



# 中南药 学

ZHONGNAN YAOXUE

月刊 2003年4月创刊 第22卷 第8期(总第223期) 2024年8月20日出版

## 目 次

### 顾问

周宏灏

### 主编

李焕德

### 社长

张毕奎

### 编辑部主任

邬志娟

### 主管单位

湖南省食品药品监督管理局

### 主办单位

湖南省药学会

编辑: 中南药 学编辑委员会

地址: 长沙市人民 中路 139 号中南  
大学湘雅二医院内

出版: 《中南药 学》编辑部

发行: 湖南省报 刊发行局

印刷: 长沙建 华印务有限公司

订阅: 全国各地 邮局

定价: 每期 30.00 元, 全年 360.00 元

邮编: 410011

电话: (0731) 82258487/84895602

传真: (0731) 82258487

邮发代 号: 42-290

投稿网 址: <http://znyx.cbpt.cnki.net>

email: [znyxzz2003@vip.163.com](mailto:znyxzz2003@vip.163.com)

广告经 营许可 证: 4300004000764

中国标 准连续 出版物 号

ISSN 1672-2981

CN43-1408/R

2024 年 版 权 归 《 中 南 药 学 》

编辑 部 所 有

## 研究论文

- (1971) 锐裂钱袋苔化学成分研究……………王潇, 崔伟亮, 王姝麒
- (1976) 中药芸香中 (+)/(-)-Rutabenzofuran A 和 (+)/(-)-Rutabenzofuran B 的抗肝炎活性评价……………苏彦红, 刘艳阳, 王春江, 等
- (1981) 丹参 - 三七药对对氧糖剥夺 / 再灌注损伤的小胶质细胞的保护作用……………吴桂月, 李蕊臣, 雷震, 等
- (1986) 基于酰胺甲基化策略的 GluA2 内吞阻滞剂环肽的合成及评价……………陈小雨, 董铭心
- (1993) 甘草次酸调控铁死亡缓解舒尼替尼肝损伤的机制研究……………曹蓉, 刘灵, 郭林, 等
- (1999) 虎杖多糖中蛋白去除工艺及多糖的抗炎作用研究……………罗励耕, 王丹, 孟宪群, 等
- (2006) 高剪切工艺制备阿立哌唑长效注射混悬剂……………朱思琪, 王丹, 刘坤鹏, 等
- (2012) 褪黑素通过下调 PD-L1 表达抑制胶质瘤细胞免疫逃逸……………王梦迪, 孙定亚, 任欢欢, 等
- (2019) 基于网络药理学和体外实验探讨金银花治疗 IgA 肾病的作用机制……………王蕾, 梁冬雨, 曹励欧
- (2025) 基于 TGF- $\beta$ 1/Smad2/3 信号通路探讨茴香胶囊抗支气管哮喘作用及机制……………阿依妮葛尔·麦提艾力, 阿布里米提·阿不列里木, 窦勤, 等
- (2033) 基于 UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> 的倒提壶指纹图谱的建立和多指标含量测定……………阿迪莱·阿不力米提, 滕亮, 马桂芝
- (2040) 二陈汤化裁方破壁饮片水溶液的化学成分及入血成分分析……………张义, 陈炜璇, 刘苗玲, 等
- (2048) 不同产地白术挥发性成分 HS-SPME/GC-MS 分析……………刘雅冬, 刘舒, 向蒙, 等
- (2053) UPLC-MS/MS 法及均相酶免疫法测定人全血西罗莫司浓度……………杨华, 王兰, 宋微微, 等
- (2058) 用于伤口镇痛及愈合的 PLGA-PEG-PLGA 热敏凝胶的制备……………余紫依, 夏方亮, 张建勇, 等
- (2064) AHP-CRITIC 法结合正交设计优选芪术平喘止汗胶囊水提取工艺……………郭君婷, 叶斯木·塔拉甫别克, 赵婷婷, 等

## 造影剂的临床应用与药代动力学研究进展专题

- (2070) 微泡超声造影剂生物分析方法及药代动力学研究进展……………陈梓欣, 陈西敬, 赵娣

## 《中南药学》杂志第五届编委会

### 主编

李焕德

### 副主编 (按姓氏笔画排列)

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

### 编委 (按姓氏笔画排列)

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

(2077) 近红外荧光造影剂的临床应用与药代动力学研究进展

..... 刘睿婷, 李涛, 陈梓欣, 等

## 中医药原创思维与临床疗效提升研究专题

(2084)《辅行诀》与《脏腑标本虚实寒热用药式》中肝木疾病临床表现及治疗用药的异同点分析 ..... 齐明月, 吕旭潇, 金锐

(2090) 从“汤液经法图”角度探讨陈无择天干十方的组方用药规律 ..... 金锐, 王静, 齐明月, 等

(2095) 对《辅行诀》中大黄味咸记载的探讨 ... 龚宗玉, 郭红叶, 张盛敏, 等

## 综述

(2100) 浅谈 rasH2-Tg 小鼠短期致癌性试验的设计要点

..... 张佳珊, 张冬霞, 宫田田, 等

(2108) 不同化学型樟树中萜类成分及药理活性的研究进展

..... 俞静怡, 胡文杰, 罗辉, 等

(2116) 丹参酚酸类化合物的合成生物学研究进展

..... 郑伊诺, 贾佳庆, 刘媚琪, 等

(2124) 达比加群在儿童血栓栓塞性疾病的应用研究进展

..... 周姝含, 胡长平, 罗平

(2131) 透明质酸修饰血清白蛋白纳米粒在肿瘤诊疗中的研究进展

..... 唐嘉, 周莉莉

(2138) 雪莲多糖的结构分析及其生物活性研究进展

..... 马巧丽, 胡玉龙, 李杰明, 等

(2144) 治疗视网膜分支静脉阻塞及继发黄斑水肿药物研究进展

..... 杨玉畅, 白杰, 胡盼祥, 等

(2149) 钩藤碱治疗阿尔茨海默病的药理作用研究进展

..... 张阳, 朱梦宇, 陈垒, 等

(2156) 数学模型在肾脏药物浓度预测中的应用 ..... 赵一馨, 何华

## 药物分析与检验

(2163) 橘红药材、饮片、标准汤剂与配方颗粒的指纹图谱相关性研究

..... 李仰华, 黄凯伟, 郭志俊, 等

(2170) 药用辅料甘油三乙酯中 7 种 ICH 控制元素测定方法的建立

..... 张悦, 郑金凤, 刘雁鸣, 等

(2173) 药用玻璃颗粒耐水性测定的能力验证研究

..... 齐艳菲, 李晓宇, 谢兰桂, 等

(2177) 红药片中黄曲霉毒素的含量测定及限度研究

..... 张耀文, 李尚颖, 隋晓璠, 等

(2182) HPLC 法测定富马酸伏诺拉生注射液中有物质的含量

..... 解元元, 崔祥祯, 杨永, 等

(2187) 离子色谱法同时测定低分子量肝素钠注射液中的有机酸和无机阴离子 ..... 肖菁, 王蓉蓉, 张俊, 等

(2191) 高温条件下盐酸雷尼替丁中 *N*-亚硝基二甲胺及其前体化合物二甲胺和亚硝酸盐研究 ..... 杜冬生, 钟鸿姣, 胡杰, 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。

(2197) 高效液相色谱法同时测定多索茶碱注射液中 9 种杂质的含量  
 ..... 李锋武, 范菲, 周娜, 等

## 中药资源开发与利用

(2201)《神农本草经》与《中国药典》2020 年版对中药四气五味表述异同分析  
 ..... 王莹, 杨文华, 梁艳, 等

(2206) 麻黄“先煮”“去沫”理论的历史演变规律与探讨  
 ..... 杨文华, 王莹, 潘霖, 等

(2212) 基于数据挖掘的《奇效良方》中鲜药应用特点分析  
 ..... 井卫朋, 李洵, 齐玉濮, 等

## 临床药师在临床

(2217) 1 例抗 GABA<sub>B</sub>R 抗体相关脑炎的全程化药学监护和用药分析  
 ..... 张璇, 姜珊珊, 焦秀秀, 等

(2221) 1 例利奈唑胺与克拉霉素药物相互作用的病例分析  
 ..... 刘群, 扎央, 卓嘎, 等

## 药物与临床

(2225) 个体化预测急性脑梗死患者阿替普酶溶栓出血风险的 Nomgram 模型的初步建立及验证 ..... 庞天义, 满德强, 常群

(2230) 利培酮联合阿立哌唑对男性精神分裂症患者内分泌激素水平的影响  
 ..... 张燕, 王国元, 郭影影

## 医院药学

(2234) 免疫检查点抑制剂治疗非小细胞肺癌患者疗效影响因素分析及预测模型的构建 ..... 罗竣豪, 沈悦, 陈洁祺, 等

(2243) 两票制政策对医疗机构药品供应的影响效应研究——以山东省某医院为例 ..... 梁轶群, 闫美兴, 于宝东

## 药品不良反应

(2248) 基于 FAERS 数据库的喹硫平不良事件信号挖掘与分析  
 ..... 邓珍珍, 冯灿, 汪江林

(2255) 替雷利珠单抗治疗晚期非小细胞肺癌致免疫相关性胰腺炎 1 例  
 ..... 谢杏梅, 高悦

(2258) 雷公藤多苷片致脊髓亚急性联合变性 1 例 ..... 孙楠, 庄伟, 孔祥文

[ 本刊基本参数 ] CN43-1408/R\*2003\*b\*A4\*286\*zh\*P\*30.0\*50\*2024-08

本期责任编辑: 邬志娟, 彭金飞, 李科, 陆窈窈

英文编辑: 周静

# CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 22, Number 8 August 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](mailto:znyxzz2003@vip.163.com)

## Advertisement Publishing Certification

4300004000764

## CONTENTS IN BRIEF

- (1971) Chemical constituents of *Marsupella commutata* (Limpr.) Bernet.  
..... WANG Xiao, CUI Wei-liang, WANG Shu-qi
- (1976) Anti-hepatitis activities of (+)(-)-Rutabenzofuran A and (+)(-)-Rutabenzofuran B in traditional Chinese medicine *Ruta graveolens* L.  
..... SU Yan-hong, LIU Yan-yang, WANG Chun-jiang, et al
- (1981) Protective effect of salvia miltiorrhiza-panax notoginseng against microglia cell injury induced by oxygen-glucose deprivation/reperfusion  
..... WU Gui-yue, LI Rui-chen, LEI Zhen, et al
- (1986) Synthesis and evaluation of cyclopeptide, a GluA2 endocytosis blocker based on amide methylation strategy  
..... CHEN Xiao-yu, DONG Ming-xin
- (1993) Glycyrrhetic acid alleviates sunitinib-induced liver injury via regulating ferroptosis and related mechanism  
..... CAO Rong, LIU Ling, GUO Lin, et al
- (1999) Protein removal process and anti-inflammation effect of polysaccharides from *Polygonum cuspidatum*  
..... LUO Li-geng, WANG Dan, MENG Xian-qun, et al
- (2006) Preparation of aripiprazole long-acting injectable suspension by high-shear rotor-stator wet milling  
..... ZHU Si-qi, WANG Dan, LIU Kun-peng, et al
- (2012) Melatonin attenuated the immune evasion of glioma cells by down-regulating PD-L1 expression  
..... WANG Meng-di, SUN Ding-ya, REN Huan-huan, et al
- (2019) Mechanism of honeysuckle for IgA nephropathy based on network pharmacology and in vitro experimental verification  
..... WANG Lei, LIANG Dong-yu, CAO Li-ou
- (2025) Anti-bronchial asthma effect of Huixiang capsules based on TGF- $\beta$ 1/Smad2/3 signaling pathway and related mechanism  
..... Ayinigeer Maimaitiali, Abulimiti Abulielimu, DOU Qin, et al
- (2033) Fingerprints and multi-component content determination of *Cynoglossum officinale* L. based on UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>  
..... Adila Ablimit, TENG Liang, MA Gui-zhi
- (2040) Chemical composition and blood ingredient of the water solution of ultra-fine granular powder of Erchen decoction modified formula  
..... ZHANG Yi, CHEN Wei-xuan, LIU Miao-ling, et al
- (2048) Volatile compounds of *Atractylodes macrocephala* from different regions by HS-SPME/GC-MS ... LIU Ya-dong, LIU Shu, XIANG Meng, et al



**Postal code**

42-290

**Publish**

Editorial Department of Central South Pharmacy

**Subscribe**

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

**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.

- (2053) Determination of sirolimus concentration in human whole blood by UP-LC-MS/MS and homogeneous enzyme immunoassay  
..... YANG Hua, WANG Lan, SONG Wei-wei, et al
- (2058) Preparation of PLGA-PEG-PLGA thermal gel for wound analgesics and healing..... YU Zi-yi, XIA Fang-liang, ZHANG Jian-yong, et al
- (2064) Optimization of aqueous extraction of Qizhu Pingchuan Zhihan capsules by AHP-CRITIC method combined with orthogonal design  
..... GUO Jun-ting, Yesem Talpbek, ZHAO Ting-ting, et al
- (2070) Advances in bioanalysis methods and pharmacokinetics of microbubble ultrasound contrast agents ... CHEN Zi-xin, CHEN Xi-jing, ZHAO Di
- (2077) Progress in clinical application and pharmacokinetics of near-infrared fluorescent imaging agents ... LIU Rui-ting, LI Tao, CHEN Zi-xin, et al
- (2085) Clinical manifestations and therapeutic use of Chinese medicine for liver diseases in *Fuxingjue* and *Medication Patterns for Treating Deficiency-excess and Cold-heat of Five Viscera*  
..... QI Ming-yue, LYU Xu-xiao, JIN Rui
- (2090) Rules of formulation combinations in ten heavenly stems from the perspective of “Tang-ye-jing-fa map”  
..... JIN Rui, WANG Jing, QI Ming-yue, et al
- (2095) Discussion of “salty” flavor of Rheum officinale in *Fuxingjue*  
..... GONG Zong-yu, GUO Hong-ye, ZHANG Sheng-min, et al
- (2100) Key points in study design of the short-term carcinogenicity with rasH2-Tg mice model  
..... ZHANG Jia-shan, ZHANG Dong-xia, GONG Tian-tian, et al
- (2108) Research progress in terpenoids and their pharmacological activities in different chemotypes of *Cinnamomum Camphora*  
..... YU Jing-yi, HU Wen-jie, LUO Hui, et al
- (2116) Research progress in synthetic biology of salvianolic acid compounds  
..... ZHENG Yi-nuo, JIA Jia-qing, LIU Mei-qi, et al
- (2124) Research of dabigatran in children with thromboembolic diseases  
..... ZHOU Shu-han, HU Chang-ping, LUO Ping
- (2131) Advances of hyaluronic acid-modified serum albumin nanoparticles in the diagnosis and treatment of cancer..... TANG Jia, ZHOU Li-li
- (2138) Research progress in structure analysis and bioactivities of *Saussurea involucrata* polysaccharide ..... MA Qiao-li, HU Yu-long, LI Jie-ming, et al
- (2144) Advances in drug therapy for branch retinal vein occlusion  
..... YANG Yu-chang, BAI Jie, HU Pan-xiang, et al
- (2149) Research progress in the pharmacology of rhynchophylline for Alzheimer’s disease ..... ZHANG Yang, ZHU Meng-yu, CHEN Lei, et al
- (2156) Mathematical models in predicting renal drug concentration  
..... ZHAO Yi-xin, HE Hua
- (2163) Correlation analysis of fingerprints of Citri Eoxcarpium Rubrum medicinal materials, decoction pieces, standard decoction and formula granules  
..... LI Yang-hua, HUANG Kai-wei, GUO Zhi-jun, et al
- (2170) Determination of 7 elements in pharmaceutical excipient triacetin by ICH requirement ..... ZHANG Yue, ZHENG Jin-feng, LIU Yan-ming, et al
- (2173) Hydrolytic resistance of pharmaceutical glass grains  
..... QI Yan-fei, LI Xiao-yu, XIE Lan-gui, et al

- (2177) **Determination and limit of aflatoxins in Hongyao tablets**  
 ..... ZHANG Yao-wen, LI Shang-ying, SUI Xiao-fan, et al
- (2182) **HPLC determination of related substances in vonoprazan fumarate injection**  
 ..... XIE Yuan-yuan, CUI Xiang-zhen, YANG Yong, et al
- (2187) **Determination of organic acids and inorganic anions in low molecular weight heparin sodium injection by ion chromatography**  
 ..... XIAO Jing, WANG Rong-rong, ZHANG Jun, et al
- (2191) **N-nitrosodimethylamine and its precursors dimethylamine and nitrite in ranitidine hydrochloride under high temperature**  
 ..... DU Dong-sheng, ZHONG Hong-jiao, HU Jie, et al
- (2198) **Simultaneous determination of 9 impurities in doxofylline injection by HPLC** ..... LI Feng-wu, FAN Fei, ZHOU Na, et al
- (2201) **Similarities and differences between *Shennong's Herbal Classic* and *Chinese Pharmacopoeia* (2020) on the expression of four properties and five flavors of traditional Chinese medicine**  
 ..... WANG Ying, YANG Wen-hua, LIANG Yan, et al
- (2206) **Historical evolution and theory of “boiling first” and “removing foam” for *Ephedrae Herba*** ..... YANG Wen-hua, WANG Ying, PAN Lin, et al
- (2212) **Characteristics of use of fresh medicine in *Qixiao Liangfang* based on data mining** ..... JING Wei-peng, LI Xun, QI Yu-pu, et al
- (2217) **Whole-course pharmaceutical care for a patient with anti- $\gamma$ -aminobutyric acid B receptor encephalitis and medication analysis**  
 ..... ZHANG Xuan, JIANG Shan-shan, JIAO Xiu-xiu, et al
- (2225) **Preliminary establishment and verification of Nomgram model for individualized prediction of the risk of bleeding in patients with acute cerebral infarction and thrombolysis with alteplase**  
 ..... PANG Tian-yi, MAN De-qiang, CHANG Qun
- (2230) **Effect of risperidone combined with aripiprazole on the endocrine hormone levels in male patients with schizophrenia**  
 ..... ZHANG Yan, WANG Guo-yuan, GUO Ying-ying
- (2234) **Prognostic factors after non-small cell lung cancer patients treated with immune checkpoint inhibitors and establishment of a prediction model**  
 ..... LUO Jun-hao, SHEN Yue, CHEN Jie-qi, et al
- (2243) **Effect of Two-vote system on drug supply in medical institutions: a hospital in Shandong as a case study**  
 ..... LIANG Yi-qun, YAN Mei-xing, YU Bao-dong
- (2248) **Data mining of adverse drug event signals for quetiapine based on FAERS database** ..... DENG Zhen-zhen, FENG Can, WANG Jiang-lin

## 研究论文

## 锐裂钱袋苔化学成分研究

王潇<sup>1</sup>, 崔伟亮<sup>2</sup>, 王姝麒<sup>1\*</sup> (1. 山东大学药学院, 济南 250012; 2. 山东省食品药品检验研究院, 济南 250101)

**摘要:** 目的 分离鉴定锐裂钱袋苔的次级代谢产物。方法 利用 MCI 树脂、硅胶、LH-20 凝胶、C<sub>18</sub> 反相硅胶柱色谱及高效液相色谱等技术对锐裂钱袋苔乙醇提取物进行分离纯化, 通过波谱数据分析, 鉴定化合物的结构。结果 从锐裂钱袋苔中分离鉴定 6 个化合物, 分别为 neryl hydroquinone (1)、(R, Z)-2-(3-hydroxy-3, 7-dimethylocta-1, 6-dien-1-yl) benzene-1, 4-diol (2)、didehydroconicol (3)、2, 6-dihydroxy-3, 4-dimethylbenzoic acid methyl ester (4)、ethyl orsellinate (5) 和 ethyl haematommate (6)。化合物 2 抑制促炎因子 *IL-18* 转录和 iNOS 及 TNF- $\alpha$  表达。结论 化合物 1 ~ 3 为异戊烯基化的对苯二酚衍生物, 为首次从钱袋苔属植物中分离得到, 化合物 4 ~ 6 为间苯二酚衍生物。化合物 2 可以抑制脂多糖 (LPS) 诱导的 RAW264.7 细胞炎症反应。

**关键词:** 钱袋苔; 苔类植物; 异戊烯化; 抗氧化剂; 化学成分

中图分类号: R914, R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)08-1971-05  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.001

### Chemical constituents of *Marsupella commutata* (Limpr.) Bernet.

WANG Xiao<sup>1</sup>, CUI Wei-liang<sup>2</sup>, WANG Shu-qi<sup>1\*</sup> (1. School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012; 2. Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101)

**Abstract: Objective** To determine the secondary metabolites of *Marsupella commutata* (Limpr.) Bernet. (*M. commutate*). **Methods** The ethanol extract from *M. commutate* was isolated and purified by MCI, silica gel, LH-20 gel, C<sub>18</sub> reversed phase silica gel column chromatography and high performance liquid chromatography. The structures of the compounds were identified by spectral data analysis. **Results** Totally 6 compounds were isolated and identified from *M. commutate*, including neryl hydroquinone (1), (R, Z)-2-(3-hydroxy-3, 7-dimethylocta-1, 6-dien-1-yl) benzene-1, 4-diol (2), didehydroconicol (3), 2, 6-dihydroxy-3, 4-dimethylbenzoic acid methyl ester (4), ethyl orsellinate (5), and ethyl haematommate (6). Compound 2 inhibited the transcription of pro-inflammation cytokines *IL-18*, and the intracellular expression of iNOS and TNF- $\alpha$ . **Conclusion** Compounds 1 ~ 3 are prenylated hydroquinone derivatives, which are isolated from *M. commutate* for the first time, and compounds 4 ~ 6 are resorcinol derivatives. Compound 2 can inhibit the inflammatory responses of lipopolysaccharide stimulated RAW264.7 cells.

**Key words:** *Marsupella*; liverwort; prenylation; antioxidation; chemical constituent

苔纲植物 (Marchantiophyta) 遍布世界各地, 约有 6000 种, 它们可以在潮湿的土壤、岩石和树木上生长, 有些种类生长在河流和湖泊中<sup>[1]</sup>。与藓纲 (Bryophyta) 和角苔纲 (Anthocerotophyta) 不同, 苔纲植物的细胞内通常富含油体 (oil bod-

ies), 由结构多样的萜类及芳香化合物构成<sup>[2]</sup>。目前, 从苔纲植物中已经分离得到数百个新化合物, 其中包括 40 多个萜类和芳香族化合物的新碳骨架<sup>[3]</sup>。民间将苔藓植物的干燥粉末与油混合, 用于治疗刀割、火烧导致的外伤<sup>[4]</sup>。

基金项目: 国家重点研发计划 - 中医药现代化专项 (No. 2023YFC3504102)。

作者简介: 王潇, 女, 实验师, 主要从事天然药物化学研究, email: wxiao1226@sdu.edu.cn \*通信作者: 王姝麒, 男, 正高级实验师, 主要从事药物分析研究, email: wangsq@sdu.edu.cn

钱袋苔属 (*Marsupella*) 植物属于苔纲全萼苔科 (Gymnomitriaceae), 研究发现该属植物次级代谢产物多为三环倍半萜类化合物, 并以长叶松烷型倍半萜 (longipinane) 为标志性成分<sup>[5-12]</sup>。为了充分挖掘钱袋苔属植物药用价值, 本文对锐裂钱袋苔 *Marsupella commutata* (Limpr.) Bernet. 的乙醇提取物进行分离鉴定, 从中获得了 neryl hydroquinone (1)、(R, Z)-2-(3-hydroxy-3, 7-dimethylocta-1, 6-dien-1-yl) benzene-1, 4-diol (2)、didehydroconicol (3)、2, 6-dihydroxy-3, 4-dimethylbenzoic acid methyl ester (4)、ethyl orsellinate (5) 和 ethyl haematommate (6) 等 6 个化合物, 这是首次对锐裂钱袋苔化学成分进行研究, 化合物 1~3 系首次从钱袋苔属植物中分离得到, 化合物结构见图 1。

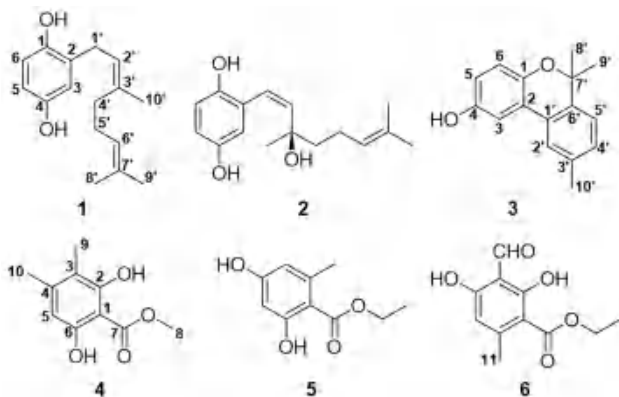


图 1 化合物 1~6 结构

Fig 1 Structures of compounds 1~6

## 1 试药与仪器

### 1.1 试药

锐裂钱袋苔全株于 2014 年 7 月采自中国吉林省长白山, 由临沂大学医学院周金川副教授鉴定, 标本保存于山东大学药学院天然药物化学研究所, 标本号: 20140720-13。

MCI 微孔树脂 (CHP20P, 75~150  $\mu\text{m}$ , 三菱化学工业有限公司), 硅胶 (200~300 目, 青岛海洋化工有限公司),  $\text{C}_{18}$  反相硅胶 (40~63  $\mu\text{m}$ , Fuji Sylysia 公司), 凝胶 (Sephadex LH-20, 25~100  $\mu\text{m}$ , Pharmacia Biotech 公司), 薄层层析采用硅胶 GF254 预制板 (青岛海洋化工有限公司), 石油醚、丙酮、二氯甲烷、甲醇 (分析纯, 天津四友试剂公司), 高效液相色谱仪用甲醇 (色谱纯, 美国天地公司)。MEM 培养基、DMEM 高糖培养基和胎牛血清 (Gibco 公司), 非必需氨基酸 (100 $\times$ , 武汉普诺赛生命科技有限公司), 丙酮酸钠 (100  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、100 $\times$  青链霉素混合液和总 RNA 提取试剂 (北京索莱宝科技有限公司), CCK-8 试剂盒 (大连美仑生

物技术有限公司)。PrimeScript RT Master Mix 和 TB Green Premix Ex Taq (TaKaRa 公司)。HepG2 人肝癌细胞 (山东大学药学院张涛教授惠赠), RAW264.7 小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 (山东大学药学院张志岳教授惠赠), 脂多糖 (LPS) 和棕榈酸 (纯度  $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich 公司), qPCR 引物 (生工生物工程股份有限公司), 诱导型 - 氧化氮合酶 (iNOS)、肿瘤坏死因子  $-\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 流式检测抗体 (eBioscience 公司)。

### 1.2 仪器

N-1001 型旋转蒸发仪 (东京理化器械株式会社); AG135 十万分之一电子分析天平 (瑞士梅特勒托利多科有限公司); AvanceCore 核磁共振波谱仪和 Avance DRX-600 核磁共振分析 (美国布鲁克科技有限公司); 1200 型高效液相色谱仪和 Eclipse XDB- $\text{C}_{18}$  (9.4  $\text{mm}\times 250\text{ mm}$ , 5  $\mu\text{m}$ ) 半制备柱 (美国安捷伦科技有限公司); Infinite f50 吸收光酶标仪 (瑞士帝肯公司); LTQ-Orbitrap XL 高分辨质谱仪、NanoDrop One 超微量紫外-可见分光光度计 (美国赛默飞世尔科技有限公司); Lightcycler96 荧光定量 PCR 仪 (瑞士罗氏生命科学有限公司); FACSCelesta 流式细胞仪 (美国碧迪生命科学有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 提取与分离

自然阴干的锐裂钱袋苔全株 500 g, 剪碎后, 以 10 倍体积的 90% 乙醇回流提取 (4 次, 每次 2.5 h), 合并抽滤液, 旋转蒸发仪浓缩至浸膏。浸膏加甲醇超声溶解后上 MCI CHP20P 微孔树脂, 以甲醇水体系梯度 (30% $\rightarrow$ 100%) 洗脱, 对 60% 甲醇洗脱组分 (5.0 g) 进行系统分离: 硅胶柱以石油醚-丙酮体系梯度 (200:1 $\rightarrow$ 2:1) 洗脱, 得到 Fr.1A~Fr.1D 四个组分, Fr.1A (134.5 mg) 依次经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱 (二氯甲烷-甲醇=1:2, 等度洗脱)、 $\text{C}_{18}$  反相硅胶柱色谱 (甲醇水 50% $\rightarrow$ 90%, 梯度洗脱) 后再次通过硅胶柱色谱以石油醚/丙酮体系 (100:1 $\rightarrow$ 10:1, 梯度洗脱) 分离得到化合物 6 (2.0 mg); Fr.1B 组分依次经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱 (二氯甲烷-甲醇=1:1, 等度洗脱)、 $\text{C}_{18}$  反相硅胶柱色谱 (甲醇水 50% $\rightarrow$ 90% 梯度洗脱) 后, 高效液相色谱 (65% 甲醇) 分离得到化合物 2 (17.6 mg,  $t_{\text{R}}$  = 14.0 min); Fr.1C 和 Fr.1D 分别经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱 (二氯甲烷-甲醇=1:1, 等度洗脱) 后, 合并薄层色谱检测相同组分, 经  $\text{C}_{18}$  反相硅胶柱色谱 (甲醇水 50% $\rightarrow$ 90% 梯度洗脱) 后, 高效液相



色谱 (68% 甲醇) 分离得到化合物 **1** (21.3 mg,  $t_R = 32.1$  min)、**3** (3.2 mg,  $t_R = 24.0$  min)、**4** (26.7 mg,  $t_R = 17.6$  min) 和 **6** (21.5 mg,  $t_R = 20.2$  min)。

## 2.2 细胞培养

HepG2 人肝癌细胞和 RAW264.7 小鼠单核巨噬细胞白血病细胞分别用 MEM 培养基 (含 10% 胎牛血清、非必需氨基酸、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  丙酮酸钠、 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  青霉素和  $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  链霉素) 和 DMEM 高糖培养基 (含 10% 胎牛血清、 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  青霉素和  $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  链霉素) 传代培养。

## 2.3 细胞活力评价

CCK-8 法检测化合物 **2** 对 HepG2 细胞,  $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  棕榈酸诱导的 HepG2 细胞、RAW264.7 细胞和  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  LPS 诱导的 RAW264.7 细胞活力的影响。

## 2.4 炎症因子转录水平检测

将 RAW264.7 细胞 ( $2 \times 10^5$  个/孔) 接种于 12 孔板, 过夜贴壁后, 弃上清液, 分别加入完全培养基、含 LPS ( $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的完全培养基和含 LPS ( $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 及化合物 **2** ( $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的完全培养基, 孵育 6 h, 弃上清液, TRIzol 法提取总 RNA, 超微量分光光度计测得质量和纯度后, 逆转录为 cDNA, qPCR 检测 *IL-1 $\beta$* 、*IL-6*、*IL-18* 转录水平变化, 以 *GAPDH* 为内参基因,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算目的基因 mRNA 的相对表达量, 引物序列见表 1。

表 1 qPCR 引物序列  
Tab 1 qPCR primer sequence

名称		引物 (5'-3')
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	F	GCCACCTTTTGACAGTGATGAG
	R	AAGGTCCACGGAAAGACAC
<i>IL-6</i>	F	CTCATTCTGCTCTGGAGCCC
	R	CAACTGGATGGAAGTCTCTTGC
<i>IL-18</i>	F	CAACTTTGGCCGACTTCACTG
	R	TCTGGGGTTCACCTGGCACTT
<i>GAPDH</i>	F	GTCGGTGTGAACGGATTGG
	R	TTCCCATCTCGGCCTTGAC

## 2.5 胞内炎症因子表达检测

化合物 **2** ( $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和 LPS ( $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 处理 RAW264.7 细胞 24 h 后收集细胞, PBS 清洗一遍,  $400 \text{ g}$  离心, 弃上清液, 1% 多聚甲醛室温固定 30 min, PBS 清洗, 离心, 大鼠血清和破膜剂孵育 30 min, PBS 清洗, 离心, 加流式抗体室温避光孵育 30 min, PBS 清洗, 离心后重悬, 流式细胞仪检测胞内 TNF- $\alpha$  和 iNOS 含量变化。

## 2.6 统计学分析

数据使用 GrapPad Prism 9 软件分析, 各组间

差异比较使用单因素方差分析,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 结构鉴定

化合物 **1**: 透明油状物。HRESIMS  $m/z$  247.1644  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calcd 247.1642), 分子式为  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_2$ 。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 6.69 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-3), 6.61 (1H, d,  $J = 2.8$  Hz, H-5), 6.58 (1H, dd,  $J = 2.8, 8.4$  Hz, H-4), 5.29 (1H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-2'), 5.07 (1H, t,  $J = 6.0$  Hz, H-6'), 3.30 (2H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-1'), 2.09 (4H, m, H-4' 和 H-5'), 1.75 (3H, s, H-10'), 1.69 (3H, s, H-8'), 1.60 (3H, s, H-9')。  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 149.2 (C-4), 148.2 (C-1), 138.7 (C-3'), 132.0 (C-7'), 128.2 (C-2), 123.8 (C-6'), 121.2 (C-2'), 116.6 (C-3), 116.6 (C-6), 113.7 (C-5), 39.7 (C-4'), 29.8 (C-1'), 26.4 (C-5'), 25.7 (C-8'), 17.7 (C-9'), 16.2 (C-10')。以上数据与文献报道一致<sup>[13]</sup>, 故鉴定化合物 **1** 为 neryl hydroquinone。

化合物 **2**: 透明油状物,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -148.10$  (c 0.100, MeOH)。HRESIMS  $m/z$  280.1904  $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$  (calcd 280.1907), 分子式为  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_3$ 。  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 6.64 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz, H-3), 6.57 (1H, dd,  $J = 8.5, 2.9$  Hz, H-4), 6.48 (1H, d,  $J = 2.9$  Hz, H-6), 6.28 (1H, d,  $J = 9.8$  Hz, H-1), 5.60 (1H, d,  $J = 9.8$  Hz, H-2), 5.09 (1H, t,  $J = 7.1$  Hz, H-6), 2.10 (2H, m, H-5), 1.70 (1H, m, H-4a), 1.66 (3H, s, H-8), 1.63 (1H, m, H-4b), 1.57 (3H, s, H-9), 1.36 (3H, s, H-10)。  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 149.2 (C-5'), 146.9 (C-2'), 131.7 (C-7), 131.0 (C-2), 124.1 (C-6), 122.7 (C-1), 122.0 (C-1'), 116.7 (C-3'), 115.3 (C-4'), 112.8 (C-6'), 78.1 (C-3), 40.8 (C-4), 26.0 (C-10), 25.7 (C-8), 22.7 (C-5), 17.6 (C-9)。以上数据与文献报道一致<sup>[14]</sup>, 故鉴定化合物 **2** 为 (*R, Z*)-2-(3-hydroxy-3, 7-dimethylocta-1, 6-dien-1-yl) benzene-1, 4-diol。

化合物 **3**: 白色无定形粉末。HRESIMS  $m/z$  258.1486  $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$  (calcd 258.1489), 分子式为  $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_2$ 。  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$ : 7.46 (1H, bs, H-2'), 7.20 (1H, d,  $J = 2.9$  Hz, H-3), 7.13 (bs, 1H, H-4'), 6.82 (1H, d,  $J = 8.6$  Hz, H-6'), 6.70 (1H, dd,  $J = 8.6, 2.9$  Hz, H-5), 2.39 (3H, s, H-10'), 1.60 (6H, s, H-8' 和 H-9')。  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$ : 150.0 (C-4), 146.8 (C-1), 137.2

(C-3'), 137.1 (C-6'), 128.9 (C-4'), 128.2 (C-1'), 123.4 (C-2), 123.1 (C-5'), 122.9 (C-2'), 118.7 (C-6), 116.2 (C-5), 109.3 (C-3), 77.2 (C-7'), 27.4 (C-8' and C-9'), 21.3 (C-10')。以上数据与文献报道一致<sup>[15]</sup>, 故鉴定化合物 **3** 为 didehydroconicol。

化合物 **4**: 白色无定形粉末。HRESIMS  $m/z$  219.0625  $[M + Na]^+$  (calcd 219.0628), 分子式为  $C_{10}H_{12}O_4$ 。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_H$ : 7.26 (1H, s, OH-6), 6.21 (1H, s, H-5), 5.19 (1H, s, OH-2), 3.90 (3H, s, H-8), 2.50 (3H, s, H-9), 2.10 (3H, s, H-10)。<sup>13</sup>C NMR (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_C$ : 172.6 (C-7), 163.1 (C-2), 158.0 (C-6), 140.2 (C-4), 110.6 (C-3), 108.5 (C-5), 105.2 (C-6), 51.8 (C-8), 24.1 (C-10), 7.7 (C-9)。以上数据与文献报道一致<sup>[16]</sup>, 故鉴定化合物 **4** 为 2, 6-dihydroxy-3, 4-dimethylbenzoic acid methyl ester。

化合物 **5**: 白色无定形粉末。HRESIMS  $m/z$  197.0809  $[M + H]^+$  (calcd 198.0808), 分子式为  $C_{10}H_{12}O_4$ 。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_H$ : 11.84 (1H, s, OH-2), 6.28 (1H, d,  $J = 2.7$  Hz, H-5), 6.22 (1H, d,  $J = 2.7$  Hz, H-3), 5.27 (1H, s, OH-4), 4.40 (2H, q,  $J = 7.1$  Hz, H-8), 2.51 (3H, s, H-10), 1.41 (3H, t,  $J = 7.1$  Hz, H-9)。<sup>13</sup>C NMR (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_C$ : 171.7 (C-7), 165.4 (C-2), 160.1 (C-4), 144.1 (C-6), 111.3 (C-5), 105.8 (C-1), 101.3 (C-3), 61.3 (C-8), 24.4 (C-10), 14.2 (C-9)。以上数据与文献报道一致<sup>[17]</sup>, 故鉴定化合物 **5** 为 ethyl orsellinate。

化合物 **6**: 白色无定形粉末。HRESIMS  $m/z$  242.1024  $[M + NH]^+$  (calcd 242.1023), 分子式为  $C_{11}H_{12}O_5$ 。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_H$ : 12.97 (1H, s, OH-4), 12.40 (1H, s, OH-6), 10.34 (1H, s, H-10), 6.29 (1H, s, H-3), 4.43 (2H,

q,  $J = 7.1$  Hz, H-8), 2.54 (3H, s, H-11), 1.43 (3H, t,  $J = 7.1$  Hz, H-9)。<sup>13</sup>C NMR (101 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_C$ : 193.9 (C-10), 171.6 (C-7), 168.4 (C-6), 166.6 (C-4), 152.4 (C-2), 112.1 (C-3), 108.5 (C-5), 104.0 (C-1), 61.9 (C-8), 25.3 (C-11), 14.2 (C-10)。以上数据与文献报道一致<sup>[18]</sup>, 故鉴定化合物 **6** 为 ethyl haematommate。

### 3.2 细胞活力评价

文献报道<sup>[19]</sup>部分异戊烯基化的对苯二酚衍生物可作为抗氧化剂, 具有抑制大鼠肝微粒体中脂质过氧化形成的作用, 因此本研究探索其对脂肪性肝炎的治疗作用, CCK-8 法对上述化合物的细胞毒性评价结果显示其在  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  内对 HepG2 细胞和 RAW264.7 细胞无明显细胞毒性。用棕榈酸诱导肝细胞系 HepG2 建立非酒精性脂肪性肝细胞损伤模型, 化合物 **2** 剂量依赖性地抑制棕榈酸诱导的 HepG2 细胞死亡 (见图 2)。

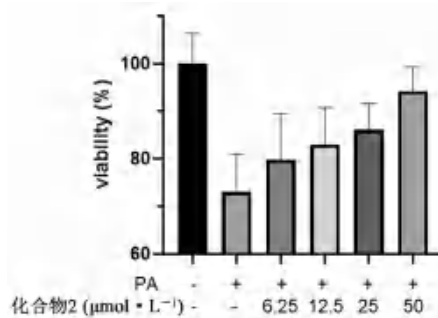


图 2 化合物 **2** 对棕榈酸诱导的 HepG2 细胞死亡的影响  
Fig 2 Inhibition effect of compound **2** on the cell death of palmitic acid-induced HepG2

### 3.3 化合物 **2** 抑制炎症反应

用 LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞炎症模型, 结果显示化合物 **2** 显著抑制促炎细胞因子  $IL-18$  的转录及胞内 iNOS 和  $TNF-\alpha$  蛋白的表达 (见图 3)。

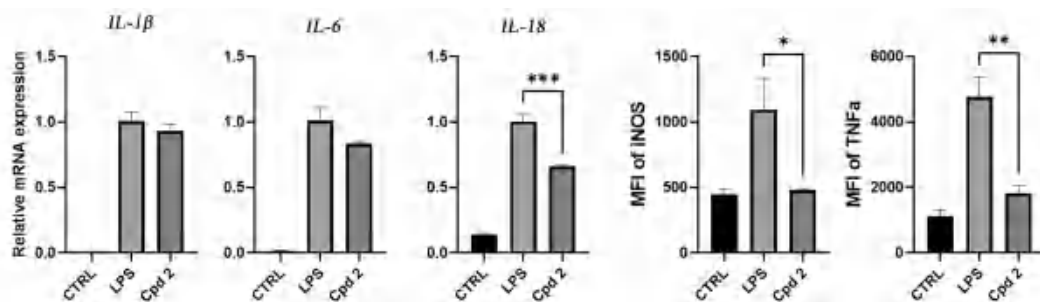


图 3 化合物 **2** 对炎症因子的影响 (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ )  
Fig 3 Effect of compound **2** on pro-inflammatory cytokines (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ )

## 4 讨论

本文系首次对锐裂钱袋苔进行化学成分的分

离与鉴定, 共分离鉴定了 6 个化合物, 其中化合物 **1** ~ **3** 为异戊烯基化的对苯二酚衍生物, 化

合物 4~6 为间苯二酚衍生物。此前对钱袋苔属植物的化学研究多集中在 *Marsupella alpine*、*Marsupella aquatica* 和 *Marsupella emarginata*，可能因它们分布相对广泛。长叶松烷型倍半萜被认为是钱袋苔属植物的主要特征性成分，本次分离并未得到，这可能与锐裂钱袋苔的生长环境和采收时间有关。本次分离得到的化合物均为芳烃类成分，且有较多的活泼基团，丰富了钱袋苔属植物的化学成分种类。本次分离得到的芳烃化合物多具有抗氧化和清除自由基活性<sup>[17, 19]</sup>，化合物 2 可以抑制棕榈酸诱导的 HepG2 人肝癌细胞死亡，并抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 炎症模型中促炎因子 *IL-18* 的转录和 iNOS 及 TNF- $\alpha$  的表达，提示该化合物可抑制脂肪性肝损伤，在脂肪性肝炎中发挥治疗作用，本研究为其在代谢性疾病方面的研究提供基础。

### 参考文献

- [1] Wellman C, Osterloff P, Mohiuddin U. Fragments of the earliest land plants [J]. *Nature*, 2003, 425 (18): 282-285.
- [2] Asakawa Y, Ludwiczuk A, Novakovic M, et al. Bis-bibenzyls, bibenzyls, and terpenoids in 33 genera of the *Marchantiophyta* (liverworts): structures, synthesis, and bioactivity [J]. *J Nat Prod*, 2022, 85 (3): 729-762.
- [3] Asakawa Y, Ludwiczuk A. Chemical constituents of bryophytes: structures and biological activity [J]. *J Nat Prod*, 2018, 81 (3): 641-660.
- [4] Nikolajeva V, Liepina L, Petrina Z, et al. Antibacterial activity of extracts from some bryophytes [J]. *Adv Microbiol*, 2012, 2 (3): 345-353.
- [5] Adio A, Paula C, Konig W, et al. Volatile components from European liverworts *Marsupella emarginata*, *M. aquatica* and *M. alpina* [J]. *Phytochemistry*, 2002, 61 (1): 79-91.
- [6] Zhang JZ, Fan PH, Zhu RX, et al. Marsupellins A-F, *ent*-longipinane-type sesquiterpenoids from the Chinese liverwort *Marsupella alpine* with acetylcholinesterase inhibitory activity [J]. *J Nat Prod*, 2014, 77 (4): 1031-1036.
- [7] Adio A, Reuss S, Paul C, et al. Sesquiterpenoid constituents of the liverwort *Marsupella aquatica* [J]. *Tetrahedron-Asymmetry*, 2007, 18 (10): 1245-1253.
- [8] Nagashima F, Ishimaru A, Asakawa Y. Sesquiterpenoids from the liverwort *Marsupella aquatica* [J]. *Phytochemistry*, 1994, 37 (3): 777-779.
- [9] Huneck S, Connolly J, Rycroft D, et al. (-)-*Ent*-12 $\beta$ -acetoxy-longipin-2 (10)-*en*-3-one, an *ent*-longipinane derivative from the liverwort *Marsupella aquatica* [J]. *Phytochemistry*, 1982, 21 (1): 143-145.
- [10] Harrison L, Becker H, Connolly J, et al. (+)-(4*S*\*, 5*R*\*, 7*S*\*, 8*R*\*)-eremophila-9, 11-dien-8 $\alpha$ -ol from the liverwort *Marsupella emarginata* [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31 (11): 4027-4028.
- [11] Matsuo A, Nozaki H, Yano K, et al. Gymnomitrane sesquiterpenoids from the liverwort *Marsupella emarginata* var. *Patens* [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29 (6): 1921-1924.
- [12] Matsuo A, Uto S, Sakuda K, et al. Structures of three new *ent*-longipinane type sesquiterpenoids from the liverwort *Marsupella emarginata* subsp. *Tubulosa* [J]. *Chem Lett*, 1979, 8 (1): 73-76.
- [13] Inouye H, Tokura K, Tobita S. Über die Inhaltsstoffe von Pirolaceen, XV Zur Struktur des Pirolatins [J]. *Chem Ber*, 1968, 101 (12): 4057-4065.
- [14] Ioset J, Marston A, Gupta M, et al. Antifungal and larvicidal compounds from the root bark of *Cordia alliodora* [J]. *J Nat Prod*, 2000, 63: 424-426.
- [15] Simon-Levert A, Arrault A, Bontemps-Subielos N, et al. Meroterpenes from the *Ascidian aplidium* aff. *densum* [J]. *J Nat Prod*, 2005, 68 (9): 1412-1415.
- [16] Lee TH, Yeh MH, Chang CI, et al. New constituents from the heartwood of *Picea morrisonicola* HAYATA [J]. *Chem Pharm Bull*, 2006, 54 (5): 693-695.
- [17] Lopes T, Coelho R, Yoshida N, et al. Radical-scavenging activity of orsellinates [J]. *Chem Pharm Bull*, 2008, 56 (11): 1551-1554.
- [18] Ismed F, Arifa N, Zaini E, et al. Ethyl haematommate from *Stereocaulon graminosum* Schaer.: isolation and crystal structure [J]. *Nat Prod Sci*, 2018, 24 (2): 115-118.
- [19] Aknin M, Dayan T, Rudi A, et al. Hydroquinone antioxidants from the Indian ocean tunicate *Aplidium savignyi* [J]. *J Agric Food Chem*, 1999, 47 (10): 4175-4177.

(收稿日期: 2024-03-26; 修回日期: 2024-04-19)

## 中药芸香中 (+) / (-)-Rutabenzofuran A 和 (+) / (-)-Rutabenzofuran B 的抗肝炎活性评价

苏彦红<sup>1</sup>, 刘艳阳<sup>2, 3</sup>, 王春江<sup>4</sup>, 蒋跃平<sup>2, 3\*</sup> (1. 山东省临沂市沂南县人民医院药学部, 山东 临沂 276300; 2. 中南大学湘雅医院药学部, 长沙 410008; 3. 中南大学湘雅医院 国家老年医学临床研究中心, 长沙 410008; 4. 中南大学湘雅三医院药学部, 长沙 410013)

**摘要:** **目的** 研究中药芸香中分离鉴定的两对 Z/E 异构化的苯并呋喃香豆素对映异构体 (+) / (-)-Rutabenzofuran A 和 (+) / (-)-Rutabenzofuran B 对肝脏的保护作用。**方法** 以 (+) / (-)-Rutabenzofuran A 和 (+) / (-)-Rutabenzofuran B 为研究对象, 采用脂多糖 (LPS) 100 ng · mL<sup>-1</sup> 建立 HepG2 细胞的炎症模型, 对 4 个化合物的抗肝炎活性进行初步评估。**结果** 在浓度 10、20 和 40 μmol · L<sup>-1</sup> 下, 4 个化合物可以剂量依赖性地降低谷丙转氨酶 (ALT) 和谷草转氨酶 (AST) 水平及肿瘤坏死因子 (TNF)-α 水平, 升高白细胞介素 (IL-4) 和 IL-10 水平。**结论** 芸香通过抑制 TNF-α 和促进 IL-4 及 IL-10 的产生发挥抗肝炎活性, 且具有剂量依赖性, 本研究为中药芸香的临床应用及药用开发提供充分的理论依据。

**关键词:** 芸香; 肝炎; IL-4; IL-10

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)08-1976-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.002

### Anti-hepatitis activities of (+) / (-)-Rutabenzofuran A and (+) / (-)-Rutabenzofuran B in traditional Chinese medicine *Ruta graveolens* L.

SU Yan-hong<sup>1</sup>, LIU Yan-yang<sup>2, 3</sup>, WANG Chun-jiang<sup>4</sup>, JIANG Yue-ping<sup>2, 3\*</sup> (1. Department of Pharmacy, Yinan People's Hospital, Linyi Shandong 276300; 2. Department of Pharmacy, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008; 3. National Clinical Research Center for Geriatric Disorders, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008; 4. Department of Pharmacy, the Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013)

**Abstract: Objective** To determine the hepatoprotective effect of two Z/E isomerized enantiomers of benzofuran coumarin (+) / (-)-Rutabenzofuran A and (+) / (-)-Rutabenzofuran B isolated from Rutabenzofuran. **Methods** (+) / (-)-Rutabenzofuran A and (+) / (-)-Rutabenzofuran B were used to establish the inflammation model of HepG2 cells with lipopolysaccharide (100 ng · mL<sup>-1</sup>). The anti-hepatitis activities of the 4 compounds were preliminatively evaluated. **Results** At the concentrations of 10, 20 and 40 μmol · L<sup>-1</sup>, the four compounds reduced the levels of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and tumor necrosis factor α level, and increased interleukin-4 and interleukin-10 levels dose-dependently. **Conclusion** *Ruta graveolens* L. can inhibit tumor necrosis factor α and promote interleukin-4 and interleukin-10 to produce anti-hepatitis activity in a dose-dependent manner, providing theoretical basis for clinical application and medicinal development of traditional Chinese medicine ruta.

**Key words:** *Ruta graveolens* L.; hepatitis; interleukin-4; interleukin-10

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目 (No.2023JJ30847)。

作者简介: 苏彦红, 女, 主要从事中药临床应用方面的研究, email: xy3yy202001@126.com \* 通信作者: 蒋跃平, 男, 博士, 副主任药师, 主要从事中药药效物质基础方面的研究, email: jiangyueping@126.com



芸香 (*Ruta graveolens* L.) 属于芸香科芸香属的多年生草本植物, 以其芳香性和药用价值闻名, 原产于地中海地区, 之后逐渐传播至世界各地<sup>[1-2]</sup>。芸香全草可入药, 具有较高的治疗价值, 被用于传统医学和替代医学, 具有清热解毒、凉血散瘀的功效<sup>[3]</sup>。迄今为止, 芸香中发挥药效的物质基础多为挥发油、苯丙素、生物碱以及黄酮化合物<sup>[4-7]</sup>。

肝脏在药物代谢中扮演着非常重要的角色, 而诱导肝脏疾病的原因很多, 如病毒感染、酒精、药物和肥胖等因素<sup>[8]</sup>。虽然对于不同类型的

肝脏疾病治疗方法各有差异, 但是控制肝脏的炎症进程是绝大多数治疗肝脏疾病的必要手段, 因此加强对疗效好且安全性高的抗肝炎药物的研发就显得尤为重要。芸香是一种具有良好抗炎活性的药用植物, 但是芸香的抗肝炎活性还未见相关研究。因此, 本研究选取课题组前期分离鉴定的芸香中两对 *Z/E* 异构化的苯并呋喃香豆素对映异构体 [(+)/(−)-Rutabenzofuran A 和 (+)/(−)-Rutabenzofuran B] (见图 1) 作为研究对象<sup>[9]</sup>, 对其肝保护活性进行初步评价, 为芸香科植物的临床应用及药用开发提供充分的理论依据。

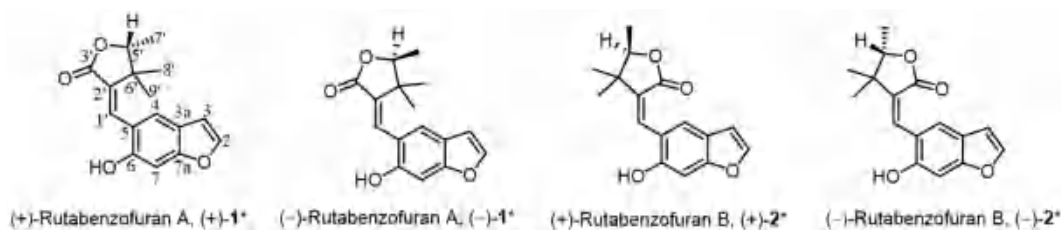


图 1 芸香水提取中分离鉴定的两对 *Z/E* 异构化的苯并呋喃香豆素对映异构体

Fig 1 Two pairs of *Z/E* isomerized enantiomers of benzofuranocoumarin isolated and identified from *Ruta graveolens* L. water extraction

## 1 材料

### 1.1 细胞株

人肝癌细胞 (HepG2) [美国菌种保藏中心 (ATCC)]。

### 1.2 试剂

MEM 培养基、胎牛血清 (FBS) (Gibco 公司); 双抗 (Beyotime 公司); PBS 缓冲液、细胞冻存液、胰酶消化液 (Abiowell 公司); 脂多糖 (LPS)、二甲基亚砜 (DMSO) (Sigma 公司); 谷丙转氨酶 (ALT) 试剂盒、谷草转氨酶 (AST) 试剂盒 (南京泰成公司); 肿瘤坏死因子 (TNF)- $\alpha$  试剂盒、白细胞介素 (IL)-4 试剂盒、IL-10 试剂盒 (Proteintech 公司); 水飞蓟素 (毕得医药公司); CCK-8 检测试剂盒 (日本同仁公司)。

### 1.3 仪器

台式高速冷冻离心机、自动平衡离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); 超净工作台 (北京亚泰隆); 直热式二氧化碳培养箱 (上海三藤仪器); 倒置生物显微镜 (北京中显恒业仪器); 紫外可见分光光度计 (上海天普分析仪器有限公司); 恒温水浴锅 (江苏新瑞仪器); 96 孔培养板 (Eppendorf); 6 孔培养板 (Corning); 多功能酶标分析仪 (深圳市汇松科技发展有限公司); 各型号离心管 (广州杰特生物有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 溶液配制

取化合物 (−)-1<sup>\*</sup>、(+)-1<sup>\*</sup>、(+)-2<sup>\*</sup>、(−)-2<sup>\*</sup> 和阳性药水飞蓟素适量, 精密称定, 加 DMSO 制成 10 mmol · L<sup>-1</sup> 储备液备用。

### 2.2 细胞培养

HepG2 细胞培养于含 10%FBS 和 1% 双抗的 MEM 培养基中, 在 37℃、5%CO<sub>2</sub>, 饱和湿度培养箱中培养。当细胞生长状态良好, 生长量 80%~90% 时, 进行传代培养, 细胞传代 2~3 次。

### 2.3 炎症模型的建立

选取 LPS (100 ng · mL<sup>-1</sup>) 建立 HepG2 细胞的炎症模型, 并通过检测细胞中的 ALT 和 AST 来判断造模成功与否。

### 2.4 待测化合物对 HepG2 细胞的毒性评价

将细胞悬液按照每孔 5 × 10<sup>3</sup> 个细胞加入 96 孔板内, 每孔 100 μL, 同时设置只有完全培养基的空白组 (Blank 组), 所有组别在 37℃、5% CO<sub>2</sub>, 饱和湿度培养箱中培养。取对数生长的细胞给予待测药物, 每种药物设置 7 个浓度 (0、10、20、40、60、80、100 μmol · L<sup>-1</sup>), 培养 24 h 后, 去除每孔中的培养基, 然后加入含有 10 μL (10%) CCK-8 的培养基 100 μL, 每种处理均设置 3 个复孔。继续孵育 4 h 后, 取出用酶标仪测定 450 nm 下的吸光度 (OD) 值, 取均值做柱状图。

### 2.5 细胞分组、给药与样品采集

以 LPS 诱导的 HepG2 炎症细胞为模型, 分别设立正常组、模型组、阳性组和实验低、中、高

剂量组。细胞处于对数生长期时给药，正常组细胞不给予 LPS 和待测药物的处理；模型组的细胞加入  $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  LPS 处理；阳性组给予 LPS 和  $20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的水飞蓟素处理；实验组按照低、中、高剂量 ( $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $40 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 分别给予相应的待测化合物和 LPS 处理。所有组别孵育处理 24 h。每种处理均设置 3 个平行组。收集细胞，在  $2 \sim 8 \text{ } ^\circ\text{C}$ 、 $1000 \text{ g}$  离心  $15 \text{ min}$ ，取上清液立即检测。分装的样品需  $-80 \text{ } ^\circ\text{C}$  保存，解冻后的样品需再次离心，然后进行检测。

### 2.6 检测化合物对 LPS 诱导 HepG2 细胞产生的 ALT 和 AST 的影响

细胞分组、造模、给药及样品收集同“2.4”项下。采用微板法，严格按照 ALT 和 AST 试剂盒检测方法操作。加入终止液后，轻轻水平摇晃 96 孔板使其混匀，在室温下放置  $15 \text{ min}$ ，用酶标仪在  $510 \text{ nm}$  波长测量各孔的 OD 值。

### 2.7 检测化合物对 LPS 诱导 HepG2 细胞产生的炎症因子的影响

细胞分组、造模、给药及样品收集同“2.4”项下。严格按照 ELISA 试剂盒的说明书操作，测定各组 HepG2 细胞上清液中的 IL-4、IL-10 和 TNF- $\alpha$  的含量。

### 2.8 数据分析

实验数据结果以平均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，采用统计软件 IBM SPSS statistics 21.0 进行单因素方差分析 (one-way ANOVA)，采用 GraphPad Prism 8.0.1 软件绘图， $P < 0.05$  表示组与组之间比较差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 化合物对 HepG2 细胞的毒性评价

不同浓度 ( $10 \sim 100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的待测化合物作用于 HepG2 细胞 24 h，用 CCK-8 法检测各组的细胞活力。(−)-1\*、(+)-1\*、(+)-2\* 和 (−)-2\* 对 HepG2 细胞的毒性检测结果如图 2 所示。由结果可知，与空白组 (细胞存活率为 100%) 相比，不同浓度的待测化合物处理组细胞存活率显著高于空白组，表明其对细胞均无明显毒性。根据以上实验结果以及分离得到的化合物总量，后续实验中待测化合物的低、中、高浓度设置为  $10$ 、 $20$  和  $40 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

### 3.2 化合物对 LPS 诱导 HepG2 细胞产生 ALT 和 AST 的影响

(−)-1\*、(+)-1\*、(+)-2\* 和 (−)-2\* 的低、中、高剂量组对 HepG2 细胞上清液中 ALT

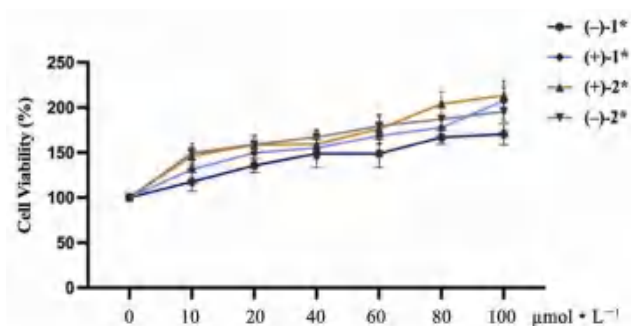


图 2 HepG2 细胞中化合物安全浓度的测定

Fig 2 Determination of safe concentration of compounds in HepG2 cells

和 AST 的含量如图 3 所示。与正常组相比，模型组的 ALT 和 AST 水平显著升高 ( $P < 0.01$ )，说明造模成功。与模型组相比，除了 LPS + L-(−)-1\* 组 ( $P > 0.05$ )，低、中、高剂量组和阳性组的 ALT 和 AST 水平都有不同程度的下降 ( $P < 0.01$ )。(−)-1\*、(+)-1\*、(+)-2\* 和 (−)-2\* 的低、中、高剂量组的 ALT 和 AST 水平均显示出随给药剂量的增加呈降低的趋势。

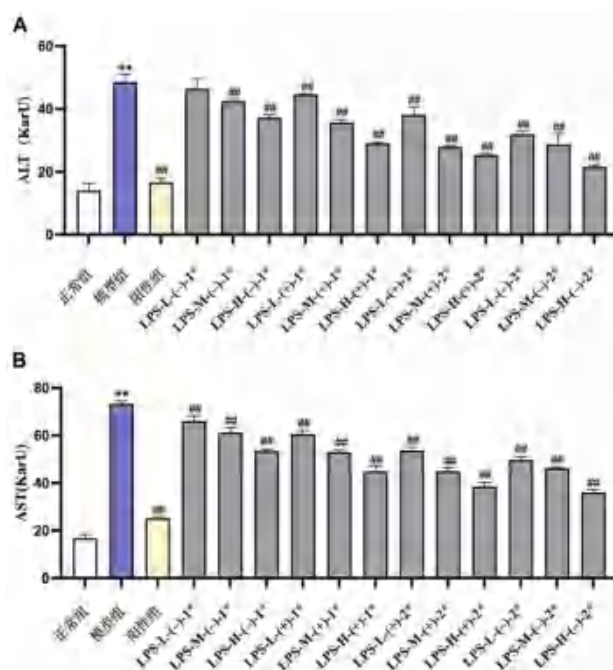


图 3 化合物对 HepG2 细胞中 ALT (A) 和 AST (B) 的影响

Fig 3 Effect of compounds on ALT (A) and AST (B) in HepG2 cells

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

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

### 3.3 化合物对 LPS 诱导 HepG2 细胞产生炎症因子的影响

(−)-1\*、(+)-1\*、(+)-2\* 和 (−)-2\* 低、中、高实验组 HepG2 细胞上清液中的促炎因子 TNF- $\alpha$  和抗炎因子 IL-4、IL-10 的含量如图 4 所示。

与正常组相比, 模型组的 TNF- $\alpha$ 、IL-4 和 IL-10 具有显著差异 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比, 除了 LPS + L-(-)-**1**\* 组 TNF- $\alpha$  ( $81.28 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $P > 0.05$ ) 和 IL-10 ( $8.25 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $P > 0.05$ ) 外, 阳性药组和其他实验组的 TNF- $\alpha$  水平显著降低 ( $P < 0.05$ )、IL-4 和 IL-10 水平显著升高 ( $P < 0.05$ )。(-)-**1**\*、(+)-**1**\*、(+)-**2**\* 和 (-)-**2**\* 的低、中、高剂量组的 TNF- $\alpha$  水平均显示出随给药剂量的增加呈降低趋势; (-)-**1**\*、(+)-**1**\*、(+)-**2**\* 和 (-)-**2**\* 的低、中、高剂量组的 IL-4 和 IL-10 水平随给药剂量的增加呈增长趋势。

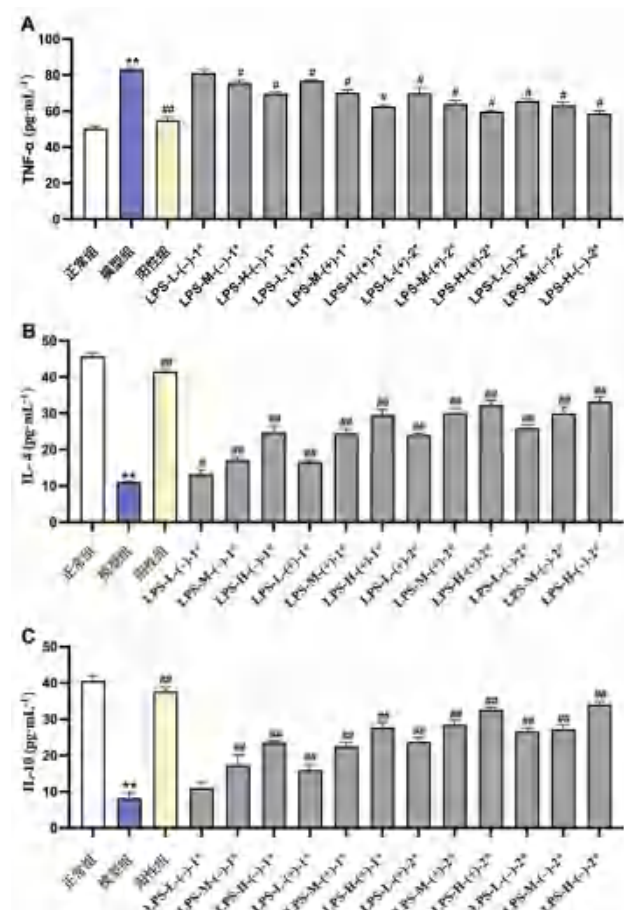


图 4 化合物对 HepG2 细胞中 TNF- $\alpha$  (A)、IL-4 (B)、IL-10 (C) 的影响

Fig 4 Effect of compounds on TNF- $\alpha$  (A), IL-4 (B) and IL-10 (C) in HepG2 cells

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

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

#### 4 讨论

肝损伤是威胁人类健康的重要原因之一。肝损伤导致的死亡人数占了全球死亡人数的 3.5%<sup>[10]</sup>。肝脏可产生促炎因子, 启动炎症反应。TNF- $\alpha$  可直接损伤肝细胞, 同时促进炎症因子释放。炎症风暴

可导致肝损伤和肝脏清除能力降低, 进而导致患者病死率增加<sup>[11]</sup>。在现代药理研究中芸香提取物和芸香中的小分子化合物显示出了广泛的生物活性, 其中报道最多的是抗菌、抗炎、抗肿瘤、抗增殖以及抗氧化等作用<sup>[12-14]</sup>。本研究通过对芸香水提取物中分离得到的两对 Z/E 异构化的苯并呋喃对映异构体 [(-)-**1**\*、(+)-**1**\*、(+)-**2**\* 和 (-)-**2**\*] 的抗肝炎活性评价显示, 化合物 (-)-**1**\*、(+)-**1**\*、(+)-**2**\* 和 (-)-**2**\* 在浓度  $10 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  对 HepG2 细胞无毒性, 且具有一定的促进细胞增殖的作用, 能够降低 AST 和 ALT。

肝损伤的发生发展与巨噬细胞和单核细胞有密切联系。在致炎因子的干预下, 巨噬细胞和单核细胞产生 TNF- $\alpha$  导致肝损伤。化合物 (-)-**1**\*、(+)-**1**\*、(+)-**2**\* 和 (-)-**2**\* 可显著降低 TNF- $\alpha$  水平保护肝脏。研究已经证实炎症引发的肝炎涉及多种信号通路的改变。TLR4、NF- $\kappa$ B 和 NLRP3 炎症小体在肝脏的炎症反应中起了重要作用<sup>[15-16]</sup>。中药提取物和单体化合物通过 TLR4、NF- $\kappa$ B 和 NLRP3 信号通路在急性肝损伤中已表现出良好的抗炎效果。抗炎因子 IL-10 可通过 JAK-STAT 通路和 NF- $\kappa$ B 通路发挥作用, 抑制炎症细胞因子分泌, 如 TNF- $\alpha$  等<sup>[17-18]</sup>。IL-4 可抑制单核巨噬细胞产生 IL-6 和 TNF- $\alpha$  等炎症因子, 减轻肝组织炎症<sup>[19]</sup>。进一步研究显示, 化合物 (-)-**1**\*、(+)-**1**\*、(+)-**2**\* 和 (-)-**2**\* 能够提高抗炎因子 IL-4 和 IL-10 的水平, 具有较好的抗肝炎活性, 且呈剂量依赖性。综上, 可以证明苯并呋喃香豆素类能够剂量依赖性地发挥出抗肝炎活性, 而苯并呋喃香豆素类提高 IL-4 和 IL-10 及降低 TNF- $\alpha$  水平的具体抗炎信号通路和靶点需要进一步的探讨。

本研究初步探讨了苯并呋喃香豆素类的抗炎活性。然而, 研究主要基于体外研究得出的结论, 未在动物中进一步验证。因此, 今后需要构建更多的实验模型, 更深入探索中药芸香的起效机制。中药具有多途径多靶点的作用优势, 作用于肝损伤的各个阶段, 如抗氧化、调控自噬、代谢、凋亡。苯并呋喃香豆素类是否通过其他途径保护肝脏是未来的一个研究方向。

综上所述, 芸香可抑制 TNF- $\alpha$  及促进 IL-4 和 IL-10 的产生, 且具有剂量依赖性。这为肝损伤的治疗提供了一种新的治疗策略。然而, 芸香抗炎活性的机制需要进一步深入研究。



## 参考文献

- [1] Asgarpanah J. Phytochemistry and pharmacological properties of *Ruta graveolens* L. [J]. J Med Plants Res, 2012, 6 (23): 3942-3949.
- [2] Ratheesh M, Sindhu G, Helen A. Anti-inflammatory effect of quinoline alkaloid skimmianine isolated from *Ruta graveolens* L. [J]. Inflamm Res, 2013, 62 (4): 367-376.
- [3] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1997: 88.
- [4] Shahrajabian MH. A candidate for health promotion, disease prevention and treatment, common Rue (*Ruta graveolens* L.), an important medicinal plant in traditional medicine [J]. Curr Rev Clin Exp Pharmacol, 2022, 19 (1): 2-11.
- [5] Orlita A, Sidwa-Gorycka M, Kumirska J, et al. Identification of *Ruta graveolens* L. metabolites accumulated in the presence of abiotic elicitors [J]. Biotechnol Prog, 2008, 24 (1): 128-133.
- [6] Oliva A, Meepagala KM, Wedge DE, et al. Natural fungicides from *Ruta graveolens* L. leaves, including a new quinolone alkaloid [J]. J Agric and Food Chem, 2003, 51 (4): 890-896.
- [7] Sahu D, Raghav SK, Gautam H, et al. A novel coumarin derivative, 8-methoxy chromen-2-one alleviates collagen induced arthritis by down regulating nitric oxide, NF- $\kappa$ B and proinflammatory cytokines [J]. Int Immunopharmacol, 2015, 29 (2): 891-900.
- [8] Wei CL, Qiu J, Wu YY, et al. Promising traditional Chinese medicine for the treatment of cholestatic liver disease process (cholestasis, hepatitis, liver fibrosis, liver cirrhosis) [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 297: 115550.
- [9] Liu YY, Peng J, Huang L, et al. (+)/(−)-Rutabenzofuran A and (+)/(−)-Rutabenzofuran B: two unprecedented pairs of Z/E isomeric benzofuran enantiomers from the aerial part of *Ruta graveolens* L [J]. Phytochemistry, 2023, 210: 113677.
- [10] Asrani SK, Devarbhavi H, Eaton J, et al. Burden of liver diseases in the world [J]. J Hepatol, 2019, 70 (1): 151-171.
- [11] Sun J, Zhang JX, Wang XF, et al. Gut-liver crosstalk in sepsis-induced liver injury [J]. Crit Care, 2020, 24 (1): 614.
- [12] Colucci-D' Amato L, Cimaglia G. *Ruta graveolens* as a potential source of neuroactive compounds to promote and restore neural functions [J]. J Tradit Complement Med, 2020, 10 (3): 309-314.
- [13] Bharati H, Prajakta B, Shubham B, et al. Review on *Ruta graveolens* [J]. World J Pharm Pharm Sci, 2018, 7 (10): 377-383.
- [14] Nazish I, Kaskoos RA, Mir SR, et al. Pharmacognostical standardization of *Ruta graveolens* L. aerial parts [J]. Res J Medicinal Plant, 2009, 3 (2): 41-44.
- [15] Carotti S, Guarino MP, Vespasiani-Gentilucci U, et al. Starring role of toll-like receptor-4 activation in the gut-liver axis [J]. World J Gastrointest Pathophysiol, 2015, 6 (4): 99-109.
- [16] Sharma BR, Kanneganti TD. NLRP3 inflammasome in cancer and metabolic diseases [J]. Nature immunology, 2021, 22 (5): 550-559.
- [17] Rodig SJ, Meraz MA, White JM, et al. Disruption of the Jak 1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses [J]. Cell, 1998, 93 (3): 373-383.
- [18] Schottelius AJ, Mayo MW, Sartor RB, et al. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding [J]. J Biol Chem, 1999, 274 (45): 31868-31874.
- [19] 石裕明, 张立煌, 孙永良. IL-4 对治疗前后亚急性重型病毒性肝炎患者 PBMCs TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\alpha$  mRNA 表达的影响 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1999, 13 (3): 269-273.

(收稿日期: 2024-03-27; 修回日期: 2024-04-18)



## 丹参 - 三七药对对氧糖剥夺 / 再灌注损伤的小胶质细胞的保护作用

吴桂月<sup>1</sup>, 李蕊臣<sup>2</sup>, 雷震<sup>3</sup>, 侯瑞英<sup>1</sup>, 焦伟杰<sup>1\*</sup> (1. 河南中医药大学第二附属医院药学部, 郑州 450002; 2. 河南中医药大学药学院, 郑州 450046; 3. 河南中医药大学第二附属医院中心实验室, 郑州 450008)

**摘要:**目的 探讨不同配比丹参 - 三七 (SM-PN) 药对抗 BV2 细胞氧糖剥夺 / 再灌注 (OGD/R) 损伤的保护作用, 并探索其可能的作用机制。方法 建立 BV2 细胞 OGD/R 模型, 实验分为空白组、模型组及不同配比 SM-PN + OGD/R 组, 采用 CCK-8 法筛选出细胞活力最好的 SM-PN 配比; Real-time PCR 检测肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素  $1\beta$  (IL- $1\beta$ )、白细胞介素 -6 (IL-6)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、白细胞介素 -10 (IL-10)、转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 的 mRNA 表达; Western blot 法检测核因子  $\kappa$ B 抑制蛋白  $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ )、磷酸化核因子  $\kappa$ B 抑制蛋白  $\alpha$  (p-I $\kappa$ B $\alpha$ )、核因子  $\kappa$ B p65 (NF- $\kappa$ B p65)、磷酸化核因子  $\kappa$ B p65 (NF- $\kappa$ B p-p65) 的磷酸化蛋白水平。结果 200 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup> 的 SM-PN 5 : 3 组 BV2 细胞生存率较模型组显著升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, SM-PN 组能显著下调 I $\kappa$ B $\alpha$  和 p65 蛋白磷酸化水平; SM-PN 组 iNOS、TNF- $\alpha$ 、IL- $1\beta$ 、IL-6 mRNA 表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ ); TGF- $\beta$ 、IL-10 mRNA 表达水平显著增加 ( $P < 0.05$ )。结论 SM-PN 能减轻 OGD/R 诱导的 BV2 细胞炎症损伤, 这可能与抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路, 促进小胶质细胞从 M1 向 M2 型转化抑制炎症反应有关。

**关键词:** 丹参 - 三七药对; 小胶质细胞; 氧糖剥夺 / 再灌注; 炎症

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)08-1981-05  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.003

## Protective effect of salvia miltiorrhiza-panax notoginseng against microglia cell injury induced by oxygen-glucose deprivation/reperfusion

WU Gui-yue<sup>1</sup>, LI Rui-chen<sup>2</sup>, LEI Zhen<sup>3</sup>, HOU Rui-ying<sup>1</sup>, JIAO Wei-jie<sup>1\*</sup> (1. Department of Pharmacy, The Second Affiliated Hospital, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450002; 2. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046; 3. Central Laboratory, The Second Affiliated Hospital, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008)

**Abstract: Objective** To determine the protective effect of salvia miltiorrhiza-panax notoginseng (SM-PN) with different proportions against BV2 cell injury induced by oxygen-glucose deprivation/reperfusion (OGD/R), and its possible mechanism. **Methods** BV2 cells were cultured in vitro and the models were established by OGD/R. The cells were randomly divided into a blank group, a model group, and an SM-PN + OGD/R group. The survival rate of cells in each group was screened by CCK-8, and the best SM-PN matching group was selected for subsequent experiments. The expression of TNF- $\alpha$ , IL- $1\beta$ , IL-6, iNOS, TGF- $\beta$  and IL-10 mRNA was analyzed by Real-time PCR. The protein levels of I $\kappa$ B $\alpha$ , p-I $\kappa$ B $\alpha$ , p65 and p-p65 were determined by Western blot. **Results** Compared with the model group, the cell viability of SM-PN 5 : 3 groups at 200 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> significantly increased, I $\kappa$ B $\alpha$  and p65 protein phosphorylation levels markedly decreased, the mRNA expression level of iNOS, TNF- $\alpha$ , IL- $1\beta$ , and IL-6 was significantly lower ( $P < 0.05$ ), and that of TGF- $\beta$  and IL-10 was significantly higher ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** SM-PN can inhibit OGD/R-induced neuroinflammatory

基金项目: 河南省中医药科学研究专项 (No.20-21ZY2211; No.20-21ZY3012)。

作者简介: 吴桂月, 女, 副主任药师, 主要从事临床药学及药理学研究, email: guiyuew@163.com \*通信作者: 焦伟杰, 男, 副主任药师, 主要从事临床药学及药事管理学研究, email: yjkff@sina.com

responses in BV2 cells, whose mechanism may be related to the inhibition of NF- $\kappa$ B pathway, promoting the polarization of the microglia from M1 to M2 phenotype.

**Key words:** herbal pair of salvia miltiorrhiza-panax notoginseng; microglia cell; oxygen-glucose deprivation/reperfusion; inflammation

缺血性脑卒中具有高致病的特点, 约占脑卒中疾病的 80%<sup>[1-2]</sup>。其神经损伤的主要病理生理机制之一为炎症反应, 炎症可引起脑水肿, 进而导致神经细胞死亡<sup>[3-4]</sup>。小胶质细胞是中枢神经系统中的固有免疫细胞, 神经炎症主要与小胶质细胞异常激活有关, 小胶质细胞激活后可分化为促炎 M1 型和抗炎 M2 型, 促进小胶质细胞向 M2 型转化是缺血性脑卒中的一个重要的治疗方向。

丹参-三七 (salvia miltiorrhiza-panax notoginseng, SM-PN) 是广泛用于脑血管疾病的经典药对。丹参主要成分为水溶性的酚酸类及脂溶性的二萜类, 三七的主要成分为三七总皂苷。据文献报道, 丹参多酚酸、三七总皂苷及两者配伍可上调小胶质细胞白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10)、转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 的蛋白表达, 下调白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 的蛋白表达, 促进小胶质细胞 M1 型极化向 M2 型转换<sup>[5]</sup>。

本研究建立 BV2 细胞氧糖剥夺/再灌注 (oxygen-glucose deprivation/reperfusion, OGD/R) 模型, 从 SM-PN 不同配比的分组中优选出最佳组合, 并进一步结合经典的蛋白组学和分子生物学手段, 从炎症免疫损伤的角度探讨 SM-PN 药对是否能够改善脑缺血再灌注后的炎症水平及可能机制。

## 1 材料

### 1.1 细胞

小鼠小胶质细胞 BV2 细胞购自武汉普诺赛生命科学有限公司 (批号: CL-0493)。

### 1.2 试剂

丹参和三七配方颗粒剂 (四川新绿色药业科技发展有限公司, 批号: 21010114, 2104048)。磷酸盐缓冲液 (PBS)、高糖 DMEM、无糖 DMEM、胎牛血清 (FBS)、胰蛋白酶和青霉素-链霉素溶液 (PS) (以色列 BI 公司); CCK-8 试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司); I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-I $\kappa$ B $\alpha$ 、p65、p-p65 抗体 (Cell Signaling Technology);  $\beta$ -actin 抗体 (武汉三鹰生物公司)。

### 1.3 仪器

3110 型 CO<sub>2</sub> 培养箱、Multiskan FC 酶标仪 (美国赛默飞公司); FACSJazz 型流式细胞仪 (美国 BD 公司); 185-2148 型基因扩增仪、170-4070 型电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); 1384-A2 型生物安全柜 (美国赛默飞公司)。

## 2 方法

### 2.1 不同 SM-PN 药对的配制

将丹参和三七配方颗粒分别按比例 (5:0、5:1、5:3、5:5、3:5、1:5、0:5) 加入 PBS 加热 60 °C, 超声 30 min 溶解, 10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min (离心半径  $r = 7.5$  cm), 取上清液用 0.22  $\mu$ m 的无菌过滤膜过滤后, 定量为相同浓度, 置于 4 °C 冰箱保存备用。

### 2.2 BV2 细胞培养及分组

快速复苏细胞, 加入含 10% FBS 及 100 U·L<sup>-1</sup> PS 的高糖 DMEM, 接种于 25 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶, 在 5% CO<sub>2</sub>、95% O<sub>2</sub>、37 °C 环境下培养。待细胞生长至对数生长期, 胰酶消化后, 1000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min (离心半径  $r = 16.5$  cm), 弃上清液, 按  $1 \times 10^4$  个/孔接种于 96 孔板, 按  $1 \times 10^5$  个/孔接种于 12 孔板。将细胞随机分为空白组、模型组、不同配比 (SM-PN + OGD/R) 给药组。给药组分别按 100、200、400 mg·L<sup>-1</sup> 三个浓度于造模前 4 h 加入相应药物。

### 2.3 BV2 细胞 OGD/R 模型构建

依据文献<sup>[6-7]</sup>中 OGD/R 模型构建方法, 将 BV2 细胞接种至 12 孔板的细胞生长 24 h 后, 用 PBS 洗涤 2 遍, 加入无糖无血清 DMEM 在 5% CO<sub>2</sub>、95% N<sub>2</sub>、37 °C 环境中氧糖剥夺 6 h, 将无糖无血清培养基更换为正常培养基依次复氧 0、6、12、24 h, 确定最佳复氧时间。

### 2.4 CCK-8 筛选最佳给药浓度和比例

将对数生长期的细胞接种于 96 孔板并按照上述造模及分组给药方式进行操作, 在 OGD/R 结束后每孔加入 100  $\mu$ L 含有 CCK-8 的高糖 DMEM 37 °C 孵育 1 h。在酶标仪 450 nm 吸光度值下测定 OD 值, 并根据公式细胞生存率 (%) =  $OD_{\text{模型组}} / OD_{\text{空白组}} \times 100\%$ , 计算出各组细胞生存率。选出最优给药浓度及最佳配比组。

2.5 Real-time PCR 法检测 M1 型和 M2 型小胶质细胞相关标志物 mRNA 表达

Trizol 法提取各组细胞内的总 RNA，定量检

测 RNA 浓度及纯度，逆转录合成 cDNA 后进行检测（引物详情见表 1）。根据  $2^{-\Delta\Delta ct}$  计算各组之间 mRNA 表达差异。

表 1 PCR 引物序列  
Tab 1 Primer sequence of PCR

引物名称	上游 (5'-3')	下游 (5'-3')
TNF- $\alpha$	GAGCGACTCAAAGTGCCT	GCTGGTATCTCTCAGCTCCA
IL-1 $\beta$	GCTTCAGGCAGGCAGTATCA	TGCAGTTGTCTAATGGGAACG
IL-6	AAATGATGGATGCTACCAAAGT	CTCTGGCTTTGTCTTCTTGTATC
IL-10	GCTGGACAACATACTGCTAACCGACTC	CCTTGATTTCTGGCCATGCTTCTC
iNOS	CCGCCGCTCTAATACTTA	TTCATCAAGGAATTATACAGGAA
TGF- $\beta$	CGCAACAACGCCATCTAT	TGCTCCCGAATGTCTGA
$\beta$ -actin	TTCCTTCTGGGTATGGAAT	GAGCAATGATCTTGATCTTC

2.6 Western blot 检测 I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-I $\kappa$ B $\alpha$ 、p65、p-p65 蛋白磷酸化水平

收集各组细胞，加入 RIPA 裂解液振荡离心，提取各组细胞总蛋白，BCA 法进行蛋白定量。凝胶电泳分离蛋白后将蛋白转移至 PVDF 膜，使用 5% 的脱脂奶粉摇床封闭 2 h，一抗 (1 : 1000) 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日二抗孵育 1 h 加入显影液，凝胶成像系统成像，采用 Image J 软件分析各蛋白灰度值，计算 p-I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-p65/p65 蛋白变化水平。

2.7 统计学分析

使用 SPSS 23.0 版软件进行统计分析，所有数据以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，组间比较采用单因素方差分析，以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 BV2 细胞 OGD/R 模型的建立

模型组 BV2 细胞生存率随着复氧时间的增加而逐步下降 (见图 1)，且在复氧 24 h 时达到最低值 (约 50%)，与空白组相比，复氧 24 h 时差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。因此，本研究 OGD/R 模型的建立采用氧糖剥夺 6 h 复氧 24 h。

3.2 不同浓度不同配比 SM-PN 对 OGD/R 细胞生存率的影响

CCK-8 检测结果表明，与模型组相比，不同配比 SM-PN + OGD/R 给药组的细胞生存率均有所增加，且呈一定的浓度依赖性，并在 200  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时达到最大值 (见图 2)。使用 200  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度药物进行干预时，SM-PN 5 : 3 + OGD/R 给药组细胞生存率显著增加，因此选择 SM-PN 5 : 3 (200  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 作为后续研究的配比浓度。

3.3 SM-PN 对 OGD/R BV2 细胞 M1 型和 M2 型标志物 mRNA 水平的影响

与空白组比较，模型组 iNOS、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、

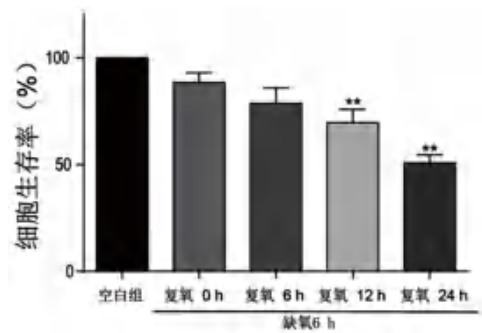


图 1 不同时间 OGD/R 对 BV2 细胞活性的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )  
Fig 1 Effect of OGD/R at different times on cell viability of BV2 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

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

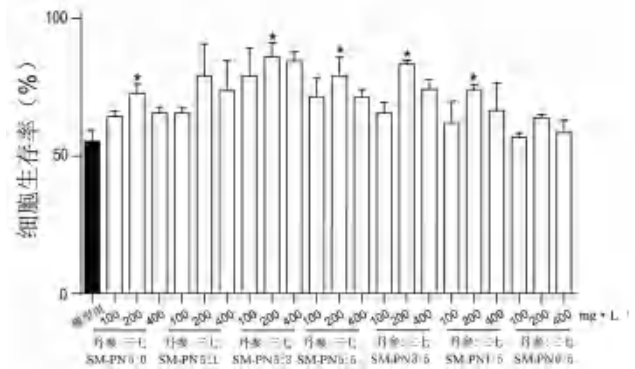


图 2 不同浓度和配比的 SM-PN 对 OGD/R 的 BV2 细胞生存率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )  
Fig 2 Effect of different concentrations and ratios of SM-PN on cell viability of BV2 cells after the OGD/R ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

注：与模型组比较，\* $P < 0.05$ 。  
Note: Compared with the model group, \* $P < 0.05$ .

IL-6 mRNA 表达水平明显上调 ( $P < 0.01$ )，TGF- $\beta$ 、IL-10 mRNA 表达降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )；与模型组比较，SM-PN 组 iNOS、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 mRNA 表达水平显著降低，TGF- $\beta$ 、IL-10 mRNA 表达显著增加 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )，见图 3。



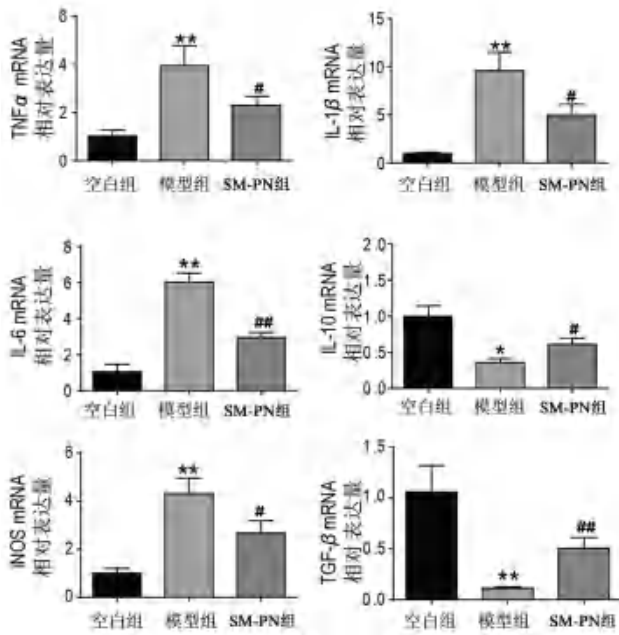


图3 SM-PN对 OGD/R BV2 细胞中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10、iNOS 和 TGF- $\beta$  mRNA 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig 3 Effect of SM-PN on the expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, iNOS and TGF- $\beta$  mRNA in BV2 cells after the OGD/R ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

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

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

### 3.4 SM-PN 对 OGD/R BV2 细胞中 p-I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-p65/p65 磷酸化蛋白水平的影响

Western blot 结果显示，与空白组比较，模型组小胶质细胞中 I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化水平 (p-I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$ ) 和 P65 磷酸化水平 (p-p65/p65) 显著升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与模型组比较，SM-PN 组 I $\kappa$ B $\alpha$  和 p65 蛋白磷酸化水平显著降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )，见图 4。

## 4 讨论

2020 年版《中国药典》收录的以 SM-PN 药对为主要成分的中药复方制剂有很多种，如复方血栓通胶囊 (50 : 250, g/g)、芪参胶囊 (155 : 148, g/g)、复方丹参片 (450 : 141, g/g)、丹七片 (250 : 250, g/g) 等，SM-PN 的比例不同，其功能主治也有所差异。查阅文献，关于 SM-PN 药对在缺血性脑卒中治疗中的优化配比文献较少，本课题研究不同配比 SM-PN 对 BV2 细胞 OGD/R 后细胞生存率的影响，发现 SM-PN 5 : 3 配比能显著提高 OGD/R 损伤的 BV2 细胞生存率，这可为临床缺血性脑卒中患者开具中药复方时 SM-PN 的给药比例提供参考。

M1 型小胶质细胞释放促炎细胞因子，导致

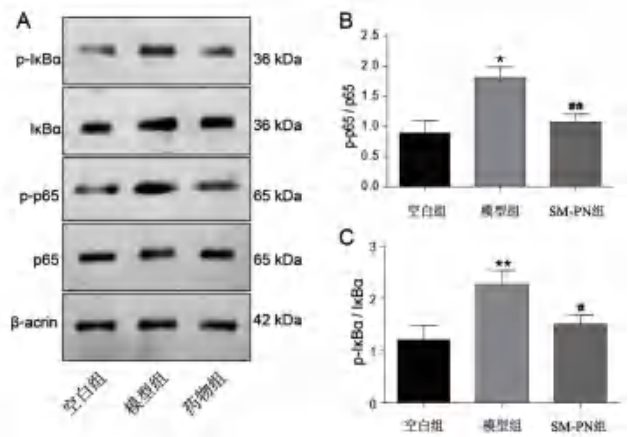


图4 SM-PN对 OGD/R BV2 细胞中 I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-I $\kappa$ B $\alpha$ 、p65、p-p65 蛋白的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig 4 Effect of SM-PN on the protein expression of I $\kappa$ B $\alpha$ , p-I $\kappa$ B $\alpha$ , p65 and p-p65 in BV2 cells after the OGD/R ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

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

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

炎症反应加剧，M2 型小胶质细胞产生抑制神经元炎症的抗炎细胞因子，并恢复中枢神经系统的稳态<sup>[8-9]</sup>。本研究发现，SM-PN 可抑制 M1 型小胶质细胞标志性促炎因子 iNOS、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 mRNA 表达，其中 IL-6 mRNA 表达水平降低更显著；增加 M2 型小胶质细胞标志性抑炎因子 TGF- $\beta$ 、IL-10 mRNA 的表达。进一步查阅文献发现，IL-6 可影响缺血性脑卒中的发生、发展及预后，干预 IL-6 通路具有预防心血管疾病复发的作用<sup>[10]</sup>，提示 SM-PN 能够促进 OGD/R 损伤的 BV2 细胞由 M1 型转变为 M2 型，抑制炎症反应，发挥脑缺血的神经保护作用。

NF- $\kappa$ B 信号通路是炎症调节的主要通路<sup>[11]</sup>，由 NF- $\kappa$ B/Rel 蛋白的同源或异二聚体组合组成，主要的可诱导形式由 p65 和 p50 亚基组成，与 I $\kappa$ B $\alpha$  (NF- $\kappa$ B 抑制剂) 形成复合体存在于细胞质中<sup>[12]</sup>。本研究结果发现 SM-PN 可显著下调 OGD/R 损伤的 BV2 细胞内 p65 和 I $\kappa$ B $\alpha$  的蛋白磷酸化水平，抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路的活化，降低促炎因子 iNOS、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 的表达水平，进而发挥抗炎作用。研究表明，小胶质细胞受到刺激后 I $\kappa$ B $\alpha$  发生降解和磷酸化，游离的 NF- $\kappa$ B p65 蛋白磷酸化后发生核易位，结合到 DNA 上特定的启动子区域上，促进炎症相关基因的转录和表达，进而调控下游炎症因子的表达<sup>[13]</sup>。但文献报道丹参和三七及其主要成分可通过多种信号通路调控基因表达、转录等在缺血性卒中疾病中发挥神经保护作用



用<sup>[14-16]</sup>，在脑缺血损伤的炎症反应中是否涉及其他信号通路，还有待进一步研究。

综上所述，SM-PN 5:3 时对 OGD/R 损伤的 BV2 细胞的保护作用最显著，且可通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路的活化，促进 OGD/R 损伤的 BV2 细胞由 M1 型转变为 M2 型，减少促炎细胞因子的表达，发挥抗炎作用。

### 参考文献

- [1] Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, et al. Heart disease and stroke Statistics-2017 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2017, 135 (10): e146-e603.
- [2] Yao DB, Zhang S, Hu ZW, et al. CHIP ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury by attenuating necroptosis and inflammation [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13 (23): 25564-77.
- [3] 佟玲, 苏志强. 炎性小体在脑缺血中的作用 [J]. *国际脑血管病杂志*, 2017, 259 (2): 170-173.
- [4] Zhang F, Yan C, Wei CJ, et al. Vinpocetine inhibits NF- $\kappa$ B-dependent inflammation in acute ischemic stroke patients [J]. *Transl Stroke Res*, 2018, 9 (2): 174-184.
- [5] 贾壮壮, 陈红阳, 赵磊, 等. 丹参多酚酸配伍三七总皂苷通过调节 M1/M2 型小胶质细胞极化对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响 [J]. *天津中医药*, 2020, 37 (7): 824-830.
- [6] 杨春澜, 孟祥武, 郑龙, 等. 大黄素通过 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路减轻缺糖/缺氧对小胶质细胞的损伤 [J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35 (12): 2285-2289.
- [7] 吴飞飞, 郭明. 汉防己甲素对缺氧缺糖损伤 BV2 细胞炎症反应的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36 (10): 1350-1352.
- [8] Timmerman R, Burm SM, Bajramovic JJ. Tissue-specific features of microglial innate immune responses [J]. *Neurochem Int*, 2021, 142: 104924.
- [9] Gogoleva VS, Drutskaya MS, Atretkhany KS. The role of microglia in the homeostasis of the central nervous system and neuroinflammation [J]. *Mol Biol (Mosk)*, 2019, 53 (5): 790-798.
- [10] 龚宇田, 黎洁洁. IL-6 和动脉粥样硬化性缺血性卒中的关系研究进展 [J]. *中国卒中杂志*, 2022, 17 (9): 1022-1026.
- [11] Cho JJ, Xu Z, Parthasarathy U, et al. Hectd3 promotes pathogenic Th17 lineage through Stat3 activation and Malt1 signaling in neuroinflammation [J]. *Nat Commun*, 2019, 10 (1): 701.
- [12] Chang JW, Wu MT, Song WS, et al. Ultrasound stimulation suppresses LPS-induced proinflammatory responses by regulating NF- $\kappa$ B and CREB activation in microglial cells [J]. *Cereb Cortex*, 2020, 30 (8): 4597-4606.
- [13] Du SB, Deng YL, Yuan HJ, et al. Safflower yellow B protects brain against cerebral ischemia reperfusion injury through AMPK/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 7219740.
- [14] 刘佩, 刘玥彤, 杨鑫鑫, 等. 基于网络药理学和 GEO 数据研究三七、黄芪和丹参防治缺血性脑卒中作用机制 [J]. *右江民族医学院学报*, 2022, 44 (1): 43-52.
- [15] 李汶泽, 李智, 万梅绪, 等. 注射用丹参多酚酸对脑缺血再灌注后脑功能保护作用的研究进展 [J]. *中南药学*, 2022, 20 (11): 2658-2664.
- [16] 国家中医心血管病临床医学研究中心, 中国医师协会中西医结合医师分会, 中国中西医结合学会活血化瘀专业委员会, 等. 三七总皂苷制剂临床应用中国专家共识 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2021, 41 (10): 1157-1167.

(收稿日期: 2023-12-15; 修回日期: 2024-04-11)

# 基于酰胺甲基化策略的 GluA2 内吞阻滞剂环肽的合成及评价

陈小雨, 董铭心\* (青岛大学药学院, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 目的 在 GluA2-3Y 结构基础上通过环化和 *N*-甲基化策略设计甲基化环肽, 提高化合物与靶标的亲和力、神经保护活性及稳定性。方法 基于 Fmoc 固相合成法合成目标多肽, 经 RP-HPLC 对多肽进行分析和纯化。采用表面等离子共振技术测试多肽与 BRAG2 蛋白的亲和力。通过 CCK8 法检测多肽对 HT22 细胞的毒性。构建氧糖剥夺 (OGD) 模型评价多肽的体外神经保护活性。通过 HPLC 检测多肽的血浆稳定性。结果 基于 Fmoc 固相合成法共设计合成 14 条多肽, 经 RP-HPLC 分析纯度均在 90% 以上。表面等离子共振结果显示: 环肽 c10c-Y-5 表现出与对照药 Ac-3Y 相近的亲和力, 解离常数  $KD$  为  $0.68 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 与 BRAG2 蛋白有较强的亲和力。CCK8 法测试多肽的毒性结果显示:  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  多肽在 HT22 细胞上基本没有毒性。环肽在 OGD 模型上对 HT22 细胞的神经保护活性结果显示: 与模型组相比, 环肽 c10c-Y-2 在  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  下有神经保护活性 ( $P < 0.05$ ); 环肽 c10c-Y-5 在 3 个浓度下有神经保护活性 ( $P < 0.05$ ); 环肽 c10c-Y5G6 在  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  下有神经保护活性 ( $P < 0.01$ )。环肽的血浆稳定性实验结果显示: c10c-Y-2 和 c10c-Y-5 经环化和 *N*-甲基化修饰后, 与线性肽相比稳定性有大幅度提高。结论 本研究应用 SPR 技术和多肽在 OGD 模型上对 HT22 细胞的神经保护活性评价手段, 筛选出了具有潜在神经保护活性且增强了血浆稳定性的环肽 c10c-Y-2 和 c10c-Y-5, 可为多肽药物的修饰改造提供思路和依据。

**关键词:** *N*-甲基化修饰; 环化; HT22 细胞; 神经保护; 血浆稳定性

中图分类号: R914.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)08-1986-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.004

## Synthesis and evaluation of cyclopeptide, a GluA2 endocytosis blocker based on amide methylation strategy

CHEN Xiao-yu, DONG Ming-xin\* (School of Pharmacy, Qingdao University, Qingdao Shandong 266071)

**Abstract: Objective** To design methylated cyclopeptides by cyclization and *N*-methylation strategies based on the GluA2-3Y structure to improve the affinity, neuroprotective activity and stability. **Methods** The target peptides were synthesized based on Fmoc solid-phase method, and then analyzed and purified by RP-HPLC. The affinity of peptides to BRAG2 protein was tested by surface plasmon resonance. The toxicity of peptides to HT22 cells was detected by CCK8. A model of oxygen-glucose deprivation was established to evaluate the neuroprotective activity of peptides in vitro. The plasma stability of peptides was detected by HPLC. **Results** Totally 14 peptides were designed and synthesized based on Fmoc solid-phase method, with purity more than 90% by RP-HPLC. The surface plasmon resonance showed that the affinity of cyclopeptide c10c-Y-5 was similar to that of control drug Ac-3Y, the dissociation constant  $KD = 0.68 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , and had a strong affinity with BRAG2 protein. The CCK8 assay showed that  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  peptides had no toxicity on HT22 cells. The neuroprotective activity of cyclopeptide on HT22 cells in OGD model showed that: compared with the model group, cyclopeptide c10c-Y-2 had neuroprotective activity at  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  and  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $P < 0.05$ ), and cyclopeptide c10c-Y-5 had neuroprotective activity at three concentrations ( $P < 0.05$ ). Cyclopeptide c10c-Y5G6 had neuroprotective activity under  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $P < 0.01$ ). The plasma stability test of cyclopeptides showed that the stability of both c10c-Y-2 and c10c-Y-5 was greatly improved as compared with linear peptides after cyclization and *N*-methylation. **Conclusion** By surface plasmon resonance technique

作者简介: 陈小雨, 女, 硕士, 主要从事药物化学研究, email: 2021024541@qdu.edu.cn \*通信作者: 董铭心, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事药物化学研究, email: qddongmx@163.com

and evaluation of neuroprotective activity of polypeptides on HT22 cells in OGD model, cyclopeptide c10c-Y-2 and c10c-Y-5 are screened out to show potential neuroprotective activity and may enhance the plasma stability. This study provides ideas and basis for the modification of peptide drugs.

**Key words:** *N*-methylation modification; cyclization; HT22 cell; neuroprotection; plasma stability

脑卒中是一种由局部脑血液循环阻塞导致神经功能障碍的疾病, 每年脑卒中新发患者超过 1300 万, 支出费用 113 亿美元, 给患者和国家带来了巨大的经济负担<sup>[1-2]</sup>。神经保护作为一种很有前途的治疗方法<sup>[3]</sup>, 旨在通过阻止单个或多个有害的级联反应来延长神经元的存活时间, 可用于急性缺血发作阶段以及随后的康复阶段, 对于那些错过溶栓治疗最佳时间窗的患者十分重要。因此, 探索治疗脑缺血性损伤的新型神经保护药物是十分迫切的。

(S)- $\alpha$ -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙氨酸受体 (AMPA) 是由 GluA1-4 亚基形成的四聚体离子型谷氨酸受体, 可介导大脑中大部分快速兴奋性突触传递。生理情况下, AMPA 内吞和上膜数量处于动态平衡状态, 突触后膜上稳定数量的 AMPA 能够维持神经信号正常传递<sup>[4]</sup>。在某些病理状态下, 兴奋性谷氨酸受体的大量激活会导致 AMPA 内吞数量超过上膜数量, 导致突触后膜 AMPA 数目减少, 造成  $Ca^{2+}$  大量内流<sup>[5]</sup>, 进而导致大脑中许多钙依赖通路的异常激活和坏死、凋亡及自噬过程的启动<sup>[6-7]</sup>。

在过去的二十年中, 已有许多 AMPA 拮抗剂被开发, 但直接阻断 AMPA, 会影响谷氨酸受体的正常功能, 产生不良反应<sup>[5]</sup>。鸟嘌呤-核苷酸交换因子 BRAG2-腺苷酸核糖基化作用因子 6 (Arf6) 通路为 GluA2 AMPA 内吞的一种新调节机制<sup>[8]</sup>。GluA2 中 876 位的酪氨酸被 Src 家族的酪氨酸激酶磷酸化后<sup>[9-10]</sup>, 通过富含酪氨酸的基序 (YKEGYNVY876G, 指定为 GluA2-3Y 基序) 与 BRAG2 产生特异性结合, 激活了 Arf6, 进而促进了 AMPA 的内吞作用, 此外研究表明 GluA2-3Y 中酪氨酸的苯环在与 BRAG2 蛋白的结合过程中发挥着关键作用<sup>[11]</sup>。因此, BRAG2 的缺失或 GluA2-BRAG2 相互作用的抑制可防止 AMPA 内吞。

Tat-GluA2-3Y<sup>[12]</sup> 是一种干扰肽, 由一段穿膜序列 Tat 和模拟 GluA2 羧基端 3 个酪氨酸的活性序列组成。它可竞争性结合 BRAG2 突触蛋白, 从而抑制 Arf6 的激活, 减少过度内吞的发生<sup>[13]</sup>, 在治疗脑卒中<sup>[14]</sup>、重度抑郁<sup>[15]</sup>、阿尔茨海默病<sup>[16]</sup> 等疾病方面发挥着重要的作用。目前此药物已经进入 I 期临床, 但因为直链多肽依从性稳定性差、难以透过消化屏障和细胞膜、体内生物利用度低、功能性不强、长链多肽合成难度也较大、

其成药性有待进一步提高。

为了改善线性肽的性质, 本研究在 GluA2-3Y 的基础上进行结构改造, 通过头尾环化以及引入 *N*-甲基化策略, 设计 GluA2 内吞阻滞剂环肽, 探究 *N*-甲基化和环化修饰对多肽的亲合力、生物活性和稳定性等的影响。我们优先在 GluA2-3Y 中的 Y873 位和 Y876 位的酪氨酸进行 *N*-甲基化, 并通过首尾环化的方式合成单甲基化环肽, 随后在单甲基化环肽的基础上进行二轮甲基化修饰。

## 1 材料

MQT-60R 恒温振荡器 (上海旻泉科技有限公司); OSE-DB-02 恒温金属浴 (北京天根生化科技有限公司); 摇床 (济南科哲仪器设备有限公司); 真空泵 (维根技术有限公司); CTFD-10P 冷冻干燥机 (永和创信科技有限公司); Nova EU 型超纯水一体机 (青岛普洛斯科技有限公司); 1220 高效液相色谱仪、1260 高效液相色谱仪 (安捷伦科技有限公司); ST16R 高速冷冻离心机 (美国赛默飞世尔科技有限公司); GL224-1SCN 经济型分析天平 (精度: 0.0001 g, 上海赛多利斯贸易有限公司); pH 调节计 (华志电子科技有限公司); MS-H-S 标准加热磁力搅拌器 (大龙兴创实验仪器股份公司); FlexStation 3 多功能酶标仪工作站 (Molecular Devices); NIB620-FL 倒置荧光显微镜 (宁波永新光学股份有限公司); C100-SE 型细胞计数仪 (深圳瑞沃德生命科技有限公司); 二氧化碳培养箱 (苏州贝茵科技股份有限公司); HH-2 型恒温水浴锅 (国华仪器制造有限公司); 超净工作台 (上海拜艾斯净化设备有限公司); 厌氧培养箱 (上海川宏实验仪器有限公司)。

甲醇、乙腈和三氟乙酸 (色谱级, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 二氯甲烷 (DCM) 和 *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) (分析纯, 北京伊诺凯科技有限公司); 细胞级二甲基亚砜 (DMSO) (纯度: 99.9%)、100 $\times$  青霉素-链霉素溶液、氨基偶联试剂盒 (北京伊塔生物科技有限公司); DMEM 基本培养基、DMEM 无糖培养基 (亿泽丰生物科技有限公司); 胎牛血清 (FBS, 深圳中科百抗生物科技有限公司); CCK8 试剂盒 (上海和之莱生物科技有限公司); 0.25% 胰蛋白酶-EDTA (上海研谨生物科技有限公司); 大鼠血浆 (北京百奥莱博科技有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 目标化合物的合成



**2.1.1 目标化合物的合成方法** 采用 Fmoc 固相法<sup>[17-18]</sup>在 Rink Amide resin ( $0.32 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 上合成线性肽 Ac-3Y (Ac-YKEGYNVYG)。N-末端的乙酰化反应采用 3eq 乙酸酐 ( $\text{Ac}_2\text{O}$ )、3eq 2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯 (HATU)、3eq 1-羟基苯并三唑 (HOBT) 和 6eq N,N-二异丙基乙胺 (DIPEA) 在 DMF 中反应 1.5 h。

以环肽 c10c-Y-5 为例 (见图 1), 首先在 C-末端引入 Fmoc-Glu-(OAll)-OH 作为线性肽头尾环化的连接物, 然后用标准的多肽化学方法合成线性序列。在 DCM 中用  $0.03 \text{ mmol Pd}(\text{PPh}_3)_4$  和  $1 \text{ mmol}$  苯硅烷

处理 3 次, 去除 L-谷氨酸 C 端  $\alpha$ -羧基上的烯丙基。树脂在 DMF 中用  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  二甲基二硫代氨基甲酸钠洗涤 2 次, 在 DMF 中加入 20% 的哌啶去除 N-末端 Fmoc 基团 15 min (2 次)。先后用 DMF、DCM 和 DMF 洗涤树脂各 3 次, 并与  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HOBT 孵育 15 min。全保护直链肽在树脂上用  $0.5 \text{ mmol}$  HATU、 $0.5 \text{ mmol}$  HOBt 和  $1 \text{ mmol}$  DIPEA 在 DMF 中环化 2 h (2 次)。用 87.5 : 2.5 : 2.5 : 5 (V/w/V/V) 的三氟乙酸 (TFA)、二硫代苏糖醇 (DTT)、苯酚 (Phenol) 和  $\text{H}_2\text{O}$  从树脂上切割多肽, 3 h 后收集滤液, 用冰乙醚沉淀,  $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心, 收集沉淀。

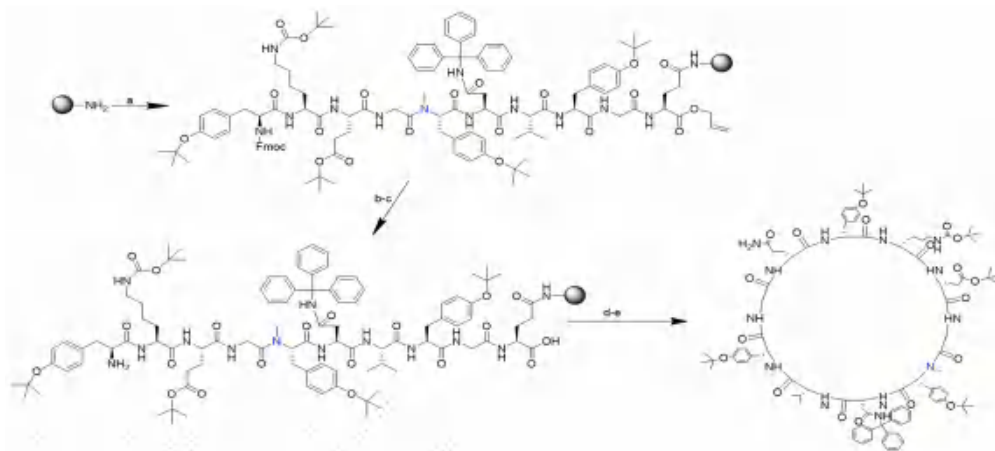


图 1 c10c-Y-5 的合成路线图

Fig 1 Synthesis roadmap of c10c-Y-5

注: a. 固相多肽合成; b.  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ ; c. 哌啶; d. HATU; e. TFA。

Note: a. Solid-phase peptide synthesis; b.  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ ; c. piperidine; d. HATU; e. TFA.

**2.1.2 环肽合成条件的优化** 在直链肽 Tyr (tBu)-Lys (Boc)-Glu (OtBu)-Gly-Tyr (Tbu)-Asn (Trt)-Val-Tyr (Tbu)-Gly-Glu (OAll) 合成中, 选用 HBTU 作为缩合剂, 进行 HPLC 分析, 结果出现两个主峰 (见图 2A), 其中保留时间 8.295 min 处的峰纯度为 42%, 保留时间 9.589 min 处的峰纯度为 35%。若在连接 Fmoc-Gly-OH 时选用 HATU 作为缩合剂, HPLC 分析结果出现一个主峰 (见图 2B), 纯度为 70%。由此可以看出, 在 HBTU 缩合剂条件下, Gly 没有缩合完全。另外在进行头尾环化反应时, 采用 HBTU 作为缩合剂时, 茚三酮呈蓝紫色, 延长反应时间效果不明显, 环化反应不彻底, 考虑可能是头尾环化反应的空间位阻较大, 采取 HATU 进行环化反应的偶联, 反应 4 h, 茚三酮为阴性, 反应完全。因此, 对于环肽反应中 N-甲基化氨基酸后一个氨基酸的偶联和环化反应, 采用 HATU 为缩合剂更有利于反应的进行。

**2.2 目标化合物的分析与纯化**

将粗肽冷冻干燥, 溶解在最小体积的 DMSO 中。采用反相高效液相色谱法在 0.05% TFA 的水和乙腈体系中分离纯化。用 Positsil OSD-PC18 分析

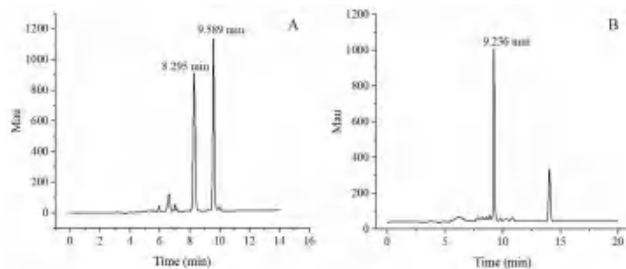


图 2 不同缩合剂条件下的直链粗肽 HPLC 图

Fig 2 HPLC of crude straight-chain peptide under different condensation agents

A. HBTU 为偶联缩合剂 (HBTU as coupling condensation agent); B. HATU 为偶联缩合剂 (HATU as coupling condensation agent)

柱 ( $5 \mu\text{m}$ ,  $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ ), 采用 1 ~ 20 min, 15% ~ 60% 乙腈的洗脱条件和  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  的流速进行分析。根据 280 nm 处的吸光度收集组分, 用电喷雾质谱 (ESI-MS) 进行分子量确证。用 Positsil OSD-PC18 制备柱 ( $5 \mu\text{m}$ ,  $10 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ ) 对粗肽进行制备, 采用 1 ~ 35 min, 15% ~ 40% 乙腈的洗脱梯度和  $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  的流速进行纯化。经冷冻干燥后计算多肽的收率并对多肽的纯度进行分析, 结果如表 1 所示。



表 1 多肽的结果表征

Tab 1 Characterization of polypeptides

多肽名称	多肽序列	保留时间 /min	实测分子量 / (g · mol <sup>-1</sup> )	收率 /%	纯度 /%
Ac-3Y	Ac-YKEGYNVYG	9.329	1133.52	75	92.9
c10c-Y-2	c (-YKEGYNVN-MeYGE-)	12.902	1216.68	50	98.2
c10c-Y-5	c (-YKEGNN-MeYNVYGE-)	13.843	1216.56	60	98.2
c10c-Y5G1	c (-YKEGN-MeYNVN-MeGE-)	13.550	1230.59	65	96.6
c10c-Y5Y2	c (-YKEGN-MeYNVN-MeYGE-)	14.520	1230.59	31	95.3
c10c-Y5V3	c (-YKEGN-MeYNN-MeYVYGE-)	14.000	1230.28	20	99.8
c10c-Y5N4	c (-YKEGN-MeYN-MeNVYGE-)	12.492	1230.32	62	99.4
c10c-Y5G6	c (-YKEN-MeGN-MeYNVYGE-)	14.244	1230.58	63	99.6
c10c-Y5E7	c (-YKN-MeEGN-MeYNVYGE-)	14.514	1230.58	64	99.8
c10c-Y5K8	c (-YN-MeKEGN-MeYNVYGE-)	13.623	1230.67	60	99.2
c10c-Y5Y9	c (-N-MeYKEGN-MeYNVYGE-)	14.244	1230.67	25	91.1
c10c-Y2N4	c (-YKEGYNN-MeNVN-MeYGE-)	13.740	1230.59	58	99.7
c10c-Y2G6	c (-YKEN-MeGYNVN-MeYGE-)	11.618	1230.59	62	92.4
c10c-Y2E7	c (-YKN-MeEGYNVN-MeYGE-)	12.324	1230.59	55	92.4
c10c-Y2K8	c (-YN-MeKEGYNVN-MeYGE-)	13.134	1230.59	22	99.8

### 2.3 多肽与 BRAG2 蛋白的表面等离子共振技术 (SPR) 检测

**2.3.1 配体蛋白的偶联** 基于表面等离子共振技术, 将 BRAG2 蛋白以氨基偶联的方式共价连接到 CM5 芯片上。首先 1:1 进样 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺 (EDC) 和 *N*-羟基丁二酰亚胺 (NHS) 混合物 220 μL 进行活化, 接触时间 430 s, 然后进样用 pH 4.5 的醋酸钠缓冲液配制的质量浓度为 15 μg · mL<sup>-1</sup> 的配体分子, 采用多针进样的方式, 使偶联量略高于目标偶联量, 最后进样乙醇胺进行封闭, 结合时间 420 s。根据公式: 芯片表面最大结合容量 = 分析物的分子量 ÷ 配体的分子量 × 配体偶联水平 × 化学计量比, 一般取芯片表面最大结合容量为 100, 化学计量比为 1, 进行理论配体偶联量的计算, 实际偶联量 = 1.5 倍的理论配体偶联量。

配体偶联过程如图 3 所示。a 点 → b 点表示混合 NHS 和 EDC 对芯片表面羧基的活化过程; c 点 → d 点表示 BRAG2 蛋白以脉冲进样的方式吸附和共价结合到芯片; d 点 → e 点表示配体偶联后乙醇胺的封闭过程。配体的实际偶联量为  $RL_{d-c} = 6723.4$  RU, 达到预期的实验要求。

**2.3.2 多肽药物活性初筛** 将对照药 Ac-3Y 配制不同的浓度, 手动进样, 流速为 30 μL · min<sup>-1</sup>, 多肽与蛋白结合时间 60 s, 配体再生时间 30 s。根据传感图响应强度确定对照药与 BRAG2 蛋白结合的质量浓度为 25 μg · mL<sup>-1</sup>。随后将其他多肽配制成初筛浓度, 检测多肽与 BRAG2 蛋白的结合强度, 挑选响应强度大于 2.5 RU 的多肽作为潜在化合物。结果见图 4, Ac-3Y、c10c-Y-2、c10c-Y-5、c10c-Y2N4、c10c-Y2G6 和 c10c-Y2E7 的响应强度大于 2.5 RU, 作为潜在的活性化合物进行后续亲和力大小的测定。

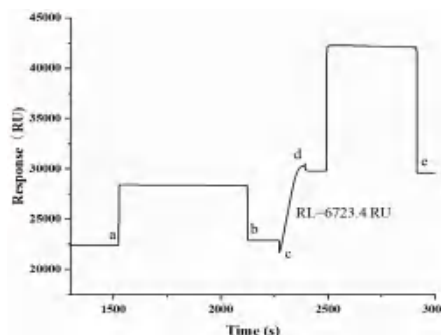


图 3 配体偶联传感图

Fig 3 Ligand-coupled sensing map

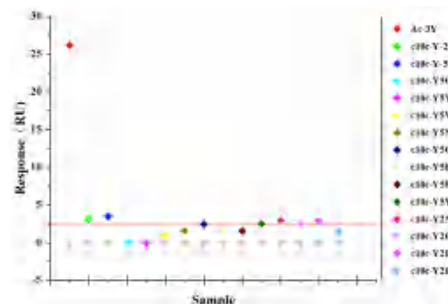


图 4 化合物活性初筛

Fig 4 Compound activity primary screening

**2.3.3 多肽药物亲和力测定** 根据多肽活性初筛结果, 选择具有活性潜力的多肽进行亲和力大小的测定。设置多肽的结合时间 60 s, 解离时间 120 s, 再生时间 30 s。设定流速为 30 μL · min<sup>-1</sup>, 配体分子的流路通道选择 4-1。在初筛浓度的基础上设置 2~3 个浓度, 将配制的各浓度多肽依次流经芯片, 经结合、解离、再生后, 收集和绘制各多肽响应值随时间变化的曲线。依照不同结合模式图选择不同的拟合模型, 拟合计算多肽对 BRAG2 蛋白的解离常数 KD, 这反映了结合的强度。结果如图 5 所示, 环肽 c10c-Y-5 与 BRAG2 蛋白的结合亲和力最佳,

KD = 0.68  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 与对照药 Ac-3Y 的结合亲和力相近。与对照药 Ac-3Y 相比, 其他环肽与 BRAG2 蛋白的结合亲和力都有所下降, 与 BRAG2 蛋白呈现中等强度的结合水平。

## 2.4 多肽对 HT22 细胞的毒性测定

### 2.4.1 HT22 细胞的培养和药物的准备

用完全培养基 (含  $10 \times 10^4 \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$  青霉素、 $0.1 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  链霉素和 10%FBS) 培养 HT22 细胞 (博汇生物科技有限公司), 置于  $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  的培养箱中。细胞复苏后传代 2 ~ 3 代用于实验。

将细胞分为空白组 (基本培养基)、对照组 (含细胞的基本培养基) 和给药组 (含细胞和药物的基本培养基)。多肽药物用细胞级 DMSO 配制成  $10 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  母液, 然后用 DMEM 培养基将多肽稀释到不同浓度。

### 2.4.2 CCK8 法检测多肽对 HT22 细胞的毒性

将 HT22 细胞以  $3 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$  的细胞密度接种于 96 孔板中培养, 12 h 后给药组用浓度为  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  多肽与细胞共孵育, 24 h 后加入  $10 \mu\text{L}$  的 CCK8, 继续孵育 2 h, 在  $450 \text{nm}$  波长下检测吸光度, 计算细胞存活率。细胞存活率 (%) = (给药组 OD - 空白组 OD) / (对照组 OD - 空白组 OD)  $\times 100\%$ 。

多肽对 HT22 细胞的毒性评价结果如表 2 所示, 结果显示所有的多肽在  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  下 HT22 细胞的存活率超过了 95%, 基本没有细胞毒性, 有利于开展后续的细胞活性实验。

表 2 多肽的细胞毒性

Tab 2 Cytotoxicity of polypeptides

实验组	细胞存活率 / %
对照组	100.00
Tat-GluA2-3Y	97.96 $\pm$ 1.11
c10c-Y-2	100.08 $\pm$ 2.24
c10c-Y-5	99.57 $\pm$ 7.90
c10c-Y5G1	97.13 $\pm$ 1.43
c10c-Y5Y2	98.79 $\pm$ 1.36
c10c-Y5N4	98.05 $\pm$ 1.61
c10c-Y5G6	98.79 $\pm$ 2.80
c10c-Y5E7	100.45 $\pm$ 1.75
c10c-Y5K8	100.63 $\pm$ 1.90
c10c-Y5Y9	98.19 $\pm$ 1.22
c10c-Y2N4	100.13 $\pm$ 2.48
c10c-Y2G6	98.79 $\pm$ 2.80
c10c-Y2E7	98.95 $\pm$ 1.67
c10c-Y2K8	101.43 $\pm$ 1.74

## 2.5 多肽在氧糖剥夺 (OGD) 模型上对 HT22 细胞的神经保护作用评价

### 2.5.1 多肽药物的配制及实验分组

多肽药物用 DMSO 配制成  $10 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  母液, 然后用 DMEM 无糖培养基将多肽稀释到 0.1、1 和  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的浓度。将细胞分为 3 组, 包括对照组、OGD 组和给药组。

### 2.5.2 OGD 模型的建立

取对数生长期的 HT22 细胞以  $3 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$  的密度铺于 96 孔板中, 培养 12 h 后, 弃去完全培养基, 给药组中的细胞加入不同浓度的多肽。其他组细胞更换成 DMEM 基本培养基继续培养; 孵育 24 h 后将 OGD 组和给药组中的培养基更换为 DMEM 无糖培养基, 放入缺氧装置中缺氧。3 h 后, 将 OGD 组和给药组中的培养基更换成 DMEM 基本培养基置正常培养环境中复氧。6 h 后取出培养板将所有组的细胞加入  $10 \mu\text{L}$  的 CCK8。用锡箔纸包好将其放入  $37^\circ\text{C}$  恒温培养箱中继续孵育。2 h 后用全自动酶标仪在  $450 \text{nm}$  波长处检测每个孔中细胞的 OD 值。计算细胞存活率。

### 2.5.3 OGD 模型中 HT22 细胞形态的变化

倒置显微镜观察细胞形态, 对照组 HT22 细胞贴壁生长, 细胞呈两极或多极, 突起明显, 突起之间相互交织成网状, 与对照组相比, OGD 组细胞表现为胞体轴突减少, 细胞皱缩, 细胞间连接减少, 细胞贴壁不紧, 部分细胞团脱落 (见图 6)。

### 2.5.4 多肽对 HT22 细胞的神经保护活性

通过对 HT22 细胞进行缺糖缺氧体外实验模拟脑缺血模型, 探究多肽对脑缺血再灌注损伤的保护作用。结果如表 3 所示, 与对照组相比, OGD 组的 HT22 细胞存活率差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。与 OGD 组相比, 阳性药 Tat-GluA2-3Y ( $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 可以阻止 OGD 诱导的细胞死亡, 并将细胞存活率从 61% 分别提高到 67% 和 74% ( $P < 0.01$ );  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的环肽 c10c-Y-2, 三个浓度的环肽 c10c-Y-5 及  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的环肽 c10c-Y5G6 对细胞存活率的影响差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

## 2.6 多肽的血浆稳定性测定

将一定多肽溶解在  $150 \mu\text{L}$  的血浆中配制成  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的工作样品浓度。将多肽与血浆在  $37^\circ\text{C}$  下孵育, 在不同孵育点 (0、0.5、1、2、4、6、12 和 24 h) 取样  $70 \mu\text{L}$ , 每个样品立即用  $140 \mu\text{L}$  乙腈淬灭。在  $4^\circ\text{C}$  下以  $13\,000 \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min 收集样品, 取上清液进行 RP-HPLC 分析。以  $1 \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$  的流速在线性梯度为 1 ~ 30 min, 15% ~ 55% 乙腈条件下对多肽进行含量分析。

结果如图 7 所示, Ac-3Y 在 4 h 内完全消化。Ac-3Y 的半衰期约为 1 h, 阳性药 Tat-GluA2-3Y 在 6 h 左右可达到半衰期。而 c10c-Y-2 和 c10c-Y-5 处理 24 h 后, 多肽剩余量约为 70%。这些结果表明环化和 N-甲基化修饰可减少酶对多肽的降解, 提高多肽的稳定性。

## 2.7 统计学分析

采用 GraphPad Prism 7 软件进行数据分析,

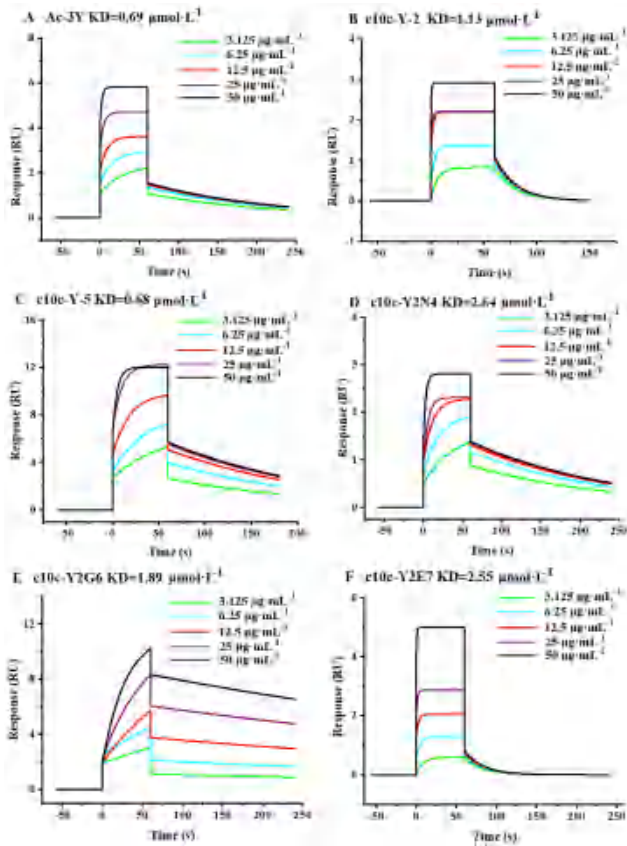


图 5 多肽 Ac-3Y (A)、c10c-Y-2 (B)、c10c-Y-5 (C)、c10c-Y2N4 (D)、c10c-Y2G6 (E) 和 c10c-Y2E7 (F) 与 BRAG2 蛋白的动力学曲线

Fig 5 Kinetic profile of peptide Ac-3Y (A), c10c-Y-2 (B), c10c-Y-5 (C), c10c-Y2N4 (D), c10c-Y2G6 (E) and c10c-Y2E7 (F) with BRAG2 protein

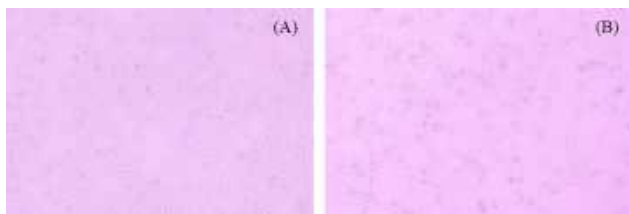


图 6 在正常 (A) 和氧糖剥夺 (B) 条件下 HT22 细胞的成像 (×20)  
Fig 6 Imaging of HT22 cells under normal (A) and oxygen-glucose deprivation (B) conditions (×20)

采用 Origin 软件进行图片绘制。以  $\bar{x} \pm s$  表示实验结果数据。多组间比较采用 One-way ANOVA 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义，所有的实验和测量都以随机、盲法进行。

### 3 讨论

在环肽合成的过程中，对于普通氨基酸的偶联，使用常规缩合剂 HBTU 即可反应完全。而 *N*-甲基引起的空间位阻会影响后续氨基酸的偶联效率，因此对于 *N*-甲基化基团后的偶联反应使用高效缩合剂 HATU，反应 4 h 即可完成。头尾环化反应，相比于其他环合方式（头与侧链环化、侧链

**表 3 多肽的神经保护活性**  
**Tab 3 Neuroprotective activity of polypeptides**

实验组	细胞存活率 / %		
	0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
对照组	100.0	100.0	100.0
平行 OGD 组	38.62 ± 0.79**	38.62 ± 0.79**	38.62 ± 0.79**
c10c-Y-2	42.63 ± 4.70	50.17 ± 1.05*	49.85 ± 2.16*

实验组	细胞存活率 / %		
	0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
平行 OGD 组	61.44 ± 1.78**	61.44 ± 1.78**	61.44 ± 1.78**
Tat-GluA2-3Y	64.16 ± 1.45	67.94 ± 2.16**	74.64 ± 5.06**
c10c-Y-5	67.50 ± 3.91*	67.50 ± 1.04*	67.72 ± 1.58**

实验组	细胞存活率 / %		
	0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
平行 OGD 组	41.64 ± 0.95**	41.64 ± 0.95**	41.64 ± 0.95**
c10c-Y5G1	36.36 ± 1.51	49.49 ± 5.23	41.61 ± 2.31
c10c-Y5Y2	52.88 ± 1.54	50.96 ± 0.47	55.61 ± 2.15
c10c-Y5N4	42.63 ± 4.70	50.17 ± 1.05	49.85 ± 2.16
c10c-Y5G6	47.83 ± 6.65	53.80 ± 5.78	59.65 ± 4.82**
c10c-Y5E7	24.12 ± 3.14	26.42 ± 2.53	40.98 ± 4.11
c10c-Y5K8	26.42 ± 0.95	32.26 ± 2.49	25.97 ± 1.01
c10c-Y5Y9	27.02 ± 1.73	28.21 ± 1.71	44.00 ± 4.87
c10c-Y2N4	43.66 ± 1.32	44.12 ± 1.39	46.49 ± 2.06
c10c-Y2G6	37.42 ± 4.48	47.26 ± 1.92	45.35 ± 4.12
c10c-Y2E7	36.37 ± 1.51	49.49 ± 5.23	41.61 ± 2.31
c10c-Y2K8	30.86 ± 1.52	32.62 ± 2.64	43.67 ± 1.06

注：与对照组相比，\*\* $P < 0.01$ ；与 OGD 组相比，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ 。

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

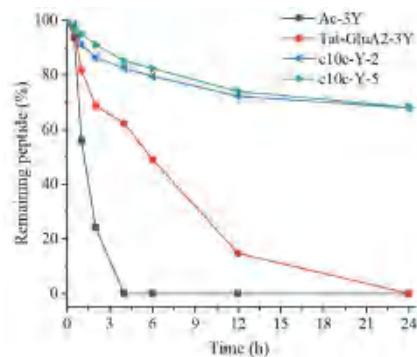


图 7 多肽在不同时间的血浆稳定性  
Fig 7 Plasma stability of peptides at different times

与侧链环化)，合成难度最大，分子更偏爱形成反式构象，呈舒展状态，造成处于反应中心羧基和氨基在空间上距离较远，不利于发生分子内缩合反应，采用 HATU 可以大大提高反应的合成效率。因此正式实验中采用 HATU 为这两步的反应条件。

本文对合成的 14 条多肽进行 HPLC 分析，与线性肽 Ac-3Y 相比，环肽在 HPLC 上的保留时



间都有所延长,说明分子极性减小,符合环肽的设计理念,环化和 *N*-甲基化可通过减少氢键供体和氢键受体的方式增加多肽的疏水性。

在多肽对氧糖剥夺后 HT22 细胞的神经保护活性评价中,除 c10c-Y-2、c10c-Y-5 和 c10c-Y5G6 外,其他多肽并没有表现出良好的神经保护作用。分析可能有以下几种因素影响化合物的活性:

① 进入细胞中的药量能够影响多肽药物的神经保护活性:一方面,随着给药浓度的提高,c10c-Y-2 的神经保护活性也随之提高,c10c-Y5G6 在低浓度下没有神经保护活性,高浓度有活性;另一方面,环肽的神经保护活性与穿膜效率有关,线性肽 Ac-3Y 与 BRAG2 蛋白的亲合力较高,然而 Ac-3Y 不具有细胞活性<sup>[18]</sup>,结合 Ac-3Y 在 RP-HPLC 上的保留时间较短,相较于其他 *N*-甲基化环肽,极性较大,推测 Ac-3Y 不易穿膜,而 *N*-甲基化环肽经修饰后氢键供体和氢键受体的数量减少,亲脂性增大,更容易进入细胞发挥神经保护作用,从而相比于其他多肽更能发挥保护作用。

② 神经保护活性还与多肽和 BRAG2 蛋白的结合亲和力有关。本研究发现,c10c-Y-5 与 BRAG2 蛋白的结合亲和力跟对照药 Ac-3Y 相当,与在 HT22 细胞上的神经保护活性一致。研究表明将活性基团进行构象限制能够很好地固定活性构象,降低构象自由度,降低结合过程中因熵增加导致的结合自由能损失,增强靶分子的结合亲和力,进而提高化合物在细胞水平的保护疗效。

血浆稳定性是评价多肽药物能否成药的重要因素之一。本研究中环肽 c10c-Y-2 和 c10c-Y-5 的血浆稳定性明显优于线性肽 Ac-3Y 和 Tat-GluA2-3Y。与线性肽相比,*N*-甲基化环肽从两方面改善了血浆的降解:一方面多肽经环化后,消除了 N 端和 C 端较易被水解酶识别的氨基和羧基;另一方面多肽经环化和 *N*-甲基化后,构象被限制,结构更刚性,抑制了其在血液中的蛋白水解速率。同时一些侧链上较易水解的基团也容易被环肽包裹起来,使水解酶不易进入,降低了水解速率。

综上所述,通过甲基化和环化策略设计的环肽 c10c-Y-2 和 c10c-Y-5,在 OGD 模型上对 HT22 细胞表现出一定的神经保护活性,能够避免血浆中一些酶的水解,提高血浆稳定性。本研究为多肽药物的修饰改造提供了思路和数据支持。

## 参考文献

[1] 陈婷,张成,潘文娟,等.脑卒中患者住院费用变动趋势分析——基于灰色关联和结构变动度[J].新疆医学,2023,53(10):1276-1278.

[2] 中国心血管健康与疾病报告 2020 概要[J].中国循环杂志,2021,36(6):521-545.

[3] 王凯,张学琴,杨珍珍,等.神经保护剂改善急性缺血性脑卒中神经功能的网状 Meta 分析[J].中南药学,2020,18(4):685-693.

[4] Bencsik N, Morales COO, Hausser A, et al. Endocytosis of AMPA receptors: role in neurological conditions [J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2023, 196: 59-97.

[5] Mattes H, Carcache D, Kalkman HO, et al. A-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) antagonists: from bench to bedside [J]. J Med Chem, 2010, 53(15): 5367-5382.

[6] Jones RS, Carroll RC, Nawy S. Light-induced plasticity of synaptic AMPA receptor composition in retinal ganglion cells [J]. Neuron, 2012, 75(3): 467-478.

[7] Widagdo J, Chai YJ, Ridder MC, et al. Activity-dependent ubiquitination of GluA2 and GluA2 regulates AMPA receptor intracellular sorting and degradation [J]. Cell Rep, 2015, 10(5): 783-795.

[8] Fukaya M, Sugawara T, Hara Y, et al. BRAG2a mediates mglur-dependent AMPA receptor internalization at excitatory postsynapses through the interaction with PSD-95 and Endophilin 3 [J]. J Neurosci, 2020, 40(22): 4277-4296.

[9] Kohda K, Kakegawa W, Matsuda S, et al. The 2 glutamate receptor gates long-term depression by coordinating interactions between two AMPA receptor phosphorylation sites [J]. PNAS, 2013, 110(10): E948-E957.

[10] Manavski Y, Carmona G, Bennewitz K, et al. BRAG2 differentially regulates B1-and B3-integrin-dependent adhesion in endothelial cells and is involved in developmental and pathological angiogenesis [J]. Basic Res Cardiol, 2014, 109: 1-19.

[11] Ge Y, Wang YT. Postsynaptic signaling at glutamatergic synapses as therapeutic targets [J]. Curr Opin Neurobiol, 2022, 75: 102585.

[12] Dias C, Wang YT, Phillips AG. Facilitated extinction of morphine conditioned place preference with Tat-GluA2<sub>3Y</sub> interference peptide [J]. Behav Brain Res, 2012, 233(2): 389-397.

[13] Ge Y, Wang YT. Postsynaptic signaling at glutamatergic synapses as therapeutic targets [J]. Curr Opin Neurobiol, 2022, 75: 102585.

[14] Lu HF, Chen SJ, Nie QQ, et al. Synaptotagmin-3 interacts with GluA2 mediates brain damage and functional recovery in stroke [J]. Cell Rep, 2023, 42(3): 112233.

[15] Dong ZF, Gong B, Li HJ, et al. Mechanisms of hippocampal long-term depression are required for memory enhancement by novelty exploration [J]. J Neurosci, 2012, 32(35): 11980-11990.

[16] Miguez PV, Liu LD, Archbold GEB, et al. Blocking synaptic removal of GluA2-containing AMPA receptors prevents the natural forgetting of long-term memories [J]. J Neurosci, 2016, 36(12): 3481-3494.

[17] 严志祥,韩帅,陈积,等. GluA2 亚基内吞阻滞穿膜环肽 CMT-3Y 的设计合成与评价 [J]. 精准医学杂志, 2022, 37(1): 22-27.

[18] 王宇航,陈学明,刘俗生,等.一种多肽固相合成方法与纯化策略研究 [J]. 中国生物工程杂志, 2023, 43(1): 35-41.

(收稿日期:2024-05-16;修回日期:2024-06-04)



## 甘草次酸调控铁死亡缓解舒尼替尼肝损伤的机制研究

曹蓉<sup>1,2</sup>, 刘灵<sup>1</sup>, 郭林<sup>2</sup>, 夏爽<sup>2</sup>, 罗欢<sup>3</sup>, 颜苗<sup>2\*</sup>, 江志超<sup>1,3\*</sup> (1. 湖南中医药大学, 长沙 410208; 2. 中南大学湘雅二医院药学部, 长沙 410011; 3. 湖南中医药高等专科学校附属第一医院, 湖南 株洲 410016)

**摘要:** **目的** 探讨甘草次酸 (GA) 对舒尼替尼诱导的肝损伤的保护作用及机制。 **方法** 首先提取美国 FDA 药物不良反应数据库 (FAERS) 中使用舒尼替尼与其他治疗转移性肾细胞癌和胃肠道间质瘤的药物的肝脏不良事件 (AEs) 数据, 采用贝叶斯法计算药物与不良反应的信号关联强度, 对比舒尼替尼与其他抗肿瘤药物的肝毒性风险。其次在动物水平上, 将小鼠随机分为正常对照组、舒尼替尼组 (120 mg · kg<sup>-1</sup>)、舒尼替尼 + GA 低剂量组 (10 mg · kg<sup>-1</sup>)、舒尼替尼 + GA 高剂量组 (20 mg · kg<sup>-1</sup>), 每组 5 只, 各组小鼠每日灌胃给药, 连续 2 周。给药结束后检测小鼠血清谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 水平; 苏木素伊红 (HE) 染色观察肝组织病理变化; 试剂盒测定肝组织脂质过氧化物 (LPO)、丙二醛 (MDA) 及铁 (Fe) 含量; Western blot 分别检测核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)、溶质载体家族 7 成员 11 (SLC7A11)、血红素氧合酶 (HO-1)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 的蛋白表达情况。 **结果** FAERS 数据库信号挖掘分析发现舒尼替尼相比于其他治疗转移性肾细胞癌和胃肠道间质瘤的药物, 与肝脏 AEs 存在的信号关联性更为显著, 尤其与黄疸、高胆红素血症、AST 升高、肝衰竭紧密相关。在动物实验结果中, 与正常对照组相比, 舒尼替尼组血清 ALT、AST 水平显著升高; HE 染色结果显示明显的肝细胞肝索排列紊乱、空泡样变及炎性细胞浸润; LPO、MDA 和 Fe 含量明显升高; Nrf2、SLC7A11、HO-1、GPX4 蛋白均表达降低。与 GA 联合后, ALT、AST 水平明显降低; 肝组织病理损伤程度得到一定的恢复; LPO、MDA 和 Fe 水平降低; Nrf2、SLC7A11、HO-1 及 GPX4 蛋白表达增加。 **结论** GA 可有效缓解舒尼替尼所致的肝损伤, 其作用机制可能与抑制铁死亡有关。

**关键词:** 甘草次酸; 肝损伤; 舒尼替尼; 铁死亡

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)08-1993-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.005

## Glycyrrhetic acid alleviates sunitinib-induced liver injury via regulating ferroptosis and related mechanism

CAO Rong<sup>1,2</sup>, LIU Ling<sup>1</sup>, GUO Lin<sup>2</sup>, XIA Shuang<sup>2</sup>, LUO Huan<sup>3</sup>, YAN Miao<sup>2\*</sup>, JIANG Zhi-chao<sup>1,3\*</sup> (1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208; 2. Department of Pharmacy, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011; 3. The First Affiliated Hospital of Hunan Chinese Medicine College, Zhuzhou Hunan 410016)

**Abstract: Objective** To determine the protective effect and of glycyrrhetic acid (GA) on sunitinib-induced liver injury related mechanism. **Methods** Firstly, adverse event (AE) data of sunitinib and other drugs used for the treatment of metastatic renal cell carcinoma and gastrointestinal stromal tumors were collected from the US Food and Drug Administration Adverse Event Reporting System (FAERS) database. The signal association strength between the drugs and AEs was calculated with Bayesian method, and the hepatotoxicity risk of sunitinib was compared with that of other antitumor drugs. At the animal level, mice were randomly divided into a normal control group, a sunitinib group (120 mg · kg<sup>-1</sup>), a sunitinib plus low-dose GA group (10 mg · kg<sup>-1</sup>), and a sunitinib plus

**基金项目:** 湖南省自然科学基金杰出青年基金 (No.2022JJ10097); 湖南省自然科学基金 (No.2023JJ60351); 湖南省教育厅优秀青年基金 (No.21B0014); 中国药学会医院药学专业委员会人才专项资助项目 (No.CPA-Z05-ZC-2021-003); 湖南省中医药管理局 (No.A2023032)。

**作者简介:** 曹蓉, 女, 硕士, 主要从事中医药与中西医结合临床研究, email: 1511457427@qq.com \***通信作者:** 颜苗, 男, 主任药师, 主要从事药理学与毒理学研究, email:yanmiao@csu.edu.cn; 江志超, 男, 主任医师, 主要从事中医学基础与临床研究, email: 912015107@qq.com

high-dose GA group ( $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), with 5 mice in each group. The mice in each group were orally administered daily for 2 weeks. After the treatment, the levels of serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were measured. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes in the liver tissues. The levels of lipid peroxides (LPO), malondialdehyde (MDA), and iron (Fe) in the liver tissues were determined by assay kits. Western blot was used to detect the protein expression of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2), solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11), heme oxygenase-1 (HO-1), and glutathione peroxidase 4 (GPX4).

**Results** The signal mining of the FAERS database showed that sunitinib had a more significant association with the liver AEs than did other drugs in the treatment of metastatic renal cell carcinoma and gastrointestinal stromal tumors, especially for patients with jaundice, high bilirubin levels, AST elevation, and liver failure. In the animal experiment, compared with the normal control group, the serum ALT and AST levels in the sunitinib group significantly increased. HE staining showed obvious disorder in the liver cell cords, vacuolar degeneration, and inflammatory cell infiltration. The levels of LPO, MDA, and Fe were significantly increased, and the protein expression of Nrf2, SLC7A11, HO-1, and GPX4 were decreased. After combining GA, the levels of ALT and AST were significantly decreased, the pathological damage in the liver tissue was partially restored, the levels of LPO, MDA, and Fe were decreased, and the protein expression of Nrf2, SLC7A11, HO-1, and GPX4 were increased.

**Conclusion** GA can effectively alleviate sunitinib-induced liver injury, whose mechanism may be related to the inhibition of ferroptosis.

**Key words:** glycyrrhetic acid; liver injury; sunitinib; ferroptosis

舒尼替尼是一种靶向血小板源性生长因子受体、血管内皮生长因子受体和 c-Kit 原癌基因的口服多靶点酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitors, TKIs), 于 2006 年被 FDA 批准用于转移性肾细胞癌和胃肠道间质瘤<sup>[1]</sup>。患者在使用舒尼替尼治疗过程中, 其主要不良反应为手足综合征、高血压、骨髓抑制、心脏毒性、肝毒性等<sup>[2-3]</sup>。前期队列研究报道了舒尼替尼使用者出现肝毒性<sup>[4]</sup>, 在舒尼替尼的临床使用过程中, 已有多例舒尼替尼治疗相关的肝功能衰竭致死的病例报道<sup>[5]</sup>。2010 年, FDA 在舒尼替尼产品说明书中添加肝毒性的黑框警告<sup>[6]</sup>。但是目前关于舒尼替尼肝毒性的研究样本量小, 未能全面揭示舒尼替尼所致肝毒性的临床特征。FDA 药物不良反应数据库 (Food and Drug Administration Adverse Event Reporting System, FAERS) 是全球最大的药物不良反应 (adverse events, AEs) 自发呈报数据库之一, 被广泛应用于药物 AEs 信号挖掘。本研究将首先采用 FAERS 数据库对比舒尼替尼与其他抗肿瘤药物的肝毒性信号关联强度, 以揭示舒尼替尼使用者的肝毒性风险。

目前, 针对舒尼替尼肝毒性这一问题临床上主要采取减量或停药、提供保肝治疗等支持措施, 因此亟待寻找切实可行的干预策略。研究发现, 许多中药有效成分有保肝护肝作用, 且中医药在防治肝

损伤方面有独特优势及明确疗效<sup>[7]</sup>。甘草具有中药“国老”的美誉, 在组方中发挥“调和诸药”“配伍减毒”作用, 其主要活性物质为甘草酸、甘草次酸 (glycyrrhetic acid, GA) 和甘草酮等<sup>[8]</sup>。近年来随着对 GA 的不断研究, 它广泛的药理作用逐渐被大众所熟知, 主要包括抗肿瘤、抗氧化、抗病毒、免疫调节、肾上腺皮质激素样作用和治疗心脑血管疾病等<sup>[9-11]</sup>。因为 GA 在抗氧化、抗肿瘤方面发挥的优越作用, 越来越多的研究考虑将其应用于药物性肝损伤 (drug-induced liver injury, DILI) 的防治。

铁死亡是一种新型的非凋亡性细胞死亡方式, 其标志性特征表现为铁依赖性、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 活性丧失以及脂质和活性氧 (ROS) 过量堆积。最新研究表明铁死亡也是 DILI 中重要的细胞死亡方式<sup>[12-13]</sup>。众多研究表明, 具有保肝护肝作用的天然药物不仅参与调控细胞凋亡、坏死及自噬等, 还能调控细胞铁死亡, 抑制铁死亡以减轻肝损伤。然而, GA 能否通过抑制铁死亡发挥作用尚不清楚。因此, 本研究探讨 GA 对舒尼替尼肝脏毒性的缓解作用及其相关的分子机制, 以期进一步为 TKIs 肝损伤的防治策略提供理论和实验基础, 促进临床安全用药。

## 1 材料

### 1.1 试剂

舒尼替尼 (九鼎化学试剂公司); GA (西亚试剂

公司); 谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 苏木素伊红 (HE) 染色试剂 (Servicebio 公司); 蛋白酶抑制剂、增强型 RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (Gibco 公司); 脂质过氧化物 (LPO)、丙二醛 (MDA) 及铁 (Fe) 含量试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 抗体 (批号: AF7006, Affinity 公司)、溶质载体家族 7 成员 11 (SLC7A11) 抗体 (批号: ab175186)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 抗体 (批号: ab125066)(Abcom 公司)、 $\beta$ -actin 抗体 (批号: ac026, ABclonal 公司)、山羊抗兔 IgG H&L (HRP, 批号: SA00001-2)、血红素氧合酶 (HO-1) 抗体 (批号: 10701-1-AP (Proteintech 公司)、超敏 ECL 化学发光即用型底物 (新赛美)。

## 1.2 实验动物

雄性 SPF 级 C57BL/6J 小鼠, 4 ~ 6 周龄, 体重 18 ~ 22 g [湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可证号 SCXK (湘) 2019-0004], 饲养环境温度 (23 ± 2) °C, 湿度 50% ~ 60%。

## 2 方法

### 2.1 数据挖掘

提取 FAERS 数据库中 2006 年第一季度到 2022 年第四季度使用舒尼替尼与其他治疗转移性肾细胞癌和胃肠道间质瘤的药物的肝脏 AEs 数据。纳入的治疗肾细胞癌和胃肠道间质瘤的药物源于美国国家癌症研究所官网 (美国药监局批准的药物); 纳入了 Medical Dictionary for Regulatory activities (MedDRA, 25.1) 中 Drug related hepatic disorders-comprehensive search (SMQ) 下所有肝脏相关的 AEs。采用贝叶斯法<sup>[14]</sup> 计算信息成分 (information component, IC) 值作为信号检测标准, IC 的 95% 置信区间下限 (IC<sub>025</sub>) > 0 可被视为药物相关 AEs 的阳性信号。

### 2.2 分组与给药

所有小鼠均自由进食饮水, 适应性饲养一周后给药。20 只 C57BL/6J 小鼠随机分为正常对照组、舒尼替尼组 (120 mg · kg<sup>-1</sup>)、舒尼替尼 + GA 低剂量组 (10 mg · kg<sup>-1</sup>)、舒尼替尼 + GA 高剂量组 (20 mg · kg<sup>-1</sup>), 每组 5 只。正常对照组灌胃等体积生理盐水, 给药组小鼠每日灌胃给予 120 mg · kg<sup>-1</sup> 舒尼替尼以及按照分组剂量给予 GA, 每日 1 次, 连续 2 周。末次给药 24 h 后, 摘眼球采血并安乐死处死所有小鼠, 解剖取肝组织进行后续检测与分析。

### 2.3 血清肝脏生化指标 ALT、AST 检测

动物称重, 予以麻醉后摘眼球采血, 血液静置 30 min, 4 °C、1000 r · min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 取上层血清, 按照试剂盒说明书步骤使用酶标仪 (瑞士

Tecan 公司) 测定肝脏生化指标 ALT、AST 水平。

### 2.4 HE 染色观察小鼠肝脏形态

取肝左叶浸泡在 4% 通用型组织固定液中, 室温固定, 脱水, 石蜡包埋, 切片, 用 HE 染色, 在光学显微镜下观察小鼠肝组织的病理变化并拍照。

### 2.5 检测 LPO、MDA 及 Fe 含量

取冻存肝组织, 称重后研磨制备组织匀浆, 离心后取上清液, 按照试剂盒说明书步骤使用酶标仪测定吸光度值, 用 BCA 法对肝组织的蛋白进行定量, 并根据标准曲线计算 LPO、MDA 及 Fe 含量。

### 2.6 Western blot 法检测蛋白表达水平

制备动物肝组织匀浆, 离心取上清液, BCA 法测定蛋白浓度, 制备 SDS-PAGE 凝胶, 将蛋白转移到 PVDF 膜后, 5% 脱脂牛奶中封闭 1 h, 在一抗 (1 : 1000) 稀释液中, 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜, 随后与二抗 (1 : 5000) 于室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次后, 用 ECL 发光液显影。最后, 采用 Image J 软件分析目标条带相对灰度值。

### 2.7 统计学分析

实验数据采用 SPSS 21.0 软件进行处理与分析, 数据结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 FAERS 数据库舒尼替尼肝毒性信号挖掘

如图 1 所示, 舒尼替尼较其他治疗转移性肾细胞癌的多数药物来说, 是与肝脏 AEs 存在关联性较强的药物, 尤其与黄疸 (IC<sub>025</sub> = 2.26), 高胆红素血症 (IC<sub>025</sub> = 1.91), AST (IC<sub>025</sub> = 1.87) 的升高紧密相关, 而在与治疗胃肠道间质瘤的其他药物相比时, 其与黄疸 (IC<sub>025</sub> = 2.62)、肝衰竭 (IC<sub>025</sub> = 2.43) 的关联性远远高于其他药物。

### 3.2 各组小鼠血清中肝脏生化指标 ALT、AST 的含量

如图 2 所示, 与正常对照组相比, 舒尼替尼组小鼠血清 ALT、AST 水平显著上升 ( $P < 0.001$ ); 与舒尼替尼组相比, 舒尼替尼 + GA 低剂量组、舒尼替尼 + GA 高剂量组 ALT、AST 水平均显著下降 ( $P < 0.001$ )。

### 3.3 各组小鼠肝组织的病理变化

HE 染色结果显示正常对照组小鼠肝细胞排列整齐, 结构清晰, 无明显细胞水肿及坏死; 舒尼替尼组小鼠肝索排列紊乱并伴有肝细胞水肿, 空泡样变, 同时伴有炎性浸润; GA 干预组较舒尼替尼组肝细胞水肿减轻, 炎细胞数量减少, 见图 3。

### 3.4 各组小鼠肝组织 LPO、MDA 及 Fe 含量情况



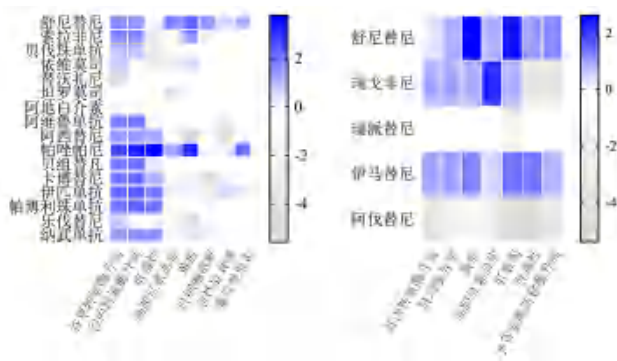


图 1 FAERS 数据库中舒尼替尼和其他抗肿瘤药物与肝毒性的信号关联热图

Fig 1 Heatmap of the signal association of sunitinib with other anti-tumor drugs with hepatotoxicity in the FAERS database

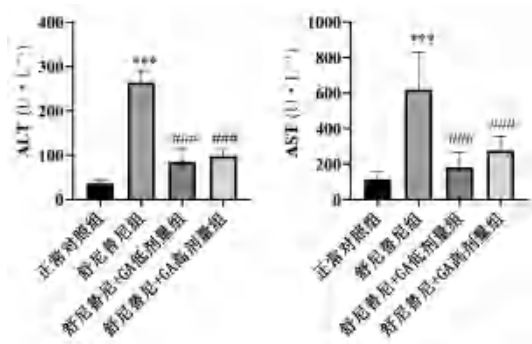


图 2 各组小鼠血清中 ALT、AST 含量 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig 2 Content of ALT and AST in the serum of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

注：与正常对照组相比， $***P < 0.001$ ；与舒尼替尼组相比， $###P < 0.001$ 。

Note: Compared with the normal control group,  $***P < 0.001$ ; compared with the sunitinib group,  $###P < 0.001$ .

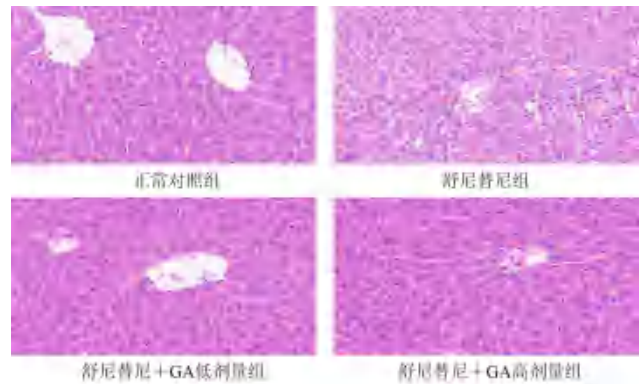


图 3 各组小鼠肝组织病理切片 (HE 染色,  $\times 400$ )

Fig 3 Histopathological sections of the liver of mice in each group (HE staining,  $\times 400$ )

如图 4 所示，与正常对照组相比，舒尼替尼组肝组织 LPO、MDA 及 Fe 含量显著升高 ( $P < 0.01$ )；与舒尼替尼组相比，GA 干预组肝组织 LPO、MDA 及 Fe 含量明显下降 ( $P < 0.05$ )。

### 3.5 对铁死亡相关蛋白表达的影响

如图 5 所示，与正常对照组相比，舒尼替尼组肝组织 Nrf2、SLC7A11、HO-1、GPX4 的蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ )；与舒尼替尼组相比，GA 干预组的 Nrf2、SLC7A11、HO-1 和 GPX4 的蛋白表达明显提高 ( $P < 0.05$ )。

## 4 讨论

DILI 是指人体使用一定剂量药物后，由于药物本身或其代谢产物所引起的不同程度肝损伤<sup>[15]</sup>，急性肝损伤最为常见，也可表现为慢性肝损伤，主要引起机体内 ROS 生成增多，进而出

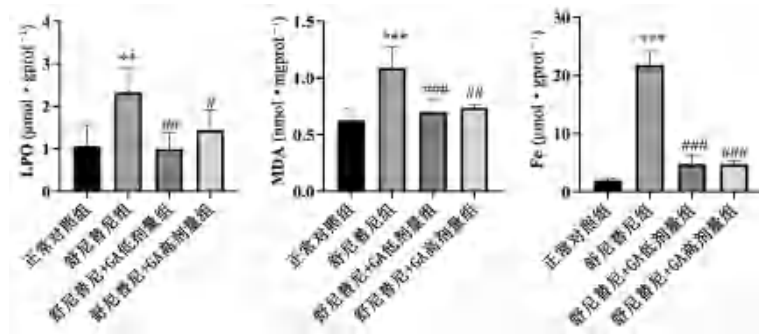


图 4 各组小鼠肝组织 LPO、MDA 及 Fe 含量情况 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig 4 Content of LPO, MDA and Fe in liver tissues of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

注：与正常对照组相比， $**P < 0.01$ ， $***P < 0.001$ ；与舒尼替尼组相比， $#P < 0.05$ ， $##P < 0.01$ ， $###P < 0.001$ 。

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

现脂质过氧化性损伤，乃至细胞死亡。舒尼替尼是一个临床广泛使用的抗肿瘤药物，本文通过对 FAERS 数据库的回顾性分析发现舒尼替尼与肝毒性信号关联显著，其治疗相关的严重肝毒性已经明显限制它的临床安全运用。甘草具有良好的保肝护肝作用，其活性成分 GA 在抗氧化方面发

挥着较强的作用。因此，本研究探究舒尼替尼与 GA 联合后小鼠肝毒性的变化和其潜在的机制，对临床用药安全具有重大意义。

血清中 ALT 和 AST 的浓度在肝损伤时会明显升高，因此 ALT 和 AST 的水平反映了肝损伤的严重程度<sup>[16]</sup>。本实验结果显示 GA 不同剂量 (10、20



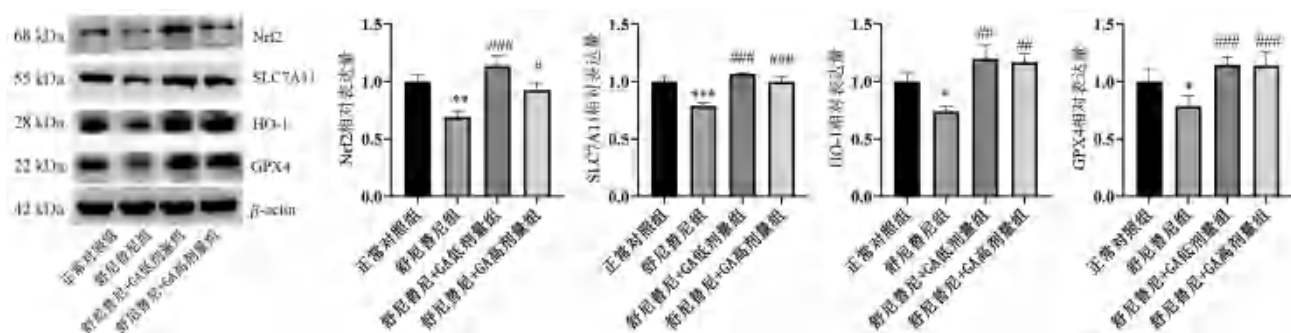


图 5 各组小鼠肝组织铁死亡相关蛋白表达水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig 5 Expression levels of ferroptosis-related proteins in the liver tissues of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

注：与正常对照组相比，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ ，\*\*\* $P < 0.001$ ；与舒尼替尼组相比，# $P < 0.05$ ，### $P < 0.01$ ，#### $P < 0.001$ 。

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

mg · kg<sup>-1</sup>) 分别与舒尼替尼联合后，血清 ALT、AST 水平下降；病理切片检测发现肝脏组织病理改变较舒尼替尼单独作用组明显减轻。这些结果表明 GA 可有效缓解舒尼替尼引起的肝损伤，且 GA 低剂量组较高剂量组保护作用明显，但两个剂量之间差异并没有明显的统计学意义，可能是 GA 在一定剂量范围内呈现保护的药理作用，较低或较高浓度下差异并没有发挥效应。GA 发挥肝保护效应并不完全呈现一定的剂量依赖性<sup>[17]</sup>。此外，舒尼替尼与黄疸、高胆红素血症等肝脏 AEs 紧密相关，可通过检测反映肝排泄功能的碱性磷酸酶 (ALP) 以及胆红素的水平来反映舒尼替尼肝损伤的程度。

研究显示，在肝脏疾病的不同发展阶段中，均发现铁代谢紊乱、氨基酸抗氧化系统失衡和 LPO 集聚等铁死亡特征<sup>[18-21]</sup>，而调控铁死亡可以影响肝脏疾病进程<sup>[22]</sup>。GPX4 是铁死亡的核心调控因子，抑制其表达可使含多不饱和脂肪酸的磷脂中铁依赖的 LPO 的堆积，导致细胞/亚细胞膜受损，从而促进铁死亡的发生<sup>[23]</sup>。铁死亡关键因子除 GPX4 外，还包括 SLC7A11。该关键转运体 SLC7A11 将胞外半胱氨酸转运至细胞内转化为谷胱甘肽 (GSH)，随后 GPX4 利用 GSH 降低脂质过氧化，进而抑制铁死亡<sup>[24]</sup>。因此通过调控 GPX4 或 SLC7A11 均影响铁死亡的发生发展。多年来，Cystine/GSH/GPX4 系统被认为是防御铁死亡的最主要手段，这一系统中的两个关键蛋白 SLC7A11 和 GPX4 均受 Nrf2 调控。Nrf2 是控制细胞氧化还原、动态平衡和炎症的关键转录因子，同时与铁死亡氧化应激通路密切相关，Nrf2 作为转录因子促进 SLC7A11 和 GPX4 的表达，还调控下游的靶基因 HO-1<sup>[25-27]</sup>。HO-1 的表达在很大程度上依赖于细胞的氧化应激状态，有报道显示 Maresin1 通过激活 HO-1/GPX4 通路减

轻铁死亡诱导的肝损伤<sup>[28]</sup>。本研究结果显示，舒尼替尼单独给药组肝组织中 Nrf2、SLC7A11、HO-1、GPX4 蛋白水平显著下降，可能是舒尼替尼抑制了 Nrf2 的表达，Nrf2 又下调了 SLC7A11、HO-1、GPX4 的表达；与 GA 联合后，肝组织 Nrf2、SLC7A11、HO-1、GPX4 水平均显著提高。这提示 GA 对舒尼替尼引起的肝毒性的保护作用是通过激活 Nrf2、SLC7A11、HO-1、GPX4 的表达来抑制铁死亡实现的。

课题组前期研究了舒尼替尼的肝毒性机制，证明了舒尼替尼能够通过产生过量 ROS 诱导氧化应激<sup>[29]</sup>、降低抗氧化能力，从而引起过氧化脂质的堆积，造成肝细胞氧化应激损伤。脂质过氧化和代谢功能障碍是铁死亡的关键下游反应。当铁代谢紊乱导致细胞内游离铁增加时，铁通过芬顿反应催化 ROS 的产生，进而促进脂质过氧化，导致脂质过氧化聚集和代谢功能紊乱<sup>[12, 30]</sup>。LPO 是一种自由基或 ROS 作用于不饱和脂肪酸链后产生的含有过氧基的脂质，多不饱和的脂肪酸过氧化物分解产生 MDA 和 4-羟基烯酮类 (HNE)，已被证实可以准确反映机体的脂质过氧化程度。本实验结果显示舒尼替尼与 GA 联合后显著降低 LPO、MDA、Fe 含量水平。这些结果证实了 GA 可通过抑制脂质过氧化、降低 Fe 含量来缓解舒尼替尼引起的肝毒性。

综上所述，GA 能够缓解舒尼替尼引起的肝毒性，其通过抑制脂质过氧化、降低 Fe 含量，激活 Nrf2、SLC7A11、HO-1、GPX4 等蛋白的表达来调控铁死亡，进而抑制肝细胞死亡，促进肝脏的修复。GA 这类中药活性成分参与调节铁死亡，发挥抗氧化及减毒效应，在一定程度上保护受损肝细胞，为舒尼替尼这一类药物引起的肝损伤提供了防治策略，为后续的临床安全用药提供了实验和理论依据。

## 参考文献

- [1] Goodman VL, Rock EP, Dagher R, et al. Approval summary: sunitinib for the treatment of imatinib refractory or intolerant gastrointestinal stromal tumors and advanced renal cell carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13 (5): 1367-1373.
- [2] 张文婷, 桂玲, 贡雪芑, 等. 苹果酸舒尼替尼致不良反应 30 例调查分析 [J]. *中国医院药学杂志*, 2013, 33 (5): 417-420.
- [3] Gore ME, Szczylik C, Porta C, et al. Safety and efficacy of sunitinib for metastatic renal-cell carcinoma: an expanded-access trial [J]. *Lancet Oncol*, 2009, 10 (8): 757-763.
- [4] Shantakumar S, Nordstrom BL, Djousse L, et al. Occurrence of hepatotoxicity with pazopanib and other anti-VEGF treatments for renal cell carcinoma: an observational study utilizing a distributed database network [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2016, 78 (3): 559-566.
- [5] Shah RR, Morganroth J, Shah DR. Hepatotoxicity of tyrosine kinase inhibitors: clinical and regulatory perspectives [J]. *Drug Saf*, 2013, 36 (7): 491-503.
- [6] Chalasani NP, Hayashi PH, Bonkovsky HL, et al. ACG clinical guideline: the diagnosis and management of idiosyncratic drug-induced liver injury [J]. *Am J Gastroenterol*, 2014, 109 (7): 950-967.
- [7] Beyoğlu D, Idle JR. Metabolomic insights into the mode of action of natural products in the treatment of liver disease [J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 180: 114171.
- [8] Hoever G, Baltina L, Michaelis M, et al. Antiviral activity of glycyrrhizic acid derivatives against SARS-coronavirus [J]. *J Med Chem*, 2005, 48 (4): 1256-1259.
- [9] Hendricks JM, Hoffman C, Pascual DW, et al. 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid delivered orally induces isolated lymphoid follicle maturation at the intestinal mucosa and attenuates rotavirus shedding [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (11): e49491.
- [10] Veratti E, Rossi T, Giudice S, et al. 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid and glabridin prevent oxidative DNA fragmentation in UVB-irradiated human keratinocyte cultures [J]. *Anticancer Res*, 2011, 31 (6): 2209-2215.
- [11] Zhang L, Yao J, Zhou JP, et al. Glycyrrhetic acid-graft-hyaluronic acid conjugate as a carrier for synergistic targeted delivery of antitumor drugs [J]. *Int J Pharm*, 2013, 441 (1-2): 654-664.
- [12] Chen S, Zhu JY, Zang X, et al. The emerging role of ferroptosis in liver diseases [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 801365.
- [13] Iorga A, Dara L. Cell death in drug-induced liver injury [J]. *Adv Pharmacol*, 2019, 85: 31-74.
- [14] Norén GN, Hopstadius J, Bate A. Shrinkage observed-to-expected ratios for robust and transparent large-scale pattern discovery [J]. *Stat Methods Med Res*, 2013, 22 (1): 57-69.
- [15] 超声影像学检查在药物性肝损伤诊断与治疗中的应用价值 [J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2017, 26 (3): 303-306.
- [16] Adeyemi OS, Akanji MA. Biochemical changes in the kidney and liver of rats following administration of ethanolic extract of *Psidium guajava* leaves [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2011, 30 (9): 1266-1274.
- [17] Cao LP, Ding WD, Jia R, et al. Anti-inflammatory and hepatoprotective effects of glycyrrhetic acid on CCl<sub>4</sub>-induced damage in precision-cut liver slices from Jian carp (*Cyprinus carpio* var. jian) through inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2017, 64: 234-242.
- [18] Zhou Z, Ye TJ, DeCaro E, et al. Intestinal SIRT1 deficiency protects mice from ethanol-induced liver injury by mitigating ferroptosis [J]. *Am J Pathol*, 2020, 190 (1): 82-92.
- [19] Li XY, Wang TX, Huang XM, et al. Targeting ferroptosis alleviates methionine-choline deficient (MCD) -diet induced NASH by suppressing liver lipotoxicity [J]. *Liver Int*, 2020, 40 (6): 1378-1394.
- [20] Lőrincz T, Jemnitz K, Kardon T, et al. Ferroptosis is involved in acetaminophen induced cell death [J]. *Pathol Oncol Res*, 2015, 21 (4): 1115-1121.
- [21] Louandre C, Ezzoukry Z, Godin C, et al. Iron-dependent cell death of hepatocellular carcinoma cells exposed to sorafenib [J]. *Int J Cancer*, 2013, 133 (7): 1732-1742.
- [22] 张飞宇, 阿迪拉·亚克普, 赵金明, 等. 铁死亡的发生机制及在肝脏疾病中的作用 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2021, 37 (6): 1454-1458.
- [23] Stockwell BR, Jiang XJ, Gu W. Emerging mechanisms and disease relevance of ferroptosis [J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30 (6): 478-490.
- [24] Nguyen TH, Mahalakshmi B, Velmurugan BK. Functional role of ferroptosis on cancers, activation and deactivation by various therapeutic candidates-an update [J]. *Chem Biol Interact*, 2020, 317: 108930.
- [25] Yuan Y, Zhai YY, Chen JJ, et al. Kaempferol ameliorates oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced neuronal ferroptosis by activating Nrf2/SLC7A11/GPX4 axis [J]. *Biomolecules*, 2021, 11 (7): 923.
- [26] Gong P, Zhang W, Zou CL, et al. Andrographolide attenuates blood-brain barrier disruption, neuronal apoptosis, and oxidative stress through activation of Nrf2/HO-1 signaling pathway in subarachnoid hemorrhage [J]. *Neurotox Res*, 2022, 40 (2): 508-519.
- [27] Ramos S, Carlos AR, Sundaram B, et al. Renal control of disease tolerance to malaria [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116 (12): 5681-5686.
- [28] Yang WC, Wang YX, Zhang CG, et al. Maresin1 protect against ferroptosis-induced liver injury through ROS inhibition and Nrf2/HO-1/GPX4 activation [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 865689.
- [29] Guo L, Gong H, Tang TL, et al. Crizotinib and sunitinib induce hepatotoxicity and mitochondrial apoptosis in L02 cells via ROS and Nrf2 signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 620934.
- [30] Xie Y, Hou W, Song X, et al. Ferroptosis: process and function [J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23 (3): 369-379.

(收稿日期: 2023-11-05; 修回日期: 2023-12-28)

# 虎杖多糖中蛋白去除工艺及多糖的抗炎作用研究

罗励耕, 王丹, 孟宪群\*, 侯昊良, 黄政浩 (辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

**摘要:** 目的 优化虎杖多糖提取工艺, 研究其对 RAW264.7 细胞活性的影响以及在脂多糖诱导的炎症过程中的作用机制。方法 用 Sevage 法对虎杖多糖粗提取物中游离蛋白进行处理, 然后进行单因素实验, 最后利用响应面法筛选虎杖多糖提取及除蛋白方案。将 RAW264.7 细胞分为正常组和不同浓度虎杖多糖组 (5、10、20、40、80、120  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 采用 CCK-8 试剂盒检测虎杖多糖对细胞活力的影响。将 RAW264.7 细胞分为空白组, 模型组 (100  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  脂多糖), 不同浓度给药组 (20、40、80  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  虎杖多糖溶液), 采用 ELISA 试剂盒检测肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6 (IL-6) 分泌水平; 采用 Western blot 法检测 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ Bp65 蛋白表达水平。结果 筛选得虎杖多糖最优提取方案为 Sevage 试剂与供试液体积比 1:4、振摇强度 8 档、振摇时间 12 min、除蛋白 4 次。虎杖多糖质量浓度在 20 ~ 40  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  内使细胞活力显著提升, 对 RAW264.7 细胞生长有明显促进作用。与空白组相比, 模型组细胞活力升高, TNF- $\alpha$  和 IL-6 分泌水平及 TLR4、NF- $\kappa$ Bp65 和 MyD88 蛋白表达水平显著升高, 表明巨噬细胞炎症模型构建成功。与模型组相比, 虎杖多糖 20、40、80  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  组 RAW264.7 细胞活力显著降低。此外, 在细胞上清液中发现 TNF- $\alpha$  和 IL-6 分泌水平明显减少, 并且 TLR4、MyD88 和 NF- $\kappa$ Bp65 蛋白表达水平也显著降低。结论 虎杖多糖可以减少脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 分泌, 抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路可能是其发挥抗炎作用的一种机制。

**关键词:** 虎杖多糖; 响应面法; RAW264.7 细胞; 脂多糖; 炎症因子; NF- $\kappa$ B 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)08-1999-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.006

## Protein removal process and anti-inflammation effect of polysaccharides from *Polygonum cuspidatum*

LUO Li-geng, WANG Dan, MENG Xian-qun\*, HOU Hao-liang, HUANG Zheng-hao (College of Pharmaceutical Sciences, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian Liaoning 116600)

**Abstract: Objective** To improve the extraction of polysaccharides from *Polygonum cuspidatum* and determine their effect on RAW264.7 cell activity and mechanism in lipopolysaccharide-induced inflammation. **Methods** The free protein in the crude extract of *Polygonum cuspidatum* polysaccharide was treated by Sevage method, and then the single factor experiment was conducted. Finally, the response surface method was used to screen the extraction of *Polygonum cuspidatum* polysaccharide and protein removal scheme. RAW264.7 cells were divided into a normal group and different concentrations of *Polygonum cuspidatum* polysaccharide groups (5, 10, 20, 40, 80 and 120  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). CCK-8 kit was used to observe how *Polygonum cuspidatum* polysaccharide affected the cell viability. RAW264.7 cells were divided into a blank group, a model group (100  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  lipopolysaccharide), and different concentration groups (20, 40, and 80  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  *Polygonum cuspidatum* polysaccharide solution). The secretion levels of inflammatory factors

基金项目: 辽宁省科技厅博士启动项目 (No.2021-BS-179); 2021 年辽宁中医药大学大学生创新创业训练计划项目 (No.X202110162012S)。

作者简介: 罗励耕, 男, 主要从事中药药效物质基础研究, email: 172525657@qq.com \*通信作者: 孟宪群, 女, 博士, 讲师, 主要从事中药药效物质基础研究, email: 1446569115@qq.com



TNF- $\alpha$  and IL-6 were detected by ELISA. The protein expression levels of TLR4, MyD88 and NF- $\kappa$ Bp65 were detected by Western blot. **Results** The optimal extraction scheme of polysaccharides from *Polygonum cuspidatum* was as follows: the volume ratio of Sevage reagent to the test solution was 1 : 4, the shaking intensity was 8, shaking for 12 min, and the protein was removed 4 times. The cell viability was greatly increased at the concentration range of 20 ~ 40  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , and the growth of RAW264.7 cells was much promoted. Compared with the blank group, the cell viability of the model group was increased, the secretion levels of TNF- $\alpha$  and IL-6, and the expression levels of TLR4, NF- $\kappa$ Bp65 and MyD88 proteins were obviously increased, indicating that the macrophage inflammation model was successfully constructed. Compared with the model group, the viability of RAW264.7 cells in *Polygonum cuspidatum* polysaccharides 20, 40 and 80  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  groups was greatly decreased. In addition, the secretion levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 were reduced in the cell supernatant, and the expression levels of TLR4, MyD88 and NF- $\kappa$ Bp65 proteins were also reduced. **Conclusion** *Polygonum cuspidatum* polysaccharides can reduce the secretion of TNF- $\alpha$  and IL-6 in RAW264.7 cells induced by lipopolysaccharide, and the inhibition of NF- $\kappa$ B signaling pathway may be a mechanism for its anti-inflammatory effect.

**Key words:** *Polygonum cuspidatum* polysaccharide; response surface method; RAW264.7 cell; lipopolysaccharide; inflammatory factor; NF- $\kappa$ B signaling pathway

中药虎杖来自蓼科植物虎杖 (*Polygonum cuspidatum* Sieb.et Zucc.) 的干燥根及根茎, 其性平味苦, 归属肝、肺、胆经, 常用于祛风利湿、活血化瘀、止咳化痰, 是一种历史悠久的名贵药材<sup>[1]</sup>。虎杖中的成分十分丰富, 包括醌类、黄酮类、多糖类、酚类以及二苯乙烯类等物质<sup>[2]</sup>。多项相关研究发现虎杖多糖具有抗炎、抗血栓、抗肿瘤等药理作用<sup>[3]</sup>。从天然药材中提取的多糖常含有蛋白质杂质, 蛋白质的存在不仅会影响多糖的生理活性和结构, 还会导致多糖的药理活性发生变化, 如何有效地去除蛋白质对于多糖提取至关重要。Sevage 试剂法因具有适用广泛、成本较低、操作便捷等特点常被用于去除多糖溶液中游离蛋白质<sup>[4]</sup>, 其原理是向多糖溶液中加入有机试剂与蛋白质接触, 使蛋白质反应发生变性而沉淀, 再通过离心把蛋白质分离, 保留多糖。但是 Sevage 试剂法需要重复多次处理多糖样品, 所以多糖有可能随着蛋白质变性沉淀而产生损失。此外, 有机溶剂溶解变性蛋白质后黏度增大, 离心分离时会带走部分多糖, 产生损失<sup>[5]</sup>。所以探究合理的 Sevage 法去除蛋白质方案对于多糖提取至关重要。

巨噬细胞是免疫系统的重要组成部分, 其表面存在多种可与植物多糖结合的受体, 活化后分泌肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6 (IL-6) 等细胞因子, 以抵御外来刺激, 发挥免疫调节作用<sup>[6]</sup>。小鼠 RAW264.7 巨噬细胞能强力附着和

吞噬抗原, 常被用于构建体外炎症反应模型<sup>[7]</sup>。脂多糖 (LPS) 广泛存在于细菌细胞壁中, 当进入人体后会激活 TLR4 受体, 与巨噬细胞髓样分化因子 88 (MyD88) 结合后, 复合物进而与 IL-1 受体相关激酶 (IRAK1) 结合, 在 TNF 受体相关因子 6 (TRAF6) 存在下激活下游炎症相关信号通路例如核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 通路, 最终导致大量细胞炎性因子的合成, 如 IL-6、TNF- $\alpha$  等<sup>[8]</sup>。

本研究选用 Sevage 法对虎杖粗提多糖的游离蛋白进行处理, 然后设计单因素实验, 探究多糖保留率和蛋白质清除率在不同处理条件下的结果, 随后利用 Box-Behnken 响应面法优化虎杖粗多糖除蛋白工艺, 再利用 LPS 体外构建小鼠 RAW264.7 细胞炎症模型后, 加入不同浓度的虎杖多糖, 探索其产生的影响和作用机制, 为深入研究虎杖多糖的抗炎免疫功能提供相关基础。

## 1 材料

### 1.1 药材

药材虎杖来源于四川省阿坝藏族羌族自治州, 经辽宁中医药大学药学院康廷国教授鉴定为虎杖 (*P. cuspidatum* Sieb.et Zucc.), 存放于辽宁中医药大学中药资源教研室, 编号 HZSCABX-01。

### 1.2 细胞与试剂

考马斯亮蓝 G-250 (上海信裕生物工程有限公司); 葡萄糖对照品、牛血清蛋白对照品 (纯度分别为 99.7%、98%, 批号分别为 M11bv141284、



22133975, 上海联迈生物工程有限公司); CCK-8、TNF- $\alpha$ 、IL-6 ELISA 试剂盒 (广州奥瑞达生物技术有限公司); TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ Bp65 抗体 (爱博泰克生物技术有限公司); CCK-8 试剂盒 (碧云天生物技术有限公司), TNF- $\alpha$ 、IL-6 ELISA 试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司)。

### 1.3 仪器

UV-5200 紫外可见分光光度计 (上海精密仪器有限公司); CO<sub>2</sub> 细胞培养箱、多功能酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司); 等电聚焦多用途电泳仪 (北京六一生物科技有限公司); 全自动化学成像分析仪 (广州誉维生物科技仪器有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 虎杖多糖除蛋白工艺优化

**2.1.1 虎杖粗多糖提取** 称取干燥虎杖药材粉末 10 g, 用适量蒸馏水加热回流, 分别在 3、5.5、7.5 h 后取水提溶液, 药渣过滤, 混合 3 次水提溶液, 浓缩后加入适量 95% 乙醇进行醇沉, 24 h 后抽滤并干燥, 得虎杖粗多糖提取率约为 18.76%。

**2.1.2 苯酚硫酸法测定多糖含量** 精密称取 10 mg 葡萄糖对照品, 配制得到 0.1 mg·mL<sup>-1</sup> 葡萄糖溶液。分别量取 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 于七支试管中, 加蒸馏水至 2.0 mL, 得到 0、0.005、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 mg·mL<sup>-1</sup> 葡萄糖对照品溶液, 量取 5% 苯酚试剂 1.0 mL 和浓硫酸 5.0 mL 加入上述溶液中, 在沸水中持续加热 15 min。然后静置混合物使其在室温下冷却 20 min, 在波长为 490 nm 处测定吸光度值。利用公式 (1) 计算多糖的保留率。

多糖的保留率 (%) = 供试液除蛋白后多糖浓度 / 供试液除蛋白前多糖浓度 × 100% (1)

**2.1.3 Bradford 法测定蛋白质含量** 配制 0.1 mg·mL<sup>-1</sup> 牛血清蛋白的标准液, 精密量取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 牛血清蛋白液, 滴加 0.9% 氯化钠水溶液至 1 mL, 得到 0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1 mg·mL<sup>-1</sup> 牛血清蛋白对照品溶液, 向各个试管中滴加 5 mL 的 G-250 考马斯亮蓝染液, 随后混合使其均匀, 并静置试管 2 min 后在 595 nm 处测定其吸光度值。蛋白质清除率参照公式 (2) 计算。

蛋白质清除率 (%) = (供试液除蛋白前蛋白质浓度 - 供试液除蛋白后蛋白质浓度) / 供试液除蛋白前蛋白质浓度 × 100% (2)

**2.1.4 单因素实验设计** 选取 Sevage 试剂与供试液体积比 (V/V)、振摇强度 (档)、振摇时间 (min)、除蛋白次数这四个因素进行单因素实

验。其中振摇强度的依据是涡旋混合器的档位 (1 ~ 10 档位, 转速范围 300 ~ 3000 r·min<sup>-1</sup>) 设 Sevage 试剂与供试液的体积比为 1 : 6、1 : 5、1 : 4、1 : 3, 振摇强度为 2、4、6、8 档, 振摇时间为 10、12、14、16 min, 除蛋白次数为 4、6、8、10 次, 进行实验, 虎杖粗多糖溶液除蛋白后以 3000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 吸取上清液, 测定多糖和蛋白质含量。

**2.1.5 响应面实验设计** 使用软件 Design Expert 12 中 Box-Behnken 方案, 对 Sevage 试剂与供试液体积比、振摇强度、振摇时间、除蛋白次数设计响应面实验。设计因素及其所对应的水平编码见表 1。

表 1 Box-Behnken 设计水平与因素  
Tab 1 Level and factor for Box-Behnken design

水平	因素			
	体积比 (V/V)	振摇强度 / 档	振摇时间 / min	除蛋白次数 (次)
-1	1 : 6	4	12	4
0	1 : 5	6	14	5
1	1 : 4	8	16	6

### 2.2 虎杖多糖抗炎作用探究

**2.2.1 RAW264.7 细胞培养** 在 10% 胎牛血清和 1% 抗菌药物的 DEME 培养基中, 5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中 37 °C 下培养 RAW264.7 细胞, 每隔 2 ~ 3 d 换液一次, 并按 1 : 3 比例传代培养。

**2.2.2 虎杖多糖对 RAW264.7 细胞活力的影响** 将 RAW264.7 细胞密度调整为 5 × 10<sup>3</sup> 个·mL<sup>-1</sup>, 接种于 96 孔板中, 培养 18 h, 设 0、5、10、20、40、80、120 μg·mL<sup>-1</sup> 7 个质量浓度组, 每组设置 3 个复孔。正常组加入 200 μL 培养液, 给药组加入 200 μL 不同浓度的虎杖多糖细胞培养液, 继续培养 24 h, 更换孔内液体, 向每孔内加入完全培养基 180 μL 和 CCK-8 溶液 20 μL, 继续培养细胞 3 h, 在波长为 450 nm 处的吸光值进行检测, 采用酶标仪进行操作。

**2.2.3 实验分组** 在 96 孔板上接种按对数周期生长的 RAW264.7 细胞, 每孔加入 100 μL 密度为 7 × 10<sup>4</sup> 个·mL<sup>-1</sup> 的细胞液, 在 5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中 37 °C 下培养 24 h。待 RAW264.7 细胞贴壁后, 将 0 μg·L<sup>-1</sup> LPS 的细胞培养液添加至 RAW264.7 细胞中, 用作空白组。将含 100 μg·L<sup>-1</sup> LPS 的细胞培养液添加至 RAW264.7 细胞中, 作为模型组。在此基础上, 分别向模型组加入 20、40 和 80 μg·mL<sup>-1</sup> 的虎杖多糖细胞培养液, 作为给药组, 每组均设置 3 个复孔。

**2.2.4 炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平检测** 在 3000  $r \cdot \text{min}^{-1}$  条件下对各组细胞培养液持续离心 15 min, 收集上清液, 采用 ELISA 试剂盒检测样品中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的分泌水平。

**2.2.5 Western blot 法检测 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ Bp65 蛋白表达水平** 从各组细胞裂解液中提取总蛋白和核蛋白, 并采用 BCA 法对蛋白质含量进行测定。将样品与 5 倍浓度的上样缓冲液混合, 混匀后放入沸水中煮沸 10 min, 最后将其存放在  $-80^{\circ}\text{C}$  条件下。取 30  $\mu\text{g}$  煮沸后的蛋白样品, 使用 SDS-PAGE 电泳技术将其进行分离, 将分离后得到的蛋白质转移到聚丙烯酰胺膜上。然后, 用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h。漂洗之后与 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ Bp65 对应一抗在  $4^{\circ}\text{C}$  下孵育至第 2 日, 漂洗之后加入对应二抗在常温下孵育 2 h, 计算各蛋白的相对表达率。

**2.3 统计学分析**

采用  $\bar{x} \pm s$  表示实验数据, 并使用 SPSS 26.0 软件进行方差齐性检验和单因素方差分析, 当  $P < 0.05$  时差异具有统计学意义。

**3 结果**

**3.1 多糖及蛋白质含量的线性回归方程**

按照“2.1.2”“2.1.3”项下方法, 以葡萄糖作为对照, 得到多糖含量线性回归方程:  $y = 0.0378x + 0.0329$ ,  $R^2 = 0.9994$ ; 以牛血清白蛋白作为对照, 得到蛋白质含量线性回归方程:  $y = 0.1081x - 0.0092$ ,  $R^2 = 0.9993$ 。

**3.2 单因素实验结果分析**

根据图 1 所示: 多糖保留率在供试液中 Sevage 试剂的体积比变小时先增后减, 在 Sevage 试剂与供试液体积比为 1:4 时达到最大值; 蛋白质清除率则随着 Sevage 试剂与供试液体积比变小而逐渐提高。多糖保留率和蛋白质清除率都随着振摇档位的增大先上升后下降, 在 6 档时两者达到最大。多糖保留率随振摇时间增长呈递增趋势, 16 min 时达到峰值, 蛋白质清除率则持续降低。去除 8 次蛋白质后多糖保留率达到最低值, 蛋白质清除率则在进行除蛋白 6 次时达到最大值。进行 6 次除蛋白操作后, 多糖的保留程度较高而且蛋白质的清除率也达到最大值。综上, 在单因素条件下, Sevage 试剂与供试液体积比为 1:4, 12 min 振摇处理, 振摇强度 6 档, 进行除蛋白 6 次可获得多糖保留和蛋白质清除的最佳效果。

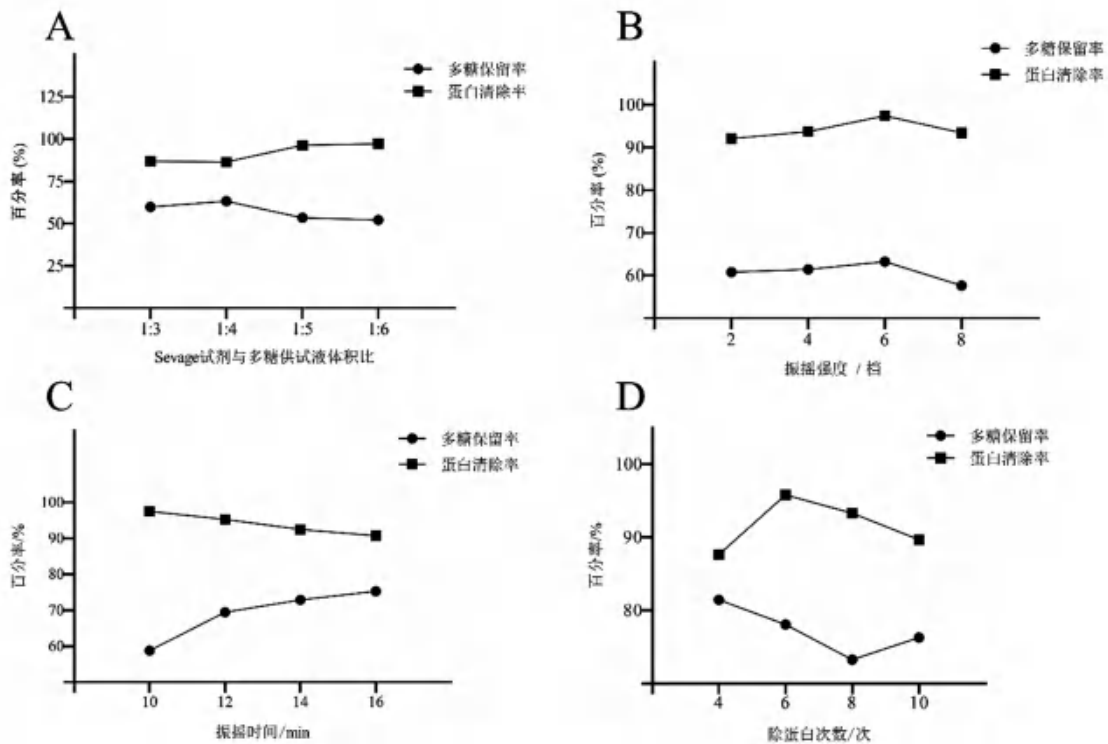


图 1 各单因素对虎杖多糖保留率及蛋白清除率的影响

Fig 1 Effect of single factors on polysaccharide retention and protein clearance of *Polygonu ncuspidatum* polysaccharide

**3.3 虎杖除蛋白响应面优化结果**

**3.3.1 Box-Behnken 方案设计与回归模型建立**

根据单因素实验结果, 并依照 Box-Behnken 方案

进行实验设计, 共设计 27 组实验。实验设计和结果见表 2。

表 2 响应面实验设计及结果

Tab 2 Response surface experimental design and results

组序	因素				多糖保留率/%	蛋白清除率/%
	体积比	振摇强度	振摇时间	除蛋白次数		
1	1	0	1	0	83.25	93.66
2	1	-1	0	0	85.33	90.52
3	-1	-1	0	0	90.08	87.24
4	0	-1	0	1	87.14	86.97
5	0	0	1	1	86.10	90.03
6	0	0	0	0	87.45	89.47
7	0	1	1	0	85.61	90.98
8	1	0	0	1	84.32	96.22
9	0	0	0	0	86.92	83.09
10	0	0	0	0	88.55	83.38
11	0	1	0	-1	90.33	87.44
12	0	0	-1	-1	89.64	86.84
13	1	0	-1	0	87.69	92.55
14	0	1	-1	0	86.99	88.56
15	-1	0	-1	0	91.11	82.77
16	0	0	0	0	89.03	85.32
17	1	0	0	-1	90.86	91.11
18	0	0	0	0	88.87	84.66
19	0	1	0	1	86.20	88.65
20	-1	0	0	-1	91.24	83.47
21	-1	1	0	0	89.77	83.44
22	0	0	-1	1	87.44	88.41
23	-1	0	1	0	92.17	84.25
24	0	0	1	-1	86.98	88.27
25	0	-1	-1	0	87.59	89.11
26	1	1	0	0	88.47	91.76
27	-1	0	0	1	88.71	83.98

利用 Design-Expert 12 软件进行分析, 得到针对多糖保留率 ( $Y_1$ ) 和蛋白质清除率 ( $Y_2$ ) 为响应值的二次多项式回归方程:

$$Y_1 = 88.16 - 1.93A - 0.2133B - 0.8425C - 1.89D + 0.8625AB - 1.38AC - AD - 0.0075BC + 0.57BD + 0.33CD + 0.5926A^2 - 0.1199B^2 - 0.9312C^2 + 0.5313D^2;$$

$$Y_2 = 85.18 + 4.22A + 0.3308B + 0.525C + 0.955D + 1.26AB - 0.0925AC + 1.15AD + 1.05BC - 0.0225BD + 0.0475CD + 1.73A^2 + 1.32B^2 + 1.95C^2 + 1.24D^2.$$

**3.3.2 响应面优化结果分析** 根据软件 Design-Expert 12 绘制蛋白质清除率和多糖保留率交互项的三维表面图 (见图 2), 可得蛋白质清除率随着 Seville 试剂与供试液体积比增大而显著增大, 多糖保留率则随着 Seville 试剂与供试液体积比增大、除蛋白次数增加而显著降低。从回归模型中

得到最优工艺参数包括 Seville 试剂与供试液体积比为 1 : 4、振摇强度为 7.99 档、振摇时间为 11.97 min 以及除蛋白次数为 3.99 次, 按照该工艺条件得出的多糖保留率为 91.83%, 蛋白质清除率为 93.71%。

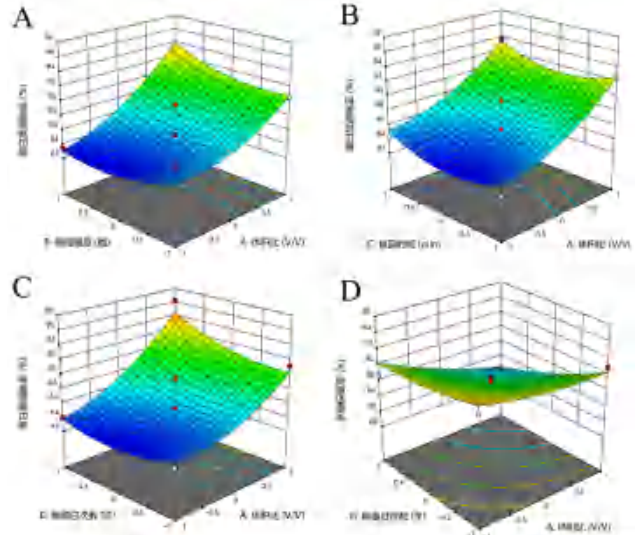


图 2 各因素交互作用对虎杖多糖蛋白质清除率和多糖保留率的响应面图

Fig 2 Response surface of the interaction of various factors on the protein clearance rate and polysaccharide retention rate of *Polygonum cuspidatum* polysaccharide

**3.3.3 回归模型验证实验** 参考响应面优化后的最优工艺参数, 即 Seville 试剂与供试液体积比为 1 : 4、振摇强度为 8 档、振摇时间为 12 min、除蛋白次数为 4 次, 进行 3 次平行实验并取平均值来验证回归模型。最终的结果显示, 多糖保留率为 90.23%, 蛋白质清除率为 91.22%, 与软件给出的优化结果相差较小, 说明所建立的回归模型具有一定的参考价值。

**3.4 虎杖多糖对 RAW264.7 细胞活力的影响**

与空白组相比较, 随着虎杖多糖质量浓度的增加, 细胞活力先升高后降低, 在  $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时最高 (见图 3), 在  $120 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时抑制细胞生长, 故在后续实验中选择 20、40、 $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  质量浓度构成低、中、高剂量组进行研究。

**3.5 虎杖多糖对 RAW264.7 细胞在 LPS 诱导下的细胞活力的影响**

与空白组比较, 模型组 RAW264.7 细胞活力显著提升; 与模型组相比, 虎杖多糖 20、40、 $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  组 RAW264.7 细胞活力显著降低, 且在  $20 \sim 80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  内虎杖多糖浓度越大对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞活力降低程度越显著 (见图 4)。



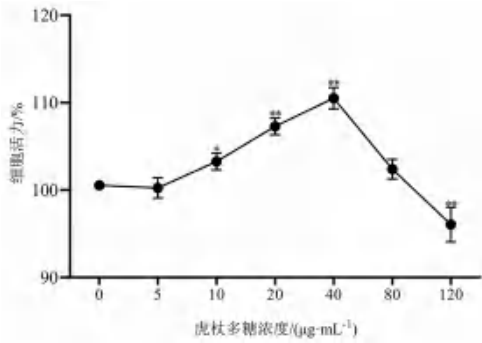


图3 虎杖多糖对 RAW264.7 细胞活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Fig 3 Effect of *Polygonum cuspidatum* polysaccharide on the viability of RAW264.7 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注: 与空白组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。  
Note: Compared with the blank group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

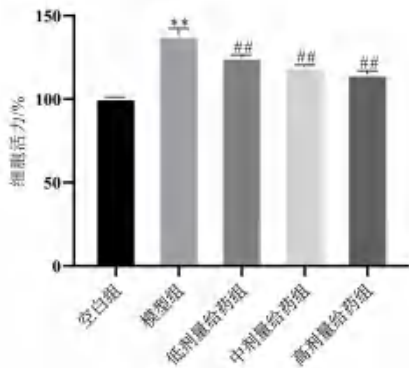


图4 虎杖多糖对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Fig 4 Effect of *Polygonum cuspidatum* polysaccharide on the viability of LPS-induced RAW264.7 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

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, ### $P < 0.01$ .

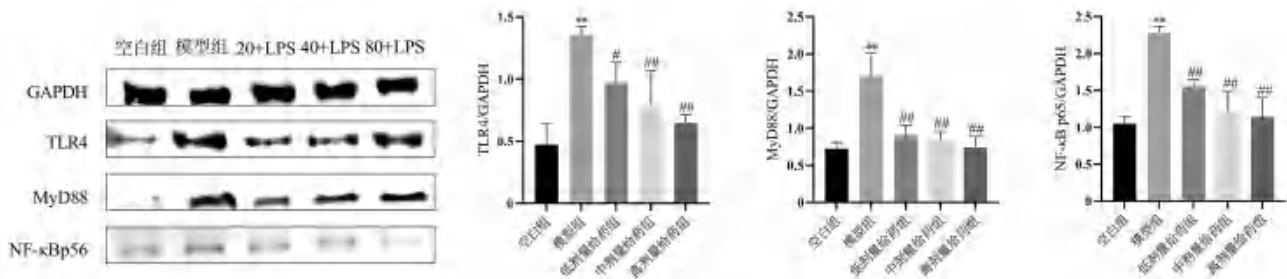


图6 TLR4、MyD88、NF-κBp65 蛋白在各组 RAW264.7 细胞中的表达  
Fig 6 Expression of TLR4, MyD88 and NF-κBp65 protein in RAW264.7 cells in each group

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, ### $P < 0.01$ .

## 4 讨论

### 4.1 虎杖多糖除蛋白优化

本实验结果表明, 多糖的保留率在 Seville 试剂与供试液体积比变小时呈现出先增后减的趋势, 这一现象可能是因为 Seville 试剂用量相对减少, 除杂效果降低, 导致更多杂质残留在溶液中, 影

### 3.6 虎杖多糖对炎症模型 RAW264.7 细胞中 TNF-α、IL-6 分泌水平的影响

与空白组比较, 模型组 RAW264.7 细胞 TNF-α、IL-6 分泌水平显著升高, 提示炎症模型构建成功。与模型组比较, 虎杖多糖 20、40、80 μg · mL<sup>-1</sup> 组 RAW264.7 细胞 TNF-α、IL-6 分泌水平显著降低 (见图 5), 提示虎杖多糖能不同程度地抑制 TNF-α、IL-6 的释放, 且在 20 ~ 80 μg · mL<sup>-1</sup> 内, 随着质量浓度的增加抑制程度增大。

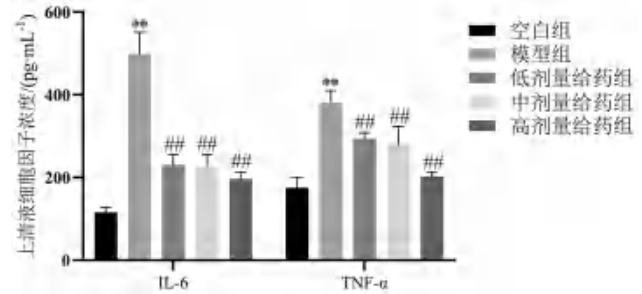


图5 TNF-α、IL-6 在各组 RAW264.7 细胞中的分泌水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )  
Fig 5 Secretion levels of TNF-α and IL-6 in RAW264.7 cells of each group ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

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, ### $P < 0.01$ .

### 3.7 虎杖多糖对炎症模型 RAW264.7 细胞中 TLR4、MyD88、NF-κBp65 蛋白表达的影响

与空白组比较, 模型组显著提升 TLR4、MyD88 和 NF-κBp65 蛋白表达水平; 与模型组比较, 虎杖多糖 20、40、80 μg · mL<sup>-1</sup> 组 TLR4、MyD88 和 NF-κBp65 蛋白表达水平显著降低 (见图 6)。

响多糖纯度。

本实验在探究蛋白去除工艺方面仍存在一定的不足。Seville 法除蛋白过程中温度及 pH 会影响蛋白质的稳定性和溶解度, 从而影响 Seville 法的除蛋白效果。此外, 实验中未对 Seville 试剂与供试液体积比、振摇挡位和时间进行详细的优化,

可能导致实验结果的偏差。

#### 4.2 虎杖多糖对 RAW264.7 细胞活力影响及抗炎作用

在实验中观察到虎杖多糖在  $0 \sim 80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  内对 RAW264.7 细胞的活力无明显抑制作用, 加入 LPS 能显著提高细胞活力, 而向模型组 RAW264.7 细胞加入 20、40、 $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  虎杖多糖后, 细胞活力比模型组显著下降。此现象的原因可能是: LPS 可以激活细胞的炎症反应, 导致细胞代谢活性的增加, LPS 处理后的 RAW264.7 细胞在炎症反应的刺激下活力增加; 加入虎杖多糖后由于虎杖多糖与 LPS 之间存在相互作用, 虎杖多糖可能与 LPS 竞争细胞受体结合位点, 从而减弱 LPS 对细胞的刺激作用, 导致细胞活力下降。

巨噬细胞是机体重要的固有免疫细胞, 具有抗原呈递性, 能够通过激活免疫系统, 释放细胞因子、脂类介质以及活性氧等一系列炎症介质, 引发机体炎症反应<sup>[9]</sup>。在 LPS 的刺激下, 这些激活的巨噬细胞会分泌大量的炎症介质和促炎因子, 如 COX-2、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  等<sup>[10]</sup>。IL-6 主要由 T 细胞和巨噬细胞分泌, 在损伤和感染后能迅速合成并激活急性免疫应答。目前发现在多种与炎症相关的疾病中 IL-6 水平明显升高, 因此 IL-6 水平常作为抗炎效果的检测指标<sup>[11]</sup>。TNF- $\alpha$  主要由巨噬细胞分泌, 在炎症反应早期出现, 其分泌水平能够直接反映出机体炎症的严重程度, 被视作经典的炎症指标<sup>[12]</sup>。本实验结果显示, LPS 能够诱导 RAW264.7 细胞炎症因子的分泌增多, 而虎杖多糖能够降低 LPS 诱导的 TNF- $\alpha$ 、IL-6 分泌, 结果表明虎杖多糖能抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症。

在 LPS 对 RAW264.7 细胞的激活过程中, LPS 被 LPS 结合蛋白转运到细胞表面与膜 mCD14 结合形成三联复合物, 并在 MD-2 的帮助下与 TLR4 结合并激活 TLR4, 将信号传入胞内, 激活 MyD88, 进而影响下游 NF- $\kappa$ B、MAPK 信号通路<sup>[13]</sup>。本实验结果显示, LPS 能上调 RAW264.7 细胞 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ Bp65 蛋白表达, 而虎杖多糖能够下调 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ Bp65 蛋白的表达, 由此

可见, 虎杖多糖对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症反应的抑制作用与调控 NF- $\kappa$ B 信号通路有关。

综上所述, 本实验初步探究了虎杖多糖中 Sevage 法蛋白去除工艺的优化及多糖的抗炎作用, 并发现虎杖多糖在细胞水平上具有显著的抗炎作用。但需进一步优化实验条件和扩大研究范围, 以期为虎杖多糖的临床应用和开发提供更为可靠的依据。

#### 参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 217.
- [2] 张云婷, 黄晓, 陈运中, 等. 虎杖主要化学成分及其生物合成机制研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45 (18): 4364-4372.
- [3] 樊慧婷, 丁世兰, 林洪生. 中药虎杖的药理研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38 (15): 2545-2548.
- [4] 何美佳, 刘晓, 唐翠, 等. 多糖脱蛋白方法的研究进展 [J]. 中国海洋药物, 2019, 38 (3): 82-86.
- [5] 王珊, 黄胜阳. 植物多糖提取液脱蛋白方法的研究进展 [J]. 食品科技, 2012, 37 (9): 188-191.
- [6] Schepetkin IA, Quinn MT. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential [J]. Int Immunopharmacol, 2006, 6 (3): 317-333.
- [7] 刘莉园, 张钊, 葛乃嘉, 等. 草苈蓉多糖对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症反应的影响 [J]. 中国药理学杂志, 2021, 56 (18): 1479-1485.
- [8] Raetz CR, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins [J]. Annu Rev Biochem, 2002, 71: 635-700.
- [9] Oh GS, Pae HO, Lee BS, et al. Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor-kappaB via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide [J]. Free Radic Biol Med, 2006, 41 (1): 106-119.
- [10] Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family [J]. Annu Rev Immunol, 2009, 27: 519-550.
- [11] Nishimoto N. Interleukin-6 as a therapeutic target in candidate inflammatory diseases [J]. Clin Pharmacol Ther, 2010, 87 (4): 483-487.
- [12] Anderson GM, Nakada MT, DeWitte M. Tumor necrosis factor-alpha in the pathogenesis and treatment of cancer [J]. Curr Opin Pharmacol, 2004, 4 (4): 314-320.
- [13] 张晓音, 吴旻, 李雨萌, 等. LPS 的效应及其机理研究进展 [J]. 动物医学进展, 2015, 36 (12): 133-136.

(收稿日期: 2023-11-07; 修回日期: 2023-12-25)

## 高剪切工艺制备阿立哌唑长效注射混悬剂

朱思琪, 刘坤鹏, 邹佳, 李海燕, 王丹\*, 王震\* (浙江圣兆药物科技股份有限公司, 杭州 310051)

**摘要:** 目的 优化阿立哌唑长效注射混悬剂的制备工艺。方法 采用高剪切工艺制备阿立哌唑长效注射混悬剂, 考察定转子类型、线速度、定转子间距、助悬剂浓度、药物浓度、料液温度对药物粒径的影响, 并与球磨法制备的样品对比颗粒形貌、体外释放、体内缓释效果。结果 最优制备工艺为: 以胶体磨模块作为剪切头, 药物浓度为 13%, 羧甲基纤维素钠浓度为 0.52%, 辅料溶液 pH 为 5.0 ~ 6.0, 转子线速度为  $35 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ , 定转子间距为  $100 \mu\text{m}$ , 料液温度在  $48 \sim 65 \text{ }^\circ\text{C}$ , 得到阿立哌唑长效注射混悬剂的平均粒径为  $(3.83 \pm 0.05) \mu\text{m}$ 。与球磨法制备的样品相比, 具有更好的分散性, 药物颗粒更为圆滑, 以及具有更为优异的体内外缓释效果。结论 通过高剪切工艺制备阿立哌唑长效注射混悬剂, 制备工艺简便, 易于放大生产, 并实现了较好的缓释效果, 对其他药物的开发具有一定的参考价值。

**关键词:** 阿立哌唑; 长效注射混悬剂; 高剪切工艺; 体外释放; 体内释药

中图分类号: R944.9

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)08-2006-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.007

## Preparation of aripiprazole long-acting injectable suspension by high-shear rotor-stator wet milling

ZHU Si-qi, LIU Kun-peng, ZOU Jia, LI Hai-yan, WANG Dan\*, WANG Zhen\* (Zhejiang Sundoc Pharmaceutical Science and Technology Co., Ltd., Hangzhou 310051)

**Abstract: Objective** To optimize the preparation of aripiprazole (APZ) long-acting injectable suspension (LAIs). **Methods** APZ LAIs were prepared by high-shear rotor-stator wet milling. Effect of types of the rotor-stator, rotation tip speed, gaps of the rotor-stator, concentrations of suspension agent, drug concentrations and material temperature on the particle size were determined. APZ LAIs were characterized by surface morphology, in vitro release and the sustained release effect in vivo, and compared with samples prepared by wet media milling. **Results** The optimal conditions for the preparation of APZ LAIs included module colloid mill as a shear tool, the drug concentration at 13%, the carboxymethylcellulose sodium concentration at 0.52%, the pH of excipients solution at 5.0 ~ 6.0, the rotation tip speed at  $35 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ , the gap of the rotor-stator at  $100 \mu\text{m}$ , and the material temperature at  $48 \sim 65 \text{ }^\circ\text{C}$ . The obtained average particle size of APZ LAIs was  $(3.83 \pm 0.05) \mu\text{m}$ . Compared with the samples prepared by wet media milling, APZ LAIs had better dispersion without aggregation, with smoother surface and shape, and more excellent sustained release effect in vitro and vivo. **Conclusion** The preparation of APZ LAIs is simple and convenient, feasible for mass production. This study provides a reference for the development of other drugs.

**Key words:** aripiprazole; long-acting injectable suspension; high-shear rotor-stator wet milling; in vitro drug release; in vivo drug release

精神分裂症是一种以幻觉、幻想、情感失调和认知功能障碍为主要特征的精神疾病, 具有较高的遗传性, 是一种最常见的精神病性障碍<sup>[1]</sup>。由于精

神分裂症往往需要长期治疗, 许多患者通过口服抗精神病药物以稳定症状。然而, 多数患者都难以坚持每日的口服治疗方案, 即存在依从性问题, 常

作者简介: 朱思琪, 女, 工程师, 主要从事长效和靶向制剂研究, email: zhu\_siqi@sundoc.com \*通信作者: 王震, 男, 工程师, 主要从事长效和靶向制剂研究, email: wang\_zhen@sundoc.com; 王丹, 女, 工程师, 主要从事长效和靶向制剂研究, email: wang\_dan@sundoc.com



常会导致症状恶化、治疗反应不佳、频繁复发和再次入院，并且无法得益于康复治疗和心理社会治疗<sup>[2]</sup>。这也是精神疾病治疗中最困难的问题。

阿立哌唑 (aripiprazole, APZ) 是一种新型的非典型抗精神分裂症药物<sup>[3]</sup>，从 2002 年起，美国食品药品监督管理局 (FDA) 陆续批准了多种剂型的阿立哌唑，包括普通片剂、口服溶液、口腔崩解片、注射剂、注射用混悬剂等。阿立哌唑是水难溶性药物，对于难溶性药物，可通过一定的制备方法，将其制成长效制剂以实现药物在局部注射部位缓慢释放<sup>[4]</sup>。长效制剂相比于口服制剂的一个重要优势在于极大地提高治疗依从性，通过减少用药次数，延长单次给药后药物作用时间，可有效控制病情、预防复发<sup>[5-6]</sup>。目前，阿立哌唑长效制剂除了已上市的注射用混悬剂 (商品名分别为 Abilify Maintena 和 Arista) 外，还包括公开资料中公布的微球制剂<sup>[7]</sup>。混悬剂是药物颗粒分散于水性介质中，相比于微球制剂，在制备过程中无需添加有机溶剂如二氯甲烷，不存在有机溶剂残留风险；此外，混悬剂的制备工艺步骤相对更简单，工艺更为可控。

阿立哌唑长效注射混悬剂 (APZ LAIs) 的制备方法主要包括球磨法及多工艺联用法。球磨法是通过研磨介质与药物颗粒及腔体碰撞使颗粒减小，但该工艺存在药物大颗粒可能会穿过研磨介质，无法充分被研磨的问题，及可能的介质污染<sup>[8]</sup>。多工艺联用法包括高剪切高速搅拌机和高压均质机联用<sup>[9]</sup>，球磨机和高压均质机联用<sup>[10]</sup>，高剪切均质器与球磨机联用<sup>[11]</sup>等，但均存在工艺烦琐、不利于产业化生产的问题。

为了解决上述工艺存在的问题，本研究探索了采用特定工艺参数定转子高剪切工艺，直接获得阿立哌唑混悬液的可行性。该工艺通过转子高速旋转产生强大的离心力，形成强负压区，将物料吸入工作腔，在定转子间距内受到剪切、离心挤压、撞击、湍流、强烈摩擦力等综合作用，使药物颗粒粒度减小<sup>[12-13]</sup>。该方法操作简单、设备生产成本低、易于产业化生产。本研究通过单因素考察优化处方工艺参数，并与球磨法制备的样品对比颗粒形貌、体内外释药特性，报道如下。

## 1 材料

### 1.1 试药

阿立哌唑一水合物 (印度 MSN 公司，批号：HA0020618，纯度：100.3%)，羧甲基纤维素钠 (美国亚什兰公司，型号：7L2P PH BET，批号：0551901001)，甘露醇 (法国罗盖特公司)，磷酸二氢钠一水合物 (湖南九典制药股份有限公司)，

氢氧化钠 (湖南尔康制药有限公司)，十二烷基硫酸钠 (安徽山河药用辅料有限公司)，其余试剂均为分析纯或色谱纯，水为自制纯化水。

### 1.2 仪器

ECM-AP 05 型研磨机 (华尔宝机械有限公司)，IKA 2000/4 型高剪切机、EURO-ST60D 型顶置式搅拌 (德国 IKA 公司)，S8 型 pH 计 (上海梅特勒-托利多仪器有限公司)，XT5218-B12-R25C 型低温循环水浴 (杭州雪中炭恒温技术有限公司)，LYO-0.5 型真空冷冻干燥机 (上海东富龙科技股份有限公司)，马尔文 3000 型激光粒度分析仪 (英国马尔文仪器有限公司)，RC8MD 溶出仪 (天津市天大天发科技有限公司)，UV-1900i 型紫外可见分光光度计 (日本岛津)，NovaNano450 型扫描电镜 (美国 Thermo 公司)，Allegra V-15R 型离心机 (美国贝克曼库尔特)，5810R 型高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司)，API4000 三重四极杆液相质谱仪 (美国 AB Sciex 公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 APZ LAIs 的制备

称取 13 g 羧甲基纤维素钠，43.3 g 甘露醇和适量磷酸二氢钠一水合物溶于 2117 g 纯水中，得到 pH 为 5.0 ~ 6.0 的辅料溶液。将 325 g 原料药阿立哌唑一水合物搅拌分散于辅料溶液中，形成预混悬液。将预混悬液用 IKA 高剪切机 (胶体磨剪切头，型号 MK2000)，以线速度  $35 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ ，定转子间距 100  $\mu\text{m}$  进行连续式循环剪切，流量  $4.5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ ，剪切过程中通过夹套水浴控制料液温度在 48 ~ 65  $^{\circ}\text{C}$ ，获得次混悬液。再用适量氢氧化钠调节 pH 至 6.5 ~ 7.5，获得终混悬液，最后进行冷冻干燥，得到最终冻干成品。

### 2.2 APZ LAIs 粒径的测定

采用马尔文激光粒度仪测定粒径，取适量 APZ LAIs 样品于少量纯水中，摇匀分散。设定折射率 1.62，颗粒吸收率 0.01，搅拌速度 2000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ ，测定时间红光 20 s、蓝光 20 s，平行测定 3 次，取平均值。

### 2.3 APZ LAIs 处方工艺的确定

采用单因素实验设计，以平均粒径 ( $D_{50}$ )、跨距为评价指标，分别考察定转子类型、线速度、定转子间距、助悬剂浓度、药物浓度、料液温度对粒径的影响，筛选出较优的处方工艺参数。

**2.3.1 定转子类型的考察** IKA 高剪切机有多种定转子模块可选，选择胶体磨剪切头 (型号 MK2000)、锥体磨剪切头 (型号 MKO2000)、三层定转子剪切头 (< 6F, 8SF, 8SF >; 型号 DR) 3 种不同类型的剪切头进行考察。药物浓度为 18%，羧甲基纤维素钠浓度为 0.72%，辅料溶

液 pH 为 6.0, 剪切头的线速度均为  $35 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ , 定转子间距为  $100 \mu\text{m}$  (除型号 DR 定转子间距不可调, 为  $200 \mu\text{m}$ ), 剪切时间为 3 h, 控制剪切过程中料液温度在  $48 \text{ }^\circ\text{C}$ 。在剪切后的次混悬液中加入适量氢氧化钠使 pH 至 6.5 ~ 7.5, 获得终混悬液。测定各终混悬液粒径, 结果见表 1。使用 3 种不同定转子进行剪切, 均可获得  $D_{50}$  在 3 ~ 6  $\mu\text{m}$  的混悬液。在相同剪切时间内, 使用胶体磨剪切头时得到的混悬液粒径最小, 故优选胶体磨剪切头。

表 1 定转子类型对 APZ LAIs 粒径的影响 ( $n = 3$ )Tab 1 Effect of rotor-stator type on the particle size of APZ LAIs ( $n = 3$ )

定转子类型	$D_{50}/\mu\text{m}$	跨距
MK2000	$3.98 \pm 0.02$	$2.02 \pm 0.04$
MKO2000	$5.52 \pm 0.03$	$2.19 \pm 0.04$
DR	$5.74 \pm 0.02$	$2.25 \pm 0.05$

**2.3.2 线速度的考察** 根据 IKA 高剪切机的线速度范围, 采用胶体磨剪切头, 考察不同线速度 ( $12$ 、 $24$ 、 $35 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ ) 对粒径的影响。药物浓度为 13%, 羧甲基纤维素钠浓度为 0.52%, 辅料溶液 pH 为 6.0, 定转子间距为  $100 \mu\text{m}$ , 剪切时间为 3 h, 控制剪切过程中料液温度在  $48 \text{ }^\circ\text{C}$ 。在剪切后的次混悬液中加入适量氢氧化钠使 pH 至 6.5 ~ 7.5, 获得终混悬液。测定各终混悬液粒径, 结果见表 2。对于定转子高剪切设备, 线速度和定转子间距之间的关系可用剪切系数表示, 计算公式为: 剪切系数 = 线速度 / 定转子间距<sup>[14]</sup>。可通过调节线速度和定转子间距, 使剪切系数在一定范围内, 以得到目标粒径的样品。线速度为  $12 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  时, 剪切系数较小为  $1.2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ , 难以使  $D_{50}$  降低至  $6 \mu\text{m}$  以下。在相同剪切时间内, 线速度为  $35 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$  时, 得到的混悬液粒径最小, 故优选较高的线速度  $35 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

表 2 线速度对 APZ LAIs 粒径的影响 ( $n = 3$ )Tab 2 Effect of rotor tip speed on the particle size of APZ LAIs ( $n = 3$ )

线速度 / ( $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$D_{50}/\mu\text{m}$	跨距
12	$7.21 \pm 0.04$	$2.81 \pm 0.06$
24	$4.40 \pm 0.02$	$2.05 \pm 0.05$
35	$3.91 \pm 0.03$	$1.96 \pm 0.05$

**2.3.3 定转子间距的考察** 胶体磨剪切头的定转子间距可连续调整, 以获得最佳的剪切效果。考察定转子间距为 150、120、 $100 \mu\text{m}$  时对混悬液粒径的影响。药物浓度为 30%, 羧甲基纤维素钠浓度为 1.2%, 辅料溶液 pH 为 6.0, 胶体磨剪切头的线速度为  $35 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ , 剪切时间为 3 h, 控制

剪切过程中料液温度在  $48 \text{ }^\circ\text{C}$ 。在剪切后的次混悬液中加入适量氢氧化钠使 pH 至 6.5 ~ 7.5, 获得终混悬液。测定各终混悬液粒径, 结果见表 3。固定线速度, 定转子间距越小时, 得到的混悬液粒径最小, 故优选定转子间距为  $100 \mu\text{m}$ 。

表 3 定转子间距对 APZ LAIs 粒径的影响 ( $n = 3$ )Tab 3 Effect of rotor-stator gap on the particle size of APZ LAIs ( $n = 3$ )

定转子间距 / $\mu\text{m}$	$D_{50}/\mu\text{m}$	跨距
150	$4.55 \pm 0.02$	$2.06 \pm 0.04$
120	$4.02 \pm 0.03$	$2.03 \pm 0.05$
100	$3.87 \pm 0.03$	$1.98 \pm 0.04$

**2.3.4 助悬剂浓度的考察** 以羧甲基纤维素钠为助悬剂, 药物浓度为 30%, 辅料溶液 pH 为 6.0, 胶体磨剪切头的线速度为  $35 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ , 定转子间距为  $100 \mu\text{m}$ , 剪切时间为 3 h, 控制剪切过程中料液温度在  $48 \text{ }^\circ\text{C}$ 。分别配制羧甲基纤维素钠浓度为 0.24%、0.72%、1.2% (即原料药与羧甲基纤维素钠重量比分别为 125、41.7、25 倍) 的预混悬液进行制备。在剪切后的次混悬液中加入适量氢氧化钠使 pH 至 6.5 ~ 7.5, 获得终混悬液。测定各终混悬液粒径, 结果见表 4。不同羧甲基纤维素钠用量下的  $D_{50}$  相差不大。但考虑到较高浓度的羧甲基纤维素钠更有利于减缓颗粒沉降速度, 故优选原料药与羧甲基纤维素钠重量比为 25 倍。

表 4 助悬剂浓度对 APZ LAIs 粒径的影响 ( $n = 3$ )Tab 4 Effect of suspending agent concentration on the particle size of APZ LAIs ( $n = 3$ )

羧甲基纤维素钠浓度 / %	$D_{50}/\mu\text{m}$	跨距
0.24	$3.90 \pm 0.04$	$1.99 \pm 0.05$
0.72	$3.95 \pm 0.03$	$1.98 \pm 0.06$
1.2	$3.87 \pm 0.03$	$1.98 \pm 0.04$

**2.3.5 药物浓度的考察** 固定原料药与羧甲基纤维素钠重量比为 25 倍, 辅料溶液 pH 为 6.0, 胶体磨剪切头的线速度为  $35 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ , 定转子间距  $100 \mu\text{m}$ , 剪切时间为 3 h, 控制剪切过程中料液温度在  $48 \text{ }^\circ\text{C}$ 。分别配制药浓度为 6%、13%、18%、30% 的预混悬液进行制备。在剪切后的次混悬液中加入适量氢氧化钠使 pH 至 6.5 ~ 7.5, 获得终混悬液。测定各终混悬液粒径, 结果见表 5。药物浓度为 6% 时,  $D_{50}$  稍大, 推测是因为低浓度下颗粒被剪切的概率相对更小; 药物浓度为 13%、18%、30% 时,  $D_{50}$  相差不大。从成品黏度最为便利的通针性考虑, 优选药物浓度为 13%。

**2.3.6 料液温度的考察** 固定药物浓度为 13%, 羧甲基纤维素钠浓度为 0.52%, 辅料溶液 pH 至 5.0 ~ 6.0, 胶体磨剪切头的线速度为  $35 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ ,



表 5 药物浓度对 APZ LAIs 粒径的影响 ( $n = 3$ )

Tab 5 Effect of drug concentration on the particle size of APZ LAIs

$(n = 3)$		
药物浓度 /%	$D_{50} / \mu\text{m}$	跨距
6	$4.12 \pm 0.04$	$2.00 \pm 0.06$
13	$3.91 \pm 0.03$	$1.96 \pm 0.05$
18	$3.98 \pm 0.02$	$2.02 \pm 0.04$
30	$3.87 \pm 0.03$	$1.98 \pm 0.04$

定转子间距为  $100 \mu\text{m}$ ，剪切时间为 3 h，分别控制剪切过程中料液温度在 2、30、48、55、65 °C。在剪切后的次混悬液中加入适量氢氧化钠使 pH 至 6.5 ~ 7.5，获得终混悬液。测定各终混悬液粒径，结果见表 6。

表 6 料液温度对 APZ LAIs 粒径的影响 ( $n = 3$ )

Tab 6 Effect of material temperature on the particle size of APZ LAIs ( $n = 3$ )

$(n = 3)$		
料液温度 /°C	$D_{50} / \mu\text{m}$	跨距
2	$4.07 \pm 0.03$	$2.28 \pm 0.05$
30	$3.84 \pm 0.03$	$2.21 \pm 0.04$
48	$3.96 \pm 0.04$	$2.01 \pm 0.04$
55	$4.01 \pm 0.04$	$1.97 \pm 0.04$
65	$3.94 \pm 0.02$	$1.94 \pm 0.06$

当料液温度在 2 ~ 65 °C，均可制备获得  $D_{50}$  在 3 ~ 6  $\mu\text{m}$  的混悬液，在此温度范围内增高温度制备时，可获得更窄粒度分布（跨距值减小）的趋势。理论上，当物料温度越高，布朗运动越剧烈，颗粒越易聚集。但结果表明，当控制辅料溶液的 pH 在 5.0 ~ 6.0 内，不同高低温制备时均可实现目标粒径，均不易出现团聚。

较高温度（48、55、65 °C）下剪切时呈现窄粒径分布，说明小颗粒占比极小，可有效避免小颗粒聚集。较低温度（2、30 °C）下呈现相对稍宽的粒径分布，说明存在占比相对较多的小颗粒。48 °C 和 65 °C 下跨距值相近，选择料液温度在 48 ~ 65 °C。

## 2.4 APZ LAIs 处方工艺的验证

根据单因素实验结果，APZ LAIs 制备的优选工艺参数为：药物浓度 13%，羧甲基纤维素钠浓度 0.52%，辅料溶液 pH 为 5.0 ~ 6.0，胶体磨剪切头的线速度为  $35 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ ，定转子间距为  $100 \mu\text{m}$ ，剪切过程中料液温度在 48 ~ 65 °C。按照该工艺参数平行制备 3 批 APZ LAIs，测得粒径数据见表 7。不同批间药物粒径相差不大，重复性好。

表 7 处方工艺验证实验结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Tab 7 Prescription and process validation test ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

批次	$D_{50} / \mu\text{m}$	跨距
1	$3.82 \pm 0.03$	$1.94 \pm 0.04$
2	$3.79 \pm 0.04$	$1.93 \pm 0.05$
3	$3.88 \pm 0.03$	$1.96 \pm 0.04$
平均值	$3.83 \pm 0.05$	$1.94 \pm 0.04$

## 2.5 球磨法制备 APZ LAIs

参考专利<sup>[8]</sup>，采用球磨法制备 APZ LAIs。将 13 g 羧甲基纤维素钠（浓度为 0.52%），43.3 g 甘露醇和适量磷酸二氢钠一水合物溶于 2117 g 纯水中，加入适量氢氧化钠调节 pH 至 6.5 ~ 7.5；再加入 325 g 阿立哌唑一水合物（药物浓度为 13%）形成预混悬液。将预混悬液用球磨机进行研磨，研磨介质直径为 0.5 mm，筛网孔径为 0.2 mm，研磨转速为  $1100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ，通过夹套水浴控制物料温度在 2 ~ 30 °C，进行循环研磨至目标粒径，测得  $D_{50}$  为  $(3.78 \pm 0.03) \mu\text{m}$ ，跨距为  $(2.54 \pm 0.06)$ 。与“2.3.6”项下高剪切法制备的样品相比，跨距更大。

## 2.6 冷冻干燥

将“2.5”及“2.3.6”项下样品灌装于 10 mL 西林瓶中，灌装量为 3.8 mL，按表 8 冻干工艺进行冷冻干燥。取冻干品加无菌注射用水混合调配成混悬水溶液后，测定复溶后样品粒径，结果见表 9。

表 8 APZ LAIs 冻干工艺参数

Tab 8 Freeze-drying process parameters of APZ LAIs

步骤	工艺参数			
	设定温度 /°C	设定时间 /min	维持时间 /h	控制真空 /mbar
预冻	-45	100	5	常压
一次升华	-12	150	40	0.2

表 9 APZ LAIs 样品冻干前后粒径对比 ( $n = 3$ )

Tab 9 Particle size of APZ LAIs before and after the freeze-drying ( $n = 3$ )

样品	粒径		
	冻干前	冻干后	冻干前后
	$D_{50} / \mu\text{m}$	$D_{50} / \mu\text{m}$	$D_{50}$ 差值 / $\mu\text{m}$
球磨法制备的样品	$3.78 \pm 0.03$	$3.11 \pm 0.04$	$0.67 \pm 0.06$
高剪切法 30 °C 制备的样品	$3.84 \pm 0.03$	$3.75 \pm 0.04$	$0.09 \pm 0.03$

球磨法制备的样品冻干后  $D_{50}$  存在较明显的下降。由“2.3.6”项下结果可知，高剪切法较高温度制备获得窄粒径分布的小颗粒少，而较低温度制备时具有占比相对较多的小颗粒，因此选取较低温度制备的样品进行比对。高剪切法 30 °C 制备的样品冻干后  $D_{50}$  无明显降低。推测可能是球磨法产生了更多的小颗粒，因小颗粒具有更高的表面能，存在部分小颗粒团聚现象，其中的聚集颗粒经冻干过程分散，造成冻干前后  $D_{50}$  差值较大。而高剪切法通过料液在定转子间距内受到剪切、离心挤压、撞击、湍流、强烈摩擦力等作用使颗粒降低至目标粒度，同时能有效抑制小颗粒的团聚，冻干前后  $D_{50}$  基本一致。

## 2.7 体外释放度

选取“2.5”及“2.3.6”项下样品，按照《中国药典》2020 年版四部通则 0931 第二法关于释放度的测定<sup>[15]</sup>，使用桨法进行释放度测定。以 900 mL 0.25% 十二烷基硫酸钠溶液为溶出介质，转速设为  $50 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ，水浴温度为  $(37 \pm 0.5) \text{ } ^\circ\text{C}$ ，分别于



5、15、30、60、120、180、300 min 取样 10 mL，并于取样后立即补充同体积同温度溶出介质。使用紫外可见分光光度计在 252 nm 波长处测定吸光度，计算各样品累计释放度，绘制体外释放曲线，结果见图 1。根据体外释放结果可知，相比于球磨法，高剪切低温法释放略有改善，高温制备的样品体外释放显著更平缓。

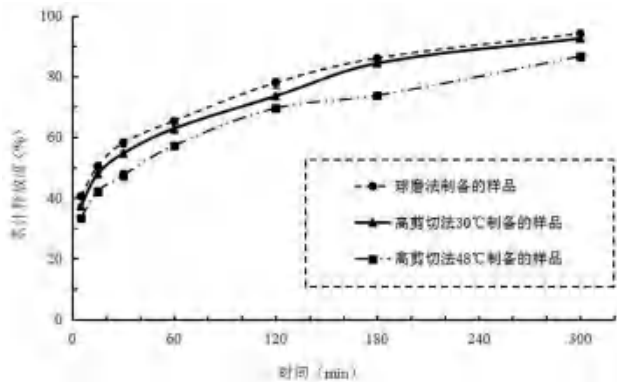


图 1 不同制备工艺样品的体外药物释放曲线 ( $n = 3$ )

Fig 1 In vitro drug release curve of AZP LAIs with different preparation methods ( $n = 3$ )

## 2.8 扫描电镜 (SEM) 表征形貌

选取原料药、“2.5”项下及“2.3.6”项下样品进行颗粒表面形貌表征。将混悬液摇匀，吸取 1 mL 于离心管中，离心后弃去上清液，加入 1 mL 纯水重悬后再次离心，并弃去上清液，最后用 10 mL 纯水重悬分散，取 1 滴于 SEM 载物台上，自然挥干后喷金；另取少量原料药粉末置 SEM 载物台上，均匀摊开后喷金，观察药物颗粒形态，结果如图 2 所示。

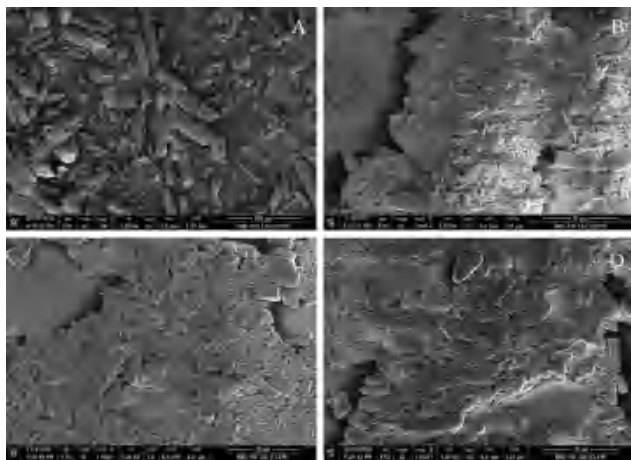


图 2 原料药和不同制备工艺 APZ LAIs 样品的扫描电镜图

Fig 2 SEM images of active pharmaceutical ingredient and APZ LAIs with different preparation methods

A. 原料药 (active pharmaceutical ingredient); B. 球磨法制备的样品 (samples prepared by wet media milling); C. 高剪切法 30℃制备的样品 (samples prepared by high-shear rotor-stator wet milling at 30℃); D. 高剪切法 48℃制备的样品 (samples prepared by high-shear rotor-stator wet milling at 48℃)

从电镜图片中可以发现，原料药多呈长条棒状，棱角较尖锐。球磨法获得的颗粒保持了原料药的颗粒形态，即颗粒的尖锐部位较多，大部分颗粒经研磨后多呈平面片状结构。而高剪切法较低温度 (30℃) 下制备的颗粒形态较球磨法轻微改变，颗粒表面略微圆滑，尤其观察到大颗粒表面趋于圆滑；高剪切法较高温度 (48℃) 下制备的样品显著改变了阿立哌唑晶体颗粒形态，不同于原有的原料药形貌，获得的颗粒多呈块状，表面圆滑。

结合体外释放结果，发现改变颗粒形态更有利于药物的平缓释放。推测是因设备的原理不同，颗粒所受的作用力不同，球磨法更多是通过颗粒和研磨介质之间的碰撞使粒度下降，其不具备高的剪切力和空化作用，而这两个作用对颗粒形态和解团聚作用显著。

## 2.9 体内释药水平

采用 20 只健康的雄性 SD 大鼠 [动物许可证号 SYXK (苏) 2021-0019]，饲养温度维持在 20 ~ 26℃，相对湿度为 50% ~ 70%，自由进食和饮水，正常喂养 5 d。给药前禁食 12 h，给药后 4 h 进食，自由饮水。

大鼠随机分为两组，每组 10 只，选取“2.5”及“2.3.6”项下样品，分别于大鼠后肢肌内注射给药，给药剂量为 50 mg · kg<sup>-1</sup>，在给药后 1 h、6 h、1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d、7 d、8 d、9 d、14 d、21 d、28 d、35 d、42 d 经大鼠颈静脉采血 0.5 mL，置经肝素化的离心管中，2000 g 离心 10 min 后取上层血浆至空白离心管中，于 -80℃ 冷冻保存。

取 40 μL 上述血浆于离心管内，加入 200 μL 乙腈沉淀液 (含内标 D8-阿立哌唑 150 ng · mL<sup>-1</sup>) 涡旋 5 min 后 3220 g 离心 10 min，取上清液 60 μL，进样 5 μL。

采用 LC-MS/MS 方法测定血浆中阿立哌唑浓度<sup>[16]</sup>。色谱条件：色谱柱为 Agilent ZORBAX C18 (2.1 mm × 50 mm, 5 μm)；流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液，B 为乙腈含 0.1% 甲酸；流速 0.3 mL · min<sup>-1</sup>；柱温 30℃；进样量 5 μL。质谱条件：带电喷雾电离源 (ESI)；定量分析在多反应监测 (MRM) 模式下进行；检测方式为正离子检测模式；测定离子对为  $m/z$  448.3 → 285.2，内标为  $m/z$  456.3 → 293.3；喷雾电压 5000 V。

根据各血浆样品的测定结果计算大鼠体内的血药浓度，并绘制平均血药浓度 - 时间曲线，结果如图 3 所示，采用 WinNolin 8.1 软件非房室模型计算在大鼠体内的药动学参数，结果见表 10。由高剪切法高温制备的样品  $C_{max}$  显著低于球磨法制备的样品，血药浓度更为平稳，有利于降低不良反应。

表 10 不同制备工艺 AZP LAIs 样品在大鼠体内的药动学参数 (n = 10)  
 Tab 10 Pharmacokinetic parameters of AZP LAIs with different preparation methods in rats (n = 10)

样品	$t_{max}/d$	$C_{max}/(ng \cdot mL^{-1})$	$AUC_{0 \rightarrow t}/(ng \cdot d \cdot mL^{-1})$
球磨法制备	6.0±0.7	39.5±8.2	415.7±41.2
高剪切法 48℃制备	6.0±0.7	25.4±7.2	372.7±46.7

结合球磨法制备获得的图 2B 电镜图以及高剪切法高温制备获得的图 2D 电镜图推测, 常规球磨法制备获得的颗粒多部位呈尖锐的片状, 因比表面积大而溶解度较高, 极易引起快速释放, 而高剪切法制备获得的颗粒相对圆滑, 与片状或针状颗粒相比溶出更慢, 释放可控更平稳。

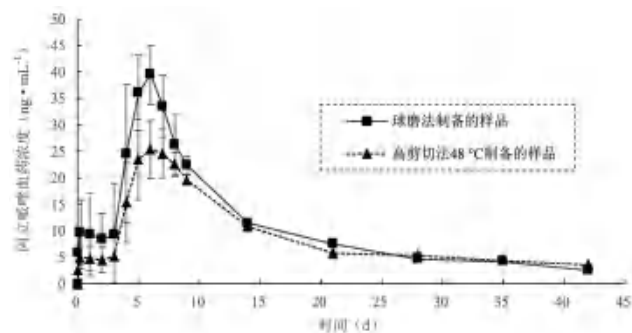


图 3 不同制备工艺 APZ LAIs 样品的平均血药浓度 - 时间曲线 (n = 10)  
 Fig 3 Plasma drug concentration-time curve of APZ LAIs with different preparation methods (n = 10)

### 3 讨论

近年来定转子高剪切设备广泛应用于生物、医药、食品以及各种新型材料制备等, 例如溶解和乳化过程、化学反应过程<sup>[17]</sup>、破碎药物颗粒<sup>[18]</sup>。该类设备具有较高的剪切线速度和极小的剪切间隙, 高速运转时会在狭小的间隙中产生很强的剪切力作用于物料。可根据物料特性和应用要求, 选择合适的定转子类型。

本研究首次采用特定工艺参数的定转子高剪切工艺制备 APZ LAIs, 通过单因素实验确定了最优的制备工艺。体内外结果均表明, 采用该方法制备的 APZ LAIs 具有良好的理化性质和优异的缓释效果。

与高压均质法相比, 定转子高剪切设备具有抗堵塞的优点, 因转子处于持续高速旋转中, 不存在可能的药物大颗粒堵塞腔体问题。与球磨法相比, 采用定转子高剪切设备不存在药物大颗粒无法充分被研磨的问题, 不存在介质污染的问题, 可有效避免小颗粒团聚的现象, 具有更平稳的血药浓度曲线, 有利于进一步降低终产品不良反应的发生。本研究为其他混悬剂品种的工艺开发提供了一种新思路。

### 参考文献

- Wang Y, Chan RCK, Shum DHK. Schizophrenia and prospective memory impairments: a review [J]. Clin Neuropsychol, 2018, 32 (5): 836-857.
- García S, Martínez-Cengotitabengoa M, López-Zurbano S, et al. Adherence to antipsychotic medication in bipolar disorder and schizophrenic patients [J]. J Clin Psychopharm, 2016, 36 (4): 355-371.
- Biagi E, Capuzzi E, Colmegna F, et al. Long-acting injectable antipsychotics in schizophrenia: literature review and practical perspective, with a focus on aripiprazole once-monthly [J]. Adv Ther, 2017, 34 (5): 1036-1048.
- Shah DA, Murdande SB, Dave RH. A review: pharmaceutical and pharmacokinetic aspect of nanocrystalline suspensions [J]. J Pharm Sci, 2016, 105 (1): 10-24.
- O' Brien MN, Jiang WL, Wang Y, et al. Challenges and opportunities in the development of complex generic long-acting injectable drug products [J]. J Control Release, 2021, 336: 144-158.
- Pacchiarotti I, Tiihonen J, Kotzalidis GD, et al. Long-acting injectable antipsychotics (LAIs) for maintenance treatment of bipolar and schizoaffective disorders: a systematic review [J]. Eur Neuropsychopharm, 2019, 29 (4): 457-470.
- 张涛, 李璐, 邓杰. 一种阿立哌唑缓释微球及其制备方法: 105310997B [P]. 2016-02-10.
- J·W·科斯坦斯基, T·松田, M·内鲁尔卡, 等. 控释无菌阿立哌唑注射剂和方法: 1870980B [P]. 2006-11-29.
- 平冈祥吾, 松田贵邦, 畑中润一. 制造阿立哌唑悬浮液和冻干制剂的方法: 101801342B [P]. 2010-08-11.
- 冯思欣, 马莉. 一种阿立哌唑纳米晶体及其制备方法: 104906038A [P]. 2015-09-16.
- Marcin K, Tomasz P, Tomasz R, et al. Method for the preparation of a pharmaceutical composition comprising aripiprazole: EP, 4043008A [P]. 2022-08-17.
- 李存红, 侯艳, 符德学. 高压均质、高剪切乳化、微射流均质的比较及在食品方面的应用 [J]. 焦作大学学报, 2021, 34 (2): 81-83.
- Rodgers TL, Cooke M. Rotor-stator devices: the role of shear and the stator [J]. Chem Eng Res Des, 2012, 90 (3): 323-327.
- Luciani CV, Conder EW, Seibert KD. Modeling-aided scale-up of high-shear rotor-stator wet milling for pharmaceutical applications [J]. Org Process Res Dev, 2015, 19 (5): 582-589.
- 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 132.
- 吴梦仪, 庄铨坤, 贾冉冉, 等. UPLC-MS/MS 方法测定中国精神分裂症患者血浆中阿立哌唑和脱氢阿立哌唑浓度 [J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36 (12): 113-116.
- 廖启江, 秦宏云, 周鸣亮, 等. 高剪切混合器研究与应用进展 [J]. 化工进展, 2019, 38 (3): 1160-1175.
- Harter A, Schenck L, Lee I, et al. High-shear rotor-stator wet milling for drug substances: expanding capability with improved scalability [J]. Org Process Res Dev, 2013, 17 (10): 1335-1344.

(收稿日期: 2023-11-27; 修回日期: 2024-02-20)

## 褪黑素通过下调 PD-L1 表达抑制胶质瘤细胞免疫逃逸

王梦迪<sup>1, 2</sup>, 孙定亚<sup>2</sup>, 任欢欢<sup>2</sup>, 王珊<sup>2</sup>, 宋涛<sup>3</sup>, 戴志洁<sup>1\*</sup> (1. 中南大学湘雅二医院代谢内分泌科, 国家代谢性疾病临床医学研究中心, 长沙 410011; 2. 中南大学化学化工学院制药工程系, 长沙 410083; 3. 中南大学湘雅医院神经外科, 长沙 410008)

**摘要:** **目的** 研究褪黑素对胶质瘤细胞免疫逃逸的抑制作用及机制。**方法** 以不同浓度的褪黑素处理 T98G、U251、U118 三种胶质瘤细胞, CCK-8 法检测细胞活性, 观察褪黑素抑制胶质瘤细胞活性的剂量-效应关系。予褪黑素单独处理胶质瘤细胞, 或先予  $\gamma$ -干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 预处理模拟肿瘤免疫微环境, 再予褪黑素干预, 采用 Western blot 与流式细胞术检测胶质瘤细胞程序性死亡受体-配体 1 (PD-L1) 总蛋白与膜蛋白表达情况。将 IFN- $\gamma$  预处理或未预处理的胶质瘤细胞与激活的外周单核细胞 (PBMC) 共培养, 用 CCK-8 法及结晶紫染色反映胶质瘤细胞的存活情况。**结果** 褪黑素可剂量依赖性地抑制 T98G、U251、U118 三种胶质瘤细胞的活性, 对正常环境下的胶质瘤细胞 PD-L1 总蛋白与膜蛋白表达无显著影响。然而, 在 IFN- $\gamma$  诱导的肿瘤免疫微环境下, 褪黑素可显著下调肿瘤细胞的 PD-L1 总蛋白与膜蛋白表达, 并显著抑制胶质瘤细胞的免疫逃逸能力, 增强 PBMC 免疫细胞的杀肿瘤细胞作用。**结论** 褪黑素可下调肿瘤免疫微环境中胶质瘤细胞的 PD-L1 表达, 抑制胶质瘤细胞的免疫逃逸能力, 进而发挥间接的抗肿瘤作用。

**关键词:** 胶质瘤; 褪黑素; PD-L1; 外周血单核细胞; 免疫逃逸

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)08-2012-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.008

## Melatonin attenuated the immune evasion of glioma cells by down-regulating PD-L1 expression

WANG Meng-di<sup>1, 2</sup>, SUN Ding-ya<sup>2</sup>, REN Huan-huan<sup>2</sup>, WANG Shan<sup>2</sup>, SONG Tao<sup>3</sup>, DAI Zhi-jie<sup>1\*</sup> (1. Department of Metabolism and Endocrinology, National Clinical Research Center for Metabolic Diseases, The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011; 2. Department of Pharmaceutical Engineering, College of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083; 3. Department of Neurosurgery, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008)

**Abstract: Objective** To determine the effect of melatonin on the immune evasion of glioma cells and the underlying mechanism. **Methods** Three glioma cell lines were used and treated with melatonin of different concentrations. The cells were pretreated with IFN- $\gamma$  to imitate the immune microenvironment of glioma and cocultured with peripheral blood mononuclear cell (PBMC). The cell viability was determined by CCK-8 assay. The total and membrane PD-L1 protein were detected by Western blot and flow cytometry, respectively. Survived glioma cells were stained by crystal violet assay. **Results** Melatonin inhibited the cell viability of T98G, U251, and U118 glioma cells in a dose-dependent manner. No significant changes were observed in the total or membrane PD-L1 expression of melatonin-treated glioma cells in a normal environment. Nevertheless, under the IFN- $\gamma$  induced immune microenvironment, melatonin remarkably down-regulated both the total and membrane expression of PD-L1 and attenuated the immune evasion of glioma cells shown by notably eliminated

基金项目: 湖南省自然科学基金 (No.2022JJ80120, No.2022JJ70134)。

作者简介: 王梦迪, 女, 硕士研究生, 主要从事肿瘤天然药物研究, email: w\_mengdi@126.com \*通信作者: 戴志洁, 女, 博士, 副主任医师, 主要从事代谢内分泌疾病、神经内分泌肿瘤发病机制及药物研究, email: daizj2017@csu.edu.cn



glioma cells by PBMCs. **Conclusion** Melatonin may attenuate the immune evasion of glioma cells by down-regulating the expression of PD-L1 in glioma cells, which provides evidence for the application of melatonin in glioma treatment.

**Key words:** glioma; melatonin; PD-L1; peripheral blood mononuclear cell; immune evasion

神经胶质瘤是最常见的颅内原发性肿瘤，约占所有恶性脑肿瘤的 81%，中位总生存期短，恶性胶质母细胞瘤仅 14.4 个月<sup>[1]</sup>。目前临床治疗神经胶质瘤的方法是原位手术切除为主，术后再联合放疗、化疗。但由于胶质瘤细胞的迁移能力异常活跃，且呈浸润性生长，导致手术难度大、手术效果及预后不理想<sup>[2-3]</sup>。此外，神经胶质瘤对放疗不敏感，而化疗药物存在跨血脑屏障困难，且对非中枢神经系统毒副作用较大<sup>[4]</sup>。因此，积极寻找可通过血脑屏障且能有效治疗胶质瘤的药物具有重要的临床意义。

褪黑素 (*N*-乙酰-5-甲氧基色胺, melatonin, MT) 是一种胺类激素，主要在松果体合成，兼具水溶性和高度亲脂性，容易透过血脑屏障<sup>[5]</sup>。近年来，越来越多的证据表明褪黑素可通过修饰褪黑素受体、抑制肿瘤细胞增殖、阻止表观遗传学改变、抑制肿瘤转移及血管生成等，在多种肿瘤的预防、延缓发展及治疗中发挥抗肿瘤作用<sup>[6]</sup>。褪黑素还可对正常组织、肿瘤细胞及肿瘤微环境进行免疫调节，在一定程度上可提高常规免疫靶向治疗的疗效<sup>[7]</sup>。有研究显示，褪黑素协同脂多糖调控巨噬细胞功能表型，促进巨噬细胞 M1 表型（具抗肿瘤活性）维持，降低其 M2 表型（具促肿瘤活性）比率，进而抑制肺癌、肝癌细胞的免疫逃逸<sup>[8]</sup>。在胶质瘤中，褪黑素已被证实不仅可增加胶质瘤放疗患者的生存时间，还可减弱肿瘤干细胞对化疗的耐药性<sup>[9-10]</sup>。然而，鲜有研究报道褪黑素对胶质瘤免疫微环境及胶质瘤细胞免疫逃逸的作用。

由于胶质瘤微环境的强免疫抑制性，胶质瘤细胞通常会表达免疫抑制因子程序性死亡受体-配体 1 (programmed death-ligand-1, PD-L1)。肿瘤细胞表面的 PD-L1 与微环境中 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞上的受体结合，抑制免疫细胞的增殖、存活以及多种细胞因子如  $\gamma$ -干扰素 (interferon  $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 的分泌，削弱免疫系统的抗肿瘤效应，实现免疫逃逸<sup>[11-12]</sup>。本研究拟从遏制免疫逃逸入手，探索褪黑素是否可通过影响胶质瘤细胞的 PD-L1 表达，发挥间接的抗胶质瘤作用。

本研究先检测褪黑素对胶质瘤细胞 PD-L1 表达水平的影响，进而将胶质瘤细胞与人源外周

血单核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PMBC) 共培养，观察褪黑素是否能增强 PMBC 免疫细胞对胶质瘤细胞的杀伤作用。该研究将为褪黑素作为胶质瘤关键或辅助治疗的候选药物提供一定的理论依据。

## 1 材料

### 1.1 细胞株

T98G 人脑多形性成胶质细胞瘤细胞、U251 人神经胶质瘤细胞以及 U118 人脑星形胶质母细胞瘤细胞 (中科院上海细胞库)。

### 1.2 试剂

DMEM 培养基 (C11995500BT)、RPMI 1640 培养基 (11875093)、胎牛血清 (FBS, A31608-02)、牛血清白蛋白 (Blocker BSA, 37520)、双抗 (1514012)(Gibco); 人重组 IFN- $\gamma$  蛋白 (HY-P70610G)(MCE); CCK-8 试剂盒 (MA0218)、ECL 发光试剂盒 (MA0186)(美仑生物); PBS 磷酸缓冲液 (KGB5001, 凯基生物); 褪黑素 (纯度 > 99.0%, M8600)、2.5% 结晶紫染色液 (G1061)、Ficoll Plus 1.077 细胞分离液 (索莱宝); 转膜液、抗体稀释液、蛋白酶抑制剂混合液 (新赛美生物); RIPA 强裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒、快速封闭液 (碧云天生物); 转膜液、5×TBST、预染彩色蛋白 Marker (塞维生物); PVDF 膜 (Millipore); 甲醇 (国药集团); 乙醇 (恒兴试剂); PE anti-human CD274 Antibody (Biolegend); PD-L1 Rabbit pAb (ABclonal); 山羊抗兔二抗 (美国 Thermo Fisher)。

### 1.3 仪器

酶联免疫检测仪 (美国 Bio-rad 公司, 型号 imark), 流式细胞仪 (美国 BD Biosciences 公司, 型号 BD FACSCalibur), 冷冻离心机 (美国 Sigma 公司), 细胞培养箱 (美国 Sheldon 公司, 型号 SCO5A)。

## 2 方法

### 2.1 胶质瘤细胞的培养与传代

T98G、U251、U118 三种胶质瘤细胞均使用含 10% FBS 及 1% 双抗的 DMEM 完全培养基，

置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。当细胞生长融合至 80%~90% 时, 使用 0.25% 胰蛋白酶进行消化与传代。

## 2.2 细胞活性检测

以二甲基亚砜为溶剂, 配制质量浓度为 5 mol·L<sup>-1</sup> 的褪黑素母液用于后续实验。收集处于对数生长期的 T98G、U251、U118 细胞, 以每孔 5×10<sup>3</sup> 个细胞量接种于 96 孔板。待细胞贴壁后, 使用 DMEM 培养基稀释褪黑素母液, 分别以 0.2、0.5、1、3、5 mmol·L<sup>-1</sup> 浓度处理细胞 24 h 或 48 h。每组设置 5 个复孔。之后每孔加入 10% 的 CCK-8 工作液 100 μL, 继续孵育 1~2 h 后, 使用酶标仪在 450 nm 波长处检测吸光度, 并计算其细胞活性, 观察褪黑素抑制胶质瘤细胞活性的剂量-效应关系, 并选择合理剂量 (3 mmol·L<sup>-1</sup>) 进行后续研究。

## 2.3 肿瘤细胞与 PBMC 共培养

收集处于对数增长期的 T98G、U251、U118 细胞, 以每孔 5×10<sup>3</sup> 个细胞量接种于 96 孔板, 待细胞贴壁后弃上清液, 用质量浓度为 100 ng·mL<sup>-1</sup> 的 IFN-γ 处理细胞。24 h 后弃上清液, 与 3 mmol·L<sup>-1</sup> 褪黑素共孵育 24 h。之后按照肿瘤细胞: PBMC = 1:5 的比例与其共培养。48 h 后弃上清液, 用 PBS 洗去死细胞与杂质, 每孔加入 100 μL CCK-8 工作液, 于 37℃ 培养 1~2 h, 在 450 nm 处检测吸光度, 计算细胞存活率。每组设置 5 个复孔。细胞存活率 (%) = (实验组吸光度 - 空白组吸光度) / (对照组吸光度 - 空白组吸光度) × 100%。

## 2.4 Western blot 检测 PD-L1 总蛋白

分别将 T98G、U251、U118 胶质瘤细胞以 2×10<sup>5</sup> 个/孔细胞数接种于 6 孔板, 待细胞贴壁后, 用质量浓度为 100 ng·mL<sup>-1</sup> 的 IFN-γ 预处理细胞。24 h 后弃上清液, 与 3 mmol·L<sup>-1</sup> 褪黑素共孵育 48 h。加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液, 使用刮刀收集细胞, 提取细胞总蛋白。用 BCA 法进行蛋白定量, 蛋白变性后, 上样于 SDS-PAGE 泳道内。垂直电泳 80 V, 持续 30 min, 再变成 120 V 完全分离蛋白。使用快速转膜液 400 mA, 30 min 转膜于 PVDF 膜。将膜封闭 1~2 h 后, 置于 PD-L1 一抗 (1:1000 稀释), 4℃ 孵育过夜。洗涤完成后, 以辣根过氧化物酶结合的二抗 (山羊抗兔 IgG 抗体, 1:10 000 稀释), 室温孵育 2 h, 洗涤 3 次后 ECL 试剂盒显色。每组设置 3 个复孔。

## 2.5 流式细胞术检测 PD-L1 膜蛋白

使用细胞刮刀收集处理之后的细胞, PBS 洗涤一次。加入含 5% BSA 的 PBS 孵育 10 min 完成

封闭。离心收集细胞后, 与 PD-L1-PE 流式抗体冰上孵育 30 min 后, PBS 洗涤重悬。流式细胞仪检测荧光强度。每组设置 3 个复孔。

## 2.6 PBMC 的提取与激活

抗凝管取 8~10 mL 人全血, 转移至 15 mL 离心管中, 2000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min 去除上层血清。提前在离心管中准备适当 Ficoll 分离液, 将得到的沉淀血细胞与 HBSS 溶液 1:1 混合为混悬液后, 缓慢叠加于分离液液面上, 于 4℃、400 g 离心 30 min。离心完成后管内分为三层, 取白膜层并使用 HBSS 溶液离心 (1500 r·min<sup>-1</sup>, 5 min) 洗涤两次。最终沉淀细胞重悬于含 10% FBS 的 RPMI 1640 完全培养基中, 并放于细胞培养箱中培养。24 h 后可加入 CD3/CD28 细胞因子辅助激活, 加入 IL-2 辅助细胞扩增。

## 2.7 结晶紫染色检测存活胶质瘤细胞

将三种胶质瘤细胞分别以每孔 1×10<sup>3</sup> 个细胞量接种于 24 孔板中, 待细胞贴壁后进行无血清培养基培养 24 h。之后同“2.3”项下方法进行 IFN-γ 预处理。24 h 后, 按照肿瘤细胞: PBMC = 1:5 的比例与其共培养。每组设置 3 个复孔。48 h 后弃上清液, 用 PBS 洗去死细胞, 4% 的多聚甲醛固定 20 min 后用 0.5% 的结晶紫染色液孵育 10 min, PBS 洗涤后晾干, 存活的胶质瘤细胞被染成紫色, 拍照并观察统计。

## 2.8 统计学处理

使用 Image J (v1.8.0) 软件计算分析蛋白印迹值数据。使用 FlowJo 10 软件分析统计流式细胞结果。应用 SPSS 17.0 统计软件完成实验数据的统计与处理, 结果以均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。两组数据差异比较采用 *t* 检验, 多组数据差异比较采用单因素 ANOVA 方差分析方法, 以 *P* < 0.05 代表差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 褪黑素对胶质瘤细胞活性的抑制作用

如表 1 所示, 不同浓度的褪黑素对 T98G、U251、U118 三种胶质瘤细胞的活性均有抑制作用, 且随着褪黑素浓度的升高, 其抑制作用逐渐增强, 呈剂量依赖性。而随着褪黑素作用时间由 24 h 延长至 48 h, 褪黑素对胶质瘤细胞的抑制效果并未见明显增强。此外, 三种胶质瘤细胞对于褪黑素的敏感度不同, 在 U251 细胞和 T98G 细胞中, 当褪黑素浓度为 3 mmol·L<sup>-1</sup> 时, 均已可见抑制效果差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。因此后续研究中选取褪黑素 3 mmol·L<sup>-1</sup> 的浓度进一步实验。

表 1 褪黑素对胶质瘤细胞活性的抑制作用 (n = 5)  
Tab 1 Melatonin inhibited the cell viability of glioma cells (n = 5)

褪黑素浓度 / (mmol · L <sup>-1</sup> )	T98G 细胞活性 /%		U118 细胞活性 /%		U251 细胞活性 /%	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
0.2	84.1 ± 15.1	83.3 ± 15.3	94.2 ± 4.8	75.2 ± 18.9	79.8 ± 6.3*	73.6 ± 7.2 <sup>#</sup>
0.5	86.0 ± 8.2	82.3 ± 17.0	88.6 ± 4.1	80.8 ± 10.8	72.0 ± 5.5*	62.8 ± 7.7 <sup>#</sup>
1.0	87.1 ± 7.4	76.0 ± 5.3 <sup>#</sup>	79.4 ± 8.3*	71.9 ± 9.8 <sup>#</sup>	56.2 ± 4.5**	44.2 ± 2.2 <sup>###</sup>
3.0	74.5 ± 9.9*	68.0 ± 12.5 <sup>#</sup>	82.8 ± 12.7	64.8 ± 6.2 <sup>#</sup>	44.2 ± 2.2***	44.4 ± 1.5 <sup>###</sup>
5.0	64.5 ± 2.1*	65.0 ± 7.8 <sup>#</sup>	63.0 ± 16.0*	60.0 ± 22.1 <sup>##</sup>	14.2 ± 3.6***	14.6 ± 3.6 <sup>###</sup>

注: 与 24 h 0 mmol · L<sup>-1</sup> 组 (对照组) 比较, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001; 与 48 h 0 mmol · L<sup>-1</sup> 组 (对照组) 比较, <sup>#</sup>P < 0.05, <sup>##</sup>P < 0.01, <sup>###</sup>P < 0.001。

Note: Compared with the 24 h 0 mmol · L<sup>-1</sup> (control group), \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001; compared with the 48 h 0 mmol · L<sup>-1</sup> (control group), <sup>#</sup>P < 0.05, <sup>##</sup>P < 0.01, <sup>###</sup>P < 0.001.

### 3.2 褪黑素对胶质瘤细胞 PD-L1 总蛋白与膜蛋白表达的影响

结果显示, 褪黑素不影响胶质瘤细胞 PD-L1 总蛋白的表达水平 (见图 1A、1B)。流式结果也表明, 褪黑素处理不干扰胶质瘤细胞膜表面

PD-L1 蛋白的表达 (见图 1C、1D), 提示褪黑素对正常环境下胶质瘤细胞的 PD-L1 蛋白表达并无显著影响。而对处于肿瘤微环境下的胶质瘤细胞, 褪黑素是否有作用尚不明确。

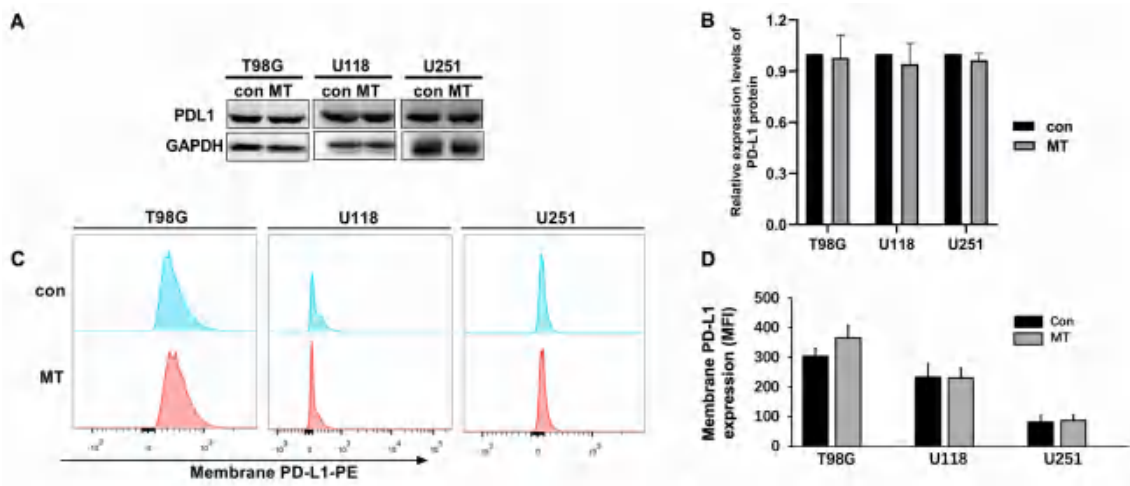


图 1 褪黑素对胶质瘤细胞 PD-L1 蛋白表达的影响

Fig 1 Effect of melatonin on the expression of PD-L1 protein in melatonin-treated glioma cells

### 3.3 褪黑素逆转 IFN-γ 诱导的胶质瘤细胞 PD-L1 蛋白上调

蛋白印迹 (见图 2A、2B) 与流式结果 (见图 2C、2D) 均显示, 在 IFN-γ 存在的微环境下, T98G、U118 和 U251 三种胶质瘤细胞的 PD-L1 总蛋白与膜蛋白表达均明显上调。而褪黑素处理可一定程度上抑制这种 IFN-γ 诱导的 PD-L1 蛋白高表达 (P < 0.05, 见图 2)。

### 3.4 褪黑素抑制胶质瘤细胞的免疫逃逸并增强免疫细胞的杀伤作用

将肿瘤微环境下的胶质瘤细胞与已激活的 PBMC 进行共培养, 观察肿瘤细胞的存活情况。结果如图 3A ~ 3C 所示, 在 IFN-γ 诱导的肿瘤微

环境下, 与 PBMC 共培养的胶质瘤细胞经褪黑素处理后肿瘤细胞存活率显著降低, 提示褪黑素削弱了胶质瘤细胞的免疫逃逸能力, 间接增强了 PBMC 对肿瘤细胞的杀伤效应 (P < 0.05)。其中 U251 胶质瘤细胞尤为敏感, 与 PBMC 共培养的肿瘤细胞经褪黑素处理后存活率低至 22.6% (见图 3C)。结晶紫染色结果 (见图 3D) 进一步显示, 处于肿瘤微环境下的胶质瘤细胞经褪黑素处理后更易于被 PBMC 杀伤, 从而使细胞数明显减少 (染色变浅)。

## 4 讨论

在我国, 脑胶质瘤年发病率为 5 万 ~ 10 万, 五年生存率不足 5%, 其病死率仅次于胰腺癌和



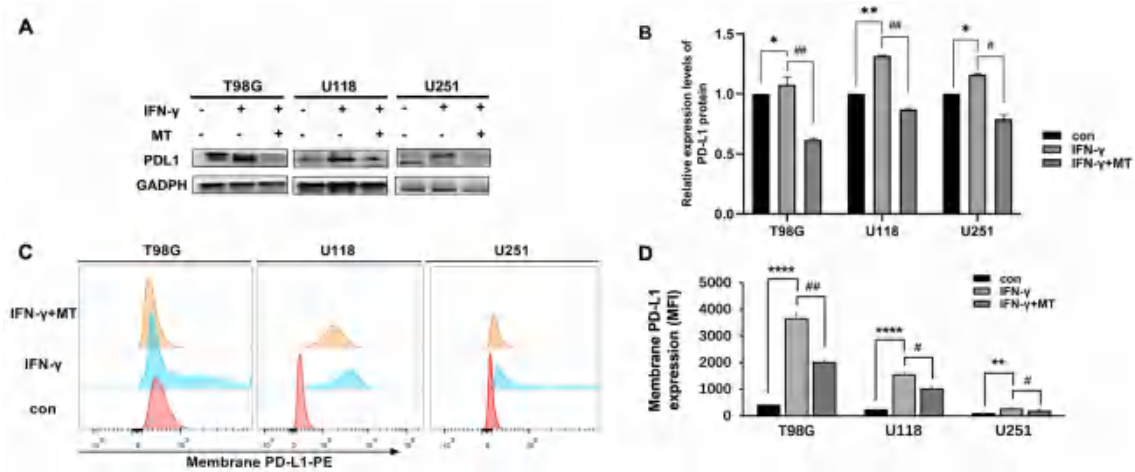


图 2 褪黑素对 IFN- $\gamma$  诱导的胶质瘤细胞 PD-L1 蛋白的影响

Fig 2 Effect of melatonin on the PD-L1 expression in glioma cells induced by IFN- $\gamma$

注 (Note): 与对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; 与 IFN- $\gamma$  预处理组比较, # $P < 0.05$ , ### $P < 0.01$  (Compared with the control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; compared with the IFN- $\gamma$  group, # $P < 0.05$ , ### $P < 0.01$ ).

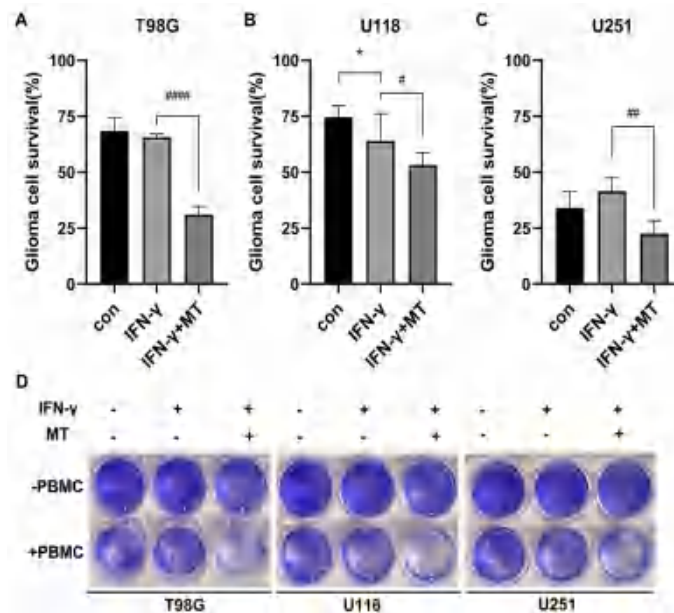


图 3 褪黑素对胶质瘤细胞的免疫逃逸的影响

Fig 3 Effect of melatonin on the immune evasion of glioma cells.

注: 与对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 IFN- $\gamma$  预处理组比较, # $P < 0.05$ , ### $P < 0.01$ , #### $P < 0.0001$ 。

Note: Compared with the control group, \* $P < 0.05$ ; compared with the IFN- $\gamma$  group, # $P < 0.05$ , ### $P < 0.01$ , #### $P < 0.0001$ .

肺癌<sup>[1, 13]</sup>。胶质瘤的临床治疗中, 手术、化疗和放疗均存在一定的弊端, 治疗效果不理想<sup>[14]</sup>。此外, 胶质瘤细胞的增殖与迁移能力强, 也导致预后差。大量研究表明, 抑制胶质瘤细胞的增殖可以在一定程度上改善患者的预后<sup>[15]</sup>。因此寻找可穿过血脑屏障, 能有效抑制胶质瘤细胞增殖的药物有积极的研究意义。

褪黑素作为一种易跨过血脑屏障的内源性物质, 在抗脑肿瘤的领域中有一定的研究<sup>[13, 16]</sup>, 是治疗胶质瘤的候选药物之一, 但其抗胶质瘤的作用机制尚未完全清楚。本研究首先探究了褪黑素

对三种胶质瘤细胞增殖的直接抑制作用。通过浓度梯度的探索发现 T98G、U118、U251 三种胶质瘤细胞对褪黑素的敏感度不同, 其中 U251 对褪黑素的敏感度较高。当褪黑素浓度达到  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, U251 即可达至半数抑制。而当褪黑素浓度达到  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, T98G 细胞和 U251 细胞的活性均可被显著抑制, 提示  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  可能是褪黑素对于胶质瘤细胞的最大受用浓度。不同胶质瘤细胞对褪黑素的敏感度差异, 考虑与细胞来源有关。T98G、U118 和 U251 细胞分别是多形胶质母细胞瘤、星形胶质母细胞瘤和恶性胶质母细胞瘤, 代

表不同亚型的胶质瘤，具有不同的临床特征，反映胶质瘤的多样性和异质性。

目前，关于褪黑素抗胶质瘤的研究主要集中于褪黑素通过多种肿瘤相关信号通路对胶质瘤细胞的生长和增殖的直接抑制作用<sup>[13, 15]</sup>。早期研究显示，褪黑素抑制活性氧（ROS）及 ROS 激活的下游转录因子核因子（NF）- $\kappa$ B、蛋白激酶 C（PKC）与受体酪氨酸激酶（RTK）信号途径，阻止 Akt 磷酸化和 NF- $\kappa$ B 活化，进而减少细胞周期抑制因子 p21 的表达，下调基质金属蛋白酶（MMP）-2 和 MMP-9 的表达，从而遏制细胞增殖与肿瘤生长<sup>[17-18]</sup>。近年来研究还发现对微小 RNA（miRNA）的调控也是褪黑素发挥抗胶质瘤效应的重要机制，如显著抑制恶性胶质瘤中 c-myc/miR-155 的表达<sup>[19]</sup>，上调原代胶质母细胞瘤的 miR-6858 表达来抑制胶质瘤各恶性生物学表现<sup>[20]</sup>，以及调控多种血管生成相关 miRNA 阻碍胶质瘤的发生及侵袭<sup>[21]</sup>。而褪黑素是否可通过影响胶质瘤相关免疫蛋白，激活免疫系统，间接实现其抗胶质瘤的作用还未见相关报道。

PD-L1 是常表达于肿瘤细胞表面的第一型跨膜蛋白，与 PD-1 受体结合后可显著抑制活化的 T 细胞活性，实现肿瘤细胞的免疫逃逸<sup>[22-23]</sup>。PD-L1 是经典的评估肿瘤免疫逃逸的指标。本研究发现，正常环境下使用褪黑素干预胶质瘤细胞并不会影响其 PD-L1 蛋白的表达。然而，肿瘤的发生发展离不开复杂的肿瘤微环境，IFN- $\gamma$  是一种炎症因子，主要由 T 细胞分泌，存在于肿瘤微环境中发挥广泛的免疫调节作用<sup>[24]</sup>。本研究显示在 IFN- $\gamma$  的微环境下三种胶质瘤细胞的 PD-L1 总蛋白与膜蛋白表达均显著上调，而褪黑素可有效逆转这种上调，提示在肿瘤微环境明显上调胶质瘤细胞 PD-L1 表达的情况下，褪黑素才会对 PD-L1 的表达水平有明显的抑制作用。进一步的结果证明，激活的 PBMC 对经褪黑素孵育过的胶质瘤细胞的杀伤力明显增强，提示褪黑素削弱了胶质瘤细胞的免疫逃逸能力，从而间接增强了免疫细胞的杀伤效果。

褪黑素抗肿瘤作用中调控 PD-L1 的潜在机制及信号通路，目前仍欠清楚，仅有少量文献报道。研究显示，褪黑素可下调巨噬细胞的 PD-L1 水平，减弱肝癌及胃癌细胞产生的外泌体对巨噬细胞的免疫抑制，使巨噬细胞的抗肿瘤活性得以恢复，机制分别是 STAT3 信号途径的参与，以及对肿瘤外泌体中相关 miRNA 的调控<sup>[25-26]</sup>。而在 KRAS 突变

的非小细胞肺癌中，褪黑素调节免疫抑制肿瘤微环境的机制似乎是 Yes 相关蛋白（YAP）、具 PDZ 结合基因的转录共激活因子（TAZ）及 PD-L1 轴的互相作用<sup>[27]</sup>。在头颈部鳞状细胞癌中，褪黑素则在体外和体内通过 ERK1/2/FOSL1 途径显著抑制 PD-L1 表达，抑制头颈部鳞状细胞癌的上皮-间质转化<sup>[28]</sup>。现有研究显示，不同类型肿瘤中褪黑素调节 PD-L1 表达及肿瘤微环境的作用存在明显机制差异，提示褪黑素对不同的肿瘤细胞 PD-L1 表达的调控强度及其涉及的信号通路不同。此外，褪黑素在正常培养环境下即能明显降低头颈部鳞状细胞癌 PD-L1 的表达，而本研究发现，在正常环境下使用褪黑素干预胶质瘤细胞并不会影响其 PD-L1 蛋白的表达，只有在 IFN- $\gamma$  的微环境下，褪黑素才明显逆转 PD-L1 的上调，其具体的机制值得进一步探讨。后续研究可在胶质瘤细胞或组织中，联合应用 PD-1/PD-L1 的抗体或抑制剂，进一步探索褪黑素下调胶质瘤细胞 PD-L1 表达的相关细胞因子及免疫逃逸通路的上下游信号，观察褪黑素对免疫逃逸相关的其他免疫指标的影响等。

综上所述，褪黑素在治疗胶质瘤方面有良好的潜在应用价值，且其抗胶质瘤作用很有可能是通过免疫相关途径实现的，值得我们进行进一步的探索与研究。

### 参考文献

- [1] Jiang T, Nam DH, Ram Z, et al. Clinical practice guidelines for the management of adult diffuse gliomas [J]. *Cancer Lett*, 2021, 499: 60-72.
- [2] Zhang MY, Song T, Yang L, et al. Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2008, 27 (1): 85.
- [3] Chu LZ, Yu L, Liu J, et al. Long intergenic non-coding LINC00657 regulates tumorigenesis of glioblastoma by acting as a molecular sponge of miR-190a-3p [J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11 (5): 1456-1470.
- [4] Wion D. Therapeutic dormancy to delay postsurgical glioma recurrence: the past, present and promise of focal hypothermia [J]. *J Neurooncol*, 2017, 133 (3): 447-454.
- [5] 刘一勋, 夏世文. 褪黑素联合亚低温治疗新生儿缺氧缺血性脑病的研究进展 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2023, 25 (8): 864-869.
- [6] Rohilla S, Singh M, Priya S, et al. Exploring the mechanical perspective of a new anti-tumor agent: melatonin [J]. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2023, 42 (1): 1-16.
- [7] Hekmatirad S, Moloudizargari M, Fallah M, et al. Cancer-associated immune cells and their modulation by mel-

- atonin [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2023, 45 (6): 788-801.
- [8] 林玉坤. 褪黑素协同 LPS 调控巨噬细胞防治肿瘤的作用研究 [D]. 郑州: 河南大学, 2020.
- [9] Maitra S, Bhattacharya D, Das S, et al. Melatonin and its anti-glioma functions: a comprehensive review [J]. *Rev Neurosci*, 2019, 30 (5): 527-541.
- [10] Serrano C, Guzmán S, Arias JI, et al. Melatonin decreases in vitro viability and migration of spheres derived from CF41. Mg canine mammary carcinoma cells [J]. *BMC Vet Res*, 2019, 15 (1): 390.
- [11] Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells [J]. *J Exp Med*, 2009, 206 (13): 3015-3029.
- [12] 王刚, 郝春成. PD-1/PD-L1 与胶质母细胞瘤关系的研究进展 [J]. *现代肿瘤医学*, 2023, 31 (7): 1344-1348.
- [13] Neamati F, Asemi Z. The effects of melatonin on signaling pathways and molecules involved in glioma [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2020, 34 (2): 192-199.
- [14] Li XG, Feng H, Li F. Progression of basic research, clinical application of photodynamic therapy and fluorescence-guided surgery in glioma treatment [J]. *Journal of Central South University (Medical Sciences)*, 2018, 43 (4): 360-367.
- [15] Zhang X, Zhang W, Mao XG, et al. Malignant intracranial high grade glioma and current treatment strategy [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2019, 19 (2): 101-108.
- [16] Moretti E, Favero G, Rodella LF, et al. Melatonin's antineoplastic potential against glioblastoma [J]. *Cells*, 2020, 9 (3): 599.
- [17] Martín V, Herrera F, Carrera-Gonzalez P, et al. Intracellular signaling pathways involved in the cell growth inhibition of glioma cells by melatonin [J]. *Cancer Res*, 2006, 66 (2): 1081-1088.
- [18] Wang JT, Hao HB, Yao LL, et al. Melatonin suppresses migration and invasion via inhibition of oxidative stress pathway in glioma cells [J]. *J Pineal Res*, 2012, 53 (2): 180-187.
- [19] Gu JY, Lu ZS, Ji CH, et al. Melatonin inhibits proliferation and invasion via repression of miRNA-155 in glioma cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93: 969-975.
- [20] Wang CL, Zhao ZM, Qi QC, et al. miR-6858 plays a key role in the process of melatonin inhibition of the malignant biological behavior of glioma [J]. *J Clin Neurosci*, 2021, 87: 137-146.
- [21] Doğanlar O, Doğanlar ZB, Delen E, et al. The role of melatonin in angio-miR-associated inhibition of tumorigenesis and invasion in human glioblastoma tumour spheroids [J]. *Tissue Cell*, 2021, 73: 101617.
- [22] Sun C, Mezzadra R, Schumacher TN. Regulation and function of the PD-L1 checkpoint [J]. *Immunity*, 2018, 48 (3): 434-452.
- [23] Jiang YS, Chen M, Nie H, et al. PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: clinical implications and future considerations [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2019, 15 (5): 1111-1122.
- [24] Jorgovanovic D, Song M, Wang L, et al. Roles of IFN- $\gamma$  in tumor progression and regression: a review [J]. *Biomark Res*, 2020, 8: 49.
- [25] Cheng L, Liu JT, Liu QQ, et al. Exosomes from melatonin treated hepatocellular carcinoma cells alter the immunosuppression status through STAT3 pathway in macrophages [J]. *Int J Biol Sci*, 2017, 13 (6): 723-734.
- [26] Wang KF, Cai R, Fei ST, et al. Melatonin enhances anti-tumor immunity by targeting macrophages PD-L1 via exosomes derived from gastric cancer cells [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2023, 568-569: 111917.
- [27] Chao YC, Lee KY, Wu SM, et al. Melatonin downregulates PD-L1 expression and modulates tumor immunity in KRAS-mutant non-small cell lung cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (11): 5649.
- [28] Luo XY, Chen Y, Tang HK, et al. Melatonin inhibits EMT and PD-L1 expression through the ERK1/2/FOSL1 pathway and regulates anti-tumor immunity in HNSCC [J]. *Cancer Sci*, 2022, 113 (7): 2232-2245.

(收稿日期: 2023-12-14; 修回日期: 2024-03-07)



# 基于网络药理学和体外实验探讨金银花治疗 IgA 肾病的作用机制

王蕾<sup>1</sup>, 梁冬雨<sup>2</sup>, 曹励欧<sup>1\*</sup> (1. 肾内科; 2. 临床科研中心; 上海市嘉定区中心医院仁济医院嘉定分院, 上海 201800)

**摘要:** **目的** 运用网络药理学预测金银花治疗 IgA 肾病 (IgAN) 潜在作用机制, 进一步通过体外实验进行验证。**方法** 通过 TCMSP 平台获取金银花的主要活性成分, 运用 GeneCards、OMIM 数据库检索 IgAN 相关靶点, 并映射到金银花的潜在作用靶点中, 将 IgAN 和金银花靶点取交集, 通过构建药物-成分-疾病-靶点网络图, 进行 KEGG 通路富集分析。最后通过重组人 IgA 刺激共培养人肾小球血管内皮细胞 (HRGECs) 和人肾小球系膜细胞 (HMCs) 构建 IgAN 细胞模型, 并给予不同浓度木犀草素进行干预, 验证网络药理学结果。**结果** 网络药理学分析结果发现 PI3K-AKT 信号通路可能是金银花治疗 IgAN 的潜在作用靶点。网络图拓扑学分析显示, 活性成分木犀草素与 PI3K-AKT 信号通路关系最大。体外实验发现, 木犀草素能抑制 HMCs 增殖, 减少 IL-6 分泌, 从而增强 HRGECs 间黏附分子的表达, 改善细胞间的紧密连接, 减少 HRGECs 单层通透性。对 HMCs 内 PI3K-AKT 信号通路相关蛋白检测发现, 木犀草素可以抑制细胞内 PI3K 和 AKT 的磷酸化水平。**结论** 木犀草素通过抑制 HMCs 内 PI3K-AKT 信号通路, 抑制 HMCs 增殖和 IL-6 分泌, 进而改善肾小球滤过屏障发挥治疗 IgAN 作用。

**关键词:** 金银花; IgA 肾病; 网络药理学; 体外实验; 木犀草素

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)08-2019-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.009

## Mechanism of honeysuckle for IgA nephropathy based on network pharmacology and in vitro experimental verification

WANG Lei<sup>1</sup>, LIANG Dong-yu<sup>2</sup>, CAO Li-ou<sup>1\*</sup> (1. Department of Nephrology; 2. Clinical Research Center, Jiading Branch of Renji Hospital, Central Hospital of Jiading District, Shanghai 201800)

**Abstract: Objective** To predict the mechanism of honeysuckle for IgA nephropathy (IgAN) by network pharmacology, and to verify the results by in vitro experiments. **Methods** The main active components of honeysuckle were obtained through TCMSP platform. The related targets of IgAN were retrieved by GeneCards and OMIM database, and mapped to the potential targets of honeysuckle. The targets of IgAN and honeysuckle were overlapped, and the KEGG pathway enrichment analysis was performed by constructing drug-component-disease-target network diagram. Finally, an cell model of IgAN was constructed by co-culturing human glomerular endothelial cells (HRGECs) and human mesangial cells (HMCs) stimulated with recombinant human IgA. Different concentrations of luteolin were given to verify the network pharmacology results. **Results** Network pharmacology analysis showed that PI3K-AKT signaling pathway might be a potential target of honeysuckle for IgAN. The topological analysis of network diagram showed that the active component luteolin was most related to PI3K-AKT signaling pathway. In vitro experiments showed that luteolin inhibited the proliferation of HMCs and reduced the secretion of inflammatory factor IL-6, thus enhancing the expression of adhesion molecules in HRGECs, improving the junction between cells and reducing the permeability of HRGECs monolayers. The expression of PI3K-AKT signaling pathway-related proteins in HMCs was detected, and luteolin inhibited the phosphorylation of PI3K and AKT in cells.

**基金项目:** 嘉定区自然科学研究课题 (No.JDKW-2021-0022)。

**作者简介:** 王蕾, 女, 副主任医师, 主要从事肾小球疾病和腹膜透析方面的研究, email: wl.0754@163.com \***通信作者:** 曹励欧, 女, 副主任医师, 主要从事 IgA 肾病及免疫相关肾病方面的研究, email: caoliou@jdhospital.com

**Conclusion** Luteolin inhibits the proliferation of HMCs and IL-6 secretion by inhibiting PI3K-AKT signaling pathway to improve glomerular filtration barriers in IgAN.

**Key words:** honeysuckle; IgA nephropathy; network pharmacology; in vitro experiment; luteolin

IgA 肾病 (immunoglobulin A nephropathy, IgAN) 是目前全球范围内最为常见的原发性肾小球疾病 (占比达 20% ~ 45%)。我国慢性肾病患者中, 40% ~ 50% 属于 IgAN, 且呈逐年升高趋势, 20% ~ 30% 的 IgAN 患者在 10 ~ 20 年内进展为终末期肾脏病<sup>[1-3]</sup>。目前只有通过减轻免疫炎症反应以及减少蛋白尿等方法延缓疾病进展, 但治疗效果有限<sup>[4]</sup>。IgAN 发病机制尚不清楚, 近年来, 研究焦点主要集中在系膜细胞和足细胞损伤等方面<sup>[5-6]</sup>。然而, 最近研究显示内皮细胞损伤与多种肾小球疾病的进展有关。Kusano 等<sup>[7]</sup>发现在 IgAN 中肾小球内皮细胞损伤与肾脏疾病严重程度相关, 并可能是血尿、蛋白尿和肾功能下降发生的重要原因。在最新的 IgAN 牛津病理分型中, 内皮细胞损伤也用来评判疾病严重程度和不良预后<sup>[8]</sup>。因此, 保护内皮细胞损伤可能成为 IgAN 的治疗靶点。

金银花, 为忍冬科类植物, 入药部分为干燥的花蕾或带初开的花, 具有清热解毒、疏散风热、凉血止痢等功效。现代药理研究表明, 金银花具有广谱抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗过敏及免疫调节等多种作用<sup>[9]</sup>。姚源璋等<sup>[10]</sup>研究表明, 金银花可以抑制核转录因子 NF- $\kappa$ B 活化, 减轻肾脏炎性病理损伤。中药金银花治疗 IgAN 临床疗效显著, 如名老中医聂莉芳教授经验方益气养肾汤 (太子参、生黄芪、生地、丹参、芡实、旱莲草、金银花、炒栀子、小蓟、当归、白芍) 治疗 IgAN 临床疗效明显, 方中金银花为重要药物组成部分<sup>[11]</sup>。但其药效物质基础和作用机制尚不明确。因此, 本研究以网络药理学为基础, 运用分子生物学手段, 通过挖掘传统中医药宝库, 探索金银花治疗 IgAN 的有效成分及作用机制。

## 1 材料

### 1.1 试药与仪器

木犀草素 (成都瑞思芬公司, HPLC  $\geq$  98%); 重组人 IgA (北京博尔西科技有限公司); 胎牛血清、青霉素链霉素双抗、 $\alpha$ -MEM、PBS (美国 Gibco 公司); CCK-8 试剂盒 (东仁化学科技有限公司); IL-6 ELISA 试剂盒 (美国 R&D 生物有限公司); ZO-1、Occludin、Claudin 5、AKT、p-AKT (Ser473)、PI3K、p-PI3K (Tyr464)、VE-cadherin (Abcam 公司);  $\beta$ -actin、IgGHRP 和 Cy3 羊抗兔 IgG (武汉三鹰生物技术有限公司); TRIzol (美国

Invitrogen 公司); 逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司); Centrifug 5430R 高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf); ABI 7500 荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI); 全自动化学发光仪器 (Tanon 5200); 荧光显微镜 (日本 OLYMPUS)。

### 1.2 细胞

原代人肾小球内皮细胞 (HRGECs, #4000) 和人肾小球系膜细胞 (HMCs, #4200) (美国 ScienCell 有限公司)。细胞复苏后在含 10% 胎牛血清的  $\alpha$ -MEM 培养基中, 于 37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养, 只有前 5 代的细胞用作此实验。

## 2 方法与结果

### 2.1 网络药理学

**2.1.1 活性成分-潜在靶点网络的构建** 通过 TCMID 数据库, 根据 Caco-2  $\geq$  0.4, DL  $\geq$  0.18, 并且结合相关文献, 筛选出 36 个金银花的活性成分, 导入 Swiss TargetPrediction 数据库预测潜在作用靶点 133 个。在 OMIM 和 GeneCards 数据库检索 IgAN 相关靶点 549 个, 剔除重复靶点后映射到金银花的潜在作用靶点中, 获取 63 个共同靶点作为金银花治疗 IgAN 的潜在作用靶点。

通过 Cytoscape 软件构建“活性成分-潜在靶点”网络图 (见图 1)。根据度值排序前后得到的主要活性成分为槲皮素 (quercetin)、木犀草素 (luteolin)、山柰酚 (kaempferol)、 $\beta$ -胡萝卜素 (beta-carotene)、 $\beta$ -谷甾醇 (beta-sitosterol)。这些成分作用的靶点有 PTGS2、AKT、VEGF、IL-6、MAPK 等, 提示其或许与金银花治疗 IgAN 的机制相关。

**2.1.2 靶点功能富集分析与网络构建** 将潜在作用靶点通过 R 语言的 cluster Profiler 软件包进行 KEGG 富集通路分析, 发现具有较大差异且与 IgAN 发病相关的通路为 PI3K-AKT 信号通路 (见图 2)。将金银花活性成分, 共同靶点以及 KEGG 富集分析结果进行可视化处理, 绘制网络图, 通过拓扑学分析发现, 与 PI3K-AKT 通路相关性最大的活性成分是木犀草素 (见图 3)。

### 2.2 体外实验

**2.2.1 IgAN 细胞模型构建及分组** 通过 Transwell 共培养 HMCs 和 HRGECs, 上层培养 HRGECs, 下层培养 HMCs, 用重组人 IgA (25  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>) 刺激 HMCs 建立 IgAN 细胞模型。

实验分组, 对照组: 共培养 HMCs 和 HRGECs; 模型组: 共培养 HMCs 和 HRGECs, 下层用重组

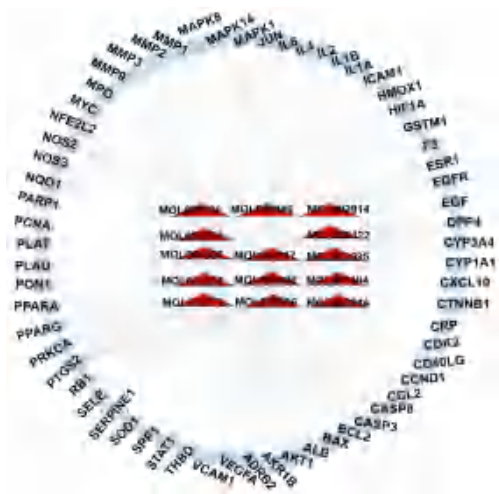


图 1 金银花治疗 IgAN 活性成分-潜在靶点网络图  
Fig 1 Network of active ingredients in honeysuckle for IgAN and potential targets

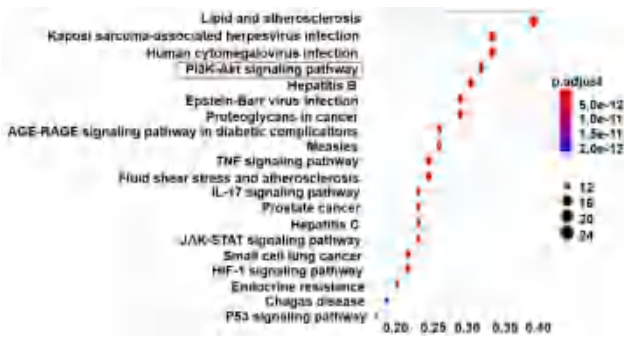


图 2 金银花-IgAN 共同靶点 KEGG 通路富集分析  
Fig 2 KEGG pathway enrichment analysis of common targets of honeysuckle and IgAN

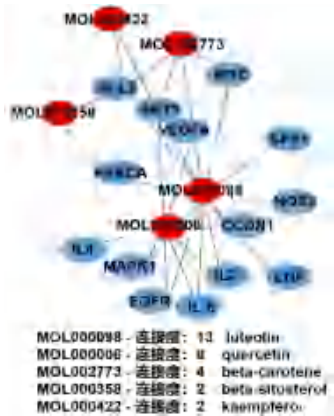


图 3 金银花活性成分-靶点-通路网络图  
Fig 3 Active ingredient of honeysuckle-target-pathway network diagram

人 IgA (25  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 刺激 HMCs; 药物组: 共培养 HMCs 和 HRGECs, 下层用重组人 IgA (25  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 刺激 HMCs 的同时加不同浓度木犀草素 (5、10、20、40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 进行干预。

**2.2.2 CCK-8 法检测木犀草素对 IgA 刺激 HMCs 增殖的影响** 将 HMCs 铺于 96 孔板中, 用不同浓

度木犀草素 (0、5、10、20、40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 处理 HMCs 24 h 或 48 h 后, 每孔加入 10  $\mu\text{L}$  的 CCK-8 溶液, 继续在培养箱避光孵育 2~4 h 后, 在波长 450 nm 处测定每孔的 OD 值, 计算细胞存活率, 细胞存活率 (%) = (OD 实验组 - OD 空白组) / (OD 对照组 - OD 空白组)  $\times$  100%。结果见图 4A、4B, 当药物浓度  $\leq$  20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 各组细胞存活率无明显差异, 说明对 HMCs 无明显细胞毒作用。因此, 本研究选取 10 和 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的木犀草素作为低浓度和高浓度药物组进行木犀草素对 IgA 刺激 HMCs 增殖的影响实验。结果显示, 模型组 (IgA 刺激) HMCs 的细胞存活率比对照组明显升高, 而药物组 HMCs 的细胞存活率比模型组降低, 且随着木犀草素浓度的增加, 细胞存活率逐渐降低 (见图 4C、4D)。

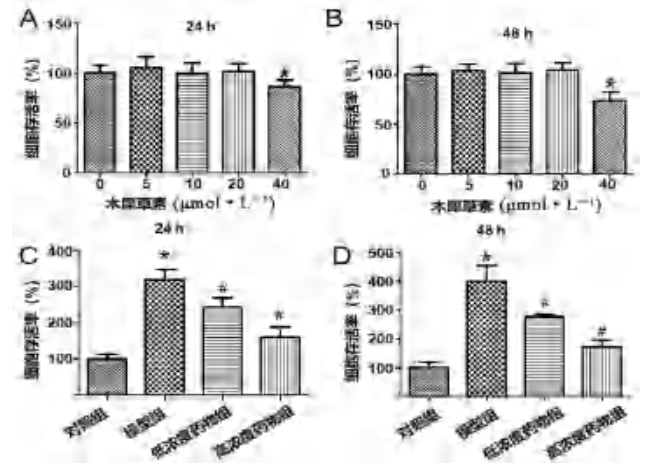


图 4 木犀草素对 IgA 刺激 HMCs 增殖的影响  
Fig 4 Effect of luteolin on IgA-stimulated proliferation of HMCs  
注: 与对照组相比, \* $P < 0.05$ ; 与模型组相比, # $P < 0.05$ 。  
Note: Compared with the control group, \* $P < 0.05$ ; compared with the model group, # $P < 0.05$ .

**2.2.3 酶联免疫吸附法检测木犀草素对 IgA 刺激 HMCs 分泌 IL-6 的影响** 将细胞按照不同方式处理 24 h 后, 取细胞上清液, 按照试剂盒说明书检测细胞上清液中 IL-6 水平。结果如图 5 所示, 模型组 (IgA 刺激) 分泌的 IL-6 明显高于对照组 ( $P < 0.05$ )。与模型组相比, 药物组木犀草素以剂量依赖的方式抑制 IL-6 的分泌。

**2.2.4 实时荧光定量 PCR 检测木犀草素对 IgA 刺激 HMCs 细胞内 IL-6 mRNA 的影响** 将细胞按照不同方式处理 24 h 后, 收集细胞, 提取细胞内总 RNA, 逆转录成 cDNA 第一链, 以此 cDNA 为模板, 加入 IL-6 引物, 上游: 5'-tcaatgaggagacttg-cctg-3'; 下游: 5'-gatgagtgtcatctgcctgc-3'。GAPDH 引物, 上游: 5'-tcattgacctcaactacatg-3'; 下游: 5'-gcagtgat-ggcatggactgt-3'。按照实时荧光定量 PCR 试剂盒说明



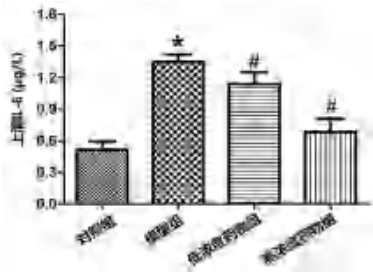


图 5 木犀草素对 IgA 刺激 HMCs 分泌 IL-6 的影响

Fig 5 Effect of luteolin on IL-6 secretion in HMCs stimulated by IgA

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

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

书在 ABI7500 荧光定量 PCR 仪上进行定量 PCR, 以 GAPDH 作为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示相对表达量。结果如图 6, 与对照组相比, 模型组 HMCs 细胞内表达更高水平的 IL-6 mRNA, 与模型组相比, 药物组木犀草素以剂量依赖的方式抑制细胞内 IL-6 mRNA 水平。

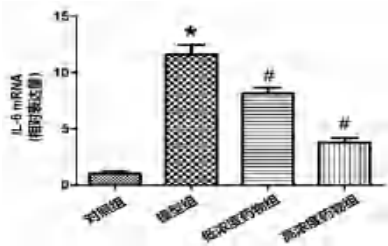


图 6 木犀草素对 IgA 刺激 HMCs 内 IL-6 mRNA 的影响

Fig 6 Effect of luteolin on IL-6 mRNA in HMCs stimulated by IgA

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

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

**2.2.5 Western blot 检测木犀草素对 IgA 刺激 HMCs 细胞内 PI3K-AKT 信号通路的影响** 将细胞按照不同方式处理 24 h 后, 收集细胞, RIPA 裂解后, BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量, 取 20  $\mu\text{g}$  蛋白经电泳、转膜、封闭, 稀释一抗 AKT (1 : 500)、p-AKT (Ser473) (1 : 5000)、PI3K (1 : 1000)、p-PI3K (Tyr464) (1 : 1000), 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔二抗, 继续室温孵育 2 h, 滴加化学发光检测试剂, 置于全自动化学发光仪器显色成像, Image J 软件分析蛋白条带灰度值。结果如图 7 所示, IgA 刺激的模型组, 细胞内 p-PI3K 和 p-AKT 的表达水平比对照组显著升高 ( $P < 0.05$ ), 药物组细胞内 p-PI3K 和 p-AKT 的表达水平均显著下调 ( $P < 0.05$ )。

**2.2.6 跨膜电阻检测木犀草素对 IgAN 细胞模型中 HRGECs 通透性的影响** 将细胞按照不同方式处理 24 h 后, 将上层培养有 HRGECs 的细胞转入新的小室中, 同时加入 1.5 mL 的完全培养

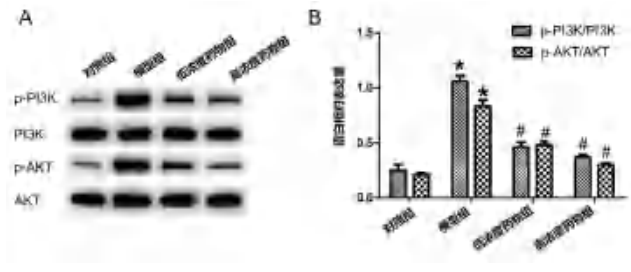


图 7 木犀草素对 IgA 刺激 HMCs 内 PI3K-AKT 信号通路的影响

Fig 7 Effect of luteolin on PI3K-AKT signaling pathway in HMCs stimulated by IgA

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

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

基到小室下室。增设空白对照组。每日镜下观察细胞融合状态, 且用跨膜电阻仪测定跨膜电阻 (TEER), 数值稳定 24 h 以上, 认为单层细胞模型已经建立。TEER 值 = (各孔电阻值 - 空白孔电阻值)  $\times$  上室底面积, 每孔设 3 个复孔。结果如图 8 所示, 与对照组相比, 模型组的 TEER 值明显下降 ( $P < 0.05$ ), 而经木犀草素干预的药物组 TEER 值明显升高 ( $P < 0.05$ )。

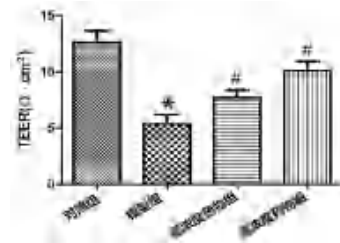


图 8 木犀草素对 IgAN 细胞模型中 HRGECs 通透性的影响

Fig 8 Effect of luteolin on HRGECs permeability in IgAN cell models

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

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

**2.2.7 FITC-BSA 检测木犀草素对 IgAN 细胞模型中 HRGECs 单层通透率的影响** FITC-BSA 实验选择 TEER 值稳定 24 h, 单层细胞形成后进行实验。按照细胞分组处理细胞 24 h 后, 弃去 Transwell 板中培养基, PBS 漂洗小室, 同时加入 500  $\mu\text{L}$  含有 5  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  FITC-BSA 的培养基, 下室加入新鲜培养基。避光培养 30 min 后, 荧光分光光度计检测上室、下室样品的荧光强度 (激发波长 495 nm, 发射波长 520 nm)。采用通透率 ( $P$ ) 表示内皮细胞单层对牛血清白蛋白 (BSA) 的通透性大小, 通透率的计算公式:  $P = [F] (1/A) (V/[L])$ 。其中  $[F]$  为下室 FITC-BSA 的荧光强度,  $A$  为 Transwell 上室底面积,  $V$  为下室溶液体积,  $[L]$  为上室荧光强度。结果见图 9, 模型组荧光通透率明显增加 ( $P < 0.05$ ), 而经木犀草素干预的药物组同模型组相比改善了细胞通

透性, 使荧光通透率明显降低 ( $P < 0.05$ )。

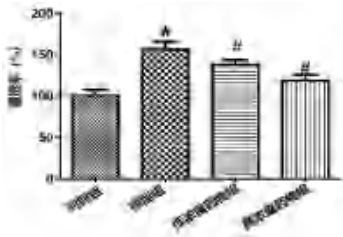


图 9 木犀草素对 IgAN 细胞模型中 HRGECs 单层通透率的影响  
Fig 9 Effect of luteolin on monolayer permeability of HRGECs in IgAN cell models

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

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

**2.2.8 免疫荧光检测木犀草素对 IgAN 细胞模型中血管内皮细胞钙黏蛋白表达的影响** 将细胞按照不同处理 24 h 后, 经固定、穿孔、封闭后加入 1 : 200 稀释的抗血管内皮细胞钙黏蛋白 (VE-cadherin) 一抗, 4 °C 过夜, PBS 冲洗 3 遍, 加入 Cy3 标记二抗, 37 °C 孵育 30 min 后 PBS 冲洗, 防淬灭封片剂封片, 拍照。结果见图 10, 与对照组相比, 模型组细胞间 VE-cadherin 的表达明显降低, 而经木犀草素干预的药物组细胞间 VE-cadherin 的表达较模型组显著增加, 提示细胞间紧密连接有所改善。

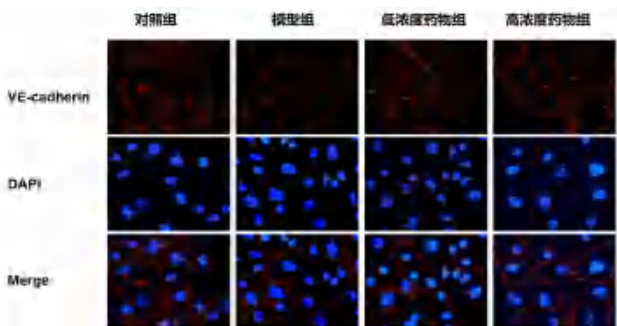


图 10 木犀草素对 IgAN 细胞模型中 HRGECs 细胞间 VE-cadherin 表达的影响  
Fig 10 Effect of luteolin on the expression of VE-cadherin in HRGECs in IgAN cell models

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

**2.2.9 Western blot 检测木犀草素对 IgAN 细胞模型中细胞间黏附分子表达的影响** 将细胞按照不同处理 24 h 后, 收集细胞, RIPA 裂解后, BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量, 取 20 μg 蛋白经电泳、转膜、封闭, 稀释一抗 ZO-1 (1 : 1000)、Occludin (1 : 1000)、Claudin 5 (1 : 1000), 4 °C 孵育过夜, 加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔二抗, 继续室温孵育 2 h, 滴加化学发光检测试剂, 置于全自动化学发光仪器显色成像, Image J 软件分析蛋白条带灰度值。结果如图 11 所示, 模型组细胞间黏附分子 (ZO-1、Claudin-5 和 Occludin) 表达水平较对照

组显著下降 ( $P < 0.05$ ), 而经木犀草素干预的药物组 ZO-1、Claudin-5 和 Occludin 的表达与模型组相比显著升高 ( $P < 0.05$ )。

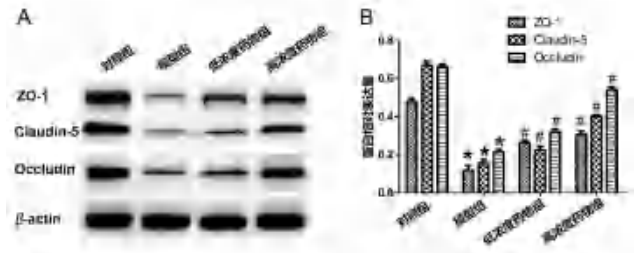


图 11 木犀草素对 IgAN 细胞模型中细胞间黏附分子表达的影响  
Fig 11 Effect of luteolin on the expression of intercellular adhesion molecules in IgAN cell models

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

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

**2.2.10 统计学分析** 数据通过 SPSS 20.0 软件进行分析统计, 结果数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组内比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

### 3 讨论

在 IgAN 中, IgA 免疫复合物在系膜区的沉积是疾病发病的启动因素, 既往研究也多集中在免疫复合物刺激系膜细胞, 引起细胞增殖、炎症反应以及肾小球损伤<sup>[12]</sup>。随着研究的不断深入, 大量研究显示, 在 IgAN 中, 系膜细胞与其他细胞之间存在某种相关作用, 共同介导 IgAN 肾损伤<sup>[13-14]</sup>。肾小球内皮细胞是位于肾小球最外层的一种高度分化的内皮细胞, 是肾小球滤过屏障的重要组成部分, 在肾脏生理病理过程中起着重要作用。有研究证实肾小球内皮细胞的损伤与 IgAN 的发展密切相关<sup>[15]</sup>。肾小球内皮细胞通过细胞间的一系列黏附分子在肾小球表面形成一层半透膜屏障, 一旦细胞受损, 细胞间的紧密连接破坏, 细胞屏障通透性增加, 大分子物质如白蛋白就会从间隙中漏出, 最终出现蛋白尿<sup>[16]</sup>。范琦强等<sup>[17]</sup>发现 IgAN 大鼠模型肾组织中 CD31、CD34 和 JG12 表达下降, 提示 IgAN 大鼠模型内皮细胞和微血管减少, 说明 IgAN 发病存在内皮细胞损伤和微血管的丢失。但另一方面, 有研究显示内皮细胞表面并不表达 IgA 受体, 也就是说 IgA 免疫复合物应该对内皮细胞不产生直接作用, 而且, 在 IgAN 的肾活检中罕见有 IgA 沉积内皮细胞。更说明内皮细胞的损伤可能源于周围的炎症因子环境<sup>[18]</sup>。因此, 本研究通过 Transwell 共培养 HMCs 和 HRGECs, 模拟体内生理环境, 建立 IgAN 体外细胞模型。

已有文献报道了金银花治疗 IgAN 的活性成



分和作用靶点<sup>[19]</sup>，但相关机制研究甚少，基于此，本研究以虚拟技术分析为指导，首先发现 PI3K-AKT 信号通路可能是金银花治疗 IgAN 的潜在作用靶点。进一步通过网络图拓扑学分析，显示活性成分木犀草素与 PI3K-AKT 信号通路关系最大。为了验证其活性及功能，首先在 IgAN 细胞模型中加入不同浓度木犀草素进行干预，然后检测其对 HMCs 和 HRGECs 的作用。结果显示，木犀草素可以显著抑制 HMCs 的增殖以及 IL-6 的分泌。经木犀草素干预的药物组细胞内 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白的表达水平均被显著下调，提示木犀草素可能通过 PI3K-AKT 信号通路抑制 HMCs 的活化。IL-6 是系膜细胞活化后分泌的炎症因子，其被认为参与 IgAN 的发病<sup>[20]</sup>。在 IgAN 患者中，尿 IL-6 浓度与肾功能密切相关，并可预测 IgAN 患者的长期肾脏转归<sup>[21]</sup>。CD37<sup>-/-</sup>小鼠 IgAN 模型，其血清 IL-6 水平明显升高，而其他炎症因子水平如 TNF- $\alpha$  等却未见增加<sup>[22]</sup>。Yang 等<sup>[15]</sup>研究发现 IL-6 可以影响 IgAN 肾小球内皮细胞 VE-cadherin 的表达，增加肾小球内皮细胞的通透性。本研究中也发现，IgAN 模型组，HRGECs 单层的 TEER 值降低、荧光通透率增加，细胞间黏附分子表达减少，而经木犀草素干预的药物组同模型组相比，黏附分子的表达显著增加，HRGEC 单层的通透性明显减少，细胞间的紧密连接被改善。

综上，本研究发现通过虚拟技术筛选出的木犀草素通过抑制 PI3K-AKT 信号通路，抑制 HMCs 增殖和 IL-6 分泌，进而改善肾小球滤过屏障发挥治疗 IgAN 作用。后续进一步在动物模型中进行验证，探讨木犀草素治疗 IgAN 的作用及其机制。

## 参考文献

- [1] Wyatt RJ, Julian BA. IgA nephropathy [J]. N Engl J Med, 2013, 368 (25): 2402-2414.
- [2] McGrogan A, Franssen CF, Vries CS. The incidence of primary glomerulonephritis worldwide: a systematic review of the literature [J]. Nephrol Dial Transplant, 2011, 26 (2): 414-430.
- [3] Cai GY, Chen XM. Immunoglobulin A nephropathy in China: progress and challenges [J]. Am J Nephrol, 2009, 30 (3): 268-273.
- [4] Floege J, Rauen T, Tang SCW. Current treatment of IgA nephropathy [J]. Semin Immunopathol, 2021, 43 (5): 717-728.
- [5] Zhu XD, Shen XG, Lin B, et al. Liuwei Dihuang pills inhibit podocyte injury and alleviate iga nephropathy by directly altering mesangial cell-derived exosome function and secretion [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 889008.
- [6] Zhang HD, Deng ZL, Wang Y. Molecular insight in intrarenal inflammation affecting four main types of cells in nephrons in IgA nephropathy [J]. Front Med (Lausanne), 2023, 10: 1128393.
- [7] Kusano T, Takano H, Kang D, et al. Endothelial cell injury in acute and chronic glomerular lesions in patients with IgA nephropathy [J]. Hum Pathol, 2016, 49: 135-144.
- [8] Trimarchi H, Barratt J, Cattran DC, et al. IgAN classification working group of the international IgA nephropathy network and the Renal Pathology Society; Conference Participants. Oxford Classification of IgA nephropathy 2016: an update from the IgA Nephropathy Classification Working Group [J]. Kidney Int, 2017, 91 (5): 1014-1021.
- [9] Zheng SW, Liu ST, Hou AJ, et al. Systematic review of *Lonicerae Japonicae* Flos: a significant food and traditional Chinese medicine [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 1013992.
- [10] 姚源璋, 张敏, 曹鹏. 清热解毒中药对 TNF- $\alpha$  诱导的小鼠肾小球系膜细胞 NF- $\kappa$ B 信号转导通路的影响 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2013, 14 (12): 1047-1050.
- [11] 徐建龙, 李爱峰, 张晶晶. 聂莉芳运用金银花治疗慢性肾脏病经验 [J]. 山西中医, 2018, 34 (12): 4-8.
- [12] Hassler JR. IgA nephropathy: a brief review [J]. Semin Diagn Pathol, 2020, 37 (3): 143-147.
- [13] Leung JCK, Lai KN, Tang SCW. Role of mesangial-podocyte-tubular cross-talk in IgA nephropathy [J]. Semin Nephrol, 2018, 38 (5): 485-495.
- [14] Trimarchi H, Coppo R. Podocytopathy in the mesangial proliferative immunoglobulin A nephropathy: new insights into the mechanisms of damage and progression [J]. Nephrol Dial Transplant, 2019, 34 (8): 1280-1285.
- [15] Yang YC, Fu H, Zhang B, et al. Interleukin-6 downregulates the expression of vascular endothelial-cadherin and increases permeability in renal glomerular endothelial cells via the trans-signaling pathway [J]. Inflammation, 2022, 45 (6): 2544-2558.
- [16] Zhang L, Wang JX. Sinomenine alleviates glomerular endothelial permeability by activating the C/EBP- $\alpha$ /claudin-5 signaling pathway [J]. Hum Cell, 2022, 35 (5): 1453-1463.
- [17] 范琦强. IgAN 大鼠肾小球内皮细胞损伤与修复的机制 [D]. 太原: 山西医科大学, 2022.
- [18] 黄美春, 张仙珍, 胡岗, 等. IgA 肾病循环 IgA1 复合物通过活化系膜细胞诱导血管内皮细胞损伤 [A]/2018 年学术年会论文摘要汇编 [C]. 浙江省立同德医院, 2018.
- [19] 王如梦, 赵明明, 常美莹, 等. 基于咽肾相关理论探讨金银花治疗 IgA 肾病作用机制的网络药理学研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2021, 16 (4): 665-672.
- [20] Groza Y, Jemelkova J, Kafkova LR, et al. IL-6 and its role in IgA nephropathy development [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2022, 66: 1-14.
- [21] Zhao WJ, Feng S, Wang YC, et al. Elevated urinary IL-6 predicts the progression of IgA nephropathy [J]. Kidney Int Rep, 2022, 8 (3): 519-530.
- [22] Rops ALWMM, Jansen E, van der Schaaf A, et al. Interleukin-6 is essential for glomerular immunoglobulin A deposition and the development of renal pathology in Cd37-deficient mice [J]. Kidney Int, 2018, 93 (6): 1356-1366.

(收稿日期: 2024-01-02; 修回日期: 2024-03-08)



# 基于 TGF- $\beta$ 1/Smad2/3 信号通路探讨茴香胶囊 抗支气管哮喘作用及机制

阿依妮葛尔·麦麦提艾力<sup>1</sup>, 阿布里米提·阿不列里木<sup>1</sup>, 窦勤<sup>2</sup>, 买买提·艾力<sup>3</sup>, 蔡晓霞<sup>1</sup>, 巴合沙拉·马乃甫<sup>2</sup>, 斯拉甫·艾白<sup>2\*</sup> (1. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆维吾尔自治区维吾尔医药研究所, 乌鲁木齐 830011; 3. 新疆维吾尔自治区维吾尔医医院, 乌鲁木齐 830049)

**摘要:** **目的** 探讨茴香胶囊抗支气管哮喘作用及潜在机制。**方法** 采用环磷酰胺腹腔注射法建立小鼠免疫低下模型评价茴香胶囊免疫增强作用; 采用浓氨水引咳法及酚红排泄法评价茴香胶囊止咳祛痰活性; 采用卵清蛋白致敏和激发方式构建支气管哮喘小鼠模型, 实验过程中观察并记录小鼠体重及行为学变化; 检测小鼠肺泡灌洗液 (BALF) 中炎症细胞计数; ELISA 法检测免疫球蛋白 E (IgE)、 $\gamma$ -干扰素 (IFN- $\gamma$ )、白细胞介素-4 (IL-4)、白细胞介素-17A (IL-17A)、转化生长因子- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 水平; HE 和 Masson 染色观察肺组织病理学变化; RT-qPCR、Western blot 检测 TGF- $\beta$ 1/Smad2/3 通路相关蛋白表达。**结果** 茴香胶囊可增强免疫低下小鼠的免疫功能, 延长小鼠咳嗽潜伏期, 减少小鼠咳嗽次数, 增加小鼠气管酚红排泌量, 降低支气管哮喘小鼠 BALF 中白细胞等炎性细胞数量, 降低 IgE、IL-4、IL-17A、TGF- $\beta$ 1 水平, 增加 IFN- $\gamma$  水平, 减轻小鼠肺组织病理学变化; 下调 TGF- $\beta$ 1/Smad2/3 通路相关蛋白表达。**结论** 茴香胶囊可能通过增强机体免疫力、止咳祛痰缓解支气管哮喘小鼠哮喘症状, 调节 Th1/Th2 失衡、降低肺组织中炎症因子水平、下调 TGF- $\beta$ 1/Smad2/3 信号通路减少气道炎症及气道重塑。

**关键词:** 茴香胶囊; 支气管哮喘; 气道炎症; 转化生长因子- $\beta$ 1/Smad2/3 信号通路

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)08-2025-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.010

## Anti-bronchial asthma effect of Huixiang capsules based on TGF- $\beta$ 1/ Smad2/3 signaling pathway and related mechanism

Ayinigeer Maimaitaili<sup>1</sup>, Abulimiti Abulielimu<sup>1</sup>, DOU Qin<sup>2</sup>, Maimaiti Aili<sup>3</sup>, CAI Xiao-xia<sup>1</sup>, Baheshala Manaifu<sup>2</sup>, Silafu Aibai<sup>2\*</sup> (1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011; 2. Uygur Medical Research Institute, Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830011; 3. Uygur Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830049)

**Abstract: Objective** To determine the anti-bronchial asthma effect and related mechanism of Huixiang capsules based on immune enhancement and cough expectoration. **Methods** Cyclophosphamide intraperitoneal injection was used to establish a mouse immunocompromised model to evaluate the immune enhancing effect of Huixiang capsules. Concentrated ammonia cough inducing method and phenol red excretion method were used to evaluate the cough expectorant activity of Huixiang capsules. Ovalbumin sensitization and excitation were used to establish a mouse model of bronchial asthma. The body weight of mice and behavioral changes were observed and recorded in the experiment. The inflammatory cells were counted in the BALF of the mice. IgE, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17A, and TGF- $\beta$ 1 were detected by ELISA. Pathological changes in the lung tissues were observed by HE and Masson staining. The levels of TGF- $\beta$ 1, Smad2, Smad3,  $\alpha$ -SMA, and VEGF mRNA expressions were determined by RT-qPCR and Western blot. **Results** Huixiang capsule enhanced the immune

基金项目: 2021 年新疆维吾尔自治区重大科技专项项目 (No.2021A03002-1); 2021 年新疆维吾尔自治区自然科学基金 (No.2021D01A157)。

作者简介: 阿依妮葛尔·麦麦提艾力, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药药理学研究, email: 3516654944@qq.com \*通信作者: 斯拉甫·艾白, 男, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事药理毒理学研究, email: 3289288689@qq.com

function in immunocompromised mice, prolonged the cough latency, reduced the cough times, and lowered the amount of phenol red excretion in the trachea. The number of inflammatory cells such as white blood cells in the BALF of mice with bronchial asthma was reduced as well. The levels of IgE, IL-4, IL-17A, and TGF- $\beta$ 1 were decreased, while the IFN- $\gamma$  level was increased. The pathological changes in the lungs of mice were relieved and the expression of TGF- $\beta$ 1/Smad2/3 pathway related proteins down-regulated. **Conclusion** Huixiang capsules may alleviate symptoms in mice with bronchial asthma by enhancing the immunity, relieving cough and expectorant, regulating Th1/Th2 imbalance, decreasing inflammatory factor levels in the lung tissues, and down-regulating TGF- $\beta$ 1/Smad2/3 signaling pathway to reduce airway inflammation and remodel the airway.

**Key words:** Huixiang capsule; bronchial asthma; inflammation of the airway; transforming growth factor- $\beta$ 1/Smad2/3 signaling pathway

支气管哮喘 (bronchial asthma, BA) 简称哮喘,《支气管哮喘防治指南 (2020 年版)》指出 BA 的临床表现为反复发作的喘息、气急、咳嗽等,以气道的慢性炎症、气道高反应性、可逆性的气流受限以及气道重塑为主要特征<sup>[1-2]</sup>,发病率较高,已严重威胁人们的健康和生活。气道重塑和气道炎症是 BA 的基本病理特征,气道炎症是 BA 的本质,气道重塑则是造成本病进展及肺功能进行性恶化的主要原因<sup>[3]</sup>。目前西医多以  $\beta$  肾上腺素受体激动剂等作为治疗和控制 BA 的首选药物,但长期使用上述药物容易引发一系列不良反应<sup>[4]</sup>,故寻找新的治疗药物逆转气道炎症和重塑是现阶段 BA 临床研究的热点。

茴香胶囊来源于维医学经典名方,由黄芪、茴香根皮、防风、白术、牛至 5 味药材组成,具有调节异常黏液质,增强免疫力,止咳祛痰平喘作用。用于治疗 BA 和慢性支气管炎。方中主药黄芪具有擅补肺脾之气,被历代医家誉为“补气之圣药”、防风<sup>[5]</sup>、白术<sup>[6]</sup>、牛至等<sup>[7]</sup>中药已被证实具有治疗 BA 之功效。研究显示<sup>[8]</sup>,TGF- $\beta$ 1/Smad2/3 信号通路在 BA 发生与治疗中发挥着重要作用。据报道,抑制 TGF- $\beta$ 1/Smad2/3 通路可缓解气道炎症及气道重塑<sup>[9]</sup>。基于此,本研究以免疫增强、止咳祛痰作为切入点,构建小鼠 BA 模型,初步探究茴香胶囊对 BA 小鼠气道炎症和气道重塑的影响,以期对 BA 的治疗提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 试药

黄芪 (批号: 20200811-07)、白术 (批号: 20200810-08)、茴香根皮 (批号: 20200810-01)、防风 (批号: 20200810-18)、牛至 (批号: 20220323-02)(新奇康药业股份有限公司),各药材经新疆维

吾尔自治区药物研究所何江研究员鉴定。卵清蛋白 (OVA, Sigma, 批号: SLCR2806); 氢氧化铝胶生理盐水稀释液 (哈药集团, 批号: 202315); 醋酸地塞米松片 (新乡市常乐制药有限责任公司, 批号: D2207061); 桂龙咳喘宁胶囊 (桂龙药业有限责任公司, 批号: K221203); 注射用环磷酰胺 (江苏恒瑞医药股份有限公司, 批号: 2D542A); 玉屏风颗粒 (云南白药集团, 批号: ZHB2222); 左旋咪唑片 (桂林南药股份有限公司, 批号: ZX221103); 喷托维林片 (上海玉瑞生物科技药业有限公司, 批号: 20220406); 氨溴索分散片 (珠海同源药业有限公司, 批号: 20220602); 小鼠  $\gamma$ -干扰素 (IFN- $\gamma$ )、白细胞介素-4 (IL-4)、白细胞介素-17A (IL-17A)、转化生长因子- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司); TRIzol Reagent 试剂盒 (Ambion 公司); TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3 抗体 (Affinity, 批号分别为 10058、3b48041、2h43678)。小鼠免疫球蛋白 M (IgM) 试剂盒、小鼠免疫球蛋白 G (IgG) 试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司)。

### 1.2 仪器

PARI Turbo BOY 型压缩雾化吸入器 (德国帕瑞有限公司); H1650RB 型台式高速冷冻离心机 (上海卢湘仪离心机仪器有限公司); RM2245 型切片机 (LEICA); KZPG-1 型摊片烤片机 (天津天利航空机电有限公司); MyCycler Thermal Cycler 型 PCR 仪、POWERPAC TM 型电泳、电转仪 (Bio-Rad)。

### 1.3 实验动物

ICR 小鼠,雌雄兼用,6~8 周龄 (20 $\pm$ 2) g [新疆医科大学动物实验中心,动物生产许可证: SCXK (新) 2018-0002]。BALB/c 小鼠,雌性,6~7 周龄 (18 $\pm$ 2) g [北京华阜康生物科技股份

有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2019-0008]。饲养环境: 20 ~ 26 °C, 相对湿度 40% ~ 70%, 通风良好, 室内 12 h 明暗自动切换。本研究经新疆维吾尔自治区维吾尔医药研究所伦理委员会批准 (批件号: nGLP-202301)。

## 2 方法

### 2.1 茴香胶囊制备方法

按处方称取上述药材, 加 8 倍量水回流提取 3 次, 每次 1 h, 滤过, 合并滤液, 减压浓缩 (-0.02 ~ 0.09 MPa, 70 ~ 80 °C) 至药液比为 1 : 5 的浸膏 (相对密度为 1.01 ~ 1.05), 300 目筛网滤过, 取上清液减压浓缩至相对密度为 1.1 ~ 1.15 的浸膏, 出膏率为 30%, 与辅料 (乳糖:淀粉 = 1 : 1) 进行一步制粒, 制成含生药材 1.57 g/粒的胶囊。采用高效液相色谱法测定, 防风以升麻素苷计, 含量  $\geq 0.5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ; 黄芪以毛蕊异黄酮葡萄糖苷计, 含量  $\geq 0.19 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

### 2.2 茴香胶囊对免疫低下小鼠免疫功能的影响

**2.2.1 动物分组、造模及给药** 按参考文献方法并改进, 建立免疫抑制小鼠模型<sup>[10]</sup>: 取 56 只 ICR 小鼠, 雌雄各半, 按体重随机分为空白组, 模型组, 左旋咪唑组 ( $67.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 玉屏风颗粒组 ( $9.01 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 茴香胶囊低、中、高剂量组 ( $0.36$ 、 $0.72$ 、 $1.44 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 每组 8 只。各给药组每日灌胃给药 1 次, 连续 14 d, 空白组与模型组给予等体积生理盐水。除空白组外, 各组在给药 6、8、10、12 d 腹腔注射  $80 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  环磷酰胺生理盐水溶液。

**2.2.2 小鼠体重及免疫器官指数测定** 给药 14 d 后小鼠眼眶取血及离心分离血清冻存备用。无菌条件下取胸腺和脾脏计算胸腺指数、脾脏指数。

**2.2.3 小鼠血清免疫球蛋白水平测定** 按照 ELISA 试剂盒说明书检测小鼠血清中 IgG、IgM 的含量。

### 2.3 茴香胶囊对浓氨水引咳小鼠咳嗽潜伏期及咳嗽次数的影响

按参考文献方法并改进, 建立小鼠咳嗽模型<sup>[11]</sup>: 60 只雄性 ICR 小鼠分为空白组, 喷托维林组 ( $15.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 桂龙咳喘宁组 ( $0.68 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 茴香胶囊低、中、高剂量组 ( $0.36$ 、 $0.72$ 、 $1.44 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 每组 10 只。各给药组每日灌胃给药 1 次, 连续 10 d, 空白组给予等体积生理盐水。末次给药 1 h 后, 在操作台上倒扣 500 mL 的广口瓶, 里面放置一团带有 0.3 mL 浓氨水的棉花, 挥发 20 s 后取出棉花, 将小鼠迅速放至广口瓶内, 观察并记录小鼠咳嗽潜伏期以及 2 min 内咳嗽次数。

### 2.4 茴香胶囊对小鼠气管酚红排泌量的影响

建立小鼠气管酚红排泌模型<sup>[11]</sup>, 动物选取及给药方式同“2.3”项下, 阳性药变更为氨溴索 ( $0.027 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。末次给药 1 h 后, 小鼠腹腔注射 5% 酚红生理盐水溶液  $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 30 min 后取下气管放入 4 mL 生理盐水中, 加入 5% 碳酸氢钠溶液 0.2 mL, 振摇使气管中的酚红完全释放。在 546 nm 测定 OD 值, 根据酚红的标准曲线计算出酚红的排泌量。

### 2.5 茴香胶囊对 BA 小鼠气道炎症及气道重塑的影响

**2.5.1 动物分组、造模及给药** 将 56 只小鼠按体重随机分为空白组, 模型组, 地塞米松组 ( $1.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 桂龙咳喘宁组 ( $0.68 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 茴香胶囊低、中、高剂量组 ( $0.36$ 、 $0.72$ 、 $1.44 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。结合文献与预实验结果, 制备 BA 模型<sup>[12]</sup>: 除了空白组以外, 其余小鼠分别于第 1 日和第 8 日腹腔注射 0.2 mL 致敏液 ( $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  OVA, 氢氧化铝胶生理盐水稀释液) 致敏两次, 空白组小鼠注入等量的生理盐水, 第 15 日开始用 2% OVA 生理盐水溶液雾化共 21 d, 每日雾化一次, 每次 40 min。给药组于实验第 15 日起每次雾化前 1 h 灌胃给药, 共给药 21 d。以小鼠出现挠鼻子、打喷嚏、收腹样喘促等哮喘样症状, 肺组织中支气管出现炎性细胞浸润、肺泡管壁增厚、胶原沉积等病理改变为造模成功标准<sup>[13]</sup>。

**2.5.2 小鼠一般状态观察** 观察小鼠体重变化, 及挠鼻子、打喷嚏、收腹样喘促等哮喘样症状。

**2.5.3 小鼠血清 IgE 水平检测** 小鼠摘眼球取血放置离心管中, 离心, 取血清冻存, 用于检测 IgE。

**2.5.4 炎症因子检测** 分离气管周围组织, 结扎右肺, 在气管上段做一横切口, 将 1 mL 注射器针头插入气管内, 并用无菌缝合线打结固定, 将 0.8 mL 预冷的 PBS 缓冲液缓慢注射, 反复灌洗左肺共两次, 离心, 取上清液冻存, 测定 IL-4、IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$ 1 及 IL-17A 水平; BALF 沉淀用 0.2 mL PBS 液重悬, 检测炎症细胞计数。

**2.5.5 病理形态学变化** 将右肺甲醛固定, 脱水、包埋、切片、脱蜡、染色、封片, 观察病理形态学改变。采用 Image J 软件计算 Masson 染色中胶原沉积占比<sup>[14]</sup>。

**2.5.6 RT-qPCR 检测 TGF- $\beta$ 1/Smad2/3 通路相关蛋白表达** 取肺组织提取总 RNA, 将 RNA 反转录为 cDNA 后进行扩增, 检测 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3、 $\alpha$ -SMA、VEGF 的 mRNA 相对表达量。各引物序列见表 1。



表 1 荧光定量 PCR 引物序列信息  
Tab 1 PCR primer sequence information

引物名称	序列 (5' → 3')	产物大小 / bp
TGF-β1-F	CTTCAATACGTCAGACATTCGGG	142
TGF-β1-R	GTAACGCCAGGAATTGTTGCTA	
Smad2-F	ATGTCGTCCATCTTGCCATTC	173
Smad2-R	AACCGTCCTGTTCTTTAGCTT	
Smad3-F	TCTCCCCGAATCCGATGTCC	108
Smad3-R	GCTGGTTCAGCTCGTAGTAGG	
α-SMA-F	GTCCCAGACATCAGGGAGTAA	102
α-SMA-R	TCGGATACTTCAGCGTCAGGA	
VEGF-F	GCACATAGAGAGAATGAGCTC	105
VEGF-R	CTCCGCTCTGAACAAGGCTT	
β-actin-F	GTGACGTTGACATCCGTAAGA	245
β-actin-R	GCCGGACTCATCGTACTCC	

**2.5.7 Western blot 检测 TGF-β1/Smad2/3 通路相关蛋白表达** 将所需检测的蛋白裂解后测定样品蛋白浓度，电泳、转膜、封闭、膜与对应一抗 (TGF-β1、Smad2、Smad3、β-actin) 4℃ 过夜，再与相应二抗孵育 2 h，ECL 试剂显影，蛋白条带灰度值使用软件 Image J 处理进行统计。

**2.5.8 统计学分析** 采用 SPSS 27.0、GraphPad Prism 10.0 软件进行数据分析及作图，结果以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。数据采用单因素方差分析 (One way ANOVA)。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 体重变化

与空白组比较，模型组小鼠体重增长率显著降低 (P < 0.01)；与模型组比较，玉屏风颗粒组，茴香胶囊中、高剂量组小鼠体重增长率均显著上升 (P < 0.05 或 P < 0.01)(见表 2)。

表 2 茴香胶囊对免疫低下小鼠体重的影响 (n = 8)

Tab 2 Effect of Huixiang capsule on body weight of immune compromised mice (n = 8)

组别	末始体重 / g
空白组	29.06 ± 1.67
模型组	27.14 ± 1.01 <sup>###</sup>
左旋咪唑组	28.60 ± 1.46*
玉屏风颗粒组	28.90 ± 1.10**
茴香胶囊低剂量	28.30 ± 0.82
茴香胶囊中剂量	28.53 ± 0.79*
茴香胶囊高剂量	28.86 ± 1.04**

注 (Note)：与空白组比较，<sup>###</sup>P < 0.01；与模型组比较，\*P < 0.05，\*\*P < 0.01 (vs the blank group, <sup>###</sup>P < 0.01; vs the model group, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01)。

#### 3.2 免疫器官指数

与空白组比较，模型组小鼠胸腺指数、脾脏指数显著降低 (P < 0.01)；与模型组比较，茴

香胶囊高剂量组、左旋咪唑组胸腺指数显著升高 (P < 0.05)；茴香胶囊高剂量组、玉屏风颗粒组脾脏指数显著升高 (P < 0.05)(见表 3)。

表 3 茴香胶囊对免疫低下小鼠免疫器官指数的影响 (n = 8)

Tab 3 Effect of Huixiang capsule on immune organ index in immune compromised mice (n = 8)

组别	胸腺指数 / (mg · g <sup>-1</sup> )	脾脏指数 / (mg · g <sup>-1</sup> )
空白组	1.63 ± 0.24	3.30 ± 0.43
模型组	0.73 ± 0.19 <sup>###</sup>	1.58 ± 0.27 <sup>###</sup>
左旋咪唑组	1.07 ± 0.12*	1.98 ± 0.13
玉屏风颗粒组	1.06 ± 0.19	2.03 ± 0.20*
茴香胶囊低剂量	0.91 ± 0.15	1.64 ± 0.21
茴香胶囊中剂量	0.95 ± 0.08	1.95 ± 0.22
茴香胶囊高剂量	1.02 ± 0.09*	2.03 ± 0.22*

注 (Note)：与空白组比较，<sup>###</sup>P < 0.01；与模型组比较，\*P < 0.05 (vs the blank group, <sup>###</sup>P < 0.01; vs the model group, \*P < 0.05)。

#### 3.3 免疫因子水平

与空白组比较，模型组小鼠血清 IgM、IgG 含量显著降低 (P < 0.01)；与模型组比较，各给药组小鼠血清 IgM、IgG 含量均显著升高 (P < 0.01)(见表 4)。

表 4 茴香胶囊对免疫低下小鼠免疫功能的影响 (n = 8)

Tab 4 Effect of Huixiang capsule on immune function in immune compromised mice (n = 8)

组别	IgM / (ng · mL <sup>-1</sup> )	IgG / (ng · mL <sup>-1</sup> )
空白组	4.28 ± 0.31	4.50 ± 0.86
模型组	3.12 ± 0.18 <sup>###</sup>	2.30 ± 0.42 <sup>###</sup>
左旋咪唑组	4.04 ± 0.36**	4.12 ± 0.36**
玉屏风颗粒组	4.06 ± 0.29**	4.25 ± 0.62**
茴香胶囊低剂量	3.68 ± 0.33**	3.73 ± 0.38**
茴香胶囊中剂量	3.91 ± 0.19**	3.94 ± 0.66**
茴香胶囊高剂量	4.03 ± 0.28**	4.11 ± 0.58**

注 (Note)：与空白组比较，<sup>###</sup>P < 0.01；与模型组比较，\*\*P < 0.01 (vs the blank group, <sup>###</sup>P < 0.01; vs the model group, \*\*P < 0.01)。

#### 3.4 咳嗽潜伏期及咳嗽次数

与空白组比较，喷托维林组，茴香胶囊高、中剂量组小鼠咳嗽潜伏期显著延长 (P < 0.05 或 P < 0.01)；各给药组小鼠咳嗽次数均显著减少 (P < 0.05 或 P < 0.01)(见表 5)。

#### 3.5 检测气管酚红排量

与空白组比较，各给药组小鼠酚红排量显著增加 (P < 0.01)，见表 6。

#### 3.6 一般形态学及体重变化

在致敏期间，各组小鼠体征均未见异常，体重呈逐渐增长趋势；在雾化激发过程中 (d22 ~ d29)，与空白组比较，模型组小鼠体重显著降低 (P < 0.05)，并出现挠鼻子、打喷嚏、收腹样喘促等哮喘样症状；

表 5 茴香胶囊对小鼠咳嗽潜伏期及咳嗽次数的影响 (n = 10)

Tab 5 Effect of Huixiang capsule on cough latency and number of coughs in mice (n = 10)

组别	咳嗽潜伏期 /s	咳嗽次数
空白组	23.60 ± 3.44	51.20 ± 8.99
喷托维林组	34.80 ± 8.57*	30.60 ± 8.50**
桂龙咳喘宁组	29.90 ± 7.72	36.00 ± 9.08**
茴香胶囊低剂量	26.40 ± 7.28	43.50 ± 4.45*
茴香胶囊中剂量	30.40 ± 4.45*	41.70 ± 6.00*
茴香胶囊高剂量	33.90 ± 4.01**	38.00 ± 4.73**

注 (Note): 与空白组比较, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 (vs the blank group, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01)。

表 6 茴香胶囊对小鼠气管酚红排泄量的影响 (n = 10)

Tab 6 Effect of Huixiang capsule on tracheal phenol red excretion in mice (n = 10)

组别	酚红排泄量 / (ng · mL <sup>-1</sup> )
空白组	1.15 ± 0.33
氨溴索组	2.90 ± 0.68**
桂龙咳喘宁组	2.59 ± 0.51**
茴香胶囊低剂量	1.93 ± 0.60**
茴香胶囊中剂量	2.60 ± 0.74**
茴香胶囊高剂量	3.16 ± 0.71**

注 (Note): 与空白组比较, \*\*P < 0.01 (vs the blank group, \*\*P < 0.01)。

与模型组比较, 地塞米松组、茴香胶囊高剂量组小鼠体重下降幅度显著减小 (P < 0.05 或 P < 0.01), 哮喘样症状减轻 (见图 1)。

### 3.7 茴香胶囊对血清 IgE 水平的影响

与空白组比较, 模型组小鼠血清 IgE 水平显著升高 (P < 0.01); 与模型组比较, 茴香胶囊高、中剂量组, 地塞米松组, 桂龙咳喘宁组小鼠血清 IgE 水平显著降低 (P < 0.05 或 P < 0.01)(见表 7)。

### 3.8 茴香胶囊对 IL-4、IFN-γ、TGF-β1、IL-17A 水平的影响

表 8 茴香胶囊对小鼠 BALF 中 IL-4、IFN-γ、TGF-β1、IL-17A 水平的影响 (n = 8)

Tab 8 Effect of Huixiang capsule on levels of IL-4, IFN-γ, TGF-β1, and IL-17A in BALF of mice (n = 8)

组别	IL-4/ (pg · mL <sup>-1</sup> )	IFN-γ/ (pg · mL <sup>-1</sup> )	TGF-β1/ (ng · mL <sup>-1</sup> )	IL-17A/ (ng · mL <sup>-1</sup> )
空白组	25.55 ± 2.22	172.50 ± 30.52	0.33 ± 0.07	45.18 ± 3.97
模型组	45.60 ± 5.22 <sup>#</sup>	70.57 ± 13.71 <sup>#</sup>	0.79 ± 0.17 <sup>#</sup>	66.09 ± 8.39 <sup>#</sup>
地塞米松组	28.66 ± 1.72**	163.74 ± 18.60**	0.39 ± 0.06**	41.00 ± 4.14**
桂龙咳喘宁组	28.00 ± 1.69**	168.20 ± 14.78**	0.41 ± 0.06**	46.79 ± 7.09**
茴香胶囊低剂量组	32.00 ± 3.53**	110.03 ± 25.97*	0.47 ± 0.06*	51.56 ± 10.19**
茴香胶囊中剂量组	31.18 ± 2.76**	150.35 ± 32.00**	0.44 ± 0.07**	48.23 ± 6.21**
茴香胶囊高剂量组	29.95 ± 6.15**	160.93 ± 29.90**	0.42 ± 0.02**	40.39 ± 6.69**

注 (Note): 与空白组比较, <sup>#</sup>P < 0.01; 与模型组比较, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 (vs the blank group, <sup>#</sup>P < 0.01; vs the model group, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01)。

### 3.9 茴香胶囊对 BALF 中炎症细胞计数的影响

与空白组比较, 模型组小鼠 BALF 炎症细胞数量均显著升高 (P < 0.01); 与模型组比

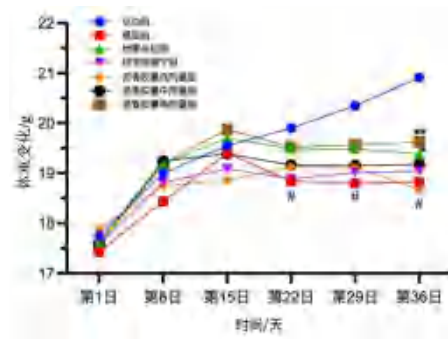


图 1 各组小鼠体重变化 (n = 8)

Fig 1 Changes in body mass of mice in each group (n = 8)

注 (Note): 与空白组比较, \*P < 0.05; 与模型组比较, <sup>#</sup>P < 0.05, \*\*P < 0.01 (vs the blank group, \*P < 0.05; vs the model group, <sup>#</sup>P < 0.05, \*\*P < 0.01)。

表 7 茴香胶囊对小鼠血清 IgE 水平的影响 (n = 8)

Tab 7 Effect of Huixiang capsule on the serum IgE levels in mice (n = 8)

组别	IgE/ (ng · mL <sup>-1</sup> )
空白组	2486.23 ± 346.40
模型组	5657.94 ± 626.94 <sup>#</sup>
地塞米松组	2871.66 ± 188.69**
桂龙咳喘宁组	2948.10 ± 296.00*
茴香胶囊低剂量组	3928.37 ± 444.02
茴香胶囊中剂量组	3404.25 ± 503.90*
茴香胶囊高剂量组	3047.59 ± 259.11*

注 (Note): 与空白组比较, <sup>#</sup>P < 0.01; 与模型组比较, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 (vs the blank group, <sup>#</sup>P < 0.01; vs the model group, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01)。

与空白组比较, 模型组小鼠 BALF 中 IL-4、TGF-β1、IL-17A 水平显著升高 (P < 0.01), IFN-γ 水平显著降低 (P < 0.01); 与模型组比较, 各给药组小鼠 IL-4、TGF-β1、IL-17A 水平显著降低 (P < 0.05 或 P < 0.01), IFN-γ 水平显著升高 (P < 0.05 或 P < 0.01)(见表 8)。

较, 各给药组以上指标均显著降低 (P < 0.05 或 P < 0.01)(见表 9)。

表 9 茴香胶囊对各组小鼠 BALF 炎症细胞数量的影响 ( $n = 8, \times 10^9 \cdot L^{-1}$ )

Tab 9 Effect of Huixiang capsule on number of inflammatory cells in BALF of mice in each group ( $n = 8, \times 10^9 \cdot L^{-1}$ )

组别	WBC	Neu	Lym	Mon	Eos
空白组	1.01±0.13	0.24±0.08	0.20±0.03	0.05±0.03	0.64±0.21
模型组	3.68±0.84 <sup>###</sup>	0.69±0.09 <sup>###</sup>	1.07±0.17 <sup>###</sup>	0.24±0.071 <sup>###</sup>	2.20±0.51 <sup>###</sup>
地塞米松组	1.29±0.52 <sup>**</sup>	0.25±0.11 <sup>**</sup>	0.26±0.03 <sup>**</sup>	0.08±0.04 <sup>**</sup>	0.76±0.34 <sup>**</sup>
桂龙咳喘宁组	1.22±0.49 <sup>**</sup>	0.29±0.17 <sup>**</sup>	0.27±0.05 <sup>**</sup>	0.06±0.02 <sup>**</sup>	0.92±0.27 <sup>**</sup>
茴香胶囊低剂量组	2.07±0.56 <sup>*</sup>	0.33±0.13 <sup>**</sup>	0.73±0.98 <sup>*</sup>	0.13±0.03 <sup>**</sup>	1.18±0.27 <sup>**</sup>
茴香胶囊中剂量组	1.68±0.68 <sup>**</sup>	0.28±0.06 <sup>**</sup>	0.51±0.16 <sup>**</sup>	0.12±0.03 <sup>**</sup>	0.90±0.52 <sup>**</sup>
茴香胶囊高剂量组	1.27±0.42 <sup>**</sup>	0.25±0.07 <sup>**</sup>	0.35±0.11 <sup>**</sup>	0.10±0.03 <sup>**</sup>	0.79±0.19 <sup>**</sup>

注 (Note): 与空白组比较, <sup>###</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  (vs the blank group, <sup>###</sup> $P < 0.01$ ; vs the model group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ )。

### 3.10 病理形态学变化

HE 染色结果显示, 空白组小鼠肺组织结构正常, 无炎症细胞浸润; 模型组小鼠支气管管腔变窄, 有炎症细胞浸润, 黏液分泌增加; 与模型组比较, 炎症细胞浸润减轻, 黏液分泌减

少。Masson 染色结果显示, 与空白组比较, 模型组小鼠肺组织胶原沉积增多 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各给药组小鼠肺组织胶原沉积减轻 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ) (见图 2、3 及表 10)。



图 2 HE 染色检测各组小鼠肺组织病理变化 ( $\times 400$ )

Fig 2 Histopathological changes in the lungs of mice in various groups by HE staining ( $\times 400$ )



图 3 Masson 染色检测各组小鼠肺组织纤维化程度 ( $\times 400$ )

Fig 3 Degree of fibrosis in the lung tissue of mice in each group by Masson staining ( $\times 400$ )

表 10 茴香胶囊对各组小鼠肺组织胶原沉积的影响 ( $n = 4$ )

Tab 10 Effect of Huixiang capsule on collagen deposition in lung tissue of mice in each group ( $n = 4$ )

组别	胶原沉积占比 /%
空白组	8.59±1.43
模型组	16.76±1.77 <sup>###</sup>
地塞米松组	9.85±0.78 <sup>**</sup>
桂龙咳喘宁组	9.79±0.28 <sup>**</sup>
茴香胶囊低剂量组	14.00±1.02 <sup>*</sup>
茴香胶囊中剂量组	10.83±1.44 <sup>**</sup>
茴香胶囊高剂量组	10.35±0.53 <sup>**</sup>

注 (Note): 与空白组比较, <sup>###</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  (vs the blank group, <sup>###</sup> $P < 0.01$ ; vs the model group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ )。

### 3.11 RT-qPCR 法检测小鼠肺组织相关基因 mRNA 表达量

与空白组比较, 模型组小鼠 *TGF-β1*、*Smad2*、

*Smad3*、*α-SMA*、*VEGF* mRNA 表达量显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各给药组以上基因 mRNA 表达量显著下降 ( $P < 0.05$ ) (见表 11)。

### 3.12 Western blot 法检测小鼠肺组织相关蛋白表达量

与空白组比较, 模型组小鼠 *TGF-β1*、*Smad2* 蛋白表达显著上升 ( $P < 0.05$ ), *Smad3* 蛋白表达上升, 但无显著差异; 与模型组比较, 茴香胶囊高剂量组 *TGF-β1*、*Smad2*、*Smad3* 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.05$ ) (见图 4)。

## 4 讨论

BA 是一种慢性呼吸道疾病, 受遗传因素和环境因素的双重影响<sup>[15]</sup>, 全球 3 亿多人患有 BA, 且其患病率每年持续增加<sup>[16]</sup>, 已成为世界性的公共健康问题。气道炎症是 BA 发病的核心环节, 气道重塑是气道炎症慢性化发展的必然结果。气道重塑



表 11 茴香胶囊对小鼠肺组织中 *TGF-β1*、*Smad2*、*Smad3*、*α-SMA*、*VEGF* mRNA 表达量的影响 ( $n = 4$ )

Tab 11 Effect of Huixiang capsule on changes in *TGF-β1*, *Smad2*, *Smad3*, *α-SMA*, and *VEGF* mRNA expression in lung tissues of mice ( $n = 4$ )

组别	<i>TGF-β1</i>	<i>Smad2</i>	<i>Smad3</i>	<i>α-SMA</i>	<i>VEGF</i>
空白组	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.10	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.13
模型组	1.93 ± 0.16 <sup>###</sup>	1.63 ± 0.15 <sup>###</sup>	1.87 ± 0.11 <sup>###</sup>	2.22 ± 0.24 <sup>###</sup>	1.61 ± 0.15 <sup>###</sup>
地塞米松组	1.08 ± 0.15 <sup>*</sup>	1.03 ± 0.09 <sup>*</sup>	1.29 ± 0.08 <sup>*</sup>	1.11 ± 0.13 <sup>*</sup>	1.08 ± 0.16 <sup>*</sup>
桂龙咳喘宁组	1.23 ± 0.16 <sup>*</sup>	1.30 ± 0.09 <sup>*</sup>	1.09 ± 0.10 <sup>*</sup>	1.23 ± 0.16 <sup>*</sup>	1.19 ± 0.13 <sup>*</sup>
茴香胶囊低剂量组	1.44 ± 0.06 <sup>*</sup>	1.34 ± 0.17 <sup>*</sup>	1.33 ± 0.13 <sup>*</sup>	1.47 ± 0.04 <sup>*</sup>	1.32 ± 0.14 <sup>*</sup>
茴香胶囊中剂量组	1.40 ± 0.09 <sup>*</sup>	1.33 ± 0.08 <sup>*</sup>	1.05 ± 0.10 <sup>*</sup>	1.28 ± 0.16 <sup>*</sup>	1.32 ± 0.08 <sup>*</sup>
茴香胶囊高剂量组	1.33 ± 0.11 <sup>*</sup>	1.16 ± 0.10 <sup>*</sup>	1.02 ± 0.12 <sup>*</sup>	1.07 ± 0.13 <sup>*</sup>	1.09 ± 0.14 <sup>*</sup>

注 (Note): 与空白组比较, <sup>###</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$  (vs the blank group, <sup>###</sup> $P < 0.01$ ; vs the model group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ )。

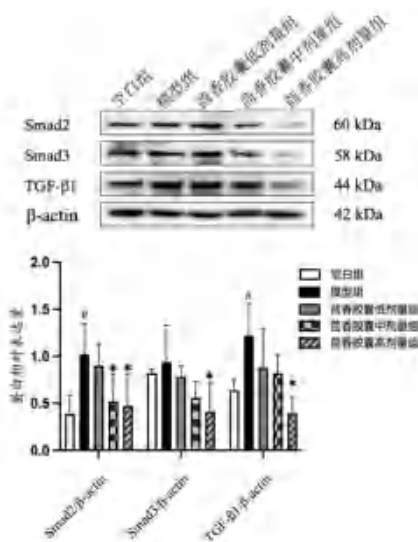


图 4 茴香胶囊对各组小鼠肺组织中 *TGF-β1*、*Smad2*、*Smad3* 蛋白表达的影响 ( $n = 3$ )

Fig 4 Effect of Huixiang capsule on expression of *TGF-β1*, *Smad2*, and *Smad3* protein of mice in each group ( $n = 3$ )

注 (Note): 与空白组比较, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$  (vs the blank group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; vs model group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ )。

可引起气道结构的组织学改变, 包括气道基底膜增厚、平滑肌增生、纤维化增加等, 从而导致肺功能下降<sup>[17]</sup>。维医学认为 BA 起初是在内外诱因的作用下, 使机体体液平衡失调, 异常黏液质过盛并沉积于局部 (尤其是气道) 导致肺和气道的气质失调, 从而形成炎症。因此清除异常黏液质, 增加体液平衡, 减少炎症是治疗 BA 的主要原则。茴香胶囊的功效与 BA 发作的内因“脾肺不足、肺气虚弱, 卫气不固”相符, 方中黄芪大补元气、健脾、补肺固表为主药; 茴香根皮、防风、白术增强免疫、理气化痰、祛风止咳为辅药。全方共有补肺健脾益气、止咳化痰之效, 可预防和减少 BA 发作。

免疫器官、免疫细胞、免疫分子是免疫系统的重要组成部分。脾脏是发生免疫活动的重要器官。胸腺是 T 细胞分化和成熟的场所, 可参与机体细胞免疫过程, 使机体保持免疫稳态, 脾脏和胸

腺指数可以反映机体的免疫功能<sup>[18]</sup>。IgE、IgG、IgM 是反映体液免疫的重要指标。本研究通过小鼠免疫低下模型, 氨水引咳法和气管酚红排泌法证明茴香胶囊可提高小鼠体内免疫调节功能, 缓解小鼠咳嗽, 增加小鼠酚红排泌量, 具有增强免疫, 止咳祛痰作用。

BA 的发病机制复杂, 目前主要认为, 嗜酸性粒细胞和肥大细胞积累, Th1/Th2 比例和功能失衡导致 BA 的发生<sup>[19]</sup>。Th1 细胞产生的 IFN- $\gamma$  可以抑制炎症细胞的活性, Th2 细胞产生的 IL-4 能通过促进 B 细胞的活化、分化, 诱导 IgE 的合成, 而 IgE 的过度释放亦会引起嗜酸性粒细胞、肥大细胞、中性粒细胞等炎症因子释放, 引发气道炎症和气道重塑<sup>[20]</sup>。常用 IFN- $\gamma$ /IL-4 反映 Th1/Th2 失衡<sup>[21-22]</sup>。IL-17A 通过释放促炎因子和中性粒细胞等趋化因子<sup>[23]</sup>, 促进气道炎症, 诱发起道重塑<sup>[24-25]</sup>。本研究中, 经茴香胶囊给药干预后, 各剂量组小鼠 IL-4、*TGF-β1*、IL-17A、IgE 水平降低, 炎症细胞数量降低, IFN- $\gamma$  水平升高, 肺组织肺泡管壁增厚程度减轻, 炎性细胞浸润及胶原沉积减少、黏液分泌降低, 可知茴香胶囊可能通过改善哮喘小鼠中 Th1/Th2 失衡、减少肺组织中的炎症细胞浸润, 从而减轻气道炎症和气道重塑。

*TGF-β1* 是一种重要的免疫调节因子, 可由肺组织中多种免疫细胞合成分泌, 在 BA 患者中显著高于正常人。*TGF-β1* 可刺激气道和血管平滑肌细胞增殖及表型转化, 促进血管生成, 诱导细胞外基质、蛋白酶抑制物的合成和其他生长因子的基因表达, 诱导气道成纤维细胞的分裂增殖, 促进成纤维细胞向成肌纤维细胞转化, 增加纤维黏蛋白和胶原的合成<sup>[26]</sup>。*Smad* 蛋白是细胞内唯一的 *TGF-β1* 受体激酶底物, 通过调控细胞的增殖、转化、合成和凋亡等过程, 将 *TGF-β1* 受体复合物下游信号从细胞膜转运到细胞核, 介导 *TGF-β1* 细胞内信号转导并促进靶基因的转录。BA 发病时, 肺和气管内多种炎症

细胞可以释放出大量的 TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1 介导下游的 Smad 蛋白发生磷酸化, 通过自分泌和旁分泌途径激活 Smad2/3 通路, Smad2、Smad3 磷酸化后促进  $\alpha$ -SMA、VEGF 的表达, 加重气道重塑<sup>[27]</sup>。本实验中, 茴香胶囊可下调肺组织中 TGF- $\beta$ 1、Smad2、Smad3、 $\alpha$ -SMA、VEGF 的 mRNA 和蛋白表达。

综上所述, 茴香胶囊可通过增强体内免疫功能, 止咳祛痰, 改善 BA 小鼠中 Th1/Th2 失衡, 减少肺组织中的炎性细胞的浸润, 改善气道重塑, 其作用机制可能与其下调 TGF- $\beta$ 1、Smad2/3 mRNA 及蛋白的表达有关。本研究为临床用药提供了实验依据, 但是 BA 气道重塑的机制仍然较为复杂, 还需进一步研究。

### 参考文献

- [1] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南 (2020 年版) [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2020, 43 (12): 1023-1048.
- [2] Cloutier MM, Dixon AE, Krishnan JA, et al. Managing asthma in adolescents and adults: 2020 asthma guideline update from the national asthma education and prevention program [J]. JAMA, 2020, 324 (22): 2301-2317.
- [3] 郭旭冉, 郑海涛, 陈晨, 等. 搜风愈喘方调控 TGF- $\beta$ 1/Smad2/3 信号通路干预哮喘大鼠气道重塑的作用机制 [J]. 中药药理与临床, 2023, 39 (7): 14-20.
- [4] Lee JE, Im DS. Suppressive effect of carnosol on ovalbumin induced allergic asthma [J]. Biomol Ther (Seoul), 2021, 29 (1): 58-63.
- [5] 刘双利, 姜程曦, 赵岩, 等. 防风化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48 (10): 2146-2152.
- [6] 张晓娟, 左冬冬. 白术化学成分及药理作用研究新进展 [J]. 中医药信息, 2018, 35 (6): 101-106.
- [7] 林国栋. 牛至精油提取工艺、化学成分及生物活性研究 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2022.
- [8] 黄文鑫, 石绍顺. 基于 TGF- $\beta$ 1/Smad、NF- $\kappa$ B 的中药干预哮喘气道重塑实验研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25 (9): 127-133.
- [9] 张倩, 乔赞, 时宜蓉, 等. 基于 TGF- $\beta$ 1/Smad3 信号通路探讨针刺抗哮喘气道重塑的作用机制 [J]. 中国针灸, 2023, 43 (6): 684-690.
- [10] 胡逸中, 薛征, 胡炆. 黄芪甲苷对环磷酰胺所致免疫抑制小鼠免疫功能的影响 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32 (8): 1843-1844.
- [11] 廖万忠, 刘微, 周贤强, 等. 霸王花提取物止咳祛痰抗炎镇痛作用及初步机制研究 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33 (4): 821-823.
- [12] 戎晓娟, 孔令霏, 康雨彤, 等. 基于脂质代谢组学的卵白蛋白诱导小鼠过敏性哮喘机制研究 [J]. 中国药理学通报, 2023, 39 (3): 477-483.
- [13] 代晓寒, 赵霞, 严花, 等. 固本防哮饮对支气管哮喘缓解期模型小鼠肺组织氧化应激与 AMPK/Nrf2/HO-1 通路的影响 [J]. 中医杂志, 2024, 1 (9): 1-8.
- [14] 李重, 程俊敏, 彭红星, 等. 四逆汤抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路改善过敏性哮喘小鼠气道重塑 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47 (22): 6191-6198.
- [15] Camoretti M, Blanca L, Richard F, et al. Airway smooth muscle pathophysiology in asthma [J]. J Allergy Clin Immunol, 2021, 147 (6): 1983-1996.
- [16] Papi A, Brightling C, Pedersen SE, et al. Asthma [J]. The Lancet, 2018, 391 (101): 783-790.
- [17] Dong LY, Wang Y, Zhang TT, et al. Hypoxic hUCMSC derived extracellular vesicles attenuate allergic airway inflammation and airway remodeling in chronic asthma mice [J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12 (1): 534-539.
- [18] Pozios I, Knosel T, Zhao Y, et al. Expression of phosphorylated estrogen receptor beta is an independent negative prognostic factor for pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2018, 144 (10): 1887-1897.
- [19] 冯玲, 许玉竹, 高燕, 等. METTL3 对重症支气管哮喘小鼠 T 细胞分化的影响 [J]. 国际呼吸杂志, 2023, 43 (7): 830-836.
- [20] 郭音, 孟维金, 孙健康, 等. UBC13 对支气管哮喘模型小鼠 Th2、Th17 型细胞极化的影响 [J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47 (4): 1148-1155.
- [21] 朱小石, 张渝, 邓俊超, 等. 哮喘儿童血清中 IgE、TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$  水平与疾病严重程度的相关性分析 [J]. 西部医学, 2019, 31 (10): 1573-1576.
- [22] Gibbons FK, Israel E, Deykin A, et al. The combined effects of zafirlukast, prednisone, and inhaled budesonide on IL-13 and IFN- $\gamma$  secretion [J]. J Clin Immunol, 2005, 25 (5): 437-444.
- [23] 许婷, 崔壮, 王俊洁, 等. 芳香烃受体通过介导 Th17/Treg 分化调控哮喘对过敏原诱导的哮喘 [J]. 南方医科大学学报, 2021, 41 (5): 716-721.
- [24] Hong YF, Chu ZI, Kong JW, et al. IL-17A aggravates asthma-induced intestinal immune injury by promoting neutrophil trafficking [J]. J Leukoc Biol, 2022, 11 (2): 425-435.
- [25] Zhang BB, Zeng MN, Zhang QQ, et al. Ephedrae herba polysaccharides inhibit the inflammation of ovalbumin induced asthma by regulating Th1/Th2 and Th17/Treg cell immune imbalance [J]. Mol Immunol, 2022, 15 (2): 14-26.
- [26] Kremer M, Son G, Zhang K, et al. Smad3 signaling in the regenerating liver: implications for the regulation of IL-6 expression [J]. Transplant international, 2014, 27 (7): 748-758.
- [27] Chuan JH, Yan S, Na L, et al. IL-27 attenuates airway inflammation and epithelial mesenchymal transition in allergic asthmatic mice possibly via the RhoA/ROCK signalling pathway [J]. Eur Cytokine Netw, 2022, 33 (1): 13-24.

(收稿日期: 2024-04-08; 修回日期: 2024-06-05)

# 基于 UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> 的倒提壶指纹图谱的 建立和多指标含量测定

阿迪莱·阿不力米提<sup>1</sup>, 滕亮<sup>2</sup>, 马桂芝<sup>1, 3\*</sup> (1. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆医科大学第一附属医院药学部, 乌鲁木齐 830054; 3. 新疆及中亚特色医药资源教育部工程研究中心, 乌鲁木齐 830017)

**摘要:** **目的** 对倒提壶进行化学成分分析, 建立倒提壶高效液相色谱 (HPLC) 指纹图谱, 并对 5 种成分进行定量分析, 对不同来源的倒提壶进行质量评价。**方法** 采用超高效液相色谱四极杆-飞行时间串联质谱法 (UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>) 结合 UNIFI 数据库对倒提壶的化学成分进行鉴定; 采用 Agilent ZORBAX SB C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以乙腈 (A)-0.2% 磷酸溶液 (B) 为流动相, 梯度洗脱; 流速为 1 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温为 30 °C; 检测波长为 354 nm; 进样量为 10 μL。建立 15 批倒提壶的 HPLC 指纹图谱, 进行相似度评价, 采用 2 种化学模式识别方法综合分析不同来源倒提壶的差异, 并对 5 种成分进行定量分析。**结果** 在正离子模式下共鉴定出 8 个化合物, 负离子模式下鉴定出 16 个化合物; 建立了倒提壶 HPLC 指纹图谱共有模式, 确定了 14 个共有峰, 指认了 5 种成分, 相似度均大于 0.900, 5 种成分定量分析方法符合方法学要求。**结论** 基于 UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> 分析结果所建立的 HPLC 指纹图谱和多指标成分定量分析方法准确可靠, 可为倒提壶的质量控制提供参考。

**关键词:** 倒提壶; 化学成分; 指纹图谱; 定量分析; HPLC

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)08-2033-07  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.011

## Fingerprints and multi-component content determination of *Cynoglossum officinale* L. based on UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>

Adila Ablimit<sup>1</sup>, TENG Liang<sup>2</sup>, MA Gui-zhi<sup>1, 3\*</sup> (1. School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011; 2. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054; 3. Engineering Research Center of Xinjiang and Central Asian Medicinal Resources, Ministry of Education, Urumqi 830017)

**Abstract: Objective** To identify the main chemical constituents of *Cynoglossum officinale* L., establish an HPLC fingerprint of *Cynoglossum officinale* L., quantitatively analyze 5 components, and evaluate the quality of *Cynoglossum officinale* L. from different sources. **Methods** The chemical constituents in *Cynoglossum officinale* L. were qualitatively analyzed by ultra performance liquid chromatography quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>) combined with UNIFI database. The separation was performed on an Agilent ZORBAX SB C<sub>18</sub> column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), with a gradient elution of acetonitrile (A)-0.2% phosphoric acid solution (B) as the mobile phase. The flow rate was 1 mL·min<sup>-1</sup>, the column temperature was 30 °C, the detection wavelength was 354 nm, and the injection volume was 10 μL. The HPLC fingerprints of 15 batches of *Cynoglossum officinale* L. were evaluated for similarity, and 2 chemical pattern recognition methods were used to comprehensively analyze the differences between different sources of *Cynoglossum officinale* L. and quantify the 5 components. **Results** Totally 8 compounds were identified in the positive ion mode and 16 compounds were identified in the negative ion mode. The

基金项目: 新疆维吾尔自治区重大科技专项项目 (No.2022A03019-3)。

作者简介: 阿迪莱·阿不力米提, 女, 在读硕士研究生, 主要从事药品质量标准研究, email: a1505226228@163.com \*通信作者: 马桂芝, 女, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药 (民族药) 物质基础研究, email: maguizhi000@126.com



HPLC fingerprinting common mode of *Cynoglossum officinale* L. was established, and 14 common peaks were identified to designate the 5 components, with similarities greater than 0.900. The quantitative analysis of the 5 components met the methodological requirements. **Conclusion** The HPLC fingerprints and quantitative analysis methods of the multi-indicator components are accurate and reliable, which can provide a reference for the quality control of *Cynoglossum officinale* L..

**Key words:** *Cynoglossum officinale* L.; chemical composition; fingerprint; quantitative analysis; HPLC

倒提壶 (*Cynoglossum officinale* L.), 又称红花琉璃草, 是紫草科 (*Boraginaceae*) 琉璃草属 (*Cynoglossum*) 多年生草本植物, 维吾尔名为都拉高孜弯, 主要分布于云南、贵州、重庆、新疆等地<sup>[1]</sup>, 《维吾尔药志》中记载倒提壶具有清热解毒、降压清脑等功效, 用于头痛头晕、高血压、记忆力差、痰喘咳嗽、神经衰弱<sup>[2]</sup>; 《新疆中草药手册》中记载倒提壶主治肺癆咳嗽、失音, 在新疆农村、牧区常用于治疗鼻出血、吐血<sup>[3]</sup>。

目前, 关于该药材化学成分的研究甚少, 质量控制方面的研究主要集中于显微及薄层鉴别<sup>[4-5]</sup>、水分及灰分的检查<sup>[4]</sup>、总黄酮的含量测定<sup>[6]</sup>等方面。现有的研究不足以对该药材进行全面的质量控制, 采用指纹图谱结合多指标定量分析评价不同批次倒提壶药材质量的研究未见报道。中药指纹图谱能客观反映中药整体的化学成分及其相对比例。指纹图谱结合化学计量学既能表征中药的化学成分群整体特征, 又能通过化学

识别模式对指纹图谱中的信息进行深入分析, 通过提取信息间的差异性, 有效评价中药质量<sup>[7-8]</sup>。指纹图谱技术可实现中药的定性分析和特定目标成分定量分析的有机结合, 达到对中药质量进行全面控制的目标。

本文采用 UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> 对倒提壶的化学成分进行研究, 采用 HPLC 法建立倒提壶药材的指纹图谱, 对 5 种有效成分进行定量分析, 并进行相似度评价及化学计量学分析, 表征倒提壶化学成分的整体性及质量差异性, 可为完善倒提壶药材的质量评价体系提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 材料

本研究共收集了 15 批倒提壶药材, 经伊犁食品药品检验所敬松主任鉴定为紫草科 (*Boraginaceae*) 琉璃草属 (*Cynoglossum*) 多年生草本植物倒提壶 (*Cynoglossum officinale* L.) 的全草。样品采集信息见表 1。

表 1 药材采集信息

Tab 1 Collection information of medicinal materials

编号	采集地点	经度 /°	纬度 /°	采集时间
S1	新疆伊犁哈萨克自治州昭苏县后山野狼谷	81.1427	43.2783	2023-08-26
S2	新疆伊犁哈萨克自治州昭苏县后山野狼谷	81.1424	43.2846	2023-08-27
S3	新疆伊犁哈萨克自治州昭苏县后山野狼谷	81.1330	43.2810	2023-08-28
S4	新疆伊犁哈萨克自治州昭苏县后山野狼谷	81.1192	43.2822	2023-08-29
S5	新疆伊犁哈萨克自治州昭苏县后山野狼谷	81.1077	43.2883	2023-08-30
S6	新疆伊犁哈萨克自治州昭苏县后山野狼谷	81.1188	43.2903	2023-08-31
S7	新疆伊犁哈萨克自治州昭苏县后山野狼谷	81.1213	43.2736	2023-09-01
S8	新疆伊犁哈萨克自治州昭苏县后山野狼谷	81.1074	43.2806	2023-09-02
S9	新疆伊犁哈萨克自治州昭苏县 74 团 2 连	80.4538	42.8347	2023-09-05
S10	新疆伊犁哈萨克自治州昭苏县 74 团 2 连	80.4431	42.8243	2023-09-06
S11	新疆伊犁哈萨克自治州昭苏县 74 团 2 连	80.4306	42.8215	2023-09-07
S12	新疆伊犁哈萨克自治州昭苏县 74 团 2 连	80.4154	42.8088	2023-09-08
S13	新疆伊犁哈萨克自治州昭苏县 76 团水库	80.8047	43.0703	2023-09-10
S14	新疆伊犁哈萨克自治州昭苏县 76 团水库	80.7597	43.0581	2023-09-11
S15	新疆伊犁哈萨克自治州昭苏县 76 团水库	80.7844	43.0567	2023-09-12

### 1.2 试药

绿原酸对照品 (批号: A22GB158496)、异槲皮苷对照品 (批号: HJ0604XA13)、咖啡酸对照品 (批号: M28HB183194)、迷迭香酸对照品 (批号: Y06A9K67402) (纯度 ≥ 98%, 上海源叶生物科技有限公司); 芦丁对照品 (成都曼思特

生物科技有限公司, 批号: MUST-16031813, 纯度 ≥ 98%); 甲醇 (批号: WXB8017V)、乙腈 (批号: WXBC4379V, 色谱纯) (美国 Sigma-Aldrich 公司); 磷酸 (上海联合化工厂, 分析纯)。

### 1.3 仪器

Acquity 超高效液相色谱仪、Waters Xevo-

G2-XS-QTOF 质谱仪 (美国 Waters 公司); LC-20AD 高效液相色谱仪 (日本岛津公司); Exceed-Cd-16A 艾柯超纯水仪 (成都唐氏康宁科技发展有限公司); AB135-S 分析天平 (精度: 0.1 mg, 瑞士梅特勒公司); KQ-5200DE 超声波清洗器 (昆山市超声仪器公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 倒提壶化学成分研究

#### 2.1.1 溶液的制备

① 供试品溶液: 精密称定倒提壶药材粉末 0.5 g, 置 50 mL 锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇溶液 10 mL, 称定重量, 50 °C 超声提取 30 min, 室温放冷, 补足减失的重量, 精密量取 0.5 mL 置 25 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇定容, 即得。

② 对照品溶液: 分别取绿原酸、咖啡酸、芦丁、异槲皮苷、迷迭香酸对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含 10.00 μg 各对照品的对照品溶液。

**2.1.2 色谱条件** 采用 ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 以乙腈 (A) -0.1% 甲酸溶液 (B) 为流动相进行梯度洗脱 (0 ~ 1.39 min, 13% ~ 14%A; 1.39 ~ 3.61 min, 14% ~ 15%A; 3.61 ~ 8.61 min, 15%A; 8.61 ~ 10.84 min, 15% ~ 17%A; 10.84 ~ 13.62 min, 17% ~ 19%A; 13.62 ~ 16.40 min, 19%A; 16.40 ~ 20.29 min, 19% ~ 25%A; 20.29 ~ 22.23 min, 25% ~ 45%A; 22.23 ~ 25.01 min, 45% ~ 13%A); 流速为 0.3 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温为 40 °C; 进样量为 2 μL。

**2.1.3 质谱条件** 采用 ESI 电喷雾离子源; MS<sup>E</sup> 正、负离子扫描模式; 质量扫描范围为 *m/z*: 50 ~ 1200; 毛细管电压为 2.5 kV; 锥孔电压为 40 V; 锥孔气流速为 50 L·h<sup>-1</sup>; 脱溶剂氮气流量为 900 L·h<sup>-1</sup>; 离子源温度为 120 °C; 脱溶剂气温度为 450 °C; 低能通道中碰撞能量设置为 6 V; 高能通道中碰撞能量设置为 20 ~ 40 V; 数据采集及分析使用 Masslynx V4.2 质谱分析工作站及 Waters UNIFI V1.8 软件。

**2.1.4 UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> 倒提壶化学成分分析** 取“2.1.1”项下供试品溶液, 按“2.1.2”项下色谱条件和“2.1.3”项下质谱条件进样分析。将数据导入 UNIFI 软件, 通过获得各分子离子峰的精确相对分子量和二级质谱碎片离子峰, 结合对照品保留时间及相关文献, 对倒提壶化学成分进行分析。在负离子模式 (见图 1A) 下共鉴定出 16 种化合物, 包括 5 个黄酮类成分、11 个有机酸类成分; 在正离子模式 (见图 1B) 下共鉴定出 8 个化合物, 包括 3 个黄酮类成分和 5 个生物碱成分。

化合物鉴定数据见表 2。

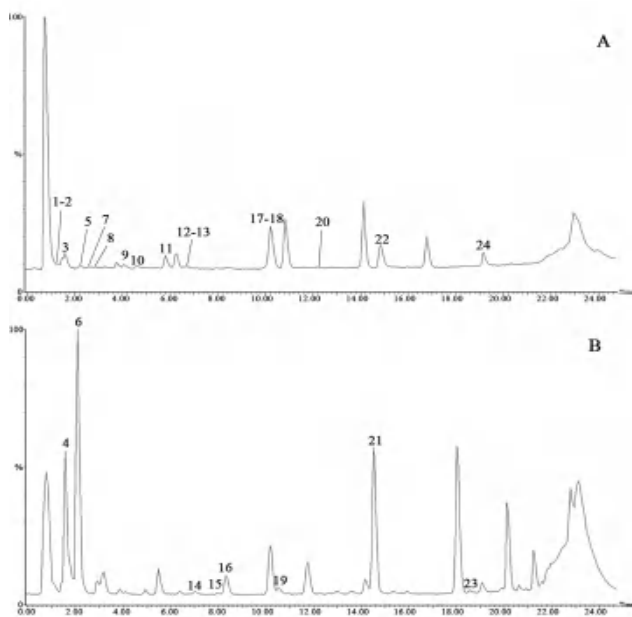


图 1 倒提壶 70% 甲醇提取物在负离子 (A) 和正离子 (B) 模式下的总离子流图

Fig 1 Total ion flow diagram of 70% methanol extract of *Cynoglossum officinale* L. in negative (A) and positive (B) ion mode

### 2.2 倒提壶指纹图谱的建立

#### 2.2.1 溶液的制备

① 供试品溶液: 精密称定倒提壶药材粉末 0.5 g, 置 50 mL 锥形瓶中, 加入 10 mL 70% 甲醇溶液, 精密称定, 50 °C 超声提取 30 min, 放冷, 补足减失的重量, 以 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

② 对照品溶液: 分别取绿原酸、咖啡酸、芦丁、异槲皮苷、迷迭香酸对照品适量, 精密称定, 置量瓶中, 加甲醇使溶解, 定容, 制成含绿原酸、咖啡酸、芦丁、异槲皮苷、迷迭香酸分别为 72.00、19.00、194.00、21.40、589.00 μg·mL<sup>-1</sup> 的混合对照品储备液。

**2.2.2 色谱条件** Agilent ZORBAX SB C<sub>18</sub> 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以乙腈 (A) -0.2% 磷酸溶液 (B) 为流动相, 梯度洗脱 (0 ~ 5 min, 13% ~ 14%A; 5 ~ 13 min, 14% ~ 15%A; 13 ~ 31 min, 15%A; 31 ~ 39 min, 15% ~ 17%A; 39 ~ 49 min, 17% ~ 19%A; 49 ~ 59 min, 19%A; 59 ~ 73 min, 19% ~ 25%A; 73 ~ 80 min, 25% ~ 45%A; 80 ~ 90 min, 45% ~ 13%A); 流速为 1 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温为 30 °C; 检测波长为 354 nm; 进样量为 10 μL。

**2.2.3 方法学验证** 精密称取本品 0.5 g, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.2”项

表 2 倒提壶化学成分质谱信息

Tab 2 Mass spectrometry information of *Cynoglossum officinale* L.

No.	化合物	$t_R$ /min	分子式	实测值 ( $m/z$ )	离子模式	主要的碎片离子
1	苹果酸	1.04	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	133.0138	[M-H] <sup>-</sup>	115.0024
2	柠檬酸	1.10	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	191.0190	[M-H] <sup>-</sup>	191.0190, 146.9668
3	绿原酸*	1.57	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	353.0931	[M-H] <sup>-</sup>	191.0613, 179.0376, 135.0474
4	石松胺-N-氧化物	1.75	C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>6</sub>	316.175	[M+H] <sup>+</sup>	172.0963, 138.0902
5	咖啡酸*	2.18	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	179.0403	[M-H] <sup>-</sup>	135.0474
6	仰卧天芥菜碱	2.20	C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>4</sub>	284.1854	[M+H] <sup>+</sup>	140.1065
7	3-O-trans-coumaroylquinic acid	2.48	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	337.0919	[M-H] <sup>-</sup>	191.0554
8	4-阿魏酰奎宁酸	3.05	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	367.1021	[M-H] <sup>-</sup>	191.0551
9	芦丁*	4.17	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	609.1594	[M-H] <sup>-</sup>	301.0401, 300.0355, 271.0312, 255.0388, 243.0347, 151.0059
10	异槲皮苷*	4.73	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	463.1006	[M-H] <sup>-</sup>	301.0401, 300.0355, 271.0312, 255.0356, 243.0379, 151.0059
11	槲皮素 3-(2"-乙酰半乳糖苷)	5.97	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>13</sub>	505.0982	[M-H] <sup>-</sup>	301.0334, 300.0271, 271.0236
12	紫草酸	6.54	C <sub>27</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	537.1027	[M-H] <sup>-</sup>	339.0494
13	槲皮素-3-O-(6"-O-乙酰基)-β-D-吡喃葡萄糖苷	6.83	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>13</sub>	505.0978	[M-H] <sup>-</sup>	363.0744, 301.0329, 300.0269
14	槲皮素-3-O-芸香糖苷	7.19	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	611.1631	[M+H] <sup>+</sup>	303.0494
15	金丝桃苷	8.10	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	465.1045	[M+H] <sup>+</sup>	303.0509
16	蓝萆定-N-氧化物	8.50	C <sub>20</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>8</sub>	414.2120	[M+H] <sup>+</sup>	254.1375
17	木犀草素 7-O-β-D-(6'-乙酰基)-吡喃葡萄糖苷	10.16	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	489.1028	[M-H] <sup>-</sup>	429.0820, 284.0321
18	迷迭香酸*	10.52	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	359.0863	[M-H] <sup>-</sup>	197.0486, 179.0376, 161.0284, 135.0474
19	槲皮素	10.72	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	303.0504	[M+H] <sup>+</sup>	153.0178
20	丹酚酸 A	12.41	C <sub>26</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	493.1128	[M-H] <sup>-</sup>	295.0692
21	天芥菜品	14.59	C <sub>20</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>7</sub>	398.2164	[M+H] <sup>+</sup>	220.1319, 120.0802
22	丹酚酸 B	15.01	C <sub>36</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	717.1453	[M-H] <sup>-</sup>	519.0921
23	欧天芥菜碱-N-氧化物	18.79	C <sub>16</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>7</sub>	346.2623	[M+H] <sup>+</sup>	172.8714
24	紫草酸单甲酯	19.40	C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	551.1184	[M-H] <sup>-</sup>	393.0580, 321.0398, 293.0453

注：\*为通过与对照品比对确证的成分。

Note: \*the components confirmed by comparison with the standard solution.

下色谱条件进样测定，以 10 号峰（迷迭香酸）为参照峰，分别对方法精密度、稳定性和重复性进行考察。结果显示，精密度试验测得共有峰相对保留时间 RSD 值均小于 0.070%，相对峰面积 RSD 值均小于 3.0%；重复性试验测得共有峰相对保留时间 RSD 均小于 0.49%，相对峰面积 RSD 值均小于 3.0%；稳定性试验测得共有峰相对保留时间 RSD 值均小于 0.10%，相对峰面积 RSD 值均小于 3.0%。所建方法精密度、重复性和稳定性良好，均符合方法学要求。

**2.2.4 HPLC 指纹图谱的建立与分析** 分别取 15 批 (S1 ~ S15) 倒提壶药材粉末，按“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并记录色谱图。将数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”，以 S1 号样品为参照图谱，生成叠加图谱和对照指纹图谱 (见图 2)。共标定 14 个共有峰，通过与混合对照品溶液保留时间、PDA 紫外吸收光谱图比对，指认了其中 5 个共有峰 (见图 3)，峰 1 为绿原酸、峰 3 为咖啡酸、峰 5 为芦丁、峰 6 为异槲皮苷、峰 10 为

迷迭香酸。15 批倒提壶药材相似度均大于 0.900 (见表 3)，说明 15 批药材的质量差异较小，药材质量较稳定，具有较高的相似性。

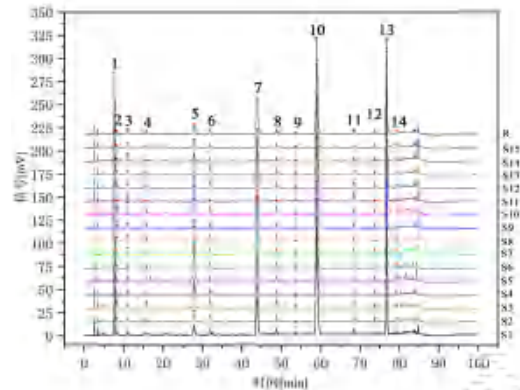


图 2 15 批倒提壶药材叠加指纹图谱

Fig 2 HPLC fingerprints of 15 batches of *Cynoglossum officinale* L.

**2.2.5 化学识别模式分析**

① 主成分分析 (PCA): 采用 SPSS 27 软件对 14 个共有峰峰面积进行标准化处理 [9]，以特征值大于 1 得到了 4 类主成分，结果见表 4。4 类主成分方差百分比分别为 39.794%、13.563%、



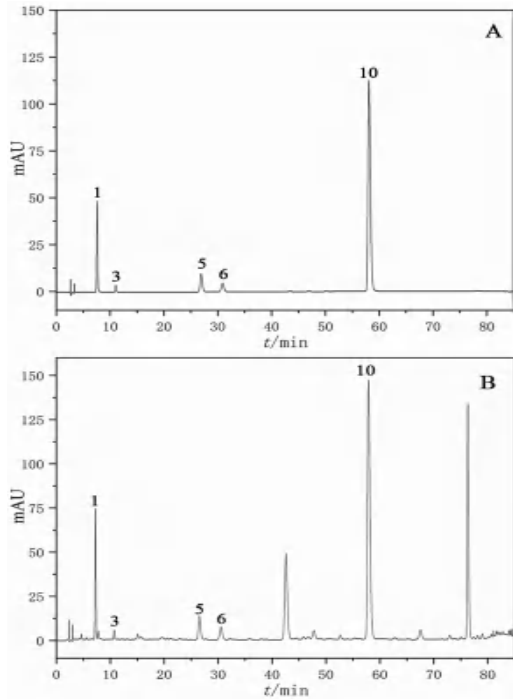


图 3 混合对照品溶液 (A) 和供试品溶液 (B) HPLC 图谱  
Fig 3 HPLC chromatogram of mixed substances solution (A) and test solution (B)

1. 绿原酸 (chlorogenic acid); 3. 咖啡酸 (caffeic acid); 5. 芦丁 (rutin); 6. 异槲皮苷 (isoquercetin); 10. 迷迭香酸 (rosemic acid)

表 3 15 批倒提壶药材指纹图谱相似度评价结果

Tab 3 Fingerprint similarity of 15 batches of *Cynoglossum officinale* L.

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.978	S9	0.995
S2	0.998	S10	0.931
S3	0.923	S11	0.915
S4	0.992	S12	0.993
S5	0.957	S13	0.995
S6	0.979	S14	0.982
S7	0.961	S15	0.955
S8	0.962	R	1.000

13.414%、13.303%，累计方差贡献率为 80.074%，说明这 4 类主成分包含了倒提壶药材中 14 个共有成分 80.074% 的信息，能较好地反映样品的主要特征，具有较好的代表性；采用 SIMCA14.1 软件绘制 15 批倒提壶药材的得分散点图 (见图 4)。

表 4 倒提壶主成分分析特征值与累积方差贡献率

Tab 4 PCA characteristic value and cumulative variance contribution of *Cynoglossum officinale* L.

主成分	特征值	方差贡献率	累计方差贡献率 /%
1	5.723	39.794	39.794
2	2.381	13.563	53.357
3	1.768	13.414	66.771
4	1.338	13.303	80.074

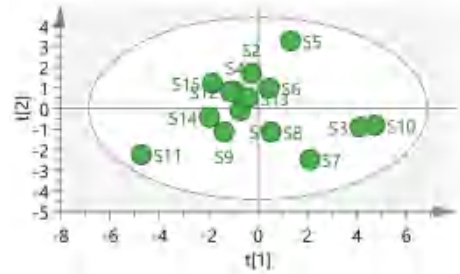


图 4 倒提壶 PCA 得分散点图

Fig 4 PCA score plots of *Cynoglossum officinale* L.

② 正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA): 根据 PCA 结果, 采用 SIMCA14.1 软件, 对 15 批倒提壶药材进行 OPLS-DA 分析。结果显示, 得到的模型  $R^2Y = 0.986$  (反映模型的稳定性),  $Q^2 = 0.805$  (反映模型的预测能力), 均大于 0.5 (越接近 1 越好), 表明所建立的模型稳定性及预测能力较强, 模型预测能力参数  $Q^2$  截距为负值, 说明所建模型没有出现过拟合现象, 能够有效判别分析不同批次倒提壶药材 [9-11]。由图 5 可知, OPLS-DA 模型中所有数据点均在 95% 置信区间内, 表明 15 批倒提壶药材聚类良好, 区分明显。以 VIP 值 > 1.0 作为标准筛选出 6 个对不同批次药材质量影响较大的成分, 见图 6, 从大到小依次为色谱峰 2、1、4、7、8、3, 其中 1 号峰为绿原酸, 3 号峰为咖啡酸。

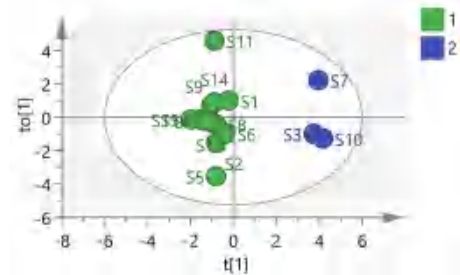


图 5 倒提壶 OPLS-DA 得分散点图

Fig 5 OPLS-DA score plots of *Cynoglossum officinale* L.

### 2.3 多指标定量分析

**2.3.1 线性关系考察** 精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液, 依次倍量稀释, 制成系列质量浓度的混合对照品溶液, 按“2.2.2”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图。以峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X) 绘制标准曲线, 结果见表 5。r 均大于 0.9990, 说明 5 种成分在相应浓度范围内与峰面积有良好的线性关系。

**2.3.2 精密度试验** 精密称取本品 0.5 g, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.2”项下色谱条件连续进样 6 次, 测得绿原酸、咖啡酸、芦丁、异槲皮苷、迷迭香酸峰面积的 RSD 值分别为 0.63%、2.0%、0.50%、2.4%、0.32%, 均小于 3.0%, 表明仪器精密度良好。

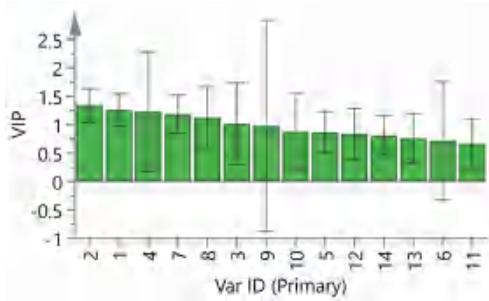


图 6 倒提壶 OPLS-DA 的 VIP 值图

Fig 6 VIP plot of OPLS-DA of *Cynoglossum officinale* L.

表 5 5 种成分含量测定的线性关系 (n = 5)

Tab 5 Linear relationship of the 5 components (n = 5)

化合物	回归方程	r	浓度范围 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
绿原酸	$Y = 1.159 \times 10^4 X - 3.979 \times 10^3$	1.000	2.25 ~ 72.00
咖啡酸	$Y = 1.516 \times 10^4 X + 5.512 \times 10^2$	1.000	0.622 ~ 19.90
芦丁	$Y = 1.824 \times 10^4 X + 2.495 \times 10^3$	1.000	6.06 ~ 194.00
异槲皮苷	$Y = 2.371 \times 10^4 X - 3.023 \times 10^3$	1.000	0.67 ~ 21.40
迷迭香酸	$Y = 1.293 \times 10^4 X - 1.827 \times 10^4$	1.000	18.41 ~ 589.00

**2.3.3 稳定性试验** 精密称取本品 0.5 g, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.2”项下色谱条件分别于 0、4、8、12、16、24 h 进样测定, 测得绿原酸、咖啡酸、芦丁、异槲皮苷、

迷迭香酸峰面积的 RSD 值分别为 2.1%、2.5%、1.2%、2.9%、0.31%, 均小于 3.0%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.3.4 重复性试验** 精密称取本品 0.5 g, 按“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, 测得绿原酸、咖啡酸、芦丁、异槲皮苷、迷迭香酸峰含量的 RSD 值分别为 2.5%、3.0%、2.0%、1.8%、2.1%, 均小于 3.0%, 表明该方法重复性良好。

**2.3.5 加样回收试验** 精密称定 6 份已知含量的倒提壶药材粉末, 各约 0.25 g, 分别加入绿原酸、咖啡酸、芦丁、异槲皮苷、迷迭香酸对照品适量, 按“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, 测得绿原酸、咖啡酸、芦丁、异槲皮苷、迷迭香酸的平均回收率分别为 104.0%、102.2%、92.1%、97.7%、95.4%, RSD 值分别为 1.7%、1.7%、2.1%、3.2%、2.2%, 表明该方法准确度良好。

**2.3.6 样品含量测定** 取 15 批倒提壶药材粉末, 按“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, 计算绿原酸、咖啡酸、芦丁、异槲皮苷、迷迭香酸的含量, 结果见表 6。

表 6 15 批倒提壶药材中 5 种成分的含量 ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , n = 3)

Tab 6 Content of 5 ingredients in 15 batches of *Cynoglossum officinale* L. ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , n = 3)

批次	绿原酸	咖啡酸	芦丁	异槲皮苷	迷迭香酸
S1	1.390 ± 0.024	0.093 ± 0.002	0.402 ± 0.007	0.199 ± 0.023	6.781 ± 0.117
S2	1.232 ± 0.018	0.101 ± 0.003	0.464 ± 0.002	0.285 ± 0.005	3.989 ± 0.059
S3	2.984 ± 0.099	0.067 ± 0.006	1.172 ± 0.040	0.556 ± 0.027	2.775 ± 0.054
S4	1.591 ± 0.007	0.094 ± 0.000	0.683 ± 0.001	0.215 ± 0.002	4.038 ± 0.011
S5	1.896 ± 0.007	0.151 ± 0.012	1.976 ± 0.011	0.168 ± 0.002	4.778 ± 0.014
S6	2.036 ± 0.008	0.070 ± 0.001	0.707 ± 0.002	0.269 ± 0.001	3.080 ± 0.013
S7	2.528 ± 0.022	0.080 ± 0.001	0.781 ± 0.001	0.407 ± 0.011	4.242 ± 0.008
S8	2.130 ± 0.016	0.094 ± 0.001	0.840 ± 0.006	0.345 ± 0.016	4.637 ± 0.013
S9	1.462 ± 0.014	0.073 ± 0.003	0.423 ± 0.004	0.182 ± 0.006	3.663 ± 0.036
S10	3.076 ± 0.015	0.114 ± 0.002	1.637 ± 0.010	0.423 ± 0.021	6.863 ± 0.036
S11	0.167 ± 0.003	0.087 ± 0.009	0.062 ± 0.002	0.028 ± 0.002	3.575 ± 0.049
S12	1.304 ± 0.005	0.049 ± 0.000	0.451 ± 0.001	0.131 ± 0.008	4.867 ± 0.023
S13	1.528 ± 0.005	0.051 ± 0.000	0.772 ± 0.005	0.167 ± 0.010	4.980 ± 0.018
S14	0.863 ± 0.005	0.058 ± 0.001	0.306 ± 0.002	0.099 ± 0.005	5.588 ± 0.027
S15	1.224 ± 0.001	0.089 ± 0.001	0.363 ± 0.000	0.110 ± 0.006	7.127 ± 0.007

### 3 讨论

#### 3.1 指纹图谱色谱条件的优化

本研究在前期研究<sup>[12]</sup>基础上优化了 HPLC 梯度洗脱程序, 采用二极管阵列检测器在波长 200 ~ 400 nm 对供试品溶液进行全波长扫描, 对不同柱温 (25、30、35 °C), 不同扫尾剂 (0.1% 甲酸、0.2% 甲酸、0.2% 磷酸) 进行了筛选。结果表明, 当流动相为乙腈 -0.2% 磷酸, 柱温为 30 °C,

检测波长为 354 nm 时色谱图基线平整, 色谱图峰信息丰富, 且色谱峰峰形对称, 分离度较好。因此最后确定指纹图谱流动相为乙腈 -0.2% 磷酸, 柱温为 30 °C, 检测波长为 354 nm 进行梯度洗脱。

#### 3.2 指纹图谱、化学计量学分析及含量测定

本研究以 15 批倒提壶药材为研究对象, 建立了倒提壶药材高效液相指纹图谱, 标定了 14 个共有峰, 并指认了其中 5 个成分 (绿原酸、咖

啡酸、芦丁、异槲皮苷、迷迭香酸)。相似度评价结果显示 15 批药材相似度均在 0.900 以上,说明不同批次样品间相似度较高,整体质量较为稳定,但 15 批药材中各成分含量有一定的差异。PCA 确定了对倒提壶药材质量贡献率大的 4 个主成分,累计贡献率为 80.074%,信息主要来源于 12 个共有峰,其中包括绿原酸、咖啡酸、芦丁、异槲皮苷、迷迭香酸;OPLS-DA 分析根据 VIP 值筛选出了 6 个差异性标志物质(包括绿原酸和咖啡酸)。PCA 及 OPLS-DA 分析结果包含了指认的 5 种成分,其中芦丁和异槲皮苷为黄酮类成分,具有抗炎<sup>[13-14]</sup>、抗氧化<sup>[15-16]</sup>等作用;绿原酸、咖啡酸、迷迭香酸为酚酸类化合物,具有抗菌<sup>[17-19]</sup>、抗肿瘤<sup>[20-22]</sup>等活性,因此将以上 5 种成分作为评价倒提壶质量的关键药效物质,建立了同时测定倒提壶中绿原酸、咖啡酸、芦丁、异槲皮苷、迷迭香酸含量的 HPLC 方法,以期通过测定药材中的多种活性成分或标志性成分的含量,更加全面,准确地评价倒提壶的质量。

### 3.3 小结

综上所述,本研究建立了倒提壶药材 HPLC 指纹图谱及同时测定倒提壶药材中 5 种成分含量的 HPLC 分析方法,通过化学计量学筛选出影响倒提壶质量的关键因素,并进行了方法学验证,结果表明本方法稳定、可靠,可为倒提壶药材的质量控制和质量标准完善奠定基础。

### 参考文献

[1] 《中国植物志》编辑委员会.中国植物志[M].北京:科技出版社,2004,64(6):222.  
 [2] 刘勇民.维吾尔药志[M].上册.乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999:446-451.  
 [3] 国家中医药管理局编委会.中华本草(第六册)[M].上海:上海科技出版社,1999:535  
 [4] 李伟,赵翡翠.倒提壶药材质量标准研究[J].新疆医科大学学报,2010,33(9):1036-1038.  
 [5] 郭伟,滕亮,马桂芝.意大利牛舌草与其易混淆品的鉴定[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(21):32-39.  
 [6] 买买提·努尔艾合提,吐送江·阿不都艾尼,木合塔尔·奴尔买买.高孜万药材中总黄酮含量的测定[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(24):134-136.  
 [7] 周海琴,何雨晴,陈盛君.基于 UPLC 指纹图谱和多指标成分定量的野生与栽培贯叶金丝桃的质量评价[J].中南药学,2023,21(12):3274-3280.  
 [8] 王雅静,周思倩,冯敏,等.基于 UPLC-Q-TOF HRMS 技术建立逍遥丸指纹图谱及化学成分鉴定[J].中南药学,2023,21(10):2597-2601.  
 [9] 巴宇姮,汪秋兰,万青,等.基于指纹图谱和多组分定

量分析的中药制剂洁泽洗液质量评价[J].中国现代应用药学,2024,41(4):452-459.  
 [10] 郑露,李鸿,张钰,等.不同产地文王一支笔的 HPLC 指纹图谱及化学模式识别[J].药物分析杂志,2022,42(5):896-903.  
 [11] 王震.不同生长期穿心莲药材 HPLC 指纹图谱及化学模式识别[J].药物分析杂志,2021,41(3):410-420.  
 [12] 郭伟.意大利牛舌草及其总黄酮有效部位质量标准的研究[D].乌鲁木齐:新疆医科大学,2018.  
 [13] Hae EK, Young YS, In HL, et al. Astragaloside and isoquercitrin isolated from aster scaber suppress LPS-induced neuroinflammatory responses in microglia and mice [J]. Foods, 2022, 11(10): 1505.  
 [14] Divya B, Saurabh K, Parmanand K, et al. Rutin ameliorates malaria pathogenesis by modulating inflammatory mechanism: an in vitro and in vivo study [J]. Inflammopharmacology, 2022, 30(1): 159-171.  
 [15] Kolesárová K, Michalcová K, Roychoudhury S, et al. Antioxidative effect of dietary flavonoid isoquercitrin on human ovarian granulosa cells HGL5 in vitro [J]. Physiol Res, 2021, 70(5): 745-754.  
 [16] Peter AE, Olachi DO, Oluchi SO, et al. The antioxidant/anti-inflammatory protective effects of rutin against ethanol-induced testicular perturbation in rats: involvement of the immunosuppressive indoleamine 2, 3-dioxygenase [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2023, 133(3): 254-264.  
 [17] Alqahtani A, Marrez DA, Aleraky M, et al. Characterization and isolation of the major biologically active metabolites isolated from ficus retusa and their synergistic effect with tetracycline against certain pathogenic-resistant bacteria [J]. Pharmaceuticals, 2022, 15(12): 1473.  
 [18] Cheng C, Sha Z, Chen X, et al. Rosmarinic acid bolsters antibacterial immunity activity of macrophages by up-regulating PINK1/Parkin-mediated mitophagy [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2022, 47(23): 6450-6456.  
 [19] 张毅,刘锦秀,钮福祥,等.甘薯叶片中多酚成分及其抗菌活性研究[J].食品安全质量检测学报,2022,13(19):6299-6305.  
 [20] Sese PJT, Macas ON, Thangirala S, et al. Anticancer effects of the corchorus olitorius aqueous extract and its bioactive compounds on human cancer cell lines [J]. Molecules, 2021, 26(19): 6033.  
 [21] Chen CL, Liu YL, Shen Y, et al. Rosmarinic acid, the active component of Rubi Fructus, induces apoptosis of SGC-7901 and HepG2 cells through mitochondrial pathway and exerts anti-tumor effect [J]. N-S Arch pharmacol, 2023, 396(12): 3743-3755.  
 [22] Tyszka-Czochara M, Konieczny P, Majka M. Caffeic acid expands anti-tumor effect of metformin in human metastatic cervical carcinoma HTB-34 cells: implications of AMPK activation and impairment of fatty acids De Novo biosynthesis [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(2): 462.

(收稿日期:2024-03-18;修回日期:2024-05-18)



## 二陈汤化裁方破壁饮片水溶液的化学成分及入血成分分析

张义<sup>1</sup>, 陈炜璇<sup>2</sup>, 刘苗玲<sup>2</sup>, 甘钧龙<sup>2</sup>, 葛鹏玲<sup>1\*</sup> (1. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150000; 2. 中山市中智药业集团有限公司, 广东 中山 528400)

**摘要:** **目的** 分析二陈汤化裁方破壁饮片水溶液的化学成分及入血成分。**方法** 采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱 (UHPLC-Q-Exactive-MS) 法对比复方样品、空白血清、含药血清色谱图, 分析二陈汤化裁方破壁饮片水溶液在大鼠血清中的原形及代谢产物。**结果** 从复方样品中共鉴定出 151 个化学成分, 通过对照品比对, 最终确定了 11 个成分 (柠檬酸、绿原酸、橙皮苷、茯苓酸 B、熊果酸、天麻素、巴利森苷 A、牡荆素、金丝桃苷、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rd)。共鉴定出 33 个入血成分, 其中 28 个为原形成分, 5 个为代谢产物。**结论** 本实验通过 UHPLC-Q-Exactive-MS 分析二陈汤化裁方破壁饮片的入血成分, 为进一步阐明二陈汤化裁方破壁饮片的药效物质基础提供了参考。

**关键词:** 二陈汤; 破壁饮片; 方剂化裁; 入血成分; UHPLC-Q-Exactive-MS

**中图分类号:** R286 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)08-2040-08  
**doi:**10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.012

### Chemical composition and blood components of the water solution of ultrafine granular powder of Erchen decoction modified formula

ZHANG Yi<sup>1</sup>, CHEN Wei-xuan<sup>2</sup>, LIU Miao-ling<sup>2</sup>, GAN Jun-long<sup>2</sup>, GE Peng-ling<sup>1\*</sup> (1. Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150000; 2. Zhongzhi Pharmaceutical Group Co., Ltd., Zhongshan Guangdong 528400)

**Abstract: Objective** To determine the chemical compositions and blood components in the water solution of ultrafine granular powder of Erchen decoction modified formula. **Methods** Ultra performance liquid chromatography quadrupole electrostatic field Orbitrap high resolution mass spectrometry (UHPLC-Q-Exactive-MS) was used to compare the chromatograms of compound samples, blank serum and drug containing serum, and analyze the prototype and metabolites of the water solution of ultrafine granular powder of Erchen decoction modified formula in the rat serum. **Results** Totally 151 chemical components were identified from the water solution of ultrafine granular powder of Erchen decoction modified formula. After comparison with standard substance, 11 components (citric acid, chlorogenic acid, hesperidin, poric acid B, ursolic acid, gastrodin, parishin A, vitexin, hyperoside, hinsenoside Rg<sub>1</sub>, and ginsenoside Rd) were ultimately determined. Totally 33 blood components were identified, 28 of which were prototypes and 5 were metabolites. **Conclusion** The blood components in the water solution of ultrafine granular powder of Erchen decoction modified formula are determined by UHPLC-Q-Exactive-MS, providing a reference for further elucidating the pharmacological substance basis and mechanism of its action.

**Key words:** Erchen decoction; ultrafine granular powder of Chinese materia medica; modified formula; blood component; UHPLC-Q-Exactive-MS

作者简介: 张义, 男, 博士研究生, 主要从事中药防治 2 型糖尿病的现代药理学研究, email: 1291575791@qq.com \* 通信作者: 葛鹏玲, 女, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药防治 2 型糖尿病的现代药理学研究, email: penglingge@126.com

二陈汤始见于宋代《太平惠民和剂局方·卷四》，是治疗痰症的基础方<sup>[1]</sup>，在代谢疾病中也表现出良好的防治和干预效果<sup>[2]</sup>。本课题组对传统二陈汤进行了药味加减化裁，去具有毒性的半夏及令人中满的甘草，加入消食化积的山楂、养阴生津的西洋参及平肝潜阳的天麻，在整体治疗痰证的基础上更针对代谢类疾病的相关并发症<sup>[3-7]</sup>。此外，传统中药饮片煎煮步骤烦琐，且难以服用，特别是慢性病患者难以坚持服药，从而降低了治疗效果<sup>[8]</sup>。破壁饮片作为一种新型中药饮片，具有使用方便、配伍灵活等优点<sup>[9]</sup>。本课题组前期进行的药效学实验中观察到了二陈汤化裁方破壁饮片对代谢疾病良好的治疗效果。

药物通过吸收入血进行体内分布<sup>[10]</sup>，故鉴定二陈汤化裁方破壁饮片入血成分对阐明其药效物质基础及作用机制研究至关重要。本实验采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱(UHPLC-Q-Exactive-MS)法对二陈汤化裁方破壁饮片水溶液给药后的入血成分进行分析，以期为该破壁制剂药效物质基础研究提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠[辽宁长生生物技术有限公司，实验动物生产许可证号：SCXK(辽)2020-0001，动物合格证号 SYXK(辽)2020-0007]。本动物实验经黑龙江中医药大学实验动物伦理委员会审批，动物伦理批件号：20220610001。

### 1.2 仪器

UPLC I-Class 超高效速液相色谱(Waters)；Q Exactive 四极杆轨道离子阱质谱(ThermoFisher Scientific)；ACQUITY UPLC HSS T3 (1.8 μm, 2.1 mm×100 mm) 反相色谱柱(Waters)；Mikro 220R 台式高速冷冻离心机(Hettich Lab Technology)。

### 1.3 试药

陈皮破壁饮片(批号：CX202302141)、茯苓破壁饮片(批号：2210130A)、山楂破壁饮片(批号：2305020A)、天麻破壁饮片(批号：20230523T)、西洋参破壁饮片(批号：20230523X)，均由中山市中智药业集团有限公司提供，药材经中智药业集团甘均龙研究员及黑龙江中医药大学刘伟明研究员鉴定为合格饮片；水为屈臣氏蒸馏水，甲醇、甲酸(质谱级，Fisher Scientific)。

## 2 方法

### 2.1 溶液制备

**2.1.1 药液制备** 称取陈皮破壁饮片 10 g、茯苓破壁饮片 15 g、山楂破壁饮片 15 g、天麻破壁饮片 10 g、西洋参破壁饮片 15 g，加适量的水加热溶解，

搅拌均匀，配制成质量浓度为 0.53 g·mL<sup>-1</sup> 的破壁饮片溶液备用。

**2.1.2 供试品溶液制备** 精密称取“2.1.1”项下的破壁饮片母液 100 μL，置于 1.5 mL 离心管中，加入 300 μL 甲醇，沉淀。将离心管置于低温离心机中，4℃、12 000 r·min<sup>-1</sup> 下离心 10 min。取上清液 100 μL 置于 1.5 mL 离心管中，加入 900 μL 甲醇，混匀。将离心管置于低温离心机中，4℃、12 000 r·min<sup>-1</sup> 下离心 10 min。取上清液 100 μL，置于进样瓶中，待测。

### 2.2 血清采集

大鼠适应性喂养一周后进行实验，经 12 h 禁食不禁水，于给药前眼眶取血作为空白血液样本，随后按千克体重换算人与大鼠给药剂量，以 60 kg 成年人为标准，根据公式：大鼠给药剂量(mg·kg<sup>-1</sup>)=折算系数(6.30)×成人用药剂量(mg·kg<sup>-1</sup>)<sup>[11]</sup>。经换算后，大鼠灌胃给予二陈汤化裁方破壁饮片水溶液(1 mL·100 g<sup>-1</sup>)，给药 1、2、4 h 后眼眶取血混合作为含药血样本。

### 2.3 样品处理

取空白血液、含药血样本各 100 μL，分别置于 1.5 mL 离心管中，加入 300 μL 甲醇，沉淀。将离心管置于低温离心机中，4℃、12 000 r·min<sup>-1</sup> 下离心 10 min。取血清 100 μL，置于进样瓶中，待测。

### 2.4 UHPLC-Q-Exactive-MS/MS 分析条件

**2.4.1 色谱条件** 采用 UPLC I-Class 超高效液相色谱系统进行分离，条件如下：Waters UPLC HSS T3 色谱柱(1.8 μm, 2.1 mm×100 mm)，以甲醇(A)-0.1% 甲酸水溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~1 min, 2%A; 1~41 min, 2%~100%A; 41~50 min, 100%A; 50.1~52 min, 2%A)，流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>，进样量 10.0 μL，柱温 40℃。

**2.4.2 质谱条件** 采用配备热电喷雾离子源的四极杆轨道离子阱质谱仪(Q Exactive)进行质谱分析。正、负离子的离子源电压分别为 3.7 kV 和 3.5 kV；毛细管加热温度为 320℃；鞘气压力为 30 psi，辅助气压力为 10 psi；溶剂加热蒸发温度为 300℃；鞘气和辅助气均为氮气；碰撞气为氮气，压力为 1.5 mTorr。一级全扫描参数为：分辨率 70 000，自动增益控制目标 1×10<sup>6</sup>，最大隔离时间 50 ms，质荷比扫描范围 100~1500。采用外标法校准质谱质量轴，质量误差为 5×10<sup>-6</sup>。化合物鉴定采用 dd-MS<sup>2</sup> 扫描模式(数据依赖扫描模式)，参数如下：分辨率 17 500，自动增益控制目标 1×10<sup>5</sup>，最大隔离时间 50 ms，碰撞能 30 V，强度限定 1×10<sup>5</sup>。采用 Xcalibur 2.2 SP1.48 软

件控制液质系统，并进行数据采集。

### 2.5 数据处理

通过查阅国内外相关文献，整理复方中各饮片所含的化学成分信息，包括分子式、相对分子质量、名称等，构建复方化学成分数据库。采用 Xcalibur 2.2 SP1.48 软件控制液质系统，并进行数据采集。

### 3 结果

#### 3.1 二陈汤化裁方破壁饮片 UHPLC-Q-Exactive-MS 的总离子流图

在正、负离子模式下二陈汤化裁方水溶液、空白血清和给药血清的 UHPLC-Q-Exactive-MS 结果见图 1 和表 1。

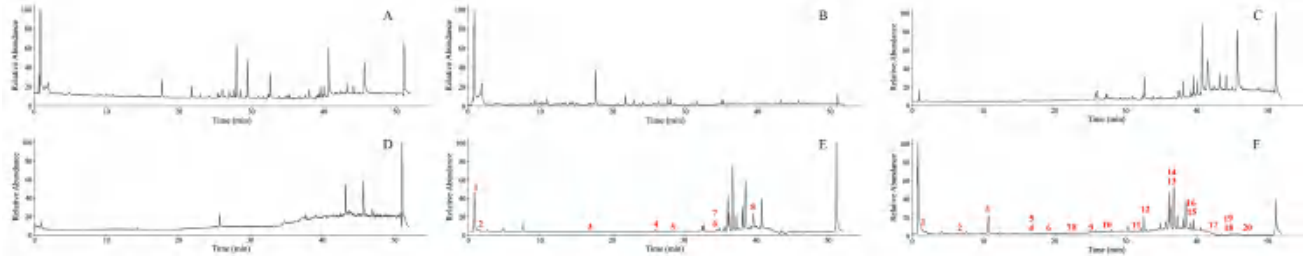


图 1 正离子 (A、C、E) 及负离子 (B、D、F) 模式下二陈汤化裁方的总离子流图

Fig 1 Total ion flow chart of Erchen decoction under positive ion (A, C, E) and negative ion (B, D, F) modes

A、B. 二陈汤化裁方 (Erchen decoction); C、D. 空白血清 (blank serum); E、F. 含药血清 (medicated serum)

表 1 二陈汤化裁方破壁饮片水溶液中化学成分分析与鉴定

Table 1 Analysis and identification of chemical components of the water solution of ultrafine granular powder of Erchen decoction modified formula

No.	保留时间 /min	离子模式	实测值	质量误差 / $\times 10^{-6}$	主要碎片离子 ( $m/z$ )	分子式	化合物名称	归属
1	0.80	[M - H] <sup>+</sup>	104.1075	-0.17	101.2188	C <sub>5</sub> H <sub>14</sub> NO <sup>+</sup>	胆碱	茯苓
2	0.83	[M - H] <sup>+</sup>	219.0261	-2.10	97.0289, 88.0402	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	甘露糖	天麻
3	0.85	[M - H] <sup>+</sup>	343.1229	-1.68	97.029, 69.0347	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	松二糖	茯苓
4	0.85	[M - H] <sup>-</sup>	237.0607	-4.57	87.0061, 85.0268	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	奎宁酸	茯苓
5	0.89	[M - H] <sup>-</sup>	341.1086	-0.90	59.0112	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	蔗糖	西洋参
6	0.92	[M - H] <sup>+</sup>	193.0704	-1.22	133.0283	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	景天庚酮糖	陈皮
7	1.24	[M - H] <sup>-</sup>	549.1677	0.99	89.022, 85.0267	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	潘糖	西洋参
8	1.30	[M - H] <sup>+</sup>	118.0864	2.04	102.0142, 70.0663	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	L- 缬氨酸	陈皮
9	1.56	[M - H] <sup>+</sup>	150.0910	-1.46	150.0912	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	对羟福林	陈皮
10	1.76	[M - H] <sup>-</sup>	479.0845	3.39	111.0062	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	多糖苷	茯苓
11	1.80	[M - H] <sup>+</sup>	156.0652	-2.20	68.9983, 111.0081	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	二羟基苯甲醛	天麻
12 <sup>*</sup>	1.95	[M - H] <sup>-</sup>	191.0181	-8.40	174.0422, 128.9685	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	柠檬酸	山楂
13	2.02	[M - H] <sup>+</sup>	169.0491	-2.02	152.0704, 134.0661	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	香草酸	茯苓
14	2.54	[M - H] <sup>+</sup>	132.1017	-1.47	86.0973	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	L- 亮氨酸	陈皮
15	2.65	[M - H] <sup>+</sup>	182.0809	-1.63	136.0755, 91.055	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	顺式对羧酸	陈皮
16	2.73	[M - H] <sup>-</sup>	243.0617	-1.88	128.0326, 103.9176	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	L- 尿苷	茯苓
17	3.81	[M - H] <sup>+</sup>	268.1033	-2.42	136.0616	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	腺嘌呤核苷	茯苓
18	4.51	[M - H] <sup>-</sup>	321.0746	0.60	79.9548, 71.0112	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>	线型二倍半萜	天麻
19	4.53	[M - H] <sup>+</sup>	107.0496	4.00	93.0581	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	4- 羟基苯醇	天麻
20 <sup>*</sup>	4.53	[M - H] <sup>-</sup>	331.1035	0.25	278.9965, 123.0422	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	天麻素	天麻
21	4.94	[M - H] <sup>+</sup>	127.0390	0.59	109.0288, 81.0345	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	5- 羟甲基糠醛	山楂
22	5.30	[M - H] <sup>-</sup>	331.0672	0.54	125.0221, 151.0014	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	没食子酰基葡萄糖	茯苓
23	6.08	[M - H] <sup>+</sup>	137.0595	-1.25	122.0364	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	香草醇	天麻
24	6.80	[M - H] <sup>+</sup>	146.1173	-1.90	99.0447, 86.0973	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	2- 甲基丁 -2- 烯酸乙酯	山楂
25	9.32	[M - H] <sup>-</sup>	459.1144	0.04	111.0063	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>13</sub>	巴利森苷 E	天麻
26	9.69	[M - H] <sup>+</sup>	123.0442	1.30	95.0499	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	对羟基苯甲醛	天麻
27 <sup>*</sup>	10.06	[M - H] <sup>-</sup>	353.0878	-0.03	194.5512, 174.0216	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	绿原酸	山楂
28	10.34	[M - H] <sup>-</sup>	301.1193	0.001	167.0596	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	二甲氧基 - 苯甲酸	山楂
29	10.51	[M - H] <sup>+</sup>	209.0804	-1.69	117.0338, 145.0283	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	咖啡酸二甲醚	山楂
30	10.96	[M - H] <sup>+</sup>	263.0519	-2.77	182.0961, 107.0496	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	苹果酸	山楂
31	10.98	[M - H] <sup>-</sup>	239.0553	-3.85	179.0336, 146.0009	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	阿魏酸	山楂
32	11.07	[M - H] <sup>+</sup>	166.0858	-2.74	131.0685, 133.0842	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	苯甲酸二甲酯	陈皮
33	11.31	[M - H] <sup>+</sup>	506.2017	-0.54	191.0695, 120.0813	C <sub>25</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>10</sub>	异西米乙酰胺	陈皮
34	11.40	[M - H] <sup>-</sup>	431.0984	0.21	109.0269	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	异卵黄蛋白	山楂



续表 1

No.	保留时间 /min	离子模式	实测值	质量误差 / ×10 <sup>-6</sup>	主要碎片离子 (m/z)	分子式	化合物名称	归属
35	11.62	[M - H] <sup>+</sup>	153.0543	- 1.82	111.0445, 65.0398	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	香兰素	天麻, 陈皮
36	11.72	[M - H] <sup>-</sup>	449.1092	0.61	125.0202	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	二辛基葡萄糖苷	山楂
37	11.76	[M - H] <sup>-</sup>	289.0718	0.24	242.0804, 109.0274	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	儿茶精	茯苓
38	12.43	[M - H] <sup>-</sup>	609.1468	1.22	300.0746, 151.9089	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	芦丁	山楂
39	12.68	[M - H] <sup>-</sup>	727.2100	1.31	442.7718, 424.1879	C <sub>32</sub> H <sub>40</sub> O <sub>19</sub>	巴利森苷 B	天麻
40	12.95	[M - H] <sup>-</sup>	335.0775	1.04	135.043, 179.0335	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	表儿茶素	山楂
41	14.60	[M - H] <sup>-</sup>	501.1042	0.77	85.0268, 119.0477	C <sub>23</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	Pinnatifinoside C	山楂
42	14.74	[M - H] <sup>-</sup>	387.1087	0.59	134.0351	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub>	5- 羟基酸橙黄酮	山楂
43	14.83	[M - H] <sup>-</sup>	447.0935	0.62	327.0509, 133.0272	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	异荛草苷	山楂
44	15.04	[M - H] <sup>-</sup>	551.2137	0.60	59.0112	C <sub>27</sub> H <sub>36</sub> O <sub>12</sub>	滇白珠苷 B	天麻
45 <sup>†</sup>	15.16	[M - H] <sup>-</sup>	995.3047	0.93	423.0936	C <sub>45</sub> H <sub>56</sub> O <sub>25</sub>	巴利森苷 A	天麻
46	15.27	[M - H] <sup>-</sup>	447.0935	0.56	327.0514	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	荛草苷	山楂
47	15.36	[M - H] <sup>-</sup>	593.1518	1.02	297.0772	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	葡萄糖苷	山楂
48 <sup>†</sup>	15.80	[M - H] <sup>-</sup>	431.0984	0.08	311.0563, 283.0605	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	牡荆素	山楂
49	16.14	[M - H] <sup>-</sup>	493.1355	0.90	134.0353	C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	獐牙菜苷	天麻
50	16.23	[M - H] <sup>-</sup>	593.1518	1.18	297.0757	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	新西兰牡荆苷	陈皮
51	16.62	[M - H] <sup>+</sup>	581.1856	- 1.43	603.1663, 331.0994	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub>	柚皮苷	陈皮
52	16.88	[M - H] <sup>-</sup>	593.1514	0.40	285.0404	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	牡荆素 -7- 葡萄糖苷	山楂
53 <sup>†</sup>	17.10	[M - H] <sup>-</sup>	463.0884	0.55	300.0275	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	金丝桃苷	山楂
54	17.14	[M - H] <sup>-</sup>	501.1041	0.71	267.0667	C <sub>23</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	山楂素 I	山楂
55	17.50	[M - H] <sup>+</sup>	207.1012	- 1.50	181.0855, 151.0752	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	洋川芎内酯 H	茯苓
56 <sup>†</sup>	17.64	[M - H] <sup>-</sup>	609.1821	- 0.66	301.0721, 151.0017	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	橙皮苷	陈皮
57	17.65	[M - H] <sup>+</sup>	153.0179	- 1.53	101.1145	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	没食子酸	茯苓
58	17.66	[M - H] <sup>-</sup>	677.1695	- 4.40	301.0718, 323.0536	C <sub>30</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	没食子酰芍药苷	茯苓
59	17.66	[M - H] <sup>-</sup>	727.2083	- 1.09	423.0928, 397.113	C <sub>32</sub> H <sub>40</sub> O <sub>19</sub>	巴利森苷 C	天麻
60	17.98	[M - H] <sup>-</sup>	437.1454	0.34	145.0272, 119.0477	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>8</sub>	天麻苷	天麻
61	18.13	[M - H] <sup>+</sup>	521.1647	- 1.15	359.1122, 329.0651	C <sub>25</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub>	胡黄连苷 III	西洋参
62	18.30	[M - H] <sup>-</sup>	577.1566	0.66	269.0456	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	牡荆素鼠李糖苷	山楂
63	18.65	[M - H] <sup>+</sup>	249.1480	- 1.92	105.0704, 91.0551	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub>	苍术内酯	茯苓
64	19.05	[M - H] <sup>-</sup>	623.1987	1.01	315.0876	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub>	橙皮苷查尔酮	陈皮
65	19.42	[M - H] <sup>-</sup>	861.4867	1.73	71.0112	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>15</sub>	五倍子花 C	西洋参
66 <sup>†</sup>	19.44	[M - H] <sup>-</sup>	1007.5449	1.81	961.5373	C <sub>48</sub> H <sub>82</sub> O <sub>19</sub>	人参皂苷 Rd	西洋参
67	19.70	[M - H] <sup>-</sup>	437.1454	0.24	245.045, 275.0927	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>8</sub>	吡喃葡萄糖苷	天麻
68	19.86	[M - H] <sup>-</sup>	609.1829	0.81	301.0717	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	橙皮苷查尔酮	陈皮
69	19.95	[M - H] <sup>-</sup>	863.5025	1.92	671.4399, 509.3843	C <sub>42</sub> H <sub>74</sub> O <sub>15</sub>	西洋参皂苷	西洋参
70	21.21	[M - H] <sup>-</sup>	271.0612	0.35	178.1421, 119.0478	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	柚皮素	陈皮
71	21.74	[M - H] <sup>+</sup>	383.1844	- 2.28	95.0136, 161.0583	C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	乙基羌活醇	山楂
72	21.74	[M - H] <sup>-</sup>	515.1919	- 0.74	407.0551	C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	柠檬苦素	陈皮
73	22.10	[M - H] <sup>-</sup>	285.0404	- 0.05	243.9017, 153.0272	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	山柰酚	山楂
74	22.96	[M - H] <sup>+</sup>	288.0859	4.95	258.0395	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	吡喃葡萄糖苷间苯三酚	陈皮
75	23.19	[M - H] <sup>-</sup>	991.5500	1.80	945.544, 770.0111	C <sub>48</sub> H <sub>82</sub> O <sub>18</sub>	人参皂苷 Re	西洋参
76	23.19	[M - H] <sup>+</sup>	665.2062	1.55	329.0656, 359.1114	C <sub>29</sub> H <sub>38</sub> O <sub>16</sub>	异丙托派	茯苓
77 <sup>†</sup>	23.35	[M - H] <sup>-</sup>	845.4917	1.65	799.4897, 633.4892	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub>	人参皂苷 Rg <sub>1</sub>	西洋参
78	23.37	[M - H] <sup>+</sup>	375.1066	- 2.12	345.0592	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	金花介素	西洋参
79	23.47	[M - H] <sup>+</sup>	214.1796	- 2.43	95.0862, 81.0709	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	香叶酸甲酯	茯苓
80	23.99	[M - H] <sup>+</sup>	251.1247	- 2.63	192.0652, 164.0704	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	樟脑酸二甲酯	山楂
81	23.99	[M - H] <sup>+</sup>	259.0595	- 2.08	219.0567, 121.065	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	山楂醌 A	山楂
82	23.99	[M - H] <sup>+</sup>	329.1011	- 2.38	299.0543	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	4- 乙酰苯甲酸	陈皮
83	24.03	[M - H] <sup>+</sup>	515.2269	- 1.19	105.0705, 95.0134	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>9</sub>	诺米林	陈皮
84	24.11	[M - H] <sup>-</sup>	625.1783	1.59	116.926, 127.0585	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub>	柚皮芸香苷	陈皮
85	24.22	[M - H] <sup>+</sup>	593.1521	3.31	91.0586, 319.9338	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>17</sub>	二辛基二葡萄糖苷	山楂
86	24.98	[M - H] <sup>+</sup>	405.1536	- 1.86	427.1364, 149.0233	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>8</sub>	枸橼酸	陈皮
87	25.50	[M - H] <sup>-</sup>	861.4868	1.91	815.4808, 71.0112	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>15</sub>	五倍子花 D	西洋参
88	25.79	[M - H] <sup>-</sup>	343.0822	- 0.31	328.0596	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	桑廷	山楂
89	26.00	[M - H] <sup>+</sup>	373.1274	- 2.01	365.0622, 243.7781	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	橘皮素	陈皮
90	26.05	[M - H] <sup>+</sup>	183.0802	- 1.19	105.034, 95.0499	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	二羟基二苯甲烷	天麻
91	26.11	[M - H] <sup>+</sup>	455.2057	- 1.58	477.1872, 119.0852	C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> O <sub>7</sub>	黄柏酮	陈皮

续表 1

No.	保留时间 /min	离子模式	实测值	质量误差 / ×10 <sup>-6</sup>	主要碎片离子 (m/z)	分子式	化合物名称	归属
92	26.41	[M - H] <sup>-</sup>	845.4909	0.70	799.4846, 59.0113	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub>	人参皂苷 Rf	西洋参
93	26.66	[M - H] <sup>+</sup>	457.3669	- 1.52	119.0858, 105.0706	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	羊毛甾醇糖苷	茯苓
94	26.86	[M - H] <sup>-</sup>	343.0821	- 0.39	328.0594, 298.0124	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	藜香黄酮醇	茯苓
95	27.24	[M - H] <sup>-</sup>	239.1282	- 3.26	195.1374, 223.0286	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	3- 丁基二氢邻苯二甲酸酯	茯苓
96	27.43	[M - H] <sup>+</sup>	375.1066	- 2.18	397.0881, 96.5905	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	蓖麻素	西洋参
97	27.56	[M - H] <sup>-</sup>	863.5020	1.35	817.4983, 655.4453	C <sub>42</sub> H <sub>74</sub> O <sub>15</sub>	西洋参皂苷	西洋参
98	27.60	[M - H] <sup>-</sup>	503.3380	0.42	328.4183	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>6</sub>	阿江榄仁素	茯苓
99	27.94	[M - H] <sup>+</sup>	403.1376	- 2.62	317.0718, 243.1008	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	川陈皮素	陈皮
100	28.13	[M - H] <sup>-</sup>	887.5014	0.59	102.9543, 841.4933	C <sub>44</sub> H <sub>74</sub> O <sub>15</sub>	长春花苷 R <sub>1</sub>	西洋参
101	28.34	[M - H] <sup>-</sup>	503.3383	1.15	455.3168	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>6</sub>	AlisolA	茯苓
102	28.57	[M - H] <sup>+</sup>	433.1484	- 2.00	455.1295, 425.0835	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>	Hepta-3	陈皮
103	28.59	[M - H] <sup>-</sup>	683.4381	0.86	683.4377	C <sub>36</sub> H <sub>62</sub> O <sub>9</sub>	人参皂苷 Rh <sub>1</sub>	西洋参
104	29.05	[M - H] <sup>+</sup>	419.1328	- 2.00	441.1147, 411.0671	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	七甲氧基黄酮	陈皮
105	29.28	[M - H] <sup>+</sup>	261.1843	- 2.09	77.0396, 105.0341	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	人参环氧炔醇	西洋参
106	29.47	[M - H] <sup>+</sup>	587.1473	4.14	343.0799, 431.9976	C <sub>17</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>4</sub>	马兜铃内酰胺	陈皮
107	29.49	[M - H] <sup>+</sup>	829.1986	1.49	461.007, 676.7911	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	羽状半糖苷 A	山楂
108	29.55	[M - H] <sup>+</sup>	467.3139	- 3.41	408.3774, 370.5519	C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> O <sub>5</sub>	茯苓酸 B	茯苓
109	29.70	[M - H] <sup>+</sup>	439.3562	- 1.79	95.0863, 119.0858	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	齐墩果酸	西洋参
110	29.71	[M - H] <sup>-</sup>	955.4917	1.02	793.4407	C <sub>48</sub> H <sub>76</sub> O <sub>19</sub>	竹节人参皂苷	西洋参
111	29.77	[M - H] <sup>+</sup>	511.3397	0.82	88.0401	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>5</sub>	泽泻醇	茯苓
112	30.13	[M - H] <sup>+</sup>	439.3563	- 1.47	119.0858, 95.0862	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	丝氨酸二醇	西洋参
113	30.24	[M - H] <sup>+</sup>	207.1739	- 1.85	192.1508	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O	二甲基苯酚	陈皮
114	30.84	[M - H] <sup>+</sup>	277.1792	- 2.23	55.0557, 57.0713	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	Pq-2	西洋参
115	31.02	[M - H] <sup>-</sup>	955.4891	- 1.73	911.4987, 801.5013	C <sub>48</sub> H <sub>76</sub> O <sub>19</sub>	人参皂苷 Ro	西洋参
116	31.10	[M - H] <sup>+</sup>	587.4298	- 1.29	81.0707, 107.0859	C <sub>36</sub> H <sub>58</sub> O <sub>6</sub>	股金醇棕榈酸酯	茯苓, 天麻
117	31.17	[M - H] <sup>+</sup>	301.1766	- 2.59	70.0664	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	人参炔三醇	西洋参
118	31.29	[M - H] <sup>+</sup>	219.1739	- 1.51	203.1429	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	三甲基十二碳三烯醇酮	山楂
119	31.33	[M - H] <sup>+</sup>	200.2005	- 1.92	55.0557, 101.0603	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O	十二碳烯醛	陈皮
120	31.54	[M - H] <sup>-</sup>	487.3429	0.04	91.5854	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>5</sub>	榄仁萜酸	茯苓
121	31.59	[M - H] <sup>+</sup>	405.3508	- 1.86	95.0863	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub>	花侧柏烯	陈皮
122	32.30	[M - H] <sup>+</sup>	301.1402	- 2.63	149.0232, 219.0567, 279.0928	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	邻苯二甲酸二异丁酯	陈皮
123	32.51	[M - H] <sup>+</sup>	509.3231	- 1.14	91.5806	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>5</sub>	Alisol C	茯苓
124	32.54	[M - H] <sup>-</sup>	485.3273	0.18	467.3178	C <sub>31</sub> H <sub>46</sub> O <sub>5</sub>	茯苓酸 G	茯苓
125	32.56	[M - H] <sup>+</sup>	181.0490	- 2.42	149.0232, 163.0387	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	二羟基肉桂酸	山楂
126	32.58	[M - H] <sup>+</sup>	121.0285	1.06	120.0811, 104.9487	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	对羟基苯甲酸	山楂
127	33.14	[M - H] <sup>-</sup>	829.4970	1.93	783.4908, 71.0112	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>13</sub>	人参皂苷 Rg <sub>3</sub>	西洋参
128	33.80	[M - H] <sup>+</sup>	338.2679	- 3.10	69.0707, 55.0555	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	二萜	茯苓
129	34.37	[M - H] <sup>+</sup>	199.1688	- 1.90	55.0557, 69.0711	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	11- 十二烯酸	茯苓
130	35.07	[M - H] <sup>-</sup>	783.4896	- 0.44	59.0112	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>13</sub>	人参皂苷 Rg <sub>2</sub>	西洋参
131	35.27	[M - H] <sup>-</sup>	931.5249	- 2.43	71.0112	C <sub>47</sub> H <sub>80</sub> O <sub>18</sub>	喹奎诺西 117	西洋参
132	36.29	[M - H] <sup>+</sup>	407.3663	- 2.09	443.3874, 91.0585	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	白桦脂醇	山楂
133	36.62	[M - H] <sup>-</sup>	540.3306	- 0.01	255.2326, 480.3076	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	溶血卵磷脂	西洋参
134	37.12	[M - H] <sup>+</sup>	493.3276	- 2.46	88.0404	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>	泽泻醇 C	茯苓
135*	37.44	[M - H] <sup>-</sup>	527.3741	- 0.22	115.9182	C <sub>33</sub> H <sub>52</sub> O <sub>5</sub>	茯苓酸	茯苓
136	37.59	[M - H] <sup>-</sup>	667.4434	1.26	90.9309	C <sub>36</sub> H <sub>62</sub> O <sub>8</sub>	人参皂苷 Rh <sub>2</sub>	西洋参
137*	38.29	[M - H] <sup>-</sup>	455.3532	0.40	438.9111, 393.0818	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	熊果酸	山楂
138	38.84	[M - H] <sup>-</sup>	457.2363	0.67	78.9564, 152.9933	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>	曼陀罗灵	西洋参
139	39.06	[M - H] <sup>-</sup>	255.2324	- 1.98	61.9858	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	十六烷酸	茯苓
140	39.26	[M - H] <sup>+</sup>	483.3801	- 1.56	55.0193	C <sub>30</sub> H <sub>52</sub> O <sub>3</sub>	拟人参皂苷元	西洋参
141	39.46	[M - H] <sup>-</sup>	281.2483	- 0.72	115.2516	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	油酸	茯苓
142	39.56	[M - H] <sup>+</sup>	483.3800	- 1.76	55.0193	C <sub>30</sub> H <sub>52</sub> O <sub>3</sub>	原人参二醇	西洋参
143	40.01	[M - H] <sup>+</sup>	149.0229	- 2.27	121.0286	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	邻苯二甲酸	茯苓
144	40.48	[M - H] <sup>-</sup>	283.2639	- 0.92	115.9185	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	硬脂酸	山楂
145	41.61	[M - H] <sup>-</sup>	311.2955	- 0.09	183.0105	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	花生四烯酸	茯苓
146	41.86	[M - H] <sup>+</sup>	599.4264	- 3.05	599.4279	C <sub>35</sub> H <sub>60</sub> O <sub>6</sub>	亚历山德林	茯苓
147	41.93	[M - H] <sup>+</sup>	469.3274	- 3.08	149.0232, 57.0713	C <sub>28</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>	Alisol B	茯苓
148	42.25	[M - H] <sup>+</sup>	465.3691	- 2.50	57.0712	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	乌发醇	山楂

续表 1

No.	保留时间 /min	离子模式	实测值	质量误差 / × 10 <sup>-6</sup>	主要碎片离子 (m/z)	分子式	化合物名称	归属
149	43.31	[M - H] <sup>-</sup>	487.3792	- 0.13	217.0857, 196.8751	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	款冬二醇	陈皮
150	43.42	[M - H] <sup>+</sup>	444.4186	- 3.26	81.0709, 95.0862	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O	α-淀粉酶	陈皮
151	43.49	[M - H] <sup>+</sup>	449.3738	- 3.50	81.0709, 69.0711	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O	丁酰鲸鱼醇	山楂

注 (Note): \*表示经对照品对比指认 (Indicating identification through reference materials)。

**3.2 二陈汤化裁方破壁饮片入血成分分析与鉴定**  
通过对比二陈汤化裁方破壁饮片水溶液、含药血清和空白血清样品的质谱图确认入血成分。若该化合物在二陈汤化裁方破壁饮片水溶液和给药血清样本中均含有, 而不存在于空白血清中, 则判断该化合物为二陈汤化裁方破壁饮片水溶液的入血原形成分; 若该化合物存在于给药血清样

本中, 而二陈汤化裁方破壁饮片水溶液和空白血清中不存在, 则推断该成分可能是二陈汤化裁方破壁饮片水溶液的入血代谢产物。根据化合物的一级、二级质谱进行解析, 从给药血清样本中共检测到 33 个入血成分, 其中 28 个为原形成分, 5 个为代谢产物。代谢途径主要为水解、磺酸化、加合反应等。其 UHPLC-Q-Exactive-MS 见表 2。

表 2 二陈汤化裁方破壁饮片水溶液入血成分鉴定结果

Tab 2 Identification of blood component in the water solution of ultrafine granular powder of Erchen decoction modified formula

No.	保留时间 /min	离子模式	实测值	质量误差 / × 10 <sup>-6</sup>	主要碎片离子 (m/z)	分子式	化合物名称	归属
P1	0.41	[M + H] <sup>+</sup>	173.0813	- 1.53	101.0607	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	没食子酸	茯苓
P2	0.82	[M + H] <sup>+</sup>	118.0870	2.04	102.0560, 70.2681	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	缬氨酸	陈皮
P3	1.88	[M - H] <sup>-</sup>	191.0182	- 2.41	174.9543, 129.0170	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	柠檬酸	天麻
P4	7.50	[M - H] <sup>-</sup>	289.7745	1.05	242.1755, 108.3994	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	儿茶素	茯苓
P5	10.29	[M - H] <sup>-</sup>	192.0651	0.16	179.0425, 146.9638	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	阿魏酸	山楂
P6	17.13	[M - H] <sup>-</sup>	333.0180	0.83	279.8564, 124.0380	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	天麻素	天麻
P7	17.45	[M + H] <sup>+</sup>	167.0231	- 1.83	151.0056, 134.9969	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	香草酸	天麻
P8	17.82	[M - H] <sup>-</sup>	609.1831	- 0.66	302.5440, 151.5726	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	橙皮苷	陈皮
P9	19.45	[M - H] <sup>-</sup>	464.3014	0.55	300.9990	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	金丝桃苷	山楂
P10	22.82	[M - H] <sup>-</sup>	991.5417	1.80	944.5823, 770.6639	C <sub>48</sub> H <sub>82</sub> O <sub>18</sub>	人参皂苷 Re	西洋参
P11	23.35	[M - H] <sup>-</sup>	846.7272	1.65	798.6219, 633.8063	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub>	人参皂苷 Rg <sub>1</sub>	西洋参
M1	23.83	[M - H - HCOOH] <sup>-</sup>	243.8988	0.95	288.9363, 204.9878	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	儿茶素去甲酸代谢物	儿茶素
P12	25.78	[M - H] <sup>-</sup>	431.0323	0.22	310.1636, 282.8441	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	异牡荆苷	山楂
P13	26.31	[M + H] <sup>+</sup>	373.0974	1.71	365.1011, 243.1959	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	橘皮素	陈皮
P14	27.01	[M - H] <sup>-</sup>	431.2284	0.09	310.9309, 288.9364	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	牡荆素	山楂
M2	27.34	[M + H + SO <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	249.1101	1.41	164.9849, 155.0818	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> S	香草酸磺酸化代谢物	香草酸
M3	28.01	[M - H - CH <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	933.1246	- 0.71	945.2859, 768.6711	C <sub>47</sub> H <sub>80</sub> O <sub>18</sub>	人参皂苷 Re 去亚甲酸代谢物	人参皂苷 Re
P15	28.17	[M + H] <sup>+</sup>	403.1395	1.88	317.1728, 242.2118	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	川陈皮素	陈皮
M4	30.64	[M - H - CH <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	599.2999	- 0.83	153.5184	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	橙皮苷去亚甲基代谢物	橙皮苷
P16	31.44	[M - H] <sup>-</sup>	271.8345	0.36	178.0491, 119.2064	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	柚皮素	陈皮
P17	33.69	[M - H] <sup>-</sup>	285.2069	- 0.06	243.8987, 153.8664	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	山柰酚	山楂
P18	34.20	[M + H] <sup>+</sup>	444.3690	4.19	218.1391, 196.0631	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	款冬二醇	陈皮
P19	34.35	[M + H] <sup>+</sup>	104.9642	- 0.17	101.0970	C <sub>5</sub> H <sub>14</sub> NO <sup>+</sup>	胆碱	茯苓
P20	36.15	[M - H] <sup>-</sup>	353.1998	- 0.04	192.9269, 174.9540	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	绿原酸	山楂
P21	36.22	[M - H] <sup>-</sup>	608.3179	1.23	299.2586, 152.2237	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	芦丁	山楂
P22	39.16	[M - H] <sup>+</sup>	466.3295	- 1.41	408.3084, 369.2403	C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> O <sub>5</sub>	茯苓酸 B	茯苓
M5	39.23	[M - H + C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> ] <sup>-</sup>	369.3005	- 0.79	192.9271, 146.9211	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	阿魏酸维生素 C 加合代谢物	阿魏酸
P23	39.47	[M - H] <sup>-</sup>	281.2481	- 0.73	115.0974	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	油酸	茯苓
P24	39.65	[M - H] <sup>-</sup>	455.3528	0.40	440.2230, 393.2777	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	熊果酸	山楂
P25	42.61	[M - H] <sup>-</sup>	727.5023	- 0.42	442.8939, 424.9285	C <sub>32</sub> H <sub>40</sub> O <sub>19</sub>	巴利森苷 B	天麻
P26	44.63	[M - H] <sup>-</sup>	469.9125	- 0.74	407.1866	C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	柠檬苦素	陈皮
P27	44.79	[M - H] <sup>-</sup>	283.9308	- 0.93	115.9181	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	硬脂酸	西洋参
P28	46.30	[M - H] <sup>-</sup>	311.1686	- 0.89	182.8599	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	花生四烯酸	茯苓

注 (Note): P 为原形成分; M 为代谢产物 (P is the original component; M is the metabolite)。

**3.2.1 入血原形成分分析** 陈皮中的主要化学成分为黄酮类化合物, 以川陈皮素为例。川陈皮素分子

式为 C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub>, 精确质量数为 402.3900。该化合物的可能裂解途径见图 2, 在正离子模式下, 川陈皮



素准离子峰为 403.1395。失去 6 个亚甲基生成  $m/z$  317.1728 的离子；断裂双键生成  $m/z$  161.0783 和  $m/z$  242.2118 两个离子。

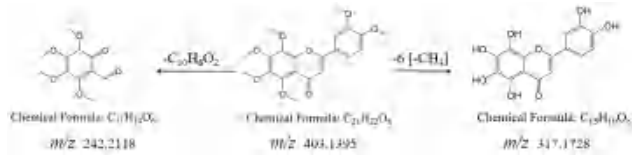


图 2 川陈皮素的质谱碎片和可能裂解途径

Fig 2 Mass spectrometry fragments and possible cleavage pathways of nobletin

天麻中含有丰富的苯酚类物质，以巴利森昔 B 为例。巴利森昔 B 的分子式为  $C_{32}H_{40}O_{19}$ ，精确质量数为 728.6530。该化合物的可能裂解途径见图 3，在负离子模式下，巴利森昔 B 准离子峰为 727.5023。酯基断裂生成  $m/z$  442.8939 的离子；随即脱羟基生成  $m/z$  424.9285 的离子。

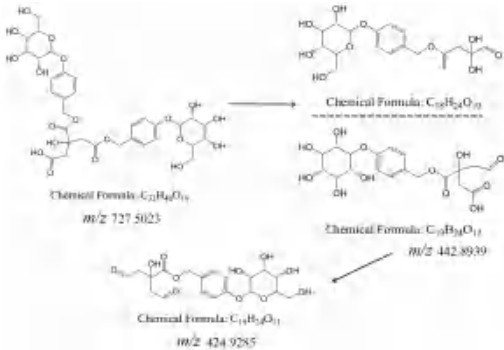


图 3 巴利森昔 B 的质谱碎片和可能裂解途径

Fig 3 Mass spectrometry fragments and possible cleavage pathways of parishin B

山楂的主要化学成分为黄酮类化合物，以芦丁为例。芦丁的分子式为  $C_{27}H_{30}O_{16}$ ，精确质量数为 610.5180。该化合物的可能裂解途径见图 4，在负离子模式下，芦丁的准离子峰为 608.3179。经水解反应生成  $m/z$  299.2586 的离子（槲皮素）；随后经 RDA 反应生成  $m/z$  152.2237 的离子。

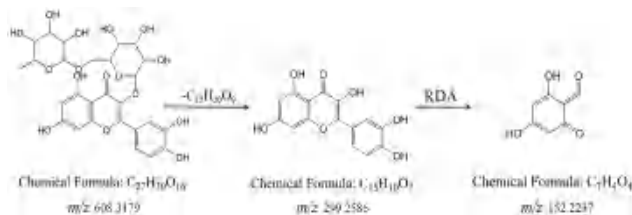


图 4 芦丁的质谱碎片和可能裂解途径

Fig 4 Mass spectrometry fragments and possible cleavage pathways of rutin

西洋参的主要化学成分为四环三萜类化合物，以人参皂昔  $Rg_1$  为例。人参皂昔  $Rg_1$  的分子式为  $C_{42}H_{72}O_{14}$ ，精确质量数为 801.0100。该化合物的可能裂解途径见图 5，在负离子模式下，人参皂昔  $Rg_1$  准离子峰为 846.7272，推测是人参皂昔  $Rg_1$  与  $HCOOH$

加合后的产物。脱去 1 个葡萄糖基生成  $m/z$  632.8063 的离子。

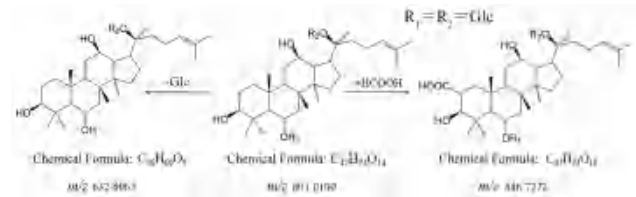


图 5 人参皂昔  $Rg_1$  的质谱碎片和可能裂解途径

Fig 5 Mass spectrometry fragments and possible cleavage pathways of ginsenoside  $Rg_1$

茯苓的主要化学成分为三萜类化合物，以茯苓酸 B 为例。茯苓酸 B 的分子式为  $C_{30}H_{44}O_5$ ，精确质量数为 484.6700。该化合物的可能裂解途径见图 6，在负离子模式下，茯苓酸 B 的准离子峰为 466.3295，推测是茯苓酸 B 的脱水产物。脱去羧酸生成  $m/z$  408.3084 的离子；随后脱去 1 个羧基生成  $m/z$  369.2403 的离子。

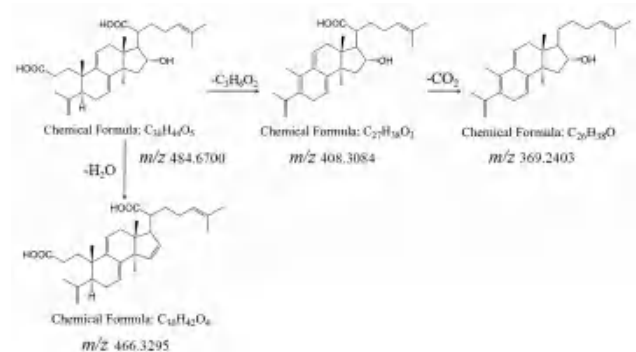


图 6 茯苓酸 B 的质谱碎片和可能裂解途径

Fig 6 Mass spectrometry fragments and possible cleavage pathways of pachymic acid B

**3.2.2 入血代谢产物分析** 代谢物 M1 准离子峰为 243.8988，加合 1 分子甲酸生成  $m/z$  288.9363 的特征离子，其余碎片离子与儿茶素相同，推测该为儿茶素去甲酸代谢物。代谢物 M2 准离子峰为 249.1101，脱去 1 分子磺酸酯基生成  $m/z$  164.9849 特征离子，其余碎片离子与香草酸相同，推测该为香草酸磺酸化代谢物。代谢物 M3 准离子峰为 933.1246，加合 1 分子甲酸生成  $m/z$  989.8794 的特征离子，其余离子碎片与人参皂昔  $Re$  相同，推测该为人参皂昔  $Re$  的去甲酸代谢物。代谢物 M4 准离子峰为 599.2999，加合 1 个亚甲基生成  $m/z$  607.2215 的特征离子，其余碎片离子与橙皮昔相同，推测该为橙皮昔去亚甲基代谢物。代谢物 M5 准离子峰为 369.3005，脱去 1 分子维生素 C 生成  $m/z$  192.9271 的特征离子，其余碎片离子与阿魏酸相同，推测该为阿魏酸维生素 C 加合代谢物。以代谢物 M3 为例具体说明代谢鉴定过程（见图 7）。

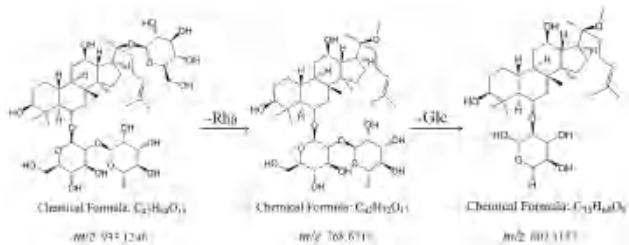


图 7 代谢物 M3 的质谱碎片和可能裂解途径

Fig 7 Mass spectrometry fragments and possible cleavage pathways of pachymic metabolite M3

#### 4 讨论

中药复方根据临床辨证不同而灵活配伍，具有中医独特的治疗优势，但中药化学成分复杂，难以阐明其发挥治疗作用的药效物质基础以及作用机制<sup>[12-13]</sup>。对药物入血成分进行分析，可在一定程度上缩小药效物质的研究范围<sup>[14]</sup>。本课题组对传统化痰方剂二陈汤进行药味加减化裁，使其更针对现代临床常见的代谢疾病相关并发症，并使用破壁饮片，提高了药物的溶出率和吸收利用效率。

UHPLC-Q-Exactive-MS 具有分辨率高、准确度高、分离度高的特点，是对中药复方复杂体系中化学成分分析鉴定的高效方法。汤药溶剂中加入有机溶剂甲醇，可溶解更多类型的有效成分，沉淀其中可能存在的蛋白，低温条件离心保证物质原本的结构，然后去掉沉淀和残渣，取上清液后再次使用有机溶剂溶解，起到二次提取的作用。在此基础上，本课题组采用 UHPLC-Q-Exactive-MS 法对大鼠灌胃给药二陈汤化裁方破壁饮片水溶液后的血清样本进行分析，将血清样本与二陈汤化裁方破壁饮片水溶液及空白样本进行对比，依据入血成分二级质谱图准分子离子及特征碎片离子，结合文献查阅，本课题组共鉴定出 33 个化合物，包括 28 个原形成分及 5 个代谢产物<sup>[15-18]</sup>。代谢产物的反应途径涉及水解、磺酸化、加合反应等。这些化合物均可能是二陈汤化裁方破壁饮片在体内产生药效作用的物质。

综上，二陈汤化裁方成分复杂，本研究通过建立二陈汤化裁方破壁饮片含药血清的 UHPLC-Q-Exactive-MS 分析方法，解析了二陈汤化裁方破壁饮片的入血原形成分及代谢产物，为二陈汤化裁方的临床合理应用及破壁饮片的进一步开发奠定了理论基础。

#### 参考文献

- [1] 姚金彤, 马莹莹. 二陈汤的临床应用研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(68): 58-60.
- [2] 刘思祎, 陈锦明, 俞洁. 二陈汤对高脂饮食小鼠糖脂代谢和生殖激素分泌的调节作用研究: 基于 Kisspeptin/GPR54 通路[J]. 亚太传统医药, 2023, 19(12): 17-21.
- [3] Bai J, Qi JB, Yang L, et al. A comprehensive review on ethnopharmacological, phytochemical, pharmacological and toxicological evaluation, and quality control of *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit[J]. J Ethnopharmacol, 2022, 298(5): 115650.
- [4] Caré W, Grenet G, Schmitt C, et al. Adverse effects of licorice consumed as food: an update[J]. Rev Med Interne, 2023, 44(9): 487-494.
- [5] Gheytasi I, Savari F, Akbari G, et al. Molecular mechanisms of Hawthorn extracts in multiple organs disorders in underlying of diabetes: a review[J]. Int J Endocrinol, 2022, 2022(2): 2002768.
- [6] Yoon SJ, Kim SK, Lee NY, et al. Effect of Korean Red Ginseng on metabolic syndrome[J]. J Ginseng Res, 2021, 45(3): 380-389.
- [7] Lee OH, Kim KI, Han CK, et al. Effects of acidic polysaccharides from gastrodia rhizome on systolic blood pressure and serum lipid concentrations in spontaneously hypertensive rats fed a high-fat diet[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(1): 698-709.
- [8] 何忠义, 于澄. 代谢综合征中西医研究进展[J]. 中国中医药现代远程教育, 2022, 20(15): 196-198.
- [9] 宋叶, 梅全喜, 胡莹, 等. 中药破壁饮片临床应用研究进展[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(1): 173-176.
- [10] 石慧, 李晓, 周英, 等. 基于 UPLC-QE-HF-MS/MS 技术分析红凉伞化学成分及入血成分[J]. 中国药房, 2024, 35(3): 316-321.
- [11] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [12] 贺琪璐, 王敏存, 陈定芳, 等. 中药复方配伍的整体定量药理学表征体系建立与实验验证[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2023, 37(S1): 36-37.
- [13] 字磊, 李艳娟, 李艳芹, 等. 中药复方配伍机制研究方法/策略进展[J]. 中国药房, 2023, 34(11): 1393-1398.
- [14] 张雅秋, 渠弼, 杨巧荷. 中药血清药物化学研究进展[J]. 疾病监测与控制, 2019, 13(2): 148-151, 157.
- [15] 康安, 郭锦瑞, 谢彤, 等. UPLC-LTQ-Orbitrap 质谱联用技术分析茯苓中的化学成分[J]. 南京中医药大学学报, 2014, 30(6): 561-565.
- [16] 杨璐嘉, 张传洋, 王丽娟, 等. 基于 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 法比较不同炮制方法下山楂化学成分差异[J]. 山东化工, 2023, 52(10): 138-145.
- [17] 刘金莲, 南海鹏, 陶然, 等. 基于超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱技术的清利湿热颗粒入血成分分析[J]. 世界中医药, 2023, 18(6): 756-760.
- [18] 胡晒平, 严建业, 伍红年, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 的西洋参提取物及入血成分分析[J]. 中南药学, 2019, 17(6): 825-830.

(收稿日期: 2024-03-11; 修回日期: 2024-07-16)

## 不同产地白术挥发性成分 HS-SPME/GC-MS 分析

刘雅冬<sup>1,2</sup>, 刘舒<sup>1</sup>, 向蒙<sup>1,2</sup>, 赵权<sup>1</sup>, 肖扬波<sup>2,3\*</sup>, 彭国平<sup>1,2\*</sup> (1. 湖南农业大学生物科学技术学院, 长沙 410128; 2. 道地药用植物规范化栽培综合利用湖南省工程实验室, 长沙 410128; 3. 湖南省农科院茶叶研究所, 长沙 410125)

**摘要:** **目的** 分析不同产地白术挥发性成分差异, 为白术产地溯源、加工和品质评价提供科学依据。**方法** 采用顶空固相微萃取技术 (HS-SPME) 结合气相质谱联用技术 (GC-MS), 联合层次聚类分析 (HCA)、主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 法对不同产地 11 批白术挥发性成分进行差异分析。**结果** 从白术样品中共鉴定出 30 种挥发性成分, 其中共有成分 17 种, 占总挥发性成分含量的 88.31% 以上; 不同产地白术 8 种挥发性成分含量存在显著差异 ( $VIP > 1, P < 0.05$ ), 其中包含 4 种品质挥发性成分; 浙江和河北白术特征品质挥发性成分为苍术酮, 湖南白术特征品质挥发性成分为莪术烯、 $\alpha$ -桉叶醇和大根香叶烯 B, 安徽和重庆白术特征品质挥发性成分为  $\alpha$ -桉叶醇。**结论** 不同产地白术特征品质挥发性成分可为产地溯源、加工和品质评价奠定基础。

**关键词:** 白术; 产地; 挥发性成分

中图分类号: R284.1, O658 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)08-2048-05  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.013

## Volatile compounds of *Atractylodes macrocephala* from different regions by HS-SPME/GC-MS

LIU Ya-dong<sup>1,2</sup>, LIU Shu<sup>1</sup>, XIANG Meng<sup>1,2</sup>, ZHAO Quan<sup>1</sup>, XIAO Yang-bo<sup>2,3\*</sup>, PENG Guo-ping<sup>1,2\*</sup> (1. College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128; 2. Hunan Engineering Laboratory for Good Agricultural Practice and Comprehensive Utilization of Genuine-Regional Medicinal Plants, Changsha 410128; 3. Tea Research Institute, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125)

**Abstract: Objective** To determine the differences in the volatile compounds of *Atractylodes macrocephala* from different regions, and to provide reference for the region traceability processing, and quality evaluation of *Atractylodes macrocephala*. **Methods** Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME), gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), coupled with hierarchical cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA), and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) were used to analyze the differences in volatile compounds in 11 batches of *Atractylodes macrocephala* from different regions. **Results** Totally 30 volatile compounds were identified, 17 of which were shared compounds, accounting for more than 88.31% of the total volatile compound content. There were significant differences in the content of 8 volatile compounds in *Atractylodes macrocephala* from different regions ( $VIP > 1, P < 0.05$ ), 4 of which contained quality volatile compounds. The characteristic quality volatile compounds of *Atractylodes macrocephala* from Zhejiang and Hebei included atractylenol, that from Hunan was curzerene,  $\alpha$ -eudesmol, and germacrene B, and that from Anhui and Chongqing was  $\alpha$ -eudesmol. **Conclusion** The volatile compounds of *Atractylodes macrocephala* from different regions can be used for region tracing, processing and quality evaluation.

**Key words:** *Atractylodes macrocephala*; region; volatile compound

**基金项目:** 湖南省发改委 2019 年省预算内基本建设投资计划项目 (湘发改投资 [2019]208 号); 2019 年湖南省普通高校校企合作创新创业教育基地项目 (湘教通 [2019]333 号)。

**作者简介:** 刘雅冬, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药材品质化学研究, email: lyd2373@163.com \***通信作者:** 肖扬波, 男, 硕士, 研究实习员, 主要从事茶叶与中药材香气化学研究, email: xiaoyangboh@163.com; 彭国平, 男, 博士, 副教授, 主要从事中药规范化栽培与应用研究, email: pgphh@163.com



白术为菊科植物白术 (*Atractylodes macrocephala* Koidz.) 的干燥根茎, 味苦、甘、温, 归脾、胃经, 有健脾益气、燥湿利水、止汗、安胎功效。白术源于浙江省宁波市, 目前在河北、湖南、安徽和重庆等省也有广泛种植。在《神农本草经》中白术被列为上品, 主产南方, 浙江地区的品质最好<sup>[1]</sup>。

白术是一种药食同源的芳香性中药材, 具有丰富的营养价值和药用价值<sup>[2]</sup>。挥发性成分是芳香性中药材的重要药理活性成分。白术含有丰富的挥发性成分, 包括倍半萜和内酯类等挥发性成分<sup>[3]</sup>, 其中苍术酮和白术内酯类成分含量最高, 具有改善肠胃功能、调节免疫、抗肿瘤和抗炎等药理作用<sup>[4-7]</sup>。然而, 由于不同产地具有不同的气候环境、土壤结构和栽培管理方式, 导致不同产地白术积累的次生代谢挥发性产物存在差异<sup>[8]</sup>。但目前关于产地对白术挥发油品质的影响研究报道较少。

顶空固相微萃取 (HS-SPME) 技术是挥发性成分提取的常用方法, 具有样品量需求少, 提取速度快和无有机溶剂等优势<sup>[9-10]</sup>。气相质谱联用 (GC-MS) 技术是分离香气化合物, 并对目标化合物进行定性定量分析的强有力工具<sup>[11]</sup>。因此, 本研究通过 HS-SPME 结合 GC-MS 技术, 联合层次聚类分析 (HCA)、主成分分析 (PCA) 及偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA), 分析不同产地白术挥发性成分差异, 可为白术产地溯源、品质评价及产地加工奠定基础。

## 1 材料

### 1.1 试药

白术样品分别来源于浙江磐安市、河北安国市、安徽亳州市、湖南岳阳市和重庆市, 样品来源见表 1。试验用水 (华润怡宝饮料有限公司)。

表 1 样品来源信息

Tab 1 Sample source information

编号	产地	编号	产地
ZJ	浙江省磐安市	HN-1	湖南省岳阳市
HB	河北省安国市	HN-2	湖南省岳阳市
AH-1	安徽省亳州市	HN-3	湖南省岳阳市
AH-2	安徽省亳州市	CQ-1	重庆市
AH-3	安徽省亳州市	CQ-2	重庆市
		CQ-3	重庆市

### 1.2 仪器

CS-700 型高速多功能粉碎机 (武义海纳电器有限公司); FA-2104N 型电子天平 (精度: 0.0001 g, 上海菁海仪器有限公司); MASS-M02 型萃取纤维头 (上海新拓分析仪器科技有限公司); MASS-6036ASH 型恒温磁力加热台 (上海新拓分析仪器科技有限公司); 8860-5977B 型气相质谱联用仪 (安捷伦科技有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 HS-SPME 提取挥发性成分

称取 2 g 样品于 20 mL 顶空瓶中, 置恒温磁力加热台上, 40 °C 平衡 10 min, 插入老化后 (250 °C 加热 10 min) 的 75 μm PDMS/DVB/CAR 萃取纤维头, 60 °C 下萃取 40 min, 取出纤维头, 插入 GC-MS 仪器解析进样。

### 2.2 GC-MS 分析挥发性成分

**2.2.1 GC 条件** DB-5ms 色谱柱 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm); 初始温度 45 °C, 保持 3 min, 以 5 °C · min<sup>-1</sup> 速率升温至 100 °C, 保持 2 min, 以 10 °C · min<sup>-1</sup> 速率升温至 250 °C, 保持 5 min; 流速为 1.4 mL · min<sup>-1</sup>; 检测器: MSD 检测器; 载气: He (99.999% 纯度); 进样分流比: 5 : 1; 隔垫吹扫流量: 3 mL · min<sup>-1</sup>; 进样口温度: 250 °C。

**2.2.2 MS 条件** 离子源为 EI 源, 电子能量: 70 eV; 离子源温度: 230 °C; 四极杆温度: 150 °C; 传输线温度: 280 °C; 采集方式: 扫描模式 (Scan/SIM); 扫描质量范围 (*m/z*): 35 ~ 550; 溶剂延迟 1.0 min。

### 2.3 挥发性成分定性与定量

经 NIST 2017 质谱数据库检索匹配, 按相似度 > 75% 的原则作为鉴定结果, 按峰面积归一化法计算化合物的相对百分含量。

### 2.4 数据处理与分析

通过 Office Excel 2019 对挥发性成分数据进行统计分析, Region 2023 软件绘制环状热图, Simca 14.1 软件进行 HCA、PCA 和 OPLS-DA 分析, Prism 8 软件进行柱状图分析。

## 3 结果与分析

### 3.1 挥发性成分鉴定结果

通过 HS-SPME/GC-MS 技术对 11 批次白术样品的挥发性成分进行分析, 结果见表 2。从白术中鉴定出 30 种挥发性成分, 其中共有成分 17 种, 占总挥发性成分含量的 88.31% 以上。11 批次白术中含量最高的挥发性成分均为苍术酮, 平均占比 30.61%, 其次为丙羟木栓酮、莪术烯、β-neoclovene 和 β-新丁子香萜烯, 平均占比分别为 11.09%、10.33%、8.65% 和 8.32%。

### 3.2 HCA

采用 HCA 法对不同产地白术挥发性成分进行分析 (见图 1)。结果表明, 当欧氏距离为 45 时, 可将 5 个产地的 11 批白术分为四类, 重庆 3 个白术样品归为 1 类、安徽 3 个白术样品归为 1 类、湖南 3 个白术样品归为 1 类、河北和浙江白术归为 1 类。通过挥发性成分聚类分析, 可将湖南、安徽、重庆与河北和浙江产地白术进行区分, 但不能区分河北产地和浙江产地的白术。

表 2 白术挥发性成分鉴定结果

Tab 2 Identification of volatile compounds in *Atractylodes macrocephala*

$t_R$ /min	分子式	化合物名称	CAS 号 / CID 号	编号											
				ZJ	HB	AH-1	AH-2	AH-3	HN-1	HN-2	HN-3	CQ-1	CQ-2	CQ-3	
19.38	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O	4A-甲基-4, 4a, 5, 6, 7, 8-六氢-3H-萘-2-酮	826-56-2	2.22	3.71	2.96	3.00	3.13	3.38	3.27	3.15	2.52	2.33	3.06	
21.06	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	石竹烯	87-44-5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.04	
21.28	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	$\gamma$ -榄香烯	3242-08-8	0.80	0.00	0.68	0.80	0.94	1.26	1.18	1.10	0.72	0.78	0.53	
21.61	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	$\alpha$ -石竹烯	6753-98-6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.08	
22.07	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O	4-(2, 6, 6-三甲基-2-亚环己邻烯基)-2-丁酮	56052-61-0	2.03	1.89	2.49	2.29	2.47	2.66	2.62	2.57	2.21	2.25	2.46	
22.14	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O	(反式, 反式)-8-甲基-7-(1-甲基乙基)-3, 5, 7-壬三烯-2-酮	70372-94-0	5.55	6.84	4.25	4.88	5.49	5.65	5.49	5.33	3.61	4.03	3.79	
22.83	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	芹子-3, 7(11)-二烯	6813-21-4	0.86	0.64	0.83	0.95	1.19	1.42	1.37	1.33	0.95	1.11	1.08	
22.96	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub>	$\beta$ -vatiorene	6431532	0.76	0.70	0.77	0.78	0.86	1.28	1.18	1.08	0.91	0.90	1.33	
23.13	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	大根香叶烯 B	15423-57-1	0.32	0.41	0.28	0.33	0.31	0.55	0.50	0.43	0.33	0.29	0.39	
23.18	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	反式橙花叔醇	7212-44-4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.18	
23.49	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	$\alpha$ -古巴烯-11-醇	41370-56-3	0.50	—	0.65	0.57	—	0.41	0.42	0.42	0.79	0.68	1.06	
23.63	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub>	3, 4-二乙基-7, 7-二甲基-1, 3, 5-环庚三烯	590161	0.46	—	1.17	0.31	—	0.58	0.52	0.46	1.63	0.80	2.21	
23.89	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O	8-亚异丙基二环壬烷-2-酮	596085	—	—	0.51	0.19	—	—	—	—	0.98	0.64	1.29	
23.98	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	$\beta$ - $\alpha$ -石竹烯	116-04-1	—	—	0.32	0.22	—	—	—	—	0.40	0.38	0.49	
24.36	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	$\beta$ -桉叶醇	473-15-4	—	—	0.31	0.00	—	0.00	0.13	0.24	0.40	0.35	0.56	
24.44	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O	莪术烯	17910-09-7	11.28	7.90	7.68	9.40	8.33	16.83	15.48	14.13	8.63	9.62	4.31	
24.54	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	$\alpha$ -桉叶醇	473-16-5	0.43	0.08	1.17	1.17	0.99	0.99	1.05	1.11	1.18	1.14	1.14	
24.65	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	$\beta$ -马榄烯	489-29-2	—	—	0.66	0.50	0.39	0.47	0.52	0.57	0.81	0.81	1.06	
24.90	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	$\alpha$ -愈创木烯	3691-12-1	—	—	0.83	0.49	0.32	0.34	0.41	0.47	0.46	0.72	—	
25.13	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	桉油烯醇	6750-60-3	—	—	0.97	—	—	—	0.30	0.61	0.87	1.02	1.08	
25.34	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	桔利酮	6754-66-1	0.70	1.24	3.38	2.86	1.99	1.71	1.97	2.23	3.32	2.84	2.18	
25.89	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> NO	2, 2-二甲基-2-苯乙酰胺	826-54-0	—	—	2.14	1.68	0.93	1.14	1.28	1.41	1.64	1.44	1.88	
26.55	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	蓝桉醇	51371-47-2	1.03	1.37	1.59	1.38	1.31	1.24	1.42	1.59	1.43	2.45	1.71	
26.62	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O	2, 6, 7, 7a-四氢-4, 4-二甲基-5(4H)-茛酮	18366-35-3	0.66	0.74	1.39	1.08	0.63	—	—	—	1.03	—	1.25	
26.78	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	$\beta$ -新丁子香烯	56684-96-9	5.30	4.98	9.15	7.49	7.77	5.08	6.00	6.92	11.84	14.88	12.13	
27.09	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	白术内酯 I	73069-13-3	3.04	3.93	3.90	3.94	3.66	2.98	3.14	3.29	3.51	3.54	3.83	
28.34	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	丙羟木栓酮	552-96-5	13.54	13.32	10.15	11.14	12.17	10.87	11.23	11.61	8.87	10.24	8.85	
28.68	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	$\beta$ -panasinsene	595133	4.34	5.37	4.99	3.82	3.78	3.40	3.46	3.52	4.79	4.32	3.99	
28.81	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	$\beta$ -neoclovene	595094	7.03	7.02	8.01	7.46	8.25	9.17	9.58	10.00	10.02	8.93	9.61	
29.19	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O	苍术酮	6989-21-5	39.17	39.85	28.75	33.25	35.10	28.59	27.48	26.42	26.13	23.51	28.46	

注 (Note): “—” 表示该成分未检测到 (“—” Indicates that the compound is not detected)。

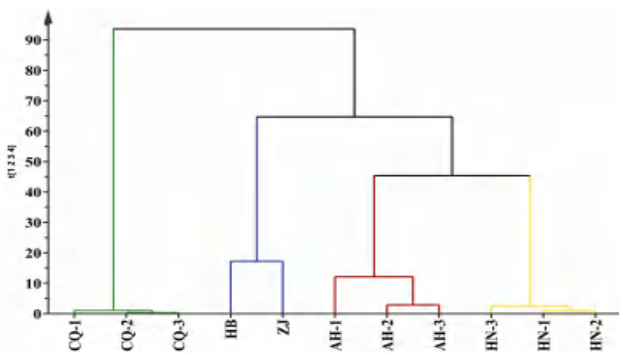


图 1 不同产地白术挥发性成分聚类分析

Fig 1 Cluster analysis of volatile compounds of *Atractylodes macrocephala* from different regions

### 3.3 PCA

基于白术 30 种挥发性成分相对百分含量, 采用 PCA 对安徽、湖南、重庆、浙江和河北白术挥发性成分进行分析 (见图 2)。结果表明,  $R^2X = 45\%$ 、 $R^2Y = 24.6\%$ , 总方差 ( $R^2X + R^2Y$ ) 为 69.6%, 表明该模型具有较好的预测性。PCA 图中, 同一产地表

现出较好的聚类, 而不同产地表现出较好的分离, 表明同一产地白术挥发性成分差异较小, 不同产地白术挥发性成分差异较大。

### 3.4 OPLS-DA

进一步采用 OPLS-DA 法对不同产地白术挥发性成分进行分析 (见图 3)。结果  $R^2X = 0.938$ ,  $R^2Y = 0.942$ ,  $Q^2 = 0.651$ , 表明该模型具有较好的预测效果,  $X$  方向解释率为 93.8%,  $Y$  方向解释率为 94.2%。为验证该模型是否存在过拟合, 设置假设检验次数为 200, 对该模型进行检验, 结果发现,  $R^2$  和  $Q^2$  的回归线的斜率为正数,  $Q^2$  为负数, 表明该模型不存在过拟合。通过 OPLS-DA 模型发现, 不同产地白术在图中表现出较好的分离, 表明该模型对不同产地白术具有较好的判别效果。

### 3.5 差异挥发性成分分析

基于  $VIP > 1$  和  $P < 0.05$  对不同产地白术挥发性成分进行差异成分筛选。结果共鉴定出 8 种差异挥

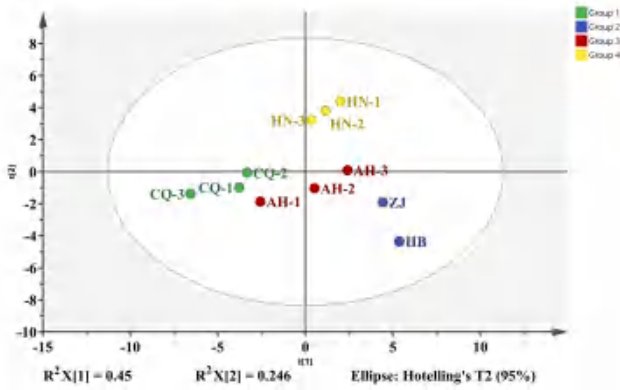


图 2 不同产地白术挥发性成分 PCA 分析  
Fig 2 PCA analysis of volatile compounds of *Atractylodes macrocephala* from different regions

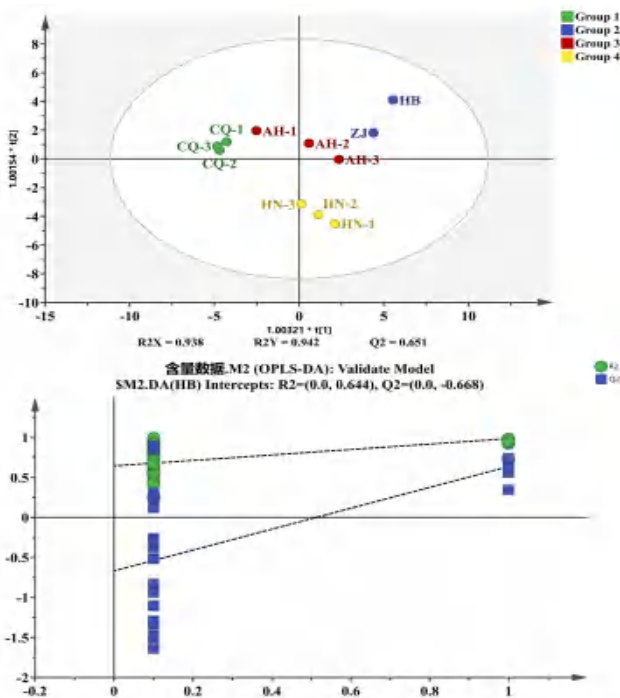


图 3 不同产地白术挥发性成分 OPLS-DA 模型分析  
Fig 3 OPLS-DA analysis of volatile compounds in *Atractylodes macrocephala* from different regions

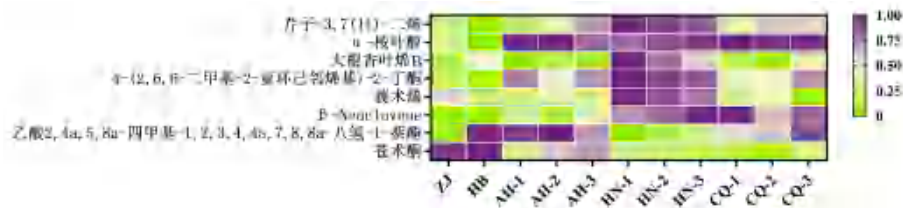


图 4 不同产地白术差异挥发性成分热图分析  
Fig 4 Heatmap analysis of differential volatile compounds of *Atractylodes macrocephala* from different regions

丁子香萜烯等。但是，不同产地白术的挥发性成分含量差异较大，其中 4 种品质挥发性成分存在显著差异，为苍术酮、莜术烯、 $\alpha$ -桉叶醇和大根香叶烯 B。浙江和河北白术中苍术酮含量较高，湖南白术中莜术烯、 $\alpha$ -桉叶醇和大根香叶烯 B 含

量较高，安徽和重庆白术中  $\alpha$ -桉叶醇含量较高。基于不同产地白术品质挥发性成分差异，可为白术产地溯源、品质评价和加工提供理论依据。

苍术酮是白术中含量最高的挥发性成分，也是白术中关键的药理活性成分，具有保肝、抗肿瘤和

### 3.6 差异品质挥发性成分分析

根据作用类别进行分类，白术挥发性成分可分为药理活性品质成分、香气活性品质成分和其他成分。据目前研究报道，不同产地白术 8 种差异挥发性成分可分为 3 种药理活性成分、1 种香气活性成分和 4 种其他挥发性成分。药理活性品质成分为苍术酮、莜术烯和  $\alpha$ -桉叶醇，香气活性品质成分为大根香叶烯 B。对不同产地白术中 4 种品质成分含量进行分析，结果表明，苍术酮在浙江和河北白术中含量最高，莜术烯和大根香叶烯 B 在湖南白术中含量最高， $\alpha$ -桉叶醇在安徽、湖南和重庆白术中含量最高（见图 5）。因此，苍术酮是浙江和河北白术特征药理品质成分，莜术烯和  $\alpha$ -桉叶醇是湖南白术特征药理品质成分， $\alpha$ -桉叶醇是安徽和重庆白术特征药理品质成分；大根香叶烯 B 是湖南白术特征香气品质成分。

## 4 讨论

本研究采用 HS-SPME/GC-MS 技术对比了浙江、河北、安徽、湖南和重庆产地白术挥发性成分，发现主要挥发性成分种类一致，均为苍术酮、丙羟木栓酮、莜术烯、 $\beta$ -neoclovene 和  $\beta$ -新



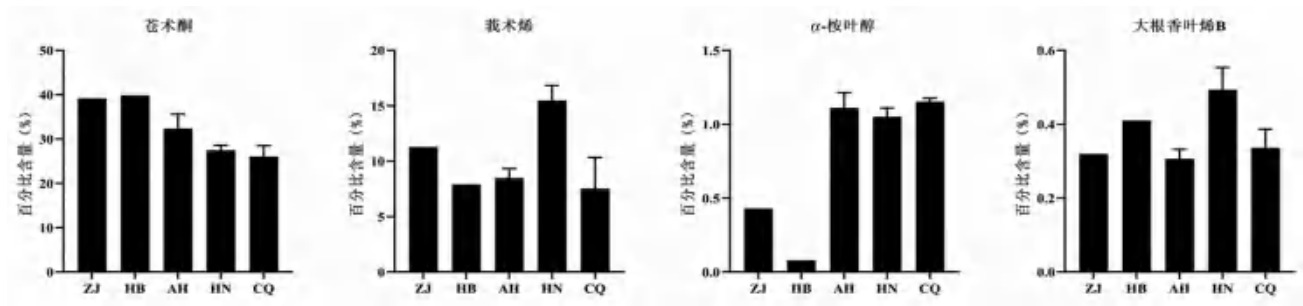


图5 不同产地白术差异品质挥发性成分

Fig 5 Differential quality of volatile compounds of *Atractylodes macrocephala* from different regions

抗病毒等药理作用<sup>[12-14]</sup>。与安徽、湖南和重庆白术相比,源产地(浙江)白术和河北白术中苍术酮含量较高,表明浙江和河北白术挥发油品质相对较好。但白术整体品质的评价,还需结合外形、含水量、灰分、二氧化硫残留、多糖含量和内酯含量等因素进行综合分析。莪术烯和 $\alpha$ -桉叶醇也是重要的药理活性成分,具有抗肿瘤、抗虫、抗炎和抑制神经血管扩张等<sup>[15-18]</sup>。莪术烯在湖南白术中含量最高,对挥发油品质具有一定提升作用。 $\alpha$ -桉叶醇在安徽、湖南和重庆白术中含量较高,但 $\alpha$ -桉叶醇在总挥发性成分中占比较低,对挥发油品质影响较小。此外,大根香叶烯B是一种重要的芳香活性化合物,具有强烈的甜香、木香和天竺葵香,有研究表明大根香叶烯B在酸橙皮油中占比仅0.35%,但对整体香气起着决定性的作用<sup>[19]</sup>。大根香叶烯B在湖南白术中含量最高,可能对湖南白术的香气品质具有重要作用。

## 参考文献

[1] 谭小娟,李世雄,李璎峪,等.白术饮片的指纹图谱形状特征与质量标志物(Q-Marker)研究[J].中草药,2021,52(16):4844-4851.

[2] 郭慧玲,徐梦甜,伍振峰,等.白术热风干燥动力学及其挥发性成分变化规律的研究[J].中国中药杂志,2022,47(4):922-930.

[3] 杨丹阳,于欢,吴晓莹,等.白术化学成分及其生物活性研究进展[J].中华中医药学刊,2023,41(5):171-182.

[4] 鲁慧东,李艳梅.白术内酯Ⅲ通过调节JAK2/STAT3信号通路减轻溃疡性结肠炎模型小鼠肠道损伤[J].中国病理生理杂志,2023,39(1):142-149.

[5] 刘鹏,胡阳黔,曹扶胜,等.白术内酯I对自身免疫性肝损伤小鼠JAK/STAT信号通路的调节作用研究[J].现代中西医结合杂志,2021,30(27):2975-2980,2986.

[6] Huang HL, Lin TW, Huang YL, et al. Induction of apoptosis and differentiation by atractylenolide-1 isolated from *Atractylodes macrocephala* in human leukemia cells [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2016, 26(8): 1905-1909.

[7] 夏非,杨武,金鹏,等.白术内酯I调控Janus激酶2/信号转导和转录激活因子3通路对分泌性中耳炎大鼠听功能及炎症反应的影响[J].中国临床药理学杂志,2023,39

(8): 1127-1131.

[8] 阳湖荣,袁洁,戴传超.影响白术挥发油积累因素的研究进展[J].中草药,2018,49(3):754-760.

[9] Peng Q, Li SS, Zheng H, et al. Characterization of different grades of Jiuqu hongmei tea based on flavor profiles using HS-SPME-GC-MS combined with E-nose and E-tongue [J]. Food Res Int, 2023, 172: 113198.

[10] Su D, He JJ, Zhou YZ, et al. Aroma effects of key volatile compounds in Keemun black tea at different grades: HS-SPME-GC-MS, sensory evaluation, and chemometrics [J]. Food Chem, 2022, 373: 131587.

[11] Song H, Liu J. GC-O-MS technique and its applications in food flavor analysis [J]. Food Res Int, 2018, 114: 187-198.

[12] Cheng Y, Mai JY, Hou TL, et al. Antiviral activities of atractylon from *Atractylodis Rhizoma* [J]. Mol Med Rep, 2016, 14(4): 3704-3710.

[13] Cheng Y, Chen TY, Yang XL, et al. Atractylon induces apoptosis and suppresses metastasis in hepatic cancer cells and inhibits growth in vivo [J]. Cancer Manag Res, 2019, 11: 5883-5894.

[14] Kim DB, Lee DK, Cheon C, et al. Natural products for liver cancer treatment: from traditional medicine to modern drug discovery [J]. Nutrients, 2022, 14(20): 4252.

[15] Asakura K, Kanemasa T, Minagawa K, et al.  $\alpha$ -Eudesmol, a P/Q-type  $Ca^{2+}$  channel blocker, inhibits neurogenic vasodilation and extravasation following electrical stimulation of trigeminal ganglion [J]. Brain Res, 2000, 873(1): 94-101.

[16] Wang YD, Li JH, Guo JQ, et al. Cytotoxic and antitumor effects of curzerene from *Curcuma longa* [J]. Planta Medica, 2017, 83(1/02): 23-29.

[17] De Lima Nunes TA, Santos MM, De Oliveira MS, et al. Curzerene antileishmania activity: effects on *Leishmania amazonensis* and possible action mechanisms [J]. Int Immunopharmacol, 2021, 100: 108130.

[18] De Jesus ENS, Tavares MS, Barros PAC, et al. Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory activities of the curzerene type essential oil of *Eugenia uniflora* from Brazil [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 317: 116859.

[19] Clark BC, Chamblee TS, Iacobucci GA. HPLC isolation of the sesquiterpene hydrocarbon germacrene B from lime peel oil and its characterization as an important flavor impact constituent [J]. J Agric Food Chem, 1987, 35(4): 514-518.

(收稿日期: 2023-10-05; 修回日期: 2023-12-06)

# UPLC-MS/MS 法及均相酶免疫法测定人全血西罗莫司浓度

杨华, 王兰, 宋微微, 杨晓娟, 冀召帅, 艾超\* (清华大学附属北京清华长庚医院药学部, 清华大学临床医学院, 北京 102218)

**摘要:** **目的** 建立高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 法监测人全血西罗莫司浓度, 并将检测结果与均相酶免疫法进行比较。**方法** 100  $\mu\text{L}$  全血样品加入 10  $\mu\text{L}$  西罗莫司-D<sub>3</sub> 内标、100  $\mu\text{L}$  0.1 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub> 溶液、300  $\mu\text{L}$  甲醇, 涡旋离心后, 上清液 5  $\mu\text{L}$  进样。以 0.1% 甲酸-甲醇为有机相, 0.1% 甲酸-水 (含 10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 乙酸铵) 为水相, 流速 0.5 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, FastCore Super C<sub>18</sub> (2.1 mm  $\times$  100 mm, 2.6  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱进行梯度洗脱分离。在多反应监测 (MRM) 模式下采用电喷雾离子源 (ESI) 正离子化方式检测, 西罗莫司、内标的定量离子对分别为  $m/z$  931.6 > 864.6,  $m/z$  934.6 > 864.6。进行方法学考察 (包括特异性、定量下限、标准曲线、准确度、精密度、残留效应、基质效应、稳定性和回收率)。测定 94 例器官移植患者的西罗莫司浓度, 与均相酶免疫法结果进行比较。**结果** 西罗莫司标准曲线浓度范围为 2.5 ~ 50 ng  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>。西罗莫司的日内、日间准确度相对误差 (RE) 在 -5.3% ~ 7.5%, 变异系数 (CV) 小于 11.8%。低、中、高不同浓度的质控回收率和基质效应一致, 经内标校正后回收率为 100.22% ~ 108.56%, 经内标归一化后基质效应为 95.45% ~ 96.48%, CV 小于 7.0%。全血样本室温放置 3 d, 4  $^{\circ}\text{C}$  放置 3 d, -20  $^{\circ}\text{C}$  放置 20 d, 反复冻融 3 次, 处理后样本自动进样器放置 20 h, 室温放置 24 h 结果稳定。Passing-Bablok 回归分析及 Bland-Altman 结果表明均相酶免疫法与 UPLC-MS/MS 两种西罗莫司测量方法存在比例偏差。**结论** 本研究建立了一种简单、高效的 UPLC-MS/MS 方法检测人全血西罗莫司浓度, 均相酶免疫法与 UPLC-MS/MS 法检测人全血西罗莫司存在比例偏差。UPLC-MS/MS 方法更加准确, 是免疫抑制剂治疗药物监测检测金标准。

**关键词:** 西罗莫司; UPLC-MS/MS 方法; 方法学开发; 方法学验证

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)08-2053-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.014

## Determination of sirolimus concentration in human whole blood by UPLC-MS/MS and homogeneous enzyme immunoassay

YANG Hua, WANG Lan, SONG Wei-wei, YANG Xiao-juan, JI Zhao-shuai, AI Chao\* (Department of Pharmacy, Beijing Tsinghua Changgung Hospital, School of Clinical Medicine, Tsinghua University, Beijing 102218)

**Abstract: Objective** To quantify sirolimus concentration in human whole blood by UPLC-MS/MS and to evaluate the agreement with the homogeneous enzyme immunoassay. **Methods** Human whole blood (100  $\mu\text{L}$ ) was spiked with 10  $\mu\text{L}$  sirolimus-D<sub>3</sub> (the internal standard, IS), 100  $\mu\text{L}$  0.1 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub> and 300  $\mu\text{L}$  methanol. After the vortex and centrifugation (14 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup>), 5  $\mu\text{L}$  supernatant was injected. Water (containing 10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> ammonium acetate and 0.1% formic acid, solvent A) and methanol (containing 0.1% formic acid, solvent B) were used as the eluent, with the gradient elution at 0.5 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup> in FastCore Super C<sub>18</sub> column (2.1 mm  $\times$  100 mm, 2.6  $\mu\text{m}$ ). The multiple reaction monitoring (MRM) with electrospray ionization (ESI) in the positive-ion mode was used.  $m/z$  931.6 > 864.6 and  $m/z$  934.6 > 864.6 were used for sirolimus and the IS quantitation. Method validation, including selectivity, LLOQ, calibration curve, accuracy, precision, remaining-effect, matrix effect, stability and recovery was evaluated. Passing-Bablok regression analysis and Bland-Altman plot were used to assess the agreement between UPLC-MS/MS and homogeneous enzyme immunoassay. **Results**

作者简介: 杨华, 女, 博士, 药师, 主要从事治疗药物监测及个体化用药, email: yanghua0113@126.com \*通信作者: 艾超, 男, 副主任药师, 主要从事医院药学管理, email: arronaye@163.com

The calibration ranged  $2.5 \sim 50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  for sirolimus. The relative error of intra- and inter- day accuracy of sirolimus ranges from  $-5.32\%$  to  $7.46\%$ , and the coefficient of variation was less than  $11.8\%$ . The IS normalized recovery and matrix effect were  $100.22\% \sim 108.56\%$  and  $95.45\% \sim 96.48\%$  with coefficient of variation less than  $7.0\%$ . Sirolimus was stable in the test conditions. Comparison between UPLC-MS/MS with homogeneous enzyme immunoassay showed a deviation in proportion.

**Conclusion** UPLC-MS/MS method for the determination of sirolimus in human whole blood is rapid, easy and reliable. A proportion deviation in the two methods is observed.

**Key words:** sirolimus; UPLC-MS/MS; method development; method validation

器官移植是挽救终末期器官功能衰竭患者的有效治疗措施。器官移植受者的长期生存和生存质量很大程度取决于术后中长期健康管理和免疫抑制方案。移植术后长期应用钙调磷酸酶抑制剂 (calcineurin inhibitors, CNI) 可引起相关并发症, 包括肾损伤、神经毒性、糖尿病等, 已经成为影响移植长期疗效的重要原因<sup>[1-2]</sup>。因 CNI 引起的肾脏毒性、神经毒性等问题影响移植受者预后, 近年来临床逐渐减少其用量并积极寻求其他替代物。

西罗莫司 (sirolimus, SRL), 是哺乳动物雷帕霉素靶蛋白抑制剂的代表, 作为低毒性的抗真菌药物被发现后, 于 1999 年被批准作为免疫抑制剂上市, 主要适用于移植患者预防排斥反应<sup>[3]</sup>。

西罗莫司治疗窗窄, 药代动力学和药效学存在显著个体间差异。药物暴露量过低可能引发急性排斥反应, 影响移植物存活; 而药物暴露量过高则可能引起各种不良反应。相关指南指出低剂量 CNI 联合西罗莫司 (血药浓度谷值维持在  $4 \sim 8 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 可显著改善肝移植受者的肾功能, 延长生存时间; 而早期使用大剂量西罗莫司 (血药浓度谷值  $\geq 10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 显著增加肝移植受者并发症包括受者死亡率、移植物失功率和脓毒症发生率<sup>[4]</sup>。治疗药物监测对器官移植患者西罗莫司用药的有效性、安全性具有重要临床意义。本研究建立了一种高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 法监测人全血西罗莫司浓度, 并将其检测结果与均相酶免疫法进行比较。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

ExionLC 液相色谱系统与 Triple Quad 4500 MD 三重四极杆质谱仪、数据分析处理软件 MultiQuant MD 3.0.3 (AB Sciex); 涡旋混合器 (Thermo Scientific); 高速冷冻医用离心机 (北京白洋医疗); 移液器 (Eppendorf); FastCore Super C<sub>18</sub> 色谱柱 ( $2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$ ,  $2.6 \mu\text{m}$ , Phenomenex)。

### 1.2 试剂

西罗莫司对照品 ( $10 \text{ mg}$ , 纯度  $99.79\%$ )、西

罗莫司-D<sub>3</sub> (内标,  $1 \text{ mg}$ , 纯度  $98.7\%$ ) (美国 CFW laboratories 公司); ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O ( $10 \text{ g}$ , Sigma); 乙酸铵 ( $100 \text{ g}$ , 上海阿拉丁); 甲醇和甲酸 (色谱纯, Fisher Scientific); 超纯水为实验室自制。

## 2 方法

### 2.1 溶液配制

精密称取西罗莫司, 西罗莫司-D<sub>3</sub> 适量, 分别用甲醇定量配制成  $1$ 、 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  储备液,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  保存。西罗莫司储备液配制成  $25$ 、 $50$ 、 $100$ 、 $200$ 、 $250$ 、 $500 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的标准工作液和  $30$ 、 $150$ 、 $300 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  质控工作液。内标 (IS) 临用前甲醇稀释成  $500 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  工作液。

### 2.2 样品配制

$90 \mu\text{L}$  空白全血加入不同浓度系列标准或质控工作溶液, 内标工作液各  $10 \mu\text{L}$ , 混匀, 加入  $100 \mu\text{L}$   $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ZnSO<sub>4</sub> 溶液、 $300 \mu\text{L}$  甲醇, 涡旋混匀  $30 \text{ s}$ ,  $14\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心  $10 \text{ min}$ , 配制质量浓度为  $2.5$ 、 $5$ 、 $10$ 、 $20$ 、 $25$ 、 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  作为西罗莫司标准曲线溶液, 质控浓度为  $3$ 、 $15$ 、 $30 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液。待测样品  $100 \mu\text{L}$  加入  $10 \mu\text{L}$  内标工作液, 混匀后续操作同上。

### 2.3 色谱方法

流动相为  $0.1\%$  甲酸-水 (含  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙酸铵) (A),  $0.1\%$  甲酸-甲醇 (B), 梯度洗脱:  $0 \sim 0.5 \text{ min}$ ,  $40\% \sim 95\% \text{ B}$ ;  $0.5 \sim 2.6 \text{ min}$ ,  $95\% \text{ B}$ ;  $2.6 \sim 2.7 \text{ min}$ ,  $95\% \sim 40\% \text{ B}$ ;  $2.7 \sim 4.0 \text{ min}$ ,  $40\% \text{ B}$ 。使用 FastCore Super C<sub>18</sub> ( $2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$ ,  $2.6 \mu\text{m}$ ) 色谱柱, 流速  $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 进样量  $5 \mu\text{L}$ , 柱温  $45 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

### 2.4 质谱方法

在多反应监测 (MRM) 模式下采用电喷雾离子源 (ESI) 正离子化方式检测, 西罗莫司、IS 的定量离子对分别为  $m/z$   $931.6 > 864.6$ ,  $m/z$   $934.6 > 864.6$ , 质谱图见图 1。西罗莫司与 IS 去簇电压、碰撞能量、入口电压、碰撞室射出电压分别为  $180 \text{ V}$ 、 $52 \text{ eV}$ 、 $8 \text{ V}$ 、 $18 \text{ V}$ ,  $160 \text{ V}$ 、 $50 \text{ eV}$ 、 $8 \text{ V}$ 、 $20 \text{ V}$ 。



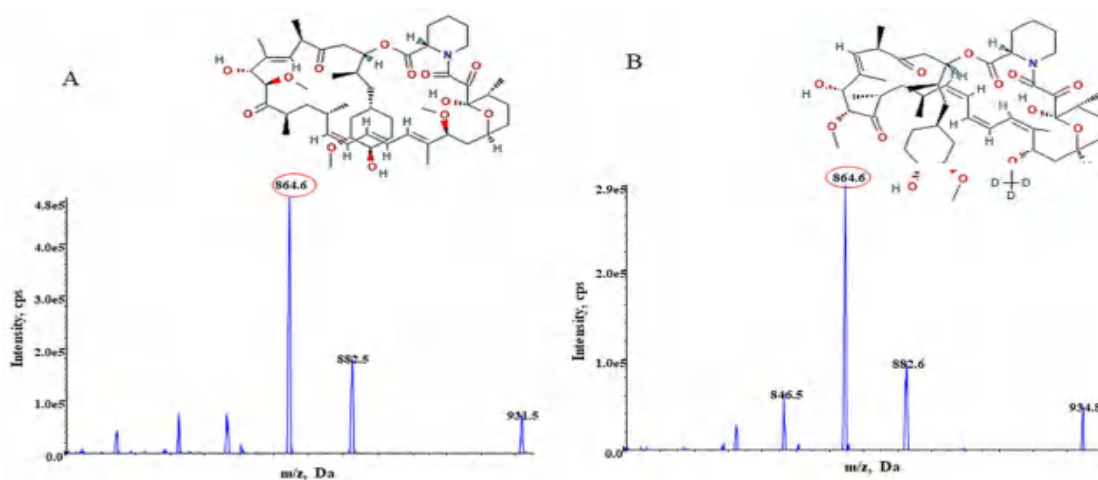


图 1 西罗莫司 (A)、西罗莫司 -D<sub>3</sub> (B) 的化学结构图及质谱图

Fig 1 Chemical structures and mass spectrums of sirolimus (A) and sirolimus-D<sub>3</sub> (B)

### 2.5 方法学验证

依照生物样本定量分析方法确证的指导原则对该方法进行验证, 验证内容包括: 特异性、残留效应、定量下限 (LLOQ)、标准曲线、准确度、精密度、基质效应、稳定性和回收率<sup>[5-6]</sup>。

### 2.6 临床样本测定

日常进行西罗莫司治疗药物监测 (TDM) 的全血样本 94 例, 混匀后分装, 一份送北京金域医学检验实验室采用均相酶免疫方法测定, 一份采用所建立的 UPLC-MS/MS 方法进行检测。

均相酶免疫方法测定采用西门子全自动药物浓度分析仪 (SYVA.E 型号), 雷帕霉素测定试剂盒 (Emit\*2000, 西门子)。报告范围 3.5 ~ 30 ng · mL<sup>-1</sup>, 精密度变异系数 (CV) 小于 13.4%, 不同浓度质控回收率 102.0% ~ 107.7%。试剂测定及样本处理严格按照试剂盒说明书操作。本研

究经清华大学附属北京清华长庚医院伦理委员会批准, 伦理批件号 23042-6-01。

### 2.7 数据分析

采用 SPSS 25.0 (IBM, Armonk, New York)、Excel 对数据进行记录、处理、统计分析; 检测西罗莫司结果采用 MedCalc 软件进行 Passing-Bablok 回归分析及 Bland-Altman 图形绘制。

## 3 结果

### 3.1 方法学特异性

在本实验条件下, 西罗莫司及 IS 的保留时间为 1.43 min。将空白全血各化合物的响应与 LLOQ 中的响应值进行比较, 西罗莫司为 8.93%, IS 为 0.08%。6 份不同来源空白全血显示内源性物质对西罗莫司及 IS 的测定无显著干扰。人空白全血、人空白全血加 IS、LLOQ、真实患者全血生物样本进样分析色谱图见图 2。

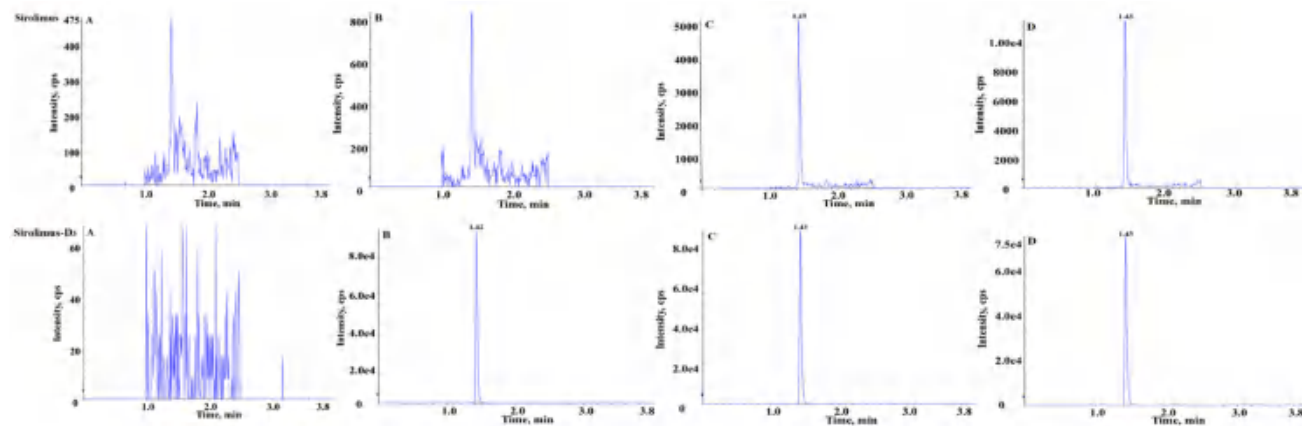


图 2 西罗莫司、西罗莫司 -D<sub>3</sub> 典型图谱

Fig 2 Typical spectrums of sirolimus and sirolimus-D<sub>3</sub>

A. 空白全血 (blank blood); B. 空白全血加内标 (blank blood spiked with sirolimus-D<sub>3</sub>); C. LLOQ 溶液 (LLOQ, sirolimus 2.5 ng · mL<sup>-1</sup>); D. 真实患者样本 (sample from a patient)

### 3.2 LLOQ 及标准曲线

按照“2.2”项下方法处理, 经 UPLC-MS/MS

分析, 测得西罗莫司与内标峰面积之比 (y) 为纵坐标, 以全血西罗莫司浓度 (x) 为横坐标,

表 1 方法测定人全血西罗莫司基质效应和提取回收率 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Tab 1 Matrix effect and recovery of sirolimus in human whole blood ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

化合物	理论值 / (ng · mL <sup>-1</sup> )	内标校正后基质效应 / %	CV / %	内标校正后提取回收率 / %	CV / %
西罗莫司	30	95.45 ± 3.07	3.2	103.62 ± 4.18	4.0
	15	96.42 ± 4.79	5.0	108.56 ± 7.62	7.0
	3.0	96.48 ± 5.01	5.2	100.22 ± 5.19	5.2

得到标准曲线方程:  $y = 0.0168x + 0.0124$  ( $r = 0.9999$ ), 权重系数为  $1/\chi^2$ 。西罗莫司在 2.5 ~ 50 ng · mL<sup>-1</sup>, 各浓度点偏差均在指导原则所推荐范围内, 线性良好。

### 3.3 准确度及精密性

本方法日内及日间精密性和准确度结果表明, LLOQ 及低、中、高 3 个不同浓度水平的质控, 西罗莫司日内及日间相对误差 (RE) 在 -5.3% ~ 7.5%; 西罗莫司日内及日间 CV 小于 11.8%, 符合生物样本检测要求, 表明该检测方法的准确度和精密性良好。

### 3.4 残留效应、回收率及基质效应

在测定最高浓度标准曲线样本后, 测得空白溶剂考察方法的残留效应, 小于 LLOQ 的 20%, 不影响样本检测。本方法的回收率及基质效应结果表明, 经内标校正后, 不同浓度质控样本的 CV 小于 7.0%, 见表 1。

### 3.5 稳定性

低、中、高不同水平的质控样本分别于室温放置 3 d, 4 °C 放置 3 d, -20 °C 放置 20 d, 反复冻融 3 次, 处理后样本于自动进样器 15 °C 放置 20 h, 室温 24 h 条件下稳定, RE 为 -14.9% ~ 12.7%, CV 小于 10.2%。

### 3.6 方法学应用与比较

分别采用 UPLC-MS/MS、均相酶免疫法检测 94 例器官移植患者全血西罗莫司浓度。UPLC-MS/MS 方法与均相酶免疫法检测结果的中位数及最小、最大值分别为 5.42 (2.58, 12.46), 7.31 (3.60, 17.10) ng · mL<sup>-1</sup>。Passing-Bablok 回归方程得出两种方法的换算公式为  $SRL_{均相酶免疫法} = 1.349 \times SRL_{UPLC-MS/MS} + 0.272$ 。Passing-Bablok 回归和 Bland-Altman 分析结果表明均相酶免疫法与 UPLC-MS/MS 方法一致性欠佳, 存在比例偏差, 见图 3。

## 4 讨论

西罗莫司治疗窗窄, 个体间差异较大, 治疗药物监测对剂量调整及不良反应预防具有重要的临床意义。本研究建立了一种简单、高效的 UPLC-MS/MS 方法用以监测器官移植患者全血西罗莫司的浓度。

西罗莫司为疏水化合物, 体内分布广泛。研究报道移植患者西罗莫司全血与血浆分布比例为 35 : 1, 约 95% 分布在红细胞中<sup>[7-8]</sup>, 因此临床测

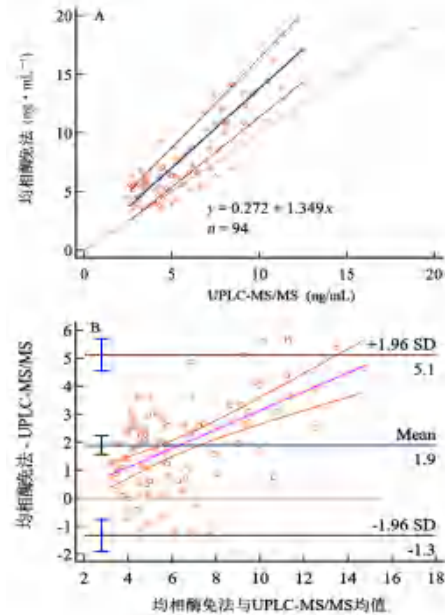


图 3 Passing-Bablok 回归分析及 Bland-Altman 分析 UPLC-MS/MS 与均相酶免疫法测定人全血西罗莫司的一致性评价

Fig 3 Passing-Bablok regression analysis and Bland-Altman plots for UPLC-MS/MS and homogeneous enzyme immunoassay of sirolimus in human whole blood

定的生物样本为全血。本方法采用蛋白沉淀法, 简化样本前处理过程, 缩短样本处理时间。单个样本分析时间为 4 min, 含柱子平衡时间 1.3 min, 可满足日常临床检测需求。以往文献使用不同仪器、色谱柱、流动相等条件, 单个样品分析时间在 1.5 ~ 13 min<sup>[9-11]</sup>。

为提高方法的准确性, 降低基质效应对检测的影响, 本方法采用了同位素内标。基质效应的结果表明 UPLC-MS/MS 检测人全血西罗莫司存在一定的基质抑制作用 (78.64% ~ 85.81%), 但经内标校正后, 基质效应为 95.45% ~ 96.48%, CV 小于 5.2%, 满足指导原则要求。文献报道西罗莫司全血样本室温放置 7 d, 反复冻融 3 次, -20 °C 放置 14 个月, 处理后样本自动进样器放置 7 d 均稳定<sup>[12-13]</sup>。本方法验证了室温、4 °C、-20 °C 常见的样本储存温度, 化合物稳定, 与文献报道一致。

本研究采用所建立的 UPLC-MS/MS 方法检测 94 例器官移植患者西罗莫司浓度, 并与均相酶免疫法结果进行比较。酶联免疫法与 LC-MS/MS 是免疫抑制剂治疗药物监测重要的方法。LC-MS/MS 方法灵活、灵敏度高、特异性好、所需血液量更少,

但设备昂贵、需要专业人员。酶联免疫法具有仪器设备便宜、高度自动化及易使用等优点，主要缺点为特异性较低，检测试剂与代谢产物、结构类似物间的交叉反应导致结果偏高<sup>[14]</sup>。研究表明西罗莫司与人肝脏微粒体共同孵育后，69.7%为西罗莫司，9.3%为39-O-脱甲基西罗莫司，9.3%为34-羟基西罗莫司，4.6%为12-羟基西罗莫司及其他少量代谢产物<sup>[15]</sup>。这些不同的代谢产物在一定浓度下与西罗莫司酶联免疫试剂盒交叉反应率在44%~127%<sup>[16]</sup>，从而导致酶联免疫法检测西罗莫司的结果高于LC-MS/MS方法。

Polledri等<sup>[9]</sup>采用西罗莫司LC-MS/MS试剂盒时与免疫分析法进行了比较。Passing-Bablok回归结果显示斜率为1.23，截距为0.36，LC-MS/MS与免疫分析两种方法存在比例偏差，一致性欠佳。Lee等<sup>[17]</sup>采用LC-MS/MS及电化学发光法检测120例样本，Passing-Bablok回归结果显示两种方法存在比例偏差，斜率为1.29。Liu等<sup>[18]</sup>比较了UPLC-MS/MS与化学发光微粒子免疫法、电化学发光法检测西罗莫司的一致性。化学发光微粒子免疫法与UPLC-MS/MS比较，斜率为1.21；电化学发光法与UPLC-MS/MS比较，斜率为1.26。本研究中均相酶免疫法与UPLC-MS/MS方法存在比例偏差，斜率为1.35，高于以往报道，可能原因是不同酶联免疫法之间存在差异。

综上，本研究建立了一种简单、高效的UPLC-MS/MS方法检测人全血西罗莫司浓度。均相酶免疫法与UPLC-MS/MS两种方法检测人全血西罗莫司存在比例偏差。

## 参考文献

- [1] Li L, Zhao HJ, Chen BY, et al. FXR activation alleviates tacrolimus-induced post-transplant diabetes mellitus by regulating renal gluconeogenesis and glucose uptake [J]. *J Transl Med*, 2019, 17 (1): 418.
- [2] U.S. Multicenter FK506 Liver Study Group. A comparison of tacrolimus (FK 506) and cyclosporine for immunosuppression in liver transplantation [J]. *N Engl J Med*, 1994, 331 (17): 1110-1115.
- [3] FDA. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/99/21083A\\_Rapamune\\_appltr.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/99/21083A_Rapamune_appltr.pdf) [Z]. 1999: 2023.
- [4] 季茹, 李建辉, 张洪涛, 等. 肝移植受者雷帕霉素靶蛋白抑制剂临床应用中国专家共识 (2023版) [J]. *肝胆胰外科杂志*, 2023, 35 (9): 513-524.
- [5] FDA. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. Available at: <https://www.fda.gov/ucm/groups/fdagov-public/@fdagov-drugs-gen/documents/document/ucm070107.pdf> [Z]. 2018.
- [6] Emea. Committee for Medical Products for Human Use, Guideline on Bioanalytical Method Validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2\*\*. Available at: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf) [Z]. 2012: 2023.
- [7] Yatscoff RW, Wang P, Chan K, et al. Rapamycin: distribution, pharmacokinetics, and therapeutic range investigations [J]. *Ther Drug Monit*, 1995, 17 (6): 666-671.
- [8] Ferron GM, Mishina EV, Zimmerman JJ, et al. Population pharmacokinetics of sirolimus in kidney transplant patients [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1997, 61 (4): 416-428.
- [9] Polledri E, Mercadante R, Ferraris FC, et al. Immunosuppressive drugs in whole blood: validation of a commercially available liquid chromatography/tandem mass spectrometry kit and comparison with immunochemical assays [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2017, 31 (13): 1111-1120.
- [10] Zheng M, Song JS, Xue H, et al. Simultaneous determination of six immunosuppressants in human whole blood by HPLC-MS/MS using a modified QuEChERS method [J]. *Molecules*, 2022, 27 (13): 4087.
- [11] 杨旭萍, 蒋振伟, 蒋艳, 等. LC-MS/MS法测定人全血中他克莫司和西罗莫司浓度及临床应用 [J]. *中南药学*, 2022, 20 (11): 2514-2519.
- [12] Pohanka A, Rosenborg S, Lindh JD, et al. Experiences from using LC-MS/MS for analysis of immunosuppressive drugs in a TDM service [J]. *Clin Biochem*, 2016, 49 (13-14): 1024-1031.
- [13] Taibon J, van Rooij M, Schmid R, et al. An isotope dilution LC-MS/MS based candidate reference method for the quantification of cyclosporine A, tacrolimus, sirolimus and everolimus in human whole blood [J]. *Clin Biochem*, 2020, 82: 73-84.
- [14] Zhang Y, Zhang R. Recent advances in analytical methods for the therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs [J]. *Drug Test Anal*, 2018, 10 (1): 81-94.
- [15] Streit F, Christians U, Schiebel HM, et al. Structural identification of three metabolites and a degradation product of the macrolide immunosuppressant sirolimus (rapamycin) by electrospray-MS/MS after incubation with human liver microsomes [J]. *Drug Metab Dispos*, 1996, 24 (11): 1272-1278.
- [16] Jones K, Saadat-Lajevard S, Lee T, et al. An immunoassay for the measurement of sirolimus [J]. *Clin Ther*, 2000, 22 Suppl B: B49-B61.
- [17] Lee EJ, Kim HK, Ahn S, et al. Accuracy evaluation of automated electrochemiluminescence immunoassay for everolimus and sirolimus compared to liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Clin Lab Anal*, 2019, 33 (7): e22941.
- [18] Liu BY, Geng N, Zhao HY, et al. Development of UHPLC-MS/MS method for simultaneous determination of tacrolimus and sirolimus in human whole blood and comparisons with two immunoassays [J]. *Biomed Chromatogr*, 2023, 37 (2): e5538.

(收稿日期: 2023-12-15; 修回日期: 2024-03-15)



# 用于伤口镇痛及愈合的 PLGA-PEG-PLGA 热敏凝胶的制备

余紫依<sup>1</sup>, 夏方亮<sup>2</sup>, 张建勇<sup>3</sup>, 郝蕾蕾<sup>3</sup>, 刘洋<sup>3</sup>, 翟光喜<sup>4</sup>, 张涛<sup>1, 2\*</sup> (1. 中国海洋大学医药学院, 山东 青岛 266003; 2. 滨州市检验检测中心, 山东 滨州 256606; 3. 山东齐都药业有限公司, 山东 淄博 255400; 4. 山东大学药学院, 济南 250012)

**摘要:** **目的** 构建一种由 PLGA-PEG-PLGA/甘油组成的温敏凝胶系统, 用以负载盐酸布比卡因和多聚脱氧核糖核苷酸复方药物。**方法** 以胶凝温度作为关键响应参数, 单因素法初步筛选凝胶基质浓度、药物装载量以及甘油添加量。随后, 采用正交实验设计, 并引入渗透压作为优化参数, 以深化配方的优化过程。最后, 对优选的配方进行质量评估。**结果** 优选配方包含 16% PLGA-PEG-PLGA、5% 甘油、2% 盐酸布比卡因, 0.4% 多聚脱氧核糖核苷酸。常温下配方呈均一透明溶液态, 胶凝温度 33.83 °C, 胶凝时间 100 s, pH 值 3.11, 渗透压 836 mOsm, 可注射性及黏附性良好。药物体外释放符合 Ritger-peppas 方程。开放型伤口模型证实了该样品能够有效促进伤口的愈合, 达到镇痛的效果。**结论** 优选配方制备工艺简单, 各项质量指标均符合要求, 有望在临床中得到应用。

**关键词:** 温敏型原位凝胶; 处方筛选; 镇痛; 促愈合; 布比卡因; 多聚脱氧核糖核苷酸

中图分类号: R94

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)08-2058-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.015

## Preparation of PLGA-PEG-PLGA thermal gel for wound analgesics and healing

YU Zi-yi<sup>1</sup>, XIA Fang-liang<sup>2</sup>, ZHANG Jian-yong<sup>3</sup>, HAO Lei-lei<sup>3</sup>, LIU Yang<sup>3</sup>, ZHAI Guang-xi<sup>4</sup>, ZHANG Tao<sup>1, 2\*</sup> (1. Ocean University of China School of Medicine and Pharmacy, Qingdao Shandong 266003; 2. Binzhou City Inspection and Testing Center, Binzhou Shandong 256606; 3. Shandong Qidu Pharmaceutical Co., Ltd., Zibo Shandong 255400; 4. School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012)

**Abstract: Objective** To prepare a temperature-sensitive gel system composed of PLGA-PEG-PLGA/glycerol for loading bupivacaine hydrochloride and polydeoxyribonucleotide combination drugs. **Methods** Gelling temperature was used as the key response parameter, the gel matrix concentration, drug loading and glycerol addition were preliminarily screened by a single factor method. Subsequently, an orthogonal experiment was designed, and osmotic pressure was introduced as a parameter to optimize the formulation. Finally, the quality of the selected formulations was evaluated. **Results** The preferred formula contained 16% PLGA-PEG-PLGA, 5% glycerol, 2% bupivacaine hydrochloride, and 0.4% polydeoxyribonucleotide. The formula was a uniform transparent solution at room temperature, with gelling temperature of 33.83 °C, gelling time of 100 s, pH value of 3.11, and osmotic pressure of 836 mOsm, with good injectability and adhesion. The drug release conformed to the Ritger-peppas equation. The open wound model confirmed that the sample effectively promoted wound healing and showed analgesic effect. **Conclusion** The preparation of the optimal formula is simple, and all quality indicators meet the requirements, which is expected to be used in clinical practice.

**Key words:** temperature-sensitive in situ gel; prescription screening; analgesia; healing promotion; bupivacaine hydrochloride; polydeoxyribonucleotide

作者简介: 余紫依, 女, 硕士研究生, 主要从事温敏型原位凝胶研究, email: zyz9001@stu.ouc.edu.cn \*通信作者: 张涛, 男, 硕士研究生导师, 正高级工程师, 主要从事基于药效团及作用机制的创新药物研究, email: zhangtao226@163.com

疼痛是指机体对损伤组织或潜在损伤产生的一种不愉快的反应,是临床中最常见却易被忽视的症状之一。由于对疼痛治疗的错误认知,很多患者长期忍痛生活,持续的疼痛对患者身体、心理都是巨大的折磨,因此科学合理地止痛治疗非常必要。

盐酸布比卡因(bupivacaine hydrochloride, BH)是临床上广泛使用的酰胺类局麻药,有麻醉和镇痛的效果。相比于阿片类药物, BH 不易导致成瘾<sup>[1-2]</sup>。虽然 BH 是长效类局麻药,但其半衰期仅为 3~6 h,不足以覆盖疼痛的持续期<sup>[3]</sup>。多聚脱氧核糖核苷酸(polydeoxyribonucleotide, PDRN)是一种生长活性物质,具有改善微环境,有效缓解炎症,加速伤口愈合的作用<sup>[4]</sup>。将这两种药物联合使用,在镇痛领域是一种新尝试,对于痛感强烈且伤口难以愈合的症状,利用此复方制剂能够达到协同效应。

原位凝胶又称即位凝胶,是一种制备工艺简单的新型制剂。特殊的相转变能力使其在响应后由溶液转变为半固体凝胶,并在原位形成药物贮库<sup>[5]</sup>。原位凝胶应用广泛,优势众多,特殊的理化性质,良好的生物相容性,优越的生物黏附性及缓控释特性等使之成为药物制剂方向的研究热点<sup>[6]</sup>。PLGA-PEG-PLGA 是由亲水性嵌段聚乙二醇(PEG)和疏水性嵌段聚丙交酯-乙交酯(PLGA)组成的两亲性三嵌段共聚物。聚合物溶于水形成自由流动液体,温度升高至相转变温度以上,聚合物水溶液发生相变形成非化学交联的凝胶,此特性可用于制备温敏水凝胶<sup>[7]</sup>。

在本研究中,针对开放性创伤的治疗采用 BH-PDRN 温敏凝胶,单因素法确定优化区域,正交实验设计进一步优化处方,并进行质量评价,以探究其是否满足长效镇痛、促愈合制剂的基础需求。

## 1 材料

### 1.1 仪器

MS204TS/02 电子天平(精度:0.0001 g)、S210 pH 计(梅特勒-托利多仪器有限公司);YP20001 电子秤(精度:0.1 g,上海衡际科学仪器有限公司);DZKW-C 恒温水浴锅(上海树立仪器仪表有限公司);Model OM819.C 冰点渗透压仪(德国罗泽公司);SHZ-88 水浴恒温振荡器(江苏金怡仪器科技有限公司);V-2550 紫外分光光度计、LC-10ATVP Plus 高效液相色谱仪(日本岛津公司);BXH-130 电热鼓风干燥箱(上海博讯医疗生物仪器股份有限公司);BP80 皮肤打孔器(南京强科生物技术有限公司)。

### 1.2 试药

BH(批号:28220201,济南诚汇双达化工有限公司);PDRN[批号:RN04-220701,润辉生物技术(威海)有限公司];PLGA-PEG-PLGA(批号:2023021506,济南聚福凯生物技术有限公司);BH 对照品(含量:94.6%,批号:101034-202103,中国食品药品检定研究院);甘油(批号:F113C201201,湖北葛店人福药用辅料有限责任公司);罗丹明 B(批号:C15205928,麦克林生化科技股份有限公司);青霉素 V 钾片(批号:V3081201,华北制药股份有限公司);其余试剂均为分析纯。

### 1.3 动物

雄性 SD 大鼠,体重(200±20)g[济南朋悦实验动物繁育有限公司,动物许可证号 SCXK(鲁)2022 0006]。本研究中的动物实验得到了中国海洋大学医药学院伦理委员会的批准(编号:OUC-2021-0301-02),并符合《实验动物护理和使用指南》。实验前饲养 3 d,其间不禁食禁水。

## 2 方法

### 2.1 温敏凝胶的制备

称取 BH 和 PDRN 置于蒸馏水中,35℃加热使其充分溶解。再加入 PLGA-PEG-PLGA,将混合溶液置于 15~20℃环境下不定时搅拌,溶解后再加入甘油,所得无色澄清透明溶液即为载药温敏凝胶溶液。

### 2.2 胶凝温度

采用试管倒置法测定<sup>[8]</sup>。样品置于恒温水浴锅,倒转 30 s 不倒流温度即为胶凝温度,测定范围 25~50℃,每次升温 0.5℃,达到指定温度后稳定 5 min。平行实验 3 次,结果取平均值。

### 2.3 胶凝时间

采用试管倒置法测定。样品置于 37℃恒温水浴锅,倒转不倒流时间即为胶凝时间,测定范围 0~300 s,每 15 s 倒转一次试管。平行实验 3 次,结果取平均值。

### 2.4 pH 值

按照《中国药典》2020 年版第四部通则 0631 中的方法测定。平行实验 3 次,结果取平均值。

### 2.5 渗透压

按照《中国药典》2020 年版第四部通则 0632 中的方法测定。测定时控制环境温度不高于 17.5℃。平行实验 3 次,结果取平均值。

### 2.6 黏附性

取部分离体鼠皮,修剪出圆形、三角形、五角星形伤口。在伤口处给予部分用罗丹明 B 染色

样品。再将鼠皮放入 37℃ 烘箱中，加热 10 min 使样品完全成胶。取出鼠皮，平铺、弯折、翻转。观察不同伤口处样品的状态以及在活动的过程中样品是否出现破裂或掉落的现象<sup>[9]</sup>。

### 2.7 可注射性

在室温环境下，取部分用罗丹明 B 染色样品置于 5 mL 的注射器中，依次在注射器上放置 4.5、5、6、7 号的针头，推动注射器，感受推动过程是否存在明显的堵塞和起泡感<sup>[10]</sup>。将其注入水中后，仔细观察样品的挤压形态。

### 2.8 药物的体外释放

采用无膜溶出法进行实验，平行实验 3 次，结果取平均值。取 3 份 1 mL 样品 (BH: 20 mg·mL<sup>-1</sup>, PDRN: 4 mg·mL<sup>-1</sup>) 于 10 mL 离心管中，称取初始重量，再将离心管放入 37℃ 水浴恒温振荡器，固化 10 min。分别向离心管中加入 5 mL 介质 (pH 7.4)，振荡速度为 50 r·min<sup>-1</sup><sup>[11]</sup>。在 1、2、4、8、24、48、72、96、120、144、168、192、216、240 h 时分别取 0.5 mL 溶出液，并补充 0.5 mL 新鲜介质，利用高效液相色谱仪及紫外分光光度计进行分析。

### 2.9 开放性伤口模型

选用 12 只 220 g 左右的雄性 SD 大鼠，将大鼠平均分为两组。组 1 为模型组，造模后不给予任何药物。组 2 为复方凝胶组，造模后给予 0.1 mL 样品。Day0 时使用 8 mm 打孔器对大鼠背部皮肤打孔，打孔后用生理盐水冲洗伤口，给药组再给予药物<sup>[12]</sup>。大鼠术后注射 1 mL 青霉素，避免因感染导致死亡。同时拍照记录大鼠精神状态以及伤口大小，在 Day3、Day5、Day7、Day10 观察大鼠伤口愈合情况，并以大鼠的体重、毛发、粪便、眼部状态、自主行动能力等指标评价大鼠的疼痛感。

## 3 结果

### 3.1 单因素考察温敏凝胶制备工艺

**3.1.1 凝胶基质浓度筛选** 胶凝温度是评估温敏凝胶质量的重要指标，在不加入活性成分的情况下，利用胶凝温度初步筛选基质浓度 (12% ~ 32%)。研究发现，基质浓度与胶凝温度成负相关，这与体系内胶束数量增加和缠结概率升高有关。尽管基质浓度增加导致胶凝温度降低，但这种降低的幅度相对较小 (31.66 ~ 29.00℃)。随着基质浓度增大，溶解时间延长 (3 ~ 10 d)，制剂成本升高，因此初步确定制剂中 PLGA-PEG-PLGA 的浓度范围为 16% ~ 24%。

**3.1.2 载药浓度筛选** 活性成分的加入可能会影响体系中胶束缠结、堆砌的自由度和有序性。选定 PLGA-PEG-PLGA 浓度为 16%、24%，加入活性成

分后，体系的胶凝温度显著上升。这是由于活性成分与 PEG 嵌段相互作用，影响了体系内自组装过程<sup>[11-12]</sup>。然而，当添加相同浓度活性成分时，基质的浓度变化却不会导致胶凝温度的明显改变，结合其成胶机制发现，凝胶化过程受亲疏水嵌段平衡的影响<sup>[12-13]</sup>。若在不同浓度的凝胶中这种平衡能够维持相对稳定，那么胶凝温度可能会呈现出相似性。

**3.1.3 甘油浓度筛选** 在制剂中，当两种活性成分的质量浓度分别为 2.5% 和 0.5% 时，体系的胶凝温度约为 44℃，远超过体温响应范围。甘油作为一种多元醇，可以通过从聚合物链的水合鞘中去除水分来降低体系的相变温度<sup>[14]</sup>。为了探究甘油的加入对胶凝温度的影响，固定基质浓度为 24%，BH、PDRN 浓度分别为 2.5%、0.5% 的情况下，筛选甘油浓度范围 2.5% ~ 10%，当甘油的浓度为 5% 时，制剂的胶凝温度约为 38℃，接近体温响应范围，因此初步筛选甘油浓度为 5% ~ 10%。

### 3.2 正交实验优选温敏凝胶制备工艺

在前期单因素实验的基础上，确定以 PLGA-PEG-PLGA (A)、BH-PDRN (B)、甘油 (C) 的不同浓度为考察因素，采用三因素三水平正交表，进行正交设计，具体浓度范围见表 1。原辅料的不同组合会影响到体系的渗透压，因此增加筛选指标，以胶凝温度、渗透压筛选最优处方，实验结果见表 2，方差分析结果见表 3、4。根据方差分析结果可知，各因素对胶凝温度的影响顺序为 B > C > A，而对渗透压的影响顺序为 C > A > B。综合考虑载药量、胶凝温度、制剂成本、渗透压等指标，确定最优工艺为 A<sub>1</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>。即 BH 浓度为 2.0%，PDRN 浓度为 0.4%，PLGA-PEG-PLGA 浓度为 16%，甘油浓度为 5%。

表 1 温敏凝胶制备工艺的正交设计因素水平表

Table 1 Factor and level for orthogonal design of temperature-sensitive gel preparation process

因素	水平		
	1	2	3
PLGA-PEG-PLGA/%	16	20	24
BH-PDRN/(%/%)	1.5 : 0.3	2.0 : 0.4	2.5 : 0.5
甘油/%	5	7.5	10

### 3.3 含量测定方法学

**3.3.1 测定 BH 色谱条件及方法学考察** 利用高效液相色谱仪进行考察，色谱柱为 Titank C18 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)，以乙腈-0.02 mol 磷酸盐 (65 : 35) 为流动相；流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>；柱温 35℃；检测波长 240 nm；进样量 20 μL。在该色谱条件下，



表 2 温敏凝胶制备工艺的正交设计结果

Tab 2 Orthogonal design of temperature-sensitive gel preparation process

序号	因素			胶凝温度 / °C	渗透压 / mOsm
	PLGA-PEG-PLGA	BH-PDRN	甘油		
1	1	1	1	32.83±0.85	823±5.71
2	1	2	3	32.50±0.41	1813±5.79
3	1	3	2	36.16±0.24	1317±4.64
4	2	1	3	30.16±0.24	1827±2.05
5	2	2	2	32.66±0.47	1352±8.95
6	2	3	1	38.00±0.41	879±7.04
7	3	1	2	29.83±0.62	1353±6.16
8	3	2	1	33.83±0.62	912±4.98
9	3	3	3	33.33±0.24	1903±10.33
$K_1$	101.49	92.82	104.66		
$K_2$	100.82	98.99	98.65		
$K_3$	96.99	107.49	95.99		
$k_1$	33.83	30.94	34.89		
$k_2$	33.61	33.00	32.88		
$k_3$	32.33	35.83	32.00		
$R$	1.5	4.89	2.89		

表 3 自变量对温敏凝胶胶凝温度的方差分析结果

Tab 3 ANOVA of independent variables for gelling temperature of temperature-sensitive in situ gel

源	平方和	自由度	均方	F 值	P
校正模型	53.521 <sup>a</sup>	6	8.875	39.142	0.025
截距	9953.388	1	9953.388	43 896.942	< 0.001
A	3.930	2	1.965	8.666	0.103
B	36.170	2	18.085	79.759	0.012
C	13.152	2	6.576	29.001	0.033
误差	0.453	2	0.227		
总计	10 007.092	9			
校正总计	53.705	8			

注: a.  $R^2 = 0.992$  (调整后  $R^2 = 0.996$ )。

Note: a.  $R^2 = 0.992$  (adjusted  $R^2 = 0.996$ ) .

表 4 自变量对温敏凝胶渗透压的方差分析结果

Tab 4 ANOVA of independent variables on osmolality of temperature-sensitive in situ gel

源	平方和	自由度	均方	F 值	显著性
校正模型	1 439 941.333 <sup>a</sup>	6	239 990.222	2550.073	< 0.001
截距	16 480 893.444	1	16 480 893.444	175 121.654	< 0.001
A	7705.556	2	3852.778	40.939	0.024
B	1686.222	2	843.111	8.959	0.100
C	1 430 549.556	2	715 274.778	7600.322	< 0.001
误差	188.222	2	94.111		
总计	17 921 023.000	9			
校正总计	1 440 129.556	8			

注: a.  $R^2 = 1.000$  (调整后  $R^2 = 0.999$ )。

Note: a.  $R^2 = 1.000$  (adjusted  $R^2 = 0.999$ ) .

BH 保留时间 11 min, 其余成分不干扰 BH 的测定, 专属性良好。配制 50、100、250、500、750、1000  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的系列浓度标准溶液, 各取 20  $\mu\text{L}$  注入高效液相色谱仪, 记录色谱图, 以峰面积 ( $A$ ) 对质量浓度 ( $C$ ,  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 进行线性回归。得到 BH 的标准曲线方程为  $A = 5.578 \times 10^3 C + 2.545 \times 10^5$ ,  $R^2 = 0.9982$ , BH 在 50 ~ 1000  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  与峰面积呈良好的线性关系。进行方法学考察, 结果精密度  $RSD = 0.58\%$  ( $n = 6$ ), 日内稳定性  $RSD = 0.89\%$  ( $n = 12$ ), 日间稳定性  $RSD = 1.6\%$  ( $n = 12$ ), 加样平均回收率 99.22%,  $RSD = 0.88\%$  ( $n = 6$ )。

**3.3.2 测定 PDRN 色谱条件及方法学考察** 利用紫外分光光度计进行考察, 紫外检测波长 260 nm, 配制 10、20、30、40、50  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的系列浓度标准溶液, 记录吸光度, 以吸光度 ( $A$ ) 对质量浓度 ( $C$ ,  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 进行线性回归, 得到 PDRN 的标准方程为  $A = 0.0202C - 0.0702$ ,  $R^2 = 0.9994$ , PDRN 在 10 ~ 50  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  与吸光度呈良好的线性关系。

**3.4 优选处方质量研究**

**3.4.1 外观** 常温下, 样品呈澄清透明溶液状, 到达体温条件后, 样品呈浅白色半固体凝胶状态, 且 30 s 内不发生倒流 (见图 1)。

**3.4.2 胶凝温度、胶凝时间、pH 值、渗透压** 平行测定 3 次, 结果如表 5 所示, 测得优选处方胶凝温度 ( $33.83 \pm 0.24$ ) °C, 胶凝时间 ( $100 \pm 7.07$ ) s, pH 值 ( $3.11 \pm 0.01$ ), 渗透压 ( $836 \pm 3.74$ ) mOsm。

表 5 温敏型原位凝胶优选处方相关质量指标

Tab 5 Preferred prescription-related quality indicators of temperature-sensitive in situ gel

编号	胶凝温度 / °C	胶凝时间 / s	pH 值	渗透压 / mOsm
1	34.0	105	3.10	831
2	33.5	90	3.13	840
3	34.0	105	3.12	837

**3.4.3 黏附性** 实验结果显示, 样品能够有效地填充各类型伤口的空腔, 且不会溢出。当样品完成溶胶 - 凝胶转变后, 在弯折、翻转鼠皮的过程中, 样品未出现破裂或掉落的情况 (见图 2), 这展现出了其良好的相变能力和黏附性能。

**3.4.4 可注射性** 在室温环境下, 当推动样品经过 4.5、5、6、7 号的针头时, 并未观察到明显的阻塞或起泡现象。目前, 市面上 1 ~ 10 mL 注射器的针头型号是 4.5 ~ 7 号, 这表明样品能满足市场上常规注射器的注射需求。通过水下注射实验可观察到, 经注射器针头挤压后, 样品呈现出良好的线性外观 (见图 3)。



图 1 温敏凝胶的外观性状的优选  
Fig 1 Appearance traits of preferred prescription of temperature-sensitive in situ gel



图 2 优选处方黏附性能  
Fig 2 Optimal formulation adhesion performance



图 3 优选处方可注射性能  
Fig 3 Optimal prescription injectable performance

**3.4.5 药物的体外释放** 以时间为横坐标 ( $t$ ), 累计释放率均值 ( $Q$ ) 为纵坐标绘制累计释放曲线, 结果见图 4。对累计释放曲线进行零级动力学、一级动力学、Higuchi 模型、Ritger-peppas 模型拟合<sup>[15]</sup>。从拟合结果可看出两种药物的体外释放均符合 Ritger-peppas 模型, 见表 6。

表 6 活性成分释药动力学拟合方程及相关系数

Tab 6 Fitting equation and correlation coefficient of drug release kinetics of active ingredients

活性成分	模型	方程	$R^2$
BH	零级	$Q = 0.404t + 16.439$	0.910
	一级	$\ln(1 - Q/90.404) = e^{0.012}t$	0.958
	Higuchi	$Q = 6.014t^{1/2} - 0.072$	0.993
	Ritger-peppas	$Q = 6.069t^{0.498}$	0.993
PDRN	零级	$Q = 0.400t + 14.011$	0.935
	一级	$\ln(1 - Q/94.015) = e^{0.013}t$	0.967
	Higuchi	$Q = 6.266t^{1/2} + 0.931$	0.994
	Ritger-peppas	$Q = 7.404t^{0.469}$	0.994

**3.4.6 开放性伤口模型** 通过观察模型组伤口愈合过程可发现, 伤口的愈合具有自限性, 在没有使用任何药物的情况下, Day5 ~ Day10 模型组大鼠伤

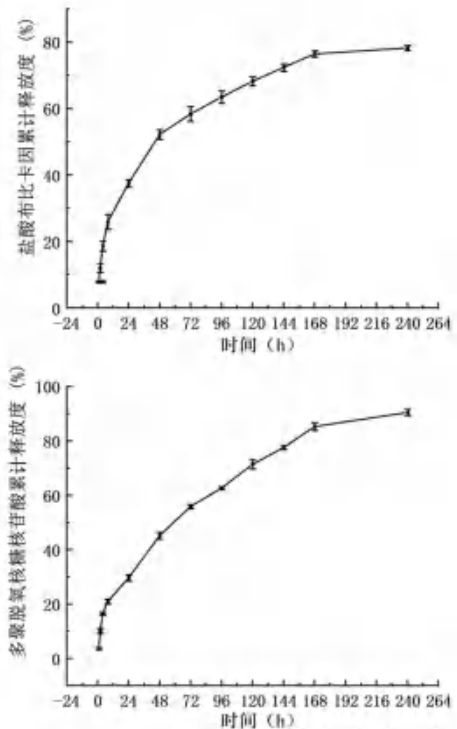


图 4 盐酸布比卡因 (A) 和多聚脱氧核糖核苷酸 (B) 的体外累计释放度  
Fig 4 In vitro cumulative release of bupivacaine hydrochloride (A) and polydeoxyribonucleotides (B)

口进入了自我修复阶段。因此, 在进行药效学考察时, 应着重观察 Day1 ~ Day5 期间不同组别大鼠伤口愈合情况。从图 5 观察到, 给药组大鼠在伤口愈合速度方面明显优于模型组。此外, 通过对大鼠的体重、排便量、眼部状态、毛发光泽度、自主进食行为进行评价发现, 活性成分 BH 的加入有效地缓解了大鼠的术后疼痛 (见表 7)。样品的使用达到了良好的镇痛效果, 并促进了大鼠伤口的愈合。

#### 4 讨论

本研究利用 BH 和 PDRN 作为模型药物, 采用 PLGA-PEG-PLGA 与甘油作为辅料, 构建了一种新型的温敏型凝胶剂。通过单因素法筛选并结合正交实验优化, 得到的配方满足了长效镇痛和伤口愈合制剂的基础需求。

本研究从外观、胶凝温度、胶凝时间、药物的体外释放行为以及开放性伤口实验的角度进行探讨。温敏凝胶具有特殊的相转变性质, 使溶胶状药液在常温下以较低黏度的形式存在, 这有利于简化生产灌装过程, 并提升储存效率。在药液取用的场景中, 低黏度的药液更易于通过注射器等精密工具进行取用, 有效地解决传统凝胶剂剂量控制不精确的问题。而在体温驱动的相变环境中, 原位形成的药物储库又能够显著延长模型药物的释药速率, 持

表 7 大鼠术后疼痛高发期状态 (n = 6)

Tab 7 State of high incidence of postoperative pain in rats (n = 6)

术后 /d	组别	体重 /g	毛发	眼部状态	粪便	自主进食
1	模型组	193.8 ~ 203.1	暗淡到正常	大量分泌物	少量	无
	给药组	190.6 ~ 201.8	正常	少量分泌物	少量	无到正常
3	模型组	199.7 ~ 209.2	暗淡到正常	少量分泌物	较少	无到正常
	给药组	206.5 ~ 218.4	正常	正常	正常	正常

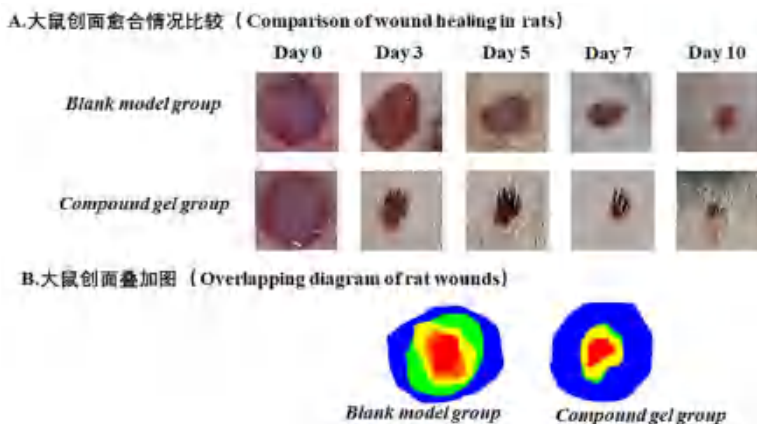


图 5 大鼠术后伤口愈合情况

Fig 5 Postoperative wound healing in rats

续及高效地释放药物，降低了患者的用药频率，提升了治疗的顺应性。从 pH 值的角度探讨，具有酸性 pH 值的配方能够有效抑制开放性伤口部位的菌落的生长，创造出有利于伤口愈合的微环境。从可注射性、黏附性能的角度讨论，该配方具有优异的可注射特性和出色的黏附力，使其可在广泛的创面类型和使用场景中得以应用。

综上所述，本文所制备复方温敏型原位凝胶剂处方组成简单、使用方便，具有良好质量特性，研究所得的数据可为今后进一步研究此类制剂提供参考。

### 参考文献

[1] Yalcin EK, Araujo-Duran J, Turan A. Emerging drugs for the treatment of postsurgical pain [J]. Expert Opin Emerg Dr, 2021, 26 (4): 371-384.

[2] Zhao MX, Zhu SS, Zhang D, et al. Long-lasting postoperative analgesia with local anesthetic-loaded hydrogels prevent tumor recurrence via enhancing CD8<sup>+</sup> T cell infiltration [J]. J Nanobiotechnol, 2023, 21 (1): 50.

[3] Aroke EN, McMullan SP, Woodfin KO, et al. A practical approach to acute postoperative pain management in chronic pain patients [J]. J PeriAnesth Nurs, 2020, 35 (6): 564-573.

[4] Hwang JT, Lee SS, Han SH, et al. Polydeoxyribonucleotide and polynucleotide improve tendon healing and decrease fatty degeneration in a rat Cuff repair model [J]. Tissue Eng Regen Med, 2021, 18 (6): 1009-1020.

[5] 许欢, 张永萍, 程纯, 等. 原位凝胶给药系统的研究进展 [J]. 湖北民族大学学报 (医学版), 2021, 38 (3): 81-85.

[6] Tian ML, Zhou JF, Qi X, et al. Thermo-sensitive hydrogel and their biomedical applications [J]. IOP Conf Ser Earth Environ Sci, 2021, 714 (3): 032062.

[7] 安中原, 冯白茹, 余巧, 等. 原位凝胶的研究进展 [J]. 江西化工, 2023, 39 (1): 1-4.

[8] Wang TY, Ma B, Hao G, et al. Temperature-sensitive hydrogel loaded with minocycline hydrochloride complex for accelerating infected wound healing [J]. J Drug Deliv Sci Tec, 2023, 88: 104961.

[9] 方自龙. 一种抗菌、促细胞生长可注射的粘性水凝胶用于皮肤创面愈合的研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2023.

[10] 张廷婷. 盐酸氨基葡萄糖关节腔注射用温敏凝胶的制备及其对骨关节炎的药效研究 [D]. 成都: 四川农业大学, 2019.

[11] Fu XD, Zeng HL, Guo JP, et al. A PLGA-PEG-PLGA thermosensitive gel enabling sustained delivery of ropivacaine hydrochloride for postoperative pain relief [J]. Chem Pharm Bull, 2017, 65 (3): 229-235.

[12] Chan PS, Li Q, Zhang B, et al. In vivo biocompatibility and efficacy of dexamethasone-loaded PLGA-PEG-PLGA thermogel in an alkali-burn induced corneal neovascularization disease model [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2020, 155: 190-198.

[13] 肖丽蒙, 严真, 尹莉芳. 微球与原位凝胶植入剂长效策略与控制突释的研究进展 [J]. 中国药科大学学报, 2022, 53 (1): 10-17.

[14] 吴迪, 王萍, 雷晨, 等. 负载抗菌多肽温敏水凝胶的制备及性能研究 [J]. 南京医科大学学报 (自然科学版), 2022, 42 (7): 957-964.

[15] Macoon R, Robey M, Chauhan A. In vitro release of hydrophobic drugs by oleogel rods with biocompatible gela-tors [J]. Eur J Pharm Sci, 2020, 152: 105413.

(收稿日期: 2024-01-24; 修回日期: 2024-06-19)



# AHP-CRITIC 法结合正交设计优选芪术平喘止汗胶囊水提取工艺

郭君婷<sup>1,2</sup>, 叶斯木·塔拉甫别克<sup>1,2</sup>, 赵婷婷<sup>1,2</sup>, 阿依妮葛尔·麦麦提艾力<sup>3</sup>, 苏文灵<sup>1,2\*</sup>, 刘桂花<sup>1,2,3\*</sup> (1. 新疆维吾尔自治区药物研究所, 乌鲁木齐 830000; 2. 新疆维吾尔药重点实验室, 乌鲁木齐 830000; 3. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011)

**摘要:**目的 优选芪术平喘止汗胶囊的提取工艺, 为其进一步开发提供参考。方法 以总多糖、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷含量和出膏率为评价指标, 采用层次分析(AHP)法、基于指标相关性的权重赋权系数(CRITIC)法以及 AHP-CRITIC 混合加权法来确定处方中各指标的权重系数, 结合正交试验结果优选出芪术平喘止汗胶囊的提取工艺参数。结果 最终优选出的芪术平喘止汗胶囊的提取工艺条件为: 加 8 倍量水加热回流提取 3 次, 每次 1.0 h。结论 AHP-CRITIC 混合加权法确定的权重系数客观且真实, 可以更全面地反映处方的配伍信息, 优选得到的提取工艺稳定可行, 重复性良好, 可为其后续研究与开发提供参考。

**关键词:** 芪术平喘止汗胶囊; 提取工艺; 正交设计; AHP-CRITIC 法; 权重分析

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)08-2064-06  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.016

## Optimization of aqueous extraction of Qizhu Pingchuan Zhihan capsules by AHP-CRITIC method combined with orthogonal design

GUO Jun-ting<sup>1,2</sup>, Yesem Talpbek<sup>1,2</sup>, ZHAO Ting-ting<sup>1,2</sup>, Aingar Mamatali<sup>3</sup>, SU Wen-ling<sup>1,2\*</sup>, LIU Gui-hua<sup>1,2,3\*</sup> (1. *Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830000*; 2. *Xinjiang Key Laboratory of Uygur Medicine, Urumqi 830000*; 3. *College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011*)

**Abstract: Objective** To optimize the extraction of Qizhu Pingchuan Zhihan capsules, and provide a reference for its further development. **Methods** The content of total polysaccharide, calycosin glucoside, prim-*O*-glucosylcimifugin, 5-*O*-methyl-asamin glycoside and the extract yield were used as evaluation indexes, AHP, CRITIC and AHP-CRITIC hybrid weighting methods were used to determine the weight coefficients of each index in the formula. The extraction parameters of Qizhu Pingchuan Zhihan capsules were optimized by orthogonal design. **Results** The optimized extraction of Qizhu Pingchuan Zhihan capsules included 8 times of water, heating and refluxing for 3 times, and 1.0 h each time. **Conclusion** The weight coefficient determined by AHP-CRITIC hybrid weighting method is objective and true, which can comprehensively reflect the compatibility of the formula. The optimized extraction is stable, feasible and repeatable, and can provide reference for its follow-up research and development.

**Key words:** Qizhu Pingchuan Zhihan capsules; extraction; orthogonal design; AHP-CRITIC method; weighting analysis

基金项目: 自治区重点实验室项目 (No.2023D04035); 新疆维吾尔自治区重大科技专项项目 (No.2021A03002-1)。

作者简介: 郭君婷, 女, 实验师, 主要从事药物新制剂与新剂型研发, email: 554538320@qq.com \*通信作者: 刘桂花, 女, 研究员, 主要从事药物新制剂与新剂型研究, email: lisena-lgh@163.com; 苏文灵, 女, 助理研究员, 主要从事中药新剂型与新技术研究, email: 1183441237@qq.com

芪术平喘止汗胶囊是根据维吾尔医古方,结合现代科学技术研制的复方制剂,由黄芪、白术、防风等 7 味中药组成,具有止汗平喘的功效,用于汗多、易感发喘等。该中药方剂主要为水煎温服,拟将其开发成为胶囊制剂。提取工艺是中药制备过程中的重要环节,结合药效学试验的预筛选,确定了该方的最佳工艺路线为水提法。处方中黄芪含有糖类及皂苷类有效成分(毛蕊异黄酮葡萄糖苷)<sup>[1-2]</sup>,白术含有挥发油及多糖<sup>[3-4]</sup>,防风含有色原酮类(升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷)<sup>[5-7]</sup>,这些活性成分均具有明显的增强机体免疫、镇痛、抗炎和减轻气道炎症反应的作用。考虑到干膏得率常被用作中药复方提取率的评价依据,因此本研究选取复方中总多糖、黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、防风中升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷及出膏率作为检测指标。

鉴于中药成分丰富多样,为了更加客观地分析其成分,优化工艺流程等,设置多指标检测标准已成为复方提取工艺的重要方法,同时在中药提取工艺指标评价体系中,权重系数赋值问题显得尤为重要,引起了广泛的关注。查阅文献发现,层次分析法(analytic hierarchy process, AHP),是结合主观判断与确定权重系数的一种定性、定量方法<sup>[8-13]</sup>。客观赋权法-CRITIC 赋权法(criteria importance through inter-criteria correlation, CRITIC),是利用评价指标的对比强度与指标的冲突性综合确定指标的客观权重,兼顾指标的变异和相关性<sup>[14]</sup>。本研究根据正交试验设计,采用热提法提取复方,通过 AHP 法、CRITIC 法及 AHP-CRITIC 混合加权法对正交试验的结果进行综合分析,并根据结果筛选最佳权重系数,采用 SPSS 21.0 软件对最佳权重系数所评估分数进行方差分析,确定复方提取工艺最佳参数,为进一步研究芪术平喘止汗胶囊提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

高效液相色谱仪(ULTIMATE3000 型, Thermo); RS 紫外检测器(VWD-3x00 型, 赛默飞); Chromeleon7 数据工作站; 电子天平(CDP225D 型, 赛多利斯科学仪器北京有限公司); 电子天平(FA2004N 型, 上海民桥精密科学仪器有限公司); 电子天平(LT1002E 型, 常熟市天量仪器有限责任公司); 调温电热套(KDM 型, 山东省鄞城永兴仪器厂); 实验室专用超纯水机(SC082132 型, 四川沃特尔科技发展有限公司); 手提式高速万能粉碎机(DET-200 型, 温岭市林大机械有限公司);

UV765 紫外可见分光光度计(上海精科); RE-2000 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); 101 型电热鼓风干燥箱、DZKW-6-6 型电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器有限公司)。

### 1.2 试药

黄芪(批号: 20200811-16, 内蒙古包头)、防风(批号: 20200810-19, 内蒙古赤峰)、白术(批号: 20200810-07, 安徽亳州)等药材均购自新疆维草集有限公司, 经新疆维吾尔自治区药物研究所何江研究员鉴定, 均符合《中国药典》2020 年版相关规定。对照品升麻素苷(批号: 111522-201913, 纯度: 94.6%)、5-O-甲基维斯阿米醇苷(批号: 111523-201811, 纯度: 97.4%)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号: 111920-201907, 纯度: 96.8%)、D-无水葡萄糖(批号: 110833-202109)(中国食品药品检定研究院); 色谱纯乙腈(美国霍尼韦尔); 甲酸(批号: 20220208, 天津市鑫铂特化工有限公司, 纯度 88.0%); 无水乙醇(批号: 2020051045, 天津市致远化学试剂有限公司); 水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent XDBC<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.2% 甲酸(B); 梯度洗脱(0 ~ 18 min, 15%A; 18 ~ 28 min, 20%A; 28 ~ 35 min, 40%A; 35 ~ 45 min, 15%A); 流速: 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 检测波长: 254 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。

### 2.2 对照品溶液的制备

分别精密称定适量升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷等对照品, 用甲醇分别配制成质量浓度为 504、498、494 μg · mL<sup>-1</sup> 的对照品储备液。分别精密量取储备液适量, 加入适量甲醇, 即得到对照品溶液, 备用。

### 2.3 供试品溶液的制备

称取处方量药材, 加水回流提取(物料比 1:10), 过滤得滤液, 加水定容至 2000 mL, 摇匀后取 500 mL 药液浓缩至 100 mL, 精密量取 5 mL 浓缩液, 加入适量无水乙醇定容至 10 mL, 采用 0.45 μm 微孔滤膜滤过适量溶液, 即得供试品溶液。

### 2.4 阴性样品溶液的制备

称取处方量药材(一份不含有防风, 一份不含有黄芪)各 3 份, 物料比 1:10 加水回流提取 2 次, 1 h/次, 过滤, 合并滤液, 加水定容至 2000 mL, 参照“2.3”项下方法制得阴性样品溶液。

## 2.5 HPLC 含量测定方法学考察

**2.5.1 专属性试验** 分别精密吸取阴性样品溶液、混合对照品溶液及供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，HPLC 色谱图见图 1。

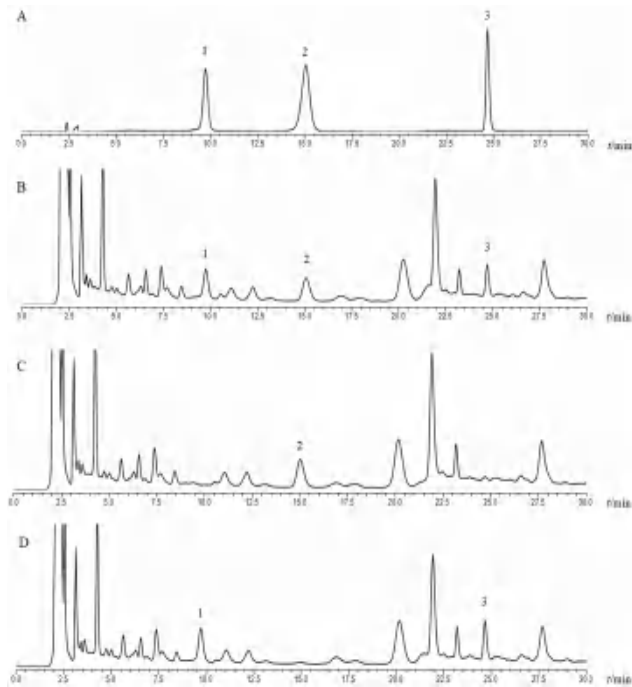


图 1 芪术平喘止汗胶囊 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of Qizhu Pingchuan Zhihan capsules

A. 混合对照品 (mixed reference); B. 供试品 (sample); C. 缺防风阴性样品 (negative sample without of *Saposhnikovia divaricata*); D. 缺黄芪阴性样品 (negative sample without of *Astragalus membranaceus*); 1. 升麻素苷 (prim-*O*-glucosylcimifugin); 2. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (calycosylglucoside); 3. 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷 (5-*O*-methyl-asamin glycoside)

**2.5.2 线性关系考察** 取适量对照品溶液，稀释成系列浓度，参照“2.1”项下条件进行分析，以对照品质量浓度 ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 为横坐标 ( $X$ )，峰面积为纵坐标 ( $Y$ )，进行线性回归，结果见表 1。升麻素苷定量限、检测限分别为  $0.244 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.073 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，5-*O*-甲基维斯阿米醇苷定量限、检测限分别为  $1.089 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.327 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，毛蕊异黄酮葡萄糖苷定量限、检测限分别为  $0.146 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.044 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

表 1 3 种成分线性关系

Tab 1 Linearity of three constituents

成分	回归方程	$r$	线性范围 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
升麻素苷	$Y = 0.3127X + 1.0274$	0.9995	25.2 ~ 126.0
5- <i>O</i> -甲基维斯阿米醇苷	$Y = 0.3733X + 0.7100$	0.9995	24.9 ~ 124.5
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	$Y = 0.6183X + 0.6008$	0.9996	24.7 ~ 123.5

**2.5.3 精密度试验** 取同一供试品溶液，按照“2.1”项下条件连续进样 6 次，结果升麻素苷、5-*O*-

甲基维斯阿米醇苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的  $RSD$  分别为 0.52%、0.93% 和 0.61%，表明方法精密度良好。

**2.5.4 重复性试验** 依据“2.3”项下方法平行制备供试品溶液 6 份，按“2.1”项下色谱条件进样，结果升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷的质量分数  $RSD$  分别为 1.9%、1.6%、1.8%，表明该方法重复性良好。

**2.5.5 稳定性试验** 取同一供试品溶液，于制备后 0、2、4、8、12 和 24 h 分别按照“2.1”项下色谱条件进样分析，利用各成分峰面积计算  $RSD$  值，结果升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷峰面积  $RSD$  分别为 1.2%、1.5%、1.7%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.5.6 加样回收试验** 依据“2.3”项下方法平行制备供试品溶液 6 份，精密量取已知浓度的供试品溶液 (升麻素苷  $152.65 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷  $90.50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、毛蕊异黄酮葡萄糖苷  $65.40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 2.5 mL，共 6 份，分别置于 10 mL 量瓶中，精密加入对应对照品溶液 1.0 mL，用无水乙醇定容至刻度，按“2.1”项下色谱条件测定，并计算加样回收率，可得升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷的加样回收率分别为 101.39%、99.57%、101.95%，其  $RSD$  分别为 1.3%、1.4% 和 1.6%，表明该方法回收率良好。

## 2.6 总多糖的含量测定

**2.6.1 D-无水葡萄糖对照品溶液制备** 取 D-无水葡萄糖对照品适量， $105^\circ\text{C}$  干燥至恒重，精密称取的 13.30 mg，加水定容至 50 mL，摇匀，制成  $266 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 D-无水葡萄糖对照品溶液，即得。

**2.6.2 标准曲线制备** 精密量取 D-无水葡萄糖对照品溶液 0、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 mL，分别加水定容至 25 mL，摇匀。分别取已定容溶液 1.0 mL 于 10 mL 具塞刻度试管中，冰浴中精密加入 0.2% 硫酸蒽酮溶液 4 mL，摇匀，再转移至  $90^\circ\text{C}$  水浴中恒温反应 10 min，取出，速降至室温，静置 30 min，取第一份溶液作为空白对照，在 400 ~ 700 nm 进行扫描，可得 610 nm 为最大吸收波长。以对照品质量浓度为  $X$  轴，吸光度为  $Y$  轴，进行回归分析，可得标准曲线，回归方程为  $Y = 0.0465X + 0.0821$ ， $r = 0.9992$ ，结果表明 D-无水葡萄糖在  $2.128 \sim 17.024 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  内与吸光度呈良好的线性关系。

**2.6.3 供试品溶液制备** 精密量取提取液 1.0 mL，加水定容至 100 mL，摇匀后量取 1.0 mL 置于 10 mL 具塞刻度试管中，参照“2.6.2”项下自“精密加入 0.2% 硫酸蒽酮溶液”起操作，依据《中国药典》2020



年版四部通则 0401, 随行空白, 在 610 nm 处测定各样品吸光度, 并计算其总多糖含量。

### 2.7 出膏率测定

精密量取 100 mL 供试品溶液, 置于已恒重处理的蒸发皿中, 水浴蒸干, 于 105 °C 干燥 3 h, 取出, 置干燥器中冷却 30 min, 精密称定重量, 根据公式: 出膏率 (%) = 干膏质量 / 药材质量 × 100%, 计算出膏率。

### 2.8 各成分溶出量的测定

鉴于前期预试验结果以及药物性质, 结合生产实际要求, 选取提取次数 (A)、提取时间 (B)、物料比 (C) 为考察因素, 以总多糖、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、升麻素苷、5-O-甲基维斯阿

米醇苷含量和干膏得率为指标, 进行  $L_9(3^4)$  正交试验, 因素水平见表 2。

表 2 正交试验水平因素表

Tab 2 Factor and level for orthogonal test

水平	因素		
	提取次数 (A) / 次	提取时间 (B) / h	物料比 (C) / 倍
1	1	1.0	1 : 8
2	2	1.5	1 : 10
3	3	2.0	1 : 12

精密吸取供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 测定各指标性成分在药液中的含量 ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 和出膏率, 结果见表 3。

表 3 正交试验设计与结果

Tab 3 Design and result of orthogonal test

序号	A	B	C	D (误差)	升麻素苷 / ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	5-O-甲基维斯阿米醇苷 / ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	毛蕊异黄酮葡萄糖苷 / ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	总多糖 / ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	出膏率 / %
1	1	1	1	1	1.4397	0.9626	0.1799	155.06	24.22
2	1	2	2	2	1.9097	1.1045	0.2627	165.63	26.94
3	1	3	3	3	1.8905	1.0741	0.2727	168.84	29.48
4	2	1	2	3	1.8732	1.3478	0.3353	170.59	31.30
5	2	2	3	1	2.2726	1.3401	0.3473	213.75	30.62
6	2	3	1	2	1.7115	1.2943	0.3917	194.94	30.79
7	3	1	3	2	2.2181	1.6160	0.3463	192.66	32.38
8	3	2	1	3	2.8365	1.5789	0.4080	210.74	33.11
9	3	3	2	1	2.8965	1.5833	0.4168	197.65	32.03

### 2.9 指标权重的确立

**2.9.1 AHP 法确定权重系数** 根据芪术平喘止汗胶囊药味君臣佐使配伍规律, 将权重指标设定为成分含量与出膏率并予以指标量化<sup>[15]</sup>, 按照指标的优先顺序: 总多糖 > 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 > 升麻素苷 = 5-O-甲基维斯阿米醇苷 > 出膏率, 将 5 项指标分 4 个层次, 构建成对比较的判断优先矩阵, 并对各项指标赋予相对评分, 指标成对比较的判断优先矩阵见表 4。

表 4 指标成对比较的判断优先矩阵

Tab 4 Priority judgment matrices for pairwise comparison of indicators

权重指标	总多糖	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	升麻素苷	5-O-甲基维斯阿米醇苷	出膏率
总多糖	1	2	3	3	5
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	1/2	1	2	2	3
升麻素苷	1/3	1/2	1	1	2
5-O-甲基维斯阿米醇苷	1/3	1/2	1	1	2
出膏率	1/5	1/3	1/2	1/2	1

由表 4 结果分析表明, 利用 AHP 法, 经过层次分析后, 总多糖、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、升麻素苷、

5-O-甲基维斯阿米醇苷和出膏率等指标的权重系数分别为 0.4143、0.2410、0.1352、0.1352 和 0.0743。结合参考文献<sup>[16-18]</sup>, 根据公式:  $CR = CI / RI$  (一致性指标) / (平均随机一致性指标), 计算可得  $CR = 0.0039 < 0.10$ , 表明指标优先比较判断矩阵具有满意的一致性, 已获得的权重系数有效。

**2.9.2 CRITIC 法确定权重系数** CRITIC 法是一种确定客观权重的方法。为了使各组分对总体效应贡献不同, 结合 CRITIC 法确定各个指标的权重, 对表 3 中的数据按照公式: 指标成分 = (实测值 - 最小值) / (最大值 - 最小值), 通过线性插值进行标准化处理<sup>[19]</sup>, 并采用 SPSS 21.0 软件进行分析, 可得到总多糖、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷和出膏率的权重系数分别为 0.2425、0.1571、0.2496、0.1833、0.1675, 具体结果见表 5。

**2.9.3 AHP-CRITIC 法确定权重** 鉴于复方主要治疗功能的特点以及各配伍之间的关系, AHP 法量化了评价指标重要性排序的信息, 并主观地评估了指标的权重, 又使用 CRITIC 法客观评价相关指标的

表 5 相关计算数据

Tab 5 Related calculation data

考察指标	总多糖	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	升麻素苷	5-O-甲基维斯阿米醇苷	出膏率
$s_i$	35.8642	32.8166	33.7735	36.7150	32.0916
$\delta_i$	0.8826	0.6248	0.9647	0.6518	0.6815
$c_i$	31.6541	20.5038	32.5826	23.9307	21.8703
$\omega_i$	0.2425	0.1571	0.2496	0.1833	0.1675

权重,该方法不仅考虑了抽样差异对权重的影响,还考虑了指标之间的不一致性。本试验将两种方法结合起来计算综合权重系数,既注重客观性,又不剔除主观性,使评价结果更加科学有效。按照公式:综合权重( $\omega_{\text{综合}ij}$ )= $(\omega_{\text{AHP}ij} \omega_{\text{CRITIC}ij} / \sum \omega_{\text{AHP}ij} \omega_{\text{CRITIC}ij})$ ,计算 5 项指标混合加权法权重系数,结果为:总多糖 0.1532、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 0.0992、升麻素苷 0.4831、5-O-甲基维斯阿米醇苷 0.2064、出膏率 0.0582。

2.10 综合评价结果的比较

采用 3 种方法计算得出的权重系数,按照公式:综合评分=(总多糖含量/总多糖最大含量) $\times 0.1532 \times 100$ +(毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量/毛蕊异黄酮葡萄糖苷最大含量) $\times 0.0992 \times 100$ +(升麻素苷含量/升麻素苷最大含量) $\times 0.4831 \times 100$ +(5-O-甲基维斯阿米醇苷含量/5-O-甲基维斯阿米醇苷最大含量) $\times 0.2064 \times 100$ +出膏率 $\times 0.0582 \times 100$ ,进行综合评分,结果见表 6。

表 6 AHP、CRITIC、AHP-CRITIC 权重系数评分

Tab 6 Weight coefficient score of AHP, CRITIC and AHP-CRITIC

试验号	AHP	CRITIC	AHP-CRITIC
1	60.66	59.95	55.96
2	71.49	71.30	68.82
3	72.92	72.82	69.02
4	79.50	79.25	74.16
5	90.20	87.62	83.99
6	86.16	81.88	73.78
7	88.50	88.73	85.37
8	98.32	98.39	98.11
9	96.36	97.25	98.25

从表 6 结果可知,AHP 法、CRITIC 法与 AHP-CRITIC 法无显著差异,对 3 种方法采用相关性分析,结果发现 3 种方法相关性显著,其中,AHP 法与 CRITIC 法的相关系数为 0.9941,AHP 法与混合加权法的相关系数为 0.9991,CRITIC 法与混合加权法的相关系数为 0.9901( $P < 0.05$ ),具有统计学意义;对于权重系数进行相关性分析,结果发现 AHP 法与 CRITIC 法的相关系数为 0.6955( $P > 0.05$ ),相关性不显著,两种方法较独立,而 AHP-

CRITIC 混合加权法兼顾主观因素和客观因素的影响,考察变量更加全面、综合,使信息更接近客观、评估结果更加符合实际情况,因此,AHP-CRITIC 法可作为综合权重评分的更好选择。

2.11 提取工艺的确定

为了全面评价试验结果,采用 AHP-CRITIC 法计算得到的权重系数,对试验数据进行直观分析和方差分析。结果见表 7 和表 8。由表 7 可得, $R(A) > R(B) > R(C)$ ,表明从直观分析方面因素 A 对工艺影响较大,因素 C 对工艺影响较小;表 8 结果表明,从方差分析角度发现,因素 A 对试验结果影响依然显著( $P < 0.05$ ),因素 B 和因素 C 对试验结果无影响。综合多因素的考虑及工业大规模生产,可选择  $A_3B_1C_1$  为最佳提取工艺,即物料比 1:8,提取 3 次,每次 1.0 h。

表 7 直观分析结果

Tab 7 Intuitive analysis

因素	A	B	C	D(空白)
$K_1$	193.80	215.50	227.85	238.19
$K_2$	231.93	250.91	241.23	227.97
$K_3$	281.73	241.05	238.39	241.30
R	87.93	35.42	13.38	13.33

表 8 方差分析结果

Tab 8 Variance analysis

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	3888.74	2	39.99	$< 0.05$
B	668.23	2	6.87	—
C	99.40	2	1.02	—
D(误差)	97.23	2	—	—

2.12 验证工艺

称量处方药材 3 份,按  $A_3B_1C_1$  工艺提取,对总多糖、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷和出膏率进行测定,结果见表 9。3 批验证试验 RSD 均小于 2.0%,说明优选出的工艺重现性良好。

表 9 工艺验证结果

Tab 9 Process validation

批次	总多糖 / ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	毛蕊异黄酮葡萄糖苷 / ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	升麻素苷 / ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	5-O-甲基维斯阿米醇苷 / ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	出膏率 / %
1	190.68	0.3486	2.4006	1.3035	31.86
2	184.37	0.3440	2.4247	1.2658	31.99
3	188.84	0.3555	2.4910	1.2858	31.68
RSD/%	1.7	1.7	1.9	1.5	0.50

3 讨论

中药复方以中医药理论为指导,在提取过程中,有效成分总量与复方的临床疗效密切相关,

活性单体和活性成分均不确定时,常使用多成分、多组分、多因素作为评价指标进行分析研究。本文结合芪术平喘止汗胶囊中药效确切成分,如总多糖、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷及工艺中的出膏率进行作为评价指标综合评价。总多糖和毛蕊异黄酮葡萄糖苷为君药黄芪的主要药效成分,研究表明<sup>[20]</sup>,黄芪多糖在TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路对慢性阻塞性肺疾病(COPD)鼠抑制炎症反应发挥作用。臣药白术多糖对淋巴细胞具有免疫调节作用<sup>[21]</sup>。升麻素苷和5-O-甲基维斯阿米醇苷分别为佐使药防风的主要药效成分,可降低大鼠体温,提高热痛阈,显著抑制二磷酸腺苷(ADP)诱导的血小板聚集,具有明显的解热、抗炎和抗血小板作用<sup>[22]</sup>。出膏率是衡量前期提取纯化工艺的重要指标,是水提取技术优化的次要评价指标,出膏率的稳定是后面制剂成型的重要保证。

本试验采用AHP-CRITIC方法在确定多指标评价的权重系数时,可以考虑到各个指标之间的相对重要性以及它们之间的相互影响。这些指标可能包括提取物的化学成分、生物活性、纯度、产量等,每个指标都有其特定的权重,反映了它们在整体评价中的相对重要性。这样的方法既考虑中药复方的药效发挥特点及中药复方的配伍,又能客观区分实际样本数据,获得的结果稳定可靠。

### 参考文献

[1] 张容,周儒兵,周双容.黄芪多糖减轻放射引起的小鼠肺部炎症和纤维化[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2020,29(4):321-327.  
 [2] 沈钦华,李素娟,董苏一.黄芪多糖对流感病毒性肺炎大鼠肺组织NLRP3信号通路的影响[J].山西医科大学学报,2021,52(9):1154-1159.  
 [3] 杜航,何文生,胡红兰,等.白术活性成分药理作用研究进展[J].江苏中医药,2022,54(5):76-80.  
 [4] 冯子芳,杨瑞宾.白术多糖通过TLR4信号通路对结肠癌CT26荷瘤小鼠肿瘤生长及免疫调节的影响[J].中成药,2022,44(1):231-235.  
 [5] 张佰虎,刘兴雁.中兽药防风的药理作用和质量控制种植措施[J].中兽医学杂志,2018(4):94.  
 [6] 姜华,胡立立,王紫玮,等.静脉给药防风色原酮单体

药理活性对比研究[J].时珍国医国药,2016,27(7):1575-1577.  
 [7] 陈雨秋,张涛,陈长宝,等.防风的化学成分、提取工艺及药理作用研究进展[J].江苏农业科学,2021,49(9):43-48.  
 [8] 刘桂花,王云飞,于宁,等.基于多指标权重分析和正交设计法优选景红颗粒复方提取工艺[J].中国新药杂志,2019,28(10):1178-1184.  
 [9] 李磊,程虹毓,朱玉野,等.多指标综合评分法优化栀子柏皮汤的提取工艺[J].中成药,2015,37(2):306-310.  
 [10] 贾成友,李微,张传辉,等.基于多指标权重分析和正交设计法优选白黄泄热止痢片复方提取工艺[J].中草药,2016,47(6):917-922.  
 [11] 陈娇,余姣,江敏瑜,等.基于多指标权重分析和正交设计法对三七跌打损伤软膏提取工艺的探究[J].中药材,2017,40(2):412-415.  
 [12] 常占璞,古丽巴哈尔·卡吾力,王梅,等.基于多指标权重和正交设计法优选复方必清颗粒的提取工艺[J].中国现代应用药学,2019,36(1):64-68.  
 [13] 任爱农,卢爱玲,田耀洲,等.层次分析法用于中药复方提取工艺的多指标权重研究[J].中国中药杂志,2008,33(4):372-374.  
 [14] Diakoulaki D, Mavrotas G, Papayannakis L. Determining objective weights in multiple criteria problems: the critic method[J]. Computers Ops Res, 1995, 22(7): 763-770.  
 [15] 石金敏,周灿,余绪明,等.CRITIC-AHP法结合Box-Behnken响应面法优选三金排石合剂提取工艺[J].中南药学,2022,20(6):1333-1337.  
 [16] 石振武,赵敏.运用层次分析法确定指标的权值[J].科技和产业,2008,8(2):23-25.  
 [17] 袁寅,王拥兵.层次分析法在高校教育质量评价中的应用[J].高师理科学刊,2019,39(3):34-37.  
 [18] 刘桂花,何承辉,帕依曼·亥米提,等.多指标综合评分法优选复方双金感冒颗粒的提取工艺[J].中国药房,2016,27(4):510-513.  
 [19] 石振武,赵敏.运用层次分析法确定指标的权值[J].科技和产业,2008,8(2):23-25.  
 [20] 向璐,张巧艳,赵琦明,等.黄芪-当归化学成分、药理作用及临床应用的研究进展[J].中草药,2022,53(7):2196-2213.  
 [21] 徐伟,方思佳,关然,等.白术多糖对小鼠淋巴细胞的免疫调节作用[J].中国免疫学杂志,2020,36(13):1573.  
 [22] 薛宝云,李文,李丽,等.防风色原酮苷类成分的药理活性研究[J].中国中药杂志,2000,25(5):297-299.

(收稿日期:2023-12-06;修回日期:2024-03-19)



## 造影剂的临床应用与药代动力学研究进展专题

### 【编者按】

现代医学影像中广泛使用造影剂，目前常用造影剂根据原理和用途不同，可分为 X 光和 CT 造影剂、磁共振造影剂、超声造影剂以及光学造影剂等。造影剂在使用后可改变机体局部组织的影像对比度，基于此特点不断创新的造影剂结合医学影像技术，可实现疾病的精准诊疗。然而不同造影剂的成像部位与成像类型各有不同，提示其安全性和有效性与其体内处置过程密切相关，但是造影剂的药代动力学研究尤其是临床特殊人群中的研究较少。本专栏综述了微泡超声造影剂与荧光造影剂的药代动力学研究进展，以期为造影剂的精准诊疗及新型造影剂的研发提供参考。

### 【主持人简介】



赵娣，中国药科大学副教授，硕士研究生导师，中国药理学会药物代谢专业委员会和临床药理学专业委员会青年委员会委员。研究方向为基于个体化给药的临床药物代谢动力学研究和创新药物的药物代谢动力学研究。近年发表 SCI 论文多篇，已授权中国发明专利两项。主持国家自然科学基金项目一项，参与国家自然科学基金面上项目两项。

## 微泡超声造影剂生物分析方法及药代动力学研究进展

陈梓欣，陈西敬\*，赵娣\*（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 211198）

**摘要：**微泡超声造影剂是一类能够显著增强医学超声检测信号的药物，常用于心脏、肝脏、肾脏等部位的超声检查。优化对比增强成像、提高诊断效率需要对体内微泡造影剂的药代动力学有全面了解。本文归纳总结了微泡超声造影剂常用生物分析方法及其药代动力学进展，系统阐释微泡超声造影剂在体内的吸收、分布、代谢和排泄过程，以期能够为微泡类药物的研究提供参考。

**关键词：**微泡超声造影剂；药物代谢动力学；生物分析方法

中图分类号：R981

文献标识码：A

文章编号：1672-2981(2024)08-2070-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.017

### Advances in bioanalysis methods and pharmacokinetics of microbubble ultrasound contrast agents

CHEN Zi-xin, CHEN Xi-jing\*, ZHAO Di\* (Clinical Pharmacology Research Center, School of Basic Medicine and Clinical Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198)

**Abstract:** Microbubble ultrasound contrast agent is a kind of drug that can significantly enhance the medical ultrasonic detection signal, and is often used in the ultrasonic examination of the heart, liver, kidney and other parts. Optimizing contrast enhancement imaging and improving diagnostic efficiency require a comprehensive understanding of the pharmacokinetics of microbubble contrast

作者简介：陈梓欣，女，硕士研究生，主要从事药物代谢动力学研究，email: 18851106630@163.com \*通信作者：陈西敬，男，教授，博士研究生导师，主要从事药物代谢动力学研究，email: 83271286@163.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

agents in vivo. In this paper, the commonly used biological analysis methods and pharmacokinetic progress of microbubble ultrasound contrast agents were summarized, and the absorption, distribution, metabolism and excretion processes of microbubble ultrasound contrast agents in vivo were systematically explained, hoping to provide references for the research of microbubble drugs.

**Key words:** microbubble ultrasonic contrast agent; pharmacokinetics; bioanalytical method

在当前临床诊断中，超声成像已成为一种应用最为普遍的医学影像技术<sup>[1]</sup>。与其他成像方式相比，超声能够提供软组织结构和血流无创实时的横截面图像。然而，由于血液对超声信号的反射性差，使用常规多普勒超声检测血管或较深部位组织中的血流时往往图像分辨率差，难以把组织和病变组织区分开来<sup>[2-3]</sup>。微泡超声造影剂的出现，提高了诊断的准确性。

微泡超声造影剂，是一种由气体为核心、脂质、白蛋白或其他物质为外膜组成的微泡。微泡核心气体由惰性气体组成，如氟碳类化合物以及六氟化硫（见图 1）。低溶解度的核心气体和具有弹性的外壳使得微泡可以在体内循环中保持一段时间稳定，以维持显影效果。微泡直径在 1 ~ 10 μm 内，与红细胞的大小范围大致相同，因此它们通过静脉注射后随血液流动完整地通过肺循环到达人体各个器官<sup>[4]</sup>。当暴露在超声波下时，含有微泡的组织表现为非线性回波信号，没有造影剂的部位主要产生线性回波信号。成像软件接收非线性回声信号，通过分析时间-造影强度曲线来评价心肌等组织的血流量和血流灌注情况。同时，当超声波光束到达带有微泡的组织时，会产生强烈的反向散射，从而在暗背景下产生高信号<sup>[5]</sup>。与电子计算机断层扫描（computed tomography, CT）和磁共振成像（magnetic resonance imaging, MRI）造影剂相比，超声造影剂不使用电离辐射，无肾毒性，且具有较好的成本效益。最重要的是，它提供了与 CT 和 MRI 相媲美的准确诊断信息<sup>[6]</sup>。

微泡超声造影剂虽然已上市使用多年，但其药代动力学研究不彻底，安全性和有效性评价不全面，严重阻碍了该类药物的发展。微泡超声造影剂相对于小分子化合物而言，药代动力学行为更复杂，给药后体内会同时存在完整的微泡、游离的微泡核心气体和微泡外壳辅料等不同成分，这也就为其系统药代动力学研究带来了新的困难和挑战。由于微泡中的核心气体量很少，同时大部分核心气体会在极短的时间内由肺快速排出，这导致难以对全血中以及呼出气体中的气体进行准确定量，对生物分析方法的选择性和灵敏度提出了更高的要求。本

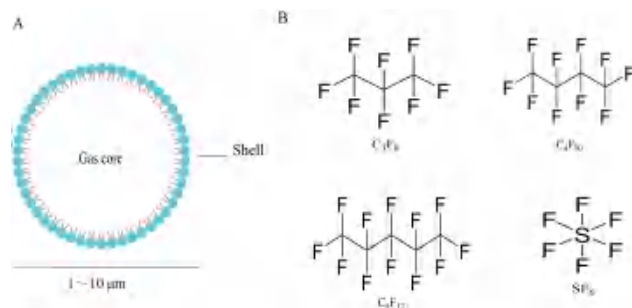


图 1 脂质微泡超声造影剂的结构 (A) 和核心气体的种类 (B)  
Fig 1 Structure of lipid microbubble contrast agent (A) and types of core gases (B)

文归纳总结了微泡超声造影剂的常用生物分析方法及其药代动力学进展，从完整的微泡、游离的微泡核心气体和微泡外壳辅料等多个方面系统阐释微泡超声造影剂在体内的处置过程，分析了目前微泡超声造影剂药代动力学研究的不足和未来的发展方向，以期微泡类药物的研究提供参考。

### 1 微泡超声造影剂的分类

回顾微泡超声造影剂发展史，根据造影剂自身结构组成特性，可以划分为三代（见表 1）<sup>[7]</sup>。第一代造影剂为空气微泡包裹蛋白质外壳造影剂，如 Albunex<sup>[8]</sup>、Levovist 等。外壳的包裹，增加了微泡在血液中的稳定性。第一代造影剂的核心气体为空气，与氟碳类化合物相比，空气在血液中的溶解度更大，这也意味着该类微泡在血液中稳定性更低，其在体内的循环时间较短，限制了其在临床上的使用<sup>[1, 9]</sup>。

第二代造影剂为氟碳气体微泡包裹脂质外壳造影剂，如 Definity（全氟脂质微泡可注射混悬剂）、SonoVue（六氟化硫微泡冻干粉注射剂）等。第二代造影剂使用高分子量和低溶解度的气体作为核心气体，以延长其体内持久性<sup>[10]</sup>。第二代微泡比第一代更小、更稳定，能够穿过肺毛细血管床<sup>[11]</sup>，这些特质使得左心室成像和心肌灌注评估结果更有效。目前第二代微泡超声造影剂也是临床使用最多的种类<sup>[12]</sup>。

第三代造影剂为正在开发的纳米级超声造影剂，它们具有独特和特异性的标记，可以定量、生理定位（分子成像）炎症和相关疾病状态<sup>[13-14]</sup>。

表 1 影像诊断研究中已研发的超声造影剂

Tab 1 Commonly developed ultrasound contrast agents in diagnostic imaging research

微泡超声造影剂	微泡外壳材料	微泡核心气体	微泡平均直径/ $\mu\text{m}$	药物代谢动力学特征	文献	
第一代微泡超声造影剂:	Albunex	白蛋白	空气	4.3	体内循环时间短, 半衰期小于 1 min	[1, 8-9]
外壳包裹空气的气泡	Levovist	脂质/半乳糖	空气	2~3		
	Sonovist	氰基丙烯酸乙酯	空气	1~2		
第二代微泡超声造影剂:	BR14	脂质	全氟丁烷	2.5~3.0	体内稳定性增强, 平均半衰期为 1~5 min	[10-12]
外壳包裹低溶解度气体的气泡	Definity	脂质/表面活性剂	全氟丙烷	1.1~3.3		
	EchoGen	表面活性剂	全氟正戊烷	2~5		
	Imagent	脂质/表面活性剂	氮气/全氟己烷	6.0		
	Optison	白蛋白	全氟丙烷	3.2		
	SonoVue	脂质	六氟化硫	2.5		
第三代微泡超声造影剂:	AI-700	聚交酯	全氟丁烷	2	具有靶向性, 可与相关靶标组合,	[13-14]
具有可控声学特性的气泡	CARDIOSphere	聚交酯	氮气	4.0	且停留时间较长, 可达 30 min	
	Sonazoid	脂质/表面活性剂	全氟丁烷	2.4~3.6		
	BR55	磷脂	氮气/全氟丁烷	/		

它的优势在于具有很强的血管穿透力, 其靶向性不仅可以提高疾病诊断的准确性, 对疾病的辅助治疗也有着积极意义<sup>[12]</sup>。

## 2 生物样本的采集与分析

微泡超声造影剂在体内可能存在完整的微泡、游离的微泡核心气体和微泡外壳辅料。目前, 微泡超声造影剂的体内分析过程包括呼吸动力学以及血液动力学, 主要通过呼出气体中微泡核心气体的浓度和全血以及组织中核心气体浓度的测定来进行评价, 对完整微泡的定量分析较少。

### 2.1 微泡核心气体的收集与分析

进入血液循环的微泡是不稳定的, 在被清除前只能循环几分钟。微泡的清除主要通过与呼出气体(主要是  $\text{N}_2$ 、 $\text{O}_2$ 、 $\text{CO}_2$ ) 交换核心气体, 使微泡核心气体经肺排出<sup>[15]</sup>。所以对于呼出气体中核心气体的准确收集和测定非常重要。例如, 杨凌等<sup>[16]</sup>将比格犬麻醉后, 气管插管后接 T 型管, T 型管一侧接呼吸机, 另一侧接采气袋; 比格犬静脉注射全氟丙烷蛋白微泡后, 进行呼出气体的采集, 并使用 GC-MS/MS 分析呼出气体中全氟丙烷 ( $\text{C}_3\text{F}_8$ ) 的含量。为了收集大鼠注射 Sonazoid (全氟丁烷脂质微泡注射剂) 后的呼出气体。Uran 等<sup>[17]</sup>制作了一个呼吸代谢室系统(带有特殊盖子和玻璃管连接的玻璃笼子组成, 将大鼠置于玻璃笼子中; 笼子玻璃管连接三通阀, 将大鼠的呼出气体导向气体收集袋中), 并使用 GC-MS/MS 分析呼出气体中全氟丁烷 ( $\text{C}_4\text{F}_{10}$ ) 的含量。由于微泡中的核心气体量很少, 进入体内后, 其全血和组织中浓度的分析对于分析方法的要求较高(定量下限通常为纳克级别), 通常使用顶空气相色谱-串联质谱法对全血中微泡核心气体的含量进行分析<sup>[18-19]</sup>。

### 2.2 微泡外壳及完整微泡的分析方法

鉴于微泡超声造影剂在体内除了核心气体外, 还具有微泡外壳和完整微泡等成分, 所以其分析方法不局限于 GC-MS/MS。例如, 在微泡制备过程中加入金属元素, 在研究微泡外壳代谢时, 可利用 ICP-MS 量化全血中金属元素浓度的变化来反映外壳成分的代谢情况。也可以使用放射标记法, 引入放射性的碳或者氧, 来间接反映外壳成分在体内的变化<sup>[20]</sup>。由于超声微泡的特性, 可通过超声强度的定量来表征造影剂在人体内各组织中的分布情况<sup>[21]</sup>。目前完整微泡的分析方法较少。Navarro-Becerra 等<sup>[22]</sup>提出使用显微镜计数的方法, 直接检测全血中微泡的数量和大小, 这种方法可以直接进行完整微泡的检测, 更能够反映微泡超声造影剂在体内的行为。

总结上述分析方法可以发现, 体内微泡超声造影剂的药代动力学研究方法可以分为两类: 第一类为间接方法, 如 GC-MS/MS、放射性标记法、超声造影等, 间接方法无法区分体内微泡的完整性以及大小和数量, 这影响了微泡超声造影剂真正有效成分微泡的药代动力学研究<sup>[22]</sup>; 第二类方法为直接方法, 如显微镜计数法, 该方法目前使用并不广泛, 其稳定性以及方法耐用性有待考察。

## 3 微泡超声造影剂的药代动力学研究

传统的微泡超声造影剂药代动力学研究只针对核心气体本身, 这具有一定的局限性, 并不能系统地阐述微泡超声造影剂在体内的真实药代动力学行为, 也会为该类制剂的药代动力学和药效学关联性研究、安全性和有效性研究带来误导。因此, 为了揭示微泡超声造影剂在体内的真实药代动力学行为, 必须同时关注微泡超声造影剂完整的微泡、游离的微泡核心气体和微泡外壳辅料及代谢物在体内的吸收、分布、代谢、排泄, 从而揭示微泡超声造影剂在体内的处置情况。



### 3.1 吸收

给药途径是影响微泡超声造影剂吸收与分布的重要因素。通过静脉给药的微泡超声造影剂直接进入血液循环。皮下注射微泡后,观察到微泡能够迅速进入淋巴管和淋巴结<sup>[23]</sup>。通过针或导管向腹腔、胸膜腔、胆道、胃肠道、泌尿道等注入微泡超声造影剂,可进行血管外(腔内)造影成像<sup>[24-26]</sup>。对于微泡超声造影剂血管外给药的体内处置行为,目前研究较少。

### 3.2 分布

微泡超声造影剂在组织中的分布主要取决于微泡大小、血管、组织供血、内皮和单核吞噬细胞系统等因素的影响。目前常用的微泡超声造影剂多为微米级别,其直径在 1 ~ 10  $\mu\text{m}$ ,由于尺寸大,完整微泡不能穿过血管壁,所以常应用于血池造影<sup>[27]</sup>。由于微泡超声造影剂进入组织后,完整的微泡难以定量,所以组织分布主要通过计算组织中放射性元素标记微泡外壳的放射强度或组织中游离核心气体浓度来进行研究。Killam 等<sup>[28]</sup>制备了放射性碘标记的 Optison,考察完整微泡在体内的分布情况。研究显示,大鼠静脉注射后的 5 min 内,平均 86.09% 的放射元素出现在组织中,其中大部分分布在肝脏(50.36%)和肺部(29.09%),给药 5 min 以后,肝脏和肺部的平均放射性水平持续下降。Toft 等<sup>[19]</sup>研究了 Sonazoid 在大鼠体内的分布情况,大鼠静脉注射 80  $\mu\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$  的全氟丁烷微泡超声造影剂后,于 5 min、20 min、3 h、24 h 收集血液、肝脏、脂肪、肾脏、肌肉、心脏、肺和大脑等组织样品,分析组织中的游离全氟丁烷气体含量。发现在注射后 5 min 可以观察到最高浓度,各组织中游离全氟丁烷气体浓度最高的部位依次为脾脏>肝脏>肺>肾脏>其他组织。同时,研究发现一些造影剂(例如 Sonazoid、BR14)可以被单核吞噬细胞系统(网状内皮细胞,例如肝脏中的库普弗细胞)吞噬<sup>[24]</sup>。微泡在体内的物理状态及分布也可通过体外超声进行控制,例如兔子静脉注射微泡超声造影剂,采用脉冲聚焦超声照射兔子脑部,可打开血脑屏障<sup>[29]</sup>。

微泡的组织分布也与其超声诊断部位息息相关。微泡超声造影剂大部分分布于供血丰富的组织,如脾脏、肝脏、肺、心等。目前已上市微泡超声造影剂其适应证大部分集中于超声心电图造影、大血管多普勒造影、肝脏血管造影等<sup>[30]</sup>。

同时,为了不断提高超声诊断的准确性和特异性,靶向超声造影的研究越来越多。例如,在微泡中嵌入能与相关生物标记物结合的物质,使微泡优先于目标部位相互作用。类似的靶向性也

改变了微泡在体内的分布情况,例如,在乳腺癌患者静脉给药后观察到靶向的 BR55 微泡在肿瘤中的滞留时间长达 30 min<sup>[31-32]</sup>。一些不良反应的发生也与微泡的组织分布有关。例如,微泡在肾脏微循环中滞留,产生补体相关的中间体,从而导致了腹部疼痛<sup>[33]</sup>。因此,了解微泡的分布情况有助于此类药物体内行为、有效性和安全性的评估。

### 3.3 药物清除(代谢、消除)

**3.3.1 微泡外壳的清除** 超声微泡的外壳主要由表面活性剂、脂质、蛋白质、聚合物等材料组成<sup>[34]</sup>。目前研究微泡外壳常用放射性标记法,如 Killam 等<sup>[28]</sup>研究 Optison 白蛋白外壳的分布和消除时,采用放射性碘标记的方法,结果发现放射性标记白蛋白外壳及碎片的主要摄取和代谢途径发生在肝脏。Definity 的脂质外壳含有二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二棕榈酰磷脂酸钠盐(DPPA)和二棕榈酰磷脂酰乙酰胺-甲氧基聚乙二醇 5000(MPEG5000 DPPE)。其中 DPPC 和 DPPA 是内源性脂质,被代谢为游离脂肪酸;MPEG5000 DPPE 不是内源性磷脂,它以聚乙二醇 5000(MPEG5000)的形式通过尿液从循环中清除<sup>[35]</sup>。研究人员在研究大鼠反复超声造影期间,出现了加速血液清除(accelerated blood clearance, ABC)现象,即免疫系统识别聚乙二醇(PEG),从而加速 PEG 的血液清除现象。这提示,反复注射具有 PEG 成分微泡时,该药物在体内的清除速度会加快(半衰期减少 4.2 倍)<sup>[36]</sup>。

**3.3.2 微泡核心气体的清除** 微泡核心气体为氟碳类化合物,全氟化碳通常对除碱金属外的所有化学试剂都非常稳定,该类化合物中的碳氟键非常稳定,气体分子不含氢和其他卤素原子,全部被氟饱和取代,化学反应活性很弱,并且该类化合物在血液中溶解度低,很难被酶所代谢<sup>[37]</sup>。

微泡核心气体主要经肺从呼出气体中快速排出。比格犬静脉注射 0.3、0.6 和 1.0  $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  Optison 后,在其呼出的气体中,全氟丙烷平均回收率为 111%、100.5% 和 121.6%<sup>[28]</sup>。兔子静脉注射 0.3  $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  的 SonoVue 后,其体内六氟化硫消除半衰期为 5.98 min,超过 90% 的六氟化硫从呼出气体中排出<sup>[38]</sup>。有研究对 12 名健康受试者静脉注射两种剂量水平(0.03  $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  和 0.3  $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 的 SonoVue 后六氟化硫的血液动力学和肺消除情况进行评价,发现六氟化硫经肺途径迅速从血液中清除,给药后 1 min 内消除 40% ~ 50% 的注射剂量,给药后 11 min 消除 80% ~ 90% 的注射剂量;这种消除在男性和女性中相似,且与剂量无关<sup>[39]</sup>。比格犬静脉注射 1  $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  的 Definity 后,全氟丙烷平均消除半衰期为 61 s,经

肺快速消除, 2~4 min 内达到累计排泄平台<sup>[40]</sup>。Uran 等<sup>[17]</sup>研究了 Sonazoid 在大鼠体内的排泄情况, 研究表明, 以 8 μL·kg<sup>-1</sup> 剂量静脉注射, 24 h 全氟丁烷平均回收率为 96% (范围 81%~110%), 50% 以上在注射后 30 min 内呼出。多种超声微泡超声造影剂在不同种属动物中都表现出了从体内快速消除的特性。微泡超声造影剂从第一代发展至第三代, 其性质也在不断改进。例如微泡外壳稳定性的提高以及核心气体溶解度的降低, 使微泡在体内稳定性增强, 滞留时间延长, 从而满足临床的需求<sup>[41]</sup>。

Landmark 等<sup>[42]</sup>研究了 Sonazoid 在健康人群和肺扩散能力降低的人群中的血液药物代谢动力学。结果发现, 肺扩散能力降低的受试者其 AUC 明显高于健康志愿者, 这表明肺功能状态会影响该药物在体内的暴露水平。Burkard 等<sup>[43-44]</sup>指出, 全氟化碳消除的主要途径是通过肺泡内的血/气界面扩散, 因此消除的速度主要由肺灌注控制, 鉴于这些特性, 作者预测全氟化碳的消除动力学在健康人中的差异有限<sup>[45]</sup>。

**3.3.3 微泡的清除** 目前, 有研究通过多普勒强度测量法估计超声微泡的药代动力学特征<sup>[46]</sup>。研究表明, SonoVue 静脉注射后, 消除动力学表现为两个阶段: 多普勒强度快速衰减的第一阶段对应于造影剂第一次通过动脉循环, 更长时间的第二阶段缓慢下降代表超声微泡从循环中消除的过程<sup>[35]</sup>, 消除时间 (通常几分钟) 将取决于微泡超声造影剂的剂量和特性<sup>[47]</sup>。

微泡超声造影剂的清除过程对超声造影效果影响较大。第一代微泡超声造影剂半衰期小于 1 min, 极短的半衰期也说明其造影时间较短, 限制了其在临床的使用。后续微泡超声造影剂不断改进其在体内的稳定性, 以延长半衰期, 从而满足临床使用需

求。通过多普勒强度测量法研究微泡超声造影剂的药代动力学特征, 虽然无法对微泡大小、数量进行定量, 但可确定微泡超声造影剂的输注效果, 因此可利用体内多普勒强度测量技术评价注射方法<sup>[48]</sup>及给药剂量对超声造影的影响, 以优化给药方案<sup>[22]</sup>。

**3.4 全血药代动力学**

微泡超声造影剂在体内的暴露水平主要与给药剂量相关。Killam 等<sup>[28]</sup>进行了比格犬静脉注射 Optison 的药代动力学研究, 结果表明, 比格犬静脉注射 0.3、0.6 和 1.0 mL·kg<sup>-1</sup> Optison 时, 全氟丙烷全血 C<sub>max</sub> 的均值分别为 0.197、0.66、0.79 nmol·L<sup>-1</sup>, AUC<sub>0~t</sub> 的均值分别为 14.49、36.3、46.72 nmol·s·mL<sup>-1</sup>, 给药剂量与暴露量呈线性关系。比格犬静脉注射 Definity 的药代动力学研究表明, 静脉注射 1 mL·kg<sup>-1</sup> 全氟丙烷脂质微泡后, 全氟丙烷血药浓度峰值在 0.0258~0.0452 μL PFP·mL<sup>-1</sup>, 平均 AUC<sub>0~t</sub> 估计为 3237 nL·s·mL<sup>-1</sup><sup>[40]</sup>。Li 等<sup>[45]</sup>研究了在中国健康受试者中, 静脉注射 Sonazoid 0.12 μL·kg<sup>-1</sup> 及 0.6 μL·kg<sup>-1</sup>, 其 AUC<sub>0~t</sub> 分别为 (10.1±2.7) 和 (90.1±38.3) ng·min·g<sup>-1</sup>, 全氟丁烷血中 C<sub>max</sub> 分别为 (2.3±1.1) 和 (19.1±9.2) ng·g<sup>-1</sup>。

虽然微泡超声造影剂已经从第一代发展到第三代, 但因给药量很少, 排泄速度快, 导致难以量化其血液中的含量, 微泡超声造影剂的药代动力学研究仍然是一个挑战<sup>[49]</sup>。不过 Correas 等<sup>[50]</sup>认为, 微泡超声造影剂的药代动力学可能遵循微泡核心气体成分的药代动力学规律。目前研究微泡在体内的暴露量水平, 仍然以测量微泡核心气体成分在血液中的含量为主。

目前已上市的微泡超声造影剂的药代动力学研究见表 2。

表 2 目前已上市的微泡超声造影剂的药代动力学研究

Tab 2 Pharmacokinetics study of commercially available microbubble ultrasound contrast agents

制剂	核心气体	研究对象	给药剂量	C <sub>max</sub>	AUC	t <sub>1/2</sub> /s	累计排泄率/%	文献
Optison	全氟丙烷	比格犬	0.3 mL·kg <sup>-1</sup>	0.197±0.08 nmol·L <sup>-1</sup>	14.49±3.56 nmol·s·mL <sup>-1</sup>	20.08±3.41 s	111	[28]
Optison	全氟丙烷	比格犬	0.6 mL·kg <sup>-1</sup>	0.66±0.05 nmol·L <sup>-1</sup>	36.3±1.04 nmol·s·mL <sup>-1</sup>	19.23±4.68 s	100.5	[28]
Optison	全氟丙烷	比格犬	1 mL·kg <sup>-1</sup>	0.79±0.13 nmol·L <sup>-1</sup>	46.72±5.83 nmol·s·mL <sup>-1</sup>	28.30±1.93 s	121.6	[28]
Definity	全氟丙烷	比格犬	1 mL·kg <sup>-1</sup>	0.0258~0.0452 μL PFP·mL <sup>-1</sup>	3237 nL·s·mL <sup>-1</sup>	61 s	/	[40]
Sonovue	六氟化硫	家兔	0.3 mL·kg <sup>-1</sup>	3.1 ng·mL <sup>-1</sup>	/	358.8 s	98	[38-39]
Sonazoid	十氟丁烷	成人	0.12 μL·kg <sup>-1</sup>	2.3±1.1 ng·g <sup>-1</sup>	10.1±2.7 ng·min·g <sup>-1</sup>	162±42 s	/	[42]
Sonazoid	十氟丁烷	成人	0.6 μL·kg <sup>-1</sup>	19.1±9.2 ng·g <sup>-1</sup>	90.1±38.3 ng·min·g <sup>-1</sup>	1020±462 s	/	[42]
Sonazoid	十氟丁烷	大鼠	0.3 μL·kg <sup>-1</sup>	7.7 ng·g <sup>-1</sup>	1.2 ng·min·g <sup>-1</sup>	144 s	/	[42]
Sonazoid	十氟丁烷	大鼠	3 μL·kg <sup>-1</sup>	90.6 ng·g <sup>-1</sup>	12.4 ng·min·g <sup>-1</sup>	7920 s	/	[42]
EchoGen	十二氟戊烷	成人	0.01 mL·kg <sup>-1</sup>	/	8.3±3.7 mg·min·L <sup>-1</sup>	150±126 s	95±23	[50]
EchoGen	十二氟戊烷	成人	0.02 mL·kg <sup>-1</sup>	/	10.0±2.1 mg·min·L <sup>-1</sup>	126±48 s	97±19	[50]
EchoGen	十二氟戊烷	成人	0.05 mL·kg <sup>-1</sup>	/	21.8±5.5 mg·min·L <sup>-1</sup>	108±24 s	98±25	[50]
EchoGen	十二氟戊烷	成人	0.1 mL·kg <sup>-1</sup>	/	42.6±7.6 mg·min·L <sup>-1</sup>	138±66 s	103±12	[50]

#### 4 总结与展望

微泡超声造影剂具有使用场景多、不良反应少等优势, 成为了超声造影研究的热点, 微泡超声造影剂的使用为人们认识疾病和诊疗开拓了新的道路。然而, 微泡超声造影剂的药代动力学研究仍然存在很多挑战。尤其是针对完整微泡在体内的动力学过程。随着分析技术和药代动力学研究的不断完善和创新, 微泡超声造影剂的药代动力学研究必将朝着更精确的方向发展, 为该类药物的安全性、有效性研究提供更加坚实的基础。

#### 参考文献

- [1] 余后强, 何晓玲, 丁明跃. 医学超声造影研究现状与进展 [J]. 生命科学仪器, 2017, 15 (2): 3-8, 38.
- [2] 李春芳. 自制靶向纳米泡超声造影剂的特性及成像研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2017.
- [3] Roovers S, Segers T, Lajoinie G, et al. The role of ultrasound-driven microbubble dynamics in drug delivery: from microbubble fundamentals to clinical translation [J]. *Langmuir*, 2019, 35 (31): 10173-10191.
- [4] Chong WK, Papadopoulou V, Dayton PA. Imaging with ultrasound contrast agents: current status and future [J]. *Abdom Radiol*, 2018, 43 (4): 762-772.
- [5] Aggarwal A, Goswami S, Das CJ. Contrast-enhanced ultrasound of the kidneys: principles and potential applications [J]. *Abdom Radiol*, 2022, 47 (4): 1369-1384.
- [6] Wilson SR, Greenbaum LD, Goldberg BB. Contrast-enhanced ultrasound: what is the evidence and what are the obstacles [J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2009, 193 (1): 55-60.
- [7] Borden MA, Song KH. Reverse engineering the ultrasound contrast agent [J]. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2018, 262: 39-49.
- [8] Keller MW, Glasheen W, Kaul S. Alunex: a safe and effective commercially produced agent for myocardial contrast echocardiography [J]. *J Am Soc Echocardiogr*, 1989, 2 (1): 48-52.
- [9] Fournier L, de La Taille T, Chauvierre C. Microbubbles for human diagnosis and therapy [J]. *Biomaterials*, 2023, 294: 122025.
- [10] Abenojar EC, Nittayacharn P, de Leon AC, et al. Effect of bubble concentration on the in vitro and in vivo performance of highly stable lipid shell-stabilized micro- and nanoscale ultrasound contrast agents [J]. *Langmuir*, 2019, 35 (31): 10192-10202.
- [11] Lindner JR, Song J, Jayaweera AR, et al. Microvascular rheology of definity microbubbles after intra-arterial and intravenous administration [J]. *J Am Soc Echocardiogr*, 2002, 15 (5): 396-403.
- [12] Parker JM, Weller MW, Feinstein LM, et al. Safety of ultrasound contrast agents in patients with known or suspected cardiac shunts [J]. *Am J Cardiol*, 2013, 112 (7): 1039-45.
- [13] Willmann JK, Bonomo L, Testa AC, et al. Ultrasound molecular imaging with BR55 in patients with breast and ovarian lesions: first-in-human results [J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35 (19): 2133.
- [14] Smeenge M, Tranquart F, Mannaerts CK, et al. First-in-human ultrasound molecular imaging with a VEGFR2-specific ultrasound molecular contrast agent (BR55) in prostate cancer: a safety and feasibility pilot study [J]. *Invest Radiol*, 2017, 52 (7): 419-427.
- [15] Stride E, Segers T, Lajoinie G, et al. Microbubble agents: new directions [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2020, 46 (6): 1326-1343.
- [16] 杨凌, 陈志良, 刘世霖, 等. 全氟丙烷人血白蛋白微球注射剂静脉给药后试验犬气体采集方法的建立 [J]. *南方医科大学学报*, 2006, 26 (12): 1706-1708.
- [17] Uran S, Landmark K, Normann PT, et al. A respiration-metabolism chamber system and a GC-MS method developed for studying exhalation of perfluorobutane in rats after intravenous injection of the ultrasound contrast agent Sonazoid [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 39 (3-4): 746-51.
- [18] Giuliani N, Saugy M, Augsburger M, et al. Blood monitoring of perfluorocarbon compounds (F-tert-butylcyclohexane, perfluoromethyldecalin and perfluorodecalin) by headspace-gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2015, 144: 196-203.
- [19] Toft KG, Hustvedt SO, Hals PA, et al. Disposition of perfluorobutane in rats after intravenous injection of Sonazoid [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2006, 32 (1): 107-114.
- [20] Straub JA, Chickering DE, Hartman TG, et al. AI-700 pharmacokinetics, tissue distribution and exhaled elimination kinetics in rats [J]. *Int J Pharm*, 2007, 328 (1): 35-41.
- [21] Correas JM, Burns PN, Lai X, et al. Infusion versus bolus of an ultrasound contrast agent: in vivo dose-response measurements of BR1 [J]. *Invest Radiol*, 2000, 35 (1): 72-9.
- [22] Navarro-Becerra JA, Song KH, Martinez P, et al. Microbubble size and dose effects on pharmacokinetics [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2022, 8 (4): 1686-1695.
- [23] Dewitte H, Vanderperren K, Haers H, et al. Theranostic mRNA-loaded microbubbles in the lymphatics of dogs: implications for drug delivery [J]. *Theranostics*, 2015, 5 (1): 97-109.
- [24] Dietrich CF, Averkiou M, Nielsen MB, et al. How to perform contrast-enhanced ultrasound (CEUS) [J]. *Ultrasound Int Open*, 2018, 4 (1): E2-E15.
- [25] Kalayeh K, Fowlkes JB, Claflin J, et al. Ultrasound contrast stability for urinary bladder pressure measurement [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2023, 49 (1): 136-151.



- [26] Gupta S, Manchanda S, Dadhwal V. Ovarian torsion: incremental role of contrast-enhanced ultrasound [J]. *BMJ Case Rep*, 2022, 15 (12): e251285.
- [27] 杨茂发, 李敬, 张现仁. 纳米级超声造影剂的理论研究进展 [J]. *净水技术*, 2021, 40 (2): 42-52.
- [28] Killam AL, Mehlhaff PM, Zavorskas PA, et al. Tissue distribution of 125 I-labeled albumin in rats, and whole blood and exhaled elimination kinetics of octafluoropropane in anesthetized canines, following intravenous administration of Optison® (FS069) [J]. *Int J Toxicol*, 1999, 18 (1): 49-63.
- [29] Hynynen K, McDannold N, Vykhodtseva N, et al. Non-invasive opening of BBB by focused ultrasound [C]// *Brain Edema XIII: Proceedings of the 12 th International Symposium*, Hakone, Japan, November 10—13, 2002. Springer Vienna, 2003: 555-558.
- [30] Dietrich CF, Nolsøe CP, Barr RG, et al. Guidelines and good clinical practice recommendations for contrast enhanced ultrasound (CEUS) in the liver-update 2020 WFUMB in cooperation with EFSUMB, AFSUMB, AIUM, and FLAUS [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2020, 41 (5): 562-585.
- [31] Jun HY, Park SH, Kim HS, et al. Long residence time of ultrasound microbubbles targeted to integrin in murine tumor model [J]. *Acad Radiol*, 2010, 17 (1): 54-60.
- [32] Willmann JK, Bonomo L, Testa AC, et al. Ultrasound molecular imaging with BR55 in patients with breast and ovarian lesions: first-in-human results [J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35 (19): 2133.
- [33] Liu YN, Khangura J, Xie A, et al. Renal retention of lipid microbubbles: a potential mechanism for flank discomfort during ultrasound contrast administration [J]. *J Am Soc Echocardiogr*, 2013, 26 (12): 1474-1481.
- [34] Sirsi S, Borden M. Microbubble compositions, properties and biomedical applications [J]. *Bubble Sci Eng Technol*, 2009, 1 (1-2): 3-17.
- [35] Abdelmoneim SS, Mulvagh SL. Perflutren lipid microsphere injectable suspension for cardiac ultrasound [J]. *Imaging Med*, 2012, 4 (2): 171.
- [36] Fix SM, Nyankima AG, McSweeney MD, et al. Accelerated clearance of ultrasound contrast agents containing polyethylene glycol is associated with the generation of anti-polyethylene glycol antibodies [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2018, 44 (6): 1266-1280.
- [37] 艾智武, 盛凤仙, 江骥, 等. 全氟丙烷在健康人体的药代动力学 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2009, 25 (3): 211-214.
- [38] Schneider M. SonoVue, a new ultrasound contrast agent [J]. *Eur Radiol*, 1999, 9 (Suppl 3): S347-S348.
- [39] Morel DR, Schwieger I, Hohn L, et al. Human pharmacokinetics and safety evaluation of SonoVue™, a new contrast agent for ultrasound imaging [J]. *Invest Radiol*, 2000, 35 (1): 80.
- [40] Food and Drug Administration (FDA), 21-064\_Definity\_pharmr\_P3, ([https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2001/21-064\\_Definity.cfm](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2001/21-064_Definity.cfm)).
- [41] Klivanov AL. Ultrasound contrast: gas microbubbles in the vasculature [J]. *Invest Radiol*, 2021, 56 (1): 50-61.
- [42] Landmark KE, Johansen PW, Johnson JA, et al. Pharmacokinetics of perfluorobutane following intravenous bolus injection and continuous infusion of Sonazoid™ in healthy volunteers and in patients with reduced pulmonary diffusing capacity [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2008, 34 (3): 494-501.
- [43] Burkard ME. Behavior of bubbles of slowly permeating gas used for ultrasonic imaging contrast [J]. *Invest Radiol*, 1995, 30 (5): 315-321.
- [44] Klivanov AL, Hughes MS, Wojdyla JK, et al. Destruction of contrast agent microbubbles in the ultrasound field: the fate of the microbubble shell and the importance of the bubble gas content [J]. *Acad Radiol*, 2002, 9 (1): S41-S45.
- [45] Li PF, Hoppmann S, Du P, et al. Pharmacokinetics of perfluorobutane after intra-venous bolus injection of Sonazoid in healthy Chinese volunteers [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2017, 43 (5): 1031-1039.
- [46] Villanueva FS, Gertz EW, Csikari M, et al. Detection of coronary artery stenosis with power Doppler imaging [J]. *Circulation*, 2001, 103 (21): 2624-2630.
- [47] Hyvelin JM, Tardy I, Arbogast C, et al. Use of ultrasound contrast agent microbubbles in preclinical research: recommendations for small animal imaging [J]. *Invest Radiol*, 2013, 48 (8): 570-583.
- [48] Talu E, Powell RL, Longo ML, et al. Needle size and injection rate impact microbubble contrast agent population [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2008, 34 (7): 1182-1185.
- [49] Omata D, Unga J, Suzuki R, et al. Lipid-based microbubbles and ultrasound for therapeutic application [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, 154: 236-244.
- [50] Correias JM, Meuter AR, Singlas E, et al. Human pharmacokinetics of a perfluorocarbon ultrasound contrast agent evaluated with gas chromatography [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2001, 27 (4): 565-570.

(收稿日期: 2024-01-17; 修回日期: 2024-04-11)

## 近红外荧光造影剂的临床应用与药代动力学研究进展

刘睿婷<sup>1</sup>, 李涛<sup>2</sup>, 陈梓欣<sup>1</sup>, 陈西敬<sup>1</sup>, 赵娣<sup>1\*</sup> (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 211198; 2. 南京医科大学附属儿童医院肿瘤病区, 南京 210000)

**摘要:** 快速发展的荧光影像技术促进了荧光造影剂的研究。临床现有的荧光造影剂包括吲哚菁绿、亚甲蓝和 5-氨基乙酰丙酸。这些荧光造影剂临床应用广泛, 但在体内的荧光成像部位和类型各不相同, 可能与给药方式和药代动力学过程相关。目前荧光造影剂在临床尤其是特殊人群中的药代动力学研究较少。本文总结了已上市的荧光造影剂的临床应用现状和药代动力学性质, 为明确其临床应用方向, 优化药物使用提供依据。

**关键词:** 吲哚菁绿; 亚甲蓝; 5-氨基乙酰丙酸; 近红外荧光成像; 药代动力学; 生物分析方法  
**中图分类号:** R981 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)08-2077-07  
**doi:** 10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.018

### Progress in clinical application and pharmacokinetics of near-infrared fluorescent imaging agents

LIU Rui-ting<sup>1</sup>, LI Tao<sup>2</sup>, CHEN Zi-xin<sup>1</sup>, CHEN Xi-jing<sup>1</sup>, ZHAO Di<sup>1\*</sup> (1. *Clinical Pharmacology Research Center, School of Basic Medicine and Clinical Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198*; 2. *Department of Pediatric Surgery, Children's Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210000*)

**Abstract:** Advances in fluorescence imaging have greatly stimulated the research into fluorescent imaging agents. Clinically available fluorescent imaging agents include indocyanine green, methylene blue, and 5-aminolevulinic acid. Although these agents have been widely used, their in vivo fluorescence imaging sites and types vary, possibly due to differences in their routes of administration and pharmacokinetic processes. However, clinical pharmacokinetic studies of fluorescent imaging agents are scarce, particularly in special population groups. This article reviewed the clinical application and pharmacokinetic properties of commercially available fluorescent imaging agents, to provide a direction for the clinical application and optimization of drug use.

**Key words:** indocyanine green; methylene blue; 5-aminolevulinic acid; near infrared fluorescence imaging; pharmacokinetics; bioanalytical method

活体影像技术在临床前药物研究和临床应用中有着重要地位, 其中包括计算机断层扫描 (computed tomography, CT)、磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI)、正电子发射断层显像 (positron emission tomography, PET)、单光子发射计算机断层成像 (single photon emission computed tomography, SPECT) 和光学成像技术等。这些技术一般需要专门的设备、空间和技术人员; 有潜在的辐射暴露风险; 需要医师有丰富的手术经验和判别能力。荧光影像是使用荧光造影剂后, 利用相应的设备激发荧光, 荧光信号经仪器接收处理后显示在屏幕上,

研究者或医师可以对手术目标组织及周边情况进行观察。这项技术设备便携, 操作简单, 结果直观清晰, 可以作为实时导航工具应用在外科手术中。

近红外光是波长位于 650 ~ 1700 nm 的电磁波, 可分为近红外光谱一区 (NIR- I, 700 ~ 900 nm) 和近红外光谱二区 (NIR- II, 100 ~ 1700 nm)<sup>[1]</sup>。与可见光相比, 近红外光能更有效地穿透组织, 降低组织吸收和自发荧光的发生率<sup>[1-2]</sup>。吲哚菁绿是目前美国食品药品监督管理局 (FDA) 唯一批准的荧光造影剂, 另外在已上市药物中, 亚甲蓝和 5-氨基乙酰丙酸使用后能够产生荧光, 也有在临床诊疗和研究

作者简介: 刘睿婷, 女, 硕士研究生, 主要从事药代动力学研究, email: liurt09@163.com \*通信作者: 赵娣, 女, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事药代动力学研究, email: zh\_d99@cpu.edu.cn

用于荧光成像的报道。因此本文对已上市的三种药物荧光成像的临床应用、药代动力学特征进行了综述。

### 1 吲哚菁绿

吲哚菁绿 (indocyanine green, ICG, 见图 1) 属于一种两亲性的三碳菁荧光染料, 其分子由两部分亲脂性强的多环组成, 中间以碳链连接, 在两个多环部分各连有一个硫酸盐基团, 增强了吲哚菁绿的亲水性, 使其具备了两亲性的特征。

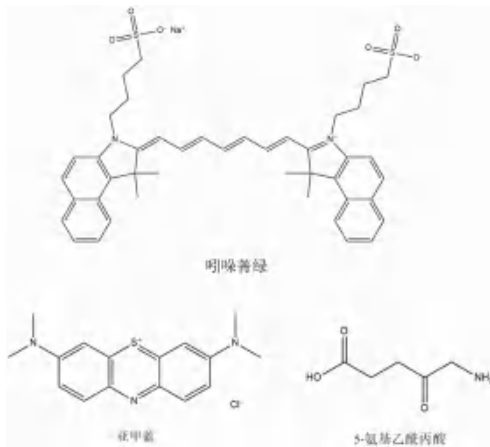


图 1 吲哚菁绿、亚甲蓝和 5-氨基乙酰丙酸的化学结构式  
Fig 1 Chemical structure of indocyanine green, methylene blue and 5-aminolevulinic acid

#### 1.1 吲哚菁绿临床应用进展

吲哚菁绿主要通过静脉或局部给药, 是目前 FDA 唯一批准的荧光造影剂, 适用于手术前、术中和术后的血管和组织灌注成像, 还包括胆管和乳腺癌、宫颈癌和子宫癌的淋巴结和淋巴管荧光成像。

吲哚菁绿在临床上应用已久, 用途广泛。自 20 世纪 50 年代开始被 FDA 批准应用于临床诊疗与研究, 最早因可不受血氧饱和度的影响应用于心排血量评价<sup>[3]</sup>。Wheeler 等<sup>[4]</sup>报道了吲哚菁绿在犬体内的药代动力学特点, 体现了吲哚菁绿在肝功能评价上的优势, 提示吲哚菁绿可用于肝生理和病理过程研究及其他药物对肝脏功能影响的评价<sup>[5-8]</sup>。目前吲哚菁绿清除试验仍然是肝储备功能评价的经典方法<sup>[9-10]</sup>。自 1970 年起, 吲哚菁绿开始应用于眼科脉络膜的血管成像, 但应用受限于

当时的成像技术, 直至 20 世纪 90 年代, 数字成像技术与红外成像设备的升级促进了这项技术的普及<sup>[11]</sup>, 为眼科疾病诊疗提供了极大的便利<sup>[12]</sup>。

吲哚菁绿在肿瘤诊疗、淋巴成像等方面发挥了突出作用<sup>[13-14]</sup>。在肿瘤治疗与检测中, 考虑到吲哚菁绿在肝脏的分布、排泄特征和荧光特性, 在肝脏肿瘤诊疗与外科手术中有着明显的优势<sup>[15]</sup>。在淋巴成像方面, 吲哚菁绿因对前哨淋巴结的示踪作用良好, 在中国和日本的临床实践指南中获得了推荐<sup>[16-17]</sup>。与经典的示踪剂放射性同位素锝-99m 和蓝色染料 (亚甲蓝、专利蓝或异硫蓝) 相比, 吲哚菁绿安全性更好, 单独使用效果优于蓝色染料<sup>[18]</sup>, 使用方便, 避免了放射性同位素的管控问题。

#### 1.2 吲哚菁绿药代动力学研究进展

1.2.1 吲哚菁绿的体内分析方法 吲哚菁绿的体内分析方法主要可分为光谱法、色谱法、高效液相色谱法 (HPLC)、超高效液相色谱串联质谱法 (UPLC-MS/MS)。

① 光谱法: 吲哚菁绿的吸收光谱在 750 ~ 900 nm 内<sup>[19]</sup>, 可利用光谱法进行检测, 包括分光光度法 (SPEC)<sup>[4-5, 20]</sup> 和脉搏染料光密度法 (PDD)<sup>[21-23]</sup>。SPEC 检测迅速, 但特异性低。吲哚菁绿在 800 ~ 805 nm 处的吸收可能会被血红蛋白干扰, 因此溶血样品可能会对结果有影响<sup>[24]</sup>。PDD 与脉搏血氧检测方法原理类似, 是根据吲哚菁绿和血红蛋白在 805 nm 和 890 nm 波长处浓度的相对变化, 展现吲哚菁绿浓度随时间的变化过程, 临床应用于心排血量和有效肝血流量的无创测定, 与 SPEC 相比, 虽然该方法实施方便, 但结果准确性可能会受到不同检测部位的影响<sup>[23]</sup>。

② HPLC 法: 考虑到 SPEC 选择性较低, 有研究对 HPLC-UV 检测法和 SPEC 进行了比较, 发现在同一给药剂量下后者测定的吲哚菁绿浓度始终高于前者, 这也会影响到最终的体内的药代动力学参数计算结果 (见表 1)。这一观察结果表明, SPEC 测定的溶液中可能存在与吲哚菁绿相同吸收波长的其他物质<sup>[20, 25-27]</sup>。HPLC 方法专属性更佳, 但定量限均高于 100 ng · mL<sup>-1</sup><sup>[7, 13, 20, 28]</sup>, 较难满足分析要求。

表 1 吲哚菁绿的药代动力学参数

Tab 1 Pharmacokinetic parameters of indocyanine green

文献	研究对象	n	给药剂量 / (mg · kg <sup>-1</sup> )	AUC <sub>0~t</sub> / (ng · mL <sup>-1</sup> · min)	AUC <sub>0~∞</sub> / (ng · mL <sup>-1</sup> · min)	t <sub>1/2</sub> /min	CL / [mL / (min · kg)]	V / (mL · kg <sup>-1</sup> )	胆汁排 泄率 /%	检测方法
[25]	犬 (i.v.)	3	0.5	/	/	42.6 ± 4.68	7.1 ± 1.5	160 ± 60	74.2 ± 10.7	UPLC-MS/MS
[5]	大鼠 (i.v.)	10	10	/	/	1.3	4.68	35.3	76.1 ± 3.9	SPEC
[28]	大鼠 (i.v.)	5	5	/	/	/	11.8 ± 3.0	64.0 ± 2.7	/	HPLC-UV
[28]	大鼠 (i.v.)	5	5	/	/	/	7.40 ± 1.17	50.5 ± 16.7	/	SPEC
[29]	大鼠 (i.v.)	6	15	501.11 ± 256.31	716.50 ± 255.07	79.5 ± 29.2	20 ± 30	2700 ± 4100	/	UPLC-MS/MS
[8]	人 (i.v.)	10	0.5	/	/	3.05 ± 0.98	10.5 ± 2.5	44.4 ± 10.4	/	HPLC-UV
[8]	人 (i.v.)	10	0.5	/	/	3.61 ± 1.01	10.5 ± 2.6	52.2 ± 9.4	/	SPEC



③ 超高效液相色谱串联质谱法：UPLC-MS/MS 综合了色谱和质谱的优点，相较之前方法进一步提升了分析方法的灵敏度、特异性和检测效率。一些研究中采用此方法检测了大鼠血浆、犬血浆和胆汁中的吡啶菁绿浓度<sup>[25, 29]</sup>，方法的定量下限分别为  $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $3 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。Sottani 等<sup>[30]</sup> 开发验证了 UPLC-MS/MS 法检测小鼠肝匀浆中吡啶菁绿纳米颗粒，辅助完成了小鼠不同组织中的吡啶菁绿纳米颗粒的浓度检测及向肿瘤组织靶向递送情况的评价<sup>[31]</sup>。

**1.2.2 吡啶菁绿体内分布及排泄** 文献中报道的吡啶菁绿基本药代动力学参数如表 1 所示，不同文献结果差异较大，特别是半衰期，这可能与分析方法的差异和实验动物数量较少相关。但总体而言，吡啶菁绿静脉注射给药后，迅速与体内血浆蛋白相结合，血药浓度快速下降，半衰期较短。随后主要进入肝脏，分布过程中不存在肝肠循环，近 80% 的药物以原形经胆汁排出，不经尿液排泄<sup>[4]</sup>。

**1.2.3 吡啶菁绿体内肝脏转运过程** 吡啶菁绿的肝脏转运可能涉及多种转运蛋白<sup>[32-33]</sup>。目前报道相关的转运蛋白包括有机阴离子转运多肽 (OATP) 钠离子-牛磺胆酸共转运蛋白 (NTCP)、多药耐药相关蛋白 (MRP)、P-糖蛋白 (P-gp) 等。de Graaf 等<sup>[34]</sup> 利用稳定表达 OATP 和 NTCP 的 CHO 细胞对吡啶菁绿的摄取进行研究，在过表达 NTCP 或 OATP1B3 的细胞中观察到了明显的吡啶菁绿摄取，但是由于吡啶菁绿的吸附作用和分光光度法的局限性，无法准确检测药物浓度，未能进一步探讨不同转运蛋白对吡啶菁绿摄取的贡献情况。有研究在 MRP2 缺陷的大鼠体内发现吡啶菁绿的排泄有所下降，表明吡啶菁绿的外排转运过程可能与 MRP2 相关，并且可能存在其他的外排转运过程<sup>[35-37]</sup>。还有研究表明，P-gp 可能也与吡啶菁绿转运相关<sup>[38-40]</sup>。Ishizawa 等<sup>[41-42]</sup> 报道了在成人肝细胞癌中，研究人员发现肿瘤组织有着不同的吡啶菁绿荧光展现模式，可分为全荧光、部分荧光和环状荧光模式，这种模式的差异可能与转运蛋白的表达相关。但对这一现象的临床意义的解读，如其他肝脏肿瘤中是否有类似的结果以及如何开展个体化用药还需要更深入的研究。

药物的肝胆转运受到多种因素的影响，除转运蛋白的作用外，肝脏功能也会产生影响。吡啶菁绿的分布及排泄特征在一定程度上能够反映这些因素的改变程度。一些研究表明，大鼠和人类年龄增长带来的肝血流量和肝体积的下降导致了吡啶菁绿清除率的下降<sup>[36, 43-44]</sup>。Kimura 等<sup>[5]</sup> 评价了在实验

性急性肝病模型大鼠（即 D-氨基半乳糖中毒大鼠、四氯化碳中毒大鼠和梗阻性黄疸大鼠）中吡啶菁绿的药代动力学表现的变化。与正常大鼠相比，模型大鼠肝血流量减少，吡啶菁绿体内血浆清除率下降。而在不同种类的急性肝病大鼠组中，D-氨基半乳糖中毒大鼠中吡啶菁绿的累积胆汁排泄率明显降低；四氯化碳中毒大鼠中几乎没有变化；在梗阻性黄疸大鼠中吡啶菁绿的胆汁排泄出现延迟，这些结果表明除肝血流量改变外，疾病状态下，相关肝脏转运蛋白和肝脏功能受到了影响，可能导致了吡啶菁绿在不同肝脏疾病中胆汁排泄的差异<sup>[45-47]</sup>。

## 2 亚甲蓝

亚甲蓝 (methylene blue, MB) 是一种杂环芳香族化合物，首次合成于 1876 年，最早在临床研究中作为一种染料使用。目前 FDA 批准其应用于成人和儿童的高铁血红蛋白血症的治疗，国内还可见用于氰化物中毒的毒性延缓治疗，也被推荐用于前哨淋巴结示踪<sup>[16-17]</sup>。亚甲蓝使用方式有口服和静脉注射，静脉给药剂量超过  $2 \sim 7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时容易发生不良反应，包括溶血、恶心呕吐、胸痛、呼吸困难和高血压等<sup>[48]</sup>。亚甲蓝的激发波长为 665 nm，发射波长为 686 nm<sup>[49]</sup>，其荧光效率低于吡啶菁绿。

### 2.1 亚甲蓝药代动力学特点及临床应用

亚甲蓝在临床诊疗上有着重要的作用，结合近红外荧光成像，在手术中可以辅助可视化不易观察的组织结构。目前临床应用较多的包括输尿管成像、甲状旁腺成像和乳腺癌边缘识别药。这些方面的荧光特性应用研究仍处于早期阶段，相关的药代动力学过程研究并不清晰。在给药方式上，亚甲蓝以静脉注射或局部使用为主，因此其分布与排泄特征与其荧光成像应用关系密切。

在体内分布表现上，有研究对十二指肠和静脉使用亚甲蓝在大鼠体内的组织分布情况进行了探讨，结果发现给药 1 h 后，静脉给药组亚甲蓝在脑内的浓度显著高于十二指肠给药组；而在十二指肠给药组中，亚甲蓝在肠壁和肝内浓度明显较高；两种给药方式在胆汁中的浓度相近<sup>[50]</sup>。这一结果表明亚甲蓝在体内有着广泛分布，使用不同的给药方式可以达到不同的组织浓度。此外，也有研究表明在 CD1 小鼠的心、肝、脾、肺、肾、胃、肠、胆囊 8 种组织中，亚甲蓝在胃和胆囊的荧光信号更明显，进一步研究发现在接种胃肿瘤的小鼠中，亚甲蓝在胃组织有着比胃肿瘤更明显的荧光信号<sup>[51]</sup>，表明亚甲蓝也有望在胃肿瘤切除手术中提供荧光引导。

亚甲蓝荧光成像还可应用于甲状旁腺和乳腺肿瘤的识别，但缺少相关的摄取分布机制的研究。

Antakia 等<sup>[52]</sup>利用亚甲蓝的近红外荧光影像成功识别了兔的甲状旁腺, 研究中发现与周边组织相比, 甲状旁腺对亚甲蓝的摄取更多, 但造成这一分布特点的相关因素并不清楚。临床研究中也报道了将亚甲蓝应用于近红外荧光成像识别甲状旁腺的可行性<sup>[53]</sup>, 并且静脉注射  $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的亚甲蓝就可以在术中灵敏识别甲状旁腺, 提升了使用安全性<sup>[48, 54]</sup>。乳腺癌手术中, 正常和恶性组织的区别通常不明显, 亚甲蓝的近红外荧光成像能够在手术中辅助切除恶性组织。Tummers 等<sup>[55]</sup>首次利用亚甲蓝在乳腺癌患者手术中进行近红外荧光成像, 结果发现 83% 患者可以确定肿瘤分界。

在排泄方面, 亚甲蓝主要经尿液和胆汁排出<sup>[48, 56-57]</sup>。因此亚甲蓝也可应用于输尿管荧光成像中。Verbeek 等<sup>[58]</sup>报道了接受下腹部手术的患者给予亚甲蓝后在近红外荧光下观察输尿管, 结果表明在不高于  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的不同剂量组中, 也能够清楚观察到输尿管, 提高了使用安全性。在胆管荧光成像中, 与吲哚菁绿相比, 应用亚甲蓝的研究较少。Matsui 等<sup>[59]</sup>的研究表明静脉注射吲哚菁绿和亚甲蓝都可以良好地识别胆管, 亚甲蓝在 10 ~ 120 min 可清楚识别胆管, 吲哚菁绿由于刚用药时大量进入到肝脏中, 在 90 ~ 240 min 才可见清晰的识别结果。但成像效果上, 吲哚菁绿的荧光背景干扰低, 对比度更高。

## 2.2 亚甲蓝的体内分析方法

目前亚甲蓝的检测分析方法包括光谱法、色谱法和液相色谱串联质谱法。Bélaz-David 等<sup>[60]</sup>利用 SPEC 对人全血、血浆和尿液中的亚甲蓝进行了检测, 采用离子对萃取法对样品进行处理, 最低可以检测到  $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。Borwitzky 等<sup>[61]</sup>采用毛细管电泳法对尿液中的亚甲蓝进行检测, 检测限为  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 周密妹等<sup>[62]</sup>建立了兔血浆中亚甲蓝的 HPLC-UV 检测方法, 但运行时间较长, 方法检测限高、提取步骤多、运行时间长, 限制了方法的大规模应用。液相色谱串联质谱法一定程度上改善了上述不足, 但这类方法报道较少。Kim 等<sup>[63]</sup>建立了血浆中亚甲蓝的 HPLC-MS/MS 检测方法, 简化了前处理过程, 采用蛋白沉淀法对血浆中亚甲蓝进行了检测, 定量限可以达到  $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。Mitrowska 等<sup>[64]</sup>和 Zhang 等<sup>[65]</sup>也建立了亚甲蓝的 UPLC-MS/MS 测定方法, 但方法是检测水产品或水样中的亚甲蓝, 而非在生物样本中的亚甲蓝。

## 3 5-氨基乙酰丙酸

5-氨基乙酰丙酸 (5-aminolevulinic acid, 5-ALA) 是一种内源性物质, 本身不能发出荧光。但在体内可以生成原卟啉 (protoporphyrin IX, PPIX), 最终转

化为血红素从体内代谢<sup>[66]</sup>。原卟啉可吸收 375 ~ 440 nm 的光, 其激发波长和发射波长分别位于 405 nm 和 635 nm, 其产生的荧光越来越多地应用到疾病的诊疗中, 由于组织穿透性弱, 5-氨基乙酰丙酸可用于皮肤相关的疾病中, 目前 FDA 批准 5-氨基乙酰丙酸应用于光化性角化病。

### 3.1 5-氨基乙酰丙酸药代动力学特点及临床应用

在体内, 原卟啉的荧光强度在皮肤上的变化与原卟啉的浓度变化相关。Rick 等<sup>[67]</sup>使用 HPLC 对口服  $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的受试者血浆中的 5-氨基乙酰丙酸和原卟啉进行了检测, 结果表明 5-氨基乙酰丙酸血药浓度达峰时间为 30 min, 8 h 后浓度低于检测限 ( $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 原卟啉的达峰时间为  $(6.7 \pm 0.8) \text{ h}$ , 35 h 后浓度低于峰浓度的 5% ( $35 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )。皮肤的荧光强度在 8 h 左右达到最大, 40 h 后低于基线, 这与原卟啉体内浓度变化趋势相同。

在组织分布的研究中, 5-氨基乙酰丙酸生成的原卟啉在体内可广泛分布。小鼠静脉注射  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  5-氨基乙酰丙酸后, 体内各组织均可见荧光, 其中肿瘤组织荧光强度最强<sup>[68]</sup>。这可能是由于原卟啉在肿瘤细胞中分解速度要慢于正常细胞, 在肿瘤细胞内积聚, 表现出荧光强度的差异<sup>[69]</sup>。此外, 原卟啉可以产生活性氧, 通过诱导细胞凋亡致肿瘤细胞死亡, 也因此应用于光动力疗法中<sup>[70]</sup>。

5-氨基乙酰丙酸在肿瘤中的荧光分布特性促进了学者对肿瘤的荧光成像的研究, 在恶性神经胶质瘤组织中, 肿瘤组织呈现红色荧光, 而正常脑组织不显示原卟啉荧光, 有较高的对比度, 在 89 例组织活检结果中, 荧光检测对恶性组织的敏感性为 85%, 而特异性达到了 100%<sup>[71]</sup>。Denzinger 等<sup>[72]</sup>研究表明, 使用 5-氨基乙酰丙酸进行荧光成像提升了膀胱肿瘤的检出率。Popken 等<sup>[73]</sup>在膀胱癌患者中膀胱内予以 5-氨基乙酰丙酸后进行了药代动力学研究, 通过 HPLC 检测了患者血浆和尿液中的 5-氨基乙酰丙酸和原卟啉的浓度, 在给药后 0.7 h 左右 5-氨基乙酰丙酸达到峰浓度, 所有患者肿瘤组织中都可以观察到明显的荧光, 表明该种给药方式下, 5-氨基乙酰丙酸可以很好地穿过紧密的膀胱上皮组织, 有效发挥荧光指示作用。对患者血浆中原卟啉的浓度进行检测, 发现给药后峰浓度约为  $14 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 而在正常生理状态下, 血浆中原卟啉的浓度在 0 ~  $15 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  内, 这在一定程度上表明了局部给予 5-氨基乙酰丙酸进行荧光成像的安全性。除了以上研究, 也有研究报道了 5-氨基乙酰丙酸应用于胃癌的检测中<sup>[74]</sup>, 但缺少详细的药代动力学研究。

### 3.2 5-氨基乙酰丙酸的体内分析方法



5-氨基乙酰丙酸的检测分析方法包括 SPEC 法、HPLC 法和 UPLC-MS/MS 法。使用 SPEC 法检测需要先使用离子交换色谱进行分离,但不能完全排除干扰物质。Miyajima 等<sup>[75]</sup>利用 HPLC 建立了人血浆中 5-氨基乙酰丙酸的分析方法,对 5-氨基乙酰丙酸进行了衍生化的处理,检测范围在 0.01 ~ 0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,提升了方法的特异性与灵敏度; Alsarra 等<sup>[76]</sup>建立了不需要衍生化的 5-氨基乙酰丙酸的 UPLC-MS/MS 分析方法,进一步简化了分析处理方法。

#### 4 讨论与展望

近红外荧光成像作为一种高灵敏度、高分辨率和快速便捷的技术,在临床研究中优势突出,但这项技术仍在探索与更新中。本文总结了目前临床上荧光成像可使用的三种药物的临床应用情况及相关的药代动力学特征,重点叙述了 FDA 唯一批准的荧光造影剂吲哚菁绿。

目前吲哚菁绿和亚甲蓝在临床近红外荧光成像研究中应用广泛,也在外科手术荧光引导中取得了较好的效果,但还需要制订更详细规范药物使用方案。另外,现在使用的三种荧光造影剂存在靶向性弱,可能造成假阳性的缺陷,吲哚菁绿还有稳定性差的问题。新型递送方式,如纳米制剂、细胞外囊泡等递送方式的开发将有助于解决上述问题<sup>[31, 77]</sup>。此外,将吲哚菁绿与一些药物连接后获得新化合物<sup>[78]</sup>,对吲哚菁绿的浓度分析检测在一定程度上可以反映药物体内暴露与疗效的关系。结合近红外荧光成像技术,未来可能为临床上越来越多的药物提供快捷有效的治疗药物监测手段。

在荧光成像中,目前还存在着受限于荧光穿透深度的问题。与 NIR- I 荧光影像相比, NIR- II 荧光影像表现出分辨率、信噪比和穿透深度方面的提升。因此,对于可用于 NIR- II 的荧光造影剂的开发是今后研究的重点。一方面探究已有的可在 NIR- II 成像的吲哚菁绿和亚甲蓝的荧光成像效果。在这些研究当中,吲哚菁绿在 NIR- II 的胆管影像中展现出了优于 NIR- I 荧光成像的效果,提供了更多的组织结构信息<sup>[79]</sup>;亚甲蓝也有研究表明在泌尿系统 NIR- II 的荧光影像中展现出分辨率和信噪比的提升<sup>[80]</sup>;另一方面开发新的 NIR- II 荧光造影剂,如花菁类染料、供体-给体-供体(D-A-D)小分子和共轭聚合物。荧光亮度高、组织穿透力强、背景干扰低和安全性好的化合物将是较为理想的荧光造影剂,对此类新化合物的使用方法、分布、代谢及排泄过程及毒性的研究将影响到其临床应用。

#### 参考文献

[1] 邱建文, 刘梦, 熊新怡, 等. 高亮度近红外荧光染料研究进展[J]. 有机化学, 2023, 43 (11): 3745-3760.

[2] 刘嘉慧, 杨燕青, 马睿, 等. 有机近红外二区荧光探针研究进展[J]. 中国激光, 2023, 50 (21): 9-35.

[3] Fox IJ. A tricarbocyanine dye for continuous recording of dilution curves in whole blood independent of variations in blood oxygen saturation[J]. Proc Mayo Clin, 1957, 32: 478-484.

[4] Wheeler HO, Cranston WI, Meltzer JI. Hepatic uptake and biliary excretion of indocyanine green in the dog[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1958, 99 (1): 11-14.

[5] Kimura T, Nakayama S, Yamao T, et al. Pharmacokinetics of indocyanine green in rats with experimentally induced hepatic diseases[J]. Biol Pharm Bull, 1993, 16 (11): 1140-1145.

[6] Tsao SC, Sawada Y, Iga T, et al. Effect of chlorpromazine on hepatic transport of indocyanine green in rats[J]. Biochem Pharmacol, 1983, 32 (6): 1105-1112.

[7] Joo EH, Lee YB. No effect of diltiazem on the hepatic clearance of indocyanine green in the rats[J]. Arch Pharm Res, 1998, 21: 411-417.

[8] Soons PA, Kroon JM, Breimer DD. Effects of single-dose and short-term oral nifedipine on indocyanine green clearance as assessed by spectrophotometry and high-performance liquid chromatography[J]. J Clin Pharmacol, 1990, 30 (8): 693-698.

[9] Mandell MS, Wachs M, Niemann CU, et al. Elimination of indocyanine green in the perioperative evaluation of donor liver function[J]. Anesth Analg, 2002, 95 (5): 1182-1184.

[10] Luerken L, Dollinger M, Goetz A, et al. Diagnostic accuracy of indocyanine green clearance test for different stages of liver fibrosis and cirrhosis[J]. Diagnostics, 2023, 13 (16): 2663.

[11] Destro M, Puliafito CA. Indocyanine green video angiography of choroidal neovascularization[J]. Ophthalmology, 1989, 96 (6): 846-853.

[12] Yannuzzi LA. Indocyanine green angiography: a perspective on use in the clinical setting[J]. Am J Ophthalmol, 2011, 151 (5): 745-751.

[13] Reinhart MB, Huntington CR, Blair LJ, et al. Indocyanine green: historical context, current applications, and future considerations[J]. Surg Innov, 2016, 23 (2): 166-175.

[14] Nowak K, Karampinis I, Gerken ALH. Application of fluorescent dyes in visceral surgery: state of the art and future perspectives[J]. Visc Med, 2020, 36 (2): 80-87.

[15] Majlesara A, Golriz M, Hafezi M, et al. Indocyanine green fluorescence imaging in hepatobiliary surgery[J]. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2017, 17: 208-215.

[16] 叶京明, 郭宝良, 张建国, 等. 中国早期乳腺癌前哨淋巴结活检手术临床实践指南(2022版)[J]. 中国实用外科杂志, 2022, 42 (2): 137-145.

[17] Jinno H, Inokuchi M, Ito T, et al. The Japanese Breast Cancer Society clinical practice guideline for surgical treatment of breast cancer, 2015 edition[J]. Breast Cancer, 2016, 23: 367-377.

[18] Akrida I, Michalopoulos NV, Lagadinou M, et al. An updated review on the emerging role of indocyanine green (ICG) as a sentinel lymph node tracer in breast cancer[J]. Cancers, 2023, 15 (24): 5755.

[19] Landsman ML, Kwant G, Mook GA, et al. Light-absorbing properties, stability, and spectral stabilization of indocyanine green[J]. J Appl Physiol, 1976, 40 (4): 575-583.



- [20] Grasela DM, Rocci ML, Vlasses PH. Experimental impact of assay-dependent differences in plasma indocyanine green concentration determinations [J]. *J Pharmacokinetic Biopharm*, 1987, 15: 601-613.
- [21] Akita H, Sasaki Y, Yamada T, et al. Real-time intraoperative assessment of residual liver functional reserve using pulse dye densitometry [J]. *World J Surg*, 2008, 32: 2668-2674.
- [22] Okochi O, Kaneko T, Sugimoto H, et al. ICG pulse spectrophotometry for perioperative liver function in hepatectomy [J]. *J Surg Res*, 2002, 103 (1): 109-113.
- [23] Imai T, Takahashi K, Goto F, et al. Measurement of blood concentration of indocyanine green by pulse dye densitometry-comparison with the conventional spectrophotometric method [J]. *J Clin Monit Comput*, 1998, 14: 477-484.
- [24] Ott P. Hepatic elimination of indocyanine green with special reference to distribution kinetics and the influence of plasma protein binding [J]. *Pharmacol Toxicol*, 1998, 83: 1-48.
- [25] Chen CY, Fancher RM, Ruan Q, et al. A liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the quantification of indocyanine green in dog plasma and bile [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 47 (2): 351-359.
- [26] Rappaport PL, Thiessen JJ. High-pressure liquid chromatographic analysis of indocyanine green [J]. *Daru*, 1982, 71 (2): 157-161.
- [27] Heintz R, Svensson CK, Stoeckel K, et al. Indocyanine green: pharmacokinetics in the rabbit and relevant studies of its stability and purity [J]. *Daru*, 1986, 75 (4): 398-402.
- [28] Dorr MB, Pollack GM. Specific assay for the quantitation of indocyanine green in rat plasma using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *Daru*, 1989, 78 (4): 328-333.
- [29] Chen Y, Chen DX, Hu WH, et al. Pharmacokinetic study of indocyanine green after intravenous administration by UPLC-MS/MS [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8 (9): 15482-15489.
- [30] Sottani C, Grignani E, Cottica D, et al. Development and validation of a bioanalytical UHPLC-MS/MS method applied to murine liver tissue for the determination of indocyanine green loaded in h-ferritin nanoparticles [J]. *Front Chem*, 2022, 9: 784123.
- [31] Sevieri M, Sottani C, Chesi A, et al. Deciphering the role of H-ferritin nanocages in improving tumor-targeted delivery of indocyanine green: combined analysis of murine tissue homogenates with UHPLC-MS/MS and fluorescence [J]. *ACS Omega*, 2023, 8: 48735-48741.
- [32] Nigam SK. What do drug transporters really do? [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14 (1): 29-44.
- [33] Meier PJ, Eckhardt U, Schroeder A, et al. Substrate specificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake systems in rat and human liver [J]. *Hepatology*, 1997, 26 (6): 1667-1677.
- [34] de Graaf W, Häusler S, Heger M, et al. Transporters involved in the hepatic uptake of <sup>99m</sup>Tc-mebrofenin and indocyanine green [J]. *J Hepatol*, 2011, 54 (4): 738-745.
- [35] Jansen PL, Van Klinken JW, van Gelder M, et al. Preserved organic anion transport in mutant TR-rats with a hepatobiliary secretion defect [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 1993, 265 (3): G445-G452.
- [36] Montgomery PR, Sitar DS. Hepatic uptake of indocyanine green and perfusion rate in rats: effect of age and albumin concentration [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 1988, 66 (5): 592-595.
- [37] Sathirakul K, Suzuki H, Yasuda K, et al. Kinetic analysis of hepatobiliary transport of organic anions in Eisai hyperbilirubinemic mutant rats [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1993, 265 (3): 1301-1312.
- [38] Huang L, Vore M. Multidrug resistance p-glycoprotein 2 is essential for the biliary excretion of indocyanine green [J]. *Drug Metab Dispos*, 2001, 29 (5): 634-637.
- [39] Portnoy E, Gurina M, Magdassi S, et al. Evaluation of the near infrared compound indocyanine green as a probe substrate of P-glycoprotein [J]. *Mol Pharm*, 2012, 9 (12): 3595-3601.
- [40] Bishara A, Meir M, Portnoy E, et al. Near infrared imaging of indocyanine green distribution in pregnant mice and effects of concomitant medications [J]. *Mol Pharm*, 2015, 12 (9): 3351-3357.
- [41] Ishizawa T, Masuda K, Urano Y, et al. Mechanistic background and clinical applications of indocyanine green fluorescence imaging of hepatocellular carcinoma [J]. *Ann Surg Oncol*, 2014, 21: 440-448.
- [42] Shibasaki Y, Sakaguchi T, Hiraide T, et al. Expression of indocyanine green-related transporters in hepatocellular carcinoma [J]. *J Surg Res*, 2015, 193 (2): 567-576.
- [43] Wynne HA, Goudevenos J, Rawlins MD, et al. Hepatic drug clearance: the effect of age using indocyanine green as a model compound [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1990, 30 (4): 634-637.
- [44] Murry DJ, Crom WR, Reddick WE, et al. Liver volume as a determinant of drug clearance in children and adolescents [J]. *Drug Metab Dispos*, 1995, 23 (10): 1110-1116.
- [45] Lund M, Kang L, Tygstrup N, et al. Effects of LPS on transport of indocyanine green and alanine uptake in perfused rat liver [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 1999, 277 (1): G91-G100.
- [46] Geier A, Kim SK, Gerloff T, et al. Hepatobiliary organic anion transporters are differentially regulated in acute toxic liver injury induced by carbon tetrachloride [J]. *J Hepatol*, 2002, 37 (2): 198-205.
- [47] Geier A, Dietrich CG, Voigt S, et al. Effects of proinflammatory cytokines on rat organic anion transporters during toxic liver injury and cholestasis [J]. *Hepatology*, 2003, 38 (2): 345-354.
- [48] Bužga M, Machytka E, Dvořáčková E, et al. Methylene blue: a controversial diagnostic acid and medication? [J]. *Toxicol Res*, 2022, 11 (5): 711-717.
- [49] Selvam S, Sarkar I. Bile salt induced solubilization of methylene blue: study on methylene blue fluorescence properties and molecular mechanics calculation [J]. *J Pharm Anal*, 2017, 7 (1): 71-75.
- [50] Peter C, Hongwan D, Küpfer A, et al. Pharmacokinetics and organ distribution of intravenous and oral methylene blue [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2000, 56: 247-250.
- [51] Wang ZD, Mei L, Yang X, et al. Near-infrared fluorophores methylene blue for targeted imaging of the stomach in intraoperative navigation [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2023, 11:

- 1172073.
- [52] Antakia R, Gayet P, Guillermet S, et al. Near infrared fluorescence imaging of rabbit thyroid and parathyroid glands [J]. *J Surg Res*, 2014, 192 (2): 480-486.
- [53] Tummers QRJG, Schepers A, Hamming JF, et al. Intraoperative guidance in parathyroid surgery using near-infrared fluorescence imaging and low-dose methylene blue [J]. *Surgery*, 2015, 158 (5): 1323-1330.
- [54] Hillary SL, Guillermet S, Brown NJ, et al. Use of methylene blue and near-infrared fluorescence in thyroid and parathyroid surgery [J]. *Langenbecks Arch Surg*, 2018, 403: 111-118.
- [55] Tummers QRJG, Verbeek FPR, Schaafsma BE, et al. Real-time intraoperative detection of breast cancer using near-infrared fluorescence imaging and methylene blue [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2014, 40 (7): 850-858.
- [56] Pruthi S, Haakenson C, Brost BC, et al. Pharmacokinetics of methylene blue dye for lymphatic mapping in breast cancer—implications for use in pregnancy [J]. *Am J Surg*, 2011, 201 (1): 70-75.
- [57] Link EM, Costa DC, Lui D, et al. Targeting disseminated melanoma with radiolabelled methylene blue: comparative bio-distribution studies in man and animals [J]. *Acta Oncol*, 1996, 35 (3): 331-341.
- [58] Verbeek FPR, van der Vorst JR, Schaafsma BE, et al. Intraoperative near infrared fluorescence guided identification of the ureters using low dose methylene blue; a first in human experience [J]. *J Urol*, 2013, 190 (2): 574-579.
- [59] Matsui A, Tanaka E, Choi HS, et al. Real-time intra-operative near-infrared fluorescence identification of the extrahepatic bile ducts using clinically available contrast agents [J]. *Surgery*, 2010, 148 (1): 87-95.
- [60] B elaz-David N, Decosterd LA, Appenzeller M, et al. Spectrophotometric determination of methylene blue in biological fluids after ion-pair extraction and evidence of its adsorption on plastic polymers [J]. *Eur J Pharm Sci*, 1997, 5 (6): 335-345.
- [61] Borwitzky H, Haefeli WE, Burhenne J. Analysis of methylene blue in human urine by capillary electrophoresis [J]. *J Chromatogr B*, 2005, 826: 244-251.
- [62] 周密妹, 李性天, 耿立坚, 等. HPLC 法测定兔血浆中利多卡因和亚甲蓝浓度 [J]. *药物分析杂志*, 2007, 27 (9): 1374-1377.
- [63] Kim SJ, Ha DJ, Koo TS. Simultaneous quantification of methylene blue and its major metabolite, azure B, in plasma by LC-MS/MS and its application for a pharmacokinetic study [J]. *Biomed Chromatogr*, 2014, 28 (4): 518-524.
- [64] Mitrowska K, Kijewska L, Giannetti L, et al. A simple and sensitive method for the determination of methylene blue and its analogues in fish muscle using UPLC-MS/MS [J]. *Food Addit Contam Part A*, 2023, 40 (5): 641-654.
- [65] Zhang X, Hui YH, Fang CL, et al. Determination of methylene blue and its metabolite residues in aquatic products by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Molecules*, 2021, 26 (16): 4975.
- [66] Fotinos N, Campo MA, Popowycz F, et al. 5-aminolevulinic acid derivatives in photomedicine: characteristics, application and perspectives [J]. *Photochem Photobiol*, 2006, 82 (4): 994-1015.
- [67] Rick K, Sroka R, Stepp H, et al. Pharmacokinetics of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in skin and blood [J]. *J Photochem Photobiol B*, 1997, 40 (3): 313-319.
- [68] Sroka R, Beyer W, Gossner L, et al. Pharmacokinetics of 5-aminolevulinic-acid-induced porphyrins in tumour-bearing mice [J]. *J Photochem Photobiol B*, 1996, 34 (1): 13-19.
- [69] 赵转霞, 屠璐, 刘哲鹏. 5-氨基-3-乙酰丙酸光动力疗法在肿瘤诊断和治疗中的应用进展 [J]. *药学服务与研究*, 2014, 14 (3): 188-191.
- [70] Bhanja D, Wilding H, Baroz A, et al. Photodynamic therapy for glioblastoma: illuminating the path toward clinical applicability [J]. *Cancers*, 2023, 15 (13): 3427.
- [71] Stummer W, Stocker S, Wagner S, et al. Intraoperative detection of malignant gliomas by 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence [J]. *Neurosurgery*, 1998, 42 (3): 518-526.
- [72] Denzinger S, Burger M, Walter B, et al. Clinically relevant reduction in risk of recurrence of superficial bladder cancer using 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence diagnosis: 8-year results of prospective randomized study [J]. *Urology*, 2007, 69 (4): 675-679.
- [73] Popken G, Schultze-Seemann W, Seiler KU, et al. Intravesical administration of 5-aminolevulinic acid (5-ALA) safety and pharmacokinetics of 5-ALA and its metabolite protoporphyrin IX: safety and pharmacokinetics of 5-ALA and its metabolite protoporphyrin IX [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2000, 56: 241-246.
- [74] Namikawa T, Yatabe T, Inoue K, et al. Clinical applications of 5-aminolevulinic acid-mediated fluorescence for gastric cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21 (29): 8769-8775.
- [75] Miyajima K, Hirata M, Yoshida T, et al. Study on measurement of  $\delta$ -aminolevulinic acid in plasma by high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr B*, 1994, 654 (2): 165-169.
- [76] Alsarra IA, Yassin A EB, Alanazi FK, et al. Direct UPLC-MS-MS validated method for the quantification of 5-aminolevulinic acid: application to in-vitro assessment of colonic-targeted oral tablets [J]. *J Chromatogr Sci*, 2011, 49 (6): 428-433.
- [77] Villa A, Garofalo M, Crescenti D, et al. Transplantation of autologous extracellular vesicles for cancer-specific targeting [J]. *Theranostics*, 2021, 11 (5): 2034.
- [78] Chen HH, Lu IL, Liu TI, et al. Indocyanine green/doxorubicin-encapsulated functionalized nanoparticles for effective combination therapy against human MDR breast cancer [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019, 177: 294-305.
- [79] Wu D, Xue DW, Zhou J, et al. Extrahepatic cholangiography in near-infrared II window with the clinically approved fluorescence agent indocyanine green: a promising imaging technology for intraoperative diagnosis [J]. *Theranostics*, 2020, 10 (8): 3636-3651.
- [80] Xue DW, Wu D, Lu ZY, et al. Structural and functional NIR-II fluorescence bioimaging in urinary system via clinically approved dye methylene blue [J]. *Engineering*, 2023, 22: 149-158.

(收稿日期: 2024-01-23; 修回日期: 2024-04-09)

## 中医药原创思维与临床疗效提升研究专题

### 【编者按】

“十四五”中医药发展规划指出，中医药高质量发展应坚持中医药原创思维，深入挖掘中医药精华，并积累转化为临床优势。基于此，本团队从敦煌遗书《辅行诀》中收录的“汤液经法图”入手，尝试还原 3600 年前中医组方配伍的真正原理，解析传统中医理论识药用药的真实思路，为提高中医临床疗效提供切实可行的参考资料。本次专题从医理、医方、中药、炮制和临床角度，运用“汤液经法图”解决了中医中药领域若干关键问题，例如揭示了毒性中药炮制辅料选择的奥秘、诠释了半夏泻心汤的组方配伍原理、优化了脏腑辨证体系、厘清了常用中药大黄的药性属性、丰富了运气学派司天方的选药逻辑，并且汇报了“汤液经法图”用于临床药师会诊的实践案例，为广大中医药学者理解、运用“汤液经法图”奠定基础。

### 【主持人简介】



金锐，男，中药学博士，副主任中药师，科普自媒体人。具有中西药学联合培养教育背景，主要从事医院药学和中医药科普科研。率先开展中药处方用药合理性评价的药学标准研究及“汤液经法图”研究，主笔中药合理使用相关专家共识 4 个，主持首都卫生发展科研专项 1 项、中国中医科学院科技创新工程重大攻关项目 1 项，主编学术专著 5 部，发表学术论文 60 余篇。担任中国科协、中国非处方药协会科普专家，北京药学会《药物与人》专栏主持，央视十台“健康之路”特邀嘉宾，“小金药师说药事”公众号主创，主编科普专著 3 部，发表科普文章 700 余篇，科普书《小病药治》获全国百部优秀科普作品奖。

## 《辅行诀》与《脏腑标本虚实寒热用药式》中肝木疾病 临床表现及治疗用药的异同点分析

齐明月<sup>1</sup>，吕旭潇<sup>1</sup>，金锐<sup>2\*</sup> (1. 山东中医药大学附属医院，济南 250014；2. 中国中医科学院西苑医院，北京 100091)

**摘要：**目的 《辅行诀》与《脏腑标本虚实寒热用药式》均采用五脏虚实辨证作为理论架构，本文比较两者关于肝木疾病辨证用药的异同点，为“汤液经法图”的现代应用和理论融入提供依据。**方法** 收集《辅行诀》与《脏腑标本虚实寒热用药式》关于肝木疾病辨证论治章节的临床症状表现和治疗药物信息，数据标准化后拆分成独立的语义概念进行比较，计算相符度。最终拆分成 24 个独立症状与《辅行诀》比较并计算相符度，用药药味依据“汤液经法图”五味补泻五脏规律进行定味和标记，并计算与补肝泻肝缓肝的“辛酸甘”味相符度。**结果** 《脏腑标本虚实寒热用药式》肝木疾病包含 24 个症状，其中 17 个症状与《辅行诀》相符，相符度为 70.8%，共有症状包括头痛、多怒、两胁肿痛等，《脏腑标本虚实寒热用药式》独有症状如卵缩、寒热虐等。同时，《脏腑标本虚实寒热用药式》包含 76 个肝木病治疗中药，其中辛味、酸味和甘味药总和占比为 71.05%。**结论** 《脏腑标本虚实寒热用药式》与《辅行诀》关于肝木疾病临床症状和治疗药物的认识有许多相同之处，相似度高达 70%，两者可能具有相同的起源。五脏虚实+五味补泻辨证论治体系具有真实历史背景和临床实践价值。

**关键词：**汤液经法图；脏腑标本虚实寒热用药式；辅行诀；肝木疾病；辨证论治

**中图分类号：**R283

**文献标识码：**A

**文章编号：**1672-2981(2024)08-2084-06

**doi:**10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.019

**基金项目：**中国中医科学院科技创新工程重大攻关项目 (No. CI2021A03805, No. CI2021A00101)；中国中医科学院西苑医院能力提升项目 (No. XYZX0202-07)。

**作者简介：**齐明月，女，主管中药师，主要从事中药临床药学研究，email: LA9127645@163.com \***通信作者：**金锐，男，副主任药师，主要从事中医药基本理论与中药临床药学研究，email: jinrui9862@126.com



## Clinical manifestations and therapeutic use of Chinese medicine for liver diseases in *Fuxingjue* and *Medication Patterns for Treating Deficiency-excess and Cold-heat of Five Viscera*

QI Ming-yue<sup>1</sup>, LYU Xu-xiao<sup>1</sup>, JIN Rui<sup>2\*</sup> (1. *Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014*; 2. *Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091*)

**Abstract: Objective** To compare the similarities and differences between the two books on the syndrome differentiation of liver diseases to provide the basis for the modern application and theoretical integration of “Tang-ye-jing-fa map”, while both *Fuxingjue* and *Medication Patterns for Deficiency-excess and Cold-heat of Five Viscera* use syndrome differentiation of deficiency and excess of five viscera as the theoretical framework. **Methods** The clinical symptoms and medication information of the chapters on syndrome differentiation and treatment of liver diseases in *Fuxingjue* and *Medication Patterns for Deficiency-excess and Cold-heat of Five Viscera* were collected. After the data standardization, the symptoms were divided into independent semantic concepts for comparison and calculation of the coincidence. The flavors of medication herbs were determined and labeled according to the principle of tonifying and purging characteristics of five flavor in “Tang-ye-jing-fa map”, and the coincidence degree was calculated. **Results** *Medication Patterns for Deficiency-excess and Cold-heat of Five Viscera* included 24 symptoms of liver diseases, 17 of which were also recorded in *Fuxingjue*, with a coincidence of 70.8%. The common symptoms included headache, irritability, swelling and pain in both flanks, etc. The unique symptoms of *Medication Patterns for Deficiency-excess and Cold-heat of Five Viscera* included testicular atrophy, alternate cold and heat, etc. This book also described 76 Chinese herbs for liver diseases. Those with pungent, sour and sweet flavors accounted for 71.05% out of the 76 herbs. **Conclusion** There are many similarities in the clinical symptoms and therapeutic herbs of liver diseases in both *Medication Patterns for Deficiency-excess and Cold-heat of Five Viscera* and *Fuxingjue*, with similarity over 70%. The two books might share the same origin. Syndrome differentiation and treatment of deficiency and excess of five viscera and tonifying and purging of five flavors, may have real historical background and clinical value.

**Key words:** Tang-ye-jing-fa map; *Medication Patterns for Deficiency-excess and Cold-heat of Five Viscera*; *Fuxingjue*; liver disease; syndrome differentiation and treatment

《脏腑标本虚实寒热用药式》(简称《脏腑用药式》)为金代中医易水学派创始人张元素的代表作之一,全书共十二篇章,分别介绍了十二个脏腑的生理功能、标本常见症状以及其虚实寒热、温清补泻的常用药物<sup>[1]</sup>。该书对肝木疾病的诊断和用药进行了归类。《辅行诀五脏用药法要》(简称《辅行诀》)为梁代名医陶弘景所著的道家医籍,其收录了一幅“汤液经法图”,该图以五脏虚实认识疾病的病性和病位,描述了在八纲辨证和脏腑辨证框架下,辛、咸、甘、酸、苦五味对脏腑虚实症状的补泻作用,构建了一个完整严谨且符合逻辑的“病性-病位-药性-配伍”临床诊疗规律,见图 1<sup>[2]</sup>。从内容上看,两书均从五脏虚实辨证角度进行疾病的认识和治疗,理论架构十分相似。因

此,本研究选择肝木疾病为切入点,尝试对比两书在肝木疾病诊断和用药方面的异同点,为“汤液经法图”的现代应用和理论融入提供依据,为《辅行诀》和《脏腑用药式》的学术研究提供新思考。

### 1 资料与方法

#### 1.1 资料来源

本研究以张大昌和钱超尘主编的《<辅行诀五脏用药法要>传承集》中“1965 年范志良抄本”为底本,选取“辨肝脏病证文并方”章节;《脏腑标本虚实寒热用药式》以中医古籍出版社 1994 年版为研究底本,选取“肝部”章节。对于研究涉及中药的药味标记,以课题组前期关于中药五行属性和主导药味的研究成果为中药药味确定的参考<sup>[3-4]</sup>。上述资料不收录的中药,参考《中国药典》或《中

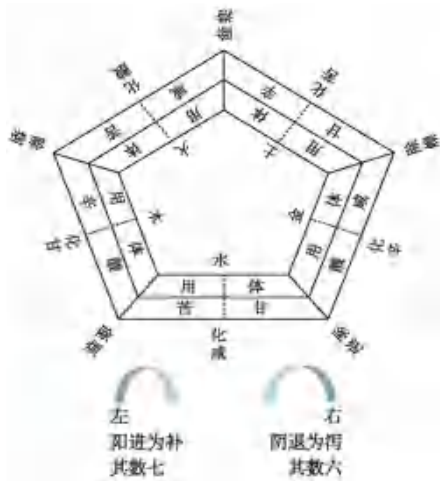


图 1 汤液经法图

Fig 1 Tang-ye-jing-fa map

《中华本草》中记载的“功效主治”，按照“汤液经法图”五味补泻五脏的规律进行药味的确定和标记<sup>[5-7]</sup>。

## 1.2 方法

### 1.2.1 《脏腑用药式》肝木疾病症状体征拆分方法

以《脏腑用药式》中对肝木疾病的记载“本病：诸风眩运，僵仆强直惊痫，两胁肿痛，胸胁满痛，呕血，小腹疝痛，症瘕，女人经病。标病：寒热虐，头痛吐涎，目赤面青多怒，耳闭颊肿，筋挛卵缩，丈夫癩疝；女人少腹肿痛阴病”为主<sup>[1]</sup>，从语义概念角度<sup>[8-9]</sup>，对研究资料中出现的症状名和体征名进行规范，对联合表述进行拆分。例如，《脏腑用药式》中“目赤面青多怒”拆分成“目赤”“面青”“多怒”3个症状与《辅行诀》进行对比分析；“头痛吐涎”拆分成“头痛”“吐涎”两个症状。

### 1.2.2 药物名称规范与五味归类方法

首先，以《中药学》为标准，将肝木疾病用药涉及的中药名称进行规范校正，如将“芎藭”规范为“川芎”，将“菝葜”规范为“菝葜”，将“真珠”规范为“珍珠”等<sup>[10]</sup>。然后从“汤液经法图”五味补泻五脏角度下，逐一列出所涉及中药的五行属性和主导药味。“汤液经法图”所用中药的药味为其五行属性的延伸，部分中药的药味与《中国药典》记载不同，例如麦冬在2020年版《中国药典》中性味记载为“甘、微苦，微寒”，但在《辅行诀》的二十五味药精记载中，五行属性是“金中金”，是一个以酸味为主导药味的中药，因此在药物五味归类时中药的药味应当予以调整<sup>[11]</sup>，例如川芎在《汤液经法图讲记2》中五行属性为木中火，主导药味为辛咸<sup>[3, 10]</sup>。《脏腑用药式》肝木疾病用药在《汤液经法图讲记2》和《医方图解》中未规定中药药味时，可参考《中国药典》或《中华本草》

中记载的功效主治，按照“汤液经法图”五味补泻五脏的规律进行药味的确定和标记，例如“菝葜”在《汤液经法图讲记2》和《医方图解》中未规定药味，参考《中国药典》中记载的功效主治（行气破血，消积止痛；用于癥瘕痞块，瘀血经闭，胸痹心痛，食胀腹痛），辛味补肝可以行气止痛治疗胸痹心痛、食积腹胀，咸味补心可以破血、软坚散结治疗癥瘕痞块和瘀血经闭，因此可以将“菝葜”的主导药味定为“辛咸”<sup>[5, 7]</sup>。

### 1.2.3 《辅行诀》与《脏腑用药式》研究方法的对比

《辅行诀》选用的研究内容为“辨肝脏病证文并方”中“肝病者，必两胁下痛……适其性而衰之也；小泻肝汤：治肝实，两胁下痛，痛引少腹迫急，时干呕者方；大泻肝汤：治头痛，目赤，多恚怒，胁下支满而痛，痛连少腹迫急无奈者方；小补肝汤：治心中恐疑，时多恶梦，气上冲心，越汗出，头目眩晕者方；大补肝汤：治肝气虚，其人恐惧不安，气自少腹上冲咽，呃声不止，头目苦眩，不能坐起，汗出心悸，干呕不能食，脉细而结者方<sup>[2]</sup>。”然后，与《脏腑用药式》从疾病症状体征和疾病治疗用药两个维度进行相似度分析，计算相似度百分比，列出异同的内容并探讨可能的原因。

## 2 结果

### 2.1 症状和体征表述的规范

《脏腑用药式》肝木疾病中“强直”指颈项、肢体僵硬，不能活动自如者；“惊”指心神不定，惊惕慌乱；“痫”是一种发作性神志异常的疾病，因此将“强直惊痫”拆分成“强直”“惊”“痫”三组症状。“头痛”指头部疼痛；“吐涎”指口中涎沫量多，时时吐出，因此将“头痛吐涎”拆分为“头痛”“吐涎”两组症状。“目赤”指眼睛发红；“面青”是色诊之一，指面色发青，多主惊、主风、主寒、主痛；“多怒”指易激惹，善忿怒之症，因此将“目赤面青多怒”拆分成“目赤”“面青”“多怒”三组症状。“耳闭”以耳内胀闷堵塞感，耳鸣、耳聋，鼓膜内陷、混浊为主要表现的疾病；“颊肿”指脸的两旁部位肿胀，因此将“耳闭颊肿”拆分为“耳闭”“颊肿”两组症状。“筋挛”指肢体筋脉收缩抽急，不能舒转自如；“卵缩”指睾丸上缩之症状，因此将“筋挛卵缩”拆分为“筋挛”“卵缩”两组症状。“少腹肿痛”指小腹部位，包括肚脐与骨盆之间的腹部胀痛；“阴病”在中医范畴里没有明确的概念，据张元素另一代表著作《医学启源》云“肝所生病者，遗尿、闭癯”，“阴病”可能为遗尿、闭、癯之证<sup>[12]</sup>，因此将“女人少腹肿痛阴病”拆分为“女人少腹肿痛”“阴病”两组症状。

《脏腑用药式》所有症状拆分结果见表 1。

表 1 《脏腑用药式》肝木疾病症状拆分结果

Tab 1 Dividing results of symptoms of liver diseases in Medication Patterns for Deficiency-excess and Cold-heat of Five Viscera

症状描述	拆分结果
僵仆强直惊痫	“僵仆”“强直”“惊”“痫”
头痛吐涎	“头痛”“吐涎”
目赤面青多怒	“目赤”“面青”“多怒”
耳闭颊肿	“耳闭”“颊肿”
筋挛卵缩	“筋挛”“卵缩”
女人少腹肿痛阴病	“女人少腹肿痛”“阴病”

## 2.2 中药药名规范结果

《脏腑用药式》肝木疾病“泻木”治法中用到了“芍药”，据张元素《医学启源·五脏补泻法》载“肝……实则白芍药泻之。”因此，此处的芍药应为白芍<sup>[12]</sup>。“泻火”治法中用到了“苦茶”，《汤液本草》载“茗，苦茶，腊茶是也……茶苦”，又据《中药大辞典》记载“茶叶又名苦茶、茗”<sup>[13-14]</sup>。《中国药典》里既没有“苦茶”，也没有“茶叶”的记载，但部分地方中药饮片炮制规范或中药材标准中有“茶叶”的收录，如安徽省中药饮片炮制规范（2019 年版）、浙江省中药炮制规范（2015 年版）、山东省中药材标准（2012 年版）等，因此将“苦茶”规范为“茶叶”。综上，共规范 10 个《脏腑用药式》的中药药名，见表 2。

表 2 《脏腑用药式》部分肝木药物名称规范

Tab 2 Standard names of some medicines for liver diseases in Medication Patterns for Deficiency-excess and Cold-heat of Five Viscera

原书名称	标准化名称	原书名称	标准化名称
白花蛇	金钱白花蛇	牵牛	牵牛子
菝葜	菝葜	青橘皮	青皮
槐子	槐角	芍药	白芍
决明	决明子	芍药	川芍
苦茶	茶叶	真珠	珍珠

## 2.3 肝木疾病症状体征表现的相似度分析

将《脏腑用药式》肝木疾病拆分后的临床表现症状与《辅行诀》收录的内容进行对应，结果分为“完全相同”“近似相同”“完全不同”三组。症状文字描述、含义和病因病机与《辅行诀》中的症状基本一致，则归类为完全相同组；文字描述不一致但可用藏象学说或病机十九条解释且两者对应症状的病因病机相同则归类为近似相同组；其他在《辅行诀》中无对应的症状归类为完全不同组。例如“头痛”与《辅行诀》大泻肝汤证的“头痛”对应，因此归类为完全相同组。“僵仆”指筋肉僵硬突然直挺跌倒，“强直”指筋肉强硬不柔和，“痫”指筋肉痉挛抽

搐，《辅行诀》中“疝善瘕”指小腿易抽筋，藏象学说载“肝主筋”且病机十九条曰“诸风掉眩，皆属于肝；诸暴强直，皆属于风。”因此上述症状可归类为近似相同组。“呕血”“癥瘕”“卵缩”“寒热虐”“吐涎”“面青”“阴病”7 个症状在《辅行诀》中并无对应关系，因此归类为完全不同组。《脏腑用药式》肝木疾病临床表现共拆分为 24 个独立症状，其中完全相同组有 9 个、近似相同组 8 个、完全不同组 7 个，见表 3。《脏腑用药式》与《辅行诀》完全相同和近似相同的肝木疾病表现症状占比为 70.8%。

表 3 肝木疾病临床表现的对应关系

Tab 3 Correspondence of clinical manifestations of liver diseases

组别	《脏腑用药式》	《辅行诀》
完全相同	诸风眩运	头目眩运
	惊	肝虚则恐；心澹澹然如人将捕之；心中恐疑，时多恶梦；恐惧不安
	两胁肿痛	两胁中痛；两胁下痛；胁下支满而痛
	胸肋满痛	两胁中痛；两胁下痛；胁下支满而痛
	头痛	头痛
	目赤	目赤
	多怒	实则怒；多恚怒
	耳闭	耳聋
	颊肿	颊肿
	近似相同	僵仆
强直		疝善瘕（筋脉拘挛性疾病）
痫		疝善瘕（筋脉拘挛性疾病）
小腹痛痛		痛引少腹
女人经病（表现为少腹痛）		痛连少腹
筋挛		疝善瘕（筋脉拘挛性疾病）
完全不同	丈夫癩疝（表现为少腹痛）	痛引少腹
	女人少腹肿痛	痛连少腹
	呕血	—
	癥瘕	—
	寒热虐	—
	吐涎	—
	面青	—
	阴病	—
	卵缩	—

“呕血”指血随呕吐而出，血出有声。从《辅行诀》脏腑辨证论治体系看，脾胃不和，胃气上逆，故见呕；心主血，与血相关的症状在《辅行诀》内多与心火疾病相关，因此“呕血”应为脾土疾病合心火疾病的症状。“癥瘕”指腹腔内结聚成块的一类疾病。癥瘕积聚多因气滞血瘀、血闭导致，治疗时多采用破血通经之药，可见仍与血关系密切，应为心火疾病的症状。“寒热虐”即寒热



往来，指忽寒忽热，寒与热互相往来，一天可发作数次。往来寒热属少阳证，又因肝胆相表里，因此“寒热虐”确可归为肝木疾病的症状，但《辅行诀》中未见。“吐涎”指口中涎沫量多，时时吐出。脾在液为涎，因此“吐涎”应为脾土疾病的症状。“面青”是色诊之一，《素问·脉要精微论篇》提到病在肝则脉弦面青，因此“面青”确可归为肝木疾病的症状，但《辅行诀》中未见。“卵缩”指睾丸上缩之症状，男性生殖器官又叫宗筋，也与筋相关，肝主筋，因此“卵缩”确可归为肝木疾病的症状，但《辅行诀》中未见。“阴病”因在中医范畴内无明确概念含义，暂不讨论。

### 2.4 肝木疾病治疗用药的相似度分析

《辅行诀》记载“肝德在散，故经云：以辛补之，酸泻之；肝苦急，急食甘以缓之”，从“汤液经法图”角度，可知有 3 种药味入肝，分别为辛味补肝、酸味泻肝、甘味缓肝。《脏腑用药式》“搜风”治法里的“乌头”在《中国药典》里无记载，目前常用且收录在《中国药典》内的乌头类中药有附子、川乌、草乌，《本草衍义》和《本草图经》中明确记载了乌头与附子、天雄、乌喙、侧子的原植物为同种<sup>[15]</sup>，且以上中药在“汤液经法图”的角度下都属于“木中水”的五行属性，具有“辛苦”之味，因此这里保留“乌

头”原名进行研究。“大黄”在“行血”治法和“攻里”治法里各出现一次，“白芍”在“补血”治法和“泻木”治法里各出现一次，其他中药未见重复出现，共计 76 味中药，《汤液经法图讲记 2》与《医方图解》未收录的中药共 20 个，采用“汤液经法图”理论体系为这 20 个中药界定主导药味见表 4。统计可知，在这 76 个中药里，含辛味中药 36 个（包括单一辛味的中药和辛味兼有其他药味的复合药味中药，下同）、酸味中药 17 个、甘味中药 9 个、咸味药 29 个、苦味药 25 个，见图 2。《脏腑用药式》肝木疾病用药中含有“辛酸甘”味中药的占比为 71.0%。

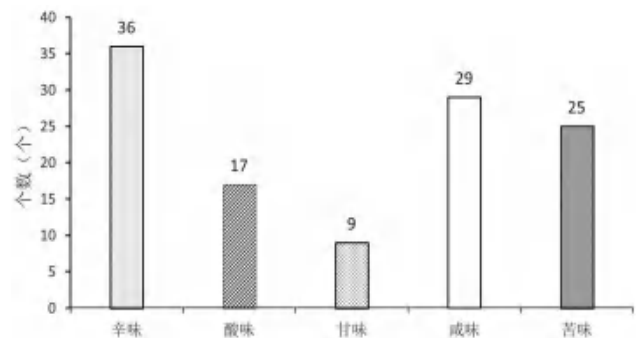


图 2 《脏腑用药式》肝木疾病中药的药味分布

Fig 2 Distribution of flavors of liver diseases in Medication Patterns for Deficiency-excess and Cold-heat of Five Viscera

表 4 《脏腑用药式》部分肝木药物主导药味调整总结

Tab 4 Modification summary of the principle medicinal flavors of some medicine for liver diseases in Medication Patterns for Deficiency-excess and Cold-heat of Five Viscera

中药	《中国药典》2020 年版药味记载	“汤液经法图”体系所示主导药味	中药	《中国药典》2020 年版药味记载	“汤液经法图”体系所示主导药味
蔓荆子	辛、苦	辛、酸	决明子	甘、苦、咸	酸、咸
谷精草	辛、甘	辛、酸	夜明砂	辛	酸、咸
铅丹	辛、咸	辛、酸	金钱白花蛇	甘、咸	酸、咸
菝葜	辛、苦	辛、咸	苏木	甘、咸	咸
三棱	辛、苦	辛、咸	金箔	辛、苦	咸
皂荚	辛、咸	辛、咸	铁落	酸、辛	咸
狗脊	苦、甘	辛、苦	银箔	辛	咸
草薢	苦	辛、苦	铅粉	辛	咸、苦
密蒙花	甘	辛、苦	茶叶	苦、甘	苦
血竭	甘、咸	酸	猪胆	苦	苦

## 3 讨论

### 3.1 《脏腑用药式》肝木疾病的临床表现和治疗用药基本符合“汤液经法图”认识

根据对比分析结果，《脏腑用药式》肝木疾病的症状与《辅行诀》相似度较高，分析原因为两者都是以五行学说为指导，藏象学说为基础，构建出脏腑辨证论治体系。《脏腑用药式》肝木疾病症状引用到了“诸风眩运”“强直”等符合病机十九

条的症状内容，同样《辅行诀》也遵循以病机十九条为中医诊断和治疗疾病的基本准则，涵盖了“头目眩运”“头目苦眩”等症状。两者肝木疾病体现的症状表现也多围绕于肝经循行过的重要部位，例如“目赤”“两胁肿痛”“头目眩运”“痛引少腹”等。《脏腑用药式》中亦收录了除肝木疾病之外其他脏腑的疾病症状，在辨证论治思路与《辅行诀》不同的基础上，其治疗肝木疾病的用药药

味依然高度集中于“辛酸甘”味，说明这对“汤液经法图”理论体系是一个强有力的支撑证据。

**3.2 《辅行诀》与《脏腑用药式》肝木疾病临床表现和治疗用药上存有差异**

经统计分析“寒热虐”“面青”“卵缩”3个症状属于肝，但《辅行诀》未记载，可见在脏腑病证归纳的内容上，《脏腑用药式》更为全面，可作为后续研究《辅行诀》脏腑辨证的补充资料。用药上，《辅行诀》中“汤液经法图”是严格按照五行-五味-五脏的配比关系进行脏腑虚实辨证论治的，选用辛、酸、甘味药治疗肝木疾病，而《脏腑用药式》同时也选用了苦味和咸味药，主要原因可能是张元素分类时把心火疾病和脾土疾病的症状也分到了肝，比如“呕血”“癥瘕”“吐涎”，而“咸味补心，苦味泻心燥脾”，可见其并不是单纯地采用五味入五脏的补泻思路，还涉及了从气血关系和母子关系等角度考虑用药，所以存在所用药味与“汤液经法图”不一致的情况，因此在五味补泻五脏的遣方用药规律上，《辅行诀》中“汤液经法图”更为严谨。

**3.3 “辛酸甘”配伍在肝木疾病治疗中具有的重要地位和价值**

《脏腑用药式》五脏用药思路虽与选择药味直接作用于本脏的《辅行诀》不同，但在肝木疾病治疗时选用的中药药味与“汤液经法图”中“辛补肝、酸泻肝、甘缓肝”选药思路一致<sup>[16]</sup>。团队前期研究中亦发现，在经方、时方中“辛酸甘”味配伍治疗肝木疾病的用法也时常体现，例如《伤寒论》中治疗拘挛疼痛诸症之方“芍药甘草汤”、《证治准绳》中治疗肝郁气滞证之代表方“柴胡疏肝散”、《太平惠民合剂局方》中治疗风寒湿痹代表方“小活络丹”等<sup>[4]</sup>。可见“辛酸甘”味药物配伍在肝木疾病中医临床治疗中具有重要的地位和价值。

**3.4 本研究的不足之处**

本研究只涉及了肝木疾病的临床症状表现及用药情况，对《辅行诀》与《脏腑用药式》辨证和用药规律的解读存在一定的局限性，后续将纳入其他脏腑疾病的研究。在“汤液经法图”中，五味补泻五脏是组方核心，但对于中药主导药味的界定却与现有的药味记载不完全相同<sup>[17]</sup>，《汤液经法图 2》与《医方图解》给出了部分中药依据“汤液经法图”用药规律的药味定位，但未收录

的中药药味只参考《中国药典》和《中华本草》的功效主治定其药味，可能与实际上的药物性味有所差异。《脏腑用药式》肝木疾病涉及的中药分类只考虑了辛补肝、酸泻肝、甘缓肝的情况，并未进一步探讨所用中药是否存在酸咸化辛、咸苦化酸的化味情况<sup>[18]</sup>，这也是今后需要进一步研究的内容之一。

## 参考文献

- [1] (金)张元素撰.吴风全等校释.脏腑标本虚实寒热用药式校释[M].北京:中医古籍出版社,1994.
- [2] 张大昌,钱超尘.辅行诀五脏用药法要传承集[M].北京:学苑出版社,2008.
- [3] 金锐.汤液经法图讲记2还原中药的五行属性[M].北京:北京科学技术出版社,2023.
- [4] 金锐.医方图解:以“汤液经法图”解读方剂配伍之秘[M].北京:中国中医药出版社,2023.
- [5] 中国药典2020年版.一部[S].2020:2.
- [6] 沈丕安.中华本草[M].上海:上海科学普及出版社,2017.
- [7] 金锐,李凡.《辅行诀》所载“汤液经法图”蕴含的中药药性理论新内容探析[J].医药导报,2023,42(4):479-483.
- [8] 徐静雯,牟冬梅,黄玉燕,等.现行中医证候分类标准比较研究[J].中华中医药杂志,2022,37(10):5943-5949.
- [9] 刘晶,王哲,刘涛,等.现行中医疾病分类标准比较研究[J].中华中医药杂志,2022,37(9):5147-5151.
- [10] 滕佳林.中药学[M].济南:山东科学技术出版社,2020.
- [11] 王宇光,金锐.“汤液经法图”系列研究之三:25味药精五行属性内涵的探索性研究[J].世界科学技术-中医药现代化,2021,23(2):385-390.
- [12] (金)张元素原著.任应秋点校.医学启源[M].北京:人民卫生出版社,1978.
- [13] (元)王好古撰.崔扫塵,尤荣辑点校.汤液本草[M].北京:人民卫生出版社,1987.
- [14] 江苏新医学院.中药大辞典[M].上海:上海人民出版社,1977.
- [15] 杜丽.基于“毒-效-证”相关性的乌头用药规律研究[D].济南:山东中医药大学,2022.
- [16] 金锐.以“汤液经法图”视角重构中医组方配伍理论体系[J].中华中医药杂志,2023,38(4):1445-1449.
- [17] 李丹丹,郭红叶,戎立保,等.基于《辅行诀》所载“汤液经法图”理论的巴戟天“苦辛”药味探讨[J].医药导报,2023,42(4):484-488.
- [18] 金锐,方子寒,朱贺,等.“汤液经法图”五味化合理论的数学模型分析[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(20):191-199.

(收稿日期:2024-02-18;修回日期:2024-05-17)

# 从“汤液经法图”角度探讨陈无择天干十方的组方用药规律

金锐<sup>1</sup>, 王静<sup>2</sup>, 齐明月<sup>3</sup>, 赵依佳<sup>4</sup> (1.中国中医科学院西苑医院, 北京 100091; 2.青岛市海慈医疗集团青岛市中医医院, 山东 青岛 266033; 3.山东中医药大学附属医院, 济南 250014; 北京大学第一医院密云医院, 北京 101515)

**摘要:** 敦煌遗书《辅行诀》所载“汤液经法图”展示了一套以五脏虚实辨证结合五味补泻治疗为主的辨证论治方法学, 其核心框架为五行阴阳; 与此同时, 五运六气同样以五行太过不及定义中运, 其核心框架同样为五行阴阳。基于此, 本文在课题组前期研究基础上, 基于“汤液经法图”理论体系解析陈无择的天干十方, 确定其适应证类型及组方配伍结构, 分析方证相符度, 分析天干十方对应年份五行强弱与其组方思路的相符度, 以阐明天干十方的组方配伍规律。

**关键词:** 汤液经法图; 五运六气; 组方配伍; 阴阳五行

中图分类号: R283

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)08-2090-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.020

## Rules of formulation combinations in ten heavenly stems from the perspective of “Tang-ye-jing-fa map”

JIN Rui<sup>1</sup>, WANG Jing<sup>2</sup>, QI Ming-yue<sup>3</sup>, ZHAO Yi-jia<sup>4</sup> (1. Xiyuan Hospital, Chinese Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100091; 2. Qingdao Traditional Chinese Medicine Hospital, Qingdao Haici Medical Group, Qingdao Shandong 266033; 3. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014; 4. Miyun Hospital, First Hospital of Peking University, Beijing 101515)

**Abstract:** Tang-ye-jing-fa map in the Dunhuang ancient book *Fuxingjue* displays a set of syndrome differentiation and treatment methods, which is mainly based on the differentiation of deficiency and excess of the five viscera combined with the treatment of five flavors. Its core framework is balance between Yin-Yang and the five elements. Sharing the same framework, the middle movement of the Five-Yun and Six-Qi is also defined as the excessiveness and deficiency of the five elements. Based on the relationship, this article tried to analyze the ten heavenly stems, based on the previous research of the theoretical system of “Tang-ye-jing-fa map”. We tried to determine the type of indications and the compatibility structure of the ten heavenly stems, and analyze their consistency of the formula. The consistency between the five elements in corresponding years of the ten heavenly stems and their composition ideas was also determined to elucidate their formulation and compatibility rules.

**Key words:** Tang-ye-jing-fa map; Five-Yun and Six-Qi; formulation compatibility; Yin-Yang and the Five Element

“汤液经法图”收载于敦煌遗书《辅行诀》, 具有重大的学术价值<sup>[1-3]</sup>。陶弘景在《辅行诀》中对其评价颇高, 认为此图是“汤液经法尽要之妙”<sup>[4]</sup>。本团队对此图开展了广泛而又深入的科学研究, 阐明了其中蕴含的五脏虚实辨证与五味补泻治疗原理, 探索其中记载的中药五行属性学说, 并且将其运用于识方解方和临床会诊<sup>[5-10]</sup>。从内容上看, “汤液经法图”直接以阴阳五行定病性(五脏虚实), 这就与五运六气学说产

生了天然联系。运气学说认为, 凡六癸年火运不及, 凡六甲年土运太过, 恰好也是阴阳(太过不及)与五行(十天干)的结合。基于此, 本文选择运气方研究最为关注的陈无择《三因极一病证方论》<sup>[11-12]</sup>, 采用“汤液经法图”理论体系解析其中所载天干十方的组方配伍原理, 旨在为两种学说的相互促进和共同发展提供支持。

### 1 材料

本研究以宋·陈无择《三因极一病证方论》所

基金项目: 中国中医科学院科技创新工程重大攻关项目(No.CI2021A03805); 中国中医科学院西苑医院能力提升项目(No.XYZX0202-07)。

作者简介: 金锐, 男, 副主任药师, 主要从事中药临床药学与中医药基本理论研究, email: jinrui9862@126.com



载天干十方为研究对象, 即该书“五运时气民病证治”章节记载的苓术汤(六壬年)、麦门冬汤(六戊年)、附子山茱萸汤(六甲年)、牛膝木瓜汤(六庚年)、川连茯苓汤(六丙年)、苻蓉牛膝汤(六丁年)、黄芪茯苓汤(六癸年)、白术厚朴汤(六己年)、紫菀汤(六乙年)和五味子汤(六辛年), 研究底本为中国中医药出版社 2018 年平装本<sup>[13]</sup>。本研究的适应证标准化方法<sup>[14-15]</sup>、五脏虚实辨证方法<sup>[16-18]</sup>及所采用的中药主导药味<sup>[18-19]</sup>均来源于文献。上述文献未涉及的中药包括钟乳粉(咸)、菟丝子(苦甘)、松节(辛)和紫河车(咸)。

## 2 方法

### 2.1 天干十方对应年份的五行强弱分析

按照五行生克关系, 结合《黄帝内经》原文记载, 梳理各年份需关注的五行属性和强弱情况。例如, 六壬年为木运太多, 木运太过即为木强, 木克土, 木强则土弱; 同时, 金克木, 木强则金气来复。所以, 与六壬年直接相关的五行强弱属性分别是: 木强土弱, 兼有金复。其余以此类推。

### 2.2 天干十方的适应证集和组方配伍结构分析

对天干十方的适应证和组方用药进行标准化提取, 整理得到适应证集和组方中药集。确定每一个适应证的五脏虚实类型, 确定每一个组方中药的主导药味。本研究取复合药味中的主导药味进行统计, 不考虑五味配伍转化关系。例如, 六壬年治疗用的苓术汤, 适应证为“治脾胃感风, 飧泻注下, 肠鸣腹痛, 四肢重滞, 忽忽善怒, 眩冒颠晕, 或左胁偏疼”。根据这段记载, 对其中症状术语进行标准化, 可提取出腹泻、肠鸣、腹痛、乏力、易怒、眩晕和胁痛作为苓术汤的适应证集。同时, 对天干十方所涉及的中药进行药味标定。复合药味中药以其中能够体现适应证改善作用的功效, 来确定本次计入配伍结构的药味。例如, 苓术汤的组方为白茯苓、厚朴、白术、青皮、干姜、半夏、草果和甘草, 其中, 茯苓和甘草味甘, 干姜和草果味辛, 青皮辛酸(苓术汤适应证有腹痛胁痛, 而青皮之酸味泻肝止痛, 与此相符。故对于辛味酸味均有的青皮, 将酸味计为主导药味, 下同), 半夏辛咸(以辛计), 白术甘苦(以甘计), 厚朴咸辛(以咸计)。

### 2.3 天干十方的方证相符度分析

在“2.2”项研究的基础上, 采用“汤液经法图”所示的五脏虚实辨证和五味补泻治疗理论, 一方面确定方剂适应证的病因病机和治则治法, 另一方面确定方剂的实际配伍组方结构, 对比考察方证相应的情况, 对相符药味和不相符药味进行分类统计, 分析不相符的可能原因。例如, “汤液经法图”理论体系认为, 肝虚则恐、实则怒, 脾

虚则四肢不用、脾实则腹满吐泻。小补肝汤治疗“头目眩晕”, 小泻肝汤治疗“两胁下痛”。所以, 苓术汤所治疗的腹泻腹痛属于脾实证, 乏力属于脾虚证, 眩晕属于肝虚证, 易怒胁痛属于肝实证, 综合来看, 这是一种虚实夹杂的肝脾共病, 以实证为主。根据“汤液经法图”, 辛补肝、酸泻肝、甘缓肝; 甘补脾、辛泻脾、苦燥脾。以实证为主的肝脾虚实夹杂证应该以酸辛为主、甘苦为辅来治疗。苓术汤由 8 味中药组成, 其组方配伍结构为“三甘三辛一酸一咸”。由此可知, 苓术汤的甘、辛、酸味符合治则治法, 但酸味偏少, 而多咸味。

### 2.4 天干十方对应五行强弱及其组方思路的相符度分析

在“2.1”和“2.2”项研究的基础上, 采用“汤液经法图”五行五味配属关系, 考察各年份五行强弱属性与组方配伍的对应情况, 对相符部分和不相符部分进行分类统计, 分析不相符的可能原因。例如, 苓术汤为六壬年治疗方, 而六壬年的五行强弱为木强土弱, 兼有金复。如果人体也感受天地五行变化而患病, 则同样为木强(肝实)土弱(脾虚)兼有金复(肺实或肺虚), 其理论治法应该是泻木补土兼有调金。根据“汤液经法图”五味补泻治疗原则, 泻木补土兼有调金的药味组合应该是酸泻肝、甘补脾为主, 咸酸调肺为辅。所以, 六壬年疾病的理论治疗药味应该是酸、甘和咸, 而苓术汤的实际组方配伍结构是“三甘三辛一酸一咸”。由此可知, 苓术汤组方中的甘、酸、咸味均符合治则治法, 但酸味偏少, 辛味偏多。

## 3 结果

### 3.1 天干十方对应年份的五行强弱

根据“2.1”项下方法, 确定天干十方对应年份的五行强弱情况见表 1。从干支周期上看, 十天干中运变化导致其五行本位也出现强弱变化, 并且涉及我克和克我的其他五行属性。

### 3.2 天干十方的适应证集

根据“2.2”项下方法, 整理得到天干十方的适应证, 并进行标准化提取后见表 2。从表 2 可知, 天干十方常用于治疗腹痛腹泻、咳喘气短、足痿不利等常见病症, 且天干十方的适应证之间有重复。例如, 附子山茱萸汤和五味子汤都能用于足痿, 苻蓉牛膝汤和白术厚朴汤都能用于胁痛腹痛。

### 3.3 天干十方的五味配伍结构

根据“2.2”项下方法, 整理得到天干十方的组方配伍结构见表 2。除附子山茱萸汤之外, 其余均由 4 种以上药味组成, 组方配伍情况比较复杂。从主导药味上看, 天干十方多以辛、甘和苦味为主。

表 1 十天干年份的五行强弱

Tab 1 Strength of the Five elements attribute based on ten heavenly stems

	六甲年	六乙年	六丙年	六丁年	六戊年	六己年	六庚年	六辛年	六壬年	六癸年
中运	土运太过	金运不及	水运太过	木运不及	火运太过	土运不及	金运太过	水运不及	木运太过	火运不及
主要方面	土强水弱	金弱火强	水强火弱	木弱金强	火强金弱	土弱木强	金强木弱	水弱土强	木强土弱	火弱水强
次要方面	木复	水复	土复	火复	水复	金复	火复	木复	金复	土复

表 2 天干十方的适应证集

Tab 2 Indications of ten heavenly stems

年份	治疗方	组成	配伍结构	适应证(标准化后)
六甲年	附子山茱萸汤	附子, 山茱萸, 木瓜, 乌梅, 半夏, 肉豆蔻, 丁香, 藿香	五辛三酸	腹痛, 寒厥, 足痿, 腰腿痛, 腹满腹泻, 纳差
六乙年	紫菀汤	紫菀, 白芷, 人参, 甘草, 黄芪, 地骨皮, 杏仁, 桑白皮	二甘二辛 二苦一酸 一咸	咳嗽喘满, 自汗, 衄血, 肩背不适, 便血, 巅顶痛, 发热, 口疮, 心痛
六丙年	川连茯苓汤	黄连, 茯苓, 麦冬, 车前子, 通草, 远志, 半夏, 黄芩, 甘草	三苦四甘 一酸一辛	身热, 烦躁, 手足冷, 心腹痛, 咳喘, 自汗, 便血
六丁年	茯苓牛膝汤	肉苁蓉, 牛膝, 木瓜, 芍药, 熟地黄, 当归, 甘草	二酸二苦 一咸一辛 一甘	胁痛腹痛, 肠鸣腹泻, 发热, 皮肤疮疡, 咳嗽, 鼻衄
六戊年	麦门冬汤	麦冬, 白芷, 半夏, 竹叶, 甘草, 钟乳粉, 桑白皮, 紫菀, 人参	二咸二酸 二甘二辛 一苦	咳逆痰喘, 气短, 咯血, 咽干, 耳聋, 腹泻, 胸痛连及肩背
六己年	白术厚朴汤	白术, 厚朴, 半夏, 桂枝, 藿香, 青皮, 干姜, 甘草	四辛二甘 一咸一酸	心腹痛, 四肢乏力, 肌肉颤动, 易怒, 吐泻, 胁痛腹痛, 善太息, 纳差
六庚年	牛膝木瓜汤	牛膝, 木瓜, 芍药, 杜仲, 枸杞, 松节, 菟丝子, 天麻, 甘草	四苦二酸 二甘一辛	胸胁小腹拘挛疼痛, 耳聋, 目赤, 咳逆, 肩背下肢痛
六辛年	五味子汤	五味子, 附子, 巴戟天, 鹿茸, 山茱萸, 熟地黄, 杜仲	二苦二辛 二酸一咸	腰膝疼痛, 腹胀腹泻, 足痿, 水肿, 面色异常, 筋脉拘挛, 目昏, 咽痛
六壬年	苓术汤	茯苓, 厚朴, 白术, 青皮, 干姜, 半夏, 草果, 甘草	三甘三辛 一酸一咸	腹泻腹胀, 肠鸣, 四肢乏力, 易怒, 眩晕, 胁痛
六癸年	黄芪茯神汤	黄芪, 茯神, 远志, 紫河车, 酸枣仁	二甘一苦 一咸一酸	胸痛连及肩背, 神昏, 下肢拘痛, 腹痛腹泻, 手足屈伸不利

### 3.4 天干十方的方证相符度分析

根据“2.3”项下方法, 整理得到天干十方的方证相符度见表 3。从“汤液经法图”角度看, 天干十方适应证的五脏虚实类型与所在年份的五行强弱属性(太过不及)具有相关性。例如, 六甲年为土运太过, 脾土克肾水, 则附子山茱萸汤的主治证里既包含以腹泻腹痛为典型症状的脾实证, 也包含以腰痛足痿为典型症状的肾虚证。六己年为土运不足, 木克土, 则白术厚朴汤的主治证里既包含以乏力、纳差为典型症状的脾虚证, 也包含以肌颤、易怒为典型症状的肝实证。

同时, 根据“汤液经法图”理论, 天干十方所治疗的病症多属于脏腑共病及虚实夹杂的情况, 需要 2~3 个药味联合治疗。实际上, 天干十方则是选用 4~5 个药味组合成方, 能够覆盖治疗所需的这 2~3 个理论治疗药味, 但同时也存在 1~2 个药味的多余或缺失。

### 3.5 天干十方对应年份五行强弱与其组方思路的相符度分析

根据“2.4”项下方法, 整理得到天干十方的方证相符度见表 4。从“汤液经法图”角度看, 调节平衡天干十方对应年份的五行强弱需要 3 个理论药味的配伍协同, 其中 1 个药味负责泻太过、1 个药味负责补不足、1 个药味负责调节复气。天干十方的实际选药组方中, 往往会覆盖这 3 个理论治疗药味中的 2~3 个, 同时也存在理论治疗药味使用不足、非理论治疗药味使用过多的情况。

## 4 讨论

### 4.1 “汤液经法图”可以清晰展示天干十方与所在年份五行属性之间的关联关系

从“汤液经法图”角度看, 无论是适应证类型还是组方选药特点, 天干十方与所在年份的五行强弱属性具有密切的相关性。例如, 六甲年土运太过, 而土克水, 所以, 用于六甲年的附子山

表 3 天干十方的方证相符度

Tab 3 Correspondence of prescription and syndrome of ten heavenly stems

名称	主治证类型	理论治疗药味	实际配伍结构	相符度分析
附子山茱萸汤	① 肝虚	① 辛为主	五辛三酸	辛相符, 酸可, 少苦
	② 脾实合并脾虚	② 辛甘为主		
	③ 肾虚	③ 苦为主		
紫菀汤	① 肺实合并肺虚	① 咸酸为主	二甘二辛	苦咸酸相符, 辛可, 多甘, 少咸酸
	② 心实	② 苦为主	二苦一酸 一咸	
川连茯苓汤	① 肺虚合并肺实	① 酸咸为主	三苦四甘	苦酸辛相符, 甘可, 少咸酸
	② 肝虚	② 辛为主	一酸一辛	
	③ 心虚或心实	③ 咸苦为主		
茯苓牛膝汤	① 肝实	① 酸为主	二酸二苦	酸辛咸相符, 苦甘可, 少咸辛
	② 脾实	② 辛为主	一咸一辛	
	③ 肺实	③ 咸为主	一甘	
麦门冬汤	① 肺实合并肺虚	① 咸酸为主	二咸二酸二甘	咸酸相符, 苦辛可, 多甘
	② 心虚或心实	② 咸苦为主	二辛一苦	
白术厚朴汤	① 脾虚合并脾实	① 甘辛为主	四辛二甘	辛甘酸相符, 少酸甘, 多咸
	② 肝实合并肝虚	② 酸辛为主	一咸一酸	
牛膝木瓜汤	① 肝实	① 酸为主	四苦二酸	苦酸甘相符, 辛可, 少咸, 多苦
	② 肺实	② 咸为主	二甘一辛	
	③ 肾虚或肾实	③ 苦甘为主		
五味子汤	① 肾虚合并肾实	① 苦甘为主	二苦二辛	苦酸辛相符, 多咸, 少甘
	② 肝实	② 酸为主	二酸一咸	
	③ 脾实	③ 辛为主		
苓术汤	① 脾实合并脾虚	① 辛甘为主	三甘三辛	辛甘酸相符, 多咸, 少酸
	② 肝实合并肝虚	② 酸辛为主	一酸一咸	
黄芪茯苓汤	① 心虚	① 咸为主	二甘一苦	咸酸相符, 多甘苦, 少咸酸辛
	② 肝实合并肝虚	② 酸辛为主	一咸一酸	
	③ 脾实	③ 辛为主		

表 4 天干十方对应年份五行强弱与组方思路相符度分析

Tab 4 Discussion between the strength of the Five elements attribute and formulation compatibility based on ten heavenly stems

名称	对应年份的五行强弱	理论治疗药味	实际配伍结构	相符度分析	名称	对应年份的五行强弱	理论治疗药味	实际配伍结构	相符度分析
附子山茱萸汤	① 土强	① 辛为主	五辛三酸	辛酸相符, 少苦	白术厚朴汤	① 土弱	① 甘为主	四辛二甘	甘酸咸相符, 多辛
	② 水弱	② 苦为主				② 木强	② 酸为主		
	③ 木复	③ 酸辛为主				③ 金复	③ 咸酸为主		
紫菀汤	① 金弱	① 酸为主	二甘二辛	苦甘酸相符, 咸可, 多辛	牛膝木瓜汤	① 金强	① 咸为主	四苦二酸	苦辛相符, 甘可, 多酸少咸
	② 火强	② 苦为主				② 木弱	② 辛为主		
	③ 水复	③ 甘苦为主				③ 火复	③ 苦咸为主		
川连茯苓汤	① 水强	① 甘为主	三苦四甘	甘辛相符, 酸可, 多苦少咸	五味子汤	① 水弱	① 苦为主	二苦二辛	苦辛酸相符, 咸可
	② 火弱	② 咸为主				② 土强	② 辛为主		
	③ 土复	③ 辛甘为主				③ 木复	③ 酸辛为主		
茯苓牛膝汤	① 木弱	① 辛为主	二酸二苦	苦辛咸相符, 甘可, 多酸	苓术汤	① 木强	① 酸为主	三甘三辛	酸甘咸相符, 多辛少酸
	② 金强	② 咸为主				② 土弱	② 甘为主		
	③ 火复	③ 苦咸为主				③ 金复	③ 咸酸为主		
麦门冬汤	① 火强	① 苦为主	二咸二酸	苦酸甘相符, 辛可, 多咸	黄芪茯苓汤	① 火弱	① 咸为主	二甘一苦	甘咸相符, 苦酸可, 少辛
	② 金弱	② 酸为主				② 水强	② 甘为主		
	③ 水复	③ 甘苦为主				③ 土复	③ 辛甘为主		

茱萸汤的适应证包含脾土实证(腹泻腹痛)和肾水虚证(足痿、腰痛), 附子山茱萸汤的组方包括辛味泻脾药(半夏、肉豆蔻、丁香、藿香)和苦

味补肾药(附子)。又如, 六乙年金运不及, 而火克金, 所以, 用于六乙年的紫菀汤适应证包含肺金虚证(发热汗出)和心火实证(口疮、衄血),



紫菀汤的组方也包括酸味补肺药（桑白皮）和苦味泻心药（地骨皮、苦杏仁）。当然，不同方剂的关联程度不同，但采用“汤液经法图”理论体系可以清晰地展示这种关联性。需要注意的是，“汤液经法图”分析所采用的药味来源于中药的五行属性，可能与教材标记的药味不同，需要根据中药功效加以核对和确认。

#### 4.2 天干十方仍然存在优化提升的空间

“汤液经法图”展示了一种病症与组方之间的配属关系，这种配属关系不仅是定性的，也是半定量化的，即关于一个治疗特定病证组方的主辅药味的界定。从这个角度看，陈无择天干十方仍然存在优化提升的空间。例如，六乙年金运不及，而火克金，故补金泻火是治疗常态，酸苦联用是治疗常法，但用于六乙年的紫菀汤配伍结构为“二甘二辛二苦一酸一咸”，虽然也有酸苦药味但并非主导，故可在紫菀汤基础上，针对“自汗，衄血，肩背不适，便血，癩顶痛，发热，口疮”的临床表现，增加养阴止汗的酸味药麦冬、柔筋止痛的酸味药白芍、收敛止血的酸味药仙鹤草、凉血止血的苦味药牡丹皮等，同时适当减少甘辛药味，可能是更好的选择。

#### 4.3 加强“汤液经法图”与五运六气的关联性研究

“汤液经法图”的核心框架就是五行阴阳，而五运六气所述五行太过不及同样是五行阴阳。所以，两者同宗同源，底层逻辑相通。运用“汤液经法图”解析运气方组方原理，不仅可以从症状体征辨知五脏虚实类型，而且可以直接从年份五行强弱推知五脏虚实类型，殊途同归。同时，“汤液经法图”本身对于组方配伍原理的强大解析能力，也为基于五运六气的临床选药组方提供更多的参考<sup>[20-21]</sup>。所以，应加强此类研究，为上述两种学术思想的交融发展提供支持。

### 参考文献

[1] 钱超尘.《伤寒论》源于《汤液经法》考[J]. 世界中西医结合杂志, 2007, 2(12): 683-685.  
 [2] 梁永林, 刘稼, 李应存.《辅行诀·汤液经法图》述义[J]. 中国中医基础医学杂志, 2011, 17(4): 349-350.  
 [3] 金锐. 以“汤液经法图”视角重构中医组方配伍理论体

系[J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(4): 1445-1449.  
 [4] 梁·陶弘景撰. 张大昌, 钱超尘主编. 辅行诀五藏用药法要传承集[M]. 北京: 学苑出版社, 2008.  
 [5] 金锐, 王宇光. 基于“汤液经法图”的新型冠状病毒肺炎临床各期中药治疗复方的配伍原理及加减原则研究[J]. 中南药学, 2020, 18(3): 340-344.  
 [6] 金锐. “汤液经法图”系列研究之一: 汤液经法图的来历、内容与应用[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2020, 22(8): 2954-2960.  
 [7] 王宇光, 金锐. “汤液经法图”系列研究之三: 25味药精五行属性内涵的探索性研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(2): 385-390.  
 [8] 金锐, 李凡.《辅行诀》所载“汤液经法图”蕴含的中药药性理论新内容探析[J]. 医药导报, 2023, 42(4): 479-483.  
 [9] 金锐, 方子寒, 朱贺, 等. “汤液经法图”五味化合理论的数学模型分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(20): 191-199.  
 [10] 杨寿圆, 龚宗玉, 王华阳, 等. 运用《辅行诀》所载“汤液经法图”理论开展中药汤剂治疗消渴病的药学监护1例[J]. 医药导报, 2023, 42(4): 496-502.  
 [11] 陈冰俊, 顾植山, 陶国水, 等. 司天“五运方”组方原则初探[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(2): 667-669.  
 [12] 王静, 顾植山. 再从湿疹病案谈运气司天方的临床应用[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(1): 184-186.  
 [13] 宋·陈无择撰. 三因极一病证方论[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2018.  
 [14] 李经纬, 余瀛鳌, 秦景峰, 等. 中医大辞典(第二版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2017.  
 [15] 姚乃礼. 中医症状鉴别诊断学(第二版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2019.  
 [16] 金锐, 郭红叶, 田佳鑫.《辅行诀》所载“汤液经法图”体系中五脏虚实辨证的四诊信息库构建和判别模型研究[J]. 医药导报, 2023, 42(4): 464-471.  
 [17] 金锐. 汤液经法图讲记: 解构经方时方的底层逻辑[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2022.  
 [18] 金锐. 医方图解: 以“汤液经法图”解读方剂配伍之秘[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2023.  
 [19] 金锐. 汤液经法图讲记2: 还原中药的五行属性[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2023.  
 [20] 金锐, 王宇光. “汤液经法图”系列研究之五: 五味排列组合所成31种配伍类型的功效特点和代表性方剂分析[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2023, 25(1): 63-73.  
 [21] 金锐. 从五运六气角度探讨新型冠状病毒肺炎的发病、诊断及治疗[J]. 医学争鸣, 2020, 11(1): 11-14, 17.  
 (收稿日期: 2023-12-29; 修回日期: 2024-04-08)

## 对《辅行诀》中大黄味咸记载的探讨

龚宗玉<sup>1</sup>, 郭红叶<sup>2</sup>, 张盛敏<sup>1</sup>, 金锐<sup>2\*</sup> (1. 泸州市中医医院, 四川 泸州 646000; 2. 中国中医科学院西苑医院, 北京 100091)

**摘要:** 从《神农本草经》记载至今, 大黄药味为苦味, 而敦煌遗书《辅行诀》二十五味药精中记载大黄为火中木, 属于咸味药, 与历代本草中大黄味苦的定义不同。且从《辅行诀》中收录的“汤液经法图”体系看, 味苦泻心清热, 味咸泻肺通便, 以泻下为主的大黄似乎更应属于咸味。本文通过查阅有关大黄基源、别名、产地、功效等信息的历代本草记载, 结合“汤液经法图”理论体系中五味的作用特点对大黄的法象药理和功效药理进行匹配分析, 并对含有大黄的三黄泻心汤、大承气汤和大陷胸汤进行方解, 论证大黄归属为咸味的可能性。旨在为以“汤液经法图”理论为基础、以法象药理与功效药理相结合为途径的中药药味认识及大黄的临床组方配伍应用提供新的思路。

**关键词:** 大黄; 五味; 药性; 汤液经法图; 咸味; 辅行诀

中图分类号: R283

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)08-2095-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.021

### Discussion of "salty" flavor of Rheum officinale in *Fuxingjue*

GONG Zong-yu<sup>1</sup>, GUO Hong-ye<sup>2</sup>, ZHANG Sheng-min<sup>1</sup>, JIN Rui<sup>2\*</sup> (1. Luzhou Traditional Chinese Medicine Hospital, Luzhou Sichuan 646000; 2. Xiyuan Hospital, Chinese Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100091)

**Abstract:** From the *Shennong's Classic of Materia Medica* to the present day, Rheum officinale (Da huang) taste of rhubarb is bitter, while the Dunhuang ancient book *Fuxingjue* records that Rheum officinale is a type of salty medicine, belonging to the category of wood in fire, which is different from the definition of bitter taste of Rheum officinale in traditional Chinese medicine throughout history. Moreover, from the "Tang-ye-jing-fa map" system included in the *Fuxingjue*, it can be seen that Rheum officinale, which has a bitter taste and can clear the heart and heat, and a salty taste that can clear the lungs and promote bowel movements, is more likely to have a salty taste. This article conducts a matching analysis of the pharmacological and functional properties of Rheum officinale by consulting historical herbal records related to its origin, alias, origin, and efficacy, combined with the characteristics of the five flavors in the theoretical system of "Tang-ye-jing-fa map". It also explains the formulas of Sanhuang Xiexin decoction, Dachengqi decoction and Daxianxiong decoction containing Rheum officinale, demonstrating the possibility of Rheum officinale having a salty taste. Intended to provide new ideas for the understanding of traditional Chinese medicine taste and the clinical formulation and compatibility application of rhubarb based on the theory of "Tang-ye-jing-fa map" and combining pharmacological theory and efficacy pharmacology.

**Key words:** Rheum officinale; five flavor; herbal property; Tang-ye-jing-fa map; salty; *Fuxingjue*

大黄为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L.、唐古特大黄 *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. 和药 用大黄 *Rheum officinale* Baill. 的干燥根或根茎<sup>[1]</sup>, 具有泻下、凉血、逐瘀的功效。《神农本草经》载

基金项目: 中国中医科学院科技创新工程项目 (No. CI2021A03805)。

作者简介: 龚宗玉, 女, 中药师, 主要从事中药临床药学研究, email: 18102388481@163.com \* 通信作者: 金锐, 男, 博士, 副主任药师, 主要从事中药药性理论与临床中药学研究, email: jinrui9862@126.com

其味苦性寒，并成为主流观点。从《辅行诀》中对五味的解释来看，味苦泻心，味咸泻肺<sup>[2]</sup>，大黄所具有的通便、泻下和软坚作用，符合咸味的功效表达。本文尝试从《辅行诀》所载“汤液经法图”二十五味药精理论、历代本草记载、法象药理和代表方方解的角度，尝试对其咸味进行讨论。

### 1 《辅行诀》中关于大黄味咸的理论记载

《辅行诀》记载了已佚《汤液经法》的内容，并附有一张关键原理图，即“汤液经法图”（见图1），明确了五味对五脏的作用特点。图中用为补，体为泻，化味可由用、体味化合而生。如在肾（水）区，苦能补肾，甘能泻肾，咸能润肾。苦甘同用化咸，表达咸味润肾的功效。目前国内学者普遍认为，“汤液经法图”体系是张仲景《伤寒杂病论》经方配伍理论的源头，对于分析中药性味归经，指导中药应用配伍具有极其重要的参考价值及现实意义<sup>[3]</sup>。

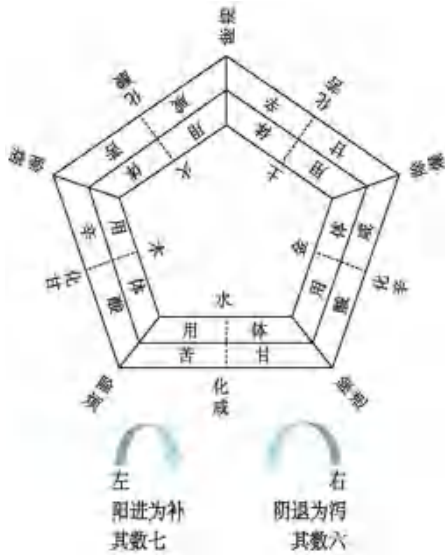


图1 汤液经法图

Fig 1 Tang-ye-jing-fa tu

《辅行诀》收录了 25 味常用中药的五行属性和主导药味，称为二十五味药精，其中对大黄的描述内容为：“味辛皆属木，桂为之主，椒为火，姜为土，细辛为金，附子为水。味咸皆属火，旋覆花为之主，大黄为木，泽泻为土，厚朴为金，硝石为水。味甘皆属土，人参为之主，甘草为木，大枣为火，麦冬为金，茯苓为水。味酸皆属金，五味子为之主，枳实为木，豉为火，芍药为土，薯蕷为水。味苦皆属水，地黄为之主，黄芩为木，黄连为火，白术为土，竹叶为金”<sup>[2]</sup>。由此可知，在对二十五味药精的描述中，明确大黄的五行属性为火中木，指向的主导药味为咸味。

## 2 从历代本草记载和法象药理探讨大黄的咸味

### 2.1 大黄的别称

大黄的别称很多，包括将军、黄良、火参等。如《吴普本草》载曰“大黄，一名火参”<sup>[4]</sup>，后经考证，“火参”一名从色从形而得<sup>[5]</sup>，火有红色之意，参则为形状。根据中医取类比象的理论分析，“火”为赤色属心走血，符合“二十五味药精”中大黄属“火”的观点；“参”字与人参相似而得，其意为补，《素问·脏气法时论》记载：“心欲软……用咸补之”<sup>[6]</sup>，本脏所喜即名为补，故咸味补心。因此，从其“药象”推导，大黄有属火补心之意，符合对大黄属咸味的推断。

### 2.2 大黄的产地

中药的产地方位是五行理论判断药味的依据之一。通过对大黄产地的本草考证<sup>[7-11]</sup>，发现大黄道地产区为四川、青海、甘肃，较当前道地产区未发生明显变迁，故以产地推论大黄五味的思路符合古今时空特性。根据五行理论分析，大黄道地产区方位属西方，五行为金，五脏属肺，而“汤液经法图”示，酸补肺、咸泻肺、辛散肺，故可理解大黄的药味应与酸味，咸味，或辛味有关。

## 3 从功效探讨大黄的咸味

《辅行诀》中“汤液经法图”理论示，每一种中药的药味具有 3 个功效特点。例如，辛味能够补肝、泻脾和散肺；甘味能够补脾、泻肾和缓肝；酸味能够补肺、泻肝和收心；苦味能够补肾、泻心和燥脾；咸味能够补心、泻肺和润肾。大黄为“火中木”，主导药味为咸味，应该具有补心、泻肺和润肾功效中的一个或几个。故可通过大黄对心、肺、肾的作用及其表现的功效分析大黄的药味。

### 3.1 大黄对心的作用

心主血脉，血脉不利则心病。《灵素节注类编》言“心主一身之血，其本脉圆活如钩者，阳气升浮而按之柔和也”<sup>[12]</sup>。可见心脉以通为要，以柔软当其功用。心脉瘀阻治则活血化瘀，瘀血散，则心脉复其功用。历代医书或本草均认为大黄有逐瘀通经，治诸血证之效。《神农本草经》记载“大黄主下瘀血，血闭……破癥瘕积聚”<sup>[13]</sup>，《医学衷中参西录》载大黄“能入血分，破一切瘀血”<sup>[14]</sup>，《中国药典》记载大黄“凉血解毒，逐瘀通经”<sup>[1]</sup>。《素问·脏气法时论》记载：心欲软，急食咸以软之，用咸补之<sup>[6]</sup>。表明咸味药能补心，使心恢复正常的生理状态。大黄破瘀实为心之所欲，补心之功，符合“汤液经法图”理论咸能补



心的特性，表明大黄应具有咸味。

从现代药理学看，大黄对心血管系统的作用<sup>[15]</sup>有抗血栓形成、抗血管痉挛、抗心律失常、强心、抗动脉粥样硬化、降压等作用。心血管系统疾病的发展会导致周围组织坚硬，血管壁增厚发硬等。大黄可以改善此种情况，表现为咸味的补心、软心的特征，印证了其可使心柔软的观点，即发挥咸味药的功效。

### 3.2 大黄对肺的作用

肺主宣降，司呼吸。《黄帝内经》载：“肺实则喘喝胸盈仰息”<sup>[6]</sup>，肺失宣降导致的胸满咳喘诸症，为肺实证。另肺为贮痰之器，痰壅则呼吸不畅，喘息窒闷；又因肺与大肠相表里，肠热燥结致浊气壅于大肠，上逆于肺，则症见喘息、不能久立。因此痰实、肠热便秘皆为肺实证，以泻肺论治。《名医别录》记载大黄：“除痰实，肠间结热”<sup>[7]</sup>，《药性论》言大黄：“能破痰实，冷热结聚宿食，利大小肠贴热毒肿”<sup>[16]</sup>，《得配本草》曰大黄：“荡涤肠胃之邪结……滚顽痰”<sup>[17]</sup>。可知大黄有除痰清肠，泻肺之功。“汤液经法图”理论认为“肺德在收，以酸补之，以咸泻之”，即咸能泻肺，因此大黄应具有咸味。

从现代药理学看，大黄能促进结肠蠕动，同时抑制肠平滑肌细胞膜上的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶产生肠腔容积性泻下作用，也有研究表明泻下可能与抑制结肠水通道蛋白有关<sup>[18-19]</sup>。此外，大黄还具有广谱抗菌作用，对细菌感染性、病毒性呼吸道感染及脓毒症均有疗效，能治疗肺脓肿、小儿肺炎、大叶性肺炎及其他肺系疾病。以上也佐证了大黄具有咸味的观点，反映大黄具泻肺之功，发挥咸味之力。

### 3.3 大黄对肾的作用

肾主水，封藏，纳气，与膀胱相表里。《注解伤寒论》言“水停心下不行，则肾气燥”<sup>[20]</sup>，“肾燥”实为肾脏气化失调，封藏太过，津液不布，致小便不利，水肿，口干口渴之象。治则清热利水，通腑气以调肾气。大黄味厚，为阴中之阴，主下，具降浊通腑之用。且大黄在历代载有利水、利小便之功，如《药性论》云：“大黄利水肿”<sup>[16]</sup>，《景岳全书》亦言大黄：“通水道，退湿热”<sup>[21]</sup>，《中国药典》记载大黄：“用于淋证、水肿”<sup>[1]</sup>。大黄通小便，水饮随之而下，肾之气化功能得以恢复，以治肾燥，体现润肾之效。“汤液经法图”示，咸能润肾，大黄能润肾燥，则大黄应属咸味。

现代研究表明，大黄可抑制肾小管上皮细胞

水通道蛋白的表达水平，并能抑制肾髓质 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶均表现出利尿作用，此外对肾小球肾炎和慢性肾衰竭有改善作用<sup>[18, 22]</sup>，体现了大黄通利水道润肾之功，为咸味润肾的功效特点。

从传统中医角度看，大黄对心、肺、肾 3 个脏腑的作用特点体现为大黄能补心、泻肺、润肾，与“汤液经法图”理论认为咸能补心、泻肺、润肾的作用特点相契合，为进一步证实大黄属咸味提供理论依据。

## 4 从方剂配伍原理验证大黄的咸味

本课题组前期对“汤液经法图”理论进行了系统研究<sup>[23-27]</sup>，发现其核心观点是确定脏腑病症虚实，选用该脏腑对应的药味组方，组方规律为实证用药以泻（体）味为主，虚证以补（用）味为主，可佐以其他药味。

运用“汤液经法图”原理，可以精确分析方剂的配伍结构，明确每一味中药在配伍成方时的角色。临床含有大黄的常用方剂很多，包括三黄泻心汤、大承气汤、大陷胸汤等，通过对这些方剂配伍结构的分析，也可以看出大黄在其中的主导药味和作用。

### 4.1 三黄泻心汤

三黄泻心汤收载于《金匱要略》，亦收载于《辅行诀》，为小泻心汤原方。三黄泻心汤由大黄 10 g，黄连 5 g，黄芩 10 g 组成，功效为清热解毒，泻火通便，主治三焦热盛导致的吐血、衄血、目赤肿痛、口舌生疮等。

由“汤液经法图”原理分析，三焦热盛所致的吐血衄血、目赤肿痛诸症，属于心火实证，当以苦味泻心为主。根据《辅行诀》所载 24 首大小补泻汤的配伍规律，所有小泻汤，均以泻该脏为主，配以补该脏之药，配比关系为 2 : 1。例如，小泻肝汤以“二酸一辛”成方，小泻脾汤以“二辛一甘”成方，小泻肺汤以“二咸一酸”成方，小泻肾汤以“二甘一咸”成方。故小泻心汤以“二苦一咸”成方（见图 2），以苦味泻心为主。在小泻心汤组方的 3 个中药里，黄芩为苦，黄连为苦。而大黄为咸味，发挥清热凉血的作用。

### 4.2 大承气汤

大承气汤收载于《伤寒论》，以大黄 12 g，厚朴 24 g，枳实 12 g，芒硝 9 g 组成，功效为峻下热结，主治大便不通、腹满而喘、热结旁流等。

经云“肺虚则鼻息不利；实则喘咳，凭胸仰息”。肠燥热结导致的大便不通、腹满而喘、热结旁流诸症，均为肺实病证，治则当以咸味泻肺

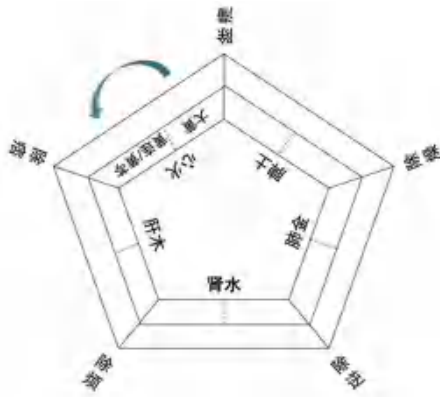


图 2 三黄泻心汤方解  
Fig 2 Sanhuang Xiexin decoction analysis

为主。方中枳实为酸味药，厚朴、芒硝、大黄为咸味药，组成“三咸一酸”结构（见图 3），组方整体补泻兼施，以咸泻为主。大黄为咸味，发挥泻下通便的作用。

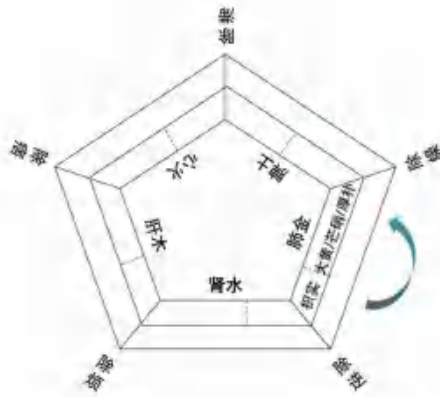


图 3 大承气汤方解  
Fig 3 Dachengqi decoction analysis

#### 4.3 大陷胸汤

大陷胸汤收载于《伤寒论》，由大黄 10 g，芒硝 10 g，甘遂 1 g 组成，功效为泻热逐水，主治心下疼痛，拒按，伴短气烦躁，大便秘结等。

经云“肾气虚则厥逆；实则腹满，面色正黑，泾溲不利”。水热结于胸间为肾实病症，短气烦躁、大便不通诸症为肺实病症，治则当以甘味泻肾和咸味泻肺为主。方中大黄、芒硝为咸味，甘遂为甘味，则大陷胸汤为“二咸一甘”的配伍结构（见图 4），组方整体发挥为泻肺合泻肾的作用。大黄为咸味，发挥泻下通便、通利水道的作用。

### 5 讨论

本文以《辅行诀》所载“二十五味药精”为切入点，从大黄的别名、产地、法象药理，尤其是结合“汤液经法图”的医理分析和解方分析，可以得出结论：将大黄认定为咸味药符合“汤液经法图”理论逻辑，也能更好地理解大黄的功效特

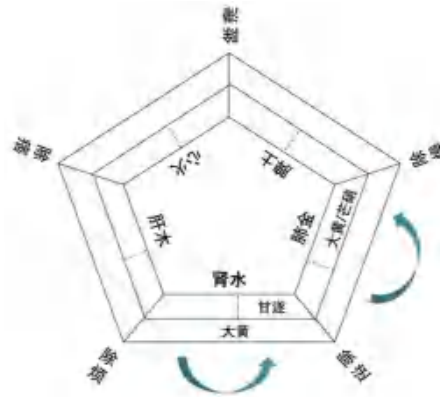


图 4 大陷胸汤方解  
Fig 4 Daxianxiang decoction analysis

点和使用特点。

**5.1** 从“汤液经法图”角度定义大黄为咸味药的必要性

“汤液经法图”收载于《辅行诀》，描述了 3600 年前组方配伍的理论体系。这个理论体系与现有辨证论治理论具有一些不同之处，最重要的两点，其一是脏腑虚实证型的分类，其二是中药五行属性和主导药味的认识。两者环环相扣，相辅相成，一以贯之，共同构成“汤液经法图”辨证论治方法学体系。只有将大黄认定为咸味药，从咸补心（活血软坚）、咸泻肺（泻下通便）和咸润肾（通利水道）角度认识大黄，才能解释大黄的功效，才能明白小泻心汤、小泻肺汤、大承气汤和大陷胸汤的组方原理。因此，要想让“汤液经法图”理论体系用于现代临床，就必须梳理现有中药的五行属性和主导药味，即确定常用中药的五行属性和主导药味，是“汤液经法图”走向临床的基础。大黄是《辅行诀》原文记载的咸味火性药精之一，自然是研究的起点和重点。

**5.2** 历代均记载大黄为苦味的可能原因

从本草史角度看，我国本草学术发展有很强的继承性特点，现存最早的本草《神农本草经》就记载大黄为苦寒药，故后世医家在编纂本草时，可能会倾向于沿袭这一记载。从临床应用角度看，根据“热者寒之”，大黄具有的清热泻火作用是一个典型的寒性中药作用，而目前药性研究发现，辛味与温性、甘味与平性、苦味与寒性有很强的关联性。所以，寒性清热中药多数具有苦味，这可能是由固化的思维习惯造成的。从药性研究角度看，目前在药性与功效的关联关系方面，虽然认为此两者有关，但一般是松散的离合关系，并非真正严谨的关联和对应。这些都是历代本草均记载大黄为苦味药的可能原因。

### 5.3 本研究的不足

任何一个中医药问题，都需要循理循证相结合的综合分析才有说服力。从循理角度看，大黄的咸味的确与其功效、与解方有良好的对应关系。但从单纯的循证角度，目前也的确没有本草将其直接记载为咸味，未来可以在更多的医书中检索挖掘。另外，从四气与五味的关系角度看，咸味补心而心主火，辛咸属温热，酸苦配寒凉。所以，一个典型的咸味药应该是温热性的，而大黄是寒凉性中药，能够清热泻火，所以，从理论上讲，要么是大黄的寒凉性并不明显，要么就是大黄在咸味同时还合并有苦味，是一个咸苦兼有的复合型中药。这些问题，都有待未来继续研究思考。

### 参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 24.
- [2] 陶弘景.《辅行诀》传承集[M]. 北京: 学苑出版社, 2008.
- [3] 王淑民.《辅行诀脏腑用药法要》与《汤液经法》,《伤寒杂病论》三书方剂关系的探讨[J]. 中医杂志, 1998, 39(11): 3.
- [4] 吴普. 吴普本草[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1987.
- [5] 郭润康. 大黄名称考解[J]. 贵阳中医学院学报, 1983(2): 53-55.
- [6] 国医编委会. 黄帝内经译释[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 2014.
- [7] 陶弘景集. 名医别录[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986.
- [8] 苏敬等撰, 尚志钧辑校. 新修本草[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2004.
- [9] 苏颂. 本草图经[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1994.
- [10] 黄泰康. 现代本草纲目[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2001.
- [11] 吴其濬. 植物名实图考[M]. 北京: 中华书局, 2018.
- [12] 楠虚谷编注. 灵枢节注类编[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1986.
- [13] 尚志钧校注, 尚志钧. 神农本草经校注[M]. 北京: 学苑出版社, 2008.
- [14] 张锡纯, 王吉匀. 医学衷中参西录[M]. 石家庄: 河北科学技术出版社, 2007.
- [15] 谭晓虹, 张丹参, 张力, 等. 大黄及其有效成分对心血管系统的作用[J]. 河北北方学院学报, 2005, 22(5): 68-69.
- [16] 甄权. 药性论[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2006.
- [17] 严西亭. 得配本草[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1957.
- [18] 王玉, 杨雪, 夏鹏飞, 等. 大黄化学成分、药理作用研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中草药, 2019, 50(19): 4821-4837.
- [19] 傅兴圣, 陈菲, 刘训红, 等. 大黄化学成分与药理作用研究新进展[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(16): 1534-1538, 1568.
- [20] (汉) 张仲景著. 注解伤寒论[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012.
- [21] 张介宾, 孙玉信, 朱平生. 景岳全书[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2006.
- [22] 鲍军强. 大黄总蒽醌对结肠和肾脏水通道蛋白表达的调节效应[D]. 西安: 第四军医大学, 2008.
- [23] 金锐, 方子寒, 朱贺, 等. “汤液经法图”五味化合理论的数学模型分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(20): 191-199.
- [24] 金锐, 李凡.《辅行诀》所载“汤液经法图”蕴含的中药药性理论新内容探析[J]. 医药导报, 2023, 42(4): 479-483.
- [25] 金锐, 郭红叶, 田佳鑫.《辅行诀》所载“汤液经法图”体系中五脏虚实辨证的四诊信息库构建和判别模型研究[J]. 医药导报, 2023, 42(4): 464-471.
- [26] 金锐. “汤液经法图”系列研究之二: 基于五味补泻理论的 10 首经方配伍原理解析[J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2020, 22(8): 2961-2968.
- [27] 金锐. “汤液经法图”系列研究之一: 汤液经法图的来历、内容与应用[J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2020, 22(8): 2954-2960.

(收稿日期: 2023-11-07; 修回日期: 2023-12-25)



综述

## 浅谈 rasH2-Tg 小鼠短期致癌性试验的设计要点

张佳珊<sup>1, 2</sup>, 张冬霞<sup>1</sup>, 宫田田<sup>1</sup>, 张素才<sup>1\*</sup> (1. 北京昭衍新药研究中心股份有限公司, 生物制品安全性评价北京市重点实验室, 北京 100176; 2. 中国药科大学药学院, 南京 211198)

**摘要:** rasH2-Tg 小鼠是当前转基因替代模型中应用最广泛的短期致癌性试验模型小鼠, 对遗传阳性致癌物和非遗传阳性致癌物均敏感, 且自发肿瘤率较低。目前国内外相关指导原则还没有针对该转基因小鼠致癌性试验的详细设计要求, 本文通过汇总并分析了 2013—2022 年在美国获批上市且采用该转基因小鼠进行的 51 个新药的致癌性试验申报资料, 并结合实际工作经验对试验设计要点进行整理论述, 为国内新药致癌性试验的开展提供参考。

**关键词:** 致癌性试验; rasH2-Tg 小鼠; 替代小鼠模型

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)08-2100-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.022

### Key points in study design of the short-term carcinogenicity with rasH2-Tg mice model

ZHANG Jia-shan<sup>1, 2</sup>, ZHANG Dong-xia<sup>1</sup>, GONG Tian-tian<sup>1</sup>, ZHANG Su-cai<sup>1\*</sup> (1. JOINN Laboratories (Beijing), Beijing Key Laboratory for Biological Products Safety Evaluation, Beijing 100176; 2. School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198)

**Abstract:** The rasH2-Tg bioassay is a widely used transgenic alternative model in short-term carcinogenicity test, which is sensitive to gene-positive or negative carcinogens. No details have been found about experimental requirements for the model in relevant guidelines at home and abroad. This review summarized the information of rasH2-Tg test batteries from 51 new drug application reviews evaluated by FDA/CDER from 2013 to 2022, and described the key points in the trial design combined with practical experience. The review aims to support the development of carcinogenicity trials of transgenic alternative models for the use of new drugs in China.

**Key words:** carcinogenicity study; rasH2-Tg mouse; alternative mouse model

致癌性试验转基因替代模型 (alternative model) 是指非临床研究中用于短期或中期体内致癌性试验, 能够提供致癌性终点的转基因动物。1997 年发布的人用药品注册技术要求国际协调会 (The International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH) S1B<sup>[1]</sup> 指导原则中提及的转基因小鼠模型包括 p53 + / - 缺失模型、TgAC 模型、rasH2-Tg 模型、XPA 缺失模型等, 同年, 国

际生命科学学会 (International Life and Sciences institute, ILSI) 和健康与环境科学学会 (Health and Environment Science Institute, HESI) 联合发起了一项关于以上替代模型的验证性研究<sup>[2]</sup>。经比较, rasH2-Tg 模型表现出对人专属致癌物的高敏感性, 试验数据重复性高、稳定性好, 优于其他模型, 目前已被美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA)、中国国家药品监督管理局 (National Medical Products

**基金项目:** 国家重点研发计划资助项目 (No.2021YFC2302505); 建设医药科技成果转移转化公共服务平台项目 (No.2021019611)。

**作者简介:** 张佳珊, 女, 硕士研究生, 主要从事药物临床前安全性评价研究, email: zhangjiashan@joinn-lab.com \* 通信作者: 张素才, 男, 副研究员, 主要从事药物非临床安全性评价研究, email: zhangsucui@joinn-lab.com

Administration, NMPA)、欧洲专利药品委员会 (Committee for Proprietary Medicinal Products, CPMP)、日本厚生劳动省 (the Ministry of Health, Labor, and Welfare, MHLW) 等认可, 成为最常用的短期致癌性试验替代模型<sup>[3]</sup>。

在 2022 年公布的 ICHS1B (R1) 指导原则中, 该小鼠名称为 rasH2-Tg 小鼠, 日本实验动物中央研究所 (Central Institute for Experimental Animals, CIEA) 的官网名称为 CByB6F1-Tg (HRAS) 2Jic mice。该小鼠是由嵌入人源 *c-ha-ras* 三联基因的 C57BL6/J 小鼠与 BALB/C 小鼠杂交而来<sup>[4]</sup>, 得到的子代中杂合子为含转入基因的 rasH2-Tg (transgenic type, rasH2-tg 型) 小鼠, 纯合子为不含转入基因的 Non-rasH2-Tg (wild type, rasH2-wt 型)。虽然监管机构的技术指南或相关文献中有关于该模型的说明, 但除了在 ICHS1B (R1)<sup>[5]</sup> 中有关于高剂量选择的意见外, 其余指南均未提出具体的试验设计指导, 这给创新药物非临床致癌性试验设计带来了困难。

目前国内在长周期用药研发方面正处于上升期, 致癌性试验开展还不多, 良好实验室规范 (GLP) 条件下开展非临床 rasH2-Tg 小鼠致癌性试验的经验更为稀缺, 虽然国内已有少数实验室具有开展该类试验的经验, 但是普遍来看国内对短期致癌性试验的认识不足。因此, 总结 rasH2-Tg 小鼠 26 周致癌性试验设计要点十分重要。

在 2013—2022 年, 美国 FDA 的药品审评中心 (Center for Drug Evaluation and Research, CDER) 审批通过了 428 项新药上市, 其中有 51 项新药进行了 rasH2-Tg 小鼠 26 周致癌性试验, 51 项新药药物基本信息见表 1。通过对其公开资料的分析, 本文从剂量探索试验的设置、高剂量组的剂量选择依据与再评估、rasH2-Tg 小鼠起始给药周龄、阳性对照组的设置和检测指标设置几方面浅谈 rasH2-Tg 小鼠短期致癌性试验设计的基本要点。

## 1 试验设计要点

### 1.1 剂量探索试验的设置

剂量探索试验 (dose-range finding, DRF) 是指长周期试验前的先行试验, 通过进行 DRF 暴露药物毒性靶点, 寻找最佳给药剂量和间隔, 估算毒性代谢动力学的趋势和毒性反应发生频率<sup>[6]</sup>。使用转基因小鼠开展 26 周致癌性试验前, 开展 DRF 是十分必要的: 一方面由于药物在 rasH2-Tg 小鼠体内的毒性反应尚不明确, 前期试

验动物种属多为大鼠和犬, 且常用小鼠种系 ICR 小鼠、C57BL6/J 小鼠与 rasH2-Tg 小鼠的代谢相关性也有待进一步研究; 另一方面由于该转基因小鼠致癌性试验的周期长、使用的动物数多, 成本高, 因此进行 DRF 显得尤为重要。

表 1 的 51 项药物中, 31 项新药的 DRF 给药周期都在 4 周及以上 (其余 20 项未显示), 长于 4 周的试验周期是由于药物临床拟用间隔较长或需前期剂量爬坡建立动物耐受。致癌性试验的 DRF 试验可参考正式的重复给药毒性试验来设计; 也可在 DRF 试验开展前进行更短周期的预试验, 以探索 DRF 的剂量, 预试验周期在一周或两周。

与正式试验主研究组使用 rasH2-Tg 小鼠不同, DRF 使用的动物为 rasH2-wt 型小鼠, 研究显示 rasH2-wt 型小鼠与 rasH2-Tg 型小鼠在生化指标、器官重量和药物代谢上几乎没有差别<sup>[7]</sup>。在 51 项新药的申报资料中, 设有 rasH2-Tg 小鼠对照组的 DRF 试验结果显示: rasH2-wt 型小鼠与 rasH2-Tg 型小鼠在药物代谢和一般毒性反应上没有显著性差别, 由此认为使用 rasH2-wt 小鼠预测正式试验是可行的。DRF 试验结果可为正式致癌性试验高剂量的选择提供依据, 但能否以 rasH2-wt 小鼠的体重变化作为判定条件还存在一些争议<sup>[8]</sup>: 一方面, 该小鼠多为进口所得, 长途长时间运输后, 在 4 周的试验周期内有较长的适应期或应激波动, 观察到的体重改变不一定是药物毒性所致; 另一方面, 由于 rasH2-wt 小鼠较同窝 rasH2-Tg 小鼠平均体重略大<sup>[7, 9]</sup>, 仅体重指标不能完全代表正式致癌性试验中的 rasH2-Tg 小鼠; 此外, 一些有减重效果的药物 (如降糖药、减脂药) 在高剂量下有放大的药效作用, 药效引起的 DRF 体重变化被误认为是毒性反应会导致高剂量选择偏低而不能达到充分暴露。基于以上, 以 DRF 试验动物体重改变作为高剂量判定依据时还需综合其他指标或前期试验毒性反应结果。此外, 毒性代谢动力学分析在 DRF 中十分重要, 供试品原药和 / 或其代谢物在体内的暴露量决定了 rasH2-Tg 正式试验的剂量。

### 1.2 高剂量组的剂量选择依据与再评估

致癌性试验高剂量的选择应该在指导原则的要求下进行综合考虑。ICHS1C (R2)<sup>[10]</sup> 中关于致癌性试验高剂量的选择依据包括: 基于毒性改变, 以死亡率、临床症状、体重变化或体重增长量的变化及组织病理学异常为参照设置的最大耐受剂量 (maximum tolerated dose, MTD); 基于血液中药物暴露倍数, 50 倍血浆暴露量比值 (啮齿动物:

表 1 2013—2022 年 FDA/CDER 审批通过的进行 rasH2-Tg 小鼠致癌性试验的药物基本信息

Tab 1 Information of drugs approved by FDA/CDER in 2013 to 2022

NDA/ BLA 编号	通用名	药物类型	适应证
125469	度拉糖肽 (dulaglutide)	胰高血糖素样肽 (GLP)-1 受体激动剂	2 型糖尿病
761033	瑞利珠单抗 (reslizumab)	IL-5 单抗	哮喘
022247	雌激素 / 巴多昔芬 (estrogens/bazedoxifene)	复方 / 含共轭雌激素和巴多昔芬	绝经后骨质疏松
204370	卡利拉嗪 (cariprazine)	非典型抗精神病药物	精神分裂症和抑郁症
204569	苏沃雷生 (suvorexant)	选择性食欲素 1/2 受体拮抗剂	失眠症
205552	依鲁替尼 (ibrutinib)	布鲁顿氏酪氨酸激酶 (BTK) 抑制剂	套细胞淋巴瘤
206038	依伐卡托 / 鲁马卡托 (ivacaftor/lumacaftor)	囊性纤维化跨膜电导调节剂 (CFTR) 增强剂	囊性纤维化
206619	奥比替韦 / 帕利普韦 / 达塞布韦 (ombitasvir /paritaprevir/dasabuvir)	NS5A 抑制剂 / NS3 蛋白酶抑制剂 / NS5B 非核苷类 抑制剂	抗丙型肝炎病毒
206843	达卡他韦 (daclatasvir)	HCVNS5A 抑制剂	抗丙型肝炎病毒
207924	巴瑞替尼 (baricitinib)	JAK 抑制剂	中度至重度类风湿关节炎
207988	雷西纳德 (lesinurad)	尿酸再吸收抑制剂	痛风相关高尿酸血症
208051	来那替尼 (neratinib)	Her2 抑制剂	乳腺癌
208325	伊特卡肽 (etelcalcetide)	钙感受受体激动剂	血液透析慢性肾脏病 (CKD) 成年患者 继发性甲状旁腺功能亢进
208623	米加司他 (migalastat)	$\alpha$ 半乳糖苷酶 A	法布里病
208712	帕克替尼 (pacritinib)	JAK2 和 FLT3 抑制剂	骨髓纤维化
208794	特罗斯他乙酯 (telotristat ethyl)	色氨酸羟化酶 (TPH) 抑制剂	成年患者类癌综合征腹泻
209241	talbenazine	囊泡单胺转运体 2 (VMAT2) 抑制剂	成人迟发性运动障碍
210251	比替替拉韦 (bictegrovir)	整合酶链转移抑制剂 (INSTI) / 核苷类似物逆转 录酶抑制剂 (NRTIs)	抗艾滋病
210491	替扎卡托 / 依伐卡托 (tezacaftor/ivacaftor)	CFTR 蛋白构象修饰剂或稳定剂 / 囊性纤维化跨膜 电导调节剂 (CFTR) 增强剂	囊性纤维化
210806	加多拉韦林 (doravirine)	非核苷逆转录酶抑制剂	抗艾滋病
210922	patisiran	抗 TTR mRNA 的 siRNA	遗传性转甲状腺素介导的淀粉样变性 hATTR 患者神经损伤
211150	替洛利生 (pitolisant)	H3 受体拮抗剂	成年发作性睡眠患者的白日过度嗜睡
211172	transthyretin	甲状腺素转运蛋白 hTTR 反义寡核苷酸	遗传性甲状腺素介导的淀粉样变性导 致神经损伤
211280	拉米地坦 (lamiditan)	血清素 1F 受体激动剂 (5-HT)	急性治疗偏头痛
211281	乳糖醇 (lactitol)	容积型泻药	慢性特发性便秘
215888	奥特康唑 (oteseconazole)	抗真菌药	外阴道念珠菌复发
211675	乌帕替尼 (upadacitinib)	JAK 抑制剂	中重度类风湿关节炎
211801	替那帕诺 (tenapanor)	钠氢交换 3 抑制剂 (NHE3)	便秘型肠易激综合征
211810	培西达替尼 (pexidartinib)	激酶抑制剂	腱鞘巨细胞瘤
211964	维洛沙嗪 (viloxazine)	去甲肾上腺素再摄取抑制剂	注意缺陷多动障碍
212028	莱博雷生 (lemborexant)	食欲素受体拮抗剂	失眠症
212161	氯苯唑酸 (tafamidis)	转甲状腺素蛋白稳定剂	转甲状腺素介导的淀粉样变性引起的 心脏病
212273	elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor + ivacaftor	TBD/TBD/CFTR 增效剂	囊性纤维化
212327	菲卓替尼 (fedratinib)	激酶抑制剂 (JAK2、FLT3)	中度或高危骨髓纤维化
212839	森巴考特 (cenobamate)	抗惊厥药 (钠通道阻滞剂, GABAA 正向调节剂)	局灶性癫痫发作
212950	福斯特沙韦 (fostemsavir)	HIV-1 附着抑制剂	抗艾滋病
213137	伏塞洛托 (voxeloto)	血红蛋白 S 聚合抑制剂 Hgb S	镰状细胞贫血
213378	奥氮平 + 沙米多芬 (olanzapine + samidorphan)	选择性单胺拮抗剂和选择性 $\mu$ 阿片受体拮抗剂	精神分裂症和双相障碍
213535	利斯普兰 (risdiplam)	SMN2 拼接修饰体	脊髓性肌肉萎缩
213871	阿布西替尼 (abrocitinib)	JAK1 抑制剂	难治性中重度特应性皮炎



续表 1

NDA/ BLA 编号	通用名	药物类型	适应证
214012	英克司兰 (inclisiran)	合成 siRNA	家族性杂合子高胆固醇血症或其他高脂血症性心血管疾病
214094	贝罗司他 (berotralstat)	激肽释放酶抑制剂	遗传性血管水肿
214662	氯马昔巴特 (maralixibat)	钠依赖型胆汁酸转运蛋白抑制剂	Alagille 综合征所致的胆汁淤积性瘙痒
214916	difelikefalin	外周选择性 $\kappa$ 阿片受体激动剂	CKD 透析期间相关的中重度瘙痒
214958	氩可来西替尼 (deucravacitinib)	激酶 TYK2 抑制剂	中重度斑块银屑病
214985	达利雷生 (daridorexant)	食欲素受体阻滞剂	成人失眠
214998	玛伐凯泰 (mavacamten)	选择性可逆心肌球蛋白抑制剂	梗阻性肥厚型心脏病
215866	替尔泊肽 (tirzepatide)	GLP-1 和 GIP 双靶点激动剂	2 型糖尿病

人)作为参考依据的药代动力学指标;基于生物利用度的吸收饱和量;药效学指标;药物治疗窗较宽时使用的最大可行剂量(maximum feasible dose, MFD)和动物实验限度剂量。此外,一些 rasH2-Tg 小鼠致癌性试验以供试品致死剂量的 1/3 作为试验的高剂量,这一选择也受到监管机构的认可。所有的选择依据都体现了“充分暴露”这一原则,但由 DRF 试验结果得到的 MTD 作为首选早已达成科学共识, FDA 毒理学指南 Redbook 2000<sup>[11]</sup> 中推荐 MTD 作为高剂量的选择依据,经济合作与发展组织(Organization for Economic Cooperation and Development, OECD)致癌性指导文件 Test Guide 451 (TG451)<sup>[12]</sup> 中要求选择能引起如抑制体重增加(与阴性对照组相比约 10%)等不影响动物预期寿命的毒性反应最高剂量水平,这与 MTD 的设定条件一致<sup>[12]</sup>。51 项新药中有 27 项明确选择 MTD 作为 rasH2-Tg 小鼠 26 周致癌性试验高剂量,有 5 项注明参考 MFD 作为高剂量(其余 19 项药物选择指标在申报资料中未见明确信息),其他依据(基于血液中药物暴露倍数,50 倍血浆暴露量比值,基于生物利用度的吸收饱和量,药效学指标)在剂量选择中也具有一定的参考价值。

致癌性试验的终点是指与供试品相关的肿瘤性病变,而试验中的一般毒性反应体现了致癌性试验的暴露有效性。为验证致癌性试验设计的科学性和试验数据有效性,研究人员应在致癌性试验结束时,通过分析包括死亡率、临床症状、体重变化、非肿瘤性病变和血药浓度在内的试验结果再评估剂量设计。

**1.2.1 死亡率** 致癌性试验中的死亡率指发现非预期死亡和濒死安乐死的动物数量占比。我们认为高剂量组动物死亡率的轻微上升可以看作是剂

量达到了充分暴露这一要求的表现,但高剂量组动物死亡率过高时,不仅要评估其对数据统计的影响,而且要考虑过高的剂量是否会造成假阳性率升高而影响结果判断。

**1.2.2 临床症状** 药物的一般毒性反应靶点在重复给药毒性试验中已有研究,出现一般毒性反应症状是体内暴露量达到毒性剂量的直接体现,在致癌性研究中,需要区分实验系统出现的异常临床改变是由供试品毒性反应引起还是由肿瘤继发性改变引起,或是否属于偶发症状。在致癌性试验中首次发现的异常临床改变应给予足够的重视,必要时需针对该症状开展追加调查。

**1.2.3 体重变化** 体重是实验动物生长状况的综合体现,体重的异常包括体重降低或体重增长量的降低,过低的体重会影响动物正常寿命,这是剂量设置过高的体现。Tenapanor (NDA 编号 211801)<sup>[13]</sup> 的 rasH2-Tg 小鼠 26 周致癌性试验中高剂量组由于雄性动物体重与阴性对照组相比降低超过 40%,预测继续给药会导致高剂量组雄性动物大量死亡,因此对高剂量雄性动物进行剂量调整,在第 99 日由原来的剂量 165 mg/(kg·d) 调整到了 110 mg/(kg·d)。

**1.2.4 非肿瘤性病变** 在 51 项新药中常见的与供试品相关的非肿瘤性病变有肝细胞肥大、空泡化、坏死以及脾脏重量增加或降低等,高剂量组这些轻微到轻度的异常足以证明 MTD 选择合理有效。研究人员在评估非肿瘤性病变时,建议从以下几个方面考虑:① 是否属于 rasH2-Tg 小鼠背景性病变;② 是否已在本品的其他一般毒理学试验中有相关发现;③ 是否属于肿瘤继发性病变;④ 是否会对临床试验产生影响。

**1.2.5 血药浓度** 在 ICHS1C 中并未对转基因小鼠的体内暴露量倍数给出建议,仅是要求两年致癌

性试验的暴露倍数不少于 25 倍。在转基因小鼠致癌性试验中,若以上毒性反应指标均无异常,可结合毒性代谢动力学数据或组织分布结果考察代谢和体内暴露以评价剂量水平合理性。rasH2-Tg 小鼠 26 周致癌性试验伴随进行毒性代谢动力学试验的目的—为得到 GLP 条件下药物代谢趋势,二为确认 MTD 剂量下动物的体内暴露,ICH S1B (R1)<sup>[5]</sup>中认为 rasH2-Tg 小鼠给予高剂量时体内暴露量达到 50 倍人的血浆暴露比值符合充分暴露。

### 1.3 rasH2-Tg 小鼠起始给药周龄

FDA、OECD、美国国家环境保护局 (U.S. Environmental Protection Agency, EPA) 等机构相关指导文件均建议啮齿类动物起始给药周龄在 8 周龄及以前,并遵循离乳后经检疫或适应期后尽早开始的原则<sup>[11-14]</sup>。小鼠 6~8 周龄已达性成熟期,器官发育成熟,生理生化指标稳定。转基因小鼠致癌性试验动物起始给药周龄受到离乳后基因型检测、国际运输、出入境检疫、rasH2-Tg 小鼠自发肿瘤等多重制约:一方面,小鼠出生后 20~21 d 离乳,之后通过 RT-PCR、Northern 杂交、Western blot 及免疫组化等方法检测人源 *ras* 基因表达<sup>[15]</sup>,确定转基因座位与标准遗传概貌完全一致<sup>[16]</sup>,区分杂合子 rasH2-Tg 小鼠和纯合子 rasH2-wt 小鼠,长途运输后进入机构通过检疫期并适应环境。由于长距离运输后动物容易应激,建议观察和环境适应时间在 1~2 周;另一方面,rasH2-Tg 小鼠在 34 周龄之后一些自发肿瘤发生率升高,影响试验结果的判断<sup>[17]</sup>。小鼠自发肿瘤主要与周龄有关,周龄越大,自发肿瘤发生率越高。rasH2-Tg 小鼠致癌性试验给药周期长达 26 周,由于前后限制因素,给药起始周龄建议选择在 8 周龄及之前。

### 1.4 阳性对照组的设置

小的基因群体中由于动物生育数量不同导致基因型频率波动的现象称为遗传漂变 (genetic drift)<sup>[18]</sup>。转基因小鼠需要同时关注遗传漂变和转入的基因功能是否丧失,因此有必要设置阳性对照组以帮助判断实验体系是否满足科学性。致癌性试验的阳性对照组试剂应选择具有明确致癌效应的遗传阳性物。已有研究中使用同时对人和啮齿类动物有致癌作用的 *N*-甲基-*N*-亚硝基脲 (MNU) 和尿烷建立啮齿类动物胃癌、乳腺癌、前列腺癌等模型<sup>[19-20]</sup>。MNU 单次腹腔注射剂量 75 mg/(kg·d) 即可引起动物患肿瘤概率升高,诱发肿瘤,以恶性淋巴瘤、胃乳头状瘤较多;尿烷给药剂量一般选择 1000 mg/(kg·d),隔日给

药一次,共腹腔注射 3 次,诱发上皮异常增生和腺瘤的概率较大<sup>[20]</sup>。51 项新药 26 周致癌性试验结束时,阳性对照组动物死亡率最高可达 100%;注明阳性对照品选择的共 44 项,其中 29 项选择 MNU,15 项选择尿烷;阳性对照组的动物数量在每种性别 10~25 只,其中每种性别 10 只占 46%,15 只占 31%,其他占 23%。

### 1.5 检测指标设置

致癌性试验除了常规检查指标,如一般临床观察、详细临床观察、体重、摄食量等项目外,还要有针对肿瘤的触诊检查,以及针对不同的供试品特性设置的非常规指标,如激素水平检测、免疫原性等,帮助评估剂量水平合理性<sup>[21]</sup>。血涂片是检查血液细胞形态学的样本,rasH2-Tg 小鼠致癌性试验需制备血涂片,可在经组织病理学评估有造血系统肿瘤的情况下进行辅助诊断<sup>[22]</sup>。

检测指标中组织病理学死亡原因分析是进行肿瘤统计学检测的前提,为帮助解释死亡原因,致癌性试验组织学检查部位要求详尽且有代表性<sup>[23]</sup>。致癌性试验使用的动物数多,镜下检查范围广,因此病理检查的工作量大、时间久,而致癌性试验要求在上市前完成,关注度高,研究压力大,取材检查部位过多会增加技术难度、拖延试验进度<sup>[24]</sup>。2003 年美国毒理学会 (STP)<sup>[23]</sup>给 FDA 关于致癌性试验的病理检查清单中建议在欧洲和日本监管机构检查部位的基础上删去如咽、喉、视神经、输卵管、输尿管、鼻腔、凝固腺等部位,理由是这些脏器极少见供试品致癌相关性、不具有所在生理系统代表性或病发即可见于临床观察等。哈氏腺、前胃、Zymbal's 腺等是大小鼠特有的解剖学结构,与人体安全学的相关性有待研究<sup>[25]</sup>。FDA<sup>[11]</sup>、OECD<sup>[12]</sup>和 CDE<sup>[26]</sup>建议取材部位和 STP 建议取材清单见表 2。

组织样本的病理学评估是致癌性试验的关键部分,包括专题病理学家的诊断结果和同行评议病理学家的评审结果。专题病理学家诊断致癌性试验中动物组织或器官的异常改变并出具病理学报告,具有同行评议资格的病理学家进行同期或回顾性病理学同行评议 (pathology peer review),保证病理结果和病理学报告的质量<sup>[27]</sup>。虽然同行评议不是 GLP 研究的必需项,但是各国 GLP 法规中均有提及,并且在 2019 年 FDA 颁布《非临床毒理学研究病理学同行评议指南草案:Q&A》<sup>[28]</sup>中规范了病理学同行评议的管理和实施,进一步强调了同行评议在安全性评价研究中的重要性。我



表 2 FDA、OECD、CDE 的指导原则关于病理检查部位的建议及 STP 推荐病理检查部位清单

Tab 2 Recommended list for histopathologic examination in FDA guidelines, OECD test guidelines, CDE guidelines and STP proposal

指导原则或建议	病理检查部位
FDA: 红皮书 2000 啮齿类致癌性研究	肾上腺、主动脉、脑(至少 3 个水平)、盲肠、结肠、十二指肠、子宫和子宫颈、附睾、食管、眼、胆囊(如果有)、哈氏腺、心脏、肾脏、回肠、空肠、肝脏、肺脏(附支气管)、淋巴结(一个与给药途径相关,一个在较远距离)、乳腺、卵巢和输卵管、胰腺、垂体、前列腺、唾液腺、精囊(如果有)、皮肤、骨骼肌、脊髓(3 个部位:颈椎、中段胸椎、腰椎)、脾脏、胃、睾丸、甲状腺/甲状旁腺、气管、膀胱、阴道、所有大体观察到的异常、骨(股骨)、骨髓(胸骨)、直肠、鼻甲、坐骨神经、胸腺(如果有)、Zymbal's 腺
OECD: 致癌性研究 Test No.451	肾上腺、主动脉、脑(包括大脑、小脑和脑髓/脑桥的切片)、盲肠、结肠、十二指肠、子宫(包括子宫颈)、附睾、食管、眼(包括视网膜)、胆囊(大鼠除外)、哈氏腺、心脏、肾脏、回肠、空肠、肝脏、肺脏、淋巴结(包括浅表和深处)、乳腺(雌性必须取,如果雄性可以操作的话也取)、卵巢、胰腺、垂体、前列腺、唾液腺、精囊、皮肤、骨骼肌、脊髓(3 个部位:颈椎、中段胸椎、腰椎)、脾脏、胃(前胃,腺胃)、睾丸、甲状腺和甲状旁腺、气管、膀胱、阴道、所有大体损伤、带关节的股骨、骨髓切片及/或新鲜骨髓抽吸术胸骨、直肠、上呼吸道,包括鼻、鼻甲和鼻窦、外周神经、凝固腺、牙齿、舌头、输尿管、尿道、嗅球、泪腺(exorbital)
CDE: 重复给药的指导原则	肾上腺、主动脉、脑(至少 3 个水平)、盲肠、结肠、十二指肠、子宫和子宫颈、附睾、食管、眼、胆囊、哈氏腺、心脏、肾脏、回肠、空肠、肝脏、肺脏(附支气管)、淋巴结(一个与给药途径相关,一个在较远距离)、乳腺、卵巢和输卵管、胰腺、垂体、前列腺、唾液腺、精囊(如果有)、皮肤、骨骼肌、脊髓(3 个部位:颈椎、中段胸椎、腰椎)、脾脏、胃、睾丸、甲状腺(含甲状旁腺)、气管、膀胱、阴道、所有大体观察到的异常组织、骨(股骨)、骨髓(胸骨)、直肠、鼻甲、坐骨神经、胸腺(或胸腺区域)
STP: 长期毒性和致癌性试验病理学检查内容推荐目录	肾上腺、主动脉、脑、盲肠、结肠、十二指肠、子宫、附睾、食管、眼、胆囊、哈氏腺、心脏、肾脏、回肠、空肠、肝脏、肺脏、淋巴结、乳腺、卵巢、胰腺、垂体、前列腺、唾液腺、精囊、皮肤、骨骼肌、脊髓、脾脏、胃、睾丸、甲状腺和甲状旁腺、气管、膀胱、阴道、其他有大体损伤的器官、骨和骨髓、组织切块、外周神经、胸腺

们建议国内致癌性试验均进行同行评议,原因是致癌性试验根据组织病理学检查结果评价细胞在形态学上是否发生肿瘤性改变,从而判断有无致癌潜力,病理学结果的准确性是判断的关键,同行评议主要是确保病理学诊断术语的准确性和一致性,确保病理学检查的完整性,确认剂量选择的合理性,进而确保病理学报告解释的正确性<sup>[29]</sup>。

## 2 综合试验结果判断实验体系是否成立

根据国标 GB/T 35823—2018 中关于实验动物质量的标准,使用基因修饰的动物应明确其遗传背景<sup>[30]</sup>, rasH2-Tg 小鼠转入研究机构前已完成基因型鉴定,但需要在 26 周致癌性试验中进一步确定其转入基因的表达情况,主要是基于阴性组和阳性对照组动物的死亡率和肿瘤发生情况。根据 Nambiar 等<sup>[31]</sup>在 2012 年进行的 rasH2-Tg 小鼠自发病变研究, rasH2-Tg 小鼠致癌性试验阴性组动物死亡原因包括自发性肿瘤、非肿瘤性病变造成的死亡及其他原因死亡,阴性对照组动物经 26 周试验后存活率在 92% ~ 100%,平均存活率在 95% 以上,本文中 51 项新药致癌性研究中阴性组动物平均存活率为 96%。根据背景数据<sup>[32-33]</sup>,阴性组动物死亡原因及概率见表 3。阳性组动物的死亡原因与阳性对照品诱导的肿瘤性病变有关,51 项新药中阳性组动物平均死亡率在 80% 以上。肿瘤发生情况包括肿瘤发生类型及发生率。阴性

表 3 rasH2-Tg 小鼠 26 周致癌性试验结束时阴性对照组动物死亡原因及概率

Tab 3 Mortality and percentage of animals in negative control groups at the end of 26-week carcinogenicity test of rasH2-Tg mice

死亡原因	概率 /%	
	雄性	雌性
肿瘤性病变	1.5	2.2
非肿瘤性病变	1.5	0.27
其他原因死亡	0.3	2.2

对照组动物常见自发肿瘤类型及概率见表 4。肿瘤发生情况方面,上文提及尿烷与 MNU 的诱发肿瘤类型稍有不同,使用 MNU 诱发 rasH2-Tg 小鼠肿瘤的研究较多,常见诱发肿瘤类型及发生率见表 5。

表 4 rasH2-Tg 小鼠 26 周致癌性试验过程中阴性对照组动物常见自发肿瘤类型及概率

Tab 4 Spontaneous tumor and its percentage in rasH2-Tg mice during 26-week carcinogenicity test in negative control group

常见自发肿瘤类型	概率 /%	
	雄性	雌性
肺癌 / 肺腺瘤	7.4	7.4
血管瘤 / 血管肉瘤	5.5	5.2
胃癌 / 胃乳头状瘤	2.6	2.3
皮肤乳头状瘤	1.4	1.1

表 4 中的 rasH2-Tg 小鼠的背景数据显示自发概率最高的是肺部肿瘤,其次是血管瘤和血管肉瘤,但是这些自发性病变在不同研究中的数据差



表 5 MNU 腹腔注射给予 rasH2-Tg 小鼠 26 周常见诱发肿瘤类型及概率

Tab 5 Common tumor and its percentage induced by intraperitoneal injection of MNU in rasH2-Tg mice in 26-week carcinogenicity test

常见诱发肿瘤类型	概率 /%	
	雄性	雌性
胃鳞状细胞乳头状瘤	71.3	63.2
淋巴瘤	65.5	66.7
皮肤乳头状瘤	29.9	46.0
肺癌	8.0	18.4
脾血管肉瘤	3.4	4.6

异性很大,且发生情况十分复杂:血管瘤在不同组织中表现出相似的特点,但不同类型的血管瘤发生率有差别;肺部肿瘤细胞形态学区别较大,分布情况不同,出现的概率也差别较大<sup>[34]</sup>。根据对照组背景数据和试验结果判定的实验动物体系可以帮助排除供试品主研究组中出现的假阳性结果,这也是致癌性试验总结报告的重要部分。

### 3 讨论

rasH2-Tg 小鼠作为皮肤致癌性试验短期替代模型的研究也在开展。在此之前 TgAC 小鼠曾作为皮肤给药致癌性研究的替代动物,但研究发现 TgAC 小鼠具有假阳/阴性率高、与人组织相关性不明等缺点,目前已经不再使用<sup>[33]</sup>。Suguro 等<sup>[34]</sup>使用能特异性诱导小鼠肺部肿瘤的化学致癌物 1, 2-二氯乙烷经皮给予 rasH2-Tg 小鼠 26 周致癌性试验,肿瘤发病率达到 100%,证明了该小鼠模型也可以考虑用于皮肤给药途径的致癌性试验。另外阳性对照品对 rasH2-Tg 小鼠的高肿瘤诱导率让研究人员发现了该品系建立疾病模型的可能。目前一些实验使用了 rasH2-Tg 小鼠进行肺部肿瘤的研究, Teruaki 等<sup>[35]</sup>借助该品系建立了化学诱导的肺癌疾病模型,用于临床前评估抗肿瘤药物药效。

随着我国医药产业的发展,临床拟用时长在 6 个月以上的创新性药物正被不断开发。致癌性试验一般在 II 期临床完成后开始,上市前完成,完成一项两年致癌性试验需要 3~4 年的时间<sup>[36]</sup>,而进行一项 rasH2-Tg 小鼠 26 周致癌性试验仅大约需要 1.5 年时间。目前 rasH2-Tg 小鼠致癌性试验仍作为两年致癌性试验的附加试验,但 51 项药物中有因大鼠非相关种属经过风险评估后使用 rasH2-Tg 小鼠致癌性研究材料申报上市的例子<sup>[37]</sup>,这说明 rasH2-Tg 小鼠在解释药物致癌风险方面的权重在增加。

尽管 rasH2-Tg 小鼠不尽完善,但其对致癌物质更加敏感<sup>[38]</sup>,暴露时间远小于人体的终生暴

露;与两年啮齿类动物致癌性试验相比, rasH2-Tg 小鼠试验周期短,试验结束时动物的周龄较小,因此可以排除一些老年病对结果分析的干扰;26 周试验节省供试品约 90%,动物设施和饲养成本节约 75%,这大大降低了临床前试验的成本,减轻了创新药申报的压力。总体而言,致癌性试验相较其他临床前试验周期长、难度大,更需要经过严谨的设计、严密的监控和合理的分析才能支持药物临床研究或上市申请。

### 参考文献

- [1] International Conference on Harmonization (ICH). S1B: Guidance for industry: testing for carcinogenicity of pharmaceuticals [EB/OL]. 1997.
- [2] Robinson DE, Macdonald JS. Background and framework for ILSI's collaborative evaluation program on alternative models for carcinogenicity assessment [J]. Toxicol Pathol, 2001, 29 (1): 13-19.
- [3] 杨艳伟,刘魁苏,吕建军,等.我国临床前药物致癌试验转基因动物模型研究进展 [J]. 中国药事, 2019, 33 (8): 880-886.
- [4] Urano K, Tamaoki N, Nomura T. Establishing a laboratory animal model from a transgenic animal: rasH2 mice as a model for carcinogenicity studies in regulatory science [J]. Vet Pathol Suppl, 2012, 49 (1): 16-23.
- [5] International Conference on Harmonization (ICH). S1B (R1): Guidance for industry: testing for carcinogenicity of pharmaceuticals [EB/OL]. 2022.
- [6] 彭健. 创新性药物非临床安全性评价的基本要点 [J]. 中国新药杂志, 2010, 19 (24): 2261-2266.
- [7] Hiroshi K, Zen-yo T, Yoshimasa I, et al. Historical background data in CB6F1-Tg-rasH2 mice and CB6F1-nonTg-rasH2 mice over a 26-week experimental period [J]. J Toxicol Pathol, 2003, 16 (4): 267-274.
- [8] Paranjpe MG, Belich J, Vidmar TJ, et al. rasH2-Tg mice and not CByB6F1 mice should be used for 28-day dose range finding studies prior to 26-week rasH2-Tg carcinogenicity studies [J]. Int J Toxicol, 2017, 36 (4): 287-292.
- [9] 刘魁苏,魏杰,王辰飞,等. CB6F1-Tg (HRAS) Nifdc 小鼠与 CByB6F1-Tg (HRAS) 2Jic 小鼠的脏器及血液生理指标测定与比较分析 [J]. 实验动物科学, 2021, 38 (3): 636-640.
- [10] International Conference on Harmonization (ICH). S1C (R2): Guidance for industry: dose selection for carcinogenicity studies of pharmaceuticals [S]. 1997.
- [11] U. S. Food and Drug Administration. FDA Guidance for industry: toxicological principles for the safety assessment of food ingredients [EB/OL]. [July 2007].
- [12] OECD (2018). "Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies (OECDTG 451-3)", in Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, OECD Publish-

- ing, Paris [EB/OL]. [September 2018].
- [13] FDA ( Food and Drug Administration ): label for Tena-panor. ( EB/OL ) U. S. 2013 [September 30, 2023]. 212801Orig1s000PharmR. pdf ( fda. gov ).
- [14] U. S. Environmental Protection Agency ( EPA ). Health Effects Test Guidelines: Combined Chronic Toxicity/ Carcinogenicity [EB/OL]. [August 1998].
- [15] Central Institute for Experimental Animals ( CIEA ). Strict quality control of the animals [EB/OL]. [June 29, 2023].
- [16] GB 14923-2022, 实验动物遗传质量控制 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2022.
- [17] Paranjpe MG, Elbekaei RH, Shah SA, et al. Historical control data of spontaneous tumors in transgenic CByB6F1-Tg ( HRAS ) 2Jic ( rasH2-Tg ) mice [J]. *Int J Toxicol*, 2013, 32 ( 1 ): 48-57.
- [18] Lynch M, Ackerman M, Gout JF, et al. Genetic drift, selection and the evolution of the mutation rate [J]. *Nat Rev Genet*, 2016, 17: 704-714.
- [19] Bosland MC, Schlicht MJ, Acevedo N, et al. Effects of perinatal exposure to bisphenol A on induction of prostate cancer in Sprague Dawley rats by MNU and testosterone [J]. *Toxicol*, 2023, 484: 153394.
- [20] Satoshi T, Yusuke K, Hironori T, et al. Gene expression analysis in the lung of the rasH2 transgenic mouse at week 4 prior to induction of malignant tumor formation by urethane and *N*-methylolacrylamide [J]. *J Toxicol Sci*, 2015, 40 ( 6 ): 685-700.
- [21] 张晶璇, 魏金锋, 叶向锋, 等. 新药致癌性试验研究注意事项 [J]. *中国新药杂志*, 2015, 24 ( 13 ): 1467-1470.
- [22] Jamie KY, Robert LH, Peter OB, et al. Best practices for clinical pathology testing in carcinogenicity studies [J]. *Toxicol Pathol*, 2011, 39 ( 2 ): 429-434.
- [23] Bregman CL, Adler RR, Morton DG, et al. Recommended tissue list for histopathologic examination in repeat-dose toxicity and carcinogenicity studies: a proposal of the society of toxicologic pathology ( STP ) [J]. *Toxicol Pathol*, 2003, 31 ( 2 ): 252-253.
- [24] 陈珂, 杜艳春, 邱爽, 等. 长期毒性和致癌性试验病理学检查内容推荐目录——美国毒性病理学会 ( STP ) 的建议 [J]. *现代预防医学*, 2009, 36 ( 6 ): 1136-1137.
- [25] 张素才, 谷玲玲, 姚大林, 等. 新药非临床安全性评价中啮齿动物致癌试验结果分析要点 [J]. *中国新药杂志*, 2018, 27 ( 23 ): 2755-2764.
- [26] 国家药品监督管理局. 药物重复给药毒性研究技术指导原则 [EB/OL]. 2014.
- [27] OECD: Guidance Document 116 on the Conduct and Design of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453: Second edition, OECD Series on Testing and Assessment, No. 116, OECD Publishing, Paris [EB/OL]. [September 2014].
- [28] U. S. Food and Drug Administration. Pathology peer review in nonclinical toxicology studies: questions and answers, guidance for industry. draft guidance [EB/OL]. [2019-07-31]/[2019-09-23].
- [29] Morton D, Sellers RS, Barale-Thomas E, et al. Recommendations for pathology peer review [J]. *Toxicol Pathol*, 2010, 38 ( 7 ): 1118-1127.
- [30] GB/T 35823-2018, 实验动物动物实验通用要求 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.
- [31] Nambiar PR, Turnquist SE, Morton D. Spontaneous tumor incidence in rasH2 mice: review of internal data and published literature [J]. *Toxicol Pathol*, 2012, 40 ( 4 ): 614-623.
- [32] Usui T, Mutai M, Hisada S, et al. CB6F1-rasH2 mouse: overview of available data [J]. *Toxicol Pathol*, 2001, 29 ( 1\_suppl ): 90-108.
- [33] Jacobs AC, Brown PC. Regulatory forum opinion piece: transgenic/alternative carcinogenicity assays: a retrospective review of studies submitted to CDER/FDA 1997—2014 [J]. *Toxicol Pathol*, 2015, 43 ( 5 ): 605-610.
- [34] Suguro M, Numano T, Kawabe M, et al. Lung tumor induction by 26-week dermal application of 1, 2-dichloroethane in CB6F1-Tg rasH2 mice [J]. *Toxicol Pathol*, 2017, 45 ( 3 ): 427-434.
- [35] Teruaki H, Takamasa N, Tomomi H, et al. Chemical-induced lung tumor in Tg-rasH2 mice: a novel mouse tumor model to assess immune checkpoint inhibitors combined with a chemotherapy drug [J]. *J Toxicol Pathol*, 2022, 35 ( 4 ): 321-331.
- [36] 张云, 李定洲, 黄芳华, 等. 啮齿类动物致癌性试验的关注要点 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38 ( 10 ): 1151-1160.
- [37] FDA ( Food and Drug Administration ): label for Patisiran [EB/OL]. U. S. 2013 [2023-11-14]. 210922Orig1s-000PharmR. pdf ( fda. gov ).
- [38] 高羚喻, 吴纯启, 廖明阳, 等. 药物中、短期致癌性试验的研究进展 [J]. *中南药学*, 2011, 9 ( 3 ): 231-233.

( 收稿日期: 2023-11-14; 修回日期: 2023-12-14 )

## 不同化学型樟树中萜类成分及药理活性的研究进展

俞静怡<sup>1</sup>, 胡文杰<sup>1\*</sup>, 罗辉<sup>2</sup>, 周升团<sup>1</sup>, 戴彩华<sup>2</sup> (1. 井冈山大学 生命科学学院, 江西 吉安 343009; 2. 井冈山大学 医学部, 江西 吉安 343009)

**摘要:** 5 种化学型樟树在医药、化工、香精香料等领域具有重要的价值, 这与其含有丰富的萜类成分密切相关。据统计, 在 5 种化学型樟树中已报道的萜类成分共有 184 种, 包括单萜 94 种、倍半萜 88 种和二萜 2 种, 这些萜类化合物中除了共有成分 7 种以外, 特有成分油樟型樟树有 18 种、脑樟型樟树有 7 种、芳樟型樟树有 27 种、龙脑樟型樟树有 41 种以及异樟型樟树有 25 种。5 种化学型樟树具有抗菌、抗炎、抗肿瘤和抗病毒等作用, 因此备受人们的关注。本文对近 30 年 5 种化学型樟树中萜类成分及药理活性研究进行总结分析, 并对其萜类化合物的药物开发进行讨论与展望, 以期对不同化学型樟树的深入研究与开发提供参考。

**关键词:** 樟树; 化学型; 萜类; 化学成分; 药理活性

中图分类号: R284, R285 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)08-2108-08  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.023

### Research progress in terpenoids and their pharmacological activities in different chemotypes of *Cinnamomum Camphora*

YU Jing-yi<sup>1</sup>, HU Wen-jie<sup>1\*</sup>, LUO Hui<sup>2</sup>, ZHOU Sheng-tuan<sup>1</sup>, DAI Cai-hua<sup>2</sup> (1. School of Life Sciences, Jinggangshan University, Ji'an Jiangxi 343009; 2. Faculty of Medicine, Jinggangshan University, Ji'an Jiangxi 343009)

**Abstract:** Different chemotypes of *Cinnamomum Camphora* have important medicinal values, and also in chemical industry, flavor and fragrance selection, which is closely related to their rich terpenoids. According to statistics, 184 terpenes have been reported in 5 camphor trees, including 94 monoterpenes, 88 sesquiterpenes and 2 diterpenes. In addition to 7 common components, there are also 18 cineol types, 7 cineol types, 27 linalol types, 41 bornecol types, and 25 isonerolidol types. The terpenes reported in different chemotypes of *Cinnamomum Camphora* mainly include monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes, most showing anti-bacterial, anti-inflammatory, anti-cancer, and anti-flu virus effects. Terpenoids of different chemotypes of *Cinnamomum Camphora* have attracted much attention. This review summarized terpenoids and their pharmacological activities in different chemotypes of *Cinnamomum Camphora* in the past 30 years and analyzed; the research and development of terpenoids was discussed to provide reference for further development of chemotypes of *Cinnamomum Camphora*.

**Key words:** *Cinnamomum Camphora* (L.) Presl; chemotype; terpenoid; chemical constituent; pharmacological activity

樟树是樟科樟属的一种常绿乔木, 可以存活多年, 广泛生长在中国长江以南, 其中台湾地区的数量最为丰富。根据樟树枝叶精油中所含主成分的不同, 可将其划分成油樟 (主含 1, 8- 桉叶

素)、脑樟 (主含樟脑)、芳樟 (主含芳樟醇)、龙脑樟 (主含右旋龙脑) 和异樟 (主含异橙花叔醇) 5 种化学型<sup>[1]</sup>。不同化学型樟树的划分有助于更好地认识和利用这一植物资源, 优化资源利用并

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (No.32160089); 江西省自然科学基金面上项目 (No.20232BAB205044; No.20181BAB204014); 江西省教育厅科学技术研究重点项目 (No.GJJ2201609)。

**作者简介:** 俞静怡, 女, 硕士, 主要从事生物技术与医药研究, email: 3401767339@qq.com \*通信作者: 胡文杰, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事植物研究开发利用研究, email: huwenjie2008@126.com



降低生产成本,进一步发挥樟树的经济和社会价值<sup>[2]</sup>。因此,深入了解不同化学型樟树对推动相关产业的发展具有重要意义。

目前,不同化学型樟树已报道的化学成分主要有挥发油、萜类、木脂素类、糖苷类、黄酮类等,其中挥发油萜类成分是特征成分,对其地理分布、亲缘关系及系统发育等研究具有重要参考意义。同时,该类成分是传统药材临床功效的物质基础,也是活性筛选的重要化学来源<sup>[3]</sup>。不同化学型樟树具有多种药理活性,如抗肿瘤<sup>[4]</sup>、抗菌<sup>[5]</sup>、抗病毒<sup>[6]</sup>等功效。基于此,本文就 30 年来 5 种化学型樟树的萜类成分及药理活性进行总结分析,并对其萜类化合物的药物开发进行探讨与展望,以期能为基于萜类化合物的新药发现和药物设计提供借鉴。

## 1 樟树中的萜类成分

### 1.1 不同化学型樟树中萜类成分种类数的比较

根据表 1 可知<sup>[7-34]</sup>,5 种不同化学型樟树共有萜类成分 184 种,包括单萜成分 94 种,倍半萜成分 88 种,二萜成分 2 种。这些成分中,油樟型共有萜类成分 58 种,其中单萜成分 43 种(链状单萜 12 种,环状单萜 31 种),倍半萜成分 15 种(链状倍半萜 1 种,环状倍半萜 14 种);脑樟型共有萜类成分 22 种,其中单萜成分 15 种(链状单萜 2 种,环状单萜 13 种),倍半萜成分 7 种(链状倍半萜 4 种,环状倍半萜 3 种);芳樟型共有 72 种,其中单萜成分 32 种(链状单萜 10 种,环状单萜 22 种),倍半萜成分 40 种(链状倍半萜 2 种,环状倍半萜 38 种);龙脑樟型共有萜类成分 80 种,其中单萜成分 45 种(链状单萜 9 种,环状单萜 36 种),倍半萜成分 34 种(链状倍半萜 1 种,环状倍半萜 33 种),二萜成分 1 种(链状二萜 1 种);异樟型共有萜类成分 67 种,其中单萜成分 29 种(链状单萜 5 种,环状单萜 24 种),倍半萜成分 37 种(链状倍半萜 2 种,环状倍半萜 35 种),二萜成分 1 种(链状二萜 1 种)。5 种不同化学型樟树中均具有的萜类化合物共 7 种,这 7 种化合物均属于环状单萜。

### 1.2 不同化学型樟树中萜类成分组成的差异

由表 1 可知,5 种不同化学型樟树中除了共有成分  $\alpha$ -蒎烯、 $\beta$ -蒎烯、 $\alpha$ -水芹烯、樟脑、萜品醇-4、 $\alpha$ -松油醇和  $\alpha$ -石竹烯外,还有各自化学型樟树特有成分。油樟型樟树特有成分有 18 种;脑樟型樟树有 7 种;芳樟型樟树有 27 种;龙脑樟型樟树有 41 种;异樟型樟树有 25 种。由此可见,5 种化学型樟树萜类化合物组成差异非常明显。在大多数情况下,不同的药材含有各自独特的有效成分,这些成分的不同导致了它们各自具有不同

的功效。因此,对于 5 种化学型樟树资源,应当区别对待,根据它们各自的特点进行综合开发利用,发挥出它们各自的优势,满足不同的需求。

### 1.3 不同化学型樟树中萜类的主要组成成分

樟树是一种具有多种化学型的植物,不同化学型樟树在萜类组成成分和特性上存在显著差异。这些差异主要源于它们的生物合成路径和基因型。如油樟主要含有 1,8-桉叶素,该成分具有强烈的油腻气味,因此油樟在香料和化妆品等领域有广泛的应用。脑樟主含樟脑,它具有清凉感和一定的刺激性,常用于药品和清凉油等领域。芳樟主含芳樟醇,具有强烈的香气,可利用其香气增强产品的感官体验。因此芳樟在相关产业中具有较高的经济价值。龙脑樟主含龙脑成分,具有强烈的刺激性,治疗一些疾病或抑制微生物的生长。异樟主含异橙花叔醇等成分,也具有独特的香味,在相关产业中具有较高的经济价值。

## 2 不同化学型樟树药理活性

### 2.1 抗菌作用

不同化学型樟树具有一定的抑菌效果。丁雄等<sup>[18]</sup>发现,龙脑樟鲜叶中的挥发油及其主要成分右旋龙脑对细菌、酵母菌和霉菌都具有抗菌效果。而杨鹏飞等<sup>[25]</sup>则进一步研究了其挥发油的抗烟草花叶病毒(TMV)活性以及对烟曲霉、白念珠菌的抑制作用,首次报道了挥发油的抗 TMV 活性,并发现其对烟曲霉和白念珠菌有显著抑制作用。胡文杰等<sup>[34]</sup>从油樟叶中得到了芳姜黄酮和 3S-(+)-9-氧代橙花叔醇 2 个倍半萜化合物,并测定了其抗百合尖孢镰刀菌的活性。尹浩等<sup>[35]</sup>研究显示,利用酶辅助溶剂萃取、酶辅助水蒸气蒸馏和酶辅助同时蒸馏萃取法提取的油樟油对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌均有较好的抗菌效果,而超临界流体萃取提取的油樟油抗菌效果较差。郑红富等<sup>[11]</sup>研究结果表明,芳樟精油表现出对水稻纹枯病菌的显著抑菌活性,在 500、250 和 125  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的质量浓度下,其抑制率分别为 100%、90.88% 和 67.94%。林雅慧<sup>[36]</sup>研究发现芳樟油对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、肺炎链球菌、铜绿假单胞菌、溶血性链球菌有显著的抗菌活性,其中以气相熏蒸法抗菌能力更为明显。此外,芳樟醇具有很好的抗菌性能,对于致龋菌具有显著的抑制作用,因此,可以作为牙膏或漱口液的有效成分。然而,需要注意的是芳樟醇应控制在  $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  以下以保证安全性<sup>[37]</sup>。胡文杰等<sup>[24]</sup>曾用异樟叶精油对尖孢镰刀菌、七叶树壳梭孢和拟茎点霉进行抑菌活性研究,但具体异樟叶精油中哪种物质对其有抑菌效果,还有待进一步研究。Chavan 等<sup>[38]</sup>研究发现从异樟精油

表 1 不同化学型樟树萜类化学成分

Tab 1 Chemical constituents of terpenoids from different chemical types of *Cinnamomum Camphora*

类别	序号	化学成分	化学式	不同化学型					参考文献
				油樟型	脑樟型	芳樟型	龙脑樟	异樟	
链状单萜	1	香叶烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	✓	—	✓	✓	—	[7, 10, 25]
	2	芳樟醇	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	✓	—	✓	✓	✓	[7-18]
	3	橙花醇	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	✓	✓	—	—	—	[7]
	4	橙花醛	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	✓	—	✓	—	—	[7, 10, 19-20]
	5	β-罗勒烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	✓	—	✓	—	✓	[8-10, 16]
	6	乙酸-4-松油烯醇酯	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	✓	—	—	—	—	[8]
	7	异丁酸芳樟酯	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	✓	—	—	—	—	[8]
	8	β-月桂烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	✓	—	—	✓	—	[17-18, 21]
	9	罗勒烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	✓	—	—	✓	✓	[13, 15, 22-25]
	10	香叶烯醇	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	✓	—	—	—	—	[26]
	11	牻牛儿醛	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	✓	✓	✓	—	—	[10, 19-20]
	12	(2, 6-二甲基-3, 7-辛二烯)-2, 6-二醇	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	—	—	✓	—	—	[9]
	13	香茅醇	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O	—	—	✓	—	—	[10]
	14	香叶醇 1	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	—	—	✓	—	—	[10]
	15	乙酸香茅酯	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	—	—	✓	—	—	[10]
	16	β-香茅醇	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O	—	—	—	—	✓	[15, 23-24]
	17	蒿酮	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	—	—	—	—	✓	[13]
	18	反式-β-罗勒烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	—	—	—	✓	—	[17]
	19	2, 5-二甲基-3-亚甲基-1, 5-庚二烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	—	—	—	✓	—	[17]
	20	甲酸芳樟酯	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	—	—	—	✓	—	[17]
	21	6-羟基-6-甲基-4, 7-辛二烯醇	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	—	—	✓	—	—	[27]
	22	薰衣草醇 1	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	—	—	—	✓	—	[28]
	23	顺式菊醇	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	—	—	—	✓	—	[28]
	24	β-萜品烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	✓	—	—	—	—	[29]
环状单萜	1	α-宁烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	✓	—	—	✓	—	[7, 17-18, 21]
	2	α-蒎烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	✓	✓	✓	✓	✓	[7, 10, 13-22, 24, 26, 28]
	3	α-蒎烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	✓	—	—	—	—	[7-8]
	4	香桉烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	✓	—	—	—	—	[7]
	5	β-蒎烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	✓	✓	✓	✓	✓	[7, 10, 13-17, 19-22, 25-26]
	6	α-水芹烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	✓	✓	✓	✓	✓	[7-8, 10, 13, 15, 17-20, 22-24]
	7	3-萜烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	✓	—	—	✓	—	[7-8, 17, 29]
	8	1, 8-桉叶油素	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	✓	—	—	✓	✓	[7, 13-15, 18, 21-22, 24, 29-30]
	9	γ-萜品烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	✓	—	—	—	✓	[7, 14-15, 21, 26]
	10	冰片	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	✓	✓	—	—	✓	[7, 15, 19, 33]
	11	樟脑	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	✓	✓	✓	✓	✓	[7, 10, 12-17, 19, 24-25, 28, 33]
	12	萜品醇-4	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	✓	✓	✓	✓	✓	[7-8, 10, 13-15, 17, 19, 21-26]
	13	α-萜品醇	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	✓	—	—	—	—	[7, 26]
	14	黄樟油素	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	✓	—	—	✓	✓	[7, 14, 16, 18, 24]
	15	β-水芹烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	✓	—	✓	—	—	[8, 10, 22, 29]
	16	萜品油烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	✓	—	—	✓	✓	[8, 14-15, 17, 25]
	17	乙酸异龙脑酯	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	✓	—	—	—	—	[8]
	18	γ-松油烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	✓	—	✓	✓	—	[8, 10, 17, 22, 25, 29]
	19	α-松油烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	✓	—	—	✓	—	[8, 18]
	20	对伞花烃	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>	✓	—	—	—	✓	[8, 14-15, 22, 24]
	21	4-亚甲基-1-(1-甲基乙基)环己烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	✓	—	—	—	—	[8]
	22	β-桉叶油醇	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	✓	—	—	—	—	[8, 20]
	23	2-萜烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	✓	—	✓	✓	—	[8, 10, 17]
	24	侧柏醇	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	✓	—	✓	—	—	[8, 10, 22]
	25	α-松油醇	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	✓	✓	✓	✓	✓	[8, 10, 13-15, 17, 19, 21-25, 29-30]
	26	乙酸松油酯	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	✓	—	—	—	—	[8]

续表 1

类别	序号	化学成分	化学式	不同化学型					参考文献
				油樟型	脑樟型	芳樟型	龙脑樟	异樟	
	27	4 (10) - 侧柏烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	✓	—	—	—	—	[21]
	28	异嗪皮啶	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	✓	—	—	—	—	[31]
	29	黑麦草内酯	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	✓	—	—	—	—	[31]
	30	邻伞花烃	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>	✓	—	—	✓	—	[17, 22]
	31	丁子香酚	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub>	✓	✓	✓	—	—	[6, 12, 19]
	32	4- 萜烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	—	—	✓	—	—	[10]
	33	2- 蒎烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	—	—	✓	—	—	[10]
	34	蒎烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	—	✓	✓	✓	✓	[10, 12-19, 23-25, 32]
	35	2- 萜烯环氧化物	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	—	—	✓	—	—	[10]
	36	柠檬烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	—	—	✓	—	✓	[12, 10, 13, 15-16, 24]
	37	桉叶油素	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	—	✓	✓	—	—	[10, 19]
	38	(+) -4- 萜烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	—	—	✓	—	—	[10]
	39	异蒲勒醇	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	—	—	✓	—	—	[10]
	40	(+) 氧化柠檬烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	—	—	✓	—	—	[10]
	41	桉树脑	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	—	✓	—	—	—	[19, 33]
	42	异茨烷	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub>	—	✓	—	—	—	[19, 33]
	43	β- 松油醇	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	—	✓	—	—	—	[19]
	44	侧柏烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	—	—	—	—	✓	[14-15, 23-24]
	45	桉烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	—	—	—	✓	✓	[13, 15-18, 23-24, 30]
	46	左旋乙酸龙脑酯	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	—	—	—	—	✓	[15, 23-24]
	47	异龙脑	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	—	—	—	✓	✓	[13, 17, 25]
	48	顺式 - 桉烯水合物	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	—	—	—	—	✓	[14]
	49	肉豆蔻醚	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	—	—	—	—	✓	[14-15]
	50	左旋樟脑	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	—	—	—	—	✓	[23]
	51	水芹烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	—	—	—	✓	✓	[13, 25]
	52	右旋龙脑	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	—	—	—	✓	—	[17, 25]
	53	桉叶油醇	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	—	—	—	✓	—	[17, 25]
	54	1- 蒎烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	—	—	—	✓	—	[17]
	55	1- 龙脑	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	—	—	—	✓	—	[17]
	56	(S) -1- 柠檬烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	—	—	—	✓	—	[17]
	57	α- 侧柏烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	—	—	—	✓	—	[17]
	58	1, 7, 7- 三甲双环 [2.2.1] 庚 -2- 烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	—	—	—	✓	—	[17]
	59	3- 甲基 -6- (1- 甲基乙亚基) 环己烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	—	—	—	✓	—	[17]
	60	(R) -1- 甲基 -5- (1- 甲基乙基) 环己烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	—	—	—	✓	—	[17]
	61	1, 5, 5- 三甲基 -6- 亚甲基环己烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	—	—	—	✓	—	[17]
	62	对薄荷 -1 (7), 3- 二烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	—	—	—	✓	—	[17]
	63	3, 6, 6- 三甲基 -双环 (3.1.1) 庚 -2- 烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	—	—	—	✓	—	[17]
	64	乙酸龙脑酯	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	—	—	—	✓	—	[17-18, 28]
	65	安息香	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	—	—	—	✓	—	[17]
	66	薄荷醇	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O	—	—	—	✓	—	[28]
	67	α- 崖柏烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	—	—	—	✓	—	[18]
	68	松油醇	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	—	—	—	✓	—	[18]
	69	顺式芳樟醇氧化物	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	—	—	✓	—	✓	[10, 15, 24]
	70	反式芳樟醇氧化物	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	—	—	✓	—	✓	[10, 15, 24]
链状倍半萜	1	β- 橙花叔醇	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	—	—	—	—	✓	[16]
	2	橙花叔醇	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	—	✓	✓	✓	—	[3, 12, 10, 18-19]
	3	金合欢醇	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	—	—	✓	—	—	[10]
	4	α- 麝子油烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	✓	—	—	—	[19]
	5	麝子油醇	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	—	✓	—	—	—	[19]
	6	麝子油醛	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	—	✓	—	—	—	[19]
	7	异橙花叔醇	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	—	—	—	—	✓	[13-15, 23-24, 30]
	8	3S-(+) -9- 氧代橙花叔醇	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	✓	—	—	—	—	[27, 34]
环状倍半萜	1	β- 丁香烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	✓	—	—	—	—	[7]
	2	香树烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	✓	—	✓	✓	✓	[7, 10, 13, 17]
	3	γ- 榄香烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	✓	—	✓	✓	—	[7-9, 17, 29]
	4	β- 榄香烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	✓	—	✓	✓	—	[8, 10, 13-15, 17, 23-24]
	5	α- 石竹烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	✓	✓	✓	✓	✓	[8-13, 15, 17-19, 23-24]



续表 1

类别	序号	化学成分	化学式	不同化学型					参考文献
				油樟型	脑樟型	芳樟型	龙脑樟	异樟	
	6	萜澄茄烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	✓	—	—	—	✓	[8, 13, 15, 23-24]
	7	β-萹草烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	✓	—	—	—	—	[8]
	8	异长叶烯	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	✓	—	—	✓	—	[8, 17]
	9	愈创木醇	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	✓	—	✓	—	✓	[8, 12, 16, 18, 24]
	10	大根香叶烯 B	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	✓	—	✓	✓	—	[11, 17, 21]
	11	β-石竹烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	✓	—	—	✓	—	[13, 20, 25]
	12	匙叶桉油烯醇	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	✓	—	—	—	✓	[15, 23-24, 26, 30]
	13	δ-榄香烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	✓	—	—	[10]
	14	α-萜澄茄油烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	✓	✓	—	[10, 17]
	15	依兰烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	✓	—	✓	[10, 14]
	16	α-可巴烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	✓	—	—	[10]
	17	β-波旁烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	✓	—	✓	[10, 13, 15, 24]
	18	α-古芸烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	✓	—	✓	[10, 14-15]
	19	石竹烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	✓	—	✓	✓	—	[9-11, 17, 19]
	20	榄香烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	✓	—	✓	[10, 15, 23-24]
	21	马兜铃烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	✓	—	✓	[12, 10, 15]
	22	γ-衣兰油烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	✓	—	—	[10]
	23	γ-芹子烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	✓	✓	✓	[10, 14-15, 17]
	24	β-萜澄茄油烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	✓	✓	—	[10, 17]
	25	喇叭烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	✓	—	✓	[10, 14-15]
	26	α-芹子烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	✓	✓	✓	—	[10, 19, 17]
	27	δ-萜澄茄烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	✓	—	—	[10]
	28	γ-萜澄茄烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	✓	—	—	[10]
	29	β-萜澄茄烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	✓	—	—	[10]
	30	去氢白菖烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	✓	—	—	[10]
	31	α-萜澄茄烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	✓	—	—	[10]
	32	石竹烯氧化物	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	—	—	✓	✓	✓	[9-12, 15, 23-25, 30]
	33	蓝桉醇	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	—	—	✓	—	✓	[10, 12-13]
	34	表蓝桉醇	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	—	—	✓	—	✓	[10, 14-15]
	35	檀香醇	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	—	—	✓	—	—	[10]
	36	蛇麻烯氧化物	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	—	—	✓	—	✓	[10, 13]
	37	萜澄茄油烯醇	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	—	—	✓	—	—	[10]
	38	(-)-斯巴醇	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	—	—	✓	—	—	[10]
	39	异长叶醇	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	—	—	✓	—	—	[10]
	40	异喇叭烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	✓	—	—	[12]
	41	大根香叶烯 -D	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	✓	✓	✓	[9, 14-15, 17, 24]
	42	桉油烯醇	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	—	—	✓	—	✓	[9, 11-13]
	43	异丁香烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	—	✓	✓	[15, 23-25]
	44	β-桉叶烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	—	—	✓	[15, 23-24]
	45	桉脑	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	—	—	—	—	✓	[15, 23-24]
	46	古巴烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	—	—	✓	[14-15]
	47	瑟林烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	—	—	✓	[14-15]
	48	萹草烯环氧化物 II	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	—	—	—	—	✓	[14]
	49	佛术烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	—	—	✓	[14-15]
	50	α-布黎烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	—	—	✓	[15, 17, 28]
	51	瓦伦亚烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	—	—	✓	[15]
	52	绿花白千层醇	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	—	—	—	—	✓	[15]
	53	香柠烯醇	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	—	—	—	—	✓	[15]
	54	r-杜松醇	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	—	—	—	—	✓	[15]
	55	牛儿烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	—	—	✓	[13]
	56	β-瑟林烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	—	—	✓	[13, 17]
	57	δ-芹子烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	—	✓	—	[17]
	58	3, 7 (11)-蛇床二烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	—	✓	—	[17]
	59	δ-杜松烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	—	✓	—	[17, 25]
	60	β-杜松烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	—	✓	—	[17]
	61	二环大根香叶烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	—	✓	—	[17]
	62	D-佛术烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	—	✓	—	[17]

续表 1

类别	序号	化学成分	化学式	不同化学型					参考文献
				油樟型	脑樟型	芳樟型	龙脑樟	异樟	
	63	反式 -Z- $\alpha$ - 环氧化红没药烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	—	—	—	✓	—	[17]
	64	1, 5, 9, 9- 四甲基 -1, 4, 7- 环十一碳三烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	—	✓	—	[17]
	65	(1S, 8aR) -1- 异丙基 -4, 7- 二甲基 -1, 2, 3, 5, 6, 8a- 六氢萘	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	—	✓	—	[17]
	66	3, 3, 7, 7- 四甲基 -5- (2- 甲基 -1- 丙烯) 三 环 [4.1.0.0 <sup>2,4</sup> ] 庚烷	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	—	✓	—	[17]
	67	(1S, 2E, 6E, 10R) -3, 7, 11, 11- 四甲基二 环 [8.1.0] 十一 -2, 6- 二烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	—	✓	—	[17]
	68	$\gamma$ - 阿吗啉	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	—	✓	—	[17]
	69	2, 6, 10, 10- 四甲基双环 [7.2.0] 十一 -2, 6- 二烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	—	✓	—	[17]
	70	顺式 - $\alpha$ - 甜没药烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	—	✓	—	[28]
	71	环氧化蛇麻烯 II	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	—	—	—	✓	—	[25]
	72	$\beta$ - 丁子香烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	—	✓	—	[18]
	73	$\alpha$ - 古巴烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	—	✓	—	[18]
	74	$\beta$ - 甜没药烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	—	✓	✓	[18]
	75	别香树烯氧化物	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	—	—	✓	—	—	[10]
	76	红没药烯环氧化合物	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	—	—	✓	—	—	[10]
	77	$\beta$ - 澄椒烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	✓	—	—	—	[19]
	78	反式 -Z- 环氧红没药烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	—	—	—	—	✓	[15, 23-24]
	79	$\beta$ - 朱栾	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	—	—	—	—	✓	[15]
	80	芳姜黄酮	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O	✓	—	—	—	—	[34]
链状二萜	1	叶醇	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	—	—	—	—	✓	[13]
	2	异植醇	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	—	—	—	✓	—	[18]

注：“—”表示尚未检测到该成分；“✓”表示检测到该成分。

Note: “—” indicates that no component has been detected; “✓” indicates that an ingredient has been detected.

中分离出的石竹烯氧化物等物质具有抑菌等作用。马英姿等<sup>[39]</sup>曾对樟树叶精油抑菌作用进行研究,樟树叶精油对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、青霉和黑曲霉 4 种试验菌株表现出良好的抑菌效果,但天竺桂精油对青霉无抑制作用。

## 2.2 抗炎作用

不同化学型樟树植物的精油、萜类等成分均存在抗炎作用。丛赢等<sup>[8]</sup>通过对脂多糖(LPS)致炎 RAW 264.7 巨噬细胞的 MTT 检验和一氧化氮(NO)含量检测,发现油樟精油具有一定的抗炎活性。低、中、高剂量油樟精油对大鼠肿胀部位均有不同程度抑制作用并可改善组织水肿。Peana 等<sup>[40]</sup>研究发现,天然芳樟醇具有减轻小鼠水肿的功效。Li 等<sup>[41]</sup>研究发现,芳樟醇可通过激活 Nrf2/HO-1 信号传导途径,抑制 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞炎症,从而起到抗炎作用。

## 2.3 抗肿瘤作用

Ling 等<sup>[42]</sup>研究结果显示辛纳毒蛋白和樟脑水杨酸钠两种核糖体失活蛋白能产生细胞毒性从而抑制癌细胞。张婷<sup>[43]</sup>研究发现,芳樟醇通过诱导肿瘤细胞以细胞凋亡的方式来抑制多种人淋巴细胞白血病细胞的生长和增殖。Cheng 等<sup>[44]</sup>发现芳樟醇通过调节 SIRT3-SOD2-ROS 信号传导对胶质瘤细胞具有抑制作用。曹明原等<sup>[45]</sup>研究发现低

剂量的龙脑樟枝乙酸乙酯部位可显著抑制炎症介质 NO 的释放,有一定的抗炎活性;中等剂量的样品对 SH-SY5Y 神经瘤细胞及 HepG2 肝癌细胞的增殖有显著的抑制作用。

## 2.4 抗病毒作用

Saddi 等<sup>[46]</sup>研究发现油樟叶挥发油的主要成分 1, 8- 桉叶油素具有抗病毒和抗微生物等药理作用。

## 2.5 抗氧化能力

吴静等<sup>[47]</sup>研究发现樟树根多糖、樟树茎多糖、樟树叶多糖以及樟树果实多糖均具有抗氧化活性并可以提高免疫力,在功能食品的开发中,可以作为一个潜在的抗氧化剂、免疫调节剂。

## 2.6 镇静作用

芳樟精油中主要成分为芳樟醇,陈冬晶<sup>[48]</sup>研究发现芳樟醇有非常好的助眠效果,芳樟醇被广泛使用于含有芳樟醇的挥发油,作为镇静剂和催眠药物。此外,人体吸收试验表明,芳樟醇具有镇静、放松等功效<sup>[49-50]</sup>。

## 2.7 其他生理活性

除以上活性外,樟脑还具有促进皮肤吸收的作用<sup>[51]</sup>以及强心、升压和兴奋呼吸作用<sup>[52]</sup>。

## 3 总结与展望

不同化学型樟树主产化合物为环状单萜和环

状倍半萜，其中萜类是自然界存在最广泛的一类天然产物，在植物生长繁殖和防御反应等方面发挥重要作用<sup>[53]</sup>。目前针对不同化学型樟树中萜类成分的研究主要集中在精油。

萜类及其衍生物是一类具有异戊二烯单位(C<sub>5</sub>)结构特征的化合物，它们由戊二羧酸构成。根据分子中的异戊二烯数量，可以将萜类划分为单萜、倍半萜、二萜、三萜、四萜等不同类型<sup>[54]</sup>。单萜类化合物中，大多数萜类及其衍生物具有强烈的香气，例如 $\alpha$ -蒎烯是合成香料的重要原料，主要用于合成松油醇、芳樟醇以及一些檀香型香料，也可用于日化品以及其他工业品的加香，还可用作合成润滑剂、增塑剂等<sup>[55-56]</sup>；双环单萜龙脑(冰片)具有发汗、抗菌、镇静止痛和驱虫作用<sup>[57]</sup>。在挥发油中，倍半萜化合物是常见的成分，它们通常具有香气和生物活性，如 $\alpha$ -石竹烯具有抗炎功效，可有效防止感冒、肺炎等呼吸道疾病病毒侵入人体<sup>[58]</sup>。随着分子量的增大，如二萜类化合物，绝大多数物质不具备挥发性，叶醇是一种具有强烈新鲜叶草香气的名贵香料，属于清香型，它被广泛应用于香精配方、化妆品行业以及食品香料中，并常用于制备系列的叶醇酯<sup>[59-60]</sup>。因此，对植物化学成分与生物活性的对应关系进行更深入的研究，将有助于设计出更安全、更高效的新型药物。

5种不同化学型樟树资源在利用上具有较大的差异：油樟主要用于提取樟脑和樟油，广泛应用于香料、油漆、印刷油墨等制造领域，同时具有抗炎、抗肿瘤等功效；龙脑樟主要用于提取龙脑，广泛应用于医药、日用品、香料等领域；芳樟主要用于香料、化工、医药等领域，还可用于提取精油、生产樟脑油等；樟脑则侧重于提取樟脑，除了用于药品、清凉油等产品，还可用于生产驱虫药、樟脑丸等；异樟在香料工业中具有重要价值，其挥发油可用于高级香水、化妆品等，同时还可以提取生物活性物质如黄酮类化合物，具有抗菌、抗炎等作用。因此，不同化学型樟树资源的应用开发情况各有特色和优势，这反映了它们各自独特的化学组成和性质。通过合理地开发和利用这些资源，可以推动相关产业的发展，提高经济效益和社会效益，为人类健康和经济发展作出更大的贡献。

5种不同化学型樟树资源的主含成分具有广泛的药理活性，包括消炎、抗菌、镇痛、抗肿瘤、抗氧化等作用，并可用于治疗一些疾病。这些主含成分还具有清凉感、刺激性和香味等特点，广泛应用于香料、化妆品、食品和医药等领域。不同化学型樟树资源在利用上表现出多样性，如油

樟主要用于提取1,8-桉叶素，脑樟侧重于提取樟脑，芳樟用于提取芳樟醇，龙脑樟则提取右旋龙脑，而异樟可以提取异橙花叔醇和其他生物活性物质。总的来说，芳樟是目前研究最多、应用最广泛的化学型。

不同化学型樟树的化学成分复杂，药理活性多样，具有广谱的抗菌、抗病毒等作用。深入研究樟树各类化学成分的药理活性、构效关系及作用机制，为发挥我国作为樟树植物资源大国，实现其资源保护、可持续利用、生态效应等方面提供坚实基础，为临床应用和新药研发提供基础数据和有益参考。

## 参考文献

- [1] 龙光远, 郭德选, 刘银苟. 樟树精油含量的研究[J]. 江西林业科技, 1989(6): 7-14.
- [2] 张箬晦, 童永清, 钱信怡, 等. 香樟化学成分及药理作用研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(10): 320-333.
- [3] 高佳琪, 焦顺刚, 马瑾煜, 等. 丁香属植物中萜类成分研究进展[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(10): 2343-2352.
- [4] Song X, Yin ZQ, Ye KC, et al. Anti-hepatoma effect of safrole from *Cinnamomum longepaniculatum* leaf essential oil in vitro[J]. Int J Clin Exp Hyp, 2014, 7(5): 2265-2272.
- [5] Huang JF, Yang LY, Zou Y, et al. Antibacterial activity and mechanism of three isomeric terpineols of *Cinnamomum longepaniculatum* leaf oil[J]. Folia Microbiologica, 2021, 66(1): 59-67.
- [6] Tao C, Wei Q, Yin ZQ, et al. Antifungal activity of essential oil from *Cinnamomum longepaniculatum* leaves against three dermatophytes in vitro[J]. Afr J Pharm Pharmacol, 2013, 7(19): 1148-1152.
- [7] 曹玫, 贾睿琳, 江南, 等. 油樟叶挥发油的镇痛活性研究[J]. 广西植物, 2013, 33(4): 552-555.
- [8] 丛赢, 张琳, 祖元刚, 等. 油樟(*Cinnamomum longepaniculatum*)精油的抗炎及抗氧化活性初步研究[J]. 植物研究, 2016, 36(6): 949-954, 960.
- [9] 郑红富. 芳樟精油的提取与特性研究[D]. 南昌: 江西农业大学, 2019.
- [10] 周翔, 莫建光, 谢一兴, 等. 广西芳樟醇型樟树精油成分的GC-MS研究[J]. 食品科技, 2011, 36(1): 282-285.
- [11] 郑红富, 廖圣良, 范国荣, 等. 水蒸气蒸馏提取芳樟精油及其抑菌活性研究[J]. 林产化学与工业, 2019, 39(3): 108-114.
- [12] 孙娅东. 芳樟叶油细胞形态特征研究[D]. 南昌: 江西农业大学, 2018.
- [13] 李嘉欣, 孟斌斌, 朱凯. 樟树叶精油组成分析及抗氧化活性研究[J]. 林产化学与工业, 2020, 40(1): 84-90.
- [14] 胡文杰, 江香梅. 油樟和异樟根精油组分的比较[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2017, 45(4): 189-195.
- [15] 胡文杰, 江香梅. 异樟不同部位精油成分的气相色谱-质谱比较分析[J]. 东北林业大学学报, 2014, 42(10): 118-122.
- [16] 张欣宇, 陈尚研, 熊万明. 樟树精油提取及成分分析的研究进展[J]. 广州化工, 2017, 45(12): 11-13.
- [17] 李思琪, 江芊, 黄英, 等. 不同产地龙脑樟枝叶化学成分分析



- 及体外抑菌研究[J]. 热带作物学报, 2023, 44 (5): 1011-1022.
- [18] 丁雄, 苏健裕, 石磊, 等. 龙脑樟鲜叶挥发油成分及其抗菌活性的研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33 (18): 167-171.
- [19] 王丽君, 李亚伟, 廖矛川. 本樟精油的化学成分研究[J]. 中草药, 1990, 21 (7): 8.
- [20] 陶光复, 丁靖垵, 孙汉董. 湖北油樟叶精油的化学成分[J]. 武汉植物学研究, 2002, 20 (2): 75-77.
- [21] 胡文杰, 戴彩华, 周升团. 油樟叶精油馏分的主要成分、抑菌活性及其主要单体成分抑菌机理研究[J]. 安徽农学通报, 2019, 25 (15): 14-19.
- [22] 程贤, 毕良武, 李胜男, 等. 春秋两季油樟叶的油细胞形态、精油成分及其抗氧化活性研究[J]. 林产化学与工业, 2021, 41 (1): 38-44.
- [23] 胡文杰, 高捍东, 江香梅, 等. 樟树油樟、脑樟和异樟化学型的叶精油成分及含量分析[J]. 中南林业科技大学学报, 2012, 32 (11): 186-194.
- [24] 胡文杰, 李冠喜, 曹裕松, 等. 异樟叶精油的抑菌活性及其化学成分[J]. 林业科技开发, 2014, 28 (6): 69-71.
- [25] 杨鹏飞, 卢慧, 王新峰, 等. 龙脑樟挥发油化学成分、抗烟草花叶病毒及抑菌活性研究[J]. 化学试剂, 2021, 43 (8): 1090-1094.
- [26] Cheng FL, Xu M, Yang XY, et al. An improved approach for the isolation of essential oil from the leaves of *Cinnamomum longepaniculatum* using microwave assisted hydrodistillation concatenated double column liquid liquid extraction[J]. Sep Purif Technol, 2018, 195: 110-120.
- [27] 冯丹. 芳樟化学成分研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2016.
- [28] Bradley BF, Starkey NJ, Brown SL, et al. Anxiolytic effects of *Lavandula angustifolia* odour on the Mongolian gerbil elevated plus maze[J]. J Ethnopharmacol, 2007, 111 (3): 517-525.
- [29] 冯悦, 毕静, 罗茂, 等. 油樟叶精油的抑菌及抗氧化作用的研究[J]. 四川轻化工大学学报(自然科学版), 2023, 36 (3): 36-41.
- [30] 胡文杰, 江香梅, 杨海宽. 异樟叶精油及其主成分含量的动态变化研究[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2015, 41 (4): 407-411.
- [31] 周文娟, 邱远望, 贝佳炎, 等. 油樟叶水提物化学成分分离鉴定和抗肝癌活性研究[J]. 林产化学与工业, 2022, 42 (6): 1-10.
- [32] 李国政. 龙脑樟叶挥发油化学成分研究[J]. 亚太传统医药, 2015, 11 (18): 17-18.
- [33] 蔡延平, 叶飞云, 李玲玲. 樟脑的气相色谱及气相色谱-质谱分析[J]. 福建分析测试, 1998, 7 (2): 872-874.
- [34] 胡文杰, 殷帅文, 戴彩华, 等. 油樟中倍半萜化合物及其衍生物的合成与生物活性研究[J]. 浙江化工, 2021, 52 (10): 12-16.
- [35] 尹浩, 王晨笑, 岳进, 等. 油樟叶精油的提取、化学成分、抗氧化以及抗菌活性研究[J]. 保鲜与加工, 2020, 20 (4): 183-191.
- [36] 林雅慧. 芳樟油气相抗菌机制的研究[D]. 广州: 广东工业大学, 2012.
- [37] Park SN, Lim YK, Freire MO, et al. Antimicrobial effect of linalool and  $\alpha$ -terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria[J]. Anaerobe, 2012, 18 (3): 369-372.
- [38] Chavan MJ, Wakte PS, Shinde DB. Analgesic and anti-inflammatory activity of caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark[J]. Phytomedicine, 2010, 17 (2): 149-151.
- [39] 马英姿, 谭琴, 李恒熠, 等. 樟树叶及天竺桂叶的精油抑菌活性研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2009, 29 (1): 36-40.
- [40] Peana AT, D' aquila PS, Panin F, et al. Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils[J]. Phytomedicine, 2002, 9 (8): 721-726.
- [41] Li Y, Lv O, Zhou FG, et al. Linalool inhibits LPS-induced inflammation in BV2 microglia cells by activating Nrf2[J]. Neurochem Res, 2015, 40 (7): 1520-1525.
- [42] Ling J, Liu WY. Cytotoxicity of two new ribosome-inactivating proteins, cinnamomin and camphorin, to carcinoma cells[J]. Cell Biochem Funct, 1996, 14 (3): 157-161.
- [43] 张婷. 芳樟醇通过激活 GADD45 $\alpha$ /JNK 信号通路选择性诱导淋巴细胞白血病细胞凋亡的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2007.
- [44] Cheng YH, Dai C, Zhang J. SIRT3-SOD2-ROS pathway is involved in linalool-induced glioma cell apoptotic death[J]. Acta Biochimica Polonica, 2017, 64 (2): 343-350.
- [45] 曹明原, 吴静, 顾震, 等. 龙脑樟乙酸乙酯部位的抗炎及抗肿瘤活性研究[J]. 生物化工, 2022, 8 (1): 95-98.
- [46] Saddi M, Sanna A, Cottiglia F, et al. Antitherpevirus activity of *Artemisia arborescens* essential oil and inhibition of lateral diffusion in Vero cells[J]. Ann Clin Microb Anti, 2007, 6: 1-7.
- [47] 吴静, 胡居吾, 熊伟, 等. 樟树不同器官中多糖抗氧化、免疫调节活性的研究[J]. 江西农业大学学报, 2019, 41 (4): 804-813.
- [48] 陈冬晶. 芳香植物精油对改善青年人睡眠质量的功能性研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2015.
- [49] Bradley BF, Starkey NJ, Brown SL, et al. Anxiolytic effects of *Lavandula angustifolia* odour on the Mongolian gerbil elevated plus maze[J]. J Ethnopharmacol, 2007, 111 (3): 517-525.
- [50] Höferl M, Krist S, Buchbauer G. Chirality influences the effects of linalool on physiological parameters of stress[J]. Planta Medica, 2006, 72 (13): 1188-1192.
- [51] 许碧莲, 王宗, 何康, 等. 樟脑对烟酰胺和双氯芬酸钠透皮吸收作用的研究[J]. 中国医院药学杂志, 1999, 19 (7): 398-400.
- [52] 陈建南, 曾惠芳, 李耿, 等. 龙脑樟挥发油及天然冰片成分分析[J]. 中药材, 2005, 28 (9): 42-43.
- [53] Chen JN, Zeng HF, LI G, et al. Analysis of essential oil and natural borneol composition[J]. J Chin Med Mat, 2005, 28 (9): 42-43.
- [54] 尹小英, 李石蓉, 李琴, 等. 药用植物樟的研究概况[J]. 江西中医学院学报, 2009, 21 (6): 87-90.
- [55] 孟中磊, 胡亿明, 温如斯, 等. 三酸复合体系催化  $\alpha$ -蒎烯合成松油醇研究[J]. 林产化学与工业, 2023, 43 (1): 113-119.
- [56] 刘壁莹. 功能性离子液体制备及催化松节油合成松油醇研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2020.
- [57] 李福琳. 中国主要香料资源植物分布的研究[D]. 新乡: 河南师范大学, 2019.
- [58] 周小雅. 中药冰片的药理研究[J]. 中国现代应用药学, 1998 (3): 17-18.
- [59] 李然然.  $\beta$ -石竹烯对脑缺血再灌注大鼠的作用及其机制研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2016.
- [60] 杨柯林. 叶绿醇与其代谢物对骨骼肌纤维类型转化的调节作用及其机制[D]. 广州: 华南农业大学, 2019.

(收稿日期: 2023-12-13; 修回日期: 2024-02-23)

## 丹参酚酸类化合物的合成生物学研究进展

郑伊诺<sup>1</sup>, 贾佳庆<sup>1</sup>, 刘媚琪<sup>1</sup>, 孙立丽<sup>1, 2\*</sup>, 任晓亮<sup>1, 2</sup> (1. 天津中医药大学中药学院, 天津 301617; 2. 天津市中药功效物质重点实验室, 天津 301617)

**摘要:** 丹参酚酸类化合物是丹参发挥保护心血管系统、抗肿瘤与抗纤维化等多种药理作用的一类关键物质基础。以合成丹酚酸 A、丹酚酸 B 和迷迭香酸等丹参酚酸类化合物为目标的微生物细胞工厂的构建, 可以实现丹参酚酸类化合物异源高效合成, 缓解临床对丹参药材的用药压力。本文就丹参酚酸类化合物的合成生物学、生物合成关键催化酶及其代谢调控等研究现状进行了归纳分析, 以期为丹参酚酸类化合物的高效合成与资源应用提供科学依据。

**关键词:** 丹参; 丹参酚酸; 合成生物学; 生物合成; 代谢工程

**中图分类号:** R282.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)08-2116-08  
**doi:**10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.024

### Research progress in synthetic biology of salvianolic acid compounds

ZHENG Yi-nuo<sup>1</sup>, JIA Jia-qing<sup>1</sup>, LIU Mei-qi<sup>1</sup>, SUN Li-li<sup>1, 2\*</sup>, REN Xiao-liang<sup>1, 2</sup> (1. School of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617; 2. Tianjin Key Laboratory of Therapeutic Substance of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617)

**Abstract:** Salvianolic acid compounds serve as pivotal constituents in *Salvia miltiorrhiza* Bge., exhibiting diverse pharmacological effects such as cardiovascular protection, anti-tumor activity, and anti-fibrotic properties. The establishment of microbial cell factories aiming at synthesizing of salvianolic acid A, salvianolic acid B and rosmarinic acid and other salvianolic acid compounds can realize the heterogeneous and efficient synthesis of salvianolic acid compounds, and relieve the clinical pressure in the use of *Salvia miltiorrhiza* Bge.. This paper summarized the synthesis biology of salvianolic acids, key catalytic enzymes of biosynthesis and metabolic regulation of salvianolic acids to provide scientific basis for efficient synthesis and resource application of salvianolic acids.

**Key words:** *Salvia miltiorrhiza* Bge.; salvianolic acid; synthetic biology; biosynthesis; metabolic engineering

丹参为唇形科鼠尾草属植物丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bge.) 的干燥根和根茎, 具有活血祛瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痈的功效<sup>[1]</sup>。现代药理学研究表明其具有保护心血管系统<sup>[2]</sup>、抗肿瘤<sup>[3]</sup>和抗纤维化<sup>[4]</sup>等多种药理作用。目前, 丹参及其提取物制品临床应用广泛, 市场需求量大, 但由于存在野生资源匮乏、引种质量不稳定和药效成分含量低等问题, 极大地限制了其药用价值的应用。

丹参中含有种类丰富的次生代谢产物, 其中水溶性丹参酚酸类化合物是其发挥疗效的关键物质基础<sup>[5]</sup>。丹参酚酸类化合物大部分属于丹参素和迷

迭香酸的衍生物, 主要包括迷迭香酸 (rosmarinic acid, RA)、丹酚酸 A (salvianolic acid A, SAA)、丹酚酸 B (salvianolic acid B, SAB) 以及丹参素等<sup>[6]</sup>。基于丹参酚酸类化合物的合成生物学研究, 构建微生物细胞工厂, 以合成丹参酚酸类化合物为目标, 可以实现异源高效合成, 为中药制剂生产提供大量原材料, 有效降低丹参制剂的提取成本, 缓解中医临床对丹参药材的用药压力。同时, 从生物合成途径关键酶基因出发, 建立多元、完整的丹参质量控制体系, 可为丹参的安全性和有效性提供保障<sup>[5]</sup>。因此, 丹参酚酸类化合物的合成生物学及其合成途径关键酶的研究广受关注。

作者简介: 郑伊诺, 女, 本科在读, email: zhengyinuo1002@163.com \*通信作者: 孙立丽, 女, 讲师, 主要从事中药分析研究, email: sunlili0114@tjutcm.edu.cn

本文就丹参酚酸类化合物的合成生物学、丹参酚酸类化合物生物合成的关键催化酶及其代谢调控等研究进展进行较为全面的概述, 以期为丹参酚酸类化合物的合成生物学研究与规模化生产提供参考。

## 1 丹参酚酸类化合物的主要生物合成途径及其关键酶研究

丹参酚酸类化合物的生物合成途径复杂, 涉及多个基因和酶的参与。在丹参酚酸类化合物的生物合成中, 主要通过苯丙氨酸途径和酪氨酸途径生成 4- 香豆酰辅酶 A 和 4- 羟基苯乳酸 (4-hydroxyphenyllactic acid, 4-HPL); 两者在迷迭香酸合成酶 (rosmarinic acid synthase, RAS) 和细胞色素 P450 单加氧酶 (cytochrome P450 monooxygenase, CYP) 的催化作用下生成前体物质 RA。RA 主要存在于唇形科与紫草科植物中, 其生物合成途径最初从唇形科植物彩叶草 (*Coleus blumei*) 中研究发现<sup>[7]</sup>。丹参酚酸类化合物的结构具有较高的相似度, 故推测 RA 是其他丹参酚酸类化合物的前体物质。在丹参的根及根茎中, RA 再经不同方式的缩合修饰形成各种结构的丹参酚酸类化合物。

### 1.1 苯丙氨酸途径所涉及的酶

苯丙氨酸途径以 L- 苯丙氨酸为起始, 在苯丙氨酸解氨酶 (L-phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 的催化下脱氨基形成肉桂酸, 肉桂酸进一步受 C4H 羟基化生成对香豆酸 (*p*-coumaric acid, *p*-HCA), 4- 香豆酰辅酶 A 连接酶 (4-coumarate CoA ligase, 4CL) 作为苯丙氨酸途径最后环节的关键酶, 以 *p*-HCA 为底物催化生成 4- 香豆酰辅酶 A。目前研究人员已从丹参植株中鉴定出 3 个 PAL 的基因, 包括 *SmPAL1*、*SmPAL2* 和 *SmPAL3*<sup>[8]</sup>。*SmPAL1* 和 *SmPAL3* 在根中高度表达, 并且 *SmPAL3* 直接参与 RA 的生物合成, *SmPAL1* 调控丹参酚酸类化合物的合成途径<sup>[8]</sup>。Huang 等<sup>[9]</sup>克隆出 *C4H* 基因, 通过半定量 RT-PCR 分析发现 *SmC4H* 在丹参根和根茎中具有更高的组成性表达, 表明 C4H 在丹参地下部分合成丹参酚酸类化合物中发挥重要作用。研究人员从丹参植株中鉴定出的 2 个 4CL 基因, 通过分析两种酶的动力学参数发现 *Sm4CL2* 对 *p*-HCA 的  $K_m$  值更低, 说明 4CL2 在苯丙氨酸合成途径中发挥更重要的作用<sup>[10]</sup>。此外, 值得注意的是, 抑制 *Sm4CL2* 表达不仅会下调苯丙氨酸途径的基因, 还会激活萜类化合物生物合成途径中的基因, 导致副产物的增加<sup>[11]</sup>。*Sm4CLs* 的表达水平可显著影响苯丙氨酸途径的相

关基因表达以及副产物的生成, 证明 4CL 是苯丙氨酸途径中重要的调节酶。鉴于苯丙氨酸途径也是黄酮类化合物和木脂素等其他副产物合成的通用途径, 因此, 构建微生物细胞工厂时, 可通过采取上调或过表达 *Sm4CL2* 的策略, 抑制副产物的合成, 提高 RA 的产量。

### 1.2 酪氨酸途径所涉及的酶

酪氨酸途径以酪氨酸为起始, 经酪氨酸氨基转移酶 (tyrosine aminotransferase, TAT) 催化发生羟基化形成 4- 羟基苯丙酮酸, 进一步经羟脯氨酸合成酶 (hydroxyphenylpyruvate reductase, HPPR) 还原生成 4-HPL。Huang 等<sup>[12]</sup>从丹参植株内克隆出 *SmTAT* 并分析发现 *SmTAT* 在丹参的茎中具有更高的组成性表达。已有研究表明, HPPR 是丹参的酪氨酸衍生途径中重要的调节酶。研究人员从丹参中克隆出 *SmHPPRs*, 并通过生物工程技术构建得到重组 HPPR, 发现重组 HPPR 具有更强的催化活性, 可以高效地将 4- 羟基苯丙酮酸还原为 4-HPL<sup>[13]</sup>。此外, 在丹参毛状根中诱导过表达 *SmHPPR1* 可显著提高 RA、SAB 以及总丹酚酸的产量, 分别是对照组的 1.09、1.29 和 1.15 倍; 值得注意的是, 过表达 *SmHPPR1* 还可以影响酪氨酸途径涉及的其他基因, 间接提高丹参酚酸类化合物的产量<sup>[14]</sup>。

### 1.3 RA 的合成及其酶

4- 香豆酰辅酶 A 和 4-HPL 在 RAS 的催化下偶联形成 4- 香豆酰 -4'- 羟基苯乳酸; 该化合物进一步被 CYP98A14 催化羟基化反应, 引入 3- 和 3'- 羟基形成 RA。研究人员针对 RA 合成过程中涉及的关键酶进行基因鉴定和酶功能分析。丹参共包含 1 个 *SmRAS*, 5 个 *SmHCTs* 和 1 个 *SmCYP98A14* 的 RA 合成基因<sup>[15]</sup>; Di 等<sup>[16]</sup>通过反义基因遗传转化的方法抑制 *SmRAS* 和 *SmCYP98A14* 的表达, 丹参毛状根中 RA 的含量显著降低, 证明 RAS 和 CYP98A14 与丹参 RA 合成具有强相关性。此外, Zhou 等<sup>[17]</sup>采用 CRISPR/Cas9 系统敲除丹参毛状根 *SmRAS* 的基因后, 发现 RA 的产量显著降低。研究结果表明, 丹参中的 *RAS* 和 *CYP98A14* 基因与 RA 的合成密切相关, 尤其是 RAS 作为丹参酚酸类化合物生物合成调节的关键酶, 对 RA 的合成以及丹参酚酸类化合物的积累起着至关重要的作用。

### 1.4 丹参其他酚酸类化合物的生物合成酶

目前, 关于丹参酚酸类化合物的生物合成途径, 已阐明的仅有 RA 的生物合成途径, 其他丹参酚酸类成分的生物合成途径尚不明确。现有研究推



测, SAB 是在丹参漆酶的催化下, 以 RA 为前体物质合成<sup>[16]</sup>。漆酶是多铜氧化酶家族中的一类金属糖蛋白酶, 广泛存在于多种植物体内, 其主要功能是催化植物生理代谢中的氧化反应<sup>[18]</sup>。丹参根系中的漆酶基因共有 29 个, 可以分为 7 个类群, 具有不同的功能<sup>[19]</sup>。Li 等<sup>[19]</sup>通过对 *SmLACs* 转录组学分析发现, *SmLAC7*、*SmLAC20* 和 *SmLAC28* 过表达或抑制后, 丹参毛状根中 SAB 和 RA 含量均出现显著变化。Zhou 等<sup>[20]</sup>利用 CRISPR/Cas9 系统敲除大部分漆酶基因后, 发现丹参毛状根的发育明显被抑制, 毛状根木质部细胞相较野生型大而疏松, 并且 SAB 的总合成量降低。此外, 值得注意的是 *SmLAC25* 的过度表达可促进木质素合成, 从而导致 SAB 生物合成的代谢通量下降<sup>[21]</sup>。以上研究表明, 丹参漆酶对丹参酚酸类化合物的合成具有重要的作用, 但丹参漆酶家族中不同漆酶的催化功能以及 SAB 的生物合成机制还有待深入研究阐明。

总体而言, 提高丹参酚酸类化合物产率的途径主要有两种: 直接或间接调节关键酶以及重要调节酶的基因表达, 强化上游合成途径并抑制副产物的合成, 使代谢更偏向目标产物。因此, 阐明丹参酚酸类化合物生物合成途径所涉及酶的催化机制, 有利于在体外构建用于合成丹参酚酸类化合物的微生物细胞工厂。

## 2 丹参酚酸类化合物的合成生物学发展

近年来, 生物工程学和合成生物学蓬勃发展, 丹参酚酸类化合物的合成生物学研究得到了广泛关注。目前, 应用以大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) 和酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 为代表的微生物, 在其体内重建异源丹参酚酸类化合物生物合成途径的相关研究取得了较大进展。在重建的异源丹参酚酸类化合物生物合成途径中, 研究者通过改良与调控涉及的关键酶和关键基因, 并结合诱导处理及细胞工厂等生物工程技术, 达到提高丹参酚酸类化合物的产量以及质量的目的。

### 2.1 大肠埃希菌合成丹参酚酸类化合物

大肠埃希菌是最早被应用于构建异源产物生物合成途径的微生物, 具有遗传信息简单、代谢与生长速度快等优点, 而且大肠埃希菌的基因工程技术发展较为成熟, 是合成生物学中应用最广泛的底盘细胞。目前, 关于大肠埃希菌合成丹参酚酸类化合物的研究领域主要聚焦于 RA 和 SAA 的合成。

#### 2.1.1 RA 在大肠埃希菌中的合成 (见图 1)

Bloch 等<sup>[22]</sup>基于 RA 的全生物合成途径, 以咖啡酸和 3, 4-二羟基苯乳酸为底物, 在大肠埃希菌中成

功构建出可实现 RA 生物合成的菌株, 并揭示了彩叶草 RAS 在催化 RA 合成方面具有高效能, 生成 RA 的产量可达  $0.6500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 为微生物异源合成丹参酚酸类化合物奠定了坚实基础。在以往研究的基础上, 研究人员优化了异源关键酶基因的选择, 通过克隆彩叶草 RAS 和拟南芥 4CL 的基因完成 RA 合成途径在大肠埃希菌中的重建, 实现了 RA 的显著增产, 产量可达约  $130.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[23]</sup>。值得注意的是, 更改底物种类或采用多种底物组合的方式, 也可提高大肠埃希菌合成 RA 的效率<sup>[24]</sup>。以上研究通过引入多种异源的 4CL 和 RAS 基因, 并基于其催化特性优化底物, 从而在大肠埃希菌中重构 RA 的生物合成途径, 可以为后续在细菌微生物中合成丹参酚酸类化合物的关键酶与底物的选择提供依据。



图 1 迷迭香酸的主要生物合成途径

Fig 1 Main biosynthetic pathways of rosmarinic acid

模块化共培养多种工程大肠埃希菌的模式在合成生物学领域中的研究应用取得了较大进展, 这种方法根据生物合成途径酶的功能对酶进行模块化分组, 并基于分组构建出多个工程菌株, 从而减轻单一工程菌株的代谢负担, 有效提高合成效率。Li 等<sup>[25]</sup>利用模块化共培养, 将 RA 的生物合成途径划分为两个上游模块与一个下游模块, 培养 3 种大肠埃希菌菌株, 共合成 RA  $172.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。模块化共培养为合成丹参酚酸类化合物的研究提供了新思路, 有望进一步提高异源合

成丹参酚酸类化合物的纯度和产量。另外, Wang 等<sup>[26]</sup>通过引入酪氨酸解氨酶、L-氨基酸脱氨酶和 4-羟基苯乳酸-3-羟化酶的基因,并敲除竞争通路基因以及硫酯酶基因,使大肠埃希菌中 RA 的产率提高到  $5781 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。这些基因的引入可以进一步优化代谢途径,提高产物的合成效率。值得注意的是,在部分研究中,分批补充葡萄糖的发酵方法也有助于提高 RA 的产量<sup>[26]</sup>。控制葡萄糖的补充时间和浓度,可以有效地调节代谢途径,提高产物的产量和纯度。这种方法使合成途径的调节更加灵活且可控,有助于优化微生物中目标产物的生成。

**2.1.2 SAA 在大肠埃希菌中的合成** Yao 等<sup>[27]</sup>将戊糖乳酸杆菌 (*Lactiplantibacillus pentosus*) 的 D-乳酸脱氢酶基因引入大肠埃希菌中,并应用基因组修饰技术优化 SAA 合成途径,以 4-羟基苯丙酮酸 (4-hydroxyphenylpyruvic acid, 4-HPP) 为底物,使 SAA 的产量达到  $7.100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该研究首次实现 SAA 的高效异源生物合成,并为优化 SAA 的全合成途径奠定了基础。研究人员将模块化共培养模式应用于 SAA 的异源合成,并采用染色体工程方法将模块化整合后的基因序列引入大肠埃希菌中,共从头合成出 SAA  $5.600 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[28]</sup>。此外,以左旋多巴胺为底物在大肠埃希菌内合成 SAA, SAA 产率高达 96.60%<sup>[29]</sup>。可以发现, SAA 的合成生物学研究也沿用了 RA 合成生物学的研究思路与方法,通过优化异源关键酶与底物的选取,实现 SAA 的高产率合成,可为以大肠埃希菌为代表的细菌微生物合成丹参酚酸类化合物提供参考。

目前,模块化共培养模式中多种菌株之间的平衡稳定性以及丹参酚酸类化合物生物合成途径的探索优化仍为大肠埃希菌合成丹参酚酸类化合物的大规模化生产带来一定的挑战。总之,明确与优化丹参酚酸类化合物的生物合成途径,提高模块化共培养中多种大肠埃希菌菌株群的系统稳定性,及引入异源高效关键酶的基因等多种策略的结合运用,有助于实现高纯度、高产量的丹参酚酸类化合物生物合成。

## 2.2 酿酒酵母合成丹参酚酸类化合物

酿酒酵母长久以来被广泛用于酿酒、烘焙及食品与药品工业当中,同时酿酒酵母也是最早被全基因组测序的真菌微生物之一,因此有关酿酒酵母的合成生物学研究得到了广泛关注。酿酒酵母作为真核细胞,其内部结构和代谢模式相较于原核细胞的大肠埃希菌而言,与高等植物细胞

更加相似;因此,酿酒酵母也被认为具备较大合成异源天然化合物的潜力,是植物次级代谢产物生物合成的理想微生物工厂。

**2.2.1 RA 在酿酒酵母中的合成** 酿酒酵母中的细胞色素 P450 还原酶与彩叶草中合成 RA 细胞的 CPR 蛋白序列具有同源性,提示酿酒酵母是从头合成 RA 的潜在宿主。目前酿酒酵母合成 RA 的研究主要集中于在酿酒酵母细胞中引入关键酶基因,从而重构 RA 生物合成途径。Babaei 等<sup>[30]</sup>选取多来源多物种的关键酶基因,并增加关键酶基因的拷贝数,在酿酒酵母细胞中成功地构建了 RA 完整的生物合成途径,以酪氨酸为底物,确认合成出 RA,产量为  $5.930 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,该研究验证了酿酒酵母合成 RA 的可行性,并展示了应用酿酒酵母合成丹参酚酸类化合物的发展潜力。Zhou 等<sup>[31]</sup>基于可高产咖啡酸的酿酒酵母菌株进行基因改造,并通过敲除预苯酸脱氢酶基因与下调 4CL 基因表达水平从而减弱副产物苯乳酸的合成,将 RA 合成量提高至  $208.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该研究中通过基因工程技术抑制酿酒酵母副产物的合成,提高主产物产量的研究方法,可为今后以酿酒酵母为代表的真核细胞生物合成丹参酚酸类化合物的研究提供新思路。

**2.2.2 SAB 在酿酒酵母中的合成** 尽管目前 SAB 的生物合成途径尚未完全阐明,但其合成生物学的相关研究或有助于揭示其生物合成机制。Xu 等<sup>[32]</sup>采取基因整合策略将多种不同来源的基因整合进两组酿酒酵母菌株,以期实现 SAB 全合成,另外两组菌株在不添加额外底物的情况下,首次分别合成出  $34.00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $30.00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 SAB,该研究为利用微生物细胞从头合成 SAB 提供了一种新的研究思路。值得注意的是,在没有引入外源 LAC 基因的条件下,酿酒酵母底盘细胞仍然能合成 SAB,这表明 SAB 的生物合成机制以及漆酶的催化功能还有待深入研究阐明。

微生物体内合成丹参酚酸类化合物具有反应条件温和且生产周期短的优点,是实现工业化生产丹参酚酸类化合物的重要手段。但丹参酚酸类化合物生物合成途径的复杂性,以及合成机制尚未阐明的问题,为其合成生物学的研究带来了困难。筛选高催化活性的关键酶基因,优化目标产物的生物合成途径,发掘高效并且稳定的微生物培养模式以及选择合适的底物仍是当前重要的研究方向。

## 3 丹参酚酸类化合物生物合成的代谢调控

目前的研究表明,丹参酚酸类化合物的生物



合成受多种非生物和生物因素的影响,例如无机盐、内生菌和植物激素等,这些影响因素调控多种丹参基因编码酶和转录因子的表达。

### 3.1 非生物因素

研究表明金属离子、UV-B 辐射和磷酸盐等多种非生物因素均可以影响丹参酚酸类化合物的生物合成(见表 1)。适宜条件下非生物因素对丹参酚酸类化合物中关键酶的影响多呈促进作用,其中 TAT 为受非生物因素影响最大的关键酶。因此在丹参的培养过程中,适量补充部分金属元素或减少丹参中的部分非金属元素,能够增加丹参酚酸类化合物的积累。 $\text{Ag}^+$ 通过提高丹参酚酸类化合物生物合成途径所涉及上游基因(PAL、C4H、4CL、TAT、HPPR)和下游基因(RAS、CYP98A14)的表达水平,促进丹参中 RA、咖啡酸和阿魏酸的合成,但抑制 SAB 和肉桂酸的合成<sup>[33]</sup>。 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的  $\text{Cu}^{2+}$ 可激活丹参中的 LAC20、LAC13、LAC7 和 RAS 并促进 SAA 的合成<sup>[34]</sup>。 $\text{La}^{2+}$ 通过提高 TAT 和 HPPR 活性,增强丹参毛状根中丹参酚酸类化合物的积累<sup>[35]</sup>;同时, $\text{La}^{2+}$ 作为钙通道阻滞剂还可对丹参毛状根中的钙调蛋白产生影响,继而影响代谢调控<sup>[36]</sup>。 $\text{Ca}^{2+}$ 处理丹参细胞培养物后,可同时增加 PAL 和 TAT 的活性从而显著提高 RA 的产量,并且对 PAL 的酶促作用比 TAT 更明显<sup>[37]</sup>。UV-B 辐射通过激活丹参酚酸类化合物生物合成途径所涉及的多个关键酶以及转录因子,从而促进丹参中丹参酚酸类化合物的合成。研究发现,UV-B 处理后可以增加促进 SAA 合成的植物激素的含量<sup>[38]</sup>。在磷酸盐缺乏的条件下,RA 和 SAB 的产量可随着编码 PAL、C4H、TAT、HPPR 和 RAS 基因表达的增强而增加<sup>[39]</sup>。

### 3.2 生物因素

调节丹参中丹参酚酸类化合物生物合成的生物因素包括酵母浸膏、植物内生菌、真菌菌丝提取物和叶酸等(见表 2)。生物因素对丹参酚酸类化合物中关键酶的影响没有明显偏向性,其中 TAT 为受生物因素影响最大的关键酶。在丹参的培养过程中,需注意控制植物生长的外界环境以改变微生物繁殖对于丹参酚酸类化合物积累的影响,增加有益菌在丹参中的种群优势。酵母浸膏处理丹参毛状根后,可提高 TAT 活性使丹参酚酸类化合物含量显著增加<sup>[40]</sup>。Yan 等<sup>[41]</sup>从丹参中分离出 5 种植物内生菌,并证实其可抑制丹参毛状根中 PAL 和 TAT 的活性并导致 RA 和 SAB 生成量降低;Zhou 等<sup>[42]</sup>从丹参中鉴定出 28 株 *Alternaria* 内生菌并对其进

行研究分析,结果表明 *Alternaria* sp. A13 通过提高 C4H 的活性而促进丹参生长与丹参酚酸类化合物合成。真菌菌丝提取物可以使苯丙烷途径中的关键酶(PAL、C4H 和 4CL)活性增加<sup>[43]</sup>;此外,真菌菌丝提取物也可以抑制丹参毛状根 TAT 和 HPPR 的基因表达<sup>[44]</sup>。叶酸对丹参毛状根中 RA 和 SAB 的合成均有正向诱导作用,现有研究表明叶酸可上调 PAL、TAT 和 RAS 的基因表达<sup>[45]</sup>。

表 1 非生物因素对丹参酚酸类化合物生物合成酶的影响

Tab 1 Effect of abiotic factors on key enzymes of salvianolic acid biosynthesis

酶	金属离子				UV-B 辐射	磷酸盐
	$\text{Ag}^+$	$\text{Cu}^{2+}$	$\text{La}^{2+}$	$\text{Ca}^{2+}$		
PAL	+	—	—	+	+	—
C4H	+	—	—	—	—	—
4CL	+	—	—	—	—	—
TAT	+	—	+	+	+	—
HPPR	+	—	+	—	—	—
RAS	+	+	—	—	+	—
CYP98A14	+	—	—	—	—	—
LAC	—	+	—	—	—	—

注:“+”表示对关键酶产生促进作用,“—”表示对关键酶产生抑制作用。

Note: “+” indicates promoting effect on key enzymes, “—” indicates inhibiting effect on key enzymes.

表 2 生物因素对丹参酚酸类化合物生物合成酶的影响

Tab 2 Effect of biological factors on key enzymes of salvianolic acid biosynthesis

酶	酵母浸膏	植物内生菌	真菌菌丝提取物	叶酸
PAL	—	—	+	+
C4H	—	+	+	—
4CL	—	—	+	—
TAT	+	—	—	+
HPPR	—	—	—	—
RAS	—	—	—	+

注:“+”表示对关键酶产生促进作用,“—”表示对关键酶产生抑制作用。

Note: “+” Indicates promoting effect on key enzymes, “—” indicates inhibiting effect on key enzymes.

### 3.3 植物激素

植物激素和植物生长调节剂在丹参酚酸类化合物生物合成中起着重要的调节作用。水杨酸、茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)、脱落酸(abscisic acid, ABA)、赤霉素(gibberellic acid, GA)和乙烯通过影响丹参酚酸类化合物合成途径中的关键酶,从而调节丹参酚酸类化合物的合成(见表 3)。适宜条件下植物激素对丹参酚酸类化合物中关键酶的影响多呈促进作用,其中 PAL 为受



植物因素影响最大的关键酶，TAT 在多种植物激素影响下活性均被提高。水杨酸可诱导丹参悬浮培养细胞中 NO 产生，NO 通过激活 PAL 促进 SAB 生物合成<sup>[46]</sup>。另外，水杨酸提高 PAL 活性也可能与过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 有关。水杨酸处理后的丹参细胞可显著提高 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成量，提高 PAL 的活性，进而促进 RA 的合成<sup>[47]</sup>。MeJA 可上调丹参中涉及丹参酚酸类化合物生物合成的酶基因表达，进而促进丹参酚酸类化合物的产生。Xing 等<sup>[48]</sup> 研究发现，MeJA 通过上调 *C4H*、*4CL*、*TAT*、*HPPR* 和 *RAS* 的基因表达促进 RA 和 SAB 的生物合成，但是同时 PAL 的表达受到 MeJA 抑制；除此之外，MeJA 还可激活 RA 合成途径中的关键酶 CYP98A14，促进丹参中 RA 的合成量<sup>[49-50]</sup>。ABA 处理丹参毛状根后，编码 *PAL*、*TAT*、*C4H*、*RAS*、*CYP98A14* 等关键酶的基因表达显著增高；同时，该研究还分析了 *LAC* 基因的表达情况，发现其中 7 个 LACs 与 *RAS* 和 *CYP98A14* 表现出相似的激活模式，促进丹参酚酸类化合物的形成<sup>[51]</sup>。GA 和乙烯均能提高 PAL 和 TAT 的活性从而诱导丹参毛状根合成丹参酚酸类化合物<sup>[52]</sup>。

表 3 植物激素对丹参酚酸类化合物生物合成酶的影响

Tab 3 Effect of phytohormone on key enzymes of salvanolic acid biosynthesis

酶	水杨酸	MeJA	ABA	GA	乙烯
PAL	+	-	+	+	+
C4H	-	+	+	-	-
4CL	-	+	-	-	-
TAT	-	+	+	+	+
HPPR	-	+	-	-	-
RAS	-	+	+	-	-
CYP98A14	-	+	+	-	-
LAC	-	-	+	-	-

注：“+”表示对关键酶产生促进作用，“-”表示对关键酶产生抑制作用。

Note: “+” Indicates promoting effect on key enzymes, “-” indicates inhibiting effect on key enzymes.

#### 4 总结与展望

作为广泛应用于临床心脑血管疾病治疗的中药，丹参酚酸类化合物具有重要的药理活性。然而，目前丹参酚酸类化合物的规模化生产尚未实现，导致其临床广泛应用受限。因此，识别丹参酚酸类化合物在丹参中的合成途径及代谢调控机制，为提高丹参产量和丹参酚酸类化合物含量至关重要。近年来，高通量代谢组学、基因组学、转录组学以及蛋白质组学等研究手段的应用为解

析丹参酚酸类化合物在丹参中的生物合成与代谢调控提供了新的突破口<sup>[53]</sup>。这些技术可用于识别与丹参酚酸类化合物生物合成相关的基因和代谢途径，并进一步优化丹参培育和加工方法以提高丹参酚酸类化合物的产量。但是，丹参酚酸类化合物的生物合成依然存在不可避免的问题：① 如何对具体的代谢途径和酶催化机制进行更深入的研究；② 如何利用所明晰的代谢调控机制来进一步提高丹参酚酸类化合物的生物合成；③ 如何解决丹参酚酸类化合物的生物合成产物含量低且易转化的问题。利用合成生物学和基因工程技术构建简单、繁殖代谢快速的天然微生物，结合微生物细胞内的全生物合成途径，可以实现对丹参酚酸类化合物的高效大规模生产，从而实现更高效和可控的生产方式<sup>[54]</sup>。合成生物学的出现，为丹参酚酸类化合物的生产优化提供了新的机遇，同时在为丹参酚酸类化合物生物合成途径予以佐证的基础上，也为其生物合成机制提供了进一步完善的可能。

综上所述，生物合成研究以及合成生物学技术的发展为丹参酚酸类化合物的产量和质量提高提供了新的途径。在未来的研究中，可聚焦于深入探索并阐明 SAA 和 SAB 等其他丹参酚酸类成分在丹参中的生物合成与累积机制，完善关键酶的结构与功能解析，为进一步对微生物底盘进行改造奠定理论基础，利用合成生物学手段提升多种丹参酚酸类化合物的产量和质量，应用多种代谢调控因素协同使用的手段促进所需丹参酚酸类化合物的定向合成，从而进一步提高其药用价值。

#### 参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020: 76-77.
- [2] 毛美玲, 谢丽钰, 罗文宽, 等. 丹参及其有效成分对心血管系统的药理机制研究进展 [J/OL]. 中华中医药学刊, <https://link.cnki.net/urlid/21.1546.R.20230915.1809.094>.
- [3] Pei RZ, Si T, Lu Y, et al. Salvanolic acid A, a novel PI3K/Akt inhibitor, induces cell apoptosis and suppresses tumor growth in acute myeloid leukemia [J]. *Leuk Lymphoma*, 2018, 59 (8): 1959.
- [4] Wang CH, Luo H, Xv YN, et al. Salvanolic acid B-alleviated angiotensin II induces cardiac fibrosis by suppressing NF-kappaB pathway in vitro [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 7654.
- [5] 单晓晓, 洪帮振, 刘洁, 等. 丹参化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46 (21): 5496.
- [6] 张羽钦. 基于抗氧化作用的心血管药物先导化合物活性

- 筛选与评价[D].北京:协和医学院,2010.
- [7] Petersen M, Häusler E, Meinhard J, et al. The biosynthesis of rosmarinic acid in suspension cultures of *Coleus blumei* [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 1994, 38: 171-179.
- [8] Hou XM, Shao FJ, Ma YM, et al. The phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Salvia miltiorrhiza*: genome-wide characterization, molecular cloning and expression analysis [J]. Mol Biol Rep, 2013, 40 (7): 4301-4310.
- [9] Huang BB, Duan YB, Yi B, et al. Characterization and expression profiling of cinnamate 4-hydroxylase gene from *Salvia miltiorrhiza* in rosmarinic acid biosynthesis pathway [J]. Russ J Plant Physiol, 2008, 55 (3): 390-399.
- [10] Zhao SJ, Hu ZB, Liu D, et al. Two divergent members of 4-coumarate: coenzyme A ligase from *Salvia miltiorrhiza Bunge*: cDNA cloning and functional study [J]. J Integr Plant Biol, 2006, 48 (11): 1355-1364.
- [11] Tan RH, Chen M, Wang L, et al. A tracking work on how Sm4CL2 re-directed the biosynthesis of salvianolic acids and tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. Plant Cell Rep, 2023, 42 (2): 297-308.
- [12] Huang BB, Yi B, Duan YB, et al. Characterization and expression profiling of tyrosine aminotransferase gene from *Salvia miltiorrhiza* (Dan-shen) in rosmarinic acid biosynthesis pathway [J]. Mol Biol Rep, 2007, 35 (4): 601-612.
- [13] Wang GQ, Chen JF, Yi B, et al. HPPR encodes the hydroxyphenylpyruvate reductase required for the biosynthesis of hydrophilic phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Chin J Nat Med, 2017, 15 (12): 917-927.
- [14] 谈荣慧, 赵望, 张金家, 等. 丹参 SmHPPR1 基因调控丹酚酸生物合成的研究 [J]. 药学报, 2023, 58 (9): 2818-2828.
- [15] Wang B, Sun W, Li QS, et al. Genome-wide identification of phenolic acid biosynthetic genes in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Planta, 2014, 241 (3): 711-725.
- [16] Di P, Zhang L, Chen JF, et al. <sup>13</sup>C Tracer reveals phenolic acids biosynthesis in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza* [J]. ACS Chem Biol, 2013, 8 (7): 1537-1548.
- [17] Zhou Z, Tan HX, Li Q, et al. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis of RAS in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Phytochemistry, 2018, 148: 63-70.
- [18] 陈进芳, 陈祥慧, 李卿, 等. 唇形科 8 种药用植物漆酶基因的发现与生物信息学分析 [J]. 中草药, 2021, 52 (16): 4996-5004.
- [19] Li Q, Feng JX, Chen L, et al. Genome-wide identification and characterization of *Salvia miltiorrhiza* Laccases reveal potential targets for salvianolic acid B biosynthesis [J]. Front Plant Sci, 2019, 10: 435.
- [20] Zhou Z, Li Q, Xiao L, et al. Multiplexed CRISPR/Cas9-mediated knockout of Laccase genes in *Salvia miltiorrhiza* revealed their roles in growth, development, and metabolism [J]. Front Plant Sci, 2021, 12: 647768.
- [21] Yang QQ, Hua WP, Zou HL, et al. Overexpression of SmLAC25 promotes lignin accumulation and decreases salvianolic acid content in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Plant Sci, 2022, 325 (12): .
- [22] Bloch, Sarah E, Schmidt-Dannert C. Construction of a chimeric biosynthetic pathway for the De Novo biosynthesis of rosmarinic acid in *Escherichia coli* [J]. Chembiochem, 2014, 15 (16): 2393-2401.
- [23] Jiang JJ, Bi HP, Zhuang YB, et al. Engineered synthesis of rosmarinic acid in *Escherichia coli* resulting production of a new intermediate, caffeoyl-phenyllactate [J]. Biotechnol Lett, 2015, 38 (1): 81-88.
- [24] Zhuang YB, Jiang JJ, Bi HP, et al. Synthesis of rosmarinic acid analogues in *Escherichia coli* [J]. Biotechnol Lett, 2015, 38 (4): 619-627.
- [25] Li ZH, Wang XN, Zhang HR. Balancing the non-linear rosmarinic acid biosynthetic pathway by modular co-culture engineering [J]. Metab Eng, 2019, 54: 1-11.
- [26] Wang L, Wang HJ, Chen JB, et al. Coordinating caffeic acid and salvianic acid A pathways for efficient production of rosmarinic acid in *Escherichia coli* [J]. Metab Eng, 2023, 76: 29-38.
- [27] Yao YF, Wang CS, Qiao JJ, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of salvianic acid A via an artificial biosynthetic pathway [J]. Metab Eng, 2013, 19: 79-87.
- [28] Zhou L, Ding Q, Jiang GZ, et al. Chromosome engineering of *Escherichia coli* for constitutive production of salvianic acid A [J]. Microb Cell Fact, 2017, 16 (1): 84.
- [29] Hu KS, Chen CL, Ding HR, et al. Production of salvianic acid A from L-DOPA via biocatalytic cascade reactions [J]. Molecules, 2022, 27 (18): 6088.
- [30] Babaei M, Borja Zamfir GM, Chen X, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for rosmarinic acid production [J]. ACS Synth Biol, 2020, 9 (8): 1978-1988.
- [31] Zhou PP, Yue CL, Zhang YC, et al. Alleviation of the byproducts formation enables highly efficient biosynthesis of rosmarinic acid in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. J Agric Food Chem, 2022, 70 (16): 5077-5087.
- [32] Xu YP, Geng LJ, Zhang YW, et al. *De novo* Biosynthesis of salvianolic acid B in *Saccharomyces cerevisiae* engineered with the rosmarinic acid biosynthetic pathway [J]. J Agric Food Chem, 2022, 70 (7): 2290-2302.
- [33] Xing BC, Yang DF, Guo WL, et al. Ag<sup>+</sup> as a more effective elicitor for production of tanshinones than phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. Molecules, 2014, 20 (1): 309-324.
- [34] Xiang YP, Wang XX, Song W, et al. Integrative omics analyses reveal the effects of copper ions on salvianolic acid biosynthesis [J]. Front Plant Sci, 2021, 12: 746117.
- [35] 边丽华, 邹琳, 周冰谦, 等. 稀土元素镧对丹参活性物质积累及其合成途径中酶基因表达的影响 [J]. 中国中药

- 杂志, 2016, 41 (23): 4344-4349.
- [36] Sun H, Xu ZX, Zhou J, et al. Karrikins-induced accumulation of salvianolic acid B is mediated by calcium-calmodulin, brassinolide and jasmonic acid in *Salvia miltiorrhiza* [J]. S Afr J Bot, 2020, 132: 45-49.
- [37] 刘连成, 董娟娥, 张婧一, 等.  $Ca^{2+}$ 对丹参培养细胞中迷迭香酸合成及其相关酶活性的影响 [J]. 生物工程学报, 2012, 28 (11): 1359-1369.
- [38] Yin XJ, Fan H, Chen Y, et al. Integrative omic and transgenic analyses reveal the positive effect of ultraviolet-B irradiation on salvianolic acid biosynthesis through upregulation of *SmNAC1* [J]. Plant J, 2020, 104: 781-799.
- [39] Liu L, Yang DF, Liang TY, et al. Phosphate starvation promoted the accumulation of phenolic acids by inducing the key enzyme genes in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. Plant Cell Rep, 2016, 35: 1933-1942.
- [40] 王飞艳, 尤华乾, 杜旭红, 等. 不同氮源对丹参和藏丹参毛状根有效成分积累的影响 [J]. 中草药, 2020, 51 (9): 2538-2547.
- [41] Yan Y, Zhang SC, Zhang JY, et al. Effect and mechanism of endophytic bacteria on growth and secondary metabolite synthesis in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. Acta Physiol Plant, 2014, 36: 1095-1105.
- [42] Zhou LS, Tang K, Guo SX. The plant growth-promoting fungus (PGPF) *Alternaria sp.* A13 markedly enhances *Salvia miltiorrhiza* root growth and active ingredient accumulation under greenhouse and field conditions [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19: 270.
- [43] Zhang SC, Yan Y, Wang BQ, et al. Selective responses of enzymes in the two parallel pathways of rosmarinic acid biosynthetic pathway to elicitors in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures [J]. J Biosci Bioeng, 2014, 117: 645-651.
- [44] 张顺仓, 刘岩, 沈双, 等. 诱导子对丹参毛状根酚酸类和丹参酮类成分积累的影响 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36 (10): 1269-1274.
- [45] Yang DF, Huang ZC, Xing BC, et al. Regulation of folic acid on phenolic acids production in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2016, 127: 175-185.
- [46] 张婧一, 陈红艳, 张洪培, 等. 水杨酸诱发的 NO 介导了丹参悬浮培养细胞中丹酚酸 B 的生物合成 [J]. 植物科学学报, 2015, 33 (1): 81-89.
- [47] Hao WF, Guo HB, Zhang JY, et al. Hydrogen peroxide is involved in salicylic acid-elicited rosmarinic acid production in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures [J]. Sci World J, 2014, 2014: 843764.
- [48] Xing BC, Yang DF, Liu L, et al. Phenolic acid production is more effectively enhanced than tanshinone production by methyl jasmonate in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2018, 134: 119-129.
- [49] Zhou W, Shi M, Deng CP, et al. The methyl jasmonate-responsive transcription factor SmMYB1 promotes phenolic acid biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Hortic Res, 2021, 8 (1): 10.
- [50] Deng CP, Wang Y, Huang FF, et al. SmMYB2 promotes salvianolic acid biosynthesis in the medicinal herb *Salvia miltiorrhiza* [J]. J Integr Plant Biol, 2020, 62 (11): 1688-1702.
- [51] Shi M, Hua Q, Kai GY. Comprehensive transcriptomic analysis in response to abscisic acid in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2021, 147: 389-404.
- [52] 崔北米, 梁宗锁, 刘岩, 等. ABA 及其生物合成抑制剂对丹参毛状根酚酸类成分和关键酶的影响 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37 (6): 754-759.
- [53] 史汶龙, 王健, 马莹, 等. 中药活性成分生物合成途径解析研究方法进展 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48 (9): 2273-2283.
- [54] 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.

(收稿日期: 2023-11-22; 修回日期: 2023-12-10)



## 达比加群在儿童血栓栓塞性疾病的应用研究进展

周姝含<sup>1</sup>, 胡长平<sup>1\*</sup>, 罗平<sup>2\*</sup> (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:** 近年来, 静脉血栓栓塞症在儿童人群中发病率逐渐升高。达比加群作为新型直接口服抗凝血药, 具有剂量固定、口服方便、无需监测国际标准化比值 (INR)、与食物和药物的相互作用少、起效快以及血浆半衰期短等优点, 现已成为预防和治疗儿童血栓栓塞性疾病的重要药物。达比加群酯口服颗粒于 2021 年 6 月经 FDA 批准用于治疗 3 个月至 12 岁的儿童静脉血栓以及复发性血栓, 同时批准达比加群酯口服胶囊剂用于治疗 8 岁及以上患者的静脉血栓, 以及预防完成首次静脉血栓治疗后的血栓复发。本文就达比加群在防治儿童血栓栓塞性疾病的研究进展进行综述。

**关键词:** 达比加群; 达比加群酯; 直接口服抗凝血药; 儿童; 血栓栓塞

**中图分类号:** R96, R541.75 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)08-2124-07  
**doi:**10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.025

### Research of dabigatran in children with thromboembolic diseases

ZHOU Shu-han<sup>1</sup>, HU Chang-ping<sup>1\*</sup>, LUO Ping<sup>2\*</sup> (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:** In recent years, the incidence of venous thromboembolism in children is gradually increasing. As a new type of direct oral anticoagulant, dabigatran has the advantages of fixed dose, convenient oral administration, no need to monitor international standardized ratio, few interactions with food and drugs, fast onset, and short plasma half-life. Dabigatran has therefore become an important drug for the prevention and treatment of thromboembolism in children. Dabigatran etexilate oral granules were approved by the FDA in June 2021 for venous thrombosis and recurrent thrombosis in children aged 3 months to 12 years old. At the same time, dabigatran etexilate oral capsules were approved for the treatment of venous thrombosis in children aged 8 years and above, as well as for preventing the recurrence of thrombosis after the first venous thrombosis treatment. This article reviewed the research progress of dabigatran in the prevention and treatment of thromboembolic diseases in children.

**Key words:** dabigatran; dabigatran etexilate; direct oral anticoagulant; child; thromboembolism

静脉血栓栓塞 (venous thromboembolism, VTE) 在 0~18 岁人群中发病率约为十万分之一<sup>[1-2]</sup>, 呈双峰分布, 在婴儿 (<1 岁) 和青少年 (13~18 岁) 中发病率最高<sup>[3-4]</sup>。近年来, 随着诊断水平的提高和中心静脉导管使用的增加, VTE 确诊率较前上

升<sup>[5]</sup>。美国血液学会《2018 年静脉血栓栓塞管理指南 (小儿静脉血栓栓塞的治疗)》指出目前儿科使用的抗凝药主要有三种: 低分子肝素 (low molecular weight heparin, LMWH)、普通肝素 (unfractionated heparin) 和维生素 K 拮抗药 (vitamin K antagonists,

**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); 临床用药卫生技术评估专项课题 (No. 2023WSJSPGZXKT-24 号)。

**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

VKAs)<sup>[6]</sup>。LMWH 是儿科 VTE 的首选药物，但其抗凝作用仅部分被鱼精蛋白逆转<sup>[7]</sup>。普通肝素具有潜在的不良反应，应避免长期使用<sup>[7-8]</sup>。华法林是最常用的 VKAs，但在治疗期间需频繁监测国际标准化比值 (international normalized ratio, INR)<sup>[7, 9]</sup>，降低了患儿的依从性。达比加群 (dabigatran) 是一种选择性、可逆性的直接凝血酶抑制剂 (direct thrombin inhibitors, DTIs)，与上述常用抗凝血药相比，达比加群等直接口服抗凝血药 (direct oral anticoagulants, DOACs) 具有固定剂量、无需监测 INR、与食物和药物的相互作用少、起效快以及血浆半衰期短等优势<sup>[10-11]</sup>，可能成为儿童 VTE 治疗的选择<sup>[11]</sup>。美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 于 2021 年 6 月 21 日批准达比加群酯口服颗粒用于治疗 3 个月至 12 岁的儿童静脉血栓以及复发性血栓<sup>[12]</sup>，同时还批准达比加群酯口服胶囊剂用于治疗 8 岁及以上患者的静脉血栓，以及预防完成首次静脉血栓治疗后的血栓复发<sup>[12]</sup>。国内尚无达比加群用于儿童的临床研究，现就达比加群应用于儿童血栓栓塞性疾病的研究进展进行综述。

### 1 达比加群在儿童中的药代动力学

达比加群酯属于  $\beta$ -丙氨酸类凝血酶抑制剂，是达比加群的前体药物<sup>[13]</sup>。达比加群的种群药代动力学 (pharmacokinetics, PK) 可用一级消除和吸收的两室模型充分描述，年龄、体重、体表面积、标准化肾功能和性别是具有统计学意义的协变量<sup>[14]</sup>。儿童 VTE 人群 PK 模型可以预测表观清除率的变化，并以此调整给药剂量，以达到与成人相似的暴露量<sup>[14]</sup>。

达比加群酯口服后，经胃肠吸收进入体内，被血浆酯酶水解为达比加群<sup>[15-16]</sup>。达比加群酯的生物利用度通常为 3% ~ 7%<sup>[15]</sup>，在 0.5 ~ 2 h 内达到最大血浆浓度<sup>[17]</sup>。根据成人达比加群临床研究得出暴露剂量的参考范围 (26 ~ 250 ng·mL<sup>-1</sup>)，达比加群酯给药后 12 h，大多数幼儿服用口服液后暴露量在成人参考范围内，只有少数儿童的暴露量 < 26 ng·mL<sup>-1</sup> 或 > 250 ng·mL<sup>-1</sup> (分别 < 5% 和 < 1%)<sup>[14]</sup>。达比加群表观分布容积为 50 ~ 70 L，血浆蛋白结合率约 35%，20% 通过偶联反应代谢<sup>[16, 18]</sup>，不发生氧化反应。达比加群是唯一不经细胞色素 P450 同工酶代谢的 DOACs<sup>[13]</sup>，它主要通过肾脏排泄，以达比加群形式 (77%) 或达比加群葡糖醛酸苷形式 (4%) 随尿液排泄<sup>[18]</sup>。肾功

能不全显著增加其血药浓度，故严重肾功能损伤的患者禁用达比加群，以防止药物蓄积和大出血风险增加<sup>[19]</sup>。

### 2 达比加群用于 VTE 儿童的临床试验

不同剂型 (胶囊、颗粒或口服液) 达比加群的儿童给药剂量是基于 Hayton 方程并根据年龄和体重调整的 Nomogram 预测计算得出<sup>[20]</sup>，即根据患儿的年龄和体重来估计肾功能，调整给药剂量以达到与成人相似暴露量 (成人 bid, 每次 150 mg)<sup>[20-21]</sup>。Halton<sup>[22-25]</sup> 和 Brandão<sup>[26]</sup> 等的五项临床试验评估了达比加群预防和治疗儿童 VTE 的 PK/PD 关系以及安全性、耐受性，讨论根据年龄和体重制订儿童用药方案的适用性以及达比加群作为儿童 VTE 治疗的替代的可能性。

#### 2.1 II a 期临床试验：达比加群酯用于儿童人群的安全性、耐受性和 PK/PD

有学者依次在不同年龄段 (12 ~ 18 岁青少年患者<sup>[22]</sup>、1 ~ 12 岁儿童患者<sup>[23]</sup> 和 1 岁以下婴儿患者<sup>[24]</sup>) 的儿童开展临床试验。结果显示，达比加群在不同年龄段患儿的安全性以及耐受性均较好，且都具有与成人相似的药动学 / 药效学 (pharmacokinetics/pharmacodynamics, PK/PD) 关系。

2009 年 8 月至 2012 年 2 月进行的一项多中心、开放标签、多剂量 II a 期临床研究 (NCT-00844415)<sup>[22]</sup>，旨在探讨达比加群酯在 12 ~ 18 岁原发性 VTE 青少年 ( $n = 9$ ) 中的安全性、耐受性和 PK/PD 关系。患者服用达比加群酯 (bid, 持续 3 d)，首次给药 1.71 mg·kg<sup>-1</sup>，随后 3 d 观察患者各指标以及安全问题。若无安全问题，自首日的第二次给药开始，剂量增加至 2.14 mg·kg<sup>-1</sup>；若存在安全问题则停药。试验中未报道出血事件、死亡或与药物相关的严重不良反应，除了 2 名患者出现消化不良反应外，达比加群酯的总体耐受性良好。结果显示，达比加群血浆总浓度与稀释凝血酶时间 (dilute thrombin time, dTT) 和蝮蛇毒凝血时间 (ecarin clotting time, ECT) 呈线性 PK/PD 关系，与活化部分凝血活酶时间 (activated partial thromboplastin time, APTT) 呈非线性 PK/PD 关系，该部分原发性 VTE 青少年患者与成人具有相同的 PK/PD 关系。

2010 年 3 月至 2016 年 2 月进行的一项开放标签、多国多中心、非随机、非对照的单臂 II a 期临床研究 (NCT01083732)<sup>[23]</sup>，旨在研究达比

加群酯口服液体剂在 1~12 岁 VTE 儿童患者 ( $n = 18$ ) 中的安全性、耐受性和 PK/PD 关系。所有研究对象已完成了 LMWH 或口服 VKAs 抗凝血药的标准治疗,患者在最后一次标准治疗后 5~30 d 内服用达比加群酯口服液体剂。结果显示,治疗期间和治疗后发生的不良反应判定为与试验无关,且无死亡事件、出血事件;治疗后随访 1 个月 VTE 无复发。达比加群总浓度与 dTT 和 ECT 存在线性 PK/PD 关系;与 APTT 呈非线性 PK/PD 关系,该部分儿童 VTE 患者与成人和青少年具有相同的 PK/PD 关系。

2014 年 9 月至 2016 年 1 月进行的一项开放标签、非随机、非对照、单剂量、单臂、多国安全性 II a 期临床研究 (NCT02223260)<sup>[24]</sup>,旨在研究达比加群酯口服液体剂在 VTE 婴儿中的安全性、耐受性和 PK/PD 关系。研究对象为年龄在 0~12 个月的 VTE 婴儿 ( $n = 8$ ),接受单剂量达比加群酯口服液体剂治疗。结果显示,在研究期间,所有接受治疗的患者均未发生出血事件、死亡事件以及与治疗相关的不良事件;婴儿对达比加群酯耐受性良好。达比加群总浓度与 ECT 和 dTT 呈线性 PK/PD 关系,与 APTT 呈非线性 PK/PD 关系,该部分婴儿 VTE 患者与成人和青少年具有相同的 PK/PD 关系。

## 2.2 II b/III 期临床试验: DIVERSITY 多样性试验研究

DIVERSITY 多样性试验 (NCT01895777) 是一项多国、多中心、随机、对照、开放标签、非劣效性的 II b/III 期临床试验<sup>[25]</sup>。研究对象为 18 岁以下的儿童患者 ( $n = 267$ ),其中 90 人 (33.7%) 接受标准治疗 (LMWH、普通肝素、VKAs 或磺达肝癸钠),177 人 (66.3%) 接受达比加群酯。主要综合疗效终点是治疗 3 个月期间血栓是否完全消退,随访 1 个月期间复发性 VTE 和 VTE 相关死亡发生率。由于 VTE 危险因素持续存在,部分需要接受 3 个月以上抗凝治疗的患者 (标准治疗组 33% vs 达比加群组 34%) 将转入 III 期临床试验 (NCT02197416),两组差异无统计学意义。标准治疗组与达比加群组患者血栓完全消退的比例相似 (42% vs 46%),无 VTE 复发 (92% vs 96%) 与无 VTE 相关死亡 (99% vs 100%) 的患者比例差异无统计学意义。达比加群组在血栓溶解和复发性 VTE 方面非劣效于标准治疗组,同时也显

示了达比加群儿童给药剂量算法的适用性。标准治疗组和达比加群组均报道了不良反应 (67% vs 77%),报告的出血事件相似 (24% vs 22%),显示达比加群的疗效和安全性与标准治疗相似。综上, DIVERSITY 多样性试验的结果表明,达比加群可作为儿童急性 VTE 标准治疗的替代选择。

## 2.3 III 期临床试验: 达比加群用于预防儿童 VTE 复发的疗效和安全性

2014 年 7 月至 2020 年 4 月进行了一项开放标签、单臂、前瞻性队列的临床 III 期安全性研究 (NCT02197416)<sup>[26]</sup>,旨在描述使用达比加群酯预防儿童 VTE 复发的安全性。研究对象为 3 个月~18 岁的 VTE 儿童 ( $n = 203$ )。纳入标准为确诊为 VTE 并接受标准治疗或者在 DIVERSITY 试验中需进一步抗凝治疗的患者。达比加群治疗 12 个月后评估患者的 VTE 风险因素,如果已解决则停止治疗,如未解决则改用标准治疗方案继续治疗。所有患者达比加群暴露的中位时间为 36.3 周,停用达比加群后随访 28 d。主要终点为入组后 6 个月和 12 个月评估的 VTE 复发、死亡和重大出血事件。结果显示,2 名儿童 (1.0%) 出现了 VTE 复发。在报告了出血事件的 40 名儿童中,有 3 名 (1.5%) 是重大出血事件,37 名 (18.2%) 是轻微出血事件,治疗期间无死亡病例。结果表明,给予达比加群治疗后 VTE 的复发率较低,重大出血事件或临床相关非重大出血事件较 DIVERSITY 试验少,达比加群对具有持续性 VTE 危险因素的 3 个月~18 岁患者的静脉畸形患者发生的慢性消耗性凝血病称为二级预防表现出良好的安全性。

达比加群用于儿童 VTE 的临床试验汇总表 1。

## 3 达比加群在儿童血栓疾病中的病例报道

### 3.1 达比加群用于儿童静脉畸形引起的凝血障碍

静脉畸形患者发生的慢性消耗性凝血病称为局部血管内凝血 (localized intravascular coagulation, LIC),甚至可转化为弥散性血管内凝血 (disseminated intravascular coagulopathy, DIC)<sup>[27]</sup>。LIC 的特点是血浆纤维蛋白原水平低,而血浆 D-二聚体和纤维蛋白降解产物 (fibrin degradation product, FDP) 水平升高<sup>[27]</sup>。达比加群酯不仅可以降低血浆 D-二聚体和 FDP 水平,还可提高血浆纤维蛋白原水平,缓解疼痛。1 例 2 岁静脉畸形患者右臂出现疼痛和运动障碍, LIC 和 DIC 潜



表 1 达比加群用于儿童 VTE 的临床试验汇总

Tab 1 Clinical trials of dabigatran for pediatric venous thromboembolism

临床试验	试验人群	给药剂量 (等同于成人 150 mg bid)	主要观察指标	试验结论	试验时间	安全性
II a 期研究 (NCT00844415) <sup>[22]</sup>	12 ~ 18 岁原发性 VTE 青少年 (n = 9)	达比加群酯 bid, 3 d	dTT、ECT、APTT、不良反应	原发性 VTE 青少年患者与成人具有相同的 PK/PD 关系	2009 年 8 月—2012 年 2 月	2 名患者出现消化不良反应
II a 期研究 (NCT01083732) <sup>[23]</sup>	1 ~ 12 岁 VTE 患儿 (n = 18)	多剂量 (bid, 3 d) 或单剂量的达比加群酯口服溶液	dTT、ECT、APTT、不良反应	儿童 VTE 患者与成人和青少年具有相同的 PK/PD 关系	2010 年 3 月—2016 年 2 月	无死亡事件、出血事件
II a 期研究 (NCT02223260) <sup>[24]</sup>	0 ~ 12 个月的 VTE 婴儿 (n = 8)	单剂量达比加群酯口服液体剂	dTT、ECT、APTT、不良反应	婴儿 VTE 患者与成人和青少年具有相同的 PK/PD 关系	2014 年 9 月—2016 年 1 月	无死亡事件、出血事件以及与治疗相关的不良事件; 耐受性良好
DIVERSITY 试验 (NCT01895777) <sup>[25]</sup>	18 岁以下 VTE 患儿 (n = 267)	基于 Hayton 方程、年龄和体重调整后的 Nomogram 计算剂量	治疗 3 个月血栓是否消退; 随访 1 个月有无复发性 VTE 和 VTE 相关死亡	达比加群在血栓溶解和复发性 VTE 方面非劣效于标准治疗组, 同时也显示了达比加群儿童给药剂量算法的适用性	2014 年 2 月—2019 年 11 月	标准治疗组和达比加群组均报告了不良反应, 报告的出血事件相似
III 期安全性研究 (NCT02197416) <sup>[26]</sup>	3 个月 ~ 18 岁 VTE 患儿 (n = 203)	基于 Hayton 方程、年龄和体重调整后的 Nomogram 计算剂量	入组后 6 个月和 12 个月评估 VTE 复发、死亡和重大出血事件	给予达比加群治疗后 VTE 的复发率较低, 重大出血事件或临床相关非重大出血事件较少 DIVERSITY 试验少	2014 年 7 月—2020 年 4 月	40 名 (19.7%) 儿童报告了出血事件, 治疗期间无死亡病例

在风险高。使用达比加群酯 (55 mg qd) 治疗 2 d 后, 患者疼痛减轻, 右臂运动改善, 脱离潜在风险, 因此停用达比加群, 进行血管内硬化治疗。治疗 2 d 后, 患儿血浆纤维蛋白原水平由治疗前的  $0.38 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  增加至  $0.72 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 血浆 D-二聚体水平由  $24.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  降至  $6.61 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 血 FDP 由  $70.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  降至  $26.9 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ <sup>[28]</sup>。1 例 17 岁患者静脉畸形病情加重, 已经从 LIC 发展为 DIC。住院期间首次给予达比加群 (110 mg bid) 治疗, 无明显出血, 且在肾功能正常的情况下, 患者开始小剂量达比加群治疗以避免药物性出血。服用达比加群后, 纤维蛋白原水平恢复至正常水平, FDP 和血浆 D-二聚体水平显著降低。后因裂红细胞未改善, 达比加群剂量上调至 150 mg bid<sup>[29]</sup>。从上述病例报道中可知, 达比加群酯是静脉畸形患者术前改善凝血功能和疼痛的合适选择以及治疗 DIC 的潜在药物。

### 3.2 达比加群用于儿童囊性纤维化 (cystic fibrosis, CF) 中心静脉导管诱导的血栓形成

儿童 CF 是以消化和呼吸功能障碍为特征, 可导致生长受限、慢性呼吸道感染、进行性肺部病变加重和早夭。患者如果存在中心静脉导管,

如完全植入式静脉通路装置或外周静脉穿刺中心静脉置管 (peripherally inserted central catheters, PICC), 则会增加 VTE 的发生风险<sup>[30]</sup>。Bansal 等<sup>[31]</sup>报道了 2 例 CF 青少年患者使用达比加群酯成功抗凝的病例。患者 1 为 17 岁女性 CF 患者, 因肺功能恶化入院治疗。入院当日, 患者左上肢放置 PICC; 第 5 日, 患者的 PICC 部位发生血栓。在院期间给予 LMWH 治疗, 因该药的皮下注射方式与给药频率导致患者依从性不佳, 不希望出院后继续使用, 故出院后拔除 PICC, 改用达比加群酯 (150 mg bid), 服用期间未出现并发症。PICC 拔除 1 个月后, 超声检查显示血栓消失。后续在右上肢接受 PICC 治疗, 治疗期间继续服用达比加群预防血栓形成, 无并发症出现。患者 2 为 18 岁女性 CF 患者, 有肺功能恶化复发病史。入院后需在右上肢放置 PICC, 但因右上肢存在陈旧血栓而失败。血液科建议口服达比加群 150 mg bid, 以防止血栓进展为急性静脉血栓。服用期间未出现不良事件。患者随后几次入院, 使用完全植入式静脉通路装置时未发生血栓。以上 2 例病例提示, 达比加群可作为 CF 儿童患者 PICC 血栓形成抗凝治疗的一种选择。

### 3.3 肝移植后血栓与出血并发症

儿童进行肝移植 (liver transplantation, LT) 后, 出血和血栓并发症的风险大, 促凝血药和抗凝血药通常用于预防和治疗血栓及出血并发症<sup>[32]</sup>。Werner 等<sup>[33]</sup>在 20 名接受肝移植的终末期肝病儿童 (16 岁及以下) 的血浆样本中, 测试促凝血药和抗凝血药对凝血酶生成能力的影响, 并与 30 名年龄匹配的健康儿童进行对照。抗凝血药组在两个预定时间点采取血样, 分别是麻醉诱导后不久 (pre-LT)、移植后 30 日或出院当日 (post-LT); 对照组患者在麻醉诱导后立即采集血样后开始小手术。试验所测试的抗凝血药为: 达比加群、利伐沙班、普通肝素和 LMWH。结果显示, 在 pre-LT 组达比加群 (从 629 降至 17 nmol · L<sup>-1</sup> IIa · min, 减少 96%) 和普通肝素 (从 629 降至 14 nmol · L<sup>-1</sup> IIa · min, 减少 97%) 的内源性凝血酶电位显著降低, 都显示出较高的抗凝效力; LMWH (减少 43%) 在患者中的疗效稍差。此研究结果有助于为小儿肝移植手术中及术后出血和血栓并发症等情况制订预防和治疗方案。

### 4 儿童摄入过量达比加群的处置

在美国血液学会 2018 年静脉血栓栓塞管理指南 (抗凝治疗的最佳管理) 中, 对于在达比加群过量治疗且出现危及生命的出血患者, 建议在停用达比加群的基础上使用伊达鲁单抗<sup>[34]</sup>。Shapiro 等<sup>[35]</sup>报道了 1 例 15 岁女童意外摄入 30 ~ 50 片 150 mg 达比加群酯片的病例。该女童无其他重要病史、无药物过敏史, 检查显示全血计数、肝肾功能正常, 凝血功能异常, 其中 APTT 高达 121.6 s, 凝血酶时间 (thrombin time, TT) 为 53 s, 重复凝血试验证实 INR 增加、活化部分凝血活酶比率增加。因无活动性出血, 医师决定静脉注射 10 mg · kg<sup>-1</sup> 氨甲环酸和 10 mg 维生素 K。鉴于该患者服用的达比加群剂量过大, 大约需 48 h 才能清除, 因此使用标准剂量伊达鲁单抗 (5 g) 逆转达比加群。使用伊达鲁单抗后无明显不良反应, 给药后 30 min 凝血功能显示达比加群完全逆转, APTT 和 TT 降至正常范围, 未发生进一步的出血。该病例显示, 伊达鲁单抗用于逆转儿童过量服用达比加群的安全性和有效性。

### 5 妊娠期和哺乳期妇女使用达比加群的安全性

在美国血液学会《2018 年静脉血栓栓塞管理指南 (妊娠期静脉血栓栓塞)》中, LMWH 是妊

娠期 VTE 的首选, 不建议妊娠期、哺乳期妇女使用 DOACs<sup>[36]</sup>。达比加群能部分通过胎盘屏障, 可能会引起生殖毒性或间接影响胎儿的凝血功能<sup>[37]</sup>, 但达比加群是在人类母乳中排泄量最少的 DOACs<sup>[38]</sup>。

DALMATION (Dabigatran Presence in Breast Milk) 是一项单中心、开放标签的临床试验 (ISRCTN87845776)<sup>[39]</sup>, 研究旨在检测达比加群是否进入母乳, 估计达比加群在婴儿体内的暴露量, 并研究其对新生儿凝血指标的潜在影响。该临床试验已经纳入 2 例受试者, 在分娩后 2 ~ 7 d 给予单次口服达比加群酯 (220 mg) 后, 在  $t = 0$  (给药前) 及给药 1、2、3、5、7 和 10 h 后采集 10 mL 静脉血和最多 15 mL 母乳样本。给药后 2 ~ 3 h, 2 例受试者血药浓度达到峰值 204.6、414.9 ng · mL<sup>-1</sup>; 给药后 5 ~ 7 h, 母乳中达比加群的峰值浓度为 8.0、53.0 ng · mL<sup>-1</sup> (分别为其血浆峰值浓度的 4% 和 12%)。母乳内达比加群 AUC 随时间变化受试者 1 ( $AUC_{0 \sim 5h}$ ) 为 0.016 μg / (mL · h), 受试者 2 ( $AUC_{0 \sim 10h}$ ) 为 0.17 μg / (mL · h)。同时, 测定脐带血的 TT、纤维蛋白原水平, 与其他 DTIs 比较, 以评估达比加群对新生儿凝血指标的影响。凝血试验数据表明, 新生儿血浆中预测的达比加群峰值浓度远低于对凝血指标有显著影响的浓度。本研究结果表明, 达比加群酯用于产后妇女血栓预防的口服药物值得深入研究。

目前临床数据还不能表明达比加群酯会引起胚胎畸形<sup>[40-41]</sup>。Beyer 等<sup>[40]</sup>回顾了 233 个妊娠期 DOACs 暴露的独立病例, 只有 137 例 (58.8%) 可获得妊娠结局信息, 7 例出现异常 (5.1%), 其中 3 例 (2.2%) 活产婴儿的面部畸形可能被解释为胚胎病。由于病例数样本量少、结果数据不完整等原因, 尚不能认为 DOACs 会导致胚胎畸形。因此, 需进一步的临床试验研究探讨妊娠期、哺乳期妇女使用达比加群的安全性以及有效性。

### 6 结语与展望

达比加群酯是 FDA 批准的一种儿童口服直接抗凝血药。相较于其他抗凝血药, 达比加群酯不需要频繁检测 INR 等凝血指标, 与食物和药物的相互作用少, 患者依从性较高, 提示其在儿童抗凝治疗领域的广阔前景。DIVERSITY 等五项临床试验证实了达比加群酯用于 18 岁以下儿童

VTE 的有效性、安全性以及耐受性, 提供了达比加群酯用于儿童的 PK/PD 数据, 证明了儿童给药剂量算法的适用性, 为其应用于儿童 VTE 提供参考。目前关于妊娠期妇女等特殊人群服用达比加群酯的临床研究较少, 是值得进一步研究的 DOACs 药物。国内暂无达比加群酯用于儿童抗凝治疗的报道, 需要更多来自上市后研究的真实数据, 以补充达比加群酯在儿童人群中使用的证据, 探索达比加群酯用于中国儿童的安全性、有效性以及耐受性。

### 参考文献

- [1] van Ommen CH, Peters M. Venous thromboembolic disease in childhood [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2003, 29 (4): 391-404.
- [2] Goldenberg NA. Long-term outcomes of venous thrombosis in children [J]. *Curr Opin Hematol*, 2005, 12 (5): 370-376.
- [3] Raffini L, Huang YS, Witmer C, et al. Dramatic increase in venous thromboembolism in children's hospitals in the United States from 2001 to 2007 [J]. *Pediatrics*, 2009, 124 (4): 1001-1008.
- [4] Chan AK, Monagle P. Updates in thrombosis in pediatrics: where are we after 20 years? [J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2012, 2012: 439-443.
- [5] Rühle F, Stoll M. Advances in predicting venous thromboembolism risk in children [J]. *Br J Haematol*, 2018, 180 (5): 654-665.
- [6] 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 (22): 3292-3316.
- [7] Monagle P, Newall F. Management of thrombosis in children and neonates: practical use of anticoagulants in children [J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2018, 2018 (1): 399-404.
- [8] Goldenberg NA. Venous thromboembolism in children [J]. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2019, 17 (6): 326-329.
- [9] Lassandro G, Palmieri VV, Palladino V, et al. Venous thromboembolism in children: from diagnosis to management [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2020, 17 (14): 4993.
- [10] Julia S, James U. Direct oral anticoagulants: a quick guide [J]. *Eur Cardiol*, 2017, 12 (1): 40-45.
- [11] Weitz JI, Jaffer IH, Fredenburgh JC. Recent advances in the treatment of venous thromboembolism in the era of the direct oral anticoagulants [J]. *F1000Res*, 2017, 6: 985.
- [12] Food and Drug Administration. FDA approves first oral blood thinning medication for children [EB/OL]. (2021-06-21) [2024-02-05]. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-oral-blood-thinning-medication-children>.
- [13] Stangier J. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of the oral direct thrombin inhibitor dabigatran etexilate [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2008, 47 (5): 285-295.
- [14] Röshammar D, Huang F, Albisetti M, et al. Pharmacokinetic modeling and simulation support for age- and weight-adjusted dosing of dabigatran etexilate in children with venous thromboembolism [J]. *J Thromb Haemost*, 2021, 19 (5): 1259-1270.
- [15] Stangier J, Stähle H, Rathgen K, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the direct oral thrombin inhibitor dabigatran in healthy elderly subjects [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2008, 47 (1): 47-59.
- [16] Fawzy AM, Lip GYH. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral anticoagulants used in atrial fibrillation [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2019, 15 (5): 381-398.
- [17] Fontana P, Robert-Ebadi H, Bounameaux H, et al. Direct oral anticoagulants: a guide for daily practice [J]. *Swiss Med Wkly*, 2016, 146: w14286.
- [18] Blech S, Ebner T, Ludwig-Schwelling E, et al. The metabolism and disposition of the oral direct thrombin inhibitor, dabigatran, in humans [J]. *Drug Metab Dispos*, 2008, 36 (2): 386-399.
- [19] Becattini C, Giustozzi M, Ranalli MG, et al. Variation of renal function over time is associated with major bleeding in patients treated with direct oral anticoagulants for atrial fibrillation [J]. *J Thromb Haemost*, 2018, 16 (5): 833-841.
- [20] Hayton WL. Maturation and growth of renal function: dosing renally cleared drugs in children [J]. *AAPS Pharm Sci*, 2000, 2 (1): e3.
- [21] Ko RH, Young G. Pharmacokinetic-and pharmacodynamic-based antithrombotic dosing recommendations in children [J]. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2012, 5 (4): 389-396.
- [22] Halton JML, Lehr T, Cronin L, et al. Safety, tolerability and clinical pharmacology of dabigatran etexilate in adolescents. An open-label phase II a study [J]. *Thromb Haemost*, 2016, 116 (3): 461-471.
- [23] Halton JML, Albisetti M, Biss B, et al. Phase II a study of dabigatran etexilate in children with venous



- thrombosis: pharmacokinetics, safety, and tolerability [J]. *J Thromb Haemost*, 2017, 15 (11): 2147-2157.
- [24] Halton JML, Picard AC, Harper R, et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety and tolerability of dabigatran etexilate oral liquid formulation in infants with venous thromboembolism [J]. *Thromb Haemost*, 2017, 117 (11): 2168-2175.
- [25] Halton J, Brandão LR, Luciani M, et al. Dabigatran etexilate for the treatment of acute venous thromboembolism in children (DIVERSITY): a randomised, controlled, open-label, phase 2b/3, non-inferiority trial [J]. *Lancet Haematol*, 2021, 8 (1): e22-e33.
- [26] Brandão LR, Albisetti M, Halton J, et al. Safety of dabigatran etexilate for the secondary prevention of venous thromboembolism in children [J]. *Blood*, 2020, 135 (7): 491-504.
- [27] Domp Martin A, Acher A, Thibon P, et al. Association of localized intravascular coagulopathy with venous malformations [J]. *Arch Dermatol*, 2008, 144 (7): 873-877.
- [28] Liu HY, Hu L, Yang X, et al. Dabigatran etexilate is efficacious in consumptive coagulopathy and pain associated with venous malformations [J]. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord*, 2023, 11 (2): 397-403. e1.
- [29] Yasumoto A, Ishiura R, Narushima M, et al. Successful treatment with dabigatran for consumptive coagulopathy associated with extensive vascular malformations [J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2017, 28 (8): 670-674.
- [30] VanDevanter DR, Kahle JS, O' Sullivan AK, et al. Cystic fibrosis in young children: a review of disease manifestation, progression, and response to early treatment [J]. *J Cyst Fibros*, 2016, 15 (2): 147-157.
- [31] Bansal M, Ren CL. Anti-coagulant therapy with dabigatran for cystic fibrosis patients [J]. *Pediatr Pulmonol*, 2016, 51 (8): e29-e30.
- [32] Borst AJ, Sudan DL, Wang LA, et al. Bleeding and thrombotic complications of pediatric liver transplant [J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2018, 65 (5): e26955.
- [33] Werner MJM, Adelmeijer J, de Meijer VE, et al. In vitro evaluation of pro-and anticoagulant drugs in children with end-stage liver disease undergoing liver transplantation [J]. *Thromb Haemost*, 2020, 120 (9): 1240-1247.
- [34] Witt DM, Nieuwlaat R, Clark NP, et al. American society of hematology 2018 guidelines for management of venous thromboembolism: optimal management of anticoagulation therapy [J]. *Blood Adv*, 2018, 2 (22): 3257-3291.
- [35] Shapiro S, Bhatnagar N, Khan A, et al. Idarucizumab for dabigatran overdose in a child [J]. *Br J Haematol*, 2018, 180 (3): 457-459.
- [36] Bates SM, Rajasekhar A, Middeldorp S, et al. American society of hematology 2018 guidelines for management of venous thromboembolism: venous thromboembolism in the context of pregnancy [J]. *Blood Adv*, 2018, 2 (22): 3317-3359.
- [37] Bapat P, Kedar R, Lubetsky A, et al. Transfer of dabigatran and dabigatran etexilate mesylate across the dually perfused human placenta [J]. *Obstet Gynecol*, 2014, 123 (6): 1256-1261.
- [38] Daei M, Khalili H, Heidari Z. Direct oral anticoagulant safety during breastfeeding: a narrative review [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2021, 77 (10): 1465-1471.
- [39] Ayuk P, Kampouraki E, Truemann A, et al. Investigation of dabigatran secretion into breast milk: implications for oral thromboprophylaxis in post-partum women [J]. *Am J Hematol*, 2020, 95 (1): e10-e13.
- [40] Beyer-Westendorf J, Michalski F, Tittl L, et al. Pregnancy outcome in patients exposed to direct oral anticoagulants-and the challenge of event reporting [J]. *Thromb Haemost*, 2016, 116 (4): 651-658.
- [41] Beyer-Westendorf J, Tittl L, Bistervels I, et al. Safety of direct oral anticoagulant exposure during pregnancy: a retrospective cohort study [J]. *Lancet Haematol*, 2020, 7 (12): e884-e891.

(收稿日期: 2023-10-19; 修回日期: 2024-01-05)

# 透明质酸修饰血清白蛋白纳米粒在肿瘤诊疗中的研究进展

唐嘉, 周莉莉\* (湖南中医药大学药学院, 长沙 410208)

**摘要:** 传统检测和治疗肿瘤的方法存在局限性, 如靶向性不足、灵敏度有限等。科学家们开发出的一种新型纳米系统, 即利用透明质酸修饰血清白蛋白构建一种生物相容性和降解性都得到改善的纳米系统, 有望提供一种新的肿瘤诊疗方法。此外, 该纳米系统还具有独特的双重靶向效应, 可间接提高肿瘤成像的灵敏度和治疗的准确性。本文旨在探讨透明质酸血清白蛋白纳米粒在肿瘤成像诊断、治疗和治疗一体化应用中的最新研究进展, 并指出现阶段仍面临的挑战及须解决的问题, 进而为抗肿瘤靶向纳米制剂的开发提供理论依据及方法指导。

**关键词:** 透明质酸; 血清白蛋白纳米粒; 肿瘤靶向; 成像诊断; 联合治疗

中图分类号: R73-3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)08-2131-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.026

## Advances of hyaluronic acid-modified serum albumin nanoparticles in the diagnosis and treatment of cancer

TANG Jia, ZHOU Li-li\* (School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208)

**Abstract:** The conventional methods of tumor detection and treatment have limitations, such as inadequate targeting and limited sensitivity. However, scientists have developed a new nanosystem that may offer a solution. They have modified the serum albumin with hyaluronic acid, resulting in a nanosystem with improved biocompatibility and degradability. This nanosystem has a unique dual-targeting effect, which can indirectly enhance tumor imaging sensitivity and therapeutic accuracy. This article discussed the most recent advances in hyaluronic acid-modified serum albumin nanoparticle research on tumor imaging diagnosis, treatment, and therapeutic integration, based on domestic and international literatures. It also identified the challenges that still need to be addressed, offered theoretical support and methodological guidance for the development of targeted anti-tumor nano-formulations.

**Key words:** hyaluronic acid; serum albumin nanoparticles; tumor targeting; imaging diagnosis; combined therapy

近年来, 随着纳米技术的不断发展, 纳米体系逐渐应用于肿瘤诊疗医学领域。自 2005 年血清白蛋白结合紫杉醇纳米粒注射混悬液被 FDA 批准上市以来, 纳米递药系统作为一种药物靶向载体再次引起研究者的重视。血清白蛋白纳米粒是以白蛋白为基质的纳米级微粒, 属于内源性天然产物。因其具有较好的可修饰性、被动靶向性、生物降解性等, 已广泛用于显影剂或治疗剂的开发, 但未经功能化修饰的白蛋白仍存在许多问题。例如, 疗效不够显著, 存在易产生耐药性、靶向

性弱、稳定性差等问题<sup>[1]</sup>。透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 是一种与机体炎症、肿瘤病变等进程密切相关的糖胺聚糖, 能够增强纳米粒的亲水性、稳定性, 延长半衰期。最重要的是, 其作为配体还能够靶向于肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 中过表达的活性 CD44 受体, 促进细胞内化并最终被体内的透明质酸酶 (hyaluronidase, HAase) 降解。因此, 将 HA 对牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) / 人血清白蛋白 (human serum albumin, HSA) 进行修饰来构建具有成像或

**基金项目:** 湖南省自然科学基金项目 (No.2022JJ40320); 湖南省教育厅优秀青年项目 (No.23B0362); 湖南省大学生创新创业训练计划基金资助项目 (No.S202110541034)。

**作者简介:** 唐嘉, 女, 本科, email: tangjia12010822@163.com \***通信作者:** 周莉莉, 女, 讲师, 主要从事中药制剂新剂型及纳米靶向制剂研究, email: lilizhou@hnuucm.edu.cn

治疗作用的纳米体系,可显著提高诊疗效果。本文综述了 HA-BSA/HSA 纳米粒在肿瘤诊疗应用中的研究进展,以期为其深入研究提供参考。

## 1 血清白蛋白、HA 及其受体

### 1.1 血清白蛋白

根据来源的不同,血清白蛋白主要分为 BSA 和 HSA,分别来源于牛血清、人血清,由 583、585 个氨基酸组成,前者较后者成本更低但具潜在免疫原性<sup>[2]</sup>。血清白蛋白作为纳米材料具有以下优点:①结构上富含  $-NH_2$  和  $-COOH$  等亲水基,易于功能化修饰<sup>[3]</sup>,内部的 Sudlow I、Sudlow II 位点可结合疏水性药物<sup>[4]</sup>;②具备实体瘤高通透性和滞留效应,可延长药物的血液循环保留时间和被动靶向肿瘤部位<sup>[5]</sup>;③通过与肿瘤细胞表面存在的白蛋白受体 Gp60 结合,胞吞后与过表达的分泌蛋白相互作用,促进肿瘤部位的富集<sup>[6]</sup>;④进入人体内,可被蛋白酶分解成更小的肽或氨基酸,有利于释放内容物且降解产物无毒副作用<sup>[7]</sup>。因此,血清白蛋白纳米粒的各种优势使其成为纳米药物递送体系的理想载体之一。

### 1.2 HA

HA 是一种非硫酸化线性糖胺聚糖, Meyer 等于 1934 年首次从牛眼玻璃体中分离得到后进一步证实它是由重复排列的 *N*-乙酰氨基葡萄糖和 *D*-葡萄糖醛酸二糖组成的高级多糖<sup>[8]</sup>,分子结构见图 1。按照分子大小的不同,可将 HA 分为高分子量 HA ( $\geq 1000$  kDa)、低分子量 HA ( $10 \sim 100$  kDa) 和寡聚 HA ( $\leq 10$  kDa) 三类<sup>[9]</sup>。HA 分子均具有多种活性基团,即羧基、羟基、羟甲基和乙酰氨基,其中乙酰氨基又可脱乙酰为氨基。HA 的理化性质与基团种类密切相关,①亲水性:HA 富含亲水基团,可改善药物自身水溶性差的特点<sup>[10]</sup>,同时通过引入结合水分子形成的纳米颗粒亲水壳能够有效延长纳米粒的系统循环时间;②pH 敏感性:HA 在生理条件 pH 7.4 时,分子上的羧基被电离形成聚阴离子<sup>[11]</sup>,可用于静电结合带正电的血清白蛋白纳米粒,或使其修饰的纳米载体呈高负电位从而提高自身稳定性,而在体内与血清蛋白之间产生同电荷排斥作用进一步延长药物血浆半衰期<sup>[12]</sup>;③可修饰性:HA 结构上丰富的官能团可作为功能修饰点与纳米材料共价结合,还可通过改性进一步扩大其在医药学领域的应用范围<sup>[13]</sup>。

此外,HA 修饰的纳米粒可在体内被 HAase 降解,也可通过活性氧(reactive oxygen species, ROS)、高温热、酸碱性等方式降解<sup>[14]</sup>,具有良好的可降解性,可用于构建酶触发尺寸可缩小的纳米系统。在正常生理条件下,HA 几乎以高分子量 HA 形式存在于人体组织中,在抗炎介质的产生、

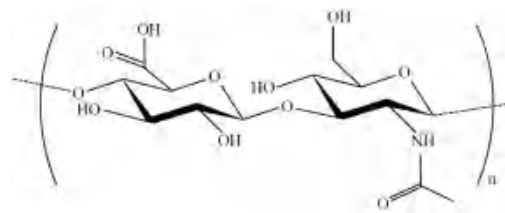


图 1 HA 分子结构图

Fig 1 HA molecular structure diagram

伤口的愈合、肿瘤细胞的生长等方面发挥着重要作用<sup>[15]</sup>。与之相反,在严重的癌变等病理条件下,高分子量 HA 会被体内 HAase 或 ROS 降解成片段 HA,使得低分子量和寡聚 HA 增多,肿瘤细胞侵袭和生长能力的增强。目前,越来越多的研究显示,当 HA 作为药物或载体表面修饰物时,由于不同分子量的 HA 对受体结合能力和肿瘤细胞生长作用有所差异,导致治疗效果可能不同<sup>[16-17]</sup>。

### 1.3 透明质酸受体

透明质酸受体是一种膜蛋白,主要分布于人体关节、皮肤等器官中,可分为 CD44、RHAMM、LYVE-1、HARE 等类型<sup>[18]</sup>。在能够与 HA 结合的膜分子中,CD44 被认为是肿瘤治疗药物最主要的作用靶点,其多表达于肿瘤细胞表面。HA 可与之结合进而参与细胞内以及细胞表面的调节功能,影响肿瘤细胞的迁移、信号传导等过程。CD44 主要存在两种亚型,即标准型 CD44s 和变异型 CD44v。CD44s 无处不在,而 CD44v 主要在肿瘤细胞中过表达。CD44 及其亚型在胞外结构域的 *N*-末端区域含有 HA 结合位点,该结构域是 CD44 被动激活及其与外部刺激相互作用的结构基础,且仅有活化后的 CD44 能够与 HA 结合并内化 HA<sup>[19]</sup>。在正常组织中,CD44 尽管能够内源性表达、调节机体功能、维持细胞稳态,但表达水平相对较低且不与 HA 结合;而在肿瘤细胞中的 CD44 不需活化却能够过表达(已知 HA 与 CD44 蛋白受体相互结合的片段有 160 多个氨基酸),这一特性显著提高了 TME 中 CD44 及亚型与 HA 结合和内化的可能性。因此,HA 与 CD44 之间结合的高敏感性增强了 HA 结合型纳米材料对肿瘤细胞的靶向性和相容性,同时 CD44 及其亚型也被广泛用于肿瘤诊疗标志物或靶向配体<sup>[20]</sup>。此外,RHAMM 在肿瘤中上调并控制与肿瘤发生、增殖和运动相关的蛋白表达,因此其作为肿瘤的治疗靶点具有巨大的潜力,但其分布、功能及机制等方面的相关研究尚少<sup>[21]</sup>。LYVE-1 和 HARE 分别表达于淋巴内皮细胞表面、肝血窦及淋巴结内,对 HA 的黏附性和全身转运性有较大的影响<sup>[22]</sup>。

## 2 HA-BSA/HSA 纳米粒在肿瘤成像方面的应用

基于上述血清白蛋白与 HA 的优势,采用特定方式将 HA-BSA/HSA 纳米粒与造影剂进行结合,



可增加造影剂在肿瘤细胞中的富集, 提高成像灵敏度或背景对比度。

### 2.1 荧光成像 (fluorescence imaging, FI)

早在 1944 年, FI 就被应用于临床诊断中。与计算机断层扫描、正电子发射断层扫描等常规成像方式相比, FI 作为一种非侵入性的成像方式, 不会产生电离辐射、放射性损伤等不良反应, 却能提供高灵敏度、实时可视化、超高分辨率的影像资料。基于纳米荧光探针的 FI 技术可以用于肿瘤诊疗过程的补充性手段。荧光探针经光照激发后会在富集处发射荧光信号, 经仪器捕捉后形成荧光影像, 具有极高的分辨率 (微米级)<sup>[23]</sup>。

为探究 HA 不同分子量与不同荧光染料间的作用关系, Qi 等<sup>[24]</sup>以 BSA 为纳米载体, 将三种不同分子量的 HA 分别与 Cy7.5 和 IRDye800 两种荧光染料的共轭物与白蛋白结合, 形成具有稳定性好、亲和性的纳米荧光探针。通过对比近红外 FI 效果可知, 由于造影剂的肿瘤特异性靶向和腹腔内器官积聚作用, 该荧光探针在胰腺内的肿瘤信号均显著增强, 此外, 还发现任何分子量的 HA 与 Cy7.5 形成的探针定向分布顺序为肝脏、脾脏和肠道, 但 IRDye800 荧光剂与不同分子量的 HA 偶联会导致探针的生物分布情况截然不同, 例如, 与 5 kDa 和 20 kDa HA 的结合低, 与 100 kDa HA 结合后的作用导致肝和脾信号变高。因此, 不同分子量 HA 与不同荧光材料结合形成的荧光探针可以提供优异的胰腺癌成像诊断技术, 且其分布特性对于在特定部位使用 FI 的药物开发具有一定指导意义。

石墨烯量子点 (graphene quantum dots, GQD) 具有优异的生物相容性、低细胞毒性、良好的多光子激发能力、易于表面修饰等特点, GQD 功能化修饰后在肿瘤医学成像和示踪方面得到了广泛的应用<sup>[25]</sup>。Nigam 等<sup>[26]</sup>基于 GQD 设计合成了多功能药物递送和成像平台 (HA 功能化的绿色荧光 GQD 标记的 HSA 纳米粒)。结果表明, HA 靶向肿瘤细胞 CD44 受体后, 可表现出高产量荧光特性 (约 14% 的荧光量子产率), 该纳米粒在胰腺癌特异性药物传递和生物成像方面具有较大潜力。

### 2.2 磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI)

MRI 能够提供高空间分辨率、高对比度的三维图像, 是临床诊断和监测多种疾病的首选。MRI 的成像机制是病变组织和正常组织的弛豫时间不同, 但遗憾的是, 正常组织和肿瘤等病变组织的弛豫时间往往相互重叠, 导致成像分辨率受到影响。通过引入造影剂来加速质子弛豫速率, 同时利用纳米颗粒的特殊尺寸和功能性能使其在体内的特定位置

聚集, 在一定程度上可提高成像分辨率<sup>[27]</sup>。二氧化锰 ( $MnO_2$ ) 具有良好的生物相容性, 可在 TME 弱酸环境下快速分解为  $Mn^{2+}$ , 为 MRI 提供优良造影信号<sup>[28]</sup>。Zhou 等<sup>[29]</sup>选取  $MnO_2$  作为 MRI 阳性造影剂, 利用 HA 对复合 BSA-多巴胺- $MnO_2$  混合纳米粒进行修饰, 形成杂化纳米粒 HMDNs。HMDNs 在体外和体内实验中表现出优异的 MRI 对比能力, 其纵向弛豫率为  $22.2 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ , 成像时间长达 2 h 以上。因此, 该纳米系统具有优异的成像效果和较长的观察窗, 为制备靶向肿瘤的多功能纳米诊疗药物提供了一种新方法。

### 2.3 光声成像 (photoacoustic imaging, PAI)

新兴的 PAI 是一种兼具光学的高对比度和超声的高空间分辨率特性的成像技术, 它能够实时收集检测信息, 并参与临床相关的深度成像工作<sup>[30]</sup>。然而, 部分造影剂在体内成像过程中由于灵敏度不够, 导致信号背景比较低和临床应用受限<sup>[31]</sup>。吲哚菁绿 (indocyanine green, ICG) 是一种临床常用光学造影剂, 但其在水中不稳定, 易发生不可逆降解。Thangavel 等<sup>[32]</sup>将 ICG 和一线化疗药物紫杉醇 (paclitaxel, PTX) 包载于 HSA 中后, 与 HA 共价结合, 开发了基于 PAI 的 HA-ICG-PTX-HSA 纳米递送系统, 并利用血管模拟管和鸡肌肉模型分别评估该纳米粒的成像信号强度与深度, 结果表明, 其 PAI 强度是游离 ICG 的 2 倍, 且信号检测深度高达 10 mm。同时, ICG 在纳米体系中表现出更好的稳定性。该实验通过使用 HA 功能化纳米粒包裹的造影剂来改善 PAI 能力和药物稳定性, 具有实现实时监测与精准治疗肺肿瘤的潜在应用价值。

### 2.4 MRI-FI

采用两种及以上的多模态成像技术突破了单一模态成像的尺度局限性, 具有全方位可视化的优点。在肿瘤检测中低灵敏度导致采集时间长是 MRI 的主要局限性。FI 则与之相反, 具有高灵敏度、实时显示等优点, 将其与 MRI 进行互补成像, 可使肿瘤信息的获取趋于完整。CuInS<sub>2</sub>-ZnS 量子点由于具有高近红外光致发光性、组织穿透性和良好的生物相容性, 已被用于体内成像<sup>[33]</sup>。磁性氧化铁 ( $Fe_3O_4$ ) 纳米颗粒因其有效性和安全性而成为 MRI 和肿瘤磁靶向治疗的通用剂<sup>[34]</sup>。Yang 等<sup>[35]</sup>通过将 HA-BSA 包被的 CuInS<sub>2</sub>-ZnS 量子点 (BQDs-HA) 与普鲁士蓝涂覆的  $Fe_3O_4$  纳米粒 ( $Fe_3O_4 @PB$ ) 偶联, 构建了近红外荧光/MRI 双模态成像纳米递药系统  $Fe_3O_4 @PB @PEI @BQDs-HA$  (FPPBH)。在 FPPBH 纳米粒中, HA 能通过受体-配体相互作用特异性结合各种肿瘤细胞

过表达的 CD44 受体,使 HA 修饰的纳米粒用于肿瘤靶向成像和治疗。 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @PB 具有磁靶向和 MRI 的双重功能,其外部 PB 壳层作为近红外光吸收剂用于光热疗法。 $\text{CuInS}_2$ -ZnS 量子点作为近红外荧光显像剂。所得 FPPBH 纳米粒粒径在 140 nm 左右,经静脉注射纳米粒制剂和外磁场处理后,近红外激光照射可有效消融裸鼠肿瘤,肿瘤生长抑制率达 89.95% 以上。FPPBH 对于治疗前准确识别肿瘤的大小和位置、治疗中实时监测光热治疗过程、治疗后评估疗效至关重要。

### 3 HA-BSA/HSA 纳米粒在肿瘤治疗方面的应用

#### 3.1 单一疗法

#### 3.1.1 化疗

化疗一直是肿瘤治疗的主导模式,然而,传统的化疗药物有明显的局限性,如细胞选择性差、生物利用度低、毒副作用大等。阿霉素 (doxorubicin, DOX) 是一种典型的化疗药物,通过细胞凋亡途径发挥作用,但其严重毒副作用大大限制了其应用。研究者在化疗的基础上发展出多种纳米共递体系,通过实现药物在病灶区域的靶向富集和定点释放,来提高治疗效率和降低 DOX 的毒副作用<sup>[36]</sup>。Brindisi 等<sup>[37]</sup>以 HA-HSA 偶联物为原料,制备了具有氧化还原响应特性的主动靶向纳米粒 DOX@HA1b,并评估了对 MCF-7 和 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的抑制作用。该纳米粒平均直径约 120 nm,体外实验结果显示,通过 CD44 靶向性和氧化还原活性,使得 DOX@HA1b 的有效性显著提高, MCF-7 和 MDA-MB-231 的半抑制浓度分别从 0.9959 和 2.516  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  降低到 0.4014 和 0.3094  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。而在正常的 MCF-10A 细胞中未检测到药物毒性的增强。

#### 3.1.2 光热疗法 (photothermal, PTT)

PTT 是利用光热转换剂将光能转化为热能,从而提高局部肿瘤温度,导致肿瘤细胞死亡或蛋白质变性。PTT 对正常组织细胞影响较小,其光热剂的吸光能力、光热转换率以及在肿瘤中的积累量是该技术的核心<sup>[38]</sup>。PTT 因其无损伤性、易控性和高精度等特点,已经在当前肿瘤治疗方法中受到了广泛关注。研究人员将光热剂分为无机光热剂、有机光热剂和无机-有机复合光热剂。其中,无机-有机复合光热剂被证明能够兼具两种材料的优势,即无机光热剂的表面易修饰、高光热效应特性以及有机光热剂的良好生物相容性、可降解性,可协同增强 PTT 治疗肿瘤的效率<sup>[39]</sup>。ICG 是一种经 FDA 认证的有机光热剂, Liu 等<sup>[40]</sup>将生物相容性良好的 BSA 包覆在无机光热剂金纳米团簇外层以提高无机材料的生物利用度和分散度,然后负载 ICG,形成 AuNC@CBSA-ICG。

AuNC@CBSA-ICG 通过静电作用与 HA 结合 (AuNC@CBSA-ICG@HA),以提高肿瘤细胞摄取载体的概率。AuNC@CBSA-ICG@HA 粒径约 200 nm,易于保留在肿瘤部位,并可被 TME 中特异性 HAase 降解成小纳米颗粒,用于肿瘤的深层穿透。在近红外激光照射下,由于 HA 靶向和光热效应的协同作用, AuNC@CBSA-ICG@HA 对肿瘤的抑制率高达 95%。

#### 3.2 联合疗法

联合方案可提供靶向肿瘤细胞中的不同治疗途径,并降低药物剂量以减少毒副作用,弥补单一疗法的缺陷。因此如何结合各种治疗方法的特点,优势互补,构建新的“鸡尾酒疗法”成为肿瘤治疗的新思路。

#### 3.2.1 化疗-PTT

PTT 具有高选择性、非侵入性、副作用少等优点,在肿瘤治疗的发展中极具潜力。然而,由于其在肿瘤组织中分布不均匀、穿透受限等缺陷,单一疗法往往不能根治肿瘤。当 PTT 与化疗联合治疗肿瘤时,利用化疗药物自身的优势特性可改善 PTT 的光分散性缺陷。同时,除了可直接热消融肿瘤细胞外,光热剂介导的轻度升温可增加肿瘤内未成熟血管的通透性和血流速度,促进药物在肿瘤内转运和积累<sup>[41]</sup>。据报道,较高浓度的一氧化氮 (NO) 可通过调节 TME 来抑制肿瘤生长、防止转移,临床上多以硝酸酯类以及有机亚硝酸酯类等物质作为 NO 供体<sup>[42]</sup>。Liu 等<sup>[43]</sup>先将 HA 与阳离子 BSA 包被金纳米簇静电结合 (AuNC@CBSA@HA),进而引入硝酸酯、抗肿瘤药物环磷酰胺 (PTX) 和光热剂 ICG 以构建基于光热-化疗双重治疗且兼具肿瘤转移抑制能力的纳米系统 AuNC@CBSA@HA,并在体外细胞摄取实验和体内肿瘤靶向效率实验中筛选出的 200 nm 为纳米粒的最佳粒径。该粒径下,纳米粒对脏器的毒性较小,在肿瘤部分的累积量与滞留时间更佳。在此基础上,进一步引入 NO 供体与化疗,并保持其粒径在 200 nm 左右。体内研究表明, AuNC@CBSA-PTX-ICG@HA-NO<sub>3</sub> 在 PTT 与化疗的联合治疗以及 HA、NO 的辅助下,肿瘤生长抑制率高达 95.3%,抑制了 88.4% 的肺转移生长,均显著优于单一的 PTT 或化疗结果。因此,该多功能纳米复合物能够实现 PTT-化疗的协同作用,促进纳米系统靶向递送至肿瘤,以提高治疗效率。

#### 3.2.2 PTT-放射治疗 (radio therapy, RT)

RT 是一种肿瘤治疗方法,它使用高剂量的辐射来杀死肿瘤细胞<sup>[44]</sup>。传统的 RT 效果有限,并且存在严重的毒副作用。当射线照射肿瘤部位时,少量电离辐射能量被肿瘤组织吸收,而大部分射线通



过正常组织而引起非选择性损伤<sup>[45]</sup>。因此,提高肿瘤组织对 RT 的敏感性,开发肿瘤组织靶向的 RT,并协同其他安全有效的治疗模式,是提高肿瘤治疗效果并降低毒副作用的关键。相较于单一疗法,RT 与 PTT 联合使用可在光热转换的驱动下增加肿瘤组织的血流量和血管通透性,改善氧合作用,从而使细胞对辐射更敏感<sup>[46]</sup>。Cheng 等<sup>[47]</sup>利用生物相容性较好的 BSA 包被高纵向弛豫率的造影剂 Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 与具有高近红外吸光度、可作为放射增敏剂的 MoS<sub>2</sub> 进行连接,再用 HA 进一步靶向性修饰,开发了诊疗一体化的纳米颗粒 (Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/BSA@MoS<sub>2</sub>-HA)。该纳米粒在体内的光热转换效果较好,温度高达 55 °C,足以杀死肿瘤细胞。在 808 nm 的 X 射线照射下,由于 HA 介导的活性靶向作用以及 MoS<sub>2</sub> 与肿瘤细胞中高水平谷胱甘肽反应后的可降解作用,Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/BSA@MoS<sub>2</sub>-HA 在肿瘤体积变化、小鼠体重变化和存活率都表明其具有最佳的治疗效果,且无明显的副作用。因此,以可修饰性和靶向性的纳米粒与光热转换剂作为增敏载体,与 RT 进行合理结合,在肿瘤治疗方面是一种极具潜力的策略。

**3.2.3 化疗-光动力疗法 (photodynamic therapy, PDT)** PDT 是通过利用光敏剂在外部光源的刺激下产生具有细胞毒性的 ROS 或单线态氧来诱导肿瘤细胞凋亡或坏死的治疗方法<sup>[48]</sup>。光敏剂对肿瘤 PDT 治疗效果起关键作用,但大多数光敏剂具有强疏水性、肿瘤靶向性差等缺点。有研究发现,PDT 可通过联合其他抗肿瘤药物的多功能递送系统,增加光敏剂溶解度,促进其在肿瘤部位富集<sup>[49]</sup>,同时,PDT 能够克服相关抗肿瘤化疗药物的耐药性,增强肿瘤协同治疗<sup>[50]</sup>。化疗药物顺铂 (cisplatin, CDDP) 是 1978 年 FDA 批准的首个用于肿瘤治疗的铂类化合物,具有抗癌谱广、作用机制独特等特点,然而,其耐药性大大限制了它的临床应用<sup>[51]</sup>。Hou 等<sup>[52]</sup>将 CDDP 与光敏剂 ICG、酰肼化 HA-BSA 纳米粒进行双配位,开发了一种基于协同治疗策略的新型配位纳米前药 (HBCI)。由于 CDDP 与 ICG 间的协同负载效应,两者表现出非常高的负载率,其中,ICG 负载效率可高达 99.87%。在体外实验中,HBCI 可高效内化至 HepG2 细胞中,在 808 nm 激光照射下产生过量的细胞内 ROS,并通过诱导线粒体介导的细胞凋亡有效杀伤肿瘤细胞。体内抗肿瘤研究表明,协同治疗策略比单一疗法表现出更高的肿瘤抑制效率,肿瘤体积显著减小了 87%,并具有良好的生物安全性。可见,基于纳米前药介导的联合 PDT 在肿瘤治疗中具有巨大的前景,但文献中均未对药物耐药

性问题进行研究。

**3.2.4 化疗-免疫治疗** 新型的免疫治疗是针对患者免疫逃逸而形成的肿瘤治疗新思路,通过人为刺激固有免疫系统和适应性免疫系统来达到治疗效果,具有生存率高、治疗效果持久、安全性好等优势。有研究表明,免疫治疗可以改善化疗受到免疫调节机制的抑制作用<sup>[53]</sup>。吡哆胺-2,3 双加氧酶 (indoleamine-2,3 dioxygenase, IDO) 是一种细胞内免疫调节酶,在 TME 中高表达,可通过抑制 T 细胞和 NK 细胞的活性引起免疫逃逸<sup>[54]</sup>。雷公藤红素是从中药雷公藤中提取的一种五环三萜类化合物,对一组胰腺肿瘤细胞系 (包括 Panc 01、Panc 02 和 BxPC-3) 显示出强烈的抑制作用,其中,小鼠 Panc 02 细胞内可高表达 IDO。Hu 等<sup>[55]</sup>将水溶性 IDO 抑制剂 1-甲基色氨酸与疏水性雷公藤红素共同包封在阳离子 BSA 中,结果显示,该纳米系统在联合治疗的作用下,在 Panc 02 异种移植瘤和原位瘤模型中肿瘤抑制作用显著增强。鉴于 T 细胞数量与 IDO 的抑制作用成反比关系,在 TME 中 T 细胞数量的检测明显降低,可证明该纳米能够有效逆转肿瘤免疫抑制环境和抑制胰腺癌生长。由此可得,免疫疗法与化疗的联合具有极大的发展潜力。

#### 4 诊疗一体化

如何实现肿瘤的诊疗一体化以达到实时监测肿瘤的发生发展一直是研究者们致力解决的问题。得益于 HA-血清白蛋白纳米材料的表面功能化、生物相容性和可降解性,越来越多的研究者将药物和显像剂共载到同一纳米载体上,利用纳米载体自身优势以实现由成像技术引导的高效可视化治疗策略<sup>[56]</sup> (见表 1)。

与传统 FI 技术不同,荧光素酶转染成像是通过细胞被基因工程改造以表达荧光素酶,该酶与外源性递送的底物反应产生光,进而用于监测肿瘤疗效的一种成像技术<sup>[57]</sup>,但目前主要用于活体动物。Pulakkat 等<sup>[58]</sup>采用分层技术,构建了 HA 表面修饰的负载抗肿瘤药物 DOX 的 BSA 纳米系统 (DOX-Ab-HA),通过荧光素酶转染 MDA-MB-231 细胞以实现全身成像观察 DOX-Ab-HA 的分布以及乳腺癌生长情况,结果表明,该纳米系统有效优化了自身空间稳定性和体内循环半衰期,且在 TME 酸性条件、HAase 和胰蛋白酶的协同作用下可促进药物释放,实现药物在肿瘤部位释放的可控性与提高药物自身安全性。通过全身成像系统可以清楚地观察到,与游离 DOX 相比,由于 HA 对转移性乳腺癌细胞中过表达的 CD44 特有的靶向性,DOX-Ab-HA 在肿瘤部位的积累浓度提高



表 1 HA-BSA/HSA 纳米粒在肿瘤诊断与治疗中的应用

Tab 1 Application of HA-BSA/HSA in cancer diagnosis and treatment

种类	纳米体系	肿瘤	应用	文献
HSA	HSA-Gem-GQD	胰腺癌	FI、化疗	[26]
BSA	HMDNs	乳腺癌	MRI、PTT	[29]
HSA	HA-ICG-PTX	非小细胞肺癌	PAI、化疗	[32]
BSA	FPPBH	宫颈癌	MRI-FI	[35]
HSA	DOX@HALb	乳腺癌	化疗	[37]
BSA	AuNC@CBSA-ICG@HA	乳腺癌	PAI、PTT	[40]
BSA	AuNC@CBSA-PTX-ICG@HA-NO <sub>3</sub>	乳腺癌	FI、化疗-PTT	[43]
BSA	Gd <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /BSA@MoS <sub>2</sub> -HA	—	MRI、PTT-RT	[47]
BSA	HBCI	肝癌	化疗-PDT	[52]
BSA	cBSA-MT-ICG-HA	胰腺癌	化疗-免疫疗法	[55]
BSA	DOX-Ab-HA	胰腺癌	化疗、荧光素酶转染法	[58]

了 2.26 倍, 肿瘤体积显著减小。此外, Zhou 等<sup>[29]</sup>构建了一种由 MRI 引导 PTT 的多功能纳米粒系统 HMDNs, 该纳米粒不仅具有 MRI 优越的对比度, 且具有良好的光热转换能力, 可在 808 nm 光的照射下于 5 min 内迅速升高 20 °C, 有效诱导肿瘤细胞凋亡。因此, 将成像技术与治疗技术相结合, 使得单一纳米系统在肿瘤治疗过程中同时具备实时监测与个性化治疗的优势。

## 5 结论与展望

HA-BSA/HSA 纳米系统作为一种新型的纳米平台, 其在医学诊疗方面具有无毒性、生物相容性等优势, 此外, 合理利用 HA 分子的肿瘤特异靶向性和血清白蛋白纳米粒的被动靶向性, 可使药物毒副作用最小化, 疗效最大化。尽管两者的应用具有诸多优势, 该纳米系统仍处于起步阶段, 许多问题需进一步解决。

① 工艺复杂: 多数纳米系统的制备过程较烦琐, 不仅加大了该药物在大规模生产中的难度, 还可能会影响或改变物质的活性; ② HA 与 CD44 的相关研究匮乏: 不同分子量的 HA 对肿瘤的靶向性及作用效果具有一定差异性 or 相反性, 而文献对 HA 分子量的分类标准并不一致, 且 HA 和 CD44 自身在生理和病理情况具有复杂性, 现有文献对两者的细胞功能及其作用机制的认识仍然较为缺乏。尽管 HA 主要与活化的 CD44 受体结合, 但人体中正常细胞表面同样含有 HA 的多种受体, 如何有效阻断或避免正常细胞对 HA 修饰纳米粒的吸收还有待深入考究; ③ 临床研究少: 目前基于 HA-BSA/HSA 纳米递送系统的临床抗肿瘤治疗研究较少, 没有相关临床研究可作为参考。

综上所述, HA-BSA/HSA 纳米粒需进一步探索, 以弥补和解决现有的不足, 发挥其在肿瘤医学领域的诊疗作用。

## 参考文献

- [1] Miao Y, Yang T, Yang SX, et al. Protein nanoparticles directed cancer imaging and therapy [J]. *Nano Converg*, 2022, 9 (1): 2.
- [2] Kunde SS, Wairkar S. Targeted delivery of albumin nanoparticles for breast cancer: a review [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2022, 213: 112422.
- [3] Liang KC, Chen HR. Protein-based nanoplatforms for tumor imaging and therapy [J]. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2020, 12 (4): e1616.
- [4] Hornok V. Serum albumin nanoparticles: problems and prospects [J]. *Polymers (Basel)*, 2021, 13 (21): 3759.
- [5] Spada A, Emami J, Tuszynski JA, et al. The uniqueness of albumin as a carrier in nanodrug delivery [J]. *Mol Pharm*, 2021, 18 (5): 1862-1894.
- [6] Gadomska M, Musiał K, Beldowski P, et al. New materials based on molecular interaction between hyaluronic acid and bovine albumin [J]. *Molecules*, 2022, 27 (15): 4956.
- [7] Hoogenboezem EN, Duvall CL. Harnessing albumin as a carrier for cancer therapies [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2018, 130: 73-89.
- [8] Kotla NG, Bonam SR, Rasala S, et al. Recent advances and prospects of hyaluronan as a multifunctional therapeutic system [J]. *J Control Release*, 2021, 336: 598-620.
- [9] Qiu YB, Ma YQ, Huang YY, et al. Current advances in the biosynthesis of hyaluronic acid with variable molecular weights [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 269: 118320.
- [10] Zhang RS, Zhao XH, Jia A, et al. Hyaluronic acid-based prodrug nanomedicines for enhanced tumor targeting and therapy: a review [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 249: 125993.
- [11] Saravanakumar K, Park S, Santosh SS, et al. Application of hyaluronic acid in tissue engineering, regenerative medicine, and nanomedicine: a review [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 222 (Pt B): 2744-2760.
- [12] Lei C, Liu XR, Chen QB, et al. Hyaluronic acid and albumin based nanoparticles for drug delivery [J]. *J Control Release*, 2021, 331: 416-433.
- [13] Di Mola A, Landi MR, Massa A, et al. Hyaluronic acid in biomedical fields: new trends from chemistry to biomaterial applications [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (22): 14372.

- [14] Vasvani S, Kulkarni P, Rawtani D. Hyaluronic acid: a review on its biology, aspects of drug delivery, route of administrations and a special emphasis on its approved marketed products and recent clinical studies [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 151: 1012-1029.
- [15] Hou XY, Zhong D, Chen HY, et al. Recent advances in hyaluronic acid-based nanomedicines: preparation and application in cancer therapy [J]. *Carbohydr Polym*, 2022, 292: 119662.
- [16] Michalczyk M, Humeniuk E, Adamczuk G, et al. Hyaluronic acid as a modern approach in anticancer therapy-review [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 24 (1): 103.
- [17] Kang Y, Sun W, Li SY, et al. Oligo hyaluronan-coated silica/hydroxyapatite degradable nanoparticles for targeted cancer treatment [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2019, 6 (13): 1900716.
- [18] Abatangelo G, Vindigni V, Avruscio G, et al. Hyaluronic acid: redefining its role [J]. *Cells*, 2020, 9 (7): 1743.
- [19] Guo Q, Yang CX, Gao F. The state of CD44 activation in cancer progression and therapeutic targeting [J]. *FEBS J*, 2022, 289 (24): 7970-7986.
- [20] Spadea A, Rios de la Rosa JM, Tirella A, et al. Evaluating the efficiency of hyaluronic acid for tumor targeting via CD44 [J]. *Mol Pharm*, 2019, 16 (6): 2481-2493.
- [21] Hinneh JA, Gillis JL, Moore NL, et al. The role of RHAMM in cancer: exposing novel therapeutic vulnerabilities [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 982231.
- [22] Carvalho AM, Reis RL, Pashkuleva I. Hyaluronan receptors as mediators and modulators of the tumor microenvironment [J]. *Adv Healthc Mater*, 2023, 12 (5): 2202118.
- [23] 许弘弢, 黄小娟, 郑重阳, 等. 荧光成像技术在口腔癌诊疗中的应用及进展 [J]. *中国癌症杂志*, 2023, 33 (9): 874-878.
- [24] Qi B, Crawford AJ, Wojtynek NE, et al. Tuned near infrared fluorescent hyaluronic acid conjugates for delivery to pancreatic cancer for intraoperative imaging [J]. *Theranostics*, 2020, 10 (8): 3413-3429.
- [25] 李慧, 倪频越, 缪臣琳, 等. 石墨烯量子点在肿瘤诊断与治疗中的应用 [J]. *自然杂志*, 2022, 44 (2): 155-165.
- [26] Nigam P, Waghmode S, Louis M, et al. Graphene quantum dots conjugated albumin nanoparticles for targeted drug delivery and imaging of pancreatic cancer [J]. *J Mater Chem B*, 2014, 2 (21): 3190-3195.
- [27] Huang RJ, Zhou XY, Chen GY, et al. Advances of functional nanomaterials for magnetic resonance imaging and biomedical engineering applications [J]. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2022, 14 (4): e1800.
- [28] 李博, 杨童, 刘锦, 等. 二氧化锰纳米材料在肿瘤诊疗领域的应用研究进展 [J]. *山东化工*, 2021, 50 (18): 45-50.
- [29] Zhou XX, He CB, Liu M, et al. Self-assembly of hyaluronic acid-mediated tumor-targeting theranostic nanoparticles [J]. *Biomater Sci*, 2021, 9 (6): 2221-2229.
- [30] Chu BB, Chen ZM, Shi HL, et al. Fluorescence, ultrasonic and photoacoustic imaging for analysis and diagnosis of diseases [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2023, 59 (17): 2399-2412.
- [31] Mirg S, Turner KL, Chen H, et al. Photoacoustic imaging for microcirculation [J]. *Microcirculation*, 2022; 29 (6-7): e12776.
- [32] Thangavel K, Lakshmikuttyamma A, Thangavel C, et al. CD44-targeted, indocyanine green-paclitaxel-loaded human serum albumin nanoparticles for potential image-guided drug delivery [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2022, 209 (Pt 1): 112162.
- [33] 晋巧利. 水相 CuInS<sub>2</sub>/ZnS 量子点的制备及其对心血管 疾病生物标志物的定量检测研究 [D]. 开封: 河南大学, 2023.
- [34] 徐阳, 甄俊平. 增强磁共振成像对比剂的研究进展 [J]. *临床放射学杂志*, 2023, 42 (9): 1523-1526.
- [35] Yang YB, Jing LJ, Li XD, et al. Hyaluronic acid conjugated magnetic prussian blue@quantum dot nanoparticles for cancer theranostics [J]. *Theranostics*, 2017, 7 (2): 466-481.
- [36] Zhu LS, Lin M. The synthesis of nano-doxorubicin and its anticancer effect [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2021, 21 (18): 2466-2477.
- [37] Brindisi M, Curcio M, Frattaruolo L, et al. CD44-targeted nanoparticles with GSH-responsive activity as powerful therapeutic agents against breast cancer [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 221: 1491-1503.
- [38] Li CW, Cheng Y, Li DW, et al. Antitumor applications of photothermal agents and photothermal synergistic therapies [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (14): 7909.
- [39] 黄小秀, 李虎, 杨松. 杂化纳米材料光热治疗肿瘤的研究进展 [J]. *贵州大学学报 (自然科学版)*, 2023, 40 (5): 37-46.
- [40] Liu R, Hu C, Yang YY, et al. Theranostic nanoparticles with tumor-specific enzyme-triggered size reduction and drug release to perform photothermal therapy for breast cancer treatment [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9 (2): 410-420.
- [41] Li ZH, Chen YJ, Yang Y, et al. Recent advances in nanomaterials-based chemo-photothermal combination therapy for improving cancer treatment [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2019, 7: 293.
- [42] 王丽凯, 田娅, 吴惠霞. 一氧化氮治疗肿瘤的研究进展 [J]. *上海师范大学学报 (自然科学版)*, 2022, 51 (4): 443-451.
- [43] Liu R, Xiao W, Hu C, et al. Theranostic size-reducible and no donor conjugated gold nanocluster fabricated hyaluronic acid nanoparticle with optimal size for combinational treatment of breast cancer and lung metastasis [J]. *J Control Release*, 2018, 278: 127-139.
- [44] Gong LY, Zhang YJ, Liu CC, et al. Application of radiosensitizers in cancer radiotherapy [J]. *Int J Nanomedicine*, 2021, 16: 1083-1102.
- [45] Hu R, Zheng MX, Wu JC, et al. Core-shell magnetic gold nanoparticles for magnetic field-enhanced radio-photothermal therapy in cervical cancer [J]. *Nanomaterials*, 2017, 7 (5): 111.
- [46] 赖建军, 吴稚冰. 基于纳米技术的肿瘤热放疗增敏的研究进展 [J]. *中国肿瘤临床*, 2021, 48 (19): 1010-1014.
- [47] Cheng Y, Lu T, Wang YD, et al. Glutathione-mediated

- clearable nanoparticles based on ultrasmall Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub> for MSOT/CT/MR imaging guided photothermal/radio combination cancer therapy [J]. *Mol Pharm*, 2019, 16 (8): 3489-3501.
- [48] Kolarikova M, Hosikova B, Dilenko H, et al. Photodynamic therapy: innovative approaches for antibacterial and anticancer treatments [J]. *Med Res Rev*, 2023, 43 (4): 717-774.
- [49] 佟勤丽, 陈梦婷, 林洪铮, 等. 光敏剂递送系统及肿瘤光动力治疗的研究进展 [J]. *药学学报*, 2023, 58 (8): 2320-2333.
- [50] 居瑞军, 杜雨蒙, 吴发亮, 等. 光动力治疗在抗肿瘤耐药中的研究进展 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2023, 25 (8): 153-157.
- [51] 王悦璇, 刘秀均. 顺铂的作用靶点及耐药机制的研究进展 [J]. *中国医药生物技术*, 2020, 15 (3): 316-319.
- [52] Hou GH, Qian JM, Guo M, et al. Hydrazided hyaluronan/cisplatin/indocyanine green coordination nanoprodruge for photodynamic chemotherapy in liver cancer [J]. *Carbohydr Polym*, 2022, 276: 118810.
- [53] Shrestha B, Wang L, Brey EM, et al. Smart nanoparticles for chemo-based combinational therapy [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13 (6): 853.
- [54] 赵凌峰, 俸彦雁, 杨钰叠, 等. 以吡啶胺-2, 3 双加氧酶为靶点的肿瘤治疗研究进展 [J]. *现代肿瘤医学*, 2022, 30 (10): 1910-1914.
- [55] Hu Y, Chen X, Xu YY, et al. Hierarchical assembly of hyaluronan coated albumin nanoparticles for pancreatic cancer chemioimmunotherapy [J]. *Nanoscale*, 2019, 11 (35): 16476-16487.
- [56] Rabaan AA, Bukhamsin R, AlSaihati H, et al. Recent trends and developments in multifunctional nanoparticles for cancer theranostics [J]. *Molecules*, 2022, 27 (24): 8659.
- [57] Liu S, Su Y, Lin MZ, et al. Brightening up biology: advances in luciferase systems for in vivo imaging [J]. *ACS Chem Biol*, 2021, 16 (12): 2707-2718.
- [58] Pulakkat S, Balaji SA, Rangarajan A, et al. Surface engineered protein nanoparticles with hyaluronic acid based multilayers for targeted delivery of anticancer agents [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8 (36): 23437-23449.

(收稿日期: 2023-12-11; 修回日期: 2024-01-11)

## 雪莲多糖的结构分析及其生物活性研究进展

马巧丽, 胡玉龙, 李杰明, 董春红\* (河南中医药大学, 郑州 450046)

**摘要:** 雪莲是一种我国传统的珍稀中药材, 甘温, 微苦, 归肝、肾经, 可祛风湿、强筋骨、补肾阳、调经止血等功效, 多糖是雪莲的主要生物活性成分之一, 具有抗氧化、抗炎、终止妊娠、抗菌、抗病毒等多种生物活性。本文对其结构及生物活性进行分析、归纳、总结, 以期为今后雪莲多糖的深入研究及糖创新药物研发、功能性产品开发利用提供参考。

**关键词:** 雪莲多糖; 结构分析; 生物活性

**中图分类号:** R283, R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)08-2138-06  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.027

### Research progress in structure analysis and bioactivities of *Saussurea involucrata* polysaccharide

MA Qiao-li, HU Yu-long, LI Jie-ming, DONG Chun-hong\* (*Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046*)

**Abstract:** *Saussurea involucrata* is a rare traditional Chinese herbal medicine, which can dispel rheumatism strengthen muscles and bones, tonify and nourish the kidney yang, regulate menstruation and stop bleeding, etc. Polysaccharides, one of the main bioactive chemical constituents in *Saussurea involucrata*, have many bioactivities, such as antioxidant, anti-inflammatory, termination of pregnancy, antibacterial, and antiviral effect. This review systematically summarized its structure

**基金项目:** 中国博士后科学基金资助项目 (No.2021M690936); 河南省科技攻关项目 (No.222102310231); 河南中医药大学科研苗圃工程项目 (No.MP2020-15; No.MP2020-27); 河南省中医药专项重点课题 (No.2023ZY1033)。

**作者简介:** 马巧丽, 男, 硕士研究生, 主要从事中药多糖及糖药物研究, email: mql2000639@163.com \*通信作者: 董春红, 女, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药多糖及糖药物研究, email: chunhong\_dong@hactcm.edu.cn



and bioactivities, aiming to provide reference for future in-depth research on *Saussurea involucrata* polysaccharides and the development of innovative drugs and utilization of functional product.

**Key words:** *Saussurea involucrata* polysaccharides; structural analysis; bioactivity

雪莲是菊科凤毛菊属 (*Saussurea*) 罕见的高山多年生草本植物, 主要有天山雪莲、绵头雪莲、水母雪莲等, 生长在新疆、西藏等海拔 4500 米左右的高山上, 《月王药物》和《本草纲目拾遗》中记载了其全草或地上部分可作为生药, 是我国民族药中一种名贵稀有的中药材<sup>[1-5]</sup>, 具有抗疲劳、抗氧化、止痛、抗肿瘤等功效。雪莲的主要化学成分有黄酮类、生物碱、多糖类等, 国内外主要对其黄酮类化合物进行了研究, 并已开发出成药, 但对其多糖类化合物研究较少<sup>[5-9]</sup>。已有研究证实雪莲多糖具有广泛的生物活性, 如抗病毒、抗氧化、抗疲劳、终止妊娠等。

### 1 雪莲的种类

根据雪莲形态的不同, 可将其分为雪兔子亚属和雪莲亚属, 雪兔子亚属主要有绵头雪莲、水母雪莲、星状雪兔子和三指雪兔子等; 雪莲亚属主要有苞叶雪莲、天山雪莲和藏雪莲等(见表 1)<sup>[2, 10-12]</sup>。这几种雪莲有混用的现象, 是由于生物多样性的原因, 同属同科的雪莲有很多种, 其所含有的化学成分大致相似, 从而导致其生物活性也大致相同。多糖类化合物是雪莲主要化学成

分之一, 其单糖组分、分子量及生物活性也类似。

### 2 雪莲多糖的结构分析

多糖是聚合高分子碳水化合物, 通过糖苷键连接不少于 10 个单糖的糖链。多糖的化学结构不同其生物活性有着很大的差异, 多糖的分子量、单糖组成、主链结构、高级结构、分支度等都会影响其生物活性, 因此分析多糖的结构对其生物活性有着十分重要的作用。

#### 2.1 单糖组成及结构

研究雪莲多糖的单糖组成是研究其结构、生物活性及构效关系的基础, 单糖组成会直接影响多糖的活性<sup>[13]</sup>。雪莲多糖主要有阿拉伯糖、鼠李糖、半乳糖、葡萄糖、半乳糖醛酸、甘露糖、木糖等单糖组成(见表 2 及图 1~2), 且具有很好的抗氧化活性, 对超氧阴离子和羟自由基有明显的清除效果, 还可以减轻氧化应激反应, 起到一定的抗炎作用。雪莲多糖抗氧化活性与其糖醛酸的含量有很大的关系, 其糖醛酸含量越高, 清除自由基的活性越强; 其抑菌与抗炎活性和半乳糖的含量有关, 且随着半乳糖含量的增加, 抑菌与抗炎活性越强(见表 2)<sup>[7, 14-18]</sup>。

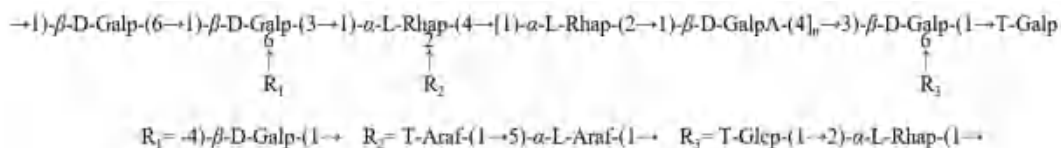


图 1 雪莲多糖 (SIP-II) 的预测结构图

Fig 1 Predictive structure of *Saussurea involucrata* polysaccharides (SIP-II)



图 2 绵头雪莲多糖 (SLP-4) 的预测结构图

Fig 2 Predictive structure of *Saussurea laniceps* polysaccharides (SLP-4)

#### 2.2 多糖的构型及活性功能基团对活性的影响

绵头雪莲多糖 (SLP-4, 见图 2) 是一种果胶型多糖, 能和乙型肝炎病毒 e 抗原 (HBeAg) 发生相互作用, 比 SLP-4 与乙型肝炎病毒表面抗原

(HBsAg) 的相互作用更强, 这是由于 SLP-4 对 HBeAg 抑制作用更显著, 其通过与乙型肝炎病毒 (HBV) 蛋白相互作用, 从而达到抗 HBV 的作用<sup>[17]</sup>。大多数硫酸化多糖具有抗凝血作用, 研究

表 1 雪莲的种类, 分布及形态特征

Tab 1 Species, distribution and morphological characteristics of *Saussurea involucrata*

雪莲种类	分布	形态特征		文献
		区别点	共同点	
雪兔子 亚属 绵头雪莲 ( <i>Saussurea laniceps</i> , SL)	主要分布在云南、西藏等地	中上端被白色或淡褐色的稠密棉毛覆盖, 如同一团棉花, 褐色叶柄, 叶呈披针形或倒椭圆形且分布极密, 花为同形淡紫色的筒状两性花	雪兔子亚属较矮小, 叶密, 被雪白色的棉毛所覆盖, 头状花序密集	[2, 10]
水母雪莲 ( <i>Saussurea medusa</i> , SM)	主要分布在青藏高原等地	叶片多呈灰绿色		
星状雪兔子 ( <i>Saussurea stella</i> Maxim, SS)		叶呈莲座状, 为紫红色		
三指雪兔子 ( <i>Saussurea tridactyla</i> , ST)		叶片为白色或灰白色, 被稠密的棉毛所覆盖		
雪莲亚属 苞叶雪莲 ( <i>Saussurea obvallata</i> , SO)	主要分布在甘肃、青海等地	茎直立, 有短柔毛或无毛; 叶有长柄, 长椭圆形或卵形, 两面有腺毛; 最上部茎叶为黄色, 呈苞片状, 长椭圆形或卵状长圆形, 包围着花序; 球形花序, 无小花梗或短的小花梗	三种雪莲茎直、粗, 球形花序, 苞叶呈淡黄色、卵形	[10-12]
天山雪莲 ( <i>Saussurea involucrata</i> , (Kar.et Kir.)Sch.-Bip.) 又称为新疆雪莲	主要分布在新疆的乌鲁木齐、博克达山、和硕等地	独茎不分枝, 莲座和茎部叶子都有叶柄, 叶子是椭圆形或倒卵形, 两面都是绿色且被柔毛所覆盖, 边缘有缘毛, 最上面的叶子无柄; 球形花序; 苞叶呈长卵形或卵形, 淡黄色, 其微香, 味微苦		
藏雪莲 ( <i>Saussurea tridactyla</i> Sch.-Bip., SSB)	主要分布在青藏高原及其毗邻地区	花序聚生茎顶呈球形, 苞叶是淡黄绿色且微透明, 茎粗厚, 底部有纤维状残叶基; 叶密集丛生, 茎叶圆形或倒披针形且无柄、叶的边缘有锯齿		

发现 5 种不同硫酸化程度的雪莲多糖都能通过经典途径和替代途径表现出较强的抗凝血活性, 并呈剂量依赖性。低分子量的硫酸化雪莲多糖具有很好的抗凝血作用, 但天然雪莲多糖则没有这种作用, 这表明多糖的硫酸基团可能对抗凝血活性至关重要<sup>[19]</sup>。

### 3 雪莲多糖的生物活性及作用机制

#### 3.1 抗氧化

自由基是人体新陈代谢所产生的, 在体内保持一种生理的动态平衡, 当这个平衡体被打破, 就会引发一系列的疾病, 例如炎症、衰老等。中药多糖具有很好的抗氧化活性, 一方面可以直接清除机体自由基; 另一方面, 还可以通过调节机体一系列抗氧化酶的表达而间接清除自由基, 从而抑制氧化损伤的发生 (见表 3)<sup>[7, 9, 11, 18, 20-28]</sup>。

#### 3.2 终止妊娠

研究发现, 雪莲多糖可以引起子宫收缩, 且兴奋子宫, 从而达到终止妊娠的作用。雪莲多糖通过对动情期组、非动情期组及乙烯雌酚诱发动情期组的大鼠子宫 3 级离体实验发现: 雪莲多糖对各性周期离体大鼠子宫肌条都有明显的兴奋作用, 子宫收缩频率、振幅和张力的强度和其剂量有关。其对动情期子宫的兴奋作用要明显高于非动情期, 可能是雌激素增加了子宫平滑肌对其的

敏感性<sup>[21]</sup>。雪莲多糖能引起子宫平滑肌收缩, 对各周期离体的大鼠子宫肌条都有明显的兴奋作用, 其除了具有直接兴奋子宫的作用外, 还可以促进内源性前列腺素合成<sup>[29]</sup>, 因此雪莲多糖具有终止妊娠的药理活性。

#### 3.3 抗炎作用

炎症是一种常见的生理反应, 也是对刺激所产生的一种防御反应, 但炎症常常伴随着红、肿、热、痛等表现, 进一步发展就会导致组织的坏死和增生, 从而导致症状或疾病的恶化。研究发现, 雪莲多糖可以通过抑制 P38MAPK 通路、炎症因子以及调控 TLR-2 和 Th2 相关细胞因子的表达等多靶点发挥抗炎作用, 而且中药多糖还具有多途径、多靶点、低毒性、不良反应少等独特的优势 (见表 4)<sup>[14, 27-31]</sup>。

#### 3.4 抑菌作用

天然多糖具有很好的抗菌活性, 如黄芪多糖、壳聚糖已经被应用于医药、食品等领域。天然多糖种类很多, 但其抗菌作用机制并无显著差别, 主要通过破坏细菌的细胞壁和细胞膜、调控细菌内酶活性和离子水平、调控能量代谢、影响基因等方面, 达到抑菌效果<sup>[32]</sup>。新疆雪莲水溶性多糖 (XL<sub>3</sub>) 对细菌有较强的抑菌作用, 但对真菌没有抑菌作用, 对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、

表 2 雪莲多糖的单糖组成及活性

Tab 2 Monosaccharide composition and bioactivity of *Saussurea involucrata* polysaccharides

种类	提取方法	单糖组成及摩尔比	相对分子质量 /Da	活性	文献
栽培雪莲多糖	超声 - 去离子水	Glc、Gal、Xyl、Rha、Ara、GalA (0.76 : 0.66 : 0.11 : 5.59 : 0.32 : 44.66)	88 600	清除自由基	[7]
		Glc、Gal、Xyl、Rha、Ara、GalA (1.65 : 0.39 : 0.07 : 8.33 : 1.76 : 40.43)	163 500		
雪莲多糖	热水提取法	Ara、Rha、Gal、GalA、Glc (19.85 : 20.30 : 27.12 : 11.95 : 8.69)	237 570	抗炎	[14]
藏雪莲多糖	热水浸提法	Xyl、Ara、Rha、Gal、Glc、GalA、Man (1.00 : 2.80 : 2.60 : 2.60 : 2.00 : 7.60 : 1.60)	—	清除超氧阴离子自由 基和羟自由基	[15]
绵头雪莲环面	热水提取法	Man、Rha、GlcA、GalA、Glc、Gal、Xyl、Ara (0.25 : 0.53 : 0.19 : 15.35 : 0.51 : 1.10 : 0.63 : 1.73)	10 113	清除自由基抗 HBV	[16-17]
		Man、Rha、GalA、Glc、Gal、Xyl、Ara (0.83 : 2.03 : 15.00 : 0.84 : 8.26 : 4.04 : 6.01)			
		Man、Rha、GlcA、GalA、Glc、Gal、Ara (0.92 : 5.61 : 0.93 : 19.50 : 2.42 : 5.27 : 3.01)	12 392	抗氧化	[18]

注 (Note): Glc. 葡萄糖 (glucose); Gal. 半乳糖 (galactose); Ara. 阿拉伯糖 (arabinose); Man. 甘露糖 (mannose); Rha. 鼠李糖 (rhamnose); Xyl. 木糖 (xylose); GlcA. 葡糖醛酸 (glucuronic acid); GalA. 半乳糖醛酸 (galacturonic acid); Fuc. 岩藻糖 (fucose)。

表 3 雪莲多糖抗氧化活性研究及机制探讨

Tab 3 Antioxidant activity and mechanism of *Saussurea involucrata* polysaccharides

种类	方法及对象	结果	机制	文献
栽培雪莲多糖	Marklun 法、DPPH 溶液、Wang 法	吸光度下降	清除超氧阴离子自由基、清除 DPPH 自由基、清除羟基自 由基	[7]
雪莲多糖	体外抗氧化实验	① 抗氧化; ② 抗黑色素生成	清除自由基; 下调黑色素形成相关蛋白和因子, 显著抑制 黑色素的生物合成	[9]
	暴露于紫外线 B (UVB) 后的小鼠	降低 UVB 辐照诱导的氧化应激和 DNA 损伤, 增加角质形成细胞的分化和脂质的产生	激活 PPAR- $\alpha$ 通路, 减轻 UVB 诱导的氧化应激并抑制炎症反应, 调节角质形成细胞的增殖和分化, 减轻脂质合成障碍	[20]
绵头雪莲多糖	红细胞溶血实验	细胞内抗氧化活性	抑制生产活性氧和丙二醛 (MDA) 的生成, 维持细胞抗氧化酶 [超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)] 的正常活性, 调节谷胱甘肽 (GSH) 和氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 的含量	[18]
天山雪莲多糖	小鼠	小鼠耗氧量降低、延长游泳时间	抑制小鼠肝匀浆硫代巴比妥酸钠反应物的产生	[21]
	清除自由基活性测定	抗氧化	对 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^-$ 自由基的清除效果较好, 对 $\text{R}\cdot$ 几乎没有清除能力	[22]
水母雪莲多糖	昆明种雄性小鼠	减轻 UVB 辐照导致的小鼠皮肤损伤	水通道蛋白 3 (AQP3) 通路来减轻 UVB 辐照导致的小鼠皮肤损伤	[23]
	细胞实验	抑制中波紫外线照射所致的细胞凋亡	上调人成纤维细胞 P38、P53 和 Bcl-2 的表达, 下调 Bax 和活性 caspase-3 的表达, 增加 SOD、CAT 的活性和谷胱甘肽的含量, 减少 MDA 含量	[24]
	小鼠	UVB 辐照引起的皮肤光老化	提高超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶和羟脯氨酸 (HYP) 水平, 同时降低 MDA 水平	[25]
藏雪莲多糖	氮蓝四唑比色法、小鼠	溶液褪色、小鼠耗氧量降低、延长游泳时间	清除超氧阴离子自由基	[11]
	HaCaT 细胞实验	① 对 UVB 辐照的 HaCaT 细胞的氧化损伤具有保护作用; ② 抗氧化	提高细胞活力, 减少凋亡细胞数量, 减轻细胞水肿程度, 恢复细胞形态, 提高 SOD 活性、GSH 含量、CAT 活性, 降低 MDA 含量	[26]
	HaCaT 细胞实验	减轻 UVB 辐照对 HaCaT 细胞造成的凋亡 / 炎性损伤	通过 P38MAPK 通路减少 UVB 辐照后 HaCaT 细胞的凋亡 / 炎性损伤, 抑制 IL-6、TNF- $\alpha$ 的表达	[27-28]



表 4 雪莲多糖抗炎活性研究及机制探讨

Tab 4 Anti-inflammatory activity and mechanism of *Saussurea involucreta* polysaccharides

种类	实验方法及对象	结果	机制	文献
雪莲多糖	细胞实验	抑制炎症因子及相关介质的表达	抑制脂多糖 (LPS) 刺激的 RAW264.7 巨噬细胞	[14]
藏雪莲多糖	采用酶联免疫吸附实验 (ELISA)	减轻 HaCaT 细胞的炎性损伤	多糖通过 P38MAPK 通路减少 UVB 辐照后 HaCaT 细胞凋亡	[27]
天山雪莲多糖	特异性皮炎 (AD) 小鼠	改善了 AD 模型小鼠的皮损	调控 TLR-2 和 Th2 相关细胞因子的表达	[30]
绵头雪莲多糖	佐剂性关节炎大鼠	减轻关节炎大鼠的足肿胀度	降低 IL-2 水平和提高 IL-10 水平	[31]

枯草杆菌这三种细菌都有很好的抑菌作用, 其抑菌活性顺序为: 大肠埃希菌 > 金黄色葡萄球菌 > 枯草杆菌, 且随着多糖浓度的升高其抑菌作用更好<sup>[22]</sup>。从凤毛属植物分离出来的多糖 (PS-SC) 具有较好的抑菌作用及成骨活性, 但与分离出来的黄酮类化合物相比, 其对金黄色葡萄球菌的抑制作用相对较强, 但其成骨活性较强<sup>[33]</sup>。天山雪莲和其组织培养雪莲的粗多糖经分离纯化分别得到新疆天山雪莲均一多糖 (XJXL<sub>1</sub>) 和组织培养雪莲均一多糖 (PYXL<sub>1</sub>), 通过细胞实验发现, XJXL<sub>1</sub> 和 PYXL<sub>1</sub> 具有很好的抗菌作用, 但是对真菌没有最低浓度限制, 可以推断这两个多糖对真菌没有抑制作用<sup>[34]</sup>。

### 3.5 其他活性

从绵头雪莲花瓣中分离纯化出一种多糖 SLP-4, 能够有效地抑制 HBV 的分泌, 其作用机制是通过 SLP-4 与 HBV 蛋白的相互作用来实现的, 但对 HepG2 细胞中 HBV 的增殖没有明显的抑制作用<sup>[17]</sup>。凤毛属植物分离纯化的多糖 (SSP2、SSP6、SFP2 和 SFP6) 主要有木糖 (63.1% ~ 76.7%)、葡萄糖 (11.8% ~ 19.2%)、半乳糖 (4.7% ~ 8.3%) 和鼠李糖 (6.8% ~ 9.4%) 等单糖组成。其中, SSP2、SSP6 和 SFP2 具有较强的免疫调节活性, 可诱导单核 THP-1 细胞产生 NO, 激活转录因子 NF- $\kappa$ B/AP-1, 并诱导单核 THP-6 细胞产生白细胞介素 (IL) -1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 等细胞因子<sup>[35]</sup>。雪莲多糖可以不同程度地减轻辐照诱发的小鼠骨髓造血功能病理学改变, 显著提高血常规红细胞数量、血红蛋白含量等, 还可以明显促进 CD34<sup>+</sup> 造血细胞在整体细胞中所占比率, 其活性与阳性药再造生血片相当, 因此, 雪莲多糖对再生障碍性贫血具有一定的治疗作用<sup>[36]</sup>。天山雪莲水提物可以显著地抑制乳腺癌细胞的增殖, 还能抑制乳腺癌细胞的迁移<sup>[37]</sup>。

### 4 总结与展望

雪莲生长在高原寒带地区, 是一种常用的中药材, 但对它的研究还处于初步阶段, 对雪莲多糖的结构和生物活性研究还不完善, 其在抗毒、抗疲劳、终止妊娠、延缓衰老等方面仍具有较大的开发价值。雪莲活性化学成分众多, 但其具有药理活性的多糖类化合物的作用机制亟待研究。雪莲多糖的研究弊端主要存在以下几个方面:

① 雪莲生长条件比较恶劣, 且数量有限, 又由于过度的开采, 从而限制了雪莲在中药及功能性产品中的广泛应用; ② 雪莲多糖的研究多集中在单糖组成, 对其结构特征研究很少; ③ 其活性研究多集中在活性验证和机制探讨阶段, 缺乏对其精细结构的研究, 从而导致多糖的结构与生物活性之间的关系不明确, 很难在分子水平阐明其活性作用机制。

### 参考文献

- [1] 熊蔚蔚, 陈曦, 杨德峰. 雪莲中水溶性多糖提取及纯化的工艺优化 [J]. 北华大学学报 (自然科学版), 2013, 14 (6): 662-665.
- [2] 郑博文, 尼玛此里, 鲁茸达瓦, 等. 绵头雪莲花有效成分的初步提取 [J]. 皮肤病与性病, 2017, 39 (5): 322-323.
- [3] Wang J, He R, Zhang HX, et al. Complete chloroplast genome of *Saussurea inversa* (Asteraceae) and phylogenetic analysis [J]. Mitochondrial DNA Part B, 2021, 6 (1): 8-9.
- [4] Yang JL, Wang R, Liu LL, et al. Phytochemicals and biological activities of *Saussurea* species [J]. J Asian Nat Prod Res, 2010, 12 (2): 162-175.
- [5] Chik WI, Zhu L, Fan LL, et al. *Saussurea involucreta*: a review of the botany, phytochemistry and ethnopharmacology of a rare traditional herbal medicine [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 172: 44-60.
- [6] Wang YF, Ni ZY, Dong M, et al. Secondary metabolites of plants from the genus *Saussurea*: chemistry and biological activity [J]. Chem Biodivers, 2010, 7 (11): 2623-2659.
- [7] Yao LY, Zhao QS, Xiao J, et al. Composition and antioxidant activity of the polysaccharides from cultivated *Saussurea involucreta* [J]. Int J Biol Macromol, 2012, 50 (30): 849-853.
- [8] Liu M, Yang JS, Qin D. Chemical constituents from the aerial parts of *Saussurea involucreta* with their inhibitory activities on  $\alpha$ -glucosidase [J]. J Asian Nat Prod Res, 2022, 24 (7): 685-690.
- [9] Kamilijiang M, Zang D, Abudukelimu N, et al. An-

- ti-melanogenesis effect of polysaccharide from *Saussurea involucrata* on forskolin-induced melanogenesis in B16F10 melanoma cells [J]. *Nutrients*, 2022, 14 (23): 5044.
- [10] 杨璐铭, 陈虎彪, 郭乔如, 等. 雪莲的化学成分及药理作用研究进展 [J]. *药学学报*, 2020, 55 (7): 1466-1477.
- [11] 卢新生, 张海玲, 苟如虎, 等. 藏药雪莲花的化学成分及药用价值研究 [J]. *北方园艺*, 2011, 35 (6): 188-191.
- [12] 商国懋, 王文颖. 维吾尔族习用药材天山雪莲 [J]. *首都医药*, 2014, 21 (13): 41.
- [13] Wang ZC, Zheng Y, Lai ZR, et al. Effect of monosaccharide composition and proportion on the bioactivity of polysaccharides: a review [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 254 (2): 127955.
- [14] Liu G, Kamilijiang M, Abuduwaili A, et al. Isolation, structure elucidation, and biological activity of polysaccharides from *Saussurea involucrata* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 222: 154-166.
- [15] 刘春兰, 邓义红, 钟婷婷, 等. 西藏雪莲多糖初步分离和清除自由基活性研究 [J]. *北京农学院学报*, 2007, 22 (1): 4-7.
- [16] 陈文博. 西藏绵头雪莲花多糖的结构鉴定及生物活性的研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2021.
- [17] Chen WB, Zhu XL, Ma JJ, et al. Structural elucidation of a novel pectin-polysaccharide from the petal of *Saussurea laniceps* and the mechanism of its anti-HBV activity [J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 223: 115077.
- [18] Chen WB, Ma JJ, Gong F, et al. Two novel polysaccharides from the torus of *Saussurea laniceps* protect against AAPH-induced oxidative damage in human erythrocytes [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 200: 446-455.
- [19] Fan H, Liu F, Bligh AS, et al. Structure of a homofructosan from *Saussurea costus* and anti-complementary activity of its sulfated derivatives [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 105: 152-160.
- [20] Wang LH, Yang KY, Jing RR, et al. Protective effect of *Saussurea involucrata* polysaccharide against skin dryness induced by ultraviolet radiation [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1089537.
- [21] 翟科峰, 王聪, 高贵珍, 等. 天山雪莲的研究进展 [J]. *湖北农业科学*, 2009, 48 (11): 2869-2873.
- [22] 刘春兰, 邓义红, 杜宁, 等. 新疆雪莲水溶性多糖的分离纯化及生物活性研究 [J]. *中药材*, 2008, 287 (1): 101-104.
- [23] 曾智, 孔悦, 郭砚. 水母雪莲多糖对 UVB 诱导的小鼠皮肤损伤保护作用的机制研究 [J]. *中国美容医学*, 2021, 30 (4): 102-106.
- [24] 孙楠, 吴艳, 姜莉. 水母雪莲多糖对中波紫外线诱导的皮肤成纤维细胞凋亡的研究 [J]. *中国美容医学*, 2019, 28 (3): 100-103.
- [25] Guo Y, Kong Y, Sun J, et al. Alleviation of ultraviolet-B radiation-induced photoaging using *Saussurea medusa* Maxim polysaccharide [J]. *Photochem Photobiol*, 2023, doi: 10.1111/php.13855.
- [26] Guo Y, Sun J, Ye J, et al. *Saussurea tridactyla* Sch. Bip. -derived polysaccharides and flavones reduce oxidative damage in ultraviolet B-irradiated HaCaT cells via a P38MAPK-independent mechanism [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2016, 10: 389-403.
- [27] 郭砚, 孙娟, 王丽雯. 藏雪莲多糖通过 P38 丝裂原激活蛋白激酶通路减轻中波紫外线辐射后皮肤角质形成细胞凋亡引起炎症损伤的研究 [J]. *中国全科医学*, 2015, 18 (27): 3314-3319.
- [28] 郭砚, 孙娟, 王丽雯. 藏雪莲多糖对 UVB 辐射 HaCaT 细胞氧化损伤的保护作用 [J]. *药物分析杂志*, 2015, 35 (6): 1016-1021.
- [29] 林秀珍, 王国祥. 雪莲多糖对离体大鼠子宫的作用 [J]. *药学学报*, 1986, 21 (3): 220-222.
- [30] 刘光荣, 敢小双, 太美灵, 等. 天山雪莲多糖外用对特异性皮炎小鼠的改善作用研究 [J]. *日用化学工业*, 2022, 52 (7): 704-709.
- [31] 魏荷琳, 封家福, 江滔. 绵头雪莲花对佐剂性关节炎大鼠的抗炎作用研究 [J]. *产业与科技论坛*, 2020, 19 (10): 48-51.
- [32] 张彤, 赵芸, 黄伟, 等. 天然多糖抑菌活性及机制研究进展 [J]. *湖北农业科学*, 2022, 61 (11): 158-162, 169.
- [33] Khlusov I, Avdeeva E, Shupletsova V, et al. Comparative in vitro evaluation of antibacterial and osteogenic activity of polysaccharide and flavonoid fractions isolated from the leaves of *Saussurea controversa* [J]. *Molecules*, 2019, 24 (20): 3680.
- [34] 刘春兰, 杜宁, 邓义红, 等. 新疆天然雪莲与其组织培养物中水溶性多糖的研究 [J]. *时珍国医国药*, 2008, 19 (11): 2604-2607.
- [35] Schepetkin IA, Danilets MG, Ligacheva AA, et al. Immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Saussurea salicifolia* L. and *Saussurea frolovii* Ledeb [J]. *Molecules*, 2023, 28 (18): 6655.
- [36] 袁绍鹏, 陈日道, 史记, 等. 天山雪莲细胞培养物多糖对免疫介导的再生障碍性贫血模型小鼠的治疗作用研究 [J]. *医学研究杂志*, 2014, 43 (1): 14-17.
- [37] 吴琪, 马婧, 舒展, 等. 天山雪莲对乳腺癌的潜在治疗作用及基于网络药理学的机制探讨 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46 (18): 4824-4832.

(收稿日期: 2023-11-30; 修回日期: 2024-01-09)

# 治疗视网膜分支静脉阻塞及继发黄斑水肿药物研究进展

杨玉畅<sup>1</sup>, 白杰<sup>1</sup>, 胡盼祥<sup>1</sup>, 刘曼婷<sup>1</sup>, 史文娟<sup>1</sup>, 朱倩<sup>1</sup>, 刘娟<sup>1</sup>, 谢立科<sup>2</sup>, 郝晓凤<sup>2\*</sup>, 曲昌海<sup>1\*</sup>  
(1.北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2.中国中医科学院眼科医院, 北京 100040)

**摘要:** 视网膜分支静脉阻塞 (BRVO) 为临床常见眼科疾病, 会对患者视力造成不可逆的损伤, 严重威胁人类生命健康。黄斑水肿 (ME) 为 BRVO 常见继发病, 目前尚无特效药物针对治疗, 因此对 BRVO 及继发 ME 相关治疗药物的研究显得尤为重要。本文就近年来治疗 BRVO 和继发 ME 的药物研究最新进展进行综述。

**关键词:** 视网膜分支静脉阻塞; 药物治疗; 研究进展; 血-视网膜屏障

中图分类号: R774.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)08-2144-05  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.028

## Advances in drug therapy for branch retinal vein occlusion

YANG Yu-chang<sup>1</sup>, BAI Jie<sup>1</sup>, HU Pan-xiang<sup>1</sup>, LIU Man-ting<sup>1</sup>, SHI Wen-juan<sup>1</sup>, ZHU Qian<sup>1</sup>, LIU Juan<sup>1</sup>, XIE Li-ke<sup>2</sup>, HAO Xiao-feng<sup>2\*</sup>, QU Chang-hai<sup>1\*</sup> (1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488; 2. Eye Hospital, Chinese Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100040)

**Abstract:** Branch retinal vein occlusion (BRVO) is a prevalent ocular pathology in clinical practice, which may potentially cause irreversible damage upon patients' visual acuity and consequently pose a substantial threat to overall human well-being. Macular edema (ME) emerges as a prevalent sequelae of BRVO, and as of now, there lacks a definitive pharmaceutical intervention for its management. Consequently, development of drugs targeting BRVO and secondary ME matters much. This article comprehensively reviewed the recent advance in pharmaceutical research on the treatment of BRVO and secondary ME.

**Key words:** branch retinal vein occlusion; medication treatment; research progress; blood-retinal barrier

视网膜分支静脉阻塞 (branch retinal vein occlusion, BRVO) 发病率较高, 30 ~ 89 岁人群患病率为 0.77%, 且半数以上患者会继发黄斑水肿 (macular edema, ME), 给视功能带来严重威胁。血流动力学变化、血管壁退化和血液高凝状态是 BRVO 病理发展过程中的重要因素, 但具体发病原因尚不明晰。其具有年龄相关性, 随年龄的增长患病率不断增加。ME 是 BRVO 常见并发症, 会对患者视功能造成严重损伤<sup>[1]</sup>, 其病理发展过程见图 1。目前, 临床治疗手段主要包括药物治疗和手术治疗, 而药物治疗是最常用的治疗手段,

治疗 BRVO 药物分类见图 2。抗血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 类药物的玻璃体内注射以及针对炎症途径的药物在缓解视网膜血管异常和减少 ME 方面表现出良好的前景。此外, 传统中药在视网膜血管疾病的治疗中展现了独特的优势, 与西药治疗相结合, 中药不仅可以减轻症状, 还可能在改善患者视觉功能方面发挥积极作用。因此, 本综述旨在全面总结近年来治疗 BRVO 的药物认识和研究进展, 以期推动治疗 BRVO 药物的开发。

基金项目: 北京市自然科学基金面上项目 (No.7202123)。

作者简介: 杨玉畅, 男, 硕士研究生, 主要从事药物制剂新技术及递药系统研究, email: yyc980276977@163.com \*通信作者: 曲昌海, 男, 副研究员, 硕士研究生导师, 主要从事药物制剂新技术及递药系统研究, email: quchanghai@bucm.edu.cn; 郝晓凤, 女, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事中西医结合眼科方面的研究, email: fmmuhao@163.com



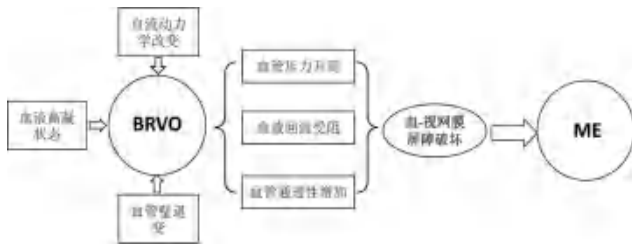


图 1 BRVO 及继发 ME 病理发展过程图

Fig 1 Pathological development process of BRVO and secondary ME



图 2 治疗 BRVO 药物汇总表

Fig 2 Summary of drugs for treating BRVO

## 1 西药治疗 BRVO

### 1.1 抗 VEGF 药

VEGF 是 BRVO 病理发展过程中的关键因子。VEGF 具有改变血管通透性和诱导新血管形成的能力，致使血-视网膜屏障 (blood-retinal barrier, BRB) 受到破坏，导致眼部血管病变<sup>[2]</sup>。因此，抗 VEGF 药物应运而生，因其疗效确切而成为临床治疗的一线用药，见表 1。

抗 VEGF 药物具有高亲和性和高靶向性，由于抗 VEGF 药物具有不同的结构特征，其在靶向选择性、药物吸收、分布、代谢、亲和力方面存在差异。雷珠单抗和贝伐单抗可以结合所有 VEGF-A 亚型，并且雷珠单抗为针对 VEGF-A 的单克隆抗体片段，其抗原结合部分具有更高的亲和性。而阿柏西普能够捕获 VEGF-A、VEGF-B 和胎盘生产因子 (placental growth factor, PLGF)<sup>[16]</sup>。Puddu 等<sup>[17]</sup>的划痕实验证明，在抑制新生血管生成方面，雷珠单抗要比阿柏西普更加有效。但有研究指出，在临床应用方面四种单克隆抗体在有效性、安全性方面无显著性差异。为个别患者选择抗 VEGF 药物时，应考虑其他因素，包括可负担性、药物可获得性和患者特征。

### 1.2 糖皮质激素

尽管抗 VEGF 药物在治疗 BRVO 方面疗效显著，但有些患者存在心血管疾病等相关禁忌证，或者对抗 VEGF 药物反应不佳<sup>[18]</sup>，为此，糖皮质激素成为一种备选治疗方案。糖皮质激素是一种类固醇，通常由肾上腺合成并释放，具有调节人体生长、发育等功能。在药理剂量下，糖皮质激素可以抑制 VEGF、IL-1、IL-6 等细胞因子表达，发挥抗炎、降低血管通透性、稳定 BRB 的作用<sup>[19]</sup>。目前治疗 BRVO 及继发 ME 常用的糖皮质激素类药物包括曲安奈德和地塞米松玻璃体植入剂 (见表 2)。

表 1 治疗 BRVO 的抗 VEGF 药物信息

Tab 1 Anti-VEGF drugs for BRVO

名称	结构类型	作用机制	临床疗效	文献
贝伐单抗	重组人源化单克隆抗体，嵌合了人免疫球蛋白 G <sub>1</sub> (immunoglobulin G <sub>1</sub> , IgG <sub>1</sub> )	抑制原钙黏蛋白 7、蛋白 FAM192A、ATP 合酶蛋白 8、白细胞介素 (interleukin) -6 (IL-6)，IL-8 和单核细胞趋化蛋白 -1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 表达；上调甲状腺素转运蛋白和Ⅲ型泛酸激酶	患者视力显著提升，中央黄斑厚度 (central macular thickness, CMT) 明显降低；促进 BRVO 继发 ME 消退	[3-5]
雷珠单抗	贝伐单抗 Fab 片段	抑制 VEGF、IL-6、IL-8、可溶性细胞间黏附分子 -1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、血小板来源生长因子 -AA (platelet-derived growth factor-AA, PDGF-AA)、MCP-1 等细胞因子表达	患者 CMT 水平明显提高；治疗有效率明显提升，且未增加并发症发生风险	[6-7]
阿柏西普	人体 VEGF 受体 (receptor) -1 (VEGFR1) 和 VEGFR2 的胞外区与人 IgG <sub>1</sub> 的抗体结晶片段 (fragment crystallizable, FC) 组成	维持脉络膜正常生理结构；降低 VEGF、IL-6、IL-8、IL-12 蛋白表达	患者最佳矫正视力由治疗前的 (0.73±0.21) 提升至 (0.53±0.17)；虽有部分患者出现眼压升高、眼痛等不良反应，但均自行缓解	[8-11]
康柏西普	人源化的可溶性的 VEGFR 融合蛋白，具有 VEGFR1 的细胞外结构域 -2 和 VEGFR-2 的细胞外结构域 -3、细胞外结构 -4	降低 ICAM-1、血清巨噬细胞炎性蛋白 -1 (serum macrophage inflammatory protein-1, MIP-1)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、还原型烟酰胺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 1 (NADPH oxidase 1, NOX1) 及 NOX-4、VEGF 蛋白表达；视网膜内皮细胞增殖减弱	患者视力水平明显提升，最佳矫正视力从治疗前的 (0.62±0.18)，提高至注射后一年的 (0.40±0.10)；CMT 明显降低	[12-15]

表 2 治疗 BRVO 的糖皮质激素类药物信息

Tab 2 Glucocorticoid drugs for BRVO

名称	作用机制	临床效果	参考文献
曲安奈德	抑制 IL-1、IL-6 和肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) 等炎症因子的表达, 减轻相关炎症反应; 抑制 VEGF 的表达, 降低血管通透性; 抑制巨噬细胞的修复和吞噬作用, 抑制免疫反应	与激光光凝联合治疗显著改善患者最佳矫正视力, CMT 明显降低, 血管血流密度显著上升; 但治疗过程中部分患者存在眼压升高现象	[20-21]
地塞米松玻璃体植入剂	抑制 VEGF 过度表达从而减少水肿; 抑制 IL-8、TNF- $\alpha$ 、ICAM-1 以减轻炎症细胞的浸润; 抑制血小板聚集以减轻血栓形成风险	与雷珠单抗联用改善患者 CMT 水平, 提高治疗效果, 有效减轻因注射引起的并发症; 早期 (0 ~ 3 个月) 应用治疗效果更佳	[22-24]

曲安奈德与地塞米松玻璃体植入剂在治疗 BRVO 及继发 ME 上表现出显著的治疗效果。然而全身应用糖皮质激素可能引起强烈不良反应, 而局部用药则难以达到有效的药物浓度。因此, 眼内注射被广泛采用, 研究指出, 后筋膜囊下注射方式更安全, 对眼内压的影响较小<sup>[21]</sup>。与曲安奈德相比, 地塞米松与小梁网和晶状体的亲和力相对较低, 降低了眼压升高和白内障发生的风险。地塞米松玻璃体植入剂由含有地塞米松微颗粒的乳酸和乙醇组成, 释药平稳、药效持久, 可有效维持 BRB 的稳定性<sup>[25]</sup>。纳米技术的应用使得糖皮质激素类药物精准递送成为可能。采用纳米脂质体包载曲安奈德可达到靶向给药的目的, 从而提高药物的安全性和耐受性<sup>[21]</sup>。

### 1.3 Rho 相关激酶抑制剂

Rho 相关激酶是一类蛋白激酶, 研究发现, Rho 相关激酶异常活性会刺激视网膜色素上皮层 (retinal pigment epithelial, RPE) 细胞中 ICAM-1 的表达, 促进白细胞黏附并导致白细胞淤积和炎症因子水平升高。此外, 视网膜处血管口径也受到 Rho 相关激酶通路的调节。其通过诱导血管收缩、腔内起泡、视网膜缺氧和 RPE 细胞重塑, 促进了 BRVO 的病理发展过程<sup>[26]</sup>。

Rho 相关激酶抑制剂多为小分子化合物, 作用机制为与腺苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP) 竞争 Rho 相关激酶分子上的 ATP 结合位点, 抑制 Rho 相关激酶催化的 ATP 的末端磷酸基团向底物分子的转移。目前 Rho 相关激酶抑制剂被研究用于治疗多种眼部疾病, 对 BRVO 及继发 ME 也展现出治疗潜力。研究表明 Rho 激酶抑制剂可降低模型小鼠视网膜中肌球蛋白磷酸化、内皮一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 磷酸化和 VEGF 的表达水平, 抑制内皮细胞中 ICAM-1 的表达, 显著减少血管渗漏和新生血管形成<sup>[27]</sup>。此外其可有效维持眼部细胞的骨架形态, 降低基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 和

TNF- $\alpha$  的含量<sup>[28]</sup>。这些效应有助于保护视网膜结构和功能, 维护 BRB 的稳定, 减少视力受损的风险。目前 Rho 相关激酶抑制剂应用于眼部疾病的治疗领域大多还处于研究阶段, 并没有广泛进入临床应用。利巴舒地尔和奈他舒地尔是两种可用于眼科的 Rho 相关激酶抑制剂, 通常耐受性良好, 但伴有轻度和短暂的局部不良反应如红肿、瘙痒等。

## 2 中药治疗 BRVO

中医视角下 BRVO 无明确病名相对应, 属“络损暴盲”“血证”范畴。中医认为 BRVO 的病因主要是由情志内伤、肝气郁结、血瘀引起, 医家多从这几方面入手, 通过辨证论治治疗疾病。

### 2.1 中药汤剂

中药汤剂最能切合中医辨证施治的理论要求, 可随症加减、配伍灵活。大多数临床方剂是根据中医古代经典名方加减变化或多方重组而来, 如渗湿明目方由天麻钩藤饮合五苓散变化而来<sup>[29]</sup>, 祛瘀通络方由血府逐瘀汤合二陈汤加减而成<sup>[30]</sup>, 黄斑消肿方由《丹溪心法》中所载四苓散化裁而成<sup>[31]</sup>。通过对临床方剂中药物的分析, 发现使用频次较高的药物主要有桃仁、红花、川芎、生地黄、当归和茯苓等。这些药物性味多为甘寒或苦寒, 大都归于肝经, 具有祛瘀、活血、行气的功效, 说明医家多根据活血化瘀、利水消肿、调达血气、化痰消肿的治疗思路进行辨证用药。常用的组方药对包括红花-桃仁、川芎-茯苓等, 提示组方需注意活血化瘀、行气、利水渗湿药物之间的配伍组合。

中药汤剂在临床使用过程中, 常根据患者自身症状随症加减, 体现中医辨证施治的特点。例如, 对于祛瘀通络方增加方中地龙和红花的含量可以提高对视网膜出血患者的治疗效果<sup>[32]</sup>, 而对于水肿明显的患者, 则可以使用黄斑消肿方并增加茯苓和猪苓的含量。在临床应用中, 中药方剂很少单独使用, 常与抗 VEGF 药物联合应用以取得更好的治疗效果。例如, 加味桃红四物汤与康

柏西普联合使用, 疗效显著提升, 临床总有效率从 75.56% 提升至 92.00%<sup>[33]</sup>。

近年来研究者们对中药复方也展开了部分实验研究, 结果表明中药复方对于 IL-6、IL-8、缺氧诱导因子 1 $\alpha$ 、VEGF 以及 Janus 激酶蛋白 2、磷酸化 Janus 激酶蛋白 2 的蛋白表达具有下调作用<sup>[34]</sup>, 其对于眼表炎症和局部缺氧缺血的状态都有一定的改善作用。

## 2.2 中成药

随着科技的不断进步, 治疗 BRVO 及继发 ME 的中成药制剂不断出现, 具有方便、易用、价格相对较低等优点。经过分析发现中成药组方形式主要有三种: 复方中药制剂、单味药中药制剂、中西医复方制剂。

复方中药制剂在中成药中所占比例最大, 组方遵循传统的“君臣佐使”原则, 中成药在组方和治疗上偏向于调节身体肝肾功能, 通过祛瘀化痰辨证治疗 BRVO 及继发 ME。绝大部分药物通过口服给药, 存在片剂、丸剂、胶囊剂、颗粒剂、注射剂等多种剂型。值得注意的是, 注射剂本身具有高风险特征, 因此在中药注射液的应用过程中, 应在中医药理论的指导下, 辨证用药。目前已上市治疗 BRVO 的中成药有复方血栓通胶囊、益脉康胶囊等, 临床也常采用治疗糖尿病视网膜病变和凉血化瘀类药物作为替代药物, 如芪明颗粒<sup>[35]</sup>和血明目片<sup>[36]</sup>等。经过文献汇总分析发现, 中成药处方中所含药物多为活血化瘀类药物, 性味多以甘寒类药物居多, 决明子、枸杞子、当归、菊花等药物在中成药的组方中出现频率较高, 这可为我们进一步研发新药提供基础。

丹参注射液为单味中药组成的中成药, 临床研究显示其可以有效改善患者视网膜血液循环和血液高凝状态, 从而缓解细胞缺氧状态, 起到保护视网膜细胞, 维持血管内皮细胞正常生理状态的功能<sup>[37]</sup>。银杏叶滴丸有效成分为银杏叶总黄酮苷、银杏萜内酯, 是中药银杏叶提取物, 具有抗氧化、抗血栓、抗血小板聚集的功能, 可以显著降低血液黏度, 改善视网膜微循环, 临床与康柏西普联用可有效改善患者视力水平, 临床总有效率显著提高<sup>[35]</sup>。复方樟柳碱注射液、银杏达莫注射液属于中西医复方制剂, 均具有视网膜处血液微循环, 缓解细胞氧化应激反应的功能<sup>[38]</sup>。但目前中西医复方制剂的相互作用机制并不明确, 因此在使用过程中应谨慎、合理用药。

## 3 小结与展望

BRVO 的发病率相对较高, 全球有 1600 多万人受其影响。目前, 抗 VEGF 药物、糖皮质激素类药物和中药复方等是常用的 BRVO 治疗药物。然而, 这些治疗药物普遍存在疗效单一、易复发等问题。眼内注射使得 Rho 相关激酶抑制剂具有更高的特异性和更低的不良反应发生率。尽管 Rho 相关激酶在 BRVO 病理中扮演着重要的角色, 但其抑制剂的疗效和安全性尚未完全确定, 因此需要更多的临床试验来验证其治疗效果。

眼部独特的生理结构使得药物在眼后端递送困难, 即便采用眼内注射方式, 也难以达到长期治疗效果。因此, BRVO 的治疗策略还需进一步深入探索以更好地满足临床需求。目前针对 BRVO 药物的研究集中在将抗 VEGF 药物与纳米材料结合, 以实现药物在体内精准递送至病变部位。尽管相关研究已经取得一定进展, 但大部分仍处于实验室研究阶段, 离临床应用还需要更多深入的研究和验证。未来药物研发的方向应充分借助新兴技术, 如基因治疗和纳米技术, 以提升治疗的精准度和效能; 加强对潜在药物靶点的深入研究, 以开发更为精确和有针对性的治疗方法。

## 参考文献

- [1] 唐同心, 杜允宏. 视网膜分支静脉阻塞研究进展 [J]. 泰山医学院学报, 2018, 39 (11): 1317-1320.
- [2] Liu H, Ma Y, Xu HC, et al. Updates on the management of ocular vasculopathies with VEGF inhibitor conbercept [J]. *Curr Eye Res*, 2020, 45 (12): 1467-1476.
- [3] Cehofski LJ, Kruse A, Alsing AN, et al. Intravitreal bevacizumab upregulates transthyretin in experimental branch retinal vein occlusion [J]. *Mol Vis*, 2018, 24: 759-766.
- [4] Azhar Mn, Muzaffar W, Arain Ma, et al. Intravitreal bevacizumab (IVB) for macular edema secondary to branch retinal vein occlusion (BRVO) [J]. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2018, 28 (10): 758-761.
- [5] Pidro A, Leparo O, Nisc F, et al. Short-term and long-term results after intravitreal bevacizumab therapy for macular oedema in branch retinal vein occlusion [J]. *Rom J Ophthalmol*, 2022, 66 (1): 22-26.
- [6] Lee A, Shirley M. Ranibizumab: a review in retinopathy of prematurity [J]. *Paediatr Drugs*, 2021, 23 (1): 111-117.
- [7] Noma H, Yasuda K, Shimura M. Change of cytokines after intravitreal ranibizumab in patients with recurrent branch retinal vein occlusion and macular edema [J]. *Eur J Ophthalmol*, 2021, 31 (1): 204-210.
- [8] Liberski S, Wichrowska M, Kocięcki J. Aflibercept versus faricimab in the treatment of neovascular age-related macular degeneration and diabetic macular edema: a re-



- view [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (16): 9424.
- [9] Mitamura Y, Enkhmaa T, Sano H, et al. Changes in choroidal structure following intravitreal aflibercept therapy for retinal vein occlusion [J]. *Br J Ophthalmol*, 2021, 105 (5): 704-710.
- [10] Kaya F, Kocak I, Aydin A, et al. Effect of aflibercept on persistent macular edema secondary to central retinal vein occlusion [J]. *J Fr Ophtalmol*, 2018, 41 (9): 809-813.
- [11] Scott Iu, Vanveldhuisen PC, Ip MS, et al. Effect of bevacizumab vs aflibercept on visual acuity among patients with macular edema due to central retinal vein occlusion: the SCORE2 randomized clinical trial [J]. *JAMA*, 2017, 317 (20): 2072-2087.
- [12] Wang B, Fang SF, Chen L. Intravitreal injection of conbercept combined with retinal photocoagulation on macular edema secondary to branch retinal vein occlusion [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19 (6): 3537-3542.
- [13] 乔建治, 梁莉, 孙洪周. 玻璃体腔注射康柏西普及继发 ME-ME 的疗效及治疗后 BCVA 的影响因素分析 [J]. *国际眼科杂志*, 2019, 19 (8): 1365-1369.
- [14] Huang YK, Linghu ML, Hu WW, et al. Conbercept improves macular microcirculation and retinal blood supply in the treatment of nonischemic branch retinal vein occlusion macular edema [J]. *J Clin Lab Anal*, 2022, 36 (12): e24774.
- [15] 夏建平. 康柏西普治疗视网膜静脉阻塞继发黄斑水肿的研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2019.
- [16] Fogli S, Del Rem, Rofi E, et al. Clinical pharmacology of intravitreal anti-VEGF drugs [J]. *Eye (Lond)*, 2018, 32 (6): 1010-1020.
- [17] Puddu A, Sanguineti R, Traverso CE, et al. Response to anti-VEGF-A treatment of endothelial cells in vitro [J]. *Exp Eye Res*, 2016, 146: 128-136.
- [18] 明静, 谢立科, 秦睿. 视网膜分支静脉阻塞继发黄斑水肿的治疗进展 [J]. *眼科新进展*, 2020, 40 (9): 879-884.
- [19] Vinkovic M, Bosnar D, Tedeschi RE, et al. combined treatment with bevacizumab and triamcinolone acetonide for macular edema due to retinal vein occlusion [J]. *Acta Clin Croat*, 2020, 59 (4): 569-575.
- [20] 陈王灵, 劳伟, 陈运信, 等. 后 Tenon 囊下注射曲安奈德对缺血性视网膜静脉阻塞黄斑水肿患者黄斑中心凹厚度的影响 [J]. *广东医学*, 2019, 40 (23): 3318-3321.
- [21] Nirbhavane P, Sharma G, Singgh B, et al. Triamcinolone acetonide loaded-cationic nano-lipoidal formulation for uveitis: evidences of improved biopharmaceutical performance and anti-inflammatory activity [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2020, 190: 110902.
- [22] 冼志林, 梁琦晨, 袁洋行, 等. 地塞米松玻璃体内植入剂 Ozurdex 治疗视网膜静脉阻塞继发黄斑水肿的研究进展 [J]. *眼科新进展*, 2020, 40 (3): 296-300.
- [23] Pielen A, Feltgen N, Isserstedt C, et al. Efficacy and safety of intravitreal therapy in macular edema due to branch and central retinal vein occlusion: a systematic review [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (10): e78538.
- [24] Du X, Sheng YJ, Shi YQ, et al. The efficacy of simultaneous injection of dexamethasone implant and ranibizumab into vitreous cavity on macular edema secondary to central retinal vein occlusion [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 842805.
- [25] Kaldirim HE, Yazgan S. A comparison of three different intravitreal treatment modalities of macular edema due to branch retinal vein occlusion [J]. *Int Ophthalmol*, 2018, 38 (4): 1549-1558.
- [26] Mateos-Olivares M, García-Onrubia L, Valentín-Bravo FJ, et al. Rho-kinase inhibitors for the treatment of refractory diabetic macular oedema [J]. *Cells*, 2021, 10 (7): 1683.
- [27] Freiberg JC, Spreckelsen AV, Kolko M, et al. Rho kinase inhibitor for primary open-angle glaucoma and ocular hypertension [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2022, 6 (6): CD013817.
- [28] Ren R, Humphrey AA, Kopczynski C, et al. Rho kinase inhibitor AR-12286 reverses steroid-induced changes in intraocular pressure, effective filtration areas, and morphology in mouse eyes [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2023, 64 (2): 7.
- [29] 左韬, 赵磊, 张祝强, 等. 渗湿明目疗法治疗视网膜分支静脉阻塞型黄斑水肿研究 [J]. *辽宁中医杂志*, 2016, 43 (11): 2326-2329, 2461.
- [30] 郝晓凤, 谢立科, 胥静, 等. 祛积通络方对 RVO 大鼠视网膜 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF mRNA 表达的影响 [J]. *中国中医眼科杂志*, 2020, 30 (11): 767-771.
- [31] 朱成义, 李冬, 伊琼, 等. 黄斑消肿方联合雷珠单抗治疗气滞血瘀型视网膜分支静脉阻塞黄斑水肿的临床疗效 [J]. *北京中医药*, 2022, 41 (7): 786-790.
- [32] 郝晓凤, 谢立科, 胥静, 等. 祛积通络方联合抗 VEGF 药物对黄斑微血管损伤修复的疗效观察 [J]. *中国中医眼科杂志*, 2021, 31 (2): 94-99.
- [33] 解云, 施丽, 袁媛. 加味桃红四物汤联用玻璃体腔注射康柏西普干预 BRVO 继发黄斑水肿的疗效分析 [J]. *贵州医药*, 2021, 45 (4): 577-578.
- [34] 王佐梅, 肖洪彬, 李雪莹, 等. 桃红四物汤的药理作用研究进展 [J]. *现代中医药*, 2021, 41 (2): 22-28.
- [35] 董照阳, 胡欣欣, 陈茜, 等. 基于网络药理学及分子对接探讨芪明颗粒治疗糖尿病视网膜病变的作用机制 [J]. *中国中医眼科杂志*, 2021, 31 (11): 825-831.
- [36] 吴勤, 朱卫星, 杨春林. 和血明目片联合雷珠单抗治疗 RVO 伴黄斑水肿的临床研究 [J]. *中外医学研究*, 2022, 20 (27): 131-134.
- [37] 李亚坤, 刘志强, 郭向东, 等. 丹参注射液离子导入治疗视网膜静脉阻塞的疗效 [J]. *国际眼科杂志*, 2022, 22 (10): 1698-1701.
- [38] 张贺鹏, 李跃峰, 韩莎莎, 等. 银杏叶滴丸联合康柏西普注射液治疗非缺血型 BRVO 继发 ME 的临床观察 [J]. *中国中医眼科杂志*, 2021, 31 (11): 803-807.

(收稿日期: 2023-12-09; 修回日期: 2024-03-20)

# 钩藤碱治疗阿尔茨海默病的药理作用研究进展

张阳, 朱梦宇, 陈垒\*, 邝莹\* (赣南医科大学, 江西 赣州 341000)

**摘要:** 阿尔茨海默病 (AD) 是一种常发于老年人的神经退行性疾病, 发病机制复杂, 且治疗药物有限, 给社会造成了巨大负担。钩藤碱是从中药钩藤中分离得到的一种吲哚类生物碱, 具有显著的神经药理作用, 可通过多种机制发挥抗 AD 治疗作用。本文首先对 AD 可能的发病机制进行总结, 深化对 AD 发病机制的认识, 为 AD 药物开发提供潜在的治疗靶点; 同时, 也对钩藤碱的神经药理作用进行综述, 为以钩藤碱为先导化合物的抗 AD 药物开发提供新思路。

**关键词:** 阿尔茨海默病; 病理机制; 钩藤碱; 药理作用

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)08-2149-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.029

## Research progress in the pharmacology of rhynchophylline for Alzheimer's disease

ZHANG Yang, ZHU Meng-yu, CHEN Lei\*, KUANG Ying\* (Gannan Medical University, Ganzhou Jiangxi 341000)

**Abstract:** Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease that often occurs in the elderly. Its pathogenesis is complex and treatment drugs are limited, which causes a huge burden to the society. Rhynchophylline is an indole alkaloid isolated from *Uncaria rhynchophylla*, which has remarkable neuropharmacological and anti-AD therapeutic effects via various mechanisms. This paper summarized the pathogenesis of AD in recent years, and proposed potential therapeutic targets for AD drug development. At the same time, the neuropharmacological action of rhynchophylline was reviewed to provide new ideas for the development of anti-AD drugs with rhynchophylline as the leading compound.

**Key words:** Alzheimer's disease; pathogenesis; rhynchophylline; pharmacological effect

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种常见的导致大脑细胞退化的神经退行性疾病, 是造成老年痴呆的主要原因, 其典型特征是个人日常活动中思维能力、语言能力和独立能力下降<sup>[1]</sup>。目前全球大约有 5000 万 AD 患者, 预计到 2050 年这一数字将增至 1.52 亿人<sup>[2]</sup>。AD 的主要病理特征包括  $\beta$  淀粉样蛋白 (amyloid  $\beta$ , A $\beta$ ) 沉积形成的老年斑、tau 蛋白过度磷酸化形成的神经原纤维缠结、神经炎症和氧化应激等<sup>[3]</sup>。由于发病机制不明确, 目前尚无能够根治 AD 的药物, 临床上主要采用“对症治疗”策略, 通过胆碱酯酶抑制剂 (多奈哌齐等)、N-甲基-D-天冬氨酸

(N-methyl-D-aspartic acid, NMDA) 受体拮抗剂 (美金刚) 和脑代谢复活剂 (尼麦角林等) 等疗法来改善患者的认知功能, 缓解病情<sup>[4]</sup>。因此, 阐明 AD 发病机制, 揭示其潜在的治疗靶点, 并以此寻找有效的治疗药物迫在眉睫。

生物碱作为一类重要的天然产物, 其结构复杂, 功能多样, 对中枢神经系统具有多种药理作用。部分生物碱类药物已被用于临床治疗 AD, 如胆碱酯酶抑制剂加兰他敏<sup>[5]</sup>。钩藤是我国一种重要的药用资源, 为钩藤属植物的干燥带钩茎枝, 具有息风定惊、清热平肝的功效, 对中枢神经系统疾病和心血管疾病具有显著的治疗作

基金项目: 国家自然科学基金地区项目 (No.82260803)。

作者简介: 张阳, 男, 硕士研究生, 主要从事中药抗炎与免疫药理学研究, email: yy489304842@163.com \*通信作者: 陈垒, 男, 博士, 主要从事中药抗炎与免疫药理学研究, email: kuangsunlight@163.com; 邝莹, 女, 博士, 主要从事神经生物学研究, email: kuangying199304@163.com

用<sup>[6]</sup>。钩藤碱是从钩藤中提取出的一种代表性吲哚类生物碱，是钩藤主要的药效物质。此外，钩藤中的另一种有效物质异钩藤碱与钩藤碱互为同分异构体，在体内钩藤碱和异钩藤碱可相互转化<sup>[7]</sup>。大量研究证实，钩藤碱对 AD 具有显著的神经保护作用，可通过多种机制发挥抗 AD 治疗作用。我国对钩藤碱的提取和应用具有天然优势，从钩藤中提取钩藤碱或化学合成钩藤碱的方法均已得到开发<sup>[8]</sup>。本文将系统介绍 AD 的发病机制，并对钩藤碱和异钩藤碱治疗 AD 的药理作用进行综述，以期对 AD 药物开发和治疗提供新思路。

## 1 AD 发病机制

### 1.1 A $\beta$ 假说

AD 的进展总是伴随 A $\beta$  沉积导致的老年斑的形成，但 A $\beta$  是否是导致 AD 的病因之一还存在疑点。一方面一篇发表在 Nature 上的“A $\beta$  假说”领域的重要开创性论文存在学术造假，许多基于 A $\beta$  的研究效果甚微；另一方面 FDA 批准上市的 A $\beta$  抗体药物 Lecanemab 已显示出有效性。对 A $\beta$  药物的评价应基于其对  $\beta$ -淀粉样蛋白的清除率和对 AD 症状的改善作用综合判断。A $\beta$  由  $\beta$ -淀粉样蛋白前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 顺序水解而得<sup>[9]</sup>，是一种主要存在于神经元上的大型 I 型跨膜蛋白，具有两个不同的结合位点，能分别结合  $\alpha$ -分泌酶和  $\beta$ -分泌酶。 $\alpha$ -分泌酶将 APP 切割后得到 C 端片段 C83， $\beta$ -分泌酶切割后得到 C 端片段 C99，接下来  $\gamma$ -分泌酶结合到 C99，进一步将其切割产生 A $\beta$  肽 (见图 1)<sup>[10]</sup>。A $\beta$  肽是可溶性物质，能通过晚期糖基化终产物受体 (the receptor of advanced glycation endproducts, RAGE) 和低密度脂蛋白受体相关蛋白 1 (low-density lipoprotein receptor-related protein 1, LRP1) 等途径转移出大脑<sup>[11-12]</sup>。当 A $\beta$  的产生与转移失衡后，A $\beta$  在脑内浓度增加，可形成斑块沉积和低聚体<sup>[13]</sup>。A $\beta$  低聚体能引起 Ca<sup>2+</sup> 内流紊乱，导致神经元活力下降甚至死亡。沉积的 A $\beta$  斑块和低聚体可与生物膜结合后破坏生物膜的正常生理功能<sup>[14]</sup>，还能够与多种模式识别受体结合激活小胶质细胞，使其释放多种炎症因子诱导炎症损伤。小胶质细胞和星形胶质细胞释放的凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein, ASC) 与 A $\beta$  形成复合物后，再与邻近小胶质细胞/星形胶质细胞 NOD 样受体蛋白热蛋白结构域蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) 结合形成炎症小体。与 ASC 相比，ASC-

A $\beta$  会放大促炎反应，并导致细胞焦亡<sup>[15-16]</sup>。因此，抑制  $\beta$ -分泌酶和  $\gamma$ -分泌酶的活性，减少 A $\beta$  的产生，增加 A $\beta$  的清除，抑制 A $\beta$  诱导的神经损伤，并以 AD 症状改善为参考，可作为治疗 AD 和药物开发的方向。

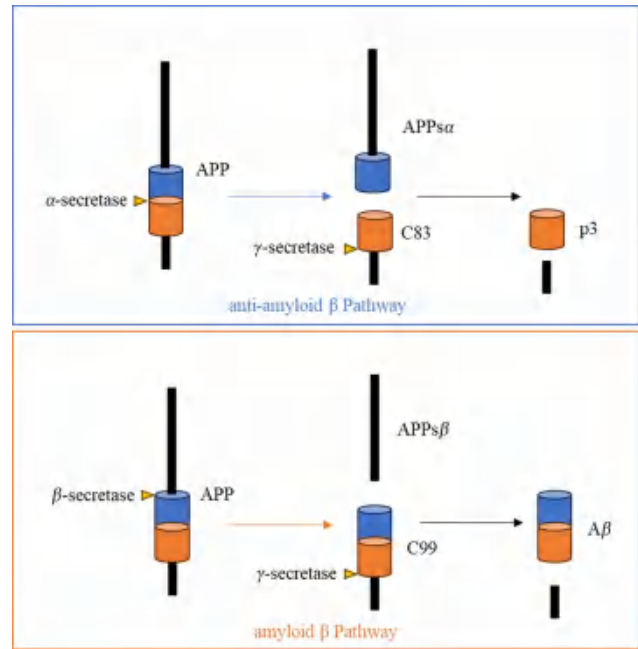


图 1 APP 的两种水解途径

Fig 1 Two hydrolysis pathways of APP

### 1.2 tau 蛋白

tau 蛋白是一种微管相关蛋白 (microtubule-associated protein tau, MAPT)，在轴突中将微管蛋白聚合为微管并维持其稳定性，能够维持复杂的神经元细胞微结构并负责细胞内物质运输，是神经元细胞骨架的重要组成部分<sup>[17-18]</sup>。在病理条件下，tau 蛋白被糖原合成酶激酶-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) 及其调节因子 c-Jun 末端激酶 (JNK)、细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶-5 (Cdk5)、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 等激酶过度磷酸化<sup>[19]</sup>，影响其结合微管蛋白和促进微管组装的能力，最终导致细胞骨架崩溃、细胞活力丧失和死亡<sup>[20]</sup>。在 AD 小鼠模型中，能观察到 A $\beta$  和 tau 蛋白的关联性：A $\beta$  可以加速 tau 蛋白的聚集，而 tau 蛋白表达的减少可以削弱 A $\beta$  诱导的神经元功能障碍<sup>[21]</sup>。tau 蛋白相关药物的开发方向主要以抑制诱导过度磷酸化的激酶为主。

### 1.3 神经炎症

研究表明，神经炎症也是诱发 AD 退行性病变的一个关键因素。早期研究主要集中在小胶质细胞介导的固有免疫应答方面。作为中枢神经系统的固有免疫细胞，小胶质细胞在大脑监测和稳



态中发挥着重要作用。生理条件下，小胶质细胞具有免疫监视和神经营养作用。当小胶质细胞受到病原相关分子刺激时，则会分泌大量炎症介质和神经毒性物质，致使神经元损伤和凋亡，损害机体认知功能。全身炎症反应产生的炎症因子浸润或脑内病理相关的  $A\beta$  和 tau 蛋白等异常蛋白可通过模式识别受体刺激并激活小胶质细胞，活化后的小胶质细胞释放大白细胞介素 (IL) -1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、干扰素  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和 IL-6 等促炎细胞因子和神经毒性物质，加剧周围神经元的损伤<sup>[22]</sup>。活化的小胶质细胞还会合成组织蛋白酶 B 等水解酶来破坏细胞外基质导致神经元功能障碍。受损或死亡的神经元也会释放内源性损伤相关分子进一步刺激小胶质细胞，最终导致长期炎症和神经退行性病变<sup>[23]</sup>。此外，TNF- $\alpha$  能增强  $\beta$ -分泌酶和  $\gamma$ -分泌酶的活性，IL-1 和 IL-6 能增加 APP 的表达，导致大脑内产生更多的  $A\beta$ 。IL-1、IL-6 还分别通过 MAPK 途径和 CDK5 途径诱导 tau 蛋白过度磷酸化<sup>[24]</sup>。

大量研究证实 T 细胞介导的适应性免疫应答对神经炎症反应也具有重要的调控作用。根据表型和功能，CD4<sup>+</sup> T 细胞可分为辅助性 T 细胞 (helper T cell, Th) 和调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg)。其中 Th1 和 Th17 是主要的效应 T 细胞亚群，常诱导中枢炎症的产生。调节性 T 细胞则能抑制机体过度免疫应答，发挥抗炎或神经修复作用。生理条件下，Th 和 Treg 处于动态平衡以维持机体免疫稳态。而病理条件下， $A\beta$  和 tau 等自身抗原可诱导 Th 大量激活，Treg 减少，打破中枢免疫平衡，从而促发或加剧神经炎症反应<sup>[25]</sup>。Th1 细胞释放 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  促进小胶质细胞活化，小胶质细胞也通过提呈自身抗原诱导更多 Th 分化。Th1 细胞还可通过激活 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞介导细胞毒作用，诱导神经元凋亡<sup>[26]</sup>。Th17 细胞及其细胞因子 IL-1、IL-6 会损害血脑屏障的完整性，促进外周淋巴细胞浸润。IL-17a 对神经元和血脑屏障具有直接毒性，并能够募集中枢神经系统中性粒细胞的浸润，激活中性粒细胞产生更多的 IL-17a，最终导致病情逐步恶化<sup>[27]</sup>。实验发现，用  $A\beta$  反应性 TefFs 处理 APP/PS1 小鼠会加剧小鼠记忆障碍和神经炎症，小胶质细胞活性上升和  $A\beta$  负荷增加，Treg 细胞数量减少<sup>[28]</sup>。而过继转移体外扩增培养的  $A\beta$  特异性 Treg 细胞能有效抑制 AD 转基因小鼠的神经炎症，并改善其记忆和认知功能<sup>[29]</sup>。因此，调节 TefFs/Treg 的平衡，能有效延缓 AD 患者的病理进程。参与调控 CD4<sup>+</sup> T 细胞的转录因子和炎症介质如表 1 所示。

表 1 CD4<sup>+</sup> T 细胞亚群在神经炎症中的作用  
Table 1 Role of subpopulations of CD4<sup>+</sup> T cells in the neuroinflammation

细胞种类	调控相关转录因子	自身分泌炎症介质	对神经炎症的影响
Th1	STAT4、T-bet	IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2	促进小胶质细胞活化、激活 CD8 <sup>+</sup> T 淋巴细胞介导的细胞毒作用、诱导神经元凋亡
Th17	STAT3、ROR $\gamma$ t	IL-1、IL-6、IL-17a、IL-22	对神经元具有直接毒性、损害血脑屏障的完整性、募集中枢神经系统中性粒细胞的浸润
Treg	Foxp3	IL-10、TGF- $\beta$	上调免疫抑制功能、控制或逆转神经炎症

#### 1.4 氧化应激

氧化应激也参与了神经元损伤和 AD 退行性病变过程。神经元受到损伤刺激后，诱导氧化作用与抗氧化能力失衡，抗氧化酶活性改变或耗竭，从而导致大量活性氧自由基 (ROS) 的累积。此外，活化的小胶质细胞为介导炎症反应，通过呼吸爆发大量生成氧自由基。ROS 主要在线粒体生成，大量线粒体 ROS 可以破坏线粒体膜电位，并进一步加速 ROS 的产生。当线粒体内 ROS 增加到一定程度后导致其他细胞器受累，最终导致蛋白和质膜发生过度氧化<sup>[30]</sup>。ROS 可影响细胞的正常代谢，导致  $A\beta$  累积增加和 tau 蛋白的过度磷酸化。 $A\beta$  也可以通过与线粒体膜结合来加速 ROS 的产生，改变线粒体功能，最终导致细胞能量代谢异常，诱导神经元凋亡和突触功能丧失，发生进行性退变<sup>[31]</sup>。核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 是对抗氧化应激的主要调节因子，被认为是一个有吸引力的 AD 治疗靶点<sup>[32]</sup>。Nrf2 激活后从细胞质转移到细胞核，调控数个抗氧化基因转录，产生包括醌氧化还原酶 (quinone oxidoreductase 1, NQO1) [如 NAD (P) H]、谷胱甘肽-S-转移酶 (glutathione-S-transferases, GSTs) 等产物对抗氧化应激<sup>[33-34]</sup>。一项关于 Nrf2 的研究发现，Nrf2 存在于正常海马神经元的细胞核和细胞质中，并且在细胞核中的丰度更大。然而，在 AD 患者中，Nrf2 仅存在于细胞质中，这表明 AD 患者大脑中 Nrf2 活性降低<sup>[35]</sup>。

#### 1.5 胆碱能学说

研究发现，早期 AD 患者就伴随着基底前脑胆碱能神经元的退行性病变，出现大量胆碱能神经元丢失。患者的记忆丧失程度和胆碱能突触功能缺失密切相关，如乙酰胆碱受体下调，乙酰胆碱合成减少等均显著影响患者的记忆功能<sup>[36]</sup>。乙酰胆碱受体一般分为两类：烟碱乙酰胆碱受体

(nicotinic acetylcholine receptor, nAChR) 和毒蕈碱型乙酰胆碱受体 (muscarinic acetylcholine receptors, mAChR)。A $\beta$  对 nAChR 产生的作用与脑内 A $\beta$  的浓度有关。生理条件下, 低浓度 A $\beta$  激活 nAChR。而在病理环境下, A $\beta$  浓度增加形成斑块沉积和低聚体时, 这种作用则被逆转, 并导致受体抑制和胆碱能缺失<sup>[37]</sup>。另外, nAChR 与细胞膜特性密切相关, 其跨膜结构域与周围脂质广泛接触。因此, nAChR 功能也受其脂质微环境的影响。APP 加工成 A $\beta$  的过程改变了细胞膜的结构, 同时也可能改变了 nAChR 的位置和功能<sup>[38]</sup>。胆碱酯酶抑制剂是目前临床获批最多的 AD 治疗药物, 例如盐酸多奈哌齐, 在治疗早期 AD 患者尤其是改善记忆认知方面效果非常显著<sup>[5]</sup>。目前从天然产物中寻找高靶向性、高选择性、低毒副作用的胆碱酯酶抑制剂依旧是抗 AD 药物开发的一个重要方向。

### 1.6 神经兴奋性损伤

NMDA 受体是人脑中的关键受体之一, 在海马体、纹状体、大脑皮层和杏仁核中密度极高。NMDA 受体数量与联想记忆、学习和突触强度密切相关。NMDA 与突触外 NMDA 受体结合引起 Ca<sup>2+</sup> 内流, 产生兴奋性动作电位, NMDA 受体过度兴奋可导致衰老大脑的神经可塑性受损和认知缺陷<sup>[39]</sup>。有研究发现, tau 蛋白在 NMDA 受体突触传递过程中发挥了重要作用。tau 蛋白能与一种 Src 酪氨酸激酶 Fyn 结合, 形成 tau-Fyn, tau-Fyn 能定位并磷酸化突触后膜外 NMDA 受体上的 GluN2B 位点, 这种磷酸化促进了 NMDA 受体和 PSD95 的相互作用, 并激活 NMDA 受体。而磷酸化的 tau 蛋白与 Fyn 结合后会增强该激酶的活性, 最终导致 NMDA 受体过度兴奋<sup>[40]</sup>。NMDA 受体拮抗剂 (美金刚) 也是临床治疗 AD 的药物之一。

## 2 钩藤碱的抗 AD 药理作用

### 2.1 钩藤碱的神经保护作用

钩藤碱及其同分异构体异钩藤碱具有显著的神经保护作用, 能抑制神经元的非正常凋亡。Zheng 等<sup>[41]</sup> 使用 LY294002 (一种 PI3K 选择抑制剂), 在 1-甲基-4-苯基吡啶 (MPP<sup>+</sup>) 处理的 PC12 细胞中, 其能阻断钩藤碱引起的 Bax 和 caspase-3 减少和 Bcl-2 增加, LY294002 还有效抑制了钩藤碱引起的 Akt 磷酸化, 这表明钩藤碱通过激活 PI3K/Akt 信号通路发挥神经保护作用。

异钩藤碱也有神经保护作用。异钩藤碱通过下调海马 Bcl-2/Bax、caspase-3 和 caspase-9 的蛋白和 mRNA 水平, 以及抑制 tau 蛋白 Ser396、Ser404 和

Thr205 位点的过度磷酸化, 减弱了 A $\beta$ <sub>25-35</sub> 诱导的神经元凋亡<sup>[42]</sup>。进一步研究表明, 异钩藤碱可以通过作用 PI3K 或 PI3K/Akt 信号通路, 加强 Akt 的磷酸化, 对 GSK-3 $\beta$  产生抑制作用。GSK-3 $\beta$  表达下调后, 脑内 tau 蛋白过度磷酸化和细胞凋亡减少。该结果表明, GSK-3 $\beta$  活性的下调和 PI3K/Akt 信号通路的激活与异钩藤碱的神经保护密切相关<sup>[43]</sup>。

### 2.2 钩藤碱对 A $\beta$ 和 tau 蛋白的作用

在 APP/PS1 小鼠中观察到淀粉样斑块在大脑皮层和海马中积聚, 而钩藤碱给药后显著降低了两个大脑区域淀粉样斑块的总面积, 且显著降低了 APP/PS1 小鼠大脑皮层中 A $\beta$  的可溶性组分, 大脑皮层中可溶性 A $\beta$ <sub>1-40</sub> 和 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 水平相比对照组, 含量分别减少约 30% 和 20%<sup>[43]</sup>。大鼠海马注射 A $\beta$ <sub>25-35</sub> 诱导空间记忆障碍、神经元凋亡和 tau 蛋白过度磷酸化。使用异钩藤碱治疗 21 d 可显著改善 A $\beta$ <sub>25-35</sub> 诱导的大鼠认知缺陷。钩藤碱和异钩藤碱都能减少脑内 A $\beta$  和 tau 的聚集<sup>[42]</sup>。钩藤碱和异钩藤碱都能减少脑内 A $\beta$  和 tau 的聚集。Kim 等<sup>[44]</sup> 通过组织学和硫黄素 T (ThT) 染色显示, 在 3xTg 小鼠中, 钩藤碱可以调节 A $\beta$  和 tau 的聚集和解离。异钩藤碱可减少 TgCRND8 小鼠大脑皮层和海马中 A $\beta$  的沉积, 通过抑制 A $\beta$  诱导的 JNK 信号通路的激活, 降低 TgCRND8 小鼠大脑中 c-Jun 和 JNK 的磷酸化水平, 从而抑制小胶质细胞和星形胶质细胞的激活<sup>[45]</sup>。

### 2.3 钩藤碱对神经炎症的调节

小胶质细胞的过度激活导致炎症细胞因子的产生增加, 从而导致神经炎症。研究发现, 钩藤碱给药能显著减少 APP/PS1 小鼠中 A $\beta$  斑块相关性小胶质细胞的数量; 钩藤碱给药导致 *Spp1*、*Gpnmb* 和 *Itgax* 三种炎症相关基因的转录水平降低<sup>[42]</sup>。Song 等<sup>[46]</sup> 研究发现脂多糖 (LPS) 能刺激小胶质细胞产生促炎介质, 而钩藤碱给药后能显著降低 LPS 激活的小胶质细胞中炎症介质一氧化氮 (NO)、前列腺素 E2 (PGE2)、单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)、TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的水平。此外, 异钩藤碱给药 40 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup> 能抑制小胶质细胞和星形胶质细胞的活化, 降低 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  的水平<sup>[47]</sup>。钩藤碱还可显著改善 1-(2, 5-二甲氧基-4-碘代苯基)-2-氨基丙烷 (DOI) 诱导的秽语综合征 (TS) 模型大鼠的行为变化, 降低 TS 大鼠纹状体和血清中 IL-6、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的水平, 抑制 TS 大鼠纹状体 TLR/NLRP3/NF- $\kappa$ B 信号蛋白通路的激活<sup>[48]</sup>。



## 2.4 钩藤碱对氧化应激的调节

研究显示,小鼠腹腔注射钩藤碱可以降低小鼠额叶皮层和海马中 ROS 和丙二醛 (MDA) 的含量,上调谷胱甘肽 (GSH) 水平,从而减轻  $A\beta_{1-42}$  诱导的氧化应激反应,改善小鼠认知障碍。钩藤碱还能恢复  $A\beta_{1-42}$  处理组小鼠额叶皮层和海马中 Nrf2 及其下游蛋白血红素加氧酶 -1 (HO-1)、NQO1 [如 NAD (P) H] 和重组谷氨酸 - 半胱氨酸连接酶修饰亚基 (GCLM) 的表达<sup>[49]</sup>。Xian 等<sup>[42]</sup>用异钩藤碱治疗  $A\beta_{25-35}$  诱导的 PC12 细胞神经毒性,结果显示异钩藤碱显著提高了 PC12 细胞的细胞活力,降低了细胞内 ROS 和 MDA 的水平,提高了 GSH 的水平,并稳定了线粒体膜电位。这些证据表明钩藤碱可以缓解氧化应激和维持代谢稳态。

## 2.5 钩藤碱对 AD 的其他作用

酪氨酸蛋白激酶 A4 受体 (ephrin A4 receptor, EphA4) 是酪氨酸蛋白激酶家族成员,是神经元突触后膜的重要细胞表面受体。EphA4 主要在成年海马中表达,可抑制神经传递和突触可塑性。研究表明,在多种神经退行性疾病中,EphA4 会阻

碍轴突再生<sup>[50]</sup>。 $A\beta$  低聚体可以激活海马神经元中的 EphA4,使 EphA4 信号在 APP/PS1 小鼠模型的海马中过表达<sup>[2]</sup>。而有研究证实,钩藤碱是 AD 新靶点 EphA4 的有效抑制剂。Fu 等<sup>[51]</sup>研究揭示了 EphA4 在介导 AD 海马突触功能障碍中的调控作用,并证明阻断 EphA4 的配体结合结构域可逆转 AD 小鼠模型中的突触损伤。而钩藤碱作为一种新型 EphA4 抑制剂,能够有效阻断海马神经元中的 EphA4 依赖性信号传导,降低 APP/PS1 小鼠海马中的 EphA4 活性。更值得一提的是,钩藤碱给药后恢复了 AD 转基因小鼠模型中受损的海马功能。

有研究表明,钩藤碱也能抑制  $A\beta_{1-42}$  诱导的大鼠突触外 NMDA 受体过度激活,下调突触外 NMDA 受体的  $Ca^{2+}$  过载,改善大鼠的空间学习和记忆功能<sup>[52]</sup>。Kang 等<sup>[53]</sup>发现钩藤碱和异钩藤碱本身不能诱导膜电流,但它们能以浓度依赖性方式可逆地降低 NMDA 诱导的电流。钩藤碱和异钩藤碱作为 NMDA 受体的非竞争性拮抗剂,可用于神经保护,治疗 AD。

钩藤碱对 AD 的药理作用研究结果总结见表 2。

表 2 钩藤碱抗 AD 的药理作用机制

Tab 2 Pharmacological effects mechanism of rhynchophylline for AD

作用机制	动物/细胞模型	目标靶点	文献
神经保护作用	PC12 细胞	Bcl-2、Bax、caspase-3	[41]
减少脑内 $A\beta$ 含量	APP/PS1 小鼠	$A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$	[43]
调节神经炎症	APP/PS1 小鼠	<i>Spp1</i> 、 <i>Gpnmb</i> 和 <i>Itgax</i> 三种炎症相关基因, NO、PGE2、MCP-1、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 等炎症介质	[43, 46-47]
调节氧化应激	$A\beta_{1-42}$ 小鼠	MDA、GSH、HO-1、NQO1、GCLM	[49]
保护神经突触	APP/PS1 小鼠	EphA4	[50-51]

## 3 结语

综上所述,AD 是一种由多因素介导的复杂的神经系统退行性疾病,由于其发病机制不明确,目前尚无有效的治疗药物。阐明 AD 确切的发病机制,开发有效治疗或延缓 AD 病理进程的药物,已成为亟待解决的重大社会问题。随着研究的深入,人们逐渐认识到 T 细胞活化介导的神经炎症反应是诱导 AD 病理损伤,推动病理进程发展的重要因素之一。因此,除了  $A\beta$  斑块沉积和 tau 蛋白磷酸化之外,神经炎症也被称为 AD 的第三大病理学特征。调节 Teffs 与 Treg 功能平衡,改善神经炎症,可作为治疗或延缓 AD 等神经退行性疾病一个行之有效的策略。

现代药理学研究发现,钩藤碱作为中药钩藤的主要药效物质,具有显著的神经保护作用。其毒副作用低,不良反应少,并可通过多靶点、多途径发挥 AD 治疗作用,有望成为临床治疗 AD

的候选药物。本文系统综述了钩藤碱的神经药理作用,将为以钩藤碱为先导化合物的抗 AD 药物开发提供新思路。此外,前期大量研究揭示钩藤碱具有显著的抗炎作用,但是都集中在小胶质细胞介导的固有免疫应答效应,T 细胞介导的适应性免疫应答是否也参与了钩藤碱的抗炎和神经保护作用以及相关的作用机制值得深入探讨。

## 参考文献

- [1] Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, et al. Alzheimer's disease [J]. Lancet, 2021, 397 (10284): 1577-1590.
- [2] Ng YP, Or TC, Ip NY. Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease [J]. Neurochem Int, 2015, 89: 260-270.
- [3] Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive review on Alzheimer's disease: causes and treatment [J]. Molecules, 2020, 25 (24): 5789.



- [4] Webers A, Heneka MT, Gleeson PA. The role of innate immune responses and neuroinflammation in amyloid accumulation and progression of Alzheimer's disease [J]. *Immunol Cell Biol*, 2020, 98 (1): 28-41.
- [5] Marucci G, Buccioni M, Ben DD, et al. Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease [J]. *Neuropharmacology*, 2021, 190: 108352.
- [6] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020: 268.
- [7] Zhang CY, Wu X, Xian YF, et al. Evidence on integrating pharmacokinetics to find truly therapeutic agent for Alzheimer's disease: comparative pharmacokinetics and disposition kinetics profiles of stereoisomers isorhynchophylline and rhynchophylline in rats [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 4016323.
- [8] 柳威, 邓林华, 赵英强. 钩藤提取物及钩藤碱的药理研究进展 [J]. *中药新药与临床药理*, 2021, 32 (6): 899-904.
- [9] Haass C, Kaether C, Thinakaran G, et al. Trafficking and proteolytic processing of APP [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2 (5): a006270.
- [10] Yang H, Li JP, Li XX, et al. Based on molecular structures: amyloid- $\beta$  generation, clearance, toxicity and therapeutic strategies [J]. *Front Mol Neurosci*, 2022, 15: 927530.
- [11] Srikanth V, Maczurek A, Phan T, et al. Advanced glycation endproducts and their receptor RAGE in Alzheimer's disease [J]. *Neurobiol Aging*, 2011, 32 (5): 763-777.
- [12] Kanekiyo T, Bu G. The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 and amyloid- $\beta$  clearance in Alzheimer's disease [J]. *Front Aging Neurosci*, 2014, 6: 93.
- [13] Ma C, Hong F, Yang S. Amyloidosis in Alzheimer's disease: pathogeny, etiology, and related therapeutic directions [J]. *Molecules*, 2022, 27 (4): 1210.
- [14] Volloch V, Olsen B, Rits S. Alzheimer's disease is driven by intraneuronally retained beta-amyloid produced in the AD-specific,  $\beta$ APP-independent pathway: current perspective and experimental models for tomorrow [J]. *Ann Integr Mol Med*, 2020, 2 (1): 90-114.
- [15] Friker LL, Scheiblich H, Hochheiser IV, et al.  $\beta$ -Amyloid clustering around ASC fibrils boosts its toxicity in microglia [J]. *Cell Rep*, 2020, 30 (11): 3743-3754.
- [16] Couturier J, Stancu IC, Schakman O, et al. Activation of phagocytic activity in astrocytes by reduced expression of the inflammasome component ASC and its implication in a mouse model of Alzheimer disease [J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13: 20.
- [17] Naseri NN, Wang H, Guo J, et al. The complexity of tau in Alzheimer's disease [J]. *Neurosci Lett*, 2019, 705: 183-194.
- [18] Jouanne M, Rault S, Voisin-Chiret AS. Tau protein aggregation in Alzheimer's disease: an attractive target for the development of novel therapeutic agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 139: 153-167.
- [19] Gao Y, Tan L, Yu JT, et al. Tau in Alzheimer's disease: mechanisms and therapeutic strategies [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2018, 15 (3): 283-300.
- [20] Hamano T, Enomoto S, Shirafuji N, et al. Autophagy and tau protein [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (14): 7475.
- [21] Brunello CA, Merezhko M, Uronen RL, et al. Mechanisms of secretion and spreading of pathological tau protein [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77 (9): 1721-1744.
- [22] Ozben T, Ozben S. Neuro-inflammation and anti-inflammatory treatment options for Alzheimer's disease [J]. *Clin Biochem*, 2019, 72: 87-89.
- [23] Sung PS, Lin PY, Liu CH, et al. Neuroinflammation and neurogenesis in Alzheimer's disease and potential therapeutic approaches [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (3): 701.
- [24] Halliday G, Robinson SR, Shepherd C, et al. Alzheimer's disease and inflammation: a review of cellular and therapeutic mechanisms [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2000, 27 (1-2): 1-8.
- [25] Liston A, Dooley J, Yshii L. Brain-resident regulatory T cells and their role in health and disease [J]. *Immunol Lett*, 2022, 248: 26-30.
- [26] Dai LB, Shen Y. Insights into T-cell dysfunction in Alzheimer's disease [J]. *Aging Cell*, 2021, 20 (12): e13511.
- [27] Shi YJ, Wei B, Li LJ, et al. Th17 cells and inflammation in neurological disorders: possible mechanisms of action [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 932152.
- [28] Olson KE, Mosley RL, Gendelman HE. The potential for treg-enhancing therapies in nervous system pathologies [J]. *Clin Exp Immunol*, 2023, 211 (2): 108-121.
- [29] Yang H, Park SY, Baek H, et al. Adoptive therapy with amyloid- $\beta$  specific regulatory T cells alleviates Alzheimer's disease [J]. *Theranostics*, 2022, 12 (18): 7668-7680.
- [30] Tönnies E, Trushina E. Oxidative stress, synaptic dysfunction, and Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2017, 57 (4): 1105-1121.
- [31] Torres AK, Jara C, Park-Kang HS, et al. Synaptic mitochondria: an early target of amyloid- $\beta$  and tau in Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2021, 84 (4): 1391-1414.
- [32] Kamat PK, Kalani A, Rai S, et al. Mechanism of oxidative stress and synapse dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease: understanding the therapeutics strategies [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53 (1): 648-661.
- [33] Ross D, Siegel D. The diverse functionality of NQO1 and its roles in redox control [J]. *Redox Biol*, 2021, 41: 101950.
- [34] Mazari AMA, Zhang L, Ye ZW, et al. The multifaceted role of glutathione S-transferases in health and disease [J]. *Biomolecules*, 2023, 13 (4): 688.
- [35] Johnson DA, Johnson JA. Nrf2-a therapeutic target for the treatment of neurodegenerative diseases [J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 88 (Pt B): 253-267.
- [36] Giacobini E, Cuello AC, Fisher A. Reimagining cholinergic

- gic therapy for Alzheimer's disease [J]. *Brain*, 2022, 145 (7): 2250-2275.
- [37] Lombardo S, Maskos U. Role of the nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease pathology and treatment [J]. *Neuropharmacology*, 2015, 96 (Pt B): 255-262.
- [38] Fabiani C, Antollini SS. Alzheimer's disease as a membrane disorder: spatial cross-talk among beta-amyloid peptides, nicotinic acetylcholine receptors and lipid rafts [J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 309.
- [39] Lin CH, Huang YJ, Lin CJ, et al. NMDA neurotransmission dysfunction in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease [J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20 (32): 5169-5179.
- [40] Italia M, Ferrari E, Diluca M, et al. NMDA and AMPA receptors at synapses: novel targets for tau and  $\alpha$ -synuclein proteinopathies [J]. *Biomedicines*, 2022, 10 (7): 1550.
- [41] Zheng MZ, Chen MH, Wang WL, et al. Protection by rhynchophylline against MPTP/MPP<sup>+</sup>-induced neurotoxicity via regulating PI3K/Akt pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 268: 113568.
- [42] Xian YF, Mao QQ, Wu JC, et al. Isorhynchophylline treatment improves the amyloid- $\beta$ -induced cognitive impairment in rats via inhibition of neuronal apoptosis and tau protein hyperphosphorylation [J]. *J Alzheimers Dis*, 2014, 39 (2): 331-346.
- [43] Fu WY, Hung KW, Lau SF, et al. Rhynchophylline administration ameliorates amyloid- $\beta$  pathology and inflammation in an Alzheimer's disease transgenic mouse model [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2021, 12 (22): 4249-4256.
- [44] Kim S, Nam Y, Shin SJ, et al. Dual modulators of aggregation and dissociation of amyloid beta and tau: in vitro, in vivo, and in silico studies of uncaria rhynchophylla and its bioactive components [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 156: 113865.
- [45] Li HQ, Ip SP, Yuan QJ, et al. Isorhynchophylline ameliorates cognitive impairment via modulating amyloid pathology, tau hyperphosphorylation and neuroinflammation: studies in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Brain Behav Immun*, 2019, 82: 264-278.
- [46] Song Y, Qu R, Zhu SH, et al. Rhynchophylline attenuates LPS-induced pro-inflammatory responses through down-regulation of MAPK/NF- $\kappa$ B signaling pathways in primary microglia [J]. *Phytother Res*, 2012, 26 (10): 1528-1533.
- [47] Li HQ, Ip SP, Yuan QJ, et al. Isorhynchophylline ameliorates cognitive impairment via modulating amyloid pathology, tau hyperphosphorylation and neuroinflammation: studies in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Brain Behav Immun*, 2019, 82: 264-278.
- [48] Long HY, Zhang MJ, Wang CY, et al. Rhynchophylline attenuates neurotoxicity in tourette syndrome rats [J]. *Neurotox Res*, 2019, 36 (4): 679-687.
- [49] Jiang P, Chen L, Xu J, et al. Neuroprotective effects of rhynchophylline against  $A\beta_{1-42}$ -induced oxidative stress, neurodegeneration, and memory impairment via Nrf2-ARE activation [J]. *Neurochem Res*, 2021, 46 (9): 2439-2450.
- [50] Verma M, Chopra M, Kumar H. Unraveling the potential of EphA4: a breakthrough target and beacon of hope for neurological diseases [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2023, 43 (7): 3375-3391.
- [51] Fu AK, Hung KW, Huang H, et al. Blockade of EphA4 signaling ameliorates hippocampal synaptic dysfunctions in mouse models of Alzheimer's disease [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111 (27): 9959-9964.
- [52] Yang Y, Ji WG, Zhu ZR, et al. Rhynchophylline suppresses soluble  $A\beta_{1-42}$ -induced impairment of spatial cognition function via inhibiting excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors [J]. *Neuropharmacology*, 2018, 135: 100-112.
- [53] Kang TH, Murakami Y, Matsumoto K, et al. Rhynchophylline and isorhynchophylline inhibit NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes [J]. *Eur J Pharmacol*, 2002, 455 (1): 27-34.

(收稿日期: 2023-11-14; 修回日期: 2024-04-08)

# 数学模型在肾脏药物浓度预测中的应用

赵一馨, 何华\* (中国药科大学, 南京 211198)

**摘要:** 肾脏是机体调节水盐平衡和容量平衡的重要器官, 也是大多数药物的排泄器官, 探究肾脏生理以及药物在肾脏的暴露水平对于新药研发意义重大。基于肾脏生理, 多种数学模型被应用于肾脏药物浓度的预测, 包括房室模型、生理药代动力学 (PBPK) 模型和定量系统药理学 (QSP) 模型的数学模型, 它们有助于预测肾脏药物浓度和分布。本文介绍该三类预测肾脏药物水平的数学模型构建过程和具体应用, 以为药物肾毒性预测、以肾脏为靶点的药物机制探索和肾脏毒性药物的临床合理应用提供参考。

**关键词:** 肾脏; 数学模型; 肾损伤; 药物浓度预测

中图分类号: R973.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)08-2156-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.030

## Mathematical models in predicting renal drug concentration

ZHAO Yi-xin, HE Hua\* (China Pharmaceutical University, Nanjing 211198)

**Abstract:** Kidneys are vital organs for water and salt balance as well as volume equilibrium in the body, a crucial excretion path for most drugs. Exploring renal physiology and exposure levels of drugs in the kidney is important in new drug development. Various mathematical models, including compartment models, physiologically-based pharmacokinetic models, and quantitative systems pharmacology (QSP) models, have been used based on renal physiology to predict drug concentration and distribution in the kidney. This paper introduced the construction process and specific applications of three types of mathematical models in predicting drug levels in the kidney, providing insights for predicting renal drug concentration and distribution. It also provided reference for drug-induced renal toxicity prediction, exploration of drug mechanisms targeting the kidney, and rational use of nephrotoxic drugs.

**Key words:** kidney; mathematical model; kidney injury; drug concentration prediction

肾脏是机体的重要器官, 主要功能是调节水和电解质的平衡, 并排泄机体产生的代谢废物。肾脏在尿液的浓缩和排泄、血容量调节以及其他多种生理过程中发挥着重要作用, 许多现有的治疗药物也以肾脏为靶点发挥药效<sup>[1]</sup>。

肾脏中药物浓度与药物的治疗效果、毒性作用密切相关。在药物研发的早期阶段, 肾脏药物浓度预测有助于筛选候选药物, 选择具有肾脏靶向效果以及肾毒性较低的药物。在临床治疗中, 可以根据预测的肾脏药物浓度更好地调整剂量和治疗方案, 以确保药物在肾脏中达到有效的治疗水平并减少不良反应事件的发生。

相比于传统的动物实验和临床试验, 数学模

型可以通过模拟降低研究成本并对不同个体实行个体化预测。肾脏数学模型是利用微分方程、偏微分方程和代数方程将肾脏解剖学、病理生理学和药理学等知识整合到一个模型框架中, 从而描述核心的肾脏生理过程。作为主要清除器官, 肾脏是药代动力学 (pharmacokinetics, PK)、药效动力学 (pharmacodynamics, PD) 和毒理学等新药开发阶段的关键研究对象, 而肾脏数学模型能够模拟药物在肾组织的分布、排泄等过程, 帮助研究人员深入了解药物体内处置的动态过程, 如肾脏转运体表达对药物相互作用 (drug-drug interactions, DDI) 的影响等。同时, 肾脏模型能够模拟药物在肾脏的浓度以及对肾脏的潜在毒

作者简介: 赵一馨, 女, 硕士研究生, 主要从事肾脏生理学建模以及利尿剂使用研究, email: tinazhaoyx@126.com \*通信作者: 何华, 女, 副教授, 博士研究生导师, 主要从事定量药理学研究, email: huahe827@163.com



性，为评估药物安全性提供了重要信息。

本文介绍了三种预测肾脏药物浓度和分布的数学模型——房室模型、生理药代动力学 (physiologically based pharmacokinetic, PBPK) 模型、定量系统药理学 (quantitative system pharmacology, QSP) 模型以及各模型的具体应用场景，以期为以肾脏靶点作用药物药代动力学特征和药效学机制、肾脏毒性药物临床前筛选以及临床合理应用提供参考。

### 1 建立肾脏数学模型的生理基础

肾脏主要由皮质和髓质 (包括外髓质和内髓质) 组成，其不仅过滤身体中的代谢废物和毒素，也在调节身体的水分平衡、电解质平衡和酸碱平衡<sup>[2]</sup>、血压<sup>[3]</sup>和血流等方面起重要的作用。

这些功能的实现与肾脏基本单位——肾单位 (nephron) 有关，其与集合管一起共同完成血浆净化和尿液生成过程<sup>[4]</sup>。人体每个肾脏中包含 80 万至 100 万个肾单位，每个肾单位由具备初始滤过功能的肾小体 [由肾小球 (glomerulus) 和肾小囊 (bowman capsule) 组成] 及具有重吸收和主动分泌功能的肾小管组成。传入小动脉的血液部分由于压力梯度进入肾小囊，其余血液流入传出小动脉。肾小囊的延续部分即为肾小管，肾小管依次由以下部分组成：近曲小管 (proximal convoluted tubule)、髓袢 (loop of Henle, 又称“亨利环”) 和远曲小管 (distal convoluted tubule)。血浆经肾小球滤过形成超滤液后，其中的水和无机盐等物质经肾小管、集合管的重吸收形成小管液后最终形成尿液。

药物在肾脏内的分布与药物自身理化性质以及肾脏生理过程密切相关。药物在肾脏中经过肾小球滤过、肾小管的重吸收以及近端小管的主动分泌等过程后排出体外，这些过程共同决定了药物在肾脏内部的药物浓度。完整的肾小球隔膜可以阻隔全部血浆蛋白及电荷，因此与血浆蛋白结合的药物以及带电荷的游离药物无法通过肾小球滤过进入肾小管<sup>[5]</sup>。当肾小球滤过功能发生损伤时，游离药物无法及时通过肾小球滤过消除从而导致肾脏功能障碍<sup>[6]</sup>。与血浆蛋白结合的药物可通过肾小管管壁的多种肾脏摄取转运蛋白如有机阴离子转运蛋白 OAT 和有机阳离子转运蛋白 OCT 等转运进入肾小管管腔从而排出体外<sup>[7]</sup>。而位于近端小管顶端刷状缘膜上的外排转运蛋白如 P-gp 和 MRP 可将药物从肾小管重吸收进入血液循环<sup>[8]</sup>。由于滤过和主动分泌作用，肾小管上皮细胞始终充分暴露于各种药物中，药物浓度会随

肾小管不同区段重吸收程度不同有所改变，当药物浓度过高时，会对肾小管上皮细胞造成损害。对于整个肾脏来说，当疾病导致肾小球功能不良和功能性肾单位数量下降时，药物在肾脏的消除速率下降，进而可能因为药物沉积在肾脏中导致肾脏疾病毒性<sup>[9]</sup>。

### 2 描述肾脏药物浓度的数学模型

在肾脏药物浓度的数学模型研究中，研究人员通常使用微分方程、偏微分方程和代数方程等数学工具来描述药物在肾脏排泄的生理过程。首先，在大鼠等动物实验数据的基础上，开发出动物肾脏数学模型<sup>[10-11]</sup> (见图 1)，并结合体外实验将相关参数比放入人类开发人体肾脏生理模型中<sup>[12-13]</sup>。接着，结合药物自身理化性质以及药物在肾脏内作用的药理过程开发模拟肾脏内药物浓度的数学模型。

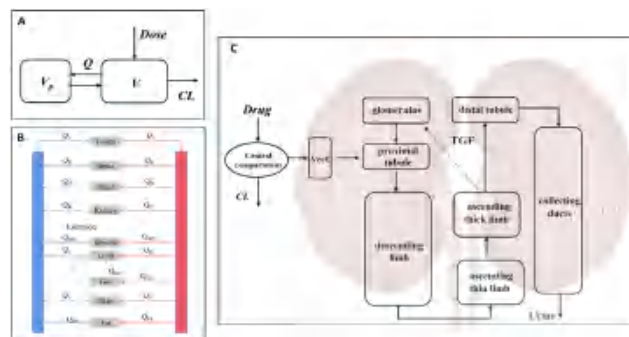


图 1 几种用于描述肾脏药物暴露水平的数学模型  
Fig 1 Several mathematical models that are used to estimate kidney exposure

A. 房室模型 (compartment model); B. PBPK 模型 (PBPK model); C. 定量系统药理学模型 (QSP model)

模拟肾脏中药物浓度的模型可以根据其在肾脏中的药物暴露机制分为以下几类：① 使用血浆药物浓度作为肾脏药物浓度替代物的房室模型；② 基于肾脏解剖生理学描述肾脏亚器官甚至是细胞水平药物浓度变化的 PBPK 模型；③ 在考虑肾脏生理基础上引入各种生理反馈的 QSP 模型。

#### 2.1 房室模型

经典的房室模型是将机体看作一个系统，并根据药物在体内的转运速率分为一个或几个房室，而药物在房室之间可逆转运或被消除<sup>[14]</sup>。肾脏作为血流灌注丰富的器官，往往可以使用血浆游离药物浓度作为肾脏暴露水平的替代物。

**2.1.1 房室模型的建立** 传统的房室模型通常包括一个中央室或一到两个外周室。下式以二房室模型为例，介绍了静脉推注情况下模型的动力学，其中，中央室的药物量可以用公式 (1) 来描

述；外周室的药量可以用公式 (2) 来描述， $C$  和  $V$  代表中央室药物浓度和中央室分布容积， $C_p$  和  $V_p$  代表外周室药物浓度和外周室分布容积。

$$d(C \times V) / dt = -CL \times C - Q \times (C - C_p) \quad (1)$$

$$d(C_p \times V_p) / dt = Q \times (C - C_p) \quad (2)$$

使用房室模型替代肾脏浓度，往往要求细胞内的游离药物浓度和血浆中的游离药物浓度满足一定关系。药物需为高渗透性的中性药物，并且不是肾脏转运体的活性底物，否则会出现较大误差。

### 2.1.2 房室模型用于抗菌药物肾脏毒性预测

Rougier 等<sup>[15]</sup>通过 PKPD 模型研究了氨基糖苷类抗菌药物在肾脏内分布并引起肾毒性的情况。其中，PK 模型为二房室模型，PK 与 PD 之间使用中央室血浆药物浓度链接，PD 指标为抗菌药物在肾脏内的累积量、药物对于肾细胞数量的影响以及肾小球滤过率的下降程度，并引入了血清肌酐水平作为肾功能的校准指标。由于抗菌药物在使用过程中非常容易引发肾脏毒性，该模型通过模拟不同给药剂量和给药频率，比较了不同给药方式下肾脏抗菌药物暴露情况，得出降低给药频率、增大给药剂量可以降低肾脏毒性的结论，为该类药物临床给药方案提供了支持。

房室模型十分简便，通过将机体器官抽象化为简单房室，可以较好地描述一些药物的基础药代动力学行为，如药物的吸收、分布、代谢和排泄等。由于房室模型涉及的微分方程相对简单，并且参数数量较少，使得与模型相关参数更容易估计。然而，房室模型也有很多局限性。由于其简化的假设，它可能无法准确地描述药物在器官水平的药物暴露，对于药物本身理化性质等也有较多限制。同时，房室模型无法较好地描述转运体的功能以及药物相互作用。这些缺点使得房室模型在描述肾脏药物浓度方面的应用有限。

## 2.2 PBPK 模型

PBPK 模型是一种基于人体的解剖学和生理学，结合药物的物理化学性质和有关药物转运及代谢的信息，来表征药物的吸收、分布、代谢和排泄的建模方法<sup>[16]</sup>。在 PBPK 模型中，可以通过调整器官的特征，如 pH、转运体和酶表达的位点特异性变化，以及药物理化性质相关参数来模拟药物浓度<sup>[17]</sup>。PBPK 模型在探究药物相互作用、剂量选择和特殊患者群体药物暴露水平变化等方面有着重要的应用价值。

**2.2.1 PBPK 模型的建立** 相比于房室模型，PBPK 模型使用更多房室来代表具体器官，各个

房室之间转运的血流量也由各器官实际血流量表示<sup>[18]</sup>。PBPK 模型建立思路为：第一，基于整个机体的生理学，建立一个由血管连接的器官和组织结构模型；第二，收集系统特异性参数，如血流、器官体积、酶和转运蛋白表达以及血浆蛋白浓度用作模型输入<sup>[19]</sup>；第三，收集药物特性的参数如清除率、分布体积、溶解度、血浆蛋白结合率、膜通透性等用作模型输入<sup>[20]</sup>。

PBPK 模型通过血浆分布系数  $K_p$ ，即肾脏中总药物浓度与血浆中总药物浓度的比值，来模拟肾脏中的药物浓度，而  $K_p$  与药物的物理化学性质相关<sup>[21]</sup>。

对于肾脏、肝脏一类的包含消除过程的器官，药物浓度往往用公式 (3) 表示：

$$V_T \times dC_T / dt = Q_T \times C_A - Q_T \times C_{VT} - CL_{im} \times C_{VUT} \quad (3)$$

其中， $C_T$  为肾脏药物浓度， $Q_T$  为肾血流量， $C_A$  为动脉药物浓度， $C_{VT} = C_T / K_p$ ， $C_{VUT}$  为游离药物浓度。

使用 PBPK 模型预测肾脏药物排泄速率时，需要考虑的主要因素包括肾血流速率、血浆蛋白结合率、肾小球滤过等，这些参数可以描述药物在差异的个体肾脏中的清除作用<sup>[22-23]</sup>。

### 2.2.2 PBPK 模型用于药物肾内结晶风险预测

部分化合物在肾脏内会发生溶质沉淀，导致液体流动受阻，进一步导致肾细胞损伤。Li 等<sup>[24]</sup>基于 PBPK 模型、药物特征性理化参数如 pKa、pH、通透性和血浆蛋白结合等，预测了 20 种药物的药物诱导晶体型肾病发生的可能性。该研究基于人类的生理参数、药物理化性质、大鼠和狗的实验结果，综合考虑肾脏中血流对药物的影响、转运体外排，以及药物在肾小管内由于 pH 梯度变化对药物溶解度的影响等因素建立了 PBPK 模型，并可利用该模型预测肾脏中的药物浓度，从而进行临床前化合物筛选。

### 2.2.3 PBPK 模型用于 DDI 引起的肾脏损伤预测

肾脏中的摄取转运蛋白在肾脏排泄外源性物质中起着重要作用。因此，联合给药的药物可能通过对这些转运蛋白的竞争性抑制从而引发药物之间的不良相互作用。Hsu 等<sup>[25]</sup>开发了三种主要经肾脏清除的药物羧酸奥司他韦、西多福韦和头孢呋辛的 PBPK 模型，并利用血浆和尿液的药物浓度数据调节模型中三种药物的滤过和主动分泌参数，从而预测转运体介导的肾脏药物分泌程度。此外，该模型能够预测竞争性抑制肾摄取转运体和急性肾损伤对上述三种药物的药代动力学行为



的影响用于肾脏药物暴露的预测，并评估肾毒性的潜在风险。

PBPK 模型可以考虑个体差异，如体重、年龄、性别、代谢差异等因素，使得模型更具个体化，能够更好地预测不同患者对药物的反应，具有向不同疾病状态的人群外推的能力<sup>[26]</sup>。相比于房室模型，PBPK 模型将机体看作多个房室，对决定药物浓度和药物作用的生理学、病理学和药理学过程进行了一定的描述，从而使模型在组织中药物浓度的模拟和外推具有合理性。PBPK 模型可以根据疾病情况对转运体转运效率等参数进行调整从而模拟药物在特殊人群中的药代动力学，如美托洛尔在肾功能不全患者中的药代动力学行为<sup>[27]</sup>。

然而，PBPK 模型中往往将各个器官看作独立的房室，缺少各器官之间的联系以及机体层面的反馈调节，与机体真实情况仍然具有一定差距。

### 2.3 QSP 模型

随着高质量大数据的发展，基于机体基本生理学特性的定量系统生理学建模方法已被广泛应用于定量探索生理过程和解释疾病机制<sup>[28]</sup>。QSP 模型是一种通过整合体外实验数据、生理药理基础和疾病特征机制的数学建模方式，在基于模型的药物开发<sup>[29]</sup>以及器官药物浓度预测<sup>[30]</sup>方面显现出越来越大的影响力。由于 QSP 模型考虑了机体反馈调节、各器官协同作用以及药物细胞水平暴露，在药物的新靶点和疾病机制探索方面发挥着重要作用。肾脏生理模型的建立与肾脏功能的关键步骤如肾小球滤过、肾小管重吸收以及肾脏自身调节等紧密相连，这些过程的定量描述和模拟不仅可以进行肾脏自身疾病机制研究，还可用于糖尿病和心血管疾病等治疗药物的开发。

**2.3.1 模型的建立** 基于肾脏生理的 QSP 模型需考虑肾小球滤过、肾小管重吸收、反馈机制、激素反馈调节等多个过程。

多年来，研究者们针对肾小球滤过这一生理过程定量建模进行了一系列的研究用于体现肾小球的不同生理、病理状态<sup>[31-33]</sup>。大鼠实验数据表明，滤过压力达到平衡时，肾小球滤过率（glomerular filtration rate, GFR）的变化与血浆流量的变化成正比。描述肾脏肾小球滤过过程的参数 GFR 由单个肾单位的肾小球滤过率（single glomerular filtration rate, SNGFR）组成：

$$SNGFR = Kf \times P_{UF} \quad (4)$$

$$P_{UF} = \Delta P - \Delta \Pi = (P_{GC} - P_T) - \Pi_{GC} \quad (5)$$

$$\Pi_{GC} = 1/2 \times (\Pi_{EA} - \Pi_{AA}) \quad (6)$$

其中， $P_{UF}$  为肾小球任一点的驱动力， $P_{GC}$  为毛细血管静水压力， $P_T$  为鲍曼空间（Bowman's space）压力， $\Pi_{GC}$  为平均肾小球毛细血管胀亡压， $Kf$  为肾小球超滤系数。而  $\Pi_{EA}$ 、 $\Pi_{AA}$  则分别表示单个传入小动脉和传出小动脉阻力。

Hallow 等<sup>[34]</sup>对于肾小管水和钠的重吸收过程进行了建模：假设近曲小管是一段均匀的圆柱形管道， $Na^+$  和水在该部位的重吸收是完全均匀分布；同时假设高渗透性的髓袢降支与间质液迅速达到平衡，并且所有被重吸收的水都被管周毛细血管迅速吸收<sup>[35]</sup>。

$$R_i = -1/L_i \times \ln(1 - \eta_i) \quad (7)$$

而 Na 在小管内的浓度可表示为：

$$Na(x) = Na(0) \times e^{-R_{pl} \times x} \quad (8)$$

其中， $Na(0)$  为肾小球过滤后的  $Na^+$  浓度， $x$  为区段肾小管长度， $R$  表示各区段单位长度的实际重吸收速率， $\eta$  表示区段标准重吸收率， $L$  表示区段长度。

肾小管流量在很大程度上依赖于 GFR，而 GFR 主要受肾小管-球间反馈（tubuloglomerular feedback, TGF）和肌源学说调节。TGF 通过感知致密斑中的氯化钠浓度并提供反馈信号来调节传入小动脉直径，从而帮助稳定血流。肌源学说是指肾小球前血管系统通过肌源性血管收缩来响应灌注压力的变化。TGF 和肌源性自调节共同对肾小球压力发挥调节作用，从而对 GFR 产生调节作用。Sgouralis 等<sup>[36]</sup>开发的描述性模型较好地模拟了健康肾脏中流量和小动脉直径相关的自身调节，而 Williamson 等<sup>[37]</sup>则通过模型模拟了收缩压敏感性对肌源学说的影响。TGF 的建模过程应突出髓袢升支部分的超滤液浓度<sup>[38-39]</sup>，在此基础上 Czerwin 等<sup>[40]</sup>将整个肾脏单元当作电阻进行串联，以传入小动脉肌为反馈调节的制动器，通过其舒张/收缩程度的改变来进行流量调节。Feldberg 等<sup>[41]</sup>的研究表明 TGF 机制的调节如果没有以肌源性反应作为基础，TGF 就不可能对肾血流量进行自动调节，说明两者紧密联系。

由于肾小球滤过是由压力驱动的，因此，机体的血容量、血压和激素等因素对肾脏生理尤其是利钠过程十分重要<sup>[42-43]</sup>。这种调节往往与机体的肾素-血管紧张素-醛固酮系统（renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS）进行的神经-体液调节有关。RAAS 激活可通过增强钠重吸收、水重吸收和血管张力来提高血容量，从而升高血压<sup>[44]</sup>，而抑制 RAAS 可减缓肾病向终末期肾病的进展<sup>[45]</sup>。



复杂生理参数可以较完整地描述生理过程，但是同时也容易导致模型过拟合。因此，应相较于研究目的选择合适参数。例如，Hallow 等<sup>[46]</sup>研究糖尿病与肾脏之间的联系，在模型中有针对性地仅考虑了肾小管水和钠离子的处置过程，着重描述了近端小管相关转运体对水和钠的处置，而有选择性地简化了肾小球滤过的有关过程。Czerwin 等<sup>[40]</sup>研究了稳态状态下平均动脉压（mean arterial pressure, MAP）对于肾脏功能的影响，描述平均动脉压与 GFR 之间的关系。在该模型中，肾小球滤过和相关反馈调节被着重描述，而重吸收的具体过程则被简化。

**2.3.2 QSP 模型用于药物临床前毒理学评价** 辉瑞公司研发了一类肝选择性葡萄糖激酶激活剂（GKa）药物 PF-04991532 用于治疗 2 型糖尿病，该药物是一种强极性、低渗透性羧酸，并且是 OAT 转运体的底物<sup>[47]</sup>。这些理化性质导致该药容易在肾小管和尿液蓄积，从而造成药物在肾小管处结晶而导致肾脏损伤。为了探究肾脏内部 PF-04991532 药物浓度，研究者们建立肾脏药物暴露模型预测该药物在肾小管液的浓度，并结合体外实验溶解度数据进行比较，发现肾脏中的药物浓度高于药物的溶解度，导致晶体的形成，引发肾毒性<sup>[48]</sup>。在临床前毒理学实验中发现，该药物会导致肾小管变性和再生进而导致晶体型肾病，辉瑞公司继而中止了该药物的研发。

**2.3.3 QSP 模型用于药物肾脏损伤机制研究** Gebremichael 等<sup>[49]</sup>在肾脏生理机制模型的基础上，开发了药物引起的肾脏近曲小管上皮细胞损伤模型。该模型研究了在使用传统抗肿瘤药物顺铂后人体肾脏近曲小管上皮细胞的损伤情况，在细胞、器官和机体多层面上分别进行建模，并选取血液和尿液中的几种生物标志物 Kim-1、 $\alpha$ -谷胱甘肽 S 转移酶（ $\alpha$ GST）、葡萄糖、尿量等指标，对肾脏损伤程度进行评估。通过细胞水平的标志物的表达情况预测肾脏近曲小管上皮细胞的损伤程度，进而在器官水平上观察 GFR 和血清肌酐的变化，以验证假设。该模型首次定量地将尿液中的生物标志物以及尿液动力学与细胞水平和器官水平的药物暴露、肾损伤联系起来，为优化给药方案提供了一种定量的方法，该方法也可大大提高检测和预防临床出现急性肾损伤的能力。

**2.3.4 QSP 模型用于疾病机制研究** QSP 模型也可用于研究疾病机制和以肾脏为靶点的药物作用机制。钠葡萄糖协同转运蛋白 II（sodium-glucose

cotransporter II, SGLT2）受体抑制剂是近年来备受关注的—种新型治疗糖尿病的药物。与传统降糖药往往作用于胰岛细胞或提高细胞胰岛素敏感型不同的是，SGLT2 抑制剂类药物的作用机制为加快近曲小管附近葡萄糖的排出从而降低血糖，并在临床试验中被发现有改善心力衰竭的作用<sup>[50]</sup>。由于 SGLT2 抑制剂类药物改善心力衰竭的机制尚不清晰，Hallow 等<sup>[34]</sup>在基础肾脏生理模型的基础上建立了心脏-肾脏交互模型，详细描述了血流动力学、心脏、肾脏以及反馈调节的生理过程<sup>[51]</sup>。通过心-肾交互模型，研究者们定量分析了 SGLT2 抑制剂在利钠、利尿、肾小球压力改变等方面以及对于血浆/间质液分布变化的影响，并结合临床试验中受试者服用达格列净后的临床指标对无法实验观察的机制如肾小球压力变化等进行了模拟<sup>[52]</sup>。接着，通过调节参数构建虚拟糖尿病患者对渗透性利尿、药物直接抑制钠和葡萄糖重吸收等过程进行模拟，结果发现糖尿病患者间质液量降低、血压降低，这些现象与临床观察相吻合。通过模拟药物在肾脏亚器官水平上的药理作用对血容量的影响，为 SGLT2 抑制剂类药物改善心力衰竭机制研究提供了一种可能。

### 3 总结与展望

关于肾脏的探索从未停歇，而先进的技术手段和数学方法可以帮助我们更好地理解机体的运作过程。肾脏内药物暴露水平，对于研究药物诱导的肾损伤以及以肾脏为靶点的药物十分重要。过去十几年，基于肾脏生理的数学模型发展十分迅速，并在预测肾脏亚器官层面药物浓度、肾脏疾病发生机制以及作用于肾脏药物等方面有许多成果。从方便简洁的房室模型到可预测肾脏器官内药物浓度的 PBPK 模型，再到可以预测亚器官水平并结合机体反馈调节进行疾病机制预测的 QSP 模型，它们从不同的层次水平替代传统的体内外实验，对肾脏的药物浓度进行预测，促进了药物的研发以及合理用药方案的探索。

目前，使用这些模型来预测肾脏药物暴露方面还存在着—系列挑战，其中最重要的是缺乏直接的体内药物浓度数据（例如肾单位细胞浓度和管腔内浓度等）对模型进行更加精准的验证。但不可否认的是，数学建模方法依然是高效、节省人力物力的技术手段，相信蓬勃发展的计算机技术以及更为先进的检测手段会为数学建模方法带来更为广阔的应用前景。

## 参考文献

- [1] Perry RJ, Shulman GI. Sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors: understanding the mechanisms for therapeutic promise and persisting risks [J]. *J Biol Chem*, 2020, 295 (42): 14379-14390.
- [2] Hernando N, Gagnon K, Lederer E. Phosphate transport in epithelial and nonepithelial tissue [J]. *Physiol Rev*, 2021, 101 (1): 1-35.
- [3] Mutchler SM, Kirabo A, Kleyman TR. Epithelial sodium channel and salt-sensitive hypertension [J]. *Hypertension*, 2021, 77 (3): 759-767.
- [4] Pearce D, Manis AD, Nesterov V, et al. Regulation of distal tubule sodium transport: mechanisms and roles in homeostasis and pathophysiology [J]. *Pflugers Arch*, 2022, 474 (8): 869-884.
- [5] Radhakrishnan J, Perazella MA. Drug-induced glomerular disease: attention required! [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2015, 10 (7): 1287-1290.
- [6] Paueksakon P, Fogo AB. Drug-induced nephropathies [J]. *Histopathology*, 2017, 70 (1): 94-108.
- [7] Mor AL, Kaminski TW, Karbowska M, et al. New insight into organic anion transporters from the perspective of potentially important interactions and drugs toxicity [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2018, doi: 10.26402/jpp.2018.3.01.
- [8] Drożdżik M, Oswald S, Drożdżik A. Impact of kidney dysfunction on hepatic and intestinal drug transporters [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 143: 112-125.
- [9] Sharma V, Singh TG. Drug induced nephrotoxicity-A mechanistic approach [J]. *Mol Biol Rep*, 2023, 50 (8): 6975-6986.
- [10] Weinstein AM. A mathematical model of the rat kidney. II . Antidiuresis [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2020, 318 (4): F936-F955.
- [11] Weinstein AM. A mathematical model of the rat kidney. III . Ammonia transport [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2021, 320 (6): F1059-F1079.
- [12] Layton AT, Layton HE. A computational model of epithelial solute and water transport along a human nephron [J]. *PLoS Comput Biol*, 2019, 15 (2): e1006108.
- [13] Thomas SR. Mathematical models for kidney function focusing on clinical interest [J]. *Morphologie*, 2019, 103 (343): 161-168.
- [14] Hof F, Bridge LJ. Exact solutions and equi-dosing regimen regions for multi-dose pharmacokinetics models with transit compartments [J]. *J Pharmacokinetic Pharmacodyn*, 2021, 48 (1): 99-131.
- [15] Rougier F, Claude D, Maurin M, et al. Aminoglycoside nephrotoxicity: modeling, simulation, and control [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47 (3): 1010-1016.
- [16] Ladumor MK, Thakur A, Sharma S, et al. A repository of protein abundance data of drug metabolizing enzymes and transporters for applications in physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modelling and simulation [J]. *Sci Rep*, 2019, 9 (1): 9709.
- [17] Scotcher D, Galetin A. PBPK simulation-based evaluation of ganciclovir crystalluria risk factors: effect of renal impairment, old age, and low fluid intake [J]. *AAPS J*, 2021, 24 (1): 13.
- [18] Rose RH, Turner DB, Neuhoff S, et al. Incorporation of the time-varying postprandial increase in splanchnic blood flow into a PBPK model to predict the effect of food on the pharmacokinetics of orally administered high-extraction drugs [J]. *AAPS J*, 2017, 19 (4): 1205-1217.
- [19] Alrubia S, Mao J, Chen Y, et al. Altered bioavailability and pharmacokinetics in Crohn's disease: capturing systems parameters for PBPK to assist with predicting the fate of orally administered drugs [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2022, 61 (10): 1365-1392.
- [20] Ellison CA. Structural and functional pharmacokinetic analogs for physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model evaluation [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2018, 99: 61-77.
- [21] Gaohua L, Zhang M, Sychterz C, et al. The interplay of permeability, metabolism, transporters, and dosing in determining the dynamics of the tissue/plasma partition coefficient and volume of distribution-a theoretical investigation using permeability-limited, physiologically based pharmacokinetic modeling [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (22). doi: 10.3390/ijms242216224.
- [22] Korzekwa K, Nagar S. Process and system clearances in pharmacokinetic models: our basic clearance concepts are correct [J]. *Drug Metab Dispos*, 2023, 51 (4): 532-542.
- [23] Jeong YS, Jusko WJ. A complete extension of classical hepatic clearance models using fractional distribution parameter  $f_d$  in physiologically based pharmacokinetics [J]. *J Pharm Sci*, 2024, 113 (1): 95-117.
- [24] Li Z, Litchfield J, Tess DA, et al. A physiologically based in silico tool to assess the risk of drug-related crystalluria [J]. *J Med Chem*, 2020, 63 (12): 6489-6498.
- [25] Hsu V, de L T Vieira M, Zhao P, et al. Towards quantitation of the effects of renal impairment and probenecid inhibition on kidney uptake and efflux transporters, using physiologically based pharmacokinetic modelling and simulations [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2014, 53 (3): 283-293.
- [26] Li J, Guo HF, Liu C, et al. Prediction of drug disposition in diabetic patients by means of a physiologically based pharmacokinetic model [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2015, 54 (2): 179-193.
- [27] Zamir A, Rasool MF, Imran I, et al. Physiologically based pharmacokinetic model to predict metoprolol disposition in healthy and disease populations [J]. *ACS Omega*, 2023, 8 (32): 29302-29313.
- [28] Au JL, Abbiati RA, Wientjes MG, et al. Target site delivery and residence of nanomedicines: application of quantitative systems pharmacology [J]. *Pharmacol Rev*,

- 2019, 71 (2): 157-169.
- [29] Helmlinger G, Al-Huniti N, Aksenov S, et al. Drug-disease modeling in the pharmaceutical industry—where mechanistic systems pharmacology and statistical pharmacometrics meet [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2017, 109S: S39-S46.
- [30] Woodhead JL, Watkins PB, Howell BA, et al. The role of quantitative systems pharmacology modeling in the prediction and explanation of idiosyncratic drug-induced liver injury [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2017, 32 (1): 40-45.
- [31] Mahato HS, Ahlstrom C, Jansson-Löfmark R, et al. Mathematical model of hemodynamic mechanisms and consequences of glomerular hypertension in diabetic mice [J]. *NPJ Syst Biol Appl*, 2018. doi: 10.1038/s41540-018-0077-9.
- [32] Punyaratabandhu N, Dechadilok P, Triampo W, et al. Hydrodynamic model for renal microvascular filtration: effects of physiological and hemodynamic changes on glomerular size-selectivity [J]. *Microcirculation*, 2022, 29 (8): e12779.
- [33] Saritas T, Kuppe C, Moeller MJ. Progress and controversies in unraveling the glomerular filtration mechanism [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2015, 24 (3): 208-216.
- [34] Hallow KM, Gebremichael Y. A quantitative systems physiology model of renal function and blood pressure regulation: model description [J]. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*, 2017, 6 (6): 383-392.
- [35] Layton AT. Mathematical modeling of kidney transport [J]. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2013, 5 (5): 557-573.
- [36] Sgouralis I, Layton AT. Mathematical modeling of renal hemodynamics in physiology and pathophysiology [J]. *Math Biosci*, 2015, 264: 8-20.
- [37] Williamson GA, Loutzenhiser R, Wang X, et al. Systolic and mean blood pressures and afferent arteriolar myogenic response dynamics: a modeling approach [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2008, 295 (5): R1502-R1511.
- [38] Liu R, Layton AT. Modeling the effects of positive and negative feedback in kidney blood flow control [J]. *Math Biosci*, 2016, 276: 8-18.
- [39] Weinstein AM. A mathematical model of the rat kidney. IV. Whole kidney response to hyperkalemia [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2022, 322 (2): F225-F244.
- [40] Czerwin BJ, Patel S, Chiofolo CM, et al. Modeling the steady-state effects of mean arterial pressure on the kidneys [J]. *IEEE Open J Eng Med Biol*, 2020, doi: 10.1109/OJEMB.2020.3036547.
- [41] Feldberg R, Colding-Jørgensen M, Holstein-Rathlou NH. Analysis of interaction between TGF and the myogenic response in renal blood flow autoregulation [J]. *Am J Physiol*, 1995, 269 (4 Pt 2): F581-F593.
- [42] Baek EJ, Kim S. Current understanding of pressure natriuresis [J]. *Electrolyte Blood Press*, 2021, 19 (2): 38-45.
- [43] Diaz-Morales N, Baranda-Alonso EM, Martinez-Salgado C, et al. Renal sympathetic activity: a key modulator of pressure natriuresis in hypertension [J]. *Biochem Pharmacol*, 2023, 208: 115386.
- [44] Georgianos PI, Agarwal R. Revisiting RAAS blockade in CKD with newer potassium-binding drugs [J]. *Kidney Int*, 2018, 93 (2): 325-334.
- [45] Schaefer JA, Gales MA. Potassium-binding agents to facilitate renin-angiotensin-aldosterone system inhibitor therapy [J]. *Ann Pharmacother*, 2016, 50 (6): 502-510.
- [46] Hallow KM, Gebremichael Y, Helmlinger G, et al. Primary proximal tubule hyperreabsorption and impaired tubular transport counterregulation determine glomerular hyperfiltration in diabetes: a modeling analysis [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2017, 312 (5): F819-F835.
- [47] Pfefferkorn JA. Strategies for the design of hepatoselective glucokinase activators to treat type 2 diabetes [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2013, 8 (3): 319-330.
- [48] Sharma R, Litchfield J, Bergman A, et al. Comparison of the circulating metabolite profile of PF-04991532, a hepatoselective glucokinase activator, across preclinical species and humans: potential implications in metabolites in safety testing assessment [J]. *Drug Metab Dispos*, 2015, 43 (2): 190-198.
- [49] Gebremichael Y, Lu J, Shankaran H, et al. Multiscale mathematical model of drug-induced proximal tubule injury: linking urinary biomarkers to epithelial cell injury and renal dysfunction [J]. *Toxicol Sci*, 2018, 162 (1): 200-211.
- [50] Fitchett DH, Udell JA, Inzucchi SE. Heart failure outcomes in clinical trials of glucose-lowering agents in patients with diabetes [J]. *Eur J Heart Fail*, 2017, 19 (1): 43-53.
- [51] Yu H, Basu S, Hallow KM. Cardiac and renal function interactions in heart failure with reduced ejection fraction: a mathematical modeling analysis [J]. *PLoS Comput Biol*, 2020, 16 (8): e1008074.
- [52] Hallow KM, Greasley PJ, Helmlinger G, et al. Evaluation of renal and cardiovascular protection mechanisms of SGLT2 inhibitors: model-based analysis of clinical data [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2018, 315 (5): F1295-F1306.

(收稿日期: 2024-02-08; 修回日期: 2024-04-17)



## 药物分析与检验

## 橘红药材、饮片、标准汤剂与配方颗粒的指纹图谱相关性研究

李仰华<sup>1, 2, 3</sup>, 黄凯伟<sup>1, 2, 3\*</sup>, 郭志俊<sup>1, 2, 3</sup>, 赵伟志<sup>1, 2, 3</sup>, 张辉<sup>1, 2, 3</sup>, 谭沛<sup>1, 2, 3</sup> (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** 建立橘红药材、饮片、标准汤剂、配方颗粒的 HPLC 指纹图谱, 并分析其相关性和差异性。**方法** 采用 CORTECS T3 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 2.7 μm), 乙腈 (A) 和 0.05% 磷酸水溶液 (B) 为流动相, 进行梯度洗脱, 流速为 1.1 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长为 300 nm, 柱温为 30 °C, 进样量为 10 μL。以橙皮苷为参照峰, 测定 15 批橘红药材、饮片、标准汤剂与 3 批配方颗粒; 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版) 进行相似度评价, 确定共有峰, 并进行聚类分析。**结果** 橘红药材、饮片、标准汤剂、配方颗粒的 HPLC 指纹图谱均确定了 12 个共有峰, 并指出了其中 7 个峰, 峰 4 为维采宁-2, 峰 6 为阿魏酸, 峰 7 为柚皮芸香苷, 峰 8 为橙皮苷, 峰 10 为川陈皮素, 峰 11 为 3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮, 峰 12 为橘皮素。橘红药材、饮片、标准汤剂、配方颗粒四者与相应对照指纹图谱的相似度均大于 0.980; 相关性分析的结果表明大部分共有峰显著相关; 系统聚类分析结果表明, 药材、饮片、标准汤剂、配方颗粒之间无显著性差异。饮片到配方颗粒的质量分数转移率在 21.7%~26.8%, 均值为 24.8%, 在均值的 ±30% 范围, 未出现离散, 说明传递性较好。**结论** 橘红药材、饮片、标准汤剂、配方颗粒的主要化学成分组成基本相同, 指纹图谱相关性良好, 可为橘红配方颗粒生产过程的质量控制提供参考。

**关键词:** 橘红; 标准汤剂; 配方颗粒; 高效液相色谱法; 指纹图谱

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)08-2163-07  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.031

## Correlation analysis of fingerprints of Citri Eoxcarpium Rubrum medicinal materials, decoction pieces, standard decoction and formula granules

LI Yang-hua<sup>1,2,3</sup>, HUANG Kai-wei<sup>1,2,3\*</sup>, GUO Zhi-jun<sup>1,2,3</sup>, ZHAO Wei-zhi<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Hui<sup>1,2,3</sup>, TAN Pei<sup>1,2,3</sup>  
(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 HPLC fingerprints of Citri Eoxcarpium Rubrum medicinal materials, decoction pieces, standard decoction and formula granules, and analyze their correlation and difference. **Methods** Gradient elution was performed on a CORTECS T3 (150 mm×4.6 mm, 2.7 μm) column with acetonitrile (A) and 0.05% phosphoric acid (B) as the mobile phase. The flow rate was 1.1 mL·min<sup>-1</sup>, the detection wavelength was 300 nm, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 10 μL. The HPLC fingerprints of 15 batches of Citri Eoxcarpium Rubrum medicinal materials, decoction pieces, standard decoction and 3 batches of formula granules were determined with the hesperidin peak as the reference peak. The Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprints of Traditional Chinese Medicine (Version 2012) was used to evaluate

基金项目: 深圳市创新项目 (No.JSGG20191129093418578)。

作者简介: 李仰华, 女, 硕士, 主要从事中药配方颗粒工艺及质量标准研究, email: LIYANGHUA9@999.com.cn \*通信作者: 黄凯伟, 男, 硕士, 主管中药师, 主要从事中药配方颗粒工艺及质量标准研究, email: huangkaiwei3@999.com.cn

the similarity and identify common peaks, and the cluster analysis was conducted. **Results** There were 12 common peaks in the HPLC fingerprints of Citri Eoxcarpium Rubrum medicinal materials, decoction pieces, standard decoction and 3 batches of formula granules, and 7 of them were identified. Peak 4 was vicenin-2, peak 6 was ferulic acid, peak 7 was narirutin, peak 8 was hesperidin, peak 10 was nobiletin, peak 11 was 3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-heptamethoxyflavone, and peak 12 was tangeretin. The similarity between each of the Citri Eoxcarpium Rubrum medicinal materials, decoction pieces, standard decoction and formula granules fingerprints and its corresponding control fingerprint was greater than 0.980. The correlation analysis showed that most common peaks were significantly correlated and the cluster analysis showed no significant difference among the medicinal materials, decoction pieces, standard decoction and formula granules. The content transfer rate from decoction pieces to formula granules was 21.7% ~ 26.8% with an average value of 24.8%. No dispersion was found within  $\pm 30\%$  of the mean, indicating good transferability. **Conclusion** The main chemical components of the medicinal materials, decoction pieces, standard decoction and formula granules of Citri Eoxcarpium Rubrum are basically the same. With good correlation, the fingerprint could provide a reference for the quality control of the production of the formula granules of Citri Eoxcarpium Rubrum.

**Key words:** Citri Eoxcarpium Rubrum; standard decoction; formula granule; HPLC; fingerprint

橘红为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥外层果皮，性温，味辛、苦。归肺、脾经，具有理气宽中，燥湿化痰的功效，适用于治疗咳嗽痰多、食积伤酒等症状<sup>[1-3]</sup>。现代研究表明，橘红主要化学成分包括黄酮类、挥发油、多糖等化学成分<sup>[4-6]</sup>，其中最常见黄酮类化合物包括橙皮苷、芸香柚皮苷、川陈皮素、橘皮素等<sup>[7-9]</sup>。黄酮类化合物被认为是其主要生物活性成分，具有抗病毒、抗炎、抗肿瘤、调节心血管系统功能、保护神经系统等多种药理活性<sup>[10]</sup>。

中药材来源广泛，化学成分复杂，为保证中药的有效性与安全性，需要进行中药质量评价，并在此基础上提高质量的可控性。中药配方颗粒源于中药饮片，其质量控制也备受业界关注<sup>[11]</sup>。橘红配方颗粒是以橘红为原料，经过水提、浓缩、干燥制备得到的颗粒剂，失去了原有饮片的外观形态，在制备过程中，部分化学成分可能发生变化。2020年版《中国药典》橘红项下含量测定方法仅规定橙皮苷单个化学成分限度，无指纹图谱测定方法相关规定。因此，对橘红药材、饮片、标准汤剂及配方颗粒的物质传递过程中各有效成分进行质量相关性研究尤为重要。

目前，有关橘红配方颗粒的指纹图谱研究较少<sup>[12-14]</sup>，且其检测得到的特征图谱，存在特征峰少、检测时间长的问题，更缺少橘红药材、饮片、标准汤剂、配方颗粒之间的相关性和差异性的研究。本研究采用高效液相色谱法建立橘红药材、饮片、标准汤剂和配方颗粒的指纹图谱，并开展从橘红药材到橘红配方颗粒之间的相关性研究，以为橘红配方颗粒整体质量的评价提供参考。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

Alliance2695 型高效液相色谱仪 (美国沃特世公司); XS204 型万分之一天平 (瑞士梅特勒托利多公司)、ME36S 型百万分之一天平 (德国赛多利斯公司)、KQ-500DE 型超声仪 (昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 试药

橙皮苷 (批号: 110721-202019, 纯度: 95.3%)、川陈皮素 (批号: 112055-202102, 纯度: 99.7%)、橘皮素 (批号: 112054-202102, 纯度: 99.7%)、阿魏酸 (批号: 110773-201915, 纯度: 99.4%) (中国食品药品检定研究院), 维采宁-2 (批号: DST210901-023, 纯度: 98%, 成都乐美天医药科技有限公司); 柚皮芸香苷 (批号: 250107-202110, 纯度: 98%)、3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮 (批号: 170106-202111, 纯度: 98%) (上海鸿永生物科技有限公司); 乙腈为色谱纯, 水为超纯水; 其他试剂均为分析纯。

15 批橘红药材产地分别来自四川省 (A1、A2、A6)、江西省 (A3 ~ A5)、浙江省 (A7 ~ A12)、福建省 (A13 ~ A15), 经安徽中医药大学刘守金教授鉴定为橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥外层果皮。15 批橘红饮片 (B1 ~ B15) 严格按照 2020 年版《中国药典》一部橘红项下饮片炮制规定进行炮制<sup>[1]</sup>: 除去杂质、切碎, 制得橘红饮片。15 批橘红饮片标准汤剂 (C1 ~ C15) 严格按照《医疗机构中药煎药室管理规范》和《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》中煎药方法进行制备: 取橘红饮片, 提取制得标准汤剂, 为了

标准汤剂的长期储存, 根据《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》, 进行低温减压浓缩, 冷冻干燥, 得橘红饮片标准汤剂。根据标准汤剂的标准, 制备橘红配方颗粒 (D1 ~ D3), 以麦芽糊精辅料作为原料制备得阴性颗粒。

## 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色谱柱: Waters CORTECS T3 (150 mm×4.6 mm, 2.7 μm), 以乙腈为流动相 A, 0.05% 磷酸溶液为流动相 B, 进行梯度洗脱 (0 ~ 35 min, 3%→8%A; 35 ~ 45 min, 8%→22%A; 45 ~ 55 min, 22%→50%A; 55 ~ 60 min, 50%→90%A); 检测波长为 300 nm; 柱温为 30 °C; 流速为 1.1 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量为 10 μL。

### 2.2 混合对照品溶液的制备

取橙皮苷、川陈皮素、橘皮素、阿魏酸、维采宁-2、柚皮芸香苷、3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮对照品适量, 精密称定, 加甲醇分别制成每 1 mL 含对照品 50 μg 的溶液, 即得混合对照品溶液。

### 2.3 供试品溶液的制备

**2.3.1 橘红药材、饮片** 取本品粉末 (过四号筛) 约 1 g, 置具塞锥形瓶中, 加水 50 mL, 加热回流 60 min, 取出, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加入 50% 甲醇 50 mL, 加热回流 30 min, 冷却, 过滤, 取续滤液, 即得。

### 2.3.2 橘红标准汤剂、橘红配方颗粒、阴性颗粒

取本品约 0.2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加入 50% 甲醇 50 mL, 密塞, 加热回流 30 min, 取出, 放冷, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

### 2.4 方法学验证

**2.4.1 专属性试验** 分别精密吸取阴性样品溶液、混合对照品溶液及供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。采用对照品定位, 指认了维采宁-2、阿魏酸、柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素、3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮、橘皮素 7 种成分。结果供试品溶液色谱在与对照品溶液色谱相应位置上有吸收峰, 分离度均大于 1.5, 且阴性样品无干扰, 表明方法专属性良好 (见图 1 ~ 2)。

**2.4.2 精密度试验** 取同一份供试品溶液 (批号: D1), 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图。以橙皮苷为参照峰, 计算得 12 个特征峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均小于 2%, 表明仪器精密度良好。

**2.4.3 重复性试验** 取同一批样品 (批号: D1), 制备 6 份供试品溶液, 进样分析, 记录色谱图。以橙皮苷为参照峰, 计算得 12 个特征峰的相对

保留时间和相对峰面积的 RSD 值均小于 2%, 表明方法重复性良好。

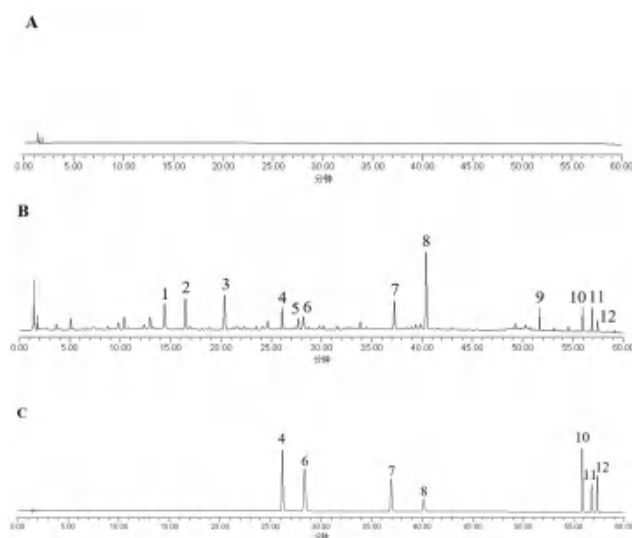


图 1 阴性样品溶液 (A)、供试品溶液 (B) 和混合对照品溶液 (C) HPLC 图

Fig 1 HPLC chromatograms of negative solution (A), test solution (B), and mixed reference solution (C)

4. 维采宁-2 (vicenin-2); 6. 阿魏酸 (ferulic acid); 7. 柚皮芸香苷 (narirutin); 8. 橙皮苷 (hesperidin); 10. 川陈皮素 (nobiletin); 11. 3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮 (3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-heptamethoxyflavone); 12. 橘皮素 (tangeretin)

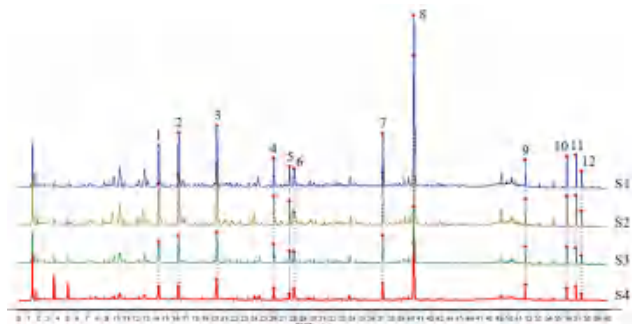


图 2 药材样品 (S1)、饮片样品 (S2)、标准汤剂样品 (S3) 和配方颗粒样品 (S4) HPLC 色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of the medicinal materials (S1), decoction pieces (S2), standard decoction (S3), and formula granules (S4)

4. 维采宁-2 (vicenin-2); 6. 阿魏酸 (ferulic acid); 7. 柚皮芸香苷 (narirutin); 8. 橙皮苷 (hesperidin); 10. 川陈皮素 (nobiletin); 11. 3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮 (3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-heptamethoxyflavone); 12. 橘皮素 (tangeretin)

**2.4.4 稳定性试验** 取同一份供试品溶液 (批号: D1), 在配制后第 0、2、4、8、12、18、24 h 进样。记录色谱图。以橙皮苷为参照峰, 计算得 12 个特征峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均小于 2%, 说明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

### 2.5 指纹图谱的建立及分析

**2.5.1 指纹图谱的建立** 分别取“1.2”项下 15 批橘



红药材、饮片、标准汤剂以及 3 批橘红配方颗粒，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，进样测定，记录色谱图。将数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）”，进行各色谱峰匹配，建立特征图谱，得到 7 个响应值较合适、分离度较好、纯度较高的共有特征峰，建立对照特征图谱及共有模式图谱（见图 3）。以峰 8 橙皮苷对照品为参照物峰（S 峰），计算各特征峰与 S 峰的相对保留时间，应在规定值的  $\pm 10\%$  之内。规定值为：0.36（峰 1）、0.41（峰 2）、0.50（峰 3）、0.65（峰 4）、0.69（峰 5）、0.70（峰 6）、0.92（峰 7）、1.28（峰 9）、1.38（峰 10）、1.41（峰 11）、1.42（峰 12）。

**2.5.2 相似度评价分析** 12 个特征峰在药材、饮片、标准汤剂、配方颗粒中均存在，较好地保留了药材的特征成分。将 15 批橘红药材、饮片、标准汤剂及 3 批配方颗粒指纹图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）”并计算各批次与其对照图谱的相似度，结果见表 1。15 批橘红药材特征图谱相似度均  $> 0.990$ ，说明不同产地的橘红药材化学成分具有良好的相似性；15 批饮片、标准汤剂及 3 批配方颗粒的指纹图谱相似度均大于 0.980，表明不同批次橘红饮片、标准汤剂、配方颗粒成分基本一致。将 15 批橘红饮片、标准汤剂及 3 批配方颗粒指纹图谱生成的对照指纹图谱 S1、S2、S3 分别导入软件“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）”，结果表明，橘红饮片、标准汤剂与配方颗粒成分基本一致（见图 4），说明标准汤剂在提取、浓缩、干燥过程中各成分种类无明显变化，质量较为稳定，生产工艺稳定可靠。

**2.6 共有峰相关性分析**

采用 SPSS 23.0 软件，以 15 批橘红药材、饮片、标准汤剂和 3 批配方颗粒共 48 个样品各特征峰的峰面积值为变量进行斯皮尔曼相关性分析，结果见表 2。可见，48 个样品中色谱峰峰 1 和峰 2 ~ 5、峰 7 ~ 12；峰 2 和峰 3 ~ 5、峰 7 ~ 12；峰 3 和峰 4 ~ 5、峰 7 ~ 12；峰 4 和峰 5、峰 7 ~ 12；峰 5 和峰 7 ~ 12；峰 7 和峰 8 ~ 12；峰 8 和峰 9 ~ 12；峰 9 和峰 10 ~ 12；峰 10 和峰 11 ~ 12；峰 11 和峰 12；峰 2 和峰 6；峰 6 和峰 9 ~ 12 均具有显著的正相关性。

**2.7 聚类分析评价**

采用 SPSS 23.0 软件，以 15 批橘红药材、饮片、标准汤剂和 3 批配方颗粒共 48 个样品各特征峰面积为变量进行聚类分析。当距离为 15 时，48 批样品可以分为两类，A1 ~ A15、B1 ~ B15 聚为一类，C1 ~ C15、D1 ~ D3 聚为一类（见图 5）。

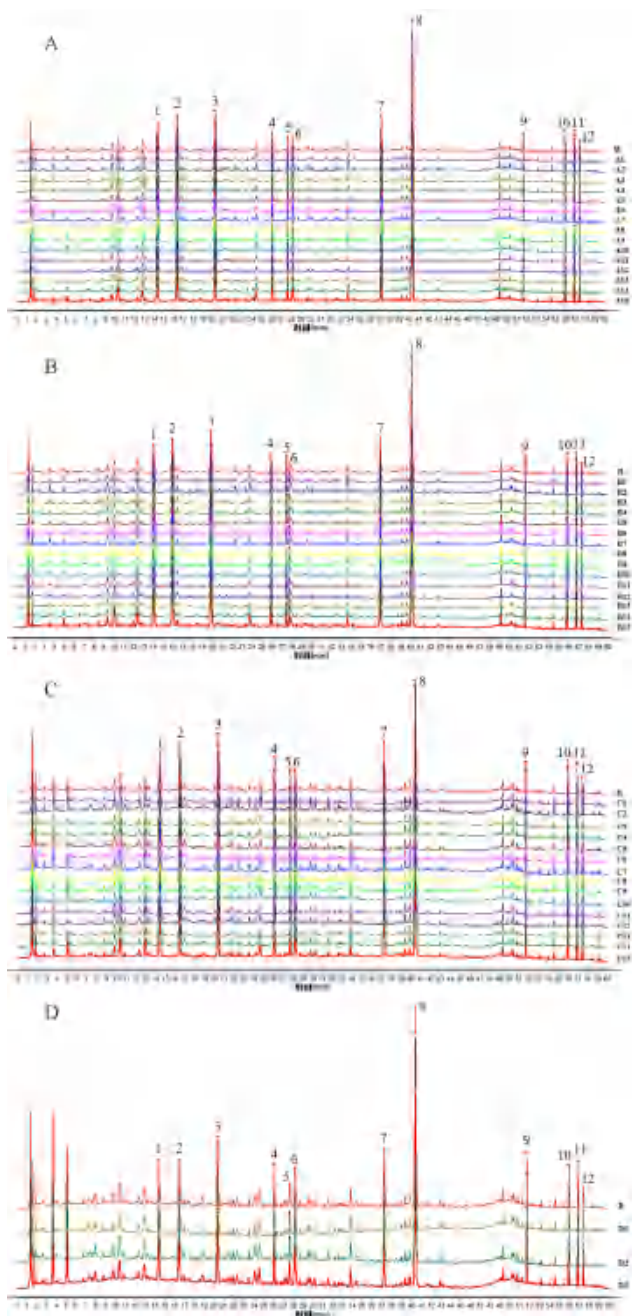


图 3 橘红 (A)、饮片 (B)、标准汤剂 (C) 及配方颗粒 (D) 药材指纹图谱

Fig 3 Fingerprints of Citri Eoxcarpium Rubrum medicinal materials (A), decoction pieces (B), standard decoction (C), and formula granules (D)

- 4. 维索宁-2 (vicenin-2); 6. 阿魏酸 (ferulic acid); 7. 柚皮芸香苷 (narirutin); 8. 橙皮苷 (hesperidin); 10. 川陈皮素 (nobiletin); 11. 3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮 (3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-heptamethoxyflavone); 12. 橘皮素 (tangeretin)

结果表明，橘红药材与饮片无显著差异，证明药典饮片炮制中“除去杂质，切碎”等步骤的合理性，同时标准汤剂与配方颗粒聚类更为接近，符合《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》中配方颗粒具备汤剂的基本属性的基本要求。

表 1 15 批橘红药材、饮片、标准汤剂及 3 批配方颗粒指纹图谱相似度结果

Tab 1 Similarity of 15 batches of Citri Eoxcarpium Rubrum medicinal materials, decoction pieces, and standard decoction and 3 batches of formula granules

药材编号	相似度	饮片编号	相似度	标准汤剂编号	相似度	配方颗粒编号	相似度
A1	0.993	B1	0.992	C1	0.993	D1	1
A2	0.994	B2	0.994	C2	0.993	D2	1
A3	0.992	B3	0.992	C3	0.992	D3	1
A4	0.999	B4	0.998	C4	0.990		
A5	0.995	B5	0.994	C5	0.993		
A6	0.994	B6	0.993	C6	0.990		
A7	0.994	B7	0.993	C7	0.991		
A8	0.995	B8	0.994	C8	0.997		
A9	0.997	B9	0.997	C9	0.992		
A10	0.992	B10	0.992	C10	0.995		
A11	0.998	B11	0.998	C11	0.991		
A12	0.995	B12	0.994	C12	0.996		
A13	0.994	B13	0.993	C13	0.997		
A14	0.996	B14	0.997	C14	0.993		
A15	0.993	B15	0.993	C15	0.988		

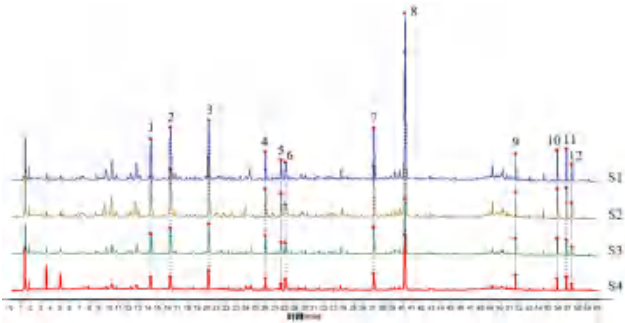


图 4 橘红药材 (S1)、饮片 (S2)、标准汤剂 (S3) 和配方颗粒对照指纹图谱 (S4)

Fig 4 Reference fingerprints of Citri Eoxcarpium Rubrum medicinal materials (S1), decoction pieces (S2), standard decoction (S3) and formula granules (S4) by HPLC

表 2 15 批橘红药材、饮片、标准汤剂、3 批配方颗粒指纹图谱共有峰的相关性分析结果

Tab 2 Correlation of common peaks of 15 batches of Citri Eoxcarpium Rubrum medicinal materials, decoction pieces, standard decoction and 3 batches of formula granules

峰号	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12
峰 1	1											
峰 2	0.990**	1										
峰 3	0.921**	0.902**	1									
峰 4	0.826**	0.815**	0.913**	1								
峰 5	0.898**	0.897**	0.838**	0.696**	1							
峰 6	0.265	0.328*	0.053	0.102	0.236	1						
峰 7	0.842**	0.839**	0.810**	0.675**	0.979**	0.184	1					
峰 8	0.665**	0.671**	0.717**	0.874**	0.542**	0.263	0.561**	1				
峰 9	0.669**	0.672**	0.705**	0.854**	0.440**	0.337*	0.397**	0.894**	1			
峰 10	0.740**	0.745**	0.766**	0.922**	0.549**	0.312*	0.517**	0.927**	0.964**	1		
峰 11	0.663**	0.665**	0.702**	0.874**	0.454**	0.324*	0.415**	0.910**	0.985**	0.977**	1	
峰 12	0.744**	0.753**	0.776**	0.917**	0.574**	0.292*	0.558**	0.951**	0.940**	0.982**	0.952**	1

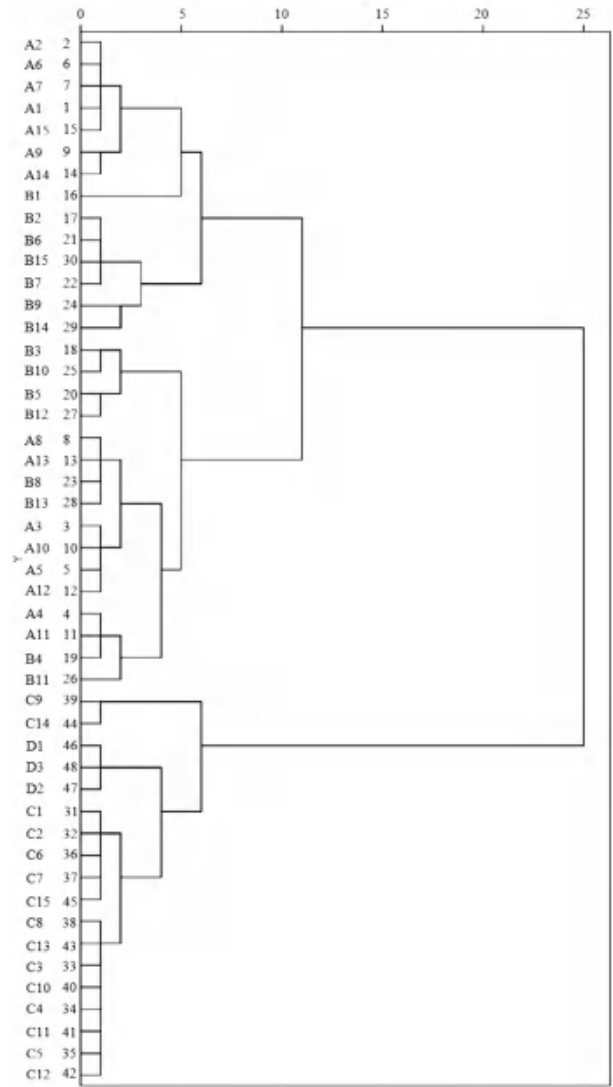


图 5 橘红药材、饮片、标准汤剂和配方颗粒 HPLC 指纹图谱聚类分析树状图

Fig 5 Cluster analysis tree of Citri Eoxcarpium Rubrum medicinal materials, decoction pieces, standard decoction and formula granules

2.8 多批质量分数测定及量值传递关系对橘红药材、饮片、标准汤剂、配方颗粒进

行质量分数测定, 考虑到柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素、3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮、

橘皮素均属于黄酮类成分,属于橘红的主要有效成分,其药理作用基本相同,因此分别计算药材、饮片到标准汤剂冻干粉与药材、饮片到配方颗粒指标成分的总量转移率,结果见表3。15批橘红药材和饮片的指标成分柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素、3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮、橘皮素的总质量分数变化率略有偏差,变化率在0.3%~3.5%,均值为1.4%,其原因主要是橘红药材经除去杂质,切碎后所得,经过炮制切碎后得到饮片,饮片样品的指标成分提取更加完全,质量分数略有增加。15批标准汤剂指标成分的总质量分数为4.37%~6.46%,均值为5.27%,均未超出均值的70%(3.69%)~130%(6.85%)范围;

饮片到标准汤剂的转移率为25.0%~40.4%,均值33.2%,均未超出均值的70%(23.3%)~130%(43.2%)范围,未出现离散。3批配方颗粒指标成分的总质量分数为5.05%~5.34%,均值为5.20%,未超出均值的70%(3.64%)~130%(6.76%)范围;饮片到成品配方颗粒的转移率为21.7%~26.8%,均值为24.8%,未超出均值的70%(17.4%)~130%(32.3%)范围,未出现离散。以上结果说明,橘红指标成分柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素、3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮、橘皮素的总质量分数在药材、饮片、标准汤剂、配方颗粒研究过程中量值传递较好。

表3 质量分数测定及转移率结果

Tab 3 Content and transfer rate

药材编号	橘红原料				标准汤剂				配方颗粒		
	药材总质量分数 /%	饮片编号	饮片总质量分数 /%	质量分数变化率 /%	标准汤剂编号	出膏率 /%	总质量分数 /%	转移率 /%	配方颗粒编号	总质量分数 /%	转移率 /%
A1	7.24	B1	7.36	1.8	C1	30.60	6.01	25.0	D1	5.21	21.7
A2	7.11	B2	7.21	1.4	C2	36.20	5.60	28.2	D2	5.34	26.8
A3	5.44	B3	5.47	0.6	C3	42.60	4.37	34.0	D3	5.05	26.0
A4	4.87	B4	4.96	1.9	C4	32.30	4.99	32.5			
A5	5.65	B5	5.82	2.9	C5	37.20	5.01	32.0			
A6	7.12	B6	7.17	0.8	C6	36.90	5.69	29.3			
A7	7.13	B7	7.19	0.8	C7	41.00	5.44	31.0			
A8	5.05	B8	5.22	3.4	C8	37.50	4.92	35.3			
A9	6.03	B9	6.07	0.8	C9	42.50	5.15	36.1			
A10	5.43	B10	5.49	1.1	C10	36.00	4.63	30.4			
A11	4.84	B11	4.88	0.8	C11	42.40	4.61	40.1			
A12	5.59	B12	5.62	0.6	C12	40.30	5.16	37.0			
A13	5.06	B13	5.24	3.5	C13	40.00	5.28	40.4			
A14	6.10	B14	6.12	0.3	C14	38.20	6.46	40.3			
A15	7.22	B15	7.27	0.7	C15	34.60	5.71	27.2			

### 3 讨论

橘红中主要含有黄酮类、多糖类等成分,针对其主要成分展开指纹图谱方法研究,通过不同色谱柱 [CORTECS T3 (4.6 mm×150 mm, 2.7 μm)、Kromasil 100-5-C18 (4.6 mm×150 mm, 5 μm)、Agilent SB-C18 (4.6 mm×150 mm, 5 μm)、Agilent Eclipse Plus C18 (4.6 mm×150 mm, 5 μm)] 进行筛选及优化, CORTECS T3 (4.6 mm×150 mm, 2.7 μm) 色谱柱下峰信息量最为丰富,对不同酸体系(甲酸、乙酸、磷酸)及酸浓度(0.05%、0.1%、0.15%、0.2%)、不同柱温(25、30、35℃)、不同流速(0.9、1.0、1.1 mL·min<sup>-1</sup>)进行考察,选择乙腈-0.05%磷酸水溶液为流动相、流速为1.1 mL·min<sup>-1</sup>、柱温为30℃时各特征峰分离最佳,并用不同仪器(Dionex UltiMate 3000和Shimadzu Prominence LC-20A)进行验证,各特征峰较为一

致且分离好,相对保留时间无偏差,同时采用二级管阵列检测器(DAD)进行全波段检测,发现在300 nm处,色谱峰数较多且响应值较好。最终选择本文条件,建立的方法简单、高效,可用于橘红的质量评价。

本研究通过建立橘红配方颗粒HPLC指纹图谱,以相似度结合特征峰的相对保留时间,并使用相关性分析、质量分数测定等方法对多批药材、饮片、标准汤剂及配方颗粒质量进行分析,都具有12个特征峰,相似度均大于0.980,说明化学成分组成基本一致,质量较为稳定,生产工艺稳定可靠。参照《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》开展特征图谱中各成分量值传递的相关性分析,标准汤剂作为配方颗粒的基准物质,用以衡量中药配方颗粒与临床汤剂的一致性,其质量参数是分析饮片、标准汤剂、配方颗粒相关性



的依据,能够阐明物质传递的情况,从而保证药效成分的有效转移<sup>[15]</sup>。斯皮尔曼相关性分析检验了共有峰两两之间的关系强度,表明大部分共有峰成显著正相关,说明橘红药材、饮片、标准汤剂和配方颗粒在化学成分类型以及成分的含量上没有明显的差异,可以进行较稳定的质量传递,与“中药配方颗粒与其相对应的单味中药饮片临床汤剂基本一致”的要求相符合。由聚类分析的结果可知,不同批次橘红药材、饮片较分散,主要由产地不同、特征成分的含量积累不同造成的;不同批次标准汤剂、配方颗粒之间较紧密,表明配方颗粒生产制备过程中,各特征峰均能稳定传递,没有发生明显的降解或者增加的情况,制得的配方颗粒质量水平与传统标准汤剂基本一致,且从特征峰的个数上看,饮片与标准汤剂、配方颗粒在化学成分的一致性。对橘红药材、饮片、标准汤剂、配方颗粒进行指标成分柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素、3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮、橘皮素的质量分数测定,15批橘红药材经过炮制切碎后,饮片样品的指标成分提取更加完全,质量分数略有增加。多批次样品指标成分的总质量分数与转移率未出现离散,说明橘红指标成分的总质量分数在药材、饮片、标准汤剂、配方颗粒研究过程中量值传递较好。

中药饮片的质量与用药的准确性在临床运用上极其重要,但是由于部分中药饮片外观相似,很容易出现混淆,导致用药错误,引起不良反应的发生。橘红、陈皮是较常用的中药饮片,两者来源于同属同科植物,陈皮是橘的干燥成熟果皮,橘红为干燥外层果皮。虽两者功效有相似之处,同为理气燥湿化痰药,但在临床应用时仍然有不少差别。生活中,人们经常将橘红与陈皮(橘皮)混为一谈,使用较混乱。陈皮药材分为陈皮和广陈皮。陈皮的含量指标成分为橙皮苷,广陈皮的含量指标成分为橙皮苷、川陈皮素、橘皮素,由本研究建立的方法获得的橘红特征图谱可知,橘红均含有以上化学成分,在含量测定上难以达到区分的效果。因此本研究进一步对陈皮与橘红的特征图谱的区分研究进行分析,结果表明,橘红与陈皮、广陈皮呈现同样的特征峰,没有明显的差别;但在相似度方面,多批次和生产验证中的橘红样品均大于0.940,而陈皮和广陈皮样品的相似度小于0.900,明显低于橘红,可为橘不同采收部位的区分作为参考依据,对于提

高易混淆中药饮片的鉴别准确率,保证患者用药安全具有现实意义。

本研究建立了橘红药材、饮片、标准汤剂和配方颗粒指纹图谱,该方法检测的图谱特征峰多且检测时间短,专属性强,重复性好,运用多种统计方法对橘红药材、饮片、标准汤剂和配方颗粒四者的相关性进行分析,结果表明四者具有良好的相关性;又通过质量分数测定对橘红进行质量评价,全面地反映了橘红配方颗粒生产全过程的量值传递规律,本研究可为橘红配方颗粒生产制备过程中从原料到成品阶段的质量评价和质量控制提供参考依据。

### 参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版.一部[S]. 2020: 395.
- [2] 屈杰, 王宝家, 孔文霞, 等. 橘红及化橘红的本草考证[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(11): 4434-4436.
- [3] 金世元. 橘红的品种及今昔药用情况[J]. 首都医药, 2005, 12(5): 41-42.
- [4] 朱丽娜, 李炜, 杨术, 等. 中药饮片橘红的质量标准[J]. 中国药师, 2009, 12(10): 1490-1492.
- [5] 张立坚, 蔡春, 王秀季. 橘红珠、橘红及化橘红挥发油成分的比较[J]. 广东医学院学报, 2006, 25(4): 344-345.
- [6] 王可, 尤良震, 胡静波, 等. 橘红多糖增强小鼠免疫功能及抗疲劳作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(21): 180-182.
- [7] 陈岩, 胡燕琴. 橘红与化橘红临床药用不同[J]. 北京中医, 2001, 20(2): 43.
- [8] 何培芸. 橘皮及橘络、橘核、橘白、橘红、青皮在临床的运用[J]. 陕西中医, 2006, 27(1): 103.
- [9] 肖尔建, 李立彩, 张伟祺, 等. 橘红药物化学成分对 DNA 氧化损伤抑制作用研究[J]. 广州化工, 2023, 51(4): 55-58.
- [10] 张恒, 饶坤林, 向韩. 橙皮苷药理活性研究进展[J]. 中南药学, 2016, 14(10): 1097-1100.
- [11] 张清波, 笔雪艳, 曲范娜. 中药配方颗粒质量控制概况与思考[J]. 中国食品药品监管, 2022, 20(3): 42-46.
- [12] 何永佳. 橘红超临界 CO<sub>2</sub> 萃取物化学成分分析[J]. 中药材, 2003, 26(3): 182-183.
- [13] 药雅俊, 张府君, 郝晶晶, 等. 橘红配方颗粒质量标准研究[J]. 广州化工, 2020, 48(17): 71-73.
- [14] 陈永刚, 林励. 柑橘属常用中药黄酮类成分 HPLC 指纹图谱研究与比较[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(19): 2660-2665.
- [15] 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.

(收稿日期: 2023-09-05; 修回日期: 2023-12-02)

# 药用辅料甘油三乙酯中 7 种 ICH 控制元素测定方法的建立

张悦<sup>1,3</sup>, 郑金凤<sup>1,3</sup>, 刘雁鸣<sup>1,3</sup>, 石蓉<sup>1,3</sup>, 谢莹莹<sup>1,2,3\*</sup>, 李娟<sup>2\*</sup> (1. 湖南省药品检验检测研究院, 长沙 410001; 2. 湖南省药品审核查验中心, 长沙 410001; 3. 国家药品监督管理局药用辅料工程技术研究重点实验室, 长沙 410001)

**摘要:** **目的** 建立电感耦合等离子体质谱法 (ICP-MS) 测定药用辅料甘油三乙酯中钒 (V)、钴 (Co)、镍 (Ni)、砷 (As)、镉 (Cd)、铅 (Pb)、汞 (Hg) 元素的含量。**方法** 样品经微波消解处理后, 按拟订的仪器工作条件, 采用 ICP-MS 法进行测定, 并通过在线加入内标元素来校正测量结果。**结果** 各元素在  $1 \sim 50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  与响应值线性关系良好 ( $r$  在  $0.998 \sim 0.999$ ); 回收率均在  $80.7\% \sim 105.8\%$  ( $n = 6$ )。**结论** 本方法准确度高、重现性好, 可用于药用辅料甘油三乙酯中多种元素杂质的含量测定。

**关键词:** 甘油三乙酯; 电感耦合等离子体质谱法; 元素杂质; ICH Q3D; 药用辅料; 定量分析  
**中图分类号:** R927 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)08-2170-03  
**doi:** 10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.032

## Determination of 7 elements in pharmaceutical excipient triacetin by ICH requirement

ZHANG Yue<sup>1,3</sup>, ZHENG Jin-feng<sup>1,3</sup>, LIU Yan-ming<sup>1,3</sup>, SHI Rong<sup>1,3</sup>, XIE Ying-ying<sup>1,2,3\*</sup>, LI Juan<sup>2\*</sup> (1. Hunan Institute for Drug Control, Changsha 410001; 2. Hunan Drug Inspection Center, Changsha 410001; 3. NMPA Key Laboratory for Pharmaceutical Excipients Engineering Technology Research, Changsha 410001)

**Abstract: Objective** To establish the inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) to determine V, Co, Ni, As, Cd, Pb and Hg in pharmaceutical excipient triacetin. **Methods** The elements in triacetin were determined by ICP-MS after the microwave digestion treatment. The measurement results were corrected through online adding the internal standard solution. **Results** The standard curves showed good linearity ( $r$  was  $0.998 \sim 0.999$ ). The recovery was  $80.7\% \sim 105.8\%$  ( $n = 6$ ). **Conclusion** The method has good accuracy and reproducibility, and can be used for the determination of element impurities in pharmaceutical excipient triacetin.

**Key words:** triacetin; ICP-MS; element impurity; ICH Q3D; pharmaceutical excipient; quantitative analysis

甘油三乙酯又称三醋酸甘油酯、甘油三乙酯、三醋精, 英文名为 triacetin, 为无色澄清稍具黏性的油状液体。本品收载于 2020 年版《中国药典》四部 (ChP2020)<sup>[1]</sup>, 美国药典 (USP 现行版)<sup>[2]</sup>、英国药典 2021 年版 (BP2021)<sup>[3]</sup> 和欧洲药典 11.0 版 (EP11.0)<sup>[4]</sup>, 仅 ChP2020 设置有重金属、砷盐检查项。ChP2020 重金属检查法主要控制银 (Ag)、砷 (As)、铋 (Bi)、镉 (Cd)、铜

(Cu)、汞 (Hg)、钼 (Mo)、铅 (Pb)、铈 (Sb) 和锡 (Sn) 等 10 种元素杂质, 该方法存在专属性差、灵敏度低等问题, 已不能满足药品安全性控制的需要。

元素杂质的控制是药品整体控制策略的一部分, 用以确保药品中元素杂质水平不超过允许日暴露量 (PDE)<sup>[5-6]</sup>。近年来, 各国药典与相关指导原则都对元素杂质检查提出了更高的要求。

作者简介: 张悦, 女, 主管药师, 主要从事药用辅料检验检测, email: 873813723@qq.com \*通信作者: 谢莹莹, 女, 主管药师, 主要从事药用辅料检验检测, email: 276468687@qq.com; 李娟, 女, 高级政工师, 主要从事药品、化妆品、医疗器械检查, email: 38209181@qq.com

ICH Q3D 最新版本指出原料药和辅料中的元素杂质被引入到药品中的可能性应在风险评估中反映<sup>[7]</sup>。故辅料中元素杂质的风险应予以重视。本品由甘油与乙酸酯化而得，为合成来源的辅料，根据前期调研显示，生产工艺中无有意添加的元素杂质，初步评估元素杂质安全风险较低。本品作为溶剂、增塑剂和保湿剂等，主要应用于片剂、胶囊剂。根据 ICH Q3D 规定，对口服给药途径，应评估药品中是否可能存在 1 类 (As、Cd、Pb、Hg) 和 2A 类钒 (V)、钴 (Co)、镍 (Ni) 元素杂质，其他非有意添加元素，无需进行风险评估。因此，本次研究采用电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 法测定 As、Cd、Pb、Hg、Co、Ni、V 这 7 种元素杂质含量，快速检测样品中的主要风险元素杂质，为本品的风险评估提供依据，为质量控制提供参考。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

iCAPQc 电感耦合等离子体质谱分析仪 (赛默飞仪器公司); ML204 电子分析天平 (Mettler Toledo, 精度: 0.1 mg)。

### 1.2 试剂

硝酸 (优级纯, 国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20220321); V、Co、Ni、As、Cd、Pb、Hg 多元素标准溶液 (北京北方伟业计量技术研究院, 质量浓度均为 1000  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 批号: 20210726); 钪 (Sc)、铟 (In)、锗 (Ge)、Bi、铑 (Rh)、铽 (Tb)、镥 (Lu) 等混合内标溶液 (安捷伦有限公司, 质量浓度均为 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 批号: 4-75MKBY2)。甘油三乙酯为市售样品。

## 2 方法与结果

### 2.1 仪器参数

射频功率: 1200 W; 射频匹配: 2.0 V; 雾化室温度: 2  $^{\circ}\text{C}$ ; 仪器使用纯氦气作为碰撞气体; 蠕动泵转速: 40.0  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 扫描次数: 200; 取样时间: 90 s, 冲洗时间: 40 s; 采集模式: 单一动能歧视效应 (KED) 碰撞池模式。

待测元素质谱参数:  $^{51}\text{V}$ 、 $^{59}\text{Co}$ 、 $^{60}\text{Ni}$ 、 $^{75}\text{As}$ 、 $^{111}\text{Cd}$ 、 $^{208}\text{Pb}$ 、 $^{202}\text{Hg}$ ; 内标元素质谱参数:  $^{21}\text{Sc}$ 、 $^{115}\text{In}$ 、 $^{72}\text{Ge}$ 、 $^{209}\text{Bi}$ 、 $^{103}\text{Rh}$ 、 $^{159}\text{Tb}$ 、 $^{175}\text{Lu}$ 。

### 2.2 溶液的制备

标准溶液: 取 V、Co、Ni、As、Cd、Pb、Hg 多元素标准溶液适量, 用 2% 硝酸溶液定量稀释制成 1、3、10、30、50  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  系列标准溶液。

供试品溶液: 取本品 0.5 g, 精密称定, 置聚

四氟乙烯消解罐中, 加 8.0 mL 硝酸, 90  $^{\circ}\text{C}$  预消解 4 h, 冷却, 放入微波消解仪中消解 2 h 后, 取出, 110  $^{\circ}\text{C}$  赶酸至消解液约 0.5 mL, 用 2% 硝酸转移至 50 mL 量瓶中, 定容, 即得。

空白溶液: 除不加入待测样品外, 其余操作同供试品溶液的制备。

内标溶液: 精密量取混合内标液适量, 用 2% 硝酸溶液定量稀释成每 1 mL 含 Sc、In、Ge、Bi、Rh、Tb、Lu 各 100 ng 的内标溶液。所有的空白溶液、标准溶液和供试品溶液都通过蠕动泵在线加入内标溶液。

### 2.3 标准曲线、检测限和定量限

取“2.2”项下系列标准溶液, 直接测定, 以各元素理论浓度为横坐标 ( $x$ ), 各元素离子响应值 ( $y$ , 内标校正后结果) 为纵坐标, 绘制标准工作曲线。结果各元素在 1 ~ 50  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的质量浓度范围内与响应值呈良好的线性关系。取空白溶液连续测定 11 次, 计算样品中各元素检测限与定量限, 结果见表 1。

表 1 各元素的标准曲线、检测限与定量限结果 ( $n = 6$ )

Tab 1 Standard curve, detection limit, and quantification limit of each elements ( $n = 6$ )

元素	标准曲线方程	$r$	检测限 / ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	定量限 / ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
V	$y = 1.3 \times 10^4 x + 9.8 \times 10^2$	0.9991	0.35	1.06
Co	$y = 9.1 \times 10^3 x + 22.6$	0.9992	0.17	0.51
Ni	$y = 1.9 \times 10^3 x + 3.1 \times 10^2$	0.9981	0.80	2.43
As	$y = 1.2 \times 10^3 x - 10.0$	0.9982	0.65	1.98
Cd	$y = 1.7 \times 10^3 x + 13.9$	0.9984	0.19	0.57
Hg	$y = 1.6 \times 10^3 x + 12.7$	0.9983	0.31	0.96
Pb	$y = 1.1 \times 10^4 x + 8.0 \times 10^2$	0.9982	1.09	3.30

注 (Note): ND. 未检出 (Not detected)。

### 2.4 精密度试验

取“2.2”项下 10  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  多元素标准溶液, 连续进样 6 次, 以各元素离子响应值为考察指标, 结果各元素 RSD 均小于 4%, 表明仪器的精密度良好。

### 2.5 重复性试验

精密称取样品 (批号: 73603) 0.5 g, 平行制备 6 份供试品溶液, 以样品中各元素含量 ( $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 为考察指标。结果样品中 Hg、Co、Ni 含量分别为 0.4、0.4、8.6  $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ , RSD 分别为 4.5%、5.4%、3.9%; 其他元素未检出。

### 2.6 加样回收试验

取样品 (批号: 73603) 0.5 g, 精密加入多元素标准溶液 (Hg、V、Co、Ni、As、Cd、Pb: 0.5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 1.0 mL, 照“2.2”项下方法处理后进样测



定。结果 7 种元素平均回收率在 80.7% ~ 105.8%, RSD 在 1.7% ~ 6.4%, 符合要求。

### 2.7 样品测定

取 7 批样品制备供试品溶液, 进样测定, 计算样品中各元素的含量, 结果见表 2。7 批样品中 7 种元素杂质含量远低于 ICH Q3D 推荐的口服允许量。

表 2 样品测定结果 ( $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ )  
Tab 2 Sample determination ( $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ )

编号	企业	批号	As	Cd	Pb	Hg	Co	Ni	V
J1	A	75597	14.08	0.18	45.71	5.38	9.11	3.80	12.78
J2	A	73603	ND	ND	ND	0.37	0.39	8.58	ND
J3	A	71432	ND	ND	ND	ND	0.74	ND	ND
J4	B	20210401	ND	ND	ND	ND	0.22	2.30	ND
J5	B	20210402	ND	0.25	ND	ND	ND	ND	ND
J6	B	20210403	ND	0.56	ND	ND	1.68	16.95	ND
J7	C	K53639700	ND	ND	ND	ND	ND	20.89	ND

注 (Note): ICH Q3D 推荐的口服允许质量浓度为 As  $1.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、Cd  $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、Pb  $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、Hg  $3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、Co  $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、Ni  $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、V  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (ICH Q3D recommends oral allowable concentrations: As  $1.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , Cd  $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , Pb  $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , Hg  $3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , Co  $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , Ni  $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , and V  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).

## 3 讨论

### 3.1 检测元素种类的选择

ICH Q3D 根据元素的毒性 (PDE) 及其在药品中出现的可能性, 将 24 种需要监控的元素杂质分为 3 类 (1 类、2 类、3 类), 其中 2 类进一步分成 2A 类和 2B 类亚类。1 类元素在药品生产中为限制使用或禁用, 所有潜在元素杂质来源以及给药途径都需要进行风险评估。2 类元素为给药途径依赖型的人体毒素, 2A 类元素为出现在药品中的相对可能性高的元素, 对所有潜在元素杂质来源以及给药途径都需要进行风险评估。甘油三乙酯为合成来源, 无有意添加的元素杂质, 主要应用于片剂、胶囊剂。因此, 本文选择 1 类、2A 类共 7 种元素进行检测。

### 3.2 样品的制备

本品在水中易溶, 直接采用 2% 硝酸稀释样品后测定, 基体干扰严重, 回收率低, 无法满足试验要求。以常用的硝酸、盐酸、王水 (盐酸、硝酸体积比为 3:1) 为溶剂进行微波消解考察。结果显示, 样品在 8.0 mL 硝酸或 8.0 mL 王水体

系中预消解 4 h 后, 再进行微波消解处理, 样品能完全消解, 回收率能达到 ChP2020 相关规定。预消解过程中, 可加入玻璃珠或瓷片防止暴沸, 消化产生大量泡沫时, 应立即减小火力。采用微波消解处理, 操作人员能避免接触酸雾, 自动化程度高, 但操作过程中应避免过高压力的设置, 如样品消解不完全, 可适当延长预消解过程。简便考虑, 选用硝酸进行消解。

### 3.3 内标元素的选择

采用 ICP-MS 法进行多元素分析时, 容易受多原子离子的干扰, 造成严重的基体效应<sup>[8]</sup>。在线内标法可有效修正不同基体对测试的影响, 根据标准 HJ 700—2014、HJ 803—2016 及相关文献筛选内标元素<sup>[9-10]</sup>,  $^{21}\text{Sc}$ 、 $^{72}\text{Ge}$ 、 $^{103}\text{Rh}$ 、 $^{115}\text{In}$  对于低质量段元素具有较好的校正效果,  $^{159}\text{Tb}$ 、 $^{175}\text{Lu}$ 、 $^{209}\text{Bi}$  对于高质量段元素具有较好的校正效果。因此, 采用 Sc、Ge、Rh、In、Tb、Bi、Lu 混合内标校正基体效应。

## 4 小结

本文建立了 ICP-MS 法测定甘油三乙酯中 7 种 ICH 控制元素的测试方法, 该方法具有灵敏度高、分析速度快、准确性高等优点。结果显示, A 企业 3 批样品批间差异较大, 生产工艺控制有待进一步完善, 但 7 种元素杂质含量远低于 ICH Q3D 推荐的口服允许量, 说明该品种元素杂质风险较低。

## 参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 634.
- [2] 美国药典委员会. 美国药典 (USP 现行版) [S]. 2023: 1-2.
- [3] 英国药典 (BP. 2021) [S]. 2021: 5421.
- [4] 欧洲药典 (EP. 11.0) [S]. 2021: 4265.
- [5] 朱俐, 赵瑜, 姚尚辰, 等. 药物中元素杂质检测技术研究最新进展 [J]. 分析测试学报, 2020, 39 (4): 547-554.
- [6] 庄目德. ICH Q3D 指南应用与药品杂质元素风险评估实例研究 [J]. 海峡药学, 2019, 31 (2): 92-95.
- [7] ICH Q3D: Guideline for elemental impurities [EB/OL]. [2023-02-15] (2024-05-06). <https://www.docin.com/p-939673436.html>.
- [8] 谢莹莹, 刘雁鸣, 张悦, 等. ICP-MS 法测定透析用醋酸钠中铝元素的含量 [J]. 中南药学, 2021, 19 (11): 2406-2408.
- [9] 中华人民共和国国家环境保护标准 [S]. HJ 700—2014.
- [10] 中华人民共和国国家环境保护标准 [S]. HJ 803—2016.

(收稿日期: 2023-10-27; 修回日期: 2023-11-24)

# 药用玻璃颗粒耐水性测定的能力验证研究

齐艳菲<sup>1</sup>, 李晓宇<sup>2</sup>, 谢兰桂<sup>1</sup>, 赵霞<sup>1\*</sup>, 杨会英<sup>1</sup> (1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 2. 中国药科大学, 南京 211198)

**摘要:** **目的** 设计和组织药用玻璃颗粒耐水性测定的能力验证项目 (No. NIFDC-PT-420), 评价参加者对玻璃类包材耐水性测定的能力。**方法** 按照中国合格评定国家认可委员会 (CNAS) 规定的程序进行样品制备, 发样前进行均匀性检验, 通过随机发放不同的干扰样品防止数据串通、伪造。采用稳健统计方法, 以所有参加者报告结果的中位值为指定值, 以标准化四分位距为能力评定标准差, 计算  $z$  比分数, 对上报结果进行评定。**结果** 样品的均匀性符合能力验证项目要求, 42 家实验室, “满意” 结果 34 家, “可疑” 结果 4 家, “不满意” 结果 4 家, 满意率为 81.0%。**结论** 本次能力验证客观科学地评估了全国部分实验室药包材的检验能力, 部分企业实验室的检测能力还有待提高, 药品监管部门须持续关注该类实验室的检验能力建设。

**关键词:** 药用玻璃; 颗粒耐水性; 能力验证

中图分类号: R95, R927 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)08-2173-04  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.033

## Hydrolytic resistance of pharmaceutical glass grains

QI Yan-fei<sup>1</sup>, LI Xiao-yu<sup>2</sup>, XIE Lan-gui<sup>1</sup>, ZHAO Xia<sup>1\*</sup>, YANG Hui-ying<sup>1</sup> (1. National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing 211198)

**Abstract: Objective** To design and organize the ability test project (No. NIFDC-PT-420) to determine the hydrolytic resistance of pharmaceutical glass grains and evaluate the participants' ability to determine hydrolytic resistance of glass packaging materials. **Methods** The samples were prepared according to the procedures specified in the China National Accreditation Service for Conformity Assessment. The uniformity was tested before the sample distribution. Different interference samples were randomly distributed to prevent data collusion and forgery. Robust statistical method and  $z$  scores were used to evaluate the reported results.  $z$  scores were calculated with the median of all participants' reported results as the specified value and the standardized quartile distance as the standard deviation in the ability evaluation. **Results** The uniformity of the samples met the requirements of the proficiency test. Among the 42 laboratories, 34 laboratory results were satisfactory, 4 were suspicious and 4 were not qualified. The satisfaction rate was 81.0%. **Conclusion** This proficiency test objectively and scientifically evaluates the testing ability of pharmaceutical packaging materials in some laboratories in China. The testing ability of some enterprise laboratories need to be improved and drug regulatory authorities should pay attention to the testing ability building in such laboratories.

**Key words:** pharmaceutical glass; hydrolytic resistance of glass grain; proficiency test

近年来, 随着我国医药工业的快速发展和药包材关联审评制度的持续推进, 制药行业对药包材质量控制的关注度不断提高, 越来越多的药品生产企业及第三方检测机构获得中国合格评定国家认可委员会 (CNAS) 药包材的检验检测资质。

能力验证 (proficiency test, PT) 是利用实验室间比对, 按预先制订的指导原则评价参加者能力的活动。能力验证是评价和监控检验检测机构技术能力的有效手段, 同时还可以有效帮助实验室识别自身在检测过程中存在的技术漏洞, 进而提升

基金项目: 中国食品药品检定研究院学科带头人培养基金 (No.2023X9)。

作者简介: 齐艳菲, 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事药包材检测及质量控制, email: qyfifdc@163.com \*通信作者: 赵霞, 女, 主任药师, 主要从事药包材检测及质量控制, email: rayradix@126.com

检验检测质量<sup>[1-3]</sup>。

玻璃类药包材具有良好的理化性质，是中国应用最早、覆盖面最广的药用包装材料之一。颗粒耐水性是药用玻璃容器化学稳定性监测的关键性能指标之一，用于评价药用玻璃材质耐受水侵蚀的能力<sup>[4-6]</sup>。颗粒耐水性方法标准收载于《中国药典》2020 年版四部，通过滴定浸提液测定<sup>[4]</sup>。虽然，滴定法在检测领域是常见的检测方法，但样品制备过程中仍然存在容易忽略的操作要点，较易出现结果偏差。此外，玻璃颗粒耐水性的测定结果能代表性地反映各检测实验室玻璃类药包材的检测能力，间接反映各检测实验室在药包材检测领域的整体水平。基于以上考量，2023 年中国食品药品检定研究院（简称中检院）按照能力验证系列文件的有关要求，在各级药检机构、相关药包材、药品生产企业和第三方检验机构内组织实施药包材领域“玻璃颗粒耐水性测定”能力验证计划（NIFDC-PT-420）。本文概述了本计划的组织与实施情况，并对结果进行技术分析和总结，为管理部门判断实验室水平提供基础数据，同时通过原始记录的深入解读，向参加的实验室提出技术改进的建议，以期其能有针对性地改善与提高。

## 1 仪器与试药

本项目中各参加实验室使用的仪器型号不同，以下仅列出本实验室使用的仪器及型号：BXM-VE-P 型立式压力蒸汽灭菌器（上海博讯医疗生物仪器股份有限公司）；电子天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）；DKN612C 型鼓风干燥箱（日本亚玛拓科技）；甲基红钠（TCI 试剂）；乙醇（国药化学试剂有限公司）。

能力验证样品：本次能力验证样品为药用玻璃碎片，以塑料桶进行包装，每桶约 500 g。为防止数据的串通与伪造，设计了 2 种干扰样品。样品共分为 3 种，为方便区分，标记为样品 A、样品 B 和样品 C，其中样品 A 是最终进行数据统计的真实样品，样品 B 和样品 C 均为干扰样品。每种样品各 200 份，于室温下保存。样品编号分别为 ANP4200001-A ~ ANP4200200-A、ANP4200001-B ~ ANP4200200-B、ANP4200001-C ~ ANP4200200-C。

## 2 方法与结果

### 2.1 样品均匀性和稳定性研究<sup>[4, 7-8]</sup>

依据能力验证样品均匀性和稳定性评价指南（CNAS-GL003：2018）和该项目自身特点，对样品的均匀性和稳定性进行评价。在样品发出前，将 200 瓶样品按顺序编号，从中随机数取样 15 瓶，作为能力验证均匀性检验用样品。参照《中国药典》2020 年版四部 < 4001 > 121 °C 玻璃颗粒

耐水性测定法进行测定，每份样品重复测定 3 次，为了减小测量中定向变化的影响，样品的所有重复测试按随机次序进行。参加实验室数据返回后，对样品的均匀性进一步采用  $S_s \leq 0.3\sigma$  准则进行评价。

采用单因素方差分析评价均匀性， $F(1.61) < F$  临界值 (2.04)，表明在 95% 置信水平下，样品均匀性符合要求。参加实验室数据返回后，满足  $S_s \leq 0.3\sigma$ ，进一步证明样品均匀。

由于样品为玻璃材质，具有较好的稳定性，在样品制备、分装及运输等过程中，温湿度的变化不会影响玻璃样品的理化性能。因此，本次能力验证所用样品无需进行稳定性考察<sup>[8]</sup>。

### 2.2 样品的分发和要求

能力验证组织者通过中国药检能力验证服务平台，赋予每个参加实验室临时随机且具有唯一性代码，按随机分配的方式向每个参加实验室提供 1 份样品，每份样品 2 瓶，采用样品 A + B 与 A + C 的组合形式，通过中国邮政 EMS 分发给每个实验室。要求收到样品后在能力验证平台进行样品确认，将样品室温保存。

要求其参照《NIFDC-PT-420 玻璃颗粒耐水性测定能力验证计划作业指导书》，按《中国药典》2020 年版四部 < 4001 > 121 °C 玻璃颗粒耐水性测定法测定。检测完成后提交 3 份平行测定的颗粒耐水性结果并报告均值，均值保留小数点后 2 位。

### 2.3 参加实验室情况

共有 43 家实验室报名，其中 1 家实验室退出本项能力验证活动，样品未开封并退回，剩余 42 家实验室均按时提交了结果报告。参加本次能力验证的实验室分布于我国 19 个省 / 自治区 / 直辖市，主要包括省市级药品、医疗器械检验机构（占比 45%）、药品生产企业（占比 26%）、药包材生产企业（占比 17%）及其他检测机构、实验室（占比 12%），每个省 / 自治区 / 直辖市的各级实验室分布见图 1。

### 2.4 结果的统计分析和评定

以 42 家实验室报送的结果统计总体，分布直方图见图 2，数据呈单峰分布。计算极大值、极小值、均值、相对标准偏差（%）、中位值、标准化四分位距等统计量，详见表 1。

依据 CNAS-GL002 能力验证结果的统计处理和评价指南<sup>[9]</sup>和 GB/T 28043—2019/ISO 13528：2015 利用实验室间比对进行能力验证的统计方法<sup>[10]</sup>，采用稳健统计方法进行运算，以减少正态分布假设或异常值（离群值）对总体的影响<sup>[11-12]</sup>。以所有参加实验室报告结果的中位值为指定值（ $X$ ），以标准化四分位距（nIQR）为能力



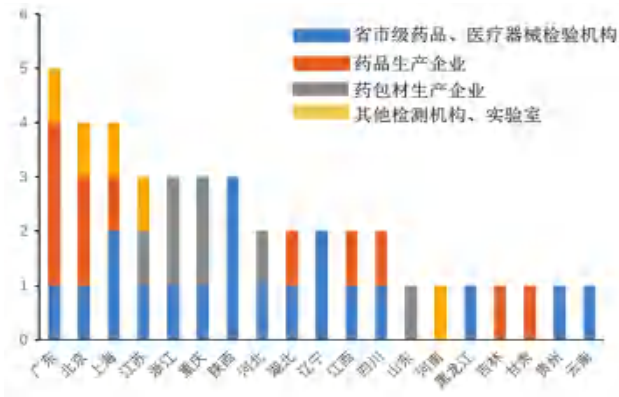


图 1 参加实验室分布情况  
Fig 1 Distribution of participating laboratory

表 1 检测结果的统计量汇总  
Tab 1 Summary of test results for statistics

参加实验室数量	最大值	最小值	平均值	相对标准偏差	中位值	标准化四分位距
42 个	7.72 mL	3.10 mL	5.88 mL	10.4%	5.95 mL	0.25 mL

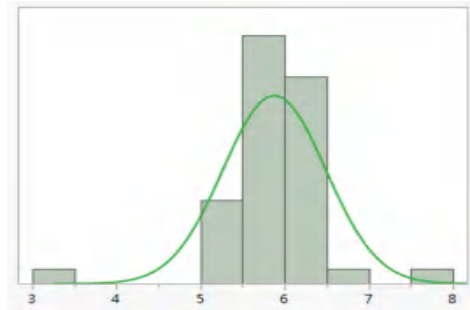


图 2 参加单位结果分布直方图  
Fig 2 Distribution histogram of participating laboratories

评定标准差  $\sigma$ 。指定值的标准不确定度按照公式  $\mu_x = 1.25 \times s^* / \sqrt{p}$  计算,  $p$  为实验室的个数 (42),  $s^*$  为能力验证结果的稳健标准差 (0.25)。指定值的标准不确定度  $\mu_x = 0.048$ 。  $\mu_x < 0.3\sigma$  (0.075), 指定值的标准不确定度可忽略不计。

按以下公式计算得各参加实验室的  $z$  比分数, 以  $z$  比分数作为统计量, 对各检测结果进行评价。42 个反馈结果中, 34 家实验室的检测结果为“满意” ( $|z| \leq 2.0$ ), 满意率为 81.0%; 4 家实验室结果为可疑 ( $2.0 < |z| < 3.0$ ), 占比 9.5%; 4 家实验室结果不满意 ( $|z| \geq 3.0$ ), 占比 9.5%。

$$z = (x - X) / \sigma$$

式中:  $x$  为参加者的测定值;  $X$  为指定值;  $\sigma$  为能力评定标准差。

为了清晰地表示各参加实验室的结果, 将  $z$  值按大小顺序排列做柱状图 (见图 3)。根据柱状图, 每个参加实验室可以将结果与其他实验室的结果进行比较, 了解其结果在本次能力验证计划中所处的水平。代码为 145、826、367、007、877、284 的 6 家实验室  $z$  值均小于 -2.0, 测定

结果偏低, 其中代码为 145 的实验室,  $z$  值达 -11.4, 测定结果严重偏离真实值。代码为 258、700 的实验室  $z$  值均大于 2.0, 测定结果偏高。另外代码为 464 的实验室,  $z$  值为 -2.0, 虽然结果为满意, 但应提高警惕, 查找试验过程中引起测定结果偏低的因素, 以纠正测定结果的偏差。

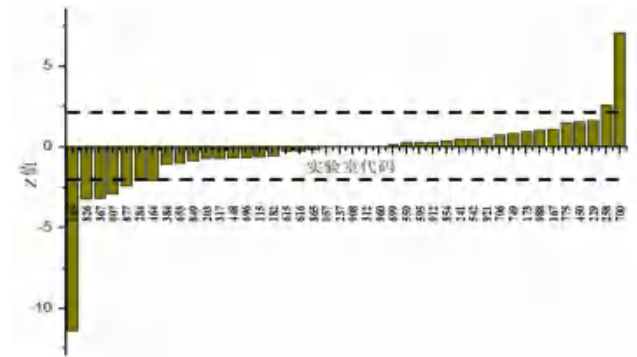


图 3 实验室  $z$  比分数柱状图 (实验室代码 -  $z$  值)  
Fig 3 Laboratory  $z$ -score bar chart (No- $z$ )

### 3 讨论

#### 3.1 参加实验室情况分析

本次能力验证计划的 42 家实验室分布于全国 19 个省/自治区/直辖市, 尚未覆盖全国, 基于药用玻璃包装容器使用的普遍性, 参加实验室的覆盖率还有待进一步提高。统计 2017 年至 2022 年药包材能力验证计划中药品及药包材生产企业实验室和第三方检测机构的参与比例发展情况, 企业实验室的占比从 2017 年的 11% 逐步增长至 2022 年的 28%, 并在 2023 年的本次能力计划中, 占比升至 55%。企业实验室参与率逐年升高的趋势, 反映出药包材质量控制与检验检测受到越来越广泛的关注。特别是药品生产企业实验室的参与度逐年提高, 本次能力验证计划中占比 26%, 突显了药品生产企业在加强药包材质量控制和研究方面所扮演的角色日渐重要, 彰显其作为药品质量第一责任人的责任感和积极性。

#### 3.2 本次能力验证计划的结果分析

从评定结果来看, “不满意” 结果的 4 家实验室均为企业检测实验室, 其中 2 家为生物制药公司实验室 (占药品生产企业实验室总数的 18%), 2 家为第三方检测公司 (占第三方检测公司实验室总数的 40%)。“可疑” 结果的 4 家实验室, 1 家为省级药检单位 (占省市级药品、医疗器械检验机构总数的 5%), 剩余 3 家均为企业检测实验室, 包括 1 家药包材生产企业实验室 (占药包材生产企业实验室总数的 14%)、2 家生物制药公司实验室 (占药品生产企业实验室总数的 18%)。

从以上结果可以看出, 省市级药品、医疗器械检验机构满意率良好 (满意率为 95%)、药包材生

产企业实验室的满意率一般(满意率为 86%),而药品生产企业与第三方检测公司实验室满意率较差(分别为 64%、60%)。药品生产企业与第三方检测公司对药包材检验检测的能力仍需进一步提升。

### 3.3 产生不满意/可疑结果的原因分析

玻璃颗粒耐水性的测定主要分为三个步骤,一是玻璃颗粒的制备,二是供试液的制备,三是对供试液进行滴定。通过原始记录的深入解读,对产生不满意/可疑结果的原因进行分析。

在玻璃颗粒的制备方面,本次能力验证的样品需按照标准的要求制备成 300~425 μm 的玻璃颗粒,并进行清洗干燥后待用。粒径大小的控制、样品是否清洗干净以及是否干燥完全均会影响最终结果。例如玻璃颗粒表面吸附的粉尘未完全清洗干净,会导致测定结果偏大;样品未完全干燥便进行称定,则会导致测定结果偏小。

在供试液的制备方面,供试液的制备要求是将玻璃颗粒加入一定量的试验用水后,置高压蒸汽灭菌器内,121℃保持 30 min 取出。标准对高压灭菌器的升、降温程序有严格的规定即“以平均 1℃·min<sup>-1</sup> 的速率在 20~22 min 内将温度升至(121±1)℃,到达该温度时开始计时。在(121±1)℃保持(30±1)min 后,缓缓冷却和减压,在 40~44 min 内将温度降至 100℃”。通用灭菌器不能满足标准的要求,需要配备专用的升降温程序。一般情况下,通用灭菌器升降温的时间偏短,缩短了整个加热过程,导致测定结果偏低。3 家实验室均因为使用的灭菌器达不到标准要求,导致测定结果偏低,能力验证评定结果为不满意/可疑。另外,供试液制备过程中所使用的玻璃容器如烧杯、锥形瓶等应为石英玻璃或平均线热膨胀系数约为 3.3×10<sup>-6</sup>·K<sup>-1</sup> 的硼硅玻璃,且需要经过老化处理。在与样品一同进行高压蒸汽灭菌的过程中,如果使用的玻璃容器不符合标准要求,可能会因其释放出少量的浸出物,从而影响测定结果。

在供试液的滴定方面发现的问题:① 滴定液稀释过程中,稀释倍数过大,移取体积过小,导致滴定液浓度误差增大;② 使用的滴定管的量程远小于滴定体积,增大读数误差;③ 滴定管读数位数有误。

此外,药用玻璃颗粒耐水性的测定过程相对较复杂,操作人员对标准的理解和掌握程度以及各个环节试验操作的规范性均会影响测定结果。

### 3.4 技术建议

针对以上对不满意/可疑结果的原因分析中提出的问题,给出以下几条建议:① 各实验室在执行《中国药典》标准时,应加强对标准学习与与

员的培训,重视《中国药品检验标准操作规范》<sup>[13]</sup> 中的相关规定,充分了解溶液配制与滴定操作的相关规范;② 在进行玻璃颗粒耐水性测定时,玻璃颗粒制备所使用的不锈钢网筛应进行计量和确认,无水乙醇清洗玻璃颗粒时应清洗至上清液澄清透明,且玻璃颗粒完全干燥后方可进行下一步试验;③ 配置满足标准要求的高压灭菌容器。

基于不同实验室测定样品与干扰样品的结果均同步偏大或偏小,测定过程中存在一定的系统偏差。且药用玻璃包装容器多用于注射剂,颗粒耐水性测定结果的偏差直接影响对药用玻璃容器性能的判断,耐水性能差的容器包装注射剂后,会引发一系列的安全风险。尤其是本次能力验证计划不满意与可疑的药品生产企业实验室均为生物制药公司,生物制品对药用玻璃容器的性能有更高的要求<sup>[14]</sup>。建议监管机构基于以上风险的考虑,发放药用玻璃颗粒耐水性测定用对照物质,以纠正测定结果的偏差,保证测定结果的准确性,进而保障药品质量。

### 参考文献

- [1] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-RL02. 能力验证提供者认可准[S]. 2018.
- [2] 刘雅丹,王菲菲,赵萌,等. 我国药品领域能力验证活动的现状研究及建议[J]. 中国药事, 2021, 35(8): 899-907.
- [3] 王颖,齐艳菲,赵霞,等. 药用玻璃输液瓶线热膨胀系数测定能力验证[J]. 中国药业, 2023, 32(5): 80-83.
- [4] 《中国药典》2020 年版. 四部[S]. 2020: 375, 549-550.
- [5] USP-NF < 660 > CONTAINERS-GLASS[S]. 2023: 1-7.
- [6] EP 11.0 3.2. 1 GLASS CONTAINERS FOR PHARMACEUTICAL USE[S]. 2022: 479-485.
- [7] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-GL003. 能力验证样品均匀性和稳定性评价指南[S]. 2018.
- [8] 国家市场监督管理总局. JJF 1343—2022. 标准物质的定值及均匀性、稳定性评估[S]. 2019.
- [9] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-GL002. 能力验证结果的统计处理和评价指南[S]. 2018.
- [10] 国家市场监督管理总局. GB/T 28043—2019/ISO 13528: 2015. 利用实验室间比对进行能力验证的统计方法[S]. 2019.
- [11] 寻延滨,敖红光,刘利群,等. 关于药品检验能力验证 Z 比分数判定方法改进的探讨[J]. 中南药学, 2023, 21(10): 2784-2786.
- [12] 王珏,许凯,杨洋,等. 药用辅料二丁基羟基甲苯吸收系数测定的能力验证研究[J]. 中南药学, 2023, 21(8): 2224-2227.
- [13] 中国药品生物制品检定所. 中国药品检验标准操作规范[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [14] 国家食品药品监督管理局办公室关于加强药用玻璃包装注射剂药品监督管理的通知[EB/OL]. [2012-11-08] (2023-05-07). <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/gzwwj/gzwwjyp/20121108120001728.html>.

(收稿日期: 2023-10-20; 修回日期: 2023-12-05)

## 红药片中黄曲霉毒素的含量测定及限度研究

张耀文, 李尚颖, 隋晓璠, 徐万魁\* (辽宁省检验检测认证中心, 辽宁省药品检验检测院, 化学药品质量研究与评价国家重点实验室, 沈阳 110036)

**摘要:** **目的** 建立高效液相色谱-质谱联用法测定红药片中黄曲霉毒素(以黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、黄曲霉毒素 B<sub>2</sub>、黄曲霉毒素 G<sub>1</sub> 和黄曲霉毒素 G<sub>2</sub> 总量计)的含量, 制订红药片中黄曲霉毒素的限度。**方法** 以 Venusil MP C<sub>18</sub> (4.6 mm×150 mm, 5 μm) 为色谱柱; 流动相为 2 mmol·L<sup>-1</sup> 醋酸铵溶液 (A) - 甲醇 (B), 梯度洗脱; 串联质谱仪检查, 电喷雾离子源 (ESI), 正离子检测模式。**结果** 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 在 0.0108 ~ 54.0 ng·mL<sup>-1</sup>、黄曲霉毒素 B<sub>2</sub> 在 0.0145 ~ 14.5 ng·mL<sup>-1</sup>、黄曲霉毒素 G<sub>1</sub> 在 0.0101 ~ 50.5 ng·mL<sup>-1</sup>、黄曲霉毒素 G<sub>2</sub> 在 0.0150 ~ 15.0 ng·mL<sup>-1</sup> 内与峰面积线性关系良好。黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub> 和 G<sub>2</sub> 回收率分别为 89.24%、80.31%、87.06% 和 74.19% (n = 6); 重复性 RSD 分别为 2.9%、4.6%、3.3% 和 5.0%。6 批红药片中的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub> 和 G<sub>2</sub> 的含量及总量均小于所制订的黄曲霉毒素限度, 结果均符合规定。**结论** 本试验建立了高效液相色谱-质谱联用法测定红药片中黄曲霉毒素的含量, 并制订了红药片中黄曲霉毒素的限度, 为其他中成药的黄曲霉毒素含量的检测及限度的制订提供了新的思路 and 理论参考。

**关键词:** 红药片; 黄曲霉毒素; 高效液相色谱-质谱联用法; TD<sub>50</sub>

**中图分类号:** R927      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1672-2981(2024)08-2177-05  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.034

## Determination and limit of aflatoxins in Hongyao tablets

ZHANG Yao-wen, LI Shang-ying, SUI Xiao-fan, XU Wan-kui\* (Liaoning Inspection, Examination & Certification Centre, Liaoning Institute for Drug Control, State Key Laboratory of Chemical Drug Quality Research and Evaluation, Shenyang 110036)

**Abstract: Objective** To establish a liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) method for the determination of aflatoxins (aflatoxins B<sub>1</sub>, aflatoxins B<sub>2</sub>, aflatoxins G<sub>1</sub> and aflatoxins G<sub>2</sub>) in Hongyao tablets, and to set limits on the amount of aflatoxins in Hongyao tablets. **Methods** The chromatographic column was Venusil MP C<sub>18</sub> (4.6 mm×150 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of 2 mmol·L<sup>-1</sup> ammonium acetate solution (A)-methanol (B) with gradient mode. Electrospray ionization source (ESI) was used for the determination by tandem mass spectrometer, and the positive ion mode was adopted. **Results** The linear calibration curves were obtained at 0.0108 ~ 54.0 ng·mL<sup>-1</sup> for aflatoxins B<sub>1</sub>, 0.0145 ~ 14.5 ng·mL<sup>-1</sup> for aflatoxins B<sub>2</sub>, 0.0101 ~ 50.5 ng·mL<sup>-1</sup> for aflatoxins G<sub>1</sub>, and 0.0150 ~ 15.0 ng·mL<sup>-1</sup> for aflatoxins G<sub>2</sub>, respectively. The recoveries of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> were 89.24%, 80.31%, 87.06% and 74.19%, respectively. The RSDs of repeatability were 2.9%, 4.6%, 3.3% and 5.0%, respectively. The content and total amount of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> in 6 batches of Hongyao tablets were all lower than the aflatoxins limits. **Conclusion** The HPLC-MS method is established for the determination of aflatoxins in Hongyao tablets, and the limit of aflatoxins in Hongyao tablets is established at the same time, which provides a new idea and theoretical reference for the determination of aflatoxins content in other proprietary Chinese medicines.

**Key words:** Hongyao tablet; aflatoxin; HPLC-MS; TD<sub>50</sub>

**基金项目:** 辽宁省自然科学基金 (No. 2020-MS-073)。

**作者简介:** 张耀文, 女, 副主任药师, 主要从事化学药品质量控制和标准研究, email: zhangyw716@126.com \*通信作者: 徐万魁, 男, 主任药师, 主要从事药物分析及药品标准研究, email: xuwanke@163.com



中成药红药片由三七、红花、当归、川芎、白芷和土鳖虫 6 味中药组成, 具有活血止痛、祛瘀生新功效, 临床主要用于治疗跌打损伤、筋骨瘀血肿痛、风湿麻木, 是临床上应用多年且疗效显著的中药复方制剂<sup>[1-2]</sup>。《中国药典》2020 年版一部中依据“真菌毒素测定法”, 共对 24 种中药及其饮片进行了黄曲霉毒素含量的控制。其中土鳖虫为红药片的处方成分, 存在黄曲霉毒素残留风险<sup>[3]</sup>。黄曲霉毒素是由真菌黄曲霉和寄生曲霉等产生的一类有毒次生代谢产物<sup>[4]</sup>, 毒性极大, 能引起人类、各种饲养动物的急性中毒死亡, 还能致癌、致畸、致突变<sup>[5]</sup>。迄今为止, 已经发现的黄曲霉毒素至少包含黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>、M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub> 等 17 种结构相似且特征已知的化合物, 其结构特征为都含有一个二呋喃环(糖酸呋喃)的基本毒性结构和一个香豆素(氧杂萜邻酮)结构。其中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 是主要的毒性物质, 以黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 毒性最强<sup>[6-8]</sup>。目前国家尚未规定有关中成药中黄曲霉毒素含量测定方法和限度标准。由于黄曲霉毒素不溶于水, 并且耐热性很高, 加热到 280 °C 才能发生裂解破坏, 一般的水洗、加热炮制等对其含量影响不大<sup>[9-10]</sup>, 因此, 中药材一旦发生霉变, 被黄曲霉毒素污染, 在制剂中也会存在而且比较稳定, 建立中药制剂中黄曲霉毒素限度标准, 保证临床用药的安全, 具有非常重要的意义。

《中国药典》2020 年版的“真菌毒素测定法”包括液相色谱法、液相色谱-串联质谱法和酶联免疫法。其中液相色谱-串联质谱法以其高灵敏度和准确性, 被广泛应用于真菌毒素的检测。本试验首次建立了高效液相色谱-质谱联用法测定红药片中黄曲霉毒素(以黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub> 和 G<sub>2</sub> 总量计)的含量, 方法方便、准确。依据黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的半数中毒剂量(TD<sub>50</sub>)计算数值和《中国药典》2020 年版一部对中药材和中药饮片中黄曲霉毒素限度的要求<sup>[11]</sup>, 制订红药片中黄曲霉毒素的限度, 以对红药片的安全性进行全面评价, 可为其他中成药中黄曲霉毒素含量的检测及限度的制订提供新的思路和理论参考。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

LC-20A 液相色谱仪(岛津公司); Q trap 4000 (美国 AB 公司); ALC-1100.2 型电子分析天平(Sartorius 公司, 精度: 0.01 g); AS10200AD 超声波振荡器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司); 酸度计(美国梅特勒)。

### 1.2 试药

红药片(企业 A, 批号: 220303、220302; 企业 B, 批号: 220505、220607、220611; 企业 C, 批号: 220701)。黄曲霉毒素混合对照品(批号: 610001-202107, 中国食品药品检定研究院, 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 以 1.08 μg · mL<sup>-1</sup> 计算; 黄曲霉毒素 B<sub>2</sub> 以 0.33 μg · mL<sup>-1</sup> 计算; 黄曲霉毒素 G<sub>1</sub> 以 1.01 μg · mL<sup>-1</sup> 计算; 黄曲霉毒素 G<sub>2</sub> 以 0.30 μg · mL<sup>-1</sup> 计算)。免疫亲和柱(VICAM, 美国维康), 甲醇(色谱纯, 默克), 醋酸铵(色谱纯, Sigma), 其他试药为分析纯, 水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Venusil MP C<sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: 2 mmol · L<sup>-1</sup> 醋酸铵溶液为流动相 A, 甲醇为流动相 B, 梯度洗脱(0 ~ 5 min, 55% ~ 15%A; 5 ~ 7 min, 15% ~ 0%A; 7 ~ 7.5 min, 0% ~ 55%A; 7.5 ~ 10 min, 55%A); 柱温: 40 °C; 流速: 0.5 mL · min<sup>-1</sup>; 进样量: 5 μL。

### 2.2 质谱条件

电喷雾离子源(ESI); 正离子模式; 采集时间为 6.5 ~ 9.0 min。各化合物检测离子对、锥孔电压(DP)和碰撞电压(CE)见表 1。

表 1 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub> 和 G<sub>2</sub> 对照品的检测离子对、DP 和 CE 值

Tab 1 Detection ion pairs, taper hole voltage (DP) and collision voltage (CE) for aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub>

化合物	母离子 ( <i>m/z</i> )	子离子 ( <i>m/z</i> )	DP/V	CE/V	性质
黄曲霉毒素 B <sub>1</sub>	313	285	100	35	定量
		241		60	定性
黄曲霉毒素 B <sub>2</sub>	315	287	110	40	定量
		259		40	定性
黄曲霉毒素 G <sub>1</sub>	329	243	100	35	定量
		311		30	定性
黄曲霉毒素 G <sub>2</sub>	331	245	100	40	定量
		313		53	定性

### 2.3 溶液的制备

**2.3.1 供试品溶液** 取本品 50 片, 除去包衣, 研细, 混匀, 取约 5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加入氯化钠 3 g, 精密加入 70% 甲醇溶液 50 mL, 超声处理 40 min (功率 560 W, 频率 40 Hz), 离心 20 min (离心速度 5000 r · min<sup>-1</sup>), 精密量取上清液 15 mL, 置 50 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 离心 10 min (离心速度 5000 r · min<sup>-1</sup>), 精密量取上清液 20 mL, 通过免疫亲和柱, 流速 3 mL · min<sup>-1</sup>, 先用淋洗缓冲液(称取 8.0 g 氯化钠、

1.2 g 磷酸氢二钠、0.2 g 磷酸二氢钾、0.2 g 氯化钾，加水 990 mL 使溶解，用盐酸调节 pH 值至 7.0，加水稀释至 1000 mL，即可) 10 mL 洗脱，再用水 20 mL 洗脱，弃去洗脱液使空气进入柱子，将水挤出柱子，再用适量甲醇洗脱，收集洗脱液，置 2 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，用微孔滤膜 (0.22 μm) 滤过，取续滤液，即得。

**2.3.2 混合对照品储备液** 精密量取黄曲霉毒素

混合对照品 0.5 mL，置 10 mL 量瓶中，用甲醇稀释至刻度，作为混合对照品储备液。

**2.3.3 空白溶液** 取已知无黄曲霉毒素的样品，按照“2.3.1”项下方法制备，作为空白溶液。

**2.4 系统适用性试验**

精密吸取空白溶液、混合对照品储备液、供试品溶液各 5 μL 注入液相色谱仪，结果空白溶液对 4 种黄曲霉毒素的含量测定无干扰，见图 1。

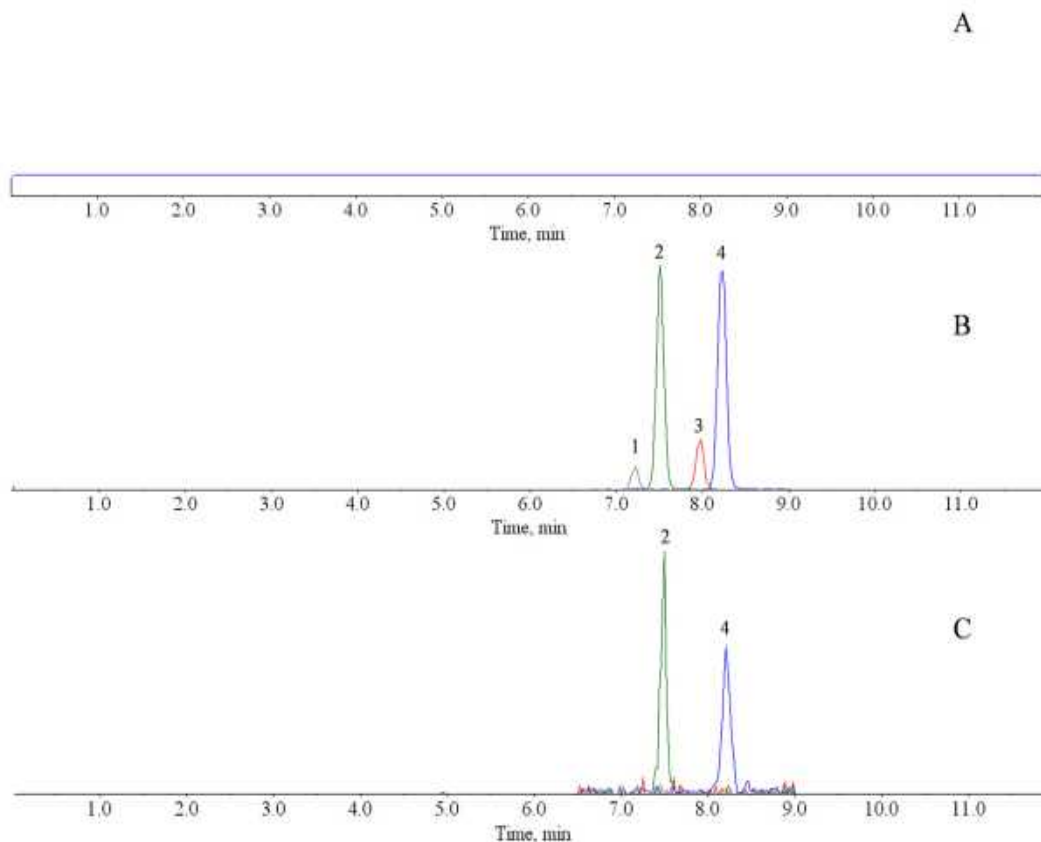


图 1 红药片中黄曲霉毒素含量测定代表性色谱图

Fig 1 Representative chromatogram for determination of aflatoxin in Hongyao tablet

A. 空白溶液 (blank solution); B. 混合对照品储备液 (mixed reference stock solution); C. 供试品溶液 (批号: 220505)(sample solution, batch: 220505); 1. 黄曲霉毒素 G<sub>2</sub> (aflatoxins G<sub>2</sub>); 2. 黄曲霉毒素 G<sub>1</sub> (aflatoxins G<sub>1</sub>); 3. 黄曲霉毒素 B<sub>2</sub> (aflatoxins B<sub>2</sub>); 4. 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> (aflatoxins B<sub>1</sub>)

**2.5 线性关系考察及检测限、定量限**

精密量取黄曲霉毒素混合对照品储备液适量，用甲醇稀释制成以黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 质量浓度计分别为 0.0108、0.054、0.54、1.08、5.4、54 ng · mL<sup>-1</sup> 的线性溶液及检测限 (以 3 倍信噪比计)、定量限 (以 10 倍信噪比计) 溶液，进样测定，黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub> 和 G<sub>2</sub> 质量浓度在试验范围内与峰面积线性关系良好，结果见表 2。

**2.6 精密度**

精密量取混合对照品储备液 2 mL 置 10 mL 量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，精密量取

1 mL 置 10 mL 量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，即得对照品溶液，连续进样 6 次，记录峰面积。结果黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub> 和 G<sub>2</sub> 的 RSD 分别为 1.2%、1.9%、0.80% 和 2.3%，表明仪器精密度良好。

**2.7 准确度和重复性**

精密量取混合对照品储备液 0.015 mL，加入空白样品中，按“2.3.1”项下方法制得回收率样品，同法制备 6 份，进样测定，计算回收率。黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub> 和 G<sub>2</sub> 的平均回收率分别为 89.24%、80.31%、87.06% 和 74.19%。以 6 份回收

表 2 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub> 和 G<sub>2</sub> 检测的线性关系、定量限和检测限相关结果Tab 2 Linearity, quantification limit, and detection limit of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> detection

化合物	线性方程	相关系数	线性范围 / (ng · mL <sup>-1</sup> )	定量限 / (ng · mL <sup>-1</sup> )	检测限 / (ng · mL <sup>-1</sup> )
黄曲霉毒素 B <sub>1</sub>	$Y = 1.336X \times 10^4 + 1.580 \times 10^3$	0.9998	0.0108 ~ 54.0	0.0108	0.0036
黄曲霉毒素 B <sub>2</sub>	$Y = 9724X \times 10^3 + 165.7$	0.9996	0.0145 ~ 14.5	0.0145	0.0048
黄曲霉毒素 G <sub>1</sub>	$Y = 1.113X \times 10^3 + 1.933 \times 10^3$	0.9998	0.0101 ~ 50.5	0.0101	0.0034
黄曲霉毒素 G <sub>2</sub>	$Y = 3.845X \times 10^3 + 36.06$	1.000	0.0150 ~ 15.0	0.0150	0.0050

率样品作为重复性试验样品, 结果测得黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub> 和 G<sub>2</sub> 的平均含量分别为 4.82、1.32、4.40 和 1.11 μg · kg<sup>-1</sup>, RSD 分别为 2.9%、4.6%、3.3% 和 5.0%, 表明方法的准确度和重复性良好。

## 2.8 溶液稳定性

按“2.6”项下方法制备对照品溶液。取一份回收率样品作为供试品溶液。取对照品溶液和供试品溶液分别于 0、4、8、12、16、24 h 进样测定, 结

果表明在 24 h 内, 对照品溶液中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub> 和 G<sub>2</sub> 峰面积的 RSD 分别为 4.4%、4.3%、3.2% 和 2.0%; 供试品溶液中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub> 和 G<sub>2</sub> 峰面积的 RSD 分别为 2.5%、4.6%、4.7% 和 3.6%, 表明对照品溶液与供试品溶液在 24 h 内稳定。

## 2.9 样品测定结果

对 6 批样品中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub> 和 G<sub>2</sub> 进样测定, 结果见表 3。

表 3 红药片中黄曲霉毒素测定结果 (μg · kg<sup>-1</sup>)Tab 3 Content determination of aflatoxin in Hongyao tablet (μg · kg<sup>-1</sup>)

样品批号	黄曲霉毒素 B <sub>1</sub>	黄曲霉毒素 B <sub>2</sub>	黄曲霉毒素 G <sub>1</sub>	黄曲霉毒素 G <sub>2</sub>	总量
220505	0.6	未检出	0.6	未检出	1.2
220607	0.4	未检出	0.5	未检出	0.9
220611	0.2	未检出	0.4	未检出	0.6
220303	0.2	未检出	0.3	未检出	0.5
220302	0.2	未检出	0.4	未检出	0.6
220701	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出

## 2.10 结果分析

根据 ICH M7<sup>[12]</sup> 中注释 4 “可以根据啮齿类动物致癌效价数据, 例如 TD<sub>50</sub> 值 (导致 50% 肿瘤发生率的给药剂量相当于患癌风险可能性水平为 1:2), 来计算特定化合物的可接受摄入量。”根据 CPDB 数据库<sup>[13]</sup>, 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的 TD<sub>50</sub> 为 0.0032 mg / (kg · d) (大鼠)。

计算十万分之一概率致癌剂量, 将该值除以 50 000, 即: 0.0032 mg / (kg · d) ÷ 50 000 = 6.4 × 10<sup>-5</sup> μg / (kg · d)。

计算人类每日总摄入量: 6.4 × 10<sup>-5</sup> μg · kg<sup>-1</sup> × 50 kg (体重) = 0.0032 μg / (人 · d)。

注: 目前 ICH M7 指导原则中以 50 kg / 人为平均体重来计算基因毒性杂质的限量。

红药片一次口服 0.5 g, 一日服用 2 次。若以红药片每日最大给药剂量 1.0 g 计算, 红药片中允许黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 含量为: 0.0032 μg ÷ 1.0 g = 0.0032 μg · g<sup>-1</sup>。

在 CPDB 数据库中, 未查询到黄曲霉毒素 B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub> 和 G<sub>2</sub> 的 TD<sub>50</sub> 值。依据《中国药典》2020 年版一部对中药材及中药饮片的限度要求 “本品每 1000 g

含黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 不得过 5 μg, 含黄曲霉毒素 G<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 和 B<sub>1</sub> 的总量不得过 10 μg”, 制订红药片中黄曲霉毒素的限度为 “本品含黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 不得过 0.0032 μg · g<sup>-1</sup>, 含黄曲霉毒素 G<sub>2</sub>、黄曲霉毒素 G<sub>1</sub>、黄曲霉毒素 B<sub>2</sub> 和黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的总量不得过 0.0064 μg · g<sup>-1</sup>。”

本次试验对 6 批红药片中的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub> 和 G<sub>2</sub> 的含量进行测定, 结果表明有 5 批样品中检出黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 及黄曲霉毒素 G<sub>1</sub>, 6 批样品中均未检出黄曲霉毒素 B<sub>2</sub> 及黄曲霉毒素 G<sub>2</sub>, 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub> 和 G<sub>2</sub> 的含量及总量均小于所制订的黄曲霉毒素限度。

## 3 讨论

### 3.1 色谱条件的选择

本文依据《中国药典》2020 年版通则 2351 “真菌毒素测定法”中的 “一、黄曲霉毒素测定法 第二法 (液相色谱 - 串联质谱法)” 建立检验方法测定红药片中黄曲霉毒素的含量。通过比较 10 mmol · L<sup>-1</sup> 醋酸铵和 2 mmol · L<sup>-1</sup> 醋酸铵为流动相 A 时目标化合物的响应强度, 确定选用 2 mmol · L<sup>-1</sup> 醋酸铵为流动相 A。



### 3.2 建议企业加强对红药片中黄曲霉毒素的检测

本研究建立了高效液相色谱-质谱联用法测定红药片中黄曲霉毒素的含量,并制订了红药片中黄曲霉毒素的限度,结果虽均小于安全限度,但所试验的 6 批样品中有 5 批样品有不同程度的检出,提示存在黄曲霉毒素超限量的风险。但因本次涉及的生产企业和抽取的样本量较少,不足以评估红药片是否存在黄曲霉毒素超限量风险。中成药污染黄曲霉菌与其药材生产、加工、贮存、保管、季节等环节都有密切关系。建议企业采用“避免为主,控制为辅”的策略,从中药材、工艺质量控制、运输贮存等方面考察黄曲霉毒素的来源,对产品中的黄曲霉毒素进行检测并加以控制,使其在安全阈值以下,提高药品的质量可控性。

### 3.3 建议监管部门开展中成药中黄曲霉毒素的专项监督

《中国药典》2020 年版一部中共对九香虫、土鳖虫、大枣、酸枣仁等 24 种中药及其饮片进行了黄曲霉毒素含量的控制,其中土鳖虫为红药片的处方成分,存在黄曲霉毒素残留风险。多个中成药处方中含有这 24 种中药材成分,建议监管部门陆续开展上述中成药中黄曲霉毒素检查的专项监督工作,对企业生产和风险控制进行指导。

### 参考文献

[1] 王艳萍,王伟东,孟庆彪,等.沈阳红药片的质量标准研究[J].中国实验方剂学杂志,2001,7(4):10-11.

- [2] 韩晶,翟宏宇,李丹,等.红药片 HPLC 特征图谱及多成分含量测定[J].中国现代中药,2023,25(3):604-607.
- [3] 中国药典 2020 年版.一部[S].2020:19-20.
- [4] Verweij PE, Denning DW. The challenge of invasive aspergillosis: increasing numbers in diverse patient groups[J]. J Infect Dis, 1997, 2(2): 61-63.
- [5] Cao WY, Yu P, Yang KP, et al. Aflatoxin B<sub>1</sub>: metabolism, toxicology, and its involvement in oxidative stress and cancer development[J]. Toxicol Mech Methods, 2022, 32(6): 395-419.
- [6] 张振凌.关于建立中药饮片黄曲霉毒素限度标准的探讨[J].中医药学刊,2006(11):2025-2026.
- [7] Rushing BR, Selim MI. Aflatoxin B<sub>1</sub>: a review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods[J]. Food Chem Toxicol, 2019, 124: 81-100.
- [8] Han Z, Zheng YL, Luan LJ, et al. An ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub> in traditional Chinese medicines[J]. Anal Chim Acta, 2010, 664(2): 165-171.
- [9] 杨建伟.黄曲霉毒素检测方法的研究进展[J].中国城乡企业卫生,2021,36(7):6-19.
- [10] 陈靖文.黄曲霉素的检测方法及预防措施[J].科学技术创新,2019,23(20):47-48.
- [11] 中国药典 2020 年版.四部[S].2020:280-281.
- [12] ICH M7 (R1). Assessment and control of Dna reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk [EB/OL]. <https://database.ich.org/sites/default/files/M7%28R2%29%29%20Guideline.pdf>.
- [13] Carcinogenic Potency Database [EB/OL]. <https://www.nlm.nih.gov/databases/download/cpdb.html>.

(收稿日期:2023-11-18;修回日期:2024-01-08)

## HPLC 法测定富马酸伏诺拉生注射液中有有关物质的含量

解元元, 崔祥祯, 杨永, 王肖, 张贵民\* (鲁南制药集团股份有限公司, 国家手性制药工程技术研究中心, 山东临沂 273400)

**摘要:** 目的 建立 HPLC 测定富马酸伏诺拉生注射液中有有关物质含量的方法。方法 采用 YMC-Pack Pro C18 色谱柱 (4.6 mm×150 mm, 3 μm), 流动相 A 为 0.04 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾溶液 (含 0.2% 三乙胺, 用磷酸调节 pH 至 6.6) - 乙腈 - 异丙醇 (92 : 4 : 4), 流动相 B 为 0.04 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾溶液 (含 0.2% 三乙胺, 用磷酸调节 pH 至 6.6) - 乙腈 (40 : 60), 采用梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 40 °C, 检测波长 220 nm, 进样量 20 μL。结果 杂质 H、杂质 B、杂质 C、杂质 F、杂质 D、杂质 E、杂质 J 和伏诺拉生的质量浓度分别在 0.12 ~ 4.99、0.12 ~ 4.99、0.12 ~ 4.90、0.13 ~ 5.01、0.12 ~ 4.99、0.13 ~ 5.01、0.13 ~ 5.01、0.13 ~ 5.01 μg·mL<sup>-1</sup> 内与峰面积呈良好线性关系 ( $r > 0.9990$ ); 7 个杂质的回收率为 94.72% ~ 100.67%, 其 RSD 值均小于 2.0%; 7 个杂质和伏诺拉生的定量限为 0.12 ~ 0.13 μg·mL<sup>-1</sup>, 检测限为 0.040 ~ 0.043 μg·mL<sup>-1</sup>。结论 经方法学验证, 本法专属性强、灵敏度高、准确度高, 可用于富马酸伏诺拉生注射液中有有关物质的含量测定。

**关键词:** 富马酸伏诺拉生注射液; HPLC; 有关物质

中图分类号: R927

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)08-2182-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.035

## HPLC determination of related substances in vonoprazan fumarate injection

XIE Yuan-yuan, CUI Xiang-zhen, YANG Yong, WANG Xiao, ZHANG Gui-min\* (*Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., National Engineering and Technology Research Center of Chirality Pharmaceutical, Linyi Shandong 273400*)

**Abstract: Objective** To establish an HPLC method to determine the related substances in vonoprazan fumarate injection. **Methods** YMC-Pack Pro C18 column (4.6 mm×150 mm, 3 μm) was used. Mobile phase A was 0.04 mol·L<sup>-1</sup> potassium dihydrogen phosphate solution (containing 0.2% triethylamine, adjusted to pH 6.6 with phosphoric acid)-acetonitrile-isopropanol (92 : 4 : 4), while mobile phase B was 0.04 mol·L<sup>-1</sup> potassium dihydrogen phosphate solution (containing 0.2% triethylamine, adjusted to pH 6.6 with phosphoric acid)-acetonitrile (40 : 60). Gradient elution was used, the flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, the column temperature was 40 °C, the detection wavelength was 220 nm, and the injection volume was 20 μL. **Results** Impurity H, impurity B, impurity C, impurity F, impurity D, impurity E, impurity J and vonoprazan all showed good linear relationship with the peak area at the concentration ranges of 0.12 ~ 4.99, 0.12 ~ 4.99, 0.12 ~ 4.90, 0.13 ~ 5.01, 0.12 ~ 4.99, 0.13 ~ 5.01, 0.13 ~ 5.01 and 0.13 ~ 5.01 μg·mL<sup>-1</sup> ( $r > 0.9990$ ). The average recoveries of the above 7 impurities ranged 94.72% ~ 100.67%, with all the RSD less than 2.0%. The quantitation limits of 7 impurities and vonoprazan were 0.12 ~ 0.13 μg·mL<sup>-1</sup> and the detection limits were 0.040 ~ 0.043 μg·mL<sup>-1</sup>. **Conclusion** The method is exclusive, sensitive and accurate, which can be used to determine the related substances in vonoprazan fumarate injection.

**Key words:** vonoprazan fumarate injection; HPLC; related substance

作者简介: 解元元, 女, 工程师, 主要从事新药质量研究, email: xyxyxyuan@163.com \*通信作者: 张贵民, 男, 研究员, 主要从事新药研究与开发, email: lunanzhangguimin@163.com

富马酸伏诺拉生 (vonoprazan fumarate, TAK-438) 是日本武田制药研发的钾离子竞争性酸阻滞药, 是一种可逆型  $K^+$  拮抗剂<sup>[1-4]</sup>, 其片剂于 2014 年 12 月首次在日本上市, 对糜烂性食管炎、幽门螺杆菌感染、十二指肠溃疡、消化性溃疡、胃溃疡、食管炎等胃酸相关性疾病 (ARDs) 疗效良好<sup>[5-10]</sup>。

由于富马酸伏诺拉生片的水溶性较差, 口服生物利用度偏低。为弥补临床应用的局限性, 我公司开发了富马酸伏诺拉生注射液。富马酸伏诺拉生通过静脉滴注途径给药, 可大幅度提高药物的生物利用度。

本文旨在建立一种 HPLC 法测定富马酸伏诺拉生注射液中有物质的含量, 并对建立的方法进行全面的药理学考察, 以用于富马酸伏诺拉生注射液中有物质的检查。

## 1 材料

### 1.1 仪器

e2695 型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司);

XPR2 型百万分之一、XS205 型十万分之一电子天平 [梅特勒托利多科技 (中国) 有限公司]; Sevencompact 型 pH 计 [梅特勒托利多科技 (中国) 有限公司]。

### 1.2 试剂

富马酸伏诺拉生对照品 (含量: 99.64%, 山东新时代药业有限公司, 批号: 626190501); 杂质 H 对照品 (含量: 85.58%, 批号: 18101927)、杂质 B 对照品 (含量: 92.68%, 批号: 18032930)、杂质 C 对照品 (含量: 96.02%, 批号: 18081425) 及杂质 E 对照品 (含量: 97.78%, 批号: 18051026) (深圳菲斯生物科技有限公司); 杂质 F 对照品 (含量: 95.71%, 批号: 1851843V-SL-01)、杂质 D 对照品 (含量: 98.57%, 批号: 195186V-SL-01) 及杂质 J (含量: 99.16%, 批号: 1951848V-SL-01) 对照品 (深圳市斯坦德化工科技有限公司)。富马酸伏诺拉生注射液 (山东新时代药业有限公司, 规格: 1 mL/1 mg, 批号: ZJ01、ZJ02)。各对照品的结构式见图 1。

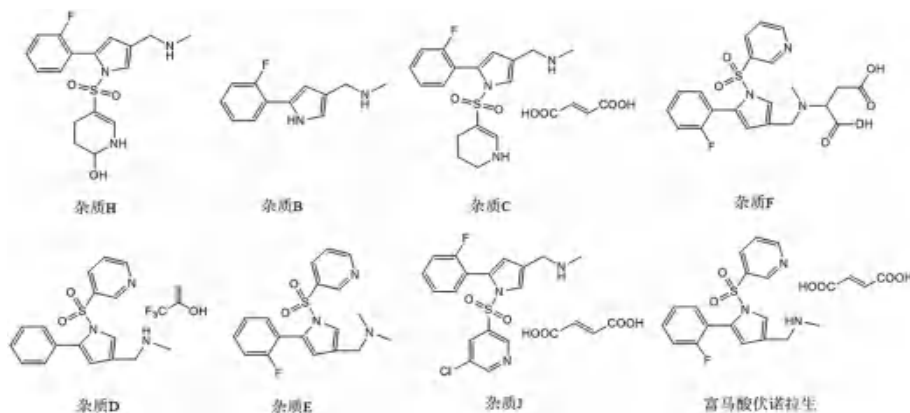


图 1 富马酸伏诺拉生及其主要杂质化学结构式

Fig 1 Chemical structures of vonoprazan fumarate and its main impurities

乙腈、异丙醇均为色谱纯 (Merck); 盐酸、氢氧化钠、过氧化氢、磷酸二氢钾、磷酸、三乙胺、氯化钠均为市售分析纯; 水为纯化水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

采用 YMC-Pack Pro C18 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 3 μm), 流动相: A 为 0.04 mol · L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾溶液 (含 0.2% 三乙胺, 用磷酸调节 pH 至 6.6) - 乙腈 - 异丙醇 (92 : 4 : 4), B 为 0.04 mol · L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾溶液 (含 0.2% 三乙胺, 用磷酸调节 pH 至 6.6) - 乙腈 (40 : 60), 按表 1 进行梯度洗脱, 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温 40 °C, 检测波长 220 nm, 进样量 20 μL。

### 2.2 专属性试验

**2.2.1 空白干扰试验** 分别精密称取杂质 H、杂质 B、杂质 C、杂质 F、杂质 D、杂质 E、杂质 J 和伏诺拉生对照品适量, 加溶剂溶解并稀释制成

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Program of gradient elution

时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	100	0
15	70	30
20	70	30
45	0	100
50	0	100
51	100	0
56	100	0

每 1 mL 中约含 2.5 μg 的混合对照品溶液。取空白溶剂 (30% 乙腈溶液)、空白辅料 (0.9% 氯化钠溶液) 和混合对照品溶液, 进样测定, 结果见图 2, 空白溶剂及空白辅料均不干扰本品有关物质检查, 主成分与各杂质及各杂质之间均可达到基线分离。**2.2.2 强制降解试验** 取本品 (批号: ZJ02) 5 支, 取出内容物, 置同一 10 mL 量瓶中, 加溶剂稀释至



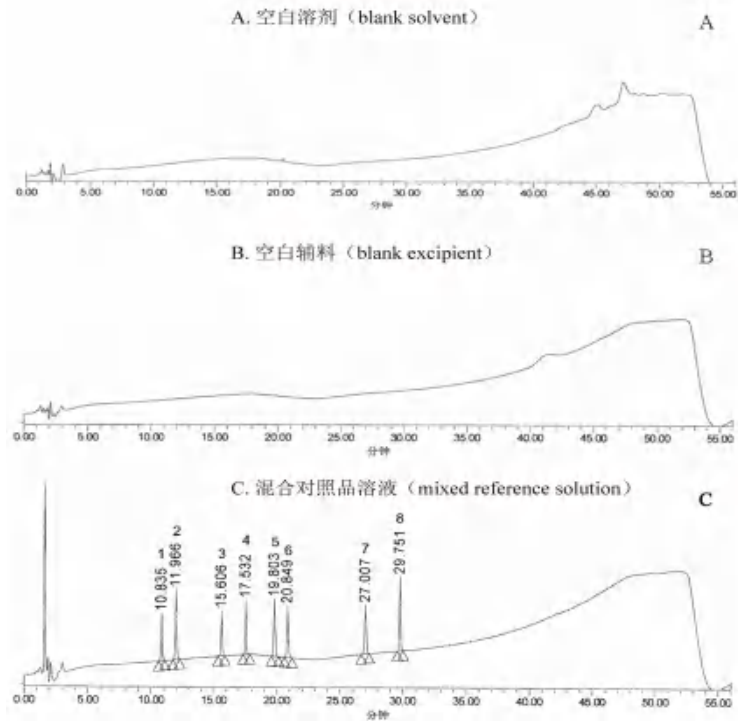


图 2 富马酸伏诺拉生注射液中有物质测定的典型 HPLC 色谱图

Fig 2 Typical HPLC chromatograms of related substance in vonoprazan fumarate injection

1. 杂质 H (impurity H); 2. 杂质 B (impurity B); 3. 杂质 C (impurity C); 4. 杂质 F (impurity F); 5. 伏诺拉生 (vonoprazan); 6. 杂质 D (impurity D); 7. 杂质 E (impurity E); 8. 杂质 J (impurity J)

刻度, 摇匀, 作为未降解样品 (即供试品溶液)。平行取本品 5 支, 将内容物置同一 10 mL 量瓶中, 进行降解试验: 酸降解 (加 1 mL 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 盐酸溶液, 90 °C 加热 45 min, 冷却中和, 溶剂定容)、碱降解 (加 1 mL 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液, 室温放置 2.5 h, 中和, 溶剂定容)、氧化降解 (加 1 mL 3% 过氧化氢溶液, 室温放置约 25 h, 溶剂定容)、热降解 (90 °C 加热 2 h, 冷却, 溶剂定容)、光降解 (5000 lx

光照 18 h 后, 溶剂定容)。取各降解条件下配制好的溶液, 进样测定, 色谱图见图 3。结果显示, 各条件下, 本品对酸、热较稳定, 对碱、氧及光不稳定, 主峰与相邻杂质峰之间的分离度均符合要求, 主峰峰纯度角度均小于峰纯度阈值, 物料保持守恒 (各条件降解后测得总峰面积与未降解溶液总峰面积的比值在 90% ~ 110%), 结果见表 2。说明该方法专属性好, 能够有效检测样品中的降解产物。

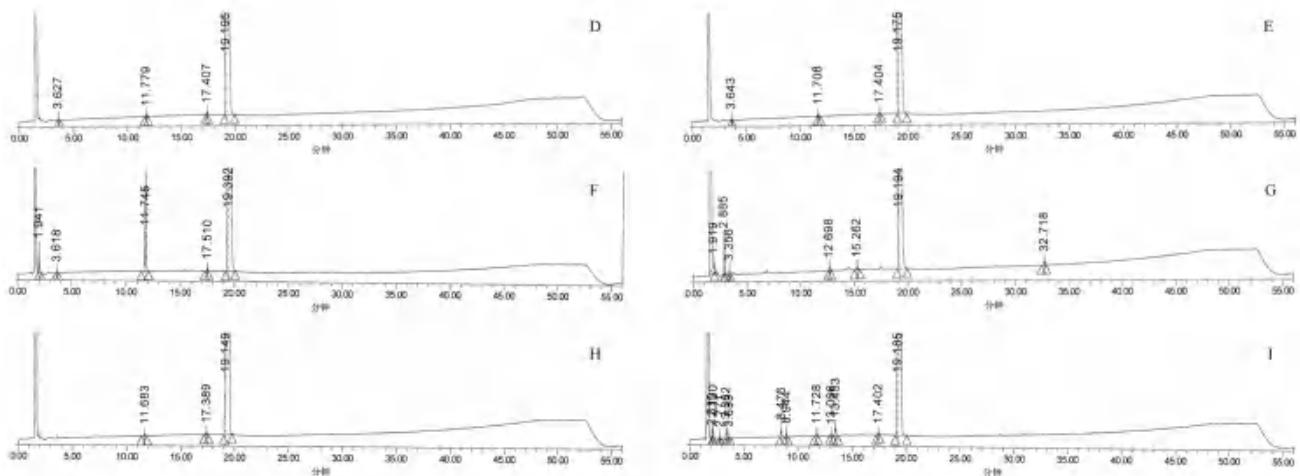


图 3 富马酸伏诺拉生注射液不同降解条件下的 HPLC 色谱图

Fig 3 HPLC chromatogram of vonoprazan fumarate injection under different degradation conditions

D. 未降解样品 (undegraded sample); E. 酸降解样品 (acid degradation sample); F. 碱降解样品 (alkali degradation sample); G. 氧化降解样品 (oxidative degradation sample); H. 热降解样品 (thermal degradation sample); I. 光降解样品 (photodegradation sample)

表 2 富马酸伏诺拉生注射液强制降解试验物料守恒数据

Tab 2 Material conservation data of forced degradation test of vonoprazan fumarate injection

条件	主峰纯度角度	主峰纯度阈值	主峰面积 A	主峰含量 /%	总峰面积 A	校正 /%
未降解	1.049	3.210	22 470 118	99.82	22 510 637	—
酸降解	1.148	3.210	21 876 909	99.80	21 920 751	97.38
碱降解	1.056	3.211	20 356 894	96.10	21 183 032	94.10
氧化降解	1.186	3.211	20 862 844	98.81	21 114 102	93.80
热降解	1.175	3.209	21 798 131	99.80	21 841 815	97.03
光降解	1.053	3.210	21 815 142	98.47	22 154 100	98.42

**2.2.3 杂质峰定位** 分别精密称取杂质 H、杂质 B、杂质 C、杂质 F、杂质 D、杂质 E 及杂质 J 对照品适量，加溶剂溶解并稀释制成每 1 mL 中约含 0.1 mg 的溶液，依法测定，结果显示上述杂质的保留时间分别为 10.396 min ( $\lambda_{\max} = 199.2 \text{ nm}$ 、 $252.3 \text{ nm}$ )、11.531 min ( $\lambda_{\max} = 199.2 \text{ nm}$ 、 $276.0 \text{ nm}$ )、15.137 min ( $\lambda_{\max} = 193.3 \text{ nm}$ 、 $258.2 \text{ nm}$ )、17.240 min ( $\lambda_{\max} = 193.3 \text{ nm}$ )、20.334 min ( $\lambda_{\max} = 193.3 \text{ nm}$ )、26.173 min ( $\lambda_{\max} = 193.3 \text{ nm}$ )、29.397 min ( $\lambda_{\max} = 193.3 \text{ nm}$ )。

**2.3 线性关系、定量限和检测限**

分别精密称取各杂质对照品及富马酸伏诺拉

生对照品适量，加溶剂溶解并逐步稀释制成每 1 mL 中约含各杂质 25  $\mu\text{g}$  的混合溶液，作为混合对照品母液。精密量取上述混合对照品母液 0.1 mL 置于 20 mL 量瓶中，另取 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mL 分别置 10 mL 量瓶中，用溶剂稀释至刻度，摇匀，作为 5%、10%、20%、50%、100%、200% 比例的溶液，按“2.1”项下条件进行测定，记录峰面积。以峰面积 A 为纵坐标，质量浓度 C ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 为横坐标进行线性回归。对混合对照品母液逐级稀释，以信噪比约为 3 时计算检测限，以信噪比为 10 时计算定量限，结果见表 3。

表 3 伏诺拉生与各杂质线性关系、定量限、检测限结果

Tab 3 Linearity, LOQ and LOD of vonoprazan and related substances

成分	回归方程	相关系数 r	浓度 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	相对校正因子 <sup>[11-13]</sup>	LOQ / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	LOD / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
杂质 H	$A = 32\,929.53C + 8.75$	1.0000	0.12 ~ 4.99	1.3	0.12	0.040
杂质 B	$A = 53\,384.79C - 170.67$	1.0000	0.12 ~ 4.99	0.8	0.12	0.040
杂质 C	$A = 32\,708.67C + 199.02$	1.0000	0.12 ~ 4.90	1.3	0.12	0.040
杂质 F	$A = 33\,042.65C + 298.81$	0.9999	0.13 ~ 5.01	1.3	0.13	0.043
伏诺拉生	$A = 43\,600.90C + 2056.71$	0.9999	0.13 ~ 5.01	—	0.12	0.040
杂质 D	$A = 42\,912.25C - 161.45$	1.0000	0.12 ~ 4.99	1.0	0.12	0.040
杂质 E	$A = 41\,834.56C + 264.08$	1.0000	0.13 ~ 5.01	1.0	0.13	0.043
杂质 J	$A = 51\,115.88C - 131.21$	1.0000	0.13 ~ 5.01	0.9	0.13	0.043

**2.4 进样精密度**

取“2.3”项下的 100% 比例溶液，精密量取 20  $\mu\text{L}$  注入液相色谱仪，连续测定 6 次，计算峰面积 RSD，结果显示杂质 H、杂质 B、杂质 C、杂质 F、杂质 D、杂质 E、杂质 J 和伏诺拉生峰面积的 RSD 值分别为 0.41%、0.21%、0.23%、0.21%、0.26%、0.15%、0.19%、0.18%。

**2.5 准确度试验**

按照“2.3”项下方法配制混合杂质对照品母液。精密量取混合杂质对照品母液 1 mL，置 10 mL 量瓶中，用溶剂稀释至刻度，摇匀，作为对照品溶液，平行配制两份。

取本品 (批号: ZJ02) 60 支，混合均匀，精密量取 5 mL，置 10 mL 量瓶中，加溶剂稀释至刻度，摇匀，作为校正溶液；精密量取 5 mL，置 10 mL 量瓶中，精密加入混合杂质对照品母液 1 mL，用溶剂稀释至刻度，摇匀，作为 100% 供试品溶液，同法制备 20%、150% 供试品溶液，每个浓度制备 3 份。取上述溶液，依法测定，按外标法以峰面积计算回收率，结果各杂

质不同加入量的平均回收率均在 94% ~ 101%，RSD 均小于 2.0%，说明本方法准确度良好。

**2.6 中间精密度**

由不同的人采用不同的仪器测定中间精密度。对照品溶液、供试品溶液 (100% 浓度) 配制方法均同“2.5”项下，取上述溶液按照外标法计算供试品溶液中各杂质的量，每个仪器测定 6 份，计算 12 次测定结果的 RSD。12 次测定的杂质 H、杂质 B、杂质 C、杂质 F、杂质 D、杂质 E、杂质 J 的含量分别为 0.52%、0.55%、0.52%、0.61%、0.51%、0.53%、0.52%，RSD 值分别为 1.0%、2.2%、1.0%、0.74%、0.76%、0.98%、1.0%。

**2.7 溶液稳定性**

**2.7.1 对照品溶液** 取各杂质对照品及富马酸伏诺拉生对照品各适量，精密称定，加溶剂溶解并稀释制成每 1 mL 中分别约含 2.5  $\mu\text{g}$  的混合溶液，分别于室温避光 24 h 和 5000 lx 光照箱放置 8 h，考察稳定性。结果上述考察条件下各杂质峰面积最大变化值均在  $\pm 10\%$  范围内，表明对照品溶液

室温避光放置 24 h、5000 lx 光照下放置 8 h 稳定。

**2.7.2 供试品溶液** 取本品 (ZJ02 批) 5 支, 转移至 10 mL 量瓶中, 用溶剂稀释至刻度, 分别考察室温避光 22 h 和 5000 lx 光照条件放置 8 h 的稳定性。室温避光 22 h 内, 总杂、各已知杂质含量及杂质个数均无明显变化, 说明供试品溶液室温避光条件下 22 h 内稳定。5000 lx 光照 6 h, 总杂、各已知杂质含量及杂质个数均无明显变化, 光照 8 h 后, 总杂含量由 0.234% 增加至 0.298%, 主峰前出现较多未知杂质, 杂质个数增加, 稳定性差。说明本品供试品溶液对光照敏感, 应避光保存。

### 2.8 系统适用性试验

取富马酸伏诺拉生及杂质 D 各适量, 加 30% 乙醇溶液溶解并稀释制成每 1 mL 中约含伏诺拉生 0.5 mg、杂质 D 为 2.5  $\mu\text{g}$  的混合溶液, 作为系统适用性试验溶液。按照“2.1”项下色谱条件, 记录色谱图,

伏诺拉生峰与杂质 D 峰的分离度为 3.95, 符合要求。

### 2.9 耐用性试验

通过改变本法的柱温 ( $\pm 5^\circ\text{C}$ )、流速 ( $\pm 0.1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ )、波长 ( $\pm 5 \text{ nm}$ )、流动相中盐溶液的 pH 值 ( $\pm 0.2$ ) 及更换不同批号色谱柱, 验证本法的耐用性。结果显示本法对柱温、流速、波长、流动相中盐溶液的 pH 值及不同批号色谱柱的耐用性均较好, 与标准条件对比, 主峰与杂质 D 峰的分离度、理论板数均符合要求, 且无明显差异, 样品溶液中杂质检出数目及总杂含量均无明显差异, 说明本法耐用性较好。

### 2.10 样品测定

取本品 2 批样品, 采用加校正因子的自身对照法测定有关物质 (其中杂质 B 的相对校正因子为 0.8, 为严格控制, 将相对校正因子按 1.0 进行计算), 结果见表 4。

表 4 2 批样品有关物质含量测定结果 (%)

Tab 4 Content of related substances in two batches samples (%)

批号	杂质 H	杂质 B	杂质 C	杂质 F	杂质 D	杂质 E	杂质 J	其他最大单杂	总杂
ZJ01	ND	0.037	0.019	0.082	ND	ND	ND	0.085	0.27
ZJ02	ND	0.061	0.015	0.089	ND	ND	ND	0.052	0.26

注 (Note): “ND” 表示未检测到 (ND means not detected)

## 3 讨论

根据本品原料有关物质 1 检查方法, 经过方法对比、筛选, 制订了本品有关物质检查的色谱条件。分析原料中的重要工艺杂质及制剂中的降解杂质, 制订了杂质分析策略。其中杂质 H、杂质 B、杂质 C、杂质 F、杂质 D、杂质 E、杂质 J 均属于原料的工艺杂质, 杂质 B、F 为制剂的主要降解杂质。本品重点关注的杂质中, 杂质 D (去氟异构体) 与主峰较难分离, 故将杂质 D 列入系统适用性试验中, 以保证杂质的有效检出。

因氧化降解产生的氧化杂质 2、氧化杂质 3 均含基因毒性警示结构, 故按照基因毒性杂质单独建立方法严格控制; 氧化降解杂质吡啶 -3- 磺酰胺由于极性较强, 也单独建立方法控制。

经验证, 本文建立的 HPLC 法测定富马酸伏诺拉生注射液中有物质的含量, 该方法专属性强, 准确度高, 灵敏度高, 可准确检测富马酸伏诺拉生注射液中的有关物质。

## 参考文献

[1] Jenkins, R, Okamoto H. Randomised clinical trial: safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of repeated doses of TAK-438 (vonoprazan), a novel potassium-competitive acid blocker, in healthy male subjects [J]. *Aliment Pharm Ther*, 2015, 41 (7): 636-648.

[2] 赵静芝, 宿亮, 朱婧, 等. 超高效液相色谱法测定富马酸伏诺拉生原料有关物质 [J]. *中国药事*, 2022, 36(7): 800-808.

[3] 乔元, 黄剑林, 徐媛, 等. 沃诺拉赞富马酸盐与传统质子泵抑制剂临床疗效对比研究进展 [J]. *药物流行病学杂志*, 2017, 26 (11): 786-788.

[4] 刘庆晓, 伊磊, 郝贵周, 等. 基于溶出曲线的测定评价富马酸伏诺拉生片与原研制剂的一致性 [J]. *中南药学*, 2023, 21 (8): 2111-2114.

[5] Matsukawa J, Hori Y, Nishida H, et al. A comparative study on the modes of action of TAK-438, a novel potassium-competitive acid blocker, and lansoprazole in primary cultured rabbit gastric glands [J]. *Biochem Pharmacol*, 2011, 81 (9): 1145-1151.

[6] Chey WD, Wong BCY. American college of gastroenterology guideline on the management of Helicobacter pylori infection [J]. *Am J Gastroenterol*, 2007, 102 (8): 1808-1825.

[7] Graham DY, Shiotani A. New concepts of resistance in the treatment of Helicobacter pylori infections [J]. *Nat Rev Gastro Hepat*, 2008, 5 (6): 321-331.

[8] 薛朝军, 杜雨晗, 靳会欣, 等. 应用《中国医疗机构药品评价与遴选快速指南》评价富马酸伏诺拉生片 [J]. *中国医院用药评价与分析*, 2022, 22 (10): 1228-1232.

[9] 郑延和, 赵晓芸, 魏宗莘. 富马酸伏诺拉生治疗难治性反流性食管炎疗效观察 [J]. *实用药物与临床*, 2022, 25 (9): 808-812.

[10] 陈琬, 焦红梅. 基于富马酸伏诺拉生的幽门螺杆菌根除治疗方案的现状 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38 (20): 2506-2509.

[11] 中国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 64.

[12] 肖亭, 王晨, 姚尚辰, 等. HPLC 校正因子法在药物分析中的应用 [J]. *药学学报*, 2020, 55 (12): 2854-2861.

[13] 余倩盈, 姚凯, 刘育, 等. HPLC 法测定富马酸沃诺拉赞原料药中的有关物质 [J]. *药物分析杂志*, 2018, 38 (4): 728-733.

(收稿日期: 2023-12-22; 修回日期: 2024-01-30)



# 离子色谱法同时测定低分子量肝素钠注射液中的有机酸和无机阴离子

肖菁<sup>1</sup>, 王蓉蓉<sup>1</sup>, 张俊<sup>1</sup>, 谢莹莹<sup>2</sup>, 李子珊<sup>1</sup>, 黄舒<sup>1</sup>, 姚静<sup>3\*</sup> (1.湖南省药品检验检测研究院, 长沙 410001; 2.湖南省药品审核查验中心, 长沙 410001; 3.中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

**摘要:** **目的** 建立同时测定低分子量肝素钠注射液中醋酸根离子、氯离子、亚硫酸根离子、硫酸根离子和草酸根离子含量的离子色谱法。**方法** 色谱柱为 Dionex IonPac AS11 (250 mm×4 mm), 保护柱为 Dionex IonPac AG11 (50 mm×4 mm), 用淋洗液自动发生器, 采用氢氧化钾梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测器为配有化学抑制器的电导检测器。**结果** 醋酸根离子、氯离子、亚硫酸根离子、硫酸根离子和草酸根离子分别在 0.12 ~ 24 μg·mL<sup>-1</sup>、0.24 ~ 48 μg·mL<sup>-1</sup>、0.4 ~ 80 μg·mL<sup>-1</sup>、0.04 ~ 8 μg·mL<sup>-1</sup>、0.3 ~ 60 μg·mL<sup>-1</sup> 与测定值线性关系良好, *r* 分别为 0.9991、0.9999、0.9999、0.9995、0.9995; 加样回收率分别为 105.3%、101.0%、102.3%、96.8% 和 108.3% (*n* = 6), *RSD* 分别为 2.2%、1.8%、1.6%、2.6% 和 1.6%。**结论** 该方法操作简便, 灵敏, 高效, 可用于同时测定低分子量肝素钠注射液中醋酸根、亚硫酸根、硫酸根、草酸根和氯离子的含量, 为其质量提供保证。

**关键词:** 离子色谱法; 低分子量肝素钠注射液; 醋酸根离子; 氯离子; 亚硫酸根离子; 硫酸根离子; 草酸根离子

中图分类号: R927

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)08-2187-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.036

## Determination of organic acids and inorganic anions in low molecular weight heparin sodium injection by ion chromatography

XIAO Jing<sup>1</sup>, WANG Rong-rong<sup>1</sup>, ZHANG Jun<sup>1</sup>, XIE Ying-ying<sup>2</sup>, LI Zi-shan<sup>1</sup>, HUANG Shu<sup>1</sup>, YAO Jing<sup>3\*</sup> (1. Hunan Institute for Drug Control, Changsha 410001; 2. Hunan Drug Inspection Center, Changsha 410001; 3. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629)

**Abstract: Objective** To establish an ion chromatography to simultaneously determine acetate ion, chloride ion, sulfurous acid ion, sulfate ion and oxalate ion in low molecular weight heparin sodium injection. **Methods** The chromatographic column was Dionex IonPac AS11 (250 mm×4 mm), and the protective column was Dionex IonPac AG11 (50 mm×4 mm). The automatic eluent generator and the gradient elution of potassium hydroxide were used. The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. A conductivity detector was used with a chemical inhibitor. **Results** The method showed good linearity at 0.12 ~ 24 μg·mL<sup>-1</sup> for acetate ion (*r* = 0.9991), 0.24 ~ 48 μg·mL<sup>-1</sup> for chloride ion (*r* = 0.9999), 0.4 ~ 80 μg·mL<sup>-1</sup> for sulfurous acid ion (*r* = 0.9999), 0.04 ~ 8 μg·mL<sup>-1</sup> for sulfate ion (*r* = 0.9995), and 0.3 ~ 60 μg·mL<sup>-1</sup> for oxalate ion (*r* = 0.9995), respectively. The average recoveries (*n* = 6) were 105.3% (*RSD* = 2.2%), 101.0% (*RSD* = 1.8%), 102.3% (*RSD* = 1.6%), 96.8% (*RSD* = 2.6%), and 108.3% (*RSD* = 1.6%) for acetate ion, chloride ion, sulfurous acid ion, sulfate ion and oxalate ion, respectively. **Conclusion** The method is simple, sensitive and efficient, which can be used to simultaneously determine the content of acetate, sulfurous acid, sulfate, oxalate and chloride ions in low molecular weight heparin sodium injection, and to control its quality.

**Key words:** ion chromatography; low molecular weight heparin sodium injection; acetate ion; chloride ion; sulfurous acid ion; sulfate ion; oxalate ion

基金项目: 湖南省自然科学基金部门(省药监局)联合基金(No. 2022JJ80071)。

作者简介: 肖菁, 女, 副主任药师, 主要从事药物分析与质量研究, email: 16275126@qq.com \*通信作者: 姚静, 女, 副主任药师, 主要从事药物分析工作, email: yaojh@nifdc.org.cn

低分子量肝素是以未分级肝素为原料, 经过降解后所制备得到的一类分子量更小的抗凝血药物, 低分子量肝素的抗凝性质和质量更可控、半衰期更长、生物利用度更高, 同时其出血倾向及骨质疏松等不良反应更少, 故近年来其临床的应用不断扩大<sup>[1-2]</sup>。由于生产工艺不同, 低分子量肝素分为低分子量肝素钠和低分子量肝素钙。低分子量肝素钠, 具有抑制 X a 活性, 同时保留 II a 的部分活性的药理作用, 在药效学上表现为抗体内外血栓以及动静脉血栓作用强, 在发挥抗栓作用时, 出血的可能性较小。临床上主要用于治疗急性深部静脉血栓, 预防血液透析时血凝块形成, 治疗不稳定型心绞痛和非 Q 波心肌梗死, 预防与手术有关的血栓形成<sup>[3-4]</sup>。

低分子量肝素钠是通过从猪肠黏膜提取的肝素经过碱裂解、酶降解、亚硝酸降解等途径得到的<sup>[5-6]</sup>。在肝素分子中, 硫酸基团取代了双糖结构上的多个位置, 硫酸基团所取代的位置和数量决定了肝素的抗凝活性的不同。在制备低分子量肝素钠的工艺过程中, 糖链上的硫酸基团会发生脱落, 而当硫酸基团脱落数量过多时, 将显著影响低分子量肝素的抗凝活性, 故需要对生产工艺参数进行精确的控制; 本品在贮存过程中, 硫酸基团也会有脱落现象, 因此对本品中游离硫酸根的控制十分必要<sup>[7]</sup>。同时在生产过程中不同的裂解方法、不同的调节 pH 值的有机酸和不同企业用水质量, 可能带入醋酸根离子、亚硫酸根离子、草酸根和氯离子等常见的有机酸和无机阴离子残留, 通过对这些残留离子进行数据化控制, 有助于评估低分子量肝素钠注射液的工艺控制水平。

离子色谱法测定有机酸和无机阴离子具有应用范围广、灵敏度高、选择性好、可多组分同时测定等优点。本文建立了一种离子色谱法, 用于同时测定低分子量肝素钠注射液中的醋酸根离子、亚硫酸根离子、硫酸根离子、草酸根离子和氯离子含量, 该方法准确、灵敏且操作简便, 并将该方法应用于评价国内市场所收集的 56 批次低分子量肝素钠注射液中上述 5 种有机酸和无机阴离子残留, 现报道如下。

## 1 材料

Thermo ICS-5000 + 型离子色谱仪 (美国赛默飞世尔科技公司, 电导检测器, 工作站为 Chromeleon 7.2); MS105DU 电子天平 (瑞士梅特勒-托利多公司, 精度为十万分之一)。水中氯离子标准溶液 [批号: GBW (E) 080268]、水中亚硫酸成分分析标准物质 (批号: BW20035-1000-W-2)、水中硫酸成分分析标准物质 (批号: BWZ6990-2016)(中

国计量科学研究院, 质量浓度均为  $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 醋酸盐标准溶液 (批号: BWZ6990-2016)、草酸盐标准溶液 (批号: BWJ4209-2016)(北京北方伟业计量技术研究院, 质量浓度均为  $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ); 水为自制超纯水。收集 4 家生产企业共计 56 批样品, 其中 17 批 A 企业样品, 31 批 B 企业样品, 3 批 C 企业样品, 5 批 D 企业样品。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件<sup>[8-9]</sup>

色谱柱: Dionex IonPac AG11 保护柱 ( $50 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$ ) 和 Dionex IonPac AS11 阴离子分析柱 ( $250 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$ ); KOH 淋洗液 (淋洗液自动发生器), 梯度洗脱 ( $0 \sim 13 \text{ min}$ ,  $5 \rightarrow 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KOH}$ ;  $13 \sim 13.1 \text{ min}$ ,  $10 \rightarrow 5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KOH}$ ;  $13.1 \sim 17 \text{ min}$ ,  $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KOH}$ ); 流速:  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 柱温:  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ; 检测器: 配有化学抑制器的电导检测器; 进样量:  $25 \mu\text{L}$ ; 采集时间:  $17 \text{ min}$ 。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密量取适量的水中醋酸根、氯离子、亚硫酸根、硫酸根及草酸根标准溶液, 置同一量瓶中, 加水稀释至刻度, 制备对照品溶液储备液, 再用超纯水逐步稀释, 得到表 1 中的各有机酸和无机阴离子系列混合对照品溶液。

表 1 各有机酸和无机阴离子的系列混合对照品溶液 ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )  
Tab 1 Series of mixed standard solutions for various organic acids and inorganic anions ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )

目标离子	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5
醋酸根	0.12	0.6	3.0	12	24
氯离子	0.24	1.2	6.0	24	48
亚硫酸根	0.40	2.0	10.0	40	80
硫酸根	0.04	0.2	1.0	4	8
草酸根	0.30	1.5	7.5	30	60

2.2.2 供试品溶液 精密量取低分子量肝素钠注射液  $1.0 \text{ mL}$ , 置  $10 \text{ mL}$  量瓶中加水稀释至刻度, 摇匀, 精密量取  $0.2 \text{ mL}$ , 置  $10 \text{ mL}$  量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 即得。

### 2.3 系统适用性及专属性试验

取“2.2.1”项下的混合对照品溶液 STD3  $25 \mu\text{L}$ , 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 并记录色谱图 (见图 1)。结果醋酸根离子、氯离子、亚硫酸根离子、硫酸根离子和草酸根离子理论板数均大于  $10\ 000$ , 且各有机酸和无机阴离子与相邻离子的色谱峰的分度均符合要求 (分度均大于  $1.5$ ), 空白溶液 (超纯水) 不干扰各有机酸和无机阴离子的测定, 表明该方法专属性良好。

### 2.4 线性关系考察

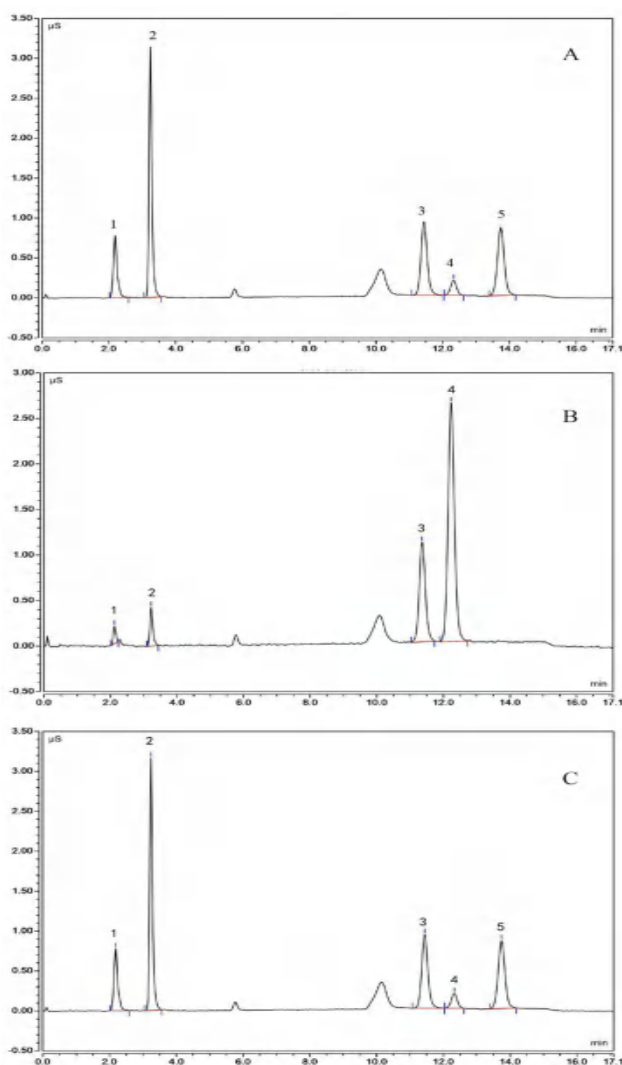


图 1 低分子量肝素钠注射液的离子色谱图  
Fig 1 Ion chromatograms of low molecular weight heparin sodium injection

A. 混合对照品溶液 (mixed standard solution); B. 供试品溶液 (sample solution); C. 空白溶液 (blank solution); 1. 醋酸根离子 (acetate ion); 2. 氯离子 (chloride ion); 3. 亚硫酸根离子 (sulfurous acid ion); 4. 硫酸根离子 (sulfate ion); 5. 草酸根离子 (oxalate ion)

精密取“2.2.1”项下系列混合对照品溶液各 25  $\mu\text{L}$ , 注入离子色谱仪, 记录色谱图, 以峰面积 ( $Y$ ) 为纵坐标, 质量浓度 ( $X, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 为横坐标, 进行线性回归, 结果见表 2。

表 2 各组分标准曲线  
Tab 2 Linearity of each ion

目标离子	标准曲线	$r$	线性范围 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
醋酸根	$Y = 0.0765X + 0.0623$	0.9991	0.12 ~ 24
氯离子	$Y = 0.2646X - 0.0111$	0.9999	0.24 ~ 48
亚硫酸根	$Y = 0.1138X - 0.0362$	0.9995	0.04 ~ 80
硫酸根	$Y = 0.2216X - 0.0063$	0.9995	0.04 ~ 8
草酸根	$Y = 0.1192X + 0.0705$	0.9995	0.3 ~ 60

## 2.5 检测限与定量限试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液 STD1, 按一定的倍数稀释后进样, 记录色谱图, 并计算信噪比, 以信噪比约为 3 时所对应的浓度为检测限, 信噪比约为 10 时所对应的浓度为定量限。结果醋酸根离子、氯离子、亚硫酸根离子、硫酸根离子和草酸根离子检测限分别为 0.075、0.025、1.175、0.275、0.825  $\text{ng}$ , 定量限分别为 0.200、0.075、3.875、0.950、2.775  $\text{ng}$ 。

## 2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液 STD3 25  $\mu\text{L}$ , 连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果醋酸根离子、氯离子、亚硫酸根离子、硫酸根离子和草酸根离子峰面积的  $RSD$  分别为 1.5%、1.3%、1.1%、1.8%、1.3%, 结果表明仪器精密度良好。

## 2.7 重复性试验

分别精密量取低分子量肝素钠注射液 (批号: 1L0432008) 各 6 份, 制备供试品溶液, 进样 25  $\mu\text{L}$ , 记录峰面积, 计算各有机酸和无机阴离子含量, 结果供试品溶液中未检出草酸根离子; 醋酸根离子、氯离子、亚硫酸根离子、硫酸根离子含量的  $RSD$  分别为 1.6%、1.0%、1.1% 和 0.50%, 表明本方法的重复性较好。

## 2.8 回收试验

采用加标回收法测定回收率, 分别精密量取 6 份低分子量肝素钠注射液 (批号: 1L0432008) 1.0  $\text{mL}$ , 分别置于 100  $\text{mL}$  量瓶中, 再分别加入醋酸根含量为 150  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、氯离子含量为 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、亚硫酸根含量为 111  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、硫酸根含量为 89  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  和草酸根含量为 111  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的混合对照品溶液 0.9  $\text{mL}$ , 摇匀, 精密量取 2.0  $\text{mL}$ , 置 10  $\text{mL}$  量瓶中加水稀释至刻度, 摇匀, 即得回收率供试品溶液, 进样测定, 结果醋酸根离子、氯离子、亚硫酸根离子、硫酸根离子和草酸根离子的回收率分别为 105.3%、101.0%、102.3%、96.8% 和 108.3%,  $RSD$  分别为 2.2%、1.8%、1.6%、2.6% 和 1.6%。结果表明, 本方法的准确度较好。

## 2.9 稳定性试验

取“2.8”项下的回收率供试品溶液, 在室温放置 0、2、6、12、24、48  $\text{h}$  时分别取样 25  $\mu\text{L}$ , 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果醋酸根离子、氯离子、亚硫酸根、硫酸根和草酸根离子峰面积的  $RSD$  分别为 2.7%、1.3%、1.1%、0.40%、3.8%, 说明供试品溶液在 48  $\text{h}$  内稳定性良好。

## 2.10 样品测定

分别精密量取各批次样品 (共计 56 批), 制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定,



采用标准曲线法计算样品中各有机酸和无机阴离子的含量，硫酸根离子的限度参考国家药典委员会网站公示的达肝素钠注射液标准中游离硫酸根项目的限度，其限度规定为“本品每 1 mL 中含硫酸根离子的量，不得过 1.2 mg”，所测定的硫酸根离子的试验结果表明，A 企业的 17 批样品中有 3 批样品超出限度，B 企业的 31 批样品中有 17 批样品超出限度，C 企业的 3 批样品和 D 企业的 5 批样品均超出限度，56 批样品中共计有 28 批次样品硫酸根离子限度超标。所含的醋酸根离子、氯离子和亚硫酸根含量极低，草酸根离子的含量极低或未检出。

### 3 讨论

#### 3.1 色谱柱的选择

由于亚硫酸根离子和硫酸根离子较难分离<sup>[10-11]</sup>，色谱柱的选择尤为重要。本试验考察了 Dionex AS18 (250 mm×4 mm)、Dionex AS19 (250 mm×4 mm) 和 Dionex AS11 (250 mm×4 mm) 等离子色谱柱，结果使用 AS11 色谱柱进行梯度洗脱，能更好地分离亚硫酸根和硫酸根离子，且峰形较好，同时其他的阴离子也分离良好，有明显优势。

#### 3.2 淋洗液的选择

常见的淋洗液主要有两类，一类为氢氧根体系，如 KOH 或 NaOH 溶液，其抑制产物为水，有利于保持基线稳定；另一类为碳酸盐体系，如 NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>，其抑制产物为碳酸，可能导致基线漂移，因此较少用于梯度洗脱系统<sup>[12]</sup>。综合考虑，本研究选用 KOH 溶液作为淋洗液，并采用梯度洗脱策略。

#### 3.3 淋洗液梯度选择

当 KOH 淋洗液的起始浓度为 5 mmol·L<sup>-1</sup> 时，分别考察等度洗脱或梯度洗脱至终浓度为 10、15、20 mmol·L<sup>-1</sup> 这 4 种不同的洗脱条件，当 KOH 淋洗液的终浓度为 10 mmol·L<sup>-1</sup> 时，各有机酸和无机阴离子能较好地分离，且进样分析过程仅需 17 min 即可顺利完成。因此，本研究最终采用 KOH 淋洗液以起始浓度为 5 mmol·L<sup>-1</sup>，终浓度为 10 mmol·L<sup>-1</sup> 的梯度洗脱策略。

#### 3.4 结果分析与建议

EP 和 USP 对达肝素钠中的游离硫酸盐采用离子色谱法进行测定，USP 对达肝素钠注射液中的游离硫酸盐采用离子色谱法进行测定，现行国内法定标准未对低分子量肝素钠的原料和制剂中

的游离硫酸盐进行控制，各生产企业未对原料和制剂中的游离硫酸盐进行足够的关注和相应的控制，故造成了本品的游离硫酸盐离子含量较高。参考国家药典委员会网站公示的达肝素钠注射液和那屈肝素钙注射液标准中游离硫酸根项目限度标准，低分子量肝素钠注射液不合格批次为 28 批，占总批次 (56 批) 的 50%，不合格率较高，建议将游离硫酸根项目列入低分子量肝素钠注射液的质量标准中进行严格控制。同时考虑到醋酸根离子、氯离子、亚硫酸根离子和草酸根离子含量均比较低，且各批次的抽样测出的量不会对产品的安全性造成影响，可暂不列入低分子量肝素钠注射液的质量标准中。

### 参考文献

- [1] 低分子肝素的制备技术及临床应用进展[J]. 山东化工, 2020, 49 (10): 52-57.
- [2] 张明瑜. 低分子量肝素精细结构分析与活性测试方法研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2016.
- [3] 陈茹茹, 罗厚江, 杨军. 低分子量肝素作用机制及临床应用研究进展[J]. 中国现代医生, 2021, 59 (6): 182-186.
- [4] 吴崇才, 林鸿彪, 吴清强. 低分子量肝素对腹腔镜下胆囊切除术后深静脉血栓形成的预防价值[J]. 血管与腔内血管外科杂志, 2023, 9 (6): 698-700.
- [5] 张丽萍, 李雷刚, 马中苏. 亚硝酸降解法制备低分子肝素的工艺参数优化与确定[J]. 药物分析杂志, 2009, 29 (7): 1148-1151.
- [6] Higashi K, Hosoyama S, Ohno A, et al. Photochemical preparation of a novel low molecular weight heparin[J]. Carbohydr Polym, 2012, 87 (2): 1737-1743.
- [7] 李京, 范慧红. 离子色谱法测定肝素及其类似物中游离和结合硫酸根[J]. 药物分析杂志, 2010, 30 (3): 452-455.
- [8] 范卫平. 离子色谱法同时测定那屈肝素钙中氯离子和硫酸根离子的含量[J]. 中国无机分析化学, 2021, 11 (2): 15-20.
- [9] 吴崇才, 林鸿彪, 吴清强. 低分子量肝素对腹腔镜下胆囊切除术后深静脉血栓形成的预防价值[J]. 血管与腔内血管外科杂志, 2023, 9 (6): 698-700.
- [10] 顾晓风, 金伟斌, 杨袁. 离子色谱法同时测定微晶纤维素中氯离子和硫酸根离子含量[J]. 中国药业, 2022, 31 (6): 1367-1370.
- [11] 范迪, 赵敬丹, 秦峰, 等. 离子色谱法同时测定硫酸妥布霉素注射液中硫酸根及抗氧化剂焦亚硫酸钠的含量[J]. 中国医药工业杂志, 2020, 51 (8): 88-1059.
- [12] 离子色谱法测定肝素及其类似物中游离和结合硫酸根[J]. 药物分析杂志, 2020, 30 (3): 452-455.

(收稿日期: 2024-05-23; 修回日期: 2024-06-17)

# 高温条件下盐酸雷尼替丁中 *N*-亚硝基二甲胺及其前体化合物二甲胺和亚硝酸盐研究

杜冬生<sup>1</sup>, 钟鸿姣<sup>1</sup>, 胡杰<sup>2</sup>, 吴静<sup>2</sup>, 刘永<sup>3\*</sup> (1. 安徽师范大学生命科学学院, 安徽 芜湖 241000; 2. 芜湖市食品药品检验中心, 安徽 芜湖 241007; 3. 安徽省食品药品检验研究院, 合肥 230051)

**摘要:** **目的** 考察盐酸雷尼替丁原料药中的 *N*-亚硝基二甲胺 (NDMA) 及其前体化合物二甲胺 (DMA) 和亚硝酸盐 ( $\text{NO}_2^-$ ) 在高温条件下含量变化。**方法** 盐酸雷尼替丁原料药分别置于有氧和无氧环境中, 在 40 °C 和 60 °C 的条件下破坏 5、10 和 30 d。采用超高效液相色谱串联质谱法 (UPLC-MS/MS)、阳离子和阴离子色谱法, 分别测定破坏后样品中 NDMA、DMA 和  $\text{NO}_2^-$  的含量。**结果** 建立的 3 种检测方法的专属性、灵敏度、线性、回收率和重复性均满足要求。在有氧和无氧环境中, 60 °C 破坏的盐酸雷尼替丁样品中 3 种物质的含量均高于 40 °C; 另外, 在有氧条件下, 3 种物质的含量也明显高于相应的无氧条件, 其中第 30 日, 60 °C 有氧条件下 NDMA、DMA 和  $\text{NO}_2^-$  分别增长至 1.92、55.50 和 44.76  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。**结论** 温度和氧气是盐酸雷尼替丁产生 NDMA 及其前体化合物 DMA 和  $\text{NO}_2^-$  的重要因素; 同时, 间接验证盐酸雷尼替丁产生 NDMA 可能的机制为首先降解生成 DMA 和  $\text{NO}_2^-$ , 并进一步反应生成 NDMA。本研究可为盐酸雷尼替丁贮存条件设置和质量标准提升提供参考。

**关键词:** 超高效液相色谱串联质谱法; 离子色谱法; 盐酸雷尼替丁; *N*-亚硝基二甲胺; 二甲胺; 亚硝酸盐; 高温破坏

中图分类号: R927 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)08-2191-07  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.037

## *N*-nitrosodimethylamine and its precursors dimethylamine and nitrite in ranitidine hydrochloride under high temperature

DU Dong-sheng<sup>1</sup>, ZHONG Hong-jiao<sup>1</sup>, HU Jie<sup>2</sup>, WU Jing<sup>2</sup>, LIU Yong<sup>3\*</sup> (1. College of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu Anhui 241000; 2. Wuhu Food and Drug Inspection Center of Anhui, Wuhu Anhui 241007; 3. Anhui Food and Drug Inspection Institute, Hefei 230051)

**Abstract: Objective** To determine the content change of *N*-nitrosodimethylamine (NDMA), and its precursor compounds dimethylamine (DMA) and nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) in ranitidine hydrochloride drug substance under high temperature. **Methods** Ranitidine hydrochloride was exposed to aerobic and anaerobic environments at 40 °C and 60 °C for 5, 10 and 30 days. The content of NDMA, DMA and  $\text{NO}_2^-$  in the degraded samples was determined by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), cation chromatography and anion chromatography, respectively. **Results** The specificity, sensitivity, linearity, recovery, and repeatability of the three methods all met the requirements. In both aerobic and anaerobic conditions, the content of the three substances in ranitidine hydrochloride samples degraded at 60 °C was higher than that at 40 °C. In addition, the amount of the three substances was much higher under aerobic conditions compared with that under anaerobic conditions. On the 30th day, at 60 °C under aerobic conditions, the content of NDMA, DMA and  $\text{NO}_2^-$  increased to 1.92, 55.50 and 44.76  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ , respectively. **Conclusion** Temperature and oxygen are crucial factors for ranitidine hydrochloride to produce NDMA and its precursor compounds DMA and

基金项目: 2021 年度安徽省药品监督管理局科技创新项目 (No.AHYJ-KJ-202103); 2020 年度安徽省高校自然科学研究项目 (No. KJ2020A0082); 2023 年度芜湖市重点研发与成果转化项目 (No.2023yf001)。

作者简介: 杜冬生, 男, 博士, 主要从事化学药品质量控制和中药药效物质基础研究, email: duds@ahnu.edu.cn \*通信作者: 刘永, 男, 硕士, 主要从事化学药品质量控制研究, email: 406583547@qq.com

$\text{NO}_2^-$ 。The study indirectly verifies that the possible mechanism of ranitidine hydrochloride producing NDMA is the primary degradation to DMA and  $\text{NO}_2^-$ , and further reaction to NDMA. This research also provides a reference for storage conditions and quality standards of ranitidine hydrochloride.

**Key words:** UPLC-MS/MS; ion chromatography; ranitidine hydrochloride; *N*-nitrosodimethylamine; dimethylamine; nitrite; high temperature degradation

盐酸雷尼替丁为  $\text{H}_2$  受体拮抗剂, 能有效地抑制组胺及五肽胃泌素刺激后引起的胃酸分泌, 临床应用于胃及十二指肠溃疡、应激性溃疡、胃出血、胃食管反流病和卓-艾综合征等消化系统疾病的治疗<sup>[1-2]</sup>。2019 年 9 月 13 日, 美国食品药品监督管理局 (FDA) 官网中第一次发布公告, 因多个盐酸雷尼替丁药品中被检出含有低浓度的基因毒性杂质 *N*-亚硝基二甲胺 (*N*-nitrosodimethylamine, NDMA), 要求召回相关产品<sup>[3]</sup>; 2020 年 4 月 1 日, 再次要求下架所有盐酸雷尼替丁的药物<sup>[4]</sup>; 2020 年 5 月 8 日, 我国国家药品监督管理局发布的《化学药物中亚硝胺类杂质研究技术指导原则 (试行)》, 也要求对盐酸雷尼替丁原料药及其制剂中产生的 NDMA 进行溯源和控制研究<sup>[5]</sup>。

目前普遍认为 NDMA 可能通过亚硝化机制生成, 即在一定条件下, 前体化合物二甲胺 (dimethylamine, DMA) 与亚硝酸盐 (如  $\text{NaNO}_2$ ) 反应而产生<sup>[6]</sup>。由此推测, 在物料、生产工艺、共线产品等药品制备环节中可能引入上述前体化合物, 并进一步反应生成 NDMA。另一种可能由盐酸雷尼替丁降解而产生, 2019 年 10 月, 澳大利亚药品管理局发现盐酸雷尼替丁近有效期的相关制剂产品中 NDMA 的含量显著高于新生产的样品<sup>[7]</sup>。后续有学者进一步证明盐酸雷尼替丁原料药及其制剂在高温、高湿以及含有氧气条件下易产生 NDMA; 并理论分析盐酸雷尼替丁化学结构中的 DMA 和亚硝基结构片段 ( $\text{NO}_2^-$ ) 是 NDMA 两个前体化合物的来源<sup>[8-10]</sup>。然而, 尚未见通过强降解试验并同时检测该三种物质来验证上述理论报道。

本研究首先建立超高效液相色谱串联质谱法 (UPLC-MS/MS)、阳离子色谱法和阴离子色谱方法, 分别测定盐酸雷尼替丁原料药中 NDMA、DMA 和  $\text{NO}_2^-$ , 并应用上述方法检测盐酸雷尼替丁原料药在有氧和无氧环境中, 经 40 °C 和 60 °C 破坏 5、10 和 30 d 后三种物质的含量, 分析其规律, 以期为盐酸雷尼替丁贮存条件的设置和质量标准的提升提供参考。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

UPLC-20AD 超高效液相 (日本岛津公司),

串联 Triple Quad 4500 三重四极杆 (美国 AB SCIEX 公司); Dionex ICS-6000 离子色谱仪 (配有 CDRS 600 离子抑制器)、Dionex AQ-1200 型离子色谱仪 (配抑制器 ADRS 600 离子抑制器) (美国赛默飞公司); ME55 型十万分之一电子分析天平 (瑞士梅特勒托利多公司); Mili-Q 纯水仪 (美国默克密理博公司); JL-DY24-N2Y 圆形旋转氮吹仪 (上海靳澜仪器制造有限公司); LRHS-800 稳定性试验箱 (上海林频仪器股份有限公司)。

### 1.2 试剂

NDMA 对照品 (纯度 > 99.0%, 上海梯希爱化成工业发展有限公司, 批号: D0761); 二甲胺盐酸盐对照品 (纯度: 以  $\text{C}_2\text{H}_7\text{N}$  计, 含量为 54.9%, 中国食品药品检定研究院, 批号: 195086-202101); 亚硝酸钠对照品 (纯度:  $200.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 坛墨质检标准物质中心, 批号: B21040055); 甲醇 (色谱纯, 美国默克公司); 甲酸 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 甲磺酸、氢氧化钾 (色谱纯, 美国赛默飞公司); 盐酸雷尼替丁原料药 (由 A 厂家提供, 批号: 20230101、20230202、20230203); Ag 柱和 C18 固相萃取柱、水系 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜 (美国安捷伦公司)。

## 2 方法和结果

### 2.1 UPLC-MS/MS 测定盐酸雷尼替丁中 NDMA 的含量

#### 2.1.1 色谱与质谱条件

① 色谱条件: 采用 ZORBAX SB-C18 (4.6 mm × 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 柱, 流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, B 为 0.1% 甲酸甲醇溶液, 梯度洗脱 (0 ~ 8.0 min, 95%A; 8.0 ~ 10.0 min, 95% ~ 5%A; 10.0 ~ 13.0 min, 5%A; 13.0 ~ 15.0 min, 5% ~ 95%A; 15.0 ~ 20.0 min, 95%A); 进样量 20  $\mu\text{L}$ ; 柱温 40 °C; 流速 0.6  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

② 质谱条件: 离子源为大气压化学电离源 (APCI), 正离子模式; 离子源温度 (TEM) 350 °C; 碰撞气体 (CAD) 7 kPa; 气帘气 (CUR) 30 kPa; 喷雾气 (GS1) 35 kPa; 质谱采集时间 3.0 ~ 7.5 min; NDMA 定量离子对  $m/z$  75.0 → 43.1; 定性离子对  $m/z$  75.0 → 58.0; 去簇电压 (DP) 20 V; 入口电压 (EP) 6 V; 碰撞能量 (CE): 19 V (定量离子对)、16 V (定



性离子对); 出口电压 (CXP) 6 V。

### 2.1.2 溶液的制备

① 对照品溶液: 取 NDMA 对照品 100.24 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加纯化水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品储备液。进一步稀释配制成 0.20、0.50、1.00、2.00、5.01、10.02、20.05 和 50.12 ng · mL<sup>-1</sup> 系列浓度对照品溶液。

② 供试品溶液: 取盐酸雷尼替丁约 2.79 g, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加纯化水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.1.3 专属性试验 分别取空白溶剂、对照品溶液和供试品溶液, 注入色谱仪, 记录色谱图见图 1。NDMA 峰无相邻色谱峰, 且空白溶剂不干扰 NDMA 检测, 方法专属性良好。

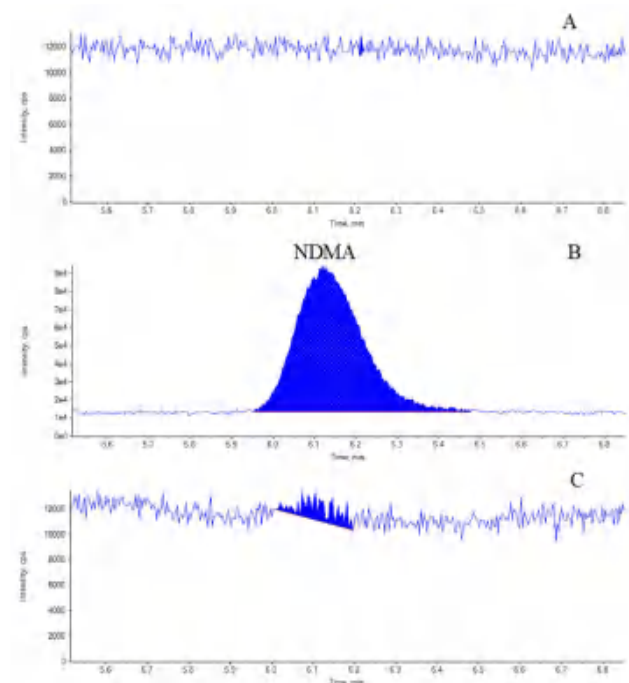


图 1 UPLC-MS/MS 测定 NDMA 典型色谱图  
Fig 1 Typical UPLC-MS/MS chromatograms of NDMA  
A. 空白溶剂 (blank solution); B. 对照品溶液 (control solution); C. 供试品溶液 (sample solution)

2.1.4 方法检测限、定量限和线性范围 精密量取 “2.1.2” 项下系列对照品溶液, 按照 “2.1.1” 项下条件测定, 记录色谱图。以浓度为横坐标 (X)、峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线。结果线性方程为  $Y = 8.13 \times 10^4 X + 7.24 \times 10^4$ ,  $r = 0.9996$ , 结果表明, NDMA 在 0.50 ~ 50.12 ng · mL<sup>-1</sup> 内与峰面积线性关系良好。以信噪比 (S/N) = 3 为检测限, S/N = 10 为定量限, 测得结果分别为 0.20 ng · mL<sup>-1</sup> 和 0.50 ng · mL<sup>-1</sup>。

2.1.5 回收试验 取盐酸雷尼替丁原料药 (批号:

20230101) 2.79 g, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 共 11 份。其中 2 份直接加纯化水溶解并稀释至刻度, 用于计算样品中 NDMA 的含量。另 9 份均分为 3 组, 精密加入 “2.1.2” 项下 NDMA 对照品溶液适量, 配制成含 NDMA 0.50、10.02 和 50.12 ng · mL<sup>-1</sup> 的溶液, 进样测定, 计算平均回收率。结果显示, 样品本底未检出 NDMA, 低、中、高浓度的平均回收率分别为 93.95%、94.16% 和 96.21%, RSD 分别为 1.4%、0.88% 和 1.3%, 表明该方法准确度良好。

2.1.6 重复性试验 取 “2.1.5” 项下 NDMA 浓度为 10.02 ng · mL<sup>-1</sup> 的溶液 6 份, 进样测定, 计算其平均含量和 RSD。结果显示, 6 份供试品溶液中 NDMA 的平均含量为 0.38 μg · g<sup>-1</sup>, RSD 为 0.76%, 表明该方法重复性良好。

2.1.7 样品测定结果 取 3 批样品, 按 “2.1.2” 项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 结果 3 批样品中均未检出 NDMA。

2.2 阳离子色谱法测定盐酸雷尼替丁中 DMA 的含量

2.2.1 色谱条件 采用 Dionex IonPac CS16 阳离子交换色谱柱 (5 mm × 250 mm, 5.5 μm) 和 Dionex IonPac CS16 保护柱 (5 mm × 50 mm, 5 μm), 以 30 mmol · L<sup>-1</sup> 甲磺酸溶液作为流动相, 等度洗脱, 流速为 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温为 30 °C, 进样体积为 25 μL。检测方式为电导检测器 (配抑制器 CDRS 600, 4 mm), 抑制电流为 88 mA, 电导池温度为 30 °C。

### 2.2.2 溶液的制备

① 对照品溶液: 取盐酸二甲胺对照品约 179.93 mg (相当于 DMA, 99.48 mg), 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加纯化水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得 DMA 对照品储备液; 并进一步稀释配制成 0.01、0.02、0.05、0.10、0.20、0.50、0.99、1.99 和 3.98 μg · mL<sup>-1</sup> 系列浓度对照品溶液。

② 供试品溶液: 精密移取 “2.1.2” 项下供试品溶液 1 mL 至 10 mL 量瓶中, 加纯化水定容, 摇匀, 滤膜滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.2.3 专属性试验 分别取空白溶剂、DMA 对照品溶液和供试品溶液, 注入离子色谱仪, 记录色谱图 (见图 2)。结果表明 DMA 峰与相邻峰的分度度较好, 均大于 1.5, 且空白溶剂无干扰。

2.2.4 方法检测限、定量限和线性范围 精密量取 “2.2.2” 项下系列浓度对照品溶液, 注入离子色谱仪, 记录色谱图。结果线性方程为:  $Y = 0.1347X - 0.0002$  ( $r = 0.9999$ ), 表明 DMA 在 0.02 ~ 3.98 μg · mL<sup>-1</sup> 内与峰面积具有良好的线性关系。另以 S/N = 3 为检测限, S/N = 10 为定量限, 测得结果分别为 0.01 μg · mL<sup>-1</sup> 和 0.02 μg · mL<sup>-1</sup>。

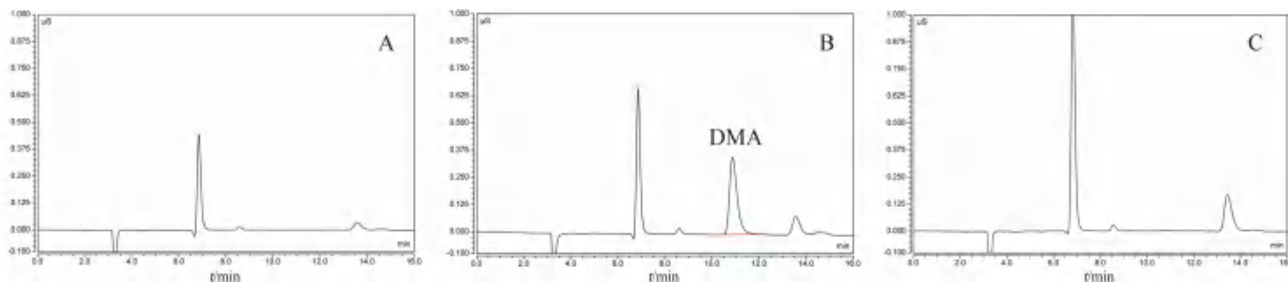


图 2 测定 DMA 典型离子色谱图

Fig 2 Typical ion chromatograms of DMA

A. 空白溶剂 (blank solution); B. 对照品溶液 (standard solution); C. 供试品溶液 (sample solution)

**2.2.5 回收试验** 取盐酸雷尼替丁原料药 (批号: 20230101) 2.79 g, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加纯化水溶解并定容至刻度, 制备盐酸雷尼替丁储备液。进一步精密量取储备液 2 mL, 置 20 mL 量瓶中, 共 11 份, 其中 2 份直接加纯化水稀释并定容至刻度。另 9 份均分为 3 组, 每组分别精密加入“2.2.2”项下 DMA 对照品溶液适量, 加入纯化水稀释并定容至刻度, 配制含 DMA 分别为 0.02、0.99 和 3.98  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液, 进样测定, 计算平均回收率。结果显示, 样品本底未检出 DMA, 低、中、高浓度平均回收率分别为 100.73%、99.90% 和 96.43%, *RSD* 分别为 3.7%、0.76% 和 1.8%, 表明该方法具有良好的准确度。

**2.2.6 重复性试验** 取“2.2.5”项下 DMA 为 0.99  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液 6 份, 进样测定, 计算平均含量和 *RSD*, 结果显示, DMA 的平均含量为 392.77  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ , *RSD* 为 1.4%, 表明该方法具有良好的重复性。

**2.2.7 样品测定结果** 取 3 批样品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 记录色谱图, 结果 3 批样品均未检出 DMA。

**2.3 阴离子色谱法测定盐酸雷尼替丁中  $\text{NO}_2^-$  的含量**

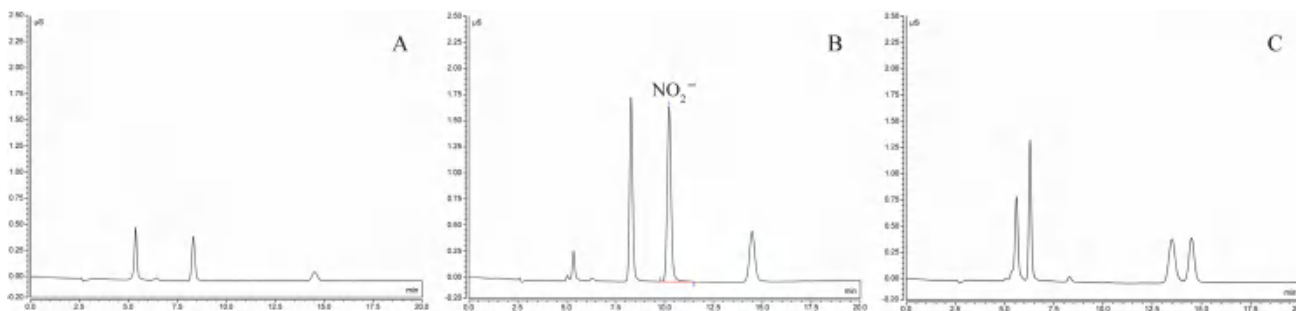


图 3 测定  $\text{NO}_2^-$  典型离子色谱图

Fig 3 Typical ion chromatograms of  $\text{NO}_2^-$

A. 空白溶剂 (blank solution); B. 对照品溶液 (control solution); C. 供试品溶液 (sample solution)

**2.3.4 方法检测限、定量限和线性范围** 精密量取“2.3.2”项下系列对照品溶液, 注入离子色谱仪, 记录色谱图。结果线性方程:  $Y = 0.4440X + 0.0005$  ( $r = 0.9999$ ), 表明  $\text{NO}_2^-$  在 0.02 ~ 5.00

**2.3.1 色谱条件** 采用 DIONEX IonPac AS19 (4 mm×250 mm, 7.5  $\mu\text{m}$ ) 阴离子交换色谱柱和 Dionex IonPac AG19 保护柱 (4 mm×50 mm, 11  $\mu\text{m}$ ), 以氢氧化钾溶液作为流动相, 梯度洗脱 (0 ~ 30 min, 10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 30.0 ~ 35.0 min, 10 ~ 70  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ); 进样量 50  $\mu\text{L}$ ; 柱温 35  $^\circ\text{C}$ ; 流速 1.0  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 抑制电流为 174 mA, 电导池温度为 35  $^\circ\text{C}$ 。

**2.3.2 溶液的制备**

① 对照品溶液: 精密移取 7.5 mL 亚硝酸钠标准溶液 (200.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 相当于  $\text{NO}_2^-$  为 133.33  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 置 100 mL 量瓶中, 加纯化水稀释至刻度, 摇匀, 配制成对照品储备液; 进一步稀释配制 0.01、0.02、0.05、0.10、0.50、1.00 和 5.00  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  系列浓度对照品溶液。

② 供试品溶液: 精密移取“2.1.2”项下供试品溶液 1 mL 至 25 mL 量瓶中, 加纯化水定容, 摇匀, 依次通过 Ag 柱、C18 固相萃取柱和滤膜滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

**2.3.3 专属性试验** 分别取空白溶剂、 $\text{NO}_2^-$  对照品溶液和供试品溶液, 注入离子色谱仪, 记录色谱图。结果表明,  $\text{NO}_2^-$  峰与相邻的峰分离度较好, 均大于 1.5, 且空白溶剂无干扰 (见图 3)。

$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  内具有良好的线性关系。另以  $S/N = 3$  为检测限,  $S/N = 10$  为定量限, 测得结果分别为 0.01  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  和 0.02  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**2.3.5 回收试验** 取盐酸雷尼替丁原料药 (批号:

20230101) 2.79 g, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加纯化水溶解并定容至刻度, 制备盐酸雷尼替丁储备液。进一步精密量取储备液 1 mL, 置 25 mL 量瓶中, 共 11 份, 其中 2 份直接加纯化水稀释并定容至刻度。另 9 份均分为 3 组, 每组分别精密加入“2.3.2”项下 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>对照品溶液适量, 加入纯化水稀释并定容至刻度, 配制成含 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>分别为 0.02、0.50 和 5.00 μg · mL<sup>-1</sup> 溶液, 进样测定, 计算平均回收率。结果显示, 样品本底未检出 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, 平均回收率分别为 109.42%、94.92% 和 98.93%, RSD 分别为 6.5%、0.80% 和 1.6%, 表明该方法具有良好的准确度。

**2.3.6 重复性试验** 取“2.3.5”项下 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 为 0.50 μg · mL<sup>-1</sup> 的溶液 6 份, 进样测定, 计算平均含量和 RSD, 结果显示, 供试品溶液中的平均含量为 474.58 μg · g<sup>-1</sup>, RSD 为 0.76%, 表明该方法具有良好的重复性。

**2.3.7 样品测定结果** 取 3 批样品, 按“2.3.2”项下方法配制供试品溶液, 进样测定, 记录色谱图, 结果 3 批样品均未检出 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>。

**2.4 盐酸雷尼替丁高温降解试验**

参照《中国药典》(2020 年版) 第四部通则指导原则 9001 “原料药物与制剂稳定性试验指导原则”, 考察盐酸雷尼替丁原料药在高温、含氧或氮气条件下三种化合物含量及其变化规律。

分别取 12 份盐酸雷尼替丁原料药 (批号: 20230101) 2.79 g, 精密称定, 置 20 mL 顶空西林瓶中, 胶塞密封; 其中 6 份样品采用氮吹仪以流量为 10 L · min<sup>-1</sup> 充入氮气 30 s, 排出氧气。12 份样品再分别置 40 和 60 °C 高温条件下放置, 每个条件下 6 份, 于 5、10 和 30 d 取样后加入纯化水溶解, 并转移至 100 mL 的量瓶中, 分别按照“2.2.2”“2.3.2”和“2.4.2”项下方法配制 NDMA、DMA 和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 供试品溶液, 进样检测, 结果见表 1。

未经高温破坏的盐酸雷尼替丁 (0 d), 3 种物质均未检出。40 °C 充氮气保护下 (无氧条件), NDMA 和 DMA 30 d 内均未检出, 而 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 第 5 日即已检出, 且呈现逐渐增长趋势, 第 30 日为 28.96 μg · g<sup>-1</sup>。40 °C 无氮气保护下 (有氧条件), NDMA 在第 10 日即已检出, 为 0.02 μg · g<sup>-1</sup>, 第 30 日为 0.03 μg · g<sup>-1</sup>; 同样的条件下 DMA 和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 第 5 日即已检出, 且均呈现增长趋势, 第 30 日分别为 11.21 和 31.11 μg · g<sup>-1</sup>。60 °C 无氧条件下, NDMA 第 5 日即已检出, 第 30 日增长至 0.18 μg · g<sup>-1</sup>; DMA 和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 第 5 日也均被检出, 第 30 日分别为 17.20 μg · g<sup>-1</sup> 和 37.65 μg · g<sup>-1</sup>。在 60 °C 有氧条件下, 3 种化合物均被检出, 各时间点高于无氧条件 (除第 5 日的

表 1 盐酸雷尼替丁高温降解样品中 NDMA、DMA 和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 检测结果 (μg · g<sup>-1</sup>)

Tab 1 NDMA, DMA and NO<sub>2</sub><sup>-</sup> in ranitidine hydrochloride by forced degradation at high-temperature (μg · g<sup>-1</sup>)

放置条件	检测项目	放置时间/d				
		0	5	10	30	
40 °C	无氧	NDMA	N/D	N/D	N/D	N/D
		DMA	N/D	N/D	N/D	N/D
		NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	N/D	9.22	12.61	28.96
	有氧	NDMA	N/D	N/D	0.02	0.03
		DMA	N/D	9.61	9.93	11.21
		NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	N/D	11.34	14.87	31.11
60 °C	无氧	NDMA	N/D	< LOQ	0.04	0.18
		DMA	N/D	10.11	10.50	17.20
		NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	N/D	19.99	26.36	37.65
	有氧	NDMA	N/D	0.15	0.18	1.92
		DMA	N/D	27.15	32.63	55.50
		NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	N/D	15.72	30.54	44.76

注: N/D 表示未检测出目标物质; < LOQ 表示低于定量下限。

Note: N/D indicates that the target substance was not detected, < LOQ indicates that the content of target substance was below the limit of quantitation.

NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), 第 30 日 NDMA、DMA 和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 分别增长至 1.92、55.50 和 44.76 μg · g<sup>-1</sup>。

**3 讨论**

**3.1 检测方法讨论**

NDMA 检测的方法主要包括高效液相色谱-串联质谱法 (HPLC-MS/MS)、气相色谱-质谱联用法 (GC-MS)、顶空气相色谱-质谱联用法 (HS-GC-MS) 等<sup>[11]</sup>。本研究主要参考 FDA 推荐的 HPLC-MS/MS 方法<sup>[12]</sup>, 采用可耐低 pH 和高含水量流动相的 ZORBAX SB-C18 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 以甲醇和水溶液作为流动相, 并在两相中均加入 0.1% 甲酸, 促进 NDMA 正离子化。另外, NDMA 极性大, 易溶于水, 首先以 95% 水相洗脱 8.0 min, 待 NDMA 出峰后, 再缓慢降至 5% 并维持 3.0 min, 冲洗色谱柱中高浓度的盐酸雷尼替丁, 结果表明专属性良好。质谱采用的离子源为 APCI, 相较于常用的电喷雾电离源 (ESI), 一般只产生单电荷离子, 且离子化效率高, 更适用于包括 NDMA 分子量小的化合物<sup>[13-14]</sup>。

DMA 为短链脂肪族仲胺类化合物, 极性大、易挥发, 且无发色基团。文献报道检测方法包括柱前衍生化高效液相色谱法<sup>[15]</sup>、顶空气相色谱法 (HS-GC-FID)<sup>[16]</sup> 和亲水相互作用液相色谱串联质谱法 (HILIC-MS/MS)<sup>[17]</sup>。根据 DMA 为碱性化合物, Chemdraw 软件模拟 pK<sub>a</sub> 为 10.19, 在酸性条件下带正电荷, 因此可通过阳离子色谱法进行检测。目前已有文献报道采用离子色谱方法检测化学药品中 DMA (如甲磺酸伊马替尼、二甲双



胍等)<sup>[18-19]</sup>。本研究选择大容量阳离子交换色谱柱 IonPac CS16, 该色谱柱的离子交换基团为羧基, 可有效分离短链烷基胺和烷醇胺类化合物<sup>[20]</sup>。以甲磺酸为淋洗液, 并考察其浓度 (25、30、35 mmol · L<sup>-1</sup>), 结果表明分离度均满足要求。最后确定条件: 淋洗液浓度为 30 mmol · L<sup>-1</sup>, 流速为 1 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温为 30 °C<sup>[19]</sup>。

NO<sub>2</sub><sup>-</sup>的测定方法主要有离子色谱、比色法、滴定法和分光光度法等<sup>[21]</sup>。其中, 离子色谱法具有简便、快速、灵敏、高效、选择性高的特点, 为常规阴离子检测的首选方法。本研究主要参考《国家标准: 食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定 (GB5009.33—2016)》中离子色谱测定方法。另外, 盐酸雷尼替丁原料药中含有氯离子, 且保留时间与 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>接近, 因此供试品溶液进样前依次通过 Ag 柱和 C18 固相萃取柱进行净化。

最后, 进一步对上述三种方法进行方法学考察, 结果表明三种方法的分离度、灵敏度、回收率和重复性均能满足要求, 为检测盐酸雷尼替丁中 NDMA 及其前体化合物 DMA 和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>的有效方法。

### 3.2 影响盐酸雷尼替丁产生 NDMA 及其前体化合物 DMA 和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>的因素

经高温降解 30 d 结果表明, 温度对 NDMA、DMA 和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>产生有显著影响, 对比 40 °C 和 60 °C 无氧条件下, 前者在 30 d 内未产生 NDMA、DMA, 而后者第 5 日即已检出 DMA, 第 10 日检出 NDMA, 且呈逐渐增长趋势; 较低温度下, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>在第 5 日已检出, 同时温度越高降解量越高。同时, 氧气也是产生 NDMA 及其前体化合物 DMA 和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>的重要因素, 40 °C 有氧条件下, DMA 和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>在第 5 日检出, NDMA 在第 10 日检出, 三种物质均呈现增长的趋势; 60 °C 有氧条件下, 三种物质在第 5 日均已检出, 且均高于相应的无氧条件。另外, DMA 和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>在各条件 (除未检出 DMA 的 40 °C 无氧条件)、各时间点的检出量均高于 NDMA。间接验证盐酸雷尼替丁产生 NDMA 机制之一, 是由于其含有不稳定的二甲胺和亚硝基片段, 首先降解生成 DMA 和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, 并进一步反应产生 NDMA, 但具体的降解机制有待进一步研究。本研究也为贮存盐酸雷尼替丁原料药及其制剂的温度和残氧控制提供了一定的依据。

### 3.3 盐酸雷尼替丁中 NDMA、DMA 和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>标准制订初步探讨

经高温影响试验表明, NDMA、DMA 和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>均为盐酸雷尼替丁降解杂质。根据 ICH Q3A, 须进行检验和控制。2019 年 12 月, 国家药典委员会发布《关于盐酸雷尼替丁及其制剂国家药品标准修订草案》设置 NDMA 的限度为 0.32 μg · g<sup>-1</sup> (即

0.32 ppm)。但包括美国药典 2023 版、欧洲药典 11.0 版在内, 均尚未收录其前体化合物 DMA 和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>检测方法和接受标准。

根据 CPDB 数据库显示, 亚硝酸钠 (NaNO<sub>2</sub><sup>-</sup>) 沙门氏菌回复突变试验 (Ames) 呈阳性, 大鼠的 50% 肿瘤发生率 (TD<sub>50</sub>) 为 167 mg / (kg · d), 线性外推至可能性为十万分之一患癌风险的每日可接受摄入量: 167 mg · kg<sup>-1</sup> ÷ 50 000 × 50 kg ≈ 每人每日 0.167 mg。盐酸雷尼替丁每日最大摄入量为 300 mg<sup>[4]</sup>, 因此计算允许盐酸雷尼替丁中亚硝酸盐的含量为: 0.167 mg ÷ 300 mg ≈ 556.66 μg · g<sup>-1</sup>。DMA 虽不是基因毒性杂质, 但作为盐酸雷尼替丁降解杂质, 依据 ICH Q3A 附件 1, 盐酸雷尼替丁每日最大摄入量低于 2 g · d<sup>-1</sup>, 应控制限度为 0.10% (即 1000 μg · g<sup>-1</sup>)。另外, 建议生产盐酸雷尼替丁原料药及其制剂企业建立 DMA 和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>内控标准, 有利于提前预警 NDMA 的产生。

## 参考文献

- [1] Brogden RN, Carmine AA, Heel RC, et al. Ranitidine: a review of its pharmacology and therapeutic use in peptic ulcer-disease and other allied diseases [J]. *Drugs*, 1982, 24: 267-303.
- [2] Grant SM, Langtry HD, Brogden RN. Ranitidine. An updated review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in peptic ulcer disease and other allied diseases [J]. *Drugs*, 1989, 37: 801-870.
- [3] Food and Drug Administration. Statement alerting patients and health care professionals of NDMA found in samples of ranitidine[EB/OL]. [2019-09-13] (2024-05-06). <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/statement-alerting-patients-and-health-care-professionals-ndma-found-samples-ranitidine>.
- [4] Food and Drug Administration. FDA requests removal of all ranitidine products (zantac) from the market[EB/OL]. [2020-04-01] (2024-05-06). <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-requests-removal-all-ranitidine-products-zantac-market>.
- [5] 国家药品监督管理局药品. 化学药物中亚硝胺类杂质研究技术指导原则 (试行) [EB/OL]. [2020-05-08]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/ypggtg/ypqtg-gtg/20200508160101122.html>.
- [6] European Medicines Agency. Assessment report: angiotensin-II-receptor antagonists (sartans) containing a tetrazole group Information on nitrosamines for marketing authorisation holders[EB/OL]. [2019-02-14] (2024-05-06). [https://www.ema.europa.eu/en/documents/variation-report/angiotensin-ii-receptor-antagonists-sartans-article-31-referral-chmp-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/variation-report/angiotensin-ii-receptor-antagonists-sartans-article-31-referral-chmp-assessment-report_en.pdf).
- [7] Therapeutic Goods Administration Australian Government Department of Health. Contamination of ranitidine medicines

- with the nitrosamine NDMA TGA laboratory testing. Version 1.0[EB/OL]. [2019-10-22] (2024-05-06). <https://www.tga.gov.au/sites/default/files/tga-laboratories-esting-ranitidine-medicines.pdf>.
- [8] King FJ, Searle AD, Urquhart MW. Ranitidine-investigations into the root cause for the presence of *N*-nitroso-*N*, *N*-dimethylamine in ranitidine hydrochloride drug substances and associated drug products [J]. *Org Process Res Dev*, 2020, 24 (12): 2915-2926.
- [9] Yokoo H, Yamamoto E, Masada S, et al. *N*-Nitrosodimethylamine (NDMA) formation from ranitidine impurities: possible root causes of the presence of NDMA in ranitidine hydrochloride [J]. *Chem Pharm Bull*, 2021, 69: 872-876.
- [10] Abe Y, Yamamoto E, Yoshida H, et al. Temperature-dependent formation of *N*-nitrodimethyl amine during the storage of ranitidine reagent powders and tablets [J]. *Chem Pharm Bull*, 2020, 68: 1008-1012.
- [11] 曹梦茹, 叶志伟, 汪隽, 等. 药品中 *N*-亚硝胺类有害杂质 [J]. *化学进展*, 2023, 35 (12): 1881-1894.
- [12] Food and Drug Administration. Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) method for the determination of NDMA in ranitidine drug substance and drug product [EB/OL]. [2019-09-13]. <https://www.fda.gov/media/130801/download>.
- [13] 章为, 王晓菲, 易必新, 等. UPLC-APCI-MS/MS 法测定二甲双胍格列吡嗪片中 *N*-亚硝基二甲胺 [J]. *中南药学*, 2020, 18 (9): 1568-1571.
- [14] 汪晨韬, 江游, 金尚忠, 等. 大气压化学电离技术及其应用 [J]. *中国计量大学学报*, 2022, 33 (4): 482-493.
- [15] Han LF, Hou DS, Ma CY, et al. Simultaneous determination of eight short-chain aliphatic amines in drug substances by HPLC with diode array detection after derivatization with halonitrobenzenes [J]. *J Sep Sci*, 2017, 40 (15): 3074-3085.
- [16] Gopalakrishnan J, Devi SA. Determination of dimethylamine and triethylamine in hydrochloride salts of drug substances by headspace gas chromatography using dimethyl sulphoxide-imidazole as diluent [J]. *Indian J Pharm Sci*, 2016, 78: 409-413.
- [17] Douša M, Jireš J. HILIC-MS determination of dimethylamine in the active pharmaceutical ingredients and in the dosage forms of metformin [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 191: 113573.
- [18] 嵇海澄, 李孝壁, 李琴, 等. 离子色谱法测定甲磺酸伊马替尼中残留的二甲胺 [J]. *中国医药科学*, 2015, 5 (3): 57-59.
- [19] 储韞婧, 邵方娴, 陈民辉, 等. 离子色谱法测定盐酸二甲双胍药物中二甲胺的含量 [J]. *中南药学*, 2022, 20 (5): 1162-1166.
- [20] Thermofisher. Ionpac CS16 cation-exchange column [EB/OL]. [2023-08-20] (2024-05-06). <https://www.thermofisher.cn/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.cn/TFS-Assets%2FCMD%2F-Specification-Sheets%2F4237-DS-IonPac-CS16-Cation-Exchange-28Nov10-LPN1257-04-R2.pdf>.
- [21] 田冶, 冯媛媛, 陶晓莎, 等. 固相萃取-离子色谱法检测利福平及利福喷丁胶囊中亚硝酸根离子 [J]. *中国新药杂志*, 2023, 32 (21): 2218-2224.

(收稿日期: 2024-01-02; 修回日期: 2024-04-05)

## 高效液相色谱法同时测定多索茶碱注射液中 9 种杂质的含量

李锋武<sup>1</sup>, 范菲<sup>1</sup>, 周娜<sup>1</sup>, 冯琴琴<sup>2\*</sup> (1.西安市食品药品检验所, 西安 710061; 2.兵器工业五二一医院, 西安 710065)

**摘要:** **目的** 建立高效液相色谱法同时测定多索茶碱注射液中 9 种杂质的含量。**方法** 使用 CAPCELL PAK C18 ME 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 以乙腈-磷酸盐缓冲液为流动相, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温为 30℃, 检测波长为 273 nm。对多索茶碱注射液中可能存在的 9 种杂质进行定量分析和限度检查。**结果** 在该条件下, 9 种杂质均能完全分离, 回收率均在 97.0%~105.0%。**结论** 该方法专属性强, 重复性好, 可用于多索茶碱注射液有关物质的测定。

**关键词:** 多索茶碱注射液; 高效液相色谱法; 杂质

**中图分类号:** R927

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-2981(2024)08-2197-04

**doi:**10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.038

**基金项目:** 国家药品抽检项目 (No. 国药监药管〔2023〕2 号)。

**作者简介:** 李锋武, 男, 副主任药师, 主要从事药品检验工作, email: procaine@126.com \***通信作者:** 冯琴琴, 女, 副主任药师, 主要从事药品研究工作, email: 1659249746@qq.com

# Simultaneous determination of 9 impurities in doxofylline injection by HPLC

LI Feng-wu<sup>1</sup>, FAN Fei<sup>1</sup>, ZHOU Na<sup>1</sup>, FENG Qin-qin<sup>2\*</sup> (1. Xi'an Institute for Food and Drug Inspection, Xi'an 710061; 2. The 521st Hospital of Ordnance Industry, Xi'an 710065)

**Abstract: Objective** To determine 9 impurities in doxofylline injection by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** A CAPCELL PAK C18 ME column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used. Acetonitrile-phosphate buffered saline was used as the mobile phase, with gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, the column temperature was 30 °C, and the detection wavelength was 273 nm. Nine possible impurities in doxofylline injection were quantitated and the limit was checked. **Results** Under these conditions, the 9 impurities were completely separated, with recoveries between 97.0% ~ 105.0%. **Conclusion** This method is specific and reproducible, and can be used for the determination of related substances in doxofylline injection.

**Key words:** doxofylline injection; HPLC; impurity

多索茶碱由意大利 Roberts 公司首先开发, 于 1988 年上市。多索茶碱为甲基黄嘌呤衍生物, 呼吸系统用药, 磷酸二酯酶抑制剂, 用于治疗支气管哮喘、喘息性慢性支气管炎等<sup>[1-3]</sup>。目前该品种我国共有 45 个批准文号, 涉及 28 个生产企业、4 种规格。

多索茶碱注射液的现行质量标准共计有 19 个, 其中有关物质检查项共涉及 9 种不同杂质, 每个质量标准中关于有关物质的检查方法和杂质的数量和限度均不相同。HPLC 可用于检测多索茶碱中有关物质<sup>[4-5]</sup>, 然而未发现同时测定多索茶碱中 9 种杂质的研究方法<sup>[6-10]</sup>, 因此本研究拟建立多索茶碱注射液有关物质 HPLC 检测方

法, 以控制多索茶碱注射液的质量, 为市售多索茶碱注射液的质量评价提供方法学借鉴。

## 1 材料

### 1.1 仪器

260 型高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); MS105 型分析天平 (瑞士梅特勒-托利多公司); Milli-Qreference 型超纯水机 (美国密理博公司)。

### 1.2 试剂

使用的各杂质对照品信息见表 1; 乙腈 (色谱纯, 赛默飞世尔科技公司); 磷酸二氢钾、磷酸氢二钾 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 水为纯化水。

表 1 杂质对照品信息

Tab 1 Impurity reference information

编号	名称	批号	纯度 /%	生产厂家
杂质 1	N-甲基-1-(1, 3, -二氧杂-2, -环戊基甲基)-4-甲氨基咪唑-5-甲酰胺	18-09-1010	97.40	SINCO PHARMACHEM
杂质 2	茶碱-7-乙醛	22-12-0250	96.89	SINCO PHARMACHEM
杂质 3	茶碱	100121-201104	100.00	中国食品药品检定研究院
杂质 4	9-(1, 3-二氧杂-2-环戊基甲基)茶碱	22-06-2808	99.20	SINCO PHARMACHEM
杂质 5	乙羟茶碱	100215-202202	100.00	中国食品药品检定研究院
杂质 6	可可碱	101110-201202	100.00	中国食品药品检定研究院
杂质 7	7-(1, 3-二甲基-2, 6-二氧-1, 2, 3, 6-四氢-7H-嘌呤-7-基)甲基-1, 3-二甲基-1H-嘌呤-2, 6(3H, 7H)-二酮	20-10-2008	100.00	SINCO PHARMACHEM
杂质 8	1-(1, 3-二氧戊环-2-基)-4-(1, 3-二甲脲基)-1-氢-咪唑-5-甲酸	21-06-0708	95.23	SINCO PHARMACHEM
杂质 9	7-(2, 2-二甲氧基乙基)-1, 3-二甲基-1-氢-嘌呤-2, 6(3-氧, 7-氧)-二酮	18-07-2476	98.84	SINCO PHARMACHEM

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: CAPCELL PAK C18 ME 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流速: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温: 30 °C; 检测波长: 273 nm; 进样量: 10 μL; 流动相: A 为乙腈, B 为磷酸盐缓冲液 (取

磷酸二氢钾 8.34 g 和磷酸氢二钾 0.87 g, 加水溶解并稀释制成 1000 mL, 调节 pH 值至 5.8), 梯度洗脱, 见表 2。

### 2.2 对照品储备液的制备

分别精密称定各杂质 1~9 对照品 10.49、9.64、10.22、9.97、10.53、9.77、10.70、9.56、9.69 mg,



表 2 梯度洗脱程序  
Tab 2 Gradient elution

时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	12	88
28	12	88
33	20	80
45	20	80
46	12	88
55	12	88

置于同一 100 mL 量瓶中，用乙腈 - 水 (50 : 50) 溶解并稀释至刻度，制成对照品储备液。

### 2.3 检测波长的选择

对各杂质进行全波长扫描，除杂质 8 在 233 nm 有最大吸收外，其他杂质均在 205 nm 和 273 nm 的波长附近有最大吸收，经过色谱图分析，在 205 nm 的波长附近，色谱图噪声较大，基线不平，且低浓度各杂质在此波长处无法检出，因此选择 273 nm 作为检测波长，噪声较小，基线平稳，各杂质均能检出，且检测限更低。

### 2.4 专属性试验

分别精密吸取对照品溶液、样品溶液（未检出杂质，批号为 2209241）和空白溶剂（纯化水），进样分析，结果如图 1 所示，各杂质峰附近无干扰，且分离度大于 1.5，表明该方法专属性良好。

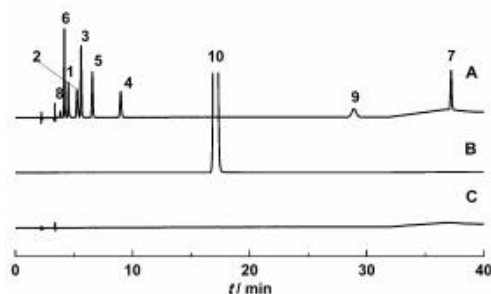


图 1 多索茶碱注射液专属性 HPLC 图

Fig 1 Specific HPLC chromatogram of doxophylline injection

A. 混合对照品溶液 (mixed control solution); B. 样品溶液 (sample solution); C. 空白溶剂 (blank Solvent); 1 ~ 9. 杂质 1 ~ 9 (impurity 1 ~ 9); 10. 多索茶碱 (doxophylline)

### 2.5 线性关系考察

分别精密吸取“2.2”项下对照品储备液 0.1、0.5、1.0、2.0、5.0 mL，置于 100 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，制成系列浓度的对照品溶液（系列 1 ~ 5）。进样测定，以峰面积 (y) 对质量浓度 (x,  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 作线性回归，得回归方程，结果见表 3。各杂质相关系数均大于 0.999，表明各杂质与峰面积线性关系良好。

### 2.6 检测限和定量限

准确移取“2.2”项下对照品储备液，逐步稀释，按“2.1”项下色谱条件进行检测，至峰面积信噪比 ( $S/N$ )  $\approx 10$  时，为定量限浓度； $S/N \approx 3$  时，为检测限浓度，结果见表 3。

表 3 多索茶碱注射液中 9 种杂质线性关系考察结果  
Tab 3 Linearity of 9 impurities in doxophylline injection

编号	回归方程	相关系数 ( $r$ )	线性范围 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	检测限 / ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	定量限 / ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
杂质 1	$y = 0.1787x + 0.0014$	1.000	0.10 ~ 5.11	2.41	7.22
杂质 2	$y = 0.2445x + 0.0050$	1.000	0.09 ~ 4.67	2.18	6.53
杂质 3	$y = 0.3790x + 0.0067$	1.000	0.10 ~ 5.11	1.38	4.15
杂质 4	$y = 0.2284x + 0.0052$	1.000	0.10 ~ 4.95	3.30	9.91
杂质 5	$y = 0.2845x + 0.0048$	1.000	0.11 ~ 5.27	2.11	6.32
杂质 6	$y = 0.3812x + 0.0059$	1.000	0.10 ~ 4.89	1.21	3.63
杂质 7	$y = 0.2806x + 0.0048$	1.000	0.11 ~ 5.35	3.67	11.02
杂质 8	$y = 0.0297x - 0.0002$	0.9998	0.09 ~ 4.55	9.87	29.61
杂质 9	$y = 0.2338x + 0.0019$	0.9999	0.10 ~ 4.79	30.54	91.62

### 2.7 精密度试验

精密吸取线性对照品溶液，连续进样 5 次，按“2.1”项下色谱条件进行检测，结果杂质 1 ~ 9 的 RSD 分别为 0.75%、0.47%、0.53%、0.58%、0.65%、0.37%、0.73%、1.2%、0.30%，均小于 1.5%，表明各杂质的精密度良好。

### 2.8 稳定性试验

精密吸取线性系列 3 对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件分别在 0、2、4、8、12、24 h 进行检测，结果杂质 1 ~ 9 的 RSD 分别为 1.2%、0.48%、

0.57%、1.1%、0.73%、1.0%、1.2%、0.72%、1.3%，表明样品制成溶液后在 24 h 内稳定。

### 2.9 回收试验

取批号为 2209241 的样品（该批次样品中未检测出杂质）9 份，分别加入混合对照品储备液 0.8、1.0 和 1.2 mL，制成低、中、高 3 种浓度的溶液，按“2.1”项下色谱条件进行检测，结果 9 种杂质的平均回收率均在 97.0% ~ 105.0%，RSD 均小于 1.5%，表明该方法回收率良好。

### 2.10 破坏性试验

取批号为 2209241 的样品 2 mL, 分别经酸 (0.5 mL 3 mol·L<sup>-1</sup> HCl)、碱 (0.5 mL 0.4% NaOH)、光 (4800 lx 照 72 h)、氧 (0.1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 强制破坏, 按“2.1”项下色谱条件进行检测, 对比经不同处

理后样品的保留情况, 如图 2 所示, 结果表明该品种样品在光、氧化条件下稳定, 在酸、碱条件下不稳定。

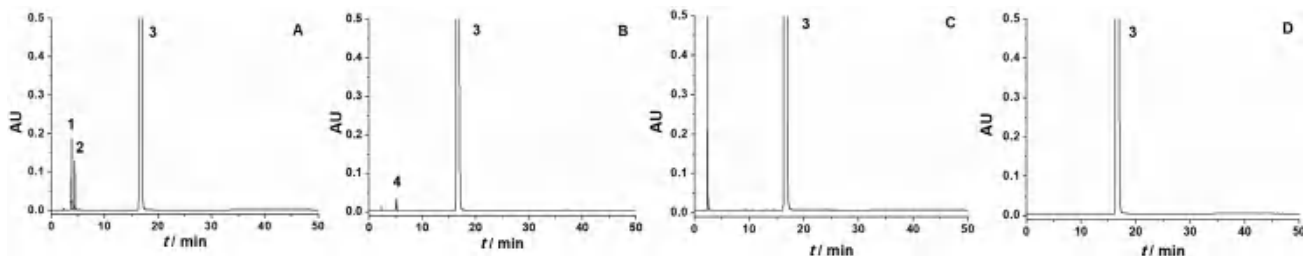


图 2 多索茶碱注射液破坏性试验色谱图

Fig 2 Destructive test chromatogram of doxophylline injection

A. 碱破坏试验 (alkali degradation); B. 酸破坏试验 (acid degradation); C. 氧化破坏试验 (oxidative degradation); D. 光照破坏试验 (light degradation); 1. 杂质 8 (impurity 8); 2. 杂质 1 (impurity 1); 3. 多索茶碱 (doxophylline); 4. 杂质 2 (impurity 2)

### 2.11 样品检测

按照上述方法对全国各地抽检的 18 个厂家的 208 批次多索茶碱注射液有关物质进行检验, 结果只在 4 个厂家的样品中检出杂质 2、杂质 4、杂质 5 和杂质 7, 且含量均未超过 0.1%, 表明该方法可用于多索茶碱注射液有关物质检测。

### 3 讨论

该品种为注射剂, 为最终灭菌产品, 灭菌温度为 121 °C, 故在破坏试验中未考察高温破坏。本试验建立了多索茶碱注射液中 9 种已知杂质的 HPLC 法, 分别考察了不同缓冲液对杂质分离度的影响, 如磷酸钾缓冲液、磷酸钠缓冲液以及醋酸-醋酸钠缓冲液, 结果显示以 pH 5.8 的磷酸钾缓冲液为水相时, 各杂质分离度可达到 1.5, 且无拖尾现象, 同时稳定性试验和回收试验结果表明该方法专属性强, 稳定性好, 分析结果准确。

根据多索茶碱合成路线和结构特征, 杂质 1、杂质 2、杂质 5 和杂质 8 为原料制备过程中产生的副产物及降解产物, 杂质 3 和杂质 6 为原料引入, 杂质 4 为在原料制备过程中产生的工艺杂质, 为位置异构体、杂质 7 为原料合成反应副产物、杂质 9 为原料制备过程中产生的工艺杂质, 为氯乙醛缩乙二醇中杂质氯乙醛缩二甲醇和茶碱反应产生<sup>[11]</sup>。《中国药典》2020 年版二部中该品种有关物质的检测方法为等度洗脱<sup>[12]</sup>, 且只规定了单个杂质和总杂质的限度, 未明确各杂质的名称。该方法的建立, 有助于生产企业明确各杂质的准确信息并在生产过程中予以规避, 更好地提升产品质量。

### 参考文献

[1] 马红玲, 徐兵, 李昕, 等. 1 例慢性阻塞性肺疾病患者

的药学监护 [J]. 中南药学, 2015, 13 (6): 657-659.

- [2] Aprile S, Colombo G, Serafini M, et al. An unexpected deuterium-induced metabolic switch in doxophylline [J]. ACS Med Chem Lett, 2022, 13 (8): 1278-1285.
- [3] Salar U, Atia-Tul-Wahab, Iqbal CM. Biochemical evaluation and ligand binding studies on glycerophosphodiester phosphodiesterase from *Staphylococcus aureus* using STD-NMR spectroscopy and molecular docking analysis [J]. Bioorg Chem, 2024, 144: 107153-107163.
- [4] Zhu PX, Lu JX, Hong LY, et al. Characterization of an unknown impurity in doxofylline using LC-MS and NMR [J]. J Pharm Biomed Anal, 2017, 140: 31-37.
- [5] Xiao TY, Lin HQ, Lao JK, et al. Simultaneous and trace-level quantification of four benzene sulfonate potential genotoxic impurities in doxofylline active pharmaceutical ingredients and tablets using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection [J]. Biomed Chromatogr, 2024, 38 (2): 5790-5797.
- [6] 王琼芬, 徐虹, 刘婷, 等. 多索茶碱注射液杂质谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38 (3): 464-468.
- [7] Raju CK, Pandey AK, Gururaj S, et al. Isolation and characterization of novel degradation products of doxofylline using HPLC, FTIR, LCMS and NMR [J]. J Pharm Biomed Anal, 2017, 140: 1-10.
- [8] 刘绪贵, 郝彦齐, 丁珊珊. HPLC 法测定多索茶碱注射液中的工艺杂质及降解产物 [J]. 药学研究, 2016, 35 (11): 646-649.
- [9] 黄玉兴. 多索茶碱注射液中有关注物质的测定方法探讨 [J]. 北方药学, 2015, 12 (11): 16-17.
- [10] 沙吉达, 施友玲, 余丽娘. 注射用多索茶碱有关物质和含量的 HPLC 测定法 [J]. 中国药事, 2006, 20 (10): 616-618.
- [11] 刘红霞, 梁军. 多索茶碱的合成工艺的研究 [J]. 齐齐哈尔大学学报, 2002, 18 (4): 23-24.
- [12] 中国药典 2020 年版. 二部 [S]. 2020: 474.

(收稿日期: 2024-01-05; 修回日期: 2024-03-08)

## 中药资源开发与利用

## 《神农本草经》与《中国药典》2020 年版对中药四气五味表述异同分析

王莹, 杨文华, 梁艳, 张莎莎, 张安特, 孙晓迪, 薛春苗\* (北京中医药大学东直门医院, 北京 100700)

**摘要:** **目的** 明确《神农本草经》与现代中药四气五味表述的差异, 为进一步指导临床合理用药提供参考。**方法** 以《神农本草经》记载的 365 种中药为来源进行统计, 《中国药典》2020 年版和《临床用药须知》(2015 版) 收录《神农本草经》记载的药物为研究对象, 建立数据库, 对比分析中药“四气”“五味”的表述差异。**结果** 本研究共统计 203 种中药, 其中中药四气表述完全不相同的有 66 种, 占 32.51%; 中药五味表述完全不一致的有 20 种, 占 9.85%。**结论** 通过对比《中国药典》《临床用药须知》与《神农本草经》中药“四气”“五味”, 大部分中药表述一致, 表述不一致的中药值得进一步深入研究。

**关键词:** 中药; 四气; 五味; 《神农本草经》; 《中国药典》

中图分类号: R283

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)08-2201-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.039

### Similarities and differences between *Shennong's Herbal Classic* and *Chinese Pharmacopoeia (2020)* on the expression of four properties and five flavors of traditional Chinese medicine

WANG Ying, YANG Wen-hua, LIANG Yan, ZHANG Sha-sha, ZHANG An-te, SUN Xiao-di, XUE Chun-miao\* (*Dongzhimen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700*)

**Abstract: Objective** To clarify the difference between *Shennong's Herbal Classic* and modern Chinese medicine on the expression of four properties and five flavors, and to provide reference to guide clinical rational drug use. **Methods** The 365 traditional Chinese medicines from *Shennong's Herbal Classic* were used as the source of statistics, and the drugs from *Shennong's Herbal Classic* collected in *Chinese Pharmacopoeia (2020)* and *Clinical Medication Guidelines (2015)* were used as the research objects. A database was established to compare the differences in the description of 'four properties' and 'five flavors' of traditional Chinese medicine. **Results** Totally 203 traditional Chinese medicines were counted, 66 (32.51%) of which were completely different in the description of the four properties of traditional Chinese medicines; while 20 (9.85%) drugs had completely inconsistent expressions of the five flavors of traditional Chinese medicine. **Conclusion** By comparing the *Chinese Pharmacopoeia*, *Instructions for Clinical Use of Drugs* and *Shennong's Herbal Classic*, most descriptions of the four properties and five flavors of Chinese medicines are consistent and those that are inconsistent deserve further in-depth study.

**Key words:** traditional Chinese medicine; four properties; five flavors; *Shennong's Herbal Classic*; *Chinese Pharmacopoeia*

**基金项目:** 2018 年全国中药特色技术传承人才培养项目 (国中医药人教函〔2018〕204 号); 国家中医药管理局高水平重点学科临床中药学 (No.zyyzdxx-2023257)。

**作者简介:** 王莹, 女, 主管中药师, 主要从事医院临床药学工作, email: wying0769@163.com \***通信作者:** 薛春苗, 女, 主任药师, 主要从事医院药学工作, email: xuechunmiao9501@163.com



中药的四气也称四性，四气的概念最早出现于《神农本草经》，是指药物有“寒、热、温、凉”四气。中药的四气与四季气候密切相关，其核心内涵就是药物作用性质，反映了药物的寒热作用倾向<sup>[1]</sup>。五味作为药性理论最早见诸《黄帝内经》《神农本草经》中，是中药药性理论的核心内容之一，与中药的功效密切相关<sup>[2]</sup>。《神农本草经》是现存最早的系统论述药物的本草著作，记载了 365 种中药，是中国现存最早的药理学专著。该书在序列中清楚记载着“药有酸、咸、甘、苦、辛五味，又有寒、热、温、凉四气，及有毒、五毒”<sup>[3]</sup>，即现行四气五味和有毒无毒理论的全部框架。本研究分析《神农本草经》<sup>[4]</sup>与现代中药药性四气五味的表述是否有差异，以期临床更好地择药组方提供参考。

## 1 研究方法

### 1.1 数据来源

本研究以《神农本草经》记载的 365 种中药为来源进行统计，与《中国药典》2020 年版<sup>[5]</sup>（简称《中国药典》）进行对比，《临床用药须知·中药成方制剂卷》（2015 版）（简称《临床用药须知》）为补充，结果《中国药典》实收载《神农本草经》药物 189 种，未收载的药物在《临床用药须知》中有 8

种，其中《神农本草经》记载的 6 种药物在《中国药典》中分别分为 2 个品种，故共统计 203 种中药。

### 1.2 数据录入

**1.2.1 药名录入** 将《神农本草经》记载的 365 种中药药名录入 Excel 表，《中国药典》《临床用药须知》相对应的药名录入，药名最终参照《中国药典》记载的中药名称。

**1.2.2 中药性味录入** 将《神农本草经》记载中药四气五味录入 Excel 表，《中国药典》《临床用药须知》相对应的中药四气和五味录入，录入完成后，由双人负责数据审核，保证数据的准确性。

### 1.3 数据统计分析

将《神农本草经》记载的中药四气五味与《中国药典》《临床用药须知》进行统计、对比，重点将表述有异的中药进行统计、分析。

## 2 结果

### 2.1 药名差异

《神农本草经》记载药名与《中国药典》《临床用药须知》药名相同的中药有 107 种，药名有差异的有 96 种。详见表 1。药名差异对照是根据《神农本草经译释》中药物名称及书中记载的对应的中国药典药名而统计得出的。

表 1 《神农本草经》与《中国药典》药名差异对照

Tab 1 Differences in drug names between *Shennong's Herbal Classic* and *Chinese Pharmacopoeia*

类别	药名
药名一致	阿胶、白头翁、白芷、车前子、大豆黄卷、大黄、丹参、甘草、甘遂、干漆、藁本、黄连、苦参、狼毒、龙胆、龙骨、漏芦、蒲黄、青箱子、瞿麦、忍冬、麝香、王不留行、蜈蚣、细辛、夏枯草、辛夷、徐长卿、紫石英、阳起石、淫漆、蜈蚣、巴豆、巴戟天、白及、白敛、白薇、百合、半夏、蒿蓄、鳖甲、常山、茺蔚子、磁石、大枣、当归、地肤子、地榆、独活、杜仲、防风、防己、附子、干姜、葛根、狗脊、龟甲、海藻、厚朴、滑石、黄芪、黄芩、积雪草、桔梗、菊花、卷柏、决明子、连翘、鹿茸、麻黄、牡蛎、木香、牛黄、牛膝、秦艽、秦皮、人参、肉苁蓉、桑螵蛸、山茱萸、商陆、蛇床子、射干、升麻、石膏、石斛、石韦、水蛭、通草、菟丝子、吴茱萸、五味子、雄黄、续断、玄参、淫羊藿、禹余粮、远志、泽兰、泽泻、知母、枳实、猪苓、紫草、紫菀、茺萸、铅丹
药名不一致	矾石/白矾；茅根/白茅根；芍药/白芍、芍药/赤芍；术/白术；白鲜/白鲜皮；柏实/柏子仁；斑猫/斑蝥；沙参/北沙参、沙参/南沙参；泉耳实/苍耳子；苳胡/柴胡；橘柚/陈皮；五色石脂/赤石脂；贝母/川贝母、贝母/浙贝母；楝实/川楝子；乌头/川乌、乌头/草乌；芎藭/川芎；竹叶/淡竹叶；干地黄/地黄；白颈蚯蚓/地龙；冬葵子/冬葵果；草薢/粉草薢、草薢/绵草薢；露蜂房/蜂房；伏苓/茯苓；水萍/浮萍；蓬藜/覆盆子；枸杞/枸杞子；海蛤/蛤壳；乌贼鱼骨/海螵蛸；合欢/合欢皮；胡麻/黑芝麻；秦椒/花椒；槐实/槐角；藁木/黄柏；丹雄鸡/鸡内金；蕤梨子/蕤藜；白僵蚕/僵蚕；大戟/京大戟；假苏/荆芥；杏核/苦杏仁；款冬/款冬花；紫芝/灵芝；紫葳/凌霄花；零羊角/羚羊角；石流黄/硫磺；龙眼/龙眼肉；白胶/鹿角胶；落石/络石藤；麦门冬/麦冬；蔓荆实/蔓荆子；朴消/芒硝；贯众/绵马贯众；牡丹/牡丹皮；女贞实/女贞子；藕实茎/藕节；兰草/佩兰；鸡头实/芡实；茜根/茜草；草蒿/青蒿；紫参/拳参；菌桂/肉桂、菌桂/桂枝；蕤核/蕤仁；桑根白皮/桑白皮；桑上寄生/桑寄生；署豫/山药；犀角/水牛角；酸枣/酸枣仁；桃核/杏仁；天门冬/天冬；栝蒌/天花粉；赤箭/天麻；菝葜子/天仙子；亭历/葶苈子；廙虫/土鳖虫；梅实/乌梅；五加/五加皮；旋复花/旋覆花；发鬣/血炭灰；薏苡人/薏苡仁；茵陈蒿/茵陈；女萎/玉竹；郁核/郁李仁；芫华/芫花；皂荚/皂角刺；代赭/赭石；枝子/梔子；石钟乳/钟乳石；丹沙/朱砂；铁落/生铁落；蛭皮/刺猬皮；蜚虻/虻虫

注：“/”前是《神农本草经》记载的药名，“/”后是《中国药典》记载的药名。

Note: Before "/" is the name of the medicine recorded in *Shennong's Herbal Classic*, and after "/" is the name of the medicine recorded in the *Chinese Pharmacopoeia*.

《神农本草经》记载的中药在《中国药典》中分为 2 个品种的药物有 6 种：芍药含赤芍、白芍，贝母含川贝母、浙贝母，乌头含川乌、草乌，草

薢含粉草薢、绵草薢，菌桂含肉桂、桂枝，沙参含北沙参、南沙参。

### 2.2 药性对比

2.2.1 中药四气对比

①《神农本草经》与《中国药典》中药四气分类对比:《神农本草经》将中药四气主要分为“寒、热、温、凉”四类,《中国药典》对中药四气性能的描述有“大寒、寒、微寒、凉、平、微温、温、热、大热”9种。《神农本草经》与《中国药典》四气划分对比结果见图 1,表明在《神农本草经》记载中,药性为平、寒、温的中药最多,少数中药药性为微寒或微温,而未见药性为大热、微温、大寒、凉的中药;《中国药典》记载中,药性为寒、温、平、微寒的中药最多,少数中药药性为大寒、凉、微温、热、大热。

②《神农本草经》与《中国药典》中药四气归类异同对比:通过对比《神农本草经》与《中国药典》《临床用药须知》中药四气性能,大部分药物四气描述相同或趋势相同,约三分之一的药物四

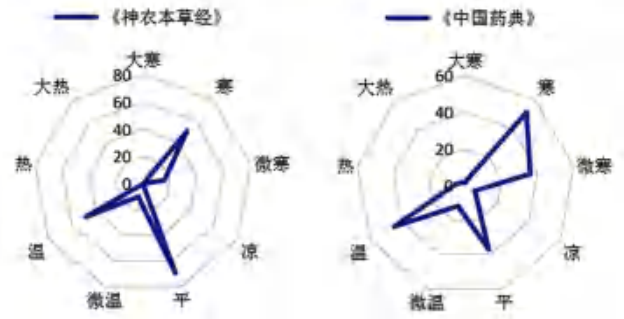


图 1 《神农本草经》与《中国药典》四气分类对比  
Fig 1 Division of the four properties in the Shennong's Herbal Classic and Chinese Pharmacopoeia

气描述完全不同。

中药四气描述完全相同的中药共 109 种, 占 53.70% (见表 2)。

表 2 《神农本草经》与《中国药典》中药四气完全相同表

Tab 2 Exact equivalence of the four properties in Chinese medicine between Shennong's Herbal Classic and Chinese Pharmacopoeia

四气描述	药名
寒	地龙、白鲜皮、青蒿、车前子、磁石、常山、大黄、京大戟、赭石、地肤子、白矾、甘遂、地黄、海藻、滑石、槐角、黄连、积雪草、苦参、川楝子、羚羊角、龙胆、漏芦、白茅根、黄柏、芒硝、茜草、瞿麦、桑白皮、浮萍、水牛角、夏枯草、泽泻、土鳖虫、栀子、知母、紫草、蜈蚣
微寒	丹参、朱砂、地榆、绵马贯众、蔓荆子、青箱子、玄参、泽漆、北沙参、南沙参、虻虫
温	陈皮、白芷、当归、干漆、藁本、厚朴、款冬花、鹿茸、麻黄、木香、花椒、麝香、硫黄、钟乳石、白术、蜈蚣、五加皮、五味子、苍耳子、细辛、辛夷、川芎、徐长卿、芫花、远志、皂角刺、紫石英、紫菀、桂枝
微温	巴戟天、续断、泽兰、阳起石
平	阿胶、柏子仁、大豆黄卷、茯苓、甘草、合欢皮、黑芝麻、芡实、佩兰、狼毒、蜂房、乌梅、藕节、蒲黄、秦艽、桑螵蛸、桑寄生、水蛭、酸枣仁、桃仁、菟丝子、王不留行、郁李仁、猪苓、刺猬皮、粉草藤、绵草藤

中药四气性能趋势相同的中药共 28 种, 占 13.79%。其中大寒、微寒同属于“寒”, 温、微温同属于“温”, 只是在层次上划分更为准确, 但性能趋势相同 (见表 3)。

表 3 《神农本草经》与《中国药典》中药四气性能趋势相同表

Tab 3 Same trend of the four properties in Chinese medicine between Shennong's Herbal Classic and Chinese Pharmacopoeia

四气描述	药名
《神农本草经》《中国药典》	
寒	大寒 葶苈子
寒	微寒 牡丹皮、拳参、天花粉、禹余粮、枳实
寒	凉 冬葵果
微寒	寒 铅丹、凌霄花、秦皮
微寒	大寒 石膏
微寒	凉 薏苡仁
温	微温 旋覆花、苦杏仁、蒺藜、荆芥、防风
微温	温 海螵蛸、黄芪、肉苁蓉
温	热 巴豆、干姜、吴茱萸、川乌、草乌
温	大热 附子、肉桂
平, 微寒	微寒 白藜

中药四气描述完全不同的中药共 66 种, 占 32.51%。其中寒热药性、寒温药性相反的有 10 种,

多数药物是由“平性”至“寒”“温”药性转变。对于某一味药来说, 平性只是相对的, 在实际用药治疗过程中, 肯定存在偏寒偏热的不同情况。详见表 4。

2.2.2 中药五味对比 中药五味即酸、苦、甘、辛、咸五种味, 此外还有淡味和涩味, 涩味附于酸味, 淡味附于甘味, 故仍以五味称之<sup>[6]</sup>。《神农本草经》与《中国药典》《临床用药须知》对比, 中药五味描述完全相同的有 87 种, 占 42.86%; 中药五味性能趋势相同的有 9 种, 占 4.43%; 中药五味描述部分相同的有 87 种, 占 42.86%。可见大多数中药五味表述一致 (详见表 5~7)。中药五味描述完全不同的有 20 种, 占 9.85%。其中由“苦味”向“甘味”转变的药物较多, 如临床常用的枸杞、蜂房、南沙参、淡竹叶等 (见表 8)。

3 讨论

中药四气五味理论是古代医家根据临床治疗经验总结归纳, 并受整体观及天人相应运气学说所影响, 通过四时寒、热、温、凉等属性表述中药性味的理论<sup>[7]</sup>, 是药物根据其药性应用于治疗疾病的重要治则。四气是反映药物在影响人体阴阳盛衰、寒热变化方面的作用倾向。中药四气中的温热与寒

表 4 《神农本草经》与《中国药典》中药四气完全不同表  
Tab 4 Completely difference of the four properties in Chinese medicine between the *Shennong's Herbal Classic* and *Chinese Pharmacopoeia*

四气描述		药名
《神农本草经》		《中国药典》
寒	平	枸杞子
寒	热	斑蝥
寒	温	天仙子、雄黄、淫羊藿
微寒	微温	人参
温	寒	忍冬藤、白头翁
温	微寒	络石藤、蕤仁
温	平	卷柏、灵芝、山药、天麻、血余炭
微温	平	鸡内金、桔梗
微温	微寒	茺蔚子
平	寒	白薇、百合、淡竹叶、防己、蛤壳、黄芩、高陆、射干、天冬、浙贝母
平	微寒	白及、篇蓄、鳖甲、柴胡、龟甲、菊花、决明子、连翘、麦冬、牡蛎、石斛、石韦、通草、茵陈、玉竹、白芍、赤芍、川贝母
平	温	半夏、赤石脂、大枣、杜仲、覆盆子、狗脊、龙眼肉、鹿角胶、蛇床子、升麻
平	微温	独活、山茱萸
平	凉	葛根、牛黄、女贞子、生铁落
未记载	平	僵蚕、牛膝、龙骨
未记载	温	茺萸

表 5 《神农本草经》与《中国药典》中药五味完全相同表

Tab 5 Exact equivalence of the five flavors in Chinese medicine between *Shennong's Herbal Classic* and *Chinese Pharmacopoeia*

五味	药名
酸	硫黄
苦	白藜、白鲜皮、篇蓄、川楝子、黄柏、黄芩、京大戟、连翘、绵马贯众、茜草、水牛角、赭石、梔子、白头翁、大黄、丹参、甘遂、黄连、苦参、龙胆、漏芦、青箱子、瞿麦、王不留行、络石藤、射干、血余炭、虻虫、泽漆、粉草藓、绵草藓、赤芍
苦, 辛	夏枯草
甘	白茅根、百合、柏子仁、大枣、地黄、合欢皮、黑芝麻、黄芪、鸡内金、灵芝、龙眼肉、蕤仁、桑白皮、山药、石斛、玉竹、钟乳石、朱砂、阿胶、车前子、大豆黄卷、甘草、蒲黄、忍冬藤、紫石英
辛	巴豆、半夏、斑蝥、川芎、浮萍、干姜、荆芥、卷柏、佩兰、白芷、干漆、藁本、狼毒、麝香、蜈蚣、细辛、辛夷、徐长卿、花椒、生铁落
辛, 苦	葶苈子
咸	鳖甲、地龙、羚羊角、牡蛎、土鳖虫、阳起石、蜈蚣

表 6 《神农本草经》与《中国药典》中药五味性能趋势相同表

Tab 6 Same trend of the five flavors in traditional Chinese medicine between *Shennong's Herbal Classic* and *Chinese Pharmacopoeia*

五味描述		药名
《神农本草经》		《中国药典》
酸	酸、涩	白矾、山茱萸、乌梅
苦	微苦	槐角
甘	甘、淡	茯苓、滑石、薏苡仁、泽泻、猪苓

本草多记载雄黄的药性为“平、寒”或“平”，笔者认为多沿袭《神农本草经》的说法以及医家结合自己的临床实践形成的对药物特点的总结；自明代张景岳在《景岳全书·本草正》将雄黄药性改为“温”，此后大部分本草、医书及现代本草均记载为“温”，雄黄的“寒”“温”药性有待进一步详

凉是与疾病的寒凉与温热相对而言的，《神农本草经》：“疗寒以热药，疗热以寒药”。《素问至真要大论》：“寒者热之，热者寒之”<sup>[8]</sup>。寒凉药应用不当，会损伤阳气；温热药应用不当，会耗伤阴液。五味代表着药物不同的功效，是药物作用的重要标志。《素问·藏气法时论》最早概括了五味与功效的关系：“辛散、酸收、甘缓、苦坚、咸软”<sup>[9]</sup>。五味实质上是药物本身的滋味和疗效的标志。中药四气五味是中医药理论的重要组成部分，两者必须综合起来看，五味是物质基础，四气是在五味基础上产生的效应<sup>[10]</sup>。每一种中药都具有气与味，气与味分别从不同角度说明药物的作用，两者合参才能全面而准确地了解药性、使用药物。

本研究通过对比《神农本草经》与《中国药典》中药四气五味的归类，发现很多中药性味的描述与《中国药典》有差异。中药四气差异较大的药物中，淫羊藿在《神农本草经》记载为“寒”性，《中国药典》记载为“温”性，且经文献考证自明代李时珍的《本草纲目》将其改为“温”后，此后历代本草、医书及当今的中药辞典、中药教科书等多载为“温”<sup>[11]</sup>。查阅历代本草发现，雄黄在《神农本草经》记载为“性平、寒”，明代以前的

细考证。人参在《神农本草经》载曰：“人参味甘，微寒”，认为人参主补五脏之阴；《名医别录》曰：“微温，无毒”，认为人参主治肠胃中冷等，由此拉开人参药性寒温之争的序幕。有研究认为历代人参或寒、或热、或平、或一药二性的药性，彼此并不矛盾，在一定临床条件下人参不同药性有存在的合理性和科学性<sup>[12]</sup>。中药四气的核心内涵是药物作用性质，反映了药物的寒热作用倾向。近年来，国内众多学者也利用现代研究方法，对中药四气五味的物质基础、性效发生机制进行了深入系统的研究，从不同侧面阐释其规律，为发展性味理论提供了新的视角<sup>[13]</sup>。如用红外扫描成像技术来研究中药的寒热药性，这一方法具有很高的应用价值<sup>[14]</sup>。朱明等<sup>[15]</sup>选择黄芩进行红外



表 7 《神农本草经》与《中国药典》中药五味部分相同表

Tab 7 Partial same of the five flavors of Chinese medicines between Shennong's Herbal Classic and Chinese Pharmacopoeia

五味描述		药名
《神农本草经》《中国药典》		
酸	甘、酸	覆盆子、凌霄花、酸枣仁、五味子
苦	苦、甘	白术、狗脊、女贞子、桑寄生、桃仁、知母、菊花、石韦、天冬
苦	苦、咸	白薇、蛤壳、海藻、芒硝
苦	辛、苦	柴胡、地肤子、独活、蒺藜、秦艽、蔓荆子、蛇床子、紫菀、厚朴、常山、积雪草、青蒿、天仙子、续断、茵陈、远志、泽兰
苦	辛、微苦	麻黄
苦	苦、涩	刺猬皮、秦皮
苦	苦、酸	白芍
苦	苦、甘、酸	牛膝
苦	甘、微苦	天花粉、北沙参
苦	甘、苦、咸	玄参
苦	苦、辛、酸	枳实
苦	苦、甘、涩	白及
苦	苦、酸、涩	地榆
苦、辛	苦、涩	拳参
甘	甘、辛	当归、葛根、鹿茸、防风
甘	甘、涩	冬葵果、禹余粮、藕节、芡实
甘	甘、咸	鹿角胶、肉苁蓉
甘	甘、微苦	麦冬、人参
甘	甘、酸、涩	赤石脂
辛	辛、苦	芫花、五加皮、芫花子、吴茱萸、木香、芫花、川乌、草乌、陈皮、桔梗、牡丹皮
辛	辛、咸	铅丹
辛	辛、甘	菟丝子、淫羊藿、附子、肉桂、桂枝、石膏、巴戟天
辛	辛、微苦	款冬花
辛、咸	辛	皂角刺
咸	咸、苦	水蛭
咸	咸、甘	龟甲、桑螵蛸
咸	咸、涩	海螵蛸
咸	咸、辛	僵蚕
咸	甘、苦、咸	决明子
咸	苦、辛、咸	旋覆花

扫描成像技术，在人体服用中药前后 2 h 分别进行红外成像的对比观测，进而推导出黄芩的寒热属性为“寒”，而《神农本草经》中记载黄芩“性平”。明确中药四气属性，能够便于认识和把握药物，更好地发挥临床疗效。

中药五味差异较大的药物中，枸杞子在《神农本草经》记载为“味苦”，《中国药典》记载为“味甘”，李时珍的《本草纲目》首次出现了对枸杞“根、叶、苗、实”性味及功效的区别，并将性味改为“凉，甘”，更加明确了枸杞子主在滋补<sup>[16]</sup>，甘味药能缓能补能和，具有补益缓和作

表 8 《神农本草经》与《中国药典》中药五味完全不同表

Tab 8 Completely difference of the five flavors in Chinese medicine between the Shennong's Herbal Classic and Chinese Pharmacopoeia

五味描述		药名
《神农本草经》《中国药典》		
酸	辛、苦、甘	郁李仁
苦	甘、淡	淡竹叶
苦	甘	蜂房、枸杞子、牛黄、南沙参
苦	甘、咸	紫草
甘	苦	苦杏仁
甘	辛、苦	苍耳子、升麻
辛	咸	磁石
辛	甘	杜仲、天麻
辛	苦	防己、商陆、浙贝母
辛	甘、淡	通草
辛	苦、甘	川贝母
苦、平	辛	雄黄

用，临床上主要用于虚证及拘挛疼痛证，与枸杞子滋补肝肾的功效较为贴合。苦杏仁在《神农本草经》中载曰“味甘”，而“苦味”最早见于《名医别录》，此后各时期本草著作如《开宝本草》《本草蒙筌》《本草逢原》《中华本草》《中国药典》均承此观点<sup>[17]</sup>。五味兼具“口尝味”与“功能味”的“综合味”，由口尝判断苦杏仁味苦，苦味能泄、能燥、能坚，由功效亦可判定苦杏仁味苦。五味是药物作用规律的高度概括，明确中药五味属性，对中药在临床中的应用发挥着重要的指导作用。

#### 4 小结

《神农本草经》与《中国药典》中药四气五味表述差异大的药物较多，中药药性的古今差异变化，可能是不同年代、不同环境、不同医家的医疗实践所获取的临床经验的差异，从而对中药性味的重新思考。查阅文献发现，目前对中药四气五味理论及现代研究较多，但未发现系统梳理《神农本草经》与《中国药典》中药四气五味的对比研究。本文通过对比《神农本草经》与《中国药典》中药四气五味的描述，发现很多药物性味不一致，值得深入研究，下一步我们将系统梳理历代医家对中药性味的认识，以期为指导临床更好地择药组方、保证临床合理用药提供参考。

#### 参考文献

- [1] 朱铁梁, 孙蕾, 姬艳苏. 中药四气理论现代研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2021, 30(28): 3188-3192.
- [2] 冯文战, 李光霞, 张林, 等. 中药五味理论的临床应用[J]. 光明中医, 2016, 31(19): 2783-2785.
- [3] 徐立思, 蔡珏, 毕丽娟. 运用《神农本草经》药性理论探要[J]. 江苏中医药, 2021, 53(5): 71-74.
- [4] 张瑞贤, 张卫, 刘更生. 神农本草经译释[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2018.

- [5] 中国药典 2020 年版.一部[S]. 2020.
- [6] 刘佳丽, 何飞武, 张冬梅, 等. 浅谈中药药性理论与认识的四个层次[J]. 环球中医药, 2016, 9(10): 1277-1279.
- [7] 王文欣, 杜武勋. 中药四气五味理论及相关性研究探析[J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(24): 61-63.
- [8] 张冰. 中药药性认知与辛热类药临床应用[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2013.
- [9] 张铁军, 刘昌孝. 中药五味药性理论辨识及其化学生物学实质表征路径[J]. 中草药, 2015, 46(1): 1-6.
- [10] 姜苗, 周平安, 赵进喜, 等. 读书参师, 全面把握中药药性; 扎根临床, 参考现代药理成果[J]. 环球中医药, 2016, 9(3): 303-307.
- [11] 王晴, 华国栋, 杨文华, 等. 淫羊藿“寒”“温”药性古今差异的文献考证[J]. 环球中医药, 2021, 14(3): 469-473.
- [12] 李成华, 薛长松. 从人参药性历史记载的变化看单味药药性成因[J]. 中国药学杂志, 2022, 57(19): 1596-1600.
- [13] 许曼文, 施钧瀚, 王艳丽, 等. 中药性味辨识的研究进展[J]. 医药导报, 2023, 42(5): 701-707.
- [14] 闫波, 孙国祥, 孙万阳, 等. 中药寒热温凉四性研究方法思路[J]. 中南药学, 2016, 14(6): 572-580.
- [15] 朱明, 李宇航, 林亭秀, 等. 关于中药寒热药性试验的红外成像观测[J]. 中国体视学与图像分析, 2007, 12(1): 53-58.
- [16] 李静, 余意, 张小波, 等. 药用枸杞本草考证[J]. 世界中医药, 2019, 14(10): 2593-2597.
- [17] 杜丽佳, 于彩娜. 苦杏仁之药性考证[J]. 中国民族民间医药, 2023, 32(15): 46-49.

(收稿日期: 2023-12-12; 修回日期: 2024-01-12)

## 麻黄“先煮”“去沫”理论的历史演变规律与探讨

杨文华, 王莹, 潘霖, 李佳怡, 张安特, 雷珍珍, 薛春苗\* (北京中医药大学东直门医院, 北京 100700)

**摘要:** **目的** 探索麻黄“先煮”“去沫”的历史演变规律, 并探讨其机制。**方法** 检索古代文献含麻黄的本草著作及方书, 构建麻黄本草数据库及含麻黄内服汤剂数据库, 并结合现代文献, 探索古今医家对麻黄“先煮”“去沫”的要求及认识。**结果** 古代文献中, 不同朝代、不同本草、不同方书及方剂中对麻黄的煎煮要求及煎煮程度不尽相同。东汉至唐代时要求麻黄“先煮”“去沫”的占比急剧下降, 唐至宋金元时期小幅度下降, 金元至明清时期无太大变化。汉晋时期含麻黄汤剂中要求麻黄“先煮”的占 58.33%、“去沫”占 55.56%, 唐代时分别占 20.87%、20.08%, 至清代时分别仅占 12.50%、12.50%。麻黄日剂量在 2.01~10.00 g 时, 要求麻黄“先煮”“去沫”的仅占 8.41% 和 5.61%, 而麻黄日剂量大于 60 g 时“先煮”“去沫”的占比均超过 50.0%, 相关性分析结果也显示麻黄日用剂量与“先煮”“去沫”之间存在弱的正相关关系, 相关系数  $r_1 = 0.259$ 、 $r_2 = 0.263$ , ( $P < 0.001$ )。**结论** 自汉唐至明清乃至现代都有麻黄“先煮”“去沫”的记载, 但未形成统一的认识, 现代医家多已不再沿用“先煮”“去沫”的特殊煎煮方法, 临证用药时可结合自身诊疗经验及麻黄用量等选择煎煮方式。

**关键词:** 麻黄; 先煮; 去沫; 历史演变; 古今文献; 麻黄用量

中图分类号: R283 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)08-2206-06  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.040

### Historical evolution and theory of “boiling first” and “removing foam” for *Ephedrae Herba*

YANG Wen-hua, WANG Ying, PAN Lin, LI Jia-yi, ZHANG An-te, LEI Zhen-zhen, XUE Chun-miao\* (Dongzhimen Hospital Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700)

**基金项目:** 2018 年全国中药特色技术传承人才培养项目(国中医药人教函[2018]204 号), 北京中医药新奥奖励基金课题(No. 2018-XAJLJJ-006)。

**作者简介:** 杨文华, 女, 硕士, 主管中药师, 主要从事医院临床药学工作, email: 1434296565@qq.com \* **通信作者:** 薛春苗, 女, 主任药师, 主要从事医院药学工作, email: xuechunmiao9501@163.com

**Abstract: Objective** To discuss the historical evolution and the theory of “boiling first” and “removing foam” for *Ephedrae Herba*. **Methods** Materia medica and formulas containing *Ephedrae Herba* in ancient literature were retrieved, and the materia medica works database of *Ephedrae Herba* and the database of oral decoction containing *Ephedrae Herba* were constructed. Combined with modern literature, the requirements and understanding of ancient and modern physicians on *Ephedrae Herba* “boiling first” and “removing foam” were explored. **Results** In ancient literature, the decoction requirements and the degree of decoction of ephedra varied in different dynasties, different Materia medica works, different formulas and prescriptions. From the Eastern Han Dynasty to the Tang Dynasty, the proportion of *Ephedrae Herba* required “boiling first” and “removing foam” decreased sharply. From the Tang Dynasty to the Song, Jin and Yuan Dynasties, the proportion decreased slightly. From the Jin and Yuan Dynasties to the Ming and Qing Dynasties, there was little change. In the Han and Jin Dynasties, 58.33% and 55.56% of the decoctions containing *Ephedrae Herba* required “boiling first” and “removing foam” respectively, 20.87% and 20.08% in the Tang Dynasty, and only 12.50% and 12.50% in the Qing Dynasty. When the daily dose of *Ephedrae Herba* was 2.01 ~ 10.00 g, only 8.41% and 5.61% were required “boiling first” and “removing foam”, while the proportion was more than 50.0% when the daily dose was more than 60 g. The results of correlation analysis also showed that there was a weak positive correlation between the daily dose of *Ephedrae Herba* and “boiling first” and “removing foam”, the correlation coefficient  $r_1 = 0.259$ ,  $r_2 = 0.263$  ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** Since the Han and Tang Dynasties to the Ming and Qing Dynasties and even in modern times, there are records of *Ephedrae Herba*’s “boiling first” and “removing foam”, but no unified understanding has been formed. Most modern doctors no longer follow the special decoction methods of “boiling first” and “removing foam”. In clinical medication, the decoction method can be selected according to their own diagnosis and treatment experience and the amount of *Ephedrae Herba*.

**Key words:** *Ephedrae Herba*; boiling first; removing foam; historical evolution; ancient and modern literature; dosage of *Ephedrae Herba*

麻黄始载于《神农本草经》，来源于麻黄科植物草麻黄、中麻黄或木贼麻黄的干燥草质茎<sup>[1]</sup>，具有发汗散寒、宣肺平喘、利水消肿的功效，被称为“伤寒解肌第一药”，在新型冠状病毒感染专利复方中出现频次较高<sup>[2]</sup>，是其防治的重要用药。一般解表类中药不宜久煎，以防止挥发性成分丢失而降低药效，但早在东汉·张仲景《伤寒论》中就明确提出了麻黄在汤剂中使用时需“先煮”“去沫”的特殊煎煮方法。后代中医药著作也在不同程度上记载了麻黄的这种煎煮方法，如北宋·《本草图经》言“古方汤用麻黄，皆先煮去沫，然后内诸药”，而现行标准《中国药典》并未沿用“先煮”“去沫”的要求。因此，本文拟对古代文献中含麻黄的本草著作及方书进行分析，探讨麻黄“先煮”“去沫”的历史演变规律，并结合现代文献，从药材标准与炮制规范、化学成分、药理药效、临床应用等方面探究麻黄“先煮”“去沫”的原因及意义。

## 1 资料与方法

### 1.1 数据来源

本研究所用数据来源于第五版《中华医典》电子丛书，它将历代中医药古籍分为医经、诊法、本草、方书、温病、综合医书、医论医案等十二个大类，涵盖方书甚广，能够满足本研究的需求。

### 1.2 数据筛选

以“麻黄”为关键词在《中华医典》电子丛书中进行检索，并按以下纳入、排除标准进行筛选录入。

**1.2.1 纳入标准** 需完全满足下列条件：①组成中包含麻黄的成人水煎内服汤剂；②服用方法为成人水煎内服的一日剂量；③含麻黄方剂的方名、方源、组成、剂量、煎煮方法、服用方法等数据基本完整。

**1.2.2 排除标准** ①麻黄单用为方；②处方中未标明剂量，或仅写“等分”“一大把”“长XX寸/节”等；③方名、组成、剂量三者完全相同的按重复方剂处理，按朝代顺序仅保留一项。



### 1.3 构建方药数据库

按照纳入和排除标准，录入不同朝代含麻黄内服汤剂的相关数据，包括朝代、方源、方名、麻黄剂量、服用方法、煎煮方法等，共筛选出 468 条含麻黄内服汤剂，涉及东汉至清代包括《伤寒论》《备急千金要方》《太平圣惠方》《景岳全书》《医学衷中参西录》等在内的共 34 本方书。再按照剂量折算标准将麻黄剂量折算成现代剂量“g”，构建基于历代方书的水煎内服麻黄方剂数据库。剂量折算规则如下<sup>[3-4]</sup>：东汉至唐代 1 斤折算为 220 g；宋金元时期 1 斤折算为 660 g；明清时期 1 斤折算为 596.8 g。

## 2 结果

### 2.1 不同朝代本草著作中麻黄“先煮”“去沫”的研究

麻黄始载于《神农本草经》，但并未记录麻黄的煎煮方法。中医经典著作《伤寒论》中明确提出麻黄“先煮”“去上沫”的特殊煎煮方法。后代本草著作，如南北朝时期《本草经集注》、唐代《新修本草》中均明确记载麻黄使用时需“先煮一两沸，去上沫”，北宋《证类本草》以及后世明、清等各朝代的 20 余部本草著作中都记录了麻黄“先煮”“去沫”的煎煮方法（见表 1）。

表 1 麻黄“先煮”“去沫”的本草考证  
Tab 1 Herbal authentication of *Ephedrae Herba* “boiling first” and “removing foam”

朝代	来源	煎煮方法描述
南北朝	《本草经集注》	先煮一两沸，去上沫，沫令人烦
唐代	《新修本草》	先煮一两沸，去上沫，沫令人烦
北宋	《本草图经》	古方汤用麻黄，皆先煮去沫，然后内诸药
北宋	《证类本草》	凡汤中用麻黄，皆先别煮两三沸，掠去其沫，更益水如本数，乃内余药，不尔，令人烦
北宋	《本草衍义》	以水半升煎，俟沸，去上沫，再煎，去三分之一，不用滓
元代	《汤液本草》	煮三二沸，去上沫。不则，令人心烦闷
明代	《本草品汇精要》	煎三四十沸竹片掠去上沫尽漉出晒干用之若不尽令人心闷
明代	《本草蒙筌》	单煮数沸，倾上沫
明代	《本草纲目》	水煮十余沸，以竹片掠去上沫，沫令人烦
明代	《炮炙大法》	去节并沫若不尽服之令人闷。煎三四十沸竹片掠去上沫
明代	《雷公炮制药性解》	凡使去节并沫，若不尽，服之令人闷。煎三四十沸，竹片掠去上沫尽
明代	《本草正》	入滚汤中煮三、五沸，以竹片掠去浮沫，晒干用之，不尔，令人动烦
明代	《本草汇言》	水煮十余沸，以竹片掠去上沫用，恐令人烦
明代	《本草通玄》	煮数沸，掠去上沫，不去沫，令人烦
清代	《本草易读》	凡煎宜去上沫再煎
清代	《本草备要》	煮十余沸，掠去浮沫，或用醋汤略泡
清代	《本经逢原》	汤泡去沫
清代	《本草经解》	水煮去沫用
清代	《本草从新》	煮十余沸，掠去浮沫
清代	《得配本草》	先煎十余沸，以竹片掠去浮沫。沫能令人烦
清代	《要药分剂》	煮十余沸。竹片掠去浮沫
清代	《本草述钩元代》	水煮十余沸，竹片掠去上沫。（沫令人烦）后入他药
清代	《本草害利》	水煎十余沸，以竹片掠去上沫，沫令人烦

古代本草著作中，关于使用麻黄时是否都需要“先煮”“去沫”，北宋《本草图经》言“古方汤用麻黄，皆先煮去沫，然后内诸药”，清《本草易读》“凡煎宜去上沫再煎”。关于“先煮”的程度，各本草著作记载不尽相同，如“先煮一两沸”“煮三、五沸”“单煮数沸”“水煮十余沸”“煎三四十沸”等。关于为何“去沫”方面，多解释为“沫令人烦”“令人心闷”。

### 2.2 不同朝代方书内服汤剂中麻黄“先煮”“去沫”的研究

本研究共录入含麻黄内服汤剂 468 条，关于麻黄的特殊煎煮方法主要归纳为“先煮”“去沫”“先煮，去沫”“无特殊煎煮要求”四类。统计分析可知：内服汤剂中仅要求麻黄“先煮”的 7 条（占 1.50%），仅要求“去沫”的 2 条（占 0.43%），同时要求“先煮，去沫”的 86 条（占 18.38%），“无特殊煎煮要求”的 373 条（占 79.70%）。

关于麻黄的煎煮程度方面，主要归纳为以下三类：

- ① 先煮麻黄，去沫：如《金匱要略》越婢加半

夏汤“先煮麻黄去上沫”；②先煮麻黄数沸，去上沫：如《备急千金要方》麻黄汤“煮麻黄三沸，去沫纳药”；③先煮麻黄，减数升或数碗、数盏、数杯，去上沫：如《伤寒论》大青龙汤“先煮麻黄，减二升，去上沫”。总体来说，不同内服汤剂中要求麻黄“先煮”的程度不同，第一种煎煮方法未明确麻黄需要先煮的程度，第二种、第三种方法虽然描述不同，但都明确了麻黄的“先煮”程度。详见表 2。

表 2 不同朝代方书中明确要求麻黄“先煮”“去沫”的方剂(列举部分)

Tab 2 Prescriptions from different dynasties clearly required *Ephedrae Herba* “boiling first” and “removing foam” (List part)

朝代	方源	方名	煎服方法	
汉晋	《伤寒论》	大青龙汤	上七味，以水九升，先煮麻黄，减二升，去上沫，内诸药，煮取三升	
		葛根汤	上七味，以水一斗，先煮麻黄、葛根，减二升，去白沫，内诸药，煮取三升	
		麻黄连翘赤小豆汤	上八味，以潦水一斗，先煮麻黄再沸，去上沫，内诸药，煮取三升	
		麻黄汤	上四味，以水九升，先煮麻黄，减二升，去上沫，内诸药，煮取二升半	
		《金匱要略》	麻黄白术汤	上五味，以水九升先煮麻黄，减二升，去上沫，纳诸药，煮取二升半
唐代	《小品方》	越婢汤	上五味，以水六升，先煮麻黄，去上沫，内诸药，煮取三升	
		贝母汤	上七味，切，以水二斗三升，先煮麻黄，得十沸，纳药，煮取三升	
		《备急千金要方》	大续命汤	以水一斗，先煮麻黄两沸，掠去沫，下诸药煮取四升
宋金元	《脾胃论》	射干麻黄汤	以东流水一斗二升，先煮麻黄，去上沫，纳药，煮取三升	
		麻黄人参芍药汤	都作一服，水三盏，煮麻黄一味，令沸，去沫，至二盏，入余药，同煎至一盏	
明代	《兰室秘藏》	麻黄白术汤	水二大盏半先煎麻黄令沸去沫再入诸药同煎至一盏	
		《古今医统大全》	桂枝二麻黄一汤	水三盏先煎麻黄一二沸，去沫，纳诸药，煎二盏，分二服
		桂枝麻黄各半汤	上水四盏先煎麻黄二三沸，去沫，纳诸药，煎至二盏，分三服	
		《脉症治方》	麻黄附子细辛汤	上作一服。先煎麻黄一二沸。次下二味同煎服
清代	《景岳全书》	麻黄甘草汤	上咀。用水二钟，先煮麻黄三、四沸，去沫，入甘草，再煎至八分	
		《温病条辨》	麻杏石甘汤	水八杯，先煮麻黄，减二杯，去沫，纳诸药，煮取三杯
		小青龙汤	水八碗，先煮麻黄减一碗许，去上沫，纳诸药，煮取三碗	
	《医学衷中参西录》	麻黄汤	先煎麻黄数沸，吹去浮沫，再入余药同煎汤一大盅	

### 2.3 不同朝代方书内服汤剂中麻黄“先煮”“去沫”的变化趋势

不同朝代方书内服汤剂中对麻黄的特殊煎煮要求存在一定的不同，东汉至唐代时要求麻黄“先煮”“去沫”的占比急剧下降，唐至宋金元时期小幅度下降，宋金元至明清时期无太大变化。本研究共录入含麻黄内服汤剂 468 条，汉晋时期要求麻黄“先煮”“去沫”的分别占 58.33%、55.56%，唐代时占 20.87%、20.08%，至清代时要求麻黄“先煮”“去沫”的分别仅占 12.50%、12.50% (见图 1)。

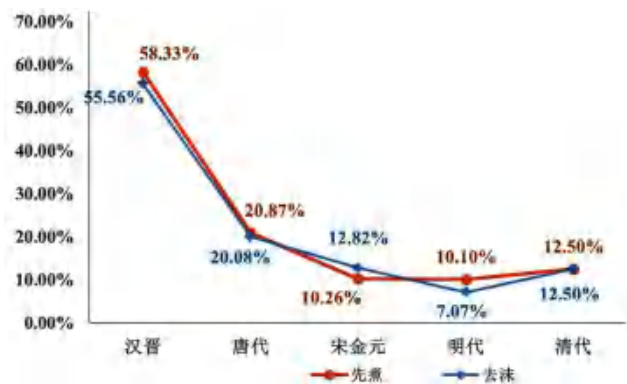


图 1 不同朝代含麻黄内服汤剂中麻黄“先煮”“去沫”的占比  
Fig 1 Proportion of *Ephedrae Herba* “boiling first” and “removing foam” in oral decoction from different dynasties

### 2.4 不同剂量区间麻黄“先煮”“去沫”的变化趋势

不同剂量区间对麻黄“先煮”“去沫”的要求不尽相同。整体来说，随着麻黄剂量的增加，要求麻黄“先煮”“去沫”的比例基本呈现出上升趋势 (见图 2)。在此基础上，为探究麻黄日用剂量与麻黄特殊煎煮方法的关系，本研究采用 SPSS 26.0 软件进行二元相关性分析，结果显示，麻黄日用剂量与“先煮”“去沫”之间的相关系数分别为  $r_1 = 0.259$ 、 $r_2 = 0.263$  ( $P < 0.001$ )，说明麻黄日用剂量与“先煮”“去沫”之间存在弱的正相关关系。另外，《中国药典》规定麻黄剂量为 2 ~ 10 g，未要求“先煮”“去沫”，本研究共录入麻黄日剂量为 0 ~ 10 g 时的数据 128 条，要求“先煮”的仅有 9 条，“去沫”的仅 6 条，正如清代医学大家张锡纯在《医学衷中参西录》更定麻杏石甘汤方中所言“不先煎麻黄吹去浮沫者，因所用只一钱，而又重用生石膏以监制之也”，认为麻黄用量小时无需“先煮”“去沫”。

### 3 讨论

清代名医徐灵胎言“煎药之法，最宜深讲，药之效不效，全在乎此”，说明煎煮方法对药效的发挥至关重要。自《伤寒论》中提到麻黄需“先煮”“去沫”，后世医家也在一定程度上延续了这种

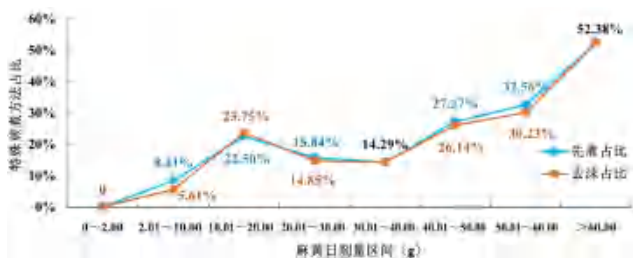


图2 不同剂量区间麻黄“先煮”“去沫”的占比  
Fig 2 Proportion of *Ephedrae Herba* “boiling first” and “removing foam” in different dosage ranges

特殊煎煮方法，但沿用程度不尽相同，如《伤寒杂病论》的33首含麻黄汤剂中就有26首要求麻黄“先煮，去沫”<sup>[5]</sup>，而唐代孙思邈《备急千金要方》的140首含麻黄汤剂中，仅30首明确“先煎，去上沫”<sup>[6]</sup>。为了解麻黄特殊煎煮的缘由，今之学者从现代标准、理论探讨、化学成分、药理研究、临床应用等多个方面探究麻黄“先煮”“去沫”的机制。

### 3.1 现代标准及教材对麻黄“先煮”“去沫”的要求

检索包括《中国药典》《中华本草》《北京市中药饮片炮制规范》《广东省中药炮制规范》《河南省中药饮片炮制规范》《四川省中药材标准》《台湾中药典第三版》等50余种标准及规范，发现仅《吉林省中药饮片炮制规范（1986年版）》提到麻黄“需先煎”。查阅中药学相关书籍，颜正华主编的《中药学》中提到“内服煎汤宜先煎，去水面浮沫”<sup>[7]</sup>；张冰主编的《临床中药学》中提到“入汤剂常规煎煮，去浮沫”<sup>[8]</sup>；《张廷模临床中药学讲稿》中也提到了麻黄“先煎”的问题，认为与其他解表药相比，麻黄的成分溶出比较缓慢，可以适当久煎，但相对于真正需要先煎的中药来说，麻黄不必先煎<sup>[9]</sup>。全国中医药院校教材《方剂学》中，如麻黄汤、小青龙汤、大青龙汤等方剂的现代用法也未保留《伤寒论》中的“先煮麻黄”“去上沫”的煎煮方法<sup>[10]</sup>。总体来说，虽然有些中医药教材中提到麻黄特殊煎煮的问题，但现代中医药标准并未要求麻黄煎煮时需“先煮”“去沫”，临证用药时也多未采用。

### 3.2 麻黄“先煮”“去沫”的化学成分研究

现代学者通过HPLC、UPLC等方法，对麻黄“先煮”“去沫”的机制进行研究。麻黄的有效成分主要为麻黄碱、伪麻黄碱、挥发油等。麻黄碱、挥发油受热易挥发消失，有学者认为“先煮”旨在挥散“令人烦”的麻黄碱与挥发油<sup>[11]</sup>；另有研究则发现，麻黄类生物碱虽能随水蒸气挥发，但“先煮”麻黄时麻黄类生物碱的溶出度更高<sup>[12]</sup>。此外，古人认为麻黄沫性悍烈，现代研究发现，麻黄沫中的有效成分主要为麻黄碱、伪麻黄碱等生物碱类<sup>[13]</sup>。关于麻黄沫中成分含量方面，有研究认为沫中麻黄碱、伪麻

黄碱含量与麻黄水煎液中相差不大<sup>[14]</sup>，另一实验却发现上沫中所含生物碱含量较少<sup>[15]</sup>。也有研究发现麻黄上沫热解后的主要成分为苯甲醛<sup>[16]</sup>，去沫后能够防止其对胃部及气道黏膜产生刺激性伤害。

### 3.3 麻黄“先煮”“去沫”的药理作用研究

有研究发现，麻黄“先煮”能够增加抗菌、抗流感病毒作用<sup>[17]</sup>。另有学者研究麻杏石甘汤不同煎煮方法对哮喘模型小鼠的影响，发现麻黄“先煮，去上沫”对于降低小鼠支气管哮喘气道黏液高分泌<sup>[18]</sup>，抑制哮喘气道平滑肌细胞增殖和改善缺氧状态的效果更佳<sup>[19]</sup>。另外，麻黄碱具有拟肾上腺素作用，是麻黄主要药效成分也是其毒性成分，可产生心率加快、心肌收缩力增强、血压升高等不良反应<sup>[20]</sup>，有研究发现“先煮、去沫”可降低麻黄碱含量<sup>[21]</sup>，能有效避免大鼠过汗、心率加快、血压升高等不良反应<sup>[22]</sup>。

### 3.4 现代学者对麻黄“先煮”“去沫”的认识

关于对麻黄“先煮”的认识，现代学者通过对经方含麻黄汤剂的研究，主要形成两种不同的观点：

①“先煮、去沫”缓其峻烈之性<sup>[23]</sup>：麻黄先煎与否在于所治病证及组方配伍，“先煎、去沫”可减弱发汗药效，若取其峻猛发汗之用者，或方剂配伍复杂有制约其悍猛之性者，或麻黄用量小者则不必“先煮、去沫”。②“先煮”增其发散之力：“先煮”麻黄时间与方剂的发散力成正相关，“先煮”时间短则避免过汗伤正，时间长则确保祛邪外出<sup>[24]</sup>。

关于对麻黄“去沫”的认识，现总结如下：

①沫性悍烈，张锡纯《医学衷中参西录·药物》言“麻黄发汗力甚猛烈，先煮之去其浮沫，因其沫中含有发表之猛力，去之所以缓麻黄发表之性也”；现代著名医学家李克绍在《伤寒语释》中言“麻黄先煮去沫是为了减轻其悍烈之性”。②沫令人恶心<sup>[25]</sup>，《金匱玉函经·卷七》有言“凡煎药，皆去沫，沫浊难饮，令人烦”，认为上浮之沫有碍视觉，令人抗拒难以下咽。

另外，有学者认为古今所用麻黄存在差异，张仲景时多用鲜麻黄，煎服时需“先煮去沫”<sup>[26]</sup>；而现代临床用经过炮制后的麻黄入药，煎煮时沫少<sup>[22]</sup>；国医大师王绵之先生也认为麻黄“放陈”之后便“不令人烦”，故无需“先煮”“去上沫”<sup>[27]</sup>。此外，现代医家根据自己的临床经验发现常规剂量麻黄不经“先煮、去沫”使用，临床疗效不受影响且未出现心烦等不良反应<sup>[28]</sup>。当然临床医案文献中也有少数医家仍坚持“先煮，去沫”<sup>[29]</sup>，或仅“先煮”<sup>[30-31]</sup>，或仅“去沫”<sup>[32]</sup>的煎煮方法。



总之，现代医家多认为临证使用麻黄时无需采取“先煮”“去沫”的煎煮方法，但也有医家坚持遵循经方思想或依据患者病情、体质、麻黄用量等选择是否需要特殊煎煮<sup>[33]</sup>。

#### 4 小结

本研究从古文献中挖掘不同历史时期麻黄“先煮”“去沫”的历史演变规律，发现自汉唐至明清都有麻黄“先煮”“去沫”的记载，但不同本草著作、不同朝代、不同方书中对麻黄是否需要特殊煎煮及煎煮程度的要求不尽相同，且与麻黄用量存在一定的关系，一般认为麻黄用量小时无需“先煮”“去沫”。现代中医药标准如《中国药典》、各省市炮制规范及临证使用麻黄时多已不再沿用“先煮”“去沫”的特殊煎煮方法，这可能与现代临证使用时麻黄的用量小有一定关系，但仍有部分医家坚持经方中麻黄的用法。现代学者从化学成分、药理作用探析麻黄特殊煎煮的机制，但关于麻黄沫所含成分及含量，麻黄“先煮”“去沫”是否增加有效成分溶出，“先煮”“去沫”是否能够减毒增效等方面的认识不一致。但不论麻黄是否需要“先煮”“去沫”，都是为了临床疗效及安全服务，临证用药时可根据患者情况、麻黄用量等再结合自身诊疗经验决定选择何种煎煮方式。

#### 参考文献

[1] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 333-334.  
 [2] 李浩, 刘伟, 侯贺祥, 等. 中药防治新型冠状病毒肺炎专利复方用药规律分析[J]. 中南药学, 2021, 19(11): 2426-2431.  
 [3] 滕占理, 樊巧玲. 古代含细辛散剂中细辛用法用量文献研究[J]. 中医杂志, 2018, 59(10): 887-889, 892.  
 [4] 丘光明, 邱隆, 杨平, 等. 中国科学技术史: 度量衡卷[M]. 北京: 科学技术出版社, 2001: 447.  
 [5] 孙祎梦, 刘纳文. 浅析《伤寒杂病论》中麻黄的用量、主治病症及配伍规律[J]. 天津中医药大学学报, 2023, 42(2): 145-150.  
 [6] 赵美美, 汤晓龙, 袁久林. 《备急千金要方》中含麻黄方剂浅析[J]. 中国中医药现代远程教育, 2022, 20(13): 61-63.  
 [7] 颜正华. 中药学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 81.  
 [8] 张冰. 临床中药学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012: 52.  
 [9] 张廷模. 张廷模临床中药学讲稿[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 120.  
 [10] 李冀, 连建伟. 方剂学[M]. 4 版. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 23.  
 [11] 丁丽丽, 施松善, 崔健, 等. 麻黄化学成分与药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(4): 1661-1664.

[12] 邱丽丽, 李灿, 范珊珊, 等. 不同煎煮方法对麻黄细辛附子汤煎剂质量的影响[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(2): 316-324.  
 [13] 陆继承. 麻黄入药须先煎[J]. 吉林中医药, 1997(1): 40.  
 [14] 宋永刚, 沈伟, 于永军, 等. 麻黄水煎液及其泡沫中麻黄碱与伪麻黄碱的含量比较研究[J]. 科技信息, 2014(9): 111, 79.  
 [15] 成睿珍, 张春艳, 李玥, 等. 基于 UPLC-DAD-TOF/MS 结合 HPLC-UV 法的麻黄“先煎去沫”样品的化学成分分析[J]. 中草药, 2018, 49(8): 1919-1923.  
 [16] 俞励平, 梁晓亮, 曾永长, 等. 麻黄“上沫”成分的热分析 TG-DTG-DSC 及热解 GC-MS 研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2011, 50(3): 94-97.  
 [17] 张世鹰, 何谷良, 卢芳国, 等. 基于 TLR7/8 介导的 IFN- $\alpha/\beta$  蛋白表达水平探讨麻黄先煎之麻杏石甘汤抗流感病毒的机制[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(3): 1188-1193.  
 [18] 孙雪文, 王晓华, 张志涛, 等. 麻杏石甘汤不同煎煮法对哮喘模型小鼠 MUC5AC 和 HIF-1 $\alpha$  的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(11): 1507-1509, 1575.  
 [19] 韩凤芹, 孙雪文, 王晓华. 麻杏石甘汤两种煎煮方法对哮喘模型小鼠气道平滑肌细胞增殖及急性缺氧的影响[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(8): 1885-1886.  
 [20] 丁禹洁, 高萍, 储全根. 麻黄治心悸与致心悸原理和机制探讨[J]. 中医药临床杂志, 2020, 32(8): 1430-1433.  
 [21] 张苗海. 对麻黄“去节先煮去上沫”的认识与研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(11): 11-12.  
 [22] 蔡佳佳, 宋永刚, 宋小莉, 等. 鲜麻黄“先煎去沫”实验研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(5): 46-47.  
 [23] 蔡然, 宋轶. 《伤寒杂病论》中麻黄煎法探析[J]. 国医论坛, 2021, 36(5): 5-6.  
 [24] 陈楚为, 肖相如, 李致重. 吴迁本《金匱要略》方剂先煎麻黄规律探讨[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(5): 1551-1554.  
 [25] 李心机, 李桂芳. 麻黄先煮去沫与“沫令人烦”考释[J]. 山东中医药大学学报, 1998, 22(5): 339-340.  
 [26] 孙一焱, 彭伟, 曲夷. 经方中麻黄的应用规律探析[J]. 中国中医急症, 2023, 32(5): 896-899, 903.  
 [27] 王绵之. 王绵之方剂学讲稿[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 111.  
 [28] 张锁庆. 麻黄的临症应用经验[J]. 甘肃中医, 2006, 19(12): 34.  
 [29] 赵欣, 何庆勇, 赵豪程, 等. 麻黄杏仁甘草石膏汤的临床心悟[J]. 中国中医急症, 2022, 31(2): 358-361.  
 [30] 余昊怡, 周天梅. 麻黄升麻汤治疗周围性面瘫验案二则[J]. 浙江中医杂志, 2022, 57(2): 151.  
 [31] 刘奇, 李秋萍, 黄智斌, 等. 麻黄类方验案举隅[J]. 江西中医药, 2023, 54(1): 15-17.  
 [32] 韩慧莹, 刘桂荣, 徐向青. 通阳化阴之麻黄[J]. 中国中医基础医学杂志, 2023, 29(3): 498-500.  
 [33] 张田, 翟华强, 金世元. 国医大师金世元教授浅析麻黄九项调剂关键技术[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(11): 3843-3846.

(收稿日期: 2023-10-05; 修回日期: 2023-12-06)

## 基于数据挖掘的《奇效良方》中鲜药应用特点分析

井卫朋, 李洵, 齐玉濮, 周天豹, 喻帅克, 苗明三\* (河南中医药大学药学院, 郑州 450046)

**摘要:** **目的** 通过对《奇效良方》中鲜用药的规律特点进行总结分析, 为鲜药的临床应用及相关研究提供参考。**方法** 查阅《奇效良方》中可鲜用的中药, 用 Excel 2016 建立数据库, 运用频次统计的方法进行数据挖掘, 分析《奇效良方》中药鲜用的频次、性味、归经、毒性等特点。**结果** 经筛选后, 共纳入可鲜用中药 246 种。药性以寒、温、平为主; 药味以苦、甘、辛为主; 归经则多归肝、肺、胃经。在诊治疾病上, 使用鲜药占比最高的是内科疾病 (795 次, 45.64%) 和外科疾病 (346 次, 19.86%)。**结论** 《奇效良方》中疾病诊治应用鲜药的例子层出不穷, 鲜药多为地产药材, 代表性高, 临床应用广泛, 涉及内、外、妇、儿、皮肤、耳鼻喉科等; 不但用于常见疾病, 亦多用于各种疑难病症。挖掘鲜药的相关古籍文献, 不仅可以逐渐丰富鲜药的用药理论, 还可进一步为鲜药的现代临床应用提供参考。

**关键词:** 《奇效良方》; 鲜药; 文献研究; 临床应用

中图分类号: R283

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)08-2212-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.041

### Characteristics of use of fresh medicine in *Qixiao Liangfang* based on data mining

JING Wei-peng, LI Xun, QI Yu-pu, ZHOU Tian-bao, YU Shuai-ke, MIAO Ming-san\* (School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

**Abstract: Objective** To summarize the characteristics of use of fresh medicine in *Qixiao Liangfang*, and provide reference for the clinical application and research of fresh medicine. **Methods** We searched fresh Chinese herbal medicines in *Qixiao Liangfang*, established a database with Excel 2016 for data mining. The characteristics of fresh Chinese herbal medicines in *Qixiao Liangfang* were analyzed, including frequency, taste, meridian distribution, and toxicity. **Results** Totally 246 fresh Chinese herbal medicines were included. The highest proportion of fresh drugs use was in internal medicine diseases (795 times, 45.64%) and surgical diseases (346 times, 19.86%). **Conclusion** Fresh medicine is widely used in the diagnosis and treatment of diseases in *Qixiao Liangfang*. Fresh medicine is mostly local medicinal materials with high representativeness and wide clinical applications, involving internal medicine and surgery, gynecology, pediatrics, dermatology, and otolaryngology, etc. It is not only used for common diseases, but also for various difficult and complicated diseases. Exploring relevant ancient literatures of fresh medicine provides reference for its modern clinical application.

**Key words:** *Qixiao Liangfang*; fresh medicine; literature research; clinical application

鲜药是中药最原始的状态, 是指不经任何干燥及加工处理, 在中医药理论的指导下直接用于治疗疾病的中药材<sup>[1]</sup>。鲜药的临床应用贯穿了中医药起源与发展的整个过程<sup>[2]</sup>。古人提倡“中药

鲜用”以及“生者尤良”的观点, 是几千年来大量临床实践的经验总结。鲜药一直受历代医家推崇, 从大量的古籍和医学文献中可以发现, 鲜药在中医临床上发挥着重要的作用<sup>[3-4]</sup>。

**基金项目:** 国家自然科学基金 (No. 82274119); 河南省重大专项 (No. 221100310400); 河南省重大公益专项 (No. 201300310100); 岐黄学者 (国中医药人教函 2022-6)。

**作者简介:** 井卫朋, 男, 在读硕士研究生, 主要从事中药学方面的研究, email: jwp2420@163.com \* **通信作者:** 苗明三, 男, 教授, 主要从事中药药理学方面的研究, email: miaomingsan@163.com

《奇效良方》是 15 世纪的一部医学巨著，汇集了前人多种医籍精华，全书 69 卷，卷内分门，共 64 门，载有方剂 7000 余首<sup>[3]</sup>。每门若干病证，每病有理有方有药，内容丰富，实用性强<sup>[4]</sup>。本文系统整理了董宿编纂的《奇效良方》中有关鲜药的应用，并对其使用特点进行总结和论述，以期为今后鲜药的引进和临床应用提供参考。

## 1 资料与方法

### 1.1 数据来源

通过查阅《奇效良方》中鲜用的中药，用 Excel 2016 建立数据库。

### 1.2 纳入标准

选取带有“鲜”“活”“汁”“捣”“绞”“露”“生”等字眼的中药。

### 1.3 数据处理

参照《中国药典》2020 年版<sup>[5]</sup>和“十四五”规划教材《中药学》<sup>[6]</sup>以及相关参考文献，对文中出现的鲜用药名称、性、味、归经进行规范统计和分类，并名称统一（如萝卜统一名称为莱菔，生萝卜子统一名称为生莱菔子）。同一味中药的不同用药部位（如生姜和生姜皮、苍耳根和苍耳叶、芭蕉根和芭蕉叶等）或者不同的使用方法（生姜和生姜汁、生藕和生藕汁等）分开统计。

## 2 鲜药数量、入药方式及性味归经和毒性分析

### 2.1 鲜药数量、药用部位及入药方式分析

经统计筛选，全书医案中共使用鲜药种类 257 种，去除重复项后剩 246 种（植物药 200 种，动物药 46 种）。全书使用鲜药频次 2159 次（植物药 2081 次，96.39%；动物药 78 次，3.61%）。入药方式也不尽相同，有取汁入药（生姜汁、生地黄汁），有捣敷入药（葱涎调敷脐中）等。鲜药使用频次排名靠前的主要为生姜、生地黄、葱白、甘草、生姜汁等，详见表 1。

表 1 排名前 20 位的鲜药使用的频次

Tab 1 Top 20 use frequency of fresh medicines

鲜药	频次	频率 /%	鲜药	频次	频率 /%
生姜	1061	60.08	薄荷	15	0.85
生地黄	171	9.68	白附子	10	0.57
葱白	113	6.4	南星	10	0.57
甘草	82	4.64	猪胆	10	0.57
生姜汁	81	4.59	草乌	9	0.51
生地黄汁	67	3.79	生藕	9	0.51
附子	30	1.7	莱菔	9	0.51
川乌	28	1.59	商陆	7	0.40
牵牛	23	1.3	黑豆汁	6	0.34
大黄	19	1.08	牛乳汁	6	0.34

### 2.2 鲜药性味归经分析

鲜药大多现采现用，其汁液丰富，不经加热、干燥等特殊处理，药性不经改变，不被破坏，

因而鲜药多为寒凉之性。

对《奇效良方》中出现的 246 种常用鲜药进行性味归经分析，性味归经参照《中华本草》<sup>[7]</sup>、《中药大辞典》<sup>[8]</sup>。据统计，明确标明药性的鲜药 239 种，共统计药性 239 次，其中寒性药有 80 种（包括性寒 65 种，性微寒 15 种），占比 33.47%；温性药有 60 种（包括性温 52 种，性微温 8 种），占比 25.10%；平性药有 49 种，占比 20.50%、凉性药有 35 种（包括性凉 34 种，性微凉 1 种），占比 14.64%；热性药仅 15 种，占比 6.28%。药味分类中存在一药多味和药味无从考证的情况<sup>[9]</sup>，246 味鲜药共统计药味频次 340 次，以味苦、味甘、味辛为主，其中苦味药 107 次（包括“苦”频次 97、“微苦”频次 7），占比 31.47%；甘味药 105 次（包括“甘”频次 102、“微甘”频次 3），占比 30.88%；辛味药 79 次（包括“辛”频次 78、“微辛”频次 1）占比 23.24%（见图 1、2）。

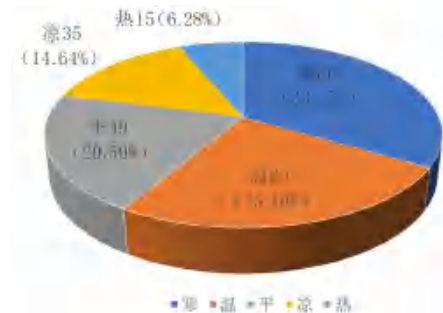


图 1 鲜药的药性频次及占比

Fig 1 Frequency and proportion of fresh medicinal properties

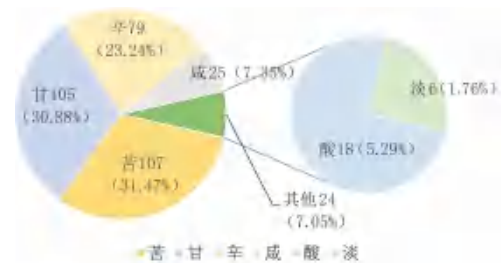


图 2 鲜药的药味分类

Fig 2 Frequency and proportion of the medicinal taste of fresh medicine

经统计归经总频次 579 次，归肝经的 118 次，占比最大，为 20.38%，然后归经占比从高到低依次为肺、胃、脾、肾、心、大肠、膀胱、胆、小肠、心包、三焦，见图 3。

鲜药多有气浓汁丰、清润通利等特点，具有清泄肝火，清热凉血，润肺、润胃之功效。《奇效良方》中多用鲜药治温热病。温热病多耗伤气津，尤用鲜药最为适宜。因此，《奇效良方》中鲜药多归肝、肺、胃经。

### 2.3 鲜药毒性分析

对《奇效良方》中出现的 246 种鲜药进行毒



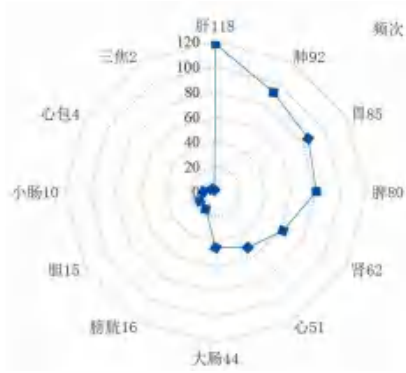


图 3 鲜药的归经分类

Fig 3 Classification of the meridian of fresh medicines

性分析。查阅《中国药典》(2020年版),其中有大毒的鲜药有4种,分别为巴豆、川乌、草乌、五倍子;有毒的鲜药有16种,分别为白附子、白药根、蟾酥汁、附子、甘遂、蛤蟆、苦楝、鲤鱼胆、南星、蛭螭、青鱼胆、商陆、野苈麻根、鱼胆、原蚕蛾、皂角;有小毒的鲜药有9种,分别为吴茱萸、艾叶、苍耳根、苍耳叶、贯众、蒺藜、生苍耳、蜗牛、知母(见表2)。

2.4 鲜药的临床应用特点及规律

将246种鲜药的临床应用主治大致分为以下7

表 2 鲜药的毒性分类

Tab 2 Toxicity classification of fresh drugs

鲜药名	毒性	鲜药名	毒性
巴豆	大毒	商陆	有毒
草乌	大毒	野苈麻根	有毒
川乌	大毒	鱼胆	有毒
五倍子	大毒	原蚕蛾	有毒
白附子	有毒	皂角	有毒
白药根	有毒	吴茱萸	小毒
蟾酥汁	有毒	艾叶	小毒
附子	有毒	苍耳根	小毒
甘遂	有毒	苍耳叶	小毒
蛤蟆	有毒	贯众	小毒
苦楝	有毒	蒺藜	小毒
鲤鱼胆	有毒	生苍耳	小毒
南星	有毒	蜗牛	小毒
蛭螭	有毒	知母	小毒
青鱼胆	有毒		

类:内科疾病、外科疾病、妇科/男科疾病、儿科疾病、皮肤科疾病、耳鼻喉等五官科疾病、传染病。鲜药使用频次最高的是内科疾病795次(45.64%),其次是外科疾病346次(19.86%)、耳鼻喉等五官科疾病345次(19.80%)、传染病88次(5.05%)、妇科/男科疾病85次(4.88%)、皮肤病73次(4.19%)、儿科疾病10次(0.57%)。详细分类见表3、4。

表 3 《奇效良方》中鲜药主治疾病类型

Tab 3 Types of diseases indicating fresh medicines in Qixiao Liangfang

疾病类型	主治病症 / 频次	频数 / 次	百分比 / %
内科疾病	诸风 358 次、解诸毒 107 次、伤寒 71 次、呕吐 68 次、痢 57 次、头痛 34 次、吐血 25 次、气喘 22 次、烦躁 18 次、肺痿肺痈 15 次、消渴 13 次、惊悸 7 次、	795	45.64
外科疾病	治诸肿 148 次、诸疮 133 次、治虫伤 18 次、诸毒(热毒 16 次)、二便不通 13 次、痈疽 13 次、痔疮肿痛 4 次、小便尿血 1 次、	346	19.86
耳鼻喉等五官科疾病	眼目 120 次、耳部疾病 45 次、鼻 43 次、咽喉疾病 37 次、口舌 33 次、膈噎 27 次、牙齿 21 次、唇 15 次、失音 4 次、	345	19.80
传染病	霍乱 42 次、疟 41 次、瘟疫 5 次、	88	5.05
妇科/男科疾病	妊娠病 35 次、产后 31 次、月经病 10 次、遗精白浊 9 次、	85	4.88
皮肤科疾病	香港脚 43 次、痈疽 13 次、癣 7 次、白癩风 5 次、丹毒 3 次、瘰疬 2 次、	73	4.19
儿科病	小儿急痢 4 次、小儿风热 4 次、小儿下痢 1 次、小儿腹胀 1 次	10	0.57

表 4 不同疾病类型对应的常用鲜药频数统计

Tab 4 Frequency of commonly used fresh drugs corresponding to different disease types

疾病类型	运用的鲜药 / 频次	频数 / 次	百分比 / %
内科疾病	生姜(452次)、生地黄(115次)、葱白(49次)、甘草(43次)、生姜汁(28次)、川乌(18次)、附子(11次)、大黄(10次)、白附子(8次)、薄荷(8次)、南星(6次)、半夏(6次)等	908	45.54
外科疾病	生姜(112次)、生地黄(70次)、甘草(50次)、葱白(28次)、大黄(13次)、牵牛(9次)、商陆(6次)、葱(4次)、白附子(3次)、蟾酥汁(3次)、黄芩(3次)、芸苔菜(3次)等	405	20.31
妇科/男科疾病	生姜(57次)、生地黄(17次)、葱白(9次)、薄荷(2次)、卷柏(1次)等	97	4.86
儿科疾病	生姜(4次)、牵牛(3次)生姜汁(1次)、葱白(1次)、猪胆(1次)等	10	0.50
皮肤科疾病	生姜(44次)、甘草(5次)、草乌(4次)、牛蹄根(2次)、生松叶(2次)、大黄(2次)、乌头(1次)等	74	3.71
耳鼻喉等五官科疾病	生姜(143次)、生地黄(77次)、甘草(23次)、葱白(21次)、生姜汁(15次)、薄荷(7次)、白附子(6次)、附子(4次)、人乳汁(4次)等	406	20.36
传染病	生姜(71次)、葱白(5次)、生姜汁(2次)、生地黄(2次)、蒜(2次)、桃叶(2次)等	94	4.71

3 鲜药应用特点总结分析

3.1 鲜药来源广泛,方便易得

246种鲜药中使用频次较高的鲜药如生姜(生姜汁)、生地黄(生地黄汁)、葱白、甘草、

附子等,均属常见地产药材,部分鲜药为药食同源类,巧妙地运用瓜果食疗的传统理念,且药食同源类药物来源广泛,便于就地取材,多现取现用,注重药物本性。鲜用植物药多以根、茎、叶、果实和种子入药,极少数以全草入药;动物类鲜药多以某一器官或部分组织入药,少数体型较小的动物或昆虫则以整体入药。书中鲜药多有一药多用的记载,如生姜可生嚼、生锉、煎煮、取自然汁和丸、取自然汁内服等;葱白可煎汤、生嚼、研涂、捣膏、捣汁和丸、捣烂做饼、泡茶等,具有多种鲜用方式。同时鲜药功效多样,如生姜可用于风寒感冒、胃寒呕吐、寒痰咳嗽等,葱白可用于风寒感冒等。

### 3.2 鲜药的性味归经分析

对鲜药性味归经特点进行总结,药性以寒性为主,寒性药一般具有清热泻火、凉血解毒、清化热痰等作用,主要用于火毒疮疡、血热吐衄、痰热咳嗽等。药味统计以甘、苦最多,甘味药“能补、能和、能缓”,苦味药“能泄、能燥、能坚”,甘苦兼味应用,具有补阴泄热之能,于温病最宜<sup>[10]</sup>。书中鲜药归经以肝经、肺经居多,《温热论》云:“温邪上受,首先犯肺,逆传心包”,故温病用属肺经之鲜药,多有辛散凉润之功<sup>[11]</sup>。鲜药以其津丰、气清、味芳等特点,尤其是在杂病和温病治疗上优势较干药更为突出<sup>[11-12]</sup>。参照中医学基础理论,寒凉性中药的鲜品较干品偏凉偏润;滋阴类中药,鲜品较干品偏润,滋养阴液更为迅捷,鲜药汁润燥力强于干品,药效迅捷<sup>[13]</sup>。

### 3.3 鲜药的毒性分析

《黄帝内经》<sup>[14]</sup>首提“有毒、无毒”及“大毒”“常毒”“小毒”“无毒”,之后历代本草书籍中,常在每一味中药的性味之下标明“有毒”“无毒”。古代常把药物的毒性看作药物的偏性,如《药治通义》<sup>[15]</sup>引张载人语:“凡药皆有毒也,非指大毒、小毒之毒”,论述了毒药的广义含义,阐明了毒性就是药物偏性,中药依靠这种偏性来治疗疾病<sup>[16]</sup>。明代张景岳《类经》<sup>[17]</sup>云:“药以治病,因毒为能,所谓毒者,因气味之有偏也”,强调中药“以毒为能”,利用“偏性”“以偏纠偏”是中药治病的基本原理<sup>[18]</sup>。中药毒性是纠正人体偏盛偏衰的基础,其特性(如四气、五味、归经、升降、沉浮)通过内服或外用方法,使人体吸收药物中的毒性,调整机体出现的阴阳失衡和脏腑失常,从而达到消除病态、改善症状、恢复机体功能的目的<sup>[19]</sup>。因此,中药毒性是其本身所具有的特质,是客观存在的,且鲜药较干品通常具有更大的毒性,但只要诊断准确、对症用药、合理

配伍、剂量得当,并做到中病即止,鲜药在临床应用上也不会出现明显的毒性反应。

### 3.4 《奇效良方》中鲜药的现代药理及临床应用

鲜药广泛用于内科、外科、耳鼻喉等五官科、妇科、儿科、皮肤科等疾病治疗。在书中记载的单方或验方中,在多卷目频繁出现的鲜药且现代临床也较常用的有生姜、生地黄、葱白、甘草、附子等。首先以生姜为例,现代研究表明,生姜的化学成分可分为挥发油、姜辣素和二苯基庚烷三大类<sup>[20]</sup>。生姜具有止呕、抗炎、抗肿瘤等作用<sup>[21-23]</sup>。中医临床上生姜主要用于治疗呕吐和伤寒等疾病,现代临床多用其治疗肿瘤、神经系统疾病、心血管疾病<sup>[24-25]</sup>。其次是治疗出血和发热疗效较优的地黄,主要化学成分为糖类、环烯醚萜苷等,具有抗癌、清除自由基等作用<sup>[26]</sup>,临床上多用于治疗心脑血管疾病<sup>[27]</sup>。葱白为药食同源类中药,也是临床常用的鲜药,主要活性成分为硫化物、黄酮类化合物等<sup>[28]</sup>,它具有发汗解热、抗氧化等药理作用<sup>[29]</sup>。甘草解药食中毒、调和药性能力较为突出,因而在中医临床应用很广,素有“十药九草”之称<sup>[30]</sup>,其主要化学成分有三萜皂苷类、黄酮类、香豆素类等,具有抑菌、抗炎等生物活性,对心脑血管疾病、糖尿病等具有良好的治疗作用,还有补脾益气、缓急止痛及调和诸药的作用<sup>[31-32]</sup>。附子为大毒中药,不可久服,被列为下品<sup>[33]</sup>。张仲景记载:“附子炮制后毒性减少,而温经复阳,补火散寒之功加强”<sup>[34]</sup>,这是用附子火炮的最早记载。生附子主要功效为回阳救逆,经方中附子生用的例子很多,如白通汤、白通加猪胆汁汤、茯苓四逆汤、干姜附子汤、四逆汤、四逆加人参汤、通脉四逆汤、通脉四逆加猪胆汁汤<sup>[35]</sup>,可见生附子在古代经方中的应用。

## 4 讨论

《奇效良方》中所载鲜药应用涉及疾病种类及科别众多,奏效迅速,对现代临床仍具有重要指导意义。根据传统中医药理论,鲜品与干品功效差异主要分两种情况:①鲜干品功效相近,但鲜品作用之力更甚。②鲜干品功效相异(相较于干品,鲜品功效相反或增加新功能)。如干鱼腥草清热解毒和消痈排脓之力不及鲜鱼腥草;艾叶散寒止痛,温经止血,但鲜艾叶有清热解暑功效;生地黄清热生津凉血之力不及鲜地黄,且鲜地黄还有止血功效<sup>[36]</sup>。研究表明,金龙胶囊(鲜守宫、鲜金钱白花蛇、鲜蕲蛇)能够抑制多种恶性肿瘤细胞生长,如肝癌、肺癌等<sup>[37]</sup>。在抗菌试验中,鲜马齿苋对大肠埃希菌、痢疾杆菌、金黄色葡萄球菌的抗菌效果均优于干马齿苋<sup>[13]</sup>。虽然市

场上已有许多鲜药制剂,但整个鲜药产业情况仍不容乐观,2020年版《中国药典》收录仅有鲜石斛、鲜益母草、鲜芦根、鲜地黄、鲜鱼腥草、牡荆叶和生姜7种鲜药,对鲜药的临床应用和推广极其不利<sup>[38]</sup>。鲜药产业的发展及应用面临多方面的问题:①鲜药理论匮乏,临床应用缺少系统理论的指导;②鲜药含水量高,易发霉变质、储存运输困难;③鲜药生产受限,目前我国鲜药质量标准几乎空白,药企生产使用鲜药无法可依<sup>[39]</sup>;④传统鲜药材种植和应用难以形成系统;⑤鲜药临床调剂麻烦,医师和患者都不太愿意使用鲜药;⑥社会生产生活模式的变化,在一定程度上限制了鲜药的应用。

本文归纳总结了《奇效良方》中所记载的鲜药及用药特点,旨在为今后鲜药的发展与应用提供一定的数据支持,呼吁广大中医药工作者提高对鲜药的关注度,对其药理作用、临床应用及其机制进行更深入的研究,实现其丰富的药用价值,促进祖国医药事业的发展。

## 参考文献

- 柳阳,许二平.张锡纯临床运用鲜药探析[J].中华中医药杂志,2023,38(3):1301-1304.
- 张小磊,李秀敏,苗明三.中药临床鲜药应用特点及鲜药理论分析[J].中华中医药杂志,2022,37(11):6402-6405.
- 董宿,方贤,可嘉.奇效良方[M].北京:中国中医药出版社,1995:657.
- 康蕾,杨仁义,陈思肴,等.《奇效良方》辨治中风病学术思想探析[J].中国中医急症,2020,29(6):1095-1097.
- 中国药典2020年版.一部[S].2020:1902.
- 钟赣生,杨柏灿.中药学[M].北京:中国中医药出版社,2021:469.
- 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草[M].上海:上海科学技术出版社,1999:863.
- 中药大辞典[M].上海:上海交通大学出版社,2018:530.
- 张亚楠,惠香香,秦格,等.基于数据挖掘的《本草纲目》中鲜药应用的规律及特点分析[J].中药药理与临床,2023,39(4):97-101.
- 李锡岭,温雅,张思超.《温病条辨》甘味药运用规律探讨[J].山东中医药大学学报,2023,47(2):187-193.
- 易昊颖,陈儒骛,南云鑫,等.王孟英“鲜药观”简析[J].中医杂志,2021,62(13):1126-1129.
- 毛兆雄,刘和善.浅谈鲜药的应用与开发[J].中药材,1995,18(10):532-533.
- 李艳,郭晖,苗明三.中药鲜用的药理作用及临床应用分析[J].中华中医药杂志,2019,34(12):5691-5695.
- 段青峰.黄帝内经[M].武汉:崇文书局,2020:179.
- 丹波元坚,徐长卿.药治通义[M].北京:学苑出版社,2008:284.
- 刘锡钧,刘紫英.中药中毒问题的剖析[J].海峡药学,2002(5):12-14.
- 张景岳,范志霞,吴少祯.类经[M].北京:中国医药科技出版社,2011:614.
- 韩岚,林朝展,赵海霞,等.2012—2021年国家自然科学基金中药毒理学研究方向资助项目分析[J].中国中药杂志,2022,47(5):1415-1420.
- 陈仁寿.中药毒性的本质与合理使用原则[J].中国合理用药探索,2022,19(2):1-5.
- 刘鑫,张宏伟,傅若秋,等.生姜中姜酚类活性成分的抗肿瘤作用及其机制[J].第三军医大学学报,2017,39(9):884-890.
- Baliga MS, Haniadka R, Pereira MM, et al. Update on the chemopreventive effects of ginger and its phytochemicals[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2011, 51(6): 499-523.
- 姚瑞东.生姜的临床应用概述[J].中国中医药现代远程教育,2012,10(1):81-82.
- 张淑娟,张育贵,辛二旦,等.生姜药理作用研究进展[J].甘肃中医药大学学报,2020,37(6):79-81.
- 雷丹,洪滔,伍庆华,等.基于网络药理学对生姜药用活性成分的发现和作用机制分析[J].江西中医药大学学报,2021,33(4):83-89.
- 娄鑫,白明,田硕,等.生姜外用对大、小鼠痔疮模型的影响[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(4):23-28.
- 郭琳,苗明三.生(鲜)地黄的化学、药理与应用特点[J].中医学报,2014,29(3):375-377.
- 李慧芬.地黄药理作用和临床应用概况[J].药学研究,2014,33(6):345-347.
- 田立群,雷杰,祝炜,等.葱白提取物对心肌缺血-再灌注损伤大鼠的保护作用及其机制[J].医药导报,2022,41(1):24-29.
- 田晓庆,于法常,王瑞,等.大葱现代药理药效研究[J].中国果菜,2016,36(10):29-33.
- 宋雪,刘思佳,樊建,等.基于炙甘草与生甘草化学成分、药理作用差异的临床应用探讨[J].中国医药科学,2022,12(19):114-117.
- 肖先,李春燕,刘晓龙,等.甘草的主要化学成分及药理作用研究进展[J].新乡医学院学报,2023,40(3):280-285.
- 韩维维,方东军,李陆军,等.甘草化学成分及生物活性研究进展[J].化学工程师,2022,36(2):56-58.
- 王萍,吴璇,吴璐,等.附子多糖的提取、纯化及药理活性研究进展[J].中华中医药学刊,2023,41(10):182-187.
- 张仲景.伤寒论[M].北京:学苑出版社,2007:45-46.
- 袁旭,袁红霞.《神农本草经》与经方应用之附子篇[J].山东中医药大学学报,2023,47(3):261-265.
- 李彩霞,苗晋鑫,余喻先,等.鲜药的功效特点及干燥对鲜药物质基础的影响[J].中华中医药杂志,2022,37(11):6652-6656.
- 李丹,刘延庆.金龙胶囊抗肿瘤的研究进展[J].湖北中医杂志,2018,40(8):57-60.
- 彭孟凡,苗晋鑫,田硕,等.基于2020年版《中国药典》分析中药鲜用现状及特点[J].中国医院药学杂志,2022,42(2):206-210.
- 徐杰,张志鹏,陈丹燕,等.中药鲜药的现代应用与研究进展[J].中国现代中药,2022,24(1):160-168.

(收稿日期:2023-12-18;修回日期:2024-01-22)



## 临床药师在临床

1 例抗 GABA<sub>B</sub>R 抗体相关脑炎的全程化药学监护和用药分析

张璇, 姜珊珊, 焦秀秀, 朱青霞, 俞晓艳\* (上海交通大学医学院附属第九人民医院药剂科, 上海 200011)

**摘要:** 1 例 67 岁男性患者因“阵发性抽搐发作 2 周余”入院, 诊断为抗  $\gamma$ -氨基丁酸 B 型受体 (GABA<sub>B</sub>R) 抗体相关脑炎。入院后给予免疫治疗, 治疗过程中出现癫痫持续状态、肺部感染、低蛋白血症、凝血功能异常等。临床药师结合患者病情, 在免疫治疗方案的选择上给予甲泼尼龙联合静脉注射免疫球蛋白, 在需要抗感染治疗时给予美罗培南 (1 g q8h ivgtt); 应用多烯磷脂酰胆碱护肝, 给予氨溴索联合布地奈德改善肺功能, 应用低分子量肝素钙预防血栓形成, 对患者的营养和电解质平衡方面进行监护, 给予患者全程化监护, 最终患者病情好转出院。

**关键词:** 抗 GABA<sub>B</sub>R 抗体相关脑炎; 全程化; 药学监护; 用药分析

中图分类号: R969.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)08-2217-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.042

## Whole-course pharmaceutical care for a patient with anti- $\gamma$ -aminobutyric acid B receptor encephalitis and medication analysis

ZHANG Xuan, JIANG Shan-shan, JIAO Xiu-xiu, ZHU Qing-xia, YU Xiao-yan\* (Department of Pharmacy, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011)

**Abstract:** A 67-year-old male patient was admitted to the hospital because of paroxysmal limb convulsions for 2 weeks, and was diagnosed as anti- $\gamma$ -aminobutyric acid B receptor encephalitis. He developed status epilepticus, pulmonary infection, hypoproteinemia, and coagulation disorder, etc during the immunotherapy after the admission. Based on the patient's condition, clinical pharmacists suggested giving methylprednisolone and intravenous immunoglobulin for immunotherapy, meropenem (1 g q8h ivgtt) for anti-infective therapy, polyene phosphatidylcholine for liver damage, ambroxol combined with budesonide for improving lung function, and low molecular weight heparin calcium for prevention of thrombosis. The nutrition condition and electrolyte balance of the patient was also closely monitored by clinical pharmacists. Finally, the patient was discharged with improved condition after the whole-course pharmaceutical care.

**Key words:** anti- $\gamma$ -aminobutyric acid B receptor encephalitis; whole-course; pharmaceutical care; medication analysis

自身免疫性脑炎 (autoimmune encephalitis, AE) 是指一类由自身免疫机制介导的脑炎<sup>[1]</sup>。抗 GABA<sub>B</sub>R 抗体相关 AE 具有边缘性脑炎的表现, 占 AE 的 4% ~ 5%, 最早于 2010 年由 Lancaster 等<sup>[2-3]</sup>首次报道。抗 GABA<sub>B</sub>R 抗体相关 AE 相对

预后较差, 对这类患者的药学监护是保证合理用药的重要过程。本文通过对 1 例抗 GABA<sub>B</sub>R 抗体相关 AE 患者全程化用药监护的介绍, 为临床药师参与临床实践提供参考。

### 1 病例概况

**基金项目:** 上海市卫健委“医苑新星”青年医学人才培养资助计划。

**作者简介:** 张璇, 女, 硕士, 主管药师, 主要从事临床药学研究, email: ziyuer.hi@163.com \*通信作者: 俞晓艳, 女, 硕士, 主管药师, 主要从事临床药学研究, email: annie8234@163.com

患者，男性，67 岁，身高 176 cm，体重 62 kg。以“阵发性抽搐发作 2 周余”入院。

患者于 2023 年 2 月 13 日 18:00 突发抽搐，口角不能闭合，从椅子上滑落，失去意识，眼睛上翻，口吐白沫，四肢抽搐，持续 2~3 min，120 急救车送至外院，就诊 5 d，具体诊治不详，苏醒后对于抽搐当时记忆丧失；2 月 22 日 21:00 第 2 次发作，症状同前，程度较前减轻，持续 2~3 min 自行缓解，未就诊；2 月 23 日 20:30 第 3 次发作，症状同前，外院就诊，家属诉注射镇静剂，具体不详；2 月 27 日 6:50 在睡眠中第 4 次发作，症状同前，伴头部左右晃动，伴小便失禁，遂至我院急诊神经内科就诊。为明确诊治，以“癫痫”收治入院。

入院查体：体温 (T) 36.4℃，脉率 (P) 78 次·min<sup>-1</sup>，呼吸 (R) 20 次·min<sup>-1</sup>，血压 (BP) 140/70 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa)。患者神清，构音障碍，饮水呛咳，双侧软腭上抬受限，理解力全、定向力全。双瞳孔等大等圆，对光反射存在，眼震 (-)；伸舌居中；四肢肢体肌张力正常，双上肢肌力 5 级；双下肢肌力 4 级，颈无抵抗，双侧病理征 (-)；双侧痛觉、深感觉、皮质复合觉正常。双肺呼吸音粗，未闻及明显湿啰音；心律齐，未及明显杂音，腹软，未及压痛、反跳痛，双下肢不肿。血常规结果回报：白细胞计数  $12.87 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ ，淋巴细胞百分比 12.4%，中性粒细胞百分比 82.6%，其余指标正常。胸部 CT 结果回报右肺炎症，双肺肺气肿。凝血指标 D-二聚体  $1.16 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 。初步诊断为癫痫。入院后给予丙戊酸钠缓释片口服 (500 mg bid) 抗癫痫，因患者存在肺炎，给予注射用盐酸头孢替安 (1 g bid ivgtt) 抗感染治疗。

## 2 主要治疗经过

患者入院后昏睡，言语含糊，强烈刺激后有少量对答，颈项可疑强直，克氏征阳性，四肢见自主活动，存在癫痫持续状态。完善腰穿，患者脑脊液无色透明，无凝块，脑脊液中细胞总数  $15 \times 10^6 \cdot L^{-1}$ ，白细胞数  $13 \times 10^6 \cdot L^{-1}$ ，脑脊液中蛋白  $383.8 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ ，葡萄糖  $5.6 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ ，氯  $126 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ ，脑脊液涂片未见菌体、新型隐球菌和抗酸杆菌。脑脊液抗 GABA<sub>B</sub>R 抗体 IgG 阳性，滴度 1:100。医师诊断为抗 GABA<sub>B</sub>R 抗体相关 AE，予以大剂量糖皮质激素冲击联合静脉注射免疫球蛋白 (IVIG) 进行免疫治疗。予以口服丙戊酸钠缓释片 (500 mg bid)，左乙拉西坦

片 (0.5 g bid) 控制癫痫症状。

患者入院第 2 日昏迷，存在全面性癫痫持续状态，医师予以地西洋注射液 20 mg 静脉注射有效，地西洋注射液 40 mg 静脉泵入  $4 \text{ mL} \cdot h^{-1}$  维持过程中再次发作，药师建议肌内注射苯巴比妥钠 0.1 g bid，无效后改为丙戊酸钠首剂  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，5 min 内静脉注射，再以  $20 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  静脉滴注控制癫痫发作。考虑患者存在肺部感染，氧饱和度 93%，血气分析提示二氧化碳潴留，入院第 3 日予以紧急气管插管，行深静脉导管置入术，转入重症监护室继续治疗。予以美罗培南 1 g q8h ivgtt 抗感染，药师建议停用丙戊酸钠，改为咪达唑仑注射液  $0.1 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{h})$  联合丙泊酚中长链脂肪乳  $1 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{h})$  静脉泵入维持治疗。同时积极治疗原发病，甲泼尼龙 500 mg qd，IVIG  $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  ivgtt 连续 5 d 进行免疫治疗。为了保证患者的能量供给，给予患者留置胃管，并予肠内营养混悬液 500 mL bid，鼻饲。为了预防血栓形成，予以低分子量肝素钙注射液 4100 IU 皮下注射给药。注射用艾普拉唑钠首剂 20 mg，之后 10 mg qd ivgtt 预防消化道出血。患者入院第 7 日，复查胸部 CT 回报双肺炎症改善，停用美罗培南，改为哌拉西林钠他唑巴坦钠 4.5 g q8h ivgtt 抗感染。药师建议停用咪达唑仑，改为丙戊酸钠静脉泵入抗癫痫治疗，同时逐渐减停丙泊酚。

患者入院第 2 周，整体癫痫持续状态得到控制。患者入院第 8 日谷丙转氨酶  $93 \text{ U} \cdot L^{-1}$ ，谷草转氨酶  $93 \text{ U} \cdot L^{-1}$ ，白蛋白  $25 \text{ g} \cdot L^{-1}$ ，药师建议予以多烯磷脂酰胆碱 ( $456 \text{ mg} \text{ q12h} \text{ ivgtt}$ ) 护肝，人血清白蛋白 ( $12.5 \text{ g} \text{ q12h} \text{ ivgtt}$ ) 补充白蛋白，激素减量为 240 mg qd ivgtt。入院第 9 日患者神志清楚，四肢肌力较前好转，无四肢抽搐，今日拔除气管插管，逐渐减停注射用丙戊酸钠，改为口服给药。患者入院第 10 日，激素减量为 120 mg qd ivgtt，血钙  $2.06 \text{ nmol} \cdot L^{-1}$ ，药师建议给予葡萄糖酸钙注射液 1 g 静脉泵入，监测电解质。患者入院第 11 日，丙戊酸钠血药浓度  $53.14 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，未再出现癫痫发作，激素减量至 60 mg qd ivgtt，转出重症监护室。入院第 13 日，多烯磷脂酰胆碱注射液序贯多烯磷脂酰胆碱胶囊 456 mg tid po 治疗，考虑患者使用激素冲击，药师建议予氯化钾 (1 g bid po)，碳酸钙 (600 mg qd po) 补钾补钙。

患者入院第 3 周，患者新发烦躁，医师予以口服喹硫平片早 12.5 mg，晚 25 mg 改善症状。

停用注射用甲泼尼龙琥珀酸钠, 改为口服醋酸泼尼松 60 mg qd 序贯治疗。头颅 MR 回报左岛叶局灶性弥散受限, 急性缺血灶可能, 予以丁苯酞 (25 mg bid ivgtt), 吡拉西坦 (8 g qd ivgtt) 改善循环。哌拉西林钠他唑巴坦钠改为头孢替安 (2 g bid ivgtt) 抗感染。

患者入院第 4 周, 停用抗感染药物和低分子量肝素钙, 维持醋酸泼尼松 (55 mg qd po) 给药, 补钾补钙护胃及抗癫痫治疗。患者入院第 5 周, 病情稳定, 拔除胃管, 予以半流质饮食, 激素减量至醋酸泼尼松 45 mg 口服。血红蛋白  $103 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 提示贫血, 药师建议予以生血宝合剂 (10 mL tid po) 对症支持治疗。患者未再出现抽搐发作, 予以带药出院。一个月后门诊回访, 激素减量过程中患者没有癫痫发作, 继续进行免疫治疗。

### 3 临床药学监护

#### 3.1 对抗 GABA<sub>B</sub>R 抗体相关 AE 合理用药的监护

抗 GABA<sub>B</sub>R 抗体相关 AE 主要见于中老年, 男性多于女性, 主要症状包括癫痫发作、精神行为异常、近事记忆力下降。根据中国专家共识<sup>[1]</sup>, AE 的治疗包括免疫治疗、对癫痫发作和精神症状等的症状治疗、支持治疗和康复治疗。免疫治疗分为一线免疫治疗、二线免疫治疗、长程免疫治疗、升级免疫治疗和添加免疫治疗等。一线免疫治疗包括糖皮质激素、IVIG 和血浆置换。其中, 静脉注射糖皮质激素是首选的一线免疫治疗。对于重症 AE 患者, 可联合使用糖皮质激素冲击治疗与 IVIG<sup>[4]</sup>。该患者亚急性病程, 逐渐进展, 入院后昏迷且存在癫痫持续状态, 由于肺部感染伴呼吸衰竭行气管插管, 结合血和脑脊液自身抗体阳性, 患者 AE 诊断明确。医师予以静脉注射免疫球蛋白 25 g + 甲泼尼龙 500 mg 冲击治疗, 药师建议在激素减量过程中密切观察病情波动, 必要时可予以第二次激素冲击治疗。大剂量的激素冲击会增加机会感染的风险, 结合患者使用呼吸机辅助通气并有癫痫发作风险, 药师建议升级抗菌药物为美罗培南 (1 g q8h ivgtt)。激素使用过程中会导致血糖、血压、血脂的异常, 需要监护患者的血糖、血压和血脂水平, 必要时积极干预。激素的使用还会导致胃出血、骨质疏松的风险增高<sup>[5]</sup>, 造成低钾以及肝损伤, 药师建议予以艾普拉唑钠 (10 mg qd ivgtt) 护胃, 口服碳酸钙 D<sub>3</sub> 颗粒补钙, 口服氯化钾补钾, 建议患者在住院期间进行限钠、补钾的饮食。患者在激素使用的第 4 日出现肝酶升高, 药师建议予以多烯磷脂酰胆碱 (456 mg q12h

ivgtt) 护肝, 4 d 后序贯口服多烯磷脂酰胆碱胶囊继续治疗。个别患者在输注免疫球蛋白时出现一过性头痛、心慌、恶心等不良反应, 可能与输注速度过快或个体差异有关。这些不良反应大多轻微且发生在输液开始一小时内, 药师建议护士在输注过程中观察患者的一般情况, 控制免疫球蛋白的输注速度, 必要时减慢或暂停输注。

目前尚无大型随机临床试验比较一线免疫治疗的优劣, 但已发表的既往病例经验表明, 血浆置换对于改善 AE 患者的临床症状非常重要。英国的一项研究报道显示, 在抗 AE 治疗初期接受血浆置换的患者 89% 最终完全康复, 而接受 IVIG 和激素治疗的患者只有 47% 完全康复<sup>[6]</sup>。经查阅文献, 血浆置换在难治性 AE 中的反应率为 65%, 其中, 具有神经元细胞表面抗体的患者在血浆置换后 83% 病情改善, 抗 GABA<sub>B</sub>R 抗体为抗细胞表面抗原抗体<sup>[7-9]</sup>。综上, 考虑到 IVIG 后立即血浆置换可能会降低其疗效<sup>[10]</sup>, 药师建议在 IVIG 治疗结束后至少 14 d 再根据病情评估是否行血浆置换术。

#### 3.2 对抗 GABA<sub>B</sub>R 抗体相关 AE 并发症的药学监护

严重且难治的癫痫发作是抗 GABA<sub>B</sub>R 抗体相关 AE 的主要并发症, 以全面强直阵挛性发作为主, 抗癫痫发作药物通常无效, 可迅速进展为癫痫持续状态。患者入院时给予丙戊酸钠和左乙拉西坦联合治疗, 癫痫控制不佳并有持续发作, 先后予以地西洋静脉注射、苯巴比妥肌内注射、丙戊酸钠静脉注射治疗, 入院第 3 日调整抗菌药物为美罗培南, 考虑到美罗培南会降低丙戊酸钠的血药浓度<sup>[11]</sup>, 药师提出停用丙戊酸钠, 改为咪达唑仑联合丙泊酚控制癫痫持续状态。肺部感染好转后, 调整抗菌药物为哌拉西林钠他唑巴坦钠, 恢复使用丙戊酸钠, 逐步减停丙泊酚和咪达唑仑。药师和医师积极配合, 持续监测丙戊酸钠的血药浓度, 调控丙泊酚的剂量, 避免丙泊酚输注综合征的发生, 有效控制患者的癫痫发作。

大剂量的激素冲击治疗往往增加机会感染的风险, 由于患者入院时已有肺炎, 在使用呼吸机辅助通气后更要关注肺部感染的进展。根据指南<sup>[12]</sup>, 考虑到覆盖铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌等病原菌, 避免诱发患者癫痫发作, 选择美罗培南进行抗感染治疗。由于患者在癫痫持续状态时使用的镇静类药物会抑制呼吸道纤毛的运动, 阻碍痰液的排出, 已有文献报道氨溴索联合布地奈德在慢性阻塞性肺疾病和新生



儿肺炎的治疗中都取得了良好的疗效<sup>[13-14]</sup>，药师提出氨溴索联合布地奈德的治疗方案，以进一步改善患者的肺功能，增强抗炎疗效。

深静脉血栓形成是股静脉穿刺置管的严重并发症，结合患者长期卧床，血清 D-二聚体进行性升高，提示患者有深静脉血栓形成的风险。医师给予低分子量肝素钙预防性抗凝，药师对患者的血小板计数和肾功能各项指标进行监护，患者在院期间没有发生深静脉血栓栓塞。

### 3.3 对抗 GABA<sub>B</sub>R 抗体相关 AE 患者营养和内环境的监护

对于重症 AE 患者，营养支持极其重要。药师根据患者的体重 62 kg，按照 25 ~ 30 kcal/(kg · d)，计算出该患者需能量 1550 ~ 1860 kcal · d<sup>-1</sup>。当患者昏迷时，需要全面的肠内营养支持，给予肠内营养混悬液 1000 mL · d<sup>-1</sup> (1500 kcal · d<sup>-1</sup>)。早期肠内营养可促进肠道蠕动、刺激胃肠激素分泌、改善肠道血流灌注，有助于维持肠黏膜结构和屏障功能的完整性，减少致病菌定植和细菌移位，优于肠外营养。患者在癫痫持续状态时镇静类药物的使用导致胃肠道蠕动减慢，从而影响营养的吸收，患者出现低蛋白血症，药师建议输注适量人血清白蛋白，补充肠外营养。

大剂量糖皮质激素的使用影响电解质代谢<sup>[15]</sup>，加速血钾和血钙的流失，继发性升高血钠，药师建议给予患者积极的补钾补钙治疗，监护电解质水平，保证内环境的稳定性。

## 4 小结

综上，对抗 GABA<sub>B</sub>R 抗体相关 AE 患者进行药学监护时，既要 AE 治疗方案的安全性、有效性和合理性进行监护，也要加强对其并发症的合理用药监护，还要积极关注患者的营养状况和内环境的稳定性。全程化药学监护可以改善抗 GABA<sub>B</sub>R 抗体相关 AE 的预后，临床药师在优化患者的治疗方案和提高用药安全性方面发挥了重要的作用。

## 参考文献

[1] 中华医学会神经病学分会神经感染性疾病与脑脊液细胞学学组. 中国自身免疫性脑炎诊治专家共识 (2022 年版) [J]. 中华神经科学杂志, 2022, 55 (9): 931-949.

[2] de Bruijn MAAM, van Sonderen A, van Coevorden-Hameete MH, et al. Evaluation of seizure treatment in anti-LGI1, anti-NMDAR, and anti-GABA<sub>B</sub>R encephalitis [J]. *Neurology*, 2019, 92 (19): e2185-e2196.

[3] Lancaster E, Lai M, Peng X, et al. Antibodies to the GABA (B) receptor in limbic encephalitis with seizures: case series and characterisation of the antigen [J]. *Lancet Neurol*, 2010, 9 (1): 67-76.

[4] Nosadini M, Eyre M, Molteni E, et al. Use and safety of immunotherapeutic management of nmethylaspartate receptor antibody encephalitis: a metaanalysis [J]. *JAMA Neurol*, 2021, 78 (11): 1333-1344.

[5] Chotiyarnwong P, McCloskey EV. Pathogenesis of glucocorticoid-induced osteoporosis and options for treatment [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2020, 16 (8): 437-447.

[6] Wright S, Hacoheh Y, Jacobson L, et al. N-methyl-D-aspartate receptor antibody-mediated neurological disease: results of a UK-based surveillance study in children [J]. *Arch Dis Child*, 2015, 100 (6): 521-526.

[7] Suppiej A, Nosadini M, Zuliani L, et al. Plasma exchange in pediatric anti-NMDAR encephalitis: a systematic review [J]. *Brain Dev*, 2016, 38 (7): 613-622.

[8] Jacob S, Mazibrada G, Irani SR, et al. The role of plasma exchange in the treatment of refractory autoimmune neurological diseases: a narrative review [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2021, 16 (4): 806-817.

[9] Heine J, Ly LT, Lieker I, et al. Immunoabsorption or plasma exchange in the treatment of autoimmune encephalitis: a pilot study [J]. *J Neurol*, 2016, 263 (12): 2395-2402.

[10] Zhang Y, Huang HJ, Chen WB, et al. Clinical efficacy of plasma exchange in patients with autoimmune encephalitis [J]. *Ann Clin Transl Neurol*, 2021, 8 (4): 763-773.

[11] Yoon H, Kim DH. Unusual drug reaction between valproate sodium and meropenem [J]. *Int J Clin Pharm*, 2013, 35 (3): 316-318.

[12] 中华医学会呼吸病学分会感染学组. 中国成人医院获得性肺炎与呼吸机相关性肺炎诊断和治疗指南 (2018 年版) [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2018, 41 (4): 255-280.

[13] 黄志龙, 郭宝红, 赵君. 布地奈德联合氨溴索治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重期临床疗效研究 [J]. 临床军医杂志, 2023, 51 (2): 214-216.

[14] 霍妹琦, 舒桂华, 王艳, 等. 氨溴索联合布地奈德混悬液雾化吸入对重型新生儿肺炎患儿的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38 (16): 1847-1850.

[15] 中华医学会内分泌学分会, 中国内分泌代谢病专科联盟. 糖皮质激素类药物临床应用指导原则 (2023 版) [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2023, 39 (4): 289-296.

(收稿日期: 2023-11-20; 修回日期: 2024-05-06)

# 1 例利奈唑胺与克拉霉素药物相互作用的病例分析

刘群<sup>1,2</sup>, 扎央<sup>1</sup>, 卓嘎<sup>1</sup>, 多布拉<sup>1\*</sup> (1.日喀则市人民医院药剂科, 西藏 日喀则 857000; 2.上海交通大学医学院附属新华医院临床药理学部, 上海 200092)

**摘要:** 探讨利奈唑胺与克拉霉素之间可能存在的相互作用, 为复杂非结核分枝杆菌感染患者用药安全提供药物的信息支持。临床药师参与 1 例利奈唑胺联合克拉霉素治疗淋巴结分枝杆菌感染患儿方案的调整, 发现利奈唑胺血药浓度异常升高, 结合患儿前期不良反应及合并用药情况进行分析, 发现克拉霉素可能与利奈唑胺发生相互作用致其血药浓度升高。以此提醒临床医师联用两药时需要引起高度重视, 特别是长期用药患者, 避免利奈唑胺不良反应的发生。

**关键词:** 临床药师; 利奈唑胺; 克拉霉素; 药物相互作用; 药学监护

**中图分类号:** R969.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)08-2221-04  
**doi:**10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.043

利奈唑胺是噁唑烷酮类合成抗菌药物, 主要被用于治疗革兰氏阳性菌引起的感染。早在 2000 年就报道了利奈唑胺对非结核分枝杆菌 (nontuberculous mycobacteria, NTM) 的体外药敏试验<sup>[1]</sup>。NTM 淋巴结病常见于儿童, 是儿童最多见的 NTM 病, 近年来呈增长趋势<sup>[2]</sup>。克拉霉素联合利奈唑胺越来越多地出现在 NTM 的治疗方案中。利奈唑胺会引起血红蛋白减少、血小板减少、贫血等血液系统不良反应<sup>[3-4]</sup>。本文详细阐述了临床药师参与 1 例淋巴结分枝杆菌感染患儿的治疗过程, 并发现利奈唑胺暴露增加可能与克拉霉素发生药物相互作用有关。

## 1 病例资料

患者, 男, 9 岁, 4 个月前 (2021 年 9 月) 患儿无明显诱因出现左侧颈部肿物, 直径约 2 cm, 质地较硬。病初在院外予阿莫西林、头孢抗感染治疗, 颈部肿物无明显变化; 后予替考拉宁 (5 d) 抗感染治疗, 肿物较前无明显变化。期间完善淋巴结穿刺活检, 病理结果显示: 镜下呈肉芽肿性炎症改变, 考虑淋巴结肉芽肿性炎。后患儿颈部肿物持续有坏死物质排出, 行局部清创, 取坏死物质送检二代病原测序, 检出 NTM 脓肿分枝杆菌, 予头孢西丁、阿米卡星、利奈唑胺 (0.5 g po bid) 及克拉霉素治疗 (11 月 22 日—12 月 18 日), 局部肿胀减轻。半个月前患儿复查血常规全血细胞下降, 减少利奈唑胺剂量为 0.4 g po bid, 予人粒细胞刺激因子皮下注射。患儿颈部肿物仍迁延不愈, 为求进一步诊治, 于 2021 年 12 月 30 日到

我院门诊, 并以“淋巴结分枝杆菌感染”收入院。

入院检查: 体温 36.3℃, 脉搏 109 次·min<sup>-1</sup>, 呼吸 25 次·min<sup>-1</sup>, 血压 102/58 mmHg (1 mmHg = 133.2 Pa), 身高 152 cm, 体重 55 kg。血常规结果显示白细胞 (WBC) 5.80×10<sup>9</sup>·L<sup>-1</sup>, 红细胞计数 4.85×10<sup>12</sup>·L<sup>-1</sup>, 血小板计数 369×10<sup>9</sup>·L<sup>-1</sup>, 中性粒细胞 65.3%, 淋巴细胞 27.8%。神清, 精神可, 左侧颈部可扪及数个肿大淋巴结融合成片, 质地较硬, 与周围组织粘连, 大小约 2 cm, 表面皮肤有破溃。右侧淋巴结活动度可, 大小约 2 cm×1 cm, 表面皮肤无红肿破溃。咽红, 无异常分泌物, 扁桃体 I 度肿大。

治疗经过: 患儿入院后临床医师邀临床药师会诊, 共同探讨治疗方案。考虑院外抗感染治疗方案有效, 结合指南<sup>[2]</sup>, 入院当日选择阿米卡星 0.8 g ivgtt qd、利奈唑胺片 0.4 g po bid 和克拉霉素片 0.25 g po bid 抗感染治疗。入院 3 日后查利奈唑胺血药浓度显示, 血清峰浓度 22.051 μg·mL<sup>-1</sup>, 血清谷浓度 11.824 μg·mL<sup>-1</sup>; 因浓度过高立即减利奈唑胺剂量为 0.3 g po bid, 患儿血常规检测暂无异常, 后患儿出院。

2022 年 2 月 9 日患儿因颈部肿物情况未见明显好转再次入院, 考虑药物使用时间长 (2021 年 11 月 22 日—2022 年 2 月 8 日), 而病情未见明显好转, 2 月 10 日增加利奈唑胺剂量为 0.57 g po q8h, 阿米卡星和克拉霉素剂量不变。2 月 11 日临床药师发现该患儿再次入院使用利奈唑胺剂量较之前显著增加, 提醒临床医师该患儿血药浓度

作者简介: 刘群, 女, 主管药师, 主要从事临床药学研究, email: liuqun85700@163.com \*通信作者: 多布拉, 男, 主任药师, 主要从事药事管理和临床药学研究, email: 995794210@qq.com



过高,但因患儿病情未见好转,此次临床选用常规推荐剂量观察治疗效果。2月16日查利奈唑胺血药峰浓度  $32.778 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,谷浓度  $21.123 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,因浓度太高立即减剂量为  $0.3 \text{ g po bid}$ ,后患儿出院。

有文献指出利奈唑胺  $C_{\min} \geq 2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  能够发挥较好的治疗作用,而  $C_{\min} \geq 10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  则可能出现不良反应<sup>[5]</sup>,大多数医疗机构将利奈唑胺血清谷浓度高限定为  $7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ <sup>[6]</sup>;因患儿离本院较远,一直网上问诊未再次来院,临床药师后续对患儿进行电话回访,仔细询问知晓患儿利奈唑胺使用剂量持续保持  $0.3 \text{ g po bid}$ ,其他药物剂量不变。2022年5月停药,停药时患儿颈部肿物基本愈合,其间查过两次利奈唑胺血药浓度均在正常安全范围,谷浓度分别为  $5.23 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $6.45 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

## 2 讨论

### 2.1 治疗方案的分析

脓肿分枝杆菌复合群(MABC)病,由3个亚种组成:脓肿亚种、马赛亚种和博莱亚种<sup>[2]</sup>。在一线抗结核药物中,几乎所有的NTM对异烟肼都高度耐药,部分物种对利福平中等敏感,对乙胺丁醇相对敏感;在其他药物中,NTM仅对利奈唑胺、氯法齐明、阿米卡星、妥布霉素和克拉霉素表现出一般敏感性,这些多作为临床推荐治疗NTM的药物<sup>[7]</sup>。2021年由上海市公共卫生临床中心牵头发表文献指出<sup>[8]</sup>,NTM对阿米卡星、利奈唑胺、头孢西丁高度敏感(96%~100%),对亚胺培南和妥布霉素敏感性也较高(72.7%~90.6%);利奈唑胺不仅敏感度较高,对皮肤、软组织及脑脊液的渗透性也良好,并且有口服剂型,可作为初始治疗选择<sup>[2]</sup>及后期的维持治疗。欧洲指南推荐包含大环内酯类的三药方案优于不含大环内酯类的三药方案<sup>[9]</sup>。克拉霉素和阿奇霉素是近20年来治疗NTM病最为重要的药物<sup>[2]</sup>。

该患儿在外院已接受头孢西丁、阿米卡星、克拉霉素及利奈唑胺治疗(11月22日—12月18日),局部肿胀有减轻。NTM治疗疗程至少4个月<sup>[2]</sup>,临床药师和医师综合考虑后选择阿米卡星静脉滴注、利奈唑胺口服、克拉霉素口服作为该患儿的治疗方案;会诊讨论中临床药师提出避免利奈唑胺和克拉霉素可能的相互作用和耐药的发生,建议阿奇霉素代替克拉霉素,但临床医师考虑前期用药的有效性,坚持使用克拉霉素。临床药师通过查阅相关资料,有文献指出NTM对克拉霉素的敏感性高于

阿奇霉素<sup>[10]</sup>,支持临床医师的用药方案。

### 2.2 患儿利奈唑胺暴露增加的原因分析

利奈唑胺清除率在各年龄层的儿童患者中有所不同,年龄最小的儿童组(即出生一周后至11岁)其清除速率最快;随着年龄的增加,利奈唑胺的清除率逐渐降低,青少年患者的清除率与成年人相似<sup>[11]</sup>。该患儿9岁,55 kg,按利奈唑胺推荐使用剂量为  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ q8h}$ ,但因患儿外院使用利奈唑胺期间发生全血细胞下降,后减量为  $0.4 \text{ g} (7.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}) \text{ bid}$ ,此次入院继续原剂量服用。2022年1月2日查利奈唑胺血药浓度,谷浓度  $11.824 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  高于文献推荐浓度( $2 \sim 7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ );也明显高于皮肤软组织感染最低限(有的为  $4.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,有的甚至需要达到  $6.7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  才有效)<sup>[5]</sup>。分析其原因可能在于:①采血时间点是否正确(给药前30 min采血);②患儿年龄、肝肾功能;③药物相互作用等。与医师及护理人员沟通后,采血时机合适,排除影响因素①。结合上述利奈唑胺代谢与年龄的关系,该患儿9岁体重55 kg,利奈唑胺一日正常推荐剂量为  $1.65 \text{ g}$ ,患儿实际使用剂量为  $0.8 \text{ g} (0.4 \text{ g bid})$ ,患儿使用剂量低于推荐剂量,年龄因素影响不大;患儿肝肾功能无异常,可以排除影响因素②。

患儿再次入院(2月9日)使用该年龄段推荐剂量后血药谷浓度  $21.123 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,更是远远超出推荐安全浓度  $2 \sim 7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。减剂量为每日  $0.6 \text{ g} (0.3 \text{ g bid})$  后才维持了安全浓度。

### 2.3 患儿治疗过程中药物相互作用分析

患儿治疗方案中还有阿米卡星、克拉霉素,入院前也在使用头孢西丁。阿米卡星和头孢西丁对肝药酶无作用,克拉霉素属于肝药酶抑制剂,由肝细胞色素P450(CYP3A)同工酶代谢。在此机制下,会使同时使用的其他药物的代谢受抑制,导致其在血清中的药物浓度升高。利奈唑胺主要代谢产物是吗啉环的氧化,无需或极少由P450代谢,因此认为除作为单胺氧化酶抑制剂与肾上腺素药物及5-羟色胺类制剂存在药物相互作用外,与其他药物的相互作用罕见<sup>[6]</sup>。

临床药师通过软件(用药助手、uptodate、Lexicomp Drug)查阅了利奈唑胺与阿米卡星、克拉霉素、头孢西丁之间的相互作用,仅在用药助手软件上显示利奈唑胺与克拉霉素存在相互作用,作用程度为轻度。一项前瞻性药动学相互作用的研究显示,克拉霉素( $0.5 \text{ g qd}$ )可使利奈唑胺( $0.3 \text{ g q12h}$ )暴露量增加44%,并且差



异具有统计学意义；小剂量的克拉霉素（0.25 g qd）也可使利奈唑胺暴露量增加，但差异无统计学意义<sup>[12]</sup>。另外国外报道过一项前瞻性药动学研究<sup>[13]</sup>，克拉霉素（1000 mg qd）明显增加利奈唑胺（300 mg bid）的浓度；利奈唑胺的曲线下面积（AUC）从 29 mg·h·L<sup>-1</sup> 显著增加至 108 mg·h·L<sup>-1</sup>。另有文献报道 4 例免疫功能低下龟分枝杆菌皮肤感染患者，采用利奈唑胺和克拉霉素联合治疗发现，该方案临床疗效好、无复发，但克拉霉素增加了利奈唑胺的血清浓度，致使频繁发生不良反应<sup>[14]</sup>。

因患儿在外院（12 月 18 日）发生全血细胞减少，后降低利奈唑胺剂量，12 月 30 日入院检查全血细胞数无异常。临床药师采用诺氏（Naranjo）评估量表<sup>[15]</sup>进行因果关系评价，患儿的该不良反应与利奈唑胺相关性评分 7 分（很可能），具体评分见表 1。患儿初次利奈唑胺治疗

剂量（0.5 g po bid）低于该患儿正常推荐剂量（10 mg·kg<sup>-1</sup> tid），同时低于成人一日剂量（1.2 g）而发生全血细胞减少，临床药师疑似由利奈唑胺与克拉霉素相互作用致其浓度过高引起，根据药物相互作用可能量表评分为 6 分（可能），具体见表 2<sup>[16]</sup>。患儿利奈唑胺减剂量为 0.4 g po bid 入院后查利奈唑胺血药浓度仍过高，再次验证临床药师的猜想，该患儿可能发生利奈唑胺和克拉霉素之间的相互作用。大环内酯类是 P-糖蛋白（P-gp）的有效抑制剂<sup>[17]</sup>，其中克拉霉素和罗红霉素对 P-gp 抑制作用最强<sup>[18]</sup>。利奈唑胺和克拉霉素之间相互作用被认为是由 P-gp 介导。利福平是明确的 P-gp 和细胞色素 P450 酶的诱导剂，可降低危重患者的利奈唑胺血清水平，推测克拉霉素也是通过影响 P-糖蛋白，抑制 P-糖蛋白外排泵，导致利奈唑胺浓度升高，具体作用机制尚不明确需要进一步的研究证实<sup>[12]</sup>。

表 1 利奈唑胺致患儿全血细胞减少的 Naranjo 评估量表

序号	相关问题	分值			得分
		是	否	未知	
1	以前是否有类似的报道	+1	0	0	+1
2	ADR 是否在使用可疑药物后发生的	+2	-1	0	+2
3	ADR 是否在停用或应用拮抗剂后得到缓解	+1	0	0	0
4	ADR 是否在再次使用可疑药物后重复出现	+2	-1	0	0
5	是否存在其他原因引起该 ADR	-1	+2	0	+2
6	该 ADR 是否在应用安慰剂后重复出现	-1	+1	0	0
7	药物在血液或其他体液中是否达到毒性浓度	+1	0	0	0
8	随剂量增加（或减少）ADR 是否加重（或减轻）	+1	0	0	+1
9	患者是否曾暴露于该药或同类药物出现类似反应	+1	0	0	0
10	是否存在任何客观证据证实该反应	+1	0	0	+1

注：总分 ≥ 9 肯定；5 ~ 8 很可能；1 ~ 4 可能；≤ 0 可疑。

表 2 利奈唑胺与克拉霉素药物相互作用可能性量表

序号	问题	是	否	不明	评分
1	关于该药物相互作用，既往是否有可信的临床报道？	+1	-1	0	+1
2	该药物相互作用是否与“促变药”的药效学或药动学性质相关？	+1	-1	0	+1
3	该药物相互作用是否与“受变药”的药效学或药动学性质相关？	+1	-1	0	+1
4	该药物相互作用发生的时间是否与两药使用的时程相符？	+1	-1	0	+1
5	该药物相互作用是否在“促变药”停用后减轻？（如未停用“促变药”，请选择“不明”，并跳过第 6 题）	+1	-2	0	0
6	再次给予“促变药”后，该药物相互作用是否发生？	+2	-1	0	0
7	是否有其他因素 <sup>a</sup> ，也可以引起该药物相互作用？	-1	+1	0	0
8	“受变药”血（或其他体液）药浓度变化是否与该相互作用的预期反应一致？	+1	0	0	0
9	是否有其他客观事实（除第八题的药物浓度外）证明该药物相互作用？	+1	0	0	+1
10	该药物相互作用是否与“促变药”的剂量成正比？药物相互作用可能性： 极可能 □（> 8 分）；可能 □（5 ~ 8 分）；稍有可能 □（2 ~ 4 分）；可疑 □（< 2 分）	+1	-1	0	+1

注：a. 指疾病状况、其他起作用药物、患者依从性差、危险因子（如年龄、“受变药”用法用量不正确等）。

克拉霉素与利奈唑胺对于耐多药结核分枝杆菌均为敏感药物，两药联合可能使利奈唑胺暴露

增加，因此需要监测利奈唑胺血药浓度，如发现浓度过高则需减少剂量，以降低治疗成本和不良

事件<sup>[19]</sup>。通过对更多人群和更长时间的克拉霉素和利奈唑胺联合用药进行研究评估,考虑克拉霉素可以用作利奈唑胺的增强剂,相对便宜的克拉霉素可以减少昂贵的利奈唑胺的剂量,同时保持相同的暴露量,从而保持疗效,降低成本;但由于患者间个体差异很大,需要监测利奈唑胺血药浓度<sup>[12]</sup>。

### 3 小结

NTM 的治疗常需要多药联合且治疗疗程较长,NTM 对克拉霉素和利奈唑胺敏感性高,且有方便服用的口服剂型,在治疗方案中占据重要地位。在国内尚未报道过克拉霉素增加利奈唑胺血药浓度的病例。临床药师通过此例相互作用,提醒临床医师在使用利奈唑胺联合克拉霉素抗分枝杆菌治疗时,应关注两药可能的相互作用,尽可能避免利奈唑胺严重血液系统不良反应的发生,有条件的应该监测利奈唑胺血药浓度并调整剂量使其处于合适范围(2~7 mg·mL<sup>-1</sup>),并可以利用其潜在的相互作用减少利奈唑胺的用量,降低患者的治疗成本。临床药师参与患者治疗过程时需要提高警惕,及时发现药物不良反应并寻找原因,不可忽视罕见的药物相互作用。同时期待更多的研究探讨克拉霉素和利奈唑胺之间的相互作用机制,给临床治疗提供合适的药物剂量方案。

### 参考文献

- [1] Liu CF, Song YM, He WC, et al. Nontuberculous mycobacteria in China: incidence and antimicrobial resistance spectrum from a nationwide survey [J]. *Infect Dis Poverty*, 2021, 10 (1): 59.
- [2] 中华医学会结核病学分会. 非结核分枝杆菌病诊断与治疗指南(2020年版)[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2020, 43 (11): 918-946.
- [3] Thiriot H, Briquet C, Fripiat F, et al. Clinical use and adverse drug reactions of linezolid: a retrospective study in four Belgian hospital centers [J]. *Antibiotics (Basel)*, 2021, 10 (5): 10 (5): 530.
- [4] 叶雪梅, 陈裕. 利奈唑胺血药浓度与血液毒性相关性的回顾性分析[J]. *药物流行病学杂志*, 2020, 29 (6): 391-394.
- [5] 白雪梅, 张峻, 何瑾. 利奈唑胺血药浓度监测研究进展[J]. *中国现代应用药学*, 2022, 39 (3): 424-428.
- [6] 曹伟, 卢志品, 余剑华. 利奈唑胺是否需要血药浓度监测[J]. *中国新药与临床杂志*, 2016, 35 (10): 690-694.
- [7] Zhou L, Xu D, Liu HC, et al. Trends in the prevalence and antibiotic resistance of non-tuberculous *Mycobacteria* in Mainland China, 2000—2019: systematic review and meta-analysis [J]. *Front Public Health*, 2020, 8: 295.
- [8] Guo Q, Wei JH, Zou WD, et al. Antimicrobial susceptibility profiles of *Mycobacterium abscessus* complex isolates from respiratory specimens in Shanghai, China [J]. *J Glob Antimicrob Resist*, 2021, 25: 72-76.
- [9] Daley CL, Iaccarino JM, Lange C, et al. Treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: an official ATS/ERS/ESCMID/IDSA clinical practice guideline [J]. *Eur Respir J*, 2020, 56 (1).
- [10] Fujiwara K, Uesugi F, Furuuchi K, et al. Minimum inhibitory concentrations before and after antibacterial treatment in patients with *Mycobacterium abscessus* pulmonary disease [J]. *Microbiol Spectr*, 2021, 9 (3): e192821.
- [11] Jungbluth GL, Welshman IR, Hopkins NK. Linezolid pharmacokinetics in pediatric patients: an overview [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2003, 22 (9 Suppl): S153-S157.
- [12] Bolhuis MS, van Altena R, van Soolingen D, et al. Clarithromycin increases linezolid exposure in multidrug-resistant tuberculosis patients [J]. *Eur Respir J*, 2013, 42 (6): 1614-1621.
- [13] Bolhuis MS, van Altena R, Uges DR, et al. Clarithromycin significantly increases linezolid serum concentrations [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54 (12): 5418-5419.
- [14] Parize P, Hamelin A, Veziris N, et al. Induction therapy with linezolid/clarithromycin combination for *Mycobacterium chelonae* skin infections in immunocompromised hosts [J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2016, 30 (1): 101-105.
- [15] Naranjo CA, Busto U, Sellers EM, et al. A method for estimating the probability of adverse drug reaction [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1981, 30 (2): 239-245.
- [16] 潘莹, 魏雪, 刘韬, 等. 基于药物相互作用可能性量表客观评价临床药物相互作用[J]. *今日药学*, 2012, 22 (3): 148-150.
- [17] Eberl S, Renner B, Neubert A, et al. Role of p-glycoprotein inhibition for drug interactions: evidence from in vitro and pharmacoepidemiological studies [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2007, 46 (12): 1039-1049.
- [18] Hughes J, Crowe A. Inhibition of P-glycoprotein-mediated efflux of digoxin and its metabolites by macrolide antibiotics [J]. *J Pharmacol Sci*, 2010, 113 (4): 315-324.
- [19] Bolhuis MS, van der Laan T, Kosterink JG, et al. In vitro synergy between linezolid and clarithromycin against *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Eur Respir J*, 2014, 44 (3): 808-811.

(收稿日期: 2023-10-05; 修回日期: 2023-12-20)

# 个体化预测急性脑梗死患者阿替普酶溶栓出血风险的 Nomgram 模型的初步建立及验证

庞天义, 满德强, 常群 (临泉县人民医院, 安徽 阜阳 236400)

**摘要:** **目的** 分析急性脑梗死患者阿替普酶溶栓出血的危险因素并建立相应的 Nomgram 风险预测模型。**方法** 回顾性分析 2020 年 1 月至 2022 年 1 月于我院就诊采用阿替普酶静脉溶栓治疗的 108 例急性脑梗死患者作为研究对象, 收集患者的临床资料, 将患者的年龄、性别、高血压、高血脂、基线血糖水平、基线 NIHSS 评分以及吸烟、饮酒史等因素与溶栓后是否发生出血不良反应进行单因素分析, 随后建立 Logistic 回归模型筛选患者溶栓后发生出血的独立危险因素, 根据筛选出的独立危险因素建立 Nomgram 风险预测模型, 并对该模型进行内部验证。**结果** 溶栓后共 40 例患者发生出血, 其中高龄 ( $OR = 2.083, 95\%CI: 1.216 \sim 2.950$ )、高血压 ( $OR = 4.402, 95\%CI: 2.001 \sim 9.652$ )、高基线 NIHSS 评分 ( $OR = 1.615, 95\%CI: 1.150 \sim 2.080$ )、高基线血糖水平 ( $OR = 2.561, 95\%CI: 1.440 \sim 4.517$ ) 为溶栓后发生出血的独立危险因素, 根据筛选出的独立危险因素, 构建个体化预测急性脑梗死患者阿替普酶溶栓出血风险的 Nomgram 模型, 该模型的 C-index 指数为 0.738, 表明模型具有较好的区分度, 对该模型进行验证后发现预测值和观察值基本一致, 表明该预测模型具有良好的一致性。**结论** 本研究通过筛选出急性脑梗死患者采用阿替普酶静脉溶栓治疗后发生出血的独立危险因素建立了能够预测出血不良反应发生风险的 Nomgram 模型, 此风险预测模型区分度及一致性良好, 对快速甄别急性脑梗死患者阿替普酶溶栓出血的高风险人群, 针对相关危险因素及早采取有效的应对措施有着较为重要的指导意义。

**关键词:** 急性脑梗死; 阿替普酶; 静脉溶栓; 危险因素; Nomgram 模型

中图分类号: R563.1, R743.3 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2024)08-2225-05  
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.044

## Preliminary establishment and verification of Nomgram model for individualized prediction of the risk of bleeding in patients with acute cerebral infarction and thrombolysis with alteplase

PANG Tian-yi, MAN De-qiang, CHANG Qun (People's Hospital of Linquan County, Fuyang Anhui 236400)

**Abstract: Objective** To analyze the risk factors of bleeding in patients with acute cerebral infarction and thrombolysis with alteplase and to establish corresponding Nomgram risk prediction model. **Methods** Totally 108 patients with acute cerebral infarction treated with intravenous thrombolysis of alteplase in our hospital from January 2020 to January 2022 were retrospectively analyzed. The clinical data of the patients were collected. Univariate analysis was performed on age, gender, hypertension, hyperlipidemia, baseline of blood glucose, baseline of NIHSS score, smoking history, drinking history etc and whether there were adverse reactions of bleeding after the thrombolysis. Subsequently, Logistic regression model was established to screen the independent risk factors for bleeding after the thrombolysis. Finally, Nomgram risk prediction model was established based on the screened independent risk factors, and the model was verified internally. **Results** Bleeding occurred in 40 patients after the thrombolysis, old age ( $OR = 2.083, 95\%CI: 1.216 \sim 2.950$ ), hypertension ( $OR = 4.402, 95\%CI: 2.001 \sim 9.652$ ), high baseline of NIHSS score ( $OR = 1.615, 95\%CI: 1.150 \sim 2.080$ ), and high baseline of blood glucose level

作者简介: 庞天义, 男, 副主任药师, 主要从事医院药学、医院药事管理等工作, email: 578918105@qq.com



( $OR = 2.561$ ,  $95\%CI: 1.440 \sim 4.517$ ) were independent risk factors of bleeding after the thrombolysis. According to the four independent risk factors screened, a Nomgram model for individualized prediction of the risk of bleeding in patients with acute cerebral infarction and thrombolysis with alteplase was established. The C-index of the model was 0.738, indicating that the Nomgram model had a good discrimination. After verification of the model, the predicted value and the observed value were basically consistent, showing a good consistency of the prediction model. **Conclusion** The independent risk factors for bleeding in patients with acute cerebral infarction and thrombolysis with alteplase were screened out to establish a Nomgram model that predicts the risk of adverse reactions of bleeding. This prediction model has good discrimination and consistency, which has important guiding significance for rapid screening of the high-risk population of bleeding in patients with acute cerebral infarction and thrombolysis with alteplase and taking effective measures against possible risk factors.

**Key words:** acute cerebral infarction; alteplase; intravenous thrombolysis; risk factor; Nomgram model

急性脑梗死 (acute cerebral infarction, ACI) 是指供应脑部动脉血管的血流急性中断后导致的神经细胞变性、坏死, 是神经内科较为常见的疾病。随着社会老龄化进程加速, 此疾病的发病、致残及致死率都在逐年增高, 严重影响了人们的身心健康并且加重了患者的经济负担<sup>[1-2]</sup>。目前临床上使用阿替普酶进行静脉溶栓为公认治疗 ACI 最有效的方法之一, 且国内外相关诊疗指南推荐, 在患者起病至 4.5 h 内使用阿替普酶静脉溶栓为 ACI 首选治疗方案<sup>[3-4]</sup>, 然而 ACI 患者采用阿替普酶溶栓治疗将面临着发生出血不良反应的风险, 如颅内出血、消化道出血及皮肤黏膜出血, 目前阿替普酶静脉溶栓患者发生出血风险的危险因素有待进一步探究<sup>[5-6]</sup>。因此本研究回顾性分析了本院 2020 年 1 月至 2022 年 1 月期间接受阿替普酶静脉溶栓治疗的 108 例 ACI 患者, 探究导致出血不良反应的危险因素并据此建立相应的 Nomgram 风险预测模型, 以期在治疗过程中通过风险预测以及早防治出血不良反应, 为阿替普酶的临床合理应用提供一定的参考。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

回顾性选取 2020 年 1 月至 2022 年 1 月于本院神经内科就诊并接受阿替普酶静脉溶栓治疗的 ACI 患者 108 例, 其中男性 68 例, 女性 40 例, 年龄分布为 33 ~ 91 岁, 平均年龄 (70.55 ± 37.55) 岁。纳入标准: ① 患者年龄 > 18 岁; ② 符合中华医学会制定的《急性缺血性脑卒中诊治指南》中的相关诊断标准, 确诊为 ACI; ③ 发病时间 ≤ 4.5 h。排除标准: ① 发病时间 > 4.5 h; ② 急性出血倾向, 服用抗凝剂致凝血功能异常; ③ 近 3 个月发生脑卒中或颅脑创伤, 有颅内出血病史者; ④ 近 3 周发生泌尿、消化系统出血或接受大型外科手术, 活动性内脏出血者; ⑤ 病历资料不全者。整理并记录的患者的性别、年龄、心脑血管疾病史、长期服用抗血小

板和 / 或抗凝药物史、血糖、血压、血脂指标, 发病至接受阿替普酶静脉溶栓治疗时间, 吸烟、饮酒、基线美国国立卫生研究所卒中量表 (National Institutes of Health Stroke Scale, NIHSS) 评分<sup>[7]</sup>、基线血糖水平、血同型半胱氨酸水平, 进而分析这些因素与阿替普酶静脉溶栓出血不良反应的相关性。

### 1.2 治疗方法

所纳入患者均采用注射用阿替普酶 (勃林格殷格翰, 50 mg) 进行静脉溶栓治疗, 给药剂量为  $0.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 给药总量 < 90 mg。具体方法: 开始将总量的 10% 于 1 min 内静脉推注完, 然后将剩余的 90% 于 60 min 内静脉泵入。患者在溶栓治疗 24 h 后复查 CT 证实无颅内出血后给予患者降纤维蛋白原、神经保护、抗血小板以及相应的对症治疗。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 25.0 统计软件对数据进行分析, 计数资料以百分比表示, 采用  $\chi^2$  检验或 Fisher 确切概率法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。多因素 Logistic 回归模型用于筛选影响结局事件的独立影响因素; 采用 R (R3.6.1) 软件包, 加载并应用 rms 程序包建立 Nomgram 风险预测模型; 加载 caret 程序包, 使用 Bootstrap 法对所建立的模型进行内部验证, 采用 Harrell's C statistic 计算一致性指数 (C-index)。受试者操作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线通过加载 rms 程序包, 采用 ROCR 绘制。

## 2 结果

### 2.1 溶栓后出血不良反应发生情况及单因素分析

本研究所纳入的 108 例 ACI 患者在使用阿替普酶静脉溶栓治疗期间, 总计 40 例发生了出血不良反应, 出血并发症的发生率为 37.04%。其中发生最多的为牙龈出血 (20 例, 18.52%), 其次为颅内出血 (7 例, 6.48%)、口腔出血 (6 例, 5.56%)、鼻腔内出血 (5 例, 4.63%)、舌尖

或舌黏膜出血（5 例，4.63%）以及痰中带血（1 例，0.93%）。部分患者发生多部位出血，如同时发生颅内出血、牙龈出血和口腔或舌黏膜出血等，出血不良反应发生时间在静脉溶栓开始后 25 ~ 1440 min。单因素分析结果显示：患者的年龄、高血压、基线 NIHSS 评分、基线血糖水平、服用抗血小板和 / 或抗凝药物史为导致 ACI 患者发生出血不良反应的影响因素，详见表 1。

表 1 108 例 ACI 患者临床资料的单因素分析  
Tab 1 Univariate analysis of clinical data of 108 patients with ACI

因素	未出血 (n)	出血 (n)	$\chi^2$ 值	P 值	
年龄	< 80 岁	35	12	4.723	0.030
	> 80 岁	33	28		
性别	男	47	21	2.982	0.084
	女	21	19		
高血压	是	36	32	7.908	0.005
	否	32	8		
高血糖	是	46	31	1.195	0.274
	否	22	9		
高脂血症	是	37	23	0.097	0.755
	否	31	17		
吸烟	是	22	7	2.829	0.093
	否	46	33		
饮酒	是	11	6	0.026	0.871
	否	57	34		
基线 NIHSS 评分	≤ 4 分	25	6	6.162	0.046
	5 ~ 20 分	20	18		
	> 20 分	23	16		
基线血糖水平	< 10 mmol · L <sup>-1</sup>	35	11	5.918	0.015
	≥ 10 mmol · L <sup>-1</sup>	33	29		
发病至溶栓治疗 时间	≤ 3 h	32	26	0.405	0.524
	> 3 h	36	14		
既往脑卒中史	是	26	20	1.426	0.232
	否	42	20		
房颤	是	15	12	0.847	0.357
	否	53	28		
服用抗血小板和 / 或抗凝药物史	是	11	15	4.431	0.035
	否	57	25		
高同型半胱氨酸血 症	是	35	25	1.241	0.265
	否	33	15		

2.2 发生出血不良反应的多因素 Logistic 回归分析  
将患者接受治疗期间否发生出血不良反应作为因变量，前述单因素分析结果中  $P < 0.05$  的因素作为自变量，构建多因素 Logistic 回归模型，即对患者的年龄、高血压、基线 NIHSS 评分、基线血糖水平、服用抗血小板和 / 或抗凝药物史这五项影响因素作回归分析，结果筛选出患者的年龄、高血压、基线 NIHSS 评分、基线血糖水平为导致 ACI 患者发生出血不良反应的独立影响因素，详见表 2。

表 2 多因素 Logistic 回归分析结果

因素	$\beta$ 值	Wald 值	P 值	OR 值	95%CI
年龄	0.734	7.148	< 0.001	2.083	1.216 ~ 2.950
高血压	1.480	13.654	< 0.001	4.402	2.001 ~ 9.652
基线血糖水平	0.942	5.858	< 0.001	2.561	1.440 ~ 4.517
基线 NIHSS 评分	0.480	7.668	0.006	1.615	1.150 ~ 2.080

2.3 个体化预测 ACI 患者溶栓出血风险的 Nomgram 模型的初步建立及评估

本项研究基于年龄、高血压、基线 NIHSS 评分、基线血糖水平是阿替普酶静脉溶栓治疗发生出血不良反应的独立影响因素，初步构建了能够个体化预测 ACI 患者溶栓出血风险的 Nomgram 模型。从该模型直观可见随着独立影响因素相对应评分的增加，模型的总得分升高，患者发生出血不良反应的风险上升（见图 1）。采用 Bootstrap 自抽样法对该模型进行内部验证，重复 Bootstrap 自抽样及验证过程 1000 次，获得并导出校准曲线（见图 2），由校准曲线图可见该 Nomgram 模型预测 ACI 患者发生溶栓出血风险的观察值和预测值具有较好的一致性。应用 ROC 曲线分析该 Nomgram 模型预测 ACI 患者溶栓发生出血风险的效率，一致性指数（C-index）为 0.738（95%CI: 0.701 ~ 0.775），表明该 Nomgram 模型区分度良好，详见图 3。

### 3 讨论

阿替普酶是一种靶向纤维蛋白的特异性血栓溶解药，其分子结构中的赖氨酸残基可结合纤维蛋白，并通过活化与纤维蛋白结合的纤溶酶原，使其转变为纤溶酶，进而产生较强的溶栓作用<sup>[8-9]</sup>。临床实践表明阿替普酶可较好地溶解血栓，对急性缺血性脑卒中、深静脉血栓及其他血管疾病有良好的治疗效果，虽然该药物引起的出血不良反应弱于链激酶，但临床上仍然存在出血风险。出血为阿替普酶静脉溶栓治疗时最常见，也是最值得警惕的不良反应，其中颅内出血最为严重，其也正是限制阿替普酶临床应用的主要因素，而其他部位出血如牙龈、黏膜出血等也是对患者可能出现颅内出血的早期预警，因此探究应用该药物后可能导致颅内及其他部位出血的独立影响因素就有较为重要的临床意义<sup>[10-12]</sup>。研究显示阿替普酶溶栓治疗后颅内出血发生率为 4.7% ~ 11.4%<sup>[13]</sup>，本研究结果显示，108 例 ACI 患者溶栓治疗期间共 40 例发生了出血不良反应，其中颅内出血 7 例，发生率为 6.48%；而最为常见的出血部位为牙龈出血，发生率为 18.52%（20/108），与相关报道接近<sup>[14]</sup>，这可能与牙龈本身的生物结构以及部分患者可能存在牙周疾病有

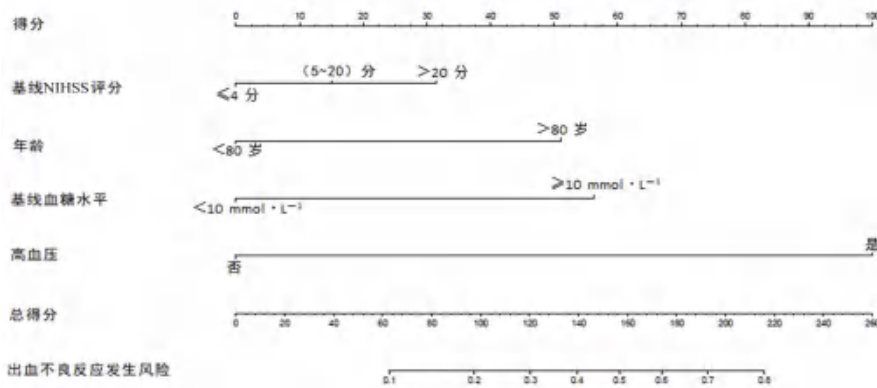


图1 个体化预测 ACI 患者阿替普酶溶栓出血风险的 Nomgram 模型

Fig 1 Nomgram model for individualized prediction of the risk of alteplase thrombolysis bleeding in patients with ACI

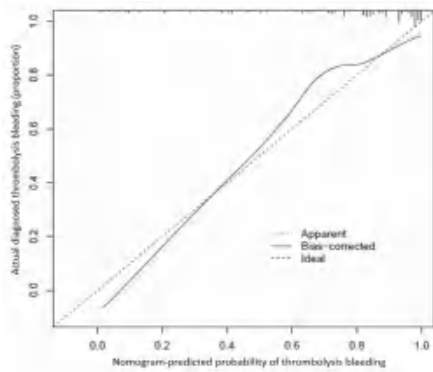


图2 Nomgram 模型预测 ACI 患者阿替普酶溶栓出血风险的内部验证  
Fig 2 Internal validation of Nomgram model predicting the risk of alteplase thrombolysis bleeding in patients with ACI

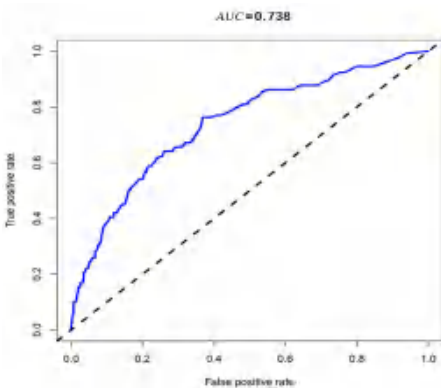


图3 Nomgram 模型预测 ACI 患者阿替普酶溶栓出血风险的 ROC 曲线  
Fig 3 ROC curve of Nomgram model predicting the risk of alteplase thrombolysis bleeding in patients with ACI

关,但相关病历资料并未明确指出,因此仍需进一步观察明确。所有出血不良反应均在静脉溶栓开始后 25 ~ 1440 min 内陆续发生。

本研究通过 Logistic 多因素回归分析筛选出高龄、高血压、高基线 NIHSS 评分、高基线血糖水平为 ACI 患者采用阿替普酶静脉溶栓治疗发生出血不良反应的独立危险因素。高龄被认为是溶栓治疗后发生出血并发症,尤其是颅内出血的独

立危险因素。有研究发现老年患者的年龄每增加 10 岁,溶栓治疗后颅内出血的风险升高 1.3 倍,若年龄超过 75 岁则风险升高至 1.6 倍<sup>[15]</sup>,但考量到风险/收益比,最新的指南仍将年龄大于 80 岁作为相对禁忌证。本研究发现 ACI 患者年龄大于 80 岁是导致阿替普酶溶栓治疗发生出血不良反应的一项独立危险因素,这可能与高龄老人出现脑白质疏松及脑淀粉样血管病等有关<sup>[16]</sup>,因此对于高龄患者选用阿替普酶进行溶栓治疗仍应谨慎。高血压本身就是导致 ACI 发生的一个重要危险因素,ACI 患者的部分动脉血管壁已发生变性,甚至坏死,对血压升高的承受能力显著下降;此外,长期的高血压能够引发血小板过度活化,加重血管内皮细胞的氧化应激损伤,同时可对已存在变性,甚至坏死的动脉管壁施加更大的压力,导致出血并发症更容易发生<sup>[17-18]</sup>。本研究也证实,高血压是导致阿替普酶溶栓治疗发生出血不良反应的独立危险因素,且相关性很高,这也提示了实施溶栓前良好的血压控制是治疗安全有效的重要保障。脑梗死患者合并高血糖在临床中较为常见,相关研究表明,高血糖与阿替普酶溶栓后发生颅内出血并发症相关,患者血糖水平每升高 1 mmol · L<sup>-1</sup>,颅内出血发生率增加 7%,且症状性颅内出血更容易出现<sup>[19]</sup>。其可能的机制为高血糖可导致血脑屏障内基质金属蛋白酶(MMPs)表达增加,下调对维持血脑屏障具有重要作用的蛋白质表达,同时促进乳酸累积,对基底膜造成一定程度的破坏,改变血脑屏障的通透性,加重缺血再灌注损伤,进而使出血风险增加<sup>[20]</sup>。本研究同样也发现,高基线血糖水平是导致阿替普酶溶栓治疗发生出血不良反应的一项独立危险因素。较高的 NIHSS 评分是已被证实的 ACI 患者溶栓治疗后发生颅内出血并发症的重要危险因素。有研究表明对于基线 NIHSS 评分 > 20 分的患者,溶栓治疗后发生症状性颅内出血的概率是



低于 5 分者的 11 倍<sup>[21]</sup>。其可能的机制为 NIHSS 评分反映神经功能缺损程度，神经功能缺损程度高往往提示存在大面积脑梗死及严重的脑水肿，血管受到压迫发生缺血，血管壁受到破坏，通透性发生改变，此外，侧支循环也难以建立，从而使得缺血再灌注后发生出血并发症的风险显著升高<sup>[22]</sup>。本研究结果也提示高 NIHSS 评分是导致阿替普酶溶栓治疗发生出血不良反应的独立危险因素。

本研究建立了个体化预测 ACI 患者阿替普酶溶栓出血风险的 Nomgram 模型，并对该模型采用 Bootstrap 自抽样法进行内部验证，结果显示该模型预测 ACI 患者阿替普酶溶栓出血风险具有良好的-一致性；采用 ROC 曲线及计算得出该 Nomgram 模型的 C-index 为 0.738，说明该模型具有较好的区分度。但本项研究因目前有效样本量有限，仅对所建立的 Nomgram 模型采用了基于自抽样法的内部验证，未能通过外部验证来进一步考察该 Nomgram 模型临床应用的可行性，因此未来需要获取更多的外部数据来验证及修正该模型。

综上所述，本项研究基于 ACI 患者的年龄、高血压、基线 NIHSS 评分、基线血糖水平这四项独立影响因素建立了个体化预测 ACI 患者阿替普酶溶栓出血风险的 Nomgram 模型，该模型不仅能够临床工作者直观地判断导致阿替普酶溶栓出血不良反应的各影响因素的不同权重，且具有较好的区分度与一致性，对快速甄别 ACI 患者阿替普酶静脉溶栓发生出血不良反应的高风险人群，提前制订相应的防治对策具有一定的指导意义，因此具有较高的临床应用价值。

### 参考文献

[1] 刘广玉, 刘晓枫. 老年急性脑梗死患者急诊溶栓后神经功能恶化的影响因素[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41 (12): 2487-2490.

[2] Huang P, XY He, Xu M. Effect of argatroban injection on clinical efficacy in patients with acute cerebral infarction: preliminary findings[J]. Eur Neurol, 2021, 84 (1): 38-42.

[3] Harris D, Hall C, Lobay K, et al. Canadian association of emergency physicians position statement on acute ischemic stroke[J]. CJEM, 2015, 17 (2): 217-226.

[4] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018[J]. 中华神经科杂志, 2018, 51 (9): 666-682.

[5] 董京. 急性脑梗死患者阿替普酶静脉溶栓的临床疗效及安全性分析[J]. 中国药物与临床, 2021, 21 (9): 1512-1514.

[6] 李金朋. 阿替普酶静脉溶栓治疗出血转化影响因素分析[J]. 山西医药杂志, 2021, 50 (12): 1936-1938.

[7] Bhardwaj A, Sharma G, Raina SK, et al. Advanced age and higher national institutes of health stroke scale score as predictors of poor outcome in ischemic stroke patients treated with alteplase: a study from a tertiary care centre in rural north-west India[J]. J Neurosci Rural Pract, 2017, 8 (2): 236-240.

[8] 王永平, 郭岩, 林亚楠, 等. 低剂量阿替普酶溶栓治疗急性缺血性脑卒中研究进展[J]. 大连医科大学学报, 2021, 43 (4): 359-363.

[9] 哈玲梅, 杨丽荣, 张赛, 等. 疏通灌注注射液联合阿替普酶治疗急性缺血性脑卒中的效果及对血液流变学的影响[J]. 中国医药, 2020, 15 (3): 378-382.

[10] 吕洋, 高思山, 滕继军. 高龄急性缺血性脑卒中阿替普酶静脉溶栓后出血转化的危险因素研究进展[J]. 中国医师杂志, 2021, 23 (4): 637-640.

[11] 欧会清, 邱金雨, 韩瑶瑶, 等. 阿替普酶溶栓后发生颅内出血的相关因素研究[J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40 (4): 397-400, 405.

[12] 陈念, 王平平, 吴杨, 等. 急性脑梗死 r-tPA 静脉溶栓所致颅内和非颅内出血事件研究[J]. 河北医药, 2013, 35 (14): 2153-2154.

[13] Emberson J, Lees KR, Lyden P, et al. Effect of treatment delay, age, and stroke severity on the effects of intravenous thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from randomised trials[J]. Lancet, 2014, 384 (9958): 1929-1935.

[14] 常红, 许亚红, 陈琳. 急性脑梗死阿替普酶静脉溶栓后出血时间特征分析及护理[J]. 护理研究, 2016, 30 (12): 1520-1522.

[15] Bhatnagar P, Sinha D, Parker RA, et al. Intravenous thrombolysis in acute ischaemic stroke: a systematic review and meta-analysis to aid decision making in patients over 80 years of age[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2011, 82 (7): 712-717.

[16] 侯红玲, 张新江, 陶丽红, 等. 轻型脑梗死溶栓后出血的危险因素及小剂量阿替普酶治疗效果分析[J]. 中国医师杂志, 2019, 21 (8): 1173-1176, 1180.

[17] 魏衡, 贾复敏, 尹虹祥, 等. 血压变异性与缺血性卒中静脉溶栓后发生症状性颅内出血的相关性研究[J]. 中国动脉硬化杂志, 2019, 27 (2): 156-160.

[18] Woloszynska I, Stepień A. Risk factors of rt-PA therapy in patients with ischemic stroke[J]. Acta Pol Pharm, 2017, 74 (1): 293-298.

[19] Ergul A, Li W, Elgebaly MM, et al. Hyperglycemia, diabetes and stroke: focus on the cerebrovasculature[J]. Vascular Pharmacol, 2009, 51 (1): 44-49.

[20] 石宝洋, 靳航, 杨弋. 急性缺血性脑卒中阿替普酶静脉溶栓相关并发症的临床研究进展[J]. 中风与神经疾病杂志, 2018, 35 (3): 275-278.

[21] The NINDS t-PA Stroke Study Group. Intracerebral hemorrhage after intravenous t-PA therapy for ischemic stroke[J]. Stroke, 1997, 28 (11): 2109-2118.

[22] 贾丽娜, 张海珍, 白爱香. 基于 NIHSS 评分的分组护理对脑出血患者术后神经康复和生活质量的影响[J]. 贵州医药, 2019, 43 (10): 1667-1669.

(收稿日期: 2023-11-05; 修回日期: 2024-02-05)

# 利培酮联合阿立哌唑对男性精神分裂症患者 内分泌激素水平的影响

张燕<sup>1</sup>, 王国元<sup>2</sup>, 郭影影<sup>2\*</sup> (1.上海市奉贤区精神卫生中心, 上海 201418; 2.上海市宝山区精神卫生中心, 上海 201900)

**摘要:** **目的** 探讨利培酮与阿立哌唑联用对男性精神分裂症患者内分泌激素水平的影响。**方法** 将 107 例男性精神分裂症患者根据用药方案分为对照组 (54 例, 单一利培酮) 和观察组 (53 例, 口服利培酮联合阿立哌唑), 治疗前及治疗 8 周后分别检测两组患者血清中游离三碘甲状腺原氨酸 (FT<sub>3</sub>)、游离甲状腺素 (FT<sub>4</sub>)、三碘甲状腺原氨酸 (T<sub>3</sub>)、甲状腺素 (T<sub>4</sub>)、促甲状腺激素 (TSH) 和泌乳素 (PRL) 浓度, 计算不良反应发生率, 并进行相关统计学分析。**结果** 治疗 8 周后, 对照组 TSH 水平较治疗前明显升高 ( $P < 0.05$ ), 且较观察组治疗后 TSH 水平明显升高 ( $P < 0.05$ ), 但观察组 TSH 水平与治疗前无明显差异, 两组 FT<sub>3</sub>、FT<sub>4</sub>、T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub> 均较治疗前无明显差异, 且组间亦无明显差异; 两组 PRL 水平均较治疗前明显升高 ( $P < 0.05$ ), 对照组血清 PRL 升高水平显著高于观察组 ( $P < 0.05$ )。两组不良反应发生率无明显差异。**结论** 在利培酮治疗基础上联用阿立哌唑有助于抑制利培酮引起的 PRL 升高, 可能减低其对甲状腺功能的影响, 且未观察到不良反应的增加, 有重要的临床联用价值。

**关键词:** 利培酮; 阿立哌唑; 精神分裂症; 甲状腺激素; 泌乳素

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)08-2230-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.045

## Effect of risperidone combined with aripiprazole on the endocrine hormone levels in male patients with schizophrenia

ZHANG Yan<sup>1</sup>, WANG Guo-yuan<sup>2</sup>, GUO Ying-ying<sup>2\*</sup> (1. Fengxian District Mental Health Center, Shanghai 201418; 2. Baoshan District Mental Health Center, Shanghai 201900)

**Abstract: Objective** To determine the effect of combination of risperidone and aripiprazole on the endocrine hormone levels in male patients with schizophrenia. **Methods** Totally 107 male patients with schizophrenia were divided into a control group (54 patients, taking oral risperidone) and an observation group (53 patients, taking oral risperidone and aripiprazole) according to the treatment plan. Before the treatment and 8 weeks after the treatment, the serum levels of free triiodothyronine (FT<sub>3</sub>), free thyroxine (FT<sub>4</sub>), triiodothyronine (T<sub>3</sub>), thyroxine (T<sub>4</sub>), thyroid stimulating hormone (TSH) and prolactin (PRL) in both groups were measured. The incidence of adverse reactions was calculated, and statistical analysis conducted. **Results** After 8 weeks of treatment, the level of TSH in the control group was higher than that before the treatment ( $P < 0.05$ ), and also higher than that in the observation group after the treatment ( $P < 0.05$ ). No significant difference was found before and after the treatment in the observation group. There were no obvious difference in the levels of FT<sub>3</sub>, FT<sub>4</sub>, T<sub>3</sub>, and T<sub>4</sub> in both groups before the treatment, and no significant difference between the groups. The level of PRL in both groups was higher than that before the treatment ( $P < 0.05$ ), but the level in the control group was much higher than that in the observation group ( $P < 0.05$ ). There was no obvious difference in the incidence of adverse reactions between both groups. **Conclusion** Combination of

作者简介: 张燕, 女, 主管技师, 主要从事精神分裂症的诊断标志物研究, email: 469624022@qq.com \*通信作者: 郭影影, 女, 主管技师, 主要从事精神障碍的临床检验及生物标志物研究, email: guoyyjw@163.com

aripiprazole and risperidone can help suppress the elevation of PRL caused by risperidone and may reduce its impact on the thyroid function, without increasing adverse reactions.

**Key words:** risperidone; aripiprazole; schizophrenia; thyroid hormone; prolactin

精神分裂症病因尚未完全阐明,主要表现为行为、思维和情感等多方面的异常<sup>[1]</sup>,是精神障碍中较为复杂严重的一种类型<sup>[1-2]</sup>。利培酮<sup>[3]</sup>和阿立哌唑<sup>[4]</sup>均为非典型抗精神病药物,在临床上日益受到青睐,然而用药后的不良反应尚不明确,尤其对机体内分泌激素水平的影响研究相对较少<sup>[5]</sup>。考虑到男性较少受生理周期影响,本研究以男性精神分裂症患者为对象,进行不同用药方案的分析比较,探索利培酮联合阿立哌唑对男性精神分裂症患者内分泌激素水平及不良反应的影响,为精神分裂症的安全合理用药奠定理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象

本研究纳入 2021 年 6 月至 2023 年 10 月上海市奉贤区精神卫生中心收治的男性精神分裂症患者 107 例作为研究对象,其中单一口服利培酮治疗的 54 例患者作为对照组,口服利培酮联合阿立哌唑治疗的 53 例患者作为观察组。对照组患者年龄为 23 ~ 58 岁,平均年龄(44.89±9.72)岁。观察组患者年龄为 20 ~ 57 岁,平均年龄(43.96±9.14)岁。两组患者的年龄差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),可进行后续研究。本研究经医院伦理委员会审批通过(伦理批件号:20210301)。

### 1.2 入组和排除标准

入组标准:① 男性,年龄在 18 ~ 60 周岁,符合国际疾病分类第 10 版(ICD-10)中精神分裂症的诊断标准;② 无甲状腺疾病史、垂体瘤疾病史及其他相关内分泌疾病史;③ 半年内未服用过抗精神疾病类药物;④ 对利培酮及阿立哌唑无使用禁忌;⑤ 患者及家属对本研究知情同意。

排除标准:① 有严重躯体疾病者;② 有可能影响内分泌激素水平的用药史;③ 有其他神经、精神疾病史;④ 对利培酮或阿立哌唑过敏者;⑤ 无法配合完成研究者。

### 1.3 用药方法

对照组采用利培酮单独治疗,口服利培酮片(浙江华海药业股份有限公司,国药准字 H20052330),初始剂量为 1 mg bid,后根据病情逐渐增加剂量,以病情稳定的剂量为维持剂量,注意每日用量应不超过 6 mg。观察组采用利培酮联合阿立哌唑治疗,利培酮剂量参考上述对照组,并加服

阿立哌唑片(浙江华海药业股份有限公司,国药准字 H20203074),初始剂量为 5 mg qd,维持 1 周后根据药效及患者耐受情况酌情增加用药剂量,注意每日剂量不超过 30 mg。两组用药疗程均为 8 周。

### 1.4 观察指标

**1.4.1 甲状腺激素测定** 两组患者用药前和用药 8 周后,分别抽取空腹安静状态下静脉血 5 mL,4000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min 后,使用安图全自动化学发光测定仪 AutoLumo A2000 Plus 检测血清中游离三碘甲状腺原氨酸(FT<sub>3</sub>)、游离甲状腺素(FT<sub>4</sub>)、三碘甲状腺原氨酸(T<sub>3</sub>)、甲状腺素(T<sub>4</sub>)、促甲状腺激素(TSH)浓度。

**1.4.2 泌乳素(PRL)测定** 用药前和用药 8 周后,分别抽取两组患者空腹安静状态下静脉血 3 mL,4000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min 后,使用安图全自动化学发光测定仪 AutoLumo A2000 Plus 检测患者血清中 PRL 含量,并做好记录。

**1.4.3 不良反应评估** 患者用药后可能出现震颤、心动过速、嗜睡、流涎、便秘等不同类型的不良反应,评估统计两组患者不良反应发生情况。

### 1.5 统计学方法

使用 SPSS 23.0 统计软件对各组数据进行分析处理,符合正态分布的计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料以 *n*(%)表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验。以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 甲状腺激素水平比较

治疗前两组 FT<sub>3</sub>、FT<sub>4</sub>、T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>、TSH 水平无明显差异( $P > 0.05$ );治疗后对照组 TSH 水平较治疗前明显升高( $P < 0.05$ ),且较观察组治疗后 TSH 水平明显升高( $P < 0.05$ );观察组 TSH 水平与治疗前无明显差异;治疗后两组 FT<sub>3</sub>、FT<sub>4</sub>、T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub> 均较治疗前无明显差异,且组间亦无明显差异,见表 1。

### 2.2 PRL 水平比较

治疗前两组 PRL 水平无明显差异( $P > 0.05$ );治疗后两组 PRL 水平均较治疗前明显升高( $P < 0.05$ ),但观察组血清 PRL 水平较对照组低( $P < 0.05$ ),见表 1。



表 1 两组治疗前后甲状腺激素及 PRL 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 1 Levels of thyroid hormone and PRL before and after the treatment between both groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别		FT <sub>3</sub> / (pmol · L <sup>-1</sup> )	FT <sub>4</sub> / (pmol · L <sup>-1</sup> )	T <sub>3</sub> / (nmol · L <sup>-1</sup> )	T <sub>4</sub> / (nmol · L <sup>-1</sup> )	TSH/ (μIU · mL <sup>-1</sup> )	PRL/ (ng · mL <sup>-1</sup> )
对照组 (n = 54)	治疗前	4.56 ± 0.58	16.08 ± 2.67	1.32 ± 0.27	120.13 ± 19.68	1.41 ± 0.36	17.29 ± 2.73
	治疗后	4.47 ± 0.52	15.78 ± 2.48	1.26 ± 0.23	115.10 ± 16.78	1.76 ± 0.39*	52.58 ± 7.18*
观察组 (n = 53)	治疗前	4.63 ± 0.60	16.26 ± 2.71	1.35 ± 0.29	122.25 ± 20.02	1.45 ± 0.38	17.46 ± 2.88
	治疗后	4.40 ± 0.49	15.67 ± 2.46	1.27 ± 0.25	119.36 ± 18.62	1.47 ± 0.40#	29.23 ± 3.25*#

注：与同组治疗前比较，\*P < 0.05；与对照组治疗后比较，#P < 0.05。

Note: Compared with the same group before the treatment, \*P < 0.05; compared with the control group after the treatment, #P < 0.05.

### 2.3 不良反应发生率比较

记录两组不良反应发生情况如下，观察组不

良反应发生率 (7.55%) 与对照组发生率 (11.11%) 比较，差异无统计学意义，见表 2。

表 2 两组治疗后不良反应比较 [n(%)]

Tab 2 Adverse reactions after the treatment between both groups [n(%)]

组别	震颤	心动过速	嗜睡	流涎	便秘	合计
对照组 (n = 54)	2 (3.70)	1 (1.85)	1 (1.85)	1 (1.85)	1 (1.85)	6 (11.11)
观察组 (n = 53)	1 (1.89)	1 (1.89)	1 (1.89)	0 (0.00)	1 (1.89)	4 (7.55)
$\chi^2$						0.638
P						0.402

### 3 讨论

随着工作和生活压力的不断增大，精神分裂症发病率逐年升高，寻求有效且不良反应较少的治疗方案成为了研究热点。研究表明，下丘脑通过多种途径（如下丘脑-垂体-甲状腺轴和下丘脑-垂体-性腺轴紊乱等）影响精神分裂症患者的症状和体征<sup>[6-8]</sup>。部分学者指出，甲状腺激素可通过调节神经细胞的增殖分化进而对神经发育产生影响<sup>[9]</sup>，呆小症是由于先天性甲状腺功能减退引起的智力发育障碍，而甲状腺功能过于活跃则会造成甲状腺功能亢进致使患者出现焦虑、情绪亢奋、易激动等精神症状，以上均证实甲状腺与精神活动密切相关。基于以上理论本研究选取了非典型抗精神病药物利培酮与阿立哌唑进行比较，分析男性精神分裂症患者不同用药方案后甲状腺功能的变化情况，发现利培酮治疗后 TSH 水平显著升高，但利培酮联合阿立哌唑治疗后 TSH 水平较治疗前并未增加，提示加用阿立哌唑能纠正利培酮治疗引起的甲状腺功能变化，有助于维持甲状腺功能的稳定。分析以上现象的原因可能是利培酮作为多巴胺受体阻断剂可调节促甲状腺激素释放激素的合成及释放，进而导致 TSH 水平升高，而阿立哌唑可部分激活多巴胺受体<sup>[10-12]</sup>，拮抗了利培酮的升 TSH 效应<sup>[13]</sup>。FT<sub>3</sub>、FT<sub>4</sub>、T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub> 水平虽有所降低，但差异无统计学意义，可能与选取时间有关，下一步可考虑设置多个用药时间段进行更细致的比较分析。

PRL 是由垂体前叶腺嗜酸细胞分泌的蛋白质类激素<sup>[14]</sup>。临床研究表明，PRL 升高可导致男性患者出现乳腺发育、勃起功能障碍和不育症等症状，从而降低患者的用药依从性，而多巴胺可与垂体前叶腺嗜酸细胞膜上的多巴胺受体结合，导致 PRL 分泌受阻<sup>[15]</sup>。本研究结果显示，服用利培酮后患者血清 PRL 水平显著升高，可能由于利培酮能阻断多巴胺受体，导致 PRL 分泌的抑制作用减弱，从而引起 PRL 水平升高。而在利培酮基础上联用阿立哌唑治疗的患者血清 PRL 水平轻度升高，提示阿立哌唑可能抑制利培酮的升高 PRL 作用，原因可能是阿立哌唑有多巴胺受体激活作用，部分拮抗了利培酮对多巴胺受体的阻断作用。此结果提示在利培酮治疗产生高 PRL 血症时，可酌情考虑是否加用阿立哌唑以中和其升高 PRL 作用，从而提升患者用药配合度。

两组患者用药后不良反应发生率无显著差异，提示加用阿立哌唑并未增加不良反应的发生。从保证安全性的角度分析，可根据病情适当联用阿立哌唑以提升用药疗效，减少不良反应的发生。

基于以上研究可知，在利培酮治疗基础上联用阿立哌唑有助于抑制利培酮引起的内分泌功能紊乱，也未引起更多不良反应的发生，对临床用药有重要的指导意义。后续研究将考虑增大样本量，设置更多追踪间隔，并进一步挖掘两药联用的作用机制，为精神分裂症的临床合理用药提供更多参考价值。

## 参考文献

- [1] Mccutcheon RA, Reis Marques T, Howes OD. Schizophrenia-an overview [J]. *JAMA Psychiatry*, 2020, 77 (2): 201-210.
- [2] Yu YH, Peng MM, Bai X, et al. Schizophrenia, social support, caregiving burden and household poverty in rural China [J]. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol*, 2020, 55 (12): 1571-1580.
- [3] Sahnoun D, Ghanmi A, Gazzeh S, et al. Risperidone-induced leukopenia: evidence from a positive rechallenge and review of the literature [J]. *Pharmacopsychiatry*, 2024, 57 (2): 78-81.
- [4] Preda A, Shapiro BB. A safety evaluation of aripiprazole in the treatment of schizophrenia [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2020, 19 (12): 1529-1538.
- [5] 唐密密, 江沛, 李焕德. 非典型抗精神病药的体内代谢与药物相互作用 [J]. *中南药学*, 2012, 10 (8): 608-613.
- [6] Du X, Hill RA. Hypothalamic-pituitary-gonadal axis dysfunction: an innate pathophysiology of schizophrenia? [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2019, 275 (3): 38-43.
- [7] Boiko DI, Chopra H, Bilal M, et al. Schizophrenia and disruption of circadian rhythms: an overview of genetic, metabolic and clinical signs [J]. *Schizophr Res*, 2024, 264 (2): 58-70.
- [8] Bernstein HG, Keilhoff G, Steiner J. The implications of hypothalamic abnormalities for schizophrenia [J]. *Handb Clin Neurol*, 2021, 182 (6): 107-120.
- [9] Giannocco G, Kizys ML, Maciel RM, et al. Thyroid hormone, gene expression, and central nervous system: where we are [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2021, 114 (5): 47-56.
- [10] Kikuchi T, Maeda K, Suzuki M, et al. Discovery research and development history of the dopamine D (2) receptor partial agonists, aripiprazole and brexpiprazole [J]. *Neuropsychopharmacol Rep*, 2021, 41 (2): 134-143.
- [11] Taylor D, Chithiramohan R, Grewal J, et al. Dopamine partial agonists: a discrete class of antipsychotics [J]. *Int J Psychiatry Clin Pract*, 2023, 27 (3): 272-284.
- [12] Keks N, Hope J, Schwartz D, et al. Comparative tolerability of dopamine D2/3 receptor partial agonists for schizophrenia [J]. *CNS Drugs*, 2020, 34 (5): 473-507.
- [13] 周李烘, 江文庆, 李华芳, 等. 常见抗精神病药物对儿童青少年患者血清催乳素水平影响的研究进展 [J]. *神经疾病与精神卫生*, 2023, 23 (9): 650-654.
- [14] Capozzi A, Scambia G, Pontecorvi A, et al. Hyperprolactinemia: pathophysiology and therapeutic approach [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2015, 31 (7): 506-510.
- [15] Auriemma RS, Pirchio R, De AD, et al. Dopamine agonists: from the 1970s to today [J]. *Neuroendocrinology*, 2019, 109 (1): 34-41.

(收稿日期: 2024-01-02; 修回日期: 2024-04-08)

## 免疫检查点抑制剂治疗非小细胞肺癌患者疗效影响因素分析及预测模型的构建

罗竣豪, 沈悦, 陈洁祺, 于珍, 陈娟, 曹磊, 孟英才, 李湘平\* (中南大学湘雅医院药学部, 长沙 410008)

**摘要:** **目的** 探讨影响免疫检查点抑制剂 (ICI) 治疗非小细胞肺癌 (NSCLC) 患者疗效的因素, 并建立预测模型及验证。**方法** 回顾性分析某三甲医院 2017 年 1 月—2022 年 1 月 656 例使用过 ICI 治疗 NSCLC 患者的一般资料和临床数据。Log-Rank 单因素分析与 Cox 多因素回归分析影响无进展生存期 (PFS) 的因素。使用 R studio 4.2.0 绘制软件构建列线图模型, 通过一致性指数 (C-index)、受试者工作曲线 (ROC)、校正曲线和决策曲线分析 (DCA) 对模型进行内部与外部验证。**结果** Cox 多因素结果显示体质量指数 (BMI)、治疗方案、免疫表达、脑转移、肾上腺转移、吸烟指数、KRAS 突变、合并抗菌药物、合并 PPI、合并降压药、合并糖皮质激素、合并镇痛药、PLR 和 CRP 为 PFS 的独立影响因素。PFS 预测模型的训练集和验证集的 C-index 分别为 0.849 vs 0.884。3、6、12 和 18 个月的曲线下面积分别为 0.900 vs 0.964, 0.885 vs 0.891, 0.835 vs 0.860 和 0.804 vs 0.846。3、6、12 和 18 个月的 Brier 指数分别为 0.093 vs 0.039, 0.110 vs 0.050, 0.116 vs 0.083 和 0.118 vs 0.085。ROC 曲线表明模型具有较好的临床鉴别能力。校准曲线的实际曲线接近理想曲线, 表明该模型具有较好的临床区分度和校准度。决策曲线表明, 该预测模型有较好的临床净获益。**结论** ① 高 BMI 基线、吸烟指数 > 400、选择 ICI 合并化疗治疗方案、免疫表达、KRAS 突变是免疫治疗预后的独立保护因素。脑转移、肾上腺转移、合并抗菌药物、合并 PPI、合并降压药、合并糖皮质激素、合并镇痛药、高 PLR 基线和 CRP 水平异常是免疫治疗疗效的独立风险因素; ② 构建的预测模型可以为临床上使用 ICI 治疗 NSCLC 患者疗效预测提供一定的参考。

**关键词:** 非小细胞肺癌; 免疫检查点抑制剂; 预测模型; 列线图

**中图分类号:** R95, R969.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2024)08-2234-09  
**doi:** 10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.046

### Prognostic factors after non-small cell lung cancer patients treated with immune checkpoint inhibitors and establishment of a prediction model

LUO Jun-hao, SHEN Yue, CHEN Jie-qi, YU Zhen, CHEN Juan, CAO Lei, MENG Ying-cai, LI Xiang-ping\* (Department of Pharmacy, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008)

**Abstract: Objective** To determine the factors affecting the efficacy of immune checkpoint inhibitors (ICI) for non-small cell lung cancer (NSCLC), establish a prediction model and verify it. **Methods** The general and clinical data of 656 patients with NSCLC treated with ICI from January 2017 to January 2022 in a top comprehensive hospital were retrospectively analyzed. Log-Rank univariate analysis and Cox multivariate regression analysis were used to identify the factors that affected progress free survival (PFS). A Nomogram model was established with the R studio 4.2.0 rendering software, and the model was validated internally and externally by consistency index (C-index), receiver operating curve (ROC), correction curve, and decision curve analysis (DCA) curve. **Results** Cox multivariate results showed that body mass index, treatment

**基金项目:** 湖南省卫健委科研基金 (No.202213014985)。

**作者简介:** 罗竣豪, 男, 硕士, 主要从事临床药学方面的研究, email: pkcsu424@163.com \* **通信作者:** 李湘平, 男, 主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事临床药学方面的研究, email: xylxping@csu.edu.cn



regimen, immune expression, brain metastases, adrenal metastases, smoking index, *KRAS* mutation, antibiotic combination, proton pump inhibitor combination, antihypertensive combination, glucocorticoids combination, analgesic combination, platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) and C-reactive protein (CRP) were all independent influencing factors for PFS. The C-index of the training set and the validation set of PFS prognostic model was 0.849 vs 0.884, respectively. The area under curve at 3, 6, 12 and 18 months was 0.900 vs 0.964, 0.885 vs 0.891, 0.835 vs 0.860 and 0.804 vs 0.846, respectively. The Brier index at 3, 6, 12 and 18 months was 0.093 vs 0.039, 0.110 vs 0.050, 0.116 vs 0.083 and 0.118 vs 0.085, respectively. ROC curve showed that the model had good clinical differential ability. The actual curve of calibration curve was close to the ideal curve, indicating good clinical differentiation and calibration degree of the model. The decision curve showed good clinical net benefit of the prediction model. **Conclusion** ① High body mass index baseline, smoking index > 400, choice of ICI combined with chemotherapy, immune expression, and *KRAS* mutation are independent protective factors for the prognosis of immunotherapy. Brain metastasis, adrenal metastasis, concomitant use of antibiotics, proton pump inhibitor, antihypertensive drugs, glucocorticoids, and analgesics, high PLR baseline, and abnormal CRP levels are independent risk factors for the efficacy of immunotherapy; ② The established prediction model can provide a certain reference for the efficacy of ICI treatment for NSCLC patients in clinical practice.

**Key words:** non-small cell lung cancer; immune checkpoint inhibitor; prediction model; nomogram

近年来,免疫检查点抑制剂 (ICI) 被广泛用于治疗非小细胞肺癌 (NSCLC) 患者,效果优于传统化疗,但客观缓解率 (ORR) 仅 20% ~ 40%<sup>[1]</sup>,且无进展生存期 (PFS) 较低<sup>[2]</sup>。研究表明,体质指数 (BMI)、PD-L1 表达可能会影响 ICI 的疗效<sup>[3-4]</sup>,合并使用靶向治疗药物、非甾体抗炎药 (NSAID)、降压药可能会导致患者疗效的降低与其他并发症的产生<sup>[5-6]</sup>,是否还有其他因素仍然有待探讨。同时,使用 ICI 治疗后,患者的预后情况也受到普遍关注。因此,本研究旨在通过回顾性分析,探究影响 NSCLC 患者使用 ICI 疗效的影响因素,并构建预测模型及列线图,以预测患者的 PFS 在 3、6、12 和 18 个月进展的概率,为临床上使用 ICI 治疗的 NSCLC 患者疗效判定提供指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

本研究为回顾性研究,收集了湖南某三甲医院从 2017 年 1 月—2022 年 1 月接受不同类型的 ICI 的晚期 NSCLC 患者的相关资料。入组标准:1) 年龄 18 ~ 80 岁。2) 使用 ICI 治疗方案:① ICI 单用;② ICI 联合化疗;③ ICI 联合靶向治疗、④ ICI 联合化疗和靶向治疗。排除标准为:1) 合并其他系统恶性肿瘤;2) 患有获得性免疫缺陷综合征等自身免疫性疾病;3) 处于妊娠期或哺乳期妇女。

### 1.2 临床数据

通过电子病历系统收集相关临床特征,合并用药情况与检验指标。临床特征包括年龄、性别、BMI、吸烟状态 (吸烟状态通过吸烟指数来衡量:吸烟年 × 日吸烟根数,若戒烟超过 15 年,认为

无吸烟状态)、病理分型等。合并用药包括抗菌药物、质子泵抑制剂 (PPI)、NSAID、降压药、降糖药等。收集患者在进行初次治疗前最近的一次检验指标数据,包括绝对淋巴细胞 (ALC)、绝对单核细胞 (AMC)、绝对中性粒细胞 (ANC)、血小板 (PLT)、白蛋白 (Alb)、C 反应蛋白 (CRP) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 等。计算中性粒细胞与淋巴细胞比值 (NLR)、血小板与淋巴细胞比值 (PLR)、单核细胞与淋巴细胞比值 (MLR)、全身免疫指数 (SII) 和预后营养指数 (PNI) 等。

### 1.3 评价指标

依据 RESIST1.1 评价临床疗效,主要终点指标为 PFS,次要终点指标为 ORR 与疾病控制率 (DCR)。

### 1.4 统计学方法

训练集与验证集按照 7 : 3 的比例划分。在训练集队列中,X-tile 确定指标在 PFS 中的 cut-off 值。PFS 单因素分析采用 log-rank 检验,Lasso 回归分析剔除多重共线性强的因素,多因素分析采用 Cox 比例风险模型分析。通过训练集队列中得到的独立影响因素建立列线图,通过一致性指数 (C-index),ROC 曲线下面积,校正曲线,Brier 指数和决策曲线分析 (DCA) 验证模型。本研究使用 SPSS 26.0 与 X-tile 软件分析数据。定性资料用例数 (%) 衡量,符合正态分布定量资料采用均数 ± 标准差表示,非正态分布的定量资料用四分位间距和中位数表示,检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 患者基线特征和检验指标

本研究最终共纳入患者 656 例，其中男性 540 例 (82.3%)，女性 116 例 (17.7%)；非鳞癌患者 338 例 (51.5%)，鳞癌患者 318 例 (48.5%)。患者 mPFS 为 7.7 个月 (95%CI 6.8 ~ 8.6)，ORR 为 18.1%，DCR 为 51.4%。按照 7 : 3 分为训练集和验证集，两组基线、检验指标、PFS、ORR 和 DCR 没有显著差异 ( $P > 0.05$ )。患者具体的临床特征和检验指标见表 1 与表 2。

表 1 患者的临床特征  
Tab 1 Clinical characteristics of patients

因素	训练集 (n = 448)	验证集 (n = 208)	$\chi^2$	P	
性别 [n (%)]	女	76 (17.0)	40 (19.2)	0.501	0.479
	男	372 (83.0)	168 (80.8)		
年龄 [n (%)]	< 65 岁	255 (56.9)	128 (61.5)	1.247	0.264
	≥ 65 岁	193 (43.1)	80 (38.5)		
BMI [n (%)]	< 18.5 kg · m <sup>-2</sup>	45 (10.0)	24 (11.5)	2.747	0.253
	18.5 ~ 23.9 kg · m <sup>-2</sup>	255 (57.0)	104 (50.0)		
	> 23.9 kg · m <sup>-2</sup>	148 (33.0)	80 (38.5)		
ECOG-PS 评分 [n (%)]	≤ 1 分	301 (67.2)	149 (71.6)	1.304	0.253
	≥ 2 分	147 (32.8)	59 (28.4)		
吸烟指数 [n (%)]	≤ 400	176 (39.3)	98 (47.1)	3.580	0.058
	> 400	272 (60.7)	110 (52.9)		
TNM 分期 [n (%)]	Ⅲ期	97 (21.7)	63 (30.3)	5.749	0.056
	Ⅳ A 期	195 (43.5)	81 (38.9)		
	Ⅳ B 期	156 (34.8)	64 (30.8)		
治疗方案 [n (%)]	单用免疫	95 (21.2)	36 (17.3)	2.368	0.500
	免疫+化疗	280 (62.5)	131 (63.0)		
	免疫+靶向	36 (8.0)	18 (8.7)		
	免疫+化疗+靶向	37 (8.3)	23 (11.1)		
病理分型 [n (%)]	非鳞癌	221 (49.3)	117 (56.3)	0.925	0.336
	鳞癌	227 (50.7)	91 (43.7)		
经外周静脉置入中心静脉导管 [n (%)]	无	263 (58.7)	136 (65.4)	2.659	0.103
	有	185 (41.3)	72 (34.6)		
KRAS 突变 [n (%)]	无	404 (90.2)	180 (86.5)	1.926	0.165
	有	44 (9.8)	28 (13.5)		
EGFR 突变 [n (%)]	无	385 (85.9)	167 (80.3)	3.398	0.065
	有	63 (14.1)	41 (19.7)		
TP53 突变 [n (%)]	无	406 (90.6)	179 (86.1)	3.070	0.080
	有	42 (9.4)	29 (13.1)		
免疫表达 [n (%)]	< 1%	143 (31.9)	67 (32.2)	0.099	0.952
	1 ~ 49%	151 (33.7)	72 (34.6)		
	≥ 50%	154 (34.4)	69 (33.2)		
转移 [n (%)]					
脑转移 /%	无	372 (83.0)	160 (76.9)	3.462	0.063
	有	76 (17.0)	48 (23.1)		
骨转移 /%	无	311 (69.4)	134 (64.4)	1.625	0.202
	有	137 (30.6)	74 (35.6)		
肝转移 /%	无	385 (85.9)	186 (89.4)	1.530	0.216
	有	63 (14.1)	22 (10.6)		
肾上腺转移 /%	无	386 (86.2)	184 (88.5)	0.660	0.417
	有	62 (13.8)	24 (11.5)		
合并用药 [n (%)]					
合并抗菌药物	无	251 (56.0)	130 (62.5)	2.445	0.118
	有	197 (44.0)	78 (37.5)		
合并 PPI	无	124 (27.7)	69 (33.2)	2.065	0.151
	有	324 (72.3)	139 (66.8)		
合并降压药	无	345 (77.0)	158 (76.0)	0.087	0.768
	有	103 (23.0)	50 (24.0)		
合并降糖药	无	404 (90.2)	188 (90.4)	0.007	0.934
	有	44 (9.8)	20 (9.6)		

续表 1

因素	训练集 (n = 448)	验证集 (n = 208)	$\chi^2$	P	
合并糖皮质激素	无	146 (32.6)	3.397	0.065	
	有	302 (67.4)			53 (25.5)
合并 NSAID	无	355 (79.2)	0.066	0.798	
	有	93 (20.8)			45 (21.6)
合并他汀类	无	379 (84.6)	0.106	0.745	
	有	69 (15.4)			30 (13.9)
合并镇静催眠药	无	293 (65.4)	1.433	0.231	
	有	155 (34.6)			82 (39.4)
合并抗凝药	无	288 (64.3)	0.770	0.380	
	有	160 (35.7)			67 (18.3)
合并抗组胺药	无	267 (59.6)	0.890	0.346	
	有	181 (40.4)			76 (36.5)
合并 $\beta_2$ 受体激动剂	无	395 (88.2)	2.584	0.108	
	有	53 (11.8)			12 (7.7)
合并止呕药	无	107 (23.9)	2.209	0.137	
	有	341 (76.1)			147 (70.7)
合并镇痛药	无	290 (64.7)	1.597	0.206	
	有	158 (35.2)			84 (40.4)
ORR/%		17.6	23.8	0.244	0.621
DCR/%		51.3	51.4	0.001	0.980
PFS/月		7.7	7.2	0.796	0.372

表 2 患者的检验指标数据

Tab 2 Laboratory parameter data of patients

指标	训练集 (n = 448)	验证集 (n = 208)	Z	P
PLT/ ( $\times 10^9 \cdot L^{-1}$ )	246.50 (195.00, 297.75)	244.5 (192.50, 307.00)	-1.160	0.246
ANC/ ( $\times 10^9 \cdot L^{-1}$ )	4.60 (3.40, 6.10)	4.45 (3.50, 5.95)	-0.219	0.827
AMC/ ( $\times 10^9 \cdot L^{-1}$ )	0.60 (0.40, 0.70)	0.60 (0.40, 0.80)	-0.023	0.982
ALC/ ( $\times 10^9 \cdot L^{-1}$ )	1.40 (1.10, 1.80)	1.40 (0.90, 1.78)	-1.152	0.249
WBC/ ( $\times 10^9 \cdot L^{-1}$ )	7.00 (5.70, 8.80)	6.97 (5.70, 9.07)	-0.076	0.939
Alb/ ( $g \cdot L^{-1}$ )	39.10 (36.00, 42.20)	39.35 (35.95, 4.80)	-0.055	0.956
CRP/ ( $mg \cdot L^{-1}$ )	9.43 (3.29, 28.68)	9.79 (7.10, 16.39)	-1.899	0.058
LDH/ ( $U \cdot L^{-1}$ )	190.05 (166.93, 231.70)	196.55 (145.50, 277.00)	-0.399	0.690
Cre/ ( $\mu mol \cdot L^{-1}$ )	86.80 (75.40, 103.98)	86.60 (74.50, 98.58)	-1.841	0.066
TBIL/ ( $\mu mol \cdot L^{-1}$ )	12.70 (9.83, 17.38)	12.90 (9.30, 16.25)	-1.271	0.204
DBIL/ ( $\mu mol \cdot L^{-1}$ )	4.70 (3.40, 6.30)	4.70 (3.40, 6.70)	-0.099	0.921
AST/ ( $U \cdot L^{-1}$ )	39.45 (28.15, 55.70)	39.20 (15.40, 84.15)	-1.133	0.257
ALT/ ( $U \cdot L^{-1}$ )	42.05 (25.95, 67.55)	40.95 (23.55, 73.10)	-0.207	0.836

注：指标均为非正态分布，使用中位数与四分位间距。

Note: This study are all non normal distributions with median and interquartile intervals.

## 2.2 影响 PFS 的单因素分析

患者的 PLR、NLR、MLR、SII、PNI、ALI 和 dNLR 根据 PFS 结局情况使用 X-tile 分析，得到它们的 cut-off 值分别为：164.62/236.67, 3.06/5.64, 0.38/0.73, 518.47/1087.82, 40.30/45.60, 107.14/342 和 2.12。单因素分析结果见表 3。将患者单因素分析（见表 3）中有统计学意义的结果纳入 Lasso 回归分析。因变量 Y 选择以 PFS 和是否进展的结局，自变量 X 为 Log-rank 分析中对 PFS 有统计学意义的影响因素 ( $P < 0.05$ )，对其进行 Lasso 回归。根据十折交叉验证的结果，当  $\lambda.min = 0.044$  时，模型误差最小，此时对应的模型是最优解，最佳的  $\lambda$  值对应

了 21 个非零回归系数，35 个自变量的回归系数值如表 4 所示，其中“.”表示系数被算法压缩至 0。

## 2.3 影响 PFS 的多因素分析

将 Lasso 回归分析中得到的 21 个变量作为协变量纳入 Cox 比例风险模型回归分析。在 Cox 比例风险模型回归分析中，被纳入协变量进行分析的因素的个数与总样本量中阳性的例数之间的倍数关系应为 10 ~ 15 倍。训练集队列中进展的患者为 218 例，倍数关系在此范围内。Cox 比例风险模型回归分析结果认为 BMI ( $P = 0.001$ )、吸烟指数 ( $P = 0.008$ )、免疫表达 ( $P = 0.001$ )、治疗方案 ( $P < 0.001$ ) 和 KRAS 突变 ( $P = 0.005$ )



表 3 影响 PFS 的单因素分析结果  
Tab 3 Single factor analysis affecting PFS

因素	分类	例数	中位生存期 / 月	P	因素	分类	例数	中位生存期 / 月	P		
性别	女	76	11.3	0.422	合并降糖药	无	404	7.3	0.397		
	男	372	7.0			有	44	6.5			
年龄	< 65 岁	255	7.0	0.106	合并糖皮质激素	无	146	12.0	< 0.001		
	≥ 65 岁	193	7.8			有	302	5.8			
BMI	< 18.5 kg · m <sup>-2</sup>	45	3.6	< 0.001	合并 NSAID	无	355	8.7	< 0.001		
	18.5 ~ 23.9 kg · m <sup>-2</sup>	255	6.4			有	93	5.3			
	> 23.9 kg · m <sup>-2</sup>	148	12.0			合并他汀类	无	379		7.0	0.746
经外周静脉置入中心静脉导管	无	263	8.2	0.024	合并镇静催眠药	有	69	8.0	0.002		
	有	185	6.1			无	293	8.0			
ECOG-PS 评分	≤ 1	301	9.1	< 0.001	合并抗凝药	有	155	6.1	< 0.001		
	≥ 2	147	5.3			无	288	8.5			
吸烟指数	≤ 400	176	5.8	< 0.001	合并抗组胺	有	160	5.8	0.005		
	> 400	272	9.0			无	267	8.3			
TNM 分期	Ⅲ期	97	23.0	< 0.001	合并 β <sub>2</sub> 受体激动剂	有	181	5.8	0.011		
	Ⅳ A 期	195	8.2			无	395	7.7			
	Ⅳ B 期	156	5.6			有	53	5.3			
治疗方案	单用免疫	95	5.8	0.001	合并止呕药	无	107	12.9	< 0.001		
	免疫+化疗	280	8.9			有	341	5.9			
	免疫+靶向	36	6.3			合并镇痛药	无	290		10.0	< 0.001
	免疫+化疗+靶向	37	6.1				有	158		5.6	
病理分型	非鳞癌	221	8.1	0.582	PLR	≤ 164.62	217	10.8	< 0.001		
	鳞癌	227	6.6			164.62 ~ 236.67	113	6.5			
KRAS 突变	无	404	6.9	0.004		≥ 236.67	118	4.2			
	有	44	15.6		NLR	≤ 3.06	217	11.3	< 0.001		
EGFR 突变	无	385	8.1	< 0.001		3.06 ~ 5.64	137	5.8			
	有	63	4.2			≥ 5.64	94	3.6			
TP53 突变	无	406	7.7	0.379	MLR	≤ 0.38	191	10.8	< 0.001		
	有	42	5.7			0.38 ~ 0.73	197	5.8			
免疫表达	< 1%	143	4.7	< 0.001		≥ 0.73	60	3.6			
	1% ~ 49%	151	8.3		全身免疫指数	≤ 518.47	153	12.9	< 0.001		
	≥ 50%	154	12.9			518.47 ~ 1087.82	139	7.7			
脑转移	无	372	8.8	< 0.001		≥ 1087.82	156	4.3			
	有	76	5.6		预后营养指数	≤ 40.30	76	3.6	< 0.001		
骨转移	无	311	9.1	< 0.001		40.30 ~ 45.60	124	5.8			
	有	137	5.6			≥ 45.60	248	10.4			
肝转移	无	385	8.0	< 0.001	肺癌炎症指数	≤ 107.14	60	3.5	< 0.001		
	有	63	5.6			107.14 ~ 342	214	5.9			
肾上腺转移	无	386	8.0	< 0.001		≥ 342	174	12.0			
	有	62	5.6		CRR	正常	207	14.2	< 0.001		
合并抗菌药物	无	251	12.9	< 0.001		异常	241	4.8			
	有	197	5.6		LDH	正常	364	7.3	0.147		
合并 PPI	无	124	14.2	< 0.001		异常	84	6.4			
	有	324	5.7		肺免疫预后指数分级	优	222	8.8	0.004		
合并降压药	无	345	8.3	0.009		中	179	5.8			
	有	103	5.6			差	47	4.8			

是 PFS 的独立保护因素。脑转移 ( $P = 0.007$ )、肾上腺转移 ( $P = 0.001$ )、合并抗菌药物 ( $P = 0.003$ )、合并 PPI ( $P = 0.001$ )、合并降压药 ( $P = 0.029$ )、合并糖皮质激素 ( $P = 0.007$ )、合并镇痛药 ( $P = 0.034$ )、PLR ( $P = 0.001$ ) 和 CRP ( $P < 0.001$ ) 是 PFS 的独立危险因素。被纳入

在 Cox 比例风险模型中的因素个数与总样本量之间的倍数关系应为 15 ~ 20 倍。训练集队列共有 448 例患者，被纳入模型中的因素 (包含哑变量) 共 19 个，认为倍数关系在范围之内。具体统计学分析结果见表 5。

#### 2.4 PFS 预测模型的建立与验证

表 4 PFS 各因素 Lasso 分析的回归系数表

Tab 4 Regression coefficient table for Lasso analysis of PFS factors

变量	回归系数	变量	回归系数
吸烟指数	- 0.193	CRP	0.748
BMI	- 0.246	TNM 分期	-
ECOG-PS 评分	0.086	KRAS 突变	- 0.486
治疗方案	- 0.221	EGFR 突变	0.071
脑转移	0.093	合并镇静催眠药	-
骨转移	-	合并抗凝药	0.051
肝转移	-	合并抗组胺药	-
肾上腺转移	0.099	合并β <sub>2</sub> 受体激动剂	-
免疫表达	- 0.256	合并止呕药	-
经外周静脉置入中心静脉导管	-	合并镇痛药	0.201
合并抗菌药物	0.308	PLR	0.192
合并 PPI	0.515	NLR	-
合并降压药	0.118	MLR	0.072
合并糖皮质激素	0.351	全身免疫指数	0.048
合并 NSAID	-	肺癌炎症指数	- 0.115
预后营养指数	-	肺免疫预后指数分级	-

表 5 影响 PFS 的 Cox 多因素分析结果

Tab 5 Cox multifactor analysis on PFS

变量	HR	95%CI	P 值
体质量指数			0.001
偏瘦 / 正常	0.684	0.443 ~ 1.056	0.087
偏瘦 / 超重	0.408	0.246 ~ 0.678	0.001
吸烟指数 (≤ 400 / > 400)	0.674	0.504 ~ 0.901	0.008
治疗方案			< 0.001
单纯免疫 / 合用化疗	0.358	0.250 ~ 0.513	< 0.001
单纯免疫 / 合用靶向	0.613	0.376 ~ 1.001	0.050
单纯免疫 / 三者联用	0.430	0.235 ~ 0.784	0.006
脑转移 (无 / 有)	1.593	1.138 ~ 2.231	0.007
肾上腺转移 (无 / 有)	1.846	1.271 ~ 2.683	0.001
免疫表达			0.001
< 1% / 1% ~ 49%	0.599	0.424 ~ 0.848	0.004
< 1% / ≥ 50%	0.500	0.340 ~ 0.737	< 0.001
KRAS 突变 (无 / 有)	0.397	0.207 ~ 0.762	0.005
合并抗菌药物 (无 / 有)	1.615	1.171 ~ 2.228	0.003
合并 PPO (无 / 有)	2.221	1.410 ~ 3.497	0.001
合并降压药 (无 / 有)	1.405	1.035 ~ 1.908	0.029
合并糖皮质激素 (无 / 有)	1.692	1.154 ~ 2.481	0.007
合并镇痛药 (无 / 有)	1.382	1.024 ~ 1.864	0.034
PLR			0.001
≤ 164.62 / 164.62 ~ 236.67	1.387	0.964 ~ 1.995	0.078
≤ 164.62 / ≥ 236.67	1.975	1.378 ~ 2.830	< 0.001
CRP (正常 / 异常)	2.780	1.964 ~ 3.934	< 0.001

PFS 临床预测模型的列线图是由 BMI、治疗方案、免疫表达、脑转移、肾上腺转移、吸烟指数、KRAS 突变、合并抗菌药物、合并 PPI、合并降压药、合并糖皮质激素、合并镇痛药、PLR 和 CRP 所构建的。用于预测患者 3、6、12、18 个月是否进展的概率 (见图 1)。

训练集的 C-index 为 0.849, 3 个月、6 个月、

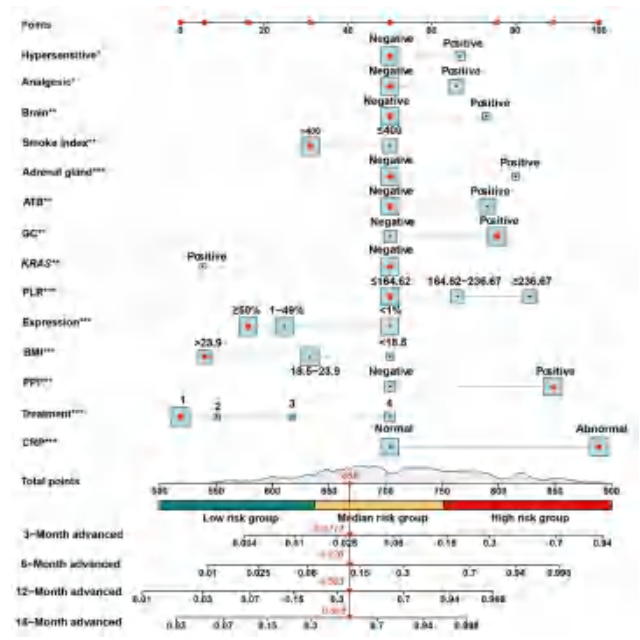


图 1 PFS 预测模型的列线图

Fig 1 A nomogram of the PFS prediction model

注 (Note): 1. 联合化疗 (combination chemotherapy); 2. 三者联合 (combination of three regimes); 3. 联合靶向 (shared targeting); 4. 单用免疫 (monotherapy immunity)。

12 个月和 18 个月 PFS 的 AUC 分别为 0.900、0.885、0.835 和 0.804, 见图 2。验证集的 C-index 为 0.884, 3 个月、6 个月、12 个月和 18 个月 PFS 的 AUC 分别为 0.964、0.891、0.860 和 0.846, 见图 3。C-index 与 AUC 均大于 0.8, 表明该模型具有较好的临床鉴别能力。训练集 3 个月、6 个月、12 个月和 18 个月 PFS 校正曲线的 Brier 指数分别为 0.093、0.110、0.116 和 0.118, 见图 4。验证集 3 个月、6 个月、12 个月和 18 个月 PFS 校正曲线的 Brier 指数分别为 0.039、0.050、0.083 和 0.085, 见图 5。校准曲线的实际曲

线接近理想曲线，表明该模型具有较好的临床区分度和校准度。

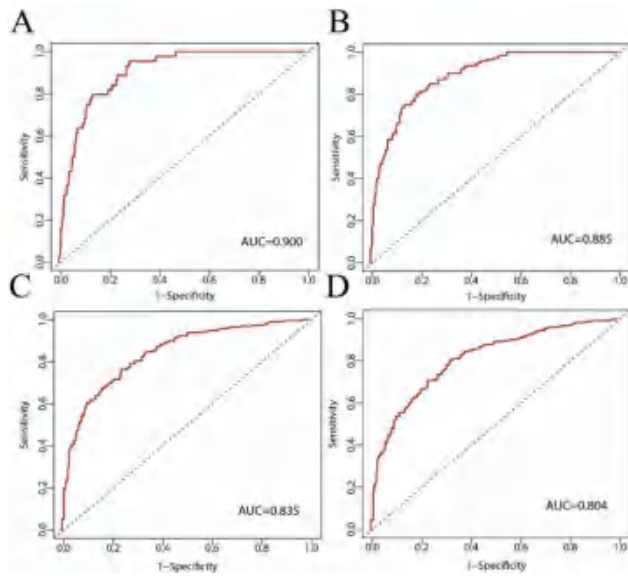


图 2 PFS 预测模型训练集的 3 (A)、6 (B)、12 (C)、18 (D) 个月的 ROC 曲线

Fig 2 ROC curves of the training set in PFS prediction model at 3 (A), 6 (B), 12 (C) and 18 (D) months

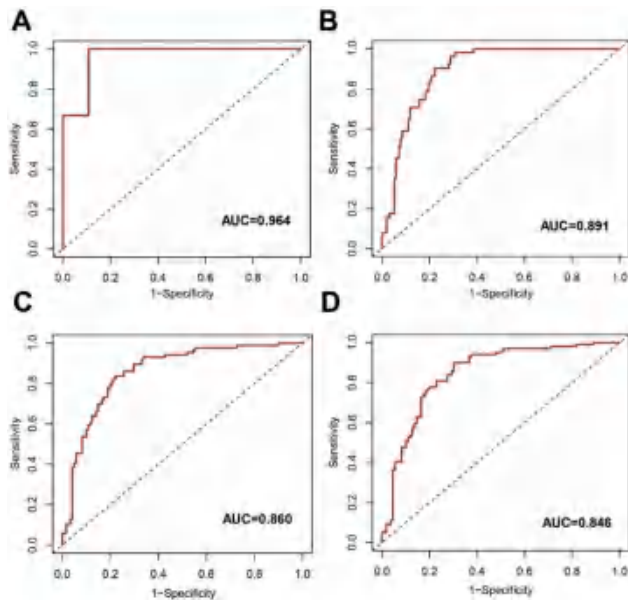


图 3 PFS 预测模型验证集的 3 (A)、6 (B)、12 (C)、18 (D) 个月的 ROC 曲线

Fig 3 ROC curves of the validation set of PFS prediction models at 3 (A), 6 (B), 12 (C) and 18 (D) months

### 2.5 模型决策曲线分析

对 PFS 预测模型进行决策曲线分析，图中横坐标为阈概率，纵坐标为净获益（真阳性的获益和假阳性的损失的差值）。在图 6 中，将阈概率定义为患者进展的概率，当通过模型预测患者进展的概率为 10% 时，患者能在模型干预下有净获益。本研究进一步对 B 模型进行比较，认为本模

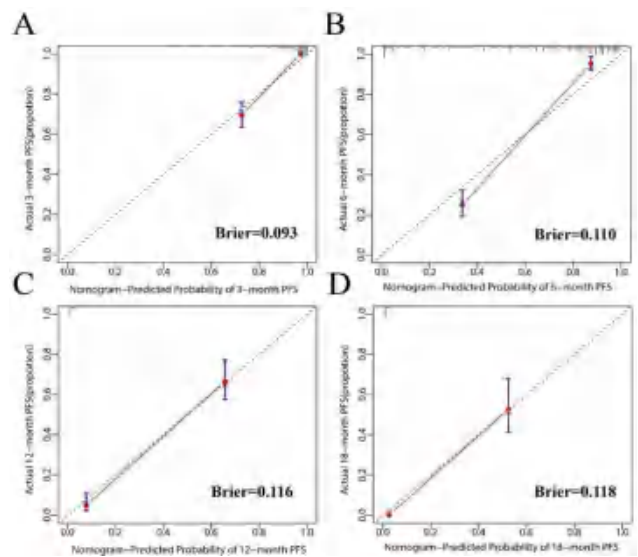


图 4 PFS 预测模型训练集的 3 (A)、6 (B)、12 (C)、18 (D) 个月的校正曲线

Fig 4 Correction curves of the training set of PFS prediction model at 3 (A), 6 (B), 12 (C) and 18 (D) months

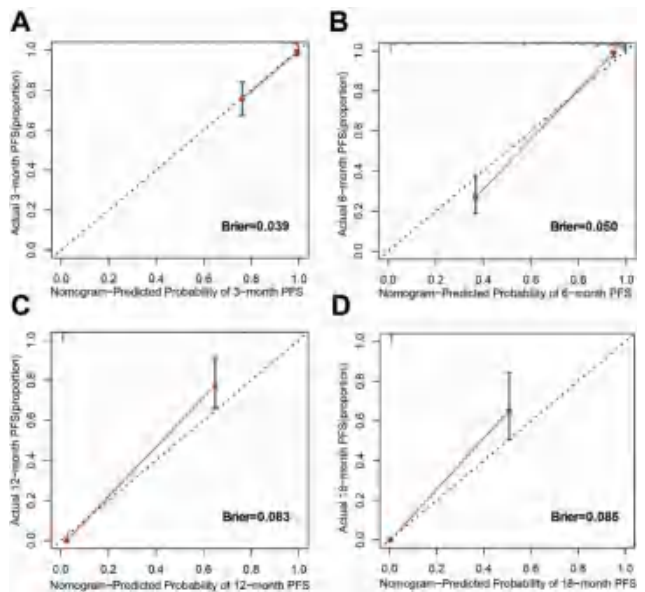


图 5 PFS 预测模型验证集的 3 (A)、6 (B)、12 (C)、18 (D) 个月的校正曲线

Fig 5 Calibration curves of the validation set of the PFS prediction model at 3 (A), 6 (B), 12 (C) and 18 (D) months

型在临床上的净获益更高，主要原因是考虑了患者合并用药情况。

### 3 讨论

本研究发现 BMI、吸烟指数、治疗方案、脑转移、肾上腺转移、免疫表达、KRAS 突变、合并抗菌药物、合并 PPI、合并降压药、合并糖皮质激素、合并镇痛药、PLR 和 CRP 是影响晚期 NSCLC 使用 ICI 患者疗效的重要因素。通过这些因素建立的列线图可以更精准地预测患者的 PFS。

患者高 BMI 基线、吸烟指数 > 400、选择 ICI



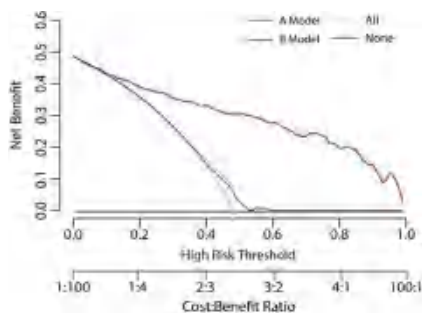


图 6 本研究模型 (A) 和对比模型 (B) PFS 的 DCA 曲线  
Fig 6 DCA curve of PFS of the research model (A) and the comparison model (B)

合并化疗方案、免疫表达、*KRAS* 突变是免疫治疗预后的独立保护因素。Wang 等<sup>[7]</sup>的研究中表明,在肥胖的大鼠体内,功能失调的 T 细胞显著增加,这种衰竭可能部分由免疫检查点介导(如 PD-1/PD-L1 途径),并由瘦素驱动,因此,更可能由 ICI 引起<sup>[8]</sup>;患者的吸烟指数 > 400 是免疫治疗预后的一个保护因素,Riviz 等<sup>[9]</sup>的研究对使用了免疫治疗的 NSCLC 患者进行了 GWAS 分析,结果显示在具有吸烟史的患者中发现了较高的非同义突变和更多的抗原负荷,这两个方面均有可能提高患者的免疫治疗的疗效;ICI 合并化疗属于患者治疗的一线方案,使用这种治疗方式的患者有更好的疗效,这与目前的研究结论一致<sup>[10]</sup>;关于免疫表达,其中 PD-L1 表达大于 50% 的患者使用 ICI 治疗有更好的疗效,本研究结果和临床试验相同<sup>[11]</sup>; *KRAS* 突变对接受 ICI 治疗的患者是一个有利因素,是因为有研究证明 *KRAS* 突变与 CD8<sup>+</sup> TILs、PD-L1 水平和 TMB 成正相关<sup>[12-13]</sup>。

脑转移、肾上腺转移、合并抗菌药物、合并 PPI、合并降压药、合并糖皮质激素、合并镇痛药、高 PLR 基线和 CRP 水平异常是免疫治疗疗效的独立风险因素。有脑转移和肾上腺转移的患者的 TNM 分期更高,身体状态更差,疗效更低,这和目前的研究结论一致<sup>[14]</sup>;有研究表明,肠道微生物群的多样性越高,对 ICI 的反应就越高,因为它与 T 细胞数量和活性成正相关<sup>[15]</sup>,与非抗菌药物和 PPI 使用者相比,抗菌药物和 PPI 使用者的肠道微生物群的多样性较低<sup>[16]</sup>,所以合并抗菌药物和合并 PPI 是接受 ICI 治疗的不利因素;有研究表明,糖皮质激素通过诱导 T 细胞凋亡,阻止促炎细胞因子的产生和释放,通过降低分化簇 CD28 和 CD80 分子的表达,减少白细胞介素-2 的产生<sup>[17-18]</sup>。加上 PD-L1 和 CTLA-4 在 NSCLC 患者肺组织中的过度表达<sup>[19]</sup>,早期使用糖皮质激

素可能会增加 ICI 免疫级联反应的阻碍,从而抑制有效抗肿瘤免疫的激活,对 NSCLC 患者的预后产生不利影响;合镇痛药与 ICI 疗效降低有关,在纳入患者的亚组分析中,合并镇痛药对 ICI 治疗期间的生存有长期的负面影响,几乎每个亚组都观察到 PFS 和总生存期(OS)的降低<sup>[20]</sup>,这与本研究结果一致;合并降压药物不利于接受 ICI 治疗患者的疗效,是因为肾素-血管紧张素系统(RAS)在肿瘤细胞和内皮细胞中的高表达,其在肿瘤细胞增殖、凋亡、血管形成和转移中起重要作用<sup>[21]</sup>。血管紧张素 II 通过与肿瘤细胞中的血管紧张素 II 受体结合来诱导细胞增殖,还通过上调血管内皮生长因子(VEGF)的表达来促进肿瘤血管生成<sup>[22]</sup>,RAS 组分也在大多数免疫细胞中表达<sup>[23]</sup>,在巨噬细胞、髓源性抑制细胞和成纤维细胞中被激活,并在肿瘤微环境中诱导免疫抑制;研究表明,当活化后的 PLT 与肿瘤细胞结合后,可阻止肿瘤细胞被人体免疫细胞检测和攻击,促使肿瘤细胞产生免疫逃逸,并且产生血管内皮生长因子和转化生长因子- $\beta$ ,促进肿瘤细胞生长,从而不利于 ICI 的效果;研究表明 CRP 水平升高的患者机体内转化生长因子- $\beta$  等免疫抑制因子的表达受到影响,抑制自然杀伤细胞功能,影响效应 T 细胞功能<sup>[24-25]</sup>,从而降低患者 ICI 的疗效。

本研究构建的预测模型,以期帮助临床医师更好地预测治疗 NSCLC 患者的疗效。因为相比之前的模型,我们将患者的临床特征、合并用药情况和临床指标纳入模型中,所有模型的 AUC 治疗 NSCLC 和 C-index 均大于 0.8,能更加精准地预测患者的疗效。当然,这一模型也有待于未来临床使用更多样本量、多中心进一步验证和完善。

### 参考文献

- [1] Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373 (2): 123-135.
- [2] Mao SQ, Zhou F, Liu YW, et al. ICI plus chemotherapy prolonged survival over ICI alone in patients with previously treated advanced NSCLC [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2022, 71 (1): 219-228.
- [3] Zhang TT, Li SL, Chang JH, et al. Impact of BMI on the survival outcomes of non-small cell lung cancer patients treated with immune checkpoint inhibitors: a meta-analysis [J]. *BMC Cancer*, 2023, 23 (1): 1023.
- [4] Yoneda T, Sone T, Koba H, et al. Long-term survival of patients with non-small cell lung cancer treated with

- immune checkpoint inhibitor monotherapy in real-world settings [J]. *Clin Lung Cancer*, 2022, 23 (6): 467-476.
- [5] Dumoulin DW, Visser S, Cornelissen R, et al. Renal toxicity from pemetrexed and pembrolizumab in the era of combination therapy in patients with metastatic nonsquamous cell NSCLC [J]. *J Thorac Oncol*, 2020, 15 (9): 1472-1483.
- [6] 唐亚娟, 史金平, 张琰, 等. 免疫检查点抑制剂所致免疫相关性肝损伤的真实世界研究 [J]. *中南药学*, 2024, 22 (3): 772-777.
- [7] Wang ZM, Aguilar EG, Luna JI, et al. Paradoxical effects of obesity on T cell function during tumor progression and PD-1 checkpoint blockade [J]. *Nat Med*, 2019, 25 (1): 141-151.
- [8] Mullen M, Gonzalez-Perez RR. Leptin-induced JAK/STAT signaling and cancer growth [J]. *Vaccines (Basel)*, 2016, 4 (3): 26.
- [9] Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer [J]. *Science*, 2015, 348 (6230): 124-128.
- [10] Sun DC, Liu JQ, Zhou HQ, et al. Classification of tumor immune microenvironment according to programmed death-ligand 1 expression and immune infiltration predicts response to immunotherapy plus chemotherapy in advanced patients with NSCLC [J]. *J Thorac Oncol*, 2023, 18 (7): 869-881.
- [11] Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, et al. Five-year outcomes with pembrolizumab versus chemotherapy for metastatic non-small-cell lung cancer with pd-1 tumor proportion score  $\geq 50$  [J]. *J Clin Oncol*, 2021, 39 (21): 2339-2349.
- [12] Liu CM, Zheng SF, Jin RS, et al. The superior efficacy of anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy in KRAS-mutant non-small cell lung cancer that correlates with an inflammatory phenotype and increased immunogenicity [J]. *Cancer Lett*, 2020, 470: 95-105.
- [13] Adderley H, Blackhall FH, Lindsay CR. KRAS-mutant non-small cell lung cancer: converging small molecules and immune checkpoint inhibition [J]. *EBioMedicine*, 2019, 41: 711-716.
- [14] Buriolla S, Pelizzari G, Corvaja C, et al. Immunotherapy in NSCLC patients with brain metastases [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (13): 7068.
- [15] Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors [J]. *Science*, 2018, 359 (6371): 91-97.
- [16] Jackson MA, Goodrich JK, Maxan ME, et al. Proton pump inhibitors alter the composition of the gut microbiota [J]. *Gut*, 2016, 65 (5): 749-756.
- [17] Kalfeist L, Galland L, Ledys F, et al. Impact of glucocorticoid use in oncology in the immunotherapy era [J]. *Cells*, 2022, 11 (5): 770.
- [18] Maeda N, Maruhashi T, Sugiura D, et al. Glucocorticoids potentiate the inhibitory capacity of programmed cell death 1 by up-regulating its expression on T cells [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294 (52): 19896-19906.
- [19] Ai LL, Chen J, Yan H, et al. Research status and outlook of PD-1/PD-L1 inhibitors for cancer therapy [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 3625-3649.
- [20] Yu XY, Zhao L, Song B. Impact of opioid analgesics on the efficacy of immune checkpoint inhibitors in a lung cancer population [J]. *BMC Pulm Med*, 2022, 22 (1): 431.
- [21] George AJ, Thomas WG, Hannan RD. The renin-angiotensin system and cancer: old dog, new tricks [J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10 (11): 745-759.
- [22] Chen XS, Meng QW, Zhao YB, et al. Angiotensin II type 1 receptor antagonists inhibit cell proliferation and angiogenesis in breast cancer [J]. *Cancer Lett*, 2013, 328 (2): 318-324.
- [23] Haznedaroglu IC, Beyazit Y. Local bone marrow renin-angiotensin system in primitive, definitive and neoplastic haematopoiesis [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2013, 124 (5): 307-323.
- [24] Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3 [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9 (11): 798-809.
- [25] Herrmann A, Kortylewski M, Kujawski M, et al. Targeting Stat3 in the myeloid compartment drastically improves the in vivo antitumor functions of adoptively transferred T cells [J]. *Cancer Res*, 2010, 70 (19): 7455-7464.

(收稿日期: 2024-04-07; 修回日期: 2024-06-14)

# 两票制政策对医疗机构药品供应的影响效应研究——以山东省某医院为例

梁轶群, 闫美兴, 于宝东 (青岛大学附属妇女儿童医院药学部, 山东 青岛 266034)

**摘要:** 目的 探讨“两票制”政策对医院药品供应的影响。方法 收集 2016 年 11 月 1 日至 2022 年 11 月 1 日期间某医院涨价、降价、涨幅区间、降幅区间品规数, 1 家及多家配送企业对应品规数, 临时及正式转配送品规数, 配送企业平均份额及平均品规数, 分析“两票制”对药品价格、配送品规数及配送集中度的影响。结果 涨价品规数占比逐年下降, 降价品规数先减少后增加 ( $P < 0.05$ ); 涨幅  $> 1000\%$  的品规数占比最大, 多数涨幅区间内品规数占比下降; 降幅区间内品规数占比变化不明显。由 1 家配送企业对应品规数占比显著减少, 由多家配送企业对应品规数占比明显增加 ( $P < 0.05$ ); 临时及正式转配送品规数比例均先增加后减少 ( $P < 0.05$ )。配送企业平均份额及平均品规数增加。结论 “两票制”对医院药品供应影响显著: 抑制大部分药品涨价, 但少数药品涨幅突出; 药品供货初期不稳定, 渐趋改善; 药品供应链集中化。建议对涨幅过高品种采取有力措施, 进一步减轻患者用药负担。

**关键词:** 两票制; 医院药品供应; 药品价格; 配送品规数; 药品配送集中度

中图分类号: R95

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)08-2243-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.047

## Effect of Two-vote system on drug supply in medical institutions: a hospital in Shandong as a case study

LIANG Yi-qun, YAN Mei-xing, YU Bao-dong (*Qingdao Women and Children's Hospital Qingdao University, Qingdao Shandong 266034*)

**Abstract: Objective** To determine the influence of “Two-vote system” policy on hospital drug supply, and provide reference for policy making. **Methods** Data from November 1st, 2016 to November 1st, 2022 were collected, concerning price change in drugs, proportion of changes types and ranges of change delivery and manufacturers, average delivery quota and types, etc. The impact of Two-vote system on drug prices, distribution regulations and drug distribution patterns were analyzed. **Results** Two-vote system significantly affected drug price ( $P < 0.05$ ). The proportion of price-increase drugs decreased year by year. The percentage of products increased by 1000% was the largest, the rest of product range mostly declined. The change of product gauge was not obvious in the decreasing range. The number of products corresponding to one distribution enterprise decreased ( $P < 0.05$ ), and more than one distribution enterprise increased ( $P < 0.05$ ). The proportion of temporary trans-distribution and formal trans-distribution decreased after the increasing of the regulation ( $P < 0.05$ ). Drug distribution concentration was reflected in the distribution enterprise average share and distribution enterprise average product size centralized. **Conclusion** Drug supply has been significantly impacted. Price increasing has been controlled, but partial still has been rising sharply. The stability of drug supply has been fluctuated and drug supply chain has been restructured. The optimization and concentration of drug distribution has appeared. Targeted measures with partial drug price increasing should be taken to reduce the burden of drug use for patients.

**Key words:** Two-vote system; hospital drug supply; drug price; distribution regulation; drug delivery distribution

基金项目: 青岛市市级临床重点专科 (医院药学)。

作者简介: 梁轶群, 女, 副主任药师, 主要从事医药政策对医疗机构药品供应影响的研究, email: lyqjennifer@hotmail.com



“两票制”是指药品生产企业到流通企业开一次发票，流通企业到医疗机构开一次发票。2017 年 1 月，国务院医改办等八部委联合出台《关于在公立医疗机构采购中推行“两票制”的实施意见（试行）》，要求我国公立医疗机构落实药品供应“两票制”。2017 年 11 月 1 日，根据《山东省公立医疗机构药品采购推行“两票制”实施方案（试行）》及《青岛市公立医疗机构药品采购推行“两票制”实施方案（试行）》的文件要求，青岛市公立医疗机构启动实施“两票制”，并在 6 个月过渡期后全部执行药品采购“两票制”。2019 年 10 月，修订版《山东省公立医疗机构药品采购推行“两票制”实施方案》公布。“两票制”的初衷是规范药品流通秩序，压缩药品价格水分，打破原有的多层次供应链条<sup>[1-2]</sup>。“两票制”对医院药品供应的影响如何？此类研究以往多采用系统分析或问卷调查，本研究通过设定三个维度，分析某医院在“两票制”实施前后连续六年的药品采购数据，旨在较全面地探讨该政策对医院药品供应的影响，为政策的制定提供有价值的参考依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 资料

收集某医院 2016 年 11 月 1 日至 2022 年 11 月 1 日的药品价格、配送企业对应品规数、配送企业份额等数据。其中，“两票制”政策允许按国家现行规定采购的药品除外（麻醉药品、精神药品、医疗用毒性药品、放射性药品等特殊药品，以及中药饮片和疫苗等）。

### 1.2 方法

将 2016 年 11 月 1 日至 2017 年 10 月 31 日界定为“两票制”实施前一年，将 2017 年 11 月 1 日至 2018 年 10 月 31 日界定为“两票制”实施后第一年，依此类推。以药品价格、配送品规数、药品配送集中度为研究维度<sup>[1]</sup>。各维度的定义如下：

**药品价格：**是指配送企业供货药品的销售价格，是反映医疗服务价格在药品领域上涨或下降的直观维度。

**配送品规数：**是指药品在是否由独家供货商配送、临时或正式转换配送企业等不同供货状态下，医院配送企业对应的品规数。该维度包含三个参数，既与药品配送状态是否稳定有关，又关联配送关系的转换模式，体现一定时期内医院药品供货情况的连续变化趋势。

**药品配送集中度：**是指医院配送企业所占份额及品规数的集中或离散程度，该维度从更深层面反映在配送状态及模式的转变过程中，医院药

品供应链的重构趋势。药品配送集中度越高，说明药品供应链趋向优化集中，反之，则趋向离散。

其中，药品价格以涨价品规数、降价品规数、涨幅区间内品规数、降幅区间内品规数为参数；配送品规数以配送企业对应品规数、临时转配送品规数、正式转配送品规数为参数；药品配送集中度以配送企业平均份额、配送企业平均品规数、超过平均份额的配送企业个数、超过平均品规数的配送企业个数为参数。各参数定义及计算方法如下：

**涨价品规数：**在界定的某年度内较前一年度价格上涨的品规数。

**降价品规数：**在界定的某年度内较前一年度价格下降的品规数。

**涨幅区间内品规数：**在设定的药品价格涨幅区间内的品规数。

**降幅区间内品规数：**在设定的药品价格降幅区间内的品规数。

**配送企业对应品规数：**由一家或多家配送企业供货对应的品规数。若某品种只有独家供货商，则为 1 家配送企业对应品规，符合该条件的所有品规数之和，即为 1 家配送企业对应品规数；有 2 家供货商的品规数汇总，即为 2 家配送企业对应品规数；以此类推，分别汇总 3 家、4 家配送企业对应品规数。

**临时转配送品规数：**医院因一家配送企业未到货导致库存不足或断货，为保证临床用药，从另一家配送企业临时采购的品规，则为临时转配送品规，某年度符合该情况的所有品规数之和，即临时转配送品规数。

**正式转配送品规数：**生产企业重新指定配送权，使某一药品由一家配送企业正式转换至另一家配送企业长期供货的品规，则为正式转配送品规，当年符合此情况的品规数之和，即为正式转配送品规数。

**配送企业平均份额：**配送企业在医院所有供货商中占比的平均值，配送企业平均份额 = 当年医院配送企业数量。假设医院有 20 家配送企业，则平均份额为 5%，统计医院当年采购金额占比 > 5% 的配送企业数量，即为超过平均份额的配送企业个数。

**配送企业平均品规数：**每家配送企业供货品规数的平均值，配送企业平均品规数 = 当年医院品规数之和 / 当年医院配送企业数量。假设医院有 1000 个品规，有 20 家配送企业，则平均品规数为 50，统计当年供货品规数 > 50 的配送企业

数量，即为超过平均品规数的配送企业个数。

### 1.3 统计学分析方法

采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析。“两票制”政策实施前后的药品价格、配送企业对应品规数、转配送品规数等各项参数采用  $\chi^2$  检验进行比较。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 “两票制”对医院药品价格的影响

**2.1.1 药品价格变化情况** 表 1 结果显示，“两票制”对药品价格有显著影响。其中，涨价品规数占比逐年显著下降，降价品规数先减少后明显增加 ( $P < 0.05$ )。

**2.1.2 药品涨幅及降幅情况** 由表 2 看出，涨幅  $\alpha > 1000\%$  的品规数占比最高，其余多数涨幅区

表 1 “两票制”实施前后药品价格情况 [n(%)]

Tab 1 Drug prices before and after the implementation of “Two-vote system” [n(%)]

时间	品规数量		
	价格不变	涨价	降价
实施前一年 (n = 936)	570 (60.90)	112 (11.96)	254 (27.14)
实施后第一年 (n = 955)	720 (75.39)	94 (9.84)	141 (14.76)
实施后第二年 (n = 976)	679 (69.57)	73 (7.45)	224 (22.95)
实施后第三年 (n = 996)	683 (68.57)	65 (6.77)	248 (24.90)
实施后第四年 (n = 1048)	701 (66.89)	59 (5.63)	288 (27.48)
实施后第五年 (n = 1067)	712 (66.73)	51 (4.78)	304 (28.50)

注 (Note):  $\chi^2 = 59.3156, P < 0.05$ .

间内品规数占比在“两票制”实施后第五年下降。

表 3 结果显示，各降幅区间内品规数占比变化趋势不明显。

表 2 “两票制”实施前后药品涨幅情况 [n(%)]

Tab 2 Range of increase before and after the implementation of “Two-vote system” [n(%)]

时间	涨幅区间内的品规数 (占涨价品规数比例)							
	$\alpha < 50\%$	$50\% < \alpha \leq 100\%$	$100\% < \alpha \leq 200\%$	$200\% < \alpha \leq 300\%$	$300\% < \alpha \leq 400\%$	$400\% < \alpha \leq 500\%$	$500\% < \alpha \leq 1000\%$	$\alpha > 1000\%$
实施前一年 (n = 112)	8 (7.14)	10 (8.93)	3 (4.11)	9 (8.04)	9 (8.04)	8 (7.14)	13 (11.61)	26 (23.21)
实施后第一年 (n = 94)	11 (11.70)	3 (3.19)	3 (4.11)	8 (8.51)	4 (4.26)	4 (4.26)	9 (9.57)	45 (47.87)
实施后第二年 (n = 73)	3 (4.11)	3 (4.11)	13 (17.81)	6 (8.22)	4 (5.48)	1 (1.37)	10 (13.70)	33 (45.21)
实施后第三年 (n = 65)	3 (4.62)	4 (6.15)	6 (8.22)	5 (7.69)	4 (6.15)	1 (1.52)	12 (18.46)	24 (36.92)
实施后第四年 (n = 59)	4 (6.78)	3 (5.08)	4 (5.48)	5 (8.47)	3 (5.08)	2 (3.39)	13 (22.03)	19 (32.20)
实施后第五年 (n = 51)	2 (3.92)	1 (1.96)	33 (45.21)	4 (7.84)	2 (3.92)	1 (1.96)	10 (19.61)	22 (43.14)

表 3 “两票制”实施前后药品降幅情况 [n(%)]

Tab 3 Range of decrease before and after the implementation of “Two-vote system” [n(%)]

时间	降幅区间内品规数 (占降价品规数比例)							
	$\alpha < 50\%$	$50\% < \alpha \leq 100\%$	$100\% < \alpha \leq 200\%$	$200\% < \alpha \leq 300\%$	$300\% < \alpha \leq 400\%$	$400\% < \alpha \leq 500\%$	$500\% < \alpha \leq 1000\%$	$\alpha > 1000\%$
实施前一年 (n = 112)	24 (9.45)	18 (7.09)	23 (9.06)	21 (8.27)	23 (9.06)	8 (3.15)	40 (15.75)	93 (36.61)
实施后第一年 (n = 94)	11 (7.80)	7 (4.96)	14 (9.93)	18 (12.77)	15 (10.64)	15 (10.64)	30 (21.28)	29 (20.57)
实施后第二年 (n = 73)	17 (7.59)	20 (8.93)	17 (7.59)	16 (7.14)	18 (8.04)	9 (4.02)	42 (18.75)	85 (37.95)
实施后第三年 (n = 65)	18 (7.26)	22 (8.87)	15 (6.05)	20 (8.06)	23 (9.27)	8 (3.23)	44 (17.74)	98 (39.52)
实施后第四年 (n = 59)	21 (7.29)	25 (8.68)	14 (4.86)	23 (7.99)	25 (8.68)	11 (3.82)	49 (17.01)	120 (41.67)
实施后第五年 (n = 51)	22 (7.24)	27 (8.89)	17 (5.59)	27 (8.89)	24 (7.89)	13 (4.28)	52 (17.11)	122 (40.13)

### 2.2 “两票制”对配送品规数的影响

**2.2.1 配送企业品规数** 表 4 显示，“两票制”对配送企业品规数有显著影响，由 1 家配送企业对应品规数占比减少，由多家配送企业对应品规数比例增加 ( $P < 0.05$ )。

**2.2.2 “两票制”对转配送品规数的影响** 表 5 显示，“两票制”对转配送品规数影响显著，临时转配送品规数比例、正式转配送品规数比例均在“两票制”实施后的前两年先增加，随后减少 ( $P < 0.05$ )。

### 2.3 “两票制”对药品配送集中度的影响

表 6 及表 7 显示，“两票制”实施后，配送企

业平均份额及配送企业平均品规数逐年上升，超过平均份额及平均品规数的配送企业增加。

## 3 讨论

“两票制”政策是国务院出台的一项重大决策，其目的是支持医疗服务价格改革，从流通领域要红利。当前，医疗机构的改革重在破除以药养医的传统机制，一方面取消了药品加成，另一方面通过招标采购来压缩药品价格空间。随着国家医改步伐加快，一致性评价、飞行检查等手段从源头上提高了市场准入门槛，国家适时推出“两票制”政策，以期从终端上严格监管药品使用，降低药品价格、保持医疗机构的良性运转。

表 4 “两票制”实施前后配送企业对应品规数 [n(%)]

Tab 4 Numbers corresponding to enterprises before and after the implementation of “Two-vote system” [n(%)]

时间	品规数			
	1 家配送企业	2 家配送企业	3 家配送企业	4 家配送企业
实施前一年 (n = 976)	956 (97.95)	17 (1.74)	1 (0.10)	2 (0.20)
实施后第一年 (n = 955)	901 (94.35)	48 (5.03)	5 (0.52)	1 (0.10)
实施后第二年 (n = 936)	865 (92.41)	55 (5.88)	15 (1.60)	1 (0.11)
实施后第三年 (n = 996)	878 (88.12)	59 (5.97)	20 (2.02)	39 (3.92)
实施后第四年 (n = 1048)	901 (85.98)	66 (6.28)	31 (2.93)	50 (4.77)
实施后第五年 (n = 1067)	872 (81.74)	76 (7.09)	36 (3.35)	83 (7.78)

注 (Note):  $\chi^2 = 59.3156, P < 0.05$ 。

表 5 “两票制”实施前后转配送品规数 [n(%)]

Tab 5 Numbers of trans-distribution before and after the implementation of “Two-vote system” [n(%)]

时间	品规数		
	未转配送	临时转配送	正式转配送
实施前一年 (n = 976)	942 (96.52)	19 (1.95)	15 (1.54)
实施后第一年 (n = 955)	886 (92.77)	53 (5.55)	16 (1.68)
实施后第二年 (n = 936)	855 (91.35)	71 (7.59)	19 (2.07)
实施后第三年 (n = 996)	934 (93.78)	52 (5.22)	10 (1.01)
实施后第四年 (n = 1048)	1007 (96.09)	33 (3.11)	8 (0.78)
实施后第五年 (n = 1067)	1044 (97.84)	17 (1.59)	6 (0.59)

注 (Note):  $\chi^2 = 34.16, P < 0.05$ 。

表 6 “两票制”实施前后配送企业平均份额及品规数情况

Tab 6 Average share and numbers before and after the implementation of “Two-vote system”

时间	配送企业平均份额 /%	配送企业平均品规数
实施前一年	3.12	28.36
实施后第一年	3.20	31.83
实施后第二年	3.35	34.86
实施后第三年	4.27	37.09
实施后第四年	4.96	39.21
实施后第五年	5.73	41.83

表 7 “两票制”实施前后超过平均份额及品规数的配送企业情况 [n(%)]

Tab 7 Enterprises exceeding average share and numbers before and after the implementation of “Two-vote system” [n(%)]

时间	超过平均份额的配送	超过平均品规数的配
	企业个数	送企业个数
实施前一年	9 (71.69)	4 (48.61)
实施后第一年	10 (74.13)	7 (65.03)
实施后第二年	11 (82.89)	8 (69.20)
实施后第三年	13 (83.21)	10 (71.20)
实施后第四年	14 (84.72)	11 (72.32)
实施后第五年	16 (86.19)	11 (72.32)

本研究表明,“两票制”政策能够抑制大部分药品涨价,分析原因:一是,“两票制”政策增加了监管机构对药品从生产到使用全过程的掌控力度,医院药品价格更透明;二是,对于山东省药品招标采购平台规定最高限价的品种,医院采用招标议价模式,加大二次议价力度,以低价中选

的原则进行院内招标,从而挤掉一部分价格虚报的水分<sup>[3]</sup>;三是,“两票制”缩减了不必要的流通环节,使药品流通全流程更为简洁可控,流通渠道的合并归拢,使节省下来的资金一部分流向更大规模的配送企业,通过企业竞争促使实力雄厚的供货企业更加有话语权<sup>[4]</sup>。但本研究也发现,“两票制”实施后,少部分大幅涨价的药品比实施前增加,这一研究结论与文献基本一致<sup>[1, 5-6]</sup>。可能的原因:一是,该部分药品往往是临床用量小,难采购的必需品种,如鱼精蛋白注射液,原料稀缺,存在原料垄断,由于政策性因素,这些品种在山东省招标采购平台的中标价很低,但流通企业供货价格远高于此,或者供货品种并非招标挂网的产地,医院为保证临床用药,不得不高于中标价或在平台之外采购<sup>[7]</sup>;二是,传统的“底价代理”模式只能依靠过票企业,上下游的运作都需要大量资金投入,而“两票制”使药品代理人排除在药品流通渠道之外,靠走票、挂靠生存的小型流通企业被淘汰,流通环节的各种费用全部上溯到生产企业,倒逼生产企业将药品出厂价格由“底价代理”模式转变为“高开返佣”<sup>[1, 3, 8-9]</sup>;三是,“两票制”实施后,流通企业增加了对接生产企业、核对票据、在电子系统上传纸质票据信息等大量工作,人力财力等各种成本增加<sup>[4, 9]</sup>。

“两票制”政策的影响不仅体现在药品价格



上, 还显著影响配送品规数。本研究显示, “两票制” 实施后, 独家配送企业减少, 多家配送企业对应的品规数比例增加, 这反映出供货不稳定。分析原因, 首先, “两票制” 实施后, 生产企业与流通企业之间的关系发生了根本性转变, 过票行为受到严厉打击, 资金的拖欠方变成了生产企业, 而流通企业需先垫付货款, 因投入和回报之间的风险加大, 可能减少备货, 导致药品供货不及时<sup>[1, 9]</sup>; 其次, 个别承诺执行“两票制”的配送企业在实际供货时不符合“两票制”, 医疗机构按照要求不能违规采购, 导致药品断货; 再者, 生产企业勾选的唯一配送企业并非医院原有供货商, 医院不得不走程序申请重新开户, 导致供货延迟。但另一个角度, 当一家配送企业供货不足时, 医疗机构有更多选择, 可从其他配送企业获取所需药品, 在一定程度上可缓解药品缺货的影响。本研究还表明, 临时转配送及正式转配送品规数比例均先增加后减少, 这说明在药品供货稳定性波动的同时, 配送关系经历了重构过程, 药品断货状况渐趋平稳<sup>[7-10]</sup>。分析原因, 可能是医疗机构为加强对药品供应链的管理, 更倾向于与配送企业建立长期稳定的合作关系, 这促使原来基于各自商业考虑的流通企业不得不进行渠道整合优化、产品合理布局, 药品流通渠道在经历调整后相对集中, 使大型配送企业的资金有了保证, 从而能够保障医疗机构药品供货及时。

此外, 本研究发现, “两票制” 也显著影响药品配送集中度。在政策实施后, 配送企业平均份额及平均品规数、超过平均份额及平均品规数的配送企业数量均增加。研究发现, “两票制” 实施后, 较大规模配送企业份额排名大幅上升。如“两票制” 实施前排名第 19 位、第 20 位的 2 家流通企业, 在“两票制” 实施后第二年份额分别升至第 9 位、第 7 位。药品配送集中度提高, 意味着药品供应链发生了深刻转变。这是由于医院可能需要建立新的配送关系, 以保证原有品规继续供应, 考虑供货方服务资质和水平、供货信誉和能力, 对配送企业的评估和筛选有更高要求; 再者, 对于无法供货品种, 医院可能选择其他生产企业的同类药品, 实现可替代品规更新<sup>[11]</sup>, 这都促使配送企业份额及品规数向实力更强的大型流通企业集中, 它们能够覆盖更广的配送区域, 更容易与上游企业建立信任, 获得更多生产企业配送权<sup>[11-14]</sup>。

当前, “两票制” 政策成效凸显, 压缩了中间环节, 降低了医院运营成本。对少数药品价格大

幅波动的状况, 建议医疗机构稳定和优化药品配送渠道, 形成竞争报价态势, 加强与政府部门的沟通合作, 及时反映遇到的困难, 争取更多支持和帮助; 药品供货稳定性方面, 流通企业应做好布局谋篇, 修正自身问题, 保证及时供货; 同时, 建议政府部门加大价格监管力度, 保障供应稳定, 确保价格合理, 在医改深度和广度上达到目标。

#### 4 结论

综上所述, “两票制” 政策显著影响医院药品供应: 有效控制多数药品价格, 但少量药品涨幅突出; 药品供货初期不稳定, 并渐趋平稳; 药品供应链优化集中。期待监管部门对少数猛涨药品采取有力措施, 进一步降低患者用药负担。

#### 参考文献

- [1] 郭益静, 唐仕炜, 周明勇, 等. “两票制” 政策对四川省某县级医院药品采购的影响 [J]. 中国药业, 2019, 28 (17): 73-75.
- [2] 夏国强. 浅谈“两票制” 对医药批发公司的影响 [J]. 财会学习, 2016, (18): 188-190.
- [3] 吴晶晶, 郑慧凌, 张娜娜, 等. 药品采购“两票制” 背景下医药流通企业的发展 [J]. 医学与社会, 2018, 31 (9): 22-25.
- [4] 黄润青, 段文越, 王游, 等. 医疗机构执行“两票制” 政策过程中存在的问题及对策研究——以云南省为例 [J]. 中国药房, 2018, 29 (24): 3313-3317.
- [5] 黄河, 孙静, 刘远立. “两票制” 药品流通领域改革探讨 [J]. 中国药房, 2017, 28 (18): 2456-2459.
- [6] 胡善联. 药品购销“两票制” 政策的理论和实践 [J]. 卫生经济研究, 2017 (4): 8-10.
- [7] 刘永谦, 朱文思, 陈烁, 等. “两票制” 实施对某三甲医院药品供应和价格的影响分析 [J]. 中南药学, 2021, 9 (19): 1988-1992.
- [8] 李翠翠, 傅鸿鹏. 药品采购“两票制” 实施效果评价研究 [J]. 卫生经济研究, 2018, 5 (373): 49-51.
- [9] 张帆, 王帆, 侯艳红. “两票制” 下药品供应链的重塑和发展 [J]. 卫生经济研究, 2017 (4): 11-15.
- [10] 许日详, 李姝婷, 江伟, 等. 医疗机构实施药品采购“两票制” 政策的效果研究: 以安徽省某三级综合医院为例 [J]. 安徽医药, 2022, 26 (3): 626-629.
- [11] 李洪宇, 孙强. “两票制” 政策对山东省药品供应状况影响分析 [J]. 中国卫生政策研究, 2021, 14 (1): 29-36.
- [12] 张琼英. “两票制” 在某大型三甲医院的实践探讨 [J]. 中国药物经济学, 2018 (10): 105-108.
- [13] 王程程, 徐文, 徐娜, 等. “两票制” 对医药流通企业的影响及应对建议 [J]. 广西医学, 2019, 41 (22): 2944-2946.
- [14] 韩世盛. 两票制背景下医药流通企业融资问题的分析 [D]. 保定: 河北金融学院, 2020.

(收稿日期: 2024-03-05; 修回日期: 2024-04-21)

## 药品不良反应

# 基于 FAERS 数据库的喹硫平不良事件信号挖掘与分析

邓珍珍<sup>1</sup>, 冯灿<sup>2</sup>, 汪江林<sup>1\*</sup> (1. 中南大学湘雅三医院药学部, 长沙 410013; 2. 中南大学湘雅药学院, 长沙 410013)

**摘要:** **目的** 基于美国食品药品监督管理局 (FDA) 不良事件报告系统 (FAERS) 数据库挖掘喹硫平的药物不良事件 (ADE) 信号, 为该药的临床安全使用提供参考。**方法** 检索 FAERS 数据库中 2004 年至 2023 年共 79 个季度关于喹硫平的不良反应报告, 同时采用报告比值比法、比例报告比值法、贝叶斯置信区间神经网络传播法、多重伽马-泊松收缩估计法, 按药物不良事件术语集的首选术语 (PT) 和系统器官分类 (SOC) 对纳入的 ADE 报告进行分类并计算风险信号。**结果** 共收集主要怀疑药物为喹硫平的 ADE 报告 261 725 份, 涉及的患者有 68 012 例, 其中以女性 (37 495 份, 55.13%) 及老年患者 (> 65 岁)(35 312 份, 占 51.9%) 居多, 报告国家以美国为主, 结局多为其他严重后果、住院、死亡和危及患者生命。共挖掘出喹硫平阳性风险信号 PT 713 个, 涉及 SOC 27 个, 所得信号基本与药品说明书一致, 其中报告数最多的 ADE 为糖尿病, 且信号强度较高。报告数超过 500 例的 ADE 中, 共挖掘 47 个阳性风险信号 PT, 其中横纹肌溶解为说明书中未收录的 ADE。喹硫平引起 ADE 发生的时间不一, 常在用药后 30 d 内或用药一年以上发生。**结论** 临床在使用喹硫平时除应在全程关注药品说明书收录的 ADE 外, 还应警惕说明书未提及的 ADE, 并且根据性别、年龄等制订个体化的用药监护方案。

**关键词:** 喹硫平; 美国 FDA 不良事件报告系统; 药物不良事件; 发生时间

中图分类号: R969.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)08-2248-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.048

## Data mining of adverse drug event signals for quetiapine based on FAERS database

DENG Zhen-zhen<sup>1</sup>, FENG Can<sup>2</sup>, WANG Jiang-lin<sup>1\*</sup> (1. Department of Pharmacy, the Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013; 2. Xiangya School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410013)

**Abstract: Objective** To mine adverse drug event (ADE) signals for quetiapine from the FDA Adverse Event Reporting System (FAERS) database, and provide reference for its safe clinical use.

**Methods** We searched the FAERS database for ADE reports related to quetiapine from 2004 to 2023, 79 quarters in total. Several methods were used, including the reporting odds ratio, proportional reporting ratio, Bayesian confidence propagation neural network, and multi-item Gamma poisson shrinker. The ADE reports were categorized and risk signals were grouped based on the preferred terms and system organ classes. **Results** Totally 261 725 ADE reports were collected in which quetiapine was the primary suspect drug, involving 68 012 patients. The majority of these reports came from females (37 495 reports, 55.13%) and over 65 years old (35 312 reports, 51.9%), mainly reported in the United States, with outcome often being other serious consequences, hospitalization, death, or life-threatening conditions. Totally 713 positive risk signals for quetiapine were identified, covering 27 system organ classes, basically consistent with the instruction in the drug package. The most frequently reported ADE was diabetes, with strong signals. Among those ADEs with more than

基金项目: 湖南省自然科学基金项目 (No.2022JJ80043)。

作者简介: 邓珍珍, 女, 硕士, 主管药师, 主要从事医院药学和临床药学研究, email: dengzhen2008.love@163.com \*通信作者: 汪江林, 女, 硕士, 主管药师, 主要从事医院药学和临床药学研究, email: jianglin\_wang@163.com

500 reports, 47 positive risk signals were identified, except rhabdomyolysis, which was not listed in the instruction. The time of ADEs onset induced by quetiapine varied, often occurring within 30 days or a year after the treatment. **Conclusion** Clinicians should not only monitor the ADEs of quetiapine in the instruction but also be vigilant about those not mentioned. Individualized monitoring plans should be catered based on factors such as gender and age.

**Key words:** quetiapine; FAERS; adverse drug event; time of onset

喹硫平 (quetiapine) 是较新的第二代非典型抗精神病药物, 通过拮抗脑内包括多巴胺 2 型受体和 5-羟色胺 2 型受体在内的多种神经递质受体, 从而起到抗精神病、稳定心境、助眠、镇静等作用, 该药于 1997 年获得美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准用于治疗精神分裂症。喹硫平与肌张力障碍和锥体外系副作用的相关性较小, 而且能改善精神病患者受损的认知功能, 因此其被认为是精神分裂症的一线治疗药物, 并逐渐取代经典的抗精神病药物, 在国际上获得广泛认可。后来, 喹硫平又被 FDA 批准用于治疗双相抑郁及躁狂, 以及与锂盐丙戊酸联合用于双相情感障碍的维持治疗<sup>[1]</sup>, 是目前唯一被 FDA 批准, 并在国内外治疗指南中推荐用于双相情感障碍急性期、巩固期和维持期治疗的一线药物<sup>[2-6]</sup>。2022 年国内医疗机构终端销售达 16 亿元人民币, 位居精神镇静类药物销量第三名。除了 FDA 正式批准的适应证外, 喹硫平还经常被超说明书用于治疗包括阿尔茨海默病、广泛性焦虑症、激越、创伤后应激障碍、强迫症以及原发性失眠等疾病。

喹硫平药理学机制及效应复杂, 且其临床应用越来越广泛, 近年来该药的不良反应报告也在不断增多, 常见的不良反应主要为胃肠道系统疾病、神经系统疾病、血液及淋巴系统疾病、心脏器官疾病、代谢和营养类疾病、眼器官疾病、免疫系统疾病、肝胆疾病等, 且约 30% 的病例报告结局严重。但目前仍缺乏基于真实世界数据的喹硫平药物不良事件 (adverse drug event, ADE) 的系统性研究。FDA 的不良事件报告系统 (FAERS) 是世界上最大的药物不良事件数据库之一, 收集了来自世界各地的 ADE 报告, 能够发现新的和潜在的不良反应, 实时跟踪药物不良反应的发生及发展, 并分析这些反应与药物之间的联系及相关程度, 以此来弥补说明书的更新滞后、不确定性和信息不全等问题。因此, 本研究旨在利用 FAERS 数据库, 通过信号检测和统计分析, 全面了解喹硫平在真实世界中 ADE 的发生情况, 为喹硫平的临床应用提供参考。

## 1 资料与方法

### 1.1 资料来源

从 FAERS 数据库中提取 2004 年第一季度至 2023 年第三季度共 79 个季度的原始数据, 每个季度的原始数据都包含 7 张表, 即: 人口统计信息 (DEMO) 表、不良事件记录 (REAC) 表、药物使用记录 (DRUG) 表、治疗结果记录 (OUTC) 表、报告来源 (RPSR) 表、治疗时间 (THER) 表和诊断 (INDI) 表。

### 1.2 方法

**1.2.1 数据清洗** 根据 FDA 推荐的标准进行去重复, 同时通过 PRIMARYID 字段建立数据间的映射关系, 对年龄、体重等异常值进行处理。

**1.2.2 数据标准化** 本研究采用《国际医学科学组织理事会国际医学用语词典》(MedDRA 26.0 版) 中药物不良事件术语集的首选术语 (preferred term, PT) 和系统器官分类 (system organ class, SOC) 对纳入的 ADE 报告进行标准化、汉化及分类。

**1.2.3 数据提取** 以喹硫平的缩写、商品名、Embase 和 PubMed 数据库检索到的主题词和自由词为关键词, 提取以喹硫平为首要怀疑药物的 ADE 报告。

**1.2.4 数据分析与筛选** 本研究采用比例失衡法中的报告比值比法 (reporting odds ratio, ROR) 和比例报告比值法 (proportional reporting ratio, PRR)、贝叶斯法中的贝叶斯置信区间神经网络传播法 (Bayesian confidence propagation neural network, BCPNN) 和多重伽马-泊松收缩估计法 (multi-item gamma Poisson shrinker, MGPS) 同时检测药物的 ADE 信号, 具体方法参考 Zou 等<sup>[7]</sup> 的研究, 其中 ROR、PRR、IC025、EBGM05 数值越大, 表示目标药物与目标 ADE 之间的关联性越强。所有统计分析采用 Microsoft EXCEL 2021 及 R 4.3.2 软件联合完成。

## 2 结果

### 2.1 ADE 报告的情况

在去除重复数据后, 从 FAERS 数据库中收集了以喹硫平为首要怀疑药物的相关 ADE 报告共计 261 725 份, 涉及的患者有 68 012 例, 其中女性占 55.13%, 男性占 38.42%, 性别不清楚的占 6.45%。



ADE 报告中患者的年龄涉及各个阶段, 其中 64 ~ 85 岁年龄段占了一半以上 (35 312 份, 占 51.9%); 报告数据来源于 119 个国家, 其中报告数量前 5 的国家依次为美国、英国、意大利、德国、法国。适应证以产品用于未知适应证、双相情感障碍、抑郁、精神分裂症、焦虑居多; 近 29.42%ADE 的结局为其他严重后果, 其次是住院 (25.01%)、死亡 (10.65%) 和危及生命 (6.63%)。喹硫平相关 ADE 报告的基本信息详见表 1。各年度喹硫平相关 ADE 报告数量呈波动变化, 其中以 2012 年报告数最多, 见图 1。

表 1 喹硫平相关 ADE 报告的基本信息

Tab 1 Characteristics of ADE reports associated with quetiapine				
基本信息	分类	报告例数 / (n)	构成比 / %	
不良事件总数		68 012		
性别	女	37 495	55.13	
	男	26 127	38.42	
年龄 / 岁	未知	4390	6.45	
	< 18	2593	3.81	
	18 ~ 64	1427	2.10	
	64 ~ 85	35 312	51.92	
	> 85	6728	9.89	
	未知	21 952	32.28	
体重 / kg	< 50	1952	2.87	
	50 ~ 100	15 105	22.21	
	> 100	4411	6.49	
	缺失	46 544	68.43	
报告人员	医务人员	37 993	55.86	
	非医务人员	17 419	25.61	
	未知	12 600	18.53	
报告国家 (前 5)	美国	36 063	53.02	
	英国	4732	6.96	
	意大利	4242	6.24	
	德国	4127	6.07	
	法国	2894	4.26	
	未知	20 012	29.42	
不良事件结局	住院	17 007	25.01	
	死亡	7246	10.65	
	危及生命	4508	6.63	
	残疾	2176	3.20	
	先天畸形	506	0.74	
	永久缺陷	749	1.10	
	其他	20 012	29.42	
	未知	15 808	23.24	
	适应证 (前 5)	用于未知适应证	13 741	20.20
		双相情感障碍	11 860	17.44
抑郁		9296	13.67	
精神分裂症		6186	9.10	
焦虑		4774	7.02	

## 2.2 喹硫平 ADE 信号累及的 SOC 分类

按照 Med DRA 26.0 版的 SOC 将有信号的 PT 进行了分类, 得到了 27 个对应 SOC。SOC 的报告频次和占比见表 2, 前 5 位的 SOC 分别是精神病类, 各类神经系统疾病, 各类损伤、中毒及操作并发症, 全身性疾病及给药部位各种反应, 代谢及营养类疾病。在 4 种分析方法中至少满足一个阈值判定标准的 SOC 有 9 个, 包括精神病



图 1 2004 年第一季度至 2023 年第三季度间喹硫平相关 ADE 每年的报告数量

Fig 1 Number of annual reports of quetiapine-related ADEs between the first quarter of 2004 and the third quarter of 2023

类, 各类神经系统疾病, 各类损伤、中毒及操作并发症, 代谢及营养类疾病, 心脏器官疾病, 妊娠期、产褥期及围产期状况, 社会环境, 各种先天性家族性遗传性疾病, 内分泌系统疾病; 其中代谢及营养类疾病是唯一一个同时满足 4 种分析方法阈值判定标准的 SOC。

## 2.3 喹硫平相关 ADE 的信号分析

在 PT 层级下, 同时满足 4 种分析方法阈值判定标准的喹硫平相关 ADE 阳性信号数有 713 个, 共涉及 27 个 SOC。ADE 报告数超过 500 例且同时满足 4 种分析方法阈值判定标准的 PT 有 47 个, 共涉及 10 个 SOC, 详见表 3, 其中喹硫平引起的糖尿病是报告数最多的 PT, 其 ROR 值为 22.91。同时, 在这 47 个 PT 中, 横纹肌溶解是唯一一个药品说明书未提及的且同时满足 4 种分析方法阈值判定标准的 ADE。而 ADE 报告数超过 100 例且同时满足 4 种分析方法阈值判定标准的 PT 有 128 个, 共涉及 15 个 SOC (除上述 9 个 SOC 外, 还涉及生殖系统及乳腺疾病、呼吸系统、胸及纵隔疾病、眼器官疾病、内分泌系统疾病、肾脏及泌尿系统疾病), 得到药品说明书未提及的且同时满足 4 种分析方法阈值判定标准的喹硫平相关 PT 阳性信号除横纹肌溶解外还包括肠胃结石 [ $n = 168$ ;  $ROR (95\%CI) = 41.88 (35.44 \sim 49.48)$ ;  $PRR = 41.85$ ;  $\chi^2 = 5502.94$ ;  $EBGM05 = 30.05$ ;  $IC025 = 3.44$ ]、心肌炎 [ $n = 157$ ;  $ROR (95\%CI) = 3.87 (3.31 \sim 4.54)$ ;  $PRR = 3.87$ ;  $\chi^2 = 327.83$ ;  $EBGM05 = 3.34$ ;  $IC025 = 0.27$ ]、缺血性结肠炎 [ $n = 150$ ;  $ROR (95\%CI) = 5.36 (4.55 \sim 6.30)$ ;  $PRR = 5.35$ ;  $\chi^2 = 516.64$ ;  $EBGM05 = 4.57$ ;  $IC025 = 0.72$ ]。

## 2.4 ADE 发生的时间分布情况

在排除不准确、缺失或未知的发病时间报告后, 对收集的 12 886 例报告进行 ADE 发生的时间分析, 结果如图 2 所示, 大多数病例发生 ADE 是在给药超过 1 年后 ( $n = 4878, 37.86\%$ ), 其次是

表 2 喹硫平 ADE 信号累及的 SOC 分类报告情况

Tab 2 Signals of ADEs of quetiapine at the System Organ Class level in FAERS database

SOC	构成比/%	报告例数	ROR (95%CI)	PRR	$\chi^2$	EBGM05	IC025
精神病类	17.76	46 488	3.61 (3.58 ~ 3.65)	3.15	71 153.11	3.08	- 0.03
各类神经系统疾病	14.99	39 221	1.88 (1.86 ~ 1.91)	1.75	13 734.18	1.73	- 0.86
各类损伤、中毒及操作并发症	11.75	30 762	1.20 (1.18 ~ 1.21)	1.18	887.98	1.16	- 1.43
全身性疾病及给药部位各种反应	10.52	27 524	0.56 (0.55 ~ 0.56)	0.60	8738.85	0.59	- 2.39
代谢及营养类疾病	8.46	22 130	4.21 (4.15 ~ 4.27)	3.94	48 561.57	3.82	0.29
各类检查	6.21	16 241	1.00 (0.98 ~ 1.02)	1.00	0.00	0.98	- 1.67
胃肠系统疾病	6.01	15 733	0.68 (0.67 ~ 0.70)	0.70	2141.26	0.69	- 2.17
各种肌肉骨骼及结缔组织疾病	3.11	8146	0.58 (0.57 ~ 0.59)	0.59	2403.19	0.58	- 2.42
心脏器官疾病	3.10	8126	1.16 (1.14 ~ 1.19)	1.16	176.98	1.13	- 1.46
呼吸系统、胸及纵隔疾病	2.99	7820	0.62 (0.61 ~ 0.64)	0.63	1735.02	0.62	- 2.32
感染及侵袭类疾病	1.98	5180	0.37 (0.36 ~ 0.38)	0.38	5513.96	0.37	- 3.06
血管与淋巴管类疾病	1.87	4902	0.86 (0.84 ~ 0.89)	0.87	103.53	0.84	- 1.87
皮肤及皮下组织类疾病	1.72	4497	0.31 (0.30 ~ 0.32)	0.32	6919.49	0.31	- 3.31
眼器官疾病	1.54	4027	0.78 (0.75 ~ 0.80)	0.78	257.53	0.76	- 2.03
肾脏及泌尿系统疾病	1.40	3673	0.72 (0.69 ~ 0.74)	0.72	400.07	0.70	- 2.13
血液及淋巴系统疾病	1.20	3136	0.71 (0.68 ~ 0.73)	0.71	375.42	0.69	- 2.16
肝胆系统疾病	0.84	2207	0.92 (0.88 ~ 0.96)	0.92	14.60	0.88	- 1.78
生殖系统及乳腺疾病	0.80	2092	0.88 (0.84 ~ 0.91)	0.88	36.88	0.84	- 1.86
妊娠期、产褥期及围产期状况	0.70	1830	1.60 (1.53 ~ 1.68)	1.60	406.26	1.52	- 1.00
社会环境	0.59	1539	1.27 (1.21 ~ 1.34)	1.27	89.10	1.21	- 1.32
各种先天性家族性遗传性疾病	0.48	1268	1.54 (1.45 ~ 1.62)	1.53	234.05	1.45	- 1.05
各种手术及医疗操作	0.44	1149	0.33 (0.31 ~ 0.35)	0.34	1529.83	0.32	- 3.24
内分泌系统疾病	0.37	973	1.49 (1.40 ~ 1.59)	1.49	157.12	1.40	- 1.09
良性、恶性及性质不明的肿瘤 (包括囊状和息肉状)	0.36	932	0.13 (0.12 ~ 0.14)	0.13	5523.97	0.12	- 4.59
耳及迷路类疾病	0.31	810	0.71 (0.66 ~ 0.76)	0.71	96.82	0.66	- 2.16
免疫系统疾病	0.27	697	0.24 (0.22 ~ 0.26)	0.24	1673.65	0.23	- 3.71
产品问题	0.24	621	0.15 (0.14 ~ 0.16)	0.15	2976.01	0.14	- 4.38

在第 1 个月内 ( $n = 3654$ , 28.36%)。随着用药时间的推移, ADE 报告数首先呈明显下降趋势, 但用药 3 个月后, ADE 报告数又呈明显增加的趋势。

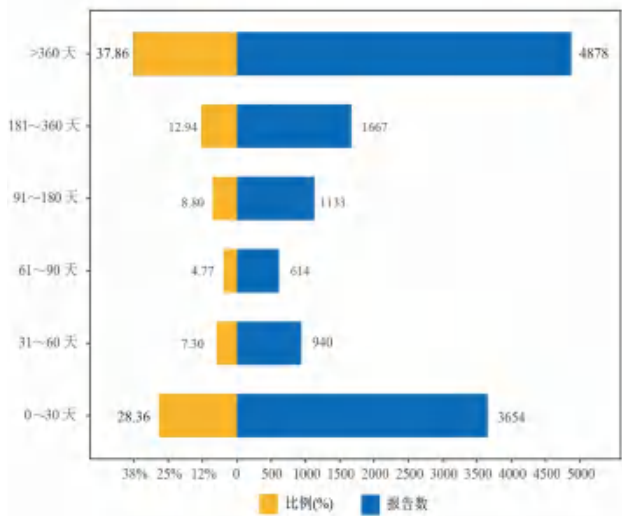


图 2 喹硫平相关 ADE 发生的时间分布情况

Fig 2 Time to onset of ADE associated with quetiapine

### 3 讨论

#### 3.1 喹硫平 ADE 的性别差异

本文对 261 725 份以喹硫平为首要怀疑药物的相关 ADE 报告进行分析和挖掘, 研究结果显

示, 女性 ADE 的报告数明显高于男性, 提示女性发生喹硫平相关 ADE 的风险可能高于男性。既往研究表明, 在所有药物类别中, 女性出现不良反应的风险几乎是男性的两倍, 而且因不良反应而住院的可能性明显更高<sup>[8-9]</sup>, 也有研究结果显示抗精神病药物的不良反应在女性中比在男性中更为普遍和严重<sup>[10-11]</sup>。然而, 喹硫平引起的不良反应存在的性别差异其原因暂不明确, 这可能由多种因素造成<sup>[11]</sup>: ① 男女性激素水平的差异可能影响喹硫平在体内的药代动力学过程, 从而导致相同剂量的药物在女性体内产生更高的血药浓度, 增加女性不良反应发生的风险<sup>[12]</sup>; ② 性别角色和社会心理因素的影响, 女性可能更加关注自己的健康状况, 这使其更可能报告药物不良反应; ③ 喹硫平是脂溶性药物, 女性通常比男性有更高的体脂比例<sup>[13]</sup>, 这可能会导致女性体内的药物累积更多, 从而增加不良反应在女性中的发生风险; ④ 女性比男性更有可能同时使用多种药物, 数据显示女性平均每年使用的药物种类为 5 种, 而男性平均每年使用的药物种类为 3.7 种, 这可能进一步增加了女性发生 ADE 的风险<sup>[14]</sup>。

#### 3.2 喹硫平 ADE 的年龄分布差异

从年龄分布上看, 小于 18 岁及 18 ~ 64 岁之

表 3 喹硫平 ADE 报告数在 500 例以上且满足 4 种分析方法阈值判定标准的 PT 信号强度

Tab 3 PT signal intensity with more than 500 ADE reports of quetiapine meeting the threshold criteria of 4 analytical methods

SOC	PT	构成比/%	报告例数	ROR (95%CI)	PRR	$\chi^2$	EBGM05	IC025
代谢及营养类疾病	糖尿病	2.63	6875	22.91 (22.34 ~ 23.50)	22.33	125 702.62	19.70	2.66
精神病类	失眠	1.46	3813	3.34 (3.24 ~ 3.45)	3.31	6062.75	3.18	0.04
各类损伤、中毒及操作并发症	各种制剂毒性	1.43	3744	4.97 (4.81 ~ 5.14)	4.91	11 418.35	4.69	0.60
各类神经系统疾病	嗜睡	1.35	3545	4.21 (4.07 ~ 4.35)	4.17	8375.20	3.99	0.37
代谢及营养类疾病	2 型糖尿病	1.24	3238	24.47 (23.58 ~ 25.38)	24.18	63 950.21	20.94	2.77
胃肠系统疾病	胰腺炎	1.12	2937	13.81 (13.30 ~ 14.34)	13.67	32 225.17	12.43	2.02
精神病类	药物滥用	0.91	2388	6.81 (6.54 ~ 7.09)	6.76	11 328.43	6.34	1.05
精神病类	实施自杀行为	0.89	2331	9.33 (8.95 ~ 9.73)	9.26	16 398.57	8.57	1.48
全身性疾病及给药部位各种反应	药物相互作用	0.89	2328	3.44 (3.30 ~ 3.59)	3.42	3926.12	3.26	0.09
精神病类	自杀既遂	0.89	2324	6.39 (6.13 ~ 6.66)	6.34	10 129.08	5.96	0.96
各类损伤、中毒及操作并发症	有意用药过量	0.81	2124	8.05 (7.71 ~ 8.41)	8.00	12 495.64	7.44	1.28
各类损伤、中毒及操作并发症	有意误用产品	0.71	1861	3.90 (3.72 ~ 4.08)	3.88	3899.23	3.67	0.27
精神病类	自杀想法	0.65	1699	4.36 (4.16 ~ 4.58)	4.34	4281.68	4.10	0.43
精神病类	酣睡	0.58	1524	27.82 (26.36 ~ 29.36)	27.67	34 258.27	23.25	2.94
精神病类	激越	0.54	1412	4.35 (4.13 ~ 4.59)	4.33	3542.35	4.07	0.42
各类神经系统疾病	昏迷	0.52	1366	6.78 (6.43 ~ 7.16)	6.75	6475.16	6.27	1.05
各类检查	心电图 QT 间期延长	0.47	1236	8.31 (7.85 ~ 8.80)	8.28	7589.47	7.61	1.33
各类神经系统疾病	神经抑制剂恶性综合征	0.47	1236	27.36 (25.77 ~ 29.04)	27.23	27 367.40	22.81	2.92
心脏器官疾病	心动过速	0.47	1224	3.26 (3.08 ~ 3.45)	3.25	1875.47	3.06	0.02
代谢及营养类疾病	酮症酸中毒	0.45	1174	44.55 (41.80 ~ 47.47)	44.35	40 439.85	34.36	3.51
代谢及营养类疾病	高血糖症	0.45	1172	7.65 (7.21 ~ 8.11)	7.62	6482.75	7.01	1.21
代谢及营养类疾病	糖尿病酮症酸中毒	0.43	1133	11.62 (10.94 ~ 12.34)	11.58	10 330.58	10.44	1.79
各类检查	血胆固醇升高	0.43	1133	5.95 (5.61 ~ 6.31)	5.93	4505.33	5.50	0.87
各类神经系统疾病	镇静	0.41	1073	10.89 (10.24 ~ 11.58)	10.85	9084.53	9.80	1.70
各类神经系统疾病	意识水平下降	0.40	1049	6.22 (5.85 ~ 6.61)	6.20	4434.08	5.73	0.93
各类神经系统疾病	迟发性运动障碍	0.39	1019	7.78 (7.31 ~ 8.29)	7.76	5769.80	7.11	1.24
精神病类	故意的自我伤害	0.38	993	9.91 (9.30 ~ 10.56)	9.88	7538.54	8.95	1.57
精神病类	攻击	0.35	924	4.18 (3.91 ~ 4.46)	4.17	2178.78	3.88	0.37
代谢及营养类疾病	糖尿病控制不佳	0.35	919	12.61 (11.79 ~ 13.48)	12.57	9187.12	11.21	1.90
各类神经系统疾病	运动障碍	0.33	867	4.99 (4.67 ~ 5.34)	4.98	2688.74	4.61	0.62
代谢及营养类疾病	肥胖	0.33	861	14.48 (13.51 ~ 15.52)	14.43	10 015.50	12.73	2.09
各类神经系统疾病	糖尿病神经病变	0.30	782	41.11 (38.05 ~ 44.41)	40.99	25154.49	31.84	3.42
精神病类	双相障碍	0.29	748	16.32 (15.14 ~ 17.58)	16.27	9888.67	14.17	2.25
各类神经系统疾病	糖尿病昏迷	0.28	742	77.57 (71.23 ~ 84.48)	77.36	39 898.89	51.65	4.13
精神病类	精神障碍	0.28	726	3.94 (3.66 ~ 4.24)	3.93	1558.07	3.64	0.29
精神病类	精神病性障碍	0.26	685	5.46 (5.06 ~ 5.89)	5.44	2417.42	4.99	0.75
代谢及营养类疾病	1 型糖尿病	0.26	671	28.21 (26.01 ~ 30.59)	28.14	15 324.62	23.06	2.96
精神病类	躁狂	0.24	638	9.22 (8.51 ~ 9.98)	9.20	4448.98	8.25	1.48
精神病类	躁动	0.24	616	3.88 (3.59 ~ 4.21)	3.88	1290.30	3.57	0.27
各类神经系统疾病	构音不全	0.23	611	3.76 (3.47 ~ 4.08)	3.75	1212.00	3.46	0.22
妊娠期、产褥期及围产期状况	妊娠糖尿病	0.23	604	35.29 (32.36 ~ 38.49)	35.21	16 974.77	27.83	3.24
各种肌肉骨骼及结缔组织疾病	横纹肌溶解	0.22	588	3.33 (3.07 ~ 3.62)	3.33	941.92	3.07	0.05
精神病类	惊恐发作	0.21	546	3.51 (3.23 ~ 3.82)	3.51	960.86	3.22	0.13
各类检查	血三酰甘油升高	0.21	541	7.12 (6.53 ~ 7.76)	7.10	2737.58	6.41	1.12
代谢及营养类疾病	高脂血症	0.21	540	10.22 (9.37 ~ 11.15)	10.20	4258.53	9.06	1.62
各类神经系统疾病	锥体外系疾病	0.21	537	4.58 (4.20 ~ 4.99)	4.57	1464.12	4.18	0.50
各类神经系统疾病	肌张力障碍	0.20	513	5.90 (5.41 ~ 6.45)	5.89	2023.09	5.34	0.86

间 ADE 的报告数分别为 2593 和 1427, 64 ~ 85 岁 ADE 的报告数超过一半, 大于 85 岁 ADE 的报告数 6728, 这表明 64 ~ 85 岁患者发生 ADE 的相对风险较其他年龄组高。出现这一现象的原因包括: ① 老年人体内药物代谢和排泄的速度会变慢, 导致药物在体内积累, 从而增加不良反应的发生风险。富马酸喹硫平的说明书中提到老年人喹硫平

的平均清除率较 18 ~ 65 岁成年人低 30% ~ 50%, 另有研究显示 70 岁以上老年人喹硫平的血药浓度较 18 ~ 69 岁成年人高了 67%<sup>[15]</sup>; ② 老年人常患有多种慢性疾病而需长期服用多种药物, 这可能会导致药物相互作用, 从而增加不良反应的发生风险; ③ 由于老年人的生理处于自然衰老过程, 导致其对药物的敏感性可能增加而对药物的耐受性可



能降低。因此，在为老年患者开具喹硫平等药物时，医师需要综合考虑上述因素，适当调整剂量，以确保治疗的安全性和有效性。

### 3.3 喹硫平 ADE 累及系统器官的特点

喹硫平 ADE 的 SOC 层级分析结果与其说明书基本一致，说明本研究具有一定的可信度。在喹硫平相关 ADE 信号所涉及的 27 个 SOC 中，精神类疾病的报告数最多，明显高于其他 SOC，提示该 SOC 的 ADE 在临床中最为常见，用药期间应加以关注。本次喹硫平相关 ADE 的 SOC 层级分析结果中也存在与说明书不一致的地方，说明书中描述的胃肠系统疾病如口干、呕吐、消化不良、便秘是比较常见的，但本研究的真实世界数据分析发现这几个胃肠系统疾病报告的病例数并不多，这可能与报告偏倚有关。本研究中 SOC 层级排名第 5 的代谢及营养类疾病是唯一一个同时满足 4 种分析方法阈值判定标准的 SOC，主要表现为糖尿病、高血糖症、高脂血症、代谢综合征、体质量异常、肥胖、体重过大及食欲增加等，基本与喹硫平说明书描述一致，其中糖尿病是喹硫平相关 ADE 报告中发生频次最高的代谢及营养类疾病。研究显示拮抗组胺受体和 5-羟色胺受体在抗精神病药诱导高血糖中起核心作用<sup>[16]</sup>，喹硫平对组胺 H1 受体和 5-羟色胺 2C 受体都有相当大的亲和力<sup>[17]</sup>，因此喹硫平引起糖代谢异常的机制可能与其可阻断组胺 H1 受体和 5-羟色胺 2C 受体有关<sup>[18]</sup>。

### 3.4 喹硫平 ADE 信号分析

在 ADE 报告数超过 500 例且同时满足 4 种分析方法阈值判定标准的 47 个 PT 中，有 46 个 PT 在药品说明书中都有提及，挖掘出常见的不良反应多数也与说明书具有一致性，比如糖尿病、体重增加、嗜睡、头晕等，但本研究中报告数排在第 2 位的失眠及第 8 位的胰腺炎均不是说明书中常见的不良反应，因此在临床应用中也要警惕。此外，该药说明书中警示的自杀意念及自杀行为风险，在本研究 ADE 报告数中排位靠前，分别为第 12 位和第 14 位，提示自杀意念及自杀行为在应用喹硫平期间也较为常见，因此使用喹硫平期间应针对自杀意念及自杀行为予以密切监测。在这 47 个 PT 中，只有横纹肌溶解是喹硫平药品说明书中未提及的阳性 PT，其报告数达到了 588 例，国内外已有多例关于喹硫平引起横纹肌溶解的报道<sup>[19]</sup>，这说明喹硫平可能具有潜在的肌毒性，不过一项汇总了 12 例喹硫平相关横纹肌溶解的研究显示，出现喹硫平相关横纹肌溶解的患者在立即停用喹硫平并接受支持治疗后均可康复<sup>[19]</sup>。在 ADE 报告数超过 100 例且同时满足

4 种分析方法阈值判定标准的阳性 PT 中，除横纹肌溶解外，心肌炎、缺血性结肠炎、肠胃结石 3 个阳性 PT 也在喹硫平药品说明书中未提及。喹硫平相关心肌炎在本研究中只有 157 例，国内外也只有极少数的个案报道<sup>[20-22]</sup>。对于喹硫平相关缺血性结肠炎近年来也有病例报道<sup>[23-24]</sup>，这可能是通过其抗胆碱能作用降低肠道运动，引起结肠梗阻和随之而来的结肠扩张<sup>[25]</sup>，严重的粪便潴留可能会进一步恶化上述情况，导致受影响部位出现气体和细菌的过度增殖，最终可能导致组织坏死和全身败血症。

### 3.5 喹硫平 ADE 的发生时间分布情况

本研究结果显示，开始服用喹硫平至发生 ADE 从一日至数月不等，只有 28.36% 的病例在用药第 1 个月内发生 ADE，总体中位发生时间为 186 d。张明等<sup>[26]</sup>对已报告的 359 例喹硫平相关 ADE 进行了汇总，结果显示，26.18% 的患者发生于用药第 1 周，16.43% 的患者发生于用药第 2 周，177 例 49.30% 发生于用药 2 周以上，这与本研究结果存在差异，可能与该研究的病例数较少有关。鉴于喹硫平相关 ADE 发生时间的不确定性，建议在临床使用该药物的整个过程中关注其不良反应。

### 3.6 局限性

本研究利用 FAERS 数据库来挖掘和分析真实世界中发生的喹硫平相关 ADE，分析揭示了与喹硫平使用相关的一些关键 ADE 信息，并为药品说明书补充了一些迟发或罕见的 ADE，但本研究也存在一些局限性和不足：① 本研究收集的 ADE 报告主要来自欧美国家，其他国家或地区的数据稀少，其结果可能不适用于其他国家或地区，因为不同地区的患者群体、医疗实践和报告习惯可能存在显著差异；② FAERS 数据库为自发呈报系统，其数据上报质量参差不齐，存在漏报、误报、选择性报告、少报、信息不全等情况，这可能会导致研究结果存在偏倚；③ 本研究使用的分析方法挖掘的风险信号也仅提示喹硫平与 ADE 存在统计学关联，不能明确两者之间的因果关系。

### 3.7 结论

综上所述，本研究利用 FAERS 数据库较全面地对真实世界中发生的喹硫平相关 ADE 进行了信号挖掘和分析，结果显示喹硫平相关 ADE 涉及 27 个 SOC，报告数超过 500 例的 ADE 中，达到 4 种分析方法阳性标准的 ADE 共 47 个，这些 ADE 基本与说明书一致，只有横纹肌溶解为说明书中未收录的 ADE，这在一定程度上补充了喹硫平的安全性数据，也为临床安全用药提供了参考依据。同时需要注意的是，喹硫平引起的

ADE 发生风险可能存在年龄和性别差异, 老年人及女性可能更易发生, 因此医务工作者更应重视老年人及女性患者使用该药的安全性。此外, 由于喹硫平引起 ADE 发生的时间不一, 因此在该药使用的整个过程中都应监测其安全性。尽管本研究为喹硫平在临床的安全使用提供了一些有价值的依据, 但由于本研究的局限性, 因此未来还需进一步的临床研究加以验证。

### 参考文献

- [1] Quetiapine indications: FDA-approved and off-label uses [2024-4]. <https://psychopharmacologyinstitute.com/publication/quetiapine-indications-fda-approved-and-off-label-uses-2112>.
- [2] UK NCCF. Bipolar Disorder: The NICE Guideline on the Assessment and Management of Bipolar Disorder in Adults, Children and Young People in Primary and Secondary Care [M]. London: The British Psychological Society and The Royal College of Psychiatrists, 2014.
- [3] Yatham LN, Kennedy SH, Parikh SV, et al. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) and International Society for Bipolar Disorders (ISBD) 2018 guidelines for the management of patients with bipolar disorder [J]. *Bipolar Disord*, 2018, 20 (2): 97-170.
- [4] Sakurai H, Kato M, Yasui-Furukori N, et al. Pharmacological management of bipolar disorder: Japanese expert consensus [J]. *Bipolar Disord*, 2020, 22 (8): 822-830.
- [5] Wang Z, Zhang DH, Du YL, et al. Efficacy of quetiapine monotherapy and combination therapy for patients with bipolar depression with mixed features: a randomized controlled pilot study [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2023, 16 (2): 287.
- [6] 于欣, 方贻儒. 中国双相障碍防治指南 [M]. 北京: 中华医学电子音像出版社, 2015.
- [7] Zou F, Cui ZW, Lou SY, et al. Adverse drug events associated with linezolid administration: a real-world pharmacovigilance study from 2004 to 2023 using the FAERS database [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1338902.
- [8] Nakagawa K, Kajiwara A. Female sex as a risk factor for adverse drug reactions [J]. *Nihon Rinsho*, 2015, 73 (4): 581-585.
- [9] Tharpe N. Adverse drug reactions in women's health care [J]. *J Midwifery Womens Health*, 2011, 56 (3): 205-213.
- [10] Ercis M, Sanchez-Ruiz JA, Webb LM, et al. Sex differences in effectiveness and adverse effects of mood stabilizers and antipsychotics: a systematic review [J]. *J Affect Disord*, 2024, 352: 171-192.
- [11] Seeman MV. The pharmacodynamics of antipsychotic drugs in women and men [J]. *Front Psychiatry*, 2021, 12: 650904.
- [12] Castberg I, Westin AA, Skogvoll E, et al. Effects of age and gender on the serum levels of clozapine, olanzapine, risperidone, and quetiapine [J]. *Acta Psychiatr Scand*, 2017, 136 (5): 455-464.
- [13] Power ML, Schulkin J. Sex differences in fat storage, fat metabolism, and the health risks from obesity: possible evolutionary origins [J]. *Br J Nutr*, 2008, 99 (5): 931-940.
- [14] Manteuffel M, Williams S, Chen W, et al. Influence of patient sex and gender on medication use, adherence, and prescribing alignment with guidelines [J]. *J Womens Health (Larchmt)*, 2014, 23 (2): 112-119.
- [15] Castberg I, Skogvoll E, Spigset O. Quetiapine and drug interactions: evidence from a routine therapeutic drug monitoring service [J]. *J Clin Psychiatry*, 2007, 68 (10): 1540-1545.
- [16] Holt R. Association between antipsychotic medication use and diabetes [J]. *Curr Diab Rep*, 2019, 19 (10): 96.
- [17] Correll CU. From receptor pharmacology to improved outcomes: individualising the selection, dosing, and switching of antipsychotics [J]. *Eur Psychiatry*, 2010, 25 (Suppl 2): S12-S21.
- [18] Montastruc F, Palmaro A, Bagheri H, et al. Role of serotonin 5-HT<sub>2C</sub> and histamine H<sub>1</sub> receptors in antipsychotic-induced diabetes: a pharmacoepidemiological-pharmacodynamic study in VigiBase [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2015, 25 (10): 1556-1565.
- [19] Heng G, Soh TH, Kwok C. Rhabdomyolysis associated with mirtazapine and quetiapine therapy: a case report and review of the literature [J]. *Cureus*, 2024, 16 (2): e53428.
- [20] Wassef N, Khan N, Munir S. Quetiapine-induced myocarditis presenting as acute STEMI [J]. *BMJ Case Rep*, 2015, 2015: bcr2014207151.
- [21] Roesch-Ely D, Van Einsiedel R, Kathofer S, et al. Myocarditis with quetiapine [J]. *Am J Psychiatry*, 2002, 159 (9): 1607-1608.
- [22] Bhogal S, Ladia V, Paul TK. Quetiapine-associated myocarditis [J]. *Am J Ther*, 2018, 25 (5): e578-e579.
- [23] Vernay J. Quetiapine-induced ischemic colitis. A case report [J]. *Presse Med*, 2015, 44 (5): 538-541.
- [24] Arkfeld DV, Svingen LA, Sutton S, et al. Repeat ischemic colitis in a patient taking quetiapine [J]. *Prim Care Companion CNS Disord*, 2018, 20 (6): 17102250.
- [25] Dome P, Teleki Z, Kotanyi R. Paralytic ileus associated with combined atypical antipsychotic therapy [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2007, 31 (2): 557-560.
- [26] 张明, 张捷, 周木子, 等. 359 例喹硫平药品不良反应文献分析 [J]. *中国药业*, 2020, 29 (18): 26-28.

(收稿日期: 2024-01-08; 修回日期: 2024-04-03)



## 替雷利珠单抗治疗晚期非小细胞肺癌致免疫相关性胰腺炎 1 例

谢杏梅, 高悦\* (上海交通大学医学院附属松江医院药剂科, 上海 201600)

关键词: 替雷利珠单抗; 免疫检查点抑制剂; 不良反应; 免疫相关性胰腺炎

中图分类号: R969.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2024)08-2255-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.049

免疫检查点抑制剂 (ICIs) 在许多肿瘤免疫治疗领域中取得了突破性进展, 通过抑制 T 细胞信号, 使 T 细胞重新被激活, 清除肿瘤细胞。当免疫反应异常增强, 也会攻击自体正常细胞或组织, 引发免疫相关性不良反应 (irAEs)<sup>[1-2]</sup>。本文报道了 1 例替雷利珠单抗治疗晚期非小细胞肺癌致免疫相关性胰腺炎的治疗经过, 以期增加临床对此类不良反应的认识和处理经验。

### 1 病例资料

患者, 男, 59 岁, 身高 172 cm, 体重 65 kg, 2017 年 6 月因“发现肺部阴影 1 月余”于上海市胸科医院就诊, CT 提示左肺上叶结节, 左侧胸膜及左侧胸壁多发结节, 转移可能, 考虑周围型肺癌。全麻下电视辅助胸腔镜手术 (VATS) 左上肺楔形切除+胸膜活检术, 术后病理提示 (左肺上叶楔切) 微乳头型浸润性腺癌, 伴实体型及乳头型成分, 大小 2.5 cm×2 cm×2 cm, 肿瘤侵犯层胸膜 (新发胸壁结节), 见癌转移, 基因检测提示 *EGFR* 和 *ALK* 均为野生型。2017 年 7 月术后予培美曲塞二钠+卡铂辅助化疗至 2019 年 11 月。2020 年 10 月行颈部淋巴结穿刺 (右锁骨上淋巴结穿刺活检): 转移性低分化腺癌, 肺源性, *TP53* 基因 (NM-000546.5) 5 号外显子错义突变, c.524G > A (p.R175H), 丰度: 18.29%, *SMAD4* 基因 (NM-005359.5) 6 号外显子无义突变, c.715C > T (p.Q239\*), 丰度: 17.44%。2020 年 11 月, 评估病情进展后予培美曲塞二钠+卡铂联合贝伐珠单抗靶向治疗至 2023 年 3 月。2023 年 2 月 24 日行头颅 MRI 增强检查, 诊断为脑内多发转移, 较前增大, 3 月予头颅放疗。4 月 8 日方案改为紫杉醇脂质体 240 mg + 卡铂 450 mg + 替雷利珠单抗 200 mg (百泽安, 广州百济神州生物制药有限公司, 批号不详) 方案治疗, 患者诉化疗后间断恶心、呕吐。5 月 5 日化验结果提示血淀粉酶 1141 U·L<sup>-1</sup> (参考值为 25 ~ 125 U·L<sup>-1</sup>), 暂停第二次免疫治疗。5 月 7 日患者

因“肺癌 6 余年, 恶心呕吐 20 余日”入我院治疗, 否认糖尿病、冠心病、高血压、脑梗死病史, 否认肝炎、结核、血吸虫等传染病史, 否认特殊食物药物过敏, 否认烟酒等嗜好。入院查体: 体温 36.8 °C, 脉搏 75 次·min<sup>-1</sup>, 呼吸 20 次·min<sup>-1</sup>, 血压 130/88 mmHg。巩膜及全身皮肤无黄染, 全腹无压痛, 无反跳痛, 无移动性浊音, 肠鸣音正常。入院诊断: 肺恶性肿瘤, P-T2aNxM1 IV 期, 呕吐待查。予雷贝拉唑钠肠溶胶囊抑酸治疗。

5 月 8 日, 入院生化报告结果提示血淀粉酶 802 U·L<sup>-1</sup>↑; 上腹部增强 CT 提示肠系膜根部及腹膜后多发淋巴结显示、部分肿大, 肝脏多发血管瘤, 肝脏及双肾多发囊肿, 右肾结石, 胆囊结石, 两肺散在纤维灶, 胰周无明显渗出、水肿表现。5 月 10 日无痛超声胃镜结果提示胰腺形态尚规则, 内部回声欠均匀, 可见花斑样改变, 胰管无明显扩张; 胆总管无扩张, 腔内未见异常回声; 肠系膜上动脉周围淋巴结显示。结合患者体征、既往史和个人史, 诊断为急性药物性胰腺炎, 轻症。患者既往因肺恶性肿瘤术后规律化疗, 临床药师考虑血淀粉酶升高为抗肿瘤药物所致, 加用胰酶肠溶胶囊抑制胰酶活性, 双歧杆菌三联活菌胶囊调节肠道菌群。5 月 11 日复查血淀粉酶未见明显下降 (776 U·L<sup>-1</sup>), 血常规、肝功能未见明显异常, 患者仍诉进食后恶心呕吐, 嘱患者禁食。次日停止口服药物, 予注射用艾司奥美拉唑钠抑酸治疗、注射用生长抑素抑制胰腺分泌、甲磺酸加贝酯注射液治疗胰腺炎、补液及营养支持治疗。5 月 14 日复查血淀粉酶 750 U·L<sup>-1</sup>↑, 白细胞介素 (IL) 45.25 pg·mL<sup>-1</sup> (参考值为 0 ~ 7 pg·mL<sup>-1</sup>), 患者仍有间断腹部不适, 伴恶心呕吐。患者及家属要求出院, 出院诊断: 肺恶性肿瘤, 急性药物性胰腺炎 (轻度)。6 月 2 日患者至中山医院就诊, 血淀粉酶 573 U·L<sup>-1</sup>↑, MRI 检查提示肠系膜根部及腹膜多发淋巴结, 胆囊小结石, 肝脏多发血管瘤, 肝脏及双肾多发囊肿, 胰腺所见无殊, 综合病史和影像学结果, 考虑免疫检查点抑制剂相关血淀粉酶升高, 暂无激素治疗指征, 建议无油饮食,

基金项目: 2018 年上海市临床药学重点专科建设项目 [No. 沪卫计药政 (2018) 9 号]。

作者简介: 谢杏梅, 女, 硕士研究生, 主管药师, 主要从事临床药学工作, email: m15026956267@163.com \*通信作者: 高悦, 女, 副主任药师, 主要从事临床药学及医院管理研究, email: gynjmu@163.com



停用替雷利珠单抗，予胰酶肠溶胶囊对症治疗。患者每月定期复查，淀粉酶变化情况见图 1。

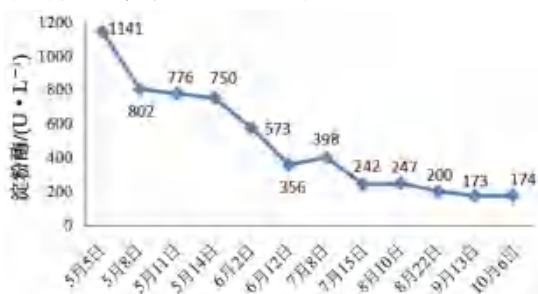


图 1 患者血淀粉酶变化情况

## 2 讨论

### 2.1 免疫相关性胰腺炎与免疫治疗的关联性评价

按照我国药品不良反应关联性评价标准<sup>[3]</sup>进行评价，患者于 2023 年 4 月 8 日调整治疗方案使用替雷利珠单抗联合紫杉醇脂质体和卡铂抗肿瘤治疗，5 月 5 日复查血淀粉酶异常升高且伴间断餐后恶心、呕吐等症状，5 月 10 日无痛超声胃镜提示胰腺炎性改变。替雷利珠单抗说明书中提到在接受替雷利珠单抗与化疗联合治疗的患者中，免疫相关性胰腺炎的发生率为 0.3%，时间在 0.6 ~ 2.1 个月，中位时间为 1.4 个月，本例患者发生的不良反应与说明书中提及的免疫相关性胰腺炎有合理的时间关系。目前，有免疫检查点抑制剂导致的免疫相关性胰腺炎的报道：许峰等<sup>[4]</sup>报道 1 例纳武利尤单抗治疗胃癌的免疫相关性胰腺炎，CT 提示胰头部局限性肿大伴血淀粉酶升高，予激素治疗后好转；周仕明等<sup>[5]</sup>报道 1 例帕博利珠单抗治疗肺癌的免疫相关性胰腺炎，CT 提示胰头及钩突周围脂肪间隙略模糊，有炎性渗出，磁共振胰胆管成像 (MRCP) 可见胰周脂肪间隙浑浊，血淀粉酶和脂肪酶升高，予激素治疗后好转；崔丽平等<sup>[6]</sup>报道 1 例信迪利单抗治疗腹膜上皮样型间皮瘤引起胰腺损伤，导致爆发性 1 型糖尿病，予胰岛素替代治疗后好转；马国伟等<sup>[7]</sup>报道 1 例卡瑞利珠单抗治疗肝癌导致的急性胰腺炎，MRI 提示胰腺实质水肿，胰周脂肪间隙少量渗液，血淀粉酶和脂肪酶升高，予激素治疗后好转。紫杉醇脂质体和卡铂联合使用发生该不良反应鲜有报道。患者停用替雷利珠单抗后复查血淀粉酶正常，无明显恶心、呕吐。经鉴别诊断，患者 CT 提示胆囊结石，但询问病史既往无胆囊炎发作史，且无痛超声提示胆总管无扩张，腔内未见异常回声，胆源性胰腺炎可能性小；患者肝肾功能、随机血糖正常，无高三酰甘油血症，无饮酒史；未曾进行过内镜逆行胰胆管造影术；发病前患者无不洁饮食史，肠鸣音及血常规正常，炎性肠病可能性小；停用替雷利珠单抗后未再发生免疫相关性胰腺炎。

综合分析，该患者使用替雷利珠单抗与其发生免疫相关性胰腺炎的关联性为“很可能”。

### 2.2 免疫相关性胰腺炎的分级和治疗

免疫治疗导致的免疫相关性胰腺炎的不良反应发生率不高，临床上一般对其进行鉴别诊断。诊断需要满足以下 3 项标准中的 2 项：急性发作的持续的严重的胃脘痛，并常放射到背部；血清脂肪酶/淀粉酶升高，至少高于正常值上限的 3 倍；B 超、CT 或者其他影像学检查出现典型的急性胰腺炎的特征性表现<sup>[8]</sup>。患者入院完善相关检查，血清淀粉酶高于正常值上限的 6 倍、无痛超声胃镜结果提示胰腺炎性改变，不伴有器官功能障碍及局部或全身并发症、无典型腹痛症状，本例患者急性胰腺炎诊断明确。免疫相关性胰腺毒性发病率低，引起典型胰腺炎的病例并不多见，一般病例出现淀粉酶和/或脂肪酶的升高，伴或不伴有腹部不适，影像学不一定有胰腺渗出的表现。相关指南和专家共识指出<sup>[8-10]</sup>：排除其他原因引起的淀粉酶/脂肪酶升高，如胆源性、高三酰甘油血症、内镜逆行胰胆管造影术、炎性肠病、肠梗阻、胃轻瘫、糖尿病等。无急性胰腺炎证据可继续免疫治疗；有急性胰腺炎证据，轻度急性胰腺炎按照急性胰腺炎诊治原则处理且可考虑暂停免疫治疗，中度/重度急性胰腺炎停止免疫治疗、使用激素治疗及按照急性胰腺炎诊疗规范对症治疗。该患者为轻度急性胰腺炎，对其停止使用替雷利珠单抗，并进行包括液体治疗、营养支持以及针对病因和并发症的对症治疗。该患者有恶心呕吐症状，通过检查淀粉酶并进行影像学检查考虑免疫治疗介导的轻度急性胰腺炎，对于这类胰腺炎患者，糖皮质激素的应用存在争议，糖皮质激素似乎不会影响 ICIs 诱导的胰腺损伤的结果；此外，接触不少于 10 mg·d<sup>-1</sup> 泼尼松当量会降低 ICIs 的抗肿瘤疗效，较未使用激素的肺癌患者缩短了其无进展生存期和总生存期，甚至还有可能促进机会性感染<sup>[11-15]</sup>。目前没有免疫相关性胰腺炎的死亡病例报道，根据替雷利珠单抗说明书中提及的临床试验研究：部分患者发生 3/4 级胰腺相关毒性未接受全身糖皮质激素治疗痊愈或缓解。故本例患者未接受激素治疗，出院后嘱其定期复查胰腺功能，密切检测血淀粉酶，患者胰腺功能正常，血淀粉酶无明显异常。

### 2.3 免疫相关性胰腺功能损伤的研究现状

ICIs 通过调节 T 细胞活化及增殖，激活抗肿瘤免疫反应实现肿瘤杀伤作用。ICIs 治疗是继手术、放疗、化疗和靶向治疗的又一重要治疗手段，随着 ICIs 的广泛应用，其 irAEs 发生率随之上升。目前，

ICIs 介导的相关性胰腺损伤的机制尚未明确, 存在的可能机制包括 ICIs 诱导 T 淋巴细胞过度活化, 不仅产生针对肿瘤抗原的特异性反应, 同时增加正常组织抗原的活性, 产生“靶向”副作用, 导致 irAEs<sup>[16]</sup>; T 淋巴细胞增加肿瘤和正常组织的抗原活性及浓度的同时, 可刺激炎症因子如干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、IL-17 和 IL-6 释放, 加剧对正常组织的伤害, 此外肿瘤微环境、免疫滤过器和肠道微生物群等可能也是 ICIs 产生的 irAEs 的潜在原因<sup>[17]</sup>。ICIs 在延长患者生存期的同时也会产生较多 irAEs, 可累及多种器官, 如肺、结肠、肝、肾、胰腺、皮肤和内分泌器官等, 其中诱导的胰腺毒性的临床症状和影像学表现为非特异性, 包括无症状性血淀粉酶、脂肪酶升高和急性胰腺炎<sup>[18]</sup>。目前, 我国有四款自主研发的 ICIs (信迪利单抗、卡瑞利珠单抗、特瑞普利单抗、替雷利珠单抗), 全部被纳入医保目录, 根据说明书提供的临床试验数据, 不同 ICIs 诱导的免疫相关性胰腺炎的发生率稍有差异, 信迪利单抗说明书中共 17 例发生胰腺炎、淀粉酶和 / 或脂肪酶升高, 占治疗人数的 3.1%; 卡瑞利珠单抗 14 例, 占治疗人数的 1.3%; 特瑞普利单抗 16 例, 占治疗人数的 2.7%。替雷利珠单抗单药治疗中有 7 例 (0.4%) 发生相关性胰腺炎, 其中 6 例发生 3 级淀粉酶 / 脂肪酶升高胰腺炎, 1 例发生 4 级淀粉酶升高, 7 例中 4 例未接受全身糖皮质激素治疗而痊愈; 本品联合化疗治疗患者中有 4 例 (0.3%) 发生相关性胰腺炎, 包括 3 例发生 3 级胰腺炎和 1 例发生 4 级胰腺炎, 无患者接受全身糖皮质激素治疗, 其中 2 例已缓解。免疫相关性胰腺炎总体发生率不高, 但复发率较高<sup>[19]</sup>, 因此需要提醒患者康复后进行规律随访, 建议每 6 个月对胰腺功能进行评估, 注意是否出现远期并发症。

### 3 小结

ICIs 是恶性肿瘤的新型免疫疗法, 具有显著的抗肿瘤效果, 但也会产生诸多不良反应。因此了解其引起的不良反应及治疗手段显得尤为重要。目前, 关于免疫相关性胰腺炎的危险因素及发病机制仍不清楚, 需要进一步研究以便做出准确的临床诊断并制订合理防治方案, 提高用药安全性。

### 参考文献

[1] 刘一, 刘青, 黄琳, 等. 程序性死亡受体 1 抑制剂——替雷利珠单抗 [J]. 临床药物治疗杂志, 2022, 20 (1): 37-42.  
 [2] Chen LP, Han X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future [J]. J Clin Invest, 2015, 125 (9): 3384-3391.  
 [3] 杨华, 魏晶, 王嘉仝, 等. 药品不良反应 / 事件报告评价

方法研究 [J]. 中国药物警戒, 2009, 6 (10): 581-584.  
 [4] 许峰, 沈珠, 陶宏, 等. 免疫检查点抑制剂纳武利尤单抗致免疫相关性胰腺炎不良反应一例 [J]. 中国医学科学院学报, 2023, 45 (2): 351-354.  
 [5] 周仕明, 黄勃, 唐红卫, 等. 程序性死亡受体 -1 抑制剂相关性胰腺炎: 1 例报道并文献复习 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2023, 32 (12): 1437-1440.  
 [6] 崔丽丽, 李贵星. PD-1 抑制剂导致免疫性胰腺炎所致暴发性 1 型糖尿病病例报道 [J]. 国际检验医学杂志, 2023, 44 (10): 1279-1280.  
 [7] 马国伟, 陈洁, 刘晖, 等. 卡瑞利珠单抗致晚期肝癌患者急性胰腺炎一例 [J]. 临床药物治疗杂志, 2023, 21 (7): 90-92.  
 [8] 中华医学会外科学分会胰腺外科学组. 中国急性胰腺炎诊治指南 (2021) [J]. 浙江实用医学, 2021, 26 (6): 511-519.  
 [9] 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 2022 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2022.  
 [10] 刘天舒, 余一祎, 艾罗燕, 等. 中国消化道肿瘤免疫治疗不良反应专家共识 (2023 年版) [J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2023, 9 (2): 26-60.  
 [11] Abu-Sbeih H, Tang TL, Lu Y, et al. Clinical characteristics and outcomes of immune checkpoint inhibitor-induced pancreatic injury [J]. J Immunother Cancer, 2019, 7 (1): 31-42.  
 [12] Brahmer JR, Lacchetti C, Schneider BJ, et al. Management of immune-related adverse events in patients treated with immune checkpoint inhibitor therapy: american society of clinical oncology clinical practice guideline [J]. J Clin Oncol, 2018, 36 (17): 1714-1768.  
 [13] 郭怀娟, 茅静贤, 王佳欣, 等. 糖皮质激素对免疫检查点抑制剂治疗非小细胞肺癌临床效果的影响 [J]. 实用临床医药杂志, 2023, 27 (1): 31-37.  
 [14] 吴侃, 杨邵瑜, 李鑫, 等. 晚期肺癌免疫检查点抑制剂治疗疗效影响因素分析 [J]. 实用肿瘤杂志, 2022, 37 (2): 138-145.  
 [15] Arbour KC, Mezquita L, Long N, et al. Impact of baseline steroids on efficacy of programmed cell death-1 and programmed death-ligand 1 blockade in patients with non-small-cell lung cancer [J]. J Clin Oncol, 2018, 36 (28): 2872-2878.  
 [16] Passat T, Toucheffeu Y, Gervois N, et al. Physiopathological mechanisms of immune-related adverse events induced by anti-CTLA-4, anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies in cancer treatment [J]. Bull Cancer, 2018, 105 (11): 1033-1041.  
 [17] Liu YH, Zang XY, Wang JC, et al. Diagnosis and management of immune related adverse events (irAEs) in cancer immunotherapy [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 120: 109437.  
 [18] 周彩存, 王洁, 王宝成, 等. 中国非小细胞肺癌免疫检查点抑制剂治疗专家共识 (2020 年版) [J]. 中国肺癌杂志, 2021, 24 (4): 217-235.  
 [19] Pollack MH, Betof A, Dearden H, et al. Safety of resuming anti-PD-1 in patients with immune-related adverse events (irAEs) during combined anti-CTLA-4 and anti-PD1 in metastatic melanoma [J]. Ann Oncol, 2018, 29 (1): 250-255.

(收稿日期: 2024-01-02; 修回日期: 2024-02-27)



# 雷公藤多苷片致脊髓亚急性联合变性 1 例

孙楠<sup>1</sup>, 庄伟<sup>2</sup>, 孔祥文<sup>3\*</sup> (1. 首都医科大学附属北京同仁医院门头沟医院药剂科, 北京 102300; 2. 首都医科大学宣武医院药学部, 北京 100053; 3. 北京中医药大学第三附属医院药学部, 北京 100029)

**关键词:** 亚急性联合变性; 雷公藤多苷片; 维生素 B<sub>12</sub>

**中图分类号:** R969.3

**文献标识码:** B

**文章编号:** 1672-2981(2024)08-2258-03

**doi:** 10.7539/j.issn.1672-2981.2024.08.050

雷公藤多苷片是雷公藤根茎提取物<sup>[1]</sup>, 其主要生物活性成分如雷公藤内酯醇、雷公藤内酯二醇、雷公藤内酯酮和生物碱具有多种信号通路活性。临床试验(NCT01613079)显示其在类风湿关节炎的治疗中具有显著的效果<sup>[2]</sup>。由于雷公藤具有多种药理活性, 它已被用于治疗类风湿关节炎、癌症、克罗恩病和获得性免疫缺陷综合征(AIDS)。近年来, 雷公藤多苷片已被用于肾脏疾病的治疗, 并能显著降低蛋白尿和保护肾功能, 在临床上显示出更多的应用潜力<sup>[3]</sup>。然而, 雷公藤多苷片存在诸多不良反应如胃肠不适、腹泻、生殖毒性、肾毒性、肝毒性、骨髓抑制与血液循环系统相关问题<sup>[4]</sup>, 尤其是肝损伤, 使其在临床的应用受到一定的限制。

由于雷公藤的有效剂量和毒性剂量十分接近<sup>[5]</sup>, 且其通过与毒性反应相同的机制发挥治疗作用, 如诱导细胞凋亡、氧化应激和释放乳酸脱氢酶等<sup>[6]</sup>, 因此雷公藤制剂在临床上的应用常受到安全性的限制。Zhang 等<sup>[7]</sup>的 Meta 分析显示, 雷公藤多苷的不良反应主要集中在胃肠道症状(13.3%)、不良生殖结局(11.7%)、不良皮肤反应(7.8%)、血液学事件和心血管事件(6.5%)几个方面。雷公藤多苷导致肝损伤的相关报道较多, 且其对于肝脏的毒性作用与用药时间和剂量具有相关性<sup>[8]</sup>, 而其对物质吸收代谢影响的报道鲜少。本文报道了 1 例疑似长期服用雷公藤多苷片导致的维生素 B<sub>12</sub> 吸收代谢障碍, 继而诱发亚急性联合变性的案例。

## 1 病历摘要

患者男, 63 岁, 因进行性双手麻木无力 2 月余, 伴颈部疼痛 1 个月, 双下肢力弱半个月, 于 2022 年 2 月 26 日入住首都医科大学宣武医院。患者 2 个月前(约 2021 年 12 月)无明显诱因出现双手麻木感, 主要表现为左手食指、中指、无名指、小指掌面和右手四指末端指节掌面, 起初不伴有

四肢无力, 无头痛、头晕; 麻木症状呈持续性并逐渐进展至左手整个掌面、右手四指掌面及手掌尺侧面, 同时逐渐出现双手无力感, 表现为持重物力弱, 双手精细触觉减弱, 不能通过触摸辨别出物体的性质及纹理, 温度觉减弱, 自觉双手较前怕冷、手指发凉; 麻木症状在较热的环境下加重, 经甩手或活动上肢后减轻; 1 个月前, 患者自觉间断性颈后疼痛感, 颈部活动不受限, 无颈部僵硬感, 经休息可缓解; 半个月前, 患者在活动中自觉双下肢发软力弱, 活动耐力较前减低, 必须停下来休息才能缓解, 偶有步态不稳, 脚底踩棉花感。患者于外院治疗, 查颈部 MRI 提示颈 2~6 椎间盘突出伴髓内后索异常信号, 患者选择保守治疗, 服用舒筋活血药物未能改善麻木症状, 贴敷膏药可缓解颈部疼痛, 具体药物名称不详。此次入院为求进一步治疗。

患者日常饮食正常, 无特殊饮食习惯。既往有高血压病史 20 余年, 最高可达 160/90 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa), 联合服用降压药硝苯地平控释片 30 mg qd 和缬沙坦胶囊 80 mg qd, 血压控制良好; 2 型糖尿病 10 余年, 空腹血糖 13~16 mmol·L<sup>-1</sup>, 使用门冬胰岛素 30 注射液早晚各 12 IU 降糖治疗, 未监测血糖; 10 余年前因尿潜血阳性发现肾小球肾炎, 经肾活检诊断为 IgA 肾炎, 服用中药制剂雷公藤多苷片 10 mg bid 治疗。无食物及药物过敏史, 有家族性高血压病史, 吸烟饮酒史 20 余年, 吸烟每日约 70 支, 饮酒每日约 100 mL, 已戒烟戒酒 10 余年。

入院体格检查: 体温 36.1℃, 脉搏 78 次·min<sup>-1</sup>, 呼吸 18 次·min<sup>-1</sup>, 血压 138/87 mmHg。记忆力轻度下降, 右侧瞳孔光反射迟钝(系既往外伤遗留); 左上肢远端肌力 5 级, 右下肢远端肌力 5 级, 左侧腱反射减低(-), 右侧腱反射消失, 双侧踝反射未引出, 病理征阴性; 双手掌面针刺觉、温度

**基金项目:** 北京市第三批中药骨干人才培养(京中医科学[2021]161号)。

**作者简介:** 孙楠, 女, 硕士, 主管药师, 主要从事中西医结合临床药学研究, email: nan\_sun07@126.com \*通信作者: 孔祥文, 女, 主任药师, 主要从事医院药学管理及临床药学研究工作, email: gongboran@sina.com



觉减低,左侧为著,左下肢音叉振动觉减低。余未见异常。颈部 MRI 提示颈 2~6 椎间盘突出伴髓内后索异常信号(见图 1)。查血清维生素 B<sub>12</sub> 和叶酸含量,维生素 B<sub>12</sub> 含量 103.00 pg·mL<sup>-1</sup>(正常范围 180.0~914.0 pg·mL<sup>-1</sup>),叶酸含量 20.88 ng·mL<sup>-1</sup>(正常范围 3.1~19.9 ng·mL<sup>-1</sup>),其余指标无特殊异常。考虑患者的肢体麻木症状由维生素 B<sub>12</sub> 缺乏导致的可能性大,诊断为“脊髓亚急性联合变性(SCD)病可能性大”。为改善患者肢体麻木,精细触觉减弱等症状,给予甲钴胺注射液 500 μg 和维生素 B<sub>1</sub> 注射液 0.1 g 肌内注射,叶酸片 5 mg po,均 1 次·d<sup>-1</sup>,以营养神经,改善神经功能。3 月 1 日临床药师查房,询问患者服药后改善情况,患者自述用药后肢体麻木的症状有所改善,精细触觉有所恢复,对物品性质的触觉有所改善,痛觉减退,左侧显著。3 月 7 日,患者双手麻木感较前明显改善,麻木范围缩小,实体觉改善,痛觉减退改善,查体可见深浅感觉较前改善明显。血清维生素 B<sub>12</sub> 水平显著升高,超过 1500 pg·mL<sup>-1</sup>,叶酸 21.25 ng·mL<sup>-1</sup>;颈椎 MRI 显示颈 2~5 水平脊髓条状异常信号(见图 1)。患者症状改善明显,建议出院后坚持肌内注射甲钴胺注射液,口服维生素 B<sub>1</sub> 片和叶酸片 2 周,2 周后门诊复诊。

根据信息推断,SCD 可能与患者长期服用雷公藤多苷片有关。根据国家不良反应监测中心关联性评价方法,结合患者血常规指标及用药情况,包括:①患者在长期服用雷公藤多苷片后出现 SCD 症状,维生素 B<sub>12</sub> 缺乏需要一定的时间积累,因此存在一定程度的时间相关性;②雷公藤多苷片常见的不良反应为消化系统反应和肝损伤,两者均与物质的吸收代谢密切相关,可能会导致某些代谢性疾病的发生,但说明书中并未明确提示有与维生素 B<sub>12</sub> 代谢相关的不良反应;③未停用药物,因患者的治疗需要,未停用雷公藤多苷片,仅通过大量补充维生素 B<sub>12</sub> 进行治疗,治疗效果明显;④未停用药物,故无再次使用方面的评价;⑤患者既往用药史中使用的药物,均未查到代谢方面相关的不良反应,相关性不大,患者基础疾病控制良好,本次治疗前无其他神经系统相关疾病。患者前后两次 MRI 结果对比显示,干预前(2 月 26 日),出现 SCD 的患者在矢状面(a)图像上显示出涉及颈脊髓后部的高信号,在轴向截面(b,箭头)上显示出倒置的 V 征;干预后(3 月 7 日),矢状面(c)图像上颈脊髓后部的高信号和轴切面(d,箭头)上倒 V 征均消失(见图 1)。

## 2 讨论

SCD 是由维生素 B<sub>12</sub> 缺乏引起的神经系统变性

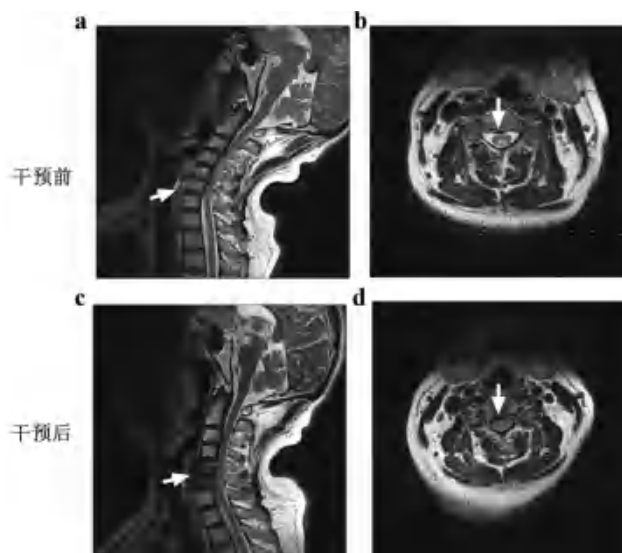


图 1 患者干预前和干预后两次 MRI 结果对比

疾病,病变主要累及脊髓的后索、侧索及周围神经,严重时大脑白质和视神经也可受累<sup>[9]</sup>。在体内维生素 B<sub>12</sub> 有 3 种形式的辅助因子,分别作为辅酶参与叶酸(一碳单位)和丙酸(三羧酸循环)的代谢<sup>[10]</sup>。1981 年,Scott 等<sup>[11]</sup>研究发现补充甲硫氨酸可以有效防止暴露在 N<sub>2</sub>O 中的猴子出现 SCD,这也证明了维生素 B<sub>12</sub> 缺乏导致的神经缺陷是由甲基化反应受损所致。现在的研究认为在神经系统中起作用的主要是甲基维生素 B<sub>12</sub>(Me B<sub>12</sub>)和腺苷维生素 B<sub>12</sub>(Ado B<sub>12</sub>),引起 Me B<sub>12</sub> 和 Ado B<sub>12</sub> 合成和利用障碍及影响其依赖酶活性的各种因素,都可能引起 SCD<sup>[12]</sup>。

可能导致维生素 B<sub>12</sub> 缺乏的主要原因有先天性维生素 B<sub>12</sub> 代谢步骤的障碍,基因缺陷,长期素食导致的摄入不足,消化系统疾病导致的获得性吸收不良以及药物导致的维生素 B<sub>12</sub> 缺乏等,后 3 种类型导致的相关疾病通过补充维生素 B<sub>12</sub> 可以快速有效地缓解。人体储存的维生素 B<sub>12</sub> 2~5 mg,每日丢失 0.1%~0.2%,发生明显的缺乏需要 3~6 年的时间<sup>[13]</sup>。

本例患者膳食均衡,无特殊饮食习惯,无消化系统病史,基因检测结果无明显缺陷,却出现维生素 B<sub>12</sub> 缺乏情况,并发生 SCD。综合患者既往用药史分析,认为很可能是雷公藤多苷片导致的,长期服用雷公藤多苷片对消化系统造成影响,导致维生素 B<sub>12</sub> 吸收障碍,继而出现相关症状。

雷公藤多苷是从卫矛科植物雷公藤的根茎中提取精制而成的一种脂溶性混合物,其药理活性由多种成分(二萜内酯、生物碱、三萜等)协同产生,具有抗炎、免疫抑制或免疫调节、抗肿瘤及抗菌等多种作用,对类风湿关节炎、肾小球肾炎、系

统性红斑狼疮等多种自身免疫性疾病具有独特疗效。现代研究显示,雷公藤多苷对于肾病综合征、IgA 肾病、慢性肾小球肾炎均具有显著疗效<sup>[3]</sup>,但与之伴随的是雷公藤制剂频发的不良反应。雷公藤及其制剂具有明显的消化系统毒性,主要表现为转氨酶升高、恶心、腹泻、肝功能异常等不良反应,且发生率均较高<sup>[7]</sup>。临床研究显示,雷公藤多苷对多种代谢通路均会产生一定的影响,主要是脂质代谢通路<sup>[14-15]</sup>、三羧酸循环<sup>[16]</sup>和消化吸收通路<sup>[17]</sup>。高剂量的雷公藤多苷会引起一个时间依赖性的毒性作用,比如代谢调节网络中包括的能量代谢紊乱、氨基酸和胆碱代谢通路的作用增强以及肠道菌群结构的改变等<sup>[18]</sup>。雷公藤多苷对 NIH 小鼠、SD 大鼠的消化道系统均具有明显的毒性作用,毒性反应具有明显的剂量-反应关系,长期服用雷公藤多苷可能导致胃肠黏膜结构被破坏,导致吸收障碍,且雷公藤对于消化系统的毒性作用与机体的状态相关,其对于正常和免疫亢进大鼠的作用机制略有差别<sup>[19]</sup>。雷公藤多苷对消化道结构及菌群的影响,可能是其导致吸收障碍,进而出现维生素 B<sub>12</sub> 缺乏,患者出现 SCD 的机制之一。代谢组学研究显示,长期大剂量服用雷公藤多苷片后,大鼠尿液中的氨基酸含量显著升高,如亮氨酸、赖氨酸、乙酰基甜菜碱、酪氨酸和谷氨酰胺等<sup>[16]</sup>。这一结果说明雷公藤多苷对氨基酸的代谢通路具有显著的增强作用,这也是雷公藤多苷片可能导致 SCD 的可能因素之一。因为维生素 B<sub>12</sub> 作为甲硫氨酸代谢通路中的关键辅酶,与氨基酸的代谢通路密切相关,氨基酸代谢通路的作用增强,可能导致代谢通路中的辅酶大量消耗,维生素 B<sub>12</sub> 消耗量增加,血清中维生素 B<sub>12</sub> 含量下降,机体储存维生素 B<sub>12</sub> 不足,最终导致患者出现 SCD。

### 3 结论

本文报道了 1 例长期服用雷公藤多苷片治疗 IgA 肾病,导致维生素 B<sub>12</sub> 吸收代谢障碍,进而诱发 SCD 的案例,该病例提示我们雷公藤多苷片对于消化系统的毒性作用可能不仅局限于恶心、呕吐、转氨酶升高等方面,其对物质的吸收代谢也可能存在一定的影响,雷公藤多苷的长期服用可能有诱发代谢性疾病的风险,应引起临床关注。

### 参考文献

[1] Zhang Y, Jiang ZZ, Xue M, et al. Toxicogenomic analysis of the gene expression changes in rat liver after a 28-day oral Tripterygium wilfordii multiglycoside exposure [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 141 (1): 170-177.  
[2] Lv QW, Zhang W, Shi Q, et al. Comparison of Tripterygium

wilfordii Hook F with methotrexate in the treatment of active rheumatoid arthritis (TRIFRA): a randomised, controlled clinical trial [J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74 (6): 1078-1086.  
[3] Wang D, Zhao XH, Cui Y, et al. Efficacy and safety of Tripterygium wilfordii Hook F for CKD in mainland China: a systematic review and meta-analysis [J]. *Phytother Res*, 2018, 32 (3): 436-451.  
[4] 李艳,任超,邹洋,等.雷公藤多苷药理毒理作用研究进展 [J]. *品牌与标准化*, 2023 (4): 97-99.  
[5] Li XJ, Jiang ZZ, Zhang LY. Triptolide: progress on research in pharmacodynamics and toxicology [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014b, 155: 67-79.  
[6] Fan D, Parhira S, Zhu GY, et al. Triterpenoids from the stems of Tripterygium regelii [J]. *Fitoterapia*, 2016, 113: 69-73.  
[7] Zhang C, Sun PP, Guo HT, et al. Safety Profiles of Tripterygium wilfordii Hook F: a systematic review and meta-analysis [J]. *Front Pharmacol*, 2016, 7: 402.  
[8] 李红刚,纪伟,苏建明,等.雷公藤多苷片的肝毒性及增效减毒的文献研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2012, 32 (3): 415-418.  
[9] 陈莹,陈牧野,吴梦倩,等.脊髓亚急性联合变性的临床特征分析 [J]. *中国卫生标准管理*, 2022, 13 (11): 48-51.  
[10] Smith AD, Warren MJ, Refsum H. Vitamin B<sub>12</sub> [J]. *Adv Food Nutr Res*, 2018, 83: 215-279.  
[11] Scott JM, Dinn JJ, Wilson P, et al. Pathogenesis of subacute combined degeneration: a result of methyl group deficiency [J]. *Lancet*, 1981, 318 (8242): 334-337.  
[12] Xiao CP, Ren CP, Cheng JL, et al. Conventional MRI for diagnosis of subacute combined degeneration (SCD) of the spinal cord due to vitamin B<sub>12</sub> deficiency [J]. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2016, 25 (1): 34-38.  
[13] Alesia Hunt. 维生素 B<sub>12</sub> 缺乏 [J]. *英国医学杂志 (中文版)*, 2015, (3): 156-163.  
[14] 罗岚,江振洲,张陆勇.雷公藤多苷肝毒性发生机制及减毒相关研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2017, 40 (10): 1504-1509.  
[15] Ma ZJ, Zhang XN, Li L, et al. Tripterygium glycosides tablet ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis via the Toll-like receptor 4/nuclear factor kappa B signaling pathway in high-fat diet fed and streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *J Diabetes Res*, 2015: 390428.  
[16] Su MX, Gao X, Song M, et al. Study on influence of glucoside Tripterygium total tablets on metabolism in rats by NMR metabonomic technique [J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2011, 36 (11): 1449-53.  
[17] 杨威,黄远铿,雷夏凌,等.雷公藤多苷对消化道的毒性研究 [A]/中国毒理学会第七次全国毒理学大会暨第八届湖北科技论坛论文集 [C]. 2015.  
[18] 陈殊,刘莉,蒋红霞,等.雷公藤药理与毒理机制代谢组学研究进展 [J]. *海峡药学*, 2022, 34 (2): 1-6.  
[19] Li J, Lu Y, Xiao CJ, et al. Comparison of toxic reaction of Tripterygium wilfordii multiglycoside in normal and adjuvant arthritic rats [J]. *Ethnopharmacol*, 2011, 135 (2): 270-277.

(收稿日期: 2024-01-30; 修回日期: 2024-03-15)