡	[44]

验中，血根碱的给药还可能降低肝脏 GSH 水平，影响 CYP450 酶活性，增加肝脏毒性^[56]。因此，必须严格控制血根碱剂量，减少对健康细胞的伤害。未来研究需找到平衡其抗肿瘤效能与副作用的最佳剂量，并探索通过纳米技术等手段降低毒性的新策略。

药物抗性是肿瘤治疗中的一个重大挑战，表现为肿瘤细胞对治疗药物的敏感性逐渐降低，影响治疗效果。血根碱尽管在体外及动物模型中展现出强效的抗肿瘤活性，其临床应用却受到了药物抵抗的限制^[57]。为了应对这一问题，采用血根碱与其他抗肿瘤药物的联合治疗策略，可以有效降低药物抵抗，提高治疗效果^[58]。深入了解血根碱的作用机制和肿瘤细胞产生抵抗的原因，对于开发能够克服药物抵抗的新型治疗方法至关重要。

5 总结与展望

未来研究需重点关注血根碱的临床前和早期临床试验，以评估其安全性、有效性和确定最佳剂量；深入药动学和药效学研究，以优化治疗方案，减少副作用。此外，需明确血根碱对正常细胞和关键器官的影响，确保安全应用。考虑到联合疗法的

普遍性，研究血根碱与其他治疗药物的相互作用，对避免药物不良反应、优化疗效具有重要意义。这些研究方向的实施，有望推动血根碱在肿瘤治疗领域的应用，为治疗提供新策略。

血根碱因其在促进肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤转移、增强 ROS 生成和调节特定 miRNA 等多方面的显著抗肿瘤效应而受到关注，这些作用机制主要涉及 Bcl-2、MAPKs、Akt 和 NF- κ B 等细胞凋亡相关信号通路的调控。尽管血根碱展现出显著的抗肿瘤潜力，但其在临床应用中的潜在毒性和副作用、药物抵抗问题及低生物利用度等挑战仍需通过进一步的安全性及剂量优化研究、新型给药系统的开发、药物联用策略探索、对其抗肿瘤机制及影响肿瘤微环境作用机制的深入研究和基于患者特定遗传背景及肿瘤特性的个体化治疗策略研究来克服，这为未来血根碱成为重要的肿瘤治疗药物提供了重要的研究方向和应用基础。

综上所述，血根碱在肿瘤治疗领域具有巨大的应用潜力，通过克服现有的挑战并深入探索其作用机制，血根碱有望成为未来肿瘤治疗中的重要药物之一。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71 (3): 209-249.
- [2] Zsolt M, Carl M, Helmut P, et al. Clinical insights into small cell lung cancer: tumor heterogeneity, diagnosis, therapy, and future directions [J]. *CA Cancer J Clin*, 2023, 73 (6): 620-652.
- [3] Zheng LW, Liu CC, Yu KD. Phase separations in oncogenesis, tumor progressions and metastasis: a glance from hallmarks of cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2023, 16 (1): 123.
- [4] 李乐, 吴启鹏, 江振洲. 化疗药物引发肿瘤转移的现象及机制探讨 [J]. *中南药学*, 2022, 20 (8): 1861-1866.
- [5] Tuyelee D, Uttpal A, Swaroop, et al. Therapeutic strategies to overcome taxane resistance in cancer [J]. *Drug Resist Updat*, 2021, 55: 100754.
- [6] Feng K, Li XJ, Bai YZ, et al. Mechanisms of cancer cell death induction by triptolide: a comprehensive overview [J]. *Heliyon*, 2024, 10 (2): 24335.
- [7] Zhang ZT, Ji Y, Hu N, et al. Ferroptosis-induced anticancer effect of resveratrol with a biomimetic nano-delivery system in colorectal cancer treatment [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2022, 17 (5): 751-766.
- [8] Sylwia Z, Anna J, Magdalena W, et al. Greater celandine's ups and downs-21 centuries of medicinal uses of chelidonium majus from the viewpoint of today's pharmacology [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 299.
- [9] 曾泽, 张华琦, 桂干北, 等. 博落回的活性成分、生物学作用及其在动物生产中的应用 [J]. *饲料研究*, 2023, 46 (8): 120-124.
- [10] 刘铭, 陈波, 彭飞, 等. 血水草中血根碱和白屈菜红碱的分离制备研究 [J]. *湖南师范大学学报 (医学版)*, 2009, 6 (1): 5-9.
- [11] Andrew C, Graham JK, John HP, et al. *Sanguinaria canadensis*: traditional medicine, phytochemical composition, biological activities and current uses [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17 (9): 1414.
- [12] 康伟松, 程辟, 曾建国. 血根碱、白屈菜红碱离子对化合物的体外抗菌活性研究 [J]. *中南药学*, 2014, 12 (5): 406-410.
- [13] Basu P, Kuma GS. Sanguinarine and its role in chronic diseases [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 928: 155-172.
- [14] Yang Y, Xiao G, Cheng P, et al. Protective application of chinese herbal compounds and formulae in intestinal inflammation in humans and animals [J]. *Molecules*, 2023, 28 (19): 6811.
- [15] Nihal A, Sanjay G, Mirza MH, et al. Differential antiproliferative and apoptotic response of sanguinarine for cancer cells versus normal cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6 (4): 1524-1528.
- [16] Lee JS, Jung WK, Jeong MH, et al. Sanguinarine induces apoptosis of HT-29 human colon cancer cells via the regulation of Bax/Bcl-2 ratio and caspase-9-dependent pathway [J]. *Int J Toxicol*, 2012, 31 (1): 70-77.
- [17] Xu JY, Meng QH, Chong Yu, et al. Sanguinarine inhibits growth of human cervical cancer cells through the induction of apoptosis [J]. *Oncol Rep*, 2012, 28 (6): 2264-2270.
- [18] Zhang DS, Li YY, Chen XJ, et al. Bcl-2 promoter methylation and miR-15a/16-1 upregulation is associated with sanguinarine-induced apoptotic death in rat HSC-T6 cells [J]. *J Pharmacol Sci*, 2015, 127 (1): 135-144.
- [19] Xu XL, Deng LL, Tang YL, et al. Cytostatic activity of sanguinarine and a cyanide derivative in human erythroleukemia cells is mediated by suppression of c-MET/MAPK signaling [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (9): 8113.
- [20] Qi XY, Chen YL, Liu S, et al. Sanguinarine inhibits melanoma invasion and migration by targeting the FAK/PI3K/AKT/mTOR signalling pathway [J]. *Pharm Biol*, 2023, 61 (1): 696-709.
- [21] Huang LJ, Lan JX, Wang JH, et al. Bioactivity and mechanism of action of sanguinarine and its derivatives in the past 10 years [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 173: 116406.
- [22] Zhang HJ, Zhang J, Venkat P, et al. Sanguinarine exhibits potent efficacy against cervical cancer cells through inhibiting the STAT3 pathway in vitro and in vivo [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 7557-7566.
- [23] Marta HW, Wioletta Z, Magdalena I, et al. The synergistic effect of piperlongumine and sanguinarine on the non-small lung cancer [J]. *Molecules*, 2020, 25 (13): 3045.
- [24] Zhu M, Gong ZY, Wu Q, et al. Sanguinarine suppresses migration and metastasis in colorectal carcinoma associated with the inversion of EMT through the Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Clin Transl Med*, 2020, 10 (1): 1-12.
- [25] Ghauri MA, Su Q, Ullah A, et al. Sanguinarine impedes metastasis and causes inversion of epithelial to mesenchymal transition in breast cancer [J]. *Phytomedicine*, 2021, 84: 153500.
- [26] Wu Y, Zhao NJ, Cao Y, et al. Sanguinarine metabolism and pharmacokinetics study in vitro and in vivo [J]. *J Vet Pharmacol Ther*, 2020, 43 (2): 208-214.
- [27] Andrew C, Graham JK, John HP, et al. Carcinogenic potential of sanguinarine, a phytochemical used in 'therapeutic' black salve and mouthwash [J]. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 2017, 774: 46-56.
- [28] Hu NX, Chen M, Liu YS, et al. Pharmacokinetics of sanguinarine, chelerythrine, and their metabolites in broiler chickens following oral and intravenous administration [J]. *J Vet Pharmacol Ther*, 2019, 42 (2): 197-206.
- [29] Zhang Y, Huang WR. Sanguinarine induces apoptosis of human lens epithelial cells by increasing reactive oxygen species via the MAPK signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19 (5): 4449-4456.
- [30] Zhang R, Wang G, Zhang PF, et al. Sanguinarine inhibits growth and invasion of gastric cancer cells via regulation of the DUSP4/ERK pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21 (6): 1117-1127.
- [31] Hwang JY, Choi YH. Sanguinarine induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells through the generation of ROS and modulation of Akt/ERK signaling pathways [J]. *J Life Sci*, 2015, 25 (9): 984-992.
- [32] Prabhu KS, Bhat AA, Siveen KS, et al. Sanguinarine medi-

- ated apoptosis in non-small cell lung cancer via generation of reactive oxygen species and suppression of JAK/STAT pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 144: 112358.
- [33] Yu YY, Luo YB, Teng WJ, et al. Mechanism of sanguinarine in inhibiting macrophages to promote metastasis and proliferation of lung cancer via modulating the lysosomes in A549 cells [J]. *Oncotargets Ther*, 2020, 13: 8989-9003.
- [34] Su Qi, Fan MY, Wang JJ, et al. Sanguinarine inhibits epithelial-mesenchymal transition via targeting HIF-1 α /TGF- β feed-forward loop in hepatocellular carcinoma [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10 (12): 939.
- [35] Park SY, Jin ML, Kim YH, et al. Sanguinarine inhibits invasiveness and the MMP-9 and COX-2 expression in TPA-induced breast cancer cells by inducing HO-1 expression [J]. *Oncol Rep*, 2014, 31 (1): 497-504.
- [36] Ansari KM, Das M. Skin tumor promotion by argemone oil/alkaloid in mice: evidence for enhanced cell proliferation, ornithine decarboxylase, cyclooxygenase-2 and activation of MAPK/NF- κ B pathway [J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 44-1 (1): 132-138.
- [37] Xu JY, Meng QH, Chong Yu, et al. Sanguinarine is a novel VEGF inhibitor involved in the suppression of angiogenesis and cell migration [J]. *Mol Clin Oncol*, 2013, 1 (2): 331-336.
- [38] Sun M, Liu CF, Nadiminty N, et al. Inhibition of STAT3 activation by sanguinarine suppresses prostate cancer cell growth and invasion [J]. *Prostate*, 2012, 72 (1): 82-89.
- [39] Qin TT, Li ZH, Li LX, et al. Sanguinarine, identified as a natural alkaloid LSD1 inhibitor, suppresses lung cancer cell growth and migration [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2022, 25 (6): 781-788.
- [40] Khan AQ, Mohamed EA, Hakeem I, et al. Sanguinarine induces apoptosis in papillary thyroid cancer cells via generation of reactive oxygen species [J]. *Molecules*, 2020, 25 (5): 1299.
- [41] Alakkal A, Thayyullathil F, Pallichankandy S, et al. Sanguinarine induces H₂O₂-dependent apoptosis and ferroptosis in human cervical cancer [J]. *Biomedicines* 2022, 10 (8): 1795.
- [42] Gong XL, Chen ZH, Han QR, et al. Sanguinarine triggers intrinsic apoptosis to suppress colorectal cancer growth through disassociation between STRAP and MELK [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18 (1): 578.
- [43] Ding QH, Zhu WN, Zhu SH, et al. Sanguinarine promotes apoptosis of hepatocellular carcinoma cells via regulating the miR-497-5p/CDK4 axis [J]. *Am J Transl Res*, 2022, 14 (12): 8539-8551.
- [44] Dong XZ, Song Y, Lu YP, et al. Sanguinarine inhibits the proliferation of BGC-823 gastric cancer cells via regulating miR-96-5p/miR-29c-3p and the MAPK/JNK signaling pathway [J]. *J Nat Med*, 2019, 73 (4): 777-788.
- [45] Zhang BL, Wang XN, Deng JC, et al. p53-dependent up-regulation of miR-16-2 by sanguinarine induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2019, 459: 50-58.
- [46] Li B, Luo YB, Fang ZH, et al. Role of sanguinarine in regulating immunosuppression in a Lewis lung cancer mouse model [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 110: 108964.
- [47] Messeha SS, Zarmouh NO, Antonie L, et al. Sanguinarine inhibition of TNF- α -induced CCL₂, IKBKE/NF- κ B/ERK1/2 signaling pathway, and cell migration in human triple-negative breast cancer cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (15): 1-22.
- [48] Su Q, Wang JJ, Fan MY, et al. Sanguinarine disrupts the colocalization and interaction of HIF-1 α with tyrosine and serine phosphorylated-STAT3 in breast cancer [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24 (6): 3756-3761.
- [49] Su Q, Wang JJ, Fan MY, et al. Sanguinarine combats hypoxia-induced activation of EphB4 and HIF-1 α pathways in breast cancer [J]. *Phytomedicine*, 2021, 84: 153503.
- [50] Pallichankandy S, Thayyullathil F, Cheratta AR, et al. Targeting oxepitosis-mediated tumor suppression: a novel approach to treat colorectal cancers by sanguinarine [J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9 (1): 94.
- [51] Han MH, Kim GY, Yoo YH, et al. Sanguinarine induces apoptosis in human colorectal cancer HCT-116 cells through ROS-mediated Egr-1 activation and mitochondrial dysfunction [J]. *Toxicol Lett*, 2013, 220 (2): 157-166.
- [52] Lin QY, Pu HD, Zhang YP, et al. Rapid identification and pharmacokinetic studies of multiple active alkaloids in rat plasma through UPLC-Q-TOF-MS and UPLC-MS/MS after the oral administration of Zanthoxylum nitidum extract [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 186: 113232.
- [53] Miao F, Yang XJ, Zhou L, et al. Structural modification of sanguinarine and chelerythrine and their antibacterial activity [J]. *Nat Prod Res*, 2011, 25 (9): 863-875.
- [54] Eversole LR, Eversole GM, Kopicik J. Sanguinaria-associated oral leukoplakia: comparison with other benign and dysplastic leukoplakic lesions [J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2000, 89 (4): 455-464.
- [55] Nitika S, Sharma B. Toxicological effects of berberine and sanguinarine [J]. *Front Mol Biosci*, 2018, 5: 21.
- [56] El-Readi MZ, Abdulkarim MA, Abdellatif AAH, et al. Doxorubicin-sanguinarine nanoparticles: formulation and evaluation of breast cancer cell apoptosis and cell cycle [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2024. doi: 10.1080/03639045.2024.2302557.
- [57] Gao L, Schmitz HJ, Merz KH, et al. Characterization of the cytotoxicity of selected chelidonium alkaloids in rat hepatocytes [J]. *Toxicol Lett*, 2019, 311 (19): 91-97.
- [58] Roya SI, Morteza M, Ader M, et al. Sanguinarine enhances cisplatin sensitivity via glutathione depletion in cisplatin-resistant ovarian cancer (A2780) cells [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2020, 95 (2): 215-223.

(收稿日期: 2024-03-18; 修回日期: 2024-04-10)

纳米金刚石载药及其抗肿瘤应用研究进展

张丹红 (吉林大学附属医院, 长春 130012)

摘要:《本草纲目》中提到金刚石主治磨水涂汤火伤。现代科学研究证明金刚石 (特别是纳米金刚石) 生物相容性良好、毒副作用小、物理化学稳定性好、硬度高、导热快、表面活性高且容易功能化等特性。纳米金刚石可以实现多种化学及核酸药物的担载, 应用于抗肿瘤药物递送等领域。文章综述了近年来基于功能化纳米金刚石的开发及其在白血病、结肠癌、肺癌、肝癌、乳腺癌、胰腺癌等疾病中的应用进展, 以期为金刚石更好地应用于临床提供新方向。

关键词: 纳米金刚石; 表面修饰; 药物递送; 肿瘤治疗

中图分类号: R94, R96 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)07-1851-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.028

Research progress in functionalized nanodiamond-related drug delivery for antitumor applications

ZHANG Dan-hong (*Jilin University Hospital, Changchun 130012*)

Abstract: In *Compendium of Materia Medica*, diamond has been mentioned for the treatment of burns and scalds. Modern medical research shows that diamond (especially nanodiamond) displays excellent biocompatibility, minimal toxicity, outstanding physical and chemical stability, superhardness, high thermal conduction, high surface activity, and easy functionalization, etc. Nanodiamonds combined with various chemical drugs and/or nucleic acid drugs are favorable for highly efficient drug delivery in antitumor treatments. This review, based on functionalized nanodiamonds, summarized the current achievements in biomedical applications for the antitumor treatment of leukemia, colon cancer, lung cancer, liver cancer, breast cancer and pancreatic cancer, etc., aiming to provide new ideas clinical practice.

Key words: nanodiamond; surface modification; drug delivery; tumor therapy

金刚石是一种由碳元素组成的物质, 具有良好的生物相容性、物理化学稳定性等特性, 正成为生物医学领域极具潜力的多功能材料之一。李时珍《本草纲目》之石部中有金刚石条目, “释名: 金刚钻。主治: 磨水涂汤火伤”, 所提出的金刚石治疗烫伤, 即利用了金刚石具有超强导热散热的特性, 迅速降低伤口的温度, 现代科学研究证明金刚石还有杀毒灭菌的作用^[1-3]。随着科学的进步, 人造金刚石规模化生产的实现, 金刚石越来越多地应用在多个生物医学领域。肿瘤是影响人类健康的重大疾病之一, 抗肿瘤治疗主要包括手术治疗、放射治疗、化学治疗、靶向治疗和免疫治疗等方式^[4]。纳米药物递送因其可以改善药物在体内的药代动力学行为, 增加药物稳定性, 实

现靶向给药和药物控释, 建立脂质体、聚合物胶束、纳米凝胶、金属/无机纳米粒子等药物递送平台, 正成为抗肿瘤治疗的研究热点^[5-7]。药物递送载体材料的选择非常重要, 要满足安全性、稳定性、靶向性、有效装载药物和可控释放性等要求^[8]。金刚石具有良好的生物相容性和物理化学稳定性, 表面碳悬键能轻易地引入氧(O)、氢(H)等各种终端, 有利于连接多种官能团, 药物容易以共价键或非共价键方式与之结合, 运输到靶细胞及靶器官, 靶向释放药物, 因此金刚石在生物医药领域的应用得到了广泛关注^[9-12]。考虑材料必须纳米化和表面修饰功能化才能进入细胞或组织, 更好地发挥体内治疗作用, 纳米金刚石(nanodiamonds, NDs), 通常指尺寸 5~10 nm

的金刚石颗粒, 具有颗粒尺寸小且粒径分布窄、比表面积大、表面易修饰、物理化学性质稳定及易跨越细胞膜等特性, 且生物安全性好, 非常适合作为高效药物递送载体。本文对近年来 NDs 表面修饰及其在抗肿瘤药物递送和治疗领域的研究进展进行综述, 以期对金刚石抗肿瘤药物研究开发提供参考。

1 NDs 表面预处理和功能性修饰方法

NDs (5 ~ 10 nm) 通常是由爆轰法制备, 因此初始粉末表面存在大量的非金刚石相 (纳米级石墨和非晶态碳等) 和各种杂质 (如金属、氮、硫等元素), 会在生物体内产生毒副作用, 因此无法直接用作载药材料, 需要在表面官能化修饰前做预处理去除。目前多采用酸煮或高温烧结工艺处理初始粉末, 去除表面非金刚石相和各种杂质^[13-14]。分散处理主要使用机械超声法、表面改性法等。机械超声法利用超声波引起的局部高温和应力变化调节溶液中 NDs 的分散; 表面改性法通常在 NDs 表面修饰 H、O、F 等功能性基团或聚合物链, 增强其与溶液的相容性, 并降低颗粒之间的吸附聚合作用, 最终使 NDs 颗粒达到较好的分散效果^[14-16]。

根据药物及肿瘤靶位的不同, NDs 表面需要先引入各种终端或官能团, 例如氧、氢、氨基、羧基、羟基、二氧化硅和聚合物等, 以共价键的形式结合在 NDs 表面, 各种药物分子与终端或官能团相互作用, 实现 NDs 的载药功能^[9-14]。NDs 还可以通过静电力、氢键和范德华力等作用实现药物吸附^[17]。

2 NDs 表面修饰载药抗肿瘤

2.1 NDs 表面羧基修饰载药

羧基是包括 NDs 在内的纳米载药体系常用的表面修饰, 多种药物都可以通过与羧基反应搭载在 NDs 上。急性髓性白血病 (AML) 代表性细胞株 HL60 肿瘤细胞通常用砒霜 (ATO) 联合全反式维 A 酸 (ATRA) 等药物治疗^[18-19], 但砒霜毒性强, ATRA 也有较大的副作用。Fan 等^[20]将生物相容性的 NDs 通过表面羧基化处理, 再通过酯化反应与 ATRA 药物结合, 利用 NDs 作为药物载体递送 ATRA, 与常规的单 ATRA 或者其他 ATRA-化疗药物作用方式相比, ND-ATRA 纳米复合物体系不仅保持了 ATRA 本身诱导分化肿瘤细胞的药物活性, 而且更有效地促进了 HL-60 肿瘤细胞凋亡, 细胞凋亡率较单独 ATRA 治疗提高了 35%, 在细胞水平上证明了 ND-ATRA 纳米复合物的有效性。可

以预期, NDs 与 ATO 联合使用时, 可以减少 ATO 和 ATRA 的用量, 增强 ATO 和 ATRA 对实体瘤治疗的作用效果。在此基础上, 通过辅助蓝光 (BL) 联合 NDs 和药物^[21], 对 HL-60 的体外细胞增殖抑制、凋亡研究发现, ND-ATRA-BL 增强了对 HL60 细胞的增殖抑制作用, 抑制率高达 75%, 是 ATRA 药物组的 4.4 倍, 高抑制率的获得可归因于高生物相容性、高载药性的 NDs 与引入蓝光的协同作用。细胞杀伤机制与蓝光光照下 ROS 水平增加, 从而诱导细胞凋亡有关, 这种通过引入光动力学治疗方法, 进一步地发挥了 NDs 和药物的作用。

表面羧基化的 NDs (ND-COOH) 搭载抗肿瘤药物阿霉素 (DOX) 的实验中, DOX 与 COOH 基团相互作用增强, 与表面未修饰 COOH 相比, 在 ND-COOH 表现出更高的药物搭载和释放效率^[22]。朱华敏等^[23]通过高温氧化法实现 NDs 表面羧基化, 对 DOX 的吸附量可达 $425 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。Wang 等^[24]以 2 mL NDs、5 mL DOX 和 0.061 mL NaOH 制备给药系统, 获得了 63.4% 的高载药率, 在酸性环境中的 DOX 释放效率达 99.9%。将 ND-COOH 和纤维素分散在 NaOH/尿素溶液中, 可制备透明纤维素纳米复合膜羧化 NDs, 用于 DOX 高效负载和释放, 细胞毒性实验证明所设计的系统具有显著的生物相容性^[25]。有研究采用超声法用 ND-COOH 搭载紫杉醇, 细胞毒性实验表明羧化 NDs 紫杉醇载药系统对 MCF-7 肿瘤细胞增殖有更强的抑制作用^[12]。

2.2 NDs 表面羟基修饰载药

羟基是 NDs 载药体系另一种常用的表面修饰官能团。口服给药是实验广泛使用和最易接受的给药途径, 而口服 DOX 由于存在胃肠道通透性差 (GIT)、P 糖蛋白外排、在肠道中停留时间短和快速水解等问题, 影响了药物治疗效果^[26]。为了解决上述问题, 研究人员尝试引入表面羟基修饰 NDs (ND-OH) 以提高 DOX 口服生物利用度和治疗效果^[27], 实验利用叶酸 (FA) - 壳聚糖寡糖偶联物 (FA-COS) 修饰 ND-OH, ND-OH 增强了不同 pH 值条件下体系的胶体稳定性, 提高了 DOX 的口服生物利用度; FA-COS 修饰延长 DOX 的保留时间, 赋予药物缓释特性, 并主动靶向肠道 FA 受体, 有效增强了 ND-OH/DOX 对 Caco-2 细胞的细胞内摄取和杀伤能力, 延长大鼠肠道滞留时间; 进一步的药代动力学研究结果表明, 与 DOX 药物相比, DOX/ND-OH 和 DOX/ND-OH/FA-COS 的血液浓度分别提高了 3.94 和 6.08 倍。

通过酯化反应将 NDs 通过乙二胺官能化, 基于迈克尔加成反应, 将亲水性和生物相容性的聚乙二醇 (PEG) 甲醚甲基丙烯酸酯 (PEGMA) 进一步偶联到 NDs 表面, 得到 ND@PEGMA 核壳型复合材料作为 DOX 载体, 细胞毒性实验表明, 修饰的 NDs 对肝癌细胞系 HepG2 具有良好的生物相容性, DOX 可从 ND@PEGMA-DOX 高效释放出来进入细胞核, 增强了其对肿瘤细胞的杀伤作用^[28]。

2.3 NDs 表面氨基修饰载药

药物载体修饰的氨基与羧基合成酰胺键, 在酸性条件下容易断裂, 实现所负载药物的可控释放。Dong 等^[29] 将 NDs 用 PEG-二胺修饰并与 FA 结合获得 ND-PEG-FA (NPF) 纳米载体, 将 DOX 连接到 NPF 纳米载体上制备药物系统 (ND-PEG-FA/DOX, NPF), 该系统能在酸性细胞外液 (pH 6.5 或 pH 5.5) 中释放大量的 DOX, 在 FA 和 FA 受体相互作用下, NPF 纳米颗粒具有肿瘤靶向能力, 且表现出缓慢和持续的药物释放特征。Beltz 等^[30] 报道了氨基修饰的 NDs 相对于羟基和羧基修饰对硫普罗宁药物具有更强的负载能力, 这是因为氨基携带正电荷更易与硫普罗宁相结合。

2.4 NDs 非共价改性载药

与上述以共价键作用的药物担载不同, 非共价改性的 NDs 通过多种相互作用来实现载药, NDs 表面官能团可诱发电荷, 并通过静电力实现对药物小分子或大分子的吸附^[31-32]。例如 PEG 修饰的 NDs 上携带负电荷, 通过静电自组装唑啉抗肿瘤药物, 可用于高效抑制和杀伤肺癌细胞^[31], 通过静电相互作用, 将带正电荷的吉非替尼 (GF) 和厄洛替尼 (EL) 药物加载到带负电荷的 PEG 修饰 NDs 上, 在 GF 和 EL 浓度分别为 50 nmol · L⁻¹ 和 100 nmol · L⁻¹ 时, 自组装的 NDs 偶联物治疗使 A549、NCI-H460 和 NCI-H1975 等肺癌细胞的存活率下降了 30% ~ 50%, 证明 NDs 偶联物对克服肺癌细胞的化疗耐药性起到了重要的作用。

Bertrand 等^[32] 报道了氢化 NDs (ND-H) 通过静电作用吸附带负电的 siRNA, 并在肿瘤细胞中递送。ND-H 分散在水中, 形成稳定的悬浮液, Zeta 电位为 + 50 mV, 有利于与核酸通过静电作用组装 ND-H/siRNA 复合物, 可有效地将促进靶向 *EWS/FLI-1* 基因沉默的 siRNA 递送到人 Ewing 肉瘤细胞系中, 成功实现对靶基因 *EWS/FLI-1* 基因表达水平的抑制。因此, NDs 在抗肿瘤基因治

疗中是一种很有前景的递送载体。

2.5 NDs 聚合物涂层和封装载药

开发具有较好水分散性的药物及载药系统是提高抗肿瘤药物药效的重要方法之一, 可将亲水聚合物对 NDs 表面改性, 提高载药及释放效果。Huang 等^[33] 基于 β -环糊精 (β -CD) 与 ND 之间的主体-客体相互作用, 通过超分子化学方法合成了含有高水分散性的超支化聚丙三醇 (HPG) 官能化复合材料 (ND- β -CD-HPG), 结果表明, ND- β -CD-HPG 复合材料具有优异的水分散性、低毒、高载药量和可控的药物释放行为, DOX 可高效吸附在 ND- β -CD-HPG 复合材料上, 通过 pH 响应性释放, 实现靶向给药。

基于甘氨酸修饰的阿霉素 (GLY-DOX) 与 PEG 修饰的 NDs (ND-PEG) 的复合, Wei 等^[34] 设计了一种对 pH 具有响应性的药物递送系统 (ND-PEG-GLY-DOX, NPGD), 体外实验证实, 在生理条件下 NPGD 具有更高的药物稳定性, 当 NPGD 被肿瘤细胞摄取时, 由于溶酶体的 pH 值低, 酯键的裂解导致荧光和细胞毒性发生, 可提高化疗效果; 体内研究表明, NPGD 的疗效比使用游离 DOX 时增强; 血液生化指标和组织学检查证实了 NPGD 具有良好的生物相容性。这种共价耦联药物和控制药物释放的策略赋予了 NPGD 系统治疗及诊断能力, 拓宽了 NDs 表面功能设计在生物医学的应用。

NDs 表面修饰 PEG 并加载 DOX 药物 (ND-PEG-DOX), 可用于胰腺导管腺癌 (PDAC) 治疗^[35], 与单独使用 DOX 药物相比, 设计的 ND-PEG-DOX 在原位胰腺异种移植模型中治疗效果显著增强, 在 PDAC 的 3D 肿瘤球状体模型中进行比较实验, ND-PEG-DOX 具有更强的肿瘤杀伤能力, 同时体内给药后主要器官没有明显器质性病变, 安全性良好。

封装载药是近年来发展的新型高效载药治疗技术。介孔有机硅 (PMO) 纳米颗粒具有高密度纳米孔洞、大比表面积, 同时载药能力高、生物相容性好, 可递送药物在血液中中长期循环^[36]。Jimenez 等^[37] 利用介孔二氧化硅纳米颗粒封装 NDs (NDs-PMO), 在 NDs-PMO 上加载抗肿瘤药物 DOX, 表现出对 pH 敏感的释放行为, 并且与 TPE-PDT (双光子激发的光动力治疗) 结合使用时, 能够在非常低浓度 DOX 条件下, 促使 MCF-7 癌细胞死亡。

综上, 研究人员从多体系证明, NDs 及其针

对性表面功能化, 结合载药、光动力治疗学等方面起到重要作用, 详见表 1。
法可在多种肿瘤的增殖抑制、促凋亡和自噬等方

表 1 纳米金刚石表面修饰载药及抗肿瘤应用

Tab 1 Functionalized nanodiamond-related drug delivery and corresponding antitumor applications

ND 表面修饰	载药	肿瘤	肿瘤细胞	文献
羧基修饰	ATRA、ATO、DOX、紫杉醇	白血病、肝癌、乳腺癌、宫颈癌	HL-60, HepG2, MCF-7, HeLa	[12, 20-25]
羟基修饰	DOX	结肠癌、肝癌	Caco-2, HepG2	[27-28]
氨基修饰	DOX、硫普罗宁	肝癌、乳腺癌	HepG2, MDA-MB-231	[29-30]
非共价改性	GF、EL、siRNA、表柔比星	肺癌、肝癌、尤因肉瘤	A549, NCI-H460, NCI-H1975, LT2-MYC, Ewing	[31-32]
聚合物涂层、封装	DOX	肺癌、胰腺导管腺癌、乳腺癌	A549, PANC-1, BxPC3, MCF-7	[33-35, 37]

3 结语

随着科技的进步, 天然及人工合成的金刚石已经从传统医学仅限于治疗烧伤、烫伤的简单应用拓展到药物传递及肿瘤治疗等众多领域。

考虑到完全由碳材料组成的 NDs 与人体组织具有良好的生物相容性及生物安全性, 金刚石表面修饰多样性、与药物高效结合、可控响应释放等优势具有重要的应用价值, NDs 相关的载药和抗肿瘤治疗的临床试验已快速开展, 为未来的临床转化积累了数据。值得指出的是, 金刚石具有高物理化学稳定性, NDs 在体内不能降解, 尽管可部分通过体液代谢, 仍可能存在潜在的副作用, 需要在动物体内开展系统、全面的论证, 进行安全性评估, 为实际临床应用提供依据。总之, NDs 载药及其抗肿瘤研究是一个快速发展的领域, 已经显示出良好的应用价值, 随着研究的深入, NDs 将为临床抗肿瘤治疗提供新的方案, 发挥优于其他载药系统的重要作用。

参考文献

[1] Mitura K, Kornacka J, Niemiec-Cyganek A, et al. The influence of diamond nanoparticles on fibroblast cell line L929, cytotoxicity and bacteriostaticity of selected pathogens [J]. *Coatings*, 2022, 12 (2): 280.

[2] Basiuk EV, Monroy-Torres B, Carrero JC, et al. Effects of solvent-free amine functionalization of graphene oxide and nanodiamond on bacterial growth [J]. *Fuller Nanotub Car N*, 2021, 29 (1): 58-66.

[3] Rifai A, Tran N, Reineck P, et al. Engineering the interface: nanodiamond coating on 3D-printed titanium promotes mammalian cell growth and inhibits staphylococcus aureus colonization [J]. *ACS Appl Mater Inter*, 2019, 11 (27): 24588-24597.

[4] Miller KD, Nogueira L, Devasia T, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2022 [J]. *Ca-Cancer J Clin*, 2022, 72 (5): 409-436.

[5] Gavas S, Quazi S, Karpinski TM. Nanoparticles for can-

cer therapy: current progress and challenges [J]. *Nanoscale Res Lett*, 2021, 16 (1): 173.

[6] Scheerstra JF, Wauters AC, Tel J, et al. Polymersomes as a potential platform for cancer immunotherapy [J]. *Mater Today Adv*, 2022, 13: 100203.

[7] Yang EY, Shah K. Nanobodies: next generation of cancer diagnostics and therapeutics [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 1182.

[8] Thakor AS, Gambhir SS. Nanooncology: the future of cancer diagnosis and therapy [J]. *Ca-Cancer J Clin*, 2013, 63 (6): 395-418.

[9] Ollia MBA, Donnelly PS, Hollenberg LCL, et al. Advances in the surface functionalization of nanodiamonds for biological applications: a review [J]. *ACS Appl Nano Mater*, 2021, 4 (10): 9985-10005.

[10] Wang XY, Sang DD, Zou LR, et al. Multiple bioimaging applications based on the excellent properties of nanodiamond: a review [J]. *Molecules*, 2023, 28 (10): 4063.

[11] Chauhan S, Jain N, Nagaich U. Nanodiamonds with powerful ability for drug delivery and biomedical applications: recent updates on in vivo study and patents [J]. *J Pharm Anal*, 2020, 10 (1): 1-12.

[12] 李东阳, 刘丹丹, 陈霁璇, 等. 紫杉醇纳米金刚石递药系统的构建及其体外评价 [J]. *中南药学*, 2019, 17 (7): 988-992.

[13] Pedroso-Santana S, Sarabia-Sainz A, Fleitas-Salazar N, et al. Deagglomeration and characterization of detonation nanodiamonds for biomedical applications [J]. *J Appl Biomed*, 2017, 15 (1): 15-21.

[14] Mochalin VN, Shenderova O, Ho D, et al. The properties and applications of nanodiamonds [J]. *Nat Nanotechnol*, 2012, 7 (1): 11-23.

[15] 苗卫朋, 丁玉龙, 翟黎鹏, 等. 爆炸法合成纳米金刚石的分散技术研究进展 [J]. *金刚石与磨料磨具工程*, 2019, 39 (1): 18-22.

[16] Pan F, Khan M, Ragab AH, et al. Recent advances in the structure and biomedical applications of nanodiamonds and their future perspectives [J]. *Mater Design*, 2023, 233: 112179.

[17] Kong XL, Huang LCL, Hsu CM, et al. High-affinity

- capture of proteins by diamond nanoparticles for mass spectrometric analysis [J]. *Anal Chem*, 2005, 77: 259-265.
- [18] Wang ZY, Mi JQ, Li JM. How all-trans retinoic acid (ATRA) was discovered and its use in the treatment of acute promyelocytic leukaemia (APL) [J]. *B Acad Nat Med Paris*, 2023, 207 (4): 402-407.
- [19] 王卫东, 何小花, 杨庆敏, 等. 治疗急性髓系白血病的中药活性成分研究进展 [J]. *时珍国医国药*, 2021, 32 (6): 1444-1449.
- [20] Fan FY, Liu JS, Li HD. Combining nanodiamond and all trans retinoic acid to increase the apoptosis of HL-60 cell [J]. *Mater Lett*, 2014, 133: 262-265.
- [21] Zhuang JJ, Liu JS, Liu YG, et al. Enhanced proliferation inhibition of HL60 cells treated by synergistic all-trans retinoic acid/blue light/nanodiamonds [J]. *RSC Adv*, 2017, 7 (62): 38895-38901.
- [22] Astuti Y, Saputra FD, Wuning S, et al. Enrichment of nanodiamond surfaces with carboxyl groups for doxorubicin loading and release [J]. *IOP Conf Ser: Mater Sci Eng*, 2017, 172: 012066.
- [23] 朱华敏, 许向阳, 邵诗宇, 等. 阿霉素在羧基化纳米金刚石表面的负载与释放性能研究 [J]. *矿冶工程*, 2019, 39 (4): 131-135.
- [24] Wang P, Su WQ, Ding XT. Control of nanodiamond-doxorubicin drug loading and elution through optimized compositions and release environments [J]. *Diam Relat Mater*, 2018, 88: 43-50.
- [25] Li L, Tian L, Zhao WJ, et al. Acetate ions enhance load and stability of doxorubicin onto PEGylated nanodiamond for selective tumor intracellular controlled release and therapy [J]. *Integr Biol-UK*, 2016, 8 (9): 956-967.
- [26] Chen C, Lu L, Yan SC, et al. Autophagy and doxorubicin resistance in cancer [J]. *Anti-Cancer Drug*, 2018, 29 (1): 1-9.
- [27] Liu DD, Su YP, Chen JX, et al. Folic acid-chitosan oligosaccharide conjugates decorated nanodiamond as potential carriers for the oral delivery of doxorubicin [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2023, 24 (4): 86.
- [28] Yang G, Long W, Yan WF, et al. Surface PEGylation of nanodiamond through a facile Michael addition reaction for intracellular drug delivery [J]. *J Drug Deliv Sci Tech*, 2020, 57: 101644.
- [29] Dong Y, Cao RX, Li YQ, et al. Folate-conjugated nanodiamond for tumor-targeted drug delivery [J]. *RSC Adv*, 2015, 5 (101): 82711-82716.
- [30] Beltz J, Pfaff A, Abdullahi IM, et al. Effect of nanodiamond surface chemistry on adsorption and release of tiopronin [J]. *Diam Relat Mater*, 2019, 100: 107590.
- [31] Lam ATN, Yoon JH, Ly NH, et al. Electrostatically self-assembled quinazoline-based anticancer drugs on negatively-charged nanodiamonds for overcoming the chemoresistances in lung cancer cells [J]. *Biochip J*, 2018, 12 (2): 163-171.
- [32] Bertrand JR, Pioche-Durieu C, Ayala J, et al. Plasma hydrogenated cationic detonation nanodiamonds efficiently deliver to human cells in culture functional siRNA targeting the Ewing sarcoma junction oncogene [J]. *Biomaterials*, 2015, 45: 93-98.
- [33] Huang HY, Liu MY, Jiang RM, et al. Facile modification of nanodiamonds with hyperbranched polymers based on supramolecular chemistry and their potential for drug delivery [J]. *J Colloid Interf Sci*, 2018, 513: 198-204.
- [34] Wei SG, Li L, Du XB, et al. OFF-ON nanodiamond drug platform for targeted cancer imaging and therapy [J]. *J Mater Chem B*, 2019, 7 (21): 3390-3402.
- [35] Madamsetty VS, Sharma A, Toma M, et al. Tumor selective uptake of drug-nanodiamond complexes improves therapeutic outcome in pancreatic cancer [J]. *Nanomed-Nanotechnol*, 2019, 18: 112-121.
- [36] Poscher V, Salinas Y. Trends in degradable mesoporous organosilica-based nanomaterials for controlling drug delivery: a mini review [J]. *Materials*, 2020, 13 (17): 3668.
- [37] Jimenez CM, Knezevic NZ, Rubio YG, et al. Nanodiamond-PMO for two-photon PDT and drug delivery [J]. *J Mater Chem B*, 2016, 4 (35): 5803-5808.

(收稿日期: 2023-10-04; 修回日期: 2023-12-05)

不同金属组成的层状双氢氧化物在医药领域的应用进展

耿革霞¹, 李丽平¹, 王瑶瑶¹, 刘颖^{2*} (1. 河北省药品职业化检查员总队, 石家庄 050000; 2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100176)

摘要: 层状双氢氧化物是由带正电的金属离子氢氧化物层和插层阴离子组成的具有二维层状结构的纳米材料, 广泛用于环境治理等领域。由于制备简便、组成灵活性高、药物装载率高、pH 响应型释放、生物相容性和安全性良好等特点, 层状双氢氧化物逐渐在抗肿瘤治疗中崭露头角。本文综述了不同金属离子组成的层状双氢氧化物在生物医药领域中的应用进展, 并对其在生物医药领域应用的进一步拓宽以及临床转化中存在的挑战进行讨论, 以期对层状双氢氧化物递药系统的开发与转化提供参考。

关键词: 层状双氢氧化物; 金属组成; 协同治疗; 磁共振成像; 肿瘤诊疗

中图分类号: R94

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)07-1856-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.029

Biomedical applications of layered double hydroxides delivery system with different metal compositions

GENG Ge-xia¹, LI Li-ping¹, WANG Yao-yao¹, LIU Ying^{2*} (1. Hebei Province Pharmaceutical Professional Inspector CORPS, Shijiazhuang 050000; 2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176)

Abstract: Layered double hydroxide is a two-dimensional layered nanomaterial composed of positively charged metal ion hydroxide layer and intercalated anion, which is widely used in environmental treatment and other fields. Owing to simple preparation, high flexibility of composition, high drug loading rate, pH responsive release, good biocompatibility and safety, layered double hydroxides have gradually been used in anti-tumor therapy. This paper reviewed the application of layered double hydroxides composed of different metal ions in biomedicine fields and discussed further application and possible challenges in clinical conversion, hoping to provide reference for the development of layered double hydroxides drug delivery system.

Key words: layered double hydroxide; metal composition; synergistic therapy; magnetic resonance imaging; tumor diagnosis and treatment

层状双氢氧化物 (layered double hydroxides, LDH) 是由过渡金属离子的六羟基配合物形成的带正电的氢氧化物层与插层阴离子通过静电作用形成的水镁石 [Mg(OH)₂] 样二维层状纳米材料, 可以由数层组成的纳米粒 (nanoparticles), 也可剥脱成几层或单层, 称为纳米片 (nanosheets)^[1]。LDH 的化学通式可表示为 M_{1-x}²⁺M_x³⁺(OH)₂^{x+}[Aⁿ⁻]_{v/n}·mH₂O, 其中 M²⁺/M³⁺ 为二价/三价金属离子, 如 Mg²⁺/Al³⁺, M³⁺ 同构取代 M²⁺ 产生正

电荷, 摩尔比通常为 2~4 (见图 1), 可交换的插层阴离子 Aⁿ⁻ 提供负电荷补偿。金属阳离子的种类和比例以及插层阴离子的种类均具有广泛的可调节性^[2], 由此形成具有各种理化学特性的 LDH 纳米结构。天然水镁石矿物最早于 1842 年在岩层中发现。1942 年, 实现了镁-铝层状双氢氧化物 (MgAl-LDH) 的人工合成并提出了层状结构模型^[3]。而后, 该材料广泛应用于环境治理、反应催化以及能量储存和转化等领域^[2]。

基金项目: 中国食品药品检定研究院关键技术研究基金 (No. GJJS-2022-9-1)。

作者简介: 耿革霞, 男, 硕士研究生, 主要从事药物质量控制研究, email: genggexia@126.com * 通信作者: 刘颖, 女, 研究员, 博士, 主要从事药物代谢动力学和药物质量控制研究, email: liuying@nifdc.org.cn

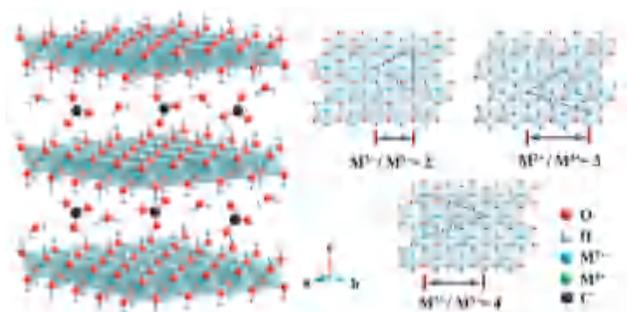


图 1 不同二价金属离子/三价金属离子摩尔比的 LDHs 的理想结构^[2]
Fig 1 Idealized structure of LDHs with different M^{2+}/M^{3+} molar ratios^[2]

LDH 制备工艺成熟，操作简便、成本低廉、易于放大生产，如共沉淀法、水热合成法和离子交换法等。LDH 的高比表面积 ($100 \sim 600 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) 和柔性层间通道便于药物的装载，荷正电的表面可吸附负电性的蛋白或多肽，还能与带负电的细胞膜表面作用，促进摄取；小分子化合物、核酸及荧光素等则通过阴离子交换机制插入层间通道，避免体内生物酶等引起过早的药物降解和清除，改善药物的体内疗效^[4]。 M^{3+} 取代比例的升高有利于目标分子的包载^[2]。作为碱性氢氧化物，一方面，LDH 进入体内后响应弱酸性的肿瘤微环境 (pH 6.8 左右) 发生裂解，实现目标药物在病灶部位的选择性持续释放；另一方面，LDH 通过网格蛋白介导的内吞作用进入细胞后，在酸性更强 (pH 6.0) 的早期内含体中发生解离，释放的金属离子导致囊泡内渗透压升高，驱动胞质中的大量水分子进入内含体，导致其膨胀爆裂，将未解离的载药 LDH 释放到胞质中，实现溶酶体逃逸^[5]，释放到胞质中的药物可更好地发挥作用^[6]。当 LDH 用作肿瘤疫苗载体时，从内含体逃逸的肿瘤抗原能经组织相容性复合物 I (major histocompatibility complex, MHC I) 交叉呈递，激活细胞毒性 T 细胞，引起强效的肿瘤杀伤免疫反应^[7-8]。无论是作为载体还是辅助治疗的活性成分，具备良好的安全性都是制剂开发的先决条件。LDH 能依赖酸敏感降解从体内清除，表现出较高的生物相容性和安全性，如小鼠静脉注射和腹腔注射 100 nm 的 MgAl-LDH 的安全剂量阈值分别为 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，皮下注射的安全剂量更高，且临床前研究中未观察到明显的局部组织病变或炎症因子的异常变化^[9]，不同化学组成的 LDH 略有差别^[10]。

基于上述优势，LDH 递药系统成为了肿瘤治疗领域炙手可热的新星^[11]。1999 年，LDH 作为载体首次用于 DNA 递送^[12]。2004 年，MgAl-LDH

首次作为递药系统装载甲氨蝶呤 (MTX) 用于肿瘤化疗^[12]。2011 年，MgAl-LDH 装载的 DNA 疫苗用于肿瘤免疫治疗^[10]。但 LDH 在医药领域的应用并不拘泥于递送载体，金属离子组成和比例的变化赋予该材料更多样的功能，如 MgAl-LDH 的组织再生功能，钆层状双氢氧化物 (Gd-LDH) 的磁共振成像 (MIR) 功能、铁层状双氢氧化物 (Fe-LDH) 催化的芬顿反应用于化学动力学治疗等 (见图 2)。

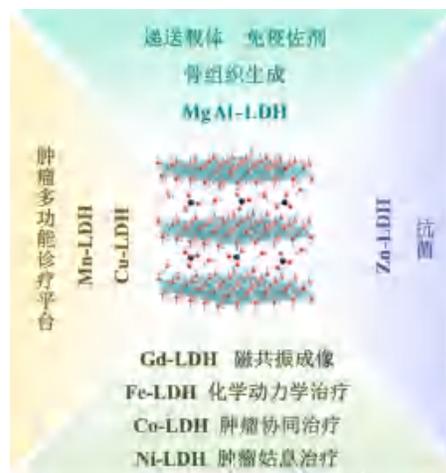


图 2 不同金属组成的 LDHs 的应用分类

Fig 2 Classification of LDHs delivery system with different metal compositions

本文将立足于不同金属离子赋予 LDH 的独特功能和应用，重点介绍 LDH 中不同金属离子如何支持 LDH 在生物医药领域发挥作用及最新的应用进展。包括经典 MgAl-LDH，含顺磁性或铁磁性金属的 Gd-LDH、Fe-LDH、钴层状双氢氧化物 (Co-LDH) 和镍层状双氢氧化物 (Ni-LDH)，用作多功能诊疗平台的锰层状双氢氧化物 (Mn-LDH) 和铜层状双氢氧化物 (Cu-LDH) 以及用作抗菌的锌层状双氢氧化物 (Zn-LDH)。还对 LDH 的临床转化和在生物医药领域应用的进一步拓宽进行了分析和展望，以期为相关研究提供参考。

1 MgAl-LDH 在生物医药中的应用

生物医药领域中开发最早，应用最广的 LDH 金属离子组成为 Mg^{2+} 和 Al^{3+} 。MgAl-LDH 不仅能作为载体将化疗药物、核酸、荧光染料及光敏剂等递送到病灶部位用于化疗、基因治疗、成像和光热治疗 (photothermal therapy, PTT) / 光动力学治疗 (photodynamic therapy, PDT)，还能作为免疫佐剂重塑肿瘤免疫抑制微环境，促进抗肿瘤免疫响应向 Th1 极化。此外， Mg^{2+} 还赋予 LDH 促成骨分化和促血管生成特性，用于骨生成等组织工程。

1.1 MgAl-LDH 用作递送载体 (见表 1)

抗肿瘤化合物 MTX 是 MgAl-LDH 作为生物相容性载体递送的首个药物, MgAl-LDH 显著改善了 MTX 的细胞摄取和递送效率, 在体外细胞毒实验中表现出显著强于 MTX 的肿瘤细胞生长抑制作用。超薄的 2D MgAl-LDH 纳米片能为药物装载提供大量锚定位点, 1 mg 该制剂能装载高达 7.34 mg 的化疗药物阿霉素 (doxorubicin, DOX), 且依然能维持良好的胶体稳定性^[6]。通过共沉淀法制备的装载鬼臼毒素 (podophyllotoxin, PPT) 的 MgAl-LDH 粒径为 80 ~ 90 nm, Zeta 电位为 20.3 mV, 相比 PPT 溶液其分布半衰期 ($t_{1/2\alpha}$) 和消除半衰期 ($t_{1/2\beta}$) 都延长了一倍多, 药物的持续释放和延缓消除使载 PPT 的 LDH 疗效更佳, 且多次腹腔注射给药未引起体重下降, 证实了其良好的安全

性^[14]。用作核酸递送的 MgAl-LDH 通常粒径较小, 如 20 nm 或 45 nm, LDH 不仅能保护插入层间的 DNA/RNA 免受核酸酶的降解, 还能通过溶酶体逃逸进入胞质将核酸在细胞核富集, 促进其转染或基因沉默^[17-18]。此外, MgAl-LDH 与光敏剂吲哚菁绿 (indocyanine green, ICG) 间的超分子相互作用, 使 ICG 在 LDH 的层间通道以单体形式存在, 提高其光热转化效率^[20]。其他纳米材料, 如金纳米簇 (gold nanoclusters, Au NCs), 超小 Fe₃O₄ 纳米粒等, 也可装载于 LDH 满足体内递送所需的浓度和稳定性要求, 或是与化学药物或基因共载实现诊疗一体化。其他金属离子组成的 LDH 也可作为递送载体用于以上物质的装载和向病灶部位的递送, 只是装载能力略有不同。

表 1 MgAl-LDH 作为载体的应用
Tab 1 Applications of MgAl-LDH as carriers

活性分子	装载于 LDH 的优势	应用	参考文献
MTX	作为生物相容性载体改善 MTX 递送效率	化疗	[13]
PPT	延长循环时间、增加生物利用度	化疗	[14]
DOX	增强肿瘤细胞摄取; 超高的载药量、良好的胶体稳定性及延长的血液循环	化疗	[6, 15]
KRASG12D 靶向核酸	有效的核内转运且细胞毒性最小化	基因治疗	[16]
Survivin siRNA	在肿瘤组织的高选择性蓄积	基因治疗	[17]
大马哈鱼精 DNA	改善基因递送效率	基因转染	[18]
香豆素 6 (C6)	提高溶解性	PDT	[19]
ICG	ICG 在 LDH 通道中为单体状态, 极大地提高其光热转化效率	PTT	[20]
Au NCs	金纳米簇的受激电子被限定, 从而大大提高量子产率并延长荧光半衰期 (~ 7 倍)	生物成像	[21]
超小氧化铁 (Fe ₃ O ₄) 纳米粒	稳定功能化的纳米粒	磁共振成像引导的化疗	[22]

1.2 MgAl-LDH 用作免疫佐剂

治疗性肿瘤疫苗通过外源性地递送抗原和佐剂来激活树突状细胞 (dendritic cells, DCs), 以诱导肿瘤消退、消除微小病灶并建立持续的抗肿瘤记忆^[23]。佐剂加入疫苗中用于增强和调节抗原免疫原性的物质, 常用于亚单位疫苗中, 分为富集并释放抗原的递送系统和直接激活固有免疫细胞的增强剂两种^[24]。MgAl-LDH 能作为递送系统携带一种或多种抗原及改善免疫抑制微环境的 siRNA, 实现向免疫细胞 DCs 的有效递送, 激活机体免疫系统上调肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-12 (IL-12) 等细胞因子以及 CD86、CD40 等共刺激因子的表达, 并增加细胞核中核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 的表达^[25], 其免疫激活行为具有 LDH 剂量依赖性。MgAl-LDH (1 : 1) 能与 DNA 有效结合形成粒径 80 ~ 120 nm

的 LDH/DNA 复合物。C57BL/6 小鼠通过皮内注射接种该疫苗后, 相比等量的 DNA 溶液, 能诱导更强的细胞免疫和体液免疫。LDH 与 Toll 样受体 9 (Toll-like receptor 9, TLR9) 配体含胞嘧啶-鸟嘌呤二核苷酸的寡脱氧核苷酸 (CpG oligonucleotide, CpG ODN) 联合还能促进免疫反应从 Th2 向 Th1 极化^[10]。相比 FDA 批准的铝佐剂 Alum 和 Quil A, LDH 在促进记忆 T 细胞增殖上更胜一筹。而且 LDH 诱导的强效佐剂效应能在小鼠模型中持续数月, 显著抑制肿瘤细胞生长^[26], 还不会引起动物器官的组织学病变。

LDH-抗原复合物皮下注射后能在组织中形成松散的聚集, 持续招募免疫细胞。瘤周注射弱碱性的 LDH, 其不仅能通过中和肿瘤周围过量的酸促进肿瘤相关巨噬细胞的增殖和 M1 型极化重塑免疫抑制的肿瘤微环境, 还能阻断肿瘤细胞自

噬通路, 促使其凋亡和肿瘤抗原释放^[7], 诱导强效的抗原特异性抗肿瘤免疫反应。LDH 纳米粒和 LDH 纳米片作为佐剂, 诱导的免疫反应强度差别不大^[27], 金属离子的比例及反离子的种类对免疫反应有一定的影响^[28]。

1.3 MgAl-LDH 在骨组织生成中的应用

由于生物可降解性和适宜的机械特性, 镁及其合金生物材料在骨植入物开发中广受关注。但过快的降解严重影响其机械完整性并造成氢气积聚。使用水热法在镁合金上包被 MgAl-LDH 涂层, 能在体内外增强镁合金的亲水性、耐蚀性和生物相容性^[29], 且体外实验中发现其能促进小鼠成骨细胞系的成骨分化和血管生成^[30]。通过调节骨植入物表面的碱度能提高生物材料的抗菌和成骨能力, 在其表面制备适宜碱度的 LDH 薄膜, 能通过抑制三磷酸腺苷 (ATP) 合成和诱导氧化应激, 有效抑制革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的生长, 还能促进骨间充质干细胞的成骨分化, 增强成骨细胞的增殖和碱性磷酸酶活性^[31]。LL37 是抗菌肽家族成员之一, 在各种细胞中表达。LL37 修饰的 LDH/壳聚糖复合物可用于软骨下骨生成, 其仿生层状结构为新骨组织和血管生成提供新的平台, 在体外能吸引间充质干细胞并促进血管生成^[32]。在骨组织工程中, LDH 能与羟基磷灰石和明胶共同制备多孔可生物降解支架, 在兔子体内表现出较好的骨再生诱导能力^[33]。装载 miRNA 的 LDH 纳米粒插入胶原-纳米羟基磷灰石支架后将 miRNA 递送至间充质基质细胞中并过表达, 可用作再生医学基因治疗的递送平台^[34]。

2 含顺磁性或铁磁性金属离子的 LDH 的应用

顺磁性物质置于外部磁场中会被其磁化并产生相同的附加磁场, 铁磁性物质产生的附加磁场则更为强烈。自然界中能在室温下被磁化的四种金属分别为 Gd、Fe、Co 和 Ni。

2.1 Gd-LDH 用于磁共振成像

镧系金属元素 Gd 位于第六周期第 III B 族, 外围电子排布为 $4f^7 5d^1 6s^2$, 常见价态为 +2、+3。Gd³⁺ 的 5d 和 6s 亚层的电子用于成键, 4f 亚层存在 7 个自旋方向相同的不成对电子。电子的自旋量子数与质子一致, 但体积却小得多, 因此磁旋比是质子的数百倍, Gd 也因此获得很强的顺磁性, 其复合物二乙三胺五醋酸钆 (gadolinium-diethylenetriamine pentaacetic acid, Gd-DTPA) 是临床应用最广泛的 MRI 造影剂 (contrast agent, CA)。Gd-DTPA 在组织中的出现使质子-电子之间的偶极子相互作用取

代原本引起组织 T₁、T₂ 弛豫的质子间偶极子相互作用, 在局部引起磁场的巨大波动, 导致 T₁、T₂ 弛豫时间缩短即质子弛豫增强。低浓度的 Gd-DTPA 对弛豫时间较长的 T₁ 弛豫影响较大, 引起 T₁ 权重的组织信号增强。T₁ 权重弛豫率 (r₁) 是 MRI 特性评估的关键参数^[35], 弛豫率越高, 则产生的组织信号增强越显著, 成像所需的造影剂剂量越少, Gd-DTPA 的 r₁ 值为 $3.5 \text{ mmol} \cdot \text{s}^{-1}$ 。在 MgAl-LDH 主体层中引入 5% (m%) Gd³⁺, r₁ 值能达到 $7.93 \text{ mmol} \cdot \text{s}^{-1}$, 是 Gd-DTPA 的 2 倍多, 因此 Gd 掺杂的 LDH 是性能良好的 CA, 其体内成像具有高渗透性和高空间分辨率。Cd-LDH 共载化疗药物如 DOX、SN-38、绿原酸和 / 或光敏剂如 ICG、Ce6、荧光物质如异硫氰酸荧光素 (FITC) 以及其他纳米粒子如 Au NCs 后作为诊疗一体化平台, 能实现非侵入性的近红外或荧光和 MRI 双模成像引导的肿瘤化疗和 PTT 或 PDT 协同治疗。静脉注射后, Gd-LDH 的 T₁ 权重磁共振信号在肿瘤部位逐渐增强, 与体内近红外信号一致。而且, Gd-LDH 对化疗药物的装载率非常高, 其中, DOX 的药物装载能力高达 797.36% (DOX/LDH, m/m), 封装率为 99.67%; 对 SN-38 的装载能力为 925% (SN-38/LDH, m/m)。Gd-LDH 的吸电子效应使 Au NCs 的荧光量子产率从 3.1% 增加到 18.5%。用于 PDT 的 Ce6 装载于 Gd-LDH 后, 活性氧 (ROS) 的生成也增强了 11.7 倍。

2.2 Fe-LDH 用于肿瘤化学动力学治疗

过渡金属元素铁 (ferrum, Fe) 位于第四周期第 VIII 族, 外围电子排布为 $3d^6 4s^2$, 常见价态为 +2、+3。Fe²⁺ 催化 H₂O₂ 生成羟基自由基 (·OH) 的反应称为芬顿反应。通过芬顿或芬顿样反应将低反应性的 H₂O₂ 转化为杀伤能力最强的活性氧物质羟基自由基 (·OH) 来诱导胞内氧化应激, 损坏生物分子如脂质、蛋白质和 DNA 来杀死肿瘤细胞的治疗称为化学动力学治疗 (chemodynamic therapy, CDT)。肿瘤细胞快速代谢以及乳酸堆积会产生弱酸性的肿瘤微环境, Fe-LDH 能响应弱酸性的 pH, 释放 Fe²⁺/Fe³⁺, 通过芬顿反应催化肿瘤微环境中高水平的 H₂O₂ 生成 ·OH, 导致肿瘤细胞死亡。相比于其他的癌症治疗方式如化疗、放疗、PDT 等, CDT 在弱酸性环境下激活且以内源性的 H₂O₂ 为底物, 具有高度的选择性^[13]。聚乙二醇 (PEG) 修饰的含 Fe²⁺ 的 LDH 单层纳米片 (PEG/Fe-LDH) 厚度为 2.4 nm, 粒径为 189 nm, 具有很高的芬顿反应催化效率, Michaelis-Menten 常数 K_m 为 0.09×10^{-3}

M, 最大反应速度 V_{\max} 为 $1.76 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。瘤内注射 PEG/Fe-LDH, 肿瘤抑制率达到 59%^[13]。但肿瘤微环境中过表达的谷胱甘肽 (GSH) 会清除 $\cdot\text{OH}$, 降低 CDT 的疗效。聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 修饰的 CoFeMn-LDH, 通过 $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ 和 Co^{2+} 催化芬顿和芬顿样反应, $\text{Mn}^{4+}/\text{Mn}^{3+}$ 则通过氧化还原反应降低 GSH 水平, LDH 的光热转化产生的热量进一步促进 CDT, 从而改善 CDT 疗效, 实现与 PTT 的协同治疗。通过在 CoFe-LDH 中装载天然葡萄糖氧化酶 (GOD) 将肿瘤微环境中的葡萄糖转化为 H_2O_2 , 持续供应底物也能提高 CDT 效率^[36]。此外, Fe-LDH 的二维结构产生的高催化活性, 使其能够产生向高 H_2O_2 梯度长距离移动的趋化特性, 实现药物的定向递送^[37]。而 Fe^{3+} 还可以将 H_2O_2 分解为氧气 (O_2) 缓解肿瘤缺氧, 因此 Fe-LDH 作为光热载体装载光敏剂后可增强氧气依赖的 PDT, 实现 PTT/PDT 或 PTT/PDT/CDT 的协同治疗^[38]。

2.3 Co-LDH 用于肿瘤协同治疗

过渡金属元素 Co 位于第四周期第 VIII 族, 外围电子排布为 $3d^74s^2$, 常见价态为 +2、+3。像 Fe^{2+} 一样, Co^{2+} 也能催化类芬顿反应用于 CDT。装载光敏剂 Ce6 的 CoMn-LDH 中, Mn 分解 H_2O_2 生成 O_2 促进 PDT, 同时消耗 GSH 与 CDT 产生协同效应^[39]。CoFe-LDH 纳米片中 Co^{2+} 空缺会改变其电子结构, 缩小带隙, 提高非辐射复合率, 从而改善近红外驱动的光热效应。在 808 nm 近红外光照射下, 随着 Co^{2+} 空缺含量升高, CoFe-LDH 纳米片产生的光热性能增强。体内外实验表明该材料可用于 PPT、近红外热成像、MRI 和光声成像。基于 Co-LDH 前体通过拓扑结构转换制备的过渡金属二硫化物 CoFe-硒化物具有超高的光热转化效率 (74.5%), 在体内外都表现出诱导肿瘤细胞的凋亡和肿瘤消融^[40]。此外, Co^{2+} 空缺还能使 Co-LDH 用于 PDT。富含空缺的 CoMo-LDH 纳米片在 NIR-III (1567 nm) 激光照射下产生 ROS 能力比初始 CoMo-LDH 纳米片高出 97 倍, 能在体外诱导肿瘤细胞凋亡^[41]。

2.4 Ni-LDH 用于肿瘤姑息治疗

过渡金属元素 Ni 位于第四周期第 VIII 族, 外围电子排布为 $3d^84s^2$, 常见价态为 +2。镍钛诺药物洗脱支架常用于肿瘤姑息治疗。NiTi-LDH 包覆在镍钛合金上装载化疗药物 DOX, 可通过 pH 响应控制药物释放, 增强抗肿瘤疗效^[42]。镍钛合金上特定 Ni/Ti 比例的 NiTi-LDH 形成的 pH 敏感膜,

在酸性环境下会释放大量的镍离子, 而在中性或弱碱性中稳定, 表现出对肿瘤细胞的选择性, 且细胞中高浓度的镍与 ROS 水平的升高相关, 导致肿瘤细胞的死亡^[43]。包覆在镍钛合金表面的丁酸盐插层的 NiTi-LDH 膜会消耗肿瘤和感染环境中过表达的 H_2O_2 , 并将细胞毒性的丁酸盐泵出, 选择性抑制肿瘤生长与代谢以及细菌感染^[44]。在镍钛合金表包覆的金纳米棒修饰的丁酸盐插层的 NiTi-LDH 能作为载药“海绵”, 在近红外光照射时触发其晶相转变, 将丁酸盐泵出, 激光关闭时高效重吸收水中的药物, 具有良好的生物安全性, 在构建局部刺激响应药物递送系统方面具有广阔的应用前景^[45]。此外, Ni₄Fe-LDH、NiCo-LDH 等具有良好的电催化特性, 修饰于电极表面能够提升葡萄糖检测的灵敏度等特性^[46-47]。

3 过渡金属 LDH 用作肿瘤多功能诊疗平台

3.1 Mn-LDH

过渡金属 Mn 位于第四周期第 VII B 族, 外围电子排布为 $3d^54s^2$, 属活泼金属, 有 +2、+4、+6、+7 等多个价态。 Mn^{2+} 较稳定, 但氢氧化锰易被氧化为黑色不溶物水合二氧化锰 $[\text{MnO}(\text{OH})_2]$, 因此 Mn-LDH 的制备过程中应格外注意氮气保护以防止氧化。Mn-LDH 中 Mn 的独特微观结构使其具有极好的纵向弛豫率, pH 5.0 时 r_1 值为 $9.48 \text{ mmol} \cdot \text{s}^{-1}$, pH 7.0 时为 $6.82 \text{ mmol} \cdot \text{s}^{-1}$, 均高于商用钆造影剂 Gd-DTPA 的 $3.5 \text{ mmol} \cdot \text{s}^{-1}$, 是性能优良的 CA^[48]。肿瘤细胞膜包裹 Mn-LDH 静脉注射后, 能特异性地靶向蓄积在同源肿瘤细胞并向组织深部渗透, 使得肿瘤中心区域 MRI 增强, 用于精确的癌症诊断^[49]。在 808 nm 近红外光照射下, Mn-LDH 还表现出良好的光热转换性能, 无需装载光敏剂, 即可实现 MRI 引导的肿瘤 PTT。装载 siRNAs 后也可将其有效递送至 Neuro-2 细胞, 增强对脑肿瘤细胞的杀伤力^[50]。而且该可降解的多功能无机诊疗平台还表现出良好的生物相容性和安全性。此外, Mn-LDH 还应用于 H_2O_2 检测领域。Mn 的强路易斯酸性和低氧化还原电位使 NiMn-LDH 表现出良好的底物亲和性、高催化活性和宽 pH 范围^[51]。包载 CuO 的 MnAl-LDH 修饰电极后对 H_2O_2 表现出较高的非酶传感性能, 用于人血清和尿液样品中的 H_2O_2 检测。

3.2 Cu-LDH

过渡金属 Cu 位于第四周期第 I B 族, 外围电子排布为 $3d^{10}4s^1$, 常见价态为 +1、+2 价。Cu-LDH 中 Cu^{2+} 周围存在的大量空缺, 有利于 808 nm 近红外光的光热转换, 酸性条件下高比表面积

的 LDH 能产生更多的空缺, 进一步促进其光热转化, 如 pH 7.4 时光热转化效率为 46.0%, 而 pH 5.4 时光热转化效率为 83.2%, 产生酸增强的光热治疗^[52]。如当 Cu 掺杂的 LDH 中 [Cu] (以各种价态存在的铜离子或原子的总浓度) 质量浓度为 $125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 808 nm 激光以 $1.0 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的功率照射 5 min, 即可使温度上升 19°C ^[51]。此外, 这种特有的微观结构也能增强 Cu-LDH 在酸性条件下的 T_1 -MR 成像。因此 Cu-LDH 可用于 MRI 引导的 PTT^[53]。Cu-LDH 中释放的 Cu^+ 同样具有芬顿样活性, 催化肿瘤微环境中的 H_2O_2 生成 $\cdot\text{OH}$ 造成肿瘤细胞死亡, 实现 CDT^[54]。Cu-LDH 还可以装载两种作用互补的化疗药物, 如 5-氟尿嘧啶和白蛋白结合型紫杉醇 (nAb-PTX), 实现 pH 响应及近红外热效应促进的化疗药物按需释放, 以最少的副作用实现最佳的肿瘤治疗效果^[55]。基于以上研究, 认为 Cu-LDH 是集 PTT、CDT 以及 MRI 于一体的诊疗系统, 装载化疗药物或基因药物等后还可用于与化疗、基因治疗等方法的联合治疗, 实现疾病的多方面诊疗。

4 Zn-LDH 用于抗菌

过渡金属 Zn 位于第四周期第 II B 族, 外围电子排布为 $3d^{10}4s^2$, 常见价态为 +2 价。 Zn^{2+} 具有突出的抗菌能力, 被广泛用作无机抗菌剂。Zn-Fe LDH 对金黄色葡萄球菌、革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌具有持续的抗菌活性, 最小抑菌浓度在 $0.49 \sim 15.60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[56]。ZnTi-LDHs 对培养液中酿酒酵母、大肠埃希菌也有杀菌作用, 能导致 95% 的细胞死亡。ZnAlTi-LDH 对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌有杀伤作用使其用于保护皮肤伤口免受细菌感染^[57]。Zn-LDH 还能包载其他抗菌物质, 如 ZnAl-LDH 对金黄色葡萄球菌和白念珠菌有抑制作用, 包载对羟基苯甲酸并溶入明胶后用作抗菌食品包装^[58]。包载的 DL-苦杏仁酸能从 ZnAl-LDH 中缓慢释放产生抗菌作用, 用作缓慢释放的防腐剂^[59]。共载 Ag NPs 和万古霉素后 ZnAL-LDH 对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌表现出更高的细菌杀灭性能^[60]。同时 Zn^{2+} 还是骨骼生长的必要元素, 缺乏可能会导致骨骼生长滞后。作为骨植入物, ZnAl-LDH 和 ZnFe-LDH 在体内表现出比 MgAl-LDH 和 MgFe-LDH 更强的抗菌活性^[18]。

5 结论与展望

LDH 在生物医药领域的应用已有二十余年, 其独特的结构组成、装载特性、降解机制以及不同金属离子赋予的特定功能使得 LDH 在肿瘤成

像、肿瘤协同治疗、骨生成以及抗菌领域中发挥重要作用。虽然该材料在临床前研究中表现出很好的安全性, 但是仍缺乏人体注射给药安全性及材料自身体内代谢过程相关的临床数据, 该类数据的充实能大大促进这一材料的临床转化和在生物医药领域应用的进一步拓宽。肿瘤免疫治疗通过刺激机体免疫系统或改善机体免疫抑制促使自身免疫系统杀伤肿瘤细胞, 因其安全性高、毒副作用低等特点, 已成为继化疗、放疗和手术治疗后的第四种肿瘤治疗方式。目前应用于免疫治疗领域的 LDH 的金属离子组成主要为 Mg 和 Al。有研究表明金属 Mn 和 Zn 同样具有免疫刺激作用, 但已有的 Mn-LDH 和 Zn-LDH 的相关研究则分别集中在 MRI 和抗菌领域, 因此可进一步探究 Mn 和 Zn 掺杂的 LDH 的免疫刺激作用及在肿瘤免疫治疗中的应用。LDH 纳米材料独特的溶酶体逃逸机制使其在疫苗载体或佐剂开发中具有得天独厚的优势, 因此材料与肿瘤免疫学的深度交叉研究将具有广阔前景。

参考文献

- [1] Xu MD, Wei M. Layered double hydroxide-based catalysts: recent advances in preparation, structure, and applications [J]. *Adv Funct Mater*, 2018, 28 (47): 1802943.
- [2] Fan GL, Li F, Evans DG, et al. Catalytic applications of layered double hydroxides: recent advances and perspectives [J]. *Chem Soc Rev*, 2014, 43 (20): 7040-7066.
- [3] Feitknecht W, Gerber M. Zur kenntnis der doppelhydroxyde und basischen doppelsalze III. Über magnesium-aluminiumdoppelhydroxyd [J]. *Helvetica*, 1942, 25 (1): 131-137.
- [4] Choi G, Kim SY, Oh JM, et al. Drug-ceramic 2-dimensional nanoassemblies for drug delivery system in physiological condition [J]. *J Am Ceram Soc*, 2012, 95 (9): 2758-2765.
- [5] Xu ZP, Niebert M, Porazik K, et al. Subcellular compartment targeting of layered double hydroxide nanoparticles [J]. *J Control Release*, 2008, 130 (1): 86-94.
- [6] Zhang H, Zhang L, Cao ZB, et al. Two-dimensional ultra-thin nanosheets with extraordinarily high drug loading and long blood circulation for cancer therapy [J]. *Small*, 2022, 18 (22): e2200299.
- [7] Jia YB, Hu J, Zhu CJ, et al. Engineered NanoAlum from aluminum turns cold tumor hot for potentiating cancer metallo-immunotherapy [J]. *J Control Release*, 2023, 354: 770-783.
- [8] Zhang LX, Jia YB, Yang JJ, et al. Efficient Immunotherapy of drug-free layered double hydroxide nanoparticles via neutralizing excess acid and blocking tumor cell autophagy [J]. *ACS Nano*, 2022, 16 (8): 12036-12048.
- [9] Zhang LX, Hu J, Jia YB, et al. Two-dimensional layered double hydroxide nanoadjuvant: recent progress and future direction [J]. *Nanoscale*, 2021, 13 (16): 7533-7549.

- [10] Shen WC, Hu TT, Liu XY, et al. Defect engineering of layered double hydroxide nanosheets as inorganic photosensitizers for NIR-III photodynamic cancer therapy [J]. *Nat Commun*, 2022, 13 (1): 3384.
- [11] Ameena Shirin VK, Sankar R, Johnson AP, et al. Advanced drug delivery applications of layered double hydroxide [J]. *J Control Release*, 2021, 330: 398-426.
- [12] Li A, Qin LL, Wang WR, et al. The use of layered double hydroxides as DNA vaccine delivery vector for enhancement of anti-melanoma immune response [J]. *Biomaterials*, 2011, 32 (2): 469-477.
- [13] Cao ZB, Zhang L, Liang K, et al. Biodegradable 2D Fe-Al hydroxide for nanocatalytic tumor-dynamic therapy with tumor specificity [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2018, 5 (11): 1801155.
- [14] Qin L, Xue M, Wang WR, et al. The in vitro and in vivo anti-tumor effect of layered double hydroxides nanoparticles as delivery for podophyllotoxin [J]. *Int J Pharm*, 2010, 388 (1-2): 223-230.
- [15] Li GM, Fan Y, Lin LZ, et al. Two-dimensional LDH nanodisks modified with hyaluronidase enable enhanced tumor penetration and augmented chemotherapy [J]. *Sci China Chem*, 2021, 64: 817-826.
- [16] Yu ZG, Hu P, Xu YY, et al. Efficient gene therapy of pancreatic cancer via a peptide nucleic acid (PNA)-loaded layered double hydroxides (LDH) nanoplatfrom [J]. *Small*, 2020, 16 (23): e1907233.
- [17] Park DH, Cho J, Kwon OJ, et al. Biodegradable inorganic nanovector: passive versus active tumor targeting in siRNA transportation [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 55 (14): 4582-4586.
- [18] Wang JY, Bao WL, Umar A, et al. Delaminated layered double hydroxide nanosheets as an efficient vector for DNA delivery [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2016, 12 (5): 922-933.
- [19] Jo YU, Sim H, Lee CS, et al. Solubilized chlorin e6-layered double hydroxide complex for anticancer photodynamic therapy [J]. *Biomater Res*, 2022, 26 (1): 23.
- [20] Li CY, Liang RZ, Tian R, et al. A targeted agent with intercalation structure for cancer near-infrared imaging and photothermal therapy [J]. *RSC Advances*, 2016, 6 (20): 16608-16614.
- [21] Tian R, Yan DD, Li CY, et al. Surface-confined fluorescence enhancement of Au nanoclusters anchoring to a two-dimensional ultrathin nanosheet toward bioimaging [J]. *Nanoscale*, 2016, 8 (18): 9815-9821.
- [22] Zhang QY, Zhou DD, Fang GC, et al. Cell-derived biomimetic 2D nanoparticles to improve cell-specific targeting and tissue penetration for enhanced magnetic resonance imaging [J]. *Advanced Materials Interfaces*, 2022, doi: 10.1002/admi.202101914.
- [23] Saxena M, van der Burg SH, Melief CJM, et al. Therapeutic cancer vaccines [J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21 (6): 360-378.
- [24] O' Hagan DT, Valiante NM. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2 (9): 727-735.
- [25] Li A, Qin LL, Zhu D, et al. Signalling pathways involved in the activation of dendritic cells by layered double hydroxide nanoparticles [J]. *Biomaterials*, 2010, 31 (4): 748-756.
- [26] Zhang LX, Liu DQ, Wang SW, et al. MgAl-layered double hydroxide nanoparticles co-delivering siIDO and Trp2 peptide effectively reduce IDO expression and induce cytotoxic T-lymphocyte responses against melanoma tumor in mice [J]. *J Mater Chem B*, 2017, 5 (31): 6266-6276.
- [27] Yan SY, Gu WY, Zhang B, et al. High adjuvant activity of layered double hydroxide nanoparticles and nanosheets in anti-tumour vaccine formulations [J]. *Dalton Trans*, 2018, 47 (9): 2956-2964.
- [28] Williams GR, Fierens K, Preston SG, et al. Immunity induced by a broad class of inorganic crystalline materials is directly controlled by their chemistry [J]. *J Exp Med*, 2014, 211 (6): 1019-1025.
- [29] Cheng S, Lan LQ, Li M, et al. Pure Mg-Al layered double hydroxide film on magnesium alloys for orthopedic applications [J]. *ACS Omega*, 2021, 6: 24575-24584.
- [30] Zhang DD, Cheng S, Tan J, et al. Black Mn-containing layered double hydroxide coated magnesium alloy for osteosarcoma therapy, bacteria killing, and bone regeneration [J]. *Bioact Mater*, 2022, 17: 397-405.
- [31] Tan J, Wang DW, Cao HL, et al. Effect of local alkaline microenvironment on the behaviors of bacteria and osteogenic cells [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10 (49): 42018-42029.
- [32] Liu P, Li MN, Yu HP, et al. Biphasic CK2.1-coated β -glycerophosphate chitosan/LL37-modified layered double hydroxide chitosan composite scaffolds enhance coordinated hyaline cartilage and subchondral bone regeneration [J]. *Chem Eng J*, 2021, 418: 129531.
- [33] Fayyazbakhsh F, Solati-Hashjin M, Keshtkar A, et al. Novel layered double hydroxides-hydroxyapatite/gelatin bone tissue engineering scaffolds: fabrication, characterization, and in vivo study [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 76: 701-714.
- [34] Cao DD, Xu ZL, Chen YX, et al. Ag-loaded MgSrFe-layered double hydroxide/chitosan composite scaffold with enhanced osteogenic and antibacterial property for bone engineering tissue [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2018, 106 (2): 863-873.
- [35] Zhu ZZ, Wang XY, Li TJ, et al. Platinum (II)-gadolinium (III) complexes as potential single-molecular theranostic agents for cancer treatment [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, 53 (48): 13225-13228.
- [36] Mei X, Hu TT, Wang H, et al. Highly dispersed nano-enzyme triggered intracellular catalytic reaction toward cancer specific therapy [J]. *Biomaterials*, 2020, 258: 120257.
- [37] Zhang H, Cao ZB, Zhang QY, et al. Chemotaxis-driven 2D nanosheet for directional drug delivery toward the tumor microenvironment [J]. *Small*, 2020, 16 (44): e2002732.
- [38] Jia T, Wang ZB, Sun Q, et al. Intelligent Fe-Mn layered double hydroxides nanosheets anchored with upconversion nanoparticles for oxygen-elevated synergetic therapy and bio-

- imaging [J]. *Small*, 2020, 16 (46): e2001343.
- [39] Yan L, Wang YJ, Hu TT, et al. Layered double hydroxide nanosheets: towards ultrasensitive tumor microenvironment responsive synergistic therapy [J]. *J Mater Chem B*, 2020, 8 (7): 1445-1455.
- [40] Wu JJ, Zhang SM, Mei X, et al. Ultrathin transition metal chalcogenide nanosheets synthesized via topotactic transformation for effective cancer theranostics [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12 (43): 48310-48320.
- [41] Wang YL, Wang ZC, Rui YP, et al. Horseradish peroxidase immobilization on carbon nanodots/CoFe layered double hydroxides: direct electrochemistry and hydrogen peroxide sensing [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 64: 57-62.
- [42] Ge NJ, Wang DH, Peng F, et al. Poly (styrenesulfonate) -modified Ni-Ti layered double hydroxide film: a smart drug-eluting platform [J]. *ACS Applied Materials Interfaces*, 2016, 8 (37): 24491-24501.
- [43] Wang DH, Ge NJ, Li JH, et al. Selective tumor cell inhibition effect of Ni-Ti layered double hydroxides thin films driven by the reversed pH gradients of tumor cells [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7 (15): 7843-7854.
- [44] Wang DH, Peng F, Li JH, et al. Butyrate-inserted Ni-Ti layered double hydroxide film for H₂O₂-mediated tumor and bacteria killing [J]. *Mater Today*, 2017, 20 (5): 238-257.
- [45] Wang DH, Ge NJ, Yang TT, et al. NIR-triggered crystal phase transformation of NiTi-layered double hydroxides films for localized chemothermal tumor therapy [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2018, 5 (4): 1700782.
- [46] An SY, Shang NZ, Chen BY, et al. Co-Ni layered double hydroxides wrapped on leaf-shaped copper oxide hybrids for non-enzymatic detection of glucose [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2021, 592: 205-214.
- [47] Amin KM, Muench F, Kunz U, et al. 3D NiCo-layered double hydroxide@Ni nanotube networks as integrated free-standing electrodes for nonenzymatic glucose sensing [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2021, 591: 384-935.
- [48] Li B, Gu Z, Kurniawan N, et al. Manganese-based layered double hydroxide nanoparticles as a T₁-MRI contrast agent with ultrasensitive pH response and high relaxivity [J]. *Adv Mater*, 2017, 29 (29): 1700373.
- [49] Zhang QY, Zhou DD, Fang GC, et al. Cell-derived biomimetic 2D nanoparticles to improve cell-specific targeting and tissue penetration for enhanced magnetic resonance imaging [J]. *Adv Mater Interfaces*, 2022, 9 (7): 2101914.
- [50] Zuo HL, Chen WY, Li B, et al. MnAl layered double hydroxide nanoparticles as a dual-functional platform for magnetic resonance imaging and siRNA delivery [J]. *Chemistry*, 2017, 23 (57): 14299-14306.
- [51] Liu JP, Wu YL, Fu CK, et al. Charge reversion simultaneously enhances tumor accumulation and cell uptake of layered double hydroxide nanohybrids for effective imaging and therapy [J]. *Small*, 2020, 16 (31): e2002115.
- [52] Hu TT, Yan L, Wang ZD, et al. A pH-responsive ultrathin Cu-based nanoplatform for specific photothermal and chemodynamic synergistic therapy [J]. *Chem Sci*, 2021, 12 (7): 2594-2603.
- [53] Li B, Tang J, Chen WY, et al. Novel theranostic nanoplatform for complete mice tumor elimination via MR imaging-guided acid-enhanced photothermo-/chemo-therapy [J]. *Biomaterials*, 2018, 177: 40-51.
- [54] Wang ZD, Fu LY, Zhu Y, et al. Chemodynamic/photothermal synergistic therapy based on Ce-doped Cu-Al layered double hydroxides [J]. *J Mater Chem B*, 2021, 9: 710-718.
- [55] Liu JP, Liu K, Zhang LM, et al. Heat/pH-boosted release of 5-fluorouracil and albumin-bound paclitaxel from Cu-doped layered double hydroxide nanomedicine for synergistical chemo-photo-therapy of breast cancer [J]. *J Control Release*, 2021, 335: 49-58.
- [56] Moaty SAA, Farghali AA, Khaled R. Preparation, characterization and antimicrobial applications of Zn-Fe LDH against MRSA [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2016, 68: 184-193.
- [57] Liu XL, Hu TT, Lin GS, et al. The synthesis of a DHAD/ZnAlTi-LDH composite with advanced UV blocking and antibacterial activity for skin protection [J]. *RSC Adv*, 2020, 10 (17): 9786-9790.
- [58] Cheng HM, Gao XW, Zhang K, et al. A novel antimicrobial composite: ZnAl-hydroxalcalite with *p*-hydroxybenzoic acid intercalation and its possible application as a food packaging material [J]. *New J Chem*, 2019, 43 (48): 19408-19414.
- [59] Tang LP, Cheng HM, Cui SM, et al. DL-mandelic acid intercalated Zn-Al layered double hydroxide: a novel antimicrobial layered material [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2018, 165: 111-117.
- [60] Sun JC, Li JJ, Fan H, et al. Ag nanoparticles and vancomycin comodified layered double hydroxides for simultaneous capture and disinfection of bacteria [J]. *J Mater Chem B*, 2013, 1 (40): 5436-5442.

(收稿日期: 2023-09-14; 修回日期: 2023-11-25)

中药及天然产物治疗高尿酸血症和痛风的作用机制研究进展

李阁, 曹慧雅, 闫思雅, 王洋, 王丹*, 王涛* (天津中医药大学省部共建组分中药国家重点实验室, 天津 301617)

摘要: 高尿酸血症是以人体血清尿酸水平升高为特征的代谢性疾病, 与尿酸生成增加或尿酸排泄减少有关。高尿酸血症不仅是导致痛风的主要因素, 而且与高血压、动脉粥样硬化和慢性肾病等疾病的发生发展密切相关。临床上治疗高尿酸血症和痛风的药物疗效显著, 但长期服用会导致患者出现不良反应。中药及天然产物因其多靶点、安全性高的特点, 能够有效地控制痛风的发生和发展。因此, 本文从中药及天然产物治疗高尿酸血症和痛风的作用机制等方面进行综述, 为研发预防或治疗高尿酸血症和痛风的安全有效的药物提供新思路。

关键词: 高尿酸血症; 痛风; 尿酸合成; 尿酸排泄; 肠道菌群

中图分类号: R589.7 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)07-1864-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.030

Research progress in the mechanism of traditional Chinese medicine and natural products for hyperuricemia and gout

LI Ge, CAO Hui-ya, YAN Si-ya, WANG Yang, WANG Dan*, WANG Tao* (National Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Co-constructed by Provincial and Ministerial Departments, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617)

Abstract: Hyperuricemia is a metabolic disorder characterized by elevated levels of uric acid, which is associated with increased production or decreased excretion of uric acid. Hyperuricemia is not only the main factor for gout, but also closely related to the occurrence and development of diseases such as hypertension, atherosclerosis, and chronic kidney diseases. The clinical treatment of hyperuricemia and gout with drugs has been effective, but long-term use may cause adverse reactions in patients. Traditional Chinese medicine and natural products, owing to their multi-targets and high safety, may effectively control the occurrence and development of gout. We comprehensively reviewed the mechanism of traditional Chinese medicine and natural products for hyperuricemia and gout, aiming to provide insights for the development of safe and effective drugs to prevent and treat hyperuricemia and gout.

Key words: hyperuricemia; gout; uric acid synthesis; uric acid excretion; gut microbiota

高尿酸血症 (hyperuricemia, HUA) 是由于尿酸 (uric acid) 代谢异常, 从而引起非同日两次空腹血尿酸水平升高 (女性 $> 6.0 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$, 男性 $> 7.0 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$, 或青少年 $> 5.5 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$), 其原因包括尿酸生产过剩、尿酸排泄不足或两者兼有^[1]。高嘌呤或高蛋白质饮食、酒精摄入、较高的血浆锌和砷等重金属水平都会增加 HUA 风险^[2]。HUA 患者

血清尿酸浓度升高, 造成尿酸单钠晶体 (MSU) 在关节腔内及关节周围发生沉积, 导致痛风的发作, 痛风的发展会进一步损伤肾脏^[3-4]。尿酸代谢异常与痛风性关节炎、糖尿病肾病、高血压、心血管疾病和非酒精性脂肪肝等疾病的发生均有关系^[5-6]。

目前, 用于治疗 HUA 和痛风的主要药物是别嘌醇、秋水仙碱、吲哚美辛、丙磺舒、苯溴

基金项目: 组分中药国家重点实验室资助课题 (No. QMJJ202105)。

作者简介: 李阁, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药尿酸代谢研究, email: 1722872768@qq.com *通信作者: 王丹, 女, 助理研究员, 主要从事中药尿酸代谢研究, email: wangdan0048@tjutc.edu.cn; 王涛, 男, 教授, 主要从事中药代谢性疾病研究, email: wangtao@tjutc.edu.cn

马隆和糖皮质激素等，这些药物具有消炎、止痛、抑制尿酸生成、促进尿酸排泄的作用，但是长期使用会引起消化道损伤、肾脏和肝脏毒性^[7-8]。因 HUA 和痛风复杂的病理学和漫长的治疗周期，它们已成为世界范围内危害人类健康的主要疾病之一。近年来，许多学者从不同角度对中药及天然产物治疗 HUA 和痛风进行了一系列的基础研究，发现中药有效成分能够通过多靶点、多途径的方式治疗痛风，中药及天然产物具有抑制尿酸合成过程中关键酶活性、调节尿酸转运蛋白表达、改善肠道菌群失调、抑制炎症相关通路等多种作用，在减少不良反应、预防复发等方面有显著优势，能够有效地控制痛风的发生和发展。基于此，本文整理归纳了中药及天然产物对抗 HUA 和痛风的相关研究，可为开发新型、安全和有效的药物替代品提供新思路。

1 抑制尿酸合成中的关键酶表达

机体内尿酸的合成过程需要多种酶的参与，每种酶的异常都会导致尿酸水平发生变化。尿酸代谢途径中的关键酶有嘌呤从头合成途径中的磷酸核糖焦磷酸合成酶 (PRPS) 和嘌呤代谢补救合成途径中的次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HPRT)，这两个关键酶缺陷均会引起尿酸代谢紊乱从而导致 HUA。PRPS 活性增加，使嘌呤核苷酸代谢加速，尿酸产生过多。HPRT 基因突变会引起 HPRT 的活性部分或完全缺失，嘌呤利用受损，减弱嘌呤代谢的负反馈，还会使体内 PRPS 积累过多，导致尿酸生成过多^[9-10]。有研究发现，维生素 C 能够降低 HPRT 基因的突变率^[11]。刘景芳等^[12]研究了血清维生素 C 含量与降低 HPRT 基因的突变率的关系，发现 HUA 患者多吃富含维生素 C 的蔬菜和水果或口服补充维生素 C，会增加血清维生素 C 浓度，提高 HPRT 活性，降低血清尿酸。Bao 等^[13]研究发现宽缨醇可下调肝脏 PRPS 和肾脏葡萄糖转运体 9 (GLUT9) 的表达，上调肾脏三磷酸腺苷结合盒式蛋白家族 2 (ABCG2)、钠-磷协同转运体 1 (NPT1) 和有机阴离子转运蛋白 1 (OAT1) 的表达，显著降低 HUA 小鼠血尿酸水平。三丫苦叶提取物对 HUA 模型大鼠黄嘌呤氧化酶 (XOD) 和 PRPS 活性均有抑制作用^[14]。肾茶乙醇提取物可通过抑制其肝脏 PRPS、XOD 的表达，上调肾脏尿酸转运体 OAT1、ABCG2 蛋白的表达，下调肾脏 GLUT9、尿酸盐阴离子转运蛋白 1 (URAT1) 蛋白的表达，降低 HUA 小鼠的血清尿酸^[15]。

嘌呤代谢过程中，鸟嘌呤核苷酸 (GMP) 被核苷酸酶转化为鸟嘌呤，鸟嘌呤经鸟嘌呤脱氨酶作用生成黄嘌呤；腺嘌呤核苷酸 (AMP) 在核苷酸酶和腺苷脱氨酶 (ADA) 作用下转化为次黄嘌呤核苷酸^[16]；最终，黄嘌呤氧化酶将次黄嘌呤氧化为黄嘌呤，将黄嘌呤氧化为尿酸^[17]，代谢途径见图 1。通过体外研究发现，很多中药活性成分对 XOD 活性有抑制作用，如乔松素、乔松素呋喃葡萄糖苷、杨梅酮、迷迭香酸、紫草酸、木犀草素、肉桂醛和海参皂苷^[18-19]。紫苏叶乙醇提取物中的野黄芩素、木犀草素和芹菜素在体外实验中显示出 XOD 抑制活性^[20]。杜洪芳等^[21]研究发现，土荆皮乙醇提取物中的杨梅素、原儿茶酸、3, 5-二羟基-2-[2-(4-羟苯乙酰基)]苯甲酸能够显著抑制 XOD 活性 (IC_{50} 分别为 0.32、0.38、0.29 $mmol \cdot L^{-1}$)。马二秀等^[22]使用腺嘌呤和乙胺丁醇复合诱导小鼠 HUA 肾损伤模型，发现藤茶总黄酮 (0.125、0.25、0.5 $g \cdot kg^{-1}$) 能降低血清尿酸、XOD 及 ADA 的含量，发挥抗 HUA 的作用。Zhao 等^[23]建立氧嗪酸钾诱导的 HUA 小鼠模型，发现绿原酸通过抑制 XOD 活性降低尿酸水平，抑制促炎细胞因子白细胞介素 (IL)-1 β 、IL-6 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的产生。有研究证明黄芩苷通过抑制 XOD 活性显著降低血清尿酸水平^[24]。卢昊等^[25]通过建立尿酸性肾损伤模型，发现高良姜素可通过降低 XOD 活性、抑制 NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎性小体激活，降低血清尿酸浓度，缓解肾损伤。刘恺等^[26]用氧嗪酸钾诱导 HUA 小鼠模型，发现 3, 5, 2', 4'-四羟基查尔酮 (2、4、8 $mg \cdot kg^{-1}$) 可降低小鼠血清尿酸水平，对黄嘌呤氧化酶的抑制具有高度选择性。

综上，大量研究证明，中药及天然产物对尿酸代谢过程中的关键酶具有调节作用，为中药和天然产物治疗 HUA 及痛风的临床应用提供一定的参考。另外，中药来源的 XOD 抑制剂来源广泛，有很高的研究价值。

2 调节尿酸盐分泌转运蛋白和尿酸盐重吸收转运蛋白的表达

肾脏是尿酸排泄的主要器官，有三分之二的尿酸通过肾脏排出。尿酸的排泄包括肾小球滤过、肾小管重吸收、肾小管再分泌、分泌后再次重吸收四个步骤。全基因组关联研究 (Genome-wide association studies, GWAS) 已在血清尿酸浓度变化相关的基因中鉴定出单核苷酸多态性，血清尿酸水平主要与 ABCG2、URAT1、GLUT9 和 NPT1

蛋白密切相关^[27-28], OAT1、有机阳离子/肉碱转运蛋白 2 (OCTN2) 等也参与尿酸转运^[29]。调节肾脏尿酸转运体的表达水平在治疗 HUA 和痛风的过程中起着核心作用。由于痛风人群中慢性肾脏病 3 期以上患病率为 24%^[30], 如何在这类患者中通过增加尿酸的排泄以降低血尿酸也是亟须解决的问题。肠道承担三分之一尿酸排泄任务, 调节肠道尿酸转运体的表达, 促进尿酸向肠腔内分泌、抑制尿酸由肠腔向血液的重吸收是降尿酸作用机制之一。

研究发现土茯苓总黄酮可以下调 URAT1, 上调 OAT1、OCTN2, 显著降低 HUA 小鼠血清尿酸浓度^[31-32]。Su 等^[33] 研究发现绵萆薢水提物可以调节 OAT1、URAT1 和 OCTN2 的表达, 降低 HUA 小鼠血清尿酸水平。也有相关文献报道薯蓣皂苷通过下调 HUA 小鼠肾脏 GLUT9, 上调 OAT1, 促进尿酸排泄, 但薯蓣皂苷的溶解性和稳定性差, 而其代谢物剑麻皂苷元在 10 ~ 100 μmol · L⁻¹ 浓度可显著下调 URAT1、上调 ABCG2, 增加尿酸排泄, 推测剑麻皂苷元可能是绵萆薢抗 HUA 的活性物质^[34]。有研究发现, 秦皮醇提物可使 URAT1 和 GLUT9 的蛋白和 mRNA 水平下调^[35], 秦皮中秦皮苷可上调 HUA 小鼠肾脏 OAT1 蛋白的表达, 改善肾功能损伤^[36]。在 HUA 小鼠中, 秦皮乙素和秦皮甲素可增加 ABCG2 mRNA 的表达, 增加尿酸在肠道的排泄, 对肾功能不全小鼠具有有益作用^[37]。黄柏的水提物能明显降低血尿酸水平, 其主要作用机制是其可以减少肾脏中 URAT1 mRNA 和蛋白表达, 降低血清尿酸水平^[38]。鸡矢藤环烯醚萜苷可降低尿酸性肾病大鼠的血尿酸、促进尿酸的分级排泄、减轻肾脏组织的炎症反应^[39]。区淑雅等^[40] 研究发现龙胆苦苷可通过调控 URAT1、GLUT9 和 OAT1 蛋白表达, 抑制 NLRP3 炎性小体信号通路的激活, 降低 HUA 小鼠体内尿酸水平、缓解肾脏炎症反应。朱春胜等^[41] 研究发现菊苣降尿酸活性成分可能为绿原酸、秦皮甲素、菊苣酸, 将不同剂量的三种单体混合物给予高嘌呤饲料诱发的 HUA 鹌鹑, 发现其可抑制 XOD、ADA 活性降低血清尿酸水平, 抑制 URAT1、GLUT9 的表达发挥降尿酸作用, 从而缓解肾脏损伤^[42]。

Hosomi 等^[43] 研究发现在肾脏功能受损的情况下, 肠道 ABCG2 表达可降低肾脏排泄尿酸的负担。GLUT9 在空肠和回肠中大量表达, 在肠道能发挥对尿酸重吸收的作用^[44]。调节肠道 ABCG2、GLUT9 的表达不仅可促进肠道尿酸排泄, 降低血

尿酸水平, 还可以减轻肾脏尿酸排泄负荷, 保护肾脏。岩白菜素可以通过调节肾脏和肠道 ABCG2 及 GLUT9 的表达来促进尿酸排泄, 并通过抗炎、抗氧化改善肾脏功能^[45]。四妙丸可上调 HUA 大鼠肠道 ABCG2 的表达促进肠道尿酸排泄、降低血尿酸水平, 同时可通过下调促炎因子保护肾脏^[46]。苗药痛风停汤^[47]、祛湿涤浊汤^[48] 可上调大鼠肠道 ABCG2 的表达, 有效降低高尿酸大鼠尿酸水平。研究报道葛根素^[49]、芒果苷^[50] 也可以通过上调肠道 ABCG2 蛋白的表达来实现降尿酸的作用。

综上, 常用治疗 HUA 的中药及天然产物不仅能调节肾脏尿酸转运蛋白的表达, 还可促进肠道尿酸排泄, 缓解因肾小管尿酸浓度过高导致的 MSU 沉积造成的肾脏炎症。对于 HUA 和痛风患者来说, 从中药及天然产物中筛选出降尿酸效果明显且具有肾脏保护作用的药物具有很大的意义。尿酸合成和排泄路径见图 1。

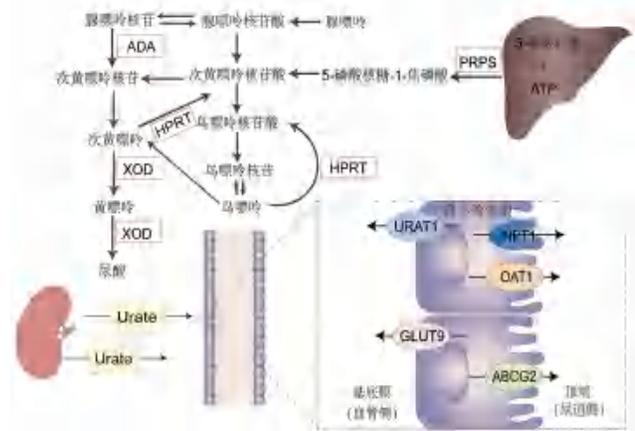


图 1 尿酸合成和排泄

Fig 1 Uric acid synthesis and excretion

3 改善肠道菌群失衡

肠道菌群寄居于肠道, 多种疾病的发病涉及肠道菌群的改变, 尤其是有益菌减少^[51]。有研究将痛风患者和健康个体的肠道菌群进行对比分析, 发现痛风患者相较于健康个体的粪便拟杆菌和解木聚糖拟杆菌丰度高, 柔嫩梭菌群和假小链双歧杆菌丰度低^[52]。Yun 等^[53] 把 HUA 大鼠粪便微生物群移植到受体大鼠体内, 受体大鼠血尿酸水平升高。与正常小鼠相比, HUA 小鼠粪便中双歧杆菌和乳酸杆菌的数量显著减少, 进一步增加血液中的脂多糖水平^[54-55]。变形杆菌属大肠埃希菌分泌嘌呤代谢过程中的黄嘌呤氧化酶^[56]; 柔嫩梭菌属的酪酸梭菌介导嘌呤代谢分解尿酸^[57]; 乳酸杆菌和假单胞菌能分泌分解尿酸的尿酸氧化酶和尿囊素酶^[58]; 酿酒酵母菌影响宿主自身免疫促

进嘌呤分解,使尿酸生成减少^[59],这些研究提示 HUA 的发生发展与肠道菌群有关。

为进一步研究肠道菌群及代谢产物与血清尿酸水平的关系,Zhao 等^[60]进行了一项随机、双盲、对照研究,饮用含菌株 *Limosilactactum fermentum* GR-3 的益生菌酸奶 2 个月后,与饮用常规酸奶相比,饮用益生菌酸奶的患者粪便和尿液中尿酸排泄显著增加,GR-3 可调节肠道菌群代谢,降解尿酸,降低血清尿酸水平。He 等^[61]对终末期肾病患者进行随机对照试验,与安慰剂组相比,益生元干预组中血清尿酸的平均浓度降低 10%,粪便中尿酸降解增强,但肾脏排泄尿酸的量、XOD 活性无显著变化,推测可能与厚壁菌门/拟杆菌门的比率增加有关。研究报道乳酸杆菌 DM9218 可通过降解肌苷和改善果糖诱导的肠道菌群失调,从而降低血清中尿酸水平、增强肠屏障功能^[62]。口服干酪乳杆菌 X11 能够恢复拟杆菌门与厚壁菌门的比例,抑制 ADA、XOD 活性、促炎细胞因子的生成,降低血清尿酸水平^[63]。有研究先以嘌呤为靶标,体外筛选出降尿酸活性为 87.40% 的发酵乳酸杆菌 F40-4,然后通过建立 HUA 小鼠模型,发现发酵乳酸杆菌 F40-4 通过调节 HUA 小鼠肠道微生物群和减轻炎症来改善 HUA^[64]。此外,已有研究发现,菊粉型益生元可以被共生细菌发酵成短链脂肪酸(SCFAs),改善肠道环境并促进肠上皮细胞和肠腔之间的底物转运^[65]。综上,肠道微生物群相互作用可改善肠道微环境,产生 SCFAs 等小分子代谢产物^[66],进一步影响宿主的尿酸和嘌呤代谢,改善肠屏障功能,降低痛风患者血清尿酸水平^[67-68]。

于栋华等^[69]用 10% 酵母饲料和 5% 氧嗪酸钾诱导 HUA 大鼠模型,发现穿山龙总皂苷不仅能显著升高 HUA 大鼠肠道中厚壁菌门属、乳酸杆菌属、梭菌属等菌种的丰度,还能显著提升粪便中丙酸、丁酸的含量。郭璐^[70]发现土茯苓的主要有效成分落新妇苷可增加 HUA 小鼠拟杆菌属、乳酸菌属、斯莱克氏菌属等促进 SCFAs 生成菌的数量,并可调节肠道尿酸转运蛋白表达,从而缓解肾损伤和促进尿酸排泄。据报道,四妙散可降低痛风小鼠肠道中克雷伯氏菌、肠球菌等致病菌的丰度,影响嘌呤与尿酸代谢,从而发挥降尿酸、抗痛风的作用^[71]。Shan 等^[72]发现小檗碱能够改善氧嗪酸钾诱导的 HUA 小鼠肠道菌群的组成结构,控制痛风的发作。综上,中药及天然产物可通过调节 HUA 引起的肠道菌群失衡和代谢,促进尿酸

的排泄,发挥对 HUA 和痛风的治疗作用。

4 抑制炎症相关通路

在 HUA 治疗不足时,体内饱和的尿酸沉积在滑膜液、关节和其他组织中形成 MSU,关节附近组织中 MSU 会刺激关节部位的中性粒细胞、巨噬细胞、滑膜细胞等相关细胞中的 NLRP3 炎症小体,释放多种促炎因子如 IL-1 β 、TNF- α 等,进而引发严重的炎症反应;同时,MSU 可被 Toll 样受体(TLRs)识别,如 TLR2、TLR4,进而激活依赖性核因子- κ B(NF- κ B),从而促进与炎症有关的细胞因子如 TNF- α 、IL-6 等的分泌,造成关节、肾脏等损伤^[73-74]。

Dang 等^[75]研究发现痛风患者血液中单核细胞中 TLR4/NF- κ B、NLRP3 信号通路相关蛋白的表达高于健康对照组,进一步研究发现小檗碱能够通过抑制 MSU 晶体诱导的 TLR4/NF- κ B 信号通路和 NLRP3 炎症小体的激活,从而减轻痛风的炎症反应。Liu 等^[76]通过在 CD-1 小鼠踝关节内注射 MSU 混悬液制备痛风模型,研究发现 30、60 mg \cdot kg⁻¹ 原花青素可以通过抑制 MSU 诱导的 NLRP3 炎症小体活化和 IL-1 β 的增加,缓解痛风疼痛,抑制踝关节肿胀。Wu 等^[77]使用 MSU 和脂多糖诱导 THP-1 细胞,建立体外痛风模型,结果证明表儿茶素可以抑制 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的分泌;然后向 C57BL/6J 小鼠踝关节内注射 MSU 溶液制备痛风小鼠模型,发现 25、50、100 mg \cdot kg⁻¹ 表儿茶素均可抑制 NLRP3 炎症小体的激活,改善小鼠急性痛风性关节炎的滑膜病理状态。Liang 等^[78]灌胃小鼠 24 d 氧嗪酸钾,在第 21 日将 MSU 注射到胫跗关节,建立具有慢性 HUA 的痛风小鼠模型,研究发现土茯苓水提物(10、30、90 mg \cdot kg⁻¹) 剂量依赖性地减轻模型小鼠的关节水肿,降低血清尿酸、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平,升高血清 IL-10、尿酸和肌酐水平,改善痛风小鼠肾脏和关节损伤。刘建鑫等^[79]研究发现黄连解毒汤能够减轻 MSU 晶体导致的小鼠关节局部炎性免疫损伤,与其降低关节组织中炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 的含量及调控 NLRP3 炎症小体、TLR4/NF- κ B 信号通路相关。参苓白术散能够减少 MSU 诱导的痛风性关节炎大鼠血清中 IL-1 β 、TNF- α 水平,抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路的激活^[80]。李国莺等^[81]使用 MSU 刺激 THP-1 细胞诱导体外炎症反应,发现葶藶总皂苷可通过下调 TLR4/NF- κ B,减少 TNF- α 、IL-1 β 分泌而发挥抗炎作用。沈瑞明等^[82]研究发现木犀草素可通过下调 TLRs/NF- κ B 通路减轻急性痛风性关节炎大鼠的炎症反应,减少踝关节

的炎症细胞浸润，改善滑膜增生。

综上，中药及天然产物不仅可通过抑制相关炎症通路的激活，抑制促炎因子的生成，还能够

通过调节尿酸转运蛋白的表达，促进尿酸排泄，缓解因尿酸浓度过高导致的 MSU 沉积造成的肾脏和关节损伤，详见表 1。

表 1 中药及天然产物对高尿酸血症和痛风的作用

Tab 1 Effect of traditional Chinese medicine and natural products on hyperuricemia and gout

中药及天然产物	作用靶点	体外 / 体内实验剂量	参考文献
土茯苓总黄酮	XOD↓、URAT1↓、OAT1↑、OCTN2↑	体内: 125 mg · kg ⁻¹	[31-32]
土茯苓	TNF-α↓、IL-1β↓、IL-6↓、BUN↓、IL-10↑、肌酐↓、XOD↓	体内: 10、30、90 mg · kg ⁻¹	[78]
原花青素	踝关节肿胀↓、NLRP3↓、IL-1β↓、ROS↓	体内: 30、60 mg · kg ⁻¹ 体外: 10 μmol · L ⁻¹	[76]
表儿茶素	IL-1β↓、IL-6↓、TNF-α↓、NLRP3↓	体内: 25、50、100 mg · kg ⁻¹ 体外: 20、40、80 μmol · L ⁻¹	[77]
龙胆苦苷	URAT1↓、GLUT9↓、OAT1↑、NLRP3↓	体内: 20、40、80 mg · kg ⁻¹	[40]
高良姜素	血清尿酸↓、肌酐↓、BUN↓、XOD↓ IL-1β↓、IL-18↓、NLRP3↓	体内: 100、200、400 mg · kg ⁻¹	[25]
宽缙醇	PRPS↓、GLUT9↓、ABCG2↑、NPT1↑、OAT1↑、血清尿酸↓	体内: 5、10、20 mg · kg ⁻¹	[13]
三丫苦叶提取物	XOD↓、PRPS↓	体内: 10 g · kg ⁻¹	[14]
肾茶提取物	PRPS↓、XOD↓、GLUT9↓、URAT1↓、OAT1↑、ABCG2↑、血清尿酸↓	体内: 100、200、400 mg · kg ⁻¹	[15]
藤茶总黄酮	尿酸↓、XOD↓、ADA↓	体内: 0.125、0.25、0.5 g · kg ⁻¹	[22]
绿原酸	XOD↓、IL-1β↓、IL-6↓、TNF-α↓	体内: 50、100、200 mg · kg ⁻¹	[23]
3, 5, 2', 4'-四羟基查尔酮	XOD↓、血清尿酸↓	体内: 2、4、8 mg · kg ⁻¹	[26]
绵草藤	OAT1↑、URAT1↓、OCTN2↑	体内: 319.22、638.43、1276.86 mg · kg ⁻¹	[33]
剑麻皂苷元	URAT1↓、ABCG2↑	体外: 10 ~ 100 μmol · L ⁻¹	[34]
秦皮提取物	URAT1↓、GLUT9↓、OAT1↑	体内: 50、100、200 mg · kg ⁻¹	[35-37]
岩白菜素	ABCG2↑、GLUT9↓	体内: 40、80 mg · kg ⁻¹	[45]
穿山龙总皂苷	厚壁菌门属↑、乳酸杆菌属↑、梭菌属↑、丙酸↑、丁酸↑	体内: 480 mg · kg ⁻¹	[69]
落新妇苷	拟杆菌属↑、乳酸菌属↑、斯莱克氏菌属↑、SCFAs↑	体内: 25、50 mg · kg ⁻¹	[70]
四妙丸	ABCG2↑、克雷伯氏菌↓、肠球菌↓	体内: 4、8、16 g · kg ⁻¹	[46, 71]
祛浊通痹汤	ABCG2↑、IL-1β↓、IL-6↓、TNF-α↓	体内: 18.0 g · kg ⁻¹	[48]
小檗碱	TLR4/NF-κB↓、NLRP3↓、IL-1β↓、IL-18↓	体外: 25、50 μmol · L ⁻¹	[75]
黄连解毒汤	TLR4/NF-κB↓、NLRP3↓、IL-1β↓、IL-6↓、TNF-α↓	体内: 5 g · kg ⁻¹	[79]
草薢总皂苷	TLR4/NF-κB↓、IL-1β↓、TNF-α↓	体外: 1、3、10 mg · L ⁻¹	[81]
菊苣酸	XOD↓、ADA↓、URAT1↓、GLUT9↓、肌酐↓、BUN↓	体内: 30、60 mg · kg ⁻¹	[41-42]
木犀草素	TLR2↓、TLR4/NF-κB↓、NLRP3↓、IL-1β↓、IL-6↓、TNF-α↓	体内: 50、150 mg · kg ⁻¹	[82]

5 展望

HUA 和痛风的预防和治疗是一个复杂的过程，目前临床上使用的治疗痛风的药物多是单靶点药物，并不总是能对疾病复杂的系统产生有效的影 响。中药及天然产物能够通过多靶点、多途径的方式起效，抑制尿酸合成过程中的关键酶活性、调节尿酸转运蛋白表达、改善肠道菌群失衡和抑制炎症相关通路，从而对抗 HUA 和痛风。中药及天然产物的研究可以提示临床工作者针对疾病的不同时期选择作用不同靶点的中药，也可为单味中药、药对、中药复方的临床应用提供依据。然而，目前相关研究主要集中在体外实验和动物模型上，与人体 HUA 及痛风的状态存在较大差

异。为了更准确地评估中药及天然产物在 HUA 和痛风治疗中的疗效和安全性，应该利用人体来源的细胞和组织进行体外研究，并收集人体 HUA 和痛风患者的样本（如血液、尿液、组织等）分析和研究。目前的研究多数是通过比较 HUA 和痛风小鼠与正常小鼠的肠道菌群差异，确定哪些菌群在疾病发展中起到关键作用，可以进一步通过肠道菌群转移实验，将 HUA 和痛风小鼠的肠道菌群移植到正常小鼠体内，观察其对正常小鼠的影响，确定肠道菌群在疾病发展中的作用。同时，结合代谢组学分析，对小鼠肠道菌群代谢产物进行检测，特别是与尿酸代谢相关的代谢产物，以揭示肠道菌群与尿酸代谢之间的相互作用。

参考文献

- [1] Wang T, Lv ZQ, Wen Y, et al. Associations of plasma multiple metals with risk of hyperuricemia: a cross-sectional study in a mid-aged and older population of China [J]. *Chemosphere*, 2022, 287 (3): 132305.
- [2] Kuo CF, Grainge MJ, Zhang WY, et al. Global epidemiology of gout: prevalence, incidence and risk factors [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2015, 11 (11): 649-662.
- [3] Mount DB. The kidney in hyperuricemia and gout [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2013, 22 (2): 216-223.
- [4] Gonick HC, Rubini ME, Gleason IO, et al. The renal lesion in gout [J]. *Ann Intern Med*, 1965, 62: 667-674.
- [5] Bardin T, Richette P. Impact of comorbidities on gout and hyperuricemia: an update on prevalence and treatment options [J]. *BMC Med*, 2017, 15 (1): 123.
- [6] Peng A, Lin LZ, Zhao MM, et al. Identifying mechanisms underlying the amelioration effect of *Chrysanthemum morifolium* Ramat Boju extract on hyperuricemia using biochemical characterization and UPLC-ESI-QTOF/MS-based metabolomics [J]. *Food Funct*, 2019, 10 (12): 8042-8055.
- [7] Chen CH, Chen CB, Chang CJ, et al. Hypersensitivity and cardiovascular risks related to allopurinol and febuxostat therapy in asians: a population-based cohort study and meta-analysis [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2019, 106 (2): 391-401.
- [8] Dalbeth N, Gosling AL, Gaffo A, et al. Gout [J]. *The Lancet*, 2021, 397 (10287): 1843-1855.
- [9] Torres RJ, Puig JG. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPR) deficiency: Lesch-Nyhan syndrome [J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2007, 2 (1): 48.
- [10] Maiuolo J, Oppedisano F, Gratteri S, et al. Regulation of uric acid metabolism and excretion [J]. *Int J Cardiol*, 2016, 213: 8-14.
- [11] Nyberg F, Hou SM, Pershagen G, et al. Dietary fruit and vegetables protect against somatic mutation in vivo, but low or high intake of carotenoids does not [J]. *Carcinogenesis*, 2003, 24 (4): 689-696.
- [12] 刘景芳, 邵春海, 张家瑛, 等. 高尿酸血症患者血尿酸与血清 HGPRT、VitC 水平的相关性 [J]. *中国临床医学*, 2018, 25 (1): 22-26.
- [13] Bao RX, Chen Q, Li Z, et al. Eurycomanol alleviates hyperuricemia by promoting uric acid excretion and reducing purine synthesis [J]. *Phytomedicine*, 2022, 96: 153850.
- [14] 胡向阳, 李安, 林春淑, 等. 三丫苦叶提取物对高尿酸血症模型大鼠尿酸合成相关酶调节作用研究 [J]. *实用中医药杂志*, 2020, 36 (12): 1520-1522.
- [15] 李凯文. 肾茶改善高尿酸血症肾病的作用和机制研究 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2023.
- [16] Wang X, Wang CP, Hu QH, et al. The dual actions of Sanmiao wan as a hypouricemic agent: down-regulation of hepatic XOD and renal mURAT1 in hyperuricemic mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 128 (1): 107-115.
- [17] Griebisch A, Zollner N. Effect of ribomononucleotides given orally on uric acid production in man [J]. *Adv Exp Med Biol*, 1974, 41 (8): 443-449.
- [18] Dong Y, Huang HH, Zhao MM, et al. Mechanisms underlying the xanthine oxidase inhibitory effects of dietary flavonoids galangin and pinobanksin [J]. *J Funct Foods*, 2016, 24: 26-36.
- [19] 谭明亮, 陈刚. 天然产物来源的黄嘌呤氧化酶抑制剂研究进展 [J]. *重庆工商大学学报*, 2014, 31 (2): 86-90.
- [20] 王亚楠, 张志军, 李会珍. 紫苏叶提取物对黄嘌呤氧化酶的抑制作用 [J]. *中成药*, 2020, 42 (2): 462-465.
- [21] 杜洪芳, 贾献慧, 赵焕新, 等. 土荆皮化学成分及其抗黄嘌呤氧化酶活性研究 [J]. *食品与药品*, 2019, 21 (6): 444-450.
- [22] 马二秀, 李思颖, 程雪瑶, 等. 藤茶总黄酮抗高尿酸血症及肾功能保护作用研究 [J]. *中药药理与临床*, 2021, 37 (3): 80-85.
- [23] Zhao QM, Zhao HT, Yun XY, et al. Study on the anti-gout activity of chlorogenic acid: improvement on hyperuricemia and gouty inflammation [J]. *Am J Chin Med*, 2014, 42 (6): 1471-1483.
- [24] Xiang HL, Lei H, Liu ZY, et al. Network pharmacology and molecular docking analysis on molecular targets: mechanisms of baicalin and baicalein against hyperuricemic nephropathy [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2021, 424: 115594.
- [25] 卢昊, 陈曦文, 要辉, 等. 高良姜素防治尿酸性肾损伤的药理作用及细胞机制研究 [J]. *中南药学*, 2020, 18 (7): 1098-1102.
- [26] 刘恺, 林华, 高丽辉, 等. 3, 5, 2', 4'-四羟基查尔酮对小鼠尿酸及尿酸合成相关酶基因的影响 [J]. *天然产物研究与开发*, 2016, 28 (1): 131-135.
- [27] Kottgen A, Albrecht E, Teumer A, et al. Genome-wide association analyses identify 18 new loci associated with serum urate concentrations [J]. *Nat Genet*, 2013, 45 (2): 145-154.
- [28] Nakatochi M, Kanai M, Nakayama A, et al. Genome-wide meta-analysis identifies multiple novel loci associated with serum uric acid levels in Japanese individuals [J]. *Commun Biol*, 2019, 2: 115.
- [29] Kou LF, Sun R, Ganapathy V, et al. Recent advances in drug delivery via the organic cation/carnitine transporter 2 (OCTN2/SLC22A5) [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2018, 22 (8): 715-726.
- [30] Roughley MJ, Belcher J, Mallen CD, et al. Gout and risk of chronic kidney disease and nephrolithiasis: meta-analysis of observational studies [J]. *Arthritis Res Ther*, 2015, 17 (1): 90.
- [31] Huang LP, Deng J, Chen GT, et al. The anti-hyperuricemic effect of four astilbin stereoisomers in *Smilax glabra* on hyperuricemic mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 238: 111777.

- [32] Cheng SP, Sun HX, Li XM, et al. Effects of Alismatis Rhizoma and Rhizoma Smilacis Glabrae decoction on hyperuricemia in rats [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019, 2019: 4541609.
- [33] Su JX, Wei YH, Liu ML, et al. Anti-hyperuricemic and nephroprotective effects of Rhizoma Dioscoreae Septemlobae extracts and its main component dioscin via regulation of mOAT1, mURAT1 and mOCT2 in hypertensive mice [J]. Arch Pharm Res, 2014, 37 (10): 1336-1344.
- [34] Zhang Y, Jin LJ, Liu JC, et al. Effect and mechanism of dioscin from Dioscorea spongiosa on uric acid excretion in animal model of hyperuricemia [J]. J Ethnopharmacol, 2018, 214: 29-36.
- [35] Zhou YL, Zhang XG, Li C, et al. Research on the pharmacodynamics and mechanism of Fraxini Cortex on hyperuricemia based on the regulation of URAT1 and GLUT9 [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 106: 434-442.
- [36] Li JM, Zhang X, Wang X, et al. Protective effects of Cortex fraxini coumarines against oxonate-induced hyperuricemia and renal dysfunction in mice [J]. Eur J Pharmacol, 2011, 666 (1): 196-204.
- [37] Wang YM, Kong WKX, Wang L, et al. Multiple-purpose connectivity map analysis reveals the benefits of esculetin to hyperuricemia and renal fibrosis [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21 (20): 7695.
- [38] Ai GX, Huang RL, Xie JH, et al. Hypouricemic and nephroprotective effects of palmatine from Cortex Phellodendri Amurensis: a uric acid modulator targeting Keap1-Nrf2/NLRP3 axis [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 301: 115775.
- [39] 吴剑霞, 乐心逸, 张蓓, 等. 鸡矢藤环烯醚萜苷类化合物在尿酸性肾病中的应用 [J]. 中国医药工业杂志, 2020, 51 (7): 908-915.
- [40] 区淑雅, 李灿涛, 邵颖颖, 等. 龙胆苦苷基于尿酸转运蛋白和 NLRP3 炎性小体信号通路改善小鼠高尿酸血症和肾脏炎症 [J]. 中南药学, 2021, 19 (11): 2334-2340.
- [41] 朱春胜, 张冰, 林志健, 等. 菊苣降尿酸有效成分及机制研究 [J]. 中草药, 2017, 48 (5): 957-961.
- [42] 李晓雨. 菊苣上调 ALPK1 抑制 URAT1 对氧嗉酸钾和酵母浸粉联合诱导高尿酸血症小鼠的降尿酸机制研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2023.
- [43] Hosomi A, Nakanishi T, Fujita T, et al. Extra-renal elimination of uric acid via intestinal efflux transporter BCRP/Abcg2 [J]. PLoS One, 2012, 7 (2): e30456.
- [44] Debusch BJ, Kluth O, Fujiwara H, et al. Early-onset metabolic syndrome in mice lacking the intestinal uric acid transporter SLC2A9 [J]. Nat Commun, 2014, 5: 4642.
- [45] Chen M, Ye CY, Zhu JN, et al. Bergenin as a novel urate-lowering therapeutic strategy for hyperuricemia [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 703.
- [46] 张永琪, 陈杰伟, 叶博闻, 等. 四妙丸上调高尿酸血症大鼠小肠 ABCG2 表达促进肠道尿酸排泄的作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28 (22): 33-39.
- [47] 冯在亮, 刘正奇, 曹跃朋, 等. 苗药痛风停汤对高尿酸模型大鼠肠道 ABCG2 基因表达的影响 [J]. 贵州中医药大学学报, 2021, 43 (6): 16-20.
- [48] 丁坤, 曹文富, 张永越, 等. 祛湿涤浊汤对高尿酸血症大鼠尿酸转运蛋白的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35 (8): 1514-1520.
- [49] 张洪长, 张莹, 律广富, 等. 葛根素对人肾近曲小管上皮细胞 ABCG2 表达影响 [J]. 上海中医药杂志, 2016, 50 (3): 74-77.
- [50] 徐象威, 牛艳芬, 高丽辉, 等. 基于肠道尿酸转运体 ABCG2 的芒果苷降尿酸作用机制分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24 (17): 145-149.
- [51] Tilg H, Zmora N, Adolph TE, et al. The intestinal microbiota fuelling metabolic inflammation [J]. Nat Rev Immunol, 2020, 20 (1): 40-54.
- [52] Shao TJ, Shao L, Li HC, et al. Combined signature of the fecal microbiome and metabolome in patients with gout [J]. Front Microbiol, 2017, 8: 268.
- [53] Yun Y, Yin H, Gao ZY, et al. Intestinal tract is an important organ for lowering serum uric acid in rats [J]. PLoS One, 2017, 12 (12): e0190194.
- [54] Cao T, Li XY, Mao T, et al. Probiotic therapy alleviates hyperuricemia in C57BL/6J mouse model [J]. Allied Academies, 2017, 28 (5): 2244-2249.
- [55] Pickard JM, Zeng MY, Caruso R, et al. Gut microbiota: role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease [J]. Immunol Rev, 2017, 279 (1): 70-89.
- [56] Roxon JJ, Ryan AJ, Wright SE. Reduction of tartrazine by a Proteus species isolated from rats [J]. Food Cosmet Toxicol, 1966, 4 (4): 419-426.
- [57] 王力, 方志荣, 沈雅庭, 等. 酪酸梭菌对高尿酸血症大鼠血尿酸及炎性因子水平的影响 [J]. 南方医科大学学报, 2017, 37: 678-682.
- [58] Crane JK. Role of host xanthine oxidase in infection due to enteropathogenic and Shiga-Toxicogenic Escherichia Coli [J]. Gut Microbes, 2013, 4 (5): 388-391.
- [59] Hiaro TR, Soto R, Stephens WZ, et al. A member of the gut mycobiota modulates host purine metabolism exacerbating colitis in mice [J]. Sci Transl Med, 2017, 9 (380): eaaf9044.
- [60] Zhao S, Feng PY, Hu XG, et al. Probiotic Limosilactobacillus fermentum GR-3 ameliorates human hyperuricemia via degrading and promoting excretion of uric acid [J]. iScience, 2022, 25 (10): 105198.
- [61] He SQ, Xiong QQ, Tian C, et al. Inulin-type prebiotics reduce serum uric acid levels via gut microbiota modulation: a randomized, controlled crossover trial in peritoneal dialysis patients [J]. Eur J Nutr, 2022, 61 (2): 665-677.
- [62] 邓英, 何春阳, 唐艳, 等. 短乳杆菌 DM9218 对高果糖饮食诱导的小鼠高尿酸血症的缓解作用及机制研究 [J]. 中国微生物生态学杂志, 2017, 29 (12): 4.
- [63] Cao JY, Liu QQ, Hao HN, et al. Lactobacillus paracasei

- X11 ameliorates hyperuricemia and modulates gut microbiota in mice [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 940228.
- [64] Cao JY, Wang T, Liu YS, et al. Lactobacillus fermentum F40-4 ameliorates hyperuricemia by modulating the gut microbiota and alleviating inflammation in mice [J]. *Food Funct*, 2023, 14 (7): 3259-3268.
- [65] Man SL, Liu TH, Yao Y, et al. Friend or foe? The roles of inulin-type fructans [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 252 (1): 117155.
- [66] Samuel BS, Shaito A, Motoike T, et al. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105 (43): 16767-16772.
- [67] Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells [J]. *Nature*, 2013, 504 (7480): 446-450.
- [68] Rosser EC, Piper CJM, Matei DE, et al. Microbiota-derived metabolites suppress arthritis by amplifying aryl-hydrocarbon receptor activation in regulatory B cells [J]. *Cell Metab*, 2020, 31 (4): 837-851.
- [69] 于栋华, 王晓菲, 王宇, 等. 穿山龙总皂苷对高尿酸血症大鼠肠道菌群和短链脂肪酸代谢的影响 [J]. *中医学报*, 2023, 51 (7): 27-33.
- [70] 郭璐. 基于肠道菌群研究落新妇苷对肾损伤小鼠尿酸排泄的促进作用及机制 [D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2020.
- [71] Lin XY, Shao TJ, Huang L, et al. Simiao decoction alleviates gouty arthritis by modulating proinflammatory cytokines and the gut ecosystem [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11:955.
- [72] Shan BX, Wu MY, Chen T, et al. Berberine attenuates hyperuricemia by regulating urate transporters and gut microbiota [J]. *Am J Chin Med*, 2022, 50 (8): 21-23.
- [73] Dalbeth N, Kalluru R, Aati O, et al. Tendon involvement in the feet of patients with gout: a dual-energy CT study [J]. *Ann Rheum Dis*, 2013, 72 (9): 1545-1548.
- [74] Martillo MA, Nazzari L, Crittenden DB. The crystallization of mono-sodium urate [J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2014, 16 (2): 1-13.
- [75] Dang WT, Xu D, Zhou JG. Effect of berberine on activation of TLR4-NF κ B signaling pathway and NLRP3 inflammasome in patients with gout [J]. *Chin J Integr Med*, 2023, 29 (1): 10-18.
- [76] Liu HJ, Pan XX, Liu BQ, et al. Grape seed-derived procyanidins alleviate gout pain via NLRP3 inflammasome suppression [J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14 (1): 74.
- [77] Wu CX, Li FF, Zhang XX, et al. (-)-Epicatechin ameliorates monosodium urate-induced acute gouty arthritis through inhibiting NLRP3 inflammasome and the NF- κ B signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 799552.
- [78] Liang GY, Nie YC, Chang YB, et al. Protective effects of *Rhizoma smilacis glabrae* extract on potassium oxonate- and monosodium urate-induced hyperuricemia and gout in mice [J]. *Phytomedicine*, 2019, 59: 152772.
- [79] 刘建鑫, 揭珊珊, 陈冰, 等. 基于 NLRP3 炎性小体和 TLR4/NF- κ B 信号通路探讨黄连解毒汤治疗急性痛风性关节炎的作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29 (23): 1-7.
- [80] 刘翠玲, 梁奇, 梁雁翔, 等. 参苓白术散对尿酸钠诱导急性痛风性关节炎模型大鼠的作用机制研究 [J]. *时珍国医国药*, 2022, 33 (6): 1311-1313.
- [81] 李国莺, 章维志, 姜璐, 等. 萹藤总皂苷对尿酸钠诱导 THP-1 细胞 Toll 样受体 / 核转录因子 - κ B (TLR/NF- κ B) 信号通路的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26 (5): 34-41.
- [82] 沈瑞明, 马丽辉, 郑颜萍. 木犀草素通过 TLR/MyD88/NF- κ B 通路参与急性痛风性关节炎大鼠的抗炎作用 [J]. *中南大学学报 (医学版)*, 2020, 45 (2): 115-122.

(收稿日期: 2023-09-18; 修回日期: 2023-11-10)

溶瘤病毒作为抗肿瘤药治疗肝癌的研究进展

刘英峰, 宋亚刚, 苗明三* (河南中医药大学, 郑州 450046)

摘要: 肝癌是全球第六大最常诊断的癌症, 也是第三大最常见的癌症死亡原因, 据相关数据推测, 预计到 2025 年, 每年将有超过 100 万人受到肝癌的影响。现有的指南推荐治疗方案, 仍然无法根治肝癌, 临床也仍然面临着高复发率、高死亡率、高转移率等窘境。采用溶瘤病毒作为治疗肿瘤的药物, 是一种全新的治疗方式, 具有一定的可行性。溶瘤病毒是天然存在或经过改造的病毒, 其具有高选择性地复制和诱导细胞病变效应的能力, 这些特性使它们非常适合用于癌症的治疗。本文通过对目前的溶瘤病毒种类及其作用机制, 目前存在的问题, 进行归纳整理。以期能为肝癌的治疗研究提供参考, 同时对于拓展新的疗法, 帮助更多的患者具有重要意义。

关键词: 肝癌; 免疫疗法; 溶瘤病毒

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)07-1872-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.031

Research advance in oncolytic viruses as anticancer agents for hepatocellular carcinoma

LIU Ying-feng, SONG Ya-gang, MIAO Ming-san* (*Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046*)

Abstract: Liver cancer is the sixth most commonly diagnosed cancer worldwide and the third most common cause of cancer death, and is expected to affect more than 1 million people annually by 2025. The existing guideline recommended treatment plan, still can not provide complete cure for liver cancer, and clinical doctors still face high recurrence rate, high mortality, high metastasis rate and other problems. Oncolytic viruses are naturally existing or modified viruses. Oncolytic viruses can selectively replicate and induce cytopathic effects. These characteristics make them very suitable for cancer. This paper summarized the types, mechanism and existing problems of oncolytic viruses, aiming to provide reference for the treatment of liver cancer, developing new therapies and helping more patients.

Key words: liver cancer; immunotherapy; oncolytic virus

肝癌是全球第六大最常诊断的癌症, 也是第三大最常见的癌症死亡原因^[1]。肝癌的治疗目前仍然是一个全球性的挑战难题, 在全球范围内其发病率逐年增长, 据相关数据推测, 预计到 2025 年, 每年将有超过 100 万人受到肝癌的影响^[2]。肝癌有多种致病因素, 如大量饮酒、肥胖、糖尿病、摄入大量黄曲霉毒素、乙型肝炎病毒感染等, 其中乙型肝炎病毒感染是肝癌发展的最显著的危险因素, 在乙型肝炎高度流行地区, 母婴传播造成这些地区的肝癌发病率远高于其他地区^[3]。肝细胞性肝癌是最常见的肝癌, 约占 90%, 在发

率上, 男性发病率高于女性。

目前肝癌诊治指南上推荐肝癌的治疗手段, 主要是通过肝切除、肝移植、药物治疗。系统抗肿瘤药物治疗包括: 一线治疗, 阿替利珠单抗+贝伐单抗类似物、信迪利单抗+贝伐单抗类似物; 多纳非尼、仑伐替尼、索拉非尼; FOLFOX^[4]等。肝细胞性肝癌的常规治疗策略虽然不断地进步, 但最常见的原发性肝癌类型, 仍然面临高术后复发率, 高移植失败率, 和对化疗或分子靶向药物的耐药性^[5]等一系列的难题。当下的治疗方案虽然延长了患者的生存时

基金项目: 岐黄学者 (国中医药人教函 2022-6); 河南省重大公益专项 (No.201300310100); 国家中医药管理局联合开放课题 (No. GZY-KJS-2022-040-1)。

作者简介: 刘英峰, 男, 在读硕士研究生, 主要从事肿瘤机制研究, email: liuyingfeng45@163.com *通信作者: 苗明三, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药药理研究, email: miaomingsan@163.com

间,但是对于患者的生存质量并没有得到良好的改善。一些常见的肝细胞性肝癌突变,如端粒酶逆转录酶(TERT)、连环蛋白β1(CTNNB1)和肿瘤蛋白p53(TP53)基因突变,是不可治愈的^[6]。针对当下的现状,急需寻找新的解决方案。肝癌干细胞是具有干细胞特征的肝细胞性肝癌细胞的一个独特子集,它决定了肿瘤的分层组织,并导致了治疗抵抗和肿瘤复发^[7]。溶瘤病毒具有高选择性地复制和诱导细胞病变效应的特性,这些特性使得溶瘤病毒有望改善传统疗法中的难题。因此,本文对溶瘤病毒用于肝癌的治疗研究进展进行归纳整理具有重要的现实意义。

1 免疫疗法

有病例报道指出,新型冠状病毒感染(COVID-19)的既往确诊癌症患者在未接受任何类型化疗、放疗或手术干预的情况下,身体上某些部位肿瘤自发地得到缓解^[8]。免疫系统通常分为两个方面,先天免疫和后天免疫(也叫适应性免疫),它们共同执行免疫监测,区分自我和非自我,自我和非自我之间的内在区别发生在生化水平上,包括细胞上的DNA组成和糖蛋白结构。即使是最微小的抗原也可以通过免疫反应检测和攻击,机体依靠本身免疫反应在内的各种免疫性机制击败恶性肿瘤^[9]。

在某些病理微环境存在的情况下,肿瘤细胞由于驱动突变的积累而产生的下调通路阻碍了免疫细胞的细胞毒作用发挥其效应功能。一些干扰肿瘤清除的耐受机制包括HLA-I下调、促进转化生长因子和血管内皮生长因子(VEGF)活性以及肿瘤细胞释放白细胞介素-10和白细胞介素-6^[10],从而导致恶性肿瘤的发生和增殖。免疫治疗的核心目标是平衡免疫系统以消除肿瘤细胞,同时不产生导致免疫治疗局限性的未经检查的自身免疫炎症反应,先天免疫仅限于细胞因子的释放,这些细胞因子招募免疫细胞以开始非特异性免疫反应^[11]。

免疫疗法被认为是手术、放疗和化疗以及靶向治疗后癌症治疗的“第五支柱”^[12]。与常见的癌症疗法不同,免疫疗法刺激免疫系统能根除肿瘤细胞,并诱导、恢复或增强抗肿瘤免疫应答,进而抑制肿瘤进展复发和转移,基于免疫的疗法作为一种新颖的治疗方法的集合,已经改变了传统肿瘤学的治疗方向^[13]。

2 溶瘤病毒

2.1 溶瘤病毒的介绍

从物质基础上来说,溶瘤病毒属于生物制品的范畴,但从美国FDA对于基因治疗药物的概念,溶瘤病毒也属于基因治疗药物中的一种^[14]。采用溶瘤病毒作为药物是属于免疫疗法中治疗肿

瘤的一种选择,利用野生型或基因工程病毒在肿瘤细胞中的选择性复制,最终导致肿瘤细胞裂解而不损害正常细胞^[15]。

溶瘤病毒疗法,具有广泛的前景和应用的可能性。溶瘤病毒是天然存在或经过改造的,具有优先感染、复制和裂解恶性肿瘤细胞,以及激活免疫应答的独特功能^[16]。溶瘤病毒的一个重要特性是它们有选择性地复制和诱导细胞病变效应,非常适合癌症免疫治疗。因此溶瘤病毒在肿瘤治疗中的应用范围逐渐拓宽,因为它们引发T细胞应答,进而引发抗肿瘤免疫;其本质上是免疫原性的,因此能够触发抗肿瘤免疫应答等。

2.2 溶瘤病毒分类及其机制

溶瘤病毒主要分为两种:天然病毒和转基因病毒。目前大部分的研究者研究的溶瘤病毒都是经过基因修饰的,以提高病毒的选择性复制和溶细胞能力,增加病毒对肿瘤细胞的靶向性、增强人体的抗肿瘤免疫反应等^[17]。溶瘤病毒的主要作用机制有以下四个方面:溶瘤病毒对肿瘤细胞表面受体的靶向作用^[18-19];溶瘤病毒对肿瘤细胞特定信号通路的作用^[20];溶瘤病毒增强机体抗肿瘤免疫反应^[21];溶瘤病毒能通过旁观者效应间接杀伤未被感染的肿瘤细胞^[22]。具体作用机制见图1。

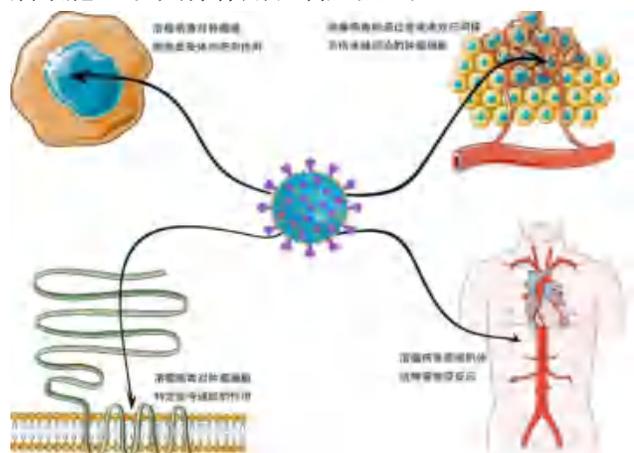


图1 溶瘤病毒的机制作用

Fig 1 Mechanism of oncolytic virus

2.3 溶瘤病毒治疗肝癌的临床前研究

2.3.1 新城疫病毒(newcastle disease virus, NDV)

NDV是一种正在研究中的溶瘤病毒,用于治疗肿瘤,虽然它在鸟类中具有传染性,但在人类中毒性较小。因此,生物安全水平相对较高^[23]。有研究者^[20]发现了野生型新城疫病毒HK84株(NDV/HK84),在体外和体内实验中测试NDV在HCC中的溶瘤作用。结果NDV/HK84在不影响健康细胞的情况下杀死人SK-HEP-1 HCC细胞,通过高通量RNA测序表明,NDV/HK84的溶瘤活性依赖于I型干扰素信号的激活。

2.3.2 Morreton 病毒 (MORV) MORV 是一种溶瘤性水疱病毒, 与水疱性口腔炎病毒 (VSV) 在基因上不同, 在具有免疫能力的同基因小鼠 CCA 模型中, MORV (1×10^7 TCID₅₀) 的单次瘤内治疗引发了强大的抗肿瘤免疫反应, 导致实质性的肿瘤消退和疾病控制, 剂量比 VSV (1×10^8 TCID₅₀) 低。MORV 导致 CD8⁺ 细胞毒性 T 细胞增加, 而肿瘤相关巨噬细胞和粒细胞或单核细胞髓系衍生抑制细胞无代偿性增加, 野生型 MORV 可以通过免疫介导和免疫非依赖机制诱导有效的肿瘤消退, 而无剂量限制性不良事件^[21]。

2.3.3 啮齿动物原细小病毒 H-1 (H-1PV, ParvOryx) H-1PV 是一种小型无包膜单链 DNA 病毒, 其天然宿主为小鼠^[24], Hajda 等^[25] 开展的 II 期临床试验, 纳入了 7 例胰腺导管腺癌患者和至少 1 例肝转移, ParvOryx 连续 4 d 静脉给药, 间歇适应 1 d, 此后 6 ~ 13 d 病灶内注射给药, 研究了 3 个递增剂量水平, 并在第 28 日开始吉西他滨治疗。结果 ParvOryx 表现出极好的耐受性, 无剂量限制性毒性, 根据 RECIST 标准, 1 例患者确认部分缓解, 1 例患者显示未确认部分缓解。ParvOryx 通过调控病毒 DNA 复制和基因转录, 影响肿瘤细胞的增殖^[25]。

2.3.4 呼肠孤病毒 (reoviruses) Kazemi 等^[26] 通过空斑试验以估计病毒数量并确定感染复数, 评价呼肠孤病毒对肝癌中的肿瘤细胞的影响, 在感染后不同时间间隔评估了呼肠孤病毒 RNA 的复制、病毒蛋白的产生、细胞病变效应和肿瘤细胞活力, 最终结果表明, 呼肠孤病毒可以破坏肝癌中的肿瘤细胞。

2.3.5 牛痘病毒 (cowpox virus) 重组牛痘病毒 JX-594 是一种携带粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 的溶瘤病毒, 主要通过病毒复制和诱导肿瘤特异性免疫而发挥作用, 肿瘤细胞可被病毒复制破坏, 通过表达 GM-CSF, 在细胞表面存在的地方有效诱导抗肿瘤免疫应答^[27]。在 II 期临床试验中, Pexa-Vec (JX-594) 治疗 HCC 肝内反应率为 62%, 高剂量给药组与低剂量给药组中位生存期分别为 14.1 个月及 6.7 个月, 初步验证了 PexaVec (JX-594) 对 HCC 治疗具有一定疗效^[28]。

2.3.6 腺病毒 (adenovirus) 利用间充质干细胞 (MSCs) 的肿瘤归巢特性, 外源性静脉注射由肝癌溶瘤腺病毒 (HCC-o Ad) 转染的 MSCs, 即肝癌靶向载溶瘤腺病毒 MSCs (HCC-o Ad/MSC), 正常氧和缺氧条件下均能有效体外裂解 HCC 细胞, 重组腺病毒可有效诱导细胞凋亡, 抑制肿瘤转移^[29]。

2.3.7 单纯疱疹病毒 (HSV) T-Vec 是一种由 1 型单纯疱疹病毒通过基因工程改造的溶瘤病毒, 瘤

内注射 T-Vec 和 / 或 RFH 治疗裸鼠 HCC 发现, 无论体外实验还是体内实验, 当 T-Vec 和 RFH 联合治疗时, HCC 细胞存活率均降低; 体内实验中联合治疗组肿瘤体积最小^[30]。经过基因修饰的单纯疱疹病毒, 可促进 T 细胞的激活, 增强病毒的溶瘤能力, 同时能降低不良反应发生率^[31]。

相关溶瘤病毒及其机制, 见表 1。

表 1 相关溶瘤病毒及其机制

种类	机制
NDV	依赖于 I 型干扰素信号的激活 ^[20]
MORV	通过免疫介导和免疫非依赖机制诱导有效的肿瘤消退 ^[21]
H-1PV	调控病毒 DNA 复制和基因转录 ^[25]
呼肠孤病毒	增强凋亡信号和使肿瘤细胞对化疗药物敏感来增强其抗肿瘤活性 ^[26]
牛痘病毒	通过病毒复制和诱导肿瘤特异性免疫而发挥作用 ^[27]
腺病毒	诱导细胞凋亡, 抑制肿瘤转移 ^[29]
HSV	促进 T 细胞的激活, 增强病毒的溶瘤能力 ^[31]

3 溶瘤病毒联合用药

3.1 溶瘤病毒联合免疫检查点抑制剂

溶瘤病毒联合免疫检查点抑制剂抗肿瘤方面表现出良好的抗肿瘤效果。例如, 在结肠癌和卵巢癌小鼠模型中感染缺失牛痘病毒后, 细胞 PD-L1 的表达水平明显增加, 联合使用牛痘病毒和抗 PD-L1 抗体, 两者显示出协同效应, 与牛痘病毒、抗 PD-L1 抗体分别单用相比具有更显著的生存优势^[32]。联合使用改良过的牛痘病毒 (表达 CXCL11) 和抗 PD-L1 抗体, 两者显示出协同效应, 具有显著的生存优势。溶瘤病毒和免疫检查点抑制剂在逆转肿瘤抑制微环境方面表现为协同作用, 另外, 溶瘤病毒本身的病毒原性和裂解肿瘤细胞后释放的肿瘤抗原等物质激活内源性免疫系统, 激活 DC 细胞对肿瘤细胞表面抗原的识别, 增强 CD8⁺ T 细胞的攻击和杀伤作用, 联合用药打破了实体瘤免疫抑制的微环境, 提高了溶瘤病毒的治疗上限^[33]。

3.2 溶瘤病毒联合小分子抑制剂

小分子抑制剂能通过多种路径控制肿瘤生长, 但其存在易产生耐药性, 且存在半衰期短、靶向特异性不强等问题, 通过与溶瘤病毒联合使用, 能使得两者的抑瘤能力得到提升^[34]。索拉非尼是一种小分子抑制剂, 它主要抑制肝癌细胞上高表达的血管内皮生长因子 (VEGF), 研究表明索拉非尼可通过抑制 VEGF 信号通路而增强溶瘤病毒对肿瘤血管的感染性, 临床上, 溶瘤牛痘病毒 JX-594 联合索拉非尼治疗肝癌, 可抑制肿瘤生长及转移^[35]。

3.3 溶瘤病毒联合化疗药物

呼肠孤病毒 REOLYSIN 联合抗肿瘤药物紫杉醇治疗携带 *p53* 突变的转移性乳腺癌的 II 期临床试验 (Clinical Trials.gov 注册: NCT01656538) 目前已完成, 这项开放标签、随机对照的研究总共纳入了 74 例转移性乳腺癌患者, 其中 82% (61 例) 患有 *p53* 突变型肿瘤。研究结果显示, 使用 REOLYSIN 联合紫杉醇治疗的 *p53* 突变型转移性乳腺癌患者 ($n = 30$) 的中位总生存期提高到了 20.9 个月, 而仅使用紫杉醇治疗的患者 ($n = 31$) 只有 10.4 个月^[36], 患者总生存期有所改善, 这表明了溶瘤病毒联合化疗药物能增强化疗药物的作用, 延长患者的生存时间。

4 当前溶瘤病毒作为药物治疗存在的难题

4.1 身体中既存免疫力削弱溶瘤病毒的疗效

虽然溶瘤病毒在临床中表现出巨大的治疗潜力, 但一些患者对溶瘤病毒疗法治疗并无免疫应答。有效的溶瘤病毒疗法治疗, 存在一个拟定限制因素, 就是患者身体中既存免疫力的影响。肝脏具有新陈代谢、葡萄糖储存、脂质和胆固醇稳态、异生素解毒和加工、生长信号的内分泌调节、血容量调节和免疫监视的功能^[37], 以上这些功能可能会造成溶瘤病毒的脱靶效应, 从而略微降低了肿瘤中的转基因表达。

虽然治疗性病毒通过血管内递送提供了到达播散性肿瘤的途径, 但是这种递送途径使病毒暴露于血液中的调理和失活因子, 这限制了有效的治疗性病毒剂量, 并且有助于激活全身毒性^[38]。

4.2 溶瘤病毒的不良反

溶瘤病毒的整体安全性相对较好, 目前在已有的人体临床试验研究中, 发现其主要的不良反应为发热、疲乏、寒战、恶心、呕吐、淋巴细胞减少、白细胞减少。在单纯疱疹病毒 G47 的 II 期临床试验中, 其不良反应主要是发热, 其次是呕吐、恶心、淋巴细胞减少和白细胞减少^[39]。在溶瘤病毒 OrientX010 的 I 期临床试验研究中, 主要不良反应为发热和注射部位反应^[40]。在溶瘤病毒 T-Vec 的 III 期临床试验中, 主要的不良反应为疲乏、寒战和发热^[41]。在溶瘤病毒 JX-594 的 II 期临床试验中, 主要不良反应是发热、疲乏、淋巴细胞减少^[42]。

5 讨论

现在肝癌依然存在高复发率, 高转移率, 肿瘤的复发及转移未能得到根治的问题。追根溯源, 要彻底解决肿瘤的复发及转移问题, 必须从诊治的治疗方案革新入手。采用溶瘤病毒治疗肿瘤这一方案, 是具有一定创新性的治疗方案。溶瘤病毒有选择性地复制和诱导细胞病变效应的特性,

同时又不会产生耐药性。在现有的临床试验中, 也证明使用溶瘤病毒治疗肿瘤的方法, 具有一定可行性。

溶瘤病毒疗法与常规的癌症治疗方法不同之处, 在于通过溶瘤病毒的表面蛋白, 刺激 T 细胞, 形成免疫记忆, 并诱导、恢复或增强抗肿瘤免疫应答, 导致抑制肿瘤进展, 复发和转移, 进而根除肿瘤细胞。虽然溶瘤病毒治疗肿瘤的方法, 看起来很有前景, 但我国溶瘤病毒领域技术专利质量仍然有待提升, 据现有的统计我国溶瘤病毒的发生专利运营的专利仅占 10.13%^[43]。需要相关部门加大对相关技术的资金支持, 以弥补不足。

未来的肿瘤治疗方案一定是围绕着高选择性、低不良反应的发展方向拓展, 把对人体的伤害降到最低。溶瘤病毒对肿瘤细胞的高选择性, 专一性, 能够高效杀死肿瘤细胞, 且不影响人体正常细胞, 符合对未来医疗的发展要求。

参考文献

- [1] Rungay H, Ferlay J, De Martel C, et al. Global, regional and national burden of primary liver cancer by subtype [J]. *Eur J Cancer*, 2022, 161 (1): 108-118.
- [2] Llovet J, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, et al. Hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Rev Dis Prim*, 2016, 2 (1): 16018.
- [3] Rungay H, Shield K, Charvat H, et al. Global burden of cancer in 2020 attributable to alcohol consumption: a population-based study [J]. *Lancet Oncol*, 2021, 22 (8): 1071-1080.
- [4] Zhou J, Sun HC, Wang Z, et al. Guidelines for diagnosis and treatment of primary liver cancer in China (2017 Edition) [J]. *Liver Cancer*, 2018, 7 (3): 235-260.
- [5] Li YT, Zhang RH, Xu Z, et al. Advances in nanoliposomes for the diagnosis and treatment of liver cancer [J]. *Int J Nanomedicine*, 2022, 17 (1): 909-925.
- [6] Chakraborty E, Sarkar D. Emerging therapies for hepatocellular carcinoma (HCC) [J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14 (11): 2798-2800.
- [7] Lee TKW, Guan XY, Ma S. Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma—From origin to clinical implications [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2022, 19 (1): 26-44.
- [8] Shin DH, Gillard A, Van Wieren A, et al. Remission of liquid tumors and SARS-CoV-2 infection: a literature review [J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2022, 26 (1): 135-140.
- [9] Abbott M, Ustoyev Y. Cancer and the immune system: the history and background of immunotherapy [J]. *Semin Oncol Nurs*, 2019, 35 (5): 150923-150928.
- [10] Barkhordar M, Rostami FT, Yaghmaie M, et al. Spontaneous complete remission of acute myeloid leukemia in the absence of disease-modifying therapy following severe pulmonary involvement by coronavirus infectious disease-19 [J]. *Case Rep Hematol*, 2022, 2022 (1): 1-10.
- [11] Mao XQ, Xu J, Wang W, et al. Crosstalk between cancer-as-

- sociated fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment: new findings and future perspectives [J]. *Mol Cancer*, 2021, 20 (1): 1-30.
- [12] Singh AK, Mcguirk JP. CAR T cells: continuation in a revolution of immunotherapy [J]. *Lancet Oncol*, 2020, 21 (3): e168-e178.
- [13] Mandlik DS, Mandlik SK, Choudhary HB. Immunotherapy for hepatocellular carcinoma: current status and future perspectives [J]. *World J Gastroenterol*, 2023, 29 (6): 1054-1060.
- [14] 张素才, 宫田田, 张冬霞, 等. 溶瘤病毒类药物非临床安全性评价的实践与思考 [J]. *中南药学*, 2019, 17 (9): 1391-1395.
- [15] Jin KT, Du WL, Liu YY, et al. Oncolytic virotherapy in solid tumors: the challenges and achievements [J]. *Cancers*, 2021, 13 (4): 588-600.
- [16] Chianese A, Santella B, Ambrosino A, et al. Oncolytic viruses in combination therapeutic approaches with epigenetic modulators: past, present, and future perspectives [J]. *Cancers*, 2021, 13 (11): 2761-2780.
- [17] 卢甲林, 袁萍, 孙军. 溶瘤病毒治疗非小细胞肺癌 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2023, 1 (1): 1-13.
- [18] Xiao C, Bator-Kelly CM, Rieder E, et al. The crystal structure of coxsackievirus A21 and its interaction with ICAM-1 [J]. *Structure*, 2005, 13 (7): 1019-1033.
- [19] Annels NE, Mansfield D, Arif M, et al. Phase I trial of an ICAM-1-targeted immunotherapeutic-coxsackievirus A21 (CVA21) as an oncolytic agent against non muscle-invasive bladder cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25 (19): 5818-5831.
- [20] Chen LM, Niu YD, Sun JT, et al. Oncolytic activity of wild-type newcastle disease virus HK84 against hepatocellular carcinoma associated with activation of type I interferon signaling [J]. *J Clin Transl Hepatol*, 2022, 10 (2): 284-296.
- [21] Thurber GM, Schmidt MM, Wittrup KD. Antibody tumor penetration: transport opposed by systemic and antigen-mediated clearance [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60 (12): 1421-1434.
- [22] Yu F, Wang X, Guo ZS, et al. T-cell engager-armed oncolytic vaccinia virus significantly enhances antitumor therapy [J]. *Mol Ther*, 2014, 22 (1): 102-111.
- [23] Schirmacher V, Van Gool S, Stuecker W. Breaking therapy resistance: an update on oncolytic newcastle disease virus for improvements of cancer therapy [J]. *Biomedicines*, 2019, 7 (3): 66-72.
- [24] Cotmore SF, Tattersall P. Parvoviruses: small does not mean simple [J]. *Ann Rev Virol*, 2014, 1 (1): 517-537.
- [25] Hajda J, Lehmann M, Krebs O, et al. A non-controlled, single arm, open label, phase II study of intravenous and intratumoral administration of ParvOryx in patients with metastatic, inoperable pancreatic cancer: ParvOryx02 protocol [J]. *BMC Cancer*, 2017, 17 (1): 576-582.
- [26] Kazemi R, Ataei-Pirkooch A, Aghasadeghi M, et al. The effects of human reoviruses on cancer cells derived from hepatocellular carcinoma biopsies [J]. *Clin Lab*, 2021, 67 (3): 1-8.
- [27] 石璠, 王海强, 郑淑丹, 等. 溶瘤病毒在肝细胞癌治疗中应用的研究进展 [J]. *国际消化病杂志*, 2023, 43 (1): 14-17.
- [28] Breitbach CJ, Moon A, Burke J, et al. A phase 2, open-label, randomized study of Pexa-Vec (JX-594) administered by intratumoral injection in patients with unresectable primary hepatocellular carcinoma [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1317 (1): 343-357.
- [29] Yoon AR, Hong J, Li Y, et al. Mesenchymal stem cell-mediated delivery of an oncolytic adenovirus enhances antitumor efficacy in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2019, 79 (17): 4503-4514.
- [30] Song JJ, Zhang F, Ji JS, et al. Orthotopic hepatocellular carcinoma: molecular imaging-monitored intratumoral hyperthermia-enhanced direct oncolytic virotherapy [J]. *Int J Hyperther*, 2019, 36 (1): 343-349.
- [31] 喻启桂. 肿瘤治疗的新突破: 溶瘤病毒治疗 [J]. *安徽医药*, 2018, 22 (1): 1-7.
- [32] Liu Z, Ravindranathan R, Kalinski P, et al. Rational combination of oncolytic vaccinia virus and PD-L1 blockade works synergistically to enhance therapeutic efficacy [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14754
- [33] 崔姣艳, 蔡世杰. 溶瘤病毒联合其他药物用于肿瘤治疗的研究进展 [J]. *中国新药杂志*, 2021, 30 (3): 246-253.
- [34] 陈琴, 黄承浩, 夏宁邵. 溶瘤病毒联合小分子抑制剂应用于肿瘤治疗的研究进展 [J]. *病毒学报*, 2017, 33 (5): 774-779.
- [35] Young YS, Narayanasamy B, Young WH, et al. Oncolytic virus-based immunotherapies for hepatocellular carcinoma [J]. *Mediators of Inflammation*, 2017, 2017 (4): 12.
- [36] Bernstein V, Ellard SL, Dent SF, et al. A randomized phase II study of weekly paclitaxel with or without pelareorep in patients with metastatic breast cancer: final analysis of Canadian Cancer Trials Group IND. 213 [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2018, 167 (2): 485-493.
- [37] Giraud J, Chalopin D, Blanc JFEDER, et al. Hepatocellular carcinoma immune landscape and the potential of immunotherapies [J]. *Front Immunol*, 2021, 12 (1): 655697.
- [38] Ochsenbein AF, Fehr T, Lutz C, et al. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies [J]. *Science*, 1999, 286 (5447): 2156-2159.
- [39] Todo T, Ito H, Ino Y, et al. Intratumoral oncolytic herpes virus G47 for residual or recurrent glioblastoma: a phase 2 trial [J]. *Nat Med*, 2022, 28 (8): 1630-1639.
- [40] Cui CL, Wang X, Lian B, et al. OrienX010, an oncolytic virus, in patients with unresectable stage III C-IV melanoma: a phase I b study [J]. *J Immunother Cancer*, 2022, 10 (4): 21-26.
- [41] Andtbacka RHI, Kaufman HL, Collichio F, et al. Talimogene laherparepvec improves durable response rate in patients with advanced melanoma [J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33 (25): 2780-2788.
- [42] Toulmonde M, Cousin S, Kind M, et al. Randomized phase 2 trial of intravenous oncolytic virus JX-594 combined with low-dose cyclophosphamide in patients with advanced soft-tissue sarcoma [J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15 (1): 149-158.
- [43] 尤瑾, 乔志伟, 邹玥, 等. 专利竞争视角下的溶瘤病毒药物发展状况研究 [J]. *中南药学*, 2022, 20 (11): 2671-2677.

(收稿日期: 2023-10-03; 修回日期: 2023-11-24)

靶向治疗 HER2 阳性乳腺癌患者的新型抗体药物偶联物： T-DM1 与 T-DXd

何明星¹, 张露^{2*}, 谭燕³ (1. 重庆市潼南区人民医院药剂科, 重庆 402660; 2. 重庆市垫江县人民医院药剂科, 重庆 408300; 3. 重庆市垫江县人民医院肿瘤科, 重庆 408300)

摘要: 抗体药物偶联物是一类很有前景的药物, 它利用单克隆抗体的特异性, 选择性地将所连接的细胞毒类药物递送至肿瘤细胞内, 通过增加抗肿瘤活性和降低脱靶毒性来达到更好的治疗效果。随着肿瘤精准治疗时代的到来, 恩美曲妥珠单抗 (T-DM1) 与德曲妥珠单抗 (T-DXd) 为 HER2 阳性乳腺癌患者带来了巨大希望, 也开启了 HER2 过表达及低表达乳腺癌患者治疗的新征程。本文就这两种药物的作用机制、适应证、有效性及安全性等方面进行论述, 对临床合理使用提供参考。

关键词: 恩美曲妥珠单抗; 德曲妥珠单抗; 抗体药物偶联物; HER2; 乳腺癌

中图分类号: R730.5 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)07-1877-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.032

A new type of antibody drug conjugate targeting HER2 therapy for breast cancer: T-DM1 and T-DXd

HE Ming-xing¹, ZHANG Lu^{2*}, TAN Yan³ (1. Department of Pharmacy, Tongnan People's Hospital, Chongqing 402660; 2. Department of Pharmacy, Dianjiang People's Hospital, Chongqing 408300; 3. Department of Oncology, Dianjiang People's Hospital, Chongqing 408300)

Abstract: Antibody drug conjugate is a promising class of drugs that utilize the specificity of monoclonal antibodies to selectively deliver the attached cytotoxic small molecules to the inside of tumor cells, achieving better results by increasing anti-tumor activity and decreasing off-target toxicity. With the advent of the era of precision tumor therapy, trastuzumab emtansine (T-DM1) and trastuzumab deruxtecan (T-DXd) have brought great hope for patients with human epidermal growth factor receptor 2 positive breast cancer, opening up a new phase in the treatment of HER2 overexpressing breast cancer and even some HER2 low-expressing breast cancer. This review discussed the mechanism of action, indication, efficacy and safety of T-DM1 and T-DXd, which may have an important guiding role for rational drug use.

Key words: T-DM1; T-DXd; antibody drug conjugate; HER2; breast cancer

乳腺癌是女性患者最常见的恶性肿瘤之一, 近年来发病率不断上升, 是全世界妇女死亡的第二大原因^[1]。根据患者基因突变情况、激素受体及细胞分子状态将乳腺癌分为四个亚型: LuminalA, LuminalB, HER2 过表达型和三阴型 (Basal-like 型)。乳腺癌的治疗方案因分子分型而异。目前有研究将免疫组织化学染色 (IHC) 1+ 或 IHC 2+ 且荧光免疫原位杂交 (FISH) 阴性归为 HER2 低表达^[2]。HER2 过表达约占乳腺癌患者的 20% 左右, 而 HER2 低表达占乳腺癌患者的 45% ~ 55%^[3]。

抗 HER2 靶向治疗可显著提高 HER2 阳性乳腺癌患者的存活率^[4]。抗体药物偶联物 (antibody drug conjugate, ADC) 的出现, 预示着乳腺癌的治疗迈向一个新的台阶。

ADC 类药物由三个重要结构组成: 针对特定细胞的抗体、连接子和用于杀死肿瘤细胞的细胞毒类药物 (有效载荷)^[5]。ADC 设计的目的是选择性地将细胞毒性药物直接输送到肿瘤细胞。这类药物的优点是结合了单克隆抗体的高选择性和细胞毒类药物的高杀伤作用^[6]。作为经典的 ADC, 恩

作者简介: 何明星, 男, 药师, 主要从事临床药学相关研究, email: 1339673861@qq.com * 通信作者: 张露, 女, 主管药师, 主要从事临床药学相关研究, email: 864121759@qq.com

美曲妥珠单抗 (trastuzumab emtansine, T-DM1) 已在 HER2 阳性乳腺癌患者新辅助化疗后残存侵袭病灶的辅助治疗和晚期患者解救治疗中广泛应用。新的 ADC 德曲妥珠单抗 (trastuzumab deruxtecan, T-DXd), 被发现可以改善耐药、转移、HER2 阳性及 HER2 低表达乳腺癌患者的总存活率。本文以“T-DM1, Trastuzumab Emtansine, T-DXd, Trastuzumab deruxtecan, 恩美曲妥珠单抗, 德曲妥珠单抗, Mechanism of action, Adverse reaction, Clinical trial”等为检索词, 检索 2013 年 1 月至 2023 年 8 月期间中国知网、万方、PubMed、Embase、ScienceDirect 等中外数据库收录的相关文献, 通过详细阅读, 比较两药的作用机制、有效性、安全性及未来发展方向, 希望能为临床合理应用提供指导。

1 作用机制

ADC 是一类靶向生物制剂, 由三部分组成: 特异性强及亲和力高的抗体、稳定的连接子及高效的小分子细胞毒类药物。其中抗体可选择性识别肿瘤细胞并与其结合, 为细胞毒类药物提供目标指导; 连接子为抗体和药物之间的桥梁, 控制肿瘤细胞内的药物释放, 连接子既要避免荷载的细胞毒药物在外周血过早释放, 造成系统毒性, 又要在内化进入肿瘤细胞后高效释放, 达到杀伤肿瘤细胞的目的; 细胞毒类药物需要具有一定的疏水性, 进入肿瘤细胞后摧毁肿瘤细胞。ADC 通过连接子将单克隆抗体偶联到细胞毒性药物, 利用大分子单抗对肿瘤表面抗原的特异性识别充当“定位导弹”, 将细胞毒性药物精准递送至肿瘤细胞内高效发挥作用。

1.1 T-DM1

T-DM1 作为首个获批上市的 ADC, 是由曲妥珠单抗和一种不可裂解硫醚连接子 [4-(*N*-马来酰亚胺基甲基), 环己烷-1-羧酸酯] 以及细胞毒性药物美坦新衍生物 (DM1) 构成^[7-8], 详见图 1。不可裂解连接子依赖于抗体分子的溶酶体降解, 与抗体的氨基酸残基形成不可还原的键, 在血液中更稳定, 半衰期更长, 脱靶毒性更低^[9], 这种方法提高了连接的稳定性。DM1 是一种强效微管聚合抑制剂, 体外研究表明, DM1 的效力比紫杉醇强 25 ~ 270 倍, 比阿霉素强 180 ~ 4000 倍; T-DM1 的药物与抗体分子比 (DAR) 为 3.5 : 1^[10-11]。T-DM1 与 HER2 的胞外结构域结合后, 形成的复合体被内化进肿瘤细胞, 然后通过一些蛋白酶将其活性代谢物 Lys-MCC-DM1 释放到细胞质中。SLC46A3 是将 Lys-MCC-DM1 从溶酶体释放到细胞质的直接转运蛋白^[12]。Lys-MCC-DM1 进入肿瘤细胞后释放的 DM1 可以与 β -1 微管蛋白结合, 抑制微管蛋白的聚合, 同时促进微管蛋白的解聚, 进而抑制微

管的形成, 发挥抗肿瘤作用^[13], 详见图 2。由于活性代谢物 Lys-MCC-DM1 是带电分子, 相对细胞膜是不通透的, 降低了 DM1 进入相邻细胞的可能性, 从而限制了对邻近细胞起细胞毒作用的可能性。T-DM1 未显示具有旁观者效应的证据, 推测可能也与其活性代谢物的低渗透性相关^[14]。

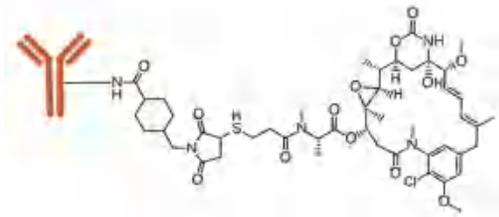


图 1 T-DM1 的结构

Fig 1 Structure of T-DM1

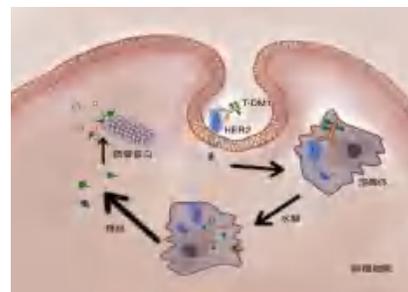


图 2 T-DM1 作用机制

Fig 2 Mechanism of action of T-DM1

1.2 T-DXd

T-DXd 是一种新型的 ADC, 由三部分^[15]组成: 人源化靶向 HER2 单抗、可裂解的四肽连接物及伊喜替康衍生物 (DXd), 详见图 3。DXd 为拓扑异构酶 I 抑制剂, Tamura 等^[16]的研究表明其抑制效力是伊立替康的活性代谢产物 SN-38 的 10 倍, T-DXd 的 DAR 值为 8 : 1, 可以携带更多的细胞毒性药物。由于亲水性可裂解连接体结构的开发, T-DXd 能在不影响 ADC 药代动力学特性的情况下, 以较高的 DAR 形成复合物, 从而表现出很强的抗肿瘤活性, 且携带的有效载荷与 T-DM1 有很大不同^[17]。这种新颖的连接物 - 有效载荷系统技术能够降低 ADC 的疏水性, 并有助于增加其 DAR 值, 详见表 1。一般来说 DAR 值越大, 复合物越不稳定, 清除率越高, 从而会限制疗效并增加体内毒性。但 T-DXd 采用新开发的连接体系统降低了 ADC 的疏水性, 确保稳定性的同时提高了其 DAR 值^[18]。T-DXd 在血浆中循环时, 细胞毒性有效载荷仍然牢固地结合在抗体分子上, 在与 HER2 结合时, 形成的复合物被内化, 并且被溶酶体酶裂解, 导致细胞毒性药物在细胞内释放, 详见图 4。由于 DXd 的高膜渗透性, DXd 可以对邻近的 HER2 阴性肿瘤细胞 (与 HER2 阳性细胞相邻的肿瘤细胞) 发挥旁观者效应。

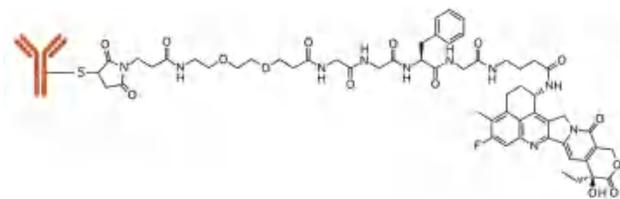


图 3 T-DXd 的结构图
Fig 3 Structure of T-DXd

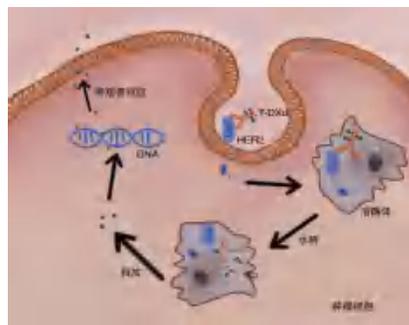


图 4 T-DXd 作用机制
Fig 4 Mechanism of action of T-DXd

2 适应证

T-DM1 于 2013 年获 FDA 批准上市用于治疗在曲妥珠单抗和紫杉醇类药物治疗期间或之后进

表 1 T-DM1 与 T-DXd 的结构差异

Tab 1 Structure difference between T-DM1 and T-DXd

药物	针对特定细胞的抗体	连接物	有效载荷	DAR 值
T-DM1	曲妥珠单抗	不可裂解硫醚连接子	美坦新衍生物	3.5 : 1
T-DXd	人源化靶向 HER2 单抗	可裂解的四肽连接物	伊喜替康衍生物	8 : 1

展的 HER2 阳性晚期乳腺癌。在 KATHERINE 研究^[19]中，新辅助化疗联合抗曲妥珠单抗靶向治疗后残留侵袭性的早期乳腺癌患者使用 T-DM1 (3.6 mg · kg⁻¹) 辅助治疗与曲妥珠单抗相比，无侵袭性疾病生存期 (IDFS) 的差异具有统计学意义。因此，该药的适应证扩大为接受紫杉醇类联合曲妥珠单抗方案为基础的新辅助治疗后仍残存侵袭性病灶的 HER2 阳性早期乳腺癌患者的辅助治疗。该研究也纳入部分亚洲人群，最终治疗效果在所有分析的亚组^[20]中是相似的。2023 版 CSCO《乳腺癌临床指南》推荐将 T-DM1 作为既往接受过抗 HER-2 治疗失败的 HER-2 阳性乳腺癌的首选治疗方案。

T-DXd 于 2019 年获 FDA 批准上市，用于治疗 HER2 阳性晚期乳腺癌患者后线治疗。Modi 等^[21]的研究发现对于 HER2 低表达的转移性乳腺癌患者，使用 T-DXd 靶向治疗是一种有效的治疗方法。T-DXd 于 2023 年 2 月 24 日获国家药品监督管理局 (NMPA) 批准上市，用于 HER2 阳性乳腺癌。该药适应证为：经抗 HER2 治疗不可切除 / 转移 HER2 阳性成人乳腺癌；HER2 低表达 (IHC 1 + / IHC 2 + 且 ISH -) 转移性乳腺癌二线；不可切除 / 转移性 HER2 阳性非小细胞肺癌；局部进展 / 转移性 HER2 阳性胃癌。

3 耐药机制

ADC 在临床应用中也会出现耐药。T-DM1 的耐药机制包括^[22]：高水平 pHER2 表达导致药物与 HER2 的结合受损；HER2 低表达肿瘤细胞导致 HER2 存在异质性；10 号染色体上缺失抑癌基因、磷酸酶和张力蛋白同源物 (PTEN)，导致 HER2 下游信号通路失调；因 HER2 不稳定，过度内循环导致溶酶体运输不足，使得 T-DM1 无法通过溶酶体

释放有效载荷^[22]。T-DXd 也会出现耐药性，但由于多药耐药区基因 (MDR) 生物学的复杂性，各种拓扑异构酶 I 抑制剂之间观察到的敏感性差异的机制仍有待阐明。针对 HER2、人表皮生长因子受体 3 (HER3) 和人滋养细胞表面抗原 2 (TROP2) 的抗体 -T 部分具有较强的治疗指数、更高的稳定性和改善瘤内药效学反应的特点。在低靶向表达和 MDR 表达阳性肿瘤中克服了同等 ADC 的内在或治疗耐药性。因此，选择适合的药物成分使游离有效载荷在溶酶体中降解后不会成为多药转运体的底物以及调节药物连接体结构，通过增加连接体的亲水性来降低药物的整体疏水性是克服多耐药的可行策略^[23]。此外，在 T-DXd 治疗失败后进行肿瘤再次活检也是可取的^[24]，以便于更好地为临床提供用药决策。

4 有效性

4.1 T-DM1

EMILIA 研究^[25]中，991 名曾使用过曲妥珠单抗和紫杉醇类药物治疗的不可切除局部晚期或转移性乳腺癌患者被随机分配到接受每 3 周一次 T-DM1 (3.6 mg · kg⁻¹) 治疗的实验组与每 21 日中 d1 ~ 14 口服拉帕替尼 1250 mg qd + 卡培他滨片 1000 mg · m⁻² bid 治疗的对照组。T-DM1 组的中位无进展生存期 (mPFS) 为 9.6 个月，对照组的 mPFS 为 6.4 个月 (HR = 0.65, 95%CI = 0.55 ~ 0.77, P < 0.001)。更重要的是，T-DM1 的中位总生存期 (mOS) 为 30.9 个月，而对照组的 mOS 仅为 25.1 个月 (HR = 0.68, 95%CI = 0.55 ~ 0.85, P < 0.001)。在 KAITLIN 研究^[26]中，旨在用 T-DM1 代替紫杉醇类药物和曲妥珠单抗来提高高风险 HER2 阳性早期乳腺癌患者的疗效，该研究结果显示只有在接受保乳治疗的亚组中，AC-THP (AC 方案序贯紫杉醇 + 曲妥珠单抗 + 帕妥

珠单抗)与 AC-KP (AC 方案序贯 T-DM1 + 帕妥珠单抗)相比, IDFS 具有略微的优势; 而其余亚组之间 IDFS 相似。在总体人群中, AC-THP 和 AC-KP 的 3 年 IDFS 分别为 94.2% (95%CI: 92.7 ~ 95.8) 和 93.1% (95%CI: 91.4 ~ 94.7)。说明曲妥珠单抗+帕妥珠单抗联合化疗仍然是 HER2 阳性早期高危乳腺癌患者的标准治疗, T-DM1 是否能在早期乳腺癌中降级治疗, 还需要进一步研究。

4.2 T-DXd

DESTINY-Breast01 研究^[27]发现, 在 T-DM1 难治或耐药的 HER2 阳性转移性乳腺癌患者中, T-DXd 显示出较高的活性, 治疗反应率为 60.9% (95%CI: 53.4 ~ 68.0), 临床获益率 76.1% (95% CI: 69.3 ~ 82.1), mPFS 为 16.4 个月 (95%CI: 12.7 个月未达), 其中 23.9% 的患者年龄 ≥ 65 岁。在 DESTINY-Breast02 研究^[28]中, 研究对象为 HER2 阳性无法切除或转移性乳腺癌, 且既往接受过 T-DM1 治疗后疾病进展的患者。608 名患者被随机分配为接受 T-DXd 治疗 ($n = 406$) 或医师选择的方案 (TPC) 治疗 ($n = 202$)。T-DXd 组 mPFS 为 17.8 个月 (95%CI: 14.3 ~ 20.8), 对照组 mPFS 为 6.9 个月 (95%CI: 5.5 ~ 8.4) ($HR = 0.36, 95\%CI: 0.28 \sim 0.45, P < 0.0001$)。T-DXd 组 mOS 为 39.2 个月 (95%CI: 32.7 ~ NE), 对照组 mOS 为 26.5 个月 (21.0 ~ NE) ($HR = 0.66, 95\%CI: 0.50 \sim 0.86, P = 0.0021$)。与 TPC 组相比, T-DXd 组获得更长的 PFS 和 OS, 差异具有统计学意义。DESTINY-Breast03 研究结果^[29]显示, T-DXd 组 mPFS 为 28.8 个月 (95%CI: 22.4 ~ 37.9), T-DM1 组 mPFS 为 6.8 个月 (5.6 ~ 8.2) ($HR = 0.33, 95\%CI: 0.26 \sim 0.43, P < 0.0001$), 且 mOS 未达到。在 HER2 阳性转移性乳腺癌患者中, 与 T-DM1 相比, T-DXd 提高了患者的 OS, 而且报告的 mPFS 也是最长的, 再次证明 T-DXd 是二线治疗的标准疗法。ESMO 大会上公布了 DESTINY-Breast04 研究细节^[30], 在 HER2 低表达转移性乳腺癌患者中, 使用 T-DXd 治疗的患者中, 有 52.3% 的患者有反应。试验结果显示 T-DXd 组的中位治疗时间为 8.2 个月 ($r = 0.2 \sim 33.3$), TPC 组的中位治疗时间为 3.5 个月 ($r = 0.3 \sim 17.6$), T-DXd 与 TPC 相比, 任何等级治疗相关不良事件的暴露调整发病率 (EAIRs) 较低^[31]。既往 HER2 低表达乳腺癌患者多按照三阴性乳腺癌进行治疗, 主要采取化疗的方式, 本研究初步证明了 T-DXd 在 HER2 低表达的转移性乳腺癌患者中具有较好的疗效和安全性。

5 安全性

ADC 相关的大多数不良反应在发生部位、发生率和严重程度与连接的细胞毒性药物相关。一

项关于靶向 HER2 的 ADC 治疗相关不良事件的荟萃分析^[32]纳入了 39 项研究, 涉及 5 种癌症类型的 7688 名患者, 分析显示最常见的 ADC 相关不良反应是恶心 (41.57%)、疲劳 (35.86%)、食欲下降 (28.84%)、头痛 (23.68%) 和血小板减少 (22.87%)。亚组分析显示不同癌症类型的发生率没有差异, 但 T-DXd 导致的间质性肺炎 (ILD), 比 T-DM1 更严重。T-DXd 导致 ILD 发生的机制可能是有效载荷的释放引起的脱靶毒性, 严重可能导致患者死亡。在 MARIANNE 研究^[33]中 T-DM1 组比曲妥珠单抗联合紫杉醇类药物治疗的方案耐受性更好, T-DM1 组因治疗中断的次数更少。一项关于 T-DXd 与 T-DM1 的头对头研究显示^[34], 两组任何级别药物相关不良事件发生率分别为 98.1% 和 86.6%, 3 级或 4 级药物相关不良事件发生率分别为 45.1% 和 39.8%, T-DXd 和 T-DM1 所致药物相关不良事件详见表 2。相比 T-DM1 而言, T-DXd 的不良事件发生率更高。ADC 也会导致一些严重的不良反应如 ILD 和心脏毒性, 但抗体分子成分相关的心脏毒性发生率较低^[35]。

表 2 T-DXd 和 T-DM1 导致停药的药物治疗相关性不良事件 (TEAEs) [n (%)]

Tab 2 Drug-related TEAEs that led to discontinuation in T-DXd and T-DM1 [n (%)]

由于 TEAE 导致的停药	T-DXd (n = 257)	T-DM1 (n = 261)
有任何与药物相关的 TEAE 停药例数	33 (12.8)	13 (5.0)
局限性肺炎	13 (5.1)	1 (0.4)
ILD	7 (2.7)	2 (0.8)
肺炎	3 (1.2)	0 (0.0)
血小板计数减少	2 (0.8)	4 (1.5)
组织肺炎	2 (0.8)	0 (0.0)
癫痫	1 (0.4)	0 (0.0)
乏力	1 (0.4)	0 (0.0)
低钾血症	1 (0.4)	0 (0.0)
中性粒细胞计数减少	1 (0.4)	0 (0.0)
发热	1 (0.4)	0 (0.0)
呕吐	1 (0.4)	0 (0.0)
血小板减少症	0 (0.0)	3 (1.1)
血胆红素增高	0 (0.0)	1 (0.4)
鼻出血	0 (0.0)	1 (0.4)
肝萎缩	0 (0.0)	1 (0.4)

6 总结与展望

HER2 是一种跨膜生长因子受体, 约 15% ~ 20% 的乳腺癌、胃癌和食管癌患者存在基因扩增, 导致受体过度激活, 刺激肿瘤生长^[36]。靶向抗 HER2 药物改变了这类患者的治疗模式。研究表明, T-DXd 可能使 HER2 表达的非乳腺癌患者获益, 包括非小细胞肺癌、胃癌或胃食管交界处腺癌及转移性结直肠癌患者^[37-41]。据统计,

10% ~ 25% 的转移性肿瘤患者会在病程中出现脑转移^[42]。目前几项正在进行的临床试验发现, T-DM1 与 T-DXd 在 HER2 阳性乳腺癌脑转移患者均具有中枢神经系统活性^[43-45]。

通过对国外关于 T-DM1 和 T-DXd 的作用机制、有效性和安全性等方面进行总结和分析, 发现目前 ADC 已在 HER2 阳性乳腺癌患者中应用广泛, 通过对连接体和有效载荷的重新选择, T-DXd 在 HER2 阳性乳腺癌中具有较显著的疗效, 在不可切除或转移性 HER2 阳性乳腺癌患者中的疗效比 T-DM1 更好, 同时 T-DXd 在其他 HER2 表达的肿瘤中也表现出一定的疗效。T-DM1 和 T-DXd 都在脑转移的患者中显示出中枢神经系统活性。更关键的是 T-DXd 对 HER2 低表达的肿瘤患者也具有较好的疗效和安全性。但 T-DXd 相关的 ILD 事件令人担忧。目前来看, T-DM1 与 T-DXd 在肿瘤应用中各有优势, T-DXd 的适应证更广, 疗效更佳, 但 T-DM1 安全性更好, 在临床实践中还需要结合的患者特征以及 ADC 的疗效和安全性作出个体化的选择。

目前全球有 100 多种 ADC 正在进行临床试验^[46], ADC 的目标是将细胞毒分子特异性地输送到肿瘤细胞内, 同时将细胞毒分子与正常组织相互作用所产生的毒性降至最低。随着临床研究的不断发展, 靶向 HER2 的 ADC 在更多类型的肿瘤患者中应用也在不断深入, 这将进一步丰富肿瘤患者的治疗选择。

综上所述, ADC 是一类很有前景的药物, 通过更深入地了解其作用机制、耐药机制、临床研究, 以及通过对药物共轭技术和临床试验设计方面的研究, 相信在未来 ADC 能够改变部分肿瘤治疗的结局。

参考文献

- [1] Ye F, Dewanjee S, Li Y, et al. Advancements in clinical aspects of targeted therapy and immunotherapy in breast cancer [J]. *Mol Cancer*, 2023, 22 (1): 105.
- [2] Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update [J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36 (20): 2105-2122.
- [3] Tarantino P, Hamilton E, Tolane SM, et al. HER2-low breast cancer: pathological and clinical landscape [J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38 (17): 1951-1962.
- [4] Giaquinto AN, Sung H, Miller KD, et al. Breast cancer statistics, 2022 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72 (6): 524-541.
- [5] Zolot RS, Basu S, Million RP. Antibody-drug conjugates [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12 (4): 259-260.
- [6] Ricciuti B, Lamberti G, Andriani E, et al. Antibody-drug conjugates for lung cancer in the era of personalized oncology [J]. *Semin Cancer Biol*, 2021, 69 (1): 268-278.
- [7] Poon KA, Flagella K, Beyer J, et al. Preclinical safety profile of trastuzumab emtansine (T-DM1): mechanism of action of its cytotoxic component retained with improved tolerability [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 273 (2): 298-313.
- [8] Barok M, Joensuu H, Isola J. Trastuzumab emtansine: mechanisms of action and drug resistance [J]. *Breast Cancer Res*, 2014, 16 (2): 209.
- [9] Conilh L, Sadilkova L, Viricel W, et al. Payload diversification: a key step in the development of antibody-drug conjugates [J]. *J Hematol Oncol*, 2023, 16 (1): 3.
- [10] Barginear MF, John V, Budman DR. Trastuzumab-DM1: a clinical update of the novel antibody-drug conjugate for HER2-overexpressing breast cancer [J]. *Mol Med*, 2013, 18 (1): 1473-1479.
- [11] Krop I, Winer EP. Trastuzumab emtansine: a novel antibody-drug conjugate for HER2-positive breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20 (1): 15-20.
- [12] Hamblett KJ, Jacob AP, Gurgel JL, et al. SLC46A3 is required to transport catabolites of noncleavable antibody maytansine conjugates from the lysosome to the cytoplasm [J]. *Cancer Res*, 2015, 75 (24): 5329-5340.
- [13] Garcia-Alonso S, Ocaña A, Pandiella A. Trastuzumab emtansine: mechanisms of action and resistance, clinical progress, and beyond [J]. *Trends Cancer*, 2020, 6 (2): 130-146.
- [14] Ogitani Y, Hagihara K, Oitate M, et al. Bystander killing effect of DS-8201a, a novel anti-human epidermal growth factor receptor 2 antibody-drug conjugate, in tumors with human epidermal growth factor receptor 2 heterogeneity [J]. *Cancer Science*, 2016, 107 (7): 1039-1046.
- [15] Makhlin I, DeMichele A. Trastuzumab deruxtecan: an antibody-drug conjugate embracing its destiny in breast cancer [J]. *Cell Rep Med*, 2022, 3 (6): 100668.
- [16] Tamura K, Tsurutani J, Takahashi S, et al. Trastuzumab deruxtecan (DS-8201a) in patients with advanced HER2-positive breast cancer previously treated with trastuzumab emtansine: a dose-expansion, phase I study [J]. *Lancet Oncol*, 2019, 20 (6): 816-826.
- [17] Drago JZ, Modi S, Chandarlapaty S. Unlocking the potential of antibody-drug conjugates for cancer therapy [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18 (6): 327-344.
- [18] Takegawa N, Nonagase Y, Yonesaka K, et al. DS-8201a, a new HER2-targeting antibody-drug conjugate incorporating a novel DNA topoisomerase I inhibitor, overcomes HER2-positive gastric cancer T-DM1 resistance [J]. *Int J Cancer*, 2017, 141 (8): 1682-1689.
- [19] Mamounas EP, Untch M, Mano MS, et al. Adjuvant T-DM1 versus trastuzumab in patients with residual invasive disease after neoadjuvant therapy for HER2-positive breast cancer: subgroup analyses from KATHERINE [J]. *Ann Oncol*, 2021, 32 (8): 1005-1014.
- [20] von Minckwitz G, Huang CS, Mano MS, et al. Trastuzumab emtansine for residual invasive HER2-positive breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2019, 380 (7): 617-628.
- [21] Modi S, Jacot W, Yamashita T, et al. Trastuzumab deruxte-

- can in previously treated HER2-low advanced breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2022, 387 (1): 9-20.
- [22] Chen YF, Xu Y, Shao ZM, et al. Resistance to antibody-drug conjugates in breast cancer: mechanisms and solutions [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2023, 43 (3): 297-337.
- [23] Weng W, Meng T, Zhao Q, et al. Antibody-exatecan conjugates with a novel self-immolative moiety overcome resistance in colon and lung cancer [J]. *Cancer Discov*, 2023, 13 (4): 950-973.
- [24] Antonarelli G, Corti C, Tarantino P, et al. Management of patients with HER2-positive metastatic breast cancer after trastuzumab deruxtecan failure [J]. *ESMO Open*, 2023, 8 (4): 101608.
- [25] Diéras V, Miles D, Verma S, et al. Trastuzumab emtansine versus capecitabine plus lapatinib in patients with previously treated HER2-positive advanced breast cancer (EMILIA): a descriptive analysis of final overall survival results from a randomised, open-label, phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2017, 18 (6): 732-742.
- [26] Krop IE, Im SA, Barrios C, et al. Trastuzumab emtansine plus pertuzumab versus taxane plus trastuzumab plus pertuzumab after anthracycline for high-risk human epidermal growth factor receptor 2-positive early breast cancer: the phase III KAITLIN study [J]. *J Clin Oncol*, 2022, 40 (5): 438-448.
- [27] Modi S, Saura C, Yamashita T, et al. Trastuzumab deruxtecan in previously treated HER2-positive breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382 (7): 610-621.
- [28] André F, Hee Park Y, Kim SB, et al. Trastuzumab deruxtecan versus treatment of physician's choice in patients with HER2-positive metastatic breast cancer (DESTINY-Breast02): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial [J]. *Lancet*, 2023, 401 (10390): 1773-1785.
- [29] Hurvitz SA, Hegg R, Chung WP, et al. Trastuzumab deruxtecan versus trastuzumab emtansine in patients with HER2-positive metastatic breast cancer: updated results from DESTINY-Breast03, a randomised, open-label, phase 3 trial [J]. *Lancet*, 2023, 401 (10371): 105-117.
- [30] Carroll HK, Higgins MJ, O'Reilly S. Trastuzumab deruxtecan in HER2-low breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2022, 387 (12): 1144.
- [31] Modi S, Jacot W, Yamashita T, et al. Trastuzumab deruxtecan (T-DXd) versus treatment of physician's choice (TPC) in patients (pts) with HER2-low unresectable and/or metastatic breast cancer (mBC): results of DESTINY-Breast04, a randomized, phase 3 study [J]. *N Engl J Med*, 2022, 387 (1): 9-20.
- [32] Fu ZW, Liu JM, Li SJ, et al. Treatment-related adverse events associated with HER2-targeted antibody-drug conjugates in clinical trials: a systematic review and meta-analysis [J]. *EclinicalMedicine*, 2022, 55: 101795-101795.
- [33] Perez EA, Barrios C, Eiermann W, et al. Trastuzumab emtansine with or without pertuzumab versus trastuzumab plus taxane for human epidermal growth factor receptor 2-positive, advanced breast cancer: primary results from the phase III MARIANNE study [J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35 (2): 141.
- [34] Curigliano G, Dunton K, Rosenlund M, et al. Patient-reported outcomes and hospitalization data in patients with HER2-positive metastatic breast cancer receiving trastuzumab deruxtecan or trastuzumab emtansine in the phase III DESTINY-Breast03 study [J]. *Ann Oncol*, 2023, 34 (7): 569-577.
- [35] Ferraro E, Drago JZ, Modi S. Implementing antibody-drug conjugates (ADCs) in HER2-positive breast cancer: state of the art and future directions [J]. *Breast Cancer Res*, 2021, 23 (1): 84.
- [36] Li BT, Michelini F, Misale S, et al. HER2-mediated internalization of cytotoxic agents in ERBB2 amplified or mutant lung cancers [J]. *Cancer Discov*, 2020, 10 (5): 674-687.
- [37] Li BT, Smit EF, Goto Y, et al. Trastuzumab deruxtecan in HER2-mutant non-small-cell lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2022, 386 (3): 241-251.
- [38] Shitara K, Iwata H, Takahashi S, et al. Trastuzumab deruxtecan (DS-8201a) in patients with advanced HER2-positive gastric cancer: a dose-expansion, phase 1 study [J]. *Lancet Oncol*, 2019, 20 (6): 827-836.
- [39] Yamaguchi K, Bang YJ, Iwasa S, et al. Trastuzumab deruxtecan in anti-human epidermal growth factor receptor 2 treatment-naïve patients with human epidermal growth factor receptor 2-low gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma: exploratory cohort results in a phase II trial [J]. *J Clin Oncol*, 2023, 41 (4): 816-825.
- [40] Van Cutsem E, di Bartolomeo M, Smyth E, et al. Trastuzumab deruxtecan in patients in the USA and Europe with HER2-positive advanced gastric or gastroesophageal junction cancer with disease progression on or after a trastuzumab-containing regimen (DESTINY-Gastric02): primary and updated analyses from a single-arm, phase 2 study [J]. *Lancet Oncol*, 2023, 24 (7): 744-756.
- [41] Siena S, Di Bartolomeo M, Raghav K, et al. Trastuzumab deruxtecan (DS-8201) in patients with HER2-expressing metastatic colorectal cancer (DESTINY-CRC01): a multicentre, open-label, phase 2 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2021, 22 (6): 779-789.
- [42] Epailard N, Bassil J, Pistilli B. Current indications and future perspectives for antibody-drug conjugates in brain metastases of breast cancer [J]. *Cancer Treat Rev*, 2023, 119: 102597.
- [43] Montemurro F, Delaloue S, Barrios CH, et al. Trastuzumab emtansine (T-DM1) in patients with HER2-positive metastatic breast cancer and brain metastases: exploratory final analysis of cohort 1 from KAMILLA, a single-arm phase III b clinical trial [J]. *Ann Oncol*, 2020, 31 (10): 1350-1358.
- [44] Bartsch R, Berghoff AS, Furtner J, et al. Trastuzumab deruxtecan in HER2-positive breast cancer with brain metastases: a single-arm, phase 2 trial [J]. *Nat Med*, 2022, 28 (9): 1840-1847.
- [45] Mair MJ, Bartsch R, Le Rhun E, et al. Understanding the activity of antibody-drug conjugates in primary and secondary brain tumours [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2023, 20 (6): 372-389.
- [46] Chau CH, Steeg PS, Figg WD. Antibody-drug conjugates for cancer [J]. *Lancet*, 2019, 394 (10200): 793-804.

(收稿日期: 2023-11-05; 修回日期: 2023-12-28)

药物分析与检验

ICP-MS 法测定香苏正胃丸中朱砂的含量

高立金, 李杰*, 张琳, 卢彩会*, 仇晓晴 (廊坊市药品检验所, 河北 廊坊 065000)

摘要: **目的** 建立香苏正胃丸中毒性成分朱砂的含量测定方法。**方法** 香苏正胃丸样品用盐酸-硝酸 (3:1) 5 mL 超声, 使朱砂反应生成可溶性汞盐, 用水和 2% 硝酸稀释, 加入金储备液, 使含汞和金比例为 1:200, 用 ICP-MS 法对朱砂中的汞进行含量测定。**结果** 汞的质量浓度在 $0 \sim 15 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与信号强度呈良好的线性关系, 回归方程 $Y = 2614X + 317$, 相关系数 (r) 0.9999, 平均回收率为 97.6%, RSD 为 1.7%, 3 批次样品每丸含朱砂 (以硫化汞计) 在 5.76 ~ 5.85 mg 内。**结论** 建立的方法简便可靠、准确性高、专属性强, 可用于香苏正胃丸质量控制。

关键词: ICP-MS 法; 香苏正胃丸; 毒性成分; 朱砂

中图分类号: R927, R284.1 文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)07-1883-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.033

Determination of cinnabar in Xiangsu Zhengwei pills by ICP-MS

GAO Li-jin, LI Jie*, ZHANG Lin, LU Cai-hui*, QIU Xiao-qing (Langfang Institute for Drug Control, Langfang Hebei 065000)

Abstract: **Objective** To determine the toxic component cinnabar in Xiangsu Zhengwei pills. **Methods** The sample of Xiangsu Zhengwei pills was dissolved in 5 mL hydrochloric acid-nitric acid (3:1) before ultrasound. The mixture was diluted with water and 2% nitric acid, and a gold reserve solution was added to achieve a mercury to gold ratio of 1:200, and then diluted with 2% nitric acid to quantitatively analyze the content of mercury in cinnabar by ICP-MS. **Results** The mercury concentration was in a good linearity with signal intensity within $0 \sim 15 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. The regression equation was $Y = 2614X + 317$, $r = 0.9999$, and the average recovery was 97.6%, with RSD of 1.7%. The content of mercury in cinnabar in 3 batches of samples (calculated as mercury sulfide) ranged 5.76 ~ 5.85 mg per pill. **Conclusion** The method is reliable, accurate, and specific, and can effectively control the content of toxic ingredients in the preparation.

Key words: ICP-MS; Xiangsu Zhengwei pill; toxic component; cinnabar

香苏正胃丸由广藿香、紫苏叶、香薷、陈皮、姜厚朴、麸炒枳壳、砂仁、炒白扁豆、炒山楂、六神曲 (炒)、炒麦芽、茯苓、甘草、滑石、朱砂等 15 味药组成。该处方来源于《北京市中药成方选集》的经典验方^[1], 具有解表化湿、和中消食的功效, 用于小儿暑湿感冒, 症见头痛发热、停食停乳、腹痛胀满、呕吐泄泻、小便不利等功效。该品种自《中国药典》1963 年版^[2] 收载以来, 各

版药典均予以收载。处方中的朱砂为毒性成分, 用量较小, 《中国药典》2020 年版一部^[3] 对厚朴酚、和厚朴酚的含量进行了测定, 未测定朱砂含量, 对朱砂用量控制存在不足。本文采用 ICP-MS 法测定汞的含量, 以此计算药物中朱砂含量, 以期控制该药物中朱砂用量提供依据。

1 仪器与试剂

NexION350 电感耦合等离子体质谱仪 (美国

基金项目: 河北省药品监督管理局科技计划项目 (No.2023ZC1002)。

作者简介: 高立金, 男, 高级工程师, 主要从事化学药、抗菌药物、中药检验及相关标准的起草复核等工作, email: gaolijin666@126.com

*通信作者: 李杰, 男, 工程师, 主要从事化学药、抗菌药物、中药检验及相关标准的起草复核等工作, email: lfsyj@sina.com; 卢彩会, 女, 工程师, 主要从事药品标准物质的研究, email: 2269984137@qq.com

PerkinElmer 公司); XS105 电子天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司, 精度为 0.01 mg); MARS 高通量密闭微波消解仪 (美国 CEM 公司); JM-16D-28 型超声波清洗机 (广东洁盟超声实业有限公司); SMARTPLUS-NT 型超纯水机 (力康生物医疗科技有限公司)。汞单元素标准溶液 ($1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 编号: GSB04-1729-2001, 批号: 21B027-4)、金单元素标准溶液 ($1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 编号: GSB04-1715-2004, 批号: 21B022-2) (国家有色金属及电子材料分析测试中心), 硫化汞对照品 (含量: 99%, 编号: 243566, 批号: STBK5653, 西格玛奥德里奇上海贸易有限公司); 硝酸 (德国默克公司, 优级纯), 盐酸 (北京市通广精细化工公司, 分析纯); 广藿香、紫苏叶、香薷、陈皮、姜厚朴、麸炒枳壳、砂仁、炒白扁豆、炒山楂、六神曲 (炒)、炒麦芽、茯苓、甘草、滑石、朱砂等 15 味饮片均为市售, 经河北省药械院段吉平主任药师鉴定符合药典规定; 香苏正胃丸样品为市售成药。

2 方法与结果

2.1 仪器条件

ICP-MS 工作条件及参数: 射频功率 1600 W, 等离子体流速 $18 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 载气流速 $1.045 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 辅助气流速 $1.2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 数据采集重复 3 次, 读取 1 次, 蠕动泵转速 $24 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$; 测量元素 Hg, 标准测量模式。

2.2 溶液制备

2.2.1 标准储备液 精密量取汞单元素标准溶液适量, 用 2% 硝酸制成含汞 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 即得汞储备液。精密量取金单元素标准溶液适量, 用 2% 硝酸制成含金 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 即得金储备液。

2.2.2 供试品溶液 取样品 10 丸, 剪碎, 混匀, 精密称取样品 0.2 g, 置 100 mL 量瓶, 加盐酸-硝酸 (3:1) 5 mL, 超声 (温度 30°C , 功率 600 W, 频率 28 kHz, 下同) 15 min, 使分散溶解, 加水定容, 取 10 mL, $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 精密量取上清液 3 mL 置 100 mL 量瓶中, 用加 2% 硝酸定容, 摇匀, 精密量取 2 mL 置 50 mL 量瓶中, 加金储备液 4 mL, 加 2% 硝酸定容, 摇匀即得。

2.2.3 标准曲线溶液 精密量取汞储备液 0.0、1.0、1.0、1.0、2.0、3.0 mL, 分别置于 50、50、25、10、10、10 mL 量瓶中, 分别加金储备液 1、1、1、1、2、3 mL, 加 2% 硝酸溶液定容, 摇匀, 制成 1 mL 含汞 0.0、1.0、2.0、5.0、10.0、15.0 ng 的对照品溶液, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 硫化汞反应情况考察 精密称取硫化汞对照品约 12 mg (含汞约 10 mg), 加王水 5 mL, 初始硫化汞在王水中呈颗粒状分散, 未迅速反应。超声使反应加速, 10 min 后观察, 溶液由红色浑浊逐渐

变为淡黄色浑浊, 偶见红色颗粒, 继续超声至 15 min 后, 变为淡黄色浑浊溶液。分别取超声 10 min 和 15 min 的溶液, $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 精密量取上清液稀释至含汞约 $4 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 按“2.1”项下仪器条件测定, 结果显示, 超声 10 min 样品汞含量为 94.3% ($n = 3$, $RSD = 3.5\%$), 超声 15 min 样品汞含量为 100.25% ($n = 3$, $RSD = 1.6\%$)。故采取超声 15 min 制备供试品溶液。

2.3.2 样品溶液制备方法考察 分别精密称取样品 0.2 g 和 0.1 g, 分别置 100 mL 量瓶中, 再按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液 1 和 2。

分别精密称取样品 0.2 g 和 0.1 g, 置聚四氟乙烯消解罐中, 加盐酸-硝酸 (3:1) 5 mL, 置微波消解仪中消解 (消解程序见表 1), 用水转移至 100 mL 量瓶中并定容, 取 10 mL, $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 精密量取上清液 3 mL 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液 3 和 4。

按“2.1”项下仪器条件测定并进行计算, 结果见表 2。结果表明, 微波消解和直接溶解两种制备方法汞含量无显著差异, 直接溶解方法快速、简便、高效, 故采取盐酸-硝酸 (3:1) 溶解硫化汞制备样品溶液的方法。取样 0.1 g, 约含药材粉末 0.05 g, 取样代表性较差, 结果偏差较大, 故选择取样量 0.2 g 进行试验。

表 1 微波消解程序

消解程序	温度 / $^\circ\text{C}$	升温时间 /min	维持时间 /min
1	120	5	5
2	150	5	10
3	180	15	30

表 2 样品溶液制备方法考察结果 ($n = 3$)

制备方法	供试品溶液	汞含量 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	RSD/%
直接溶解	1	1.651	0.81
	2	1.682	4.5
微波消解	3	1.624	1.2
	4	1.648	5.3

ICP-MS 测定汞过程中, 浓度较高的汞溶液记忆效应明显。在试验过程中, 分别考察了汞质量浓度在 $4.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 加入不同比例金溶液, 使汞和金的比例分别为 1:2、1:20 和 1:200, 分别进样测定, 结果显示汞-金比例 1:2 和 1:20 制备的供试品溶液, 记忆效应未明显改善, 约冲洗 15 min 才能完全清除记忆, 汞-金比例 1:200 制备供试品溶液, 汞残留较少, 可以快速洗脱, 对测定结果影响较小, 能有效缓解汞记忆效应。

2.3.3 线性关系考察 取“2.2.3”项下标准曲线溶液, 按“2.1”项下仪器条件测定并进行计算, 以响应值为纵坐标, 浓度为横坐标绘制标准曲线, 计

算得回归方程 $Y = 2614X + 317$, 相关系数 (r) 0.9999, 结果表明, 汞在 $0 \sim 15 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与响应值有良好的线性关系。

2.3.4 检测限和定量限 除不加供试品外, 其他按“2.2.2”项下方法制备, 制取空白溶液, 连续进样 11 次, 3 倍响应值标准偏差所对应的汞元素质量浓度为检测限, 结果为 $0.047 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 10 倍响应值标准偏差所对应的汞元素质量浓度为定量限, 结果为 $0.157 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3.5 重复性试验 取样品 (批号为 20010464) 6 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下仪器条件进样测定并计算, 结果汞含量平均值为 $1.667 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 为 0.85%, 表明该方法重复性较好。

2.3.6 稳定性试验 取“2.2.2”项下供试品溶液适量, 分别于室温下放置 0、2、6、12、24 h, 按“2.1”项下仪器条件测定并计算。结果汞含量 RSD 为 0.71% ($n = 5$), 表明供试品溶液在室温下放置 24 h 内基本稳定。

2.3.7 回收试验 取除朱砂外的处方中其余 14 味中药饮片, 粉碎成细粉, 按处方模拟投料, 混匀, 精密称取 2.978 g, 精密加入硫化汞对照品 12.12 mg (含汞量为 $3.459 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), 混合均匀。精密称取 0.1 g, 称取 6 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下仪器条件测定, 计算汞的回收率。结果见表 3。

2.3.8 样品测定结果 取 3 批样品各约 0.2 g, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下仪器条件测定, 计算样品中汞的含量, 转换成朱砂的含量 (以硫化汞计), 结果见表 4。

表 3 回收试验结果 ($n = 6$)

Tab 3 Recovery ($n = 6$)

取样量/g	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.1059	0.3663	0.3645	99.51	97.60	1.7
0.1113	0.3850	0.3702	96.16		
0.1028	0.3556	0.3378	94.99		
0.1054	0.3646	0.3582	98.24		
0.1041	0.3601	0.3536	98.19		
0.1016	0.3514	0.3461	98.49		

表 4 样品含量测定结果 ($n = 3$)

Tab 4 Content determination in samples ($n = 3$)

批号	汞含量 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	每丸含朱砂 (以硫化汞计) /mg
20010464	1.667	5.801
20010465	1.656	5.763
20050709	1.682	5.853

3 讨论

香苏正胃丸多为儿科用药, 处方中朱砂为毒性药材, 不能盲目服用。水飞后虽然不存在可溶性的

汞, 但存在酸可溶性的汞, 过量或长时间服用含朱砂的中成药, 容易对人体造成伤害^[4-7]。另外, 制剂处方中朱砂用量最少, 朱砂的均匀性可反映该制剂的生产工艺, 批间差异和制剂工艺稳定性联系紧密。处方中其他成分不含汞元素, 可以根据制剂中汞含量来确定朱砂的含量。企业通过考察该药品的制备工艺, 以朱砂的投料量与成品中朱砂量的差别为基础, 结合临床朱砂使用情况, 制订朱砂含量范围, 进而控制该制剂的安全性、有效性及制剂的稳定性。

朱砂主要成分为硫化汞, 可以在王水中溶解, 在测定朱砂时, 考虑将硫化汞转化成可溶性汞盐, 测定汞含量^[8]。目前测定汞含量的方法主要有原子吸收分光光度法 (AAS)、原子荧光分光光度法 (AFS)、电感耦合等离子体质谱法 (ICP-MS) 等^[9-10]。由于本品汞的含量相对较低, AAS 和 AFS 均需要消解, 操作烦琐, 容易造成损失。本文在供试品溶液制备时, 用盐酸-硝酸 (3:1) 直接溶解, 适当增加稀释倍数, 可减少基体影响, ICP-MS 直接进行测定。既避免消解烦琐过程, 也减少消解过程中汞的损失或污染, 提高检测的结果准确度。

本文在回收试验中, 由于样品中朱砂含量较低, 需加入硫化汞的量低于 10 mg, 不便准确称量, 如采用加入汞标准溶液的方法, 不能验证硫化汞的溶解情况, 因此, 采取制备模拟样品, 用硫化汞对照品代替朱砂进行投料, 称取适量样品, 按建立的方法测定汞含量, 进行回收试验。该操作客观、准确、真实地反映了所建立方法的准确度。

参考文献

- [1] 北京市公共卫生局. 北京市中药成方选集 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1961.
- [2] 中国药典 1963 年版. 一部 [S]. 1963: 381.
- [3] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 1286.
- [4] 李锡岩. 含朱砂的中成药不能盲目服用 [J]. 家庭医学, 2004 (8): 27.
- [5] 叶祖光, 王智民, 王跃生, 等. 安宫牛黄丸中朱砂和雄黄的药理作用特点与安全性评价研究 [J]. 医学研究通讯, 2005, 34 (9): 35.
- [6] 梁萍, 宋民宪, 王东晓. 治疗小儿惊风的含朱砂中成药的分析 [J]. 华西药学杂志, 2011, 26 (2): 196-198.
- [7] 孔莉. 中药朱砂合理应用的探讨与改进 [J]. 中医药学报, 2013, 41 (4): 144-146.
- [8] 耿师科. HgS 溶解性的实验研究 [J]. 内蒙古石油化工, 2007 (11): 158.
- [9] 刘兰生, 滕宝霞, 刘柏龙, 等. 微波消解-原子荧光光谱法测定小儿奇应丸中二硫化二砷和硫化汞的含量 [J]. 中国药事, 2011, 25 (7): 650-651, 673.
- [10] 李西林, 柳国斌, 夏晶, 等. 原子吸收分光光度法测定紫朱软膏中总汞的含量 [J]. 上海中医药杂志, 2019, 53 (10): 97-99.

(收稿日期: 2023-11-02; 修回日期: 2023-12-20)

直接进样 - 气质联用法测定头孢曲松钠中 10 种残留溶剂及其质量评价研究

李荣, 王涛, 张亚锋, 孙晓, 饶雅琨 (西安市食品药品检验所, 西安 710700)

摘要: **目的** 建立直接进样测定头孢曲松钠中 10 种残留溶剂的气质联用方法, 对不同企业的样品进行质量评价研究。**方法** 采用 Agilent J&W DB-624UI 色谱柱 (60 m×0.250 mm, 1.4 μm); 进样口温度为 235 °C, 初始温度 30 °C, 保持 12 min, 以 5 °C·min⁻¹ 速率升至 100 °C, 保持 1 min, 再以 50 °C·min⁻¹ 速率升至 235 °C, 保持 10 min; 流速 3 mL·min⁻¹; 不分流进样; 进样体积 0.2 μL; 在选择性离子检测模式下, 以正丁醇为溶剂直接进样检测, 外标法定量。采用 Plackett-Burman 试验设计结合 Pareto 图对方法耐用性影响因素进行考察, 并对 51 家企业的 51 批样品的残留溶剂进行考察。**结果** 10 种残留溶剂分别在各自浓度范围内与峰面积线性关系良好 (r 均大于 0.999); 回收率为 99.7%~103.9%, RSD 均小于 2%; 检测限范围为 0.006~67.750 μg·g⁻¹; 方法耐用性良好。51 批样品中丙酮均有检出, 甲醇、乙腈及异丙醇 3 种残留溶剂部分企业有检出。**结论** 该方法操作简便、准确可靠、样品用量少, 试剂来源广、易得, 适用于头孢曲松钠残留溶剂的含量测定及质量控制。

关键词: 头孢曲松钠; 残留溶剂; 直接进样; 气质联用法; 质量评价

中图分类号: R927

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)07-1886-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.034

Determination of 10 residual solvents in ceftriaxone sodium and quality evaluation by direct injection gas chromatography-tandem mass spectrometry

LI Rong, WANG Tao, ZHANG Ya-feng, SUN Xiao, RAO Ya-kun (*Xi'an Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710700*)

Abstract: Objective To establish a direct injection gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) method to determine 10 residual solvents in ceftriaxone sodium and evaluate its quality. **Methods** An Agilent J&W DB-624UI capillary column (60 m×0.250 mm, 1.4 μm) was used. The temperature of injection was 235 °C, the initial column temperature was 30 °C, held for 12 min and then increased at a rate of 5 °C·min⁻¹ to 100 °C, held for 1 min, and finally increased at a rate of 50 °C·min⁻¹ to 235 °C, held for 10 min. The flow rate was 3 mL·min⁻¹. Splitless injection was adopted, and the injection volume was 0.2 μL. The mass spectrometer was operated with the mass scanning combining selective ion monitoring, *n*-butanol was used for direct-injection detection, and external standard method was used for quantification. Plackett-Burman design combined with Pareto chart was used to determine the factors influencing the robustness of the method. The method was used to measure residual solvents in 51 batches from 51 producers. **Results** The 10 residual solvents had good linear relationship within their respective concentration ranges ($r > 0.999$); the recoveries ranged 99.7%~103.9%, with RSD less than 2%; the detection limits ranged 0.006~67.750 μg·g⁻¹. Acetone was detected in 51 batches of samples while methanol, acetonitrile and isopropanol were partially detected. **Conclusion** The method is simple, accurate and reliable, with few samples needed, and easy availability of reagents. It can be used for the determination and quality evaluation of residual solvents in ceftriaxone sodium.

Key words: ceftriaxone sodium; residual solvent; direct injection; GC-MS/MS; quality evaluation

基金项目: 陕西省市场监督管理局科技计划项目 (No.2021KY14)。

作者简介: 李荣, 女, 副主任药师, 主要从事药物分析与质量标准研究, email: 276832850@qq.com

头孢曲松钠 (ceftriaxone sodium), 又称头孢三嗪, 是一种半合成第三代头孢菌素类抗感染药物。由于其具有抗菌活性强、抗菌谱广、半衰期长 (6~8 h) 等特点, 在临床中应用广泛^[1-3]。近年来, 在药物联合治疗上, 头孢曲松钠对于提高临床应用效果方面备受关注^[4-5]。因各企业的生产工艺路线不同, 所使用的有机溶剂种类不同, 可能存在生产环境带入以及生产过程中更改有机溶剂等潜在风险。在 2022 年头孢曲松钠的国家药品抽检研究中已发现该品种残留溶剂检出种类不尽相同: 丙酮均有检出, 甲醇、乙腈及异丙醇 3 种残留溶剂部分企业有检出, 其中, 异丙醇为未备案的溶剂。

《中国药典》2020 年版收载的头孢曲松钠残留溶剂仅涉及甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯 4 种成分, 故采用顶空进样-气相色谱法即可实现此类低沸点、易挥发成分的分析^[6]。目前报道的文献同样因检测对象有限, 对于头孢曲松钠中残留溶剂的检测也均采用顶空进样-气相色谱^[7-11]。本研究根据其合成工艺特点^[12-13], 对残留溶剂种类进行扩增, 拟分析甲醇、乙醇、丙酮、异丙醇、乙腈、二氯甲烷、乙酸乙酯、苯、*N,N*-二甲基丙胺及 2-乙基己酸等 10 种残留溶剂。上述残留溶剂种类多样, 沸点范围较广, 原顶空进样-气相色谱法已无法实现同时、快速测定。同时, 为实现更高的检测灵敏度, 本研究摒弃已收载的顶空进样-气相色谱法, 采用直接进样-气质联用法测定上述 10 种残留溶剂, 并利用 Plackett-Burman 试验设计结合 Pareto 图对方法耐用性影响因素进行考察。同时, 采用该法测定来自 51 家企业样品的残留溶剂, 并对其质量进行评价研究, 对仿制药质量一致性评价的推进起到积极作用。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Thermo Scientific TSQ 9000 三重四极杆气质联用谱仪 (美国 Thermo 公司); ME403 型十万分之一电子分析天平 (瑞士 METTLER TOLEDO 公司); KQ-700VDB 型双频数控超声仪 (昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

无甲醇乙醇 (纯度 ≤ 99.7%, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 异丙醇 (纯度 ≥ 100%, Supelco); 二氯甲烷 (纯度 ≥ 99.9%, Supelco); 苯 (纯度 ≥ 99.9%, 上海沃凯化学试剂有限公司); 甲醇 (纯度 ≥ 99.9%, Honeywell); 乙酸乙酯、丙酮 [纯度均 ≥ 99.9%, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司]; *N,N*-二甲基丙胺、乙腈 (纯度均 ≥ 98.0%, TCI); 2-乙基己酸 (纯度: 99.6%, Dr. Ehrenstorfer GmbH); 正丁醇 (纯度 ≥ 99.9%,

Fisher Chemical); 样品均为 2022 年该品种国家药品抽检研究中收集的 51 家头孢曲松钠。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent J&W DB-624UI (60 m × 0.250 mm, 1.4 μm); 进样口温度: 235 °C; 柱温: 程序升温 (初始温度 30 °C, 保持 12 min, 以 5 °C · min⁻¹ 速率升至 100 °C, 保持 1 min, 再以 50 °C · min⁻¹ 速率升至 235 °C, 保持 10 min); 载气: 氮气 (≥ 99.999%); 碰撞气: 氦气 (≥ 99.999%); 流速 3 mL · min⁻¹; 不分流进样; 进样体积: 0.2 μL。

2.2 质谱条件

电子轰击 (EI) 离子源; 传输线温度: 150 °C; 离子源温度: 235 °C; 四极杆温度: 150 °C; 电子能量: 70 eV; 选择性离子扫描 SIM 模式; 质谱检测时间: 3.88 ~ 33.88 min。扫描范围: 30 ~ 300 *m/z*。具体条件见表 1。

表 1 各组分的保留时间、定量离子、定性离子和分离度

Tab 1 Retention time, quantitative ion, qualitative ion and separation degree of each component

化合物	保留时间 /min	定量离子 (<i>m/z</i>)	定性离子 (<i>m/z</i>)	分离度
甲醇	5.50	31	29, 32	3.58
乙醇	7.82	45	46	4.75
丙酮	9.07	42	43, 58	2.81
异丙醇	9.82	43	41, 45	1.51
乙腈	10.08	38	39, 41	1.64
二氯甲烷	10.73	49	84, 86	18.32
乙酸乙酯	16.93	70	43, 61	10.52
苯	19.56	51	77, 78	31.03
<i>N,N</i> -二甲基丙胺	31.52	77	51, 104, 120	1.62
2-乙基己酸	31.68	88	73, 101, 116	1.52

2.3 溶液制备

2.3.1 混合对照品溶液 预先加入适量正丁醇置于 50 mL 量瓶中, 精密称取甲醇 55.00 mg、乙醇 62.49 mg、丙酮 73.77 mg、异丙醇 60.38 mg、乙腈 63.39 mg、二氯甲烷 77.15 mg、乙酸乙酯 62.68 mg、苯 61.60 mg、*N,N*-二甲基丙胺 50.92 mg 和 2-乙基己酸 68.00 mg 置于 50 mL 量瓶中, 用正丁醇稀释至刻度, 摇匀作为混合对照品储备液。精密量取混合对照品储备液 1 mL, 置于 20 mL 量瓶中, 用正丁醇稀释至刻度, 摇匀, 即得混合对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液 取样品约 0.1 g, 精密称定, 置于 5 mL 量瓶中, 加入适量正丁醇, 25 °C 超声 (频率: 40 kHz, 功率: 500 W) 提取 5 min, 用正丁醇定容至刻度, 摇匀, 即得。

2.4 专属性试验

取各空白溶液 (正丁醇)、混合对照品溶液及

供试品溶液直接进样。各组分峰分离效果良好，空白溶液对测定结果均无干扰，表明该方法专属性良好，总离子流色谱 (TIC) 图见图 1。

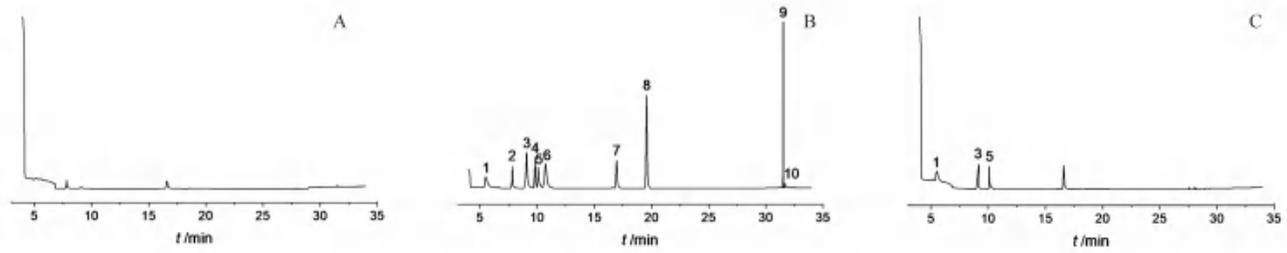


图 1 空白溶液 (A), 混合对照品溶液 (B), 供试品溶液 (C) 中 10 种残留溶剂 TIC 图

Fig 1 TIC chromatogram of 10 residual solvents in the blank solution (A), mixed reference (B), and sample solution (C)

1. 甲醇 (methanol); 2. 乙醇 (ethanol); 3. 丙酮 (acetone); 4. 异丙醇 (isopropanol); 5. 乙腈 (acetonitrile); 6. 二氯甲烷 (dichloromethane); 7. 乙酸乙酯 (ethyl acetate); 8. 苯 (benzene); 9. *N, N*-二甲基丙胺 (*N, N*-dimethylpropylamine); 10. 2-乙基己酸 (2-ethylhexanoic acid)

2.5 精密度和重复性试验

取“2.3.1”项下混合对照品溶液连续进样 6 次，甲醇、乙醇、丙酮、异丙醇、乙腈、二氯甲烷、乙酸乙酯、苯、*N, N*-二甲基丙胺及 2-乙基己酸的保留时间 *RSD* 为 0.08% ~ 0.59% ($n = 6$)，峰面积 *RSD* 为 0.57% ~ 1.5% ($n = 6$)，*RSD* 均小于 2%，表明该方法精密度良好，结果见表 2。

取空白样品 (即不含待测残留溶剂的样品) 约 0.1 g，精密称定，置于 5 mL 量瓶中，加入适量正丁醇，精密加入混合对照品溶液 1.25 mL，按“2.3.2”项下方法平行配制 6 份样品。按外标法计算供试品中残留溶剂的含量，其 *RSD* 均 ≤ 2%，表明该方法重复性良好，结果见表 2。

2.6 线性范围、定量限 (LOQ) 和检测限 (LOD)

精密量取“2.3.1”项下混合对照品储备液适量，稀释配制成混合对照品标准系列工作溶液，以质量浓度 ($X, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 对相应色谱峰面积 (Y) 进行回归计算，各残留溶剂的标准曲线回归方程、相关系数及线性范围如表 3 所示。结果表

表 2 精密度和重复性结果 ($n = 6$)

Tab 2 Precision and repeatability ($n = 6$)

化合物	<i>RSD</i> /%		
	保留时间精密度	峰面积精密度	重复性
甲醇	0.61	1.1	0.64
乙醇	0.33	1.5	0.90
丙酮	0.20	1.1	1.1
异丙醇	0.24	1.2	0.31
乙腈	0.22	1.3	1.0
二氯甲烷	0.59	0.79	1.0
乙酸乙酯	0.08	0.71	0.87
苯	0.08	0.57	0.83
<i>N, N</i> -二甲基丙胺	0.13	1.1	0.51
2-乙基己酸	0.20	1.2	0.23

明，10 种残留溶剂在各自质量浓度范围内与峰面积线性关系良好 (r 均 > 0.999)。

精密量取“2.3.1”项下混合对照品溶液适量，逐步稀释，连续进样 6 次，记录峰面积。当信噪比为 10 : 1 ~ 20 : 1 时，得 LOQ；当信噪比为 3 : 1 ~ 10 : 1 时，得 LOD，结果见表 3，各溶剂峰均能被有效检出。

表 3 线性范围、LOD 和 LOQ

Tab 3 Linearity, LOD and LOQ

化合物	线性方程	相关系数 r	浓度范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LOQ / ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	LOD / ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
甲醇	$Y = 1.893 \times 10^4 X + 8.419 \times 10^4$	0.9997	2.200 ~ 110.0	110.000	55.000
乙醇	$Y = 1.558 \times 10^4 X + 3.186 \times 10^5$	0.9996	1.250 ~ 125.0	0.625	0.006
丙酮	$Y = 4.309 \times 10^3 X + 6.731 \times 10^2$	0.9998	1.475 ~ 147.5	36.885	18.440
异丙醇	$Y = 6.120 \times 10^3 X + 1.322 \times 10^4$	0.9998	1.208 ~ 120.8	60.400	30.190
乙腈	$Y = 4.301 \times 10^3 X + 3.542 \times 10^2$	0.9999	1.268 ~ 126.8	63.400	31.700
二氯甲烷	$Y = 2.440 \times 10^4 X + 9.084 \times 10^3$	0.9996	1.543 ~ 154.3	38.575	11.570
乙酸乙酯	$Y = 5.713 \times 10^3 X + 6.207 \times 10^3$	0.9995	1.254 ~ 125.4	62.700	31.340
苯	$Y = 1.475 \times 10^4 X + 2.512 \times 10^4$	0.9998	1.232 ~ 123.2	3.080	0.924
<i>N, N</i> -二甲基丙胺	$Y = 9.850 \times 10^3 X + 1.574 \times 10^3$	0.9997	0.9980 ~ 49.90	49.900	24.950
2-乙基己酸	$Y = 2.201 \times 10^3 X + 2.445 \times 10^4$	0.9996	2.709 ~ 135.5	135.450	67.750

2.7 加样回收试验

取空白样品约 0.1 g，精密称定，置于 5 mL 量

瓶中，加入适量正丁醇，分别精密加入 1、2.5、5 mL 的混合对照品溶液 (含甲醇 $55.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、

乙醇 $62.49 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、丙酮 $73.77 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、异丙醇 $60.38 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、乙腈 $63.39 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、二氯甲烷 $77.15 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、乙酸乙酯 $62.68 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、苯 $61.60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、*N,N*-二甲基丙胺 $50.92 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 2-乙基己酸 $68.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，按“2.3.2”项下方法平行配制成低、中、高 3 种浓度样品，各 3 份，结果低、中、高浓度平均回收率在 99.7% ~ 103.9%，*RSD* 均小于 2%，表明本法准确度良好。

2.8 耐用性试验

采用 Plackett-Burman 试验设计，比较各个因

子两水平的差异与整体的差异来确定因子的显著性，并结合 Pareto 图找出影响响应变量的主要因素，以此评估工作参数在微小变化情况下分析方法的耐用性^[14-15]。试验选取进样体积 (A)、柱流速 (B)、程序升温初始温度 (C)、一阶升温速率 (D)、二阶升温速率 (E) 和离子源温度 (F) 6 个因素作为自变量，每个因素 3 个水平。通过设计 12 组试验，以样品中 10 种残留溶剂组分的含量测定结果为响应值，考察 6 个因素的变动对分析结果的影响，其因素水平及设计见表 4。

表 4 Plackett-Burman 试验因素水平及设计表

Tab 4 Factor levels and design in experiment Plackett-Burman

因素	单位	范围	水平			试验号											
			-1	0	1	a	b	c	d	e	f	g	h	i	g	k	l
A	μL	± 0.02	0.18	0.2	0.22	-1	1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1
B	$\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$	± 0.2	2.8	3	3.2	1	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
C	$^{\circ}\text{C}$	± 2	28	30	32	-1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	-1
D	$^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$	± 1	4	5	6	-1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1
E	$^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$	± 2	48	50	52	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1
F	$^{\circ}\text{C}$	± 2	233	235	237	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1

按“2.3.2”项下方法操作，在相同的试验条件下，加入 1 mL 混合对照品溶液，制成含甲醇 $11.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、乙醇 $12.50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、丙酮 $14.75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、异丙醇 $12.08 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、乙腈 $12.68 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、二氯甲烷 $15.43 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、乙酸乙酯 $12.54 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、苯 $12.32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、*N,N*-二甲基丙胺 $10.18 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 2-乙基己酸 $13.60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品溶液，每个条件重复测定 3 次，同时建立各溶剂组分标准曲线，测量各组分峰面积平均值，计算各组分均值含量 ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)。

Pareto 图上的统计显著性参考线标绘在 Z 处，其中 Z 是标准正态分布的第 $(1 - \alpha/2)$ 个百分点数。如某因子的条形跨越 Z 处的参考线，则该因子在当前模型项的 α 水平上具有统计显著性。将本次耐用性试验每个条件下各组分均值含量的测定结果数据进行标准化处理，采用 Minitab 软件对结果进行统计分析，得到 6 种因素的标准化效应 Pareto 图，其 Z 值经软件计算为 2.571 (α 取 0.05 水平)。结果见图 2。

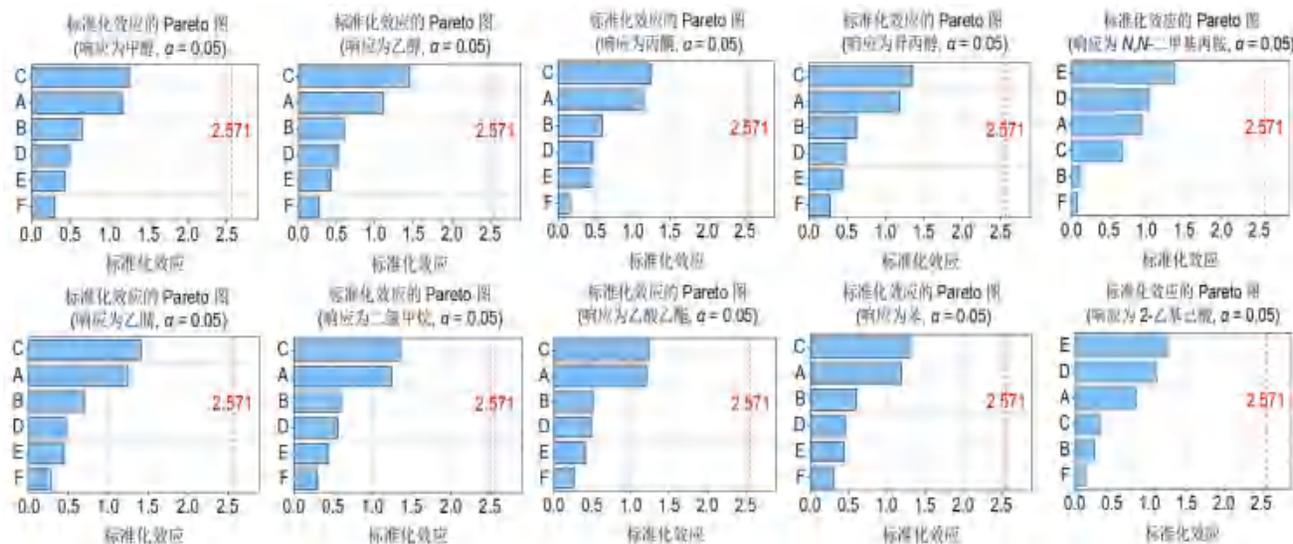


图 2 Plackett-Burman 试验 6 种因素标准化效应 Pareto 图

Fig 2 Pareto diagram of standardization effect of 6 factors in Plackett-Burman

由图 2 结果可知, 6 个因素的条形均未跨越 2.571 处的参考线, 说明工作参数在微小变化时这些因素对残留溶剂各组分的含量测定结果均无显著影响 ($\alpha > 0.05$), 表明方法的耐用性良好。此外, 6 个因素中因素 C 对甲醇、乙醇、丙酮、异丙醇、乙腈、二氯甲烷、乙酸乙酯和苯的测定结果影响相对较大, 因素 E 对 *N,N*-二甲基丙胺和 2-乙基己酸的测定结果影响相对较大, 提示在试验过程中低沸点、易挥发溶剂组分要重点控制程序升温初始温度, 高沸点溶剂要重点控制升温速率。

2.9 样品测定及质量评价

对 51 家企业的 51 批样品残留溶剂进行筛查, 结果见表 5。51 批样品中均有检出丙酮, 甲醇、乙腈及异丙醇 3 种残留溶剂部分检出, 余均未检出。其中, 丙酮、乙腈及异丙醇的含量中位数比较相近, 不同企业甲醇的残留量相对变异性较大, 各企业残留溶剂含量测定箱线图结果详见图 3。已检出的 4 种残留溶剂含量均未超过《中国药典》2020 年版及人用药品技术要求国际协调理

事会 (ICH) 对残留溶剂的限度水平 (丙酮 0.5%、甲醇 0.3%、异丙醇 0.5%、乙腈 0.041%)。但甲醇残留不同企业间残留量差异较大, 且检出了《中国药典》2020 年版未收载的乙腈和异丙醇, 提示: ① 甲醇残留作为不同企业的潜在风险, 应作为仿制药质量一致性评价的重要指标; ② 原残留溶剂的检验方法因无法同时、快速、灵敏地检测乙腈、异丙醇等 10 种残留溶剂, 已不适用。

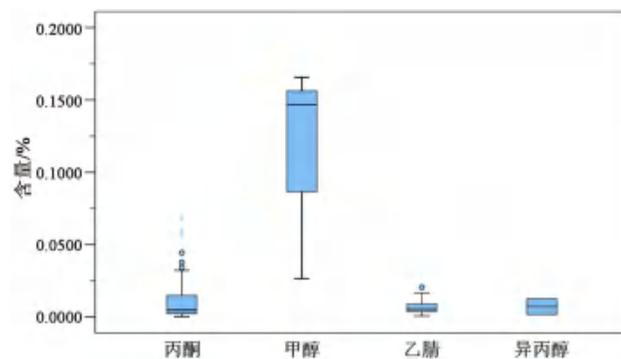


图 3 不同企业残留溶剂含量测定箱线图

Fig 3 Box diagrams for content determination of residual solvent from different enterprises

表 5 51 批次样品溶剂残留检测结果

Tab 5 Determination of residual solvent in 51 batches of samples

序号	丙酮 /%	甲醇 /%	异丙醇 /%	乙腈 /%	序号	丙酮 /%	甲醇 /%	异丙醇 /%	乙腈 /%
1	0.0036	未检出	未检出	0.0120	27	0.0050	未检出	未检出	0.007
2	0.0016	未检出	未检出	未检出	28	0.0259	未检出	未检出	0.0205
3	0.0048	未检出	未检出	0.0088	29	0.0118	未检出	未检出	未检出
4	0.0218	未检出	未检出	未检出	30	0.0120	未检出	未检出	未检出
5	0.0021	未检出	0.0124	0.0166	31	0.0023	未检出	未检出	未检出
6	0.0040	未检出	未检出	未检出	32	0.0023	未检出	未检出	未检出
7	0.0002	未检出	未检出	未检出	33	0.0047	未检出	未检出	0.0055
8	0.0016	未检出	未检出	未检出	34	0.0100	0.1657	未检出	0.0145
9	0.0155	未检出	未检出	0.0054	35	0.0443	未检出	未检出	0.0039
10	0.0026	未检出	未检出	0.0007	36	0.0037	未检出	未检出	0.0032
11	0.0680	0.0264	未检出	0.0052	37	0.0600	未检出	未检出	0.0073
12	0.0377	未检出	未检出	未检出	38	0.0047	未检出	未检出	0.0120
13	0.0299	未检出	未检出	未检出	39	0.0067	未检出	未检出	未检出
14	0.0009	未检出	未检出	0.0016	40	0.0022	未检出	未检出	未检出
15	0.0079	未检出	未检出	未检出	41	0.0006	未检出	未检出	未检出
16	0.0060	未检出	未检出	未检出	42	0.0016	未检出	未检出	0.0026
17	0.0172	未检出	未检出	未检出	43	0.0042	未检出	未检出	0.0012
18	0.0111	未检出	未检出	未检出	44	0.0321	未检出	未检出	0.0076
19	0.0020	0.1467	未检出	0.0008	45	0.0030	未检出	未检出	0.0047
20	0.0022	未检出	未检出	0.0052	46	0.0042	未检出	未检出	0.0055
21	0.0111	未检出	未检出	未检出	47	0.0022	未检出	未检出	0.0036
22	0.0299	未检出	未检出	0.0057	48	0.0012	未检出	未检出	0.0103
23	0.0027	未检出	未检出	未检出	49	0.0023	未检出	未检出	未检出
24	0.0341	未检出	未检出	未检出	50	0.0139	未检出	未检出	0.0077
25	0.0341	未检出	未检出	未检出	51	0.0121	未检出	未检出	未检出
26	0.0006	未检出	0.0017	未检出					

3 讨论

3.1 溶剂选择

由于气质联用色谱的高灵敏性特点, 为了避

免杂峰干扰, 对于溶剂纯度要求较高。此外, 经调研发现, 各生产单位用头孢曲松钠的制备工艺不尽相同, 残留溶剂种类较多。综合考虑, 选择

了相对干扰小、挥发性低且来源易得的高纯度 ($\geq 99.9\%$) 正丁醇作溶剂。

3.2 进样体积

试验发现, 进样体积不宜过大, 溶剂汽化后会使得初始谱带逐渐变宽, 导致溶剂峰拖尾逐渐严重, 并且会影响到低沸点组分间的分离度和峰形。当进样体积为 0.2 μL 时, 溶剂峰对于低沸点组分分离度和峰形影响变小, 为此进样体积确定为 0.2 μL 。

3.3 扫描模式选择

选择性离子扫描 SIM 模式, 根据各组分保留时间和质谱图特征离子设定采集窗口, 降低了组分间及溶剂的干扰, 定量结果更为可靠。同时, 进样模式选择不分流进样, 以提高分析的灵敏度和重现性。

3.4 超声时长选择

试验考察了超声提取时间对于样品残留溶剂收率的影响。具体操作为取空白样品约 0.1 g, 精密称定, 置于 5 mL 量瓶中, 分别加入 4 mL 正丁醇, 再依次加入 0.050、0.125、0.250 mL 混合对照品储备液, 超声提取 5、10、15 min 后稀释定容至刻度。试验结果表明, 在不同提取时间下, 样品中各组分浓度基本变化不大, 其回收率均可达到 90% ~ 110%, 同时阳性样品在提取时间 5 ~ 15 min, 检出组分的含量均无显著变化, 为此选择超声提取时间为 5 min。超声 5 min 时, 因超声时间短, 无温度波动。

3.5 提取温度选择

分别考察了超声提取温度在 25、30 和 35 $^{\circ}\text{C}$ 下对样品测定的影响。试验结果表明, 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 和 30 $^{\circ}\text{C}$ 下, 样品提取液各组分浓度均无明显变化, 但在 35 $^{\circ}\text{C}$ 时样品中部分组分 (如二氯甲烷) 浓度略有降低, 同时在超声提取温度升高过程中, 未发现阳性样品中的检出组分有含量增加的趋势, 为此选择超声提取温度为 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

3.6 残留溶剂解析

由头孢曲松钠的结构可以看出, 其由 7-氨基头孢烷酸 (7-ACA) 母核, 硫代三嗪杂环和氨基噻吩侧链酸三部分构成。经典的合成工艺为以 7-ACA 为原料, 先经 3 位三嗪杂环取代, 再进行 7 位侧链氨基噻吩杂环的 *N*-酰化反应, 最后经溶析结晶分离提纯^[13]。三氟化硼和本研究检出的乙腈一起作为 3 位三嗪杂环取代时的催化剂; 本研究检出的丙酮、甲醇、异丙醇均可作为最后溶析结晶时的溶析剂。其中, 丙酮、乙腈使用最广, 甲醇、异丙醇使用范围有限。

乙腈、甲醇作为二类溶剂, 无基因毒性但有动物致癌性; 丙酮、异丙醇作为三类溶剂, 为人

体低毒溶剂。已检出的上述 4 种残留溶剂含量虽未超过《中国药典》2020 年版及 ICH 对残留溶剂的限度水平, 但因甲醇在不同企业间残留量差异较大, 说明现有工艺并未完全控制甲醇残留量, 依然具有潜在风险, 对该品种进行残留溶剂监控依然具有实际意义。甲醇应作为该品种的质量控制关键参数, 在仿制药工艺流程设计上需重点关注。

3.7 小结

本方法灵敏、准确、快速, 可同时检出头孢曲松钠中 10 种残留溶剂, 对提升仿制药品质量, 推进一致性评价工作等方面具有十分积极的作用。

参考文献

- [1] 孙伟, 李波霞, 宋兵. 注射用头孢曲松钠致剂量相关性下肢关节疼痛 1 例 [J]. 中国药师, 2022, 25 (10): 1785-1786.
- [2] 耿悦, 张锦琳, 袁耀佐. 国产注射用头孢曲松钠质量分析 [J]. 中南药学, 2020, 18 (3): 489-492.
- [3] 刘向崇. 头孢曲松钠舒巴坦钠临床应用研究进展 [J]. 临床合理用药杂志, 2022, 15 (7): 178-181.
- [4] 刘立凡. 探究头孢呋辛钠、头孢曲松钠在下呼吸道感染治疗中的临床应用效果 [J]. 中国现代药物应用, 2021, 15 (2): 169-171.
- [5] 郭峰, 杨理明. 头孢曲松钠联合地塞米松治疗小儿化脓性脑膜炎的临床分析 [J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2020, 47 (5): 503-506.
- [6] 中国药典 2020 年版. 二部 [S]. 2020: 116.
- [7] 孙春艳, 赵亚萍, 陈宁林. 头孢曲松钠有机溶剂残留的考察 [J]. 中国药师, 2010, 13 (9): 1377-1378.
- [8] 陈飞, 陈华娇. 顶空气相色谱法测定头孢曲松钠中有机溶剂的残留 [J]. 福建分析测试, 2010, 19 (3): 49-52.
- [9] 冯翎, 刘彦. 顶空气相色谱法测定头孢曲松钠中有机溶剂残留量 [J]. 今日药学, 2009, 19 (10): 17-18, 25.
- [10] 游飞明. 顶空气相色谱法测定头孢曲松钠中多种溶剂残留量 [J]. 福建分析测试, 2007, 16 (1): 15-18.
- [11] 何慧清, 杨益林. 气相色谱顶空法测定头孢曲松钠中有机溶剂的残留 [J]. 广西医科大学学报, 2004, 21 (6): 897-898.
- [12] 曹观贞, 于亚娟, 宋亮亮, 等. 丙酮在头孢曲松钠精制中的应用与研究 [J]. 临床合理用药杂志, 2015, 8 (1): 118-120.
- [13] 张春桃, 王静康, 王永莉. 头孢曲松钠结晶工艺研究进展 [J]. 中国抗生素杂志, 2006, 31 (7): 388-391, 402.
- [14] Pedrosa TM, Salgado HRN. Validation of analytical methodology for quantification of cefazolin sodium pharmaceutical dosage form by high performance liquid chromatography to be applied for quality control in pharmaceutical industry [J]. Braz J Pharm Sci, 2013, 50 (1): 213-223.
- [15] Dhuria RS, Bhatti R, Bhatti MS, et al. Experimental design optimization for electrochemical removal of gentamicin: toxicity evaluation and degradation pathway [J]. Water Sci Technol, 2013, 67 (9): 2017-2024.

(收稿日期: 2023-08-14; 修回日期: 2023-09-29)

高效液相色谱法测定金莲花软胶囊中有效成分的含量

林凤屏, 翁嘉, 李士明, 朱漫玉, 刘丽婷 (惠州市食品药品检验所, 广东 惠州 516003)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法同时测定金莲花软胶囊中荜苳苔和牡荆苔的含量。**方法** 采用乙腈-0.1%磷酸溶液通过 RD-C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱进行梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 340 nm, 柱温 40 °C, 进样量 10 μL。**结果** 荜苳苔、牡荆苔分别在质量浓度 1.94 ~ 194.8 μg·mL⁻¹ ($r = 1.000$) 和 1.03 ~ 103.7 μg·mL⁻¹ ($r = 1.000$) 内与峰面积呈良好的线性关系; 平均加样回收率分别为 103.6% 和 100.2%, RSD 分别为 0.64% 和 0.78% ($n = 6$), 14 批样品荜苳苔和牡荆苔的含量分别在 3.090 ~ 4.729 mg·g⁻¹ 和 1.104 ~ 1.402 mg·g⁻¹。**结论** 所建立的方法简单、准确, 可用于金莲花软胶囊的质量控制。

关键词: 金莲花软胶囊; 高效液相色谱; 荜苳苔; 牡荆苔; 质量控制

中图分类号: R283, R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)07-1892-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.035

Content determination of active ingredients in Jinlianhua soft capsules by HPLC

LIN Feng-ping, WENG Jia, LI Shi-ming, ZHU Man-yu, LIU Li-ting (Huizhou Institute for Food and Drug Control, Huizhou Guangdong 516003)

Abstract: Objective To simultaneously determine the content of orientin and vitexin in Jinlianhua soft capsules by HPLC. **Methods** An RD-C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) chromatographic column was used with a gradient elution of acetonitrile and 0.1% phosphoric acid solution as the mobile phase. The flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, the wavelength was 340 nm, with the column temperature of 40 °C, and the injection volume of 10 μL. **Results** The linear range of orientin and vitexin was 1.94 ~ 194.8 μg·mL⁻¹ ($r = 1.000$) and 1.03 ~ 103.7 μg·mL⁻¹ ($r = 1.000$). The average recovery was 103.6% and 100.2%, and RSD was 0.64% and 0.78% ($n = 6$). The contents of orientin and vitexin in the 14 batches ranged 3.090 ~ 4.729 mg·g⁻¹ and 1.104 ~ 1.402 mg·g⁻¹. **Conclusion** The method is simple and accuracy, which can be used for the quality control of Jinlianhua soft capsules.

Key words: Jinlianhua soft capsule; HPLC; orientin; vitexin; quality standard

金莲花软胶囊广泛用于上呼吸道感染, 咽喉炎, 扁桃体炎, 牙周炎, 腮腺炎, 口腔溃疡及手足口病等各种疑难杂症的治疗。目前有研究表明, 金莲花软胶囊对于人冠状病毒 OC43 体外感染有抑制作用, 它可以抑制病毒的复制, 并且抑制病毒感染引起的宿主细胞内细胞因子的高表达^[1-3]。该药由金莲花单味药组成, 现代研究表明, 金莲花主要含黄酮类、有机酸类、生物碱类、香豆素类、甾醇类等成分, 其中黄酮类化合物 (主要包含荜苳苔和牡荆苔, 占总黄酮类成分的 2/3) 是金莲花中的主要有效成分^[4-8]。目前已有文献报道对金莲花药材进行含量研究^[9-15], 但金莲花软胶囊

现行标准中缺少对金莲花药材有效成分的定量研究。本课题在建立高效液相色谱法的同时, 选取含量较高、性质稳定的化合物进行研究, 从而更全面地反映药品质量, 为其质量控制提供依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

岛津 LC-20A (高效液相色谱仪, 安捷伦 1260, 均配置 DAD 检测器); XS205、XS204 电子天平 (梅特勒-托利多公司); KQ-250 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司, 功率 250 W, 40 kHz)。

1.2 试药

基金项目: 惠州市科技计划项目 (No.2022CZ010449)。

作者简介: 林凤屏, 女, 主管药师, 主要从事药品质量控制研究, email: 624595713@qq.com

金莲花软胶囊共 14 批, 分别来自 2 个厂家(厂家 1, 批号 L22K231、L23A081、L23A101、L23A071、L23A121、L23C021、L23A111、L23C031、L23C041、L23C051; 厂家 2, 批号 230433、221262、230333、221261)。对照品荜草苷(批号: 111777-202003, 含量: 98.0%)、牡荆苷(批号: 111687-202105, 含量: 99.1%)(中国食品药品检定研究院)。

甲醇、乙腈(色谱纯, 默克公司); 水为纯净水, 其余试剂均为分析纯(广州化学试剂厂)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 RD-C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0~40 min, 11%~15%A), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 40℃, 检测波长 340 nm, 进样量 10 μL, 理论板数按荜草苷峰计算, 应不低于 5000。

2.2 混合对照品溶液的制备

精密称取荜草苷对照品 10 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加 70%乙醇超声溶解并定容至刻度, 作为荜草苷对照品储备液; 另精密称取牡荆苷对照品 10 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加 70%乙醇

超声溶解并定容至刻度, 作为牡荆苷对照品储备液。分别精密吸取上述荜草苷对照品储备液 2 mL、牡荆苷对照品储备液 1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加 70%乙醇定容至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 供试品溶液的制备

取 10 粒供试品内容物, 混匀, 取约 0.2 g, 置于具塞锥形瓶中, 精密称定, 精密加入 70%乙醇 25 mL, 密塞, 称重, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称重, 用 70%乙醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 阴性样品溶液的制备

按金莲花软胶囊的制备过程制成缺金莲花的阴性样品, 再按“2.3”项下方法制成金莲花阴性样品溶液。

2.5 专属性试验

按“2.1”项下色谱条件, 精密量取混合对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液各 10 μL, 分别注入色谱仪, 记录色谱图。结果表明, 样品分离效果好, 荜草苷和牡荆苷与其他成分达到分离要求, 阴性样品溶液对测定无干扰, 见图 1。

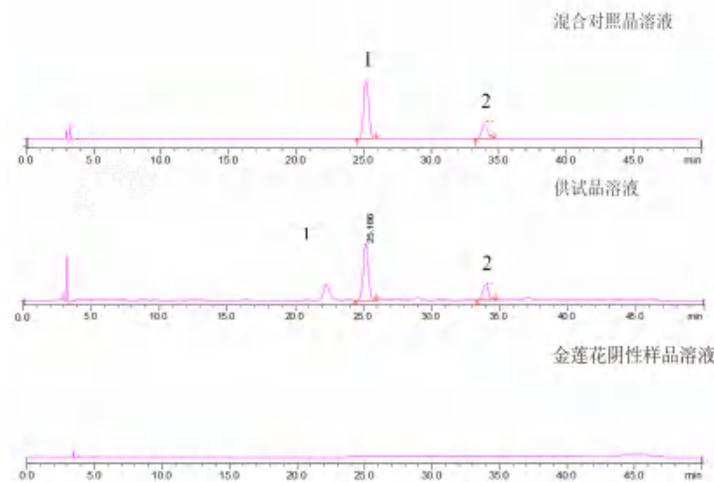


图 1 金莲花软胶囊专属性 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of specificity test for Jinlianhua soft capsule
1. 荜草苷(orientin); 2. 牡荆苷(vitexin)

2.6 线性关系考察

精密吸取“2.2”项下荜草苷和牡荆苷对照品储备液, 加甲醇溶解并稀释成不同浓度, 进样测定, 以峰面积 Y 为纵坐标、荜草苷和牡荆苷质量浓度 X ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 绘制标准曲线, 得线性方程: $Y = 2.717 \times 10^4 X + 1.456 \times 10^3$ ($r = 1.000$)、 $Y = 2.782 \times 10^4 X + 765.2$ ($r = 1.000$)。结果表明, 荜草苷质量浓度在 1.94~194.8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、牡荆苷质量浓度在 1.03~103.7 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与峰面积呈良好的线性关系。

2.7 方法学考察

2.7.1 精密度试验 精确吸取混合对照品溶液 10 μL, 连续进样 6 次, 计算得到荜草苷和牡荆苷峰面积的 RSD 分别为 0.55%、0.25%, 结果表明仪器精密度较好。

2.7.2 重复性试验 取金莲花软胶囊样品(批号: L22K231), 精密称取 6 份, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 计算得到荜草苷和牡荆苷的平均含量分别为 4.755 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 1.348 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 0.75% 和 0.80%。结果表明该方法重复性良好。

2.7.3 稳定性试验 取同一供试品溶液，分别于制备后 0、2、4、8、12、24、48 h，进样测定，记录荜草苷和牡荆苷的峰面积，结果 RSD 分别为 0.36% 和 0.54%，结果表明，供试品溶液在 48 h 内基本保持稳定。

2.7.4 加样回收试验 精密称取已知含量的样品 6 份（批号：L22K231，荜草苷含量 $4.755 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、牡荆苷含量 $1.348 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ），每份约 0.10 g，精密称定，分别精密加入适量对照品储备液，按“2.3”项下方法制备，进样测定，测得荜草苷和牡荆苷的平均加样回收率分别为 103.6%、100.2%，RSD 分别为 0.64%、0.78%，表明方法回收率良好。

2.7.5 耐用性试验 调节流速（0.9、1.0、1.1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ）、柱温（35、40、45 $^{\circ}\text{C}$ ）以及使用不同的品牌色谱柱 [RD-C18（4.6 mm \times 250 mm，5 μm ）；Ultimate XB-C18（4.6 mm \times 250 mm，5 μm ）；Camesil C18（4.6 mm \times 250 mm，5 μm ）]，考察荜草苷和牡荆苷的峰形以及与各相邻峰的分离情况。结果在本文色谱条件下色谱峰峰形良好，并且相邻峰对主峰无干扰，表明该方法耐用性良好。

2.8 样品的含量测定

取 14 批次样品，按“2.3”项下方法制备样品溶液，每批次制备 2 份样品，分别连续进样 2 次，按外标法以峰面积计算每批的含量，14 批样品含量测定结果见表 1。

表 1 样品含量测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
Tab 1 Content of orientin and vitexin ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

批号	荜草苷	牡荆苷	批号	荜草苷	牡荆苷
L22K231	4.729	1.347	L23C031	3.261	1.282
L23A081	3.781	1.317	L23C041	3.090	1.217
L23A101	3.925	1.358	L23C051	3.284	1.293
L23A071	3.923	1.385	230433	3.574	1.104
L23A121	3.900	1.395	221262	3.802	1.378
L23C021	3.342	1.332	230333	4.362	1.153
L23A111	3.933	1.402	221261	3.773	1.367

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

试验前期对乙腈-甲醇-0.1 磷酸溶液、乙腈-0.1% 磷酸溶液、甲醇-0.1% 磷酸溶液等流动相系统进行等度、梯度洗脱考察，选用了分离效果更好的乙腈-0.1% 磷酸溶液；同时也考察了不同浓度的磷酸溶液（0.1%、0.2%、0.4%）对峰形的影响，发现 3 种不同浓度磷酸对各成分的峰形影响不大，综合考虑，选择乙腈-0.1% 磷酸溶液为流动相系统。

3.2 提取方法的优化

针对金莲花的有效成分，分别考察了不同的提取方法（回流提取和超声提取），不同浓度的提

取溶剂（50% 甲醇、70% 甲醇、甲醇、50% 乙醇、70% 乙醇和乙醇），不同提取时间（20、30、40 min），不同溶剂体积（25、50、100 mL）对成分提取率的影响，结果发现超声提取与回流提取效果相当；以 70% 乙醇作为提取溶剂时提取率最优；提取时间 30 min 及以上时，每种成分提取率差异微乎其微；不同溶剂体积对各成分峰提取率影响较小；最后确定本文的提取方法。

3.3 小结

本文建立了操作简便、灵敏度高、重复性好、具有一定可行性和实用性、易于推广应用的金莲花软胶囊有效成分含量测定方法，并可用于该制剂的质量控制和评价。

参考文献

- [1] 毛鑫, 古淑尹, 刘叔文, 等. 金莲花软胶囊对人冠状病毒 OC43 的抑制作用[J]. 今日药学, 2021, 31 (12): 914-917.
- [2] 顾文丽. 中药金莲花的临床应用[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18 (89): 38-39.
- [3] 吴卓耘, 周晓俊, 王东华, 等. 金莲花软胶囊治疗急性上呼吸道感染外感风热证的疗效观察[J]. 现代药物与临床, 2018, 33 (3): 532-536.
- [4] 孙萍, 李新朋, 薛涛, 等. 金莲花药理作用及临床应用研究进展[J]. 中国药房, 2022, 33 (4): 507-512.
- [5] 雷蓉, 冯丽, 刘永利, 等. 金莲花的研究进展[J]. 中药材, 2015, 38 (5): 1085-1091.
- [6] 蒋伟, 屈海琪, 袁丹华, 等. 金莲花中荜草苷和牡荆苷对 D-半乳糖致衰老小鼠脑损伤的保护作用[J]. 中草药, 2012, 43 (7): 1376-1380.
- [7] 葛晓艳. 浅析金莲花的药用研究概况[J]. 黑龙江医药, 2012, 25 (3): 444-445.
- [8] 蔡红业, 刘海松, 郑国华, 等. 金莲花化学成分和药理活性研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23 (7): 2340-2352.
- [9] 杨天寿, 肖新月, 安瑜, 等. 金莲花的薄层鉴别与含量测定研究[J]. 药物分析杂志, 2014, 34 (10): 1878-1882.
- [10] 杨天寿, 李居安, 魏锋, 等. 金莲花的薄层鉴别及其总黄酮含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20 (24): 91-93.
- [11] 张建培, 乔桦, 张培伦, 等. RP-HPLC 法同时测定金莲花中 5 种黄酮苷类成分的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2018, 35 (1): 47-52.
- [12] 齐武强, 王明昭. 中药金莲花的质量标准及其总黄酮成分的提取工艺研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2017, 12 (8): 1089-1091, 1108.
- [13] 汪海宣, 叶红兵, 许倩, 等. 金莲花中药饮片质量研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37 (8): 963-966.
- [14] 吴磊, 陆超. 中药金莲花质量标准的建立与优化[J]. 生物加工过程, 2022, 20 (5): 552-557.
- [15] 杜柳, 应达时, 李佳俊, 等. 金莲花中荜草苷的含量测定研究[J]. 中医临床研究, 2020, 12 (30): 128-131.

(收稿日期: 2023-10-14; 修回日期: 2023-12-01)

炒制饮片焦栀子中 4 种多环芳烃测定及初步风险评估

王文婷, 郭娅*, 阳文武, 万莉 (重庆市万州食品药品检验所, 三峡库区道地药材开发利用重庆市重点实验室, 重庆 404100)

摘要: **目的** 建立对炒制饮片焦栀子中 4 种多环芳烃含量测定方法, 并利用单因子污染指数和综合污染指数对其进行风险评估。**方法** 采用高效液相-荧光检测法测定焦栀子中苯并(α)蒽、蒽、苯并(b)荧蒽、苯并(α)芘 4 种多环芳烃的含量; 采用单因子污染指数和综合污染指数对其风险进行评估。**结果** 4 种多环芳烃线性关系良好, 相关系数 $r \geq 0.999$, 回收率在 75.82% ~ 81.83%, $RSD \leq 2.5\%$ 。风险评估结果表明焦栀子中苯并(α)蒽、苯并(b)荧蒽和蒽的污染程度相当且较大, 远高于苯并(α)芘。同时, 综合污染指数 > 1 的占比为 69.57%, 提示 4 种多环芳烃污染较为严重, 表明焦栀子多环芳烃污染风险需要关注, 需进一步加强其风险监测和风险评估。**结论** 该方法可以用于焦栀子中 4 种多环芳烃的测定及其风险评估, 为炒制饮片焦栀子的多环芳烃污染水平进行监测, 为其安全风险预警及保障人民用药安全提供数据依据。

关键词: 焦栀子; 三峡库区; 高效液相-荧光检测法; 多环芳烃; 风险评估

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)07-1895-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.036

Determination and preliminary risk assessment of 4 polycyclic aromatic hydrocarbons in Gardeniae Fructus Praeparatus

WANG Wen-ting, GUO Ya*, YANG Wen-wu, WAN Li (Chongqing Wanzhou Food and Drug Inspection Institute, Chongqing Key Laboratory of Development and Utilization of Genuine Medicinal Materials in Three Gorges Reservoir Area, Chongqing 404100)

Abstract: Objective To determine the content of 4 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Gardeniae Fructus Praeparatus, and to assess the risks by single-factor pollution index and comprehensive pollution index. **Methods** The content of 4 PAHs including benzo (α) anthracene, fen, benzo (b) fluoranthene and benzo (α) pyrene in Gardeniae Fructus Praeparatus was determined by high performance liquid phase-fluorescence detection method. Moreover, the risks were assessed with single factor pollution index (P_1) and comprehensive pollution index (P_z). **Results** The 4 PAHs had a good linear relationship with the correlation coefficient $r \geq 0.999$, the recoveries ranged from 75.82% to 81.83%, and the $RSDs$ were all less than 2.5%. The risk assessment showed that the contamination level of benzo (α) anthracene, benzo (b) fluoranthene and fen in Gardeniae Fructus Praeparatus was similar and larger, much higher than that of benzo (α) pyrene. At the same time, the comprehensive pollution index $P_z > 1$ accounted for 69.57%, indicating that the 4 PAHs were more seriously polluted. The pollution risk of PAHs in Gardeniae Fructus Praeparatus should be attentioned. **Conclusion** This method can be used to determine the content and assess the risk of 4 PAHs in Gardeniae Fructus Praeparatus. The level of PAHs should be monitored to ensure the safety of medication use.

Key words: Gardeniae Fructus Praeparatus; Three Gorges reservoir area; high performance liquid phase-fluorescence detection method; polycyclic aromatic hydrocarbon; risk assessment

焦栀子为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 干燥成熟果实的炮制加工品, 收载于《中

国药典》2020 年版一部, 是由栀子经炮制后产生的一类饮片, 具有凉血止血的作用, 临床用于血

基金项目: 三峡库区道地药材木香、黄精、陈皮和太白贝母多环芳烃安全性质量标准研究 (Sys:20210029); 2020 年重庆市药品科研项目。

作者简介: 王文婷, 女, 工程师, 主要从事药物分析和研究工作, email: wenting92w@163.com *通信作者: 郭娅, 女, 主管中药师, 主要从事药品检验和标准研究工作, email: 603725622@qq.com

热吐血、尿血、崩漏等方面，因而临床用量大，被广泛使用^[1]。然而，焦栀子的炮制工艺主要为炒制，在炒制过程中，由于高温加热或不完全燃烧，极易产生多环芳烃^[2-7]。多环芳烃（PAHs）是由 2 个或 2 个以上苯环稠合而成的一类芳香族化合物，主要由有机物质（如油、木材、垃圾废物和煤）的热解和不完全燃烧产生，特别是其中的苯并（ α ）芘，具有“三致”（致癌、致畸和致突变）毒性^[8-10]。然而，目前关于 PAHs 污染情况的文献报道集中在水、大气、土壤、食品等方面，少有对中药炒制饮片中 PAHs 污染状况的报道，也并未对其制订相关限度标准^[11-15]。因此，本研究拟以焦栀子为研究对象，建立高效液相-荧光检测法对其 4 种 PAHs 残留量进行测定，并利用单因子污染指数（ P_i ）和综合污染指数（ P_z ）对焦栀子中多环芳烃残留量进行风险评估，为进一步全面控制焦栀子质量及临床安全应用提供依据。

1 仪器与试剂

LC-20A 高效液相色谱仪（日本岛津）；KH-2000DB 型超声波（昆山禾创）；MS3 涡旋振荡器（德国 IKA）；固相萃取装置（美国 Waters）；SQP 型分析天平（德国 Sartorius）；TurboVap2 氮吹仪（瑞典 Biotage）；4-16S 离心机（德国 SIGMA）。

乙腈、正己烷、二氯甲烷（均为色谱纯，DiKMA 公司）；苯并（ α ）蒽标准溶液（批号：B115087， $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）、蒽标准溶液（批号：B27327， $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）、苯并（b）荧蒽标准溶液（批号：B137900， $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）和苯并（ α ）芘标准溶液（批号：B110855， $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）（美国 CHEM SERVICE 公司）；MIP-PAHs 固相萃取柱。

三峡库区焦栀子样品为 2021 年 1 月采集，样品经重庆市万州食品药品检验所阳文武副主任中药师鉴定，样品采样信息见表 1。

表 1 样品采样信息

Tab 1 Samples information

样品批号	样品产地	样品批号	样品产地
191001	四川广安	200602	重庆荣昌
200901	四川广安	200101	重庆荣昌
200901	江西	200701	重庆万州
200401	重庆合川	200201	安徽涡阳
200801	重庆合川	190803	重庆彭水
190302	四川	200101	四川成都
180501	四川绵阳	191001	重庆璧山
200901-01	四川成都	200101	重庆九龙坡
200501	四川成都	200501	河北保定
200801	河北安国	191101	重庆梁平
200901	四川成都	200201	四川成都
1910001	四川成都		

2 方法与结果

2.1 色谱条件

以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂（ $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ ， $5 \mu\text{m}$ ）；以乙腈为流动相 A，水为流动相 B，梯度洗脱（0 ~ 6 min: 50%A；6 ~ 38 min: 50% ~ 100%A；38 ~ 46 min: 100%A；46 ~ 53 min: 100% ~ 50%A）；柱温 $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ；流速 $1.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ；进样量 $10 \mu\text{L}$ ；激发和发射波长见表 2。

表 2 多环芳烃的激发波长、发射波长及其切换色谱时间检测参数
Tab 2 Excitation wavelength, emission wavelength and detection parameters of switching chromatography time of PAHs

时间/min	激发波长/nm	发射波长/nm
0	270	385
32.5	256	446
36.0	292	410

2.2 对照品溶液的制备

分别精密量取苯并（ α ）蒽、蒽、苯并（b）荧蒽和苯并（ α ）芘标准溶液适量，用乙腈稀释成 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的单标溶液；精密吸取各单标溶液，配制成质量浓度为 1、5、10、20、50、100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

称取样品 2 g 于 50 mL 离心管中，加入 10 mL 乙腈，涡旋振荡 30 s 后，超声提取 30 min， $4500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min，重复提取 1 次，合并提取液于氮吹管中，氮气吹至近干；加入 5 mL 正己烷，涡旋振荡 30 s 溶解，全部加入 MIP-PAHs 固相萃取柱，用 2 mL 正己烷洗涤氮吹管并入柱中，用 3 mL 正己烷淋洗两次，弃去淋洗液，再用 10 mL 二氯甲烷洗脱并收集净化液到离心管中；氮气吹至近干，用乙腈定容至 1.0 mL，过滤，待测。

2.4 线性关系考察

分别精密吸取“2.2”项下各浓度混合对照品溶液，进样测定，以 4 种 PAHs 的峰面积（ Y ）为纵坐标，对照品溶液质量浓度（ X ）为横坐标，绘制标准曲线，得回归方程，结果 4 种多环芳烃在 $1 \sim 100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与峰面积线性关系良好， $r > 0.999$ ，结果见表 3。

2.5 精密度考察

取焦栀子（批号：191001）的样品，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，重复进样 6 次，测定峰面积，计算精密度，结果苯并（ α ）芘、苯并（ α ）蒽、苯并（b）荧蒽、蒽的 RSD 分别为 0.50%、0.90%、0.90%、0.50%，表明仪器精密度良好。

2.6 重复性考察

取焦栀子（批号：191001）的样品 6 份，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，进样测定，结果苯并（ α ）芘、苯并（ α ）蒽、苯并（b）荧蒽、蒽的 RSD 分别为 1.6%、1.7%、0.90%、1.6%，表明方法重复性良好。

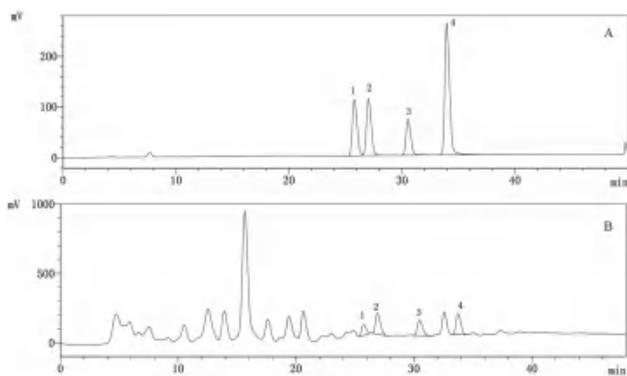


图 1 混合对照品 (A) 和阳性样品 (B) 色谱图
Fig 1 Chromatographic diagram of mixed reference substance (A) and positive sample (B)
1. 苯并 (α) 蒽 [benzo (α) anthracene]; 2. 蒎 (fen); 3. 苯并 (b) 荧蒽 [benzo (b) fluoranthene]; 4. 苯并 (α) 芘 [benzo (α) pyrene]

表 3 4 种多环芳烃线性关系、检测限和定量限

Tab 3 Linear relationship, detection limit and quantification limit of 4 PAHs

化合物	回归方程	r	检测限 / (μg · kg ⁻¹)	定量限 / (μg · kg ⁻¹)
苯并 (α) 蒽	$Y = 1.405 \times 10^5 X - 1.018 \times 10^5$	0.9993	0.33	1.0
蒎	$Y = 1.535 \times 10^5 X - 1.036 \times 10^5$	0.9996	0.30	0.8
苯并 (b) 荧蒽	$Y = 8.008 \times 10^4 X - 6.230 \times 10^4$	0.9998	0.33	1.0
苯并 (α) 芘	$Y = 3.139 \times 10^5 X - 3.908 \times 10^5$	0.9991	0.30	1.1

加入质量浓度为 1 μg · mL⁻¹ 的混合对照品溶液 50 μL, 制备供试品溶液, 分别测定, 计算平均回收率。结果苯并 (α) 蒽、蒎、苯并 (b) 荧蒽和苯并 (α) 芘的回收率在 75.82% ~ 81.83%, RSD 值分别为 2.5%、2.4%、1.7%、1.7%, 表明方法准确度良好。

2.10 焦栀子中 4 种 PAHs 含量测定

取各样品, 按“2.3”项下方法平行制备供试品溶液, 进样测定, 结果见表 4。焦栀子样品中均检出 4 种 PAHs, 但含量存在较大差异, 样品间差异明显, PAHs 总量检出范围在 6.3 ~ 213.9 μg · kg⁻¹。其中苯并 (b) 荧蒽和蒎的检出量普遍较高, 检出范围分别在 1.8 ~ 82.1 μg · kg⁻¹ 和 2.1 ~ 91.9 μg · kg⁻¹; 其次是苯并 (α) 蒽, 检出范围在 1.1 ~ 60.1 μg · kg⁻¹; 最后是苯并 (α) 芘, 检出范围在 1.2 ~ 25.6 μg · kg⁻¹。GB2762—2022《食品安全国家标准食品中污染物限量》中仅规定了苯并 (α) 芘的最高限量值, 为 10 μg · kg⁻¹。以上标准为参考限度, 在 23 批检出 PAHs 的焦栀子中, 不符合国标 GB2762—2022 的占比为 43.48%, 提示焦栀子中 PAHs 的残留量需引起重视。

2.11 风险评估^[16-17]

2.11.1 P_i 评价 当 P_i ≤ 1 时, 表明样品未被该污染物污染; 当 P_i > 1 时, 表明样品已被该污染物污染, 其计算公式为 (1)。

$$P_i = C_i/S_i \quad (1)$$

其中 P_i 为焦栀子中单个污染指标的污染指数; C_i 为焦栀子中单个污染指标的实测含量值; S_i 为

2.7 稳定性考察

取焦栀子 (批号: 191001) 的样品, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 常温下放置 0、3、6、9、12、24、36、48 h 后进样测定, 结果苯并 (α) 蒽、苯并 (α) 蒽、苯并 (b) 荧蒽、蒎的 RSD 分别为 0.60%、0.50%、0.60%、0.20%, 表明供试品溶液室温放置下 48 h 内稳定。

2.8 检测限及定量限

取阴性试样 2 g, 定容体积为 1 mL 时, 在空白基质中加入较低质量浓度的溶液后进样测定, 以信噪比 (S/N) 为 3 和 10 确定方法的检测限和定量限, 结果见表 3。

2.9 加样回收试验

称取阴性样品各 6 份, 每份约 1 g, 分别精密

表 4 焦栀子样品中 4 种多环芳烃含量测定结果 (μg · kg⁻¹)

Tab 4 Determination of 4 PAHs in Gardeniae Fructus Praeparatus (μg · kg⁻¹)

批号	苯并 (α) 蒽	苯并 (α) 芘	苯并 (b) 荧蒽	蒎	PAHs 总量
191001	20.1	9.6	18.2	22.3	70.2
200901	25.5	10.0	20.2	24.3	80.0
200901	19.6	9.7	24.3	30.4	84.0
200401	22.5	11.2	17.9	16.8	68.4
200801	15.3	7.7	16.6	21.5	61.1
190302	25.5	10.5	22.3	26.3	84.6
180501	30.9	12.5	31.3	25.8	100.5
200901-01	33.6	15.3	19.9	24.8	93.6
200501	19.7	7.8	25.3	18.8	71.6
200801	18.2	7.5	16.9	20.5	63.1
200901	35.2	15.6	32.3	33.5	116.6
1910001	6.6	2.6	1.8	3.6	14.6
200602	6.9	1.5	5.8	8.2	22.4
200101	60.1	16.5	82.1	55.2	213.9
200701	1.2	1.7	4.2	3.3	10.4
200201	42.6	18.8	56.4	91.9	209.7
190803	25.3	16.9	37.6	41.6	121.4
200101	5.2	2.9	5.6	4.1	17.8
191001	33.2	18.6	30.1	31.8	113.7
200101	1.1	1.2	1.9	2.1	6.3
200501	28.1	25.6	19.4	12.1	85.2
191101	2.5	1.9	2.1	2.7	9.2
200201	1.2	1.4	1.9	2.5	7.0

焦栀子中单个污染指标的限量标准值。

2.11.2 P_z 评价 当多种污染物质同时存在时, 忽略污染物质之间的相互作用, 可用 P_z 来评价其污染程度, 当 P_z ≤ 1 时, 表明样品未被所测污染物污染; 当 P_z > 1 时, 表明样品已被所测污染物污染,

其计算公式为(2)。

$$P_z = \sqrt{[(C_i/S_i)^2 \text{最大} + (C_i/S_i)^2 \text{平均}]/2} \quad (2)$$

其中 P_z 为焦栀子中所测的各个污染指标的综合污染指数; C_i 为焦栀子中各个污染指标的实测含量值; S_i 为焦栀子中各个污染指标的限量标准值。

由于苯并(α)芘较其他 3 种 PAHs 毒性较高,且有相应的限度标准,因此本研究采用国标 GB2762—2022 中限度标准 $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 进行计算,焦栀子中 4 种 PAHs 污染指数见表 5。

表 5 焦栀子中 4 种多环芳烃污染指数

Tab 5 Pollution index of 4 PAHs in Gardeniae Fructus Praeparatus

批号	P_i				P_z
	苯并(α)蒽	苯并(α)芘	苯并(b)荧蒹	蒽	
191001	2.01	0.96	1.82	2.23	2.01
200901	2.55	1.00	2.02	2.43	2.29
200901	1.96	0.97	2.43	3.04	2.61
200401	2.25	1.12	1.79	1.68	2.00
200801	1.53	0.77	1.66	2.15	1.86
190302	2.55	1.05	2.23	2.63	2.39
180501	3.09	1.25	3.13	2.58	2.82
200901-01	3.36	1.53	1.99	2.48	2.90
200501	1.97	0.78	2.53	1.88	2.19
200801	1.82	0.75	1.69	2.05	1.83
200901	3.52	1.56	3.23	3.35	3.23
1910001	0.66	0.26	0.18	0.36	0.53
200602	0.69	0.15	0.58	0.82	0.70
200101	6.01	1.65	8.21	5.52	5.69
200701	0.12	0.17	0.42	0.33	0.35
200201	4.26	1.88	5.64	9.19	7.48
190803	2.53	1.69	3.76	4.16	3.64
200101	0.52	0.29	0.56	0.41	0.51
191001	3.32	1.86	3.01	3.18	3.09
200101	0.11	0.12	0.19	0.21	0.19
200501	2.81	2.56	1.94	1.21	2.49
191101	0.25	0.19	0.21	0.27	0.25
200201	0.12	0.14	0.19	0.25	0.22

由表 5 可知,23 批焦栀子中,苯并(α)蒽 $P_i > 1$ 的有 16 批,占比为 69.57%; 苯并(α)芘 $P_i > 1$ 的有 10 批,占比为 43.48%; 苯并(b)荧蒹 $P_i > 1$ 的有 16 批,占比为 69.57%; 蒽 $P_i > 1$ 的有 16 批,占比为 69.57%,表明 23 批焦栀子中苯并(α)蒽、苯并(b)荧蒹和蒽的污染程度相当且较大,远高于苯并(α)芘。同时, $P_z > 1$ 的也有 16 批,占比为 69.57%,提示 4 种 PAHs 污染较为严重,表明焦栀子 PAHs 污染风险需要关注,需进一步加强其风险监测和风险评估。此外,从表 5 中还可看出, P_z 是随 P_i 增加而增加的,如果样品 4 种 PAHs 污染都较为严重,则 P_z 较高。

3 小结

本试验建立了高效液相-荧光检测法分析炒制

饮片焦栀子中 4 种 PAHs 的含量,并利用 P_i 和 P_z 对 PAHs 残留进行风险评估。该法样品前处理简单,仪器操作便捷,并能快速对 4 种 PAHs 同步分析。风险评估结果表明焦栀子中苯并(α)蒽、苯并(b)荧蒹和蒽的污染程度相当且较大,远高于苯并(α)芘。同时, $P_z > 1$ 的占比为 69.57%,提示 4 种 PAHs 污染较为严重,表明焦栀子 PAHs 污染风险需要关注,需进一步加强其风险监测和风险评估。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版.一部[S]. 2020: 260.
- [2] 曹德艳,赵思源,秦佳琪,等.6 种药食两用中药材中多环芳烃污染水平及健康风险评估[J].食品安全质量检测学报,2022,13(12):3899-3906.
- [3] 杜晓娟,曾利娜,苏畅,等.中药中多环芳烃污染风险控制研究进展[J].中国现代中药,2021,23(4):741-746.
- [4] 夏梦雨,王云,郑颖豪,等.基于颜色-成分关联分析比较焦栀子炮制过程不同炒制形态质量变化规律[J].中国中药杂志,2021,46(9):2197-2206.
- [5] 雷磊,王玉,霍志鹏,等.LCMS-IT-TOF 分析栀子炒焦前后化学成分的变化[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(17):88-97.
- [6] 田建宁,孙佰申,徐红月,等.GC-MS 测定乌参中多环芳烃残留[J].广州化工,2014,42(19):90-92.
- [7] 徐莘.焦栀子炮制机理及质量研究[D].济南:山东中医药大学,2008.
- [8] 肖静,严志宏,姚雪莲,等.多环芳烃污染在中药中的存在及分析方法研究进展[J].中成药,2023,45(3):874-880.
- [9] 刘慧敏.多环芳烃暴露、基因多态性及其交互作用与肺癌患病风险的关联研究[D].武汉:华中科技大学,2020.
- [10] 尚琼琼.表面活性剂对固定化微生物修复多环芳烃污染土壤的作用[D].青岛:中国石油大学(华东),2018.
- [11] 李珍,孙丽娜,范琪,等.土壤中聚乙烯和聚苯乙烯微塑料对多环芳烃的吸附行为和机理分析[J].环境科学学报,2022,42(11):232-244.
- [12] 张馨露,刘世杰,韩美丽,等.大气多环芳烃区域迁移转化模型比较与关键影响因素:以京津冀地区为例[J].环境科学,2022,43(6):2906-2916.
- [13] 邢巍,刘兴运,许朝阳,等.食品中痕量多环芳烃检测技术的研究进展[J].食品安全质量检测学报,2021,12(17):7036-7042.
- [14] GB 5009.265—2021.食品安全国家标准食品中多环芳烃的测定[S].2021.
- [15] 李晓亚,张莉,张永涛,等.固相膜萃取与超声洗脱联用-气相色谱-质谱法同时测定水中 33 种有机氯和多环芳烃[J].中国卫生检验杂志,2013,23(15):3018-3020.
- [16] 毛腾霄,程龙,袁涛,等.7 种即食中药中 5 种重金属的健康风险评估[J].中成药,2020,42(12):3265-3269.
- [17] 郑俊旦.食用植物油中苯并芘测定方法研究和油茶籽油风险评估[D].杭州:浙江农林大学,2018.

(收稿日期:2023-10-15;修回日期:2023-12-16)

高效液相色谱法测定替戈拉生中有关物质的研究

张磊¹, 苑艳飞², 林小晖³, 王丽华¹, 徐树娟¹, 申应德¹ (1. 临沂市检验检测中心, 山东 临沂 276001; 2. 泰安市食品药品检验检测研究院, 山东 泰安 271000; 3. 济南市食品药品检验检测中心, 济南 250000)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法测定替戈拉生原料药中 3 种有关物质的含量。方法 采用 Agilent Proshell 120 EC-C18 色谱柱 (4.6 mm×100 mm, 2.7 μm); 流动相 A 为 0.01 mol·L⁻¹ 醋酸铵缓冲液, 流动相 B 为乙腈, 线性梯度洗脱; 检测波长为 220 nm; 流速为 0.7 mL·min⁻¹; 柱温为 40℃; 进样量为 10 μL。结果 杂质 A~C 的线性范围分别为 0.0972~1.944 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9999$)、0.0509~1.018 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9997$) 及 0.1089~2.178 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9997$), 平均回收率分别为 96.27%、95.40% 和 96.10%, RSD 分别为 2.1%、2.3% 和 2.2%。结论 该方法准确可靠, 灵敏度高, 可用于替戈拉生原料药有关物质的控制。

关键词: 替戈拉生; 有关物质; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R927

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)07-1899-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.037

Determination of related substances in tegoprazan by HPLC

ZHANG Lei¹, YUAN Yan-fei², LIN Xiao-hui³, WANG Li-hua¹, XU Shu-juan¹, SHEN Ying-de¹ (1. Linyi Inspection and Testing Center, Linyi Shandong 276001; 2. Tai'an Institute for Food and Drug Control, Tai'an Shandong 271000; 3. Jinan Institute for Food and Drug Control, Jinan 250000)

Abstract: Objective To determine the 3 related substances in tegoprazan by HPLC. **Methods** An Agilent Proshell 120 EC-C18 (4.6 mm×100 mm, 2.7 μm) column was used. The mobile phase A was 0.01 mol·L⁻¹ ammonium acetate buffer, and the mobile phase B was acetonitrile, with linear gradient elution. The detection wavelength was 220 nm. The flow rate was 0.7 mL·min⁻¹, and the column temperature was 40℃. The injection volume was 10 μL. **Results** The calibration curves of impurity A, B and C were 0.0972~1.944 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9999$), 0.0509~1.018 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9997$), and 0.1089~2.178 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9997$). The average recovery was 96.27%, 95.40% and 96.10%, with RSDs of 2.1%, 2.3% and 2.2%. **Conclusion** The method is accurate and reliable, which can be used for the quality control of tegoprazan.

Key words: tegoprazan; related substance; HPLC; content determination

替戈拉生 (tegoprazan) 化学名称为 (S)-4-[(5, 7-二氟苯并二氢吡喃-4-基) 氧基]-N, N, 2-三甲基-1H 苯并 [d] 咪唑-6-甲酰胺, 是罗欣药业研发的一类新药。替戈拉生片于 2022 年 4 月 8 日获得中国上市许可, 批准的适应证为反流性食管炎。替戈拉生是一种钾竞争性酸阻断剂, 是一类新型抑酸药物^[1], 通过竞争性地阻断胃 H⁺/K⁺-ATP 酶的钾离子结合位点产生抑制胃酸分泌的作用^[2-5], 具有起效快、抑酸作用更强和更持久、安全性良好的优点^[2]。

替戈拉生中存在多种有关物质, 影响其纯度

和安全性。替戈拉生为 2022 年上市的一类新药, 尚未检索到关于其有关物质研究的文献报道。替戈拉生分子结构中含有酰胺键和醚键, 其结构并不稳定, 在样品的存放过程中会发生降解, 分别生成杂质 A、杂质 B 和杂质 C (结构式见图 1)。高效液相色谱法作为控制化学药物中有关物质的方法, 具有准确灵敏、专属性高、方法可靠的优点^[6-8], 已经成为化学药物有关物质检查的常规方法。本文结合其合成工艺和可能的降解途径, 选取其中 3 种杂质作为研究对象, 建立 HPLC 法对替戈拉生中可能存在的 3 种有关物质进行研究,

分析该药物的有关物质，为控制替戈拉生的质量提供技术方法。

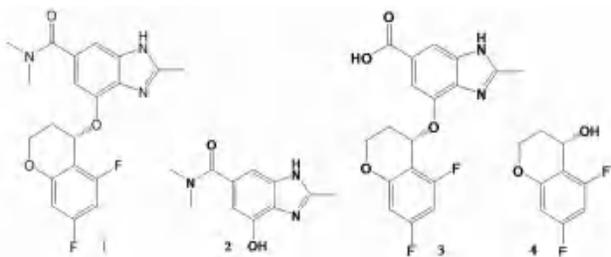


图 1 替戈拉生及各杂质的化学结构

Fig 1 Chemical structures of tegoprazan and its impurities

1. 替戈拉生 (tegoprazan); 2. 杂质 A (impurity A); 3. 杂质 B (impurity B); 4. 杂质 C (impurity C)

1 材料

Agilent1290 高效液相色谱仪 (包括自动进样器、四元泵、柱温箱、二极管阵列检测器, 美国安捷伦公司)。METELER XS 205 电子分析天平 (瑞士梅特勒公司, 精度为 0.01 mg), Milli-Q A10 型超纯水仪 (美国密理博公司)。

替戈拉生对照品 (批号: 00282-066, 纯度: 99.7%)、杂质 A 对照品 (批号: 420133-202101, 纯度: 100%)、杂质 B 对照品 (批号: 00791-071, 纯度: 97.3%)、杂质 C 对照品 (批号: 420135-202101, 纯度: 100%)(SDL 公司); 替戈拉生原料药 (批号分别为 622041040、622051026、622061057、622091016、623041003, SDL 公司); 乙腈 (色谱纯, 默克公司), 醋酸铵 (优级纯, 国药集团试剂), 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Proshell 120 EC-C18 色谱柱 (4.6 mm×100 mm, 2.7 μm); 流动相 A: 0.01

mol·L⁻¹ 醋酸铵缓冲液, 流动相 B: 乙腈, 线性梯度洗脱 (0~2 min, 90%A; 2~3 min, 90%~70%A; 3~15 min, 70%A; 15~16 min, 70%~90%A; 16~21 min, 90%~10%A); 流速: 0.7 mL·min⁻¹; 检测波长: 220 nm; 柱温: 40℃; 进样量: 10 μL。

2.2 溶液配制

2.2.1 供试品溶液 取替戈拉生原料药 100 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 用乙腈-水 (10:90)(简称溶剂) 溶解并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 制得质量浓度为 1.0 mg·mL⁻¹ 的供试品溶液。

2.2.2 对照品储备液 分别取替戈拉生对照品 25.14 mg、杂质 A 对照品 24.31 mg、杂质 B 对照品 13.08 mg、杂质 C 对照品 27.22 mg, 精密称定, 置 250 mL 量瓶中, 用溶剂溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制得质量浓度分别为 100.3、97.2、50.9、108.9 μg·mL⁻¹ 的对照品储备液。

2.2.3 混合对照品溶液 精密量取各对照品储备液 1 mL, 置同一 100 mL 量瓶中, 制得混合对照品溶液。

2.2.4 系统适用性试验溶液 取替戈拉生约 100 mg, 置 100 mL 量瓶中, 精密加入杂质 A、杂质 B 与杂质 C 对照品储备液各 1 mL, 用溶剂溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制得系统适用性试验溶液。

2.3 系统适用性试验

取“2.2”项下空白溶剂、混合对照品溶液、系统适用性试验溶液与供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件分别进样测定, 记录色谱图 (见图 2)。结果显示, 在该色谱条件下, 各色谱峰之间的分离度均大于 1.5, 理论板数均大于 5000, 拖尾因子均小于 1.5。

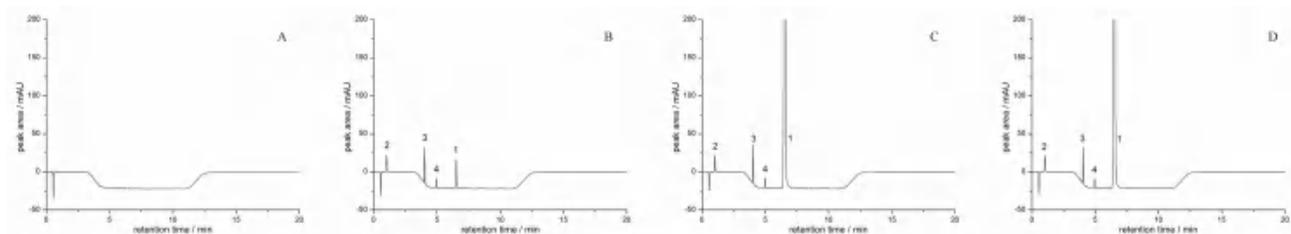


图 2 替戈拉生高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of tegoprazan

A. 溶剂 (solvent); B. 混合对照品溶液 (reference substance solution); C. 系统适用性试验溶液 (system suitability test solution); D. 供试品溶液 (sample solution); 1. 替戈拉生 (tegoprazan); 2. 杂质 A (impurity A); 3. 杂质 B (impurity B); 4. 杂质 C (impurity C)

2.4 破坏试验

称取替戈拉生原料药 5 份, 各约 100 mg, 分别置 100 mL 量瓶中, 进行如下破坏试验:

① 酸破坏试验: 精密加入 1.0 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 1 mL, 使溶解, 放置 30 min, 精密加入

1.0 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 1 mL 中和, 用溶剂稀释至刻度, 摇匀; ② 碱破坏试验: 精密加入 1.0 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 1 mL, 放置 30 min, 精密加入 1.0 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 1 mL 中和, 用溶剂稀释至刻度, 摇匀; ③ 氧化破坏试验: 精密加

入 30% 过氧化氢溶液 1 mL, 放置 1 h, 用溶剂稀释至刻度, 摇匀; ④ 高温破坏试验: 将样品用溶剂溶解, 于 90 °C 水浴加热 2 h, 摇匀; ⑤ 光照破坏试验: 将样品用溶剂溶解后, 放在可见光下照射 24 h。按照“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图 (见图 3)。结果显示, 在酸破坏条件下, 杂质 A 和杂质 C 的量明显增加; 在碱破坏条件下, 3 种杂质的量均没有明显变化, 且没有其他杂质生成, 说明替戈拉生在碱性环境中比较稳定; 在

30% 过氧化氢破坏条件下, 3 种杂质的量没有明显变化, 但是生成了多个未知杂质; 在高温破坏条件下, 杂质 A 和杂质 C 的量有所增加, 同时生成了多个未知杂质; 在光照条件下, 3 种杂质的量没有明显变化, 但是在保留时间约 10 min 处生成一个未知杂质。以上试验表明: 替戈拉生在碱性条件下比较稳定, 在酸、加热、氧化和光照条件下均不稳定, 各杂质色谱峰在试验条件下均能良好分离, 且没有相互干扰。

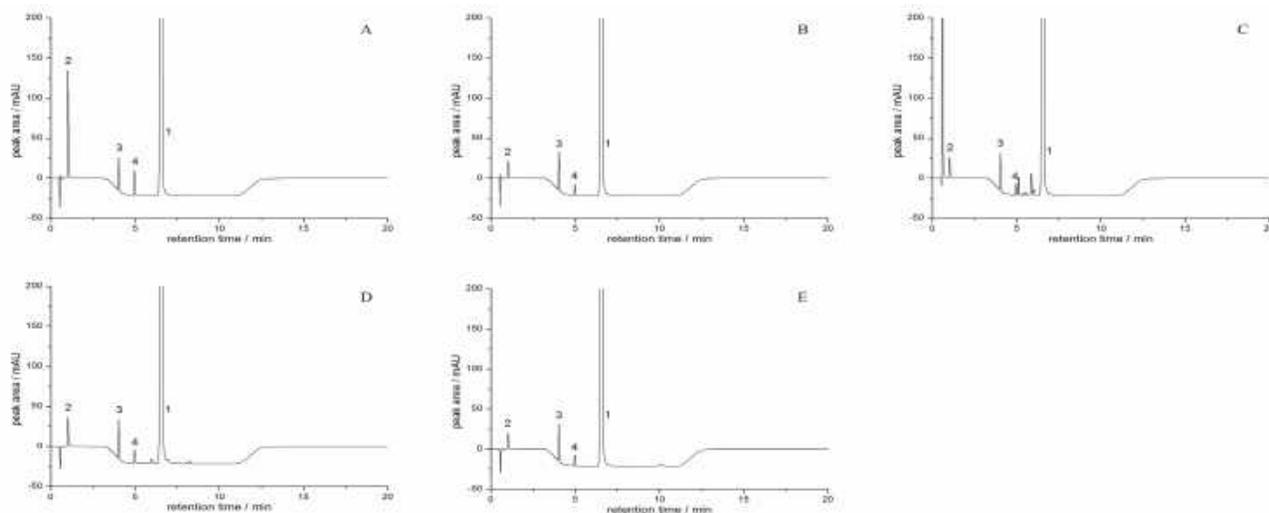


图 3 破坏试验色谱图

Fig 3 Chromatograms of destruction test

A. 酸破坏 (acid degradation); B. 碱破坏 (alkali degradation); C. 氧化破坏 (oxidative degradation); D. 高温破坏 (heat degradation); E. 光照破坏 (light degradation); 1. 替戈拉生 (tegoprazan); 2. 杂质 A (impurity A); 3. 杂质 B (impurity B); 4. 杂质 C (impurity C)

2.5 线性关系考察

分别精密量取对照品储备液 0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 mL, 置 100 mL 量瓶中, 用溶剂稀释至刻度, 摇匀, 作为系列对照品溶液, 进样测定, 记录色谱图。以替戈拉生和各杂质浓度 (X , $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 以峰面积 (Y) 为纵坐标, 采用偏最小二乘法进行线性回归, 制得标准曲线方程。替戈拉生与各杂质的标准曲线方程、相关系数 (r) 和线性范围结果见表 1。

2.6 检测限与定量限

取混合对照品溶液用溶剂逐步稀释, 以各成分色谱峰信噪比 $S/N = 10$ 时测定替戈拉生与各杂质定量限 (LOQ), 以各成分色谱峰信噪比 $S/N = 3$ 时测定替戈拉生与各杂质检测限 (LOD), 结果见表 1。

2.7 精密度试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录替戈拉生与各杂质色谱峰的峰面积, 结果替戈拉生与杂质 A ~ C 的峰面积的 RSD ($n = 6$) 分别为 0.80%、0.92%、0.57% 和 0.49%, 结果表明仪器的精密度良好。

2.8 重复性试验

取替戈拉生原料药 (批号: 622041040), 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 共 6 份, 分别进样检测, 记录 3 种杂质峰面积并计算平均含量。结果杂质 A ~ C 的含量的 RSD ($n = 6$) 分别为 1.3%、1.4% 和 2.0%, 表明方法的重复性良好。

2.9 稳定性试验

取同一供试品溶液 (批号: 622041040), 于暗处放置 0、2、4、8、12、16 和 24 h 进样检测, 记录 3 种杂质色谱峰面积。结果杂质 A ~ C 的峰面积的 RSD 分别为 0.94%、1.2% 和 0.88%, 表明样品溶液在暗处放置 24 h 稳定。

2.10 加样回收试验

精密称取同一批替戈拉生原料药 (批号: 622041040) 约 50 mg, 共 6 份, 置 100 mL 量瓶中, 精密加入各对照品储备液 0.50 mL, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 计算各杂质的回收率。结果杂质 A ~ C 的平均回收率分别为 96.27%、95.40% 和 96.10%, RSD 分别为 2.1%、2.3% 和 2.2%。

表 1 线性试验、LOD、LOQ 结果

Tab 1 Linearity test, LOD and LOQ

化合物	标准曲线方程	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	r	LOD / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LOQ / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
替戈拉生	$Y = 163.6X + 0.465$	0.1003 ~ 2.006	0.9999	0.02	0.05
杂质 A	$Y = 83.2X - 0.002$	0.0972 ~ 1.944	0.9999	0.01	0.03
杂质 B	$Y = 246.8X - 1.899$	0.0509 ~ 1.018	0.9997	0.02	0.05
杂质 C	$Y = 40.67X + 0.132$	0.1089 ~ 2.178	0.9997	0.01	0.03

2.11 样品杂质测定

取替戈拉生原料药,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,分别进样测定,3种杂质成分的含量测定结果见表2。根据对5批次样品的测定结果进行分析,3种杂质的最大含量为 $0.99 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,且未检出其他未知杂质。5批次样品中各种杂质的测定结果基本一致,说明样品的制备工艺非常稳定。按照从严控制的要求,本文建议设定杂质A和杂质C的限度为0.2%,杂质B的限度为0.1%,其他单个未知杂质的限度为0.1%,各杂质的总量限度为1.0%。通过方法学验证,本文建立的杂质检测方法能够准确检测出微量的3种待测杂质,且3种待测杂质存在于替戈拉生原料药中,在精制过程中很难去除完全,应建立方法进行控制。通过检测,3种待测杂质的含量分别为杂质A 0.083%~0.092%、杂质B 0.037%~0.053%、杂质C 0.078%~0.099%。

表 2 含量测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n = 3$)Tab 2 Content determination ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n = 3$)

批号	杂质 A	杂质 B	杂质 C
622041040	0.92	0.49	0.99
622051026	0.89	0.37	0.84
622061057	0.81	0.50	0.78
622091016	0.90	0.45	0.83
623041003	0.83	0.52	0.87

3 讨论

本文分别比较了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-磷酸盐、乙腈-醋酸盐等不同的流动相系统,发现采用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵缓冲液-乙腈作为流动相时,各色谱峰的峰形较佳,拖尾因子均小于1.5,分离度较好,各色谱峰的理论塔板数均在5000以上,因此,本文选择 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵缓冲液-乙腈作为流动相。

替戈拉生和3种杂质结构差异较大,在反相色谱系统中保留行为差别较大。尤其是杂质A为酚酸类化合物,极性较大,在反相色谱系统中出峰较快,而其他成分的极性相对较小,在反相色谱系统中出峰较慢。为使得杂质B、杂质C和主成分较快出峰,缩短分析时间,在杂质A完全洗脱出色谱柱后,提高流动相中乙腈的比例(30%),并以等度洗脱的方式继续洗脱。流动相

比例的快速变化,使得基线不平直,本文通过降解破坏试验考察,3种已知杂质及所有未知杂质与主成分之间的分离度均符合系统适用性试验的要求,并不影响对杂质的检测。

本文采用二极管阵列检测器,对3种待测杂质成分进行全波长扫描,发现所有待测成分在220 nm波长处均具有较大吸收,因此选择220 nm作为检测波长。同时,对样品的色谱图进行光谱学纯度检查,所有待测成分均为单一的色谱峰,待测成分色谱峰没有其他成分干扰。

替戈拉生中存在一些工艺杂质和降解杂质,其本身稳定性较差,在酸性、高温、氧化和光照条件下容易降解,影响其纯度。根据本文降解破坏试验考察,杂质A和杂质C在多种破坏条件下均会产生,应该重点控制其限量,而杂质B在破坏试验中并没有明显增加,属于工艺杂质。本文建立HPLC方法同时检测替戈拉生中的3种有关物质,方法准确、可靠、灵敏度高,可为替戈拉生的质量控制提供参考。

参考文献

- [1] 杨君,刘芳,臧雷.新型钾离子竞争性酸阻滞剂:替戈拉生[J].中国新药与临床杂志,2022,41(5):272-275.
- [2] 王萍,刘亚婷,赵莹,等.钾竞争性酸阻滞剂治疗胃酸相关疾病的研究进展[J].中国处方药,2023,21(5):170-176.
- [3] Kyung CY, Hak KJ, HyunSoo K. et al. Randomised clinical trial: comparison of tegoprazan and lansoprazole as maintenance therapy for healed mild erosive oesophagitis[J]. Aliment Pharm Ther, 2022, 57(1): 72-80.
- [4] Jin L. Role of tegoprazan in helicobacter pylori eradication therapy[J]. Gut Liver, 2022, 16(4): 493-494.
- [5] Han KS, Bum CK, Jai CH, et al. Randomised clinical trial: comparison of tegoprazan and placebo in non-erosive reflux disease[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2021, 54(4): 402-411.
- [6] 王发,李继,杜玮,等.多潘立酮片有关物质检测方法优化和一致性评价研究[J].中南药学,2023,21(9):2454-2458.
- [7] 王璟,刘伟,刘为中,等.高效液相色谱法测定富马酸卢帕他定口崩片的有关物质[J].中南药学,2023,21(4):1056-1061.
- [8] 张磊.高效液相色谱法测定孟鲁司特钠中有关物质的含量[J].中南药学,2023,21(12):3288-3292.

(收稿日期:2023-11-16;修回日期:2023-12-21)

蜈蚣药材、饮片、标准汤剂与配方颗粒的特征图谱相关性研究及量值传递分析

梁素仪^{1, 2, 3}, 江斌^{1, 2, 3*}, 蔡小兵^{1, 2, 3}, 李璐^{1, 2, 3}, 张辉^{1, 2, 3}, 谭沛^{1, 2, 3} (1. 华润三九现代中药制药有限公司, 广东 惠州 516000; 2. 中药配方颗粒安徽省重点实验室, 安徽 淮北 235000, 3. 华润三九医药股份有限公司, 广东 深圳 518000)

摘要: **目的** 建立蜈蚣药材、饮片、标准汤剂与配方颗粒的高效液相色谱 (HPLC) 特征图谱, 并测定其中次黄嘌呤、苯丙氨酸成分的含量, 考察四者之间化学成分的传递与差异。 **方法** 采用 Dikma Platisil ODS-C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇和水为流动相梯度洗脱, 流速为 1 mL·min⁻¹, 柱温为 25 °C。以含量、特征图谱共有峰传递数及相似度为主要评价指标, 分析其量值传递规律。 **结果** 18 批蜈蚣药材、饮片、标准汤剂及 3 批配方颗粒特征图谱均有 8 个共有特征峰, 与各自对照特征图谱相似度均大于 0.90, 指认出尿嘧啶、酪氨酸、次黄嘌呤、黄嘌呤、苯丙氨酸、肌苷、鸟苷、色氨酸 8 种成分, 并测定其含量, 未出现离散数据。 **结论** 蜈蚣药材、饮片、标准汤剂与配方颗粒的主要化学成分基本相同, HPLC 特征图谱相关性良好, 8 种成分在测定范围内与峰面积线性关系良好。所建立质量评价模式能够反映蜈蚣 4 种形态多成分的整体面貌, 为蜈蚣配方颗粒质量控制提供数据支撑。

关键词: 蜈蚣; 标准汤剂; 配方颗粒; 含量测定; 特征图谱

中图分类号: R282, R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)07-1903-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.038

Correlation of characteristic spectrum and quantitative value transfer analysis of Scolopendra and its decoction pieces, standard decoction and formula granules

LIANG Su-yi^{1,2,3}, JIANG Bin^{1,2,3*}, CAI Xiao-bing^{1,2,3}, LI Lu^{1,2,3}, ZHANG Hui^{1,2,3}, TAN Pei^{1,2,3} (1. China Resources Sanjiu Modern Chinese Medicine Pharmaceutical Co., Ltd., Huizhou Guangdong 516000; 2. Anhui Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula Granules, Huaibei Anhui 235000; 3. China Resources Sanjiu Medical & Pharmaceutical Co., Ltd., Shenzhen Guangdong 518000)

Abstract: Objective To establish the high performance liquid chromatography (HPLC) for the characteristics of Scolopendra and its decoction pieces, standard decoction and formula granules, and to determine the content of hypoxanthine and xanthine at the same time, and the transfer and difference in chemical components among the four. **Methods** Chromatography was performed on a Dikma Platisil ODS-C18 column (250 mm×4.6 mm, 5 μm). The methanol (A) and water (B) was used as the mobile phase with gradient elution. The flow rate was 1 mL·min⁻¹, and the column temperature was 25 °C. With the content, common peak transfer number and similarity of characteristic map as the main evaluation indexes, the quantitative value transfer was analyzed. **Results** There were 8 common characteristic peaks in the characteristic maps of 18 batches of Scolopendra and its decoction pieces, standard decoction and 3 batches of formula granules. The similarity between them and the control characteristic maps was greater than 0.90. Totally 8 components (uracil, tyrosine, hypoxanthine, xanthine, phenylalanine, inosine, guanosine, and tryptophan) were identified and their content was determined without discrete data.

基金项目: 深圳市科技计划项目 (No.JSGG20191129093418578)。

作者简介: 梁素仪, 女, 硕士, 主要从事中药饮片及中药配方颗粒质量标准研究, email: LIANGSUYI@999.com.cn *通信作者: 江斌, 男, 硕士, 主要从事中药饮片及中药配方颗粒质量标准研究, email: JIANGBIN51@999.com.cn

Conclusion The main chemical components in *Scolopendra* and its decoction pieces, standard decoction and formula granules are basically the same. The correlation of HPLC characteristic map is good, and the linearity of the 8 components is good within the determination concentration. The quality evaluation model can reflect the overall appearance of the four forms and components of *Scolopendra*, and provide data support for the quality control of the formula granules of *Scolopendra*.

Key words: *Scolopendra*; standard decoction; formula granule; content determination; characteristic chromatogram

蜈蚣别名“百足虫”“百脚”“天龙”等，始载于《神农本草经》，具有熄风镇痉、通络止痛、攻毒散结的功效。2020年版《中国药典》规定其基原为蜈蚣科动物少棘巨蜈蚣(*Scolopendra subspinipes mutilans* L. Koch)，用药部位为干燥体^[1]。现代药理研究显示，蜈蚣具有抗炎、镇痛、中枢抑制、抗惊厥、抗肿瘤等作用^[2-6]，在皮肤科、呼吸科、神经内科、肿瘤科、骨科、男科等均有应用^[7-9]。国家药品监督管理局2021年发布的《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》(简称《要求》)提出，中药配方颗粒以标准汤剂作为标准参照物，用于衡量其与临床汤剂疗效是否基本一致^[10]。本研究用的蜈蚣饮片标准汤剂及其配方颗粒是根据《要求》，以蜈蚣饮片为原料，经水加热提取、分离、浓缩、干燥等工艺制成的。

现行版药典对于蜈蚣药材及饮片质量控制仅限于性状、检测、浸出物项，无特征图谱及含量测定项。目前有研究利用多指标含量测定方法对蜈蚣药材进行质量控制^[11-15]，但尚未见蜈蚣配方颗粒的质量标准以及从药材到配方颗粒的相关性研究。为了全面控制蜈蚣配方颗粒质量，本研究利用高效液相色谱法(HPLC)建立了蜈蚣药材、饮片、饮片标准汤剂冻干粉和配方颗粒的特征图谱及8个成分含量测定方法，并开展从蜈蚣药材到蜈蚣配方颗粒之间的相关性研究，为蜈蚣配方颗粒的全过程质量控制提供科学参考。

1 材料

1.1 仪器

Waters e2695型高效液相色谱仪(美国沃特世公司); ME36S型百万分之一天平、XS205型十万分之一天平(瑞士梅特勒公司); SynergyUV型超纯水系统(默克股份有限公司); KQ-800DE型超声波仪(昆山市超声仪器有限公司); YMW型机械分体煎药壶(深圳一枚王有限公司)。

1.2 试药

甲醇、乙腈(色谱纯,赛默飞世尔科技有限公司); 水为超纯水; 其他试剂均为分析纯(广州化学试剂厂)。尿嘧啶(批号: 100469-201302, 纯

度: 99.6%)、酪氨酸(批号: 140609-201914, 纯度: 99.9%)、次黄嘌呤(批号: 140661-202005, 纯度: 99.4%)、黄嘌呤(批号: 140662-200802, 纯度: 100.0%)、苯丙氨酸(批号: 140676-201706, 纯度: 100.0%)、肌苷(批号: 140669-202007, 纯度: 99.2%)、鸟苷(批号: 111977-201501, 纯度: 93.6%)、色氨酸(批号: 140686-202108, 纯度: 99.9%)(中国食品药品检定研究院)。

1.3 样品

本研究所使用的18批蜈蚣药材经安徽中医药大学的刘守金教授鉴定, 鉴定结果均为蜈蚣科动物少棘巨蜈蚣的干燥体, 基原符合《中国药典》要求, 信息见表1。

2 方法与结果

2.1 颗粒制备方法

本研究根据《要求》制备蜈蚣饮片标准汤剂冻干粉, 根据标准汤剂的质量标准制备蜈蚣配方颗粒。

2.1.1 蜈蚣饮片标准汤剂冻干粉工艺参数 浸泡时间为30 min, 煎煮两次, 一煎加水量为10倍, 煎煮30 min; 二煎加水量为8倍, 煎煮25 min, 减压浓缩, 冷冻干燥。

2.1.2 蜈蚣配方颗粒工艺参数 浸泡时间为30 min, 煎煮两次, 一煎加水量为10倍, 煎煮60 min; 二煎加水量为8倍, 煎煮60 min, 减压浓缩, 喷雾干燥, 干法制粒。

2.2 特征图谱方法与结果

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取尿嘧啶、酪氨酸、次黄嘌呤、黄嘌呤、苯丙氨酸、肌苷、鸟苷、色氨酸对照品适量, 加30%甲醇制成每1 mL各含0.092、0.108、0.090、0.137、0.112、0.105、0.096、0.104 mg的混合对照品储备液, 即得。

2.2.2 供试品溶液的制备

①蜈蚣药材、饮片: 取粉末3.0 g, 加水50 mL, 加热回流30 min, 过滤, 滤液蒸干, 残渣加30%甲醇25 mL, 超声处理30 min, 取出放冷, 滤过, 取续滤液, 即得。

②标准汤剂冻干粉、配方颗粒: 取粉末约0.5 g, 加30%甲醇25 mL, 超声处理30 min, 取出

表 1 样品信息

Tab 1 Information of samples

编号	产地	蜈蚣药材批号	蜈蚣饮片批号	蜈蚣饮片标准汤剂批号	蜈蚣配方颗粒批号
1	湖北随州曾都区	2107001	2108001Y	2108001Y	—
2	湖北随州曾都区	2107002	2108002Y	2108002Y	—
3	湖北随州曾都区	2107003	2108003Y	2108003Y	—
4	湖北襄阳谷城县	2107004	2108004Y	2108004Y	—
5	湖北襄阳谷城县	2107005	2108005Y	2108005Y	—
6	湖北襄阳谷城县	2107006	2108006Y	2108006Y	—
7	湖北宜昌当阳市	2107007	2108007Y	2108007Y	—
8	湖北宜昌当阳市	2107008	2108008Y	2108008Y	—
9	湖北宜昌当阳市	2107009	2108009Y	2108009Y	—
10	河南信阳光山县	2107010	2108010Y	2108010Y	—
11	河南信阳光山县	2107011	2108011Y	2108011Y	—
12	河南信阳光山县	2107012	2108012Y	2108012Y	—
13	浙江舟山岱山县	2107013	2108013Y	2108013Y	—
14	浙江舟山岱山县	2107014	2108014Y	2108014Y	—
15	浙江舟山岱山县	2107015	2108015Y	2108015Y	—
16	湖北随州曾都区	YC2206001	220701Y	220701Y	2208001Y
17	湖北随州曾都区	YC2206002	220702Y	220702Y	2208002Y
18	湖北随州曾都区	YC2206003	220703Y	220703Y	2208003Y

放冷，滤过，取续滤液，即得。

2.2.3 色谱条件及系统适用性试验 色谱柱：Dikma Platisil ODS-C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)，流动相：甲醇 (A) - 水 (B)，按梯度洗脱 (0 ~ 15 min, 1%A; 15 ~ 30 min, 1% → 12%A; 30 ~ 45 min, 12% → 40%A)，流速：1.0 mL·min⁻¹；柱温：25 °C，检测波长：210 nm，理论板数按次黄嘌呤峰计算，不低于 5000。

2.2.4 专属性与系统适用性的验证 取蜈蚣配方颗粒及阴性颗粒，按“2.2.2”项下方法制备供试品、阴性样品溶液，按“2.2.3”项下色谱条件进样测定，结果见图 1，结果表明，阴性样品对特征图谱无干扰，色谱方法系统适用性和专属性良好。

2.2.5 重复性试验 按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份蜈蚣配方颗粒供试品溶液，按“2.2.3”项下色谱条件进样测定，结果显示，各特征峰的相对保留时间 RSD 为 0.060% ~ 0.79%，该方法重复性良好。

2.2.6 仪器精密度试验 按“2.2.2”项下方法制备蜈蚣配方颗粒供试品溶液，按“2.2.3”项下色谱条件重复进样 6 次测定，结果显示，各特征峰的相对保留时间 RSD 为 0.060% ~ 0.81%，表明仪器精密度良好。

2.2.7 中间精密度试验 分别由 3 名人员制备蜈蚣配方颗粒供试品溶液并测定，结果显示，各特征峰的相对保留时间 RSD 为 0.070% ~ 0.55%，表明方法中间精密度良好。

2.2.8 稳定性试验 取同一份蜈蚣配方颗粒供试品溶液，分别在 0、4、8、12、16、24 h，按“2.2.3”项下色谱条件进样测定，结果显示，各特征峰的相对保留时间 RSD 为 0.10% ~ 0.76%，表明溶液在 24 h 内稳定。

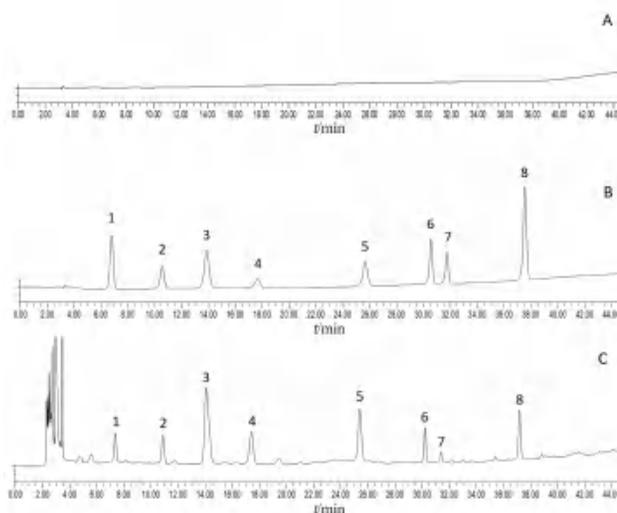


图 1 蜈蚣配方颗粒 HPLC 特征图谱专属性色谱图

Fig 1 Specific chromatogram of characteristic HPLC chromatograms of Scolopendra and formula granule

A. 阴性样品 (negative sample); A. 对照品 (reference); B. 供试品 (sample); 1. 尿嘧啶 (uracil); 2. 酪氨酸 (tyrosine); 3. 次黄嘌呤 (hypoxanthine); 4. 黄嘌呤 (xanthine); 5. 苯丙氨酸 (phenylalanine); 6. 肌苷 (inosine); 7. 鸟苷 (guanosine); 8. 色氨酸 (tryptophan)

2.2.9 蜈蚣多批特征图谱共有模式建立 取 18 批蜈蚣药材、饮片、标准汤剂和 3 批蜈蚣配方颗粒，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.2.3”项色谱条件下进样测定，将检测结果数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012)”进行分析，分别以编号 1 样品的特征图谱为参照，选择峰形及分离度较好的 8 个共有峰作为特征峰，进行多点校正、Mark 匹配以及相似度分析，建立对照特征图谱及共有模式图谱，结果见图 2，经过与对照品比对，

确定 8 个共有峰成分。以苯丙氨酸 (峰 5) 为 S 峰, 计算其他峰与 S 峰的相对保留时间, 其值应在规定值的 $\pm 10\%$ 范围以内, 规定值: 0.29 (峰 1)、0.43 (峰 2)、0.55 (峰 3)、0.68 (峰 4)、1.19 (峰 6)、1.24 (峰 7)、1.47 (峰 8)。

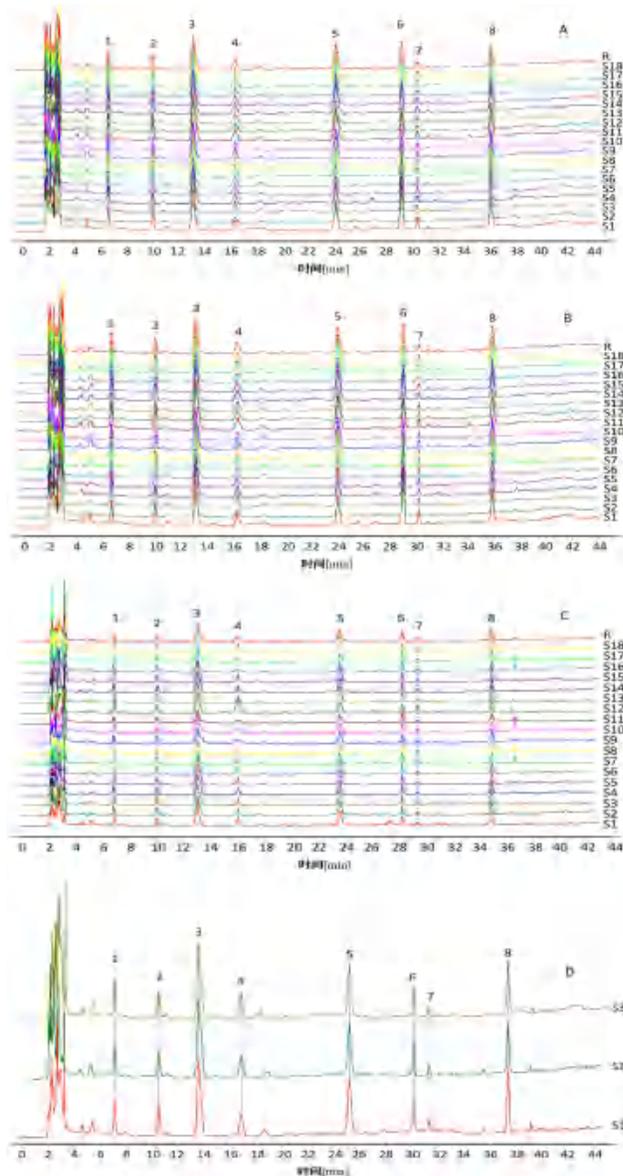


图 2 蜈蚣的指纹图谱

Fig 2 Fingerprint chromatogram of Scolopendra

A.18 批蜈蚣药材 (18 batches of Scolopendra); B.18 批蜈蚣饮片 (18 batches of Scolopendra decoction pieces); C.18 批蜈蚣饮片标准汤剂 (18 batches of Scolopendra standard decoction); D.3 批配方颗粒 (3 batches of Scolopendra formula granules)

2.2.10 相似度计算 分别计算样品与各自对照特征图谱的相似度, 结果见表 2。结果显示, 蜈蚣药材特征图谱相似度为 0.925 ~ 0.997, 说明 18 批不同来源的蜈蚣药材化学成分相似度较高。18 批蜈蚣饮片特征图谱相似度为 0.920 ~ 0.998, 标准汤剂特征图谱相似度为 0.915 ~ 0.998, 3 批配方颗粒特征图谱相

似度分别为 0.986、0.992、0.978, 说明不同批次样品质量相对稳定。8 个特征峰在各样品中均有存在, 说明各环节工艺能较好地保留药材特征成分。该特征图谱方法适用于蜈蚣药材到配方颗粒全过程控制。

表 2 相似度结果

Tab 2 Similarity

编号	药材	饮片	标准汤剂	配方颗粒
1	0.958	0.992	0.996	—
2	0.925	0.993	0.998	—
3	0.997	0.996	0.994	—
4	0.987	0.993	0.993	—
5	0.983	0.995	0.994	—
6	0.995	0.997	0.997	—
7	0.966	0.998	0.986	—
8	0.986	0.998	0.983	—
9	0.991	0.995	0.995	—
10	0.963	0.994	0.991	—
11	0.994	0.998	0.989	—
12	0.997	0.979	0.915	—
13	0.973	0.998	0.996	—
14	0.992	0.920	0.995	—
15	0.973	0.990	0.998	—
16	0.971	0.995	0.983	0.986
17	0.986	0.978	0.989	0.992
18	0.969	0.998	0.998	0.978

2.3 含量测定方法与结果

2.3.1 对照品溶液制备 精密移取“2.2.1”项下混合对照品储备液 0.5、1、2、5、8、10 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 用 30% 甲醇定容至刻度, 混匀, 即得混合对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液制备

① 蜈蚣药材、饮片: 取粉末约 2.0 g, 加入 30% 甲醇 25 mL, 超声处理 30 min, 取出放冷, 滤过, 取续滤液, 即得。

② 标准汤剂冻干粉、配方颗粒: 同“2.2.2”项。

2.3.3 线性关系、精密度、重复性、稳定性考察 根据“2.2.3”项下色谱条件建立蜈蚣配方颗粒中 8 个成分的含量测定方法, 线性及方法学考察结果见表 3。结果显示蜈蚣配方颗粒中 8 个成分含量测定方法专属性、线性、精密度、重复性、稳定性均良好。

2.3.4 加样回收试验 取已知含量的蜈蚣配方颗粒 0.25 g, 共 9 份, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 每组分别加入对照品溶液, 加入量为蜈蚣配方颗粒中各成分含量的 80%、100% 和 120%, 制备供试品溶液进行测定。结果显示 8 个成分高、中、低浓度的平均回收率均在 96.5% ~ 100.5%, RSD 均在 0.55% ~ 2.5%。

2.3.5 多指标含量测定及转移率计算 对蜈蚣样品 8 个成分含量进行测定, 结果见表 4 及表 5, 并计算转移率^[16]。

表 3 线性关系及方法学考察结果
Tab 3 Linearity and methodological examination

成分	线性方程	相关系数 (<i>r</i>)	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	RSD/%		
				精密度	重复性	稳定性
尿嘧啶	$Y = 4.001 \times 10^4 X - 3.396 \times 10^3$	0.9999	4.6 ~ 92	0.52	0.86	0.43
酪氨酸	$Y = 1.888 \times 10^4 X - 3.187 \times 10^3$	0.9999	5.4 ~ 108	0.41	0.97	0.37
次黄嘌呤	$Y = 4.223 \times 10^4 X - 4.727 \times 10^3$	0.9999	4.5 ~ 90	0.23	1.40	0.22
黄嘌呤	$Y = 1.214 \times 10^4 X + 5.375 \times 10^3$	0.9998	6.85 ~ 137	0.22	0.77	0.24
苯丙氨酸	$Y = 2.555 \times 10^4 X - 2.866 \times 10^3$	0.9999	5.6 ~ 112	0.73	1.2	0.46
肌苷	$Y = 2.534 \times 10^4 X - 280.12$	0.9999	5.25 ~ 105	0.67	1.4	0.74
鸟苷	$Y = 2.017 \times 10^4 X - 4.688 \times 10^3$	0.9999	4.8 ~ 96	0.81	0.67	0.68
色氨酸	$Y = 6.624 \times 10^4 X - 1.650 \times 10^4$	0.9999	5.2 ~ 104	0.42	1.2	0.77

表 4 蜈蚣饮片和标准汤剂的含量测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
Tab 4 Content of Scolopendra piece and standard decoction ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

批号	尿嘧啶		酪氨酸		次黄嘌呤		黄嘌呤		苯丙氨酸		肌苷		鸟苷		色氨酸	
	饮片	标汤	饮片	标汤	饮片	标汤	饮片	标汤	饮片	标汤	饮片	标汤	饮片	标汤	饮片	标汤
2108001Y	0.19	0.93	0.33	1.63	0.71	3.58	0.27	1.30	0.87	3.98	0.64	2.93	0.15	0.67	0.29	1.31
2108002Y	0.22	0.97	0.32	1.48	0.78	3.54	0.29	1.29	0.86	3.89	0.66	3.02	0.15	0.61	0.27	1.24
2108003Y	0.24	1.08	0.35	1.63	0.94	4.39	0.25	1.12	1.25	4.97	0.51	1.97	0.17	0.62	0.39	1.51
2108004Y	0.56	1.74	0.34	1.06	1.73	5.29	0.30	0.95	0.96	4.10	0.61	2.56	0.27	1.11	0.47	2.06
2108005Y	0.19	0.91	0.16	0.82	0.73	3.61	0.20	1.04	0.76	3.26	0.62	2.58	0.16	0.76	0.23	1.12
2108006Y	0.45	1.98	0.19	0.82	1.22	5.35	0.31	1.37	1.45	4.44	0.58	1.85	0.59	1.92	0.37	1.31
2108007Y	0.28	1.24	0.28	1.20	1.35	5.99	0.34	1.48	1.57	5.09	0.68	2.22	0.22	0.78	0.68	2.38
2108008Y	0.31	1.16	0.34	1.34	1.39	5.53	0.20	0.80	1.72	4.89	0.77	2.24	0.27	0.76	0.32	1.26
2108009Y	0.29	1.33	0.27	1.18	1.36	6.13	0.32	1.41	1.88	5.01	0.77	2.20	0.24	0.82	0.31	1.36
2108010Y	0.36	1.22	0.25	0.93	1.74	6.22	0.49	1.71	2.05	5.07	1.04	2.30	0.34	0.82	0.36	1.35
2108011Y	0.27	1.28	0.28	1.28	1.38	6.33	0.20	0.91	1.61	5.46	0.61	1.97	0.21	0.69	0.33	1.48
2108012Y	0.28	0.96	0.31	1.14	1.12	4.03	0.36	1.36	1.02	4.09	0.48	1.90	0.13	0.60	0.35	1.32
2108013Y	0.37	1.47	0.42	1.77	1.16	4.97	0.33	1.41	1.41	5.34	0.52	1.88	0.18	0.68	0.31	1.35
2108014Y	0.35	1.25	0.35	1.29	1.34	5.09	0.56	2.06	1.88	5.54	0.70	2.15	0.24	0.79	0.50	1.71
2108015Y	0.40	1.51	0.42	1.77	1.19	5.08	0.32	1.37	1.49	5.20	0.62	2.20	0.19	0.74	0.40	1.59
220701Y	0.33	1.13	0.31	1.12	1.46	5.13	0.39	1.41	1.78	5.97	0.31	1.22	0.25	0.98	0.47	1.82
220702Y	0.27	1.07	0.28	1.09	1.28	5.05	0.32	1.28	1.67	5.83	0.30	1.19	0.23	0.97	0.46	1.81
220703Y	0.32	1.05	0.34	1.06	1.35	4.38	0.39	1.21	1.49	5.06	0.29	1.14	0.24	0.94	0.50	1.84
均值	0.32	1.24	0.31	1.25	1.24	4.98	0.33	1.30	1.43	4.84	0.59	2.08	0.23	0.85	0.39	1.55
SD	0.090	0.29	0.070	0.30	0.30	0.90	0.090	0.29	0.39	0.73	0.18	0.53	0.10	0.30	0.11	0.33

表 5 蜈蚣配方颗粒的含量测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
Tab 5 Content of Scolopendra formula granule ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

批号	尿嘧啶	酪氨酸	次黄嘌呤	黄嘌呤	苯丙氨酸	肌苷	鸟苷	色氨酸
2208001Y	1.11	1.08	4.19	1.38	4.83	1.21	0.98	1.82
2208002Y	1.01	1.04	4.10	1.27	4.69	1.16	0.95	1.82
2208003Y	1.06	1.04	3.72	1.25	4.25	1.16	0.94	1.82

由表 4 可知, 18 批蜈蚣饮片标准汤剂冻干粉指标成分尿嘧啶的含量为 $0.91 \sim 1.98 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 转移率为 $55.7\% \sim 86.7\%$; 酪氨酸的含量为 $0.82 \sim 1.77 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 转移率为 $58.6\% \sim 88.7\%$; 次黄嘌呤的含量为 $3.54 \sim 6.33 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 转移率为 $57.6\% \sim 89.8\%$; 黄嘌呤的含量为 $0.80 \sim 2.06 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 转移率为 $55.4\% \sim 89.1\%$; 苯丙氨酸的

含量为 $3.26 \sim 5.97 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 转移率为 $46.7\% \sim 82.7\%$; 肌苷的含量为 $1.14 \sim 3.02 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 转移率为 $48.1\% \sim 81.5\%$; 鸟苷的含量为 $0.60 \sim 1.92 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 转移率为 $51.6\% \sim 80.6\%$; 色氨酸的含量为 $1.12 \sim 2.38 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 转移率为 $59.7\% \sim 85.4\%$ 。8 个成分含量及转移率均未超过 $\bar{x} \pm 3s$ 范围, 未出现离群值。测定 3 批蜈蚣配方颗粒中 8

个成分含量及转移率与对应批次的饮片标准汤剂含量基本一致，且在多批次饮片标准汤剂含量限度范围内。以上结果表明，蜈蚣指标成分的含量在饮片标准汤剂冻干粉-配方颗粒研究过程中，量值传递较好。

3 讨论

3.1 药材的资源调研

查阅本草专著可知，陕西、江苏、浙江、湖北、湖南、河南、安徽、广东、广西、四川等地均有蜈蚣资源分布^[17-20]。通过浏览中药材天地网、康美中药网、药通网，对近几年发布的蜈蚣药材产地供应信息加以统计，发现蜈蚣药材流通主要集中于湖北、安徽、浙江、安徽、河南等地，其中以湖北襄阳、随州、宜昌等地集散、流通最为频繁，河南光山、浙江岱山等地也有一定的蜈蚣药材流通。蜈蚣药材当前以野生资源为主^[21]，本研究选择湖北随州曾都区、湖北襄阳谷城县、湖北宜昌当阳市、河南信阳光山县、浙江舟山岱山县5个产地为研究样本采集地，上述产地资源较为丰富，同时涵盖了蜈蚣的主产区，研究用18批药材均为野生品，按2020年版《中国药典》方法检测均合格，故本研究选用的药材在产地和品质方面具有代表性。

3.2 色谱条件的优化

本研究考察了不同流动相体系（不同浓度的甲酸、乙酸、磷酸与甲醇、乙腈按梯度混合），不同柱温（20~30℃），不同流速（0.8~1.2 mL·min⁻¹），不同仪器（Waters e2695、Thermo ULtimate 3000 和岛津 LC-20AT）的分离效果，采用DAD检测器进行全波谱检测，确定了特征图谱最佳吸收波长。最终选择甲醇-水为流动相，流速1.0 mL·min⁻¹，柱温25℃。该方法简单、高效，在不同仪器上重现性好，可用于蜈蚣的质量评价。

3.3 相关性研究及量值传递分析

本研究对蜈蚣药材、饮片至标准汤剂冻干粉，再到配方颗粒进行了系统性研究，以特征图谱和标准汤剂冻干粉中8种成分的含量作为主要评价指标。结果显示，研究所用的18批标准汤剂冻干粉中，8个成分含量实测值及转移率均未出现离群值，3批配方颗粒含量及转移率在标准汤剂范围内，蜈蚣药材、饮片、标准汤剂冻干粉、配方颗粒特征图谱相似度均大于0.90，表明从蜈蚣药材到蜈蚣配方颗粒化学成分能够稳定传递，物质基础基本一致，最大程度保证了蜈蚣配方颗粒与标准汤剂的等效性和质量一致性，进而保证临

床疗效。该研究结果反映了蜈蚣配方颗粒生产全过程的相关性及量值传递规律，为蜈蚣配方颗粒全过程监控及质量标准建立提供参考。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 372-373.
- [2] 李钟杰, 袁亚萍, 王勇. 少棘蜈蚣多肽药用价值的研究进展[J]. 中草药, 2021, 52(3): 857-863.
- [3] Hu YX, Liu Z, Zhang Z, et al. Antihepatoma peptide, scolopentide, derived from the centipede scolopendra subspinipes mutilans[J]. World J Gastroenterol, 2023, 29(12): 1875-1898.
- [4] 宁迪敏, 田莎, 郭垠梅, 等. 蜈蚣抗肝癌的临床应用及药理研究[J]. 中医肿瘤学杂志, 2020, 2(1): 39-41.
- [5] 王程. 蜈蚣提取物抗肝损伤、抗肿瘤、抗凝血作用及其急性毒性研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2018.
- [6] 孙琳娜. 蜈蚣中有效成分的研究[D]. 天津: 天津理工大学, 2016.
- [7] 严宝飞, 朱星宇, 陈亚运, 等. 中药蜈蚣本草考证及临床应用[J]. 食品与药品, 2020, 22(4): 310-315.
- [8] 马小兵, 余金燕, 刘文武. 蜈蚣的本草及临床应用考证[J]. 中国民族民间医药, 2023, 32(13): 29-33.
- [9] 俞学勤, 尤建良. 尤建良教授运用虫类药物治疗恶性肿瘤经验[J]. 中国当代医药, 2022, 29(7): 122-125.
- [10] 王龙, 高鑫, 闫信豪, 等. 中药配方颗粒研发生产中若干关键问题研究进展[J]. 中南药学, 2022, 20(9): 2008-2014.
- [11] 马云, 马庆文, 范建伟, 等. 高效液相色谱法同时测定蜈蚣药材中5种成分含量[J]. 科学技术与工程, 2023, 23(1): 91-99.
- [12] 沈爽, 焦连庆, 张梦鹤, 等. 柱前衍生化 RP-HPLC 法测定蜈蚣中9个生物胺的含量[J]. 中药材, 2020, 43(8): 1937-1941.
- [13] 张彬若, 刘录, 李晓红, 等. 彝药地蜈蚣中化学成分的分 离及含量测定[J]. 中药材, 2020, 43(4): 915-919.
- [14] 张琪, 朱叶华, 文红梅, 等. HPLC-PDA 同时测定不同品种及产地蜈蚣中8种核苷类成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(14): 57-61.
- [15] 孟蕾蕾, 林静, 丁凯歌, 等. ICP-MS 法测定不同产地蜈蚣、地龙、僵蚕3种中药材中16个元素杂质含量[J]. 中国检验检测, 2023, 31(3): 40-43.
- [16] 李振雨, 刘晓霞, 冯涌微, 等. 基于 HPLC 指纹图谱和含量测定的半边莲饮片与标准汤剂量值传递规律研究[J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35(11): 1864-1876.
- [17] 高士贤. 中国动物药志[M]. 吉林: 吉林科学技术出版社, 1996: 185.
- [18] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草: 第九册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 143.
- [19] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编第二版: 上册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 909.
- [20] 王强, 徐国钧. 道地药材图典: 中南卷[M]. 福建: 福建科学技术出版社, 2003: 171.
- [21] 胡超逸, 森林, 詹志来, 等. 蜈蚣药材商品规格等级标准研究[J]. 安徽农业科学, 2019, 47(16): 209-211, 253.

(收稿日期: 2023-10-02; 修回日期: 2023-12-02)

托法替布片药物利用评价标准建立及应用

曹迪, 程军, 张士洋, 司福国 (蚌埠市第三人民医院药学部, 安徽 蚌埠 233000)

摘要: **目的** 建立托法替布片药物利用评价标准 (DUE), 为托法替布片临床合理使用提供参考。**方法** 参考国内外托法替布药品说明书、相关诊疗指南、专家共识及临床研究, 建立托法替布片 DUE 标准, 并以此标准回顾性分析某三甲医院 2021 年 1 月 1 日—2023 年 9 月 30 日托法替布片门诊处方的合理性。**结果** 共纳入 1086 张托法替布片门诊处方, 用药适应证符合率 93.6%, 用法用量符合率 93.6%, 4 张处方存在潜在的药物相互作用。**结论** 该院托法替布片使用较合理, 但在适应证、用法用量、药物相互等方面仍存在一定的问題, 应加强干预, 确保患者用药安全。

关键词: 托法替布片; 药物利用评价; 合理用药; 评价标准

中图分类号: R969.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)07-1909-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.039

Establishment of drug use evaluation criteria for tofacitinib tablets and application

CAO Di, CHENG Jun, ZHANG Shi-yang, SI Fu-guo (*Department of Pharmacy, the Third People's Hospital of Bengbu, Bengbu Anhui 233000*)

Abstract: Objective To establish the drug use evaluation (DUE) standard for tofacitinib tablets and provide a reference for the rationally clinical use of tofacitinib tablets. **Methods** Based on tofacitinib drug label, expert consensus on related guidelines and clinical research, DUE criteria for tofacitinib tablet were developed. The outpatient and emergency prescriptions of tofacitinib tablets from January 1, 2021 to September 30, 2023 in a Grade III Hospital were retrospectively analyzed. **Results** Totally 1086 prescriptions were included, the compliance rate of medication indications was 93.6%, and the compliance rate of usage and dosage reached 93.6%. Potential drug-drug interactions were found in 4 prescriptions. **Conclusion** The use of tofacitinib tablets in the hospital is fairly reasonable. Problems exist in indications, usage and dosage, and drug interactions. Intervention should be strengthened to ensure the safety of patient medication.

Key words: tofacitinib tablet; drug use evaluation; rational drug use; evaluation criterium

托法替布是首个新型口服 JAK 激酶 (Janus kinase, JAK) 抑制剂, JAK 激酶属于非受体酪氨酸激酶, 包括 JAK1、JAK2、JAK3 和 TYK2, 托法替布通过作用于 JAK1、JAK3、调节免疫细胞信号传导、激活转录信号参与了多种免疫疾病的临床治疗^[1]。托法替布片由美国辉瑞公司于 2012 年在美国首先上市, 于 2017 年在中国上市。美国食品

药品监督管理局 (FDA) 批准其用于治疗对一种或多种肿瘤坏死因子 (TNF) 阻滞剂反应不足或不耐受的中、重度活动性类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA)、强直性脊柱炎 (ankylosing spondylitis, AS)、银屑病关节炎 (psoriaticarthritis, PsA)、溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 成年患者及多关节型幼年特发性关节炎^[2]。由于托法替布片是口

服给药,使用方便且不存在免疫原性,近年在各种风湿免疫疾病的治疗中备受关注,相关的应用报道不断出现^[3]。而我国还未批准除 RA 以外的适应证,可能导致其临床使用经验不足。目前,国内尚未有托法替布片药物利用评价(drug use evaluation, DUE)标准的文献研究,本文通过建立托法替布片 DUE 标准,对某三甲医院托法替布片门诊处方进行回顾性用药分析及评价,为促进临床合理用药提供参考。

1 资料与方法

1.1 资料来源

通过医院逸耀合理用药软件调取蚌埠市第三人民医院 2022 年 1 月 1 日—2023 年 9 月 30 日开具托法替布片的门诊处方。采用回顾性调查的方法,通过合理用药软件详细获取患者处方信息,包括患者姓名、性别、年龄、诊断、科室、用药信息、检验结果等,如患者涉及多种疾病诊断,通过与医师沟通并结合临床实际情况,以与托法替布片治疗目的最相符的疾病诊断为准。

1.2 基于循证医学证据建立合理用药评价标准

1.2.1 循证医学证据检索

① 国外托法替布片说明书:以“tofacitinib”通过 FDA、欧洲药品管理局(EMA)、日本独立行政法人医药品医疗器械综合机构(PDMA)官网检索说明书注册情况。

② 循证数据库查询:查询事实型医药知识数据库 Micromedex 数据库收录托法替布片的超说明书用药情况。

③ 循证医学文献检索:根据循证医学检索 PICOS 原则^[4],对临床问题的检索词进行提炼,检索过程由两名临床药师独立完成,最后进行交叉核对,若有分歧由第三名临床药师仲裁。循证医学证据来源包括中国知网、万方、维普、PubMed、Cochrane 数据库、医脉通、用药助手等,检索时间为自建库开始至 2023 年 10 月 31 日。

1.2.2 DUE 标准建立 由处方点评小组以本院在用的托法替布片(生产企业:正大天晴药业;规格:5 mg/片)说明书^[5]为基础,参照国外药品说明书^[2],结合检索到的 24 篇国内外相关临床治疗指南、专家共识及临床研究等^[3, 6-28],初步建立托法替布片 DUE 标准,随后咨询医院药学专家、相关科室临床医学专家,对标准的科学性、合理性、实用性进行完善,形成最终的托法替布片 DUE 标准,见表 1 及表 2。评价标准中超说明书适应证有效性等级、推荐等级、证据等级参考 Micromedex

数据库的 Thomsom 分级系统, Micromedex 数据库未收录的,由临床药师参照 Thomsom 分级系统进行分级,见表 3。

2 结果

2.1 一般资料

应用托法替布片共计 1086 张处方,分布在 13 个临床科室。前三位分别是风湿免疫科 624 例、全科医学科 316 张、血液内科 103 张。1086 例患者中男性 187 例,女性 899 例;患者平均年龄(58.2±14.5)岁,其中 16~20 岁 2 例,21~40 岁 129 例,41~60 岁 511 例,61~93 岁 444 例。

2.2 用药合理性评价

本次调查中,适应证合理处方 1016 张(93.6%),其中超说明书适应证 64 张(5.9%)。包括 PsA 33 例、皮炎 11 例、斑秃 6 例、普秃 6 例、AS 6 例、UC 2 例。用法用量与药品说明书及指南等相符率 93.6%。不合理用药具体内容见表 4。

3 讨论

3.1 有循证医学证据的超适应证用药

本次调研中,托法替布片有循证医学证据的超适应证用药处方 64 张,分别为 PsA 33 例、皮炎 11 例、AS 6 例、斑秃 6 例、普秃 6 例、UC 2 例。目前, FDA 已经批准托法替布用于对一种或多种 TNF 阻滞剂反应不足或不耐受 PsA、AS、UC,经与医师沟通,以上适应证患者均为 TNF 阻滞剂经治患者。《2018 年 ACR/NPF 银屑病关节炎治疗指南》^[11]收录了托法替布可用于口服小分子化合物、TNF 阻滞剂经治后仍活动的 PsA 的治疗,机制可能与托法替布通过调节 IFN- γ 、IL-17、IL-22、IL-23 等细胞因子,抑制关节和关节外位置的炎症细胞的激活和增殖,以及与关节破坏相关的细胞类型的激活和增殖有关^[9-10]。

AS 是以骶髂关节和脊柱附着点炎症为主要症状的疾病,《2019 年美国 ACR/美国脊柱炎协会(SAA)/脊柱关节炎研究和治疗协作网(SPARTAN)对 AS 和放射学阴性中轴型脊柱关节炎(nr-axSpA)治疗建议的更新》^[7]指出,对于使用非甾体抗炎药治疗仍为活动性的 AS 成年患者,有条件地推荐使用托法替布。Deodhar 等^[6]的随机、双盲、安慰剂对照研究显示,托法替布在活动性 AS 患者中取得 ASAS20/40 应答的患者比例显著高于安慰剂组。

UC 是一种病因尚不十分明确的结肠和直肠慢性非特异性炎症性疾病,《2022 ÖGGH 意见书:托法替布治疗溃疡性结肠炎》^[14]指出,托法替布是一种有效的治疗 UC 的药物,相关临床试验也

表 1 托法替布片 DUE 标准
Tab 1 DUE criteria of tofacitinib tablet

指标名称	评价依据	评价结果
适应证	说明书适应证 ^[5] : ① 甲氨蝶呤疗效不足或对其无法耐受的中、重度活动性 RA 成年患者 超说明书适应证: ② 对一种或多种 TNF 阻滞剂反应不足或不耐受活动性 AS 成年患者 (II a, II b, B) ^[2, 6-7] ; ③ 对一种或多种 TNF 阻滞剂反应不足或不耐受活动性多关节幼年特发性关节炎 (II a, II b, B) ^[2-3, 8] ; ④ 对一种或多种 TNF 阻滞剂反应不足或不耐受活动性 PsA 患者 (I, II b, B) ^[9-11] ; ⑤ 对一种或多种 TNF 阻滞剂反应不足或不耐受中度至重度活动性 UC 成年患者 (II a, II b, A) ^[12-14] ; ⑥ 需要呼吸支持的 COVID-19 住院患者 (II a, II b, C) ^[15] ; ⑦ 皮炎 (II a, II b, B) ^[16-18] ; ⑧ 斑秃 (II a, II b, B) ^[19-20] ; ⑨ 对一种或多种 TNF 阻滞剂反应不足或不耐受放射学阴性中轴型脊柱关节炎成年患者 (II b, II b, C) ^[3, 7]	0: 符合①或②或③或④或⑤或⑥或⑦或⑧或⑨; 1: 不符合①和②和③和④和⑤和⑥和⑦和⑧和⑨或禁忌证用药
禁忌证	① 初始治疗淋巴细胞 (LYM) < 0.5 × 10 ⁹ · L ⁻¹ 或中性粒细胞 (ANC) < 1.0 × 10 ⁹ · L ⁻¹ 或血红蛋白 (Hb) < 9 g · dL ⁻¹ 患者 ^[2, 5] ; ② 恶性肿瘤患者 ^[21] ; ③ 严重活动性感染患者 ^[2, 5] ; ④ 孕妇、哺乳期妇女、2 岁以下儿童 ^[2, 5] ; ⑤ 重度肝功能损伤者 ^[2, 5]	
给药途径	口服, 可与食物同服, 也可单独服用 ^[22]	0: 符合①; 1: 不符合①
用法用量	成人剂量: ① RA ^[5] 、AS ^[2] 、PsA ^[2] 、皮炎 ^[17] 、斑秃 ^[19-20] 、中轴型脊柱关节炎 ^[7] : 5 mg bid; ② UC ^[2] : 诱导治疗 10 mg bid, 维持治疗 5 mg bid; ③ COVID-19 住院患者: 10 mg bid ^[23] 儿童剂量: ④ 多关节幼年特发性关节炎 ^[2] 、PsA ^[3] 、皮炎 ^[16] 患者, 10 kg < 体重 < 20 kg 3.2 mg bid, 20 kg ≤ 体重 < 40 kg 4 mg bid, 体重 ≥ 40 kg 5 mg bid 特殊人群: ⑤ 中重度肾功能不全、透析患者、中度肝功能损伤: 正常剂量 10 mg bid, 则减少为 5 mg bid, 正常剂量 ≤ 5 mg bid, 则剂量不变, 给药频次改为 qd ^[2, 5]	0: 符合①或②或③或④或⑤; 1: 不符合①或②或③或④或⑤
用药疗程	① UC: 诱导治疗至少 8 周, 根据效果决定是否过渡到维持治疗, 最多使用不超过 16 周 ^[2] ; ② COVID-19 住院患者: 最长治疗 14 d ^[23] ; ③ 斑秃: 6 个月 ^[19-20] ; ④ 其他未明确规定	0: 符合①或②或③; 1: 不符合①或②或③
药物相互作用 ^[2, 5, 24-26, 28]	① 与生物 DMARD 类药物或强效免疫抑制剂 (如硫唑嘌呤、环孢素) 联用, 增加免疫抑制的风险, 避免合用; ② 治疗期间接种疫苗效果可能会下降, 避免合用, 或接种疫苗后, 停用托法替布 1~2 周; ③ 与强效 CYP3A4 诱导剂 (见表 2) 合用, 托法替布暴露量减少, 可能导致临床反应缺少或减少, 避免合用; ④ 与强效 CYP3A4 抑制剂 (见表 2) 合用, 托法替布暴露量增加, 如服用 10 mg bid, 则减少为 5 mg bid, 如服用 ≤ 5 mg bid, 则继续当前剂量, 给药频次改为 qd; ⑤ 与一种中效 CYP3A4 抑制剂和一种强效 CYP2C19 抑制剂 (见表 2) 合用, 托法替布暴露量增加, 如服用 10 mg bid, 则减少为 5 mg bid, 如服用 ≤ 5 mg bid, 则继续当前剂量, 给药频次改为 qd	0: 符合①和②和③和④和⑤; 1: 不符合①或②或③或④或⑤
用药监测	① 每 3 个月监测 LYM, LYM < 0.5 × 10 ⁹ · L ⁻¹ , 停止给药 ^[2, 5] ; ② 每 3 个月监测 ANC, ANC 为 0.5 × 10 ⁹ ~ 1.0 × 10 ⁹ · L ⁻¹ , 如服用 10 mg bid, 则减少到 5 mg bid; 如服用 < 5 mg bid, 则中断给药, 何时 ANC 大于 1.0 × 10 ⁹ · L ⁻¹ , 恢复原剂量; ANC < 0.5 × 10 ⁹ · L ⁻¹ , 停止给药 ^[2, 5] ; ③ 每 3 个月监测 Hb, Hb < 8 g · dL ⁻¹ 或下降超过 2 g · dL ⁻¹ 者, 停止给药 ^[2, 5]	0: 符合①和②和③; 1: 不符合①或②或③
不良反应监测	① 注意头痛、过敏、血脂升高、严重感染、LYM 和 ANC 减少、血栓形成、胃肠穿孔、恶性肿瘤等不良反应 (ADR) 的监测 ^[2, 5] ; ② 发生相关药品 ADR, 立即停药, 及时对症处理, 同时填写 ADR 报表并上报	0: 符合①和②; 1: 不符合①或②

注: 0 为合理, 1 为不合理。

Note: 0 is reasonable and 1 is unreasonable.

证明托法替布在诱导和维持治疗中与对照组比较更有效, 并且表现出良好的安全性^[12-13]。

皮炎是一组主要累及皮肤和肌肉的自身免疫性疾病, 《成人皮炎诊疗中国专家共识 (2022 年)》^[17]、《幼年皮炎诊断与治疗专家共识》^[16] 均指出, 抗 MDA-5 抗体阳性的难治性患者可考虑早期使用 JAK 抑制剂 (如托法替布), 治疗后病情能得到极大改善, 并且能减少糖皮质激素、环

磷酸胺等的用量。

斑秃是一种突然发生的局限性脱发, 严重者可进展为全秃或普秃, 目前认为其是一种具有遗传背景的器官特异性自身免疫性疾病^[28]。《中国斑秃诊疗指南 (2019)》^[29] 指出口服 JKA 抑制剂对斑秃有一定的疗效。Almutairi 等^[20] 一项开放性对照研究证明, 托法替布片能显著促进斑秃毛发生长。

3.2 适应证不合理用药

表 2 P450 酶诱导剂、抑制剂强度分类^[24, 27]

Tab 2 P450 enzyme inducer and inhibitor intensity classification^[24, 27]

分类	药品名称
强效 CYP3A4 诱导剂	利福平、卡马西平、戊巴比妥、苯巴比妥、苯妥英钠、扑米酮、恩扎鲁胺、圣约翰草、米托坦、阿帕他胺、利福昔明、利福霉素、利福喷汀、磷苯妥英钠
强效 CYP3A4 抑制剂	伏立康唑、酮康唑、伊曲康唑、克拉霉素、胺碘酮、地尔硫草、沙奎那韦、达芦那韦、利托那韦、达诺瑞韦、洛匹那韦、依非韦仑、泊沙康唑、考西司他、司替戊醇、姜黄素、纳洛酮、尼洛替尼、洛哌丁胺、瑞波西利、埃威雷韦、米喹妥林、特非那定、麦角胺、益康唑、茚地那韦、甲巯咪唑、达那唑
强效 CYP2C19 抑制剂	氟康唑、咪康唑、异烟肼、氯霉素、氟西汀、吉非贝齐、兰索拉唑、奥美拉唑、艾司奥美拉唑、司替戊醇、丙咪唑、氯丙咪唑、氟伏沙明、噻氯匹定
中效 CYP3A4 抑制剂	阿瑞吡坦、红霉素、异烟肼、维拉帕米、决奈达隆、克唑替尼、卢立康唑、艾沙康唑、艾沙康唑、咪康唑、奈妥吡坦、地尔硫草、尼卡地平、达那唑、洛伐他汀、齐拉西酮、文拉法辛、米那普仑、夫西地酸、巴尼地平、贝尼地平、氟哌啶醇、利格列汀、伯氨喹、氯氮平、氟康唑、伏立康唑、氟伏沙明、环孢素、阿比特龙、克林霉素、环丙沙星

表 3 Micromedex 数据库 Thomsom 分级系统

Tab 3 Thomsom classification system of Micromedex database

分级	有效性等级	分级	推荐等级	分级	证据等级
I	药物治疗方案对特定适应证的证据和 / 或专家意见表明治疗有效	I	药物治疗方案已被证实有效，推荐使用	A	随机对照试验的荟萃分析；多个、设计良好、大规模的随机临床试验
II a	药物治疗方案对特定适应证有效性的证据和 / 或专家意见存在分歧，但证据和 / 或专家意见倾向有效	II a	药物治疗方案通常认为是有效的，在大多数情况下推荐使用	B	结论冲突的随机对照试验的荟萃分析；小规模或研究方法有显著缺陷的随机对照试验；非随机研究
II b	药物治疗方案对特定适应证有效性的证据和 / 或专家意见存在分歧，证据和 / 或专家意见对其有效性存在争议	II b	药物治疗方案可能有效，在某些情况下推荐使用，但大多数情况下不推荐使用	C	专家意见或共识，个案报道或系列案例
III	药物治疗方案对特定适应证的证据和 / 或专家意见表明治疗无效	III	药物治疗方案没有效果，应避免使用	No evidence	没有证据

表 4 托法替布片不合理用药统计

Tab 4 Statistics of irrational use of tofacitinib tablets

不合理用药类型	处方数 / 张	构成比 / %	具体问题及处方张数
适应证不合理	70	6.4	关节炎 (16)、系统性红斑狼疮 (11)、白塞综合征 (6)、风湿病 (6)、干燥综合征 (6)、风湿性多肌痛 (4)、成年型斯蒂尔病 (3)、结缔组织病 (3)、口腔阿弗他溃疡 (3)、变应性关节炎 (2)、皮疹 (2)、葡萄膜炎 (2)、慢性肾炎 (1)、皮肤淀粉样变性 (1)、软骨炎 (1)、系统性硬化病 (1)、纤维肌痛 (1)、原发性高血压 (1)
用法用量不合理	70	6.4	RA 5 mg qd (49), 10 mg bid (4), 5 mg bid (尿毒症 2 例、合用克拉霉素 2 例), 5 mg qn (1), 5 mg tid (1), 10 mg qd (1), 10 mg tid (1); 斑秃 5 mg qd (2); 普秃 5 mg qd (6); AS 5 mg qd (1)
潜在药物相互作用	4	0.4	克拉霉素 (2)、他克莫司 (1)、环孢素 (1)
禁忌证	2	0.2	疱疹病毒性角膜炎 (1)、肺部感染 (1)

适应证不合理处方中，托法替布片用于关节炎及其他风湿免疫疾病（如系统性红斑狼疮、白塞综合征、干燥综合征等）较多。药品说明书和诊疗指南中未提及托法替布片用于自身免疫性疾病关节炎以外的关节炎的治疗，《中国骨关节炎诊疗指南（2021 版）》推荐外用非甾体抗炎药物作为骨关节炎疼痛的一线治疗药物，疼痛持续或中度疼痛的可选择 COX-2 抑制剂口服^[30]。

在治疗其他风湿免疫疾病方面，使用其他风湿免疫疾病中文、英文名（如系统性红斑狼疮、白塞综合征、系统性硬化病）“托法替布”及“tofacitinib”等检索词，检索知网、万方、PubMed、Cochrane Library 等数据库，仅发现系统性红斑狼疮、

白塞综合征、系统性硬化病等有较少的报道^[31-33]，缺乏大样本、高质量的随机对照试验（RCT）临床研究或者权威指南推荐，就目前证据，托法替布治疗其他风湿免疫病方面无充分的循证医学证据。针对上述循证证据不充分的超适应证，笔者检索了相关临床试验登记信息，有几项托法替布治疗其他风湿免疫疾病的临床研究正积极开展，包括 tocilizumab 联合托法替布治疗白塞综合征（NCT05845723 研究），托法替布治疗原发性干燥综合征（NCT05087589 研究）、成人盘状红斑狼疮和系统性红斑狼疮（NCT03159936 研究）等^[34]，其结果可能会支持托法替布对相关疾病的治疗。

3.3 用法用量不合理

托法替布片用法用量不合理主要表现在 RA、AS、斑秃无剂量调整因素，每日 5 mg qd 给药，托法替布片半衰期短，约为 3 h，在治疗剂量范围内观察到全身暴露量与剂量成比例增加，bid 给药能在 24 h 内达到稳态血药浓度，qd 给药无法达到预期的治疗效果^[2, 5]。另外，观察到 1 例 RA 10 mg tid 给药，FDA 已经发布黑框警告，托法替布高剂量（10 mg bid）与更高的全因死亡率（包括心血管猝死率）有关^[35]，建议医师按照说明书用法用量给药。

3.4 药物相互作用

本次调查发现 4 例药物相互作用，分别为：联用克拉霉素 2 例，联用他克莫司、环孢素各 1 例，Micromedex 相互作用风险等级均为严重级（Major）。有文献报道托法替布与酮康唑（强效 CYP3A4 抑制剂）合用，托法替布 AUC 和 C_{max} 分别增加 103% 和 16%；与氟康唑（中效 CYP3A4、强效 CYP2C19 抑制剂）合用，托法替布 AUC 和 C_{max} 分别增加 79% 和 27%^[36]。托法替布说明书也明确规定，与一种强效 CYP3A4 抑制剂或一种中效 CYP3A4 抑制剂和一种强效 CYP2C19 抑制剂合用，会造成托法替布暴露量增加。且研究观察到高剂量托法替布（10 mg bid）与更高的全因死亡率有关^[35]，因此上述药物合用需要进行剂量调整，如服用 10 mg bid，则减少为 5 mg bid；如服用 ≤ 5 mg bid，则继续当前剂量，给药频次改为 qd^[2, 5]。克拉霉素为强效 CYP3A4 抑制剂，纳入研究的 2 例患者均未调整使用剂量。此外，已有联合其他免疫抑制导致严重感染的报道^[37]，因此不建议将托法替布与其他强效免疫抑制剂合用。

4 应对策略

4.1 超适应证用药分级管理设定

根据超适应证用药等级进行管理。① 有效性、推荐等级 II a 及以上、证据等级 A，建议全院医师均可开具；② 有效性、推荐等级 II a 及以上、证据等级 B，建议限制科室及中级职称以上医师可开具，信息系统弹窗提醒；③ 有效性、推荐等级 II b、证据等级 B 或有效性、推荐等级 II b 及以上、证据等级 C，建议限制科室及高级职称以上医师可开具，信息系统弹窗提醒；④ 证据等级为 No evidence，禁止使用，并与处方医师沟通。

4.2 剂量及药物相互作用管理设定

由于托法替布高剂量（10 mg bid）与更高的全因死亡率有关^[35]，因此需对托法替布使用剂量进行精细化管理，建议：① 根据 DUE 标准中不

同超说明书适应证，按照人群对给药剂量分别设定，超剂量处方审核规则设定为系统拦截；② 对于中重度肾功能不全、透析、中度肝功能损伤需要调整剂量的患者，规则设置为药师审核。

对存在的药物相互作用，建议：① 对 DUE 中禁止合用的联合用药，规则设置为系统拦截，同时开具两种药物时无法保存医嘱；② 联合用药需调整剂量或进行监测的，设置审查规则为药师审核。药师根据患者具体情况对未调整剂量或加强监测的拒绝发药，必须修改。

5 小结

需要指出的是，由于门诊处方信息有限，无法明确患者既往用药信息，只能通过与医师简单沟通获取，另外，虽然患者的相关检验信息可以通过全息视图获取，但由于门诊患者检验信息可能不完整，因此对适应证和用法用量等的评价可能存在一定的偏差，后续将进一步完善。本研究建立托法替布片 DUE 标准，并将标准的适应证、用法用量、相互作用等在说明书基础上进行补充，使得评价结果更具有指导意义。通过开展我院托法替布片合理用药评价，发现了一些不合理用药的情况，后期将通过医院处方审核软件对用药规则进行精细化设置，通过软件拦截和人工审核相结合的方式针对性的干预。另外，药师需要继续对相关临床科室开展托法替布片合理用药知识培训，并关注托法替布片相关循证医学证据的更新，使托法替布片 DUE 标准更加完善。

参考文献

- [1] 伍俊妍, 邱凯锋. JAK 抑制剂临床用药指引 [J]. 今日药学, 2023, 33 (6): 401-413.
- [2] 辉瑞制药有限公司. 枸橼酸托法替布片 [Z]. 2020.
- [3] 《Janus 激酶抑制剂治疗风湿免疫病超药品说明书用药中国专家共识》制定专家组. Janus 激酶抑制剂治疗风湿免疫病超药品说明书用药中国专家共识 [J]. 中华风湿病学杂志, 2023, 27 (1): 1-9.
- [4] 张文, 汪琳, 赵咏莉, 等. 利用循证医学方法对前列地尔注射液超说明书用药的评估探讨 [J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37 (2): 177-180.
- [5] 南京正大天晴制药有限公司. 枸橼酸托法替布片 [Z]. 2020.
- [6] Deodhar A, Sliwiska-Stanczyk P, Xu H, et al. Tofacitinib for the treatment of ankylosing spondylitis: a phase III, randomised, double-blind, placebo-controlled study [J]. Ann Rheum Dis, 2021, 80 (8): 1004-1013.
- [7] Ward MM, Deodhar A, Gensler LS, et al. 2019 Update of the American College of Rheumatology/Spondylitis Association of America/Spondyloarthritis Research and Treatment Network Recommendations for the treatment of ankylosing spondylitis and nonradiographic axial spondyloarthritis [J]. Ar-

- thritus Care Res (Hoboken), 2019, 71 (10): 1285-1299.
- [8] Ruperto N, Brunner HI, Synoverska O, et al. Tofacitinib in juvenile idiopathic arthritis: a double-blind, placebo-controlled, withdrawal phase 3 randomised trial [J]. Lancet, 2021, 398 (10315): 1984-1996.
- [9] Mease P, Hall S, FitzGerald O, et al. Tofacitinib or adalimumab versus placebo for psoriatic arthritis [J]. N Engl J Med, 2017, 377 (16): 1537-1550.
- [10] Gladman D, Rigby W, Azevedo VF, et al. Tofacitinib for psoriatic arthritis in patients with an inadequate response to TNF inhibitors [J]. N Engl J Med, 2017, 377 (16): 1525-1536.
- [11] Singh JA, Guyatt G, Ogdie A, et al. Special article: 2018 American College of Rheumatology/National Psoriasis Foundation Guideline for the treatment of psoriatic arthritis [J]. Arthritis Rheumatol, 2019, 71 (1): 5-32.
- [12] Panés J, Su C, Bushmakin AG, et al. Randomized trial of tofacitinib in active ulcerative colitis: analysis of efficacy based on patient-reported outcomes [J]. BMC Gastroenterol, 2015, 15: 14.
- [13] Sandborn WJ, Su C, Sands BE, et al. Tofacitinib as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis [J]. N Engl J Med, 2017, 376 (18): 1723-1736.
- [14] Kutschera M, Novacek G, Reinisch W, et al. Tofacitinib in the treatment of ulcerative colitis: a position paper issued by the Inflammatory Bowel Disease Working Group of the Austrian Society of Gastroenterology and Hepatology (ÖGG-H) [J]. Wien Klin Wochenschr, 2023, 135 (1-2): 1-13.
- [15] Guimarães PO, Quirk D, Furtado RH, et al. Tofacitinib in patients hospitalized with COVID-19 pneumonia [J]. N Engl J Med, 2021, 385 (5): 406-415.
- [16] 中华医学会儿科学分会风湿病学组, 中国医师协会风湿免疫科医师分会儿科学组, 海峡两岸医药卫生交流协会风湿免疫病学专业委员会儿童学组, 等. 幼年皮肌炎诊断与治疗专家共识 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2022, 37 (10): 726-732.
- [17] 中国医疗保健国际交流促进会皮肤科分会, 国家皮肤与免疫疾病临床医学研究中心. 成人皮肌炎诊疗中国专家共识 (2022 年) [J]. 中华皮肤科杂志, 2022, 55 (11): 939-948.
- [18] Paik JJ, Casciola-Rosen L, Shin JY, et al. Study of tofacitinib in refractory dermatomyositis: an open-label pilot study of ten patients [J]. Arthritis Rheumatol, 2021, 73 (5): 858-865.
- [19] Yu DA, Kim YE, Kwon O, et al. Treatment outcome of oral tofacitinib and ruxolitinib in patients with alopecia areata: a systematic review and meta-analysis [J]. Indian J Dermatol Venereol Leprol, 2021, 87 (5): 621-627.
- [20] Almutairi N, Nour TM, Hussain NH. Janus kinase inhibitors for the treatment of severe alopecia areata: an open-label comparative study [J]. Dermatology, 2019, 235 (2): 130-136.
- [21] Nash P, Kerschbaumer A, Dörner T, et al. Points to consider for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases with Janus kinase inhibitors: a consensus statement [J]. Ann Rheum Dis, 2021, 80 (1): 71-87.
- [22] Lamba M, Wang R, Fletcher T, et al. Extended-release once-daily formulation of tofacitinib: evaluation of pharmacokinetics compared with immediate-release tofacitinib and impact of food [J]. J Clin Pharmacol, 2016, 56 (11): 1362-1371.
- [23] Alunno A, Najm A, Machado PM, et al. 2021 update of the EULAR points to consider on the use of immunomodulatory therapies in COVID-19 [J]. Ann Rheum Dis, 2022, 81 (1): 34-40.
- [24] Walton A, Paik J, Quebe A, et al. Frequency of prescription claims for drugs that may interact with Janus kinase inhibitors among patients with rheumatoid arthritis in the US [J]. Rheumatol Ther, 2021, 8 (1): 599-607.
- [25] 伍俊妍, 邱凯锋. JAK 抑制剂临床应用药指引 [J]. 今日药学, 2023, 33 (6): 401-413.
- [26] 曹玮. 慢性肝病、结核病和风湿免疫病患者接种新冠疫苗的专家建议 [J]. 中华医学信息导报, 2021, 36 (15): 6.
- [27] Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018 [J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46 (D1): D1074-D1082.
- [28] 李璐, 杨井, 陶娟. Janus 激酶抑制剂在斑秃治疗中的研究进展 [J]. 武汉大学学报 (医学版), 2023, 44 (1): 36-40.
- [29] 中华医学会皮肤性病学分会毛发学组. 中国斑秃诊疗指南 (2019) [J]. 临床皮肤科杂志, 2020, 49 (2): 69-72.
- [30] 中华医学会骨科学分会关节外科学组, 中国医师协会骨科医师分会骨关节炎学组, 国家老年疾病临床医学研究中心 (湘雅医院), 等. 中国骨关节炎诊疗指南 (2021 年版) [J]. 中华骨科杂志, 2021, 41 (18): 24.
- [31] Komai T, Shoda H, Hanata N, et al. Tofacitinib rapidly ameliorated polyarthropathy in a patient with systemic sclerosis [J]. Scand J Rheumatol, 2018, 47 (6): 505-506.
- [32] Zhao N, Tang YC, Wang SK, et al. Case report: refractory intestinal Behçet's syndrome successfully treated with tofacitinib: a report of four cases [J]. Front Immunol, 2022, 13: 981502.
- [33] 王瑜, 袁相凤, 高文凤, 等. 托法替布治疗以脱发为首发表现的系统性红斑狼疮一例并文献复习 [J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2023, 39 (9): 664-666.
- [34] 药融云. NCT05845723 研究, NCT05087589 研究, NCT03159936 研究 [EB/OL]. (2023-09-22) [2023-10-15]. <https://data.pharmexcloud.com/1/table/47?q=托法替布>.
- [35] FDA. 美国警示托法替布的血栓及高剂量用量死亡增加风险 [J]. 中国药物评价, 2019, 36 (5): 343.
- [36] Gupta P, Chow V, Wang R, et al. Evaluation of the effect of fluconazole and ketoconazole on the pharmacokinetics of tofacitinib in healthy adult subjects [J]. Clin Pharmacol Drug Dev, 2014, 3 (1): 72-77.
- [37] 杨建伟. 托法替布不良反应文献分析 [J]. 现代药物与临床, 2023, 38 (7): 1775-1778.

(收稿日期: 2023-10-16; 修回日期: 2023-11-23)

焦虑 / 抑郁状态影响心脏瓣膜术后华法林抗凝质量的回顾性研究

史金平, 唐亚娟*, 张琰, 白娟, 洪术霞, 路小寒, 王立珍 (西安国际医学中心医院药学部, 西安 710100)

摘要: 目的 研究焦虑 / 抑郁状态对华法林抗凝质量的影响, 以提高华法林抗凝质量。方法 调取 2020 年 1 月至 2023 年 5 月到某医院就诊, 行心脏瓣膜置换术并规律口服华法林, 且定期复诊的患者病历, 以是否合并焦虑 / 抑郁状态分为研究组与对照组, 研究焦虑 / 抑郁状态对华法林抗凝质量的影响。结果 共纳入 236 例患者, 其中研究组 35 例, 对照组 201 例, 倾向性评分匹配后的结果提示: 合并焦虑 / 抑郁状态的患者华法林剂量调整次数 (3.29 ± 1.71)、维持剂量 (3.17 ± 0.84) mg 均显著高于对照组 ($P < 0.05$); 且合并焦虑 / 抑郁状态的患者获得高抗凝质量的比例 (5.71%) 与治疗范围内时间百分比 (26.00 ± 21.00)% 显著低于对照组 ($P < 0.05$)。结论 合并焦虑 / 抑郁状态的患者华法林抗凝质量普遍较低, 且此类患者需给予更高剂量的华法林才能使国际标准化比值达到稳定。

关键词: 心脏瓣膜置换; 焦虑 / 抑郁状态; 华法林; 抗凝质量; 治疗范围内时间百分比

中图分类号: R973

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)07-1915-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.040

Retrospective study on the effect of anxiety or depression on the quality of warfarin anticoagulation after heart valve surgery

SHI Jin-ping, TANG Ya-juan*, ZHANG Yan, BAI Juan, HONG Shu-xia, LU Xiao-han, WANG Li-zhen (Department of Pharmacy, Xi'an International Medical Center Hospital, Xi'an 710100)

Abstract: Objective To determine the influence of anxiety or depression on the quality of warfarin anticoagulation, and timely intervene to improve the quality of warfarin anticoagulation. **Methods** From January 2020 to May 2023, the patients who were hospitalized for heart valve replacement and regularly took warfarin orally were divided into a study group and a control group according to whether they were accompanied with anxiety or depression. The effect of anxiety or depression on the quality of warfarin anticoagulation was measured. **Results** Totally 236 patients were included (35 patients in the study group and 201 patients in the control group). The propensity score matching showed that the number of dose adjustments (3.29 ± 1.71), and the maintenance dose of warfarin (3.17 ± 0.84) mg for patients with anxiety or depression were higher than those in the control group ($P < 0.05$). The proportion of patients with anxiety or depression who achieved high anticoagulation quality (5.71%) and the percentage of time within the therapeutic range (26.00 ± 21.00)% were significantly lower than those of the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The quality of warfarin anticoagulation in patients with anxiety or depression is generally low, and such patients need to receive higher doses of warfarin to stabilize the international normalized ratio.

Key words: heart valve replacement; depression and anxiety state; warfarin; anticoagulant quality; time within therapeutic range

心脏瓣膜病是导致心血管疾病患者死亡的常见原因, 瓣膜置换术是其主要治疗方式, 接受瓣膜置换的患者术后应使用华法林抗凝至少三个

月^[1-2]。此类患者使用华法林的抗凝质量取决于华法林治疗范围内时间百分比 (time within therapeutic range, TTR), 如治疗期间无法获得高质量抗凝效

基金项目: 西安国际医学中心医院青年课题 (编号: 2023QN13)。

作者简介: 史金平, 男, 主管药师, 主要从事抗凝专业临床药学工作, email: 903442614@qq.com *通信作者: 唐亚娟, 女, 硕士, 副主任药师, 主要从事抗肿瘤药物治疗方面的研究, email: yezi11ok@163.com

果 ($TTR \geq 70\%$) 可导致患者瓣膜血栓、体循环血栓或缺血性脑卒中的风险增加^[3-4]。焦虑是一种内心紧张不安, 担心或预感到将要发生某种不利情况同时又感到难以应对的不愉快情绪体验, 近年来其发病率在逐年上升^[5]。目前, 部分研究显示, 焦虑/抑郁状态可显著增加房颤患者华法林抗凝时缺血性脑卒中与颅内出血风险, 但其机制尚不明确, 且尚无研究探讨其对瓣膜置换术后的患者华法林抗凝作用的影响^[6]。本研究经我院伦理委员会审批通过(批件号: GJYX-KY-2023-058), 拟分析焦虑/抑郁状态患者华法林抗凝质量, 以便临床及时采取干预措施, 提高华法林抗凝质量, 减少血栓事件的发生风险。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2020 年 1 月至 2023 年 5 月到某医院就诊, 行心脏瓣膜置换术, 使用华法林抗凝治疗, 且定期监测国际标准化比值 (INR) 的患者, 其中男性 146 例, 女性 90 例, 平均年龄 (55.63 ± 14.11) 岁。记录两组患者合并疾病、饮酒史、吸烟史、纽约心脏学会 (NYHA) 心脏功能分级、首次入院时的部分实验室指标、长期合并用药情况, 瓣膜置换术后 INR 稳定前的华法林日平均剂量、INR 稳定后华法林日平均维持剂量、瓣膜置换术后 INR 达稳定的时间、INR 监测次数与达标次数等。

1.2 纳入与排除标准

纳入标准: 行心脏瓣膜置换术, 且研究组明确诊断为焦虑/抑郁状态, 使用华法林抗凝, 定期至我院监测 INR, 随访周期 ≥ 3 个月。排除标准: 随访期内未规律服用华法林者, 临床病历资料不全者, 焦虑/抑郁状态诊断不明者, 随访周期 < 3 个月者, 出院后未规律监测 INR 者。

1.3 研究方法

以心脏瓣膜置换术后合并焦虑/抑郁状态的患者为研究组, 以无焦虑/抑郁状态的患者为对照组, 以线性内插法计算 TTR^[4], 比较两组患者瓣膜置换术后 INR 稳定前的华法林日平均剂量、INR 达稳定的时间、INR 达稳定前华法林剂量调整次数、INR 达稳定后华法林维持剂量、TTR 等的差异。

1.4 判定标准

依据 2022 年中华医学会胸心血管外科分会《心脏瓣膜外科抗凝治疗中国专家共识》^[1]: 心脏瓣膜术后使用华法林抗凝应维持 INR 1.8 ~ 2.5, 合并高血栓风险或其他需要抗凝因素的患者应维持 INR 2.0 ~ 3.0。因此, 本文采用的心脏瓣膜置换术后华法林抗凝目标范围为 INR 1.8 ~ 3.0。

根据 2012 年美国胸科医师学会《口服抗凝治疗: 抗血栓治疗和血栓预防》指南^[7]: 以 $TTR \geq 70\%$ 为

高抗凝质量; 以 $70\% > TTR \geq 58\%$ 为中等抗凝质量; 以 $TTR < 58\%$ 为低抗凝质量。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 23 统计软件进行数据分析, 采用倾向性评分匹配进行基线校准, 计量资料以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示^[8], 采用方差分析; 计数资料以 n 或率 (%) 表示, 采用卡方检验; 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义, GraphPad Prism 6.01 软件绘制相关图片。

2 结果

2.1 纳入患者的基线差异

本研究共纳入 236 例患者, 其中焦虑/抑郁状态组 (研究组) 35 例, 非焦虑或抑郁状态组 (对照组) 201 例, 倾向性评分匹配前两组患者年龄、性别、NYHA 分级、高血压、恶性肿瘤、红细胞等基线指标差异存在统计学意义, 使用倾向性评分匹配校准基线后, 所有基线指标差异均不存在统计学意义, 详细结果见表 1。

2.2 结局指标分析

倾向性评分匹配前, 两组患者华法林初始给药剂量、华法林剂量调整次数、华法林维持剂量 (mg) 及 TTR 达标情况等结局指标差异存在统计学意义; 倾向性评分匹配后, 研究组患者华法林初始给药剂量 (2.87 ± 0.68) mg 与对照组 (2.59 ± 0.72) mg 差异无统计学意义, 与倾向性评分匹配前结论矛盾, 其余结局指标均与倾向性评分匹配前保持一致。结果与对照组相比, 合并焦虑/抑郁状态的患者需要更频繁的剂量调整次数 (3.29 ± 1.71), 才能使患者 INR 达到稳定。此外当 INR 达稳定后, 研究组患者的华法林维持剂量显著高于对照组 [(3.17 ± 0.84) mg vs (2.73 ± 0.80) mg], 且 TTR 显著低于对照组 [$(26.00 \pm 21.00)\%$ vs $(51.65 \pm 21.80)\%$], 提示合并焦虑/抑郁状态的患者即使给予较高的华法林维持剂量, 其 TTR 仍显著低于对照组的患者, 如表 2 所示。

根据 2012 年美国胸科医师学会《口服抗凝治疗: 抗血栓治疗和血栓预防》指南对华法林抗凝质量的划分标准, 研究组患者获得高抗凝质量 ($TTR \geq 70\%$) 者占 5.71%, 显著低于对照组 (28.86%); 获得中等抗凝质量 ($70\% > TTR \geq 58\%$) 者占 8.57%, 与对照组 (10.45%) 相比差异无统计学意义, 获得低抗凝质量 ($TTR < 58\%$) 者占 85.72%, 显著高于对照组 (60.69%), 结果如图 1 所示。

3 讨论

3.1 华法林抗凝质量的常见影响因素及基线校准

华法林抗凝质量受多种因素影响, 2022 年 Tadesse 等^[8]的一项荟萃分析显示, 女性、年龄 < 50 岁、合并慢性疾病、吸烟史、受教育程度

表 1 患者基础数据表
Tab 1 Basic patient data

项目	倾向性评分匹配前				倾向性评分匹配后			
	焦虑 / 抑郁状态 (n = 35)	非焦虑 / 抑郁状态 (n = 201)	χ^2/F	P	焦虑 / 抑郁状态 (n = 35)	非焦虑 / 抑郁状态 (n = 35)	χ^2/F	P
随访时间 / 月	12.08±6.86	12.18±9.16	0.00	0.95	12.08±6.86	13.14±10.16	0.26	0.61
年龄 / 年	49.31±15.84	56.73±13.53	8.50	0.04	49.31±15.84	55.17±14.34	2.63	0.11
性别 (男)	12	134	13.25	< 0.01	12	19	2.84	0.09
吸烟史	0	18	3.39	0.07	0	0	/	/
饮酒史	1	11	0.42	0.52	1	2	0.35	0.56
冠心病	3	45	3.51	0.06	3	7	1.87	0.17
心力衰竭	6	24	0.73	0.39	6	6	0.00	1.00
NYHA ≥ III 级	13	128	8.73	0.03	13	16	0.53	0.47
高血压	8	91	6.15	0.01	8	15	3.17	0.07
合并糖尿病	6	24	0.73	0.39	6	7	0.09	0.76
合并慢性阻塞性肺疾病	0	12	2.20	0.14	0	2	2.06	0.15
合并恶性肿瘤	2	0	11.58	< 0.01	2	0	2.06	0.15
合并心肌梗死病史	0	12	2.20	0.14	0	3	3.13	0.08
合并缺血性脑卒中病史	5	30	0.01	0.92	5	5	< 0.01	1.00
合并静脉血栓史	5	18	0.96	0.33	5	5	0.13	0.72
合并出血史	3	6	2.54	0.11	3	2	0.22	0.64
合并肝功能不全	0	14	2.59	0.11	0	2	2.06	0.15
合并肾功能不全	3	15	0.05	0.82	3	1	1.06	0.30
白蛋白 / (g · L ⁻¹)	39.43±5.12	38.20±5.73	1.42	0.24	39.43±5.12	39.18±4.04	0.05	0.82
红细胞 / (×10 ¹² · L ⁻¹)	3.82±1.08	4.14±0.73	4.86	0.03	3.82±1.08	4.06±0.82	1.13	0.29
血红蛋白 / (g · L ⁻¹)	117.06±28.60	124.99±24.15	3.04	0.08	117.06±28.60	122.86±26.11	0.79	0.38
血小板 / (×10 ⁹ · L ⁻¹)	191.29±81.09	171.82±72.04	2.10	0.15	191.29±81.09	176.89±79.07	0.57	0.46
合并用药胺碘酮	4	23	0.00	1.00	4	4	< 0.01	1.00
合并用药钙通道阻滞剂	3	33	1.42	0.23	3	5	0.57	0.45
合并用药阿司匹林	0	21	4.01	0.05	0	3	3.13	0.08
合并用药氯吡格雷	0	3	0.53	0.47	0	0	/	/

表 2 焦虑或抑郁状态对华法林抗凝的影响

Tab 2 Effect of anxiety or depression on warfarin anticoagulation

结局	倾向性评分匹配前				倾向性评分匹配后			
	焦虑 / 抑郁状态 (n = 35)	非焦虑 / 抑郁状态 (n = 201)	χ^2/F	P	焦虑 / 抑郁状态 (n = 35)	非焦虑 / 抑郁状态 (n = 35)	χ^2/F	P
华法林初始剂量 / mg	2.87±0.68	2.41±0.79	6.42	0.01	2.87±0.68	2.59±0.72	1.68	0.20
华法林剂量调整次数 / 次	3.29±1.71	2.50±1.58	4.27	0.04	3.29±1.71	2.22±0.94	5.53	0.02
INR 达稳定时间 / d	14.33±9.94	18.60±18.00	1.11	0.29	14.33±9.94	18.33±11.42	1.37	0.25
华法林维持剂量 / mg	3.17±0.84	2.78±0.93	5.40	0.02	3.17±0.84	2.73±0.80	5.21	0.03
INR 监测次数 / 次	12.00±7.45	12.24±8.44	0.03	0.87	12.00±7.45	15.29±9.54	2.58	0.11
TTR / %	26.00±21.00	50.00±24.00	33.44	< 0.01	26.00±21.00	51.65±21.80	25.93	< 0.01

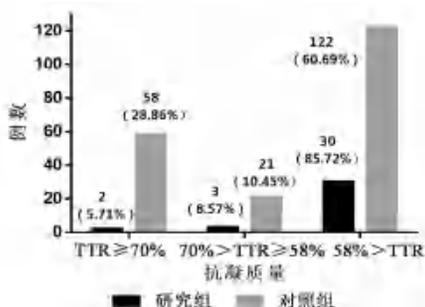


图 1 华法林抗凝质量 (TTR) 分布图

Fig 1 Distribution of warfarin anticoagulant quality (TTR)

较低等是影响华法林抗凝质量的危险因素。2023 年史金平等^[9]通过 Meta 分析进一步提示, 合并糖尿病、慢性阻塞性肺疾病、心力衰竭、肝肾疾病是影响华法林抗凝质量的危险因素。此外, 部分研究

显示肿瘤、贫血等也是华法林抗凝质量的危险因素^[10-11]。本文纳入的两组患者, 年龄、合并恶性肿瘤、红细胞计数等基线指标差异存在统计学意义, 可能影响研究结果, 因此使用倾向性评分匹配法对基线进行校准, 且校准后所有基线指标差异均不存在统计学意义, 提高了研究结果的准确性^[12]。

3.2 焦虑 / 抑郁状态对华法林抗凝质量的影响及机制

焦虑 / 抑郁状态对华法林抗凝质量的影响尚不明确, 2018 年 Baumgartner 等^[6]学者研究也发现, 焦虑 / 抑郁状态可显著增加房颤患者华法林抗凝时缺血性脑卒中与颅内出血风险, 但并未对其发生机制做进一步研究。本文研究结果显示, 倾向性评分匹配前后, 焦虑 / 抑郁状态患者与正

常患者的华法林初始剂量差异相互矛盾,可能与倾向性评分匹配前两组患者基线指标存在差异有关。但基线校准前后,两组患者华法林剂量调整次数、华法林维持剂量及 TTR 达标情况的差异保持一致,提示与无焦虑/抑郁状态的患者相比,合并焦虑/抑郁状态的患者需要更频繁的剂量调整才能使 INR 达稳定。这可能与合并焦虑/抑郁状态的患者服药依从性下降及某些抗抑郁药与华法林存在相互作用有关,尚需进一步研究^[13-14]。

3.3 提高焦虑/抑郁状态患者华法林抗凝质量

心脏瓣膜病患者由于对疾病缺乏足够的认知、处于较低的社会经济地位、医疗保险的限制、药物的使用等因素,可能出现持续抑郁和焦虑症状^[15-16]。本文研究结果显示,合并焦虑/抑郁状态的患者华法林抗凝质量较低,平均 TTR 仅 26%, TTR 达标人数仅 5.71%,因此对于心脏瓣膜术后合并焦虑/抑郁症状者,应尽早给予适宜的干预措施,以提高患者华法林抗凝质量及生活质量,降低血栓风险。Manzato 等^[17]通过院外电话随访的方式,对患者加强教育,虽然对其生活质量无显著提高,但改善了患者焦虑/抑郁状态,使患者以积极的心态面对疾病;Dong 等^[18]对心脏瓣膜置换术后的患者给予音乐辅助治疗,发现音乐辅助疗法可显著降低患者疼痛与焦虑症状。这为心脏瓣膜术后,焦虑/抑郁症状的干预方法提供了理论依据。

3.4 小结

综上所述,心脏瓣膜术后患者焦虑/抑郁状态较为普遍,且其可显著增加华法林抗凝时的血栓风险。本文通过分析此类患者的华法林抗凝质量,发现其普遍较低,可解释焦虑/抑郁状态患者华法林抗凝时血栓高发率的原因,并提示针对此类患者,临床医师可通过病情宣教、电话随访、音乐疗法、提高 INR 监测频率等手段提高其抗凝质量,降低血栓风险。

参考文献

[1] 中华医学会胸心血管外科分会瓣膜病外科学组. 心脏瓣膜外科抗凝治疗中国专家共识[J]. 中华胸心血管外科杂志, 2022, 38(3): 164-174.

[2] Vahanian A, Beyersdorf F, Praz F, et al. 2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease[J]. Eur Heart J, 2022, 43(7): 561-632.

[3] 丁征, 潘文斐, 莎兰, 等. 人工瓣膜术后华法林抗凝治疗真实世界研究[J]. 中国药理学杂志, 2020, 55(20): 1722-1725.

[4] 熊彩虹, 万建伟, 陈敏, 等. 服用华法林患者抗凝治疗现状调查及质量评价[J]. 药物流行病学杂志, 2020, 29(5): 332-335, 341.

[5] 中华医学会, 中华医学会杂志社, 中华医学会全科医学分

会, 等. 广泛性焦虑障碍基层诊疗指南(2021年)[J]. 中华全科医师杂志, 2021, 20(12): 1232-1241.

[6] Baumgartner C, Fan D, Fang MC, et al. Anxiety, depression, and adverse clinical outcomes in patients with atrial fibrillation starting warfarin: cardiovascular research network WAVE study[J]. J Am Heart Assoc, 2018, 7(8): e007814.

[7] Ageno W, Gallus AS, Wittkowsky A, et al. Oral anticoagulant therapy: antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9th ed; American College of Chest Physicians Evidence-based Clinical Practice Guidelines[J]. Chest, 2012, 141(2 Suppl): e44S-e88S.

[8] Tadesse TA, Tegegne GT, Yadeta D, et al. Anticoagulation control, outcomes, and associated factors in longterm-care patients receiving warfarin in Africa: a systematic review[J]. Thromb J, 2022, 20(1): 58.

[9] 史金平, 张琰, 唐亚娟, 等. 华法林抗凝质量影响因素的 Meta 分析与预测模型[J]. 中南药学, 2023, 21(6): 1684-1689.

[10] DeRemer CE, McMichael B, Young HN. Warfarin patients with anemia show trend of out-of-range international normalized ratio frequency with point-of-care testing in an anticoagulation clinic[J]. J Pharm Pract, 2019, 32(5): 499-502.

[11] Tsimberidou AM, Takimoto CH, Moulder S, et al. Effects of patupilone on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin in patients with advanced malignancies: a phase I clinical trial[J]. Mol Cancer Ther, 2011, 10(1): 209-217.

[12] 王瑞平. 倾向性评分匹配应用条件及 SPSS 软件实现[J]. 上海医药, 2022, 43(13): 59-62.

[13] Cosh SM, Pinto R, Denson L, et al. Understandings and experiences of adherence to secondary prevention for patients with cardiovascular disease and comorbid depression or anxiety[J]. Psychol Health Med, 2023, 28(6): 1479-1486.

[14] Komen JJ, Hjemdahl P, Mantel-Teeuwisse AK, et al. Concomitant anticoagulant and antidepressant therapy in atrial fibrillation patients and risk of stroke and bleeding[J]. Clin Pharmacol Ther, 2020, 107(1): 287-294.

[15] Rosson S, Monaco F, Miola A, et al. Longitudinal course of depressive, anxiety, and posttraumatic stress disorder symptoms after heart surgery: a meta-analysis of 94 studies[J]. Psychosom Med, 2021, 83(1): 85-93.

[16] Chandrasekhar J. Psychosocial fitness for aortic valve replacement: can anxiety, depression, and postcode influence the outcomes? [J]. JACC Cardiovasc Interv, 2022, 15(22): 2336-2338.

[17] Manzato RO, Ciol MA, Bolela F, et al. The effect of reinforcing an educational programme using telephone follow-up on health-related quality of life of individuals using warfarin: a randomised controlled trial[J]. J Clin Nurs, 2021, 30(19-20): 3011-3022.

[18] Dong Y, Zhang L, Chen LW, et al. Music therapy for pain and anxiety in patients after cardiac valve replacement: a randomized controlled clinical trial[J]. BMC Cardiovasc Disord, 2023, 23(1): 32.

(收稿日期: 2023-09-25; 修回日期: 2023-11-16)

基于 2020 年版《中国药典》一部含毒性动物饮片 中成药梳理分析与药学监护要点建立

唐贺¹, 鞠晓宇¹, 赵倩¹, 唐有权², 张笑敏¹, 程杰^{1*} (1. 河北省中医院, 石家庄 050000; 2. 华北医疗健康集团邢台总医院, 河北 邢台 054000)

摘要: **目的** 分析含毒性动物饮片中成药, 并建立其临床使用监护要点。**方法** 根据 2020 年版《中国药典》收录的 8 味含毒性动物饮片, 筛选药典中收录的含毒性动物饮片的中成药目录, 梳理其药品说明书各项内容并整理其用药监护等内容。**结果** 共纳入 94 种含毒性动物饮片中成药, 按功能分类多集中于理血剂、开窍剂、补益剂等方面, 其中含 1 种毒性动物饮片的有 65 种, 含 2 种毒性动物饮片的有 19 种, 含 3 种毒性动物饮片的有 7 种, 含 4 种毒性动物饮片的有 3 种。多数含毒性动物饮片的中成药说明书标注了妊娠、哺乳、经期、儿童、肝肾功能异常等用药禁忌, 且部分说明书标注了用药疗程等信息, 需加强用药监护。**结论** 含毒性动物饮片中成药是需加强用药监护的一类药品, 需关注药品说明书标注的特殊人群、患者基础疾病、用药疗程、药物相互作用等方面, 同时, 还应注意长期使用此类药品可能导致毒性动物饮片的毒性成分蓄积和不良反应等情况, 从而保证临床用药安全。

关键词: 含毒性动物饮片中成药; 药学监护; 安全用药

中图分类号: R282, R283 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)07-1919-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.041

Key points in pharmaceutical care of Chinese patent medicines containing toxic animal drugs in *China Pharmacopoeia* (2020 Edition, Vol. I)

TANG He¹, JU Xiao-yu¹, ZHAO Qian¹, TANG You-quan², ZHANG Xiao-min¹, CHENG Jie^{1*} (1. Hospital of Traditional Chinese Medicine in Hebei Province, Shijiazhuang 050000; 2. Xingtai General Hospital of North China Healthcare Group, Xingtai Hebei 054000)

Abstract: Objective To analyze Chinese patent medicines containing toxic animal drugs, and summarize key monitoring points of these medicines. **Methods** Chinese patent medicines containing toxic animal drugs in *China Pharmacopoeia* (2020 Edition, Vol. I) were summarized, the contents of drug instructions were counted, and the clinical monitoring was sorted out. **Results** Totally 94 Chinese patent medicines containing toxic animal drugs were included: mainly blood regulating agents, resuscitation agents and tonic formulae according to their functions. Totally 65 animal drugs contained one toxicity, 19 contained two toxicity, 7 contained three toxicity and 3 contained four toxicity. The contraindications concerning pregnancy, lactation, menstrual period, children, abnormal liver and kidney function in the instructions were specified in most Chinese patent animal drugs containing toxicity. **Conclusion** To ensure the safety of medication, Chinese patent animal drugs containing toxicity need to be monitored from special population group, patient basic disease, medication courses, drug interactions clarified in the drug instructions, and toxicity accumulation and adverse reactions especially after long time use.

Key words: Chinese patent animal drug containing toxicity; pharmaceutical care; safe medication

基金项目: 河北省中医药管理局课题 (No.2022052)。

作者简介: 唐贺, 女, 主管药师, 主要从事临床药学和药事管理方面的工作, email: 1021953998@qq.com *通信作者: 程杰, 女, 主任药师, 主要从事中药临床药学和药事管理方面的工作, email: 323240022@qq.com

动物药是重要的中药资源，具有分布广泛、药源丰富、活性显著等特点^[1]。中医认为药用动物与人体组成相近，属于“血肉有情之品”，与植物药相比更有同气相求之效，更易被人体吸收与利用。动物药在我国应用历史悠久，富含蛋白质、多肽及酶类等多种活性有效成分，在救治危急重症、调治内科杂症以及外治解毒等方面功效显著^[2]，且常加工成方便服用、有明确适应证的中成药，被临床广泛应用^[3]。但因部分动物药药性峻猛，特别是蜈蚣、全蝎等动物类有毒中药，导致含有毒性动物饮片的中成药存在一定的用药禁忌、注意事项、疗程限制等情况，在用药过程中需要重点监护^[4-6]。本研究梳理了 2020 年版《中国药典》一部中含毒性动物饮片的中成药目录，并建立了相关药学监护要点，以期为临床安全合理用药提供科学的依据。

1 资料来源与方法

1.1 资料来源

根据 2020 年版《中国药典》一部收录的 8 味毒性动物药^[7]，确定本次研究对象为含土鳖虫、全蝎、水蛭、金钱白花蛇、蕲蛇、蜈蚣、蟾酥、斑蝥的中成药，检索 2020 年版《中国药典》一部中收录的含以上毒性动物饮片的中成药目录。

1.2 方法

1.2.1 数据收集及整理 将 2020 年版《中国药典》一部中所有中成药名称及其药味组成列到 Excel 表中，并将含毒性动物饮片的中成药筛选出来，使用美康合理用药系统、药智网收集含毒性动物饮片中成药的说明书【用法用量】、【不良反应】、【禁忌】和【注意事项】等各项内容，并整理到 Excel 数据表中。

1.2.2 数据分析 对数据表内标注妊娠期、哺乳期、经期妇女、儿童、运动员、肝肾功能不全者、有明确基础疾病和中医症候等用药禁忌信息、用药疗程及限制的中成药进行梳理，筛选出有关用药监护方面的内容。

2 结果

2.1 含毒性动物饮片中成药的一般特点

2020 年版《中国药典》中收录的中成药共计 1607 种，筛选含单味或多味毒性动物饮片的中成药共 94 种。根据中成药的功能分类，含毒性动物饮片的中成药多集中于理血剂、开窍剂、补益剂种类，具体见图 1。

该 94 种含毒性动物饮片的中成药中共有 65 种含有单味动物药，按照单味动物药出现的频次排序，依次为土鳖虫 (23 种)、水蛭 (13 种)、全蝎

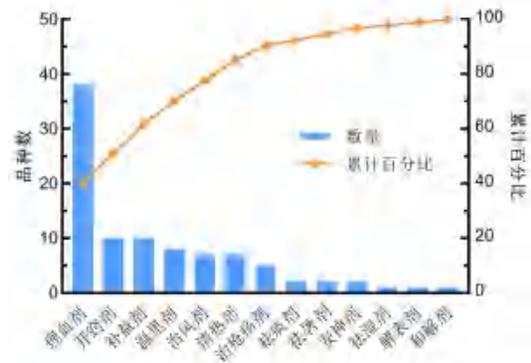


图 1 含毒性动物饮片的中成药功能分类

Fig 1 Functional classification of Chinese patent animal drugs containing toxicity

(12 种)、蟾酥 (11 种)、蜈蚣 (6 种)；含 2 种及以上动物类毒性动物饮片中成药 29 种，具体见图 2。

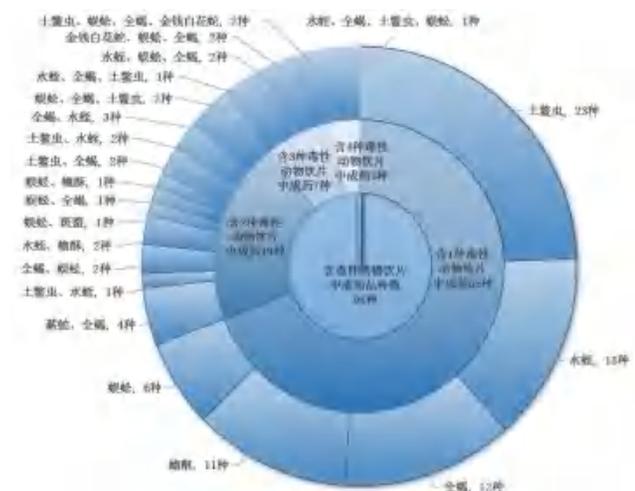


图 2 含毒性动物饮片的中成药品种数

Fig 2 Number of varieties of Chinese patent animal drugs containing toxicity

2.2 含毒性动物饮片中成药的说明书标注情况

2.2.1 特殊人群

① 肝肾功能不全者：在 94 种含毒性动物饮片的中成药中，共有 15 种对肝肾功能异常患者进行了特殊的标注，具体见表 1。

表 1 对肝肾功能异常患者禁忌有标注的含毒性动物饮片中成药
Tab 1 Chinese patent animal drugs containing toxicity labelled with contraindications for patients with liver and kidney dysfunction

类型	数量 / 种	品种
肝肾功能异常	禁用	5 伤科接骨片，活血止痛软胶囊 (胶囊、散)，伸筋活络丸
	忌用	2 活血壮筋丸，医痢丸
	慎用	8 小儿至宝丸，季德胜蛇药片，脉络舒通丸 (颗粒)，通痹片 (胶囊)，麝香通心滴丸，抗栓再造丸

② 特殊时期妇女：在 94 种含毒性动物饮片的中成药中，其中 75 种对特殊时期妇女禁忌进行了特殊标注，具体见表 2。但部分毒性动物饮片标注

孕妇禁用或慎用，而含相应饮片的中成药说明书未进行相关标注或标注级别不一致，具体见表 3。

③ 儿童：在 94 种含毒性动物饮片的中成药中，有 4 种标注儿童禁用，1 种标注 10 岁以下儿童禁用，3 种标注 6 岁以下儿童禁用，1 种标注

小儿禁用，具体见表 4。

④ 运动员：在 94 种含毒性动物饮片的中成药中，有 34 种标注运动员慎用，其组成药味中均含有国家体育总局规定的赛内赛外禁用的麻黄、麝香、蟾酥等中药饮片品种，具体见表 5。

表 2 对特殊时期妇女禁忌有标注的含毒性动物饮片中成药

Tab 2 Chinese patent animal drugs containing toxicity labelled with contraindications for women in special periods

类型	数量 / 种	品种
孕妇	禁用	47 大黄廑虫丸，天和追风膏，化癥回生片，丹桂香颗粒，正骨水，再造丸，伤科接骨片，庆余辟瘟丹，如意定喘片，芪蛭降糖片（胶囊），医病丸，沈阳红药胶囊，骨折挫伤胶囊，骨刺宁胶囊，复方夏天无片，脉络舒通丸（颗粒），活血止痛软胶囊（胶囊、散），活血壮筋丸，宫瘤清片（胶囊），脑心通胶囊，狼疮丸，益心丸，消癥丸，通心络胶囊，通痹片（胶囊），培元通脑胶囊，清眩治瘫丸，跌打丸，跌打活血散，痧药，腰痛丸（片），腰痛宁胶囊，豨莶通栓丸（胶囊），熊胆救心丸，醒脑再造胶囊，麝香风湿胶囊，麝香抗栓胶囊，麝香保心丸，麝香通心滴丸
	忌用 / 忌服	20 人参再造丸，九味肝泰胶囊，大七厘散，止痛化癥片（胶囊），止痛紫金丸，牛黄消炎片，风湿马钱片，血拴心脉宁片（胶囊），抗栓再造丸，灵宝护心丹，季德胜蛇药片，金蒲胶囊，梅花点舌丸，清脑降压片（胶囊、颗粒），颈复康颗粒，癫痫平片
	慎用	7 少林风湿跌打膏，红药贴膏，芪明颗粒，芪参胶囊，京万红软膏，复方黄柏液涂剂，跌打镇痛膏
哺乳期妇女	禁用	1 消癥丸
	慎用	3 红药贴膏，天和追风膏，正骨水
产妇	禁用	1 豨莶通栓胶囊
	慎用	1 培元通脑胶囊
计划妊娠的妇女	禁用	1 消癥丸
经期	禁用 / 停用	5 沈阳红药胶囊，宫瘤清片（胶囊），消癥丸，通心络胶囊
	慎用	1 益心丸，天和追风膏，正骨水，芪参胶囊
月经过多者	禁用	1 丹桂香颗粒

表 3 含毒性动物饮片中成药禁忌与中成药说明书禁忌证比较

Tab 3 Contraindications between Chinese patent animal drugs containing toxicity and traditional Chinese medicine

药典标注	饮片	中成药	说明书标注
有毒，孕妇禁用	全蝎	七珍丸，牛黄千金散、小儿至宝丸，小儿惊风散，小儿解热丸，中风回春丸（片），牛黄千金散，牛黄抱龙丸，牛黄镇惊丸，癫痫康胶囊	未标注妊娠禁忌
		止痛化癥片（胶囊），风湿马钱片，抗栓再造丸，复方牵正膏，癫痫平片	孕妇忌用 / 忌服
有毒，孕妇慎用	蜈蚣	拔毒膏	未标注妊娠禁忌
		牙痛一粒丸，六应丸	未标注妊娠禁忌
有小毒，孕妇禁用	土鳖虫	中风回春丸（片），参松养心胶囊，养正消积胶囊	未标注妊娠禁忌
		大七厘散，止痛化癥片（胶囊），止痛紫金丸，抗栓再造丸，颈复康颗粒	孕妇忌用 / 忌服
	水蛭	少林风湿跌打膏，红药贴膏	孕妇慎用
		天丹通络片（胶囊）	未标注妊娠禁忌
		抗栓再造丸，清脑降压片（胶囊、颗粒）	孕妇忌用 / 忌服
		芪明颗粒，芪参胶囊	孕妇慎用

表 4 对儿童禁忌有标注的含毒性动物饮片中成药

Tab 4 Chinese patent animal drugs containing toxicity labelled with contraindications for children

说明书标注	数量 / 种	品种
儿童禁用	4	伸筋活络丸，通痹片、胶囊，麝香风湿胶囊
小儿禁用	1	熊胆救心丸
10 岁以下儿童禁用	1	伤科接骨片
6 岁以下儿童禁用	3	活血止痛软胶囊、胶囊、散

2.2.2 疾病禁忌 在 94 种含毒性动物饮片的中成药中，有 18 种对患者的原患基础疾病或中医证候禁忌进行了标注，此类禁忌多与药物的功能主治、作用特点等有关，具体见表 6。

2.2.3 用药疗程 在 94 种含毒性动物饮片的中成药中，仅有 11 种标明了用药疗程的规定，具体见表 7。

3 用药监护要点

表 5 对运动员禁忌有标注的含毒性动物饮片中成药

Tab 5 Chinese patent animal drugs containing toxicity labelled with contraindications for athletes

说明书标注	数量/种	品种
运动员慎用	34	七珍丸, 人参再造丸, 九味肛泰胶囊, 小儿解热丸, 天和追风膏, 牛黄抱龙丸, 牛黄镇惊丸, 化癥回生片, 风湿马钱片, 再造丸, 伤科接骨片, 血栓心脉宁片(胶囊), 庆余辟瘟丹, 如意定喘片, 抗栓再造丸, 伸筋活络丸, 灵宝护心丹, 郁金银屑片, 京万红软膏, 复方牵正膏, 复方夏天无片, 益心丸, 通痹片(胶囊), 梅花点舌丸, 腰痛宁胶囊, 豨莶通栓丸(胶囊), 熊胆救心丸, 麝香风湿胶囊, 麝香抗栓胶囊, 麝香保心丸, 麝香通心滴丸

表 6 对基础疾病或机体状态有标注的含毒性动物饮片中成药

Tab 6 Chinese patent animal drugs containing toxicity labelled with contraindications for basic diseases or body conditions

类型	数量/种	品种
脑出血急性期	禁用	6 天丹通络片(胶囊), 中风回春丸(片), 豨莶通栓丸(胶囊)
有出血倾向	禁用	1 豨莶通栓胶囊, 通心络胶囊
	慎用	4 丹桂香颗粒, 脉络舒通丸(颗粒), 大黄廑虫丸
高血压	禁用	1 伸筋活络丸
	忌用	1 活血壮筋丸
	慎用	2 腰痛宁胶囊, 颈复康颗粒
心脏病	忌用	1 活血壮筋丸
	慎用	1 腰痛宁胶囊
热症者、阴虚火旺者	慎用	4 丹桂香颗粒, 活血壮筋丸, 腰痛丸(片)
脾胃虚弱者	慎用	3 麝香保心丸, 脑心通胶囊, 大黄廑虫丸
脾胃虚寒者	慎用	2 季德胜蛇药片, 腰痛宁胶囊

表 7 对用药疗程有标注的含毒性动物饮片中成药

Tab 7 Chinese patent animal drugs containing toxicity labelled with treatment course

品种	疗程
芪明颗粒	3~6 个月
芪蛭降糖片(胶囊)	3 个月
丹桂香颗粒	8 周
消癥丸	8 周
豨莶通栓丸(胶囊)	4 周
芪参胶囊	42 d
金蒲胶囊	42 d
活血止痛软胶囊	7 d
风湿马钱片	7 d, 两疗程间需停药 2~3 d

3.1 特殊人群

包括肝肾功能不全者、妊娠期、哺乳期、月经期妇女、儿童、运动员等, 以上人群均有特有的生理特征, 因此有不同的监护要点。如肝肾功

能不全患者, 服用含斑蝥、全蝎等具有肝肾毒性动物饮片的中药时, 有可能导致黄疸、肝功能损伤或蛋白尿、血尿、肾衰竭等毒性反应^[8-9], 因此说明书标明此类患者禁用的药品绝对不能使用, 而标明慎用的药品, 应对患者的肝肾功能进行评估后确定是否可以使用, 评估后若选用此类药品, 也应根据相关用药规范, 提醒患者每月监测一次谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)或尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)等指标。多数含毒性动物饮片的中药均标注了妊娠期禁忌, 鉴于医学伦理的原因, 部分中药缺乏妊娠人员的安全性相关数据^[10], 同样需加强用药监护, 如土鳖虫和水蛭具有破血通经、逐瘀的功效, 虽部分含此类毒性动物饮片的中药未标注妊娠期禁忌或慎用, 使用时应监测患者出血、流产风险。

3.2 中医症候或基础疾病

中药的使用应根据患者的体质进行中医症候分型, 辨证施治, 而部分药品说明书标注了不宜使用的患者症候, 对于存在忌用或慎用中医症候的患者, 应慎重选择或加强监护。还有部分中药标明具有某种基础疾病的患者应禁用或慎用, 尤其是标有禁用基础疾病的中药, 患有相关基础疾病时应绝对禁用, 慎用的基础病患者使用时, 应加强用药监护, 如脉络舒通颗粒标注具有出血性疾病或凝血机制障碍者慎用, 因其含有水蛭, 具有破血逐瘀、通经活络功效, 会增加出血性疾病或凝血障碍的患者出血风险及程度, 因此对于患有慎用基础疾病的患者应该做到严格把关, 做好用药监护, 以免增加用药风险。

3.3 用量及疗程

现代研究表明, 部分毒性动物饮片的主要毒性成分同为其活性成分, 如斑蝥的毒性成分斑蝥素可导致肝肾毒性, 但斑蝥素作为活性成分又可以治疗肝癌、肺癌等多种顽固性肿瘤^[8], 而中药的说明书用量和给药频次多是用范围表示, 最小剂量和最大剂量相差较大, 若用量较大或使用时间较长, 可能会引起毒性成分在体内蓄积, 因此使用含毒性动物饮片的中药时需监护用量及疗程, 尽量优选最小有效剂量, 且不宜久服, 避免不良反应的发生。含毒性中药材的中药中仅有少部分说明书标注了用药疗程的限制, 部分药品说明书虽未明确用药疗程, 但有不可过量/久服等用量及用药时长的提示, 使用时均应监护患者的用药时长; 对于未标注疗程限制的中药, 尤其是含有毒性中药饮片的中药也应加强用药时长的监护, 以免长期用药

产生毒副作用,如活血止痛胶囊说明书未标注用药疗程限制,但有报道患者服用 21 d 后出现消化道出血的情况^[11]。因此使用含毒性动物饮片的中成药时,应遵循“毒药缓投”和“中病即止”的原则,保证疗效且不增加用药风险。

3.4 药物相互作用

中药因成分复杂、缺乏相关研究数据导致药物相互作用的监护成为用药监护的难点,目前中药之间的不良相互作用主要是指十八反、十九畏、重复用药等情况^[12],例如,通心络胶囊含有水蛭、全蝎、土鳖虫、蜈蚣 4 种毒性动物饮片,该药与含其中任何一种毒性动物饮片的中成药合用都会存在毒性成分叠加的现象,增加毒副作用发生的风险。除了中药之间的相互作用外,还可加强药效之间相互作用的监护,如人参再造丸和中风回春丸均属于理血剂、祛痰剂,具有活血通络、祛风化痰的功效,同时使用会导致活血作用增强,导致出血风险增加。

4 讨论

含毒性动物类中药饮片所含成分较复杂、毒效成分存在一定程度的重叠、作用机制研究尚不明确^[13],使得其饮片和含毒性动物饮片中成药的使用安全性问题频发^[14-16],因此通过梳理含毒性动物饮片的中成药目录及目录内药品的监护要点对临床合理使用此类药品尤为重要。本研究梳理出的药品说明书明确标注的监护要点可在处方前置审核系统进行规则的合理设置,当医师的医嘱违反规则时给予相应的拦截或警示提示信息,特别是患者存在某种基础疾病,或不同医师开具存在相互作用的中药或中成药时,能够通过处方审核系统给予提示,降低患者用药风险。鉴于含毒性动物饮片的中成药品种较多,且部分中成药含有一种或多种毒性动物饮片,临床应用过程中需要对使用此类药品的特殊人群、患有某些基础疾病的患者及用法用量、使用疗程等情况进行药学监护,降低用药风险、避免不良反应的发生。但本研究仅梳理了含毒性动物饮片的中成药及其监护要点,且部分监护要点并非由其所含的毒性动物饮片所引起,下一步将在此基础上继

续挖掘中成药药味与监护要点之间的联系,以期更好地保障中成药安全有效使用。

参考文献

- [1] 李建生,高益民,郝近大.鲜药用动物图谱[M].北京:化学工业出版社,2009:282-295.
- [2] 赵怡楠,刘浩哲,齐玉濮,等.《中华本草》中动物药鲜用特点及临床应用分析[J].中国医院药学杂志,2023,43(7):813-819.
- [3] 王雨,林志健,张冰,等.含毒性动物饮片中成药的合理应用现状分析及警戒思考[J].中华中医药杂志,2021,36(12):7386-7391.
- [4] 张冰,李耀磊,张晓朦,等.基于中成药说明书[禁忌]完善的临床药学服务策略[J].北京中医药大学学报,2022,45(10):990-993.
- [5] 萨日娜,张晓朦,张冰,等.基于中成药说明书[注意事项]完善的临床药学服务策略[J].北京中医药大学学报,2022,45(10):994-998.
- [6] 金锐,王宇光,薛春苗,等.中成药处方点评的标准与尺度探索(八):疗程与用药时长问题[J].中国医院药学杂志,2015,35(22):1979-1985.
- [7] 中国药典 2020 年版.一部[S].2020:445-1902.
- [8] 何天目,张建永,刘流,等.斑蝥致肝、肾毒性研究进展[J].中国现代应用药学,2022,39(24):3310-3315.
- [9] 宋莹,王振,乌凯迪,等.毒药全蝎药理作用研究[J].辽宁中医药大学学报,2020,22(12):216-220.
- [10] 李春晓,王盼盼,李学林,等.2015 年版《中国药典》一部中含毒性饮片成方制剂的归纳与分析[J].中国药房,2018,29(3):337-343.
- [11] 陈楚燕,郑之铭.活血止痛胶囊诱发溃疡致出血 1 例[J].药物流行病学杂志,2008,17(5):294.
- [12] 王宇光,卢云涛,孔令伟,等.社区医院中成药不适宜联用目录清单的建立及用药调研[J].中南药学,2022,20(9):2029-2032.
- [13] 刘佳宁,李遇伯,王玉丽,等.基于配伍相互作用的中药合理用药研究进展及监管思考[J].中草药,2023,54(2):375-385.
- [14] 白宇明,郝近大.常用动物药中药饮片的不良反应分析[J].中国医院药学杂志,2010,30(20):1799-1801.
- [15] 许韩波,张琼,梅全喜.伤科接骨片致阴道出血 1 例[J].中国药房,2010,21(27):2580.
- [16] 盛玉青,张永宁,金惠.风湿马钱片致严重粒细胞缺乏伴发热 1 例[J].中国医院药学杂志,2010,30(9):808.

(收稿日期:2023-10-24;修回日期:2023-11-23)

地佐辛、喷他佐辛用于胃癌根治术患者术后镇痛的药物经济学评价

吴廷庆¹, 肖洋¹, 牛露露¹, 蔡荣达², 吴冬妮¹, 刘滔滔^{1*} (1. 广西医科大学第一附属医院药学部, 南宁 530021; 2. 中山大学附属第一医院广西医院, 南宁 530028)

摘要: **目的** 探讨两种胃癌术后镇痛方案的药物经济学评价。**方法** 回顾性分析 2020 年 10 月—2022 年 9 月在某院胃癌根治手术患者 162 例, 按术后镇痛用药的不同分为 A 组和 B 组, A 组给予地佐辛注射液 (76 例), B 组给予喷他佐辛注射液 (86 例), 统计两组患者的镇痛效果、不良反应、成本等, 运用成本-效果分析法进行分析评价。**结果** 安全性方面, A 组不良反应发生率为 2.63%, B 组不良反应发生率为 4.65%, 差异无统计学意义; 疗效方面, 各时间段 A 组疼痛数字评分 (NRS) 均显著小于 B 组 ($P < 0.05$); A 组累计有效率为 96.09%, B 组累计有效率为 70.55%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。药物经济学方面, A 组总成本为 (969.82±250.76) 元, B 组总成本为 (795.62±108.23) 元, A 组成本-效果比 (C/E) 为 1010.23, B 组 C/E 为 1120.59, 增量成本效果比为 696.80 元, 敏感性分析支持成本效果分析。**结论** 胃癌术后镇痛中地佐辛注射液相对于喷他佐辛注射液具有经济学优势。

关键词: 地佐辛; 喷他佐辛; 胃癌术后镇痛; 镇痛效果; 药物经济学; 成本效果分析

中图分类号: R956

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)07-1924-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.042

Pharmacoeconomic evaluation of postoperative analgesia in patients undergoing radical gastrectomy with dezocine or pentazocine

WU Ting-qing¹, XIAO Yang¹, NIU Lu-lu¹, CAI Rong-da², WU Dong-ni¹, LIU Tao-tao^{1*} (1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021; 2. Guangxi Hospital Division of the First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Nanning 530028)

Abstract: Objective To evaluate the pharmacoeconomics of two postoperative analgesia schemes commonly used in radical surgery for gastric cancer. **Methods** Totally 162 patients with gastric cancer undergoing radical surgery were retrospectively analyzed in a hospital from October 2020 to September 2022. According to the analgesic drugs used, patients were divided into group A and group B. Group A were injected dezocine (76 patients), and group B were injected pentazocine (86 patients). The analgesic effects, adverse reactions and costs of the two groups were analyzed by the cost-effectiveness analysis. **Results** In terms of safety, the incidence of adverse reactions of group A was 2.63%, and that of group B was 4.65%, with no significant difference ($P > 0.05$). As to curative effect, the numerical rating scale of group A was lower than that of group B at each time period ($P < 0.05$). The cumulative effective rates in group A and group B were 96.09% and 70.55%, respectively ($P < 0.05$). In terms of pharmacoeconomics, the total cost of group A was (969.82±250.76) yuan, and that of group B was (795.62±108.23) yuan. The cost-effectiveness ratio (C/E) was 1010.23 for group A, and 1120.59 for group B, and the incremental cost-effectiveness ratio was 696.80 yuan. The sensitivity analysis supported the cost-effectiveness analysis. **Conclusion** Dezocine injection has economic advantages over pentazocine injection in postoperative analgesia for

作者简介: 吴廷庆, 男, 硕士研究生, 主要从事临床药学方面的研究, email: 1010828971@qq.com *通信作者: 刘滔滔, 女, 主任药师, 主要从事群体药物动力学、个体化用药方面的研究, email: liutaotao@gxmu.edu.cn

gastric cancer.

Key words: dezocine; pentazocine; postoperative analgesia for gastric cancer; analgesic effect; pharmacoconomics; cost-effectiveness analysis

我国的胃癌新发及死亡病例数占全球 40% 以上, 死亡率及发病率均位居全球前列^[1]。在目前, 胃恶性肿瘤患者的治疗方式主要有手术、内镜治疗、放疗、药物治疗等^[2]。胃癌根治术是胃癌治疗的重要组成部分, 其可以有效地帮助患者切除整块癌灶, 重建消化道, 从而获得良好的治疗效果。外科手术在有效治疗疾病的同时, 不可避免地会给机体带来创伤, 而术后疼痛不利于患者预后治疗及康复, 是最常见和最棘手的术后问题之一^[3-4]。良好的疼痛管理不仅可以有效减缓患者的痛苦, 有利于患者的术后康复治疗, 还有巨大的社会效益^[5-6]。地佐辛、喷他佐辛均为阿片受体激动-拮抗药, 两种药物广泛用于术后镇痛。目前尚无有关研究从药物经济学角度评价地佐辛和喷他佐辛在胃癌术后镇痛的优劣。本研究通过回顾性病例研究, 阐述了喷他佐辛、地佐辛两种药物在胃癌术后的安全性、疗效、经济性, 为临床用药提供参考。

1 资料与方法

1.1 研究对象

采用单中心回顾性分析的方法, 选取 2020 年 10 月—2022 年 9 月在某院胃癌患者为研究对象。纳入标准: ① 主要诊断为胃癌且手术名称为胃癌根治术; ② 术后使用地佐辛或喷他佐辛镇痛且使用时间至少持续 48 h。排除标准: ① 对镇痛药过敏或有禁忌证的患者; ② 治疗方案仅为放疗或者化疗, 未进行手术的患者; ③ 孕妇或哺乳期妇女; ④ 疼痛评分不完整者; ⑤ 有意识缺陷的患者。资料提取: 在医院信息管理系统 (HIS) 根据患者病历号, 查阅患者资料, 记录患者的性别、年龄、体重、身高、临床诊断、个人史、基础疾病、手术名称、手术起始结束时间、镇痛药物使用剂量及起始结束时间、疼痛评分、手术时长、术中出血量、不良反应、各项费用等。本研究经广西医科大学第一附属医院伦理委员会批准 (No. 2023-E618-01)。

1.2 镇痛方案

根据胃癌术后镇痛药不同分为 A 组和 B 组。A 组: 地佐辛注射液 5 mg (扬子江药业集团有限公司, 规格: 1 mL/5 mg), 静脉推注, 每日 2 次; B 组: 喷他佐辛注射液 30 mg (华润双鹤药业股份有限公司, 规格: 1 mL/30 mg), 静脉滴注或者静脉推注, 每日 2 次。若患者出现爆发性疼痛

无法自行缓解, 则增加给药次数或采取补救治疗措施, 使用盐酸曲马多注射液或盐酸哌替啶注射液等镇痛药进行补救。

1.3 镇痛效果观察与判定标准

所有入组患者麻醉清醒后由护士按照疼痛评估流程, 分别在术后 2 h 及术后 48 h 内每日早上开展疼痛评估, 必要时增加评估次数。采用疼痛数字评分法 (numerical rating scale, NRS) 对各组患者静息状态疼痛进行评估。患者要在 4 种大类别, 共 11 种评分 (0~10) 中选择: 无疼痛 (0)、轻度疼痛 (1~3)、中度疼痛 (4~6)、重度疼痛 (7~10)^[7]。以 NRS 静息评分均在 3 分及以下为有效, 以各时间点累计有效率作为镇痛有效率。

1.4 不良反应

地佐辛、喷他佐辛均为阿片类药物, 主要不良反应包括恶心、瘙痒、呕吐、便秘、头晕、嗜睡、心动过缓、排尿困难、镇静过度、呼吸抑制等^[8]。在术后镇痛期间, 应关注患者状态, 对于镇痛药物导致的不良反应, 应采取对症处理等措施, 若发生症状严重的不良反应, 需停止使用相应的药物。

1.5 成本确定

从医疗保健系统角度, 以成本-效果分析方法进行药物经济学分析。由于患者治疗期间直接非医疗成本、隐性成本、间接成本等难以准确计算, 为避免数据偏差, 本研究以直接医疗成本作为患者疼痛治疗成本。所评价内容为镇痛的成本与效果, 与胃癌根治术无关, 故直接医疗成本仅测算胃癌术后实施镇痛治疗的相关成本, 不包括胃癌根治手术费、麻醉花费等治疗成本。故应计算的成分为: ① 一次性材料费用; ② 药品费, 包括镇痛药地佐辛注射液、喷他佐辛注射液及其溶媒 0.9% 氯化钠注射液费用; ③ 医护人员护理处置费; ④ 不良反应治疗费; ⑤ 因镇痛疗效欠佳而采取补救治疗措施的费用; ⑥ 住院费, 包括床位费和空调费。所有费用均在 HIS 系统查看医嘱, 按明细法计算。

1.6 统计学方法

采用 Excel 对数据进行记录整理, SPSS 23.0 进行统计学分析。计量资料采用均值 ± 标准差进行比较; 两组之间的均数差异比较, 若呈正态分布使用两独立样本的 *t* 检验, 若不呈正态分布使用非参数检验。对计数资料统计占比或发生率差异使用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 患者基本资料

本研究共纳入 162 例患者，其中 A 组 76 例，B 组 86 例，两组患者男女比例、年龄、体重、身高、术中出血量、手术时长等资料详见表 1，其中手术类型构成比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，其余资料差异均无统计学意义。

表 1 患者基本特征

Tab 1 Basic characteristics of patients

项目	A 组	B 组	<i>P</i>
例数	76	86	
男/女	45/31	52/34	0.871
年龄/岁	56.76 ± 11.184	57.53 ± 12.39	0.679
身高/cm	162.34 ± 7.47	160.73 ± 8.88	0.217
体重/kg	58.78 ± 14.79	57.43 ± 10.69	0.877
手术时长/min	316.76 ± 85.16	310.78 ± 78.32	0.669
术中出血量/mL	178.03 ± 267.21	163.60 ± 143.86	0.564
胃癌分期			
I	17	23	0.809
II	22	23	
III	37	40	
手术类型			
腹腔镜	40	69	0.001
机器人辅助	36	17	
住院时间/d	14.28 ± 3.39	14.09 ± 4.44	0.131

表 4 两组术后 NRS 评分基本情况

Tab 4 Basic situation of NRS score after operation in the two groups

分组	术后 2 h		术后 6 ~ 24 h		术后 24 ~ 48 h	
	NRS 评分时间	NRS 评分	NRS 评分时间	NRS 评分	NRS 评分时间	NRS 评分
A 组	2.20 ± 0.85	1.18 ± 0.76	15.00 ± 3.67	1.29 ± 1.03	39.19 ± 4.00	1.09 ± 1.01
B 组	2.27 ± 0.84	1.73 ± 1.18	14.23 ± 3.84	1.73 ± 1.00	38.8 ± 4.96	1.85 ± 1.19
<i>P</i>	0.681	0.010	0.278	0.026	0.125	< 0.001

($P < 0.05$)。两组爆发性疼痛发生情况见表 6，A 组发生爆发性疼痛人次及发生爆发性疼痛累计次数均小于 B 组 ($P < 0.05$)。本研究中，A 组患者有 3 例给予了补救措施：1 例给予氟比洛芬酯，1 例给予盐酸曲马多胶囊，1 例给予盐酸消旋山莨菪碱；B 组患者有 3 例给予了补救措施：1 例给予地佐辛，1 例给予氟比洛芬酯注射液，1 例给予盐酸哌替啶注射液。

表 5 两组累计有效率

Tab 5 Cumulative effective rate in the two groups

分组	例数	有效率/%			累计有效率/%
		术后 2 h	术后 6 ~ 24 h	术后第 24 ~ 48 h	
A 组	76	100.00	98.68	97.37	96.09
B 组	86	91.86	93.02	82.56	70.55
<i>P</i>		0.015	0.122	0.005	< 0.001

2.2 不同手术方式的 NRS 评分

本研究手术包括机器人辅助下胃癌根治术和经腹腔镜胃癌根治术，虽然两组患者手术方式构成比有差异，但同组患者不同手术方式的术后 NRS 评分差异无统计学意义，详见表 2、3。

表 2 A 组不同手术方式 NRS 评分

Tab 2 NRS scores of different surgical methods in group A

手术类型	例数	术后 2 h	术后 6 ~ 24 h	术后 24 ~ 48 h
腹腔镜	40	1.10 ± 1.01	1.45 ± 1.01	1.08 ± 1.02
机器人辅助	36	1.28 ± 0.91	1.11 ± 1.04	1.11 ± 1.00
<i>P</i>		0.399	0.167	0.874

表 3 B 组不同方式手术 NRS 评分

Tab 3 NRS scores of different surgical methods in group B

手术类型	例数	术后 2 h	术后 6 ~ 24 h	术后 24 ~ 48 h
腹腔镜	69	1.80 ± 1.23	1.81 ± 1.06	1.86 ± 1.20
机器人辅助	17	1.47 ± 0.94	1.41 ± 0.62	1.82 ± 1.19
<i>P</i>		0.297	0.255	0.957

2.3 疗效

A 组和 B 组各时间段的 NRS 评分基本情况见表 4。结果表明 A、B 两组患者各 NRS 评分时间的差异均不具有统计学意义；各时间段患者 NRS 评分 A 组均小于 B 组 ($P < 0.05$)。A、B 两组各时间段有效率见表 5，A 组累计有效率为 96.09%，B 组累计有效率为 70.55%，差异有统计学意义

表 6 两组爆发性疼痛累计次数

Tab 6 Number of explosive pains in total in the two groups

分组	例数	发生爆发性疼痛人次	爆发性疼痛累计次数
A 组	76	3	3
B 组	86	25	35
<i>P</i>			< 0.001

2.4 不良反应

在术后镇痛期间，A 组患者 2 例出现腹痛，其中 1 例同时发生呕吐，不良反应发生率为 2.63%；B 组患者出现 2 例腹痛，2 例乏力，其中 1 例同时发生恶心、呕吐、头晕，不良反应发生率为 4.65%；两组患者不良反应发生率的差异无统计学意义。

2.5 成本效果分析

本研究以累计有效率进行成本效果分析。A、B

两组的各项成本见表 7。A 组药品费用为 (742.63 ± 232.33) 元, 总成本为 (969.82 ± 250.76) 元, B 组药品费用为 (601.27 ± 90.53) 元, 总成本为 (795.62 ± 108.23) 元, B 组成本低于 A 组; A 组成本 - 效果比 (C/E) 为 1010.23, B 组 C/E 为 1120.59, 增量成本 - 效果比 (incremental cost-effectiveness ratio, ICER) 为 696.80 元。

表 7 成本效果分析
Tab 7 Cost-effect analysis

项目	A 组	B 组	P
药品药费 / 元	742.63 ± 232.33	601.27 ± 90.53	0.063
医护人员护理处置费 / 元	105.80 ± 9.74	86.92 ± 7.76	< 0.001
材料费用 / 元	1.99 ± 0.81	0.96 ± 0.84	< 0.001
不良反应治疗费用 / 元	9.76 ± 13.82	20.46 ± 33.01	—
补救措施费用 / 元	0.48 ± 3.32	6.26 ± 46.59	0.906
住院费 / 元	86.86 ± 11.83	86.34 ± 10.43	0.618
总成本 (C) / 元	969.82 ± 250.76	795.62 ± 108.23	< 0.001
增量成本 (ΔC) / 元	174.2	—	—
有效率 / (E)	0.96	0.71	—
增量效果 / (ΔE)	0.25	—	—
C/E	1010.23	1120.59	—
ICER	696.80	—	—

2.6 敏感性分析

不确定性存在于药物经济学评价的每个阶段, 敏感性分析是经济学处理不确定性的主要方法, 用以验证相关结果。以药品价格变动 ±10% 或镇痛有效率变动 ±10% 进行敏感度分析。敏感度分析结果与成本效果分析结果一致, 说明成本效果分析结果较为稳健 (见表 8)。

表 8 敏感性分析
Tab 8 Sensitivity analysis

敏感性	类别	A 组	B 组
药品费用降价 10%	降价后成本 C ₁ / 元	895.557	735.493
	C ₁ /E	932.87	1035.91
	ICER	640.26	—
药品费用增加 10%	增加后成本 C ₂ / 元	1044.08	855.75
	C ₂ /E	1087.59	1205.28
	ICER	753.34	—
疗效降低 10%	降低后累计有效率 E ₁	0.86	0.64
	C/E ₁	1122.48	1245.10
	ICER	774.22	—
疗效增加 10%	增加后累计有效率 E ₂	1.06	0.78
	C/E ₂	918.39	1018.78
	ICER	633.45	—

3 讨论

目前手术后镇痛主要采用药物治疗, 常用的镇痛药物有阿片类镇痛药、非甾体抗炎药、局部麻醉药等, 这些药物可通过口服、皮下注射、静

脉注射、患者自控镇痛等方式给予^[9]。地佐辛是阿片受体混合激动 - 拮抗剂, 对 κ 受体完全激动, 对 μ 受体部分激动、部分拮抗, 不产生典型的 μ 受体依赖, 可以松弛胃肠平滑肌, 降低恶心、呕吐的发生率, 对 δ 受体几乎没有活性, 临床上较少产生焦虑、烦躁不安, 且具有镇痛作用强、成瘾性小的特点^[10-11]。其在国内阿片类镇痛药市场占主导地位, 在全国的销售额超过 5.73 亿美元, 广泛应用于术后疼痛管理^[12]。有研究显示, 10 mg 地佐辛的效力相当于 50 mg 哌替啶和 10 mg 吗啡, 这表明它是一种有效的镇痛药物, 可用于治疗围术期疼痛^[13-14]。Zhu 等^[15]的一项初步研究表明地佐辛的镇痛效果与舒芬太尼相似。一项 meta 分析表明在静脉自控镇痛中地佐辛联合氟比洛芬酯与单用舒芬太尼相比, 临床镇痛效果更好, 并可有效降低不良反应发生率^[16]。Feng 等^[14]研究表明地佐辛可提高腹腔镜胃癌根治术患者 Th1/Th2 细胞因子比值, 减轻术后疼痛, 减少不良反应。喷他佐辛主要激动阿片 κ 受体, 较大剂量时可激动 σ 受体, 对 μ 受体部分激动或较弱的拮抗作用, 具有起效快、镇痛作用强、不良反应少且不易上瘾等特点^[17]。有研究表明喷他佐辛联合双氯芬酸比扑热息痛联合双氯芬酸对剖宫产术后镇痛的镇痛效果较好, 但不良反应多^[18]。一项随机对照研究表明剖宫产后镇痛使用喷他佐辛联合双氯芬酸钠比单独使用喷他佐辛更能达到满意的镇痛效果, 且不良反应少, 但费用更高^[19]。另一项随机对照试验研究表明在喷他佐辛在缓解急性胰腺炎患者疼痛方面优于双氯芬酸^[20]。

在真实的临床应用过程中, 不仅要考虑药物的疗效及安全性, 同时也应该考虑药物成本, 以期为患者减少经济负担, 节省资源。然而多篇研究显示, 在术后镇痛方面, 地佐辛联合其他镇痛药不具有经济学优势^[21-24]。目前的研究多集中于联合用药的研究, 单药应用研究仍然比较缺乏。因此, 本研究通过回顾性病例研究, 全面地比较地佐辛、喷他佐辛两种药物在胃癌根治术后镇痛的安全性、疗效及经济性。

本研究数据表明, 在疗效方面, 地佐辛组在术后各时间点 NRS 评分均显著低于喷他佐辛组, 地佐辛组累计有效率为 96.09%, 仅 3.95% 的患者发生爆发性疼痛, 累计发生爆发性疼痛 3 次; 喷他佐辛组累计有效率为 70.55%, 有 29.07% 的患者发生爆发性疼痛, 累计发生爆发性疼痛 35 次, 地佐辛的疗效显著优于喷他佐辛。在安全性方面, 两组安全性相当。但两组不良反应发生率都偏低, 可能低于实际发生率。其可能原因如下: 一是在

本院胃癌术后常规给予抑酸护胃、止吐、通便等治疗,故观察到的不良反应可能较少;二是本研究是回顾性研究,不良反应是根据病案记录统计的,并没有实时观察记录。在成本方面,喷他佐辛组成本明显低于地佐辛组。地佐辛在疗效方面具有优势,而喷他佐辛在成本方面具有优势,因此更需要药物经济学评价。地佐辛组 C/E 为 1010.23,喷他佐辛组 C/E 为 1120.59,地佐辛组 C/E 低于喷他佐辛组,单位效果花费少;ICER 为 696.80 元,用地佐辛镇痛,每增加一个镇痛有效的患者,需要多花费 696.80 元。根据 2020 版药物经济学指南推荐意见:ICER < 人均 GDP,增加的成本完全值得;人均 GDP < ICER < 3 倍人均 GDP,增加的成本可以接受;ICER > 3 倍人均 GDP,增加的成本不值得。本研究 ICER < 我国人均 GDP 85 698 元(2022 年),增加的成本完全值得,地佐辛具有经济学优势。

本研究存在的局限性:本研究是回顾性单中心研究;由于在真实的临床操作中,NRS 评分次数有限,同时 NRS 评分的时间难以保持一致,故本研究中 NRS 评分时间具有一定的区间范围,但两组 NRS 评分时间的差异无统计学意义;本研究只考虑直接医疗成本,未纳入直接非医疗成本、间接成本及隐性成本。因此还有待更多深入的多中心前瞻性研究来验证地佐辛的经济性,为医疗决策部门及临床用药提供依据。

综上所述,安全性方面地佐辛与喷他佐辛相当,地佐辛疗效优于喷他佐辛,但成本高于喷他佐辛,经药物经济学评价,地佐辛相对喷他佐辛具有经济学优势。

参考文献

- [1] 闫超, 陕飞, 李子禹. 2020 年全球胃癌负担分析: 聚焦中国流行现状 [J]. 中国肿瘤, 2023, 32 (3): 161-170.
- [2] JAPANESE GASTRIC CANCER A. Japanese Gastric Cancer Treatment Guidelines 2021 (6th edition) [J]. Gastric Cancer, 2023, 26 (1): 1-25.
- [3] 刘禹含, 张璇, 姜龙, 等. 右美托咪定分别复合芬太尼、舒芬太尼、地佐辛患者自控镇痛效果对比 [J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39 (20): 2077-2080.
- [4] 申乐, 黄宇光. 术后疼痛管理的发展与变革 [J]. 中国科学: 生命科学, 2021, 51 (8): 957-962.
- [5] 余艳丽, 黄秀菊, 陈群, 等. 规范化疼痛管理在腹腔镜胃癌根治术后疼痛控制中的效果观察 [J]. 当代护士 (下旬刊), 2020, 27 (7): 77-78.
- [6] 徐建国. 成人手术后疼痛处理专家共识 [J]. 临床麻醉学杂志, 2017, 33 (9): 911-917.
- [7] 万丽, 赵晴, 陈军, 等. 疼痛评估量表应用的中国专家共识 (2020 版) [J]. 中华疼痛学杂志, 2020, 16 (3): 177-187.
- [8] 覃旺军, 任夏洋, 李然, 等. 癌症疼痛管理药理学专家共识 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2019, 25 (11): 801-807.
- [9] 王安妮, 王然, 冯欣. 布托啡诺注射液用于术后镇痛的快速卫生技术评估 [J]. 中南药学, 2021, 19 (11): 2420-2425.
- [10] 耿立成, 李丽, 冯洁. 地佐辛药理及临床应用新进展 [J]. 医学综述, 2012, 18 (23): 4029-4031.
- [11] 崔敏, 司纪国, 薛明喜. 地佐辛联合帕洛诺司琼降低卡前列素氨丁三醇引起剖宫产产妇不良反应的观察 [J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39 (21): 2193-2197.
- [12] Ye RR, Jiang S, Xu X, et al. Dezocine as a potent analgesic: overview of its pharmacological characterization [J]. Acta Pharmacol Sin, 2022, 43 (7): 1646-1657.
- [13] Strain EC, Preston KL, Liebson IA, et al. Opioid antagonist effects of dezocine in opioid-dependent humans [J]. Clin Pharm Ther, 1996, 60 (2): 206-217.
- [14] Feng M, Feng QL, Chen YJ, et al. Effect of dezocine on the ratio of Th1/Th2 cytokines in patients receiving postoperative analgesia following laparoscopic radical gastrectomy: a prospective randomised study [J]. Drug Des Devel Ther, 2021, 15: 2289-2297.
- [15] Zhu H, Chen YB, Huang SQ, et al. Interaction of analgesic effects of dezocine and sufentanil for relief of postoperative pain: a pilot study [J]. Drug Des Devel Ther, 2020, 14: 4717-4724.
- [16] 陈鹏, 周本宏, 陈富超, 等. 地佐辛联合氟比洛芬酯与单用舒芬太尼在术后静脉自控镇痛中有效性与安全性的 meta 分析 [J]. 中南药学, 2019, 17 (2): 186-191.
- [17] 赵国栋, 孙来宝, 黄文起. 喷他佐辛的药代动力学及药效学研究 [J]. 广东医学, 2010, 31 (10): 1216-1218.
- [18] Garba J, Panti A, Nnadi D, et al. The efficacy of pentazocine + diclofenac versus paracetamol + diclofenac for post-caesarean section analgesia [J]. Niger Postgrad Med J, 2021, 28 (3): 187-192.
- [19] Egede JO. Pentazocine alone versus pentazocine plus diclofenac for pain relief in the first 24 hours after caesarean section: a randomized controlled study [J]. JCDR, 2017, 11 (4): QC01-QC5.
- [20] Mahapatra S, Jain S, Bopanna S, et al. Pentazocine, a Kappa-opioid agonist, is better than diclofenac for analgesia in acute pancreatitis: a randomized controlled trial [J]. AM J Gastroenterol, 2019, 114 (5): 813-821.
- [21] 赵紫楠, 李婷, 李超, 等. 地佐辛注射液的快速卫生技术评估 [J]. 中国合理用药探索, 2020, 17 (7): 14-18.
- [22] 雷伟, 赵路, 李亚丽, 等. 剖宫产术后不同药物镇痛方案的效果评价及成本-效果分析 [J]. 今日药学, 2022, 32 (10): 773-777.
- [23] 梅峥嵘, 杨镔, 谭湘萍, 等. 剖宫产术后两种镇痛方案临床疗效及经济学比较 [J]. 中国药业, 2023, 32 (2): 105-109.
- [24] 李吉, 孙璐莹. 全麻骨科和普外术后患者疼痛护理效果的随访与分析 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19 (58): 77, 354.

(收稿日期: 2023-09-10; 修回日期: 2023-12-05)

基于不同年龄段人群的金莲清热制剂不良反应报告分析

张纾, 林翼旻, 张玲萍, 黄榕珍* (福建省药品审评与监测评价中心, 福州 350003)

摘要: **目的** 探讨不同年龄段人群使用金莲清热制剂的相关安全性风险, 为临床合理用药提供参考。**方法** 结合福建省药品不良反应监测数据库(2004年1月—2023年6月)、国内文献报道及药品监管机构采取的风险管理等资料, 分析不同年龄段人群使用金莲清热制剂的不良反应情况, 分析其可能存在的风险。**结果** 金莲清热制剂药品不良反应主要涉及15岁以下的儿童, 多在用药当日发生, 最突出的是以腹泻为主的胃肠道反应和以皮疹、瘙痒为主的过敏反应。**结论** 金莲清热制剂不良反应一般较轻, 大多数不需要特殊处理, 但需关注儿童用药安全。根据药品安全性评价结果, 国家药品监督管理局已发布对金莲清热制剂药品说明书的修订要求, 药品上市许可持有人按要求修订说明书的同时还应积极开展与医务人员和患者的沟通和宣贯教育, 保障患者用药安全。

关键词: 金莲清热制剂; 不良反应; 合理用药

中图分类号: R283

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)07-1929-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.043

Adverse reactions of Jinlian Qingre preparations in different age groups

ZHANG Shu, LIN Yi-min, ZHANG Ling-ping, HUANG Rong-zhen* (Fujian Center for Drug Evaluation and Monitoring, Fuzhou 350003)

Abstract: Objective To determine the safety risks associated with the use of Jinlian Qingre preparations in different age groups, and to provide reference for rational drug use. **Methods** The adverse drug reactions (ADR) reported in the Fujian ADR monitoring Database (Jan 2004—June 2023), related domestic literature, and precautions taken in China were summarized. The risks of Jinlian Qingre preparations among different age groups were analyzed. **Results** The ADRs of Jinlian Qingre preparations mainly occurred among children under 15 years old, mostly on the first day of medication use, with the most prominent being gastrointestinal reactions (diarrhea) and allergic reactions (rash and itching). **Conclusion** The ADRs of Jinlian Qingre preparations are generally mild, and most do not need special treatment. However, attention should be paid to the children of medication safety. Based on the evaluation, the drug label of Jinlian Qingre preparations has been modified to ensure the safety medication use.

Key words: Jinlian Qingre preparation; adverse drug reaction; drug rational use

金莲清热制剂是根据中医经典名方白虎汤和增液汤加减化裁而来的纯中药复方制剂, 在我国有硬胶囊、颗粒剂、泡腾片等剂型, 其中金莲清热颗粒和金莲清热胶囊属于甲类 OTC 药品。据药品说明书记载, 金莲清热制剂主要成分均为金莲花、大青叶、石膏、知母、地黄、玄参、炒苦杏仁。功能主治为清热解毒、利咽生津、止咳祛痰, 用

于外感热证、感冒热毒壅盛证。症见高热、口渴、咽干、咽痛、咳嗽、痰稠, 亦适用于流行性感、上呼吸道感染有上述证候者。药品不良反应监测工作发现, 15 岁以下儿童不良反应占较高比例。药品说明书是根据小儿周岁以内、1~15 岁、成人等不同年龄段来规定用法用量, 为了解金莲清热制剂在不同年龄段人群用药的安全性风险, 本

作者简介: 张纾, 女, 副主任药师, 主要从事药品审评与不良反应监测评价方面的研究, email: 31677303@qq.com *通信作者: 黄榕珍, 女, 主任药师, 主要从事药品审评与不良反应监测评价方面的研究, email: anding7512@163.com

文对福建省药品不良反应监测数据库、国内外文献报道、采取的风险管理措施等相关资料进行整理与分析，旨在为临床合理用药提供参考。

1 品种基本情况

检索国家药品监督管理局网站，金莲清热制剂有金莲清热颗粒、金莲清热泡腾片和金莲清热胶囊 3 种剂型，4 个批准文号，涉及 2 家生产企业。针对不同剂型和不同年龄段的使用人群，给药方法及用药剂量有所差异，不良反应表现形式也有所不同。

2 药品不良反应监测数据库资料统计

2004 年 1 月—2023 年 6 月，福建省药品不良反应病例报告数据库中共收到金莲清热制剂不良反应/事件报告 172 例，使用 Excel 对数据进行汇总，使用 SPSS 24.0 软件对数据进行处理，率 (%) 的比较采用 χ^2 检验，若理论频数小于 1，则采用 Fisher 确切概率法检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

因福建省药品不良反应病例报告数据库为自发报告系统收集的数据，存在自发报告系统的局限性，如漏报、填写不规范、信息不完善、无法计算不良反应发生率等缺陷，故只能统计监测报告数据的构成比。

2.1 年龄分布

172 例报告中，年龄最小的为 7 个月，最大的为 77 岁；其中 7 岁以下学龄前儿童报告 86 例 (50.0%)，数量最多；8~15 岁人群报告 27 例 (15.7%)；15 岁以上的人群报告 59 例 (34.3%)。

2.2 报告类型分布

各年龄段均以一般报告为主，严重报告 6 例，占比为 3.5%，主要涉及 7 岁以下学龄前儿童和 15 岁以上人群 (见表 1)。

表 1 各年龄报告类型分布 [n (%)]

年龄 / 岁	报告类型		合计
	一般	严重	
≤ 7	84 (48.8)	2 (1.2)	86 (50.0)
8 ~ 15	27 (15.7)	—	27 (15.7)
> 15	55 (32.0)	4 (2.3)	59 (34.3)
合计	166 (96.5)	6 (3.5)	172 (100.0)

2.3 用药情况

172 例患者用药原因中明确用于中医辨证论治的病例仅有 5 例，占 2.9%，而针对呼吸系统炎症的治疗是最常见的用药原因，包括咽喉炎、扁桃体炎、疱疹性咽峡炎、支气管炎、肺炎等，其中大部分病例伴有咽痛、发热、咳嗽、咳痰等。

大部分病例为单独用药，占比 80.8%；联合用药占比 19.2%，主要涉及 7 岁及以下和 15 岁以上年龄段，联合使用的药品主要包括抗感染药、解热镇痛抗炎药、清热解毒等 (见表 2)。

表 2 各年龄段用药情况

年龄 / 岁	联合用药情况 [n (%)]		合计
	无	有	
≤ 7	70 (40.7)	16 (9.3)	86
8 ~ 15	20 (11.6)	7 (4.1)	27
> 15	49 (28.5)	10 (5.8)	59
合计	139 (80.8)	33 (19.2)	172

2.4 不良反应发生时间

不良反应发生时间多集中在用药后 24 h 内，发生时间最快的为首次用药后 5 min，表现为恶心、呕吐；最长的为 5 d，主要为连续用药 5 d 出现皮疹、瘙痒、腹泻等 (见表 3)。

表 3 各年龄不良反应发生时间情况

Tab 3 Time to onset of ADRs in different age groups

年龄 / 岁	0 min < 发生时间 ≤ 30 min	30 min < 发生时间 ≤ 2 h	2 h < 发生时间 ≤ 24 h	1 d < 发生时间 ≤ 5 d	总计
≤ 7	16	17	19	34	86
8 ~ 15	9	4	5	9	27
> 15	12	9	18	20	59
合计 [n (%)]	37 (21.5)	30 (17.4)	42 (24.4)	63 (36.6)	172 (100.0)

2.5 不良反应累及系统 - 器官及表现情况

金莲清热制剂不良反应累及系统 - 器官分类 (以 ICH 监管活动医学词典 MedDRA24.1 为标准术语集) 主要有胃肠道疾病 (78.3%)、皮肤及皮下组织类疾病 (19.2%)、各类神经系统疾病 (2.0%)、各种肌肉骨骼及结缔组织疾病 (0.5%) 等。具体不良反应表现以腹泻、呕吐、恶心、腹胀、各种类型皮疹、瘙痒、头痛、头晕、嗜睡、

腰痛等为主；严重不良反应表现有腹泻、皮疹等。可见金莲清热制剂不良反应最突出的是以腹泻为主的胃肠道反应和以皮疹、瘙痒为主的过敏反应。

7 岁以下学龄前儿童和 8~15 岁年龄段人群主要涉及以腹泻为主的胃肠道反应和以皮疹、瘙痒为主的过敏反应；15 岁以上人群除上述不良反应外，还涉及头痛、头晕、嗜睡等神经系统表现和腰痛等骨骼肌肉表现 (见表 4)。

表 4 不良反应累及系统 - 器官及临床表现

Tab 4 Systems/organs involved in ADRs and their clinical manifestations

累及系统 - 器官损害 / 临床表现	≤ 7 岁 (例次)	8 ~ 15 岁 (例次)	> 15 岁 (例次)	合计 [n (%)]
胃肠道系统疾病	腹泻 (52); 呕吐 (12); 腹痛 (8); 胃肠道反应 (4); 恶心 (3); 腹部不适 (1); 腹胀 (1); 功能性胃肠紊乱 (1)	腹泻 (21); 恶心 (2); 呕吐 (2); 腹痛 (1)	腹泻 (30); 腹痛 (5); 恶心 (5); 呕吐 (4); 胃肠道反应 (4); 腹胀 (1); 反酸 (1); 干呕 (1)	159 (78.3)
皮肤及皮下组织类疾病	皮疹 (6); 瘙痒 (2); 斑丘疹 (1); 急性荨麻疹 (1); 潮红 (1)	皮疹 (3); 瘙痒 (2)	皮疹 (10); 瘙痒 (10); 红斑疹 (1); 丘疹 (1); 眼睑水肿 (1)	39 (19.2)
各类神经系统疾病	—	—	头痛 (2); 头晕 (1); 嗜睡 (1)	4 (2.0)
各种肌肉骨骼及结缔组织疾病	—	—	腰痛 (1)	1 (0.5)
合计	93	31	79	203 (100.0)

2.6 以腹泻为主的胃肠道反应情况

涉及胃肠道系统疾病的报告共 138 例, 占报告总数的 80.2%, 其中腹泻不良反应尤其突出, 占报告总数的 59.9%。腹泻病例主要表现为大便次数增多、排稀糊便、黄色稀便、稀水样便等, 部分病例还伴有腹痛、恶心、呕吐、口干、乏力等伴随症状。

7 岁以下学龄前儿童腹泻主要在用药当日出

现, 也有部分病例在用药一日后出现腹泻; 8 ~ 15 岁主要在用药当日出现腹泻; 15 岁以上人群腹泻出现时间多在用药一日后。

对胃肠道反应和腹泻不良反应在各年龄组中的报告占比和不良反应发生时间分布进行统计, 涉及胃肠道反应和腹泻的报告占各年龄段报告数的比例均偏高; 不良反应主要发生在用药当日 (见表 5)。

表 5 各年龄组胃肠道反应情况

Tab 5 Gastrointestinal reactions in different age groups

不良反应情况	≤ 7 岁	8 ~ 15 岁	> 15 岁	合计	统计量	P
胃肠道反应报告数	76 (88.4)	23 (85.2)	39 (66.1)	138 (80.2)	$\chi^2 = 11.438$	0.003
严重报告数	2 (2.3)	—	1 (1.7)	3 (1.7)	Fisher = 0.481	1.000
胃肠道反应发生时间 (t)						
≤ 2 h	28 (36.8)	12 (52.2)	11 (28.2)	51 (37.0)	$\chi^2 = 3.904$	0.419
2 h < t ≤ 24 h	18 (23.7)	5 (21.7)	12 (30.8)	35 (25.4)		
1 d < t ≤ 5 d	30 (39.5)	6 (26.1)	16 (41.0)	52 (37.7)		
腹泻报告数 [n (%)]	52 (60.5)	21 (77.8)	30 (50.8)	103 (59.9)	$\chi^2 = 5.616$	0.06
腹泻严重报告数	1	—	1	2 (1.2)		
腹泻发生时间 (t)						
≤ 2 h	18 (34.6)	10 (47.6)	7 (23.3)	35 (34.0)	$\chi^2 = 4.263$	0.372
2 h < t ≤ 24 h	11 (21.2)	5 (23.8)	10 (33.3)	26 (25.2)		
1 d < t ≤ 5 d	23 (44.2)	6 (28.6)	13 (43.3)	42 (40.8)		
报告总数	86	27	59	172	/	/

由表 5 可知, 经卡方检验, 胃肠道反应患者的年龄分布差异有统计学意义 ($P = 0.003$), 其中 ≤ 7 岁胃肠道反应占比最高, 为 88.4%, 随年龄增加, 占比降低。

6 例严重病例中有 3 例涉及胃肠道反应, 其中 2 例均在服药当日出现较为严重的腹泻而导致不同程度的脱水住院治疗。

3 文献资料分析

通过检索 2004—2022 年中国知网、PubMed 数据库, 以“金莲清热”“不良反应”“副作用”“致”“引起”等为检索词, 查阅了涉及金莲清热不良反应的报道共 14 篇^[1-14]。

用药目的包括多种原因引起的流行性感、上呼吸道感染等, 症状、体征包括高热、口渴、咽干、咽痛、咳嗽、痰稠等。

大部分病例为单独用药, 也有部分病例联合使用其他药品, 包括抗病毒药、中成药和解热镇痛抗炎药。

文献报道的资料涉及 78 例次不良反应表现, 按照 MedDRA24.1 术语集对不良反应名称及累及系统 - 器官进行规整, 累及系统损害位居前三位的依次是肠胃系统疾病、皮肤及皮下组织类疾病、全身性疾病及给药部位各种反应 (见表 6)。

表 6 文献报道患者不良反应累及系统-器官及临床表现

Tab 6 Systems/organs involved in ADRs and their clinical manifestations of literature report

累及系统-器官损害	不良反应表现(例次)	合计[n(%)]
肠胃系统疾病	腹泻(18)、腹痛(11)、 恶心(11)、呕吐(8)	48(61.5)
皮肤及皮下组织类疾病	皮疹(15)	15(19.2)
全身性疾病及给药部位 各种反应	出汗(8)、局部肿痛(3)	11(14.1)
各类神经系统疾病	头晕(2)、失眠(1)	3(3.8)
精神病类	兴奋(1)	1(1.3)
合计		78(100.0)

总体上看,文献报道的金莲清热制剂不良反应主要累及肠胃系统疾病、皮肤及皮下组织类疾病,且多与国家药品不良反应监测数据库中不良反应一致。

2023年4月,国家药品监督管理局发布了关于修订金莲清热制剂说明书的公告(2023年第39号),要求金莲清热颗粒(胶囊)非处方药和金莲清热泡腾片处方药说明书【不良反应】项应当增加:

监测数据显示,本品可见以下不良反应:恶心、呕吐、腹胀、腹痛、腹部不适、腹泻、大便频率增多、口干、皮疹、瘙痒、潮红、过敏反应等。

4 不同年龄段人群用药风险分析

该药不良反应各年龄层均有涉及,其中15岁以下儿童报告占比高达65.7%,提示应关注儿童用药的安全性。更值得关注的是7岁以下学龄前儿童的报告最多,占比为50.0%,所以学龄前儿童使用该制剂时应更关注不良反应的发生。

各年龄段不良反应发生时间主要集中在用药后24h内,临床用药需关注患者用药当日情况,如有不良反应发生,应及时采取停药或对症治疗等措施,避免不良反应对患者造成伤害。

胃肠道反应在该药的不良反应表现中最为突出,15岁以下儿童尤其是7岁以下学龄前儿童的报告占比高于15岁以上组,出现腹泻的比例也高于15岁以上人群,用药后2h发生不良反应的比例也明显高于15岁以上人群,提示儿童尤其是学龄前儿童使用该药时较15岁以上人群更容易发生胃肠道反应,也可能更容易出现脱水现象,可能与小儿胃肠道较为娇嫩、易受激惹有关,故应引起关注。

15岁以下儿童不良反应报告占比较高的原因可能有以下几方面:

①该药在儿科用量较大。医师常用该药治疗流行性感、上呼吸道感染等病,可能导致金莲

清热制剂不良反应/事件报告较多。

②未严格按照中医辨证施治原则用药。中成药使用讲究体质和辨证,中成药说明书均以中医辨证理论的功能主治来指导用药。中成药多由西医使用,西医对中医辨证论治理论和实践可能认识不足,未能辨证施治,甚至违背其功能主治,从而导致疗效不佳、病情加重或出现不良反应等后果,必须引起临床足够的重视。特别是金莲清热颗粒和金莲清热胶囊属甲类OTC药品,不需要严格按照医师的处方即可购买,可能存在患者因缺乏专业知识,对体质把握不准,辨证不当等不合理用药出现药品不良反应/事件的风险。该制剂处方组成包括石膏、知母等苦寒之品,易败胃伤阳引起腹泻等不良反应;而儿童本身脾胃功能虚弱,可能更易发生腹泻。

③儿童对药物的敏感性高。儿童处于生长发育的旺盛时期,由于儿童免疫功能低下,肝肾功能、神经系统等发育不全,对药物敏感性较高,对药物毒性的反应较成人更为敏感,所以更易发生不良反应,在治疗过程中须给予更多的关注^[15]。

④儿童用药情况复杂。药品说明书中儿童用药信息匮乏或提示不足,导致儿科临床用药选择困难;与成人患者相比,儿童用药剂量需根据患儿体重、体表面积或年龄计算,增加了临床各环节差错发生的风险^[16]。

⑤联合用药的影响。联用了功能主治相同或也可造成腹泻等不良反应的药品,如内科清热剂、抗菌药物等。

15岁以下儿童使用该药注意事项:

①根据患儿体质和中医辨证施治原则合理用药;②根据年龄、体重选择相应的剂量,或遵医嘱服用;③用药过程中加强不良反应的监测,特别是低龄儿童更应关注严重腹泻引起脱水等风险;④注意联合用药的影响,避免因联合使用同类型药物或可引起类似不良反应的药物而加重不良反应的发生。

5 对该药上市后风险监控的思考及建议

药品说明书是医师、药师和患者了解、使用药品的科学依据,对指导临床安全合理用药具有重要作用。尤其是非处方药说明书,更是消费者合理用药的保障和规避药品不良反应的重要策略。

国家药品监督管理局已发布了关于修订金莲清热制剂说明书的公告,建议持有人及时主动修订完善中成药说明书相关安全性信息,特别要加强对非处方中成药说明书安全性内容的重视程度,并积极与医护人员、患者开展沟通和宣贯教

育, 提高其对药品不良反应及相关应对措施的关注和认知, 使得药品说明书能真正起到指导安全合理用药的作用, 有效规避可能存在的风险, 切实提升中成药说明书的用药指导效果。

临床也应及时关注已发布的说明书修订公告中更新的安全性信息, 加强儿童患者用药监护, 根据中医辨证、用药人群、患者病情、体质、机体条件合理用药。金莲清热制剂为清热解毒中成药。虽然金莲清热制剂的功能主治是用于外感热证、感冒热毒壅盛证, 但从中医理论角度看, 发热并不等于热毒壅盛证, 所以建议伴有明显口干、咽喉肿痛且明确为热毒壅盛证的感冒或以咽喉肿痛为主症同属于热毒壅盛证的其他疾病才适用, 如有受凉史等其他情况的小儿呼吸道感染, 小儿反复感冒等情况, 不建议使用。同时关注联合用药的影响, 该制剂含有小毒成分苦杏仁, 不建议与其他含有毒性成分的中成药联用, 尤其是儿童用药时, 应加强不良反应监测, 以降低对患者造成的伤害。此外, 也应进一步加强药事管理, 加大药学处方审核力度, 单纯的感冒或上呼吸道感染, 药师也须研判能否作为使用金莲清热制剂的适应证。

患者在使用非处方中成药自我药疗时, 要仔细阅读说明书, 充分了解药品功能主治、用法用量、注意事项、禁忌、药物相互作用等, 儿童尽可能在医务人员和药师的专业指导下使用非处方药, 要谨慎对待联合用药的安全性问题, 一旦出现不良反应, 立即停药并前往医院就诊。

参考文献

[1] 杨志. 小儿发热行布洛芬混悬液治疗的效果与安全性分析[J]. 中外医学研究, 2015, 13(21): 116-117.
 [2] 吴涛, 王润芝. 金莲清热泡腾片致幼儿中枢神经兴奋、

失眠 1 例[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(14): 1830.
 [3] 于祥, 董春阳. 金莲清热泡腾片治疗小儿疱疹性口腔炎 61 例疗效观察[J]. 中国中西医结合儿科学, 2012, 4(3): 241-242.
 [4] 陈草明, 张定芬. 金莲清热泡腾片治疗儿童急性上呼吸道感染 120 例临床观察[J]. 现代医院, 2013, 13(11): 54-55.
 [5] 高洁, 高以红, 李静波. 金莲清热泡腾片联合伐昔洛韦分散片治疗成人水痘疗效观察[J]. 实用中西医结合临床, 2017, 17(8): 16-17.
 [6] 万珍, 雷劲沛. 金莲清热泡腾片口服治疗成人急性上呼吸道感染的临床观察[J]. 实用中西医结合临床, 2014, 14(5): 42-43.
 [7] 刘沧海, 肖汇琼. 布洛芬混悬液治疗小儿发热的效果及安全性分析[J]. 中国当代医药, 2018, 25(10): 121-123.
 [8] 郭维娟. 金莲清热泡腾片雾化吸入治疗慢性咽炎效果观察[J]. 临床合理用药杂志, 2017, 10(13): 70-71.
 [9] 蓝英. 金莲清热泡腾片治疗小儿流感的临床观察[J]. 自我保健, 2021(22): 143-145.
 [10] 孙小鸿, 陆琴花. 金莲清热泡腾片治疗小儿手足口病疗效观察[J]. 医学理论与实践, 2014, 27(20): 2756-2757.
 [11] 蒋淑红, 石学风. 布洛芬混悬液治疗小儿发热的疗效和安全性研究[J]. 母婴世界, 2018(22): 100.
 [12] 李晓冬. 布洛芬混悬液治疗小儿发热的临床效果[J]. 中国医药指南, 2020, 18(27): 37-38.
 [13] 赵秀梅, 米海娟, 高艳. 金莲清热泡腾片雾化吸入治疗慢性咽炎的临床观察[J]. 贵阳中医学院学报, 2013, 35(5): 222-224.
 [14] 尹利红. 小儿发热行布洛芬混悬液治疗的效果与安全性[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(99): 242-244.
 [15] 徐喆, 鞠萍, 罗琪, 等. 930 例儿童抗菌药物不良反应分析[J]. 中国药物警戒, 2022, 19(3): 317-321.
 [16] 蒋志平, 彭骞, 何莉梅, 等. 儿科药品知识库和合理用药规则库的建立与探讨[J]. 中南药学, 2020, 18(6): 1076-1080.

(收稿日期: 2023-11-02; 修回日期: 2023-12-20)

《国家基本药物目录》(2012 年版和 2018 年版) 与《世界卫生组织基本药物标准清单》(2023 版) 中眼科用药的比较和分析

刘博¹, 宋钦¹, 王雪², 张亚同^{3*} (1.北京小汤山医院药剂科, 北京 102211; 2.首都医科大学宣武医院 医学信息研究室/图书馆, 北京 100053; 3.北京医院药学部, 国家老年医学中心, 中国医学科学院老年医学研究所, 药物临床风险与个体化应用评价北京市重点实验室, 北京 100730)

摘要: **目的** 为我国《国家基本药物目录》中的眼科用药提供改进建议。**方法** 采用描述性分析方法, 将《国家基本药物目录》(2012 年版和 2018 年版) 与《世界卫生组织基本药物标准清单》(2023 版) 中眼科用药部分进行对比, 重点比较药品种类、剂型、规格和备注等方面的差异。**结果** 与 2012 年版相比, 2018 年版的《国家基本药物目录》在西药和中药方面都有药物的增减和调整。《国家基本药物目录》(2018 年版) 与《世界卫生组织基本药物标准清单》(2023 版) 在药品分类、剂型和规格等方面存在差异。《世界卫生组织基本药物标准清单》(2023 版) 提供了详细的药物功能介绍和补充说明, 以及可替代方案(药物)。**结论** 《国家基本药物目录》(2018 年版) 根据我国眼科疾病的特点和需求进行了调整, 但仍有改进的空间。借鉴《世界卫生组织基本药物标准清单》(2023 版) 的分类方法、制定替代药物清单, 完善备注和适应证, 可以更好地为不同级别医疗机构提供指导, 提高眼科用药的安全性和适用性。

关键词: 国家基本药物目录; 世界卫生组织基本药物标准清单; 眼科用药; 药物分类; 比较分析
中图分类号: R95 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)07-1934-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.044

Ophthalmic medications in *List of National Essential Medicines (Version 2012 and 2018)* and *WHO Model List of Essential Medicines (Version 2023)*

LIU Bo¹, SONG Qin¹, WANG Xue², ZHANG Ya-tong^{3*} (1. *Department of Pharmacy, Beijing Xiaotangshan Hospital, Beijing 102211*; 2. *Medical Information Research Lab/Medical Library, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053*; 3. *Department of Pharmaceutical Science, Beijing Hospital, National Center of Gerontology, Institute of Geriatric Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing Key Laboratory of Drug Clinical Risks and Personalized Medication Evaluation, Beijing 100730*)

Abstract: Objective To provide recommendations for the improvement of the *National Essential Medicines List (NEML)* for ophthalmic drugs. **Methods** Descriptive analysis was used to compare the *National Essential Medicines List (Version 2012 and 2018, NEML-2012 and NEML-2018)* with the *World Health Organization Model List of Essential Medicines (Version 2023, WHO-EML-2023)*, focusing on the differences in drug types, dosage forms, specifications and notations of ophthalmic drugs. **Results** Compared with NEML-2012, NEML-2018 witnessed additions, removals, and adjustments in both western medicine and traditional Chinese medicine. Furthermore, disparities in drug classification, formulations, and specifications were observed between NEML-2018 and WHO-EML-2023, which provided detailed descriptions of the functions of the medicines and supplementary descriptions, as well as alternative solution. **Conclusion** NEML-2018 has been revised to cater to the characteristics and requirements of ophthalmic diseases in China. However, there is still room for improvement. Adopting the classification of WHO-EML-2023, developing a list of alternative

基金项目: 国家重点研发计划 (No.2020YFC2009000; No.2020YFC2009001); 北京小汤山医院扶持项目 (No. 汤 2023-12)。

作者简介: 刘博, 女, 主管药师, 主要从事临床药学和神经药理学研究, email: liubo_0511@163.com ***通信作者:** 张亚同, 男, 主任药师, 主要从事临床药学、药理学管理研究, email: zyt2002888@foxmail.com

medicines, and improving remarks and indications provides guidance to different levels of healthcare institutions and helps improve the safety and applicability of ophthalmic medicines.

Key words: *National Essential Medicines List; World Health Organization Model List of Essential Medicines; ophthalmic medication; drug classification; comparative analysis*

眼睛是人体中的重要器官，其精细结构容易受损。随着视频终端的广泛使用，眼科疾病的发病率不断上升^[1]。世界卫生组织（World Health Organization, WHO）统计显示，全球有超过 50 亿人患有眼科疾病^[2]，波及各年龄段，严重影响人民的身心健康和^[3]。眼科疾病包括眼部感染、青光眼、眼干燥症、黄斑变性和眼表过敏等 500 余种^[4]，药物在眼病的预防、诊断和治疗中发挥着关键作用。然而，由于发病因素多样，眼科用药也呈多元化^[5]。

1975 年，WHO 提出了“基本药物清单（WHO Model List of Essential Medicines, WHO-EML）”概念，清单中药物包括全球所需的关键药物，能够保障临床疗效，适应基本医疗卫生需求，具有成本-效果优势，由国家负责遴选并公平获得^[6]，并且每两年更新一次^[7]。全球超过 160 个中、低收入国家参照此清单，制定本国的基本药物清单^[8]。最新的 WHO-EML 版本为 2023 年 7 月发布的第 23 版，即 *World Health Organization Model List of Essential Medicines (Version 2023)* (WHO-EML-2023)。《国家基本药物目录》（*National Essential Medicines List, NEML*）由国家卫生健康委员会组织专家筛选制定，是我国医疗机构药品采购和使用的依据^[9]。自 1982 年首次发布以来，已更新 8 次^[10]。《国家基本药物目录》2018 年版（NEML-2018）是目前最新版本，对药物种类、剂型和规格进行了完善，包括了更多的药物品种，增幅达到 31.73%^[11]。

本文分析了 WHO-EML-2023 和 NEML-2018 中涉及眼科用药的种类、剂型和规格差异，为我国基本药物目录的完善和修订提供参考。

1 材料

国家卫生健康委员会发布的《国家基本药物目录》2012 年版（NEML-2012）和 NEML-2018，WHO 发布的 WHO-EML-2023。

2 方法与结果

采用描述性分析方法，对 NEML-2012 和 NEML-2018 进行比较，同时对 NEML-2018 和 WHO-EML-2023 中眼科用药的分类、品种、剂型、规格、适应证等内容进行差异性分析。

2.1 NEML-2012 和 NEML-2018 增减情况

NEML-2018 相较于 NEML-2012 增加了复方

托吡卡胺与康柏西普注射液两种药物。具体剂型和规格情况见表 1。NEML-2018 对药物使用提出了更严格的要求，在备注中标注“△”号表示药品应在具备相应处方资质的医师或在专科医师指导下使用，并加强使用监测和评价。

表 1 NEML-2012 和 NEML-2018 西药比较

Tab 1 Western medicines between NEML-2012 and NEML-2018

比较结果	品种名称	剂型 / 规格
共有	抗感染药物	
	氯霉素	滴眼剂：8 mL/20 mg
	左氧氟沙星	滴眼剂：0.3% (5 mL、8 mL)
	红霉素	眼膏剂：0.5%
	阿昔洛韦	滴眼剂：8 mL/8 mg
	利福平	滴眼剂：10 mL/5 mg、10 mL/10 mg
	青光眼用药	
	毛果芸香碱	注射液：1 mL/2 mg 滴眼剂
	噻吗洛尔	滴眼剂：5 mL/12.5 mg、5 mL/25 mg
	乙酰唑胺	片剂：0.25 g
	其他	
	阿托品	眼膏剂：1%
	可的松	眼膏剂：0.25%、0.5%、1%；滴眼剂：3 mL/15 mg
	NEML-2018 新增	其他
复方托吡卡胺		滴眼剂：1 mL (托吡卡胺 5 mg, 盐酸去氧肾上腺素 5 mg)、5 mL (托吡卡胺 25 mg, 盐酸去氧肾上腺素 25 mg)
康柏西普		注射液：10 mg · mL ⁻¹ , 0.2 mL/支

NEML 眼科中药部分分为清热剂和扶正剂。NEML-2018 相较于 NEML-2012 删减了用于清热散风的明目蒺藜丸，同时增加了用于补肝明目的石斛夜光丸及具有养肝明目功能的和血明目片。具体剂型和规格情况见表 2。

2.2 NEML-2018 和 WHO-EML-2023 比较情况

在抗感染药物、青光眼用药和其他分类中，NEML-2018 和 WHO-EML-2023 有相同种类药物。具体包括：3 种抗感染药物，3 种治疗青光眼的药物，以及 1 种其他类别的药物（见表 3）。尽管它们有相同的药物，但推荐剂型却不同，例如阿昔洛韦，NEML-2018 推荐了滴眼剂（8 mL/8 mg），而 WHO-EML-2023 则推荐了眼膏（3%）。与 WHO-EML-2023 相比，NEML-2018 具有 5 种独特的药物，包括 2 种抗感染药物和 3 种其他类别的药物。

相对于 NEML-2018，WHO-EML-2023 包含了 5 类独特的药物，包括 1 种抗炎药物、1 种局

表 2 NEML-2012 与 NEML-2018 中药比较

Tab 2 Traditional Chinese medicines between NEML-2012 and NEML-2018

比较结果	功能	药品名称	剂型 / 规格
共有	清热剂 清热散风	明目上清丸(片)	丸剂: 每袋(瓶)装 9 g 片剂: 素片每片重 0.6 g, 薄膜衣片每片重 0.63 g
		泻火明目 黄连羊肝丸 珍珠明目滴眼剂	丸剂: 每丸重 9 g, 每 20 丸重 1 g, 每 100 丸重 20 g 滴眼剂: 每支装 8 mL、10 mL、12 mL、15 mL
	扶正剂 滋阴养肝	明目地黄丸	丸剂: 每丸重 9 g, 每袋装 6 g、9 g, 每 8 丸相当于原生药 3 g
		障眼明片(胶囊)	片剂: 糖衣片片芯重 0.21 g, 薄膜衣片每片重 0.21 g、0.42 g 胶囊: 每粒装 0.25 g、0.4 g
	益气养阴 复方血栓通胶囊(片)	胶囊: 每粒装 0.5 g; 片剂: 每片重 0.35 g、0.4 g	
NEML-2018 删减	清热散风	明目蒺藜丸	丸剂: 每 20 粒重 1 g
NEML-2018 新增	补肝明目	石斛夜光丸	丸剂: 每丸重 5.5 g、9 g, 每瓶装 60 g, 每袋装 6 g、7.3 g, 每 100 粒重 10 g
	和血明目	和血明目片	片剂: 片芯重 0.3 g, 薄膜衣片每片重 0.31 g

部麻醉药、1 种散瞳剂、1 种抗血管内皮生长因子制剂和 2 种诊断试剂(见表 3)。此外, WHO-EML-2023 还提供了详细的药物功能介绍和补充说明, 以及可替代方案(药物)。例如, 它指出丁卡因不适用于早产儿, 那他霉素适用于治疗真菌性角膜炎, 托吡卡胺可被阿托品和环戊烯酸替代。此外, WHO-EML-2023 还提供了备注信息, 对药物功能和可替代的药物进行了详细说明。NEML-2018 未提及眼科用药适应证, WHO-EML-2023 对部分药品在备注部分提出适应证。

3 讨论

WHO-EML 要求药物根据公共卫生现状的需要而选定, 具有良好的临床效果, 成本效益明显^[6], WHO 于 1977 年正式发布了第 1 版 WHO-EML^[12]。从 2002 年起, 更新工作逐渐引入了循证医学的理念和方法, 使其更加科学和透明^[9]。NEML 是由国家卫生健康委员会组织专家筛选并制定的药物清单, 由国家基本药物委员会审核通过, 作为医疗机构药品采购和使用的依据^[11]。自 1982 年首次发布《国家基本药物目录(西药部分)》以来, 已经进行了 8 次更新, 包括 2009 年颁布的相关管理办法和《国家基本药物目录基层部分》(2009 年版)^[13]。NEML-2018 版本对药物种类、剂型和规格进行了完善, 以更好地满足临床用药需求^[14]。相对于 NEML-2012, NEML-2018 包含更多的药物品种, 新增了 165 种, 总计 685 种药物, 增幅达到 31.73%, 涵盖了 1110 种剂型和 1810 种规格, 其中包括了 417 种化学药品和 268 种中成药^[15]。

3.1 NEML-2018 与 NEML-2012 眼科用药的变化情况

NEML-2018 相对于 NEML-2012 新增了复方托吡卡胺滴眼剂和康柏西普眼内注射液。复方托吡卡胺滴眼剂结合了托吡卡胺和盐酸去氧肾上腺素, 用于散瞳和调节麻痹, 托吡卡胺为抗胆碱药, 而盐酸去氧肾上腺素则是交感神经兴奋药, 可扩张瞳孔并增强调节麻痹作用^[16]。研究表明, 康柏

西普眼内注射液对治疗黄斑水肿和提高患者视力效果显著, 特别在视网膜中央静脉阻塞黄斑囊样水肿的治疗中安全有效^[17]。

中医学认为, 不同眼科疾病需要不同的治疗方法^[18]。结膜炎的治疗注重清热养血、祛风止痒, 因为可能与肺卫不固、风邪袭表, 或肝胆虚热、心脾积热, 或血虚风动等因素有关^[19]。眼干燥症的治疗主要以养肝滋肾、清热明目为主, 因为常伴随肝肾阴虚或虚火上炎, 导致泪液分泌不足^[20]。而睑缘炎的治疗注重清热除湿、祛风止痒^[19]。因此, NEML-2018 收录了具有清热、散风、泻火、明目、滋阴、养肝、益气等特性的药物, 以满足不同疾病的需求。

NEML-2018 删除了 NEML-2012 中的明目蒺藜丸, 这是一种用于清热散风、明目退翳的药物, 主要用于眼干燥症、病毒性结膜炎和流行性角结膜炎的治疗^[21]。然而, 药物的药效成分和安全性仍需要进一步研究^[22]。NEML-2018 加入了石斛夜光丸, 其具有清肝明目的功效, 可改善眼干燥症患者的症状, 如眼干涩、畏光、眼疲劳。此外, 研究表明, 重组人表皮生长因子滴眼剂与石斛夜光丸可以增加泪液分泌, 改善眼干燥症症状, 降低炎症反应^[19, 23]。和血明目片全方以和血明目为特点, 可促进眼底出血吸收, 恢复视力, 又可预防新生血管的形成, 减少眼底反复出血的发生^[24]。

3.2 NEML-2018 与 WHO-EML-2023 眼科用药比较情况

NEML-2018 与 WHO-EML-2023 中共同收录的药物在剂型上存在一些差异。例如, 阿昔洛韦在 NEML-2018 中以滴眼剂(8 mL/8 mg)的形式推荐, 而 WHO-EML-2023 推荐眼膏(3%)。毛果芸香碱在 NEML-2018 中推荐注射液(1 mL/2 mg)和滴眼剂, 而 WHO-EML-2023 仅推荐滴眼剂。阿托品在 NEML-2018 中以眼膏剂(1%)的形式推荐, 而 WHO-EML-2023 推荐滴眼剂。这些差异可能与不同国家或地区的药品使用方式和偏好有关。尽

表 3 NEML-2018 和 WHO-EML-2023 比较
Tab 3 NEML-2018 and WHO-EML-2023

药物种类	品种名称	NEML-2018 剂型 / 规格	WHO-EML-2023	
			剂型 / 规格	备注信息
抗感染 药物	左氧氟沙星	滴眼剂: 0.3% (5 mL、8 mL)	溶液 (滴眼剂): 0.3%	氧氟沙星可用诺氟沙星、环丙沙星、洛美沙星、左氧氟沙星、加替沙星、莫西沙星、贝西沙星、托氟沙星代替, 主要治疗细菌性角膜炎和细菌性结膜炎
	红霉素	眼膏剂: 0.5%	眼膏: 0.5%	治疗沙眼衣原体或淋病奈瑟菌引起的感染
	阿昔洛韦	滴眼剂: 8 mL/8 mg	眼膏: 3%	—
	阿奇霉素	—	溶液 (眼药水) 滴眼剂: 1.5% (沙眼)	治疗沙眼
	庆大霉素	—	溶液 (滴眼剂): 0.3% (硫酸盐)	庆大霉素可用阿米卡星、卡那霉素 - 奈替米星、妥布霉素代替, 用于治疗细菌性眼膜炎或细菌性结膜炎
	那他霉素	—	悬浮液 (眼药水): 5%	治疗真菌性角膜炎
	四环素	—	眼膏: 1% (盐酸)	四环素可用金霉素和土霉素代替, 治疗细菌性眼膜炎、细菌性结膜炎、细菌性角膜炎和沙眼
	氯霉素	滴眼剂: 8 mL/20 mg	—	—
	利福平	滴眼剂: 10 mL/5 mg、10 mL/10 mg	—	—
	青光眼 用药	毛果芸香碱	注射液: 1 mL/2 mg	溶液 (滴眼剂): 2%; 4% (盐酸盐或硝酸盐)
噻吗洛尔		滴眼剂: 5 mL/12.5 mg、5 mL/25 mg	溶液 (滴眼剂): 0.25%; 0.5% (马来酸)	噻吗洛尔可用倍他洛尔、左布诺洛尔、美托洛尔、卡替洛尔、苯呋洛尔代替
乙酰唑胺		片剂: 0.25 g	片剂: 250 mg	—
拉坦前列素		—	溶液 (滴眼剂): 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	—
抗炎 药物 局部麻 醉药 散瞳剂	泼尼松龙	—	溶液 (滴眼剂): 0.5% (磷酸钠)	待审查的治疗替代方案 (2023 年)
	丁卡因	—	溶液 (滴眼剂): 0.5% (盐酸)	不适用于早产儿, 丁卡因可用奥布卡因、丙美卡因、普鲁卡因、利多卡因代替
	肾上腺素	—	溶液 (滴眼剂): 2% (盐酸盐)	补充清单
抗血管内皮 生长因子 制剂	贝伐珠单抗	—	注射: 25 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	补充清单, 包括质量保证的生物仿制药
诊断试剂	荧光素	—	眼药水: 1% (钠盐)	适用于诊断性眼底和虹膜血管的荧光素血管造影检查
	托吡卡胺	—	眼药水: 0.5%	用于散瞳及检查眼底、屈光度, 托吡卡胺可用阿托品和环戊烯酸代替
其他	阿托品	眼膏剂: 1%	溶液 (滴眼剂): 0.1%; 0.5%; 1% (硫酸盐)	阿托品可用盐酸环戊酯和氢溴酸后马托品代替
	可的松	眼膏剂: 0.25%、0.5%、1%; 滴眼剂: 3 mL/15 mg	—	—
	复方托吡 卡胺	滴眼剂: 1 mL (托吡卡胺 5 mg, 盐酸去氧肾上腺素 5 mg)、5 mL (托吡卡胺 25 mg, 盐酸去氧肾上腺素 25 mg)	—	—
	康柏西普	注射液: 10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 0.2 mL/支	—	—

管这些药物在作用和效果上是等效的, 但在实际应用中, 剂型和规格的选择可能因地区和医疗实践的不同而有所不同。

NEML-2018 相较于 WHO-EML-2023 包含了 5 个独特的药物, 包括抗感染药物氯霉素和利福平, 以及可的松、复方托吡卡胺和康柏西普。氯霉素和利福平常用于治疗眼部感染, 如沙眼、结膜炎和角膜炎。可的松常用于治疗过敏性结膜炎, 而复方托吡卡胺用于散瞳和屈光检查。康柏西普是一种我国自主研发的抗血管内皮生长因子药物, 已被批准用

于治疗糖尿病黄斑水肿。多项临床研究和真实世界数据显示, 康柏西普治疗糖尿病黄斑水肿可显著改善中央视网膜厚度和最佳矫正视力, 且优于激光治疗^[25-26]。然而, 在 NEML-2018 中, 可的松、复方托吡卡胺和康柏西普这几种药物被归类为“其他”类别, 这可能会在临床应用中引起一定的困惑。

WHO-EML-2023 相对于 NEML-2018 增加了一系列药物, 包括抗感染药物 (如阿奇霉素、庆大霉素、那他霉素和四环素), 抗青光眼药物 (拉坦前列素), 抗炎药物 (泼尼松龙), 局部麻醉药 (丁

卡因), 散瞳剂(肾上腺素), 抗血管内皮生长因子制剂(贝伐珠单抗)以及诊断试剂(如荧光素和托吡卡胺)。这些药物的增加主要是基于其在不同眼科疾病治疗中的有效性和安全性。

以阿奇霉素滴眼剂为例, 它已被美国食品药品监督管理局批准用于细菌性结膜炎的治疗^[27]。庆大霉素对眼部常见的革兰氏阴性菌有抗菌作用, 而崔永鑫^[28]的研究表明, 庆大霉素、复方氨基比林和地塞米松的联合使用可以迅速治愈红眼病患者, 并获得高度满意的疗效。那他霉素在体外显示出对多种酵母菌和真菌的抗菌作用, 而陈华桥^[29]的研究结果显示, 那他霉素滴眼剂对治疗真菌性角膜炎患者具有理想的临床效果, 可改善患者视力。泼尼松龙通过其抗炎作用治疗眼科疾病引起的炎性反应, 而丁卡因作为局部麻醉药主要用于眼科和相关手术, 具有良好的麻醉效果。拉坦前列素能够降低开角型青光眼和高眼压症患者的眼压^[30]。

综上, NEML-2018 根据我国眼科疾病的特点和需求进行了调整, 但仍有改进的空间。可借鉴 WHO-EML-2023 中眼科用药的分类方法, 制定替代药物清单和禁忌证, 提供更有逻辑性和可操作性的使用指南, 帮助临床医师或药师在复杂的临床实践中作出决策, 更好地服务医疗卫生机构, 提高眼科用药的适用性。

参考文献

- [1] 郭姗姗, 姜睿琦, 李草, 等. 眼科用药研究现状与热点文献计量分析[J]. 临床药物治疗杂志, 2022, 20(9): 18-23.
- [2] 王晓杰, 惠琦, 金子, 等. 细胞因子类药物在眼科临床的应用进展[J]. 浙江大学学报(医学版), 2022, 51(5): 626-633.
- [3] 李光耀, 王宁利, 张玉, 等. 《中国眼科药物说明书外使用临床实践指南》解读[J]. 临床药物治疗杂志, 2022, 20(9): 28-36.
- [4] 王兴, 马一平. 眼科医院药品临床综合评价标准的研究[J]. 药品评价, 2022, 19(16): 961-964.
- [5] 刘健彤, 刘颖, 于鸿杰. 合理用药指导对提高眼科用药精准性的促进作用[J]. 中国保健营养, 2020, 30(28): 313.
- [6] WHO. Selection of essential medicines at country level[EB/OL]. (2020-02-12) [2023-10-02]. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241515443>.
- [7] WHO. The selection of essential drugs [EB/OL]. (1977-10-21) [2023-10-02]. <https://www.who.int/publications/i/item/9241206411>.
- [8] 唐筱婉, 唐彦, 左玮, 等. 我国和 WHO 基本药物目录中治疗 2 型糖尿病药物比较分析[J]. 中国药师, 2019, 22(6): 1099-1102.
- [9] 张宏, 孙木红, 冷萍, 等. 2018 年版《国家基本药物目录》抗菌药物增删品规分析[J]. 中国药业, 2021, 30(4): 10-13.
- [10] 左玮, 孙雯娟, 唐筱婉, 等. WHO 和我国基本药物目录中神经系统用药收录情况的比较研究[J]. 中国药房, 2020, 31(4): 397-401.
- [11] 王慧玲, 张涛志, 尹续续, 等. WHO 儿童基本药物目录与国家基本药物目录中的抗癫痫药对比分析[J]. 中国药房, 2020, 31(20): 2452-2457.
- [12] 周艳琴, 王静宇, 郑春茂, 等. 基于 WHO 基本药物标准清单(21 版)分析本院抗菌药物品种配备合理性[J]. 中南药学, 2021, 19(9): 1947-1951.
- [13] 唐婧, 唐蕾, 刘岸, 等. 《国家基本药物目录》(2018 年版)与《WHO 基本药物标准清单》(2019)中肿瘤靶向药物对比[J]. 中国药师, 2020, 23(5): 931-934.
- [14] Purgato M, Barbu C. What is the WHO essential medicines list? [J]. Epidemiol Psychiatr Sci, 2012, 21(4): 343-345.
- [15] 闫加庆, 刘敏, 张元, 等. 《国家基本药物目录》(2018)与 WHO《基本药物示范目录》(2017)中抗肿瘤药物的比较和分析[J]. 中国药学杂志, 2019, 54(22): 1901-1906.
- [16] 梁波, 何佳丽, 徐佳佳. 复方托吡卡胺滴眼液对近视儿童散瞳验光的探讨[J]. 海峡药学, 2012, 24(6): 222-223.
- [17] 杨胜信, 李沂钢, 甘晚妹. 康柏西普眼内注射液治疗视网膜中央静脉阻塞黄斑囊样水肿的疗效观察[J]. 临床医学研究与实践, 2016, 1(18): 17-18.
- [18] 谢立科, 陈子扬, 郝晓凤. 基于优势病种研究模式探讨中医眼科研究现状和展望[J]. 中国中医眼科杂志, 2023, 33(3): 201-205.
- [19] 李新南, 景年水, 刘相文. 中药在眼部疾病治疗方面的研究进展[J]. 国际医药卫生导报, 2021, 27(16): 2517-2520.
- [20] 姜尚萍, 樊菁菁, 龙琰, 等. 干眼的中医外治研究概况[J]. 中国中医药现代远程教育, 2023, 21(8): 193-195.
- [21] 王丹, 张鹏程, 胡城. 明目蒺藜丸联合玻璃酸钠滴眼液治疗眼干燥症的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2023, 38(10): 2558-2562.
- [22] 郝菲菲, 张东蕾, 何伟. 中药蒺藜在眼科疾病治疗中的应用[J]. 实用中医内科杂志, 2020, 34(6): 113-117.
- [23] 石磊, 任睿, 唐军峰, 等. 石斛夜光丸联合重组人表皮生长因子滴眼液治疗眼干燥症的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2022, 37(12): 2808-2811.
- [24] 邢凯, 朱明娟, 张娇, 等. 和血明目片眼科临床应用的研究进展[J]. 中国中医眼科杂志, 2022, 32(11): 900-903.
- [25] 张越, 王立芳, 李筱荣. 糖尿病黄斑水肿联合治疗研究进展[J]. 中华眼底病杂志, 2023, 39(6): 505-509.
- [26] 中华医学会眼科学分会眼底病学组, 中国医师协会眼科医师分会眼底病学组. 我国糖尿病视网膜病变临床诊疗指南(2022 年)[J]. 中华眼底病杂志, 2023, 39(2): 99-124.
- [27] 陆明, 洪楠. 阿奇霉素在眼表疾病中的应用进展[J]. 浙江临床医学, 2020, 22(6): 919-921, 924.
- [28] 崔永鑫. 红眼病治疗中复方氨基比林、庆大霉素和地塞米松联用的效果分析[J]. 家庭医药, 2019(9): 108-109.
- [29] 陈华桥. 那他霉素滴眼剂治疗真菌性角膜炎的疗效评估[J]. 医学美容, 2021, 30(1): 41.
- [30] 于睿, 张磊. 拉坦前列素滴眼液治疗 POAG 的效果及对患者眼压、视野指标的影响[J]. 当代医药论丛, 2022, 20(4): 125-128.

(收稿日期: 2023-11-14; 修回日期: 2023-12-18)

临床药师在临床

肝硬化失代偿期合并肺结核的个体化治疗分析与药学监护

邓珍珍, 吴翠芳, 王胜峰* (中南大学湘雅三医院药学部, 长沙 410013)

摘要: 1 例肝硬化失代偿期患者持续高热, 经验性抗感染治疗效果不佳, 临床药师参与制订个体化抗结核+抗感染方案: 异烟肼 0.3 g qd + 利福平 0.45 g qd + 乙胺丁醇 0.75 g qd + 左氧氟沙星 0.6 g qd, 抗结核治疗一周后患者体温恢复正常; 治疗两周后, 患者胸腔积液较前明显减少, 但复查总胆红素升高 ($61 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 考虑患者出现了抗结核药物性肝损伤。临床药师评估病情与肝功能情况, 决定继续抗结核治疗, 并加用腺苷蛋氨酸保肝治疗, 一周后复查胆红素较前未再升高; 两周后肝功能显著好转, 顺利出院。肝硬化患者的抗结核治疗方案制订需结合患者的病情和抗结核药物的特点进行个体化选择, 以寻求获益与风险的平衡。

关键词: 肝硬化失代偿期; 肺结核; 个体化; 药物性肝损伤; 药学监护

中图分类号: R969.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)07-1939-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.045

Individualized treatment and pharmaceutical care for a patient with decompensated liver cirrhosis complicated with pulmonary tuberculosis

DENG Zhen-zhen, WU Cui-fang, WANG Sheng-feng* (Department of Pharmacy, The Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013)

Abstract: A patient with decompensated liver cirrhosis suffered high fever continuously, and the empiric antibiotic treatment was ineffective. Clinical pharmacists formulated a quadruple treatment regimen containing isoniazid 0.3 g qd, rifampicin 0.45 g qd, ethambutol 0.75 g qd and levofloxacin 6.6 g qd after evaluating the patient's liver function. After one week anti-tuberculosis treatment, the patient's body temperature returned normal, and his pleural effusion was significantly reduced after two weeks of treatment. However, he developed anti-tubercular drug hepatotoxicity with the total bilirubin reaching $61 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Clinical pharmacists evaluated his liver function and decided to continue anti-tuberculosis treatment with adenosyl-methionine added to improve his liver function. Two weeks later, the patient's liver function obviously improved, and he was discharged successfully. Anti-tuberculosis treatment regimen option for cirrhosis should be individualized based on patients' condition and the characteristics of anti-tuberculosis drugs to balance between the benefit and risk.

Key words: decompensated liver cirrhosis; pulmonary tuberculosis; individuation; drug-induced liver injury; pharmaceutical care

结核病 (tuberculosis, TB) 是指由结核分枝杆菌 (mycobacterium tuberculosis, MTB) 引起的慢性传染性疾病, 常见的感染部位为肺、淋巴系统, 但其他器官及系统亦常受累, 如中枢神经系

统、循环系统、泌尿系统、骨关节、皮肤等。近年来, 由于耐药性结核分枝杆菌增多、药物使用不规范及人口流动增加等原因, 部分发展中国家结核发病率仍呈上升趋势。2023 年 WHO 全球结

基金项目: 湖南省卫生健康委卫生科研课题资助 (No. W20243126, No. W20243201)。

作者简介: 邓珍珍, 女, 硕士, 主管药师, 主要从事临床药学与药物警戒研究, email: dengzhen2008.love@163.com * 通信作者:

王胜峰, 女, 博士, 副主任药师, 主要从事临床药师与个体化用药研究, email: sunfeelwang@126.com

核报告显示：2022 年全球估算结核发病人数为 1060 万，死亡人数为 130 万，结核病仍然是仅次于新型冠状病毒感染的世界第二大单一传染源死因。2022 年中国结核病新发患者数为 74.8 万，在 30 个高结核病负担国家中排名第三，占比 7.1%^[1]。

肝硬化患者的抗结核治疗是复杂而充满矛盾的。由于用药种类多，在抗结核治疗过程中可能会出现各种不同类型的不良反应，其中以抗结核药物性肝损伤最为多见，危害性最大，也是我国药物性肝损伤的常见原因之一^[2-3]。药物的肝毒性可能导致肝功能恶化，甚至引起严重的肝功能衰竭。此外，肝硬化患者由于基础肝功能差，对抗结核药物的耐受性差，其产生多药耐药（multi-drug resistant, MDR）结核病的机会也随之增加。因此，对于合并肝脏基础疾病的人群抗结核治疗方案制订应遵循个体化原则，综合患者自身疾病状况与抗结核药物的特点而制订。本文通过 1 例肝硬化失代偿期合并肺结核及结核性胸膜炎患者抗结核治疗方案制订的药学实践，探讨临床药师在肝脏疾病患者抗结核个体化药物治疗方案及药学监护实施的必要性及重要性。

1 病史摘要

1.1 入院基本情况

患者男，44 岁，身高 160 cm，体重 51 kg，体质指数 $19.92 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$ ，因腹胀 2 个月伴发热 20 余天于 2022 年 11 月 21 日入院。患者既往因“腹胀 20 余日，加重伴呼吸困难”入我院，诊断为混合型肝硬化（酒精性+乙肝）、右侧胸腔包裹性积液，给予抗乙肝病毒、护肝、利尿、抗感染等对症支持治疗后病情好转。出院后患者规律服用保肝及抗病毒药物，10 月 29 日开始出现反复发热，体温最高达 40°C ，以夜间为著，无畏寒、寒战，无咳嗽咳痰，服用布洛芬后体温可降至正常。11 月 17 日外院胸部 CT 考虑双肺结核并右侧胸膜结核可能性大，未予治疗，于 11 月 21 日于我院消化内科门诊就诊，以肝硬化收入院治疗。患者既往有乙肝及酒精性肝病病史，肺结核接触史，余无特殊。

入院查体：体温 36.5°C ，呼吸 $109 \text{ 次} \cdot \text{min}^{-1}$ ，脉搏 $20 \text{ 次} \cdot \text{min}^{-1}$ ，血压 $116/89 \text{ mmHg}$ 。右肺呼吸音弱，语颤减弱，左肺呼吸音正常，未闻及干、湿性啰音。腹部膨隆，无腹壁静脉曲张，全腹无压痛及反跳痛，双下肢重度凹陷性水肿。

辅助检查，血常规：白细胞（WBC） $7.06 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$ ，中性粒细胞百分比（NE%）68.9%，血红蛋白（Hb） $125 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，C 反应蛋白（CRP） $48.08 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ；凝血功能：凝血酶原活动度 46.3%，凝

血酶原时间 16.4 s ，国际标准化比值（INR）1.44，活化部分凝血活酶时间 43.2 s ，纤维蛋白原浓度 $1.78 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，D-二聚体 $7.18 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ；肝肾功：谷丙转氨酶（ALT） $22 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ，谷草转氨酶（AST） $74 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ，总胆红素（TBIL） $11.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，直接胆红素（DBIL） $7.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，白蛋白（ALB） $15.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，肌酐 $99 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，尿素氮 $2.91 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ；红细胞沉降率（ESR）： $78 \text{ mm} \cdot \text{h}^{-1}$ ；外院胸部 CT：双肺结核并右侧胸膜结核可能性大，右上肺支气管闭塞并右上肺不张。

入院诊断：① 混合型肝硬化（失代偿期）；② 病毒性肝炎 慢性乙型；③ 发热查因：腹膜炎？结核？④ 右侧胸腔包裹性积液：炎性？结核待排。

1.2 治疗过程

入院后患者持续夜间高热，最高体温达 40°C ，伴寒战，腹水引流液为黄色浑浊状，腹部无明显压痛及反跳痛。考虑目前不能排除腹膜炎，诊断结核证据尚不充分，给予美罗培南 1 g q8h 联合奥硝唑 0.5 g bid 抗感染治疗，替诺福韦抗乙肝病毒、多烯磷脂酰胆碱保肝和补充白蛋白等对症支持治疗。

入院第 4 日，患者体温最高达 39°C ，腹水李凡他试验阴性，细胞总数 360、白细胞分类（多核）： $12/32$ ，白细胞分类（单核）： $20/32$ ；腹水细菌及真菌培养、抗酸染色均为阴性，结核抗体 IgG（+）；血培养及结缔组织全套阴性，胸腔彩超提示右侧胸腔深约 69 mm 液暗区。患者使用美罗培南联合奥硝唑抗感染治疗 3 日后感染指标正常，体温峰值稍下降，继续目前抗感染治疗方案，并完善胸腔穿刺，送引流液细胞学及穿刺液检查。

第 7 日患者夜间仍有发热，最高体温 40°C ，复查血常规：WBC $7.53 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$ ，NE% 62.6%，Hb $128 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ；ESR： $45 \text{ mm} \cdot \text{h}^{-1}$ ；G + GM 试验阴性；胸腔积液涂片+染色阴性，胸腔积液抗酸染色：+，胸腔积液腺苷脱氨酶 $148 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ，胸腔积液培养：溶血葡萄球菌；病毒全套及 TSPOT.TB 试验（-）。临床药师分析：患者抗感染治疗 7 日仍发热，结合胸腔积液抗酸染色、腺苷脱氨酶及肺部 CT 结果，需考虑患者活动性结核感染可能，建议行诊断性抗结核治疗。通过查阅资料并评估当前肝功能情况，确定抗结核方案为：异烟肼 0.3 g qd + 利福平 0.45 g qd + 乙胺丁醇 0.75 g qd + 左氧氟沙星 0.6 g qd ，继续胸腔、腹腔引流及其他对症治疗，密切监测患者肝功能。

第 10 日患者最高体温为 38°C ，第 13 日患者体温正常，复查血常规：WBC $11.91 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$ ，NE%

76.6%, CRP 34.44 mg·L⁻¹; 肝功能: ALT 20 U·L⁻¹, AST 80 U·L⁻¹, TBIL 61.1 μmol·L⁻¹, DBIL 39.9 μmol·L⁻¹, 总胆汁酸 (TBA) 176 μmol·L⁻¹, ALB 19.9 g·L⁻¹。患者 TBIL 及 TBA 较前明显升高, 临床药师分析: 患者抗结核治疗后, 体温恢复正常, 一般状况明显好转, 排除因自身肝病进展及结核感染所致肝功能恶化可能。患者发热时间长, 营养状况不佳, 且在具有严重肝脏疾病的情况下进行抗结核治疗, 具备药物性肝损伤的高危因素, 目前肝功能异常考虑抗结核药物所致可能, RUCAM 评分为 6 分

(很可能)。患者抗结核治疗后病情好转, 虽胆红素升高达到停药标准, 但此时停药可能导致病情反复, 建议维持目前治疗方案, 加用腺苷蛋氨酸 1000 mg qd 保肝治疗, 密切监测肝生化指标。第 23 日, 患者腹胀明显减轻, 复查血常规正常, ALT 16 U·L⁻¹, AST 53 U·L⁻¹, TBIL 44.1 μmol·L⁻¹, DBIL 28.4 μmol·L⁻¹, ALB 22.4 g·L⁻¹, TBA 158.6 μmol·L⁻¹; 患者 TBIL 较前下降, 提示肝功能较前好转, 于第 28 日带药出院 (患者住院期间的肝功能指标见表 1, 体温变化见图 1)。

表 1 患者相关临床指标

Tab 1 Relevant clinical indicators of the patient

指标名称	d1	d3	d7	d13	d17	d23	d28
WBC/(×10 ⁹ ·L ⁻¹)	7.06	7.53	7.5	11.91	13.51	6.37	6.22
中性粒细胞/(×10 ⁹ ·L ⁻¹)	4.88	4.92	5.18	9.12	11.75	3.99	3.65
NE/%	68.9	69.5	69.1	76.6	87.0	62.6	58.7
CRP/(mg·L ⁻¹)	48.08	48.50	48.91	34.44	/	/	19.34
降钙素原/(ng·mL ⁻¹)	0.30	0.44	1.31	1.01	/	0.02	/
血沉/(mm·h ⁻¹)	78	62	45	50	/	34	/
ALT/(U·L ⁻¹)	22	23	25	20	20	16	15
AST/(U·L ⁻¹)	74	85	104	80	80	53	43
TBIL/(μmol·L ⁻¹)	11.4	16.0	18.8	61.1	61.0	44.1	34.3
DBIL/(μmol·L ⁻¹)	7.1	9.4	11.8	39.9	40.2	28.4	20.5
TBA/(μmol·L ⁻¹)	37.0	45.8	65.1	176.0	226.7	158.6	100.4
ALB/(g·L ⁻¹)	15.7	16.8	18.1	19.7	23.9	22.4	24.5

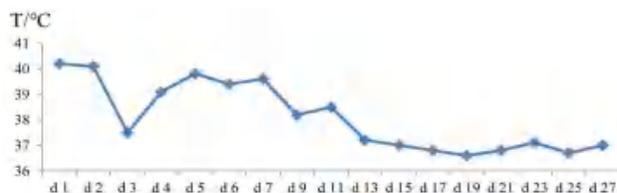


图 1 患者住院期间体温变化趋势图

Fig 1 Change of body temperature

2 药物治疗与分析

2.1 肝硬化失代偿期患者抗结核治疗方案的制订
合并肝脏疾病患者的抗结核治疗是一把双刃剑, 抗结核药物潜在的肝毒性可能加重患者本身的肝脏疾病, 而结核的进展也可能导致肝功能代偿失调, 使肝脏疾病加重, 因此, 抗结核方案应根据药物肝毒性的差异个体化制订, 以最大程度保证疗程并避免肝毒性。目前尚无权威指南指导肝硬化失代偿期患者抗结核药物的选择和治疗疗程, 肺结核患者治疗的金标准仍是 6 个月的一线治疗药物疗程, 即异烟肼 (isoniazid, INH)、利福平 (rifampicin, RIF)、吡嗪酰胺 (pyrazinamide, PZA) 和乙胺丁醇 (ethambutol, EB) 联合治疗^[4]。四种一线抗结核药物中有三种被证实具有肝毒性, 其中吡嗪酰胺被认为是肝毒性最大的药物, 特别是日剂量超过 35 mg·kg⁻¹ 时^[5]。我国《抗结核药

物性肝损伤诊治指南》(2019 年) 建议: 对于结核病并发肝脏基础疾病时仍需要遵循结核病基础治疗原则, 避免选择可致肝损伤的多个药物联合应用^[6]。WHO 结核治疗指南建议肝病越严重或不稳定, 应越少使用肝毒性药物^[7]。虽然有基础肝病的患者接受抗结核治疗过程中更易出现 DILI, 但考虑到一线抗结核药物的确切疗效, 仍是肝病合并结核病患者抗结核治疗方案的主要推荐药物, 尤其是异烟肼和利福平^[8-9]。美国胸科学会 (ATS) 指南建议晚期肝病合并结核患者选择含有一种肝毒性药物的治疗方案, 一般避免吡嗪酰胺, 保留利福平, 建议联合治疗药物包括乙胺丁醇、氟喹诺酮类药物、环丝氨酸或氨基糖苷类, 治疗时间通常超过 12 个月^[10]。

肝硬化患者病情的严重程度通常采用 Child-Pugh 分级来评价, 有研究根据 Child-Pugh 分级提出了治疗方案。Kumar 等^[9] 建议 A 级可包含利福平与异烟肼两种主要治疗药物, 可包含低剂量吡嗪酰胺或不包含吡嗪酰胺, 治疗 6~9 个月; B 级可包含异烟肼或利福平中的一种, 通常避免吡嗪酰胺, 治疗 9~12 个月; C 级治疗不推荐使用肝毒性较大的异烟肼或利福平, 推荐二线治疗药物, 治疗 12 个月以上^[9]; 中国台湾地区结核

病治疗指南建议 Child-Pugh A/B 类患者通过监测肝功能可使用异烟肼和利福平两种肝毒性药物, Child-Pugh C 类患者均不建议使用肝毒性药物^[11]。Shin 等^[12]通过比较肝硬化合并结核与非肝病的结核患者两组间短期应用潜在肝毒性的一线抗结核药联合治疗(利福平+异烟肼+乙胺丁醇)肝损伤的发生率[肝硬化组的 Child-Pugh 评分均数为(7.0±1.2)],发现虽然肝硬化组药物性肝损伤的发生率较对照组高(8% vs 2.7%),但两组间差异无统计学意义。

参考以上依据,临床药师重新评估患者当前肝功能,Child-Pugh 分级由 C 级转为 B 级,制订抗结核方案为利福平(0.45 g qd)联合异烟肼(0.3 g qd)及乙胺丁醇(0.75 g qd),药物剂量依据药品说明书及《临床用药指南》推荐肝功能不全时剂量使用。此外,患者胸腔积液培养溶血葡萄球菌,建议加用具有协同抗结核作用的氟喹诺酮类药物。因莫西沙星禁用于肝功能损伤患者,参考《桑德福抗微生物治疗指南》第 50 版推荐方案,选用左氧氟沙星 0.6 g qd^[13]。

2.2 抗结核药物治疗的药学监护

2.2.1 抗结核药物性肝损伤(anti-tuberculosis drug-induced liver injury, ATB-DILI)的监测与预防

ATB-DILI 是慢性肝脏病尤其是失代偿期肝硬化患者治疗面临的挑战。研究表明,我国 ATB-DILI 发生率约 10.4%,通常发生在治疗的前 2 个月,76.4% 患者发生在治疗 8 周内,11.6% 的患者发生在治疗 12 周后^[14-15]。因此,在治疗初期应密切监测肝功能,以便及时发现 ATB-DILI^[16]。该患者基础肝功能较差,临床药师建议患者在治疗初期应隔周监测肝功能。

研究发现,老年人、酗酒、病毒性肝炎或合并其他急慢性肝病、营养不良和人免疫缺陷病毒感染是 ATB-DILI 的危险因素^[17]。明确危险因素可以预防和早期发现 ATB-DILI,而针对具有高危因素的患者是否需要预防性保肝治疗目前仍存在争议。《抗结核药所致药物性肝损伤诊断与处理专家建议》及《抗结核药物性肝损伤诊治指南》(2023 年)均建议对具有高危因素的患者给予预防性保肝治疗^[6, 18],部分研究仍对保肝药物的预防性应用持否定态度^[19]。考虑该患者为乙肝合并酒精性肝硬化失代偿期,且合并严重营养不良、低蛋白血症等 ATB-DILI 发生的多个高危因素,为避免患者因 ATB-DILI 导致的治疗中断,初始抗结核治疗时即给予保肝药物多烯磷脂酰胆碱注射液 465 mg qd 预防性治疗,继续密切监测肝功

能及相关症状体征。

2.2.2 ATB-DILI 的处置

该患者抗结核治疗 5 日后,患者体温较前明显下降,呼吸困难较前改善,肝功能提示 ALT 20 U·L⁻¹, AST 80 U·L⁻¹, TBIL 61.1 μmol·L⁻¹, DBIL 39.9 μmol·L⁻¹, TBA 176 μmol·L⁻¹。患者出现 TBIL 及 TBA 升高,临床药师分析:患者经前期对症支持治疗后肝功能已较入院时好转,可排除自身肝脏疾病进展所致;经抗结核治疗后,患者体温下降,呼吸改善,抗结核治疗已初步起效,亦可排除结核分枝杆菌侵犯肝脏所致,因此考虑 ATB-DILI 可能性大。参照《中国药物性肝损伤诊治指南》(2023 版)及《抗结核药所致药物性肝损伤诊断与处理专家建议》(2013 版),药物性肝损伤通常发生在用药后 1 周至 3 个月内,分别在用药后 1~2 周和 2 个月左右出现高峰期。在发生时间相符,并排除其他因素所致肝功能恶化后,血清生化检测示 ALT > 2×ULN 或 TBIL > 2×ULN 即可诊断为药物性肝损伤。该患者使用抗结核药物一周后出现 AST 及 TBIL 升高,且 TBIL > 3×ULN,计算 RUCAM 评分为 6 分,考虑为抗结核药物所致中度肝损伤。

我国《抗结核药物性肝损伤诊治指南》(2019 年)建议,在 ALT ≥ 5×ULN 或 ALT ≥ 3×ULN 伴有恶心、呕吐、黄疸等症状,或 TBIL 升高 > 3×ULN 时,需立即停用所有与肝损伤相关的抗结核药物,积极保肝治疗^[6];中国台湾地区《结核病诊治指引》(2013 年)建议:在 ALT ≥ 6×ULN 和/或 TBIL ≥ 3×ULN 时,可根据患者的具体情况考虑是否暂时停用抗结核药物,当 ALT > 8×ULN 和/或 TBIL > 5×ULN 时暂时停用抗结核药物,给予护肝、利胆治疗^[11]。临床药师考虑患者病情危重,目前治疗已初见成效,虽胆红素升高达到停药标准,但此时停药可能导致病情反复,甚至出现结核耐药,因此建议继续当前抗结核治疗方案,加用腺苷蛋氨酸 1 g·d⁻¹ 降胆红素治疗,密切监测肝功能。加用保肝药物一周及两周后分别复查肝功能,提示肝功能未再恶化。

2.2.3 其他不良反应监测

该患者抗结核治疗第 11 日出现全身瘙痒,再次请临床药师会诊。临床药师了解到患者全身无红斑、丘疹,仅表现为全身皮肤瘙痒,此时 TBIL 61 μmol·L⁻¹, TBA 226.7 μmol·L⁻¹,均明显升高。临床药师查阅药品说明书及相关文献资料发现利福平和乙胺丁醇的皮肤过敏反应发生率相对较高,均表现为皮肤瘙痒、发红或皮疹,严重者可致剥脱性皮炎^[20-21]。利福平可竞争性抑制胆盐转运泵,引起结合胆红素升高,从而

导致皮肤瘙痒^[22]，患者瘙痒原因考虑为抗结核药物本身所致过敏反应，不排除抗结核药致高胆红素血症所致^[23]。根据 2010 年 WHO 抗结核指南意见：如出现皮肤瘙痒、无皮疹，可采用抗组胺药物治疗，无需停药；如出现皮疹，应停用所有抗结核药物，待皮肤反应消失，重新引入抗结核药物^[24]。继续给予该患者腺苷蛋氨酸护肝退黄，炉甘石洗剂涂抹患处，同时口服抗组胺药物枸地氯雷他定，3 d 后患者瘙痒明显好转，5 d 后复查肝功能提示胆红素较前下降，停用抗组胺药物，患者未再出现瘙痒。

3 总结

由于肝毒性发生率较高和肝储备减少，肝硬化患者成功完成抗结核治疗仍然是一个挑战。根据肝脏疾病的严重程度，可采用不同的结核病治疗方案。肝硬化的抗结核治疗方案应个体化，综合评估患者病情、抗结核药物的肝毒性风险等特点和药物疗效，寻求获益与风险的平衡。密切监测和早期发现是预防药物性肝损伤的关键。因抗结核治疗周期较长，还应充分评估患者长期用药风险，并采取适当的干预措施，以避免肝损伤。鉴于目前尚无肝硬化患者抗结核治疗指南，本文着重介绍临床药师和内科医师在处理这类疑难病例时的思路，为其典型的治疗提供参考。

参考文献

- [1] Global tuberculosis report 2023 [M]. World Health Organization, 2023.
- [2] 唐神结, 高文. 临床结核病学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 191-200.
- [3] Baskaran UL, SabinavEP. Clinical and experimental research in antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: a review [J]. *J Integr Med*, 2017, 15 (1): 27-36.
- [4] WHO consolidated guidelines on tuberculosis: Module 4: treatment-drug-susceptible tuberculosis treatment [Z]. Geneva: World Health Organization, 2022.
- [5] Hussain Z, Zhu JJ, Ma XC. Metabolism and hepatotoxicity of pyrazinamide, an antituberculosis drug [J]. *Drug Metab Dispos*, 2021, 49: 679-82.
- [6] 中华医学会结核病学分会. 抗结核药物性肝损伤诊治指南 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2019, 42 (5): 343-356.
- [7] World Health Organization. WHO global tuberculosis control report 2010. Summary [J]. *Cent Eur J Public Health*, 2010, 18 (4): 237.
- [8] Dhiman RK, Saraswat VA, Rajekar H, et al. A guide to the management of tuberculosis in patients with chronic liver disease [J]. *J Clin Exp Hepatol*, 2012, 2 (3): 260-270.
- [9] Kumar N, Kedarisetty CK, Kumar S, et al. Antitubercular therapy in patients with cirrhosis: challenges and options [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20 (19): 5760-772.
- [10] Nahid P, Dorman SE, Alipanah N, et al. Official american thoracic society/centers for disease control and prevention/infectious diseases society of america clinical practice guidelines: treatment of drug-susceptible tuberculosis [J]. *Clin Infect Dis*, 2016, 63: e147-95.
- [11] 陆坤泰. 台湾地区核病诊治指引 [M]. 5 版. 台北: 台湾卫生署疾病管理局, 2013.
- [12] Shin HJ, Lee HS, Kim YI, et al. Hepatotoxicity of anti-tuberculosis chemotherapy in patients with liver cirrhosis [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2014, 18 (3): 347-351.
- [13] Gilbert DavidN. 桑福德抗微生物治疗指南 [M]. 范洪伟主译. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2021.
- [14] Sun Q, Zhang Q, Gu J, et al. Prevalence, risk factors, management, and treatment outcomes of first-line antituberculous drug-induced liver injury: a prospective cohort study [J]. *Pharmacoevidiol Drug Saf*, 2016, 25 (8): 908-917.
- [15] Shang PH, Xia YY, Liu FY, et al. Incidence, clinical features and impact on anti-tuberculosis treatment of anti-tuberculosis drug induced liver injury (ATLI) in China [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e21836.
- [16] Abbara A, Chitty S, Roe JK, et al. Drug-induced liver injury from antituberculous treatment: a retrospective study from a large TB centre in the UK [J]. *BMC Infect Dis*, 2017, 17: 231.
- [17] Wang NN, Chen XY, Hao ZL, et al. Incidence and temporal trend of antituberculosis drug-induced liver injury: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Trop Med*, 2022, 2022: 8266878.
- [18] 中华医学会结核病学分会. 抗结核药所致药物性肝损伤诊断与处理专家建议 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2013, 36 (10): 732-736.
- [19] Saito Z, Kaneko Y, Kinoshita A, et al. Effectiveness of hepatoprotective drugs for anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity: a retrospective analysis [J]. *BMC Infect Dis*, 2016, 16: 668.
- [20] Lv XZ, Tang SW, Xia YY, et al. Adverse reactions due to directly observed treatment strategy therapy in Chinese tuberculosis patients: a prospective study [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (6): e65037.
- [21] Schaberg T, Rebhan K, Lode H. Risk factors for side-effects of isoniazid, rifampin and pyrazinamide in patients hospitalized for pulmonary tuberculosis [J]. *Eur Respir J*, 1996, 9 (10): 2026-2030.
- [22] 刘西忠, 金庆香, 姚桂芳. 肝病并皮肤瘙痒的研究进展 [J]. *中西医结合肝病杂志*, 2009, 19 (5): 317-319.
- [23] 管玫, 钟光德, 黄文志, 等. 药品不良反应病例报告评价标准的探讨 [J]. *中国药房*, 2008, 26: 2054-2056.
- [24] Treatment of tuberculosis: guidelines [M]. Geneva: World Health Organization, 2010.

(收稿日期: 2024-01-21; 修回日期: 2024-04-23)

卡泊芬净治疗念珠菌尿路感染 1 例并文献复习

周燕¹, 卢鋈¹, 邹娅¹, 郭西芮¹, 叶永琴¹, 刘欢², 李刚^{3*} (1. 成都市第二人民医院临床药学科, 成都 610021; 2. 四川省交通医院, 成都 611731; 3. 四川省交通医院和四川省人民医院医学装备部, 成都 610072)

摘要: 回顾性分析 1 例确诊为念珠菌尿路感染患者的诊治过程, 并检索国内外数据库中使用卡泊芬净治疗该病的病例, 结合文献进行分析。结果经卡泊芬净治疗后患者临床症状好转, 尿培养转阴, 炎症指标下降, 无不良反应发生, 随访 3 个月未复发。卡泊芬净为念珠菌尿路感染患者的治疗提供了新的临床用药选择, 由于耐药、药物相互作用或存在禁忌证无法选用氟康唑、两性霉素 B 和氟胞嘧啶, 或上述药物治疗失败时, 可以考虑使用卡泊芬净, 以改善患者临床结局。

关键词: 卡泊芬净; 氟康唑耐药念珠菌; 尿路感染

中图分类号: R519, R969.3 **文献标识码:** A
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.046

文章编号: 1672-2981(2024)07-1944-05

近年来, 随着广谱抗菌药物和免疫抑制剂的广泛使用, 念珠菌尿路感染的患者逐渐增多^[1], 首选药物包括氟康唑、两性霉素 B 和氟胞嘧啶。氟康唑有口服给药剂型和静脉给药剂型, 大约 80% 的药物以原形经肾脏排泄到尿液中, 是血清药物浓度的 10 ~ 20 倍, 基于氟康唑的良好耐受性以及高肾组织和尿液浓度, 是症状性念珠菌尿路感染患者初始治疗的首选药物, 它的主要缺点是药物相互作用、肝毒性以及对某些念珠菌的耐药性。其他唑类由于极少排泄到尿液中 (伊曲康唑浓度 < 1%, 伏立康唑浓度 < 2%, 泊沙康唑浓度 < 1%), 对尿路感染无效。两性霉素 B 对绝大多数念珠菌高度敏感, 治疗效果好, 是氟康唑耐药念珠菌的一线选择^[2], 但是该药全身用药不良反应大, 很多患者不能耐受; 而采用两性霉素 B 膀胱冲洗的疗效与安全性一直存在争议, 因此该药在临床的使用仍存在一定的局限性。氟胞嘧啶尿液浓度高, 对念珠菌作用强, 但是单一治疗会迅速产生耐药性^[3], 且肝脏毒性和血液系统毒性高发, 临床上不作为首选。

卡泊芬净对许多念珠菌具有较高的活性, 包括对唑类耐药的念珠菌, 安全性和耐受性也较好, 但是该药在尿液中的浓度较低, 因此, 对于尿路感染的治疗效果仍需进一步探索。目前, 治疗念珠菌尿路感染仍然是一种挑战, 特别是氟康唑耐药念珠菌, 患者无法使用氟康唑、两性霉素

B 和氟胞嘧啶, 须积极寻找进一步的替代方案。研究发现卡泊芬净对于复杂性念珠菌尿路感染具有一定的治疗作用, 为该类患者的治疗提供了新的用药思路^[4]。本文报道 1 例卡泊芬净治疗氟康唑耐药念珠菌尿路感染的病例, 并结合国内外相关文献, 对其进行回顾性分析, 旨在进一步探索卡泊芬净对于念珠菌尿路感染患者的治疗效果和安全性。

1 病历资料

患者, 男, 83 岁, 身高 155 cm, 体重 59 kg, 2023 年 2 月 22 日因“呕吐、乏力半月, 加重伴发热 1 d”入住我院。半个月前, 患者无明显诱因出现呕吐、乏力, 1 d 前症状加重, 伴发热, 最高体温 38 °C, 于我院急诊完善肾功能检查, 提示肌酐 663 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ↑, 以“肾功能不全”收入我院肾内科。既往史: 2 型糖尿病病史 5 年, 膀胱恶性肿瘤病史 5 年。因膀胱恶性肿瘤反复血尿, 患者于 2021 年 10 月 13 日行“膀胱出血动脉造影及部分栓塞术”。入院诊断: 急性肾衰竭、2 型糖尿病、膀胱恶性肿瘤、前列腺增生。体格检查: 体温 36.9 °C, 心率 105 次 $\cdot \text{min}^{-1}$, 呼吸 20 次 $\cdot \text{min}^{-1}$, 血压 136/77 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa)。一般情况: 神志嗜睡, 表情痛苦。入院后完善相关检查并安置导尿管。实验室检查: 白细胞计数 $16.1 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$ ↑, 中性粒细胞比例 92.9% ↑, 超敏 C 反应蛋白 (hs-CRP) 139.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ↑, 降钙素

基金项目: 国家重点研发计划课题 (编号: 2020YFC2005506)。

作者简介: 周燕, 女, 硕士, 主管药师, 主要从事临床药学工作, email: 757950440@qq.com *通信作者: 李刚, 男, 主任药师, 主要从事医院药学工作, email: 906369706@qq.com

原 (PCT) $20.2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \uparrow$, 白细胞介素 6 (IL-6) $134.0 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1} \uparrow$; 尿常规: 细菌数 $2363 \text{ 个} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 白细胞计数 $4978 \text{ 个} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 隐血 (++++), 白细胞酯酶 (++++), 类酵母菌 (+), 尿蛋白 (+), 类酵母菌 (镜检): 查见菌丝; 腹腔盆腔 CT: 膀胱可见多发憩室凸出于腔外, 部分憩室内可见沙粒样高密度影, 膀胱壁不均匀增厚, 右侧底壁见软组织肿块影, 长约 3.8 cm , 肿瘤性病变不能除外。双侧输尿管全程及双侧肾盂肾盏积水; 其余检查未见明显异常。患者尿液浑浊明显, 考虑泌尿道感染, 送血培养和尿培养, 使用哌拉西林他唑巴坦每次 4.5 g q12 h , 经验性抗感染治疗。2 月 23 日, 血清真菌 (1, 3) β -D- 葡聚糖检测 (G 试验) $324.7 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1} \uparrow$, 半乳甘露聚糖检测 (GM 试验) 阴性; 2 月 24 日, 患者仍反复发热, 最高体温 $38.3 \text{ }^\circ\text{C}$, 双瓶血培养和清洁中段尿培养结果均提示白念珠菌, 患者泌尿系感染明确, 同时合并念珠菌败血症, 药敏结果显示对氟康唑耐药, 对两性霉素 B 和棘白菌素类 (卡泊芬净和米卡芬净) 敏感, 鉴于患者肾功能较差, 不宜选择肾损伤大的药物, 因此选用卡泊芬净负荷剂量 70 mg , 维持剂量 50 mg , 每日 1 次抗真菌治疗, 同时, 细菌感染不能除外, 继续抗细菌治疗。2 月 26 日, 患者体温恢复正常, 神志清楚, 尿管中仍有较多白色絮状物, 白细胞计数 $4.7 \times 10^9 \text{ 个} \cdot \text{L}^{-1}$, 中性粒细胞比例 74.2% , hs-CRP $56.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$, PCT $2.8 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \uparrow$, 血培养转阴, 尿培养提示白念珠菌; 3 月 1 日, 患者尿液中絮状物较前减少, 再次更换导尿管, 血培养仍然阴性, 尿培养仍提示白念珠菌, 继续使用卡泊芬净治疗, 同时使用 1.4% 碳酸氢钠溶液进行膀胱冲洗; 3 月 3 日, 患者尿液微浑浊, 絮状物较前进一步减少, 尿培养提示白念珠菌; 3 月 6 日, 患者导尿管尿液微浊, 可见少量絮状物, 复查尿培养转阴, 血常规正常, hs-CRP $25.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$, PCT $0.28 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \uparrow$, 继续使用卡泊芬净联合哌拉西林他唑巴坦抗感染; 3 月 10 日, 患者尿液清亮, 血培养和尿培养均阴性, 一般情况良好, 保留导管出院。该患者使用卡泊芬净抗真菌治疗, 疗程 16 d , 治疗期间未出现药物相关不良反应, 3 个月以后门诊随访, 尿路感染未复发。

2 文献复习

2.1 文献检索

以“卡泊芬净、尿路感染、念珠菌尿路感染”为关键词在中国知网、万方、维普中国期刊数据

库进行检索, 通过 PubMed、Embase、Medline 外文数据库以关键词“Caspofungin、urinary tract infection、candiduria”进行检索, 检索时间均为建库至 2023 年 5 月。本研究中念珠菌尿路感染的诊断标准如下: ① 符合尿路感染的诊断标准, 即各种病原微生物在尿路中生长、繁殖而引起的感染性疾病; ② 同时满足尿培养念珠菌阳性。文献纳入标准: ① 原始的临床病例报道; ② 确诊为念珠菌尿路感染的病例; ③ 静脉使用卡泊芬净进行抗真菌治疗的病例。排除标准: ① 重复的病例报道; ② 局部使用卡泊芬净治疗的病例; ③ 联合使用其他抗真菌药物治疗的病例。

2.2 结果

纳入中文文献 3 篇, 外文文献 5 篇, 共报道了 22 例 (见表 1)。纳入的病例中, 男性 12 例, 女性 10 例, 其中 1 例为 6 岁儿童, 均合并不同基础性疾病, 16 例患者 ($16/22$, 72.7%) 患有糖尿病, 13 例患者 ($13/22$, 59.1%) 免疫功能低下 (其中 6 例接受免疫抑制剂治疗, 5 例肿瘤, 1 例移植, 1 例获得性免疫缺陷综合征), 其他疾病还包括冠心病 ($3/22$, 13.6%)、肾功能不全或肾结石 ($5/22$, 22.7%)、前列腺增生 ($4/22$, 18.2%) 和严重烧伤 ($1/22$, 4.5%)。念珠菌包括: 光滑念珠菌 (*C. glabrata*) 8 例, 耳念珠菌 (*C. auris*) 5 例, 白念珠菌 (*C. albicans*) 4 例, 热带念珠菌 (*C. tropicalis*) 3 例, 葡萄牙念珠菌 (*C. lusitaniae*) 1 例, 未知念珠菌 (*unspecified yeast*) 1 例, 标本来自尿和血。卡泊芬净给药剂量主要为负荷剂量 $70 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$, 维持剂量 $50 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$, 疗程 $5 \sim 28 \text{ d}$ 。1 例患者由于迅速产生耐药性治疗失败, 21 例患者 ($21/22$, 95.4%) 泌尿系感染症状好转, 其中 4 例患者随访期间尿路感染复发, 2 例患者死亡 (死亡原因与尿路感染无直接关系)。

3 讨论

尿路感染多见于住院患者, 主要由大肠埃希菌所致^[12], 念珠菌排名第三^[13], 念珠菌是引起导尿管相关尿路感染的第二大病原体, 其中白念珠菌最常见, 占尿路感染所有病原菌的 11.7% ^[14]。念珠菌属于条件致病菌, 尿路感染患者多合并易感因素, 本例患者患有糖尿病, 同时合并尿路梗阻, 结合本病例和既往报道^[1, 15], 易感因素包括糖尿病、肾移植、留置导尿管、尿路梗阻、长期入住重症监护病房和广谱抗菌药物的使用等。念珠菌常见于泌尿生殖系统和健康人皮肤的正常微生物菌群中, 多为定植或污染, 通常无症状, 消

表 1 国内外报道的卡泊芬净治疗念珠菌尿路感染患者临床资料汇总

文献	例数	性别	年龄 / 岁	基础病史	病原菌	标本	给药剂量	疗程 / d	临床转归
Sobel 等 ^[4]	6	男 3 例, 女 3 例	46 ~ 78	糖尿病 3 例, 冠心病 2 例, 肿瘤 2 例, 严重烧伤 1 例	光滑念珠菌 3 例, 白念珠菌 2 例, 热带念珠菌 1 例	尿 (6 例), 血 (3 例)	未注明给药剂量	9 ~ 28	所有患者培养结果均转阴, 临床症状好转。1 例脓尿持续存在; 1 例 2 个月后复发给予第 2 个疗程 (10 d) 卡泊芬净治疗后尿培养再次转阴; 1 例因为腿部坏疽死亡
刘萌 ^[5]	1	男	53	糖尿病, 肾脏结石	光滑念珠菌	尿	首日 70 mg, 维持每日 50 mg	9	泌尿系感染症状好转
李谷雨等 ^[6]	1	男	89	冠心病, 糖尿病, 前列腺增生, 慢性肾功能不全	热带念珠菌	尿	首日 70 mg, 维持每日 50 mg	12	尿培养转阴, 泌尿系感染症状好转
陈亚玲等 ^[7]	1	男	38	获得性免疫缺陷综合征, 播散性鸟分枝杆菌感染, 巨细胞病毒视网膜炎, 急性肾衰竭	热带念珠菌	尿	首日 70 mg, 维持每日 50 mg	16	尿培养转阴, 泌尿系感染症状好转, 随访 2 个月无复发
Rezai 等 ^[8]	1	男	6	肾母细胞瘤	白念珠菌	尿	每日 200 mg, 连续 14 d; 每日 100 mg, 连续 4 d	18	尿培养转阴, 随访 5 个月无复发
Rkieh 等 ^[9]	10	男 5 例, 女 5 例	55 ~ 77	糖尿病 10 例, 接受免疫抑制治疗 6 例, 移植 1 例, 肿瘤 1 例, 前列腺增生 3 例	耳念珠菌 5 例, 光滑念珠菌 2 例, 白念珠菌 1 例, 葡萄牙念珠菌 1 例, 未知念珠菌 1 例	尿	首日 70 mg, 维持每日 50 mg	5 ~ 9	临床治愈 8 例, 其中 4 例患者在 90 d 内膀胱炎复发
Kishel 等 ^[10]	1	女	37	肾上腺腺癌, 肾衰竭, 左肾、脾和部分胰腺切除术后	光滑念珠菌	尿	每日 35 mg	14	尿培养转阴, 不久后患者因心肌梗死死亡
Malani 等 ^[11]	1	女	64	糖尿病, 慢性肾功能不全, 复发性肾盂肾炎	光滑念珠菌	尿	首日 70 mg, 维持每日 50 mg	14	临床症状未好转, 念珠菌对卡泊芬净由敏感变为耐药

除易感因素即可, 一般无需抗真菌治疗^[1], 抗真菌药物治疗仅推荐用于高风险患者, 包括中性粒细胞减少症患者、极低出生体重儿 (< 1500 g)、接受泌尿外科手术的患者和妊娠期女性^[16-17]。症状性念珠菌尿路感染患者可表现为尿频、尿急、尿痛、血尿、尿潴留、排尿困难、发热和腹痛等, 可选择有效的药物进行治疗。氟康唑、两性霉素 B 和氟胞嘧啶仍然是念珠菌尿路感染的一线治疗药物。

棘白菌素是一类环六肽真菌天然产物, 主要通过非竞争性抑制细胞膜上的 1, 3-β-D 葡聚糖合成酶来抑制真菌细胞壁的合成从而达到抗真菌作用^[18], 被很多指南推荐作为侵袭性念珠菌病的一线治疗。棘白菌素主要经肝脏代谢, 非活性代谢产物主要通过胆汁 - 粪便排出体外, 仅有少量药物以原形经尿液排出 (卡泊芬净约 1.4%, 米

卡芬净约 0.7%, 阿尼芬净 < 1%), 其尿液浓度低, 限制了该类药物在尿路感染中的使用。卡泊芬净是棘白菌素类中的第一种广谱抗真菌药物, 有文献表明, 卡泊芬净对多种念珠菌具有良好的抗菌活性, 对侵袭性念珠菌病的疗效同两性霉素 B, 出现输液反应、肾毒性或低钾血症的比例明显低于两性霉素 B, 安全性更高^[19]。一项关于卡泊芬净剂量递增的 II 期临床研究表明, 每日剂量高达 200 mg, 长时间使用耐受性良好, 且未达到最大耐受剂量^[20]。一名 6 岁男性患儿使用较高剂量 (200 mg · d⁻¹ 和 100 mg · d⁻¹) 的卡泊芬净, 成功治愈了肾念珠菌病^[8]。此外, 与三唑类药物不同, 卡泊芬净不经过细胞色素 P450 酶系统代谢, 因而和其他药物的相互作用少。总体来说, 该药对大多数念珠菌具有很强的杀菌活性、低药物相互作用、罕见的获得性耐药性和更高的安全

性^[21]，而且该药对肾功能影响小，故此类药物在肾功能不全和透析患者中无须调整剂量。目前在少数患者中的证据显示（见表 1）卡泊芬净治疗念珠菌尿路感染既有成功也有失败，Malani 等^[11]报道了 1 例患者使用卡泊芬净后迅速产生耐药性而治疗失败，念珠菌属对棘白菌素耐药是相当少见的，短期使用产生耐药更为罕见，大部分患者使用卡泊芬净治疗是有效的，本研究应用卡泊芬净也成功清除了尿中的念珠菌。棘白菌素类药物尿液浓度低，但是成功应用于念珠菌尿路感染的病例并不少见，主要原因可能基于以下两方面：第一方面，涉及肾脏和膀胱的浸润性实质性尿路感染除了依赖于有效的尿药浓度，更多地取决于药物的组织和血清浓度^[4]，棘白菌素在肾脏中浓度高，卡泊芬净在肾脏中的浓度仅次于肝脏和脾脏^[22]，可以达到有效治疗浓度；第二方面，棘白菌素为浓度依赖型药物， C_{max}/MIC 及 AUC_{0-24}/MIC 是评价其临床疗效的 PK/PD 指标^[23]，针对念珠菌， $C_{max}/MIC > 10$ 是 PK/PD 目标值^[24]。由于棘白菌素的尿排泄量低，其治疗念珠菌尿路感染的 PK/PD 研究较少，一项关于米卡芬净的 PK/PD 研究提出 $C_{max}/MIC \geq 4$ 能预测米卡芬净治疗念珠菌尿路感染的疗效，该项研究显示所有患者（6/6，100%）血浆中 PK/PD 目标值均达标（ $C_{max}/MIC > 10$ ），大部分患者（5/6，83.3%）尿液中 PK/PD 目标值达标（ $C_{ur}/MIC > 4$ ），且达标的 5 例患者中有 3 例患者 $C_{ur}/MIC > 10$ ^[25]。由此可见，棘白菌素对尿路中常见念珠菌高度敏感，MIC 值较低，但是 C_{ur}/MIC 也能达到 PK/PD 目标值 4 甚至 10 以上。因此，虽然棘白菌素类药物尿液浓度低，但是对于累及肾脏和膀胱实质的复杂性尿路感染，仍然能达到一定的治疗水平。

治疗药物监测（TDM）常用于监测抗真菌药物浓度，以防止用药过量或不足，有影响药物吸收、分布或排泄的情况应考虑进行 TDM^[21]。棘白菌素安全性较好，一般情况下，无需常规进行 TDM^[26-27]，但是 TDM 的开展对于部分人群仍具有重要意义，包括新生儿、儿童、肥胖患者、肝肾肾功能不全、危重患者（包括烧伤患者）和血液病患者^[27]，这类人群在特殊的生理病理状态下，可能由于肥胖、低蛋白血症、肝损伤、肾脏替代治疗（CRRT）、体外膜肺氧合（ECMO）和潜在的药物相互作用^[28]等因素导致 PK 参数发生变化，从而无法达到 PK/PD 目标值，标准给药方案既可能过多暴露导致不良反应发生，也具有相当

大的低暴露风险导致疗效不佳，还会导致耐药性的出现，因此有必要对棘白菌素进行 TDM，进而建立个体化给药方案，实现最佳治疗。棘白菌素的抗菌药效与药物暴露有关，对于已知暴露风险的患者，应考虑进行 TDM，适时调整给药剂量，提高其治疗效果，降低不良反应，减少变异性和耐药性的发生。此外，还可根据谷浓度来评价棘白菌素的给药方案，研究显示，卡泊芬净对念珠菌的目标谷浓度应大于 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[27]，但是谷浓度与 MIC 及其临床疗效之间的关系仍需要更多大样本的数据进行研究。目前，临床上主要关注棘白菌素的血浆药物浓度，而当此类药物用于治疗念珠菌尿路感染时，尽管其在尿中排泄率低，但同时监测其尿液中药物浓度，可能有助于实现最佳 PK/PD 指标，最大限度地提高疗效和防止获得性耐药。相信随着更多的临床研究和实践经验的积累，棘白菌素的 TDM 技术将获得更快的发展。

总之，念珠菌尿路感染的治疗是一个常见的挑战，无症状念珠菌尿路感染通常不需要抗真菌治疗，症状性念珠菌尿路感染通常为复杂性尿路感染，目前常规治疗方案是氟康唑、两性霉素 B 或氟胞嘧啶，当常规治疗药物治疗失败或无法选用时，卡泊芬净也是一种选择，可以谨慎用于挽救性治疗，但是已报道的研究总体样本量偏小，缺乏大规模的循证学证据，期待有更大样本、高质量的临床对照研究来进一步证实卡泊芬净治疗念珠菌尿路感染的有效性和安全性。

参考文献

- [1] Fisher JF, Sobel JD, Kauffman CA, et al. Candida urinary tract infections—treatment [J]. Clin Infect Dis, 2011, 52 (Suppl 6): S457-466.
- [2] Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America [J]. Clin Infect Dis, 2016, 62 (4): e1-50.
- [3] Charlier C, El Sissy C, Bachelier-Bassi S, et al. Acquired flucytosine resistance during combination therapy with caspofungin and flucytosine for candida glabrata cystitis [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2016, 60 (1): 662-665.
- [4] Sobel JD, Bradshaw SK, Lipka CJ, et al. Caspofungin in the treatment of symptomatic candiduria [J]. Clin Infect Dis, 2007, 44 (5): e46-49.
- [5] 刘萌. 卡泊芬净治疗泌尿道真菌感染 1 例个案报道并文献复习 [J]. 临床药物治疗杂志, 2018, 16 (7): 89-92.
- [6] 李谷雨, 金祥龙, 付丽香, 等. 卡泊芬净治疗泌尿系

- 真菌感染一例[J]. 临床药物治疗杂志, 2022, 20(8): 80-82.
- [7] 陈亚玲, 陈伟, 孙丙虎, 等. 应用卡泊芬净治疗氟康唑耐药热带念珠菌尿路感染 1 例[J]. 中国艾滋病性病, 2019, 25(9): 974-975.
- [8] Rezai MS, Vaezi A, Fakhim H, et al. Successful treatment with caspofungin of candiduria in a child with Wilms tumor; review of literature [J]. *J Mycol Med*, 2017, 27(2): 261-265.
- [9] Rkieh L, El Nekidy WS, Alsoud LO, et al. Outcomes of caspofungin use in the treatment of Candida-related urinary tract infections, a case series [J]. *IDCases*, 2022, 28: e01510.
- [10] Kishel JJ, Arunkumar P. Two approaches to treatment of complicated candida glabrata urinary tract infection in renal failure [J]. *J Pharm Technol*, 2006, 22(1): 48-51.
- [11] Malani, Anurag N. Failure of caspofungin for treatment of candida glabrata candiduria: case report and review of the literature [J]. *Infect Dis Clin Prac*, 2010, 18(4): 271-272.
- [12] Klein RD, Hultgren SJ. Urinary tract infections: microbial pathogenesis, host-pathogen interactions and new treatment strategies [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2020, 18(4): 211-226.
- [13] 陈楠. 尿路感染的抗真菌治疗 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2011, 11(2): 119-120.
- [14] Weiner LM, Webb AK, Limbago B, et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the national healthcare safety network at the centers for disease control and prevention, 2011—2014 [J]. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2016, 37(11): 1288-1301.
- [15] Odabasi Z, Mert A. Candida urinary tract infections in adults [J]. *World J Urol*, 2020, 38(11): 2699-2707.
- [16] 尿路感染诊断与治疗中国专家共识编写组. 尿路感染诊断与治疗中国专家共识(2015版)——复杂性尿路感染 [J]. 中华泌尿外科杂志, 2015, 36(4): 241-244.
- [17] 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.
- [18] Szymański M, Chmielewska S, Czyżewska U, et al. Echinocandins-structure, mechanism of action and use in antifungal therapy [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2022, 37(1): 876-894.
- [19] Mora-Duarte J, Betts R, Rotstein C, et al. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis [J]. *N Engl J Med*, 2002, 347(25): 2020-2029.
- [20] Cornely OA, Vehreschild JJ, Vehreschild MJ, et al. Phase II dose escalation study of caspofungin for invasive Aspergillosis [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(12): 5798-5803.
- [21] Soriano A, Honore PM, Puerta-Alcalde P, et al. Invasive candidiasis: current clinical challenges and unmet needs in adult populations [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2023, 78(7): 1569-1585.
- [22] Marx J, Reinstadler V, Gasperetti T, et al. Human tissue distribution of caspofungin [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2022, 59(4): 106553.
- [23] Carmo A, Rocha M, Pereirinha P, et al. Antifungals: from pharmacokinetics to clinical practice [J]. *Antibiotics (Basel)*, 2023, 12(5): 884.
- [24] Andes D. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antifungals [J]. *Infect Dis Clin North Am*, 2006, 20(3): 679-697.
- [25] Grau S, Luque S, Echeverría-Esnal D, et al. Urinary micafungin levels are sufficient to treat urinary tract infections caused by Candida spp [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2016, 48(2): 212-214.
- [26] Lewis RE, Andes DR. Managing uncertainty in antifungal dosing: antibiograms, therapeutic drug monitoring and drug-drug interactions [J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2021, 34(4): 288-296.
- [27] Gómez-López A. Antifungal therapeutic drug monitoring: focus on drugs without a clear recommendation [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2020, 26(11): 1481-1487.
- [28] Kim HY, Baldelli S, Märtsen AG, et al. Therapeutic drug monitoring of the echinocandin antifungal agents: is there a role in clinical practice? A position statement of the anti-infective drugs committee of the international association of therapeutic drug monitoring and clinical toxicology [J]. *Ther Drug Monit*, 2022, 44(1): 198-214.

(收稿日期: 2023-08-18; 修回日期: 2023-09-18)

临床药师参与免疫相关性垂体炎继发肾上腺皮质功能不全诊治的药学实践

周玉冰, 张爱玲, 张文达, 汪新茹, 李朵璐* (郑州大学第一附属医院药学部, 郑州 450052)

摘要: 免疫检查点抑制剂 (ICIs) 所致免疫相关性垂体炎继发肾上腺皮质功能发生率低, 但预后不良, 早期识别、及时干预对改善患者临床预后至关重要。本案例中, 临床药师根据肺癌患者用药史、不良反应的临床表现及辅助检查结果, 结合 ICIs 相关不良反应谱、相关指南、共识和文献资料, 进行药品不良反应关联性分析, 协助临床医师为患者明确诊断为 ICIs 所致免疫相关性垂体炎继发肾上腺皮质功能不全, 进一步与临床医师共同制订不良反应处理方案, 并对患者进行用药教育。经及时、规范治疗, 患者免疫相关性垂体炎继发肾上腺皮质功能不全症状完全纠正。临床药师应用药学专业技术知识, 协助临床医师及时、准确识别 ICIs 相关不良反应, 并为患者提供药学监护和用药指导, 保障患者用药安全, 提高 ICIs 的临床合理应用水平, 体现临床药师专业价值。

关键词: 临床药师; 免疫检查点抑制剂; 免疫相关不良事件; 垂体炎; 肾上腺皮质功能不全; 药学实践

中图分类号: R969.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)07-1949-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.047

Pharmaceutical practice in the diagnosis and treatment of adrenal insufficiency secondary to immune-related hypophysitis

ZHOU Yu-bing, ZHANG Ai-ling, ZHANG Wen-da, WANG Xin-ru, LI Duo-lu* (*Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052*)

Abstract: The incidence of adrenal insufficiency secondary to immune-related hypophysitis caused by immune checkpoint inhibitors (ICIs) is low, but the prognosis is poor. Early identification and timely intervention are crucial for a good outcome. In this pharmaceutical practice, clinical pharmacists assisted clinical physicians in diagnosing adrenal insufficiency secondary to immune-related hypophysitis caused by ICIs, based on patient's medication history, clinical manifestations of adverse reactions, auxiliary examination results and ICIs-related adverse reaction spectrum, relevant guidelines, consensus, and literature materials. Clinical pharmacists further collaborated with clinical physicians to develop an adverse reaction management plan and monitored medication use in patients. After timely and standardized treatment, the symptoms of adrenal insufficiency secondary to immune-related hypophysitis were completely improved. Clinical pharmacists used pharmaceutical knowledge to help clinical physicians timely and accurately identify adverse reactions related to ICIs, provided medication guidance for patients, ensured medication safety, and improved the rational application of ICIs.

Key words: clinical pharmacist; immune checkpoint inhibitor; immune related adverse event; hypophysitis; adrenal insufficiency; pharmaceutical practice

以程序性细胞死亡蛋白受体 1 (programmed cell death receptor-1, PD-1) / 程序性细胞死亡蛋白配体 1 (programmed cell death ligand-1, PD-L1) 单抗为代表的免疫检查点抑制剂 (immune

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 81402266); 河南省卫生健康科技创新杰出青年人才培养项目 (No. YXKC2020032)。

作者简介: 周玉冰, 男, 副主任药师, 主要从事肿瘤临床药学研究, email: fcczhouyb@zzu.edu.cn ***通信作者:** 李朵璐, 女, 主任药师, 主要从事肿瘤临床药学研究, email: dorali1979@126.com

checkpoint inhibitors, ICIs) 具有持久应答、长期生存的临床特点,正在改变大多数肿瘤的临床治疗格局^[1-2]。目前,国内已有 16 个 PD-1/PD-L1 抑制剂应用于临床治疗,大大提高了临床医师药物的选择性和患者用药的可及性。然而,随着免疫治疗药物的广泛应用,免疫治疗相关不良事件(immunorelated adverse events, irAEs) 日益增多,尤其是一些严重的或致死性的毒性,给免疫治疗药物的临床应用带来困扰^[3-4]。irAEs 的早期识别和及时干预对改善相关不良事件临床转归具有重要意义。ICIs 治疗相关内分泌毒性是肿瘤免疫治疗常见的一类 irAEs,因其大多缺乏典型的临床表现,为相关不良反应的尽早识别和处理带来一定的困难^[5]。本文就临床药师参与 ICIs 所致免疫相关性垂体炎继发肾上腺皮质功能不全患者的诊治和药学监护实践进行分析,为此类患者的临床药学服务提供参考。

1 病历资料

患者,女,58 岁,身高 158 cm,体重 60 kg,以“确诊肺鳞癌 2 年余,全身疼痛、乏力 2 周余”为主诉入院。患者 2 年余前因刺激性咳嗽到当地医院就诊,胸部 X 线检查提示中心型肺癌,建议进一步检查确诊。遂到我院行 PET-CT 检查提示:右肺下叶软组织肿块代谢活跃,符合肺癌;纵隔(7 区)及右肺门肿大淋巴结代谢活跃,多考虑转移。行肺穿刺活检病理,结合免疫组化,确诊为肺鳞癌。排除禁忌后,患者规律接受信迪利单抗注射液[信达生物制药(苏州)有限公司,生产批号:DT2111019]治疗 14 周期(200 mg,每 3 周 1 次,即一周期)。免疫治疗期间,第 2、5、7、9 周期疗效评价持续部分缓解(PR),第 11 周期疗效评价疾病稳定(SD)。患者 2 周余前在家期间出现全身肌肉疼痛,极度乏力,不能站立和行走,恶心,呕吐,自觉有濒死感,呈进行性加重,在当地医院急诊测血压 80/40 mmHg(1 mmHg = 133.2 Pa),经补液支持治疗后升至 95/60 mmHg,但临床症状未见明显缓解。为求进一步诊治,患者入住我院肿瘤科。入院后,根据患者用药史及不良反应的临床表现,临床药师和主治医师均考虑患者为 irAEs,急查肌酸激酶、乳酸脱氢酶、谷草转氨酶、肌钙蛋白、钠尿肽等结果均无异常,初步排除免疫相关性心肌炎/肌炎。进一步行脑垂体和肾上腺皮质功能检查,结果回示:促肾上腺皮质激素(ACTH)上午 8 时 < 5 pg · mL⁻¹,皮质醇上午 8 时 < 1.00 μg · dL⁻¹; ACTH 凌晨

12 时 8.31 pg · mL⁻¹,皮质醇凌晨 12 时 < 1.00 μg · dL⁻¹; ACTH 下午 4 时 < 5 pg · mL⁻¹,皮质醇下午 4 时 < 1.00 μg · dL⁻¹。MRI 检查结果提示:双侧额叶轻度脑白质脱髓鞘;双侧上颌窦炎症;增强扫描提示肾上腺功能不全。患者既往接受信迪利单抗治疗多个周期,未出现类似症状,无其他药物过敏史。根据患者用药史、不良反应特征及辅助检查结果,诊断为免疫相关性垂体炎继发肾上腺皮质功能不全。明确诊断后,暂停原计划的信迪利单抗治疗,口服泼尼松片 60 mg,每日 1 次,并给予对症支持处理。临床药师对患者开展药学监护和不良反应监测评估发现,患者服用泼尼松片 3 ~ 4 h 后自觉全身疼痛、乏力和恶心等症状即有明显减轻,24 h 后上述症状完全消失,进食、行走等日常活动恢复正常。次日患者出院,临床药师为患者进行用药交代,嘱患者院外继续口服泼尼松片,每 5 日减量 10 mg(2 片),直至停药,定期监测激素水平。临床药师通过电话和微信进行全程跟踪随访患者院外用药情况,并给予用药指导和用药监护,嘱患者按周期继续至医院接受抗肿瘤治疗,每次入院为患者进行药物重整,治疗方案调整,药学监护及在院用药教育,共治疗 6 个周期。

2 讨论

2.1 免疫相关性垂体炎继发肾上腺皮质功能不全的早期识别与诊断

ICIs 通过解除机体的免疫抑制状态,重启免疫细胞对肿瘤细胞的识别和杀伤,达到治疗肿瘤的效果。但 ICIs 的应用可能会导致机体免疫系统的过度活化,对机体产生非特异性损伤,导致 irAEs^[6]。irAEs 几乎可以累及人体所有器官和系统,其中内分泌系统主要累及脑垂体、甲状腺、肾上腺、胰腺,导致患者出现垂体炎、甲状腺功能减退、甲状腺功能亢进、肾上腺皮质功能不全、高血糖等症状^[7]。不同 ICIs 治疗方案导致垂体炎发生概率和发病时间不同。荟萃分析显示,细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 4(CTLA-4) 抗体诱发垂体炎的发生率较高,约为 3.2%^[8]; PD-1 抗体诱发垂体炎的发生率仅为 0.4%,而 PD-L1 抗体诱发垂体炎的发生率 < 0.1%,CTLA-4 抗体联合 PD-L1 抗体治疗诱发垂体炎的风险高达 6.4%。联合治疗时出现垂体炎的时间相对较早,平均在 1 个月内,单用 CTLA-4 抑制剂时发生垂体炎的时间为 2 ~ 3 个月,单用 PD-1/PD-L1 抑制剂时发生垂体炎的时间为 3 ~ 5 个月。本例免疫相关性垂体炎继发

肾上腺皮质功能不全发生时间相对较晚，在接受 PD-1/PD-L1 抑制剂治疗 14 周期后发生。目前免疫相关性垂体炎发病机制尚不完全明确，可能与药物介导的免疫反应产生抗垂体细胞抗体有关^[9]。

免疫相关性垂体炎最常见的临床表现为头痛和疲劳，也可能表现为恶心、食欲减退、头晕、虚弱、低血压、女性闭经、男性勃起功能障碍及性欲减退等。部分垂体炎严重者可出现肾上腺危象，典型临床表现有低血压或休克、发热、恶心、呕吐、意识障碍、电解质紊乱等，可能危及生命^[9-10]。免疫相关性垂体炎继发肾上腺皮质功能不全为免疫治疗破坏垂体-肾上腺轴功能，致 ACTH 和皮质醇激素水平下降，同时可能伴有垂体和肾上腺的影像学结构改变。本例患者应用 PD-1/PD-L1 抑制剂治疗 14 个周期后出现全身肌肉疼痛，恶心呕吐，极度乏力，不能站立和行走，伴濒死感等表现。患者入院后首先考虑免疫相关性心肌炎/肌炎，但经实验室检查，心肌损伤标志物、炎症标志物、利钠肽、D-二聚体等均在正常范围（见表 1），初步排除心肌炎/肌炎，进一步考虑免疫相关性垂体炎所致肾上腺危象的可能。脑垂体和肾上腺皮质功能检查结果回示 ACTH 和皮质醇均显著降低（见表 1），MRI 检查提示肾上腺功能不全。根据患者用药史、不良反应特征及辅助检查结果，该例患者明确诊断为免疫相关性垂体炎继发肾上腺皮质功能不全，及时补充糖皮质激素后临床症状显著缓解。

表 1 患者不良反应发生前后相关实验室检查结果

Tab 1 Related laboratory examination before and after adverse events

检测项目	基线水平	irAEs 发生时水平	irAEs 缓解后水平	正常范围
ACTH 上午 8 时 / (pg · mL ⁻¹)	/	< 5	7	7.0 ~ 61.1
皮质醇上午 8 时 / (μg · dL ⁻¹)	/	< 1.00	< 1.00	5 ~ 25
ACTH 凌晨 12 时 / (pg · mL ⁻¹)	/	8.31	< 5	/
皮质醇凌晨 12 时 / (μg · dL ⁻¹)	/	< 1.00	< 1.00	/
ACTH 下午 4 时 / (pg · mL ⁻¹)	/	< 5	< 5	/
皮质醇下午 4 时 / (μg · dL ⁻¹)	/	< 1.00	< 1.00	/
肌酸激酶 / (U · L ⁻¹)	65	66	33	26 ~ 192
乳酸脱氢酶 / (U · L ⁻¹)	231	175	186	75 ~ 245
谷草转氨酶 / (U · L ⁻¹)	17	38	17	0 ~ 40
B 型钠尿肽前体 / (pg · mL ⁻¹)	/	118	/	0 ~ 150
心肌肌钙蛋白 / (ng · mL ⁻¹)	/	0.01	/	0 ~ 0.01
D-二聚体 / (mg · L ⁻¹)	0.04	0.15	0.24	0 ~ 0.55

2.2 免疫相关性垂体炎继发肾上腺皮质功能不全的药学监护与临床处理

根据 CTCAE 分级标准，免疫相关性垂体炎根据疾病的严重程度分为 5 级，1 级为无症状或

轻度症状；2 级为中度症状，日常活动不受限；3 级为重度症状，影响日常活动；4 级为严重症状，危及生命，不能进行日常活动，5 级为患者死亡。根据不同分级，免疫相关性垂体炎继发肾上腺皮质功能不全的处理主要需要做好激素替代治疗和是否重启 ICIs 治疗两方面工作。本例患者出现低血压、休克等垂体危象，继发肾上腺危象，评估为 4 级不良反应。

内分泌激素替代治疗方面，提倡早期积极治疗，当临床上有可疑垂体功能减退的征象，如患者出现恶心、呕吐、乏力、低血压、低钠血症等症状，应积极完善相关检查，尽早明确不良反应的诊断和分级，及时启动糖皮质激素治疗，避免垂体危象或肾上腺危象的发生或加重。另外，要做好糖皮质激素的长期用药监测和缓慢减量停药，并注意激素长期应用所致不良反应的识别和处理^[11]。

关于免疫相关性垂体炎继发肾上腺皮质功能不全纠正后是否重启 ICIs 治疗，《免疫检查点抑制剂引起的内分泌系统免疫相关不良反应专家共识（2020）》建议^[11]，对于 1 级或 2 级的垂体功能减退，可以继续使用 ICIs 治疗，并密切监测，继续 ICIs 治疗的生存获益远大于垂体功能减退的弊端；对于严重的 ICIs 相关垂体炎（3 级或 4 级），急性期应暂停 ICIs 类药物治疗，当激素替代治疗改善患者症状后，可与患者讨论 ICIs 治疗风险与获益的情况下，考虑是否继续使用 ICIs。结合《CSCO 免疫检查点抑制剂相关的毒性管理指南（2023）》中重启免疫检查点抑制剂治疗所致毒性管理建议^[12]，在激素治疗后症状消失时，可以重启 ICIs 治疗。本例患者前期 ICIs 治疗临床获益明显，本次免疫相关性垂体炎症状经激素治疗后完全消失，因此临床药师建议患者在替代性内分泌治疗的情况下重启 ICIs 治疗，临床做好相关监测和随访。

3 临床药师参与免疫治疗相关不良反应药学监护与处置的体会

免疫治疗相关不良反应涉及人体多个系统^[13]，内分泌腺体是较常受累的靶点之一，但 PD-1/PD-L1 抑制剂致垂体炎的发生率相对较低，其临床常表现为头痛、疲劳、厌食症、低钠血症等，缺乏特异性，临床上往往被误认为与原发病或者其他疾病相关而出现漏诊、误诊。PD-1/PD-L1 抑制剂相关垂体炎的早期识别和及时干预是避免发生垂体危象或肾上腺危象的关键所在。

因此, 在开始 ICIs 治疗前, 进行 ACTH、促甲状腺激素 (TSH)、游离三碘甲状腺原氨酸 (FT₃)、游离甲状腺素 (FT₄)、皮质醇等基线水平的检查是非常必要的。另外, 免疫治疗相关不良反应纠正后是否重启免疫治疗对肿瘤患者的治疗获益和临床安全至关重要, 需要根据不同器官/系统免疫相关不良反应的分级进行决定。本病例中, 临床药师根据《CSCO 免疫检查点抑制剂相关的毒性管理指南 (2023)》^[12] 和患者不良反应纠正情况, 建议主治医师为患者重启免疫治疗, 保障患者继续从免疫治疗中获益。后期经过 6 个治疗周期的随访证实, 患者经免疫维持治疗, 实现长期疾病稳定, 且未再次发生免疫相关不良反应。

此外, 临床药师全程跟踪随访患者院外泼尼松片的服用, 给予用药指导和用药监护, 保障糖皮质激素的有效应用和安全减量, 直至停药。不足之处是患者免疫治疗前没有进行全面系统的内分泌功能检测, 缺少基线参考值。临床药师在今后的临床实践中需进一步加强与临床医师的沟通, 完善免疫治疗患者基线水平的检查。总之, 临床药师在对 ICIs 进行药学监护时, 应注意治疗前、治疗中以及治疗后的全程监测, 确保免疫治疗相关不良反应的早期识别、及时处理, 保障患者免疫治疗的用药安全。

参考文献

- [1] Kraehenbuehl L, Weng CH, Eghbali S, et al. Enhancing immunotherapy in cancer by targeting emerging immunomodulatory pathways [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2022, 19 (1): 37-50.
- [2] Bagchi S, Yuan R, Engleman EG. Immune checkpoint inhibitors for the treatment of cancer: clinical impact and mechanisms of response and resistance [J]. *Annu Rev Pathol*, 2021, 16: 223-249.
- [3] Ramos-Casals M, Brahmer JR, Callahan MK, et al. Immune-related adverse events of checkpoint inhibitors [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2020, 6 (1): 38.
- [4] Darnell EP, Mooradian MJ, Baruch EN, et al. Immune-related adverse events (irAEs): diagnosis, management, and clinical Pearls [J]. *Curr Oncol Rep*, 2020, 22 (4): 39.
- [5] Wright JJ, Powers AC, Johnson DB. Endocrine toxicities of immune checkpoint inhibitors [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2021, 17 (7): 389-399.
- [6] Lee DJ, Lee HJ Jr, Farmer JR, et al. Mechanisms driving immune-related adverse events in cancer patients treated with immune checkpoint inhibitors [J]. *Curr Cardiol Rep*, 2021, 23 (8): 98.
- [7] Wright JJ, Powers AC, Johnson DB. Endocrine toxicities of immune checkpoint inhibitors [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2021, 17 (7): 389-399.
- [8] Barroso-Sousa R, Barry WT, Garrido-Castro AC, et al. Incidence of endocrine dysfunction following the use of different immune checkpoint inhibitor regimens: a systematic review and meta-analysis [J]. *JAMA Oncol*, 2018, 4 (2): 173-182.
- [9] Stelmachowska-Banas M, Czajka-Oraniec I. Management of endocrine immune-related adverse events of immune checkpoint inhibitors: an updated review [J]. *Endocr Connect*, 2020, 9 (10): 207-228.
- [10] Mizukoshi T, Fukuoka H, Takahashi Y. Immune checkpoint inhibitor-related hypophysitis [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2022, 36 (3): 101668.
- [11] 中华医学会内分泌学分会免疫内分泌学组. 免疫检查点抑制剂引起的内分泌系统免疫相关不良反应专家共识 (2020) [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2021, 37 (1): 1-16.
- [12] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会. 中国临床肿瘤学会 (CSCO) 免疫检查点抑制剂相关的毒性管理指南 2023[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2023.
- [13] 李哲, 孙一琦, 何超然, 等. 某院 PD-1 免疫检查点抑制剂致不良反应的发生情况及分析 [J]. *中南药学*, 2021, 19 (9): 1942-1946.

(收稿日期: 2023-10-12; 修回日期: 2023-12-08)

1 例暴发性心肌炎行体外膜肺氧合联合连续肾脏替代治疗继发动脉血栓患儿个体化抗栓治疗分析

高年婷^{1,3}, 王欣怡², 李波霞^{3*} (1.青海省交通医院药剂科, 西宁 810000; 2.兰州大学第一临床医学院, 兰州 730000; 3.兰州大学第一医院药剂科, 兰州 730000)

摘要: 本文报道了 1 例暴发性心肌炎儿童患者经体外膜肺氧合 (ECMO) 联合连续肾脏替代治疗 (CRRT) 后继发导管相关性下肢动脉血栓, 临床药师通过查阅文献及循证证据, 结合动脉血栓特点制订个体化的抗栓治疗方案, 并进行药学监护, 最终患儿转归良好。患儿 ECMO 抗凝治疗仍缺少大规模研究, 目前为止尚缺少权威性指南。临床药师应熟练掌握抗栓药物特点, 结合患者个体情况权衡风险和获益, 协助医师制订个体化治疗方案, 提高临床药物治疗的有效性和安全性。

关键词: 暴发性心肌炎; 体外膜肺氧合; 连续肾脏替代治疗; 下肢动脉血栓形成; 抗血栓治疗

中图分类号: R542.2 + 1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)07-1953-04

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.048

Individualized antithrombotic therapy for a child suffering from fulminant myocarditis with arterial thrombosis secondary to extracorporeal membrane oxygenation combined with continuous renal replacement therapy

GAO Nian-ting^{1,3}, WANG Xin-yi², LI Bo-xia^{3*} (1. Department of Pharmacy, Qinghai Traffic Hospital, Xining 810000; 2. The First Clinical Medical College of Lanzhou University, Lanzhou 730000; 3. Department of Pharmacy, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000)

Abstract: This article reported a case of catheter-related lower extremity arterial thrombosis in a child suffering from fulminant myocarditis treated with extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) and continuous renal replacement therapy (CRRT). Clinical pharmacists developed individualized antithrombotic therapy based on literatures and evidences, and conducted pharmaceutical monitoring. The child had a good outcome. There is not enough lack of large-scale studies on anticoagulation therapy with ECMO in children, and lacks authoritative guidelines. Clinical pharmacists should be familiar with the characteristics of antithrombotic drugs, assist physicians to establish individualized treatment plans, and improve the effectiveness and safety of clinical drugs.

Key words: fulminant myocarditis; extracorporeal membrane oxygenation; continuous renal replacement therapy; thrombosis of artery of the lower extremity; antithrombotic therapy

暴发性心肌炎是心肌炎最严重的类型, 起病急骤, 病情进展迅速, 与严重心律失常及血流动力学异常相关, 此外, 还可引起呼吸和肝肾功能衰竭。体外膜肺氧合 (extracorporeal membrane oxygenation, ECMO) 联合连续肾脏替代治疗

(continuous renal replacement therapy, CRRT) 作为暴发性心肌炎患者体外循环支持治疗措施广泛应用于临床, ECMO 代替受损心肺维持脏器氧合血供, 使心脏得到充分休息, 为受损心肌功能恢复提供时间。CRRT 代替受损肾脏, 模拟肾小球

基金项目: 甘肃省科技计划项目 (No.21JR7RA380)。

作者简介: 高年婷, 女, 主管药师, 主要从事临床药学工作, email: 654311982@qq.com * **通信作者:** 李波霞, 女, 副主任药师, 主要从事临床药学抗凝治疗研究, email: 18693578418@163.com

的滤过功能，过滤血液中炎症因子和毒素，净化血液。治疗期间，患儿因长期卧床制动，导管穿刺及血液高凝状态等原因易引发血栓栓塞事件。出血和血栓是 ECMO 治疗中常见的并发症^[1]。

1 病历资料

患者，男性，11 岁，30 kg，于 2022 年 9 月 12 日因“暴发性心肌炎”由临夏州人民医院转入兰州大学第一医院 PICU。患儿于入院前咳嗽伴发热 5 d，呕吐 2 次，呕吐物为胃内容物，抽搐 1 次，紧急送往当地医院，诊断为“暴发性心肌炎”，给予抗感染对症治疗后未见好转，急诊转入兰州大学第一医院 PICU。入院查体：体温 36.5℃，脉搏 141 次·min⁻¹，呼吸 42 次·min⁻¹，血压 60/40 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa) [多巴胺 10 μg/(kg·min) 持续泵入]。心脏彩超：①左室心尖部血栓形成 (1.3 cm×1.1 cm)；②左室收缩及舒张功能减低。彩色血流：二尖瓣反流 (中度)，三尖瓣反流 (轻度)。生化：谷丙转氨酶 (ALT) 22 U·L⁻¹，谷草转氨酶 (AST)/ALT 1.95↑，总胆红素 (TBIL) 7.8 μmol·L⁻¹，肌酐 (SCr) 44.3 μmol·L⁻¹↓，乳酸脱氢酶 (LDH) 486 U·L⁻¹↑，肌红蛋白 (Mb) 27.20 ng·mL⁻¹，肌酸激酶同工酶 (CK-MB) 59.67 ng·mL⁻¹↑，肌钙蛋白 I (cTnI) 0.81 ng·mL⁻¹↑，氨基末端脑钠肽前体 (NT-proBNP) 28 580.5 pg·mL⁻¹↑。入院诊断：①暴发性心肌炎；②心源性休克；③心尖部血栓；④心力衰竭；⑤重症肺炎。

2 入院诊疗经过

患儿收入 PICU 后立刻进行抢救，给予面罩吸氧、ECMO (V-A 模式：设定流量 1.5~2 L·min⁻¹、转速 2500 r·min⁻¹、氧浓度 100%、通气量 1.2 L·min⁻¹) 支持治疗，注射用盐酸多巴胺 10 μg/(kg·min) qd，静脉泵入，盐酸肾上腺素注射液 0.05 μg/(kg·min) qd 静脉持续泵入强心、改善循环；注射用比伐卢定 0.25 g qd 静脉泵入 [根据活化部分凝血酶原时间 (APTT) 动态调整滴速] 抗凝；碳酸氢钠注射液 2.0 g qd 静脉泵入纠正酸中毒；注射用甲泼尼龙琥珀酸钠 80 mg qd 静脉泵入抑制炎症反应；西咪替丁注射液 0.2 g qd，静脉泵入保护胃黏膜；注射用磷酸肌酸钠 1 g qd 静脉泵入营养心肌；注射用氟氯西林钠 1.5 g bid 静脉泵入抗感染治疗。9 月 13 日，持续 ECMO 支持下联合 CRRT，清除炎症因子，加用帕拉米韦氯化钠注射液 0.3 g qd 静脉泵入，注射用阿昔洛韦 0.15 g bid 静脉泵入抗病毒治疗；酒石酸美托洛尔片 25 mg qd po，螺内酯片 10 mg

bid po，沙库巴曲缬沙坦钠片 25 mg qd po，达格列净片 5 mg qd 口服联合抗心力衰竭治疗，持续静脉泵入比伐卢定抗凝治疗。9 月 15 日，观察到 ECMO 管路中有血栓形成，立即给予依诺肝素钠 30 mg 抗凝治疗。9 月 16 日，经心血管专科评估后予以撤除 ECMO。患儿右下肢肢端微凉，脉搏微弱，右下肢皮肤呈花斑样，毛细血管再充盈时间大于 5 s，患儿自觉右下肢麻木，疼痛难忍。凝血指标：凝血酶原时间 (PT) 13.1 s，国际标准化比值 (INR) 1.18，纤维蛋白原 (FIB) 1.46 g·L⁻¹↓，D-二聚体 (D-D) 5.93 μg·mL⁻¹↑，纤维蛋白 (原) 降解产物 (FDP) 17.23 μg·mL⁻¹↑。床旁超声提示右侧下肢动脉血栓形成，复查心脏彩超未提示心尖部血栓。邀请介入医学科、药剂科会诊明确是否急诊行介入下取栓术及术后溶栓方案。介入科医师和临床药师了解病情并查看患儿后，建议行下肢动脉造影并球囊扩张成形术，术后给予注射用尿激酶 20 万 U qd 静脉泵入，联合注射用比伐卢定 0.11 g qd 静脉泵入，溶栓治疗，警惕心尖血栓脱落致脏器栓塞，医师采纳建议。术后患儿右下肢麻木疼痛感消失，右下肢皮肤花斑样改善，毛细血管再充盈时间大于 3.5 s。术后复查凝血指标：PT 15.1 s↑，INR 1.36↑，FIB 1.57 g·L⁻¹↓，D-D 4.64 μg·mL⁻¹↑，APTT 51.2 s↑。9 月 18 日，撤除动脉置管，复查下肢动脉超声提示右侧股动脉血栓，范围大，FIB 2.08 g·L⁻¹，APTT 39.3 s，D-D 2.12 μg·mL⁻¹↑，FDP 5.87 μg·mL⁻¹↑。邀请介入医学科、药剂科会诊，调整抗栓方案。介入科医师明确患儿为右下肢股浅动脉急性血栓形成，建议停用比伐卢定，给予依诺肝素钠注射液 30 mg bid 皮下注射，临床药师建议联合阿司匹林 50 mg bid 口服，抗栓治疗，积极完善狼疮抗凝物、血栓性疾病全项、凝血因子全项及自身抗体检测，以明确患儿血栓风险因素，警惕易栓症，医师采纳建议。9 月 20 日，患儿右下肢肢端暖，脉搏较前增强，皮肤花斑消失。复查凝血指标：PT 12.6 s，INR 1.14，FIB 2.37 g·L⁻¹，D-D 1.5 μg·mL⁻¹↑，FDP 3.17 μg·mL⁻¹，抗栓治疗效果明显，停用注射用尿激酶。复查狼疮抗凝物、血栓性疾病全项、凝血因子全项、自身抗体均未见明显异常。患儿无明显易栓因素，考虑此次为继发性血栓。9 月 26 日，患儿心源性休克、心力衰竭、代谢性酸中毒纠正，心尖部血栓未见，双下肢动静脉未见异常，凝血功能：FIB 2.04 g·L⁻¹，D-D 0.51 μg·mL⁻¹，病情好转出院。出院带药：阿司匹林片 50 mg bid

口服，依诺肝素钠注射液 30 mg qd 皮下注射。嘱患儿动态复查凝血功能、血常规，门诊随诊调整药物剂量。

患儿治疗下肢动脉血栓期间凝血指标情况见图 1，药物使用情况见表 1。

3 分析与讨论

3.1 患儿心尖血栓及 ECMO 治疗期间血栓形成原因分析

患儿入院第 1 日心脏彩超示左室心尖部血栓形成，考虑与患儿入院时左心室扩大，左室壁运动搏幅减低，导致血液淤滞有关。患儿 ECMO

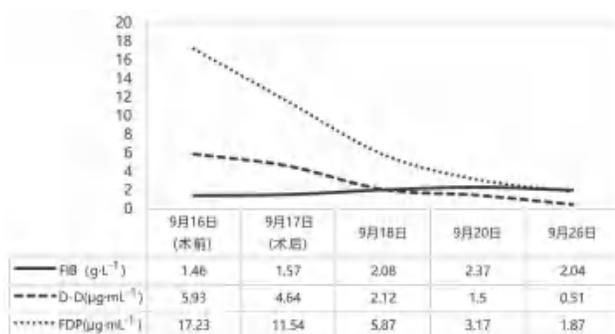


图 1 患儿治疗下肢动脉血栓期间凝血指标情况

Fig 1 Coagulation indices acquired while treating the lower extremity arterial thrombosis in the child

表 1 患儿治疗下肢动脉血栓期间药物使用情况

Tab 1 Antithrombotic drugs for the lower extremity arterial thrombosis in the child

药物名称	给药剂量	给药频次	给药途径	给药时间
注射用比伐卢定	根据 APTT 调整	qd	静脉泵入	9 月 12 日—9 月 19 日
注射用尿激酶	20 万 U	qd	静脉泵入	9 月 17 日—9 月 21 日
依诺肝素钠注射液	30 mg	bid	皮下注射	9 月 18 日—9 月 26 日
阿司匹林片	50 mg	bid	口服	9 月 19 日—9 月 26 日

(V-A 模式) 下治疗 4 d，撤机后下肢股动脉血栓形成，考虑与以下因素有关：ECMO 支持治疗期间导管致血管内皮损伤，在炎性介质、趋化因子等诱导下大量单核细胞聚集在一起形成动脉斑块，同时患儿伴心力衰竭、低血压、血液回流不畅等，导致血液呈高凝状态；ECMO 支持治疗期间管路中曾出现血凝块，依诺肝素抗凝治疗后凝块消失，既往研究报道 V-A 模式下管路中血栓可进入体循环，从而引发机体血栓形成，V-A 模式 ECMO 血栓形成的风险相较 V-V 模式下更高^[2]。

3.2 患儿右下肢股动脉血栓形成抗栓治疗分析

患儿于 9 月 16 日撤除 ECMO 后明确右下肢股动脉血栓形成，会诊后行“动脉球囊扩张成形术，股动脉置管溶栓术”，手术顺利。导管溶栓可使溶栓药物直接作用于血栓，可显著提高血栓溶解效率，但目前置管溶栓在儿童动脉血栓治疗中仍缺少临床研究。尿激酶能够直接催化裂解纤溶酶原成纤溶酶，促进纤溶，发挥溶栓作用。患儿此时处于血栓形成急性期，尝试给予尿激酶局部溶栓治疗。根据患儿体重推荐给予尿激酶 20 万 U qd 静脉泵入，同时监测凝血指标。

9 月 18 日复查示患儿下肢动脉超声提示右侧股浅动脉血栓形成。患儿溶栓效果不理想，再次会诊制订抗栓策略。介入科医师建议给予依诺肝素钠注射液 30 mg bid 皮下注射抗凝治疗。低分子肝素 (LMWH) 是普通肝素 (UFH) 经酶解得到的小分子短肽链，通过与抗凝血酶 III (ATIII) 结合形成复合物，增强 ATIII 对 Xa 因子和 IIa 因

子的抑制作用，此外 LMWH 还可以促进纤溶酶原激活以及抗血小板聚集，皮下注射吸收完全，生物利用度为 90%，相较于 UFH，LMWH 诱发肝素诱导的血小板减少症 (HIT) 发生率更低，目前常用作抗凝治疗的首选药物^[3-4]。动脉血栓形成特点^[5]：动脉血管管壁受损，炎性介质、趋化因子等诱导大量单核细胞聚集在一起形成动脉斑块，斑块脱落再次引起血管内皮损伤，活化的血小板产生聚集和黏附，斑块中的组织因子同时释放入血激活凝血系统。临床药师建议给予抗血小板联合抗凝治疗动脉血栓形成，给予患儿阿司匹林联合依诺肝素抗栓治疗。阿司匹林通过与环氧合酶活性部位不可逆结合，抑制花生四烯酸代谢，减少血栓素 A2 生成，抑制血小板聚集发挥抗血小板作用。戴辰程等^[6]报道了儿童心导管术后股动脉血栓形成后 24 h 内给予阿司匹林 (2.0 ~ 4.6 mg · kg⁻¹) 联合依诺肝素钠 (1 mg · kg⁻¹) 能有效缩短血管再通时间，通过联合用药的有效性和安全性分析，证明阿司匹林联合 LMWH 治疗儿童心导管术后股动脉血栓安全有效，但对于是否能降低血栓栓塞复发率仍缺少更大样本研究。Chechani 等^[7]报道阿司匹林联合 LMWH 抗栓治疗对儿童外周动脉血栓安全、有效。依诺肝素钠注射液及阿司匹林片在儿童抗凝及抗血小板聚集治疗中均未给出明确推荐剂量，结合既往临床研究，药师建议给予小剂量阿司匹林 50 mg bid po，依诺肝素钠注射液 30 mg bid 皮下注射抗栓治疗，医师采纳建议。

9 月 26 日, 复查双下肢彩超, 患儿双下肢动静脉未见异常, 凝血功能改善, 依诺肝素由治疗剂量每日两次调整为预防剂量每日一次, 阿司匹林剂量

不变, 嘱患儿出院后继续抗栓治疗, 预防血栓复发。尿激酶、依诺肝素及阿司匹林药物特点汇总情况见表 2。

表 2 尿激酶、依诺肝素及阿司匹林药物特点
Tab 2 Characteristics of urokinase, enoxaparin and aspirin

药物名称	作用机制	代谢途径	半衰期	优点	选用条件
尿激酶	直接激活纤溶酶原形成纤溶酶, 溶解血凝块	经肝脏代谢, 少量药物随胆汁和尿液排出体外	20 min	无抗原性, 可重复使用	对新形成的血栓起效快、效果好
依诺肝素	与抗凝血酶结合增强其对凝血因子 (II a、X a) 的抑制	经肝脏代谢, 通过肾脏和胆汁清除	单次给药 5 h; 重复给药 7 h	有逆转剂 (鱼精蛋白); 皮下注射吸收迅速、完全 (约 90%); 降低 HIT 发生率	常用作抗凝治疗首选药物
阿司匹林	抑制血小板环氧合酶, 减少血栓素生成, 抑制血小板聚集	经肝脏代谢, 通过肾脏清除	血浆阿司匹林 17 min; 血浆水杨酸盐 2 ~ 4 h	可口服, 使用方便; 具有解热镇痛、抗炎、抗风湿作用	常作为主动脉和外周动脉血栓治疗推荐药物 ^[8]

4 用药监护

患儿 ECMO 治疗期间及撤管后右下肢股动脉血栓形成经历抗凝、溶栓及抗血小板聚集治疗。诱发形成的血栓维持治疗时间 ≤ 3 个月^[3], 具体用药剂量及疗程需根据患者复查凝血指标及下肢彩超情况调整。ECMO 联合 CRRT 治疗过程中需密切观察管路中是否有血凝块产生, 注意管路通畅情况。ECMO 撤除后患儿右下肢股动脉血栓形成, 使用尿激酶、依诺肝素钠及阿司匹林抗栓治疗期间应当持续监测血常规、凝血功能, 警惕出凝血倾向。患儿出院后应告知家属详细用药注意事项: 依诺肝素钠属于肝素类抗凝药物, 长期使用有可能引起 HIT^[9], 此外, 还可能引发骨质疏松。阿司匹林通过不可逆性抑制血小板环氧合酶发挥抗血小板聚集作用, 对胃肠道也有刺激作用。两者联合使用可增加出血风险, 应定期复查凝血功能、血小板计数及下肢动静脉超声, 3 个月后进行骨密度检查, 并告知患者及家属注意是否有出血倾向, 如牙龈出血、鼻出血、皮下出血点等。依诺肝素需皮下注射给药依从性较差, 尤其是对于儿童患者。因此, 还需告知患儿家属按时用药的必要性, 嘱其定期复查, 根据检测结果确定依从性问题并进行干预。

5 总结

血栓形成是 ECMO 治疗中常见的不良事件, 国内外儿童 ECMO 治疗中导管相关性血栓报道较少, 对于患儿 ECMO 抗凝治疗仍缺少大规模研究, 目前为止仍缺少权威性指南。针对儿童病例, 在治疗中临床药师应熟练掌握抗栓药物特点, 结合患者个体情况权衡风险和获益, 协助医师制订个体化治疗方案, 提高临床药物治疗的有效性和安全性。

参考文献

- Cashen K, Meert K, Dalton H. Anticoagulation in neonatal ECMO: an enigma despite a lot of effort! [J]. *Front Pediatr*, 2019, 7: 366.
- Dalton HJ, Reeder R, Garcia-Filion P, et al. Factors associated with bleeding and thrombosis in children receiving extracorporeal membrane oxygenation [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017, 196 (6): 762-771.
- Monagle P, Cuello CA, Augustine C, et al. American Society of Hematology 2018 guidelines for management of venous thromboembolism: treatment of pediatric venous thromboembolism [J]. *Blood Adv*, 2018, 2: 3292-3316.
- Schulman S, Konstantinides S, Hu Y, et al. Venous thromboembolic diseases: diagnosis, management and thrombophilia testing: observations on NICE guideline [NG158] [J]. *Thromb Haemost*, 2020, 120 (8): 1143-1146.
- 门剑龙, 翟正国, 雷平. 凝血紊乱: 一个微观世界的宏大故事 [M]. 天津: 天津科技翻译出版有限公司, 2021.
- 戴辰程, 何楠, 肖燕燕, 等. 低分子肝素联合阿司匹林在儿童心导管术后股动脉血栓治疗中的效果 [J]. *中国医药*, 2020, 15 (2): 198-201.
- Chechani V, Tadvi H, Bhimani U. Arterial thrombosis complicating respiratory syncytial virus infection [J]. *Journal of the Pediatrics Association of India*, 2020, 9 (4): 157-159.
- Aboyans V, Bauersachs R, Mazzolai L, et al. Antithrombotic therapies in aortic and peripheral arterial diseases in 2021: a consensus document from the ESC working group on aorta and peripheral vascular diseases, the ESC working group on thrombosis, and the ESC working group on cardiovascular pharmacotherapy [J]. *Eur Heart J*, 2021, 42 (39): 4013-4024.
- 中国医师协会心血管内科医师分会血栓防治专业委员会. 肝素诱导的血小板减少症中国专家共识 (2017) [J]. *中华医学杂志*, 2018, 98 (6): 408-417.

(收稿日期: 2023-11-05; 修回日期: 2023-12-08)

污染控制策略在无菌药品参数放行中的应用探讨

汤平¹, 蒋芙蓉¹, 陈超², 申景丰¹, 李长林^{3*} (1. 湖南科伦制药有限公司, 湖南 岳阳 414100; 2. 湖南省药品审评与不良反应监测中心, 长沙 410003; 3. 湖南省药品监督管理局, 长沙 410003)

摘要: **目的** 探讨污染控制策略在无菌药品参数放行中的应用。**方法** 通过对国内外参数放行相关法规和实践的总结分析, 以及对污染控制策略实施要点的整理归纳, 总结污染控制策略在参数放行中的应用方法。**结果** 通过对污染控制策略的充分应用, 建立了全面的无菌药品参数放行的微生物污染控制体系, 确保生产过程微生物污染控制有效。**结论** 运用污染控制策略搭建参数放行的微生物污染防控体系, 管控过程要素, 能够确保产品质量, 最终实现参数放行。

关键词: 参数放行; 污染控制策略; 无菌保证

中图分类号: R95

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)07-1957-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.049

Application of contamination control strategy in parametric release for sterile drugs

TANG Ping¹, JIANG Fu-rong¹, CHEN Chao², SHEN Jing-feng¹, LI Chang-lin^{3*} (1. Hunan Kelun Pharmaceutical Co., Ltd., Yueyang Hunan 414100; 2. Hunan Center for Drug Evaluation and ADR Monitoring, Changsha 410003; 3. Hunan Medical Products Administration, Changsha 410003)

Abstract: Objective To apply the contamination control strategy in parametric release for sterile drugs. **Methods** Based on the summary and analysis of relevant laws and practices of parametric release at home and abroad, as well as the implementation key points, the application of contamination control strategy in parametric release was summarized. **Results** The comprehensive microbial contamination control system for the for the parametric release of sterile drugs was established to ensure the effective microbial contamination control in the production process. **Conclusion** Application of contamination control strategy helps prevent contamination and control elements to ensure the quality.

Key words: parametric release; contamination control strategy; sterility assurance

产品放行是质量保证的重要环节之一, 中国、欧盟和美国均规定了对无菌产品的放行要求, 其异同点比较如下。

与中国对无菌产品放行前必须进行无菌检验的要求不同, 欧盟和美国在三十年前已经允许对最终灭菌产品实行参数放行。欧盟和美国对参数放行有不同的定义, 在欧盟《药品生产质量管理规范》(GMP) 附录 17 “实时放行检测和参数放行”中, 参数放行是实时放行检测的一种, 是指

最终灭菌产品基于对产品生产过程关键工艺控制参数的审核进行批次放行而不需要进行最终产品无菌性检验^[1]。在美国药典通则 < 1222 > “参数放行”中则将参数放行定义为: 不做药典通则第 < 71 > 章规定的无菌检查, 根据灭菌关键参数标准判定最终灭菌产品无菌合格与否的程序^[2]。而美国注射剂协会第 30 号技术报告 (PDA TR30) “采用湿热灭菌法的最终灭菌药品及医疗器械的参数放行”中, 参数放行是指基于对无菌

作者简介: 汤平, 女, 硕士研究生, 主要从事药品制造、工艺研究、质量控制研究, email: tapi1121@126.com * 通信作者: 李长林, 男, 主要从事药品监管科学研究, email: 17479928@qq.com

产品经验证生产工艺的有效控制、监测及文件而建立的无菌放行程序。此程序根据关键运行参数及性能属性决定无菌放行，替代基于最终成品无菌检查结果的无菌放行^[3]。

虽然欧盟和美国对参数放行的定义描述不尽相同，但从以上定义不难看出，参数放行的核心是以生产过程控制参数的评估、监测和控制为基础，基于对制造过程中所采集的信息（例如灭菌前中间产品微生物负荷、环境监测数据、相关灭菌参数等），以及与参数放行相关的特定 GMP 要求符合性的审核，更全面、更准确地进行产品无菌保证能力的评价。参数放行体现了药品质量控制以生产过程控制为重心的基本思想，将对无菌药品的质量控制从之前的“事后检测”转为“事前设计”和“事中控制”^[4]。因此，对现有的产品或生产工艺实施参数放行，风险管理是必要条件之一，其目的是使每批次产品无菌失败风险的所有因素得到控制。

1 参数放行的微生物污染控制要求

USP 通则 < 1222 > “最终灭菌药品的参数放行”中要求^[2]，参数放行应建立灭菌工艺的微生物监控计划，以保证产品在最终灭菌前微生物负荷对灭菌工艺验证确立的微生物控制标准无明显的偏离。微生物监控计划需包括对产品、容器、密封件或包装材料以及生产环境的微生物负荷的

监控和评价，监控频率应根据各种可能的污染源所致的污染情况进行确定。在确定最终灭菌产品参数放行时，应考虑微生物的数量、种类及其对所采用灭菌方式的耐受性。

根据欧盟 GMP 附录 17 “实时放行检测和参数放行”的要求^[1]，参数放行应建立无菌保证计划，至少包括关键工艺参数的识别和监控、灭菌周期的开发和验证、容器/包装完整性验证、微生物负荷控制、环境监测计划、产品隔离计划、设备、服务和设施的设计及确认计划、维护和校准计划、变更控制计划、人员培训以及质量风险管理方法。

中国医药质量管理协会发布的团体标准“湿热灭菌无菌产品参数放行要求”中也要求，企业应建立以质量风险管理为基础的无菌保证系统^[5]。无菌保证系统应至少包括产品设计、物料的微生物控制、工艺控制、对已灭菌和未灭菌产品的隔离措施、产品在有效期内的包装容器密封性、灭菌器的校准和维护、灭菌工艺开发及其验证、涵盖无菌保证系统的质量管理系统等方面。

综上可知，不论是美国、欧盟还是中国，都从产品工艺的设计和验证、原辅包/药液/中间产品的微生物监控、生产环境的微生物污染监控、生产过程控制等方面，对参数放行的微生物污染监测和控制提出了系统的要求（见表 1）。

表 1 无菌产品的放行要求对比

Tab 1 Release requirements for sterile products

异同点	中国	欧盟	美国
不同点	产品在放行前必须完成必要的检验，确认其质量符合要求	在经授权的具体情况下，基于产品知识和工艺理解，可以使用生产过程中采集的信息代替最终产品检测作为批次放行；经监管方批准后，最终灭菌产品基于对关键工艺控制参数的审核进行批次放行而不需要进行最终产品无菌性检验	每批药品放行前，应对其与药品最终质量标准（包括每一活性成分的鉴别等）的完全符合性进行适当的实验室判定；被批准参数放行的产品，可不做药典通则第 < 71 > 章规定的无菌检查，根据灭菌关键参数标准判定最终灭菌产品无菌合格与否
相同点	1. 需建立书面的产品放行程序；2. 由质量授权人进行产品的放行；3. 产品放行前根据既定放行规程检查批次生产和检验情况，对每批药品进行质量评价		

2 污染控制策略 (contamination control strategy, CCS) 的文件框架及实施步骤

CCS 基于对现有产品和工艺的理解，为确保工艺性能和产品质量，针对微生物、细菌内毒素/热原和颗粒物提出的一系列有计划的控制措施^[6]，可包括原料药、辅料和制剂的物料和组分相关的参数和属性，厂房设施设备的操作条件，中间过程控制，成品质量标准以及相关方法和监控频次。如果现有的控制系统得到适当的管理，这些系统可能不需要更换，但应在 CCS 中引用，

并且应了解系统之间的相互作用。CCS 的核心是界定系统及流程的所有关键控制点，以及系统之间的相互作用，将对设施设备和生产工艺的风险控制措施、针对偏差和工艺过程中数据趋势分析结果采取的纠正预防措施等进行有效的整合，并将所有关键控制点和控制措施的有效性进行关联评估。

根据欧盟 GMP 附录 1 “无菌药品生产”的规定及欧洲合规学会 (ECA) 发布的 CCS 编写指南^[7]，CCS 文件框架需包含的主要要素见表 2。

表 2 CCS 文件框架要素
Tab 2 Elements of file framework for CCS

序号	要素
1	工厂和工艺的设计, 包括相关的文件记录
2	厂房和设备
3	人员
4	公共设施
5	原辅料控制 (包括中间过程控制)
6	产品容器和密封件
7	对外包活动以及关键信息在各方之间的可用性 / 转移的管理
8	供应商审批
9	工艺风险评估
10	工艺验证
11	预防性维护
12	清洁和消毒
13	监测系统
14	预防机制
15	基于上述信息的持续改进

根据 PDA 第 90 号技术报告《药品生产中的污染控制策略开发》^[8], CCS 文件应包括污染物的潜在进入点和扩散点、污染物的去除和减少能力、污染事件历史、微生物和病毒属性、无菌处理、工艺和设备设计以及清洁、消毒和灭菌原则的技术知识总结, 还应考虑原材料质量和质量风险管理原则。这些要素对于防止生产过程的每个步骤中的污染至关重要, 其要素包括:

① 工艺设计、微生物控制和监测: 需考虑生产过程控制和过程监控。

② 设施和公用设施: 需考虑设施的设计, 人流、物料和废弃物的控制, 设施的清洁和消毒, 公用设施设计, 控制和验证, 工艺用水和蒸汽, 暖通空调 (HVAC), 工艺气体等。

③ 原材料: 需考虑质量标准、微生物负荷来源、取样、供应商审计等。

④ 环境控制、验证和监测: 需考虑环境性能确认、环境和公用设施中断和恢复计划。

⑤ 人员培训和资质: 需考虑个人卫生、更衣及洁净室行为等。

⑥ 设备设计、验证和持续控制: 需考虑设备的设计、清洁验证、持续控制及维护等。

⑦ 产品容器密封系统: 需考虑内包装的组成及控制、全生命周期内容器密闭系统的完整性。

⑧ 质量体系: 包括趋势和量度、调查、纠正和预防措施、变更控制、质量风险管理、质量协议和供应商管理、质量控制等。

⑨ CCS 管理和有效性审查: CCS 的管理主要

分为 CCS 的开发、CCS 文件编制、CCS 评估三个阶段, 具体实施步骤包括收集现状、开展现状与法规的差距分析、实施风险评估、记录所有控制措施并编制 CCS 文件、评估措施的有效性并持续更新, 即在充分理解产品和工艺知识、当前控制措施的基础上, 详细收集现场的现状信息, 以欧盟 GMP 附录 1 的要求为标准, 分析现状与法规要求之间的差距, 全面评估生产过程中可能的污染源, 针对识别的污染源开展风险识别, 并输出和实施控制措施进行改善, 最后将识别的风险和全面的控制措施整理编制成 CCS 文件并定期回顾更新。

3 CCS 在参数放行中的应用

相比检验放行的产品, 参数放行产品对微生物污染监控的要求更高, 但微生物的影响因素多, 来源复杂且具有不确定性, 因此, 运用风险管理工具, 分析生产过程的每个工艺步骤和无菌保证程序的每个要素, 进行全系统、全流程的微生物 / 无菌关键风险点识别和控制是至关重要的^[9]。在实施参数放行前及实施过程中, 均应基于对具体工艺和产品信息的深入了解, 明确需要控制的微生物污染类型, 定义微生物污染控制的范围及措施。系统性、结构化的评估工具的运用有助于对参数放行无菌保证计划中的所有风险因素进行系统的识别、评估、控制和回顾。作为一个用于建立综合的污染预防策略的系统性工具, CCS 文件总结了影响微生物污染控制水平的每一个要素, 并维持适当的微生物污染水平。下面就以微生物污染风险的控制为例, 从两个方面探讨如何运用 CCS 工具进行最终灭菌注射剂参数放行的全面微生物污染控制。

3.1 CCS 文件框架指导构建参数放行整体微生物控制策略

参数放行的无菌保证主要涉及四个环节: 微生物的来源控制、微生物的去除、微生物的杀灭、容器系统密封性保证。为了达到对微生物污染进行系统控制的目的, 本文从影响无菌保证水平的四个环节出发, 参考 ECA 发布的 CCS 文件框架中的各个 CCS 要素, 建立系统化的 CCS 要素与无菌保证评估矩阵, 详见表 3。

根据以上分析评估矩阵, 建立参数放行微生物 CCS, 介绍详见表 4^[7]。

3.2 CCS 工具指导评估和管理参数放行无菌保证关键参数

参数放行是以生产过程工艺相关数据审核为基础的放行系统, 因此根据药品和灭菌工艺的特性评估合适的的关键参数并制定参数放行标准是至

表 3 CCS 要素与无菌保证评估矩阵

Tab 3 Evaluation matrix of CCS elements and sterility assurance

CCS 要素	无菌保证			
	微生物来源控制	微生物的去除	微生物的杀灭	容器系统密封性保证
工厂和工艺的设计	√	√	√	√
厂房和设备	√	√	√	√
人员	√			
公共设施	√			
原辅料控制(包括中间过程控制)	√			
产品容器和密封件	√			√
供应商审批	√			
工艺风险评估	√	√	√	√
工艺验证	√	√	√	√
清洁和消毒	√	√	√	
预防性维护	√	√	√	√
外包服务		√	√	
监测系统	√	√	√	√
预防机制	√	√	√	√
基于上述信息的持续改进	√	√	√	√

关重要的。根据控制点对无菌保证水平的影响程度，参数放行的参数可分为关键控制点（CCP）、重要控制点（KCP）和基础控制点（BCP）三类。CCP 的评估可参考图 1 决策树进行。

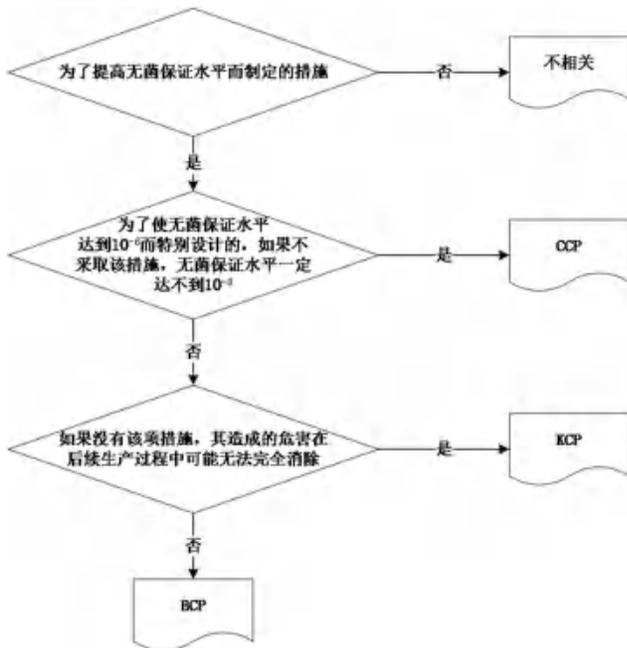


图 1 关键控制点评估决策树

Fig 1 Decision tree of critical control points in the evaluation

根据微生物的 CCS 框架，对无菌保证相关的 CCS 各要素进行微生物危害识别，包括但不限于工艺设计、微生物控制和监测、人员培训和资质、厂房设施和公用系统、设备设计验证和持续控制、

物料、环境控制验证和监测、产品密封性、质量体系等，列出控制措施和控制标准，并对每个控制措施进行决策树判断，从而完整地输出 CCP、KCP 和 BCP。表 5 以 CCS 中灭菌工艺设计和微生物控制、监测两个要素为例，指导 CCP、KCP 和 BCP 的评估和管理。

利用 CCS 文件的框架和主要要素构建了参数放行的整体微生物控制策略，并指导评估输出 CCP、KCP 和 BCP，参数放行是 CCS 在微生物污染控制方面的良好实践。

4 参数放行实践促进对 CCS 的实施及管理

CCS 能指导参数放行微生物污染控制体系的建立，参数放行的实践经验也能进一步促进 CCS 的落地实施。下面从两个方面阐述参数放行的良好实践如何促进 CCS 的管理。

将 CCS 策略参数化和标准化，能促进污染控制措施的落地实施和有效监控。生产过程工艺相关参数的识别和控制范围标准化是参数放行的基础，通过定期对基于 CCS 要素评估输出的 CCP、KCP 和 BCP 的运行情况进行回顾和趋势分析，可对各项微生物控制措施的有效性进行科学的评估，并在出现异常趋势时及时更新控制策略和控制措施，确保污染风险可控。同样，将 CCS 策略中关于细菌内毒素 / 热原和微粒污染控制的相关指标参数化，并制定适当的控制标准，通过对过程参数的持续监控和回顾来评价 CCS 策略的有效性，并在出现异常趋势时对策略和控制措施进行及时更新。

参数放行的大数据和预测模型支持建立 CCS 多样化的分析模型。为了维护洁净区环境的稳定性，建立洁净区微生物分布地图和预警模型是参数放行微生物污染控制的重要措施。通过对日常环境监测、物料、产品等收集的污染菌进行鉴定，了解污染菌的分布情况，系统分析污染菌的来源，并建立动态分布地图，通过大数据分析建立微生物污染预警，根据预测趋势针对性地及时采取杀孢子剂或其他特定消毒等防控措施。这种方法不仅适用于对微生物污染的控制，同样也适用于对细菌内毒素 / 热原和微粒的预测控制。例如，通过建立灯检发现的可见异物类型与其可能来源的对应关系，建立动态来源分析图，通过各微粒来源点的监控情况提前预警可能的异物引入风险，及时消除微粒风险。

5 总结和讨论

参数放行在中国的发展相对较晚，自 2005 年国家食品药品监督管理总局批准无锡华瑞和广

表 4 参数放行微生物 CCS
Tab 4 Microbial CCS for parametric release

控制要素	控制策略
工厂和工艺的设计	<ol style="list-style-type: none"> 1. 来源控制：根据工艺流程步骤考虑引入微生物污染的来源和类型制定控制措施 2. 去除和杀灭：根据工艺类型和微生物污染类型考虑工艺中减少或杀灭微生物的措施 3. 密封性保证：设计合适的密封系统确保完整性 4. 通过验证和定期再验证来确认措施的稳定有效
厂房和设备	<ol style="list-style-type: none"> 1. 来源控制：考虑根据产品工艺类型设计相应的洁净级别、人流和物流布局，必要时使用恰当的污染控制系统（如 RABS 等），以尽量降低环境引入微生物污染的风险 2. 去除和杀灭：考虑直接接触药液的设备的灭菌 / 消毒、过滤系统的配置 / 使用及储存条件 / 完整性检测、灭菌设备的选型及验证等 3. 密封性保证：厂房设施的密封性监控、封口设备的选型及验证等
人员	来源控制：应评估人员是否接受与其岗位职责相匹配的相关领域的培训和考核，洁净服的管理和人员洁净更衣要求是否存在微生物污染风险，是否对关键人员进行了恰当的微生物污染监控
公共设施	来源控制：公共设施的使用，尤其是与产品直接接触的工艺用水、工艺用气等，也是向产品引入微生物污染的重要途径；应对工艺用水系统、工艺用气系统的制备 / 分配方法及管控要求进行充分的污染风险评估和监控
原辅料控制（包括中间过程控制）	来源控制：原辅料的微生物和细菌内毒素限度控制将直接影响过滤前药液的微生物负荷和细菌内毒素水平，进而影响灭菌效果和成品的细菌内毒素水平，因此在微生物控制策略中应考虑对原辅料的控制和中间过程控制，包括取样和检验要求、原辅料的微生物和细菌内毒素限度标准、各工艺阶段与污染控制相关的 IPC 检测项目及标准等
产品容器和密封件	<p>产品容器和密封组件既是灭菌前药液的微生物来源之一，也是产品密封性的重要保证</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 来源控制：为了确保灭菌前产品的微生物限度，需评估产品容器和密封组件的不同来源对药液微生物限度的影响，研究制定容器和密封组件的微生物控制标准 2. 密封性保证：为了确保产品全生命周期内的容器密封性，需研究制定容器和密封组件的尺寸控制标准，开发或采用合适的测试方法，并验证其有效性
供应商审批	来源控制：基于对原辅料微生物、细菌内毒素限度以及产品容器和密封组件微生物限度的控制要求，应在供应商审批时充分考虑其生产过程中的微生物控制能力
工艺风险评估和工艺验证	在产品工艺风险评估和工艺验证时，应充分考虑和评估生产流程、设施设备清洁、净化、灭菌的微生物控制风险，制定科学的工艺验证及再验证要求，并对生产工艺进行持续核实
清洁和消毒	清洁和消毒是控制、去除或杀灭微生物污染源的有效手段，应制定清洁和消毒、净化和灭菌的程序，明确用于污染控制的产品或系统，如清洗剂、消毒剂、CIP/SIP 系统等，总结并优化最大限度减少人员和表面污染的控制方法
预防性维护	对于影响微生物来源控制、去除和 / 或杀灭效果、容器密封性保证的厂房、设施和设备（如厂房设施、配制 / 过滤 / 洗瓶 / 灌装 / 封口 / 灭菌设备等），应定义维护要求和维护方式，制定维护计划，描述重复性或关键性维修计划超期时的程序 and 产品质量影响调查，评估并确保厂房、设施 and 设备的维护不会增加污染风险
外包服务	当微生物的去除和杀灭可能涉及外包服务时，如灭菌测试、微生物检测、无菌检测等，需对外包服务的有效性和稳定性进行监督，以确保能提供足够的证据确保工艺和过程控制正确运行
监测系统和预防机制	<p>应建立监测系统和 CAPA 管理机制，并定期对监测数据进行回顾分析，对回顾分析中出现的异常趋势，应进行全面的调查，确定根本原因，并制定纠正和预防措施</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 来源控制：评估环境污染检出的可行性和科学性，明确污染监测和检测方法、取样的频率 / 位置 / 类型及标准、历史数据回顾分析频率、微生物培养基和培养程序 2. 去除和杀灭：评估微生物去除和杀灭工艺的科学性，明确工艺运行稳定性的监测方法和审核标准 3. 密封性保证：评估容器密封方式的可靠性，明确密封性检测方法、检测频率 / 位置 / 标准等
基于上述信息的持续改进	建立定期回顾和持续改进的程序，通过定期产品质量回顾、环境监测趋势分析、质量管理报告等评估关键参数的运行情况，并进行持续改善

州百特两家企业进行参数放行试点后，目前国内仅有上海通用电气药业有最终灭菌注射剂产品以参数放行申报 FDA 获批。此外，四川科伦药业于 2018 年在公司内部启动实施参数放行项目的工作，成立项目组，并于 2020 年在公司内部模拟运行参数放行。在参数放行的法规和标准方面，2020 年中国医药质量管理协会发布了团体标准《湿热灭菌无菌产品参数放行要求》。

CCS 虽然并非是一个全新的要求，但是它要求企业整合已有的污染控制措施，形成一个全面的整体控制方案，连接整个生产体系中的关键控制点，以确保所有监控措施的有效性。如何建立和管理 CCS，在欧盟、美国 PDA 和 PHSS 有相关的指导原则，但在国内暂无统一的模式和具体的操作要求。

参数放行是新构的体系，与 CCS 互有值得借鉴之处。根据系统化的 CCS 文件框架和主要要

表 5 CCP、KCP 和 BCP 的评估示例
Tab 5 Example for evaluation of CCP, KCP, and BCP

CCS 要素	微生物危害点	控制措施	控制标准	控制类型	
灭菌工艺设计	灭菌工艺无法达到灭菌效果, 微生物不能被杀灭	灭菌保温温度控制	温度范围: 121 ~ 124 °C	CCP	
		灭菌保温时间控制	保温时间 12 min	CCP	
		灭菌 F ₀ 值	F ₀ 值: ≥ 12	CCP	
		装载量、装载方式	最大装载: 10 500 瓶 最小装载: 9453 瓶	KCP	
		控制灭菌循环水流量	电流: 37 ~ 46 A	KCP	
		升温总时间	升温时间 ≤ 45 min	KCP	
		控制和监控保温阶段压力	0.16 ~ 0.23 MPa	KCP	
		灭菌监控系统温度校准	校准偏差范围: ±0.1 °C	BCP	
		灭菌保温过程计时校准	实际控制时长不小于设定时长	BCP	
		灭菌后产品在冷却过程中被污染	灭菌循环水监控微生物	每周监控微生物 ≤ 10 CFU · 100 mL ⁻¹	BCP
			压缩空气过滤器完整性测试	扩散流值小于标准值	BCP
			换热器定期维护	不得发生内漏	BCP
		已灭菌产品和未灭菌产品发生混淆	灭菌柜门互锁	灭菌程序控制前后门不能同时开启。	BCP
选择合适灭菌监测物, 每车放置化学指示剂	监测物变化反映灭菌装载已达到选择工艺的灭菌效果		KCP		
微生物控制和监测	灭菌前药液微生物负荷过高或有耐热菌, 可能导致灭菌失败	控制过滤后灭菌前微生物负荷	每批监测, ≤ 50 CFU/瓶 (规格: 100 mL)	KCP	
		过滤后灭菌前耐热菌控制	过滤后灭菌前药液检出菌进行耐热性检查, 若耐热实验阳性, 测定 D 值, 确认 D 值比验证所用的生物指示剂 D 值小, 否则需要做研究	KCP	
		控制灌装结束到灭菌前中间产品存放时限	≤ 3 h	KCP	
	灭菌前细菌内毒素过高, 可能导致灭菌后细菌内毒素超标	控制过滤后灭菌前细菌内毒素	< 0.25 EU · mL ⁻¹	KCP	

素, 全面识别和控制参数放行的无菌保证风险, 建立系统的微生物 CCS, 输出完整的参数控制点, 这是 CCS 在参数放行的良好实践。而参数放行对过程控制的参数化和标准化, 以及利用大数据建立预测模型的管理方式, 也为 CCS 有效性的评估和回顾提供了更为具体的操作参考。

参考文献

[1] European Commission. EU GMP Annex 17: Real Time Release Testing and Parametric Release [EB/OL]. (2018-06-26) [2023-08-10]. https://health.ec.europa.eu/system/files/2018-06/2018_annex17_en_0.pdf

[2] USP. < 1222 > Terminally Sterilized Pharmaceutical Products-Parametric Release: GUID-47A43122-C422-4E0B-BF92-3B408614555A_6_en-US. [EB/OL]. [2023-08-10]. https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-47A43122-C422-4E0B-BF92-3B408614555A_6_en-US.

[3] 中国医药设备工程协会. 美国注射剂协会技术报告汇编: 1 号、20 号和 48 号 [M]. 北京: 中国质检出版社, 2019.

[4] 尚悦. 无菌药品参数放行国际实施历程及我国现状浅析 [J]. 中国医药工业杂志, 2021, 52 (9): 1248-1252.

[5] 中国医药质量管理协会. 湿热灭菌无菌产品参数放行要求 [M]. 北京: 中国标准出版社, 2021.

[6] European Commission. EU GMP Annex 1: Manufacture of Sterile Medicinal Products [EB/OL]. (2022-08-22) [2023-08-10]. https://health.ec.europa.eu/system/files/2022-08/20220825_gmp-an1_en_0.pdf.

[7] ECA Foundation. How to Develop and Document a Contamination Control Strategy. [EB/OL]. (2023-02) [2023-08-10]. <https://www.eca-foundation.org/files/userFiles/documents/20220119-ECA-Task-Force-CCS-Guideline-Vers2.pdf>.

[8] Parenteral Drug Association. PDA Technical Report No. 90 (TR 90) Contamination Control Strategy Development in Pharmaceutical Manufacturing [EB/OL]. (2022-12) [2023-08-10]. <https://techpubportal.pda.org/publication/?i=782488>.

[9] 尚悦, 马仕洪, 张启明, 等. 科学监管方法之湿热灭菌药品参数放行探索研究 [J]. 中国药事, 2022, 36 (5): 497-502.

(收稿日期: 2023-10-13; 修回日期: 2023-12-05)

药品不良反应

莫西沙星与非甾体抗炎药潜在药物相互作用致不良反应 1 例

梁兴发¹, 黄怡新¹, 尚翔², 周逸云¹, 朱芹汶^{1*} (1. 上海交通大学医学院苏州九龙医院药学部, 江苏 苏州 215028; 2. 苏州市广济医院药学部, 江苏 苏州 215137)

关键词: 莫西沙星; 非甾体抗炎药; 美洛昔康; 药物相互作用

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2024)07-1963-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.050

药物相互作用是指同时或间隔一定时间使用超过一种(通常是两种)药物时, 由于药物之间或药物-机体-药物之间的反应, 改变药物原来的体内过程、组织对药物的感受性或药物理化性质, 而产生单味药物所没有的有益作用或不良作用^[1]。莫西沙星属于第四代喹诺酮类抗菌药物, 对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、厌氧菌和非典型微生物均具有广谱抗菌活性, 广泛应用于呼吸系统、皮肤、腹腔感染及软组织感染^[2]。近年来关于莫西沙星导致幻觉以及精神异常的报道日益增多^[2-5], 逐渐引起临床重视。美洛昔康属于非甾体抗炎药, 对环氧合酶-2(COX-2)具有一定选择性, 主要用于治疗骨关节炎、类风湿关节炎等。据报道, 美洛昔康有致过敏性休克^[6]、重症药疹^[7]、阴道出血^[8]等说明书中未提到的情况发生。

莫西沙星不经肝脏 P450 酶代谢, 常认为不易引起药物相互作用。美国 FDA 说明书中指出其与非甾体抗炎药合用会增加发生中枢神经系统刺激和惊厥的风险, 导致毒性增加, 需密切关注患者的临床情况。本文介绍了 1 例类风湿关节炎患者因肺炎使用莫西沙星抗感染期间出现头晕及幻觉的处理与药学监护, 以期为临床药物治疗及药学监护提供参考。

1 临床资料

患者女, 77 岁, 体重 50 kg, 于 2023 年 10 月 11 日因“咳嗽、咳痰 20 d”入院。患者约 20 d 前无明显诱因下出现咳嗽症状, 起初咳嗽不剧烈, 昼夜咳嗽频率基本相同, 咳痰不畅, 无鼻塞、流涕、无盗汗、咯血, 2023 年 10 月 9 日就诊于我院急诊,

予以静脉输注头孢唑肟以及左氧氟沙星治疗, 咳嗽较前加重, 伴有胸闷不适, 为求进一步诊治收住入院。患者既往类风湿关节炎病史, 否认食物及药物过敏史和精神疾病史, 否认疫区居住史及接触史。

体格检查: 体温 38℃, 血压 136/68 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa), 心率 105 次·min⁻¹, 呼吸 22 次·min⁻¹, 意识清, 精神可, 查体配合, 畏寒寒战。双肺叩诊呈清音, 两肺呼吸音粗, 右肺闻及明显干湿性啰音。胸部 CT (2023 年 10 月 9 日): 右肺炎症, 左肺下叶钙化灶, 心包少许积液。入院检查: 血常规基本正常; 生化全套: 直接胆红素 1.4 μmol·L⁻¹↓; 凝血: D-二聚体 1 mg·L⁻¹↑, 尿液检验、粪便常规与隐血无异常; 入院诊断肺炎、类风湿关节炎。

2 治疗经过

患者入院当日考虑社区获得性肺炎, 予以头孢美唑钠(成都倍特, 批号: 230707) 2 g ivgtt qd 联合莫西沙星(正大丰海, 批号: B2301262) 0.4 g ivgtt qd 抗感染治疗, 合并氨溴索化痰、氨茶碱平喘等对症治疗。2023 年 10 月 12 日加用美洛昔康(勃林格殷格翰, 批号: F03826) 7.5 mg po qd 抗风湿性关节炎, 同时继续静脉输注头孢美唑钠(2 g ivgtt qd) 以及莫西沙星(0.4 g ivgtt qd)。患者在口服美洛昔康后约 7 h, 输注莫西沙星结束约 5 h 后头晕并出现幻觉, 自述可以看到很多红色恐怖画面, 药师与患者家属及本人确认无相关精神疾病史、遗传史, 因此确认与所用药物相关。通过查询药品说明书及相关文献, 药师起初认为此不良反应为莫西沙星所致, 但通过询问患者及家属得知患者曾于外院输注过莫西沙星, 且无相关不良反应史,

基金项目: 苏州市科技发展计划 (No. SKJYD2021174)。

作者简介: 梁兴发, 男, 主管药师, 主要从事医院药学方面的研究, email: 798674301@qq.com *通信作者: 朱芹汶, 女, 主管药师, 主要从事药事管理方面的研究, email: zqw420@126.com

此次入院出现异常情况,药师考虑为美洛昔康与莫西沙星相互作用所致,建议医师停用莫西沙星,医师采纳,其余治疗方案保持不变。2023 年 10 月 14 日起患者异常状态基本消失,至出院也未曾复发。

3 讨论

3.1 关联性分析

根据国家药品不良反应监测中心制定的关联性评价标准^[9],对本例患者的幻觉及神经系统异常进行关联性评价:①患者入院时精神状况正常,既往无相关病史、遗传史,幻觉及神经系统异常是在使用莫西沙星及美洛昔康后出现,且停用莫西沙星后患者的精神状况明显好转,不良反应的发生与莫西沙星及美洛昔康的使用具有时间相关性;②莫西沙星说明书中关于“不良反应”的描述中指出,头晕的发生率为 $\geq 1\%$,幻觉的发生率为 $0.1\% \sim < 1\%$,符合莫西沙星已知的不良反应类型,但患者曾于外院输注过莫西沙星且未发生不良反应。说明书中指出当莫西沙星与美洛昔康合用时,“药物相互作用”提示“严重”级别,会导致中枢神经系统毒性增加,需谨慎合用,药师判断美洛昔康可能为影响因素之一;③查阅患者同期使用的其他药品的说明书及相关文献,未见有致幻觉及神经系统异常的报道,患者表示入院后未使用过其他药物、膳食补充剂等,排除其他药物、食物的影响,医师也排除了原患疾病的影响;④药师考虑本例患者出现幻觉及神经系统异常可能由莫西沙星联合美洛昔康所致,故建议先停用莫西沙星,医师采纳药师建议,停用莫西沙星后,患者精神状况逐渐好转。

综上,根据诺氏评估量表法进行因果关系等级评分(评分 > 9 分为肯定;5~8分为很可能相关;1~4分为可能有关; ≤ 0 分为可疑),莫西沙星评分为6分,美洛昔康评分为3分,因此药师认为患者出现幻觉及神经系统异常可能与莫西沙星联合美洛昔康有关。

3.2 莫西沙星与非甾体抗炎药相互作用的分析

莫西沙星具有较好的脂溶性,可以透过血脑屏障,阻断中枢抑制性递质 γ 氨基丁酸与受体结合的作用,增加中枢神经的兴奋性,进而导致神经系统的不良反应^[2]。喹诺酮类药物联合其他药物也可能导致神经系统不良反应,例如非甾体抗炎药和茶碱^[10]。已有文献报道茶碱与喹诺酮类药物联用可导致癫痫、惊厥和视觉幻觉等不良反应^[11],可能的机制为负责甲基黄嘌呤代谢的细胞色素 P450IA2 酶相关的药动学改变。氟喹诺酮类药物对茶碱类药物的影响较显著的药物有:依

诺沙星 $>$ 环丙沙星 $>$ 诺氟沙星 $>$ 培氟沙星,而左氧氟沙星、莫西沙星、加替沙星、洛美沙星、司帕沙星等对茶碱类药物的影响较小^[12]。同时 Stass 等^[13]的研究结果也显示合用茶碱不影响莫西沙星的药动学参数,药物合用耐受性好。因此虽然医嘱中显示氨茶碱注射液与莫西沙星联合使用,但药师认为此两种药物相互作用导致不良反应的概率较小,可以基本排除氨茶碱的影响。

喹诺酮类药物与非甾体抗炎药的报道与研究较少。在实验动物中,多项研究表明,与芬布芬联合给药可显著提高诺氟沙星和氧氟沙星的血清浓度^[14-15]。芬布芬促进环丙沙星、氧氟沙星和诺氟沙星进入中枢神经系统,从而提高了这些喹诺酮类药物在大脑和脑脊液中的浓度^[15-16]。据报道,合用依诺沙星与芬布芬的患者惊厥的发生率较高,两者应避免合用^[17]。莫西沙星注射液说明书中明确指出美洛昔康与莫西沙星存在“严重”级别的相互作用,稳妥起见,应密切监测患者中枢神经系统的不良反应,但更建议尽可能不要联合应用这两类药物。

通过追溯病史,患者在外院曾静脉输注过莫西沙星,未发生不良反应,既往类风湿关节炎,门诊医师开具塞来昔布但患者怕产生依赖因此拒绝服药,仅通过外用贴剂及双氯芬酸二乙胺乳胶剂止痛。此次患者入院,在莫西沙星治疗前没有出现任何异常的症状或体征,在口服美洛昔康后约7h,静脉输注莫西沙星约5h后出现头晕以及幻觉,停药后可自行消失。虽然感染是继发于精神错乱的幻觉的常见原因,但该患者神志清,各项检查指标均不符合感染指征,缺乏诱发因素。因此药师推测该神经系统异常很可能是莫西沙星联合美洛昔康导致的,该不良反应的出现与两种药物的使用有着合理的时间顺序关系,诺氏评分也支持该推论。

3.3 莫西沙星与非甾体抗炎药相互作用的机制

美洛昔康属于非甾体抗炎药,但其与莫西沙星相互作用的具体机制尚不明确,但已有相当多的研究从各个方面探讨其可能的发生机制:①非甾体抗炎药可以增强喹诺酮类药物对 GABA 受体的竞争性抑制,从而可能引发神经毒性^[10, 18];②非甾体抗炎药可以抑制前列腺素致肾血流量减少,导致喹诺酮类药物浓度升高^[10],增加中枢神经系统毒性。莫西沙星与美洛昔康相互作用的机制目前尚未得知,仍需进一步研究。

3.4 小结

莫西沙星导致的中枢神经系统异常正逐步明确,但在临床工作中我们不仅需要重视严重的不良反应,

还需要重视其他可能存在的相互作用，也应关注其他作用机制尚不明确的药物影响。本例患者使用的莫西沙星说明书中明确提出其与美洛昔康存在严重的药物相互作用，药师应从了解莫西沙星与美洛昔康相互作用的机制上进行拓展研究，对存在潜在相互作用的药物进行风险评估，防患于未然。

参考文献

[1] 吕向群. 喹诺酮类与茶碱类药物相互作用的研究进展 [J]. 中国药业, 2012, 21 (6): 88-89.
 [2] 王宝华, 于丹, 朱旭, 等. 静脉滴注莫西沙星致幻觉及精神异常的病例分析 [J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37 (12): 1594-1595.
 [3] 赵晓燕, 辛海莉. 盐酸莫西沙星氯化钠注射液致视觉 1 例 [J]. 医药报, 2019, 38 (5): 667-668.
 [4] 李海涛, 朱昆, 姜东莉. 1 例盐酸莫西沙星导致神经系统不良反应的病例分析 [J]. 中国医药指南, 2017, 15 (7): 189.
 [5] 吴春颖, 刘晓, 赵宁, 等. 输注莫西沙星注射液引起精神异常案例分析 [J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31 (6): 470-471.
 [6] 马昭霞. 美洛昔康致过敏性休克及抢救 1 例 [J]. 中国社区医师 (综合版), 2005, 7 (15): 31.
 [7] 薛竞. 美洛昔康致重症药疹、类白血病反应及肝炎 [J]. 药物不良反应杂志, 2007, 9 (2): 90.
 [8] 魏明秀. 美洛昔康致阴道出血一例 [J]. 药学服务与研究, 2007, 7 (6): 454.
 [9] 陈静静, 钱佩佩, 曹凯, 等. 我国药品不良反应关联性评价方法与诺氏评估量表法的对比与分析 [J]. 中国药事,

2020, 34 (8): 988-992.
 [10] Tomé AM, Filipe A. Quinolones: review of psychiatric and neurological adverse reactions [J]. Drug Saf, 2011, 34 (6): 465-488.
 [11] Zaudig M, von Bose M, Weber MM, et al. Psychotoxic effects of ofloxacin [J]. Pharm Psychiatry, 1989, 22 (1): 11-15.
 [12] 谢牧牧. 一例多索茶碱与莫西沙星潜在药物相互作用的病例分析 [C]/2016 年中国药学会大会暨第十六届中国药师周论文集. 中国药学会. 2016: 4.
 [13] Stass H, Kubitzka D. Lack of pharmacokinetic interaction between moxifloxacin, a novel 8-methoxyfluoroquinolone, and theophylline [J]. Clin Pharmacokinet, 2001, 40 (1): 63-70.
 [14] Naora K, Katagiri Y, Ichikawa N, et al. A minor possibility of pharmacokinetic interaction between enoxacin and fenbufen in rats [J]. J Pharmacobiodyn, 1990, 13 (2): 90-96.
 [15] James RR. Adverse reactions to fluoroquinolones [J]. Emerg Med News, 2008, 30 (10): 16-18.
 [16] Ichikawa N, Naora K, Hayashibara M, et al. Effect of fenbufen on the entry of new quinolones, norfloxacin and ofloxacin, into the central nervous system in rats [J]. J Pharm Pharmacol, 1992, 44 (11): 915-920.
 [17] Iqbal Z, Khan A, Naz A, et al. Pharmacokinetic interaction of ciprofloxacin with diclofenac [J]. Clin Drug Invest, 2009, 29 (4): 275-281.
 [18] Wierzbinski P, Hubska J, Henzler M, et al. Depressive and other adverse CNS effects of fluoroquinolones [J]. Pharmaceuticals-Base, 2023, 16 (8): 1105.

(收稿日期: 2023-12-27; 修回日期: 2024-02-27)

头孢哌酮钠舒巴坦钠致重度凝血功能障碍伴发心包积液 1 例

薛晓燕¹, 丁可¹, 谢海彬², 李想^{2*} (常州市第一人民医院, 1. 药学部, 2. 创伤中心, 江苏 常州 213003)

关键词: 头孢哌酮钠舒巴坦钠; 严重凝血功能障碍; 心包积液

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2024)07-1965-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.051

头孢哌酮钠舒巴坦钠作为一种经典的 β -内酰胺 β -内酰胺酶抑制剂复方制剂, 临床广泛用于敏感菌所致的呼吸道感染, 泌尿道感染, 腹膜炎、胆囊炎、胆管炎和其他腹腔内感染, 败血症, 皮肤软组织感染, 骨关节感染及生殖系统感染等。头孢哌酮钠舒巴坦钠作为原研药引入国内约

三十年, 其有效性及安全性得到了临床的认可, 但在少数患者中也发生了一定的不良反应。本文通过对 1 例头孢哌酮钠舒巴坦钠导致重度凝血功能障碍伴发心包积液的病例分析, 加深临床对其不良反应的认识, 可为临床安全用药提供参考。

1 病历资料

基金项目: 常州市第十四批科技计划 (应用基础研究指导性) 项目 (No.CJ20219031); 江苏省药学会医院药学基金项目 (No.H202146)。

作者简介: 薛晓燕, 女, 副主任药师, 主要从事临床药学工作, email: 18068536866@163.com *通信作者: 李想, 男, 主治医师, 主要从事急诊创伤救治工作, email: 693323999@qq.com

患者,男,31岁,体重85 kg,既往无药物过敏史,因“车祸致伤全身多处20小时余”于2023年5月28日入院,急诊在全麻下行剖腹探查+小肠切除+胰腺修补术,术中输注3 U悬浮红细胞、700 mL血浆,术后气管插管在位,腹腔引流管两根,右肋缘下双套管在位,左跟骨牵引在位,下肢腹部负压封闭引流技术(VSD)覆盖创面,术后血气分析示血钾 $5.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,血红蛋白 $110 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,转急诊重症监护室(EICU)进一步治疗。入EICU诊断:创伤性脾破裂、肝挫伤、失血性休克、多处损伤、股骨粗隆间骨折、肠系膜丛损伤、下肢损伤、胸腔积液。立即予重症监护、机械通气、扩容补液、输血、去甲肾上腺素维持血压、瑞芬太尼镇痛、环泊酚镇静、抑酸化痰等对症支持治疗,考虑患者腹腔感染较重,炎症指标偏高,予亚胺培南西司他丁抗感染,并关注患者心肺功能,维持水电解质平衡,观察腹腔引流管量及颜色变化。

入EICU治疗一周后,患者呼吸循环不稳定,血常规较前有升高趋势,C-反应蛋白(CRP)及降钙素原(PCT)水平仍高,CT示两肺炎症,患者痰及灌洗液培养均提示广泛耐药鲍曼不动杆菌,考虑为致病菌可能性大。药敏结果显示仅多黏菌素敏感、米诺环素中介,根据专家共识^[1],入院第8日调整为注射用硫酸多黏菌素B 75万U静脉滴注q12h、25万U雾化q12h(超说明书用药)联合注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠3 g静脉滴注q8h(辉瑞制药,规格:1.5 g/瓶,批号:8155504)抗感染治疗。入院第10日,患者肾功能逐渐恢复,予停用床旁连续肾脏替代疗法(CRRT);入院第10日,考虑患者腹部切口感染,予手术清创并行VSD;入院第13日,患者顺利拔除气管插管,予经鼻高流量氧疗;入院第14日,患者氧合尚可,病情稳定,转入创伤中心继续治疗。

入院第15日,临床予停用多黏菌素B,继续头孢哌酮钠舒巴坦钠3 g q8h抗感染,并予注射用依诺肝素4000 IU皮下qd预防深静脉血栓。患者病情趋于平稳,但在入院第23日早晨,患者诉胸闷不适,心率快(约 $120 \text{ 次} \cdot \text{min}^{-1}$),医嘱予停用头孢哌酮钠舒巴坦钠,查胸腹部CT示心包大量积液,停用依诺肝素并完善心脏彩超检查。入院第24日,在B超定位下行心包穿刺术,当日引流出暗红色血性液体630 mL,同时接到凝血功能危急值:凝血酶原时间(PT)78.7 s、活化部分凝血活酶(APTT)54.3 s、国际标准化比

值(INR)7.39、纤维蛋白原(Fib) $1.86 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。立即予静脉滴注人凝血酶原复合物共800 U、静脉推注维生素K₁注射液10 mg/次共2次、输注病毒灭活冰冻血浆175 mL等治疗。后予持续心包引流,至入院第27日共引流出心包积液1510 mL,于入院第29日拔除心包引流管。停用头孢哌酮钠舒巴坦钠后,当日换用哌拉西林钠他唑巴坦钠4.5 g静脉滴注q8h继续抗感染治疗,患者感染得到进一步控制,凝血功能指标逐渐趋于正常,后续复查肺部CT示心包少量积液,待自行吸收。患者凝血功能指标的变化趋势,见图1。

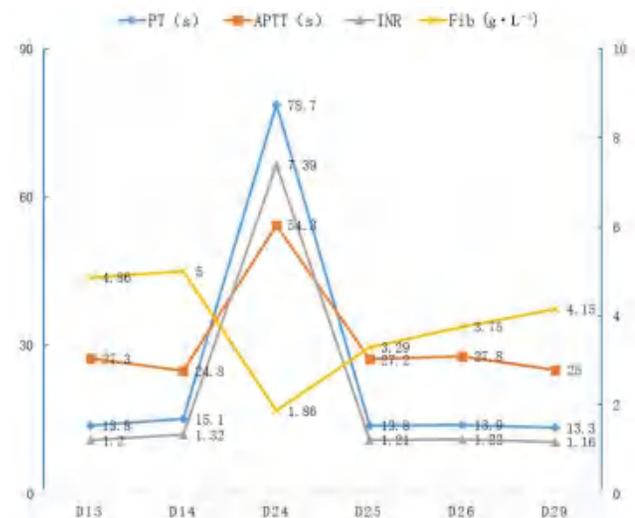


图1 患者凝血功能指标的变化趋势

2 讨论

该患者因治疗广泛耐药鲍曼不动杆菌感染使用了包含头孢哌酮钠舒巴坦钠的二联抗感染方案,其治疗前和治疗初期监测患者凝血功能基本正常,患者生命体征趋于平稳,从EICU转入创伤中心进一步治疗。之后患者出现胸闷不适、心率快,查CT提示心包大量积液,予心包穿刺引流术,当即引出约630 mL血性液体。随即凝血功能报危急值,提示重度凝血功能障碍。考虑到患者多发伤未直接致损伤肺部,在院内也未行胸外按压等,基本排除感染性因素与疾病相关的非感染性心包积液可能(如肿瘤、风湿病、心脏损伤或大血管破裂等),考虑药物性因素导致凝血功能障碍继而发生心包出血可能性大。

临床药师查看患者用药,在转入创伤中心后,头孢哌酮钠舒巴坦钠继续沿用,其引起凝血功能障碍的可能性较大,与低分子量肝素[常规予低分子量肝素预防深静脉血栓形成(DVT)]同时使用出血风险增大,其余药物无特殊,其间患者予禁食、行胃肠减压,属于存在凝血障碍的高

危人群。该患者使用头孢哌酮钠舒巴坦钠 3 g q8h 共 15 d, 用药前和用药初期凝血功能基本正常, 转入创伤中心后未常规复查凝血功能, 未能及时发现相关指标的变化并提前干预。在停药时患者感不适, CT 提示心包大量积液, 停药 1 d 后复查凝血功能示严重异常, PT、APTT 与 INR 异常升高并伴随 Fib 下降, 其间血小板计数正常, 肝功能指标基本正常且无明显变化。头孢哌酮钠舒巴坦钠说明书注意事项中明确提及, 少数患者在使用本品治疗后出现了导致凝血障碍的维生素 K 缺乏进而引起出血倾向, 应监测 PT 等指标, 必要时应另外补充维生素 K。因此, 临床立即给予维生素 K₁ 注射液、输注凝血酶原复合物和病毒灭活冰冻血浆补充凝血因子等来纠正患者凝血功能, 在对症处理后的第 2 日, 患者的凝血功能即得到明显改善。通过诺氏药物不良反应评估量表计算该患者使用头孢哌酮钠舒巴坦钠导致不良反应的总分为 5 分, 即“很可能有关”。

2019 年国家药品监督管理局发布了《关于修订含头孢哌酮药品说明书的公告》(2019 年第 13 号), 要求各生产企业对含头孢哌酮的药品说明书进行修订,【不良反应】项下增加血小板减少、低凝血酶原血症、凝血障碍及出血,【注意事项】项增加有关凝血障碍及出血风险的警告项。目前头孢哌酮钠舒巴坦钠说明书的不良反项中, 凝血障碍发生率为 1%~10%, 为常见的不良反应。

头孢哌酮钠舒巴坦钠使用后引起凝血功能障碍的机制可能为^[2-4]: 头孢哌酮为第三代头孢菌素, 具有较广谱的抗菌活性, 主要经胆汁排泄, 可抑制肠道菌群, 包括肠道内合成维生素 K 的正常菌群, 导致维生素 K 合成减少或障碍; 另外, 头孢哌酮结构中含有 N-甲基硫代四氮唑 (NMTT) 侧链, 可与维生素 K 竞争性结合 γ 谷氨酰羧化酶, 抑制维生素 K 依赖性凝血因子羧基化, 主要表现为凝血因子 II、VII、IX、X 的合成减少。除头孢哌酮外, 其他具有 NMTT 基团的还有头孢孟多、头孢美唑等, 临床使用时也需关注对凝血功能的影响。

基于头孢哌酮钠舒巴坦钠使用后存在凝血功能障碍的风险, 为减少该不良反应的发生, 在患者具有相关危险因素的情况下, 是否需要预防性给予维生素 K₁ 注射液存在一定的争议。有研究显示, 在使用头孢哌酮之前或期间给予维生素 K

没有显著的保护作用, 因此认为预防性使用维生素 K 是没有必要的, 而应在其治疗期间加强患者监护与凝血功能等的监测^[5]。

3 结论

头孢哌酮钠舒巴坦钠使用期间, 存在下述高危因素的患者应予重点关注: ① 对于用药时间超过一周的患者, 应评估疗程并定期监测感染和凝血相关指标, 及时停药^[6]; ② 对于存在肝肾功能障碍的患者, 药物代谢和清除能力的降低会导致药物在体内蓄积, 且肝脏合成凝血因子能力的减弱也会加重凝血功能障碍, 应注意调整给药剂量与频次; ③ 使用头孢哌酮钠舒巴坦钠治疗广泛耐药鲍曼不动杆菌感染时剂量相对较大, 更应密切监测肝肾功能与凝血功能指标; ④ 对于联合用药中有含有肝素、阿司匹林、氯吡格雷等的患者, 需考虑这些药物对凝血功能的影响及增加出血风险的可能性, 密切监测及时停用相关药物; ⑤ 高龄、重症感染、禁食或肠内进食少、吸收不良、酒精中毒和长期静脉滴注高营养制剂的患者为高危人群, 临床更应关注其凝血功能相关指标^[7], 监测出血和血小板减少迹象。

参考文献

- [1] 王明贵. 广泛耐药革兰阴性菌感染的实验诊断、抗菌治疗及医院感染控制: 中国专家共识 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2017, 17(1): 82-92.
- [2] 梁河, 蒙光义, 钟丽球, 等. 头孢哌酮钠舒巴坦钠致凝血功能障碍研究进展 [J]. 中国药业, 2020, 29(1): 95-96.
- [3] 李小龙, 王荣丽. 头孢哌酮舒巴坦致凝血功能障碍一例并文献复习 [J]. 黑龙江医学, 2020, 44(12): 1712-1714.
- [4] 陈良, 李冬洁. 临床药师参与处置头孢哌酮舒巴坦钠致术后出血的病例分析 [J]. 中南药学, 2017, 15(11): 1615-1617.
- [5] Strom BL, Schinnar R, Gibson GA, et al. Risk of bleeding and hypoprothrombinaemia associated with NMTT side chain antibiotics: using cefoperazone as a test case [J]. Pharmacoeconom Drug Saf, 1999, 8(2): 81-94.
- [6] Wang W, Liu YM, Yu C, et al. Cefoperazone-sulbactam and risk of coagulation disorders or bleeding: a retrospective cohort study [J]. Expert Opin Drug Saf, 2020, 19(3): 339-347.
- [7] 王为, 曹爱霖, 钱皎. 1 例头孢哌酮舒巴坦致患者血小板减少的用药分析与药学监护 [J]. 中南药学, 2018, 16(9): 1315-1318.

(收稿日期: 2023-11-15; 修回日期: 2023-12-18)

顺铂诱导的抗利尿激素分泌异常综合征致重度低钠血症 1 例

高孟婷, 郑红, 林海霞* (成都市双流区第一人民医院·四川大学华西空港医院药学部, 成都 610200)

关键词: 顺铂; 宫颈鳞状细胞癌; 抗利尿激素分泌异常综合征; 低钠血症

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2024)07-1968-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.07.052

抗利尿激素分泌异常综合征 (SIADH) 常见于恶性肿瘤, 其次为中枢神经系统疾病、肺部感染、药物以及手术等。顺铂为第一代铂类抗肿瘤药, 其主要通过与 DNA 结合, 抑制肿瘤细胞的生长而产生抗肿瘤作用^[1]。其引起的不良反应较为常见的有肾毒性、神经毒性、胃肠道反应以及骨髓抑制等^[2-3]。然而顺铂诱导的 SIADH 较为少见。SIADH 是低钠血症的主要原因, 与恶心呕吐、步态不稳、定向障碍和认知功能受损等症状有关, 但也可表现为严重的神经系统体征, 如癫痫发作和意识丧失^[4]。因此临床医师需要及时识别, 以预防危及生命的低钠血症。本文报道了 1 例少见的因宫颈鳞状细胞癌在接受顺铂联合紫杉醇化疗后, 导致 SIADH 而出现重度低钠血症的病例, 并探讨 SIADH 发生的原因以及治疗措施, 以期临床医师处理此类并发症患者提供参考。

1 病历资料

患者为绝经后女性, 71 岁, 身高 155 cm, 体重 47 kg, 体表面积 (BSA) 1.45 m²。主因“阴道流血 10 余天”于 2022 年 3 月 17 日收治入院。患者既往体健, 否认高血压、冠心病、糖尿病等其他慢性病史。否认烟酒史, 否认食物、药物过敏以及依赖史。否认恶性肿瘤家族史或其他家族史。入院查体: 体温 36.6 °C, 脉搏 78 次·min⁻¹, 呼吸 18 次·min⁻¹, 血压 140/68 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa)。腹平软, 无压痛; 阴道通畅, 阴道内可见血性分泌物, 阴道黏膜皱襞光滑稍充血; 宫颈萎缩充血, 穹隆部分消失, 摆举痛阴性; 子宫前位, 宫体萎缩扪及欠清, 无压痛。三合诊: 双侧骶主韧带短缩, 宫旁增厚。入院诊断: 宫颈病变: 子宫颈高级别鳞状上皮内病变?

患者入院后完善相关常规检查, 血液分析: 白细胞 (WBC) 7.38 × 10⁹ · L⁻¹, 中性粒细胞数 (NEU) 5.34 × 10⁹ · L⁻¹, 红细胞 (RBC) 4.21 × 10¹² · L⁻¹, 血红蛋白 (Hb) 123 g · L⁻¹, 血

小板 (PLT) 113 × 10⁹ · L⁻¹ ↓, 中性粒细胞百分比 (NEU%) 72.5%; 肝肾功能: 谷丙转氨酶 (ALT) 16 U · L⁻¹, 谷草转氨酶 (AST) 21 U · L⁻¹, γ-谷氨酰转氨酶 (GGT) 24 U · L⁻¹, 碱性磷酸酶 (ALP) 126 U · L⁻¹, 白蛋白 (ALB) 45.1 U · L⁻¹, 总胆红素 (TBIL) 19.8 μmol · L⁻¹, 直接胆红素 (DBIL) 5.6 μmol · L⁻¹ ↑, 肌酐 (Cr) 73.5 μmol · L⁻¹, 尿素 (UA) 5.77 mmol · L⁻¹; 电解质: K⁺ 3.81 mmol · L⁻¹, Na⁺ 141.9 mmol · L⁻¹, Ca²⁺ 2.39 mmol · L⁻¹, Cl⁻ 103.9 mmol · L⁻¹。人乳头状瘤病毒 (HPV) -16: 阳性。肿瘤标志物检测: 癌胚抗原定量 (CEA) 6.82 ng · mL⁻¹ ↑, 糖类抗原 (CA) 199 43.71 U · mL⁻¹ ↑, CA125 21.33 U · mL⁻¹。凝血、尿液分析、输血全套未见明显异常。完善上下腹 CT、盆腔下腹 MRI 以及三维重建成像评估患者盆腹腔情况。阴道镜宫颈及宫颈内活组织病检情况如下, 宫颈组织: 慢性宫颈炎及宫颈内膜炎, 伴子宫颈上皮内瘤样病变, 个别腺体可见受累; 宫颈内组织: 鳞状上皮高级别上皮内瘤变, 癌变。结合患者病史及检验、检查, 诊断为“宫颈鳞癌 II B 期”。患者一般状态可, 排除化疗禁忌, 于 3 月 25 日行新辅助 TP (紫杉醇 180 mg d1 + 顺铂 90 mg d1, q21d) 方案化疗, 化疗期间患者未诉特殊不适。3 月 27 日化疗 48 h 后患者诉头晕、心慌无力, 全身乏力伴不自主震颤, 尿少, 无腹胀、腹痛等不适。急查血液分析: WBC 11.96 × 10⁹ · L⁻¹ ↑, NEU 10.89 × 10⁹ · L⁻¹ ↑, RBC 3.70 × 10¹² · L⁻¹ ↓, Hb 106 g · L⁻¹, PLT 179 × 10⁹ · L⁻¹, NEU% 91.0% ↑; 肝肾功能: ALT 24 U · L⁻¹, AST 31 U · L⁻¹, GGT 25 U · L⁻¹, ALP 102 U · L⁻¹, ALB 39.2 U · L⁻¹ ↓, TBIL 40.0 μmol · L⁻¹ ↑, DBIL 9.0 μmol · L⁻¹ ↑, Cr 63.0 μmol · L⁻¹, UA 4.42 mmol · L⁻¹; 电解质: K⁺ 3.81 mmol · L⁻¹, Na⁺ 121.2 mmol · L⁻¹ ↓, Ca²⁺ 2.19 mmol · L⁻¹, Cl⁻ 89.4 mmol · L⁻¹ ↓。考虑为中度低钠血症, 予以持续补钠、补液、观察尿量、心电监护等治疗, 3 月 28 日患者

基金项目: 四川省成都市医学科研课题 (编号: 2023427)。

作者简介: 高孟婷, 女, 主管药师, 主要从事抗肿瘤临床药理学研究, email: gmt20100806@163.com *通信作者: 林海霞, 女, 副主任药师, 主要从事临床药理学研究, email: 349586078@qq.com

仍自觉头晕、心慌、四肢震颤，复查电解质： K^+ 2.84 $mmol \cdot L^{-1}$ ↓， Na^+ 115.3 $mmol \cdot L^{-1}$ ↓， Ca^{2+} 1.95 $mmol \cdot L^{-1}$ ↓， Cl^- 90.6 $mmol \cdot L^{-1}$ ↓。患者于化疗 48 h 后出现顽固性低钠，起病迅速，血钠下降快，出现明显的神经系统症状，给予补钠治疗后未恢复正常，因此考虑该患者为顺铂诱导的 SIADH 所致重度低钠血症。治疗上予以限液补钠后托伐普坦治疗，约 1 周后患者的血钠水平逐渐恢复至正常范围，转归良好，未发现相关后遗症。患者入院治疗期间主要治疗用药及血钠浓度变化见表 1 和图 1。后期患者规律入院化疗，将化疗方案中顺铂调整为卡铂后未再发生低钠血症等 SIADH 相关症状。

表 1 患者入院期间主要治疗用药

主要治疗药物及用法用量	给药时间
地塞米松 20 mg po (紫杉醇前 12 h、6 h)	D8 ~ D9
西咪替丁 0.3 g ivgtt (紫杉醇前 30 min)	D9
苯海拉明 50 mg im (紫杉醇前 30 min)	D9
紫杉醇 180 mg ivgtt qd	D9
顺铂 90 mg ivgtt qd	D9
浓氯化钠 8 g ivgtt qd	D11 ~ D15
托伐普坦 7.5 mg po qd	D15 ~ D17

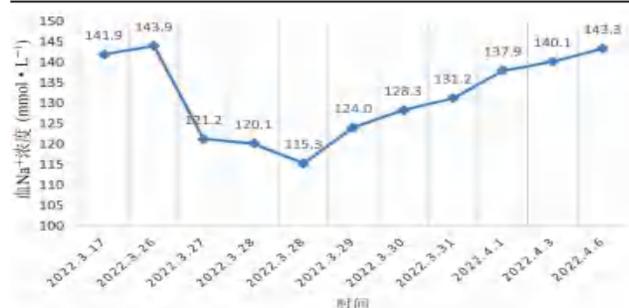


图 1 患者入院治疗期间血钠浓度变化图

2 分析讨论

本例患者化疗前电解质正常，可初步排除为肿瘤并发症副瘤综合征引起的低钠血症。患者化疗后出现顽固性低钠，起病迅速，血钠下降快，出现明显的神经系统症状，给予补钠治疗后未恢复正常。因此考虑患者低钠血症与化疗期间所用药物相关，梳理患者用药史并查阅相关资料，其中地塞米松的不良反应体液潴留以及紫杉醇导致的脱水与低钠血症之间存在一定的关系，但患者住院期间并无体液潴留相关症状，比如肿胀、体重增加、呼吸困难、尿量减少、皮肤变色等；也没有脱水相关的口渴、尿量减少、皮肤干燥等症状。因此排除了地塞米松和紫杉醇所致的低钠血症。基于既往有顺铂导致低钠血症的个案报道^[5-8]，因此考虑顺铂引起患者重度低钠血症的可能性更大。顺铂诱导的低钠血症有两种可能的病理生理学机制：SIADH 以及由于脱水和肾功能不全引起的肾盐消耗综合征 (RSWS)。RSWS 的发病机制被认为是由顺铂引起

的肾小管疾病，但确切的作用机制尚不清楚，也没有明确的诊断标准。其特征是明显的脱水和肾功能不全体征^[9]。RSWS 可能在药物暴露后几天到几个月内发生，提示累积的肾脏效应，恢复可以在几天到几个月内发生，也可能持续存在^[10]。SIADH 则被认为是由髓祥的电解质吸收受损、顺铂给药期间水合作用增加以防止肾脏损伤、呕吐和疼痛导致的抗利尿激素分泌加速引起的，发病较早，可发生在顺铂给药后的前 2 d，血钠水平在停止致病药物后迅速恢复正常^[11]。SIADH 的临床特征和时间特征与 RSWS 不同。因此，结合本例患者的相关特点我们更多考虑的是顺铂诱导的 SIADH。Naranjo 药物不良反应概率量表被广泛用于评价药物与药物不良反应 (ADRs) 之间的关系。总分 ≥ 9 分，该药物与不良反应的因果关系为肯定的；5 ~ 8 分，为很可能有关；1 ~ 4 分，为可能有关； ≤ 0 分，为可疑。根据量表结果，本例患者顺铂诱导的 SIADH，总分为 7 分，因果关系评估为“很可能” (见表 2)。

表 2 Naranjo 药物不良反应评估量表

问题	是	否	未知得分
该药是否曾引起此类 ADR	1		1
药物作用时间与 ADR 出现时间是否有关系	2		2
在停药后或使用拮抗剂后 ADR 是否得到缓解	1		1
再次使用此类药物 ADR 是否会重复出现			0 0
是否存在其他因素能引起该 ADR		2	2
使用安慰剂后会不会重复出现该 ADR			0 0
药物在体内测定可否判断为毒性反应			0 0
随着该药剂量的加重 ADR 是否加重，或随着剂量减少而缓解			0 0
患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现过类似反应		0	0
是否存在任何客观证据证实该反应	1		1
得分	7 分		

1982 年，Levin 等^[12]首次描述了顺铂诱导的恶性胸腺瘤患者低钠血症的病例。随后，在卵巢癌、非小细胞肺癌、食管癌、宫颈神经内分泌肿瘤、鳞状细胞癌、小儿骨肉瘤和尿路上皮癌患者中均有报道^[7]。一项回顾性病例对照研究显示，在混合癌症类型的患者中，静脉给予顺铂后低钠血症的发生率为 67.2% (317/472)；56.6% (267/472) 的患者低钠血症是轻度的 (血钠浓度 130 ~ 137 $mmol \cdot L^{-1}$)；8.9% (42/472) 的患者低钠血症是中度的 (血钠浓度 120 ~ 129 $mmol \cdot L^{-1}$)；只有 1.7% (8/472) 的患者低钠血症是重度的 (血钠浓度 $< 120 mmol \cdot L^{-1}$)^[13]。宫颈鳞状细胞癌患者中经顺铂治疗后出现重度低钠血症的病例很少见，目前仅有 2 例报道，1 例是 2002 年 Ishii 等^[14]发表的宫颈鳞状细胞癌经动脉内顺铂治疗诱导的重度低钠血症 (血钠浓度为 110 $mmol \cdot L^{-1}$)；另 1 例是 2008 年由李亚等^[15]报道的宫颈非角化型鳞状细胞癌经多西

他赛联合顺铂方案辅助化疗后诱导的重度低钠血症(血钠浓度为 $104.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。本文报道的此例为第 3 例因宫颈鳞状细胞癌在接受顺铂化疗后, 导致 SIADH 而出现重度低钠血症。

对于大多数 SIADH 患者, 液体限制是主要的治疗方法, 建议目标液体摄入量低于 $800 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$ ^[16]。一项纳入 1524 例 SIADH 患者的跨国研究发现, 液体限制是最常用的手段(48%), 并且在治疗最初的 24 h 内血钠浓度增加的中位数为 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[17]。对于有重度低钠血症的 SIADH 患者, 通常需要给予静脉注射 3% 高渗氯化钠, 起始速率为 $15 \sim 30 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$, 经外周静脉给药; 另一种治疗方式是每 6 h 静脉推注 $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ (最大剂量为 100 mL) 3% 高渗氯化钠, 并根据需要调整剂量。输液后应积极复查血钠浓度, 使速度控制在 24 h 血钠浓度升高 $8 \sim 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 48 h 血钠浓度升高 $18 \sim 25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[18]。必须注意纠正血钠浓度不宜过快, 否则可造成中心性桥脑髓鞘破坏, 遗留神经系统后遗症。血管升压素受体拮抗剂可选择性利尿, 但不影响钠和钾的排泄^[19]。无电解质水的流失会提高 SIADH 患者的血钠水平, 并可改善血钠浓度低于 $130 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 患者的精神状态。然而, 此类药物可导致患者口渴, 从而限制血钠的升高。血管升压素受体拮抗剂如托伐普坦, 其对血管紧张素 II 受体具有选择性, 已被批准用于治疗临床上明显的高容量性和正常容量性低钠血症。尽管托伐普坦可有效提高 SIADH 患者的血钠浓度, 但 FDA 警示托伐普坦不应使用超过 30 d, 也不应用于肝病(包括肝硬化)患者^[20]。本例患者考虑为 SIADH 后严格限水以及口服托伐普坦 7.5 mg qd 治疗, 第 3 日开始血钠水平上升至正常水平, 乏力以及神经系统症状均缓解, 治疗效果较好。

顺铂已被证实是治疗多种癌症的有效药物, 但需要注意其 ADR, 尤其是罕见的 ADR。SIADH 所致低钠血症是一种与顺铂相关的不常见并发症。临床上引发低钠血症的因素很多, 鉴别诊断也较为复杂, 临床药师在药学监护过程中若遇到顽固性低钠血症患者时, 应考虑 SIADH 的可能, 与临床积极沟通, 检查明确病因, 避免出现漏诊、误诊而延误治疗的情况。

参考文献

[1] Zhou JB, Kang Y, Chen L, et al. The drug-resistance mechanisms of five platinum-based antitumor agents [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 343.
 [2] Manohar S, Leung N. Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature [J]. *J Nephrol*, 2018, 31 (1): 15-25.
 [3] Qi LY, Luo Q, Zhang YY, et al. Advances in toxicological research of the anticancer drug cisplatin [J]. *Chem Res Toxicol*,

2019, 32 (8): 1469-1486.
 [4] Donald DM, Sherlock M, Thompson CJ. Hyponatraemia and the syndrome of inappropriate antidiuresis (siad) in cancer [J]. *Endocr Oncol*, 2022, 2 (1): R78-r89.
 [5] Abid H, Siddiqui N, Gnanajothy R. Severe hyponatremia due to cisplatin-induced syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone [J]. *Cureus*, 2019, 11 (8): e5458.
 [6] Futai R, Yoshie T, Sanuki T, et al. Folinic acid, fluorouracil, and oxaliplatin therapy for recurrent esophageal cancer with syndrome of inadequate antidiuretic hormone secretion (SIADH) after preoperative cisplatin/5-fluorouracil therapy [J]. *Am J Case Rep*, 2022, 23: e935121.
 [7] Tan AC, Marx GM. Cisplatin-induced syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion (siadh) with life-threatening hyponatraemia [J]. *BMJ Case Rep*, 2018, 2018: bcr2017.
 [8] Shimada A, Takeuchi H, Fukuda K, et al. Hyponatremia in patients with esophageal cancer treated with chemotherapy including cisplatin [J]. *Esophagus*, 2018, 15 (4): 209-216.
 [9] Kurtzberg J, Dennis VW, Kinney TR. Cisplatin-induced renal salt wasting [J]. *Med Pediatr Oncol*, 1984, 12 (2): 150-154.
 [10] Hutchison FN, Perez EA, Gandara DR, et al. Renal salt wasting in patients treated with cisplatin [J]. *Ann Intern Med*, 1988, 108 (1): 21-25.
 [11] Sawano T, Kawasaki H, Wajima N, et al. A case of syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion in a patient with esophageal carcinoma possibly induced by cisplatin in neoadjuvant chemotherapy [J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2014, 41 (8): 999-1003.
 [12] Levin L, Sealy R, Barron J. Syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion following dis-dichlorodiammineplatinum II in a patient with malignant thymoma [J]. *Cancer*, 1982, 50 (11): 2279-2282.
 [13] Hatakeyama S, Shida T, Yamaguchi H. Risk factors for severe hyponatremia related to cisplatin: a retrospective case-control study [J]. *Biol Pharm Bull*, 2019, 42 (11): 1891-1897.
 [14] Ishii K, Aoki Y, Sasaki M, et al. Syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone induced by intraarterial cisplatin chemotherapy [J]. *Gynecol Oncol*, 2002, 87 (1): 150-151.
 [15] 李亚, 陈庭惠, 马丁. 宫颈癌化疗后低钠血症致神经系统症状 1 例 [J]. *医药导报*, 2008, 27 (6): 654-654.
 [16] Adrogue HJ, Madias NE. Hyponatremia [J]. *N Engl J Med*, 2000, 342 (21): 1581-1589.
 [17] Verbalis JG, Greenberg A, Burst V, et al. Diagnosing and treating the syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion [J]. *Am J Med*, 2016, 129 (5): 537.e9-537.e23.
 [18] Ellison DH, Berl T. Clinical practice. The syndrome of inappropriate antidiuresis [J]. *N Engl J Med*, 2007, 356 (20): 2064-2072.
 [19] Greenberg A, Verbalis JG. Vasopressin receptor antagonists [J]. *Kidney Int*, 2006, 69 (12): 2124-2130.
 [20] Berl T, Quittnat-Pelletier F, Verbalis JG, et al. Oral tolvaptan is safe and effective in chronic hyponatremia [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21 (4): 705-712.

(收稿日期: 2023-11-06; 修回日期: 2024-04-09)